

学位論文

T2緩和差を利用した<sup>31</sup>P-NMRによる骨塩量・新生骨量測定法

齋藤 安奈

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織発生・再生工学  
(主指導教員:各務 秀明 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

A method of measurement for bone mineral density and  
newly formed bone quantity using <sup>31</sup>P-NMR T2 relaxation  
time

Anna Saito

Development and Engineering for Hard Tissue, Graduate School of Oral  
Medicine

(Chief Academic Advisor : Professor Hideaki Kagami )

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

## 要旨

### 【緒言】

歯槽骨の骨再生治療において、術前に新生骨量や骨質を知ることができれば、適切なインプラント埋入時期の決定に役立つ。また、骨組成や骨塩量の非侵襲的な解析は、系統的骨疾患の診断や研究にも有用である。再生骨に対しては、現在エックス線単純撮影や CT を用いた検査が行われているが、これらの方法では人工骨と新生骨とを見分けることは困難である。また、骨塩量や骨の組成に関しても、非侵襲的で短時間、かつ正確に測定する方法は限られている。これまでの研究で  $^{31}\text{P-NMR}$  を用いて、骨リン酸カルシウムの T1 緩和差を利用した海綿骨部の新生骨量測定法を確立したが、成熟骨と新生骨の割合を得るには二重エネルギーエックス線吸収測定 (DXA) 法などの骨塩量測定法を併用する欠点があった。また、 $^{31}\text{P-NMR}$  のみを用いて T1 緩和差を利用した骨塩量測定を行う場合には、測定が長時間となり実用性に欠けることが推測された。そこで、本研究では T2 緩和時間が T1 緩和時間よりも短いことに注目した。T2 緩和差を利用することで、 $^{31}\text{P-NMR}$  のみで新生骨信号量 (新生骨量)、骨塩信号量 (骨塩量) を測定する非侵襲的な短時間  $^{31}\text{P-NMR}$  二重測定法の確立を目的とした。

### 【方法】

$^{31}\text{P-NMR}$  による T2 緩和時間の測定条件の探索のため、各種合成リン酸カルシウムの T2 磁気緩和動態を Carr Purcell Meiboom Gill (CPMG) 法で測定した。Calculation delay、Relaxation delay、積算回数を変数として、それぞれについて最適化を行った。各種合成リン酸カルシウムを骨構成体と考えられているもの、骨リン酸カルシウムの前駆体と考えられているもの、そして人工骨補填剤などの生体硬組織移植材料に含まれる成分の 3 つに分類し、計 11 種類を使用した。合成リン酸カルシウムでの基礎検討の結果から、骨塩量、新生骨量の測定条件候補の決定をした。続いて、得られた測定条件候補値を利用し、マウス脛骨を用いた検討を行った。実験には 2, 4, 6, 9 ヶ月齢の雄 BALB/cAJcl マウスを各々 5 匹、合計 20 匹を用いた。 $^{31}\text{P-NMR}$ 、CPMG 法による T2 信号量の測定を行い、さらに同一サンプルについて、DXA 装置による骨塩量の測定を行った。また、テトラサイクリン、カ

ルセインによる骨二重標識(01TC-02-01CL)により組織学的な新生骨量の測定を行い、 $^{31}\text{P-NMR}$ 、CPMG法によるT2信号量の測定結果との比較を行った。

#### 【結果】

CPMG法での測定条件のうち、 $\tau_{\text{step}}$ は使用した機器における最小値の182 $\mu$ 秒に設定した。Calculation delayを変数とした場合、特に骨構成体に含まれる材料と生体硬組織移植材料との違いが最も描出されたのが0.348m秒であったため、この値に固定した。次に合成リン酸カルシウムの信号量に及ぼすRelaxation delayと積算回数については、予備実験から候補となる5つの測定条件を決定した。解析の結果、 $^{31}\text{P-NMR}$ の各条件による信号量とDXAによって測定した骨塩量との間には、相関は認められなかった。一方、 $^{31}\text{P-NMR}$ の各条件による信号量と海綿骨部の新生骨量(面積)との間には、特にRelaxation delay 10秒、積算回数60回において最も強い相関が認められた。

#### 【考察】

組織学的に解析した海綿骨部の新生骨の面積とT2緩和時間では、Relaxation delay 10秒、積算60回(測定約10分)を含む複数の条件下で有意な相関を認めたことから、 $^{31}\text{P-NMR}$ のT2緩和差を利用することで、新生骨量が非侵襲的に測定できる可能性が示唆された。この測定法を将来骨再生医療に用いることができれば、同時に移植された人工骨の影響を排除して、新生骨量のみを測定できる可能性が示された点で画期的と考えられる。また、DXAによって測定した骨塩量とT2緩和時間では相関を認めなかったことから、 $^{31}\text{P-NMR}$ のT2緩和差のみで骨塩量を測定することは困難と考えられた。その理由として、 $^{31}\text{P-NMR}$ では骨リン酸カルシウムのリンの信号を測定していることから、加齢によって骨リン酸カルシウムの組成の内、カルシウムなどの他のミネラル量が変わることが考えられた。今回の結果から、 $^{31}\text{P-NMR}$ のT2緩和差を利用した解析は、今後非侵襲的な再生骨量や骨組成の検査に有用である可能性が示された。

## 緒 言

インプラントによる治療には、インプラントを支えることができる十分な骨量が必要である。しかしながら、歯槽骨が高度に吸収している症例も少なくないため、歯槽骨再生治療が行われている<sup>1)</sup>。現在の歯槽骨再生治療の課題の一つは、骨再生の程度や期間にばらつきが大きいいため、インプラント埋入可能な時期の判断が難しいことである。したがって、再生骨の状態を、術前にできるだけ非侵襲的に把握する評価法の開発が望まれる。

近年、骨再生には人工骨と自家骨の組み合わせが広く用いられており、再生骨の評価には単純エックス線写真、コーンビーム CT あるいは CT による評価が行われている<sup>2)</sup>。しかしながら、生体吸収性の人工骨ではエックス線不透過性は経時的に減少し、逆に再生骨のエックス線不透過性は徐々に増加するため、エックス線不透過性の程度や CT 値で両者を区別することは不可能である。そこで、移植物における骨再生の程度を正確に把握するためには、再生骨と人工骨とを区別できる評価法が必要であるが、これまで実用化されていない。

一方、骨粗鬆症などの骨疾患では、疾患の程度の把握や治療効果の判定のために、骨塩量の測定が広く行われている<sup>3)</sup>。骨塩量の定量には、主にエックス線を利用する方法と超音波を利用する方法とがある。dual-energy X-ray absorptiometry 法 (DXA 法) は、2 種類のエネルギーのエックス線を測定部位に当てることにより、骨成分を他の組織と区別して測定する方法で、比較的簡便に骨密度を測定することができる<sup>3)</sup>。DXA 法は現時点では最も優れた骨塩量の測定法と考えられるが、わずかではあるものの被曝を伴う。このほかに超音波を利用した骨密度測定法である Quantitative Ultrasound 法 (QUS 法) が利用されているが、その正確性は不十分である<sup>3)</sup>。これらの状況から、被曝が無く正確に骨塩量と新生骨量を合わせて測定するための方法として、わ

れわれは核磁気共鳴法（Nuclear Magnetic Resonance 法または NMR 法）に着目した。

NMR 法は、化合物の分子構造や物性の解析を行うことが可能であり、生命科学をはじめとして幅広い分野で活用されている<sup>4, 5)</sup>。さまざまな核種を測定する事ができ、同位体の識別も可能であると同時に、非破壊・非侵襲的な測定であることが利点である。その一方で骨の解析にはあまり利用されていない。NMR 法においては水素原子を用いることが多いが、骨の硬組織はリン酸カルシウムであることから、われわれは新たな測定法として、リンの核磁気共鳴を利用した<sup>31</sup>P-NMR 法に着目した。<sup>31</sup>P-NMR 法による解析では、bisphosphonates と骨との結合状態の解析や<sup>6)</sup>、骨密度の解析に少数の文献がみられるのみであり<sup>7)</sup>、新生骨量の評価に用いた報告はない。

本研究の前に行われた検討において、各種リン酸カルシウムの T1 磁気緩和動態を測定し、六方晶や非晶質など緩和時間の短いリン酸カルシウム信号量（短緩和型リン酸カルシウム）を 5 分で測定できる条件を確立した<sup>8)</sup>。また、DXA 法による骨密度との比較から、短緩和型リン酸カルシウムによる信号量が海綿骨部の新生骨由来であることが判明した<sup>8)</sup>。しかしながら、T1 緩和時間を用いた方法では骨塩量の測定は骨中のすべてのリン酸カルシウムの緩和が終了する必要があることから、測定が長時間となることが予測された。そこで、今回われわれは T1 緩和が始まる前に緩和が終了する T2 緩和を利用した、短時間<sup>31</sup>P-NMR 法による骨密度と新生骨量の新たな測定法の開発を試みた。

## 研究方法

### （1）<sup>31</sup>P-NMR 法、T2 磁気緩和時間による測定条件の探索

<sup>31</sup>P-NMR 法による T2 緩和時間の測定条件の探索のため、各種合成リン酸カルシウムの T2 磁気緩和動態を Carr Purcell Meiboom Gill (CPMG) 法で測定した（図 1）。各種合成リン酸カルシウムを、骨構成体と考えられているもの、骨リン酸カルシウムの前駆体と考えられているもの、そして人工骨補填剤などの生体硬組織移植材料に含まれる

成分の3つに分類し、計11種類を測定に使用した。骨構成体と考えられているものとしては、ハイドロシキアパタイト（六方晶）、フルオロアパタイト六方晶を、骨リン酸カルシウムの前駆体と考えられているものとして、二リン酸三カルシウム非晶質、オクタカルシウムフォスフェート三斜晶、カーボネートアパタイト、Ca欠損ハイドロシキアパタイト、ACPを、生体硬組織移植材料に含まれる成分として、ハイドロシキアパタイト単斜晶、テトラカルシウムフォスフェート単斜晶、 $\alpha$ -トリカルシウムフォスフェート単斜晶、 $\beta$ -トリカルシウムフォスフェート三方晶を用いた。これらの合成リン酸カルシウムのT2緩和動態の測定には、NMR装置（JNM-ECA600；600MHz、日本電子株式会社、東京、日本）を使用した。対象核種を $^{31}\text{P}$ に設定し、Calculation delay、Relaxation delay、積算回数を変数として、それぞれについて最適化を行った（図1）。なお、使用したNMR装置の $\tau$  stepの最小値は182 $\mu$ 秒であったため、本実験では182 $\mu$ 秒に設定した。合成リン酸カルシウムでの基礎検討の結果から、動物を用いた骨塩量、新生骨量の測定条件候補を決定した。

## （2）マウス脛骨での $^{31}\text{P}$ -NMR法、T2磁気緩和時間と骨塩量、新生骨量（面積）との相関

続いて、得られた測定条件候補値を利用し、マウス脛骨を用いた検討を行った。実験には2, 4, 6, 9ヶ月齢の雄BALB/cAJc1マウスを各5匹、合計20匹を用いた。骨二重標識（01TC-02-01CL）のため、1日目にテトラサイクリン（0.02mg/g）、4日目にカルセイン（0.01mg/g）を皮下注射し、5日目に安楽死後に骨近位部を摘出して、70%エタノールにて固定した。その後同部位を用いて以下の測定を実施した。

- ① $^{31}\text{P}$ -NMR法（CPMG法）によるT2信号量の測定。
- ②DXA法（二重エネルギーエックス線吸収測定装置）による骨塩量測定：小動物モードでマウス脛骨近位部の骨塩量を測定した。
- ③骨形態計測による新生骨量（面積）の測定：テトラサイクリン（TC）およびカルセイン（CL）による二重標識後摘出した大腿骨の非脱

灰薄切切片を作成し、蛍光顕微鏡にて撮影した。全体像を撮影し JPEG 画像として保存した。Image J にて皮質骨を除外し、海綿骨部分のデータをさらに二値化して、標識された新生骨部の面積を測定した。

DXA 法による骨塩量と組織学的な新生骨量の結果と、 $^{31}\text{P}$ -NMR 法 (CPMG 法) による T2 信号量の測定結果との比較を行った。 $^{31}\text{P}$ -NMR 信号量と DXA 法による骨塩量および骨形態計測による新生骨量との相関を解析し、有効な計測条件を得られるかどうか検討した。

### (3) 統計学的解析

合成リン酸カルシウムの信号量に及ぼす各変数の影響については、ステップワイズ増加法による回帰分析を用いた。また、T2 緩和時間と骨塩量および新生骨量との相関関係の解析には相関係数を用いた。

## 結 果

### (1) $^{31}\text{P}$ -NMR 法、T2 磁気緩和時間による測定条件の探索

初めに、11 種類の合成リン酸カルシウムの T2 緩和動態を調べた。 $\tau$  step は使用機器の最小値である  $182\mu$  秒に固定した。Calculation delay を変数とした場合の T2 緩和動態の信号量から、比較的高値 (A 群) と比較的定値 (B 群) の 2 群に分けられることが明らかとなった (図 2)。また、この条件で新生骨と人工骨との信号量に差が出るのが期待されたため、以後の検討では、AB 群間の信号量の差が大きい Calculation delay  $0.348\text{m}$  秒に固定することとした。

合成リン酸カルシウムの信号量に及ぼす Relaxation delay と積算回数の影響をさらに検討し、条件の候補値を探した。ステップワイズ増加法による回帰分析では、合成リン酸カルシウムの信号量に及ぼす Relaxation delay と積算回数の影響から、Relaxation delay が影響し、信号量との関係は有意な正回帰を示した。一方、積算回数の影響は少ないものと考えられた (図 3)

したがって、Relaxation delay を変数として、骨塩量および新生骨

量を抽出可能な条件を検討した。その結果、5つの条件を候補値とした(図4)。総測定時間は候補値3の Relaxation delay 100秒、積算回数4回が6.7分と最も短くなった。なお、 $\tau$  step、Calculation delay、データ取り込み時間の ACQT は固定値とした。

(2) マウス脛骨での  $^{31}\text{P}$ -NMR 法、T2 磁気緩和時間と骨塩量、新生骨量(面積)との相関

続いて5つの候補値を用いて骨塩量の測定を行った。マウスにおける月齢毎の骨塩量は比較的一定していると考えられるが、 $^{31}\text{P}$ -NMR 法(CPMG法)による T2 信号量の測定では、信号量は各月齢でばらつきが大きく、 $^{31}\text{P}$ -NMR 法による骨塩量測定は困難であることが推測された(図5)。また  $^{31}\text{P}$ -NMR 法で測定した仮の骨塩量と、DXA 法によって測定した骨塩量の相関を調べた結果、今回用いた  $^{31}\text{P}$ -NMR 法の測定条件において相関は認められなかった(図6)。

次に  $^{31}\text{P}$ -NMR 法(CPMG法)による T2 信号量の測定から、新生骨量の測定が可能かどうかの検討を行った。月齢による比較では、月齢が上昇するとともに信号量が低下する一定の傾向が認められた(図7)。海綿骨部の3日間の骨新生量の組織学的解析の結果と T2 信号量の相関を比較したところ、Relaxation delay 10秒、積算回数60回の  $^{31}\text{P}$ -NMR 法の測定条件で最も強い相関を認めた(図8)。

## 考 察

今回用いた  $^{31}\text{P}$ -NMR 法(CPMG法)による T2 信号量の測定条件では、DXA 法によって測定した骨塩量との相関を認めなかったことから、骨塩量の測定は困難と考えられた。その理由として、加齢によって今回測定したリン以外のカルシウムなど、他のミネラル量に変化があることが一因と考えられた。しかしながら、Cao らは骨粗鬆症モデルラットを用いて、 $^{31}\text{P}$ -NMR 法を用いた骨密度の測定が可能であったことを報告している<sup>7)</sup>。本研究との違いは、Cao らは  $^{31}\text{P}$ -NMR 法に加えて  $^1\text{H}$ -NMR 法を併用しており、さらに独自の  $^{31}\text{P}$  solid-state magnetic



resonance imaging (SMRI) to visualize bone mineral と water-and fat-suppressed projection imaging (WASPI)法を開発して骨密度の測定に用いている点があげられる。したがって、今回われわれが用いた  $^{31}\text{P}$ -NMR 法の T2 緩和差のみの測定では、骨密度の測定は困難である可能性がある。

一方で、蛍光発色させた海綿骨部の新生骨の面積と T2 緩和時間は Relaxation delay 10 秒、積算 60 回（測定約 10 分）で有意な強い相関を認めたことから、初期新生骨の信号量が測定できるものと考えられた。この測定法では同時に移植された人工骨の影響を排除して、新生骨量を測定できる可能性を示した点で画期的と考えられる。六方晶と三方晶や単斜晶との信号量の違いを示した今回の結果から、 $^{31}\text{P}$ -NMR 法による T2 緩和時間は結晶構造の影響を受けることが明らかとなった。同じ化学式であっても結晶構造の違いを描出できることから、人工骨と再生骨、あるいは病的な骨組織とを識別できる可能性があり、臨床評価や研究への応用が期待される。

問題点としては、今回用いた NMR 装置は 14.1 テスラという非常に強い磁場で測定している点があげられる。マウスと比較して、ヒトでは骨そのものが大きいいため、同じ磁場でも得られる信号量は増加する。したがって、今回得られた結果が、より臨床的な磁場である 1.5-3.0 テスラでも得られる可能性は高い。今後臨床研究において確認していくことが重要である。本研究では、通常 NMR 法に用いられている水素原子ではなくリン ( $^{31}\text{P}$ ) を用いている。リンを用いた NMR 法が実施可能な施設は限られており、その普及のためには、本研究以外にもリンを用いた NMR 法の有用性が広く示されることが必要であろう。

## 結 論

$^{31}\text{P}$ -NMR 法の T2 緩和差を利用することで、新生骨量や骨組成が非侵襲的に測定できる可能性が示唆された。 $^{31}\text{P}$ -NMR 法の T2 緩和差を利用した解析は、今後、骨再生医療や骨系統疾患の診断、研究への応用が期待される。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際し、終始御指導、御校閲をいただきました大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座 臨床病態評価学 篠原 淳前教授、そして硬組織発生・再生工学 各務秀明教授に謹んで感謝の意を表します。

最後に、この研学生活を絶えず支え励ましてくれました両親（父：齋藤淳一、母：齋藤暁美）に心から感謝致します。

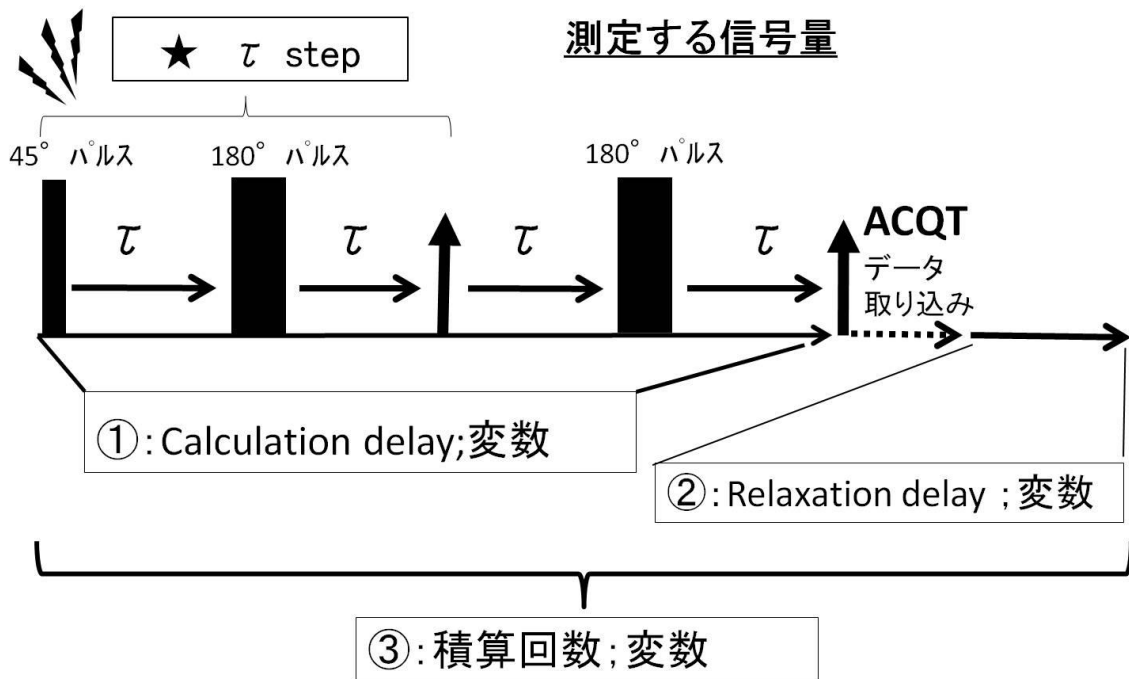
## 参考文献

- 1) Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita , Imai K. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Tissue Eng Part B Rev.* 20: 229-232, 2014.
- 2) Sisti A, Canullo L, Mottola MP, Covani U, Barone A, Botticelli D. Clinical evaluation of a ridge augmentation procedure for the severely resorbed alveolar socket: multicenter randomized controlled trial, preliminary results. *Clin Oral Implants Res.* 23:526-535, 2012.
- 3) 骨粗鬆症の 予防と治療ガイドライン 2015 年版 - 日本骨代謝学会 2015.
- 4) Ironside MS, Duer MJ, Reid DG, Byard S. Bisphosphonate protonation states, conformations, and dynamics on bone mineral probed by solid-state NMR without isotope enrichment. *Eur J Pharm Biopharm.* 76:120-126, 2010.
- 5) Mulkern RV, Meng J, Oshio K, Guttmann CR, Jaramillo D. Bone marrow characterization in the lumbar spine with inner volume spectroscopic CPMG imaging studies. *J Magn Reson Imaging.* 4:585-589, 1994.
- 6) Davies E, Duer MJ, Ashbrook SE, Griffin JM. Applications of NMR crystallography to problems in biomineralization: refinement of the crystal structure and <sup>31</sup>P solid-state NMR spectral assignment of octacalcium phosphate. *J Am Chem Soc.* 134:12508-12515, 2012.

- 7) Cao H, Nazarian A, Ackerman JL, Snyder BD, Rosenberg AE, Nazarian RM, Hrovat MI, Dai G, Mintzopoulos D, Wu Y. Quantitative  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy and  $^1\text{H}$  MRI Measurements of Bone Diseases in Rat Models. Bone. 46:1582-1590, 2010.
- 8) 篠原淳 T2緩和差を利用した  $^{31}\text{P}$ -NMRによる骨塩量・新生骨量測定法 科学研究費助成事業 研究成果報告書 2015.

### T2緩和の測定: Carr Purcell Meiboom Gill (CPMG)法

共鳴ラジオ波を照射



$$\text{測定時間} \div ((1) + \text{ACQT} + (2)) \times (3)$$

図 1

- ①  $\tau$  ステップ = 182  $\mu$  sec
- ② Calculation delay = 変数 msec
- ③ Relaxation delay = 4sec
- ④ 積算 = 1024回

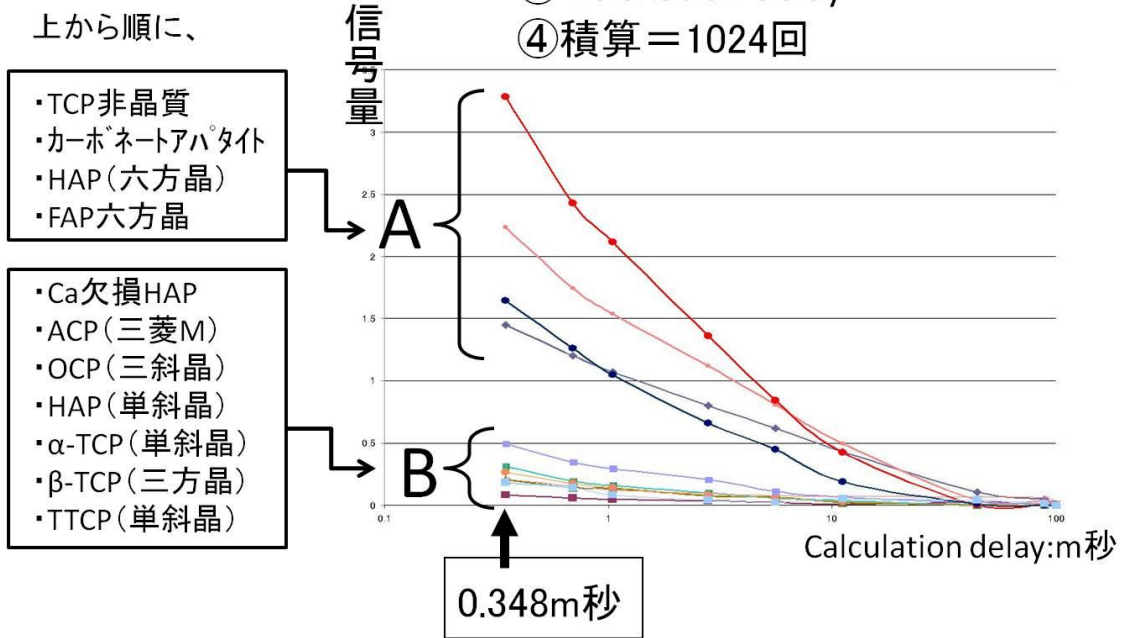


図 2

リン酸カルシウムの種類	r <sup>2</sup> 値	p値	採用項目	不採用項目
トリカルシウムフォスフェート;TCP(非晶質)	0.920	0.0064	Relaxiation delay	積算回数
$\alpha$ -TCP(単斜晶)	1.000	<0.0001	Relaxiation delay	積算回数
$\beta$ -TCP(三方晶)	0.999	<0.0001	Relaxiation delay	積算回数
ヒドロキシアパタイト;HAP(六方晶)	0.992	0.0003	Relaxiation delay	積算回数
HAP(単斜晶)	0.999	<0.0001	Relaxiation delay	積算回数
テトラカルシウムフォスフェート;TTCP(単斜晶)	1.000	<0.0001	Relaxiation delay	積算回数
オクタカルシウムフォスフェート;OCP(三斜晶)	0.999	<0.0001	Relaxiation delay	積算回数
フルオロアパタイト;FAP(六方晶)	0.970	0.0003	Relaxiation delay	積算回数
カーボネートアパタイト;CHAP	0.988	0.0006	Relaxiation delay	積算回数
カルシウム欠損ヒドロキシアパタイト;HAP	0.999	<0.0001	Relaxiation delay	積算回数

図 3

### 新生骨量の測定の場合の候補の設定

	Relaxiation delay (秒)	積算回数	総測定時間(分)
1	10	60	10
2	30	20	10

### 骨塩量の測定の場合の候補の設定

	Relaxiation delay (秒)	積算回数	総測定時間(分)
3	100	4	6.7
4	200	3	10
5	600	2	20

(固定値:  $\tau$  ステップ = 182  $\mu$  秒、CD = 0.348m秒、ACQT 26.8m秒)

図 4

固定値:  $t_{step}=182\mu\text{秒}$ 、  
 $CD=0.348\text{m秒}$ 、 $ACQT=26.8\text{m秒}$

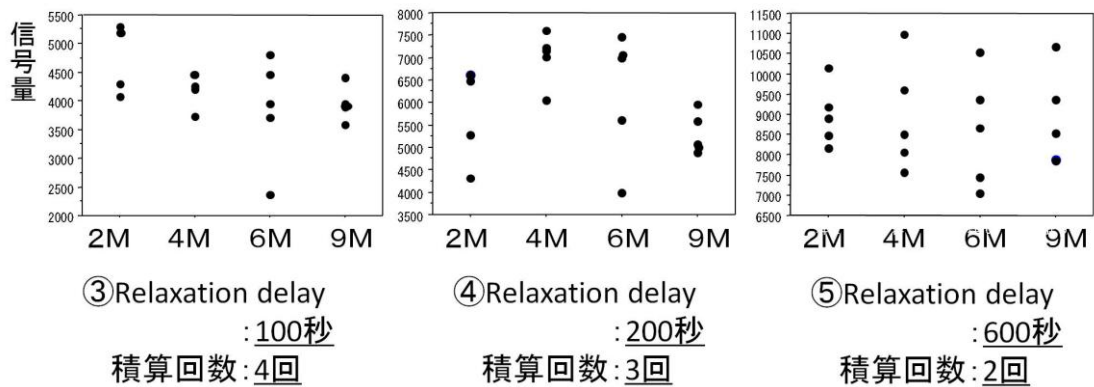
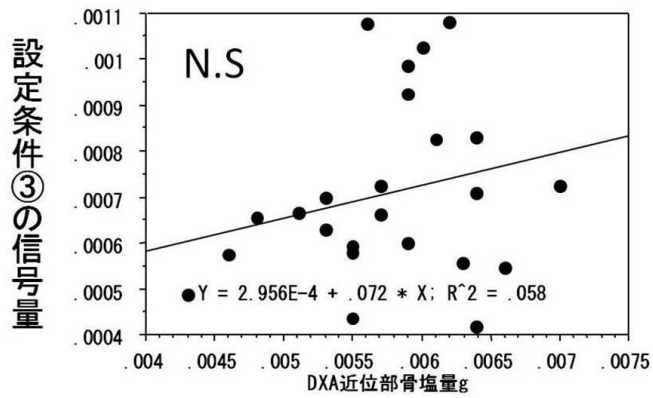


図 5



	Relaxation delay (sec)	積算回数	測定時間(min)	相関係数(r)	p値
①	10	60	10	0.057	0.7916
②	30	20	10	0.242	0.2553
③	100	4	6.7	0.242	0.2540
④	200	3	10	0.228	0.2845
⑤	600	2	20	0.108	0.6165



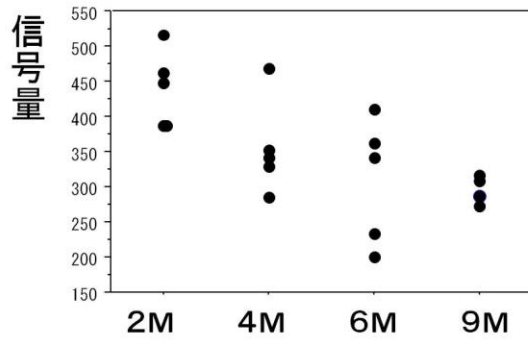
relaxation delay 100秒  
積算4回  
(測定時間約6.7分)

相関なし

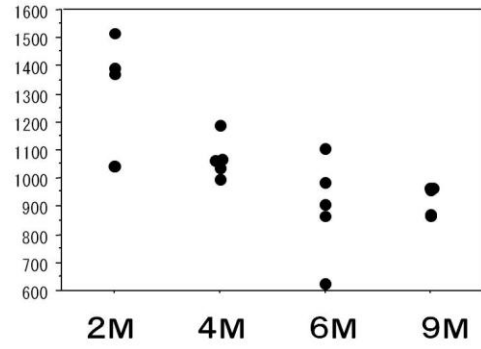
図 6

固定値:  $\tau_{step} = 182\mu\text{秒}$ 、

CD = 0.348m秒、ACQT = 26.8m秒



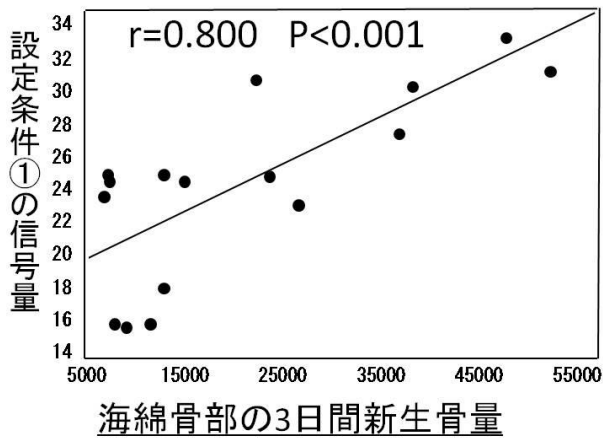
① Relaxation delay  
: 10秒  
積算回数: 60回



② Relaxation delay  
: 30秒  
積算回数: 20回

図 7

	Relaxation delay (sec)	積算回数	測定時間 (min)	相関係数 (r)	p値
①	10	60	10	0.800	0.0002
②	30	20	10	0.761	0.0006
③	100	4	6.7	0.452	0.0785
④	200	3	10	0.483	0.0580
⑤	600	2	20	0.043	0.8738



Relaxation delay 10秒  
積算60回  
(測定時間約10分)

強い相関あり

図 8

## 図の説明

図 1 : T2 緩和の測定 : Carr Purcell Meiboom Gill (CPMG)法

本検討では、T2 緩和の測定に、CPMG 法を用いた。図の左から右へ時間が進むものとして、緩和時間と変数を記載した。なお、 $\tau$  step を★印で示したが、これは  $\tau \times 2$  + リンの共鳴周波数の照射時間とした。① Calculation delay、データ取り込み時間の ACQT、②の Relaxation delay までが 1 測定のサイクルであり、このサイクルの回数が③の積算回数となる。実際の測定時間は (Calculation delay + ACQT + Relaxation delay)  $\times$  積算回数で表される。

図 2 : 11 種類の合成リン酸カルシウムを用いた T2 緩和時間の測定

ハイドロシキアパタイト (六方晶)、フルオロアパタイト六方晶は骨構成体と考えられるもの、二リン酸三カルシウム非晶質、オクタカルシウムフォスフェート三斜晶は骨リン酸カルシウムの前駆体、ハイドロシキアパタイト単斜晶、テトラカルシウムフォスフェート単斜晶、 $\alpha$ -トリカルシウムフォスフェート単斜晶、 $\beta$ -トリカルシウムフォスフェート単斜晶は生体硬組織移植材料として使用した。 $\tau$  step 182  $\mu$  秒、Relaxation delay 4 秒、積算回数 1024 回で固定し、Calculation delay を変数とした。T2 緩和動態の信号量から、比較的高値 (A 群) と比較的定値 (B 群) の 2 群に分けることが可能であった。

図 3 : ステップワイズ増加法による回帰分析

11 種類の合成リン酸カルシウムについて、合成リン酸カルシウムの信号量に及ぼす Relaxation delay と積算回数の影響を検討した。Relaxation delay と信号量のみが有意な正回帰を示した。

図 4 : 骨塩量、新生骨量の測定条件候補の決定

Relaxation delay と積算回数を変数として、骨塩量および新生骨量を抽出可能な 5 条件を計測候補とした。

図 5: 骨塩量測定条件における信号量の月齢による変化

骨塩量測定のために設定した条件にて、月齢ごとの信号量を測定した。グラフの縦軸は NMR 信号量で、横軸は月齢を表す。

図 6: 骨塩量 (DXA 法) と  $^{31}\text{P}$ -NMR 法 (CPMG 法) による信号量の相関

$^{31}\text{P}$ -NMR 法で測定した仮の骨塩量と、DXA 法によって測定した骨塩量の相関は認められなかった。各月齢 6 匹、計 24 検体の結果を表す。

図 7: 新生骨量測定条件における信号量の月齢による変化

設定した新生骨量の測定条件で、各月齢ごとの  $^{31}\text{P}$ -NMR 法 (CPMG 法) による信号量を測定したところ、月齢により信号量が低下する傾向が認められた。グラフの縦軸は NMR 信号量で、横軸は月齢を表す。

図 8: 海綿骨部の新生骨量 (面積) と  $^{31}\text{P}$ -NMR 法 (CPMG 法) による信号量の相関

$^{31}\text{P}$ -NMR 法 (CPMG 法) による信号量と海綿骨部の 3 日間骨新生量の組織学的解析の結果と比較したところ、①Relaxation delay 10 秒、積算回数 60 回および②Relaxation delay 30 秒、積算回数 20 回の  $^{31}\text{P}$ -NMR 法の測定条件で相関を認めた。グラフには①における新生骨量 (横軸) と信号量 (縦軸) との相関を示す。各月齢 4 匹、計 16 検体の結果。