

論文目録

岐阜大学

報告番号	乙第1019号	氏名	高木宣雄
主論文			
		画像処理による骨破壊の評価 —ラット・アジュバンド関節炎モデルを用いて— 平成7年9月発行 岐阜大医紀 43 (5) : 601~610	1冊
参考論文			
1)		甲状腺機能亢進症を有する患者の緊急手術 昭和55年発行 日本歯科麻酔学会雑誌 8 (3) : 471~476	1冊
2)		ヤマシリンの口腔領域における感染症に対する治験成績 昭和55年5月発行 歯科ジャーナル 11 (5) : 685~688	1冊
3)		結核性頸部リンパ節炎の1例 昭和55年10月発行 日本口腔外科学会雑誌 26 (5) : 1230~1234	1冊
4)		Enflurane 麻酔とミオグロビン尿症 昭和55年12月発行 麻酔と蘇生 16 (4) : 219~222	1冊
5)		Cervical Island Skin Flap変法による口腔領域悪性腫瘍切除後の即時再建 昭和56年8月発行 日本口腔外科学会雑誌 27 (8) : 1082~1089	1冊
6)		鼻口蓋嚢胞の1例と電顕的観察 昭和56年12月発行 日本口腔外科学会雑誌 27 (12) : 1826~1830	1冊
7)		他科入院時に発見, 転科した進展性口腔癌の1例 昭和56年12月発行 岐阜市民病院年報 1 : 115~118	1冊
8)		脂肪腫の2例と文献的考察 昭和58年9月発行 日本口腔外科学会雑誌 29 (9) : 1584~1590	1冊
9)		口腔領域におけるNaproxenの鎮痛効果についての検討 昭和58年11月発行 歯界展望 62 (5) : 1039~1043	1冊
10)		Warthin腫瘍の1例と文献的考察 昭和59年3月発行 日本口腔外科学会雑誌 30 (3) : 351~358	1冊
11)		急性炎症をともなった巨大な顎下腺管内唾石症の1例 昭和59年10月発行 臨床歯科 311 : 1~4	1冊
12)		ガッセル神経節刺激電極埋め込み術の経験 昭和61年1月発行 麻酔 35 (1) : 139~142	1冊
13)		長期経過をたどったCarcinoma in pleomorphic adenomaの1例 昭和61年1月発行 日本口腔科学会雑誌 35 (1) : 252~258	1冊
14)		Blue rubber-bleb nevus syndromeの1例 昭和61年4月発行 日本口腔外科学会雑誌 32 (4) : 627~630	1冊

- | | |
|--|----|
| 15) 口腔外科領域における凍結手術の現況
昭和61年10月発行 Cryosurgery研究会誌 10. 11 : 1~5 | 1冊 |
| 16) 異時性重複癌を伴った口腔内多発癌
昭和63年4月発行 日本口腔科学会雑誌 37 (2) : 451~460 | 1冊 |
| 17) The platysma myocutaneous flap for oral reconstruction Experience with
MacFee's cervical incision
平成元年10月発行 J. Cranio-Max.-Fac. Surg. 17 : 318~322 | 1冊 |
| 18) Pleomorphic adenoma of the sublingual gland diagnostic consideration and
report of a case
平成元年1月発行 Hosp. Dent. 1 (1) : 28~30 | 1冊 |
| 19) 炎症性骨吸収に関する研究 (I)
内毒素 (LPS) による骨吸収と抗炎症剤の効果について
平成5年9月発行 岐阜大医紀 41 (5) : 793~803 | 1冊 |
| 20) 下顎智歯と下顎管の位置関係 -CTによる術前評価-
平成6年1月発行 日本口腔外科学会雑誌 40 (1) : 148~154 | 1冊 |
| 21) 顎関節症症状を示した仮性球麻痺の1例
平成7年6月発行 日本口腔外科学会雑誌 41 (6) : 558~560 | 1冊 |

画像処理による骨破壊の評価

ラット・アジュバント関節炎モデルを用いて

高 木 宣 雄

岐阜大学医学部口腔外科学講座 (主任 岡 伸光教授)

Evaluation of the Bone Destruction by a Computer-based Image Analysis
Studies on Adjuvant Arthritis Rats

Norio TAKAGI

Department of Oral Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director : Prof. N. OKA)

Reprinted from

ACTA SCHOLAE MEDICINALIS UNIVERSITATIS IN GIFU

Vol. 43 No. 5 September 1995

画像処理による骨破壊の評価

ラット・アジュバント関節炎モデルを用いて

高木 宣雄

岐阜大学医学部口腔外科学講座 (主任 岡 伸光教授)

Evaluation of the Bone Destruction by a Computer-based Image Analysis
Studies on Adjuvant Arthritis Rats

Norio TAKAGI

Department of Oral Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director : Prof. N. OKA)

To evaluate the bone destruction, a variety of noninvasive techniques for measuring bone density is developed, *e.g.*, single-photon absorption, quantitative computed tomography and dual-energy X-ray absorptiometry. However, these methods have not yet been sufficient to study bone morphology in any small sites or small bones such as maxillary bone. In this paper, the changes in bone morphology in rats, arising from adjuvant arthritis, were studied using an image analysis of the soft X-ray photogram by a micro computer.

1) Pharmacological and biochemical evaluation of the bone destruction in the adjuvant arthritis rats.

Adjuvant arthritis was induced in male SD rats by the injection of *Mycobacterium butyricum* in liquid paraffin in a hindpaw. The extensive bone damage was observed in the tarsometatarsal region, femoral diaphyseal bone and tibial bone on radiographs during the development of the second stage inflammation 10 days after the adjuvant injection. By treating rats with dexamethazone (0.1 mg/kg/day, p.o.), both of disease and bone damage were inhibited remarkably.

Alkaline phosphatase (ALP) and DNA in femoral diaphyseal bone were extracted using an ultrasonic applicator based on the resonance effect, and then metal contents such as Ca, P, Mg, Cu and Zn were determined by a sequential plasma spectrometer. Bone ALP activity was significantly increased and DNA content was unchanged in the adjuvant arthritis rats compared to non-arthritic rats. A statistical significant increase in bone Cu and Zn contents, but no significant changes on bone Ca, P and Mg contents were observed in the adjuvant arthritis rats.

2) Radiographic image analysis of the changes in bone morphology in the adjuvant arthritis rats.

A system is based on a personal computer with commercially available software, coupled to a standard monochrome CCD camera, in turn focused on the radiograph of interest. Thus, the tarsometatarsal region and femoral diaphyseal bone were examined. An soft X-ray photogram was obtained with an aluminum wedge on the same film and gray level of each photogram was corrected.

Distribution of gray level in an image frame was demonstrated as a histogram of bone density in the intended unit area. The histogram patterns varied depending upon an extent of bone destruction. An image from no destructive bone displayed the normal distribution curve. Development of the destruction was recognized clearly as a change to an irregular pattern. To evaluate bone density distribution, line graph pattern on a certain line was processed. This pattern strictly depicted the level of hyperplastic proliferation of bone.

For the morphometric analysis, the mapping of bone destruction was obtained as binary image. The area of the binary image/area of the frame ratios reflected some distortion of the bone shape. To characterize the shape of bone destruction, segment image was extracted. This technique was of great advantage to remove interference from the soft tissues around the bone. Sum of the length of segment was the most sensitive parameter reflecting morphological changes in the bone destruction, particularly a change of trabecular arrangements.

In conclusion, this simple and economical technique of a computer-based image analysis of standard exposure radiographs can readily detect and quantify morphological changes of bone in the intended unit area. The histogram pattern of gray level in an image frame and the segment image analysis may be useful for the clinical evaluation of bone destruction.

Acta Sch Med Univ Gifu 43 ; 601-610 (1995)

Key words : bone destruction, gray level image, binary image, segment image

緒 言

骨粗鬆症のように骨破壊が進行する疾患を評価するには骨量の正確な測定が必要とされる。そのため、非侵襲的に骨破壊の程度を定量化する目的で骨塩量の測定が行われるようになり single photon absorptiometry 法¹⁾, dual photon absorptiometry 法²⁾, dual energy X-ray absorptiometry 法³⁾などに基づく測定装置が近年広く応用されている。他方、骨破壊像の臨床的評価法は基本的にはX線を用いる画像診断で行われている。すなわち、単純X線写真⁴⁾あるいはそれが進化したものにCTがあるが、破壊程度を定量的に取り扱うことは不可能である。そのため、骨破壊の程度(骨質)を定量化する試みも種々行われており、とくにQ-CT (quantitative computed tomography) が骨塩量の相対的定量と共に画像の定量化が可能なることから有用な方法⁵⁾であると言われている。さらに、最近では超音波照射後の超音波減衰測定、超音波伝導速度測定⁷⁾の応用も試みられている。しかしながら、これらの装置は比較的長い測定時間を必要とするのみならず、顎骨のような小面積で複雑な骨試料の測定は依然として困難である。

さて、X線写真像から間接的に骨塩量の変化を知る目的で、画像の黒化濃度を microdensitometry 法⁸⁾⁹⁾により測定することが従来より行われている。この場合、黒化の程度は高い精度で測定できたとしても、複数のX線写真間での比較精度は低く、また測定は線上のみであり面を把握できない欠点がある。また、厚みを有する骨と、その周囲をとりまく軟組織を含む軟X線写真は像の重なり合いがあり、そのままでは画像解析に適当とは言えない。しかし、X線写真画像は高い濃度分解能および空間分解能を有しており、得られる情報は多い。コンピューターを用いて写真画像をデジタル化後画像処理によって必要な画像を抽出・再構成し、解析する技術は現在広範囲に用いられており¹⁰⁾、骨変化の客観的評価に使用できる可能性が考えられる。画像処理技術および使用されるコンピューターは多岐にわたっているため、ここでは最も一般的なマイクログラフコンピューターと画像処理汎用ソフトウェアで構成されている画像処理装置を用い、軟X線写真の画像解析から骨破壊を密度変化と形態変化の両面から統合的かつ定量的に解析する簡便な評価法開発を試みた。

実験には骨破壊を臨時的にとらえられるモデルとしてラットのアジュバント関節炎を用いた。アジュバント関節炎ラットはヒトの慢性関節リウマチのモデルとして広範囲に検討されている¹¹⁾。二次炎症の発症とともに、罹患関節近傍ではヒトの Havers 管に相当すると考えられる組織である骨皮質内血管周囲の骨吸収が著しく認められ、同部位の炎症性細胞浸潤があり、慢性関節リウマチの傍関節性骨粗鬆症の組織所見と類似している。そのため本モデルは骨粗鬆モデルとしても有用であると考えられている¹²⁾。

まず、ラットにアジュバント注射後、二次炎症進展が著しい14日目(day 14)および二次炎症が確立し保持されている24日目(day 24)に後肢の軟X線写真を得た。ついで、比較的高解像度のビデオカメラによりX線写真の濃度変化を輝度変化として画像処理装置に取り込み解析した。同時に day 25 に骨を摘出後、アルカリフォスファターゼ活性、DNA 量、各種金属量を定量し、骨破壊の程度とこれらの生化学的パラメーターの関係についても検討した。なお、これらの試験においてステロイドとしてデキサメタゾン投与の効果も併せて試験した。

アジュバント関節炎ラットにおいて踵骨、大腿骨、足根骨、中足骨および脛骨などに破壊像を認めた。これらの破壊の程度と生化学的パラメーターとの間に有意な関係を見いだすことは困難であった。しかし、後肢の軟X線写真をデジタル化後、目的とする骨画像を抽出して画像解析した成績は骨変化の状態を評価する目的にかなう結果が得られ、非侵襲的に骨破壊を評価する方法として有用と考えられた。

材料と方法

(1) 実験動物

SD系雄性ラット(中部科学資材)を5週齢にて購入し、1週間予備飼育した後実験に供した。飼育は固形試料MF(オリエンタル酵母工業株式会社)で行い、水道水を自由に摂取させた。

(2) 群構成

各群12匹で構成し、Normal Control 群(無処置対照群)、Adjuvant Control 群、デキサメタゾン投与群(0.1 mg/kg/day)の3群で構成した。薬物は生理食塩水に溶解し、0.5 ml/100 g B.W. をアジュバント注射日(day 0)から24日目(day 24)まで連日経口投与した。

(3) ラットアジュバント関節炎モデルの作製

基本的にはPearsonらの方法¹³⁾にしたがって作製した。すなわち、熱死菌 *Mycobacterium butyricum* (Difco, 以下MBと略) 100 mg をメノウ製乳鉢で研磨粉碎した後、流動パラフィン(Merk) 10 ml を加え10分間かけて十分に懸濁した。この懸濁液を超音波破砕器(Ultrasonic Disruptor, UR-200 P, トミー精工)を用い out put 6 で1分間処理することにより MB 懸濁液を得た。

エーテル軽麻酔下、7週齢のSD系雄性ラットの右後肢足趾部にMB懸濁液0.5 mg/0.05 ml/rat を皮内注射した。注射した日を day 0 とし、以後経目的にMB注射足及び非注射足の足容積をPlethysmometer (YK-101, コニコム)を用いて測定した。

(4) Arthritis score

Tsurumiらの方法¹⁴⁾にしたがって二次炎症が発症した非注射足、前肢、耳、尾についてそれぞれ0~5点の計20点のスコアづけを行った。

(5) 大腿骨の生化学的検査

各群は day 25 に頸動脈血致死後、膝関節を露出し、大腿骨骨端部から股関節方向に筋や腱を剥離し、股関節

側骨端部を残して周囲靭帯を切断して大腿骨を取り出した。軟組織および靭帯を除去後、股関節頭および反対側骨端を切断し、矢状方向に二等分割して冷生理食塩水噴射によって骨髄腔を洗浄した。その一つを生化学的検査に使用し、他方を実験(6)の金属定量に用いた。容量10 ml のプラスチックチューブに骨試料を入れ、骨20 mg に対し1 ml の比率で0.1% SDS 含有0.1 M 炭酸緩衝液(pH 9.8)を加え、当教室で開発した超音波共鳴方式による多目的多検体生物試料処理装置¹⁵⁾¹⁶⁾により抽出した。ついで遠心分離し、その上清をアルカリフォスファターゼ(ALP)活性およびDNA量の測定に供した。ALP活性は上清10 µl をBessey-Lowry法¹⁷⁾で測定し、DNA量は上清50 µl を用いてHoechst 33342による蛍光法¹⁸⁾¹⁹⁾で定量した。また、タンパク質濃度はBCA法²¹⁾²²⁾にて求めた。

(6) 大腿骨中のCa, P, Mg, Cu, Zn量

実験(5)の他方の骨試料を105°C 5時間にて乾燥し、12N HClに溶解した。その溶液を金属分析用精製水で希釈したものを試料溶液とした。金属定量はシーケンシャル形高周波プラズマ発光分析装置(ICPS-1000 III, 島津)にて実施した。Ca, P, Mg 定量には付属のネプライザーを用い、Cu, Zn 定量は超音波ネプライザー(VAG-1, 島津)を用いた。なお、検量線作成には試料溶解作成に用いたものと同じのHClおよび精製水を使用した。

(7) 軟X線写真撮影

アジュバント関節炎ラットの day 14, day 24 における動物をエーテル軽麻酔下に腹位で下肢を一定の角度に広げ、基準のアルミニウム・ステップと共に黒色ビニール袋にいた軟X線撮影用フィルム(Softex FG, 富士写真工業)上にテープ固定した。ついで、軟X線発生装置(CMB-80, ソフテックス)を用い両後肢の軟X線撮影を行った。撮影条件は、管電圧40 kVp、管電流5 mA、照射時間15秒である。

(8) Bone damage score

肉眼的所見として関節軟X線撮影写真をもとに、田中らの方法²³⁾に従って踵骨、足根骨、中足骨および脛骨近位部の4カ所についてそれぞれ0~3点の計12点でスコアづけを行った。なお、0~3点は以下の基準を用いた。

0: 正常, 1: 軽度の関節および骨の破壊と軟骨の新生, 2: 中等度の関節および骨の破壊と軟骨の新生および軽度の骨化, 3: 強度の関節および骨の破壊と骨化

(9) 画像処理

透過照明装置(Northern Light Illuminator, 米岡)上にX線写真をのせ、マクロレンズを装着した高解像度モノクロームCCDビデオカメラ(Sony)を用いて解析用部位の画像を画像解析処理装置に取り込んだ。画像取り込みの際には透過光量、カメラの絞り、透過照明装置とカメラ間距離を一定とした。X線像を光学的に充分拡大する方法を用い、デジタル画像での拡大は行わなかった。画像処理装置は処理目的に応じてLA-555(ピアス), RAPIDシステム(ミノルタ), およびMCID System

Image Analysis for Bioscience (Imaging Research, カナダ)を用いた。いずれも有効解像度512×480ピクセル(8ビット)、256階調の仕様を有している。

画像を均一化するためシェイディング補正後、画像を取り込み、試料と同一のX線写真に存在するアルミニウム・ステップの輝度を用いて階調のスケール設定を行い、これにより骨のX線写真上の輝度をアルミニウム当量の厚さとして換算し、それを相対骨濃度とした。

骨評価のパラメータとして、まず踵骨の一定部位における輝度分布、また一定線上の輝度変化を検討した。ついで、種々の画像処理を行った。すなわち、取り込まれたX線写真画像は薄切片の画像ではなく像の重なりがあるため、重なり成分を除去する目的で鮮鋭化を行い目的とする骨像を明確にした。さらに、基本骨格を抽出するため2値化を経て細線化処理を行った。同時に2値化画像の面積、細線化画像の総長を求めた。また被覆軟組織の比較的少ない膝関節近位部の大腿骨においても同様の輝度分布および画像処理を行った。

(10) 統計処理

得られたデータは、Studentのt検定法にて処理し、5%以下の危険率で有意性が認められる場合を、統計的に有意とした。

結 果

(1) ラット・アジュバント関節炎

1: 足浮腫の進展

アジュバント注射足および非注射足における浮腫の進展をFIG. 1に示す。注射足はday 5とday 20にピークを持つ二峰性の腫脹パターンがみられた。他方、非注射足では二次炎症がday 10より出現し、day 21でピークとなるアジュバント関節炎の典型的な進展パターンとなった。デキサメタゾン投与はこれらの浮腫を抑制し、とくに二

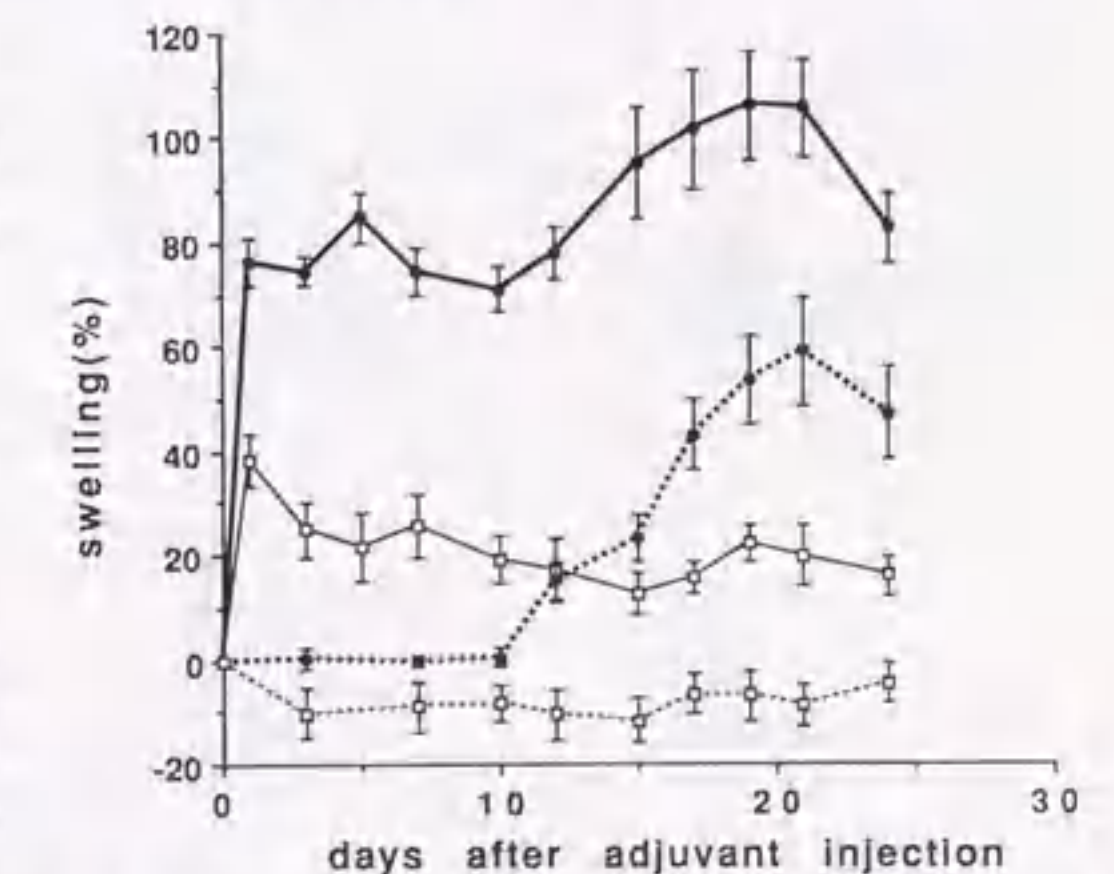


FIG. 1 アジュバント関節炎ラットの足浮腫進展曲線。実線はアジュバント注射足、破線は非注射足における無処置対照群に対する浮腫率を示す。□: デキサメタゾン(0.1 mg/kg/day)経口投与群

次炎症の発症は認められなかった。

2: Arthritis score

二次炎症の発症程度をスコアづけし(最大20点), Arthritis score とした。その経日変化を FIG. 2 に示す。アジュバント関節炎群では day 10 以降, 非注射足, 前肢, 耳, 尾に腫脹や節が認められ, Arthritis score は最大で平均12点に達した。なお, デキサメタゾン投与群は強い抑制効果を示した。

3: Bone damage score

アジュバント注射足および非注射足の軟X線撮影写真を用い, 著明な骨破壊が認められた踵骨, 足根骨, 中足

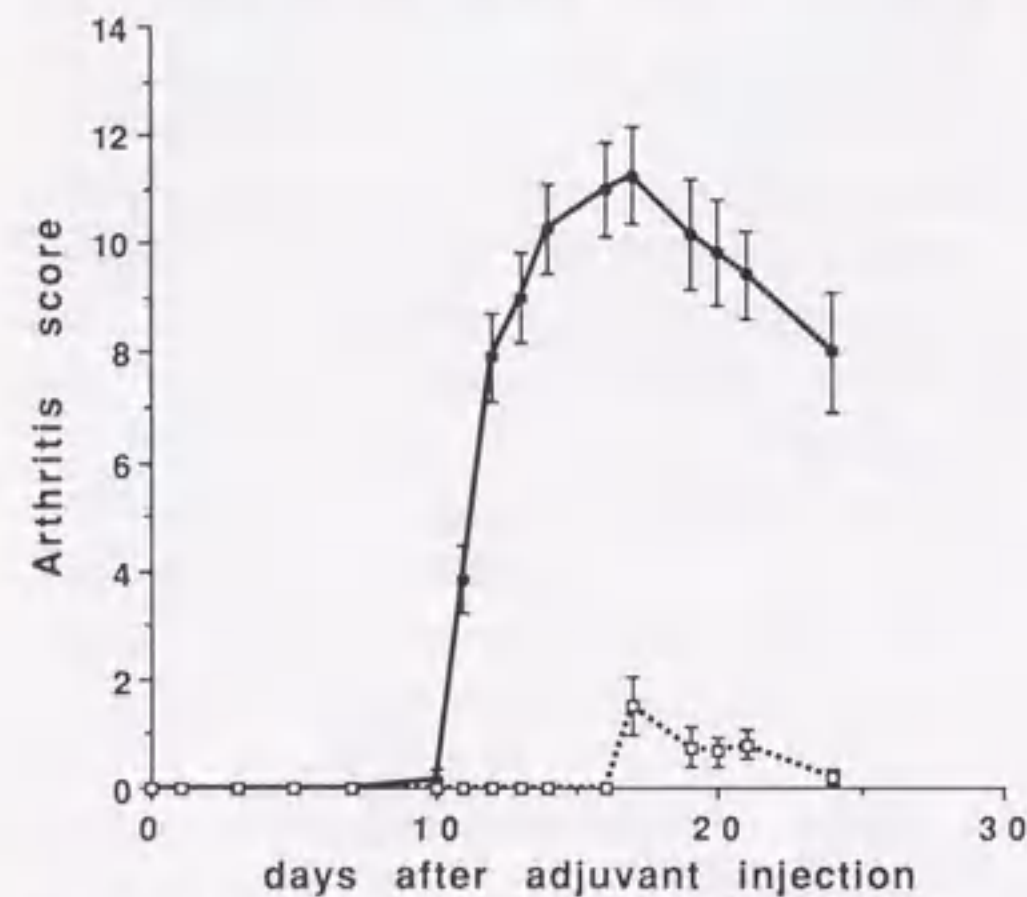


FIG. 2 アジュバント関節炎ラットにおけるアジュバント注射の経日変化
□: デキサメタゾン(0.1mg/kg/day)経口投与群

TABLE 1 アジュバント関節炎ラットにおけるアジュバント注射14日および24日後の Bone damage score

	14日目		24日目	
	注射側	非注射側	注射側	非注射側
アジュバント関節炎群	4.8±1.2	1.2±0.4	9.0±0.8	5.3±1.1
デキサメタゾン投与群 (0.1mg/kg/day)	0	0	0.2±0.2	0

全ての値は平均値±標準偏差を示す(各群の個体数: 12匹)

TABLE 2 アジュバント関節炎ラットにおけるアジュバント注射25日後の大腿骨アルカリフォスファターゼ活性および DNA 量

	アルカリフォスファターゼ活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$)	DAN 量 ($\mu\text{g}/\text{g wet bone}$)
無処置対照群	2.09±0.18	270.82±18.44
アジュバント関節炎群	2.60±0.27**	278.67±22.89
デキサメタゾン投与群 (0.1mg/kg/day)	2.81±0.21**	213.44±13.15**

全ての値は平均値±標準偏差を示す(各群の個体数: 12匹)
無処置対照群に対し, **: P < 0.01

骨および脛骨近位端の4カ所についてそれぞれ day 14 および day 24 における Bone damage score を求めた(1個の骨について最大3)。アジュバント注射足および非注射足についてそれぞれ総計したものを TABLE 1 に示した。アジュバント関節炎群では, day 14 において骨破壊, 骨新生がみられ, day 24 になるとそれらが進行し, 各骨の境界が不鮮明になっていた。

day 14 における注射足のスコアは平均4.8点であり, 非注射足では平均1.2点であった。なお, デキサメタゾン投与群では注射足, 非注射足の両者とも骨破壊が認められなかった。day 24 になると, 注射足のスコアは平均9.0点と増加し, デキサメタゾン投与群においても軽微な骨破壊像が認められた。つぎに, 非注射足のスコアは平均5.3点をあたえ, day 14 に比し著しい骨破壊が認められた。デキサメタゾン投与群には異常を認めなかった。

4: 大腿骨中のアルカリフォスファターゼ活性および DNA 量

day 25 における大腿骨中の ALP 活性および DNA 量を測定した成績を TABLE 2 にまとめて示す。アジュバント関節炎群では ALP 活性は無処置対照群に比し有意に上昇していた。デキサメタゾン投与は ALP 活性をさらに上昇させた。

DNA 量は, アジュバント関節炎群は無処置対照群と有意な差を認めなかった。他方, デキサメタゾン投与群では無処置対照群より有意に低下していた。

5: 大腿骨中の Ca, P, Mg, Cu, Zn 量

day 25 における大腿骨中の Ca, P, Mg, Cu, Zn 量の測定結果を TABLE 3 に示す。Ca, P, Mg 量は, いずれの群においても変化は認められなかった。しかし, ア

ジュバント関節炎群において Cu 量が無処置対照群の約2.6倍に増加し, Zn 量も約1.6倍となった。デキサメタゾン投与群では Zn 量は変化しなかったが, Cu 量は無処置対照群に比し有意に減少していた。

(2) 骨X線写真の画像処理

1: 輝度ヒストグラムによる評価

特定された骨のX線写真像上のある一定範囲における黒化度の分布の形(ヒストグラム)はその骨が破壊されると変化することを認めた。そこで, X線写真像上の骨を特定し測定ウィンドウを設定後, ウィンドウ内の黒化度の分布を画像輝度分布(輝度ヒストグラム)として求めた。これらの処理は LA-555 にて実施した。

1) 踵骨

FIG. 3 に day 14, day 24 の無処置対照群, アジュバント関節炎群, デキサメタゾン投与群の踵骨におけるヒストグラム(縦軸はパーセント)をそれぞれ示す。まず day 14 において, 無処置対照群は正規分布に近い形をあたえ, 相対輝度が50から100の間に分布していた。他方, アジュバント関節炎群では相対輝度50から135の間に広く分布し, 分布形に高輝度方向への偏りが認められた。デキサメタゾン投与群では無処置対照群同様の標準正規分布に近い形であるが, 相対輝度は40から75と分布範囲が狭くなり, 中央値が無処置対照群に比し低輝度となった。

次に, day 24 では無処置対照群は相対輝度55から110と day 14 に比べ範囲が広がった正規分布となった。アジュバント関節炎群は day 14 よりさらに広範囲で不規則な分

TABLE 3 アジュバント関節炎ラットにおけるアジュバント注射25日後の大腿骨 Ca, P, Mg, Cu および Zn 含有量

	Ca (mg/mg wet bone)	P (mg/mg wet bone)	Mg ($\mu\text{g}/\text{mg wet bone}$)	Cu (ng/mg wet bone)	Zn ($\mu\text{g}/\text{mg wet bone}$)
無処置対照群	0.241±0.002	0.120±0.001	4.45±0.14	7.17±3.12	0.126±0.041
アジュバント関節炎群	0.239±0.003	0.120±0.001	4.52±0.16	19.06±5.00**	0.205±0.073**
デキサメタゾン投与群 (0.1mg/kg/day)	0.244±0.003	0.122±0.001	4.43±0.13	4.51±1.81**	0.184±0.065**

全ての値は平均値±標準偏差を示す(各群の個体数: 12匹)
無処置対照群に対し, **: P < 0.01

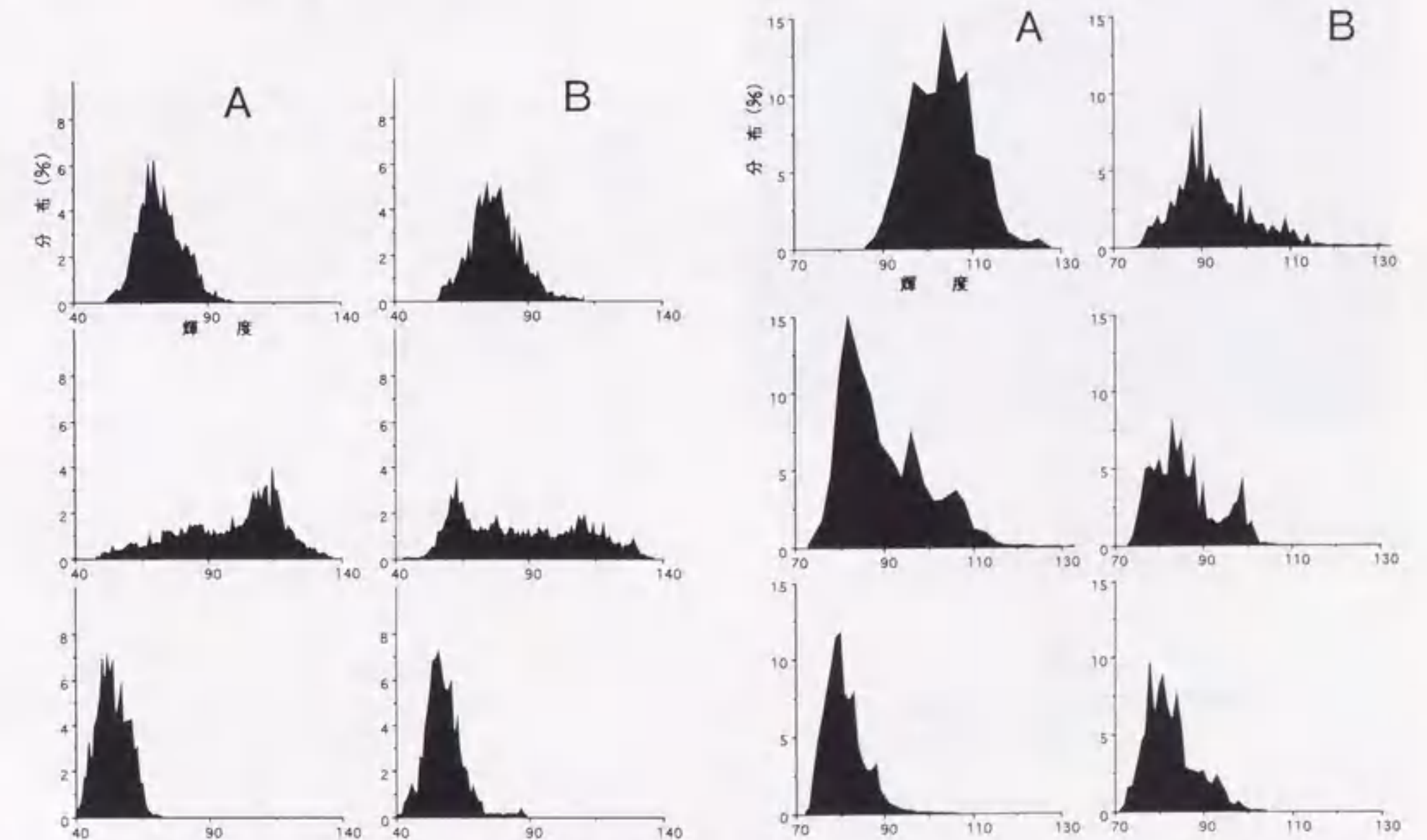


FIG. 3 アジュバント関節炎ラットにおける踵骨(非注射足)の輝度ヒストグラム
A) アジュバント注射14日後, B) アジュバント注射24日後
上段より無処置対照群, アジュバント関節炎群, デキサメタゾン投与群

FIG. 4 アジュバント関節炎ラットにおける大腿骨(非注射足)の輝度ヒストグラム
A) アジュバント注射14日後, B) アジュバント注射24日後
上段より無処置対照群, アジュバント関節炎群, デキサメタゾン投与群

布形(相対輝度45から135)を示した。デキサメタゾン投与群は狭い範囲の正規分布となり(相対輝度40から90),無処置対照群との差が明瞭となった。また, day 14 同様に中央値は低輝度領域に移動していた。

2) 大腿骨

FIG. 4 に大腿骨の成績を示す。day 14 ではいずれの群も正規分布に近い形をあたえたが, アジュバント関節炎群およびデキサメタゾン投与群は中央値が低輝度となった。他方, day 24 になると踵骨と類似の成績が得られ, 無処置対照群は正規分布(相対輝度80から115), アジュバント群は広範囲で二峰性の分布(相対輝度75から110), そしてデキサメタゾン投与群では低輝度方向に移動した正規分布となった(相対輝度70から100)。

2: ライン上輝度パターン

骨密度分布を測定する目的で対照骨の一定部位の線上輝度を MCID System にて測定した。

1) 踵骨

アジュバント関節炎群では炎症による形態変化が著しいため他群との比較が困難であるが, 比較しやすい部位として踵骨中央にラインを設定した(FIG. 5)。FIG. 6 に示すように, day 14 のアジュバント関節炎群は骨の変形によりライン長が延び, 骨梁間の X 線透過性の上昇に基づく細かい輝度変化が視測された。デキサメタゾン投与により骨の変形は認められなかったが, アジュバント関節炎群よりも細かな輝度の変化が得られた。次に, day 24 になると, 無処置対照群では day 14 と類似のパターン

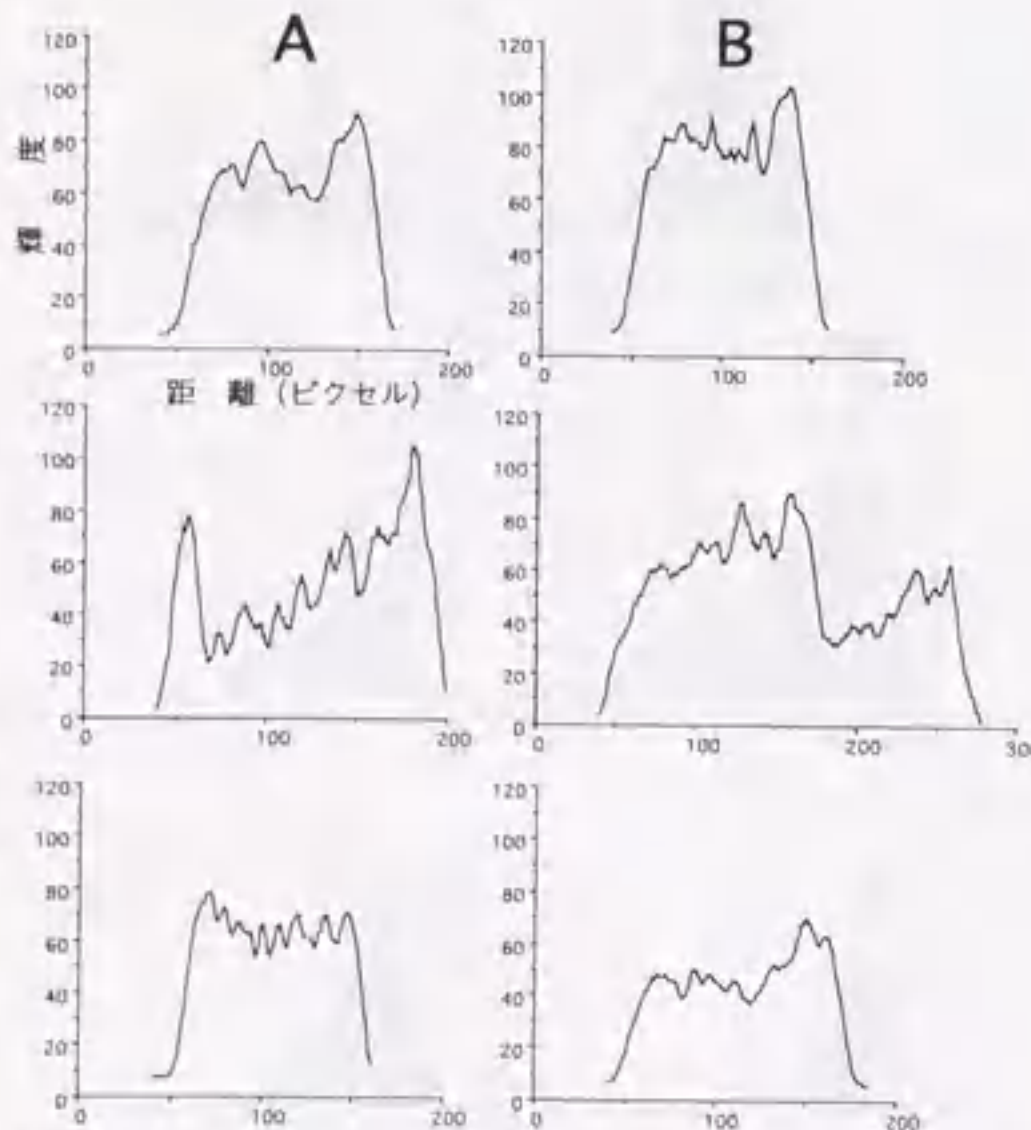


FIG. 6 アジュバント関節炎ラットにおける踵骨(非注射足)の線上輝度パターン
A) アジュバント注射14日後, B) アジュバント注射24日後
上段より無処置対照群, アジュバント関節炎群, デキサメタゾン投与群

であったが, アジュバント関節炎群は骨変形の進展とともに不規則な輝度変化を示した。デキサメタゾン投与群では全体の輝度低下がみられたが, 無処置対照群と同様のパターンとなった。

2) 大腿骨

大腿骨は膝関節7mm近位部にラインを設定した(FIG. 5)。踵骨に比べ, そのパターンは明確に分類することができた(FIG. 7)。まず, day 14 では, アジュバント関節炎群, デキサメタゾン投与群は類似のパターンを示し, 無処置対照群と比較して皮質骨部と海綿骨部の輝度差が強くあらわれ, 皮質骨部の幅が狭くなった。day 24 では

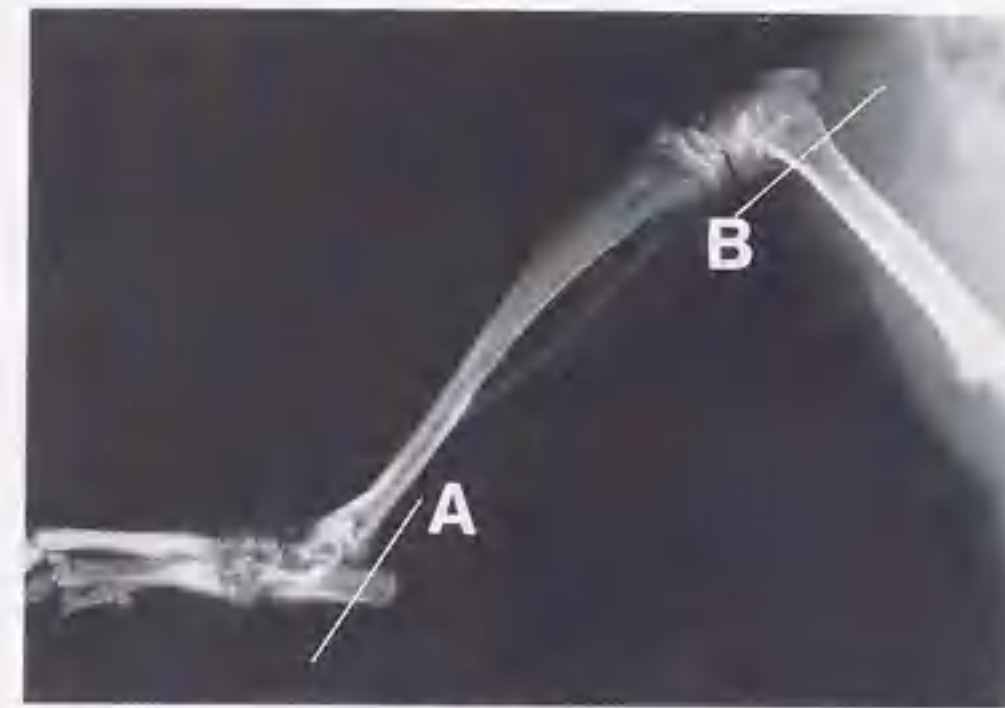


FIG. 5 アジュバント関節炎ラットにおける踵骨(A)および大腿骨(B)の線上輝度パターンを得た部位(いずれも非注射足)

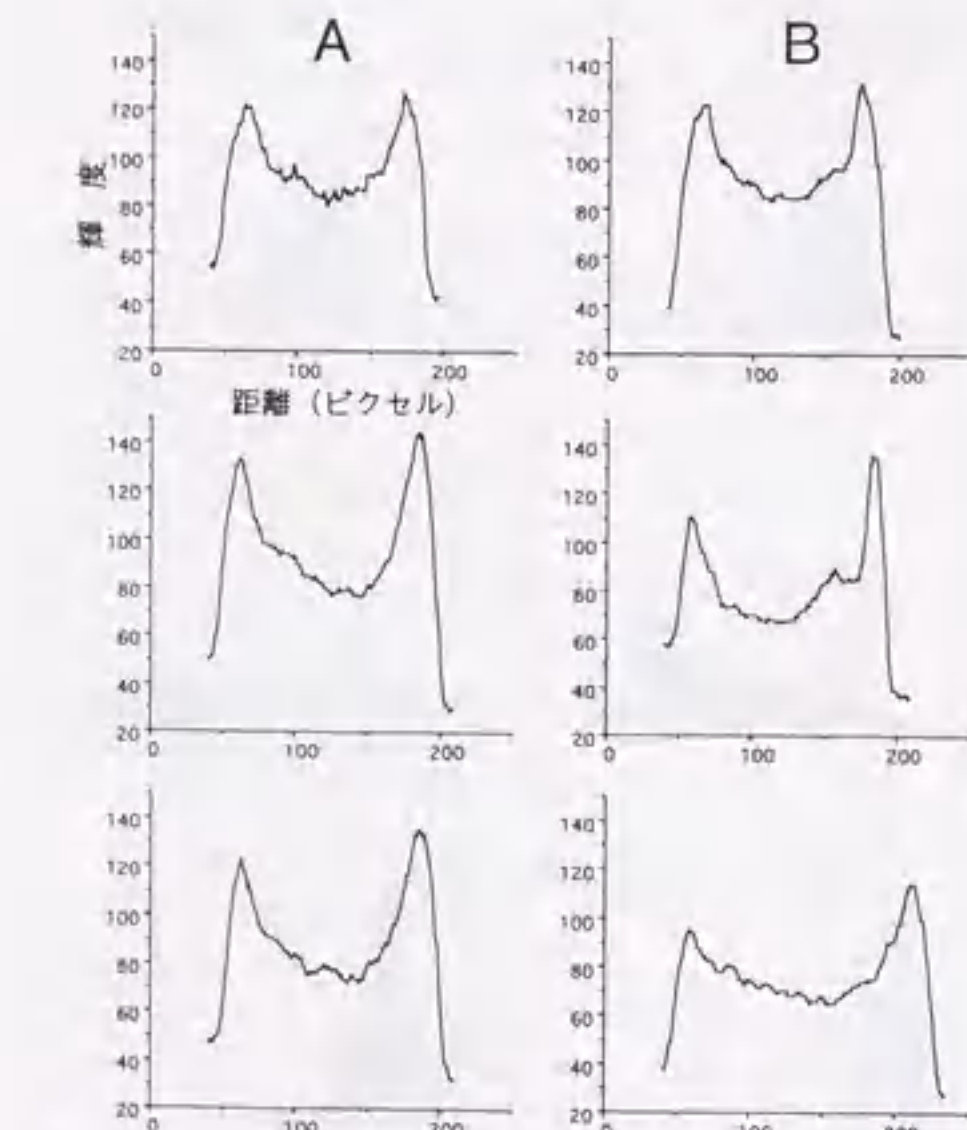


FIG. 7 アジュバント関節炎ラットにおける大腿骨(非注射足)の線上輝度パターン
A) アジュバント注射14日後, B) アジュバント注射24日後
上段より無処置対照群, アジュバント関節炎群, デキサメタゾン投与群

無処置対照群は皮質骨部から海綿骨部にかけてならかな輝度変化がみられ, アジュバント関節炎群では皮質骨部の高輝度ピークが, 幅の狭まりと海綿骨部の輝度低下により鋭くなっていた。デキサメタゾン投与群はアジュバント関節炎群と似ていたが, 皮質骨部の輝度低下も認められた。

3: 画像解析

1) 2値画像の面積

LA-555を用い, 画像の基本骨格を抽出する目的で2値化した画像の面積をウィンドウ面積に対する面積率(%)として求めた。成績をまとめて TABLE 4 に示す。day 14 では無処置対照群, デキサメタゾン投与群に比べアジュバント関節炎群では面積率が有意に大きくなった。day 24 になるといずれの群においても day 14 に比べ面積率は増加したが, 無処置対照群とデキサメタゾン投与群の間には差は認められなかった。

2) 細線化後の細線総長

踵骨の画像を2値化後細線化した画像の day 14 の例を FIG. 8 に示す(RAPID システム)。細線の総長(ピクセル)を用い, ウィンドウの総ピクセル数に対する比率(%)を求めた成績を TABLE 5 に示す。無処置対照群に比べ day 14 および day 24 ともにアジュバント関節炎群は有意に大きな値となり, それは経時的に増加していた。他方, デキサメタゾン投与群は day 14 では無処置対照群とほぼ同値であったが, 経時的に低下していた。

考 察

非侵襲的な骨変化の定量化は, その診断をより客観的にし, また経時的な程度の変化を把握することができる。臨床においては近年, 種々の定量的骨診断装置が開発され, 骨粗鬆症のような全身の骨疾患の診断に応用されている。しかし, 局所に限定される骨疾患においてはこれらの装置による骨塩量測定が十分な判定能力を有しているとは言い難い。今回, 局所的な骨変化を撮影した軟 X 線写真の画像処理によって骨密度と形態変化の両面から骨破壊を定量的に評価することを試みた。破壊骨標本はアジュバント関節炎ラットを作製することによって得た。

(1) ラット・アジュバント関節炎

ラットにアジュバントを注射10日後(day 10)から非注射足に二次炎症が出現し, 同時に Arthritis score の増

TABLE 4 アジュバント関節炎ラットにおける踵骨(非注射足)の2値画像の総面積のフレーム面積に対する面積率

	14日目	24日目
無処置対照群	41.23±1.78	45.98±0.95
アジュバント関節炎群	54.52±1.93**	62.22±0.96**
デキサメタゾン投与群 (0.1mg/kg/day)	38.73±1.14	45.53±2.02

全ての値は平均値±標準偏差を示す(各群の個体数: 6 匹)
無処置対照群に対し, **: P < 0.01

加を認め, これらの変化はデキサメタゾン投与で抑制されたことから典型的な関節炎ラットを得ることができた。二次炎症がピークに到達する day 14 および骨破壊がピークと考えられる day 24 において後肢の軟 X 線写真を撮影した。骨破壊, 骨新生は経時的に進行し, day 24 では各骨の境界が不鮮明になっていた。

骨破壊に伴う生化学的パラメーター変化を知る目的で大腿骨の ALP 活性および DNA 量, さらに Ca, P, Mg, Cu, Zn 含量を検討した。アジュバント関節炎によって破壊された骨の ALP 活性は正常骨に比し有意に上昇しており, 骨新生を反映していると考えられたが DNA 量には変化を認めなかった。デキサメタゾン投与によって破壊が著しく抑制された骨の ALP 活性は破壊骨よりさらに高値となったが, その理由は不明である。他方, DNA 量はデキサメタゾン投与による増殖抑制を反映して正常骨より低値であった。つぎに, アジュバント関節炎ラットの大腿骨中の Ca, P, Mg 含量は正常ラットと差がなく, アジュバント関節炎による骨粗鬆症は骨塩量が低下しているヒトの骨粗鬆症と質的に異なる可能性がある。一方, 破壊骨では Cu, Zn 含量の増加を認めた。ヒトの慢性関節リウマチと同様にアジュバント関節炎ラットにおいて理由は不明であるが血清中の Cu 含量が著しく上昇し, それ

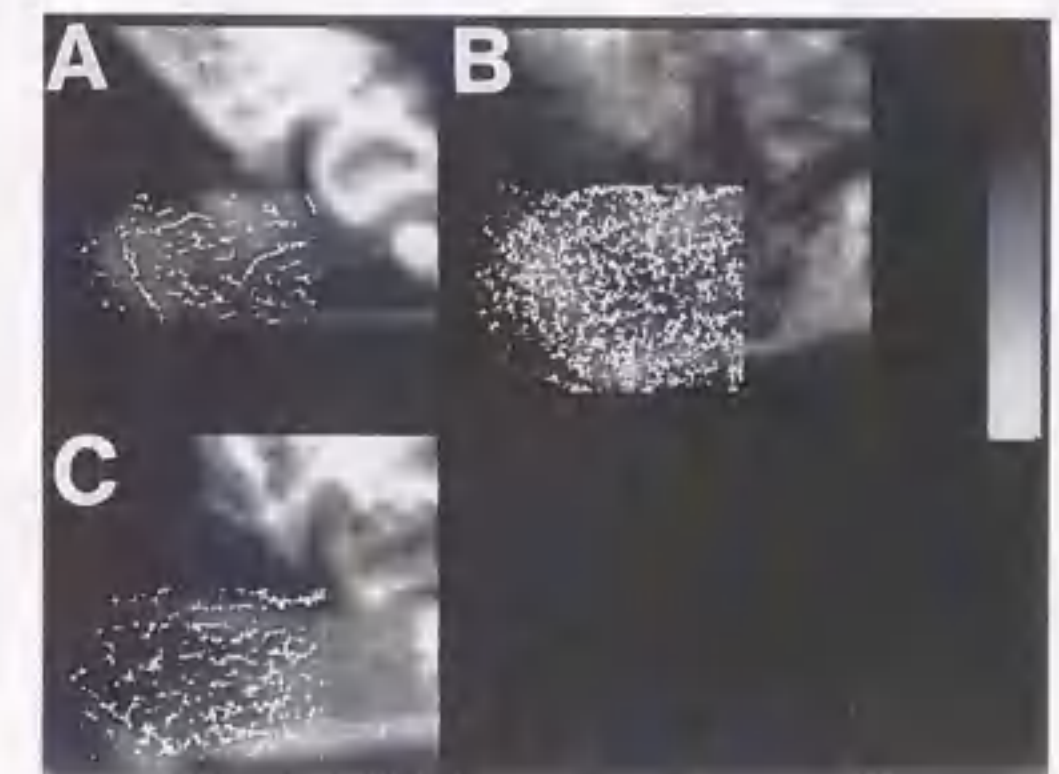


FIG. 8 アジュバント関節炎ラットにおけるアジュバント注射24日後の踵骨(非注射足)の細線化画像
A) デキサメタゾン投与群 B) アジュバント関節炎群 C) 無処置対照群

TABLE 5 アジュバント関節炎ラットにおける踵骨(非注射足)の細線化画像の総長のフレーム面積に対する比率(ピクセル比)

	14日目	24日目
無処置対照群	11.03±0.42	11.70±0.30
アジュバント関節炎群	12.04±0.79*	13.50±0.50**
デキサメタゾン投与群 (0.1mg/kg/day)	11.30±0.30	10.28±0.60**

全ての値は平均値±標準偏差を示す(各群の個体数: 6 匹)
無処置対照群に対し, **: P < 0.01, *: P < 0.05

はZnの投与により抑制されることが知られている²⁴⁾。しかし、血清Cu含量を低下させても関節炎の症状に影響は認められない。骨におけるCu含量の増加はCuの体内動態変化に起因していると考えられる。Zn含量の増加とともにこれらの金属動態変化に関してはヒトの骨粗鬆症と比較して今後の検討が必要である。いずれにせよ、ここで用いた生化学的パラメーターはアジュバント関節炎ラットにおける骨破壊を評価する目的には適当とは考えられなかった。

(2) X線写真像の画像処理

画像処理を行うには高い濃度分解能および空間分解能を有するX線写真画像の情報を十分な精度でデジタル化することが必要である。画像の高精度のデジタル化には線状検出器を用いたCCDカメラやCCDスキャナー、点状検出器を用いたレーザースキャナーなどが知られている²⁵⁾。これらに対し、マクロレンズを装着したビデオカメラは必要な局所画像を光学的に拡大することができ、必要部分での情報量を増大できる。そこで、我々はマクロレンズを装着した高解像度のモノクローム・ビデオカメラにより画像取り込みを行った。レーザースキャナーに比較して精度およびダイナミックレンジに関しては劣るものの、短時間で容易に大小様々のX線画像に対応することができ、必要に応じて顕微鏡に接続することも可能である。

X線画像の画像解析に際しては本来の画像が持つ情報を歪めないよう留意し、軟組織や厚みのある骨の像を単純化するための最低限の処理を行うこととした。X線写真像上の黒化濃度は骨塩量に対応している。しかし、黒化濃度の数値化は撮影、現像などの作業条件、またデジタル化の条件などにより大きな誤差を生ずる。特に今回の骨写真のように像の重なりがみられる場合、黒化濃度の測定比較は信頼性がない。ここで、黒化の分布を示す画像輝度分布をとると、得られたヒストグラムの形状はたとえ異なる撮影条件で得られた画像であっても同一となることから、黒化濃度全体像の状況を示す指標として有用である。アジュバント関節炎ラットの踵骨はday 14においてさまざまな輝度に分布し、ヒストグラムからは規則性を見出すことはできず、それは骨破壊を良く反映していた。day 24になると骨破壊がさらに進み、骨梁の乱れや重なりも加わり、さまざまな輝度に分布しヒストグラムはさらに規則性を失っていた。デキサメタゾン投与群で分布が低輝度側に偏ったことは骨発育抑制のため骨梁部のX線透過性が上昇したことに起因している²⁶⁾と考えられた。大腿骨は踵骨に比し破壊程度が弱かったが、ヒストグラムは踵骨と類似の変化となり、骨破壊の評価が可能であった。

次に、一定ライン上の黒化濃度パターンを輝度パターンとして得た。一定ライン上の濃度変化もヒストグラム同様、その絶対値での評価は慎重な操作と解釈が必要であるが、パターンとしての評価は中手骨X線像を用いた骨粗鬆症の診断法のDigital Image Processing Method

(DIP)²⁷⁾²⁸⁾と同じであり有用と考えられる。しかも、今回の検討ではX線画像の取り込みにマクロレンズを用いたことによりきわめて小範囲の輝度変化もとらえることが可能であった。ここで解析に使用したMCIDはオートラジオグラフィの定量目的に開発され、濃度変化の数値化を簡単な操作で、解析速度も速く行うことができる。また、硬組織薄切のコンタクトマイクロラジオグラフィなど、コントラストの明確なX線写真の解析にも応用されるシステム²⁹⁾であることから微細な破壊状態までパターン化でき、破壊の程度、皮質骨幅の変化の評価において優れた結果を得ることができた。

以上の画像処理は黒化度(密度変化)を用いて病態のパターン化を行ったものである。ここで破壊の程度が数値化できるならば形態変化の定量化につながる。そのためには目的とする骨の画像を抽出することが必要である。厚みを有する骨のX線像から不必要な画像を除去し、必要な画像を強調する基本的な処理方法は2値化である。骨のX線像の場合、2値化した画像は骨梁のX線像を反映している。像の重なりがあるため2値化は必ずしも正確に骨梁面積を表すことにはならないが、骨の破壊による像の乱れの評価としてとらえるならば有用なパラメーターになると考えられた。さらに、画像の基本骨格を表すために用いられる手法として細線化がある。種々の画像処理によるアーチファクトを軽減し、その画像をパターンとして評価することが一般的であるが、破壊の形態変化のパラメーターとして細線化画像の線分の総長を求めた。すなわち、この数値は骨梁の厚みなどは評価できないが総長から対象範囲における骨梁の広がりを示すことができる。この目的に用いたLA-555およびRAPIDシステムはともにすぐれていた。アジュバント関節炎ラットでは骨梁の配列の乱れや、骨の変形による像の重なりによって2値化では高値を示し、無処置群およびデキサメタゾン投与群はほぼ同値をあたえた。しかし、細線化により、X線画像のボケなどの影響が減少し、各群の差が明確となり、細線化像の総長は形態変化を示す数値としてきわめて有用と考えられた。

以上のようにX線写真の輝度分布と細線化画像の総長という比較的簡単な処理によって骨破壊を骨密度と骨梁の配列変化の両面から客観的かつ定量的に把握することが可能であった。X線写真の画像処理は非侵襲的方法のため経時的に病態を評価できる。また、基準濃度を写し込んだX線写真であれば複数の写真を比較評価できる。したがって、これらの評価法は臨床的に骨粗鬆症の診断以外にも硬組織疾患の病態把握、特に頸骨など小範囲の骨において、病変の広がり、進展方向、治療効果などの診断に有用であることが示唆された。

総 括

骨破壊の程度を非侵襲的に定量化する目的で、骨粗鬆症のひとつのモデルとされるラット・アジュバント関節炎を用い、軟X線写真画像として得られた二次炎症発症

時の踵骨および大腿骨の破壊像をコンピュータにて画像処理を行い、骨破壊を密度変化と形態変化の両面から統合的かつ定量的に解析する簡便な評価法を開発した。

- 1) アジュバントを注射したラットは二次炎症が非注射足にday 10より出現し、day 21でピークとなり、典型的なアジュバント関節炎が形成された。
- 2) アジュバント関節炎ラットの注射足および非注射足は踵骨、大腿骨、足根骨、中足骨及び股骨などにおいて骨破壊、骨新生が認められた。デキサメタゾン投与は二次炎症および骨破壊を強力に抑制した。
- 3) アジュバント関節炎ラットの大腸骨ALP活性は無処置対照群に比し有意に上昇していたが、DNA量には変化を認めなかった。
- 4) アジュバント関節炎ラットの大腸骨のCa, P, Mg量は変化していなかった。しかし、Cu量とZn量の増加が認められた。
- 5) 骨のX線写真像上のある一定範囲における黒化度の分布の形(ヒストグラム)はその骨が破壊されると変化し、骨密度をヒストグラム・パターンとして把握することができた。破壊の進行はパターンの不規則性の増加となった。
- 6) 骨密度分布を測定する目的で対照骨の一定部位の線上輝度測定によって得られたパターンは骨の変形程度を良く反映していた。
- 7) 形態変化を数値化する目的で骨のX線写真を2値化し、画像の面積をウインドウ面積に対する面積率(%)として求めた。このパラメーターは骨の破壊による像の乱れの評価に有用であった。
- 8) 細線化画像の線分の総長は対象範囲における骨梁の広がりを示すパラメーターとして使用でき、破壊にもなり形態変化を最も鋭敏に反映していた。
- 9) X線写真の輝度分布と細線化画像の総長という比較的簡単な処理によって骨破壊を骨密度と骨梁の配列変化の両面から客観的かつ定量的に把握することが可能であり、本法は臨床的に骨粗鬆症の診断以外にも硬組織疾患の病態把握に有用であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました岡伸光教授に深謝し、終始にわたり御指導いただきました薬理学教室 野崎正勝助教授に厚く御礼申し上げます。さらに御助言、御協力いただきました薬理学教室の皆様へ深く感謝いたします。

文 献

- 1) 向井孝夫: 骨塩定量法の原理と基本性能, 骨塩定量法の原理. 東京, メディカルレビュー社, 1989. 21-26
- 2) Cullum ID, Eil PJ, Ryder JP: X-ray dual-photon absorptiometry: a new method for the measurement of bone density. Brit J Radiol 62: 587-592 (1989)

- 3) 山崎 薫, 串田一博, 藤原敏弘, 岡本庄造, 金 洪海, 谷口正和, 大村亮宏, 勝野 浩, 井上哲郎: 骨塩定量法, Dual energy X ray absorptiometry (DXA). 整形外科 43, 1126-1132 (1992)
- 3) 伊藤昌子, 林 邦昭, 伊藤正博: Dual energy X ray absorptiometry (DEXA) 法によるラット大腿骨骨塩量の定量的評価, 日本医放会誌 50, 1150-1152(1990)
- 4) 山崎 薫, 井上哲郎: 単純X線像による骨粗鬆症の画像診断, CLINICAL CALCIUM 2, 1078-1082(1992)
- 5) 青木治人: 骨塩定量法, Q-CT. 整形外科 43, 1133-1139 (1992)
- 6) 藤井芳夫, 藤田拓男: 超音波による Bone Quality の評価, CLINICAL CALCIUM 2, 1141-1143(1992)
- 7) 吉満 豊, 石岡和彦, 西沢良記, 森井清世: 慢性関節リウマチ患者における骨塩定量の問題点, CLINICAL CALCIUM 3, 1071-1073 (1993)
- 8) 奥村秀雄, 山室隆夫, 笠井隆一, 坂 章, 林 泰一, 松下 睦: Microdensitometry による実験動物の股骨X線像解析 骨形態計測, 3版. 新島, 西村書店, 1984. 99-109
- 9) 松本千鶴夫, 串田一博, 佐藤義弘, 山崎 薫, 薄田政史, 角 林志彦, 井上哲郎, 山下源太郎, 妹背和男: 骨塩定量法, Microdensitometry 法による第2中手骨骨密度(改良型MD法), 整形外科 43, 1140-1146 (1992)
- 10) 本郷貴士: 数理形態学的应用による骨の形態計測学的研究-数理形態学の理論と応用-. 歯科学報 87, 1569-1581 (1987)
- 11) 林田賢治, 越智隆弘: アジュバント関節炎における骨髄の異常と骨粗鬆症, CLINICAL CALCIUM 3, 1059-1065 (1993)
- 12) 瀬川美秀: アジュバント関節炎ラットの末梢血白血球機能および形態に関する薬理学的研究, 岐阜大医紀 40, 698-712 (1992)
- 13) Pearson CM, Wood FD: Factors which modify adjuvant induced arthritis. Arthritis Rheum 5, 654-658 (1962)
- 14) Turumi K, Kokuba S, Okada K, Yanagihara M, Fujimura H: Arzneim Forsch. Drug Res 36, 1810-1817 (1986)
- 15) 河部一雄, 野崎正勝, 千葉 茂, 立松憲規, 岡 伸光: 骨成長に対する亜鉛の影響に関する研究 (I) 超音波共振方式による多目的多検体生物試料処理装置の開発, 岐阜大医紀 43, 48-55 (1995)
- 16) 河部一雄: 骨成長に対する亜鉛の影響に関する研究 (II) 亜鉛化合物の幼若ラットの骨代謝に対する影響について, 岐阜大医紀 43, 299-305 (1995)
- 17) Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum, J Biol Chem 164, 321-329 (1946)

- 18) Cesarone CF, Bolongnesi C, Santi L: Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal Biochem* **100**, 188-197 (1979)
- 19) Labarca C, Paigen K: A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* **102**, 344-352 (1980)
- 20) Stout DL, Becker FF: Fluorometric quantitation of single-stranded DNA: a method applicable to the technique of alkaline elution. *Anal Biochem* **127**, 302-307 (1982)
- 21) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951)
- 22) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985)
- 23) 田中 明, 嘉久志寿人, 四家 勉, 吉田豊彦, 小嶋康義, 西山進也, 矢原 功: Benoxaprofen のラット adjuvant 関節炎およびそれによる骨破壊に対する作用. *応用薬理* **24**, 571-584 (1982)
- 24) 山口 東: Adjuvant 関節炎ラットにおける全身性反応とそれらにおよぼす抗炎症薬の影響. *日薬理誌* **73**, 379-399 (1977)
- 25) 島田文生, 野中賢明, 半田英幸: X線写真画像のデジタル化. *電子写真学雑誌* **29**, 104-110 (1990)
- 26) 藤原 亨, 鳥巢岳彦: ステロイドと骨粗鬆症. *整形外科* **43**, 1071-1079 (1992)
- 27) 林 泰史, 山本吉蔵: DIP法. 骨ミネラル測定と骨粗鬆症, 東京, メディカルレビュー社, 1989. 43-47
- 28) Hayashi Y, Yamamoto K, Ishibashi T, Takahashi K, Nishi Y: Assessment of bone mass by image analysis of metacarpal bone roentgenograms, a quantitative digital image processing (DIP) method. *Radiation Medicine* **8**, 173-178 (1990)
- 29) 兵東 巖, 森 聡次郎, 高木宣雄, 立松憲親, 岡 伸光: 炎症性骨吸収に関する研究 (I) 内毒素 (LPS) による骨吸収と抗炎症剤の効果について. *岐阜大医紀* **41**, 793-803 (1993)

