

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630191

研究課題名(和文) コラーゲンに着目した超音波骨質評価法の開発

研究課題名(英文) Ultrasonic evaluation of bone quality focusing on the collagen

研究代表者

松川 真美 (Matsukawa, Mami)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：60288602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：AGEs架橋を生成した骨試料中の音速評価から、架橋が骨の弾性的性質に及ぼす影響を実験的に検討した。大型動物の皮質骨試料では架橋生成により音速の低下が確認された。今回用いた光散乱法によるGHz域の音速測定は、8μm径程度の局所領域の測定であり、骨マトリクスの評価が可能となる。得られた結果から、骨のマトリクスの弾性がAGEs架橋生成により低下した可能性が見いだされた。板状試料全体の平均音速を評価するMHz域の音速測定では、音速の精密な測定が困難であった。しかし、培養後の試料の強度を三点曲げ試験で評価したところ、AGEs生成試料は明らかに低強度を示した。

研究成果の概要(英文)：The effects of AGEs crosslinks on the bone elastic properties were measured as ultrasonic wave velocity changes. In the cortical bone samples of large animals, the wave velocity decreased due to the crosslinks. The wave velocity in the GHz range was measured by a Brillouin scattering technique which enables the evaluation of the small area (8 micrometer in diameter) of the bone matrix. The velocity decreases then indicates the decreases of bone matrix elasticity. The measurement of wave velocity in the MHz range was difficult. However, the three point bending test showed that the bone strength also decreased due to the crosslinks.

研究分野：電気電子計測

キーワード：超音波 骨 AGEs

1. 研究開始当初の背景

現在の骨評価は X 線法による骨密度（骨ミネラル量）の測定が主流であるが、近年、十分な骨密度があっても、骨折するケースが報告されている。このため米国 NIH (National Institute of Health) は骨強度を規定する因子として「骨質」を提唱した。骨質は骨中のコラーゲン架橋やマイクロダメージ、石灰化度、骨代謝回転など様々な影響を含む。実際、老化や 2 型糖尿病ではコラーゲン架橋異常と骨強度の関連が議論されており、疾病・老化による後期糖化反応生成物（advanced glycation end products: AGEs）の影響が指摘されている。この AGEs 架橋により骨は脆性が高まる。つまり粘弾性的性質が変化すると考えられる。

このため、骨の粘弾性的性質を非破壊・非接触で評価する手法の開発が望まれる。特に将来的には臨床計測に応用可能である技術が望ましい。このため、被曝もなく、繰り返し骨の粘弾性に関する性質（伝搬速度や伝搬減衰）を測定できる超音波法による評価手法の開発が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨組織の粘弾性を定量的に測定し、疾病により劣化したコラーゲンなどの「骨質」を安全に評価する超音波技術の開発である。非接触粘弾性評価手法として、ミクロあるいはマクロなレベルで骨組織中の超音波伝搬特性測定技術を確立する。特に骨組織中のコラーゲンの架橋異常など、疾病や老化により生じる骨脆弱性を骨の音波伝搬特性の変化として評価する手法を提案する。

3. 研究の方法

上記の研究を達成するため、大型動物（ウシ、ブタ）の皮質骨中に人工的に AGEs 架橋を生成し、架橋による音速変化を実験的に検討した。用いた計測手法は下記の通りである。

(1) Brillouin 光散乱計測（GHz 帯域）

(2) パルス超音波計測（MHz 帯域）

また、骨中に生成した架橋は液体クロマトグラフのアミノ酸分析（HPLC）システムを用いて評価した。

音速は媒質の弾性を反映するため、音速測定により弾性変化を評価することが可能となる。

4. 研究成果

(1) 試料作成

光散乱測定を行うため、健康ウシ左大腿骨より皮質骨を切り出し、骨軸方向と半径方向を含む平面で試料(10×10 mm²)を作成した。この試料の作成の際、アクリルによる包埋をせず、研磨の工夫により約 70 μm の薄膜試料

とすることに成功した。試料は複数枚作成し、AGEs 培養用あるいは参照用とした。

また、MHz 域の超音波測定を行うため、ブタ大腿骨骨幹部から、長手方向が骨軸方向に沿ったプレート状(20×5×0.5 mm³)の試料を複数枚作製した。

これらの作成した試料のうち AGEs 架橋を培養するものについては、生理食塩水(PBS)を 4 ml、D(-)-Ribose を 0.12 g、Protease Inhibitor Cocktail Set III を 4 μl、Penicillin-Streptomycin を 40 μl の割合で調整した溶液に浸し 37 °C の恒温槽中で培養した。比較参照用試料では PBS 4 ml に Penicillin-Streptomycin 40 μl を入れた溶液に浸して培養した。骨の劣化を考慮し培養期間は二週間とした。

試料中の AGEs 架橋の形成を確認するために、HPLC システムを用いて、培養前後におけるコラーゲン架橋の量を調べたところ、全ての試料において、培養前に比べ培養後の架橋量が 2-3 倍に増加したことを確認した。参照用試料中の架橋量は培養前と同程度であった。

(2) GHz および MHz 域の音速測定手法

骨の局所領域の弾性を評価するため、Brillouin 光散乱法を用いて音速の測定を試みた。図 1 に測定システムの概略を示す。固体レーザー (Spectra-Physics, 波長 532 nm) から発振された励起光は、ラマン用顕微システム (フォトンデザイン) を用いてスポット径約 8 μm まで集束され、試料表面に照射された。散乱光はマルチパス干渉計 (JRS 社) を用いて分光され、フォトマル (浜松ホトニクス) で受光ののち周波数スペクトルとしてコンピュータに記録された。なお、今回の薄膜状の骨測定では、Reflection Induced ΘA (RIOA) 散乱配置を用いた。この散乱配置では薄膜試料の面内方向音速を測定できる。

各薄片試料中の 9 点で音速を測定したところ、値のばらつきは 1 % 程度と比較的小さかった、このためこれらの音速平均値をその試料の光散乱測定による音速とした。

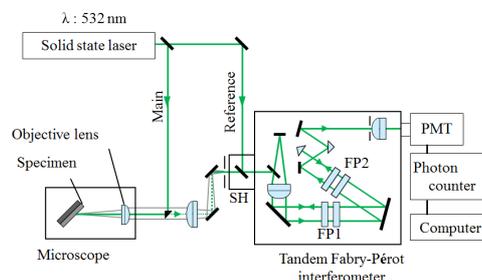


図 1 Brillouin 光散乱測定システム概略

MHz 域の音速測定では、脱気水中に設置した超音波送受波器（直径 10 mm）間にプレート状試料を設置し、長手方向に伝搬する超音波の伝搬時間を計測し、音速を算出した。使用した超音波パルスは 1MHz の正弦波 1 波あ

るいは2波で、その最大音圧は数 kPa と小さい。実験では脱気水の温度を常時測定し、水中の超音波伝搬速度の変化を補正することで、試料中の音速測定の確度を確保した。

(3) AGEs 架橋生成の効果

Brillouin 光散乱測定で得られたスペクトルを図2に示す。左右対称に現れる Brillouin 成分のうち、内側のピークが面内方向に伝搬する音波による散乱によるものである。Brillouin 光散乱法は透明材料中の音速測定に使用され、骨のような不透明材料の計測は難しい。しかし、今回のように十分薄い試料ではピークが観測され、測定可能であることが確認できた。

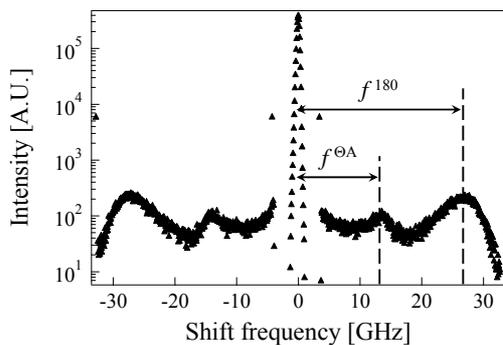


図2 骨試料からの光散乱スペクトル f^{180} は後方散乱ピークで本研究では使用していない。

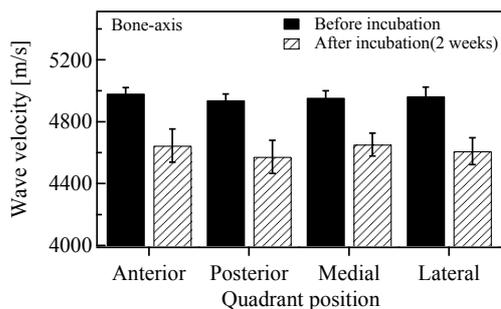


図3 AGEs 架橋生成試料の培養前後の各部位での音速変化（骨軸方向音速）

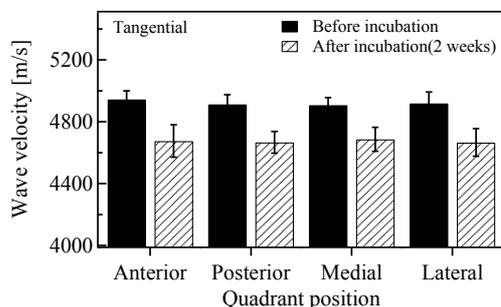


図4 AGEs 架橋生成試料の培養前後の各部位での音速変化（円周方向音速）

図3および4に培養前後の骨軸方向と円周方向の音速測定結果を示す。大腿骨の前後左右どの部位においても、二週間の培養前後で縦波音速が有意に低下した(6.1%-7.4%, $p < 0.01$)。円周方向の音速低下が顕著であった。ただし、このような音速低下は、参照用試料では観測されなかった。

これらの結果から、AGEs 架橋形成の促進により、骨の音速、すなわち弾性が低下した可能性が見いだされた。図5は plexiform 構造をもつ外側部と haversian 構造をもつ後方部それぞれで、骨軸方向、円周方向の音速がともに架橋の進行に応じて低下したことを示す。興味深いことに多くの場合、培養初期にわずかに音速が上昇した後、低下に転ずる傾向を示した。なお、市販のコラーゲンフィルムを用いて同様な検討をおこなったところ、図6のように AGEs 架橋による音速低下が観測された。従ってこの低下はコラーゲンの変化によることが確認できた。

プレート状試料をもちいた MHz 域の超音波測定においても AGEs 架橋生成の影響を確認した。AGEs 架橋を十分に生成するためには、培養溶液が浸透するように、試料が十分に薄い必要がある。しかし、試料厚さが小さいと、透過音波の振幅が低下し、音速の精密測定が困難となる。今回の測定では、音速測定誤差が1%程度であったが、すべての AGEs 架橋試料、比較参照試料で有意に音速が低下し、特に AGEs 架橋を生成した試料で著しかった。また AGEs 架橋を生成した試料の一枚において、光散乱の場合と同様に初期の音速上昇とその後の低下が観測された。なお培養後のプレート状試料の強度を3点曲げ試験で評価したところ、AGEs 架橋を生成した試料

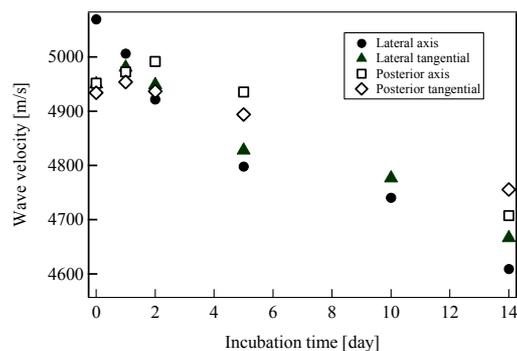


図5 培養日数による AGEs 架橋生成骨試料中の音速変化

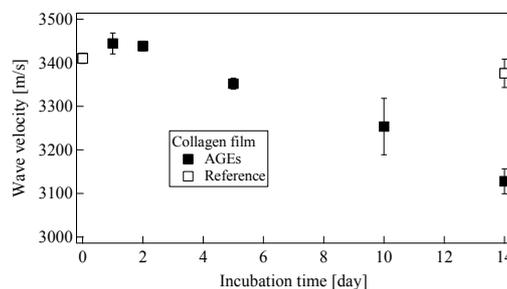


図6 培養日数によるコラーゲンフィルム試料中の音速変化

が低負荷で降伏に至り、強度が低下したことを確認した。

(4)まとめ

GHz 域および MHz 域の音速測定法をもちいて、AGEs 架橋を生成した骨試料中の音速を評価した。架橋生成により GHz 域では明確に音速（弾性）の低下が確認された。光散乱を用いた GHz 域の骨中音速測定は、 $8\mu\text{m}$ 径程度の局所領域の測定であり、微細構造の影響を避けて骨マトリクスの評価が可能となる。得られた結果から、骨のマトリクスの弾性が AGEs 架橋生成により低下した可能性が見いだされた。また試料全体を評価する MHz 域の音速測定では、音速の精密な測定が困難であったが、培養後の試料の強度を評価したところ、AGEs 生成試料が明らかに低強度を示した。

AGEs 架橋の生成はコラーゲンの粘弾性的性質に影響を与える。老化や糖尿病では骨密度が高いにも関わらず、骨折がみられる例が報告されている。今回の研究結果は、コラーゲンの変化による骨中音速（弾性）の低下を示している。一般に材質の弾性低下は強度低下にも関連することから、音波物性的にもこれらの疾病による骨折がコラーゲンの劣化による可能性を示唆している。

超音波法はすでに臨床の分野で骨粗鬆症診断などに使用されている。今回の研究成果は、疾病による骨質劣化が超音波法により評価可能であることを示しており、将来的には臨床研究にもつながる成果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Toshiho Hata, Yoshiki Nagatani, Mami Matsukawa, “Simulation study on the axial ultrasonic wave propagation in heterogeneous bovine cortical bone”, Journal of the acoustical society of America, submitted.

2) 松川真美 “超音波法による骨質評価”, Clinical Calcium, Vol.26, pp.57-64 査読無 (2016).

3) Yuki Imoto, Ryo Tsubota, Masahiko Kawabe, Mitsuru Saito, Mami Matsukawa, “Effects of abnormal collagen crosslinks on the hypersonic longitudinal wave velocity in bovine cortical bone”, Glycative Stress Research, Vol. 2, pp.101-107, Reviewed, (2015).

4) 井本有紀, 高柳真司, 齋藤充, 丸毛啓史, 松川真美, “顕微 Brillouin 散乱法を用いた皮質骨中の音速測定”, 電子情報通信学会技術研究報告, US2015-53, pp.43-46 査読無(2015).

5) Mami Matsukawa, Ryo Tsubota, Masahiko Kawabe, Kenji Fukui, “Application of a micro-Brillouin scattering technique to characterize bone in the GHz range”, Ultrasonics, Vol.45, pp.1155-1161, Reviewed, (2014). DOI: 10.1016/j.ultras.2013.09.016

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 井本有紀, 高柳真司, 太田哲男, 松川真美, “骨中のコラーゲン架橋が音速異方性に与える影響”, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会, (2016.3.19, 大岡山, 東京工業大学)

2) Y. Imoto, S.Takayanagi, M.Saito, K. Marumo, M. Matsukawa, “Hypersonic wave velocity in drying collagen film with AGE crosslinks”, 2015 IEEE International Ultrasonics Symposium, (2015.10.22, Taipei Taiwan).

3) 井本有紀, 高柳真司, 齋藤充, 丸毛啓史, 松川真美, “顕微 Brillouin 散乱法を用いた皮質骨中の音速測定”, 電子情報通信学会超音波研究会, (2015.9.4, 登別, 第一滝本館)

4) T. Hata, Y. Nagatani, M. Matsukawa, “FDTD simulations of ultrasonic wave propagation in the cortical bone with heterogeneity”, 169th meeting of the acoustical society of America (2015.5.19, Pittsburgh, USA)

5) 井本有紀, 常田裕子, 高柳真司, 松川真美, “骨中の水分が超高周波音速に与える影響”, 第 35 回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム, (2014.12.3, 御茶ノ水, 明治大学)

6) Y. Imoto, M. Matsukawa, R.Tsubota, “Evaluation of anisotropy in cortical bone by micro-Brillouin scattering”, 2014 IEEE International Ultrasonics Symposium, (2014.9.4, Chicago USA)

6. 研究組織

(1)研究代表者
松川 真美 (MATSUKAWA MAMI)
同志社大学・理工学部・教授
研究者番号：60288602

(2)研究分担者
齋藤 充 (SAITO MITSURU)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50301528

(3)連携研究者
長谷 芳樹 (NAGATANI YOSHIKI)
神戸市立工業高等専門学校・准教授
研究者番号：60448769