

レーザー誘起音響波を利用した軟骨変性・再生過程の非侵襲的粘弾性計測法の開発

—Development of noninvasive viscoelastic measurement method
using laser induce acoustic wave
in the process of degeneration and regeneration of articular cartilage—

1 X X X X X (登録番号)

研究者代表 防衛医科大学校医用工学講座 准教授 石原美弥
(助成金受領者)

共同研究者 東海大学医学部外科系整形外科 准教授 佐藤正人

[研究の目的]

高齢社会を迎えて骨軟骨の機能維持は高齢者の ADL (Activity of daily life) の維持に必須である。特に65歳以上の20%が発病する変形性関節症の早期診断のために、関節軟骨の主要な機能である粘弾性の直接的な診断が待望されている。また、変形性関節症の治療法として、盛んに研究されている軟骨再生医療の評価法の開発も急務とされている。本研究では、申請者が提案したレーザー誘起音響波の挙動から対象試料の粘弾性を非侵襲的に測定する方法(光音響法)を関節軟骨に適用し、変形性関節症モデルの軟骨変性過程及び組織工学的的手法による軟骨再生過程の評価を可能とする計測法の開発を目的とする。

[研究の内容、成果]

医療現場に持ち込める実用性に優れたレーザー光を用いた生体計測技術の1つに光音響法が挙げられる。光音響法は一定条件のパルスレーザー光を照射する際に吸収体において熱弾性過程により組織内で発生する応力波の経時変化を圧電素子で検出する方法である。光音響法は組織の光吸収係数の分布に由来する音響信号をイメージングする方法で、光計測最大の問題である散乱による信号減衰の影響を直接には受けない深部診断が可能で、光と超音波の特長を併せ持ち、医学・医療分野に幅広い需要を持つ有力な診断・

計測法として注目されている。脳内血管イメージング、眼科領域の網膜病変の1つである黄斑変性症のレーザー凝固治療時のモニタリング、グルコースモニタリング、各種癌の早期診断、熱傷の深度診断、皮膚移植の生着モニタリングなど、多分野で臨床に直結した研究開発が進められている。

研究者らは局所で発生した応力波が組織内を伝播する過程で組織固有の粘弾性により減衰する現象に着目し、光音響法で力学特性を計測できる基本原理を提案した。すなわちスプリングとダッシュポットから構成される線形粘弾性体に作用した応力の緩和時間が粘弾性パラメータに関係することをナノ秒パルスレーザー光照射により発生させた応力波の減衰時間に適用させた計測法である。計測原理を図1に示す。

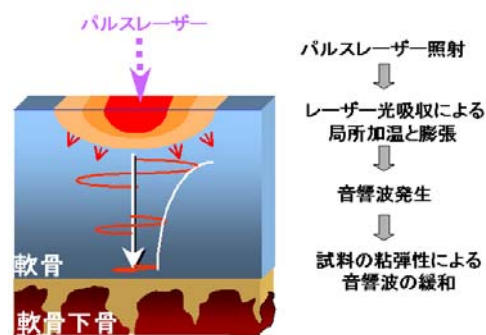


図1 光音響法による粘弾性計測の原理

測定システムの励起光源としてまず初めにOP0（光パラメトリック発振器，パルス幅；5～7ns）を用いた．コラーゲンやその他の蛋白を光の吸収体とした波長（250～355nm）をOP0の発振波長に設定した．この波長の範囲内では、短い波長を用いる方が吸収が大きいので発生する光音響波のピーク値を高めるとともに光音響波の発生深度を浅く（0.1mm以下）できる．設定した波長内を検討した結果、いずれの波長においても光音響信号が検出可能であった．光音響法の実用性を考慮すると、小型、可搬、安価な励起光源が望まれるので、これらの条件を満たすQスイッチNd:YAGレーザーの第3高調波（波長；355nm，パルス幅；5～6ns）を使用したシステムを作製した．

出力光は石英光ファイバー（コア径600 μ m、長さ1m）で導光する．光音響波の検出には、圧電性高分子フィルムのポリフッ化ビニリデン共重合体（PVDF(TrFE)）を用いた．本システム開発当初は、圧電フィルムからなるセンサーと光ファイバーを測定試料に対して対向して配置するin vitroでの計測にのみ使用可能な透過型プローブを設計し、原理実証等を行った．その後、in vivoでも使用可能な反射型プローブに改良した．反射型プローブとは、光ファイバーと圧電センサーを同軸に配置した構造で、詳細な検討の結果、光ファイバーをプローブの中央に配置し、センサーをリング状にする形状がもっとも感度が高くかつ実用的であることがわかったので、これを反射型プローブとし、設計・試作した．図2に示す．プローブの出力信号をFET増幅器（バンド幅、1kHz-100MHz；ゲイン、46dB）で増幅して、マルチチャンネルデジタルオシロスコープで観測した．光音響法計測系の全体図を図3に示す．

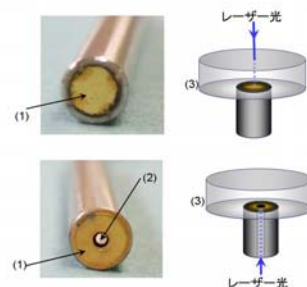


図2 開発したプローブ（透過型プローブ（上）と反射型プローブ（下））(1)圧電センサー，(2)光ファイバー，(3)測定試料



図3 レーザー誘起音響波を利用した可搬式粘弾性計測システム

次に本開発システムの非侵襲性を確認するために、細胞増殖活性試験を用いてレーザー照射による軟骨への影響を検討した．軟骨細胞に波長355nmのQスイッチNd:YAGレーザーを以下の条件で照射した．①100 μ J/mm²，30shots，②150 μ J/mm²，30shots，③100 μ J/mm²，1500shots，④positive controlである細胞が死滅する条件として、アルコールを各wellに20 μ lずつ滴下する群，⑤negative controlであるレーザーを照射しない群の5群で実験した．細胞増殖活性試験には、Cell Counting Kit-8を使用するWST-8アッセイを用いた．96ウェル培養皿に播種した細胞に5グループの条件を施行し、増殖活性試験試薬

CCK-8溶液を滴下した。その後、37℃、5% CO₂、100%湿度条件下のインキュベータで培養し、上清の450 nmにおける吸光度を計測した。

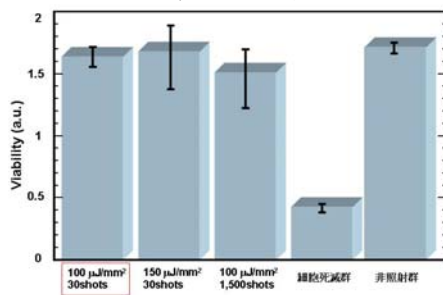


図4 開発システムの安全性試験結果

図4のグラフに示してあるように、有意差を持ってレーザー照射群①100 $\mu\text{J}/\text{mm}^2$, 30shots, ②150 $\mu\text{J}/\text{mm}^2$, 30shots, ③100 $\mu\text{J}/\text{mm}^2$, 1500shotsは、④アルコール滴下群と増殖活性が異なった。また、⑤の照射しない群とは有意差がなかった。すなわち、現在使用している①の条件ではレーザー照射による細胞の影響が全くないことが確認され、開発システムで非侵襲計測が可能であることが示された。

変形性関節症モデルを用いて軟骨変性過程の評価が本開発システムで可能かどうか検討した。実際には、ブタ膝関節からパンチアウトした軟骨一骨プラグをトリプシン(1mg/ml)で酵素処理し

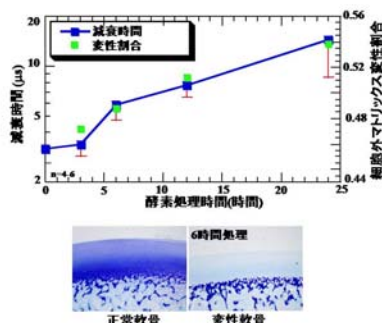


図5 変性過程の測定結果と変性割合の比較グラフ(上)とトルイジンブルー染色した組織像(下)

て変形性関節症モデルとした。トリプシンの処理時間を変化させて、変性度を変化させた。処理時間が長い方が変性が進行していることになる。結果は、トリプシン処理時間が長いほど、減衰時間は単調に長くなった。以上より、変性の進行にともなって粘弾性が変化する様子が開発システムで評価可能であった。

組織工学的手法を用いた培養軟骨組織を測定対象にして、再生過程の評価に関して検討した。測定試料は、膜付きアテロコラーゲンハニカムスポンジを担体として軟骨細胞を播種して再生軟骨組織を作製した。培養期間をパラメータとして再生の成熟度を変化させた。

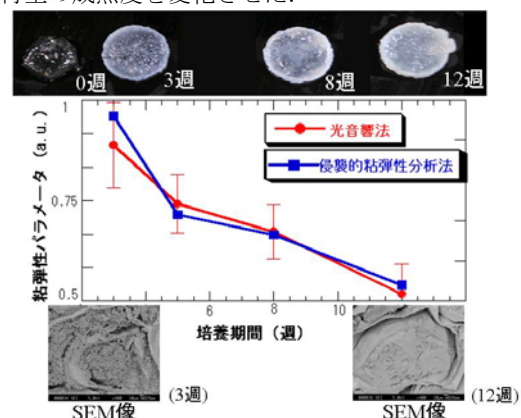


図6 開発システムによる測定結果と侵襲的分析装置による粘弾性特性の比較(グラフ)、培養軟骨組織の写真(上)と走査電子顕微鏡(SEM)像(下)

培養期間が長くなるにつれて細胞外マトリックスが構築され、この細胞外マトリックス構築の経時変化を反映する粘弾性パラメータを非侵襲的に得ることが可能であった。すなわち、再生過程において軟骨細胞が細胞外マトリックスの形成により獲得する粘弾性を評価できることが示された。以上より本開発システムによる粘弾性計測で、軟骨変性及び再生過程を非侵襲的に評価できることが実証された。

〔今後の研究の方向、課題〕

今後は、①本開発システムが関節鏡視下に適用可能となるためのプローブを開発し、臨床応用に発展させる、②再生医療で急務とされているバリデーションに用いる技術として確立する、ことを課題とする。また、本システムで用いたレーザー光は軟骨の主に細胞外マトリックスの自家蛍光を励起できるので、自家蛍光による細胞外マトリックスの性状分析も可能な多機能評価法に発展させていきたい。

〔成果の発表、論文等〕

書籍

- ①石原美弥, 佐藤正人, 菊地眞, 岡野光夫 (監修), 大和雅之 (監修): 第2章 再生医療基盤技術 6 バイオメディカルイメージング, 再生医療技術の最前線, シーエムシー出版, p. 61-68, 2007
- ②石原美弥, 菊地眞, 赤池敏宏 (編著): 再生医療教科書シリーズ④再生, 医療のためのバイオエンジニアリング, コロナ社, p. 147-167, 2007
- ③石原美弥, 菊地眞, 田畑泰彦 (編著)、岡野光夫 (編著): 第4章ティッシュエンジニアリングと周辺環境 ティッシュエンジニアリングにおける評価技術, ティッシュエンジニアリング2006, 日本医学館, p. 189- 194, 2006
- ④石原美弥, 佐藤正人, 持田譲治, 菊地眞 田畑泰彦編: 遺伝子医学MOOK「再生医療へのブレイクスルーーその革新技術と今後の方向性ー」, 再生医療を具現化するための基盤技術として

論文

- ①石原美弥, ほか: ナノ秒パルスレーザーによる細胞外マトリックスの構築モニター, 電気学会論文誌C, in print , 2007

②M. Ishihara, et al.: “Usefulness and limitation of measurement methods for evaluation of tissue-engineered cartilage function and characterization using nanosecond pulsed laser.”, Proceedings of SPIE, 6439,643909-1- 643909-4, 2007

③M. Ishihara, et al.: “Development of Diagnostic System for Osteoarthritis Using the Photo-acoustic Measurement Method.”, Lasers in Surgery & Medicine, 38,249-255, 2006

④M. Ishihara, et al.: “Multifunctional evaluation of tissue engineered cartilage using nano-pulsed light for validation of regenerative medicine”, IFMBE Proceedings, 14, 3187 (2006)

⑤M. Ishihara, et al.: “Development of a non-invasive multifunctional measurement method using nanosecond pulsed laser for evaluation of regenerative medicine for articular cartilage.” Proceedings of SPIE, 6084, V-1-V-4 ,2006

⑥石原美弥, ほか: 再生医療に役立つ光技術; 光音響法による粘弾性評価. 電気学会 光・量子デバイス研究会資料, OQD-06-19, 7-10, 2006

⑦M. Ishihara, et al.: “Usefulness of Photo-acoustic measurements for evaluation of the biomechanical properties of tissue-engineered cartilage.”, Tissue Engineering, 11(7-8), 1234-43, 2005

⑧石原美弥, ほか: 軟骨再生医療の評価に用いる光音響法の開発. レーザー医学雑誌, 26(1), 53-59, 2005

〔謝辞〕

本研究を遂行するにあたり、(財)立石科学技術振興財団の研究援助をいただきました。ここに記して深い感謝の意を表します。