

博士學位論文要旨等の公表

学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条に基づき、当該博士の学位の授与に係る論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

氏名 伊藤 哲平

学位の種類 博士（理工学）

報告番号 甲第21号

学位授与の要件 学位規程第4条第2項該当

学位授与年月日 平成30年3月17日

学位論文題目

「赤外イメージング・赤外二色性イメージングによる新規骨形態計測法の開発と慢性腎臓病の病態解析」

論文審査委員 主査 教授 木村-須田 廣美

委員 教授 下村 政嗣

委員 教授 大越 研人

学 位 論 文 要 旨

光科学研究科 光科学専攻

学籍番号：D2150010

氏 名： 伊藤 哲平

赤外イメージング・赤外二色性イメージングによる新規骨形態計測法の開発と慢性腎臓病の病態解析

【 研究背景 】

骨の健康指標である骨強度は、原発性骨粗鬆症や骨軟化症など骨疾患の他、糖尿病、高血圧、慢性腎臓病に伴うミネラル代謝異常により低下することが知られている。骨強度の評価は骨密度を計測することが最も有用な手段であると考えられていたが、2001年 NIH Consensus Conferenceにおいて、「骨強度には骨密度が70%と骨質(構造特性・材質特性)が30%程度反映される」と定義されてからは、骨質に関する基礎研究が盛んに行われるようになり、従来は材料解析に用いられてきた機器分析を採用した骨質評価法が注目されるようになった。我々はこれまで赤外イメージングやラマンイメージングを用いた骨質解析を行ってきた。しかしながら、得られた骨質データは必ずしも骨強度と強い相関関係にはなく、骨質の新規計測・解析法の開発が課題となった。そこで本研究では、骨成分であるコラーゲン線維と骨アパタイト(主にヒドロキシアパタイト)の配向性に着目し、赤外二色性イメージングによるコラーゲン線維と骨アパタイトの配向性評価法の開発および従来法と配向性評価法を駆使した慢性腎臓病(CKD)モデルラットの病態解析を行った。また、試料調整によって生じる骨の変性を最小限に留め、調整時間短縮と低コストを目的とした凍結切片作製法の開発も行った。

【 動物および実験方法 】

赤外二色性イメージングによるコラーゲン線維と骨アパタイトの配向性評価法の開発では、生後16日と6、12、33週齢の雄SDラットの大腿骨を用い、週齢に伴う骨アパタイトとコラーゲン線維配向性の変化について検討した。安楽死後に摘出した大腿骨は、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)による包埋を施し、3 μm の薄切片にした。赤外二色性イメージングでは、赤外イメージング装置に偏光子設置し、回転角 0° と 90° で各薄切片を透過法と反射法で測定した。コラーゲン線維と骨アパタイトの配向性は、それぞれアミドIとリン酸の赤外吸収バンドを使った赤外二色性イメージングから得た。また、赤外イメージングにより、石灰化度、炭酸塩含有率、結晶化度、結晶成熟度も求めた。

CKDの病態解析では、7週齢のSDラット雄に5/6腎摘出術を施した高回転型および5/6腎摘出術と副甲状腺摘出術を施した低回転型CKDモデルを作製した。各ラットはPとCaの量を調整した飼料を与え18週間飼育した後、安楽死させ大腿骨を摘出した。骨質評価には赤外イメージング、赤外二色性イメージングを行った。

新規凍結切片作製法では、ポリプロピレン(PP)フィルムに接着剤を塗布し、凍結切片をフィルムに固定した。赤外イメージングでは、試料が固定されたPPフィルムの接着面をBaF₂基板と合わせて測定を行った。

【 結果と考察 】**赤外二色性イメージングによるコラーゲン線維と骨アパタイトの配向性評価法の開発**

週齢の異なるラット大腿骨の骨質を比較した結果、石灰化度と結晶化度は週齢に伴って有意に増加した。一方、炭酸含有率は16日から6週齢の間に減少、結晶成熟度はその間向上したが、共にそれ以降有意な差は認められなかった。骨軸に沿ったコラーゲン線維の配向性は、12週齢の骨幹中央部において認められ、33週齢に著しく向上したことから、週齢に伴うコラーゲン線維配向性向上が確認された。ラット大腿骨の骨強度は週齢に伴って増加することから、コラーゲン線維の配向性は、骨強度に影響を及ぼすと考えられる。一方、骨アパタイトの配向性を検討するためにリン酸バンドを波形処理により7成分に分け、各成分とコラーゲン線維の配向性を比較検討した。その結果、低結晶性アパタイトの配向性はコラーゲン線維とよく一致するが、他の骨アパタイト成分の配向性は一致しなかった。これらの結果から、骨アパタイトの結晶成熟度が向上した場合、コラーゲン線維の配向性と骨アパタイトの配向性は異なることが明らかとなり、石灰化度の進行に伴い骨アパタイトの配向性が変化することが示唆された。また、透過法と反射法の赤外二色性イメージングに差が認められなかったことから、赤外二色性イメージングによるコラーゲン線維と骨アパタイト配向性評価法は、骨質を評価するのに極めて有効な手段であることが示された。

CKD モデルラットの病態解析

生化学検査から、CKD モデルラットは高回転型(H-CKD)が二次性副甲状腺機能亢進症を発症し、低回転型(L-CKD)が発症していないことを確認した。H-CKD と L-CKD の骨質を比較した結果、石灰化度と結晶化度は差を認めなかったが、H-CKD の炭酸塩含有率と結晶成熟度は有意に低値を示した。特に、大腿骨骨幹端部の炭酸塩含有率と結晶成熟度は著しく低下した。これは、二次性副甲状腺機能亢進症に伴う高リン血症による代謝性アシドーシスが原因で、H-CKD の骨から炭酸塩が溶出したと考えられる。また、H-CKD と L-CKD は共に骨幹中央部で低結晶性アパタイトの偏光赤外吸収強度の角度依存性を示したことから、赤外二色性イメージングによる比較検討を行なった。その結果、健常ラットと比べてCKD ラットの骨幹端における低結晶性アパタイトとコラーゲン線維配向性が低下することが認められ、その傾向はH-CKD が著しいことを確認した。これらの結果から、CKD に伴う骨脆弱性は、骨幹端における低結晶性アパタイトとコラーゲン線維の配向性低下に特徴づけられた。

新規凍結切片作製法の開発

接着剤を塗布した4 μm のPP フィルムに凍結切片を固定する短期間かつ低コストでできる試料調整法を開発した。その際、4 μm のPP フィルムが赤外イメージング(透過法)や赤外二色性イメージングの結果に影響を及ぼさないことを確認した。同じマウスから摘出した左右大腿骨をそれぞれ凍結切片とPMMA 包埋による薄切片にし、赤外イメージングによる骨質解析を行った。赤外イメージングから抽出した赤外スペクトルを比較した結果、骨アパタイト由来の PO_4^{3-} バンドとコラーゲン由来のamide I バンドの幅や形状は凍結切片とPMMA 包埋による薄切片の間で異なることが確認された。皮質骨と海綿骨の石灰化度や結晶化度は、凍結切片で低値を示し、炭酸塩含有率は高値を示した。

【 結論 】

赤外二色性イメージングによるコラーゲン線維と骨アパタイトの配向性評価は、新たな骨質評価法として極めて有効であることが示され、従来の骨質解析法と併用することにより、H-CKD と L-CKD の骨質の違いを明らかにすることができた。一方、4 μm のPP フィルムを用いた凍結切片作成法は試料調整の時間短縮と低コストを実現したことから、臨床における応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、新しい骨形態計測の分野で展開される骨質評価法の開発とその臨床応用への実現に向けて、(1) 赤外二色性イメージングによるコラーゲン線維と骨アパタイト配向性評価法の開発、(2) 新規配向性評価法と従来法を駆使した慢性腎臓病 (CKD) モデルラットの骨の病態解析、及び (3) 骨の変性を最小限に抑え、試料調整時間の短縮と低コスト化を目指した凍結切片作製法の開発に取り組んだ。

(1) のコラーゲン線維と骨アパタイト配向性評価法の開発では、骨の主成分であるコラーゲン線維と骨アパタイト配向性の相関に着目し、赤外二色性イメージングによる配向性評価法を確立した。赤外二色性イメージングでは、赤外イメージング装置に偏光子を設置、回転角 0° ならび 90° で骨の薄切片を計測し、得られた赤外スペクトルのアミドIとリン酸バンドから赤外二色性イメージを得た。これまでX線や電子線回折による微小領域のコラーゲン線維や骨アパタイトの配向性評価は報告されているが、数 cm^2 の配向性評価を可能にしたのは本評価法が初めてである。本評価法の開発に伴い、大腿骨皮質骨におけるコラーゲン線維配向性と低結晶生アパタイト配向性が一致することを見出した。

(2) のCKDモデルラットの骨の病態解析では、SDラット雄に5/6腎摘出術を施した高回転型 (H-CKD) および5/6腎摘出術と副甲状腺摘出術を施した低回転型CKDモデル (L-CKD) を作製し、赤外イメージングと赤外二色性イメージングによる大腿骨の骨質解析を行った。赤外イメージングによる骨質解析において、H-CKDの炭酸塩含有率と結晶成熟度は有意に低値を示し、特に骨幹端部では著しいことが示された。この結果は、二次性副甲状腺機能亢進症に伴う代謝性アシドーシスによる骨からの炭酸塩溶出が原因であると結論づけた。赤外二色性イメージングによる配向性評価において、HならびL-CKD大腿骨骨幹端のコラーゲン線維と低結晶性アパタイト配向性は、健常ラットに比べて低下することが明らかとなり、その傾向はH-CKDが著しいことを確認した。これにより、CKDに伴う骨脆弱性は、骨幹端におけるコラーゲン線維と低結晶性アパタイト配向性低下に特徴づけられることを示した。

(3) の凍結切片作製法の開発では、接着剤を塗布した $4\ \mu\text{m}$ のポリプロピレンフィルムに骨の凍結切片を固定する試料調整法を開発し、赤外イメージング、赤外二色性イメージングによる骨質解析の時間短縮、低コスト化を可能にした。また、この試料調整法は、脱水や樹脂包埋による骨の変性を最小限に抑えることができるため、より生体内に近い状態の骨質を評価することができる。

これら3つの取組み結果から、生体内に近い状態でより多くの骨質情報が、短時間、かつ、低コストで得られるようになり、赤外イメージング、赤外二色性イメージングによる骨質解析の臨床応用への実現に向けて大きく前進したといえる。研究内容は研

究発表会（公聴会）において詳細を発表し、参加された多くの先生方から質疑を頂いが、いずれについても明快に説明を行った。

以上の結果から、本論文は千歳科学技術大学大学院学則第25条及び千歳科学技術大学学位規定の定めるところより、博士（理工学）の学位を授与するに十分との結論に達した。