ピコ秒時間分解光計測による骨組織の光学特性の評価

荒木隆一郎¹、竹内 晃²、板橋 明²、S.G. Proskurin³、高橋ゆかり⁴、山田幸生⁴

¹埼玉医科大学 衛生学教室、²埼玉医科大学 第四内科学教室、³浜松ホトニクス、⁴通産省工業技術院機械技術研究所 バイオメカニクス研究室

Evaluation of Optical Properties of Bone Tissues by means of Picosecond Time-Resolved Spectroscopy

Ryuichiro Araki¹, Akira Takeuchi², Akira Itabashi², S.G. Proskurin³, Yukari Takahashi⁴, Yukio Yamada⁴

¹Department of Hygiene and Preventive Medicine and ²Department of Internal Medicine IV, Saitama Medical School, ³Hamamatsu Photonics K.K., ⁴Biomechanics Division, MEL, AIST-MITI

Abstract: Various bone diseases (*e.g.*, osteoporosis, osteodystrophy, osteoma, osteomalacia, osteosclerosis, *etc.*) cause increase or decrease in bone mineral density (BMD), *i.e.*, the quantity of hydroxyapatite crystals, which act as strong light-scattering particles, within bone tissues. This pathological change is directly associated with changes in the density of hydroxyapatite within bone matrix and/or the volume ratio of the calcified bone matrix and the bone marrow, which contains high concentration of hemoglobin and thus acts as a strong light absorber. These changes are expected to induce changes in optical properties of the bone tissues. By measuring temporal point-spread function of pulsed light transmitted through isolated human and animal bone samples, we determined reduced scattering coefficient (μ_s') and absorption coefficient (μ_a) of bone tissues at 765 nm. To estimate these parameters, we developed a novel method for quantification of optical constants of relatively small light-scattering and absorbing materials by means of Monte Carlo simulation of photon migration within scattering media. Among 45 samples prepared from pig and cow thigh- and shinbones, a tight correlation between BMD and μ_s' ($y=3.18x + 0.96$, $r^2 = 0.953$) was found. Human bone samples gave similar results. This tight correlation between BMD and μ_s' suggested the feasibility of noninvasive determination of BMD by means of *in vivo* picosecond time-resolved spectroscopy. Further potential advantages of optical method for assessment of bone quality were also discussed.

1. 緒言

骨粗鬆症などの骨疾患に伴って、骨内の hydroxyapatite 量変動する(1)。骨の成分比率は、hydroxyapatite 58%、コラーゲン 25%、水 12%、および炭水化物 5%であり(2)、このうち光散乱粒子として働くのは主として

hydroxyapatite 結晶であると考えられている。したがって、各種骨疾患の進展に伴って骨の光散乱特性が変化し、骨の光学特性計測が新しい骨質の評価法となる可能性がある。

近年、ピコ秒時間分解光計測法、周波数領域強度変調光計測法など、生体組織を始めと

する光散乱・吸収体の光学特性を評価可能な手法が発展し、特に生体組織の光イメージングを目指した基礎検討が進んで来ている(3-5)。これらの研究において、各種生体組織の等価散乱係数 (μ_s')、吸光係数 (μ_a)といった光学定数を把握することが必須であり、現在までに各種の組織を対象とした計測結果が報告されて来ている(6)。しかしながら、脳・肝臓等の各種軟組織については異なる研究グループからの報告がいくつかあるものの、骨組織の光学特性に関しては、Firbank らによる定常光・積分球システムを用いたブタ頭蓋骨の計測結果(7)が唯一のものであり、骨質と光学定数の関連についてはまだ明らかにされていない。骨組織における光学定数の計測は、他の生体組織と同様に前述したピコ秒時間分解光計測法や周波数領域強度変調光計測法を用いて行う事が可能である。これらの手法は、将来 *in vivo* での計測への応用が可能であるという点から、定常光を用いた手法と比較してより有用と考えられる。

以上の観点より我々は、動物およびヒト摘出骨の光学定数を、ピコ秒時間分解光計測法を用いて計測し、DXA 法によって計測した BMD との関連性について検討した。

2. 方法

2.1 骨サンプルの調製： ボーンソー (Marutoh, Japan)を用い、ブタ・ウシの新鮮大腿骨・脛骨、およびヒト第一・第二腰椎中央海綿骨より 10 mm 角立方体の骨サンプルを調製した。骨サンプルは、生理食塩水中にて 4℃で保存し、調製後可及的速やかに計測に供した。

2.2 ピコ秒時間分解光計測： 生理食塩水を満たしたガラスセル内に骨サンプルを固定し、Titanium-Sapphire レーザ (Coherent, USA)からのパルス光 (FWHM 100 fs、波長 765 nm、繰り返し周波数 76 MHz)をサンプル中央部に照射

して、対面より射出される光を光オシロスコープ (Model OOS-01, Hamamatsu Photonics K.K., Japan)に導き、ピコ秒時間分解計測した。パルス光照射後の時間経過を精密に把握するため、照射光の一部をハーフミラーによって光オシロスコープのもう一つのサンプリグヘッドに導き、信号光と同時に記録した。また、レーザー光強度はパワーメータを用いて常時モニターした。

2.3 骨サンプルの BMD 計測： 骨サンプルの BMD 値は、DXA 装置 (Model DPX-L, Lunar, USA)の計測モードを小動物用高分解能ソフトウェアモードに設定して計測した。

2.4 骨サンプルの μ_s' および μ_a の決定： 本研究では、なるべく均質な骨サンプルを得るためにサンプルの大きさを 10 mm 角立方体とした。このため、半無限媒体もしくは無限平板と近似出来るような空間的広がりを持つ生体組織の光学定数を決定する際に用いられる、光拡散方程式の解析解(8)を実測時間分解波形にフィッティングさせる手法(9)によっては、光学定数を決定する事が出来ない。この問題を解決するため、我々は、光拡散方程式の解析解を用いる事が出来ないような計測条件の場合にも適用可能な、新しい光散乱・吸収体の光学定数決定法を考案した。

本法は、モンテカルロ法による散乱体中での光伝播解析(10, 11)に基づいたものである。骨サンプルの時間分解計測に先立ち、我々は骨サンプルの形状、計測の geometry、骨の anisotropy parameter を正確にシミュレートし、かつ種々の μ_s' を持つが μ_a は 0 であるような一連の仮想ファントムについてモンテカルロシミュレーションを行い、ピコ秒パルス光入力に対する時間分解応答波形のデータセットを求めた。このデータセットを μ_s' のルックアップテーブルとみなすことによって実サンプルの μ_s' を決定した。

今、次の時間依存関数を考えて見ると：

$$f(t) = \ln \left\{ \frac{MC(t)}{I(t)} \right\} \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 $MC(t)$ および $I(t)$ は、それぞれモンテカルロ法によってシミュレートされた時間分解波形および実サンプルについて計測された実測波形である。 $MC(t)$ を生成するのに用いた $\mu s'$ と実サンプルの持つ $\mu s'$ が完全に一致した時のみ $f(t)$ は直線となり、それ以外の場合には上に凸 (シミュレーションに用いた $\mu s'$ が実サンプルのものよりも大きい時)又は下に凸 (シミュレーションに用いた $\mu s'$ が実サンプルのものよりも小さい時)の曲線となる。また、パルス光入射後、photon の最短飛行時間 (物理的厚さが 10 mm の生体組織では、約 44 ps)の 3 倍以降の時間領域では、基準波形と実測波形の $\mu s'$ が異なる場合にも $f(t)$ はほぼ直線となる。以上に基づき、 $f(t)$ の 150 ps 以降の時間領域部分について 1 次回帰直線を求め、この回帰直線からの、最短飛行時間から 150 ps までの時間領域部分の $f(t)$ のずれを評価する事によって、実サンプルの $\mu s'$ を決定する事が可能である。また、光散乱体の中では、多重散乱によって検出光の光路長分布が多様に変化するが、時間分解計測によって求めた photon の飛行時間から算出される光路長については、透明媒体中と同様に Beer-Lambert 則が成立する事が、実験的 (12)、数值的 (10)、および理論的 (13)に示されている。散乱体についての拡張 Beer-Lambert 則を用いる事により、実サンプルの μa は以下の式を用いて決定可能である：

$$\mu a = \frac{\Delta f(t)}{\Delta(t)} \cdot \frac{1}{c} \dots\dots\dots (2)$$

ここで、 c は媒体中の光速を示す。本法 (モン

Fig. 1 Dependence of $\mu s'$ (part A) and μa (part B) on BMD of trabecular and cortex bone samples taken from thigh- and shinbones of pig and cow ($n=45$).

テカルロバックアップテーブル法、MC-LUT法)の妥当性については、モンテカルロシミュレーションによって生成したテストデータ、および散乱粒子として TiO_2 を含むエポキシ樹脂製テストファントムを対象とした実測データに基づいて検証を行い、妥当な結果が得られる事を確認した(14)。

3. 結果

図 1 に、ブタ・ウシの大腿骨・脛骨より調製した骨サンプル ($n=45$) の μ_s' および μ_a と BMD の関係を示した。図 1A に示すように、統計学的に有意な BMD と μ_s' の正の相関関係が認められた。この事は、骨基質内の hydroxyapatite 結晶が骨内での主要な散乱粒子であり、骨の散乱特性は hydroxyapatite 粒子によって支配されている事を示す。一方、図 1B に示すように、海綿骨サンプルでは BMD と μ_a の正の相関関係が存在するように思われるが、皮質骨・海綿骨を含めた骨サンプル全体については BMD と μ_a の一意的な関係は認められなかった。これらの骨サンプルの BMD は $0.52 - 1.52 \text{ g/cm}^2$ の範囲であり、皮質骨の BMD は海綿骨のそれより 2-3 倍高い値を示した。また、 μ_s' は $1.34 - 5.57/\text{mm}$ の範囲、すなわち最小値と最大値には約 4.2 倍という大きな開きが認められた。 μ_a もまた、 0.006 から $0.103/\text{mm}$ の範囲で大きく変動していた。海綿骨よりも高い BMD 値を持つ皮質骨は、海綿骨と比較してより低い μ_a を持つ傾向にあった。これは皮質骨の構造が緻密であり、ヘモグロビン (Hb) を含み強い光吸収体である骨髄の容積率が低い事に起因すると考えられる。

図 2 は、ヒト腰椎中央海綿骨サンプルの BMD 値と光学定数の関係を示したものである。Hb の光学定数に与える影響を評価するため、15 分間超音波洗浄器にて Hb を除去し、その操作の前後で時間分解計測を行った。図 1A の結果と同様に、BMD の増加に伴って μ_s' の直線的な増加が認められた (図 2A)。超音波洗浄後の計測結果では、BMD 値の高い場合に μ_s' が洗浄前の計測に比べてやや低下する傾向があったが、これは、光散乱体として働く骨髄中の脂肪が、一部 Hb と共に洗い出された結果であろうと考えられる。一方、図 2B に示すように、超音波洗浄後には μ_a は大きく低下した。

Fig. 2 Dependence of μ_s' (part A) and μ_a (part B) on BMD of trabecular bone samples taken from the medial part of human spinal bone ($n=3$). To evaluate the effect of Hb on the estimated optical constants, measurements were done before and after 15 min of ultrasonication.

これは、Hb の大半が洗い出され、光吸収物質が大幅に減少した結果であると考えられる。以上の結果より、MC-LUT 法によって決定された μ_s' および μ_a はほぼ妥当なものであり、互いに独立に定量されているものと考えられた。

4. 考察

今回の結果から、BMD と μ_s' の直線的な正の相関関係が示され、このことから、骨組織においては hydroxyapatite 結晶が主要な散乱粒子であり、骨組織の光散乱特性を支配している事が明らかとなった。骨組織の光学定数に関しては、Firbank らがブタ頭蓋骨の μ_s , anisotropy parameter および μ_a についてすでに報告している (7)。しかしながら、皮質骨および海綿骨の光学特性の相違や、BMD に関連した μ_s' の変化についての報告は未だなされていない。骨質の相違による μ_s' の大幅な変動と、骨基質内の hydroxyapatite 含量が骨の μ_s' を支配している事を直接的に示した実験結果を報告するのは我々が初めてである。

今回の計測では、海綿骨単独において、BMD と μ_a の直線関係が存在すると思われる結果が得られている (図 1B)。BMD が低値である場合、単位容積あたりの骨基質量の減少・骨髄量の増加を示すものと考えられるが、この場合、BMD 値が高い場合には μ_a が低下する事が予想され、今回の計測結果とは矛盾する。これは恐らく、骨サンプルの保存中に骨髄中の Hb が流出した事によると考えられる。すなわち、BMD 値の低い骨サンプルはより porous な構造を持ち、骨髄からの Hb 流出が起きやすく、一方 BMD 値の高い場合には骨髄周囲が骨基質によって密に取り囲まれるような構造を取っているため Hb 流出が起きにくいであろう。この点については、実験条件・サンプルの保存条件を再検討する必要があると考えられる。

μ_s' が BMD に依存して変化するという事実は、骨組織以外の軟組織が光計測に与える影響をうまく除外する事が可能ならば、*in vivo* でピコ秒時間分解光計測法を用いて骨の光学定数を計測する事により、BMD の無侵襲計測が可能である事を示唆する。ヒトでこのよう

な光計測を行うのに適した部位は、踵部であると考えられる。踵部は超音波の伝達速度・減衰率の変化を利用した骨質診断装置において繁用される計測部位である。また我々は、被験者の踵部の X 線 CT 像を記録して、苦痛を感じない程度に軽度で踵部を圧迫することにより、標準的体格の被験者では、踵骨を取り囲む皮膚・皮下組織・脂肪組織・筋肉等の周辺組織を 2 mm 程度の厚みにまで圧迫排除出来る事をすでに確認している。踵骨の幅の平均値は成人で約 30 mm (15) であり、このことから、光計測に与える周辺組織の影響をごく少なくする事が可能であると考えられ、現在モンテカルロ法によりその影響の評価を進めている。

今回の結果からは明らかにする事が出来なかったが、骨組織の光計測は、BMD の変化以外に骨質に関する有用な情報を与える可能性を持つ。第一に、骨基質内の hydroxyapatite 粒子によって散乱を受けながら伝播してゆく photon はまた、骨髄中の Hb によって吸収を受ける。したがって、骨組織の μ_s' と μ_a の変動を解析する事により、骨梁の微細構造と、その間隙に入り込んだ骨髄の取っている構造に関する情報を得る事が可能であろう。次に、骨髄が脂肪髄化することにより、Hb による光吸収は減少するが、一方で脂質による光吸収が増加する。酸化・脱酸化 Hb および脂肪組織は、それぞれ固有の吸収スペクトルを近赤外領域に持っており、骨組織の近赤外吸収スペクトルをこれらの基準スペクトルに基づいて多成分系解析する事によって、各成分を独立に定量することが可能であると考えられる (16)。これらの情報は、hydroxyapatite 粒子による X 線の吸収や超音波の伝達速度・減衰率に基づいた既存の骨塩量定量装置・骨質診断装置では得られない有用かつユニークなものであり、光による骨質の無侵襲診断法の大きな利点となり得ると思われる。

謝辞

本研究の一部は、文部省科学研究費一般研究 C (32409, 04807036) の補助を受けた。また、著者の一人 (S.G. Proskurin) の在日研究は、日本基盤技術センターの補助を受けて行われたことを付記し、謝意を表します。

参考文献

1. Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am. J. Med.* 94, 646 (1993).
2. D.W. White, E.M. Widdowson, H.Q. Woodard and W.T. Dickerson. The composition of body tissues, *Br. J. Radiol.* 64, 149-159 (1991).
3. B. Chance and A. Katzir (Eds.). Time-resolved spectroscopy and imaging of tissues. *Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng.* 1431 (1991).
4. B. Chance and A. Katzir (Eds.). Photon migration and imaging in random media and tissues. *Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng.* 1888 (1993).
5. B. Chance and R. Alfano (Eds.). Optical tomography, photon migration, and spectroscopy of tissue and model media: Theory, human studies, and instrumentation. *Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng.* 2389 (1995).
6. W.F. Cheong, S.A. Prahl and A.J. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J. Quantum. Electron.* 26, 2166-2185 (1990).
7. M. Firbank, M. Hiraoka, M. Essenpreis and D.T. Delpy. Measurement of the optical properties of the skull in the wavelength range 650-950 nm. *Phys. Med. Biol.* 38, 503-510 (1993).
8. M.S. Patterson, B. Chance and B.C. Wilson. Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties. *Appl. Opt.* 28, 2331-2336 (1989).
9. Y. Tsunazawa, I. Oda, H. Eda and M. Takada. A new algorithm to determine absorption and scattering coefficient from time-resolved measurement. In: Optical tomography, photon migration, and spectroscopy of tissues and model media: Theory, human studies, and instrumentation, *Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng.* 2389, 75-86 (1995).
10. Y. Hasegawa, Y. Yamada, M. Tamura and Y. Nomura. Monte Carlo simulation of light transmission through living tissues. *Appl. Opt.* 30, 4515-4520 (1991).
11. Y. Yamada and Y. Hasegawa. Simulation of fan-beam type optical-CT imaging of strongly scattering and weakly absorbing media. *Appl. Opt.* 32, 4808-4814 (1993).
12. Y. Nomura and M. Tamura. Quantitative analysis of the hemoglobin oxygenation state of rat brain *in vivo* by picosecond time-resolved spectroscopy. *J. Biochem.* 109, 445-461 (1991).
13. K. Furutsu and Y. Yamada. Diffusion approximation for a dissipative random medium and the application. *Phys. Rev. E.* 50, 3634-3640 (1994).
14. R. Araki, A. Takeuchi, A. Itabashi, S.G. Proskurin, Y. Takahashi and Y. Yamada. Optical constants of bone tissues and their variations related to bone mineral density. *Front. Med. Biol. Engng.*, in press.
15. C.-Y. Wu, C.-C. Gluer, M. Jergas, E. Bendavid and H.K. Genant. The impact of bone size on broadband ultrasound attenuation. *Bone* 16, 137-141 (1995).
16. R. Araki and I. Nashimoto. Multicomponent analysis of near-infrared spectra of anesthetized rat head: (II) Quantitative multivariate analysis of hemoglobin and cytochrome oxidase by non-negative least squares method. *Adv. Exp. Med. Biol.* 248, 11-20 (1989).