

Microcomputed Tomography を 用いた骨粗鬆症研究

“Microcomputed tomography for the study on osteoporosis”

馬渡 太郎¹⁾ Taro Mawatari
三浦 裕正¹⁾ Hiromasa Miura
田垣 秀彦²⁾ Hidehiko Higaki
蔵田 耕作³⁾ Kosaku Kurata

諸岡 孝明¹⁾ Takaaki Moro-oka
村上 輝夫³⁾ Teruo Murakami
岩本 幸英¹⁾ Yukihide Iwamoto

1) 九州大学医学部整形外科
2) 九州産業大学工学部機械工学科
3) 九州大学工学部知能機械工学科

骨粗鬆症は、骨の量の減少と微細構造の劣化により骨折の危険性が高まった状態であり、その評価基準としては、現在唯一臨床応用されている骨密度Bone mineral density(BMD)だけでなく、力学的強度に大きく寄与すると考えられる骨の構造の検討が必要である。そこで従来CT(分解能1mm程度)よりもはるかに高分解能(分解能0.026mm程度)を有するMicro-CTが骨粗鬆症研究の手段として注目されている。従来、組織標本で2次的にしか評価できなかった微細形態情報を、連続スライス画像から3次元的に非侵襲的に得ることができ、更に連結性等の各種ハラメータにより定量的に構造評価が可能である。現在のところいくつか検討すべき点はあるが、本評価法が、今後骨粗鬆症の病態解明および各種薬物の薬効判定の手段として、また基礎と臨床の橋渡しとして発展することを願っている。

Osteoporosis is the morbidity in which the risk of fracture is enhanced due to decrease in bone volume and deterioration of its microstructure. As its evaluation standard, only the measurement of bone mineral density (BMD) has been clinically applied, however it is necessary to further study on bone structure that is considered to greatly effect on mechanical strength. From this viewpoint, attention is now focused on micro-CT which can provide far superior resolution (with a level of 0.026mm) than the conventional CT (resolution : about 1mm) for study on osteoporosis. The microstructure information which could be evaluated only in 2-dimension by histomorphometry can now be obtained in 3-dimension noninvasively from continuously sliced images, and furthermore the structure can be quantitatively evaluated with various parameters including connectivity. Although some points are to be further studies, this method is expected not only to become an effective diagnostic modality for pathological analysis of osteoporosis and evaluation of pharmaceutical effect but also to be developed as an interface between basic research and clinical application.

Key Words : Microcomputed Tomography,
Osteoporosis, Microarchitecture

1.はじめに

高齢化社会の到来に伴い、骨粗鬆患者は1990年では500万人、2000年には1200万人に達するといわれ、骨粗鬆症の正確な診断と効果的な治療法の確率が現在急務とされている。骨粗鬆症は「骨量の減少と骨微細構造の劣化が起こり、その結果骨の脆弱性が増加し、骨折の危険性が高い状態」と定義される。加齢により誰も骨量は漸減していくが、特に問題になるのは、閉経や薬物等により骨強度が著しく低下した場合で、骨折を引き起こし、それに伴っていわゆる“寝たきり”の状態となりやすい。そこで治療の目的は、著しく骨強度の低下した状態、もしくは今後低下していく状態を正確に診断し、食事指導(Ca摂取増量、P摂取減量、Vitamin摂取)、日

光浴(Vit.D合成)、適度な運動、さらには薬物療法等によって骨強度の低下を最小限に食い止めることにある。

一方、骨粗鬆症の病態解明には、皮質骨よりも代謝回転が早く、閉経後急速に骨減少がみられる海綿骨の解析が重要である。海綿骨における荷重分担割合は部位によって異なるが、例えば椎体では、皮質骨殻と海綿骨のうち、海綿骨の荷重分担率は40歳以前で55%、40歳以後で35%であるとの報告もみられ、海綿骨の力学的強度に寄与する割合は決して無視できないといえる。

海綿骨の力学的性質(Structural mechanical property)を規定する因子としては三つの因子が考えられる。(表1)

#1の骨のミネラル量に関してはDual X-ray Absorptiometry (DXA)を用いたareal BMD (mg/cm²), 更に最近ではpQCTを用いたvolumetric BMD (mg/cm³)の検討が行われている。また#2の骨梁自体の物性は微小材料試験器を用いた検討が進められているが、数十ミクロンの骨梁の力学試験は容易ではなく、いまだ研究段階である。それぞれどの程度力学的強度に寄与しているかは現在のところ不明であるが、粗鬆化に伴う海綿骨の力学的強度の変化に関して、力学的強度とBMDは必ずしも相関しないという報告があり、海綿骨の力学的性質を規定する因子として、骨梁微細構造に対する関心が高まっている。現在診断基準の主役になっている#1の骨の量だけではなく、#3の構造が重要だ、と言われてきているのは、同じ木材を用いて建物をつくる際に、梁構造のある設計のほうがより高い強度を有することを考えると分かりやすい。

近年Micro-CT等の画像機器の進歩により、微細骨梁の3次元形態情報を非破壊的に得ることができるようになった。これらの手法は、骨の研究において、発展が著しいホルモン、サイトカイン、growth factor等の生化学的因子の理論的解析とマクロな力学的挙動解析との間の“メゾ領域”である微小骨梁形態変化を解析していく上での有用なツールとして今後の発展が期待される。本稿ではMicro-CTを用いた3次元骨

表1：骨の力学的強度に寄与する因子

- #1 Mass (Bone mineral density, BMD)
- #2 Quality (Material mechanical property)
- #3 Geometry (Microarchitecture)

2. 骨粗鬆症研究に用いるサンプル及び従来の骨形態計測

I. 骨粗鬆症研究に用いるサンプル

骨粗鬆症の基礎研究、薬効判定においては、人のデータを用いることが最も望ましいが、他の関与する因子を除外できる点、年齢、体重等を基準して個体数を集めることができる点、そして屠殺後の摘出標本を用いて詳細に検討できる点、などからラット等の動物による疾患モデルが用いられることが多い。疾患モデルとしては、両側の卵巣を摘出したOVX(ovariectomized)ラット（閉経後骨粗鬆症モデル）、珪酸マグネシウムを皮下に注射して作成するIMO(inflammation-mediated osteopenia)ラット（慢性炎症による骨減少症モデル）、Streptozotocin注射によるDMラット（糖尿病モデル）、ギプス固定により作成する不動化ラット、尾部牽引により無重力状態をシミュレートする無重力ラット等の多くのものが確立されている。これらのモデルの脛骨、大腿骨、脊椎等が詳細に検討されている。それぞれ直径1~4mm程度の小さなサンプルである。また人工関節置換術や腸骨を用いた骨移植術の際に得られたサンプル、御遺体より得られたサンプルを解析する場合もある。

II. 従来の骨形態計測

従来骨の研究は骨組織を切り出した標本の組織学的観察によらざるを得なかったが、この方法では多大な労力および時間を要する上に、標本作成過程における骨梁構造の破壊が不

可避であり、3次元形態の可視化は困難であった。しかも異方性構造物である骨梁を2次的に解析することは、形態解析の観点からすると問題がある。

通常のCTの分解能が0.5~1.0mmであるのに対し、より高分解能な連続スライス画像を得ることができるいくつかの手法（後述）が近年報告され、各種コンピュータの処理能力の大幅な向上と相補って、比較的容易に骨梁3次元構造の形態解析が行えるようになりつつある。

3. Micro-CT及び他の骨形態3次元計測手法の現状

・Micro-CT (Microcomputed tomography)

日立メディコはコンデンサー等の欠陥検査等に用いられていた産業用Micro-CTをいち早く医療基礎研究分野に応用した（図1、MCT-12505MF）。他に現在日本では、Scanco medical社のヨーロッパ製μCT-20、日鉄エレックス、島津製作所の製品が存在し、空間分解能は20μm~30μm程度である。どれもX線源としてマイクロフォーカスX線管を使用するが、X線検出器としてイメージンテンシファイアで得られるデータからCTスライス面のデータをファンビームデータとして取り出し画像再構成する方法と、検出器にラインセンサを用いてCTスライス面のファンビームデータを直接測定し画像再構成する方法がある。どちらの方法も一長一短がある。また、管電圧、管電流は可変式のもの、固定のものがある。固定型はキャリブレーション等の操作が簡素化さ



図1：マイクロCT (MCT-12505MF、日立メディコ) 外観

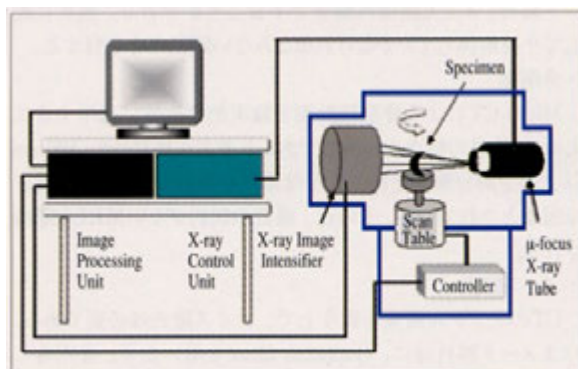


図2：マイクロCT (MCT-12505MF、日立メディコ) 構造
X線漏れ線量は1μSv/h以下で、X線防衛設備を必要としない。

検体のサイズによっては可変型でないに至適条件が得られない場合がある。日立メディコムCT-12505MFの構造図を示す。(図2)

・XTM (X-ray tomographic microscope)¹⁾

ごく最近開発されたシンクロトロン放射光を用いた現在最も高分解能なCT装置で、高輝度の平行光線を用いることによって、数ミクロンの空間分解能を得ることが可能である。ただし本手法はシンクロトロンを有する施設に限定される。

・Micro-MRI (Micro-magnetic resonance imaging)²⁾

高磁場装置を用いてGd水溶液に浸した摘出標本に対し、数十ミクロン程度の分解能を得ることが可能となってきた。しかし骨梁形態の正確な描出には撮像シーケンスやその解釈にまだ課題を残している。

・Serial grinding technique, Serial sectioning technique

硝酸銀等を用いて黒く染めた骨を白色樹脂に包埋することでコントラストをつけたサンプルを、NC工作機を用いて薄切しながら、断面をCCDカメラで連続撮影することによって3次元形態情報を得る手法である。破壊的手法ではあるが、大きなサンプルの計測ができる、等の利点を有す。

Micro-CT、XTM、Micro-MRIは主として摘出標本を用いたin vitroでの計測に用いられているが、撮影時のサンプルの乾燥等に注意すれば、非破壊的計測であり、用いたサンプルはそのまま力学試験に供することも可能である。また、一部の機器では小動物を麻酔下にin vivoで撮影することが可能となっており、薬物や力学刺激等に対する骨梁変化の経時的観察が行える。今後、同一固体を用いることでサンプルの個体差の影響を除外した、in vivoでの解析が期待される。

一方臨床用に用いられているpQCTやMRIでも150~300 μ m程度の分解能の画像を得ることが可能となっており、in vitroでの解析のノウハウを導入した生体でのin vivoの研究が期待される。

4. Micro-CT形状データ解析³⁾

上記の手法を用いて得た連続したスライス画像をワークステーションやパーソナルコンピュータに運び、適切な補間処理を行い、縦横高さ比の等しいvoxelから構成される立体情報を作成する。それから2値化、ノイズ除去を行い、いわゆるpurified volume dataを作成する。これを用いて各種ハラメータ解析、3次元画像再構築をすることができる。解析に際して今後解決していかなければならない問題点を考察する。

・分解能

Micro-CTによる骨形態計測を臨床的に生体に適用することは、被曝量の観点から困難であると考えられており、100 μ m以上の空間分解能を得ることはX線を用いたCTでは現実には困難とされている。その点、線量の制約がないMRIが期待される。

・ノイズ除去

CTのデジタル画像を扱う上で、ノイズ除去は必要である。ハラメータ解析前に、Gaussian filterを用いたり、骨内もしくは骨髄内で孤立したvoxelを除去するアルゴリズムを用いたりしてpurified volumeに対してかいせきを行うことが必要であるが、画像の空間分解能が十分でない場合はどの程度の大きさのものまでをノイズと判定するかは重大な問題で

・閾値処理

骨梁3次元形態情報をハラメータ解析するには、骨の領域と、骨でない領域を決定して、2値データを作成しなくてはならない。閾値設定により骨の形態は大きく変化し、その後のハラメータ解析に大きな影響を及ぼす。(図3) 画像の空間分解能が十分に小さい場合は閾値設定は比較的容易であるが、ラット等の小動物の骨梁(50 μ m程度)に対するMicro-CT画像(20~30 μ m程度)、また人骨梁(100~300 μ m程度)に対するpQCTやMRI画像(200~300 μ m程度)の場合のように、分解能に限界がある場合は、local thresholding procedure等を用いた閾値設定の知能化が必要である。一方従来用いられてきた閾値設定方法は、どの手法も程度の差はあれ、閾値自動決定アルゴリズムを用いたり、オペレータが恣意的にハラメータを決定するもので、いまだ確立された手法はない。我々はエッジ保存平滑化フィルタを適用して2値化操作の誤差の低減を試みている。対象に応じて検索半径、適用量を選択することで、局所的な閾値設定の最適化がはかれ、local thresholding procedureに相当する手法であると考えている。

また閾値設定の妥当性は組織切片との対比によって評価されることが多いが、組織切片作成時のサンプルの破壊や縮みが発生する可能性があることを念頭に置いておくべきである。2値化操作自体が、gray-scaleの情報のある値の上下で1と0のデジタルデータに変換する事を意味し、問題を含んでいるが、解析を行なう上で重要なことは、ハラメータの絶対値の評価ではなく、同じ解析手法を用いた群間での相対比較を行うことである。

・3次元画像再構築

得られた3次元形状データは、レンダリングソフトを用いて可視化できる。ラット骨粗鬆症モデルとコントロールの脛

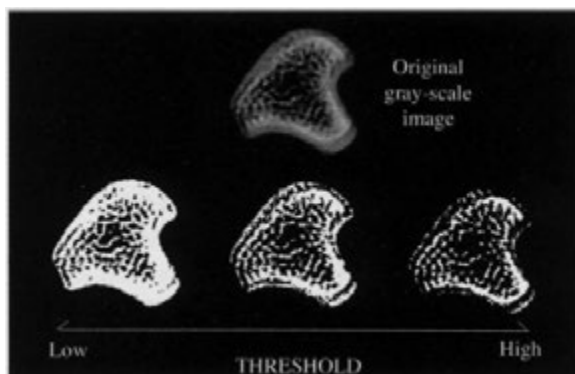


図3：閾値による画像の変化

2値化によりグレースケールの骨梁画像を骨、非骨に分類するが、閾値設定によりその結果は大きく変化し、その後の解析に大きな影響を及ぼす。上段は原画像、下段は閾値処理した画像である。

5. 3次元骨形態パラメータ評価

現在、表の様な構造指標が検討されている。⁴⁾ (表2)

組織切片を用いた骨梁形態評価の指標としては、Trabecular thickness (Tb.Th)やTrabecular separation (Tb.Sp)等がよく知られているが、voxel dataからも、それに対応する値をParfitらが提唱したparallel plate modelを用いた公式により計算できる。しかし一方、骨梁には3次元的にrod-like structureとplate-like structureがあり、それらをひとまとめに考え、骨梁の幅としてよいのか、議論の余地がある。さらに限られた分解能のデジタルデータをあつかう場合には、幅、周囲長等の長さの単位はpixel sizeに大きな影響を受け、信頼性が乏しいと言える。これに対して、面積、体積、体積密度の場合には、統計的には長さより正確な値になると考えられる。

長さ、面積以外の骨梁形態の指標としては、複雑性、連結性、異方性、配向性などが挙げられるが、これらの抽象的な

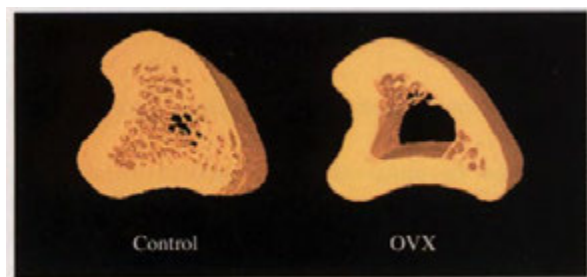


図4：骨梁3次元画像

3次元画像再構築アルゴリズムにより、3次元形態を可視化できる。図はMicro-CT (MCT-12505MF、日立メディコ) を用いて撮影した21週齢雌ラットの脛骨近位骨幹端部をワークステーション (ONYX2、Silicon Graphics、Mountain View、CA) 上で3次元レンダリングソフト (AVS Medical Viewer、KGT、東京) を用いて再構築した画像である。A；control、B；OVX ratであり、OVX ratで骨髄中央部の骨梁が消失しているのかわかる。

表2：各種3次元形態パラメータ

Tissue Volume (TV)	組織体積
Bone Volume (BV)	骨体積
Bone Surface (BS)	骨表面積
Surface to Volume (BS/BV)	骨体積表面積比
Bone Volume Fraction (BV/TV)	骨体積密度
Trabecular Thickness (Tb.Th)	骨梁幅
Trabecular Number (Tb.N)	骨梁数
Trabecular Separation (Tb.Sp)	骨梁間隙
Fractal Dimension	フラクタル次元 (複雑性指標、3次元Box Counting法で算出)
The First Betti Number (b1)	1次元ベッチ数 (連結性指標、Feldkamp法を用いて算出)
Connectivity Density (b1/TV)	連結性密度
Connectivity Index (b1/BV)	連結性指標
Mean Intercept Length (MIL)	構造異方性指標、極座標上でMIL楕円として出力

能になっている。^{5)・6)} 複雑性の指標としてフラクタル解析からFractal dimension、連結性の指標として位相幾何学的解析からThe first Betti number、fabric tensorで表す異方性・配向性の指標としてMean intercept length (MIL)、Volume orientation (VO)、Star volume distribution (SVD)、Star length distribution (SLD)等が提唱されている。さらに曲げ剛性の指標である断面二次モーメント、捻り剛性の指標である極断面二次モーメントがある。

前述したように、骨梁は異方性構造物であるので、これらの各種解析は極力3次元的に行うべきである。特に連結性の評価に2次元の評価を行っても、解析を行う平面の選択によっては全く意味をもたない結果しか得られない。

6. 今後の展望

ハード面からは、ハイビジョンCCD等の使用によるさらに高分解能の実現、撮影サンプルを載せるテーブルの遠隔制御システムの開発、同一個体を経時的に撮影するためのジグの開発、等があげられる。

ソフト面からは、日立メディコと我々でMicro-CT画像データを用いた骨三次元形態解析ソフトを現在開発中である。本ソフトは得られたスライス画像から上記のような補間操作による三次元ボクセルデータ作成、ノイズ除去、閾値処理、三次元画像再構築に加え、表に示した各種パラメータ計算が可能である。

今後種々のサンプルを用いて骨粗鬆症の病態解明、無重力空間の骨に対する影響の評価、薬効判定等に本研究が役立つことを願っている。また造影剤を使用して血管の三次元データが得られれば、それらの解析にも有用であろう。

参考文献

- 1) Kinny JH, et al : In vivo, three-dimensional microscopy of trabecular bone. J Bone Miner Res 10(2) : 264-270,1995
- 2) Majumdar S, et al : Evaluation of technical factors affecting the quantification of trabecular bone structure using magnetic resonance imaging. Bone 17(4) : 417-430,1993
- 3) 馬渡太郎、ほか：骨梁の連結性と複雑性の定量的評価・骨・関節・靭帯11(3) : 283-291,1998
- 4) Odgaard A : Three-dimensional method for quantification of cancellous bone architecture. Bone 20(4) : 315-328,1997
- 5) Mawatari T, et al : Quantitative analysis of three-dimensional complexity and connectivity changes in trabecular microarchitecture in relation to aging, menopause, and inflammation. J Orthop Sci, 1999 in