

## 小動物骨塩量の簡易測定法

篠田 壽・莊 司 佳奈子\*・鈴 藤 勝 巳\*\*

東北大学歯学部歯科薬理学講座

(主任：篠田 壽教授)

\*歯科保存学第一講座

(主任：堀内 博教授)

\*\*口腔外科学第一講座

(主任：茂木克俊教授)

(平成6年11月11日受付, 平成6年11月14日受理)

### Simple and rapid determination of bone mineral content in small experimental animals

Hisashi Shinoda, Kanako Shoji\* and  
Katsumi Suzufuji\*\*

*Department of Pharmacology,*

*(Chief : Prof. Hisashi Shinoda)*

*\*Department of Endodontics and Periodontics,*

*(Chief : Prof. Hiroshi Horiuchi)*

*\*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery I,*

*(Chief : Prof. Katsutoshi Motegi)*

*Tohoku University School of Dentistry*

**Abstract:** The objective of the present study was to develop a nondestructive simple method for the determination of bone mineral content (BMC) in small experimental animals. Determination was performed by analyzing the grey levels of soft X-ray microradiographic images of bone specimens with an image analyzer. All of the images analyzed were fed into a video camera at magnifications of 10-20 times. Since a linear relationship was found between the grey levels (0-255 steps) and the logarithm of hydroxyapatite (HA) content/mm<sup>2</sup> by analyzing the images of standard step-wedges made of synthetic hydroxyapatite plates with different thicknesses, we could determine the BMC in the desired bone area using the measured grey level of the area. The results of measurement of rat femurs showed that there was excellent agreement between the measured BMC by the present method and the ash weight determined chemically. Precision error for BMC and BMD (Bone Mineral Density) was 1.6 and 1.7%, respectively. We concluded that the present method is reliable and useful for measuring the BMC of bone in small experimental animals.

**Key words:** microdetermination, BMC, BMD, bone, rat

## 緒 言

近年、医学・歯学領域における骨代謝研究の著しい進展にともない、様々な骨疾患モデルを用いた動物実験が盛んに行なわれている。例えば、卵巣を摘出した動物に生ずる骨減少症は、閉経後の骨粗鬆症の実験モデルとして汎用されている<sup>1)</sup>、歯科領域においても、臼歯歯頸部に ligature を装着させ、これを歯周炎による歯槽骨吸収のモデルとして用いた研究が数多く発表されている<sup>2-4)</sup>。こうした骨疾患モデルが使われるのは、多くの場合ラットやマウスなどの小動物で、これらの動物に惹起させた骨疾患や、それらに対する薬物投与その他の実験的処理の効果を評価するためには、対象とする骨標本を脱灰して組織学的検索に入る前に、非脱灰の標本の特定の部位あるいは骨全体についてその骨塩量や骨密度を正確に把握しておくことが必要となる場合が多い。ヒトでは、MD法 (Microdensitometry)、SXA法 (Single energy X-ray absorptiometry)、DXA法 (Dual energy X-ray absorptiometry)、定量的CT法 (Quantitative computed tomography)、さらには超音波法などが普及することによって、非破壊的な骨塩量の定量が普及しつつある<sup>5)</sup>。しかし、動物実験では、依然として軟X線写真像などの定性的な観察にとどまる場合が多く、定量的な骨塩量の測定は、灰化した骨組織のカルシウムやリンを化学的に定量する場合がほとんどである。ここ数年の間に、DXA法によって小動物の骨塩量を測定する試みもなされてはいる<sup>6-8)</sup>が、装置が高価で簡便性に欠けること、マウスやラットなどの小動物の骨はヒトの骨よりはるかに小さいため、骨を通過する photon の数が少なく解像力が劣るなど大きな問題点がある<sup>9)</sup>。本研究では、歯科領域に広く普及している軟X線撮影装置を用い、ハイドロキシアパタイト (HA) で作った濃度基準尺 (ステップエッジ) を骨試料と同時に撮影し、これらの軟X線画像のフィルム黒化度を測定・解析することによって、小動物から摘出した骨の任意の部位、あるいは骨全体の骨塩量を比較的簡単に短時間で測定する方法を考案したので報告する。

## 材料と方法

### 1. 骨標本

週齢 28-125 週の雌ウイスター系ラット 12 匹、および生後 7 週時に卵巣を摘出した 36-126 週齢のウイ

スター系ラット 9 匹を、エーテル麻酔下で屠殺し、左右大腿骨を摘出した。附着した筋肉その他の軟組織を除去した後、70% エタノール中に保存し、以後の実験に供した。

### 2. 軟X線写真の画像解析による骨塩量の測定

#### 1) HA を用いた濃度基準尺 (ステップエッジ) の作成

X 線を吸収する主たる骨中成分が HA であることを考慮し、HA の粉末を用いて濃度基準尺を作成した。即ち、5-7 mm 程度の高さに切断した、直径 5.0 ないし 6.5 mm のプラスチック管を 5-10 本用意し、各々の一方を、厚さ 0.2 mm のプラスチックフィルム上にアロンアルファを用いて垂直に接着した。これらのプラスチック管の中には、1 mm<sup>2</sup> 当たり約 500 から 7,000  $\mu\text{g}$  の範囲となるように、段階的に異なった量の HA 粉末 (ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフ用、和光純薬) を充填した。対象となる骨の大きさに応じて、フィルム黒化度がその範囲をカバーできる様に、充填する HA 粉末の量を変えた。これらの HA 濃度基準尺は、試料となる骨標本を撮影する際、必ず同一フィルム上に置いて撮影し、骨標本の画像解析を行う際の基準として用いた (図 1)。

#### 2) 軟X線撮影

ソフテックス社製、SOFTEX, Type CMB を用いた。X 線管球とフィルム面の距離は、キャビネサイズのフィルムが X 線有効照射野の中に入る 35 cm とした。管電流は、1 mA に統一し、1 次電圧は 60-80 V、撮影時間は、試料の大きさに応じて 30-180 秒とした。軟X線フィルムとしては、富士写真フィルム社製 SOFTEX FILM, Type FR を用いた。撮影後、REN-DOL (富士写真フィルム) を用いて 20°C、4 分間現像し、15% 酢酸で停止後、RENFIX (富士写真フィルム) で 10 分間定着処理を行った。

#### 3) 軟X線画像の黒化度の測定

撮影した軟X線フィルムを、安定電源を持ったライトボックス (Carry View, 9V, 5W, きもと社) 上に置き、目的とする画像を、CCD ビデオカメラ (T1-23A, NEC) を介してビデオモニター (Type TMP-712B, NEC) に 10-20 倍の倍率で取り込んだ。それらの画像は、NEC パーソナルコンピューター、PC-9800 シリーズ上で作動する画像解析ソフトウェア-ASPECT (三谷商事) を用いて、256 階調の濃度に分けて測定した。

#### 4) 各種撮影条件下での、HA 密度 ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) と

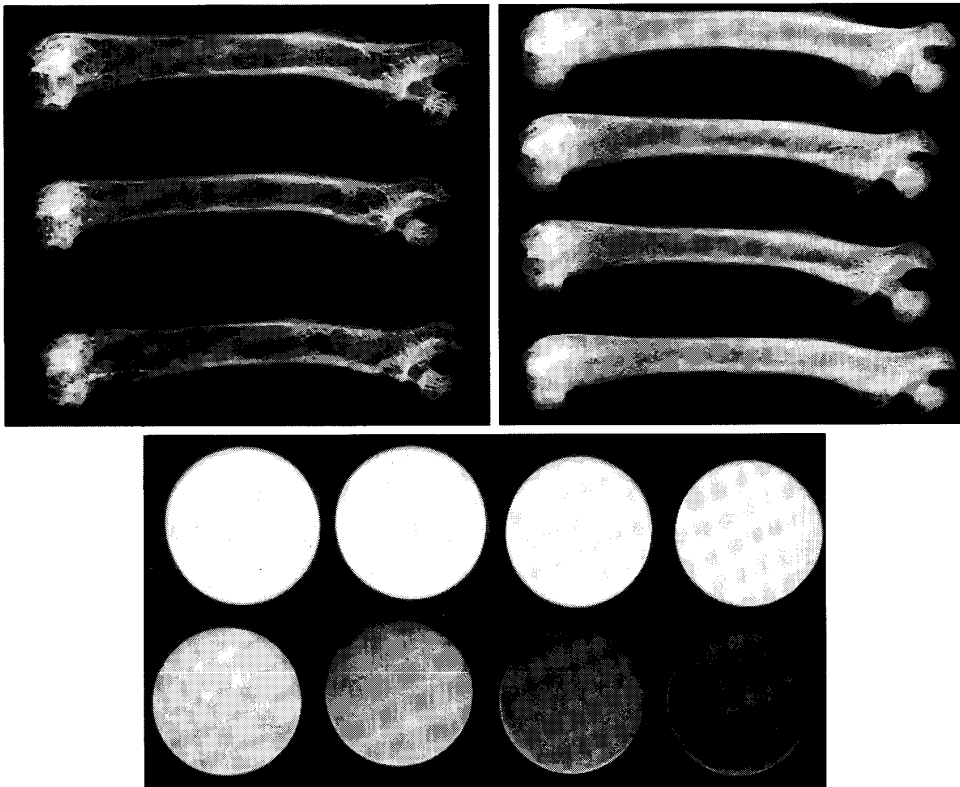


図1 ラット大腿骨およびハイドロキシアパタイト濃度基準尺の軟 X 線画像。  
左側は卵巣を摘出したラットの、右側はそれらの対照群にあたるラットから摘出した大腿骨。下方は、  
8段階のハイドロキシアパタイト濃度基準尺。これらの画像の一部をビデオカメラを介してビデオモニターに取り込み、測定領域のフィルム輝度（黒化度）を画像解析装置を用いて測定した。

#### フィルム黒化度との関係の検討

HA 濃度基準尺を使った予備的な実験から、HA 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) の対数值 (X) とフィルム黒化度 (Y) との間には、一定の範囲内で  $Y=aX+b$  の直線関係が成り立つことを確認した。そこで、ラットやマウスの骨を撮影する実用的な幾つかの撮影条件のもとでも、この関係が維持されるか否かについて、HA 濃度基準尺を用いて検討した。具体的には、X 線管電圧を一定にして撮影時間を変えた場合(線量を変えた場合)と、撮影時間と管電流を一定にして、管電圧を変えた場合(X 線波長を変えた場合)、それらが黒化度と  $\log[\text{HA} (\mu\text{g}/\text{mm}^2)]$  の間の直線関係にどのような影響を与えるかについて検討した。

#### 5) 骨標本の骨塩量測定

試料とした骨標本とともに撮影した HA 濃度基準尺の黒化度の測定から、各フィルムごとに、標準直線として採用する  $Y=aX+b$  の係数、a と b を求めた。次いで、コンピューターに接続したマウスを用いて、ビ

デオモニター上に取り込んだ試料画像の特定の骨領域(図2)、あるいは骨全体を閉曲線で囲って測定野を指定し、ASPECT の機能を利用して、その測定野の面積、測定野内の画素点の数、測定野内の各画素点の黒化度を計測した。各画素点の黒化度 Y に対応する HA 量 ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) は、各フィルムごとにあらかじめ係数 a と b が決められた標準直線  $Y=aX+b$  に黒化度 Y の値を代入することによって X の値を得、 $10^x$  の値として算出した。測定野内に含まれる HA 量の総量 (BMC: Bone Mineral Content) は、測定野内に含まれる各画素点ごとに算出した HA 量の合計値として、ASPECT に組み込んだプログラムにより算出した。さらにこの BMC を測定野面積で割った値を、骨密度 (BMD: Bone Mineral Density) として求めた。

#### 6) 骨塩量 (BMC) と骨灰分量、および骨密度 (BMD) と骨灰分量/骨体積量の相関の検討

ラット大腿骨 20 本を用い、各々の骨について、大腿骨全体の骨塩量 (BMC) と骨密度 (BMD) を上記の方

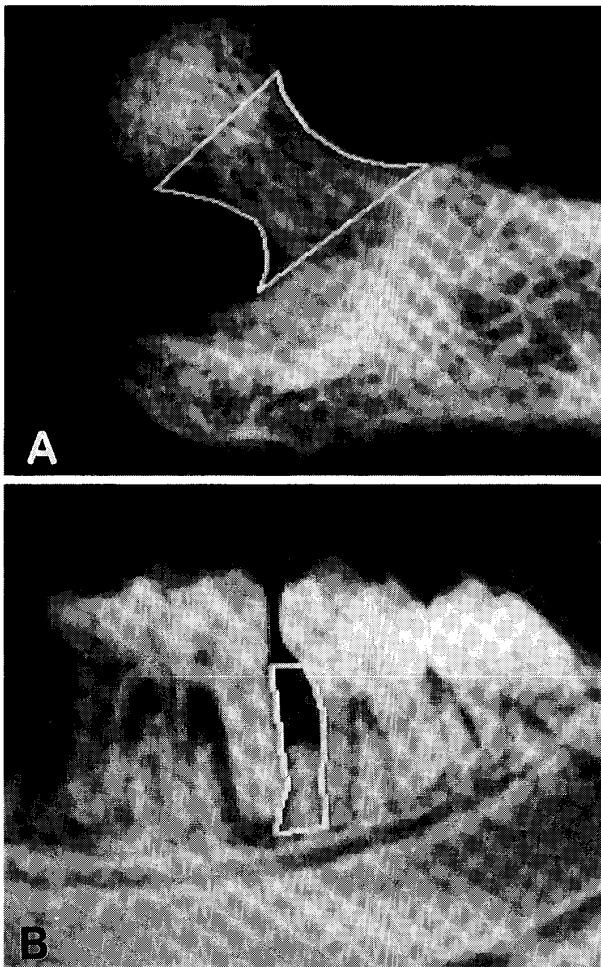


図2 ビデオモニターに取り込んだ軟 X 線画像の拡大図の例。

A: ラット大腿骨近心骨頭部

B: ラット下顎骨臼歯部

コンピューターのマウスで囲った白線の閉曲線内領域が測定野となる。

法により測定した。ついで各々の骨の体積をアルキメデスの原理によって測定したのち、660°Cで24時間灰化し、その灰分重量を測定した。BMCと灰分重量の相関、およびBMDと骨灰分量/骨体積量の相関の程度について検討した。

#### 7) 測定精度の検討

同一のラット大腿骨標本について、軟 X 線撮影からフィルムに現像、画像解析にいたる測定の全手順を7回繰り返して、得られた7個のBMCとBMDの値について、その平均値(M)±標準偏差(s)を得、 $s/M \times 100$ より変異係数(V)を算出した。

## 結 果

### 1. HA密度とフィルム黒化度との関係

X線管に流れる管電流を1mA、撮影時間を100秒に固定し(線量を固定し)、X線管にかかる一次電圧を、実際にラットやマウスの骨を撮影するとき用いる60-80Vの範囲で変化させたとき、HAの密度( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ )と、フィルム黒化度(フィルム輝度)の関係がどの様になるかを検討した(図3)。図から明らかな様に、管電圧が増すと、フィルムの黒化度が増し(フィルムの輝度が減少し)、直線が次第に右方に移動している。しかし、いずれの条件下においても、HA密度の対数とフィルム黒化度の間には、相関係数が0.99を越える良好な直線関係が維持されていた。

X線管にかかる一次電圧を80Vに固定し(波長を一定にし)、管電流は1mAにしたまま、撮影時間を50-170秒の範囲内で変化させたとき(線量を変えたとき)、HAの密度( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ )とフィルム黒化度の関係がどの様になるかを検討した(図4)。図から明らかな様に、撮影時間が長くなると、フィルムの黒化度が次第に増して(フィルム輝度は減少し)、直線は右方に移動した。しかし、これらの撮影時間の範囲内では、HA密度の対数とフィルム黒化度の間には、いずれの条件下においても相関係数が0.99を越える直線関係が維持されていた。

### 2. 骨塩量(BMC)と骨灰分量との相関、および骨密度(BMD)と骨灰分量/骨体積の相関の検討

ラット大腿骨20本について、本法によってHA量として測定した骨塩量(BMC、大腿骨1本に含まれる総量)を、同一標本を灰化して得た灰分量と比較した(図5)。測定の対象とした大腿骨には、卵巣を摘出した後、29-119週経過したものや、それらの対照となる骨が含まれており、その灰分量も広い範囲に分散している(354-565mg)。このような範囲内で、本法で測定した骨塩量と灰分量の間には、高い相関関係が認められた( $r: 0.9640$ )。

図3で用いた同一試料について、本法で測定した骨密度(BMD,  $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ )と灰分量/骨体積との相関を検討した。前者は、X線フィルム上で得られる2次元的な骨密度(HA量/ $\text{mm}^2$ )であり、後者は、実際の骨について得られた、3次元的な灰分の密度を表すが、両者には高い相関が認められた( $r: 0.8817$ ) (図6)。

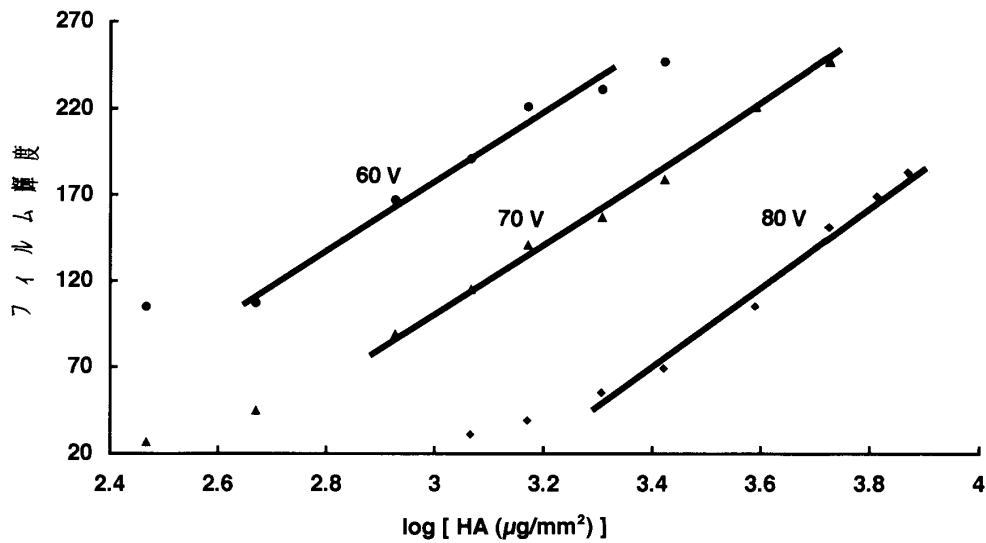


図3 管電圧を変えた場合のフィルム黒化度とハイドロキシアパタイト (HA) 密度 ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) との関係  
管電圧が上昇するとフィルム黒化度が増加するので、フィルム輝度は減少する。いずれの条件においても、一定の範囲内で両者の間には直線関係が成立する。

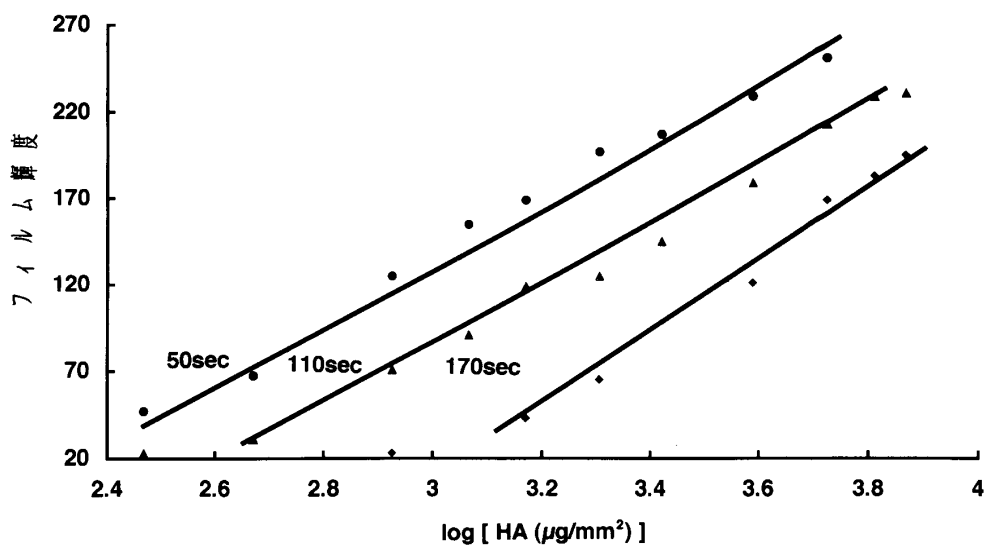


図4 撮影時間を変えた場合のフィルム輝度とハイドロキシアパタイト (HA) 密度 ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) との関係  
撮影時間を長くするとフィルム黒化度が増加するので、フィルム輝度は減少する。いずれの条件においても、一定の範囲内で両者の間には直線関係が成立する。

### 3. 測定精度

ラットから得た同一の大腿骨標本について、軟 X 線撮影 (80 V, 1 mA, 120 秒), フィルムの現像, 画像解析までの測定手順を, 7 回繰り返し, 骨塩量 (BMC) と骨密度 (BMD) についての平均値 (M)  $\pm$  標準偏差 (s) を得た (表 1)。s/M  $\times$  100 で示される変異係数は, BMC

に関しては 1.6%, BMD に関しては 1.7% であった。

### 考 察

目的とする骨領域, あるいは骨全体の骨塩量を定量的に把握することは, 動物を使った骨代謝の基礎研究において極めて重要である。従来, ラットや, マウス

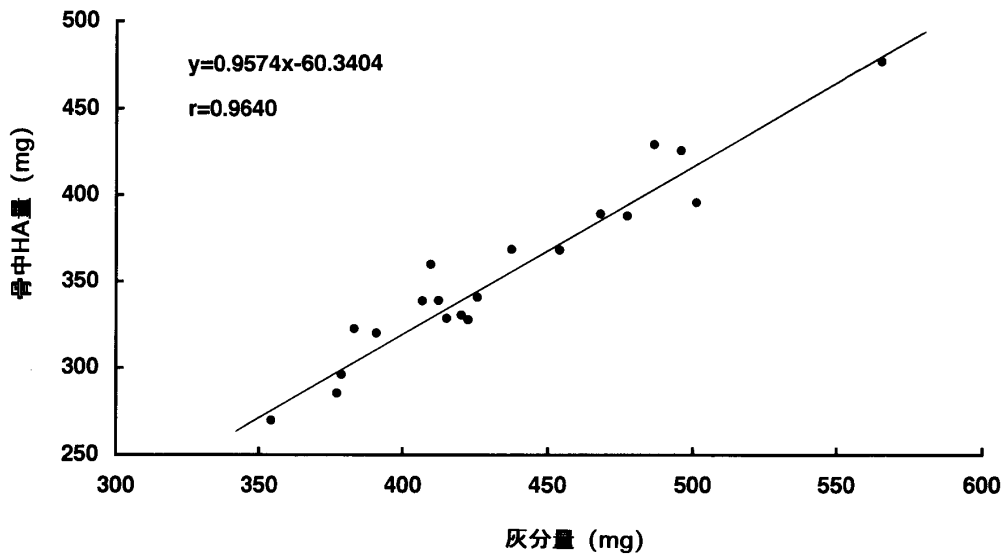


図5 測定したラット大腿骨中のハイドロキシアパタイト (HA) 量 (BMC: mg/bone) と、同一大腿骨を灰化して得た灰分重量との関係  
両者の間には高い相関関係 (r: 0.9640) が認められる。

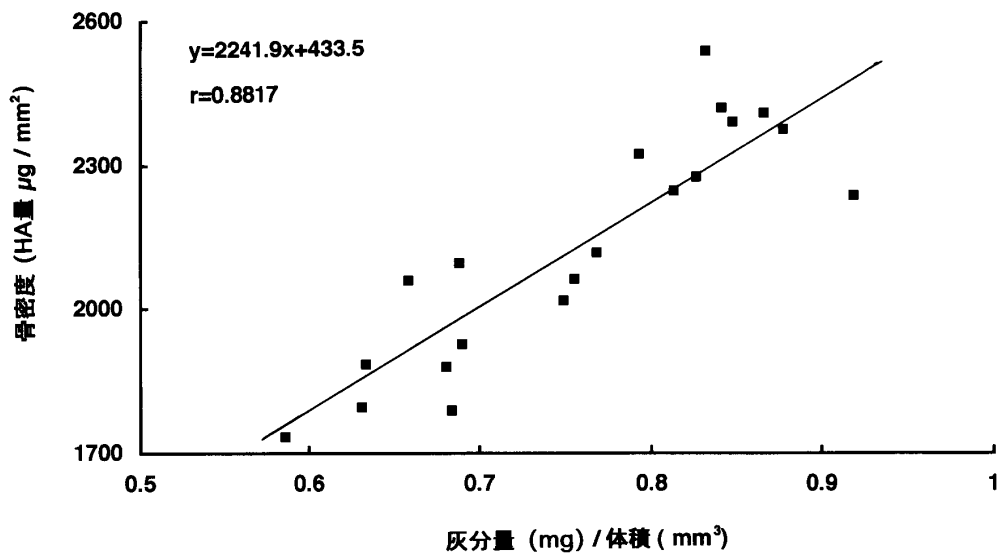


図6 測定したラット大腿骨中のハイドロキシアパタイト (HA) 密度 (BMD: µg/mm²) と灰分密度 (mg/mm³) との関係  
両者の間には高い相関関係 (r: 0.8817) が認められる。

などの骨塩量の計測は、摘出した脛骨や大腿骨の乾燥重量、灰分重量、さらにカルシウムやリンの化学定量の結果を、骨の体積測定の結果などとあわせることによって行われてきた。しかし、これらの化学定量法では、骨の形態が保存されないため、得られた結果が骨のどの部位を中心に起こっているのか、その部位の特定が困難であること、計測を再現できないこと、脱灰標本などによる組織学的な検索を併用できないなどの

大きな欠点がある。したがって、非破壊的に目的とする部位の骨塩量の定量ができる方法を持つことは極めて重要である。本研究では、こうした点を考慮に入れて、実験を企画した。

### 1. 測定条件

本研究では、骨塩量測定の濃度基準尺として HA を用いた。これまでの X 線画像の濃度解析に関する研究

表1 ラット大腿骨同一標本の骨塩量 (BMC: mg/ bone) と骨密度 (BMD:  $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) について, 7 回の測定を繰り返したときの平均値  $\pm$  標準偏差

	BMC (mg)	BMD ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ )
1	1,154	757
2	1,187	785
3	1,143	785
4	1,177	776
5	1,146	766
6	1,168	788
7	1,136	757
Mean $\pm$ SD	1,159.3 $\pm$ 18.9	774.0 $\pm$ 13.5

では, 多くの場合アルミ製のステップエッジが使用されてきた。しかし, ヒトや動物の骨の主成分は, HA であり, この HA が生体内で X 線を吸収する主要な成分であることを考えると, アルミ製の濃度基準尺を用いることは必ずしも合理的であるとはいえない。なぜなら, 各波長の X 線の吸収係数は, アルミと HA では, 比例しているわけではないので, 撮影条件, 例えば, X 線管球にかかる電圧が変われば, 発生する X 線の波長も変わるので, 両者が X 線を吸収する比率も変化することになる。ラットやマウスなどの小動物の骨も, 動物種, 週齢, 骨の種類などによって, 骨の大きさは大きく異なるので軟 X 線撮影の条件も様々である。したがって, 濃度基準尺の材質が生体の側で X 線を吸収する成分に近い HA を用いた本研究の方法では, この問題はほぼ解決されたと考えられる。しかし, 厳密には, 軟 X 線を吸収する骨の成分は, 骨塩のみならず, わずかであるにしても, コラーゲンを主とする有機質成分もある。したがって, 濃度基準尺として, HA 粉末に替えて, 骨と組成が同じである骨粉, あるいは, それに近い象牙質粉末を用いることは, さらに測定精度を上げると考えられ, この点は現在検討中である。

本研究で試みた定量法は, 軟 X 線によるフィルムの黒化度が, 単位面積あたりの HA 量の対数値と比例関係にある事を前提としている。もし, 撮影条件の違いなどにより, この比例関係が失われれば, この定量法の信頼性は失われる事になる。しかし, 図 3, 図 4 にみられるように, ラットやマウスの骨を撮影する実用的な撮影条件のもとでは, この関係は維持されていた。したがって, 測定しようとする骨標本と同じフィルム上

に HA の濃度基準尺を置いて撮影し, 骨試料の黒化度の範囲が, その濃度基準尺から得た標準式の直線範囲内にある限り, 得られた値は, 信頼性が高いと考えられた。また, 測定しようとする骨標本と同一のフィルム上で撮影した濃度基準尺の黒化度から得られた標準直線を用いる限りは, 撮影条件だけでなく, フィルムの現像条件が実験ごとに微妙に異なっても, それらの違いは事実上無視することができるであろう。

## 2. 測定の信頼性

図 3 に示されたように, 今回測定した骨塩量 (BMC) の値は, 広い測定範囲において, 灰化した骨の重量と高い相関を示した。また, 図 4 に示されたように, 骨密度 (BMD) と骨灰分量/骨体積量の間にも, 一方が 2 次元的な骨密度, 他方が 3 次元的な骨密度であるにもかかわらず高い相関がみられた。さらに同一試料を繰り返し測定して得られた変異係数も 1.6 ないし 1.7% という低い値を示しており, 十分実用に耐えるものと考えられた。

## 3. 測定法の利点

近年, DXA 法や, MD 法によるヒト骨塩量の定量が普及しつつある。また, これらの測定法を, 小動物に応用する試みもいくつか行われている<sup>6-9)</sup>。確かに, これらの測定法は非破壊的であり動物を生かしたまま測定できるという利点がある。しかしながら, 測定野単位面積当たりの photon の数が少なく, 全身骨量などの測定は可能であるにしても, 単一骨, さらに, その骨の任意の特定部位を測定できる段階にはない<sup>9)</sup>。一方, 本研究で開発した方法は, 粒子が微小な軟 X 線フィルムを用いるので, その画像を 10-20 倍以上に拡大することができる。したがって, ラットの脛骨, 大腿骨は無論のこと, マウスの脛骨や, 大腿骨, 顎骨の関節頭に至るまで, 容易に測定することができる。また, コンピューターのマウスを使って測定領域を任意に指定することも重要な利点である。さらに, 軟 X 線撮影装置は, 広く普及しており, 扱いも簡単であるし, DXA 装置よりも経済的に安価である。濃度測定が可能な画像解析装置があり, 対象とする骨の大きさにあった HA の濃度基準尺を作れば, 比較的容易に小動物の骨塩量の測定ができると考えられる。

**内容要旨：**本研究の目的は、小動物の骨の骨塩量を、組織を破壊することなく、簡単に測定する方法を開発することであった。測定は、骨試料と同時に撮影したハイドロキシアパタイト (HA) で作製した濃度基準尺の軟 X 線画像から得られた黒化度と HA 密度 (対数) の間に成り立つ直線関係にもとづき、測定領域の軟 X 線画像の黒化度を単位面積当たりの HA 量に換算することによって行った。ラットの大腿骨を測定して得られた骨塩量 (BMC: Bone Mineral Content) は、骨を灰化して得られた灰分重量と高い相関を示した。また、同一試料の繰り返し測定によって得られた BMC と BMD (Bone Mineral Density) の変異係数は、それぞれ 1.6, および 1.7% と低い値を示した。以上の結果から、本研究によって開発された方法は、小動物の骨塩量を測定するための有用かつ信頼性のある方法と考えられた。

## 文 献

- 1) Anderson, J.J.B., Garner, S.C., Mar, M.-H., Boass, A., Toverud, S.U. and Parikh, I.: The ovariectomized, lactating rat as an experimental model for osteopenia: calcium metabolism and bone change. *Bone and Mineral* **11**: 43-54, 1990.
- 2) Nyman, S., Schroeder, H.F. and Lindhe, J.: Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J. Periodont. Res.* **50**: 450-461, 1979.
- 3) 色川俊則: 無菌飼育および普通飼育ラットを用いた歯周組織の損傷と修復に関する研究. *日歯周誌* **23**: 233-248, 1981.
- 4) Dybvig, M.N., Sanavi, F., Zander, H. and Rifkin, B.R.: The effect of indomethacin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J. Periodont. Res.* **17**: 90-100, 1982.
- 5) 森田陸司: DXA による骨塩定量の現状と将来展望. 福永仁夫編: 骨粗鬆症と骨塩定量—DXA による骨塩定量—. メディカルレビュー社, 東京, 1994, pp. 14-19.
- 6) Sanchez, T.V., Myers, R.C., Bond, T.J. and Mayor, G.H.: Bone mineral analysis of the rat femur by direct photon absorptiometry. *Calcif. Tissue Int.* **33**: 587-590, 1981.
- 7) Ammann, P., Rizzoli, R., Slosman, D. and Bonjour, J-Ph.: Sequential and precise in vivo measurement of bone mineral density in rats using dual-energy X-ray absorptiometry. *J. Bone Miner. Res.* **7**: 311-316, 1992.
- 8) Casez, J-P., Muehlbauer, R.C., Lippuner, K., Kelly, T., Fleisch, H. and Jaeger, Ph.: Dual-energy X-ray absorptiometry for measuring total bone mineral content in the rat: Study of accuracy and precision. *Bone and Mineral* **26**: 61-68, 1994.
- 9) 中村利孝, 大西英生: DXA の動物実験への応用. 福永仁夫編: 骨粗鬆症と骨塩定量—DXA による骨塩定量—. メディカルレビュー社, 東京, 1994, pp. 170-175.