

1071027

|       |                  |        |
|-------|------------------|--------|
| 研究者代表 | 慶應義塾大学理工学部 専任講師  | 宮田 昌悟  |
| 共同研究者 | 東京大学大学院医学系研究科 教授 | 牛田 多加志 |

## 〔研究の目的〕

関節軟骨は生体における可動関節部の骨端に位置し、優れた荷重支持機能や潤滑能を有する結合組織である。軟骨は質量の 70－80%を占める水や電解質からなる液相とプロテオグリカン、コラーゲン繊維を主要成分とする固相で構成される。軟骨の優れた機械的機能は引張剛性を持つコラーゲン繊維網と高い水和性を示すプロテオグリカンからなる高次組織構造に由来する。その一方で、関節軟骨には血管網が存在しないことから、損傷や変性に対する回復能はきわめて低く、一旦損傷すると回復は困難であり最終的には変形性関節症へと進行する。このような関節軟骨疾患の治療手法として近年、組織工学的手法を用いた軟骨再生医療に関する研究が進められている。これは患者自身の細胞を採取し、生体外で 3 次元的に軟骨様組織を再構築した後に、患部に移植、損傷部位を置換する手法である。このような軟骨の再生医療では生体外で再生された組織が移植後の生体内環境に耐えうるか判断するための非侵襲的な組織形成度の評価法の確立が必要不可欠である。

本研究ではミクロ構造評価を可能とする新技術である「拡散分布解析用 MRI」(q-space MRI)を応用し、ミクロ構造レベルでの軟骨変性及び軟骨再生の評価技術の開発を目的とした。軟骨

に代表される高含水性の生体軟組織では水分子の運動状態が組織のミクロ構造と密接な関係を持つことから、水分子の拡散速度分布を詳細に測定できる q-space MRI は変形性関節症の早期診断システムや再生軟骨の組織評価技術として最適な技術といえる。しかしながら、本測定手法は生体組織への適用例が少なく、軟骨組織への応用例は過去の研究においても存在しない。そこで本研究では q-space MRI を応用した生体軟組織のミクロ構造評価システムの確立のための第 1 段階として、仔ウシ、ブタ軟骨細胞を用いた実験モデルを確立し、細胞、細胞外基質が軟骨組織中の水分子の制限拡散現象に与える影響を検討したので報告する。

## 〔研究の内容、成果〕

### 概要

前述のように、関節軟骨は質量の 70－80%が水分から構成されるために、組織内の水分子の運動性と軟骨組織の材料特性との間には密接な関係が存在する。軟骨内に介在する水分子の拡散はコラーゲン繊維やプロテオグリカンによる影響を受け、特に分子構造に硫酸基を持つプロテオグリカンは陰性に帯電していることで電気的引力により周囲に水分子を引き付け、制限拡散現象を生じることが予測される (図 1)。そこ

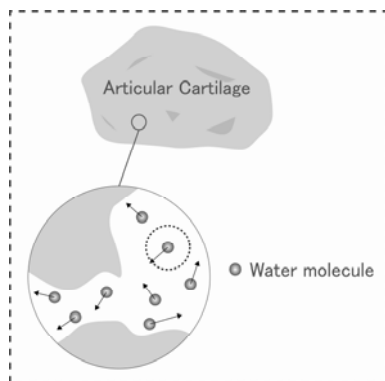


図 1 軟骨内部の水分子の制限拡散

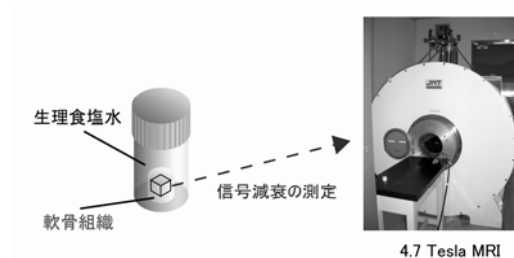
で制限拡散現象の計測手法として **q-space MRI** に着目し、再生軟骨、ハイドロゲル、生体軟骨を試料として細胞や軟骨の細胞外基質が **q-space MRI** によって測定される制限拡散特性に与える影響を調べた。

#### q-space MRI によるミクロ構造評価シーケンスの確立

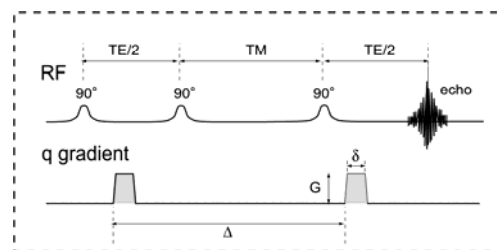
q-space MRI 測定は 4.7T の MRI 装置 (Bore size : 33cm, 1H Resonance : 200 MHz) を用いて行った。測定シーケンスは **STEAM**(stimulated echo acquisition mode)を採用した。測定条件は生体軟骨を用いて S/N 比の検証を行い、最適条件として Voxel size  $3 \times 3 \times 3$  mm, TR 8000 ms, TE 55 ms, TM 70 ms, MPG の印加時間 ( $\delta$ ) / 間隔 ( $\Delta$ ) 20 ms/100ms, MPG 強度 (G) 0-60 mT/m (31 steps) の可変強度とした (図 2)。

#### 軟骨組織モデル（細胞－ハイドロゲル培養体及び生体軟骨）での検証

試料は再生軟骨、ハイドロゲル、生体軟骨とした。再生軟骨はアガロースゲル包埋培養法を用いて軟骨細胞を三次元培養することで作製した (図 3)。軟骨細胞はブタ膝関節より採取した軟骨組織をコラゲナーゼ溶液により溶解し抽出



(a)



(b)

図 2 MRI 測定概念図 (a) 及び測定シーケンス (b)

した。細胞の懸濁液と低融点の 4%アガロース溶液を同体積で混合して軟骨細胞・アガロース溶液を調製し、4℃環境下に 25min 静置して厚さ 2mm のゲルシートを作製した。このゲルシートより直径 8mm, 厚さ 2mm の円盤状に採取して再生軟骨試料とした。再生軟骨は 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 25 日間培養した。培養 7, 25 日において試料を取り出して q-space MRI 測定を行った。また、ハイドロゲルとして細胞を含まない同形状の 2%アガロースゲル、生体軟骨としてブタ膝関節より直径 6mm, 厚さ 1.5ー2.5mm 程度となるように試料を採取し同様の測定を行った。

その結果、本研究で確立した測定シーケンスを用いて再生軟骨、アガロースゲル、生体軟骨のそれぞれの組織中の水分子の拡散速度分布を精度良く測定することが可能となった。再生軟骨モデル (図 4)、ハイドロゲルでは *b*-value

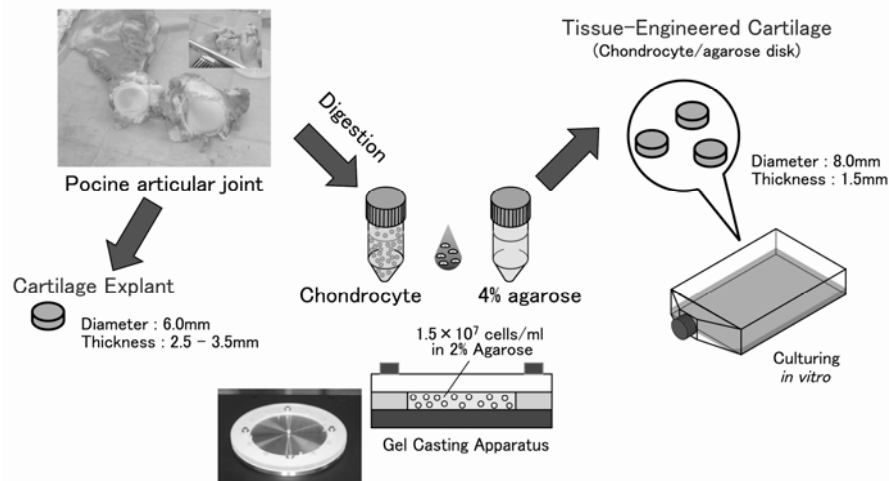


図3 軟骨細胞・アガロースゲル培養体作製法

の増加に伴って直線性の信号減衰を示すことから、拡散速度分布は自由拡散に近く、ほぼガウス分布であると考えられる（図 5a）。一方で、生体軟骨では  $b$ -value の増加に伴い非線形の信号減衰を示し、組織中の水分子の制限拡散が観察された（図 5b）。また、それぞれの試料において信号減衰が直線近似できる領域で拡散係数を求めたところ、再生軟骨（培養 25 日）： $1.79 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、2%アガロースゲル： $1.98 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、生体軟骨： $1.25 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{sec}$ であった。

生体組織の制限拡散には細胞膜の効果があることから組織中の細胞数密度を測定したところ、再生軟骨（培養 7 日）： $1.2 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ 、再生軟骨（培養 25 日）： $1.5 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ 、生体軟骨： $1.3 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ であった。再生軟骨の測定結果では培養日数によらず直線性の信号減衰を示したことを考えると、生体軟骨における非線形の信号は細胞膜に由来するものではないと考えられる。関節軟骨は引張剛性の高いコラーゲン繊維網に陰性に帯電したプロテオグリカンを含む高次組織構造からなる高含水組織である。本実験で観察された生体軟骨における制限拡散現象はコラーゲン繊維網やプロテオグリカンからの

電氣的引力によりミクロスケールでの水分子の運動が制限されたことによるものと推測される。これより、本研究で確立した  $q$ -space MRI を用いた測定手法は、関節軟骨、再生軟骨に代表される生体軟組織のミクロスケールレベルでの組織構造の変化を検出可能であることが示唆された。

[今後の研究の方向、課題]

本研究の成果として  $q$ -space MRI により関節軟骨のミクロ組織構造の変化を検出可能であることが明らかになった。しかしながら、組織構成要素と測定結果との関係は明らかになったとはいえない。今後はコラーゲン、プロテオグリカン酵素により選択的に変性する軟骨変性モデルを用いて組織の構成要素と制限拡散現象との関係を明らかにする予定である。

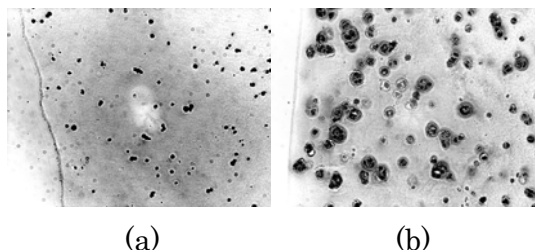


図4 再生軟骨の組織染色画像  
(a: 培養0日, b: 培養25日)

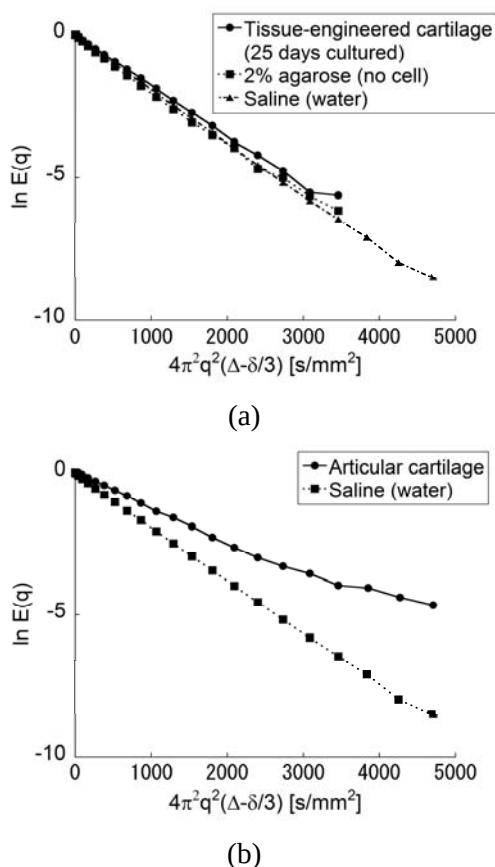


図5 再生軟骨モデル及び細胞不含有ハイドロゲル(a), 生体軟骨(b)の信号減衰曲線

[成果の発表, 論文等]

[1] 発表, 論文等

- 1) 宮田昌悟, 関野正樹, 大崎博之, 牛田多加志: q-space MRI による再生軟骨および関節軟骨の組織評価法, 第35回日本磁気共鳴医学会大会講演論文集, pp. 426 (2007)
- 2) Shogo MIYATA, Kazuhiro Homma, Tomokazu Numano, Tetsuya Tateishi, Takashi Ushida, "Assessment of permeability and hydration of tissue-engineered cartilage using diffusion-MRI", Proc. of 3rd Asian Pacific Conference on Biomechanics, S182 (2007)
- 3) Shogo MIYATA, Tomokazu Numano, Kazuhiro Homma, Tetsuya Tateishi, Takashi Ushida, "Evaluation of Permeability and Water Content of Tissue-Engineered Cartilage Using Quantitative-MRI", Proc. of 6th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, P390 (2007)
- 4) 宮田昌悟, 関野正樹, 大崎博之, 牛田多加志: q-space MRI による再生軟骨および関節軟骨の組織評価法, 日本磁気共鳴医学会誌, Vol.28 (No. 1), pp. 92-94 (2008)

[2] 受賞

- 1) 宮田昌悟: q-space MRI による再生軟骨および関節軟骨の組織評価法, 第35回日本磁気共鳴医学会大会 大会長賞 (2007)