

ラマン分光分析法による特発性大腿骨頭壊死症の分子構造の観察

江浪秀明、安藤渉、菅野伸彦（大阪大学大学院医学系研究科 運動器医工学治療学）
濱田英敏、高尾正樹（大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学）

特発性大腿骨頭壊死症(ONFH)はステロイドやアルコール等が関連因子であることが知られているが、その詳細な発生機序は不明である。我々は、光科学技術の応用であるラマン分光法を用い、正常骨のアルゴリズムの開発及び大腿骨頭壊死部の分子構造や結晶構造を解析する技術を確認した。そこで本研究ではラマン分光法を用いて、ステロイド関連およびアルコール関連 ONFH の壊死部の分子構造を解析し、その差異を評価した。ステロイド関連 ONFH はアルコール関連 ONFH と比べ、タンパク質に対する脂質関連領域の強度が高値であった。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ONFH)の病態は、大腿骨頭が虚血性壊死に陥り、骨頭が圧潰変形し、疼痛や機能障害を起こすが、詳細な病因・病態は不明である。関連因子として、ステロイドやアルコール、喫煙歴などがある^{1,2)}。

組織学的診断は壊死部や修復組織反応の確認に有用である一方、ステロイドやアルコール等の背景因子を特定する特異的な所見に関する報告は乏しく、新たな客観的解析法が必要である。そこで我々は、光科学技術の応用であるラマン分光法に着目し、正常骨のアルゴリズムの開発及び大腿骨頭壊死部の物質の分子構造や結晶構造の違いを解析する技術を確認した³⁾。この技術により、骨の組織内の無機・有機成分を同時に解析でき、病因に関連した分子・化学構造の違いが明らかとなる可能性がある。

そこで、ラマン分光法により、大腿骨頭壊死部の組織の解析で病因に関係する分子・化学構造の違いを同定できる可能性がある。本研究の目的は骨壊死を伴う大腿骨頭におけるラマン分光所見を明らかにし、病因による差異を特定することである。

2. 研究方法

対象は ONFH の診断で人工股関節全置換術を施行した症例で、ステロイド関連が 14 股、アルコール関連が 8 股であった。平均年齢はステロイド関連で 51.4

±11.5 歳、アルコール関連では 51.2±10.4 歳であった。また JIC の Stage ではステロイド関連では Stage 2: 1 股、Stage 3A: 6 股、Stage 3B: 5 股、Stage 4: 2 股であり、アルコール関連は Stage 2: 1 股、Stage 3A: 4 股、Stage 3B: 3 股であった。

手術時に摘出された大腿骨頭をマイクロ CT で壊死域と健全域を同定し(図 1)、中央冠状面のそれぞれの領域からラマン分光分析を行った。

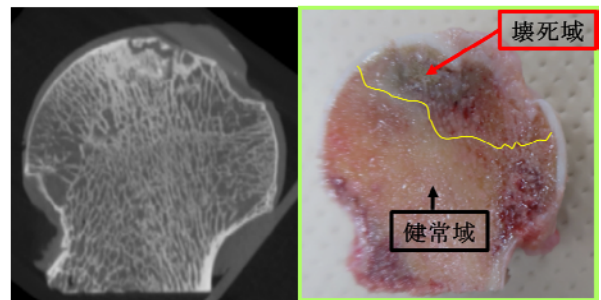


図1. 大腿骨頭標本の健全域と壊死域の冠状面

ラマン分光器は T-64000 (Jobin-Ivon/Horiba Group, Kyoto, Japan) を用いて分析した。ラマン分光器により抽出されたスペクトルを OriginPro 2020 (Light Stone Corp, Tokyo, Japan)を用いてガウス/ローレンツ混合関数により、各分子の波数(940-3000 cm^{-1})に合わせ波形分離を行った。これを、これまでに確立された正常骨組織のアルゴリズム(表1)を用いて、固有の分子に対応する波数のラマンバンドの散乱強度を比較した。健全域・壊死域のそれぞれ代表

的な波数 (Wavelength)と強度 (Intensity)を図 2 に示す。

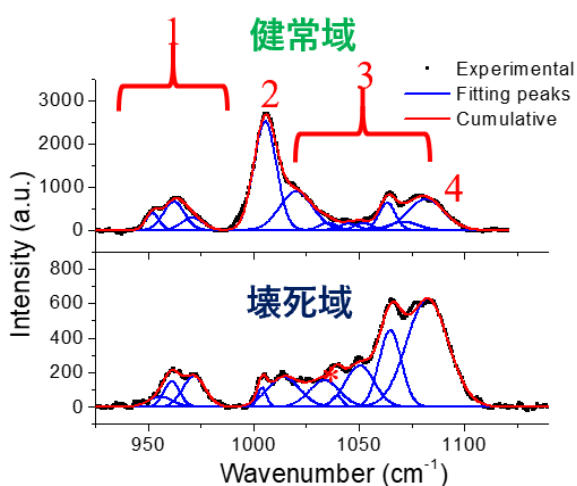
次に、壊死域と健常域で違いのあった波数において、壊死域/健常域のラマンバンドの散乱強度比を計算し、病因ごとに比較した。

表 1. 骨組織における波数と固有分子の対応表[3]

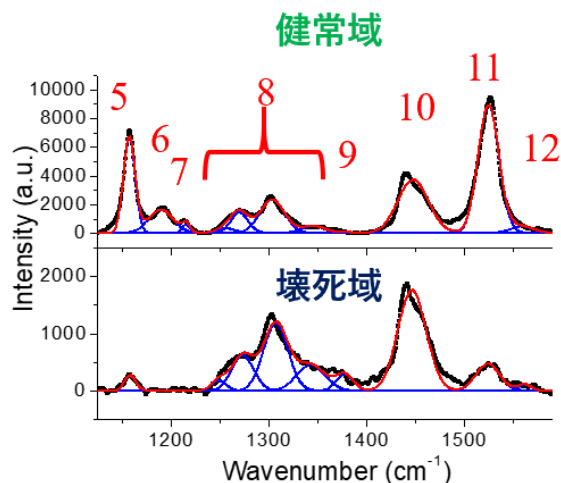
Band label	Band position (cm ⁻¹)	Principal assignment
Band 1	960	$\nu_1(\text{PO}_4)$
Band 2	1005	$\nu(\text{C}-\text{C})$ in phenylalanine
Band 3	1020-1070	$\nu_2(\text{PO}_4)$
Band 4	1081	$\nu(\text{CO}_3^{2-})$, $\nu(\text{PO}_4^{3-})$ in lipids
Band 5	1156	$\nu(\text{C}-\text{C})$ in sphingomyelin
Band 6	1173	C-O-C in proteins
Band 7	1208	Stretching mode of C-C ₆ H ₅ in tyrosine and phenylalanine
	1242	Amide III, C-N stretching, and CH ₂ wagging
	1258	Amide III, adenine, and cytosine β -sheet structure
Band 8	1315	Amide III, CH ₂ bending mode in α -helix
	1338	Amide III, α -helix N-H bending, C-N stretching
Band 9	1370	Ring and C-N stretching in cytosine and guanine
Band 10	1444	$\delta(\text{CH}_2\text{CH}_2)$ in proteins + lipids
Band 11	1526	$\nu(\text{C}=\text{C})$ in sphingomyelin
Band 12	1555	Amide II, N-H bending, and C-N stretching
Band 13	1605	C=C stretching in phenylalanine and tyrosine
Band 14	1638	Amide I, α -helix + β -sheet (C=O stretching vibrations)
Band 15	1660	Amide I, C=O stretching vibrations in α -helix
Band 16	1681	Amide I, $\nu(\text{C}=\text{O})$ in disordered structure
Band 17	1750	C=O stretching mode in lipids and phospholipids
Band 18	2851	$\nu_s(\text{CH}_3)$ in lipids (liquid)
Band 19	2877	$\nu_s(\text{CH}_3)$ in lipids (hexagonal) and symmetric stretching of CH ₃ units in collagen
Band 20	2888	$\nu_s(\text{CH}_3)$ in lipids (orthorhombic) and symmetric stretching of CH ₃ units in collagen
Band 21	2910	$\nu(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{CH}_3)$
Band 22	2930	$\nu_s(\text{CH}_3)$ in proteins
Band 23	2956	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$ in proteins
Band 24	2990	CH ₂ stretching
Band 25	3010	$\nu(\text{HC}=\text{CH})$

図.2 a, b, c, d 代表的な健常域と壊死域のスペクトル例。赤数字が各 Band に対応

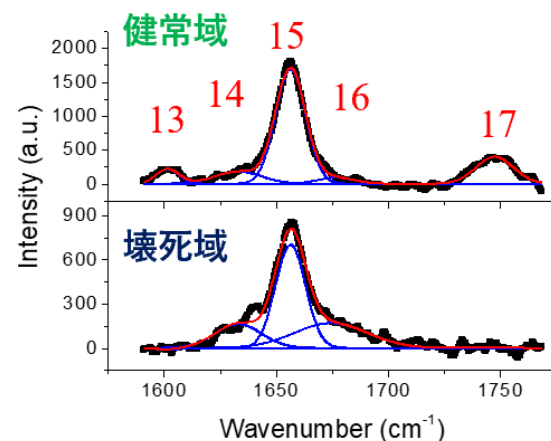
a. 波数 950-1150 cm⁻¹



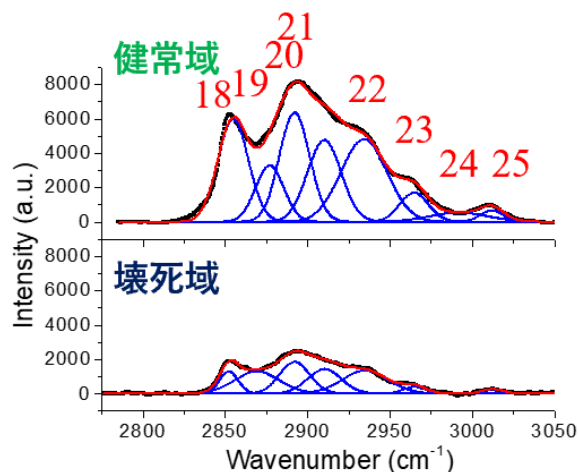
b. 波数 950-1150 cm⁻¹



c. 波数 1150-1600 cm⁻¹



d. 波数 2800-3050 cm⁻¹



3. 研究結果

① 壊死域と健常域の比較

Band 1は波数 930-980 cm^{-1} までの Hydroxyapatite 領域の波数である(図 1a)。中央の波数 960 cm^{-1} 付近が対称な結晶構造を保っている場合に高くなる一方、930-950 cm^{-1} 以下は非結晶構造を表すが、壊死域は波数が 930-950 cm^{-1} 以下の強度が増加しており、非結晶構造の割合が高いことを示した。Band 2(波数 1005 cm^{-1})や Band 7(波数 1208 cm^{-1})は Phenylalanine に対応するが、その強度が壊死域で低下していた。

Band 5(波数 1156 cm^{-1})と Band 11(波数 1526 cm^{-1})はいずれも Sphingomyelin に対応し、この強度が壊死域で低下していた(図 1b)。

Band 17(波数 1750 cm^{-1})や Band 18-20(波数 2850-2888 cm^{-1})はいずれも脂質部分に対応し、また Band 22-24(波数 2900-2990 cm^{-1})はタンパク質部分に対応するが、いずれもその強度が壊死域で低下していた(図 1cd)。

② 健常域に対する壊死域の病因ごとの比較

壊死域が健常域に比べて差異のあった以下の A-D の項目(A. Hydroxyapatite の非結晶構造部分、B. Sphingomyelin、C. Phenylalanine、D.タンパク質に対する脂質の強度)を、アルコール関連とステロイド関連で比較した。

まず A. 非結晶部分、B. スフィンゴミエリン、C. フェニルアラニンの健常域に対する壊死域の比として、ステロイド関連がそれぞれ A (1.5 \pm 0.5)、B (0.3 \pm 0.2)そして C (0.4 \pm 0.3)であり、アルコール関連が A (1.4 \pm 0.7)、B(0.5 \pm 0.3)そして C(0.2 \pm 0.6)であり、いずれも病因による有意な差異は認めなかった。

一方 D. タンパク質に対する脂質の比は、ステロイド関連 ONFH (3.4 \pm 3.0)、がアルコール関連 ONFH (1.3 \pm 0.5)と有意に高値であった(p=0.041)。

4. 考察

ラマン分光法では、蓄積されたデータベースとスペクトル形状を照合させることで物質同定が可能である。これまで変性軟骨や骨粗鬆症性骨の細胞外基質についてラマン分光法を用いた調査が報告されている^{4,5)}。本研究では ONFH に対して適用することで、

ONFH の病因によるその分子構造の差異を明らかにした。

健常域に比べて壊死域では非結晶構造部分で増加を認めたが、これは骨形成と骨吸収の不均衡な過程におこる Hydroxyapatite 格子の構造的な歪みがあることを示唆すると考えられた。

壊死域において、Sphingomyelin や Phenylalanine の Band における強度が低かったが、これは細胞死により、細胞膜を構成する一部である Sphingomyelin の分解や、栄養供給の欠如に伴う Phenylalanine の分解を示していると考えられた。これらの結果より、病因によっては差を認めず、壊死域全般に認める特徴であると考えられた。

一方、タンパク質に対する脂質の強度が、ステロイド関連の ONFH がアルコール関連の ONFH に対して高かった。過去の報告では MRI 評価で関節リウマチや SLE に対するステロイド治療群で骨髄の脂肪転換を認めるといった報告や⁶⁾、ステロイド関連 ONFH の健常域で骨髄脂肪細胞の大きさが増大するといった報告⁷⁾があり、壊死領域において、ステロイド関連 ONFH は脂質との関連性が示唆され、今後更なる研究の余地があると考えられた。

今後の展望として、さらに検証する症例を増やしたうえで、複数のリスク因子を持つ症例の場合、もっとも強い背景因子の特定が可能か検証することや、リスク因子のない ONFH や外傷性の ONFH と比較・解析することを検討している。

5. 結論

ONFH の分子構造の解析のためにラマン分光法を用いた。壊死域で Hydroxyapatite の非結晶構造の増加を認め、Sphingomyelin と Phenylalanine は壊死域で低下を認めたが病因による差はなかった。一方でステロイド関連 ONFH では、タンパク質に対する脂質の強度が、アルコール関連 ONFH に比べ壊死域で高値であった。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Fukushima W, Fujioka M, Kubo T, Tamakoshi A, Nagai M, Hirota Y. Nationwide epidemiologic survey of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res. 2010 Oct;468(10):2715-24.
- 2) Choi HR, Steinberg ME, Y Cheng E. Osteonecrosis of the femoral head: diagnosis and classification systems. Curr Rev Musculoskelet Med. 2015 Sep;8(3):210-20.
- 3) Pezzotti G, Rondinella A, Marin E, Zhu W, Aldini NN, Ulian G, Valdrè G. Raman spectroscopic investigation on the molecular structure of apatite and collagen in osteoporotic cortical bone. J Mech Behav Biomed Mater. 2017 Jan;65:264-273.
- 4) Buchwald T, Niciejewski K, Kozielski M, Szybowicz M, Siatkowski M, Krauss H. Identifying compositional and structural changes in spongy and subchondral bone from the hip joints of patients with osteoarthritis using Raman spectroscopy. J Biomed Opt. 2012Jan;17(1):017007.
- 5) Takahashi Y, Sugano N, Takao M, Sakai T, Nishii T, Pezzotti G. Raman spectroscopy investigation of load-assisted microstructural alterations in human knee cartilage: Preliminary study into diagnostic potential for osteoarthritis. J Mech Behav Biomed Mater. 2014Mar;31:77-85.
- 6) Vande Berg BC, Malghem J, Lecouvet FE, Devogelaer JP, Maldague B, Houssiau FA. Fat

conversion of femoral marrow in glucocorticoid-treated patients:a cross-sectional and longitudinal study with magnetic resonance imaging. Arthritis Rheum. 1999 Jul;42(7):1405-11.

- 7) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Sueishi K, Iwamoto Y. Bone marrow fat-cell enlargement in early steroid-induced osteonecrosis-a histomorphometric study of autopsy cases. Pathol Res Pract. 2005;200(11-12):807-11