

200718083A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

変形性関節症の病態把握と治療効果判定を可能にする
定量的機能診断システムの開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐藤 正人

平成20年 4月

はじめに

本研究報告書は、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金「長寿科学総合研究事業」において実施された「変形性関節症の病態把握と治療効果判定を可能にする定量的機能診断システムの開発」に関する研究成果報告を纏めたものである。本年は 3 年度計画の 1 年目であるが、研究期間内に一定の成果を上げることができた。しかしながら、システム開発には人的、時間的、そして空間的にも適切な研究の場と各研究者のベクトル方向の一致がなければならないことを、本報告書を纏めながら今更ながら実感している次第である。

本研究の目的は、高齢化社会で問題となる関節軟骨変性を伴う運動器疾患の正確な病態把握と治療計画を確立するために、光を用いて、軟骨本来の特性を定量的に評価可能な計測評価法を確立することである。そのために、私共が世界で初めて実証した光音響原理に基づく力学特性評価と、時間分解自家蛍光スペクトル分析による組織性状評価とを、同時に実施可能な低侵襲の計測システムの構築を目指している。本システム開発により、関節軟骨本来の定量的機能特性診断法が確立されれば、きめ細かな治療計画の遂行が可能となり、高齢者の ADL 向上と健康寿命の延伸に寄与するものと考えられる。

既に日本では 2400 万人以上が罹患していると推測されている変形性膝関節症をはじめとした運動器疾患は、加齢と共に増加し、直接生命を脅かすものではないが、ADL や QOL を著しく低下させるため、疾患がもたらす身体的苦痛ばかりでなく、精神的、社会的な影響は計り知れないものがある。本研究成果が、将来その克服に僅かばかりでも貢献できることを願って止まない。

本研究を支えて頂いている分担研究者、研究協力者、並びに関係者の方々に深謝する。

2008 年 4 月

佐藤 正人

研究班の構成

	研究者名	所属研究機関・役職	専門	分担研究項目
主任研究者	佐藤 正人	東海大学医学部外科学系 整形外科学・准教授	整形外科学 再生医学	研究統括・研究計画立案
分担研究者	石原 美弥	防衛医科大学校医用工 学・准教授	医用工学・ 光計測	光学技術開発・力学特性解 析・性状分析
	三谷 玄弥	東海大学医学部外科学系 整形外科学・講師	整形外科学	臨床診断・力学特性解析
	杵名 寿治	東海大学医学部外科学系 整形外科学・助教	整形外科学	臨床診断・性状分析
	李 禎翼	長寿科学振興財団・非常勤 職員（リサーチレジデント） 東海大学医学部外科学系 整形外科学・研究生	獣医学 再生医学	動物実験・蛍光相関分光分析
	石原 雅之	防衛医学研究センター医 療工学研究部門・教授	医療工学 糖鎖工学	糖鎖分析アドバイザー・性状 分析評価
	菊地 眞	防衛医科大学校医用工 学・教授・副校長	医用工学	光学技術アドバイザー・力学 特性解析評価
	持田 讓治	東海大学医学部外科学系 整形外科学・教授・副学部 長	整形外科学 再生医学	臨床研究アドバイザー
研究協力者	丑田 公規	理化学研究所環境ソフト マテリアル研究ユニッ ト・ユニット長	バイオマテ リアル工学	蛍光相関分光分析アドバイ ザー
経理事務局	須藤 武	東海大学伊勢原研究推進 部伊勢原研究業務課・課 長		経理事務

目 次

I. 総括研究報告

- 変形性関節症の病態把握と治療効果判定を可能にする定量的機能診断システムの
開発に関する研究
佐藤正人 1

II. 分担研究報告

1. 超音響原理に基づく力学特性計測法を用いた関節軟骨変性診断システムの
開発に関する研究
石原美弥、菊地眞、石原雅之 9
2. ナノ秒パルスレーザー励起自家蛍光時間分解スペクトル分析による
scaffold free 組織工学的軟骨の非侵襲的組織性状評価に関する研究
杵名寿治、三谷玄弥、持田讓治 61
3. 蛍光相関分光法による関節軟骨中の拡散現象に関する研究
李 禎翼、丑田公規 73

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 81

IV. 研究成果の刊行物・別刷 83

I. 総括研究報告書

変形性関節症の病態把握と治療効果判定を可能にする

定量的機能診断システムの開発に関する研究

— 総括研究報告 —

主任研究者 佐藤正人 東海大学医学部外科学系整形外科学・准教授

研究要旨：高齢化社会で問題となる変形性関節症等運動器疾患に対して、関節軟骨の定量的機能診断を可能にするため、我々が世界で初めて実証した光音響原理に基づく力学特性評価と、時間分解自家蛍光スペクトル分析による組織性状評価とを、同時に実施可能な低侵襲の計測システムの構築を目指している。本システム開発により、定量的機能的臨床診断が確立されれば、きめ細かな治療計画の遂行が可能となり、高齢者の ADL 向上と健康寿命延伸に寄与するものと考ええる。

【分担研究者】

三谷玄弥：東海大学医学部外科学系
整形外科学・講師

杓名寿治：同・助教

持田讓治：同・教授

石原美弥：防衛医科大学校医用工学・
准教授

菊地 眞：同・教授

石原雅之：防衛医学研究センター
医療工学研究部門・教授

李 禎翼：長寿科学振興財団・
リサーチレジデント
東海大学医学部・研究生

【研究協力者】

丑田公規：理化学研究所環境ソフトマテリアル研究ユニット・ユニット長

A. 研究背景と目的

高齢化社会の日本において既に2400万人以上が罹患していると考えられている変形性関節症は、生命を直接脅かす

ものではないが、ADL を下げるばかりか QOL の低下も招き、人的社会的損失は計り知れない。疾患本態は軟骨変性に伴う機能破綻であるが、現状では関節軟骨本来の機能に基づく客観的評価方法が欠如している。

表1. 評価法の比較

従来の評価法	軟骨本来の機能評価法
1. 関節裂隙狭小化 (レントゲン)	1. 力学特性評価 → 光音響法(関節鏡)
2. 軟骨表面形状 (関節鏡)	2. 細胞外マトリックス性状評価 → 時間分解自家蛍光スペクトル解析(関節鏡)
3. フロービング (関節鏡)	3. 潤滑性 → in vivoでは計測困難
4. 組織像 (生検)	

すなわち、各種の臨床評価で患者のコンディションを評価することはもちろんであるが、普遍的かつ客観的評価法としての軟骨評価法がないため、現状では単純レントゲン写真での関節裂隙の狭小化程度、関節鏡

視下での表面形状やプロービング、あるいは生検による組織学的な評価法が施行されている。変形性関節症に対する軟骨本来の機能に基づいた正確かつ詳細な定量的な機能診断を可能とする評価技術の導入が待望されている（表1）。

本事業により低侵襲で関節軟骨本来の機能である力学特性と組織性状を正確に計測し、定量的に評価することができれば、変形性関節症をはじめとする軟骨変性を伴う運動器疾患の正確な病態把握と治療計画並びにその遂行が可能となるばかりか、新薬等の治験の際の客観的評価法としても有用であると考ええる。

我々は、世界で初めて光音響原理に基づく粘弾性計測法の原理を提案し、検証実験を行った。光音響信号を効率的に励起できるナノ秒パルスレーザーの使用により、薬剤等の修飾なく測定可能な自家蛍光波長と時間を関数とした分析も可能となり、力学特性と組織性状とを同時に定量的に計測する技術を開発した。そして、組織工学的に作製した再生軟骨の移植前の *in vitro* 評価法として確立し、現在その評価技術の標準化を目指し、NEDO の助成を受け研究を継続中である。しかし、実際の臨床で、関節軟骨の診断において使用しなければならないのは、関節鏡視下環境である。本事業においては、本評価技術を関節鏡視下で実施可能なレベルまでスケールダウンする。つまり、励起用レーザー光の導光系と光音響信号と自家蛍光の検出センサーを一体化し、関節内計測用の曲げプローブを開発し、さらに、測定プロトコルの最適化によりハイスループットな計測を目指す。これらが実現されれば、臨床アプリケーションは大いに拡大

される。すなわち、再生医療の評価法として用いるばかりでなく、高齢者の多くに認められる軟骨変性の診断を関節軟骨本来の組織性状と力学特性に基づく、低侵襲で定量的評価が可能な新規の機能診断法として、疾患病態解明と治療効果判定に威力を発揮するものとする。そして、臨床データの蓄積により、詳細な病態把握と予後診断が可能となり、個々の患者の病態に応じた、きめ細かな治療計画が可能となり、ADL の向上ひいては健康寿命の延伸に寄与するものとする。

B. 研究方法と計画

光やレーザー光を計測対象である生体へ照射すると、散乱、反射、並びに吸収に伴う温度上昇、さらには蛍光や音響波発生等が主な作用として上げられる。最近注目されている光を利用した経ファイバー的、非侵襲的、選択的な診断補助装置は、このようなレーザー光と生体との相互作用の特長を生かした技術に立脚している（表2）。

表2. レーザー光を利用した特長

1. 傷害性のない波長を選択することで生体に対する非侵襲性を確保できる。
2. 光と生体との相互作用の観点から細胞・組織の特性解析が可能である。
3. 経ファイバー的な計測が可能であり計測対象部位の応用範囲が広い。
4. 装置の小型化が可能であり可搬性に優れる。
5. 解析ソフト開発により簡便かつ迅速な診断が可能である。

これらの相互作用を利用することで、形態情報だけでなく、生理的、生化学的な多

情報をも同時取得することが可能であることから、超音波のような単一情報の解析よりも、診断装置としての将来性が大いに見込まれている。我々は、関節軟骨の本来の機能特性である力学特性と組織性状をナノ秒パルスレーザー照射により非侵襲的に得られる光音響信号と蛍光情報から評価する技術を開発し、関節鏡視下に適用可能とし、変形性関節症など軟骨変性を伴う慢性関節炎等の正確な病態把握と各種治療による効果判定の定量評価を可能とするシステムを開発する。

光音響法と時間分解スペクトル分析法に必要な不可欠な各要素技術を臨床使用可能なレベルに押し上げること、及びその結果得られた測定システムの診断法としての有用性を確認することが必要である。平成19年度は3年計画の初年度であり、実用的なレーザーの選択と導光系の検討、並びに軟骨の特性が測定可能な光音響センサーの開発を計画した。

具体的な研究計画としては、現在下記の分担研究者、研究協力者を下記の3グループに分け、研究を継続中であるが、必要に応じて各グループ間でも討議し、人的交流を行いながら、効率的な研究が実施できるような体制を整えている。以下の分担研究報告は本グループ毎に報告する。

1. ナノ秒パルスレーザー励起自家蛍光時間分解スペクトル分析による scaffold free 組織工学的軟骨の非侵襲的組織性状評価に関する研究グループ

分担研究者 杵名寿治
分担研究者 三谷玄弥
分担研究者 持田譲治

2. 光音響原理に基づく力学特性計測法を用いた関節軟骨変性診断システムの開発に関する研究グループ

分担研究者 石原美弥
分担研究者 石原雅之
分担研究者 菊地眞

3. 蛍光相関分光法による関節軟骨中の拡散現象に関する研究グループ

分担研究者 李 禎翼
研究協力者 丑田公規

【倫理面への配慮】

東海大学では臨床研究審査委員会並びに医の倫理委員会を設けており、厳格な審査の上に臨床研究を行っている。厚生労働省が定めた「臨床研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、研究対象者に対してのインフォームドコンセント、患者の権利、守秘義務、プライバシーの保護に十分に留意している。本研究内容に関しては平成17年から臨床研究審査委員会の承認の下、東海大学においてヒトサンプルを用いた臨床研究を実施している。また、動物実験においては、東海大学動物実験委員会並びに防衛医科大学校動物実験施設主催の動物実験講習会に本事業の動物実験担当研究員は全員受講し、動物実験に関する理念：3Rの原則を理解し、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保育並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守し、動物愛護の精神に基づいた十分な配慮がなされている。

C. 研究結果

【光音響法による力学特性評価法】

我々は、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。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を照射して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。時間 δ における応力波の強度の時間変化 I_δ は次式で表される。

$$I_\delta = I_0 \times R \times \exp(-t_\delta / \tau)$$

I_0 は $t=0$ の時の応力波の強度、 R は反射率の積（試料の両端の界面での内部反射率の積）、 t_δ はレーザー照射後の時間で、 τ は応力波の減衰時間であり、粘性と弾性の比に相当する。

研究開発当初はレーザー光の至適な波長が不明であったため、OPO（光パラメトリック発振器）を用いて、コラーゲンやタンパクを光の吸収体として、発振波長を 250-355nm で設定し、この範囲のどの波長においても光音響信号の計測は可能であった。この波長範囲内では短い波長の方が生体の吸収は大きくなるため、発生する光音響波のピーク値を高めることと光音響波発生深度を浅く設定できる。しかしながら、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ため、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とした。出力光は石英光ファイバー（コア径：400nm）で導光し、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ポリビニリデン共重

合体 (P(VdF/TrFE)) を用いたプローブを開発した。これも当初は、レーザー照射側と計測側が対向する、すなわち透過型の *in vitro* での評価しかできないものであったが、幾多の試行錯誤の結果、光ファイバーをプローブの中央に配置して、センサーをその周囲にリング状に配置することで、一体化した反射型プローブを開発し、*in vivo* すなわち関節鏡視下でも計測可能となった（図 1）。

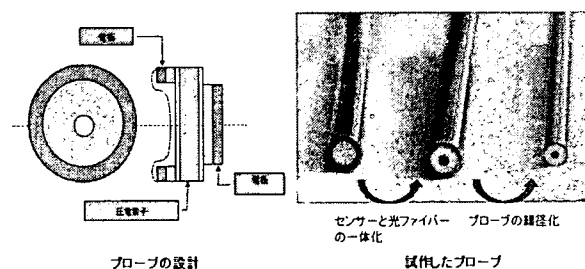


図1. プローブの開発

【時間分解自家蛍光スペクトル解析による性状評価法】

時間分解自家蛍光計測においても、光音響法と同様に、励起光は光ファイバーで導光した Q スイッチ Nd:YAG レーザー第 3 高調波を用い、イメージインテンシティファイア付 CCD センサーを光検出器として、ナノ秒オーダーのゲートで測定可能な分光システムを 4 チャンネルのデジタルパルスジェネレータで制御しながら施行した。計測パラメータは、蛍光ピーク強度、半値幅、ピーク波長、蛍光体積、蛍光寿命を算出した。対象サンプルとしては、日本白色家兔の関節軟骨、椎間板線維輪外層、市販の I 型並びに II 型コラーゲン（粉末）を各々用いた。

その結果、関節軟骨は、II型コラーゲンに近似したスペクトルを呈し、ピーク波長並びに半値幅も近似した。一方、線維輪外層はI型コラーゲンに近似したスペクトルを呈し、同様にピーク波長並びに半値幅も近似した（図2）。

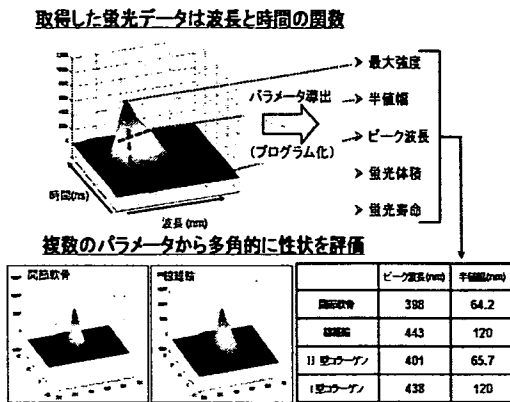


図2. 時間分解自家蛍光スペクトル解析

これは、生体内の自家蛍光物質であるコラーゲンの組成までも、非接触で計測可能であることを示したものであり、特に軟骨の変性度の診断に関してはI型、II型コラーゲンの含有比は重要と考えられており、意義深い。

D. 考察

「健康日本21」は新世紀の道標となる健康施策であり、国民の健康づくり対策が推進されている。また、国民の3分の2は運動習慣がないという状況を鑑みて「健康づくりのための運動指針2006」が生活習慣病予防のために策定された。しかしながら、生活習慣病を抱えている多くの高齢者は実は変形性関節症に罹患しており、身体能力的にはできるかもしれない運動が、関節の痛みと可動域制限のために実施できない場合も多い。特に糖尿病、高脂血症、肥満の患者では、運動療法は必須であるにもかか

わらず、変形性関節症のために思うように実施できず、さらなる疾患の増悪を招き、深刻である。変形性関節症では保存療法の予後や手術後の治療効果判定が患者の自覚症状に基づく場合が多く、正確な病態把握がなされていないばかりか、人工関節置換術等の手術的治療は末期の患者になされるため、初期から中期の患者は漫然と保存的に加療されている現状がある。

我々は、本事業を通して、非侵襲的な強度のパルスレーザーを用いて、関節鏡視下に関節軟骨の力学特性と性状評価を同時に施行可能であることを示す。そして、現在その装置化に向けて、試行錯誤を繰り返している。装置化が実現し、関節鏡視下で関節軟骨本来の機能である力学特性と組織性状を正確に計測し、誰もが定量的に機能評価することが可能となれば、変形性関節症の正確な病態把握ときめ細かな治療計画及びその遂行が可能となる。さらに、各種の薬剤等の治療効果に関しても、従来の関節周囲の痛みや炎症症状といった臨床症状評価に加え、定量的に力学特性と組織性状とを同時に計測し評価する本技術は、新薬等の治験の際の関節軟骨の客観的評価法としても有用と考えられる。

本診断システムは、関節鏡視下での評価法であり、全くの非侵襲評価とはいえないが、関節鏡視下での観察や治療の際に、定量的なデータが今後集積されれば、軟骨変性の重症度による各種保存療法の効果も予測可能となり、個々の患者に合わせた、よりきめ細かな治療計画の作成とその遂行が可能となる。上記のような理由から、本技術開発並びに装置化は患者のADLとQOLの向上ひいては国民の健康寿命の延伸に寄与

するものと確信している。

E. 結論

1. 非侵襲的なナノ秒パルスレーザー誘起の光音響法で軟骨の力学特性を、時間分解自家蛍光スペクトルで性状分析を評価可能であった。

2. 光と生体との相互作用を利用した本計測システムは、種々のパラメータに基づき、多角的かつ定量的に軟骨本来の機能評価が可能であり、関節鏡視下診断に適した評価法である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①佐藤正人, 石原美弥, 沓名寿治, 三谷玄弥, 菊地眞, 持田譲治 変形性関節症の病態把握と治療効果判定を可能にする定量的機能診断システムの開発—ナノ秒パルスレーザーを用いた力学特性と組織性状の同時計測を目指して別冊整形外科 53, 76-82, 2008
- ②Ishihara M, Sato M, Kutsuna T, Mochida J, Kikuchi M. Modification of measurement methods for evaluation of tissue-engineered cartilage function and biochemical properties using nanosecond pulsed laser. Proceeding of SPIE 6858, 685804-1-685804-5, 2008
- ③石原美弥, 佐藤正人, 三谷玄弥, 長井敏洋, 沓名寿治, 持田譲治, 菊地眞, 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, 127-C(12), 2166-2170, 2007

④石原美弥, 佐藤正人, 持田譲治, 菊地眞, 大串始(監訳). レーザーを用いた培養軟骨評価, 再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性, 123-137, シーエムシー, 2007

⑤Ishihara M, Sato M, Ishihara M, Mochida J, Kikuchi M. Multifunctional evaluation of tissue engineered cartilage using nano-pulsed light for validation of regenerative. IFMBE Proceedings WC 2007 14, 3187-3189, 2007

⑥Ishihara M, Sato M, Kaneshiro N, Mitani G, Nagai T, Kutsuna T, Ishihara M, Mochida J, Kikuchi M. 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

2. 学会発表

- ①Ishihara M, Sato M, Kutsuna T, Mochida J, Kikuchi M. Modification of measurement methods for evaluation of tissue-engineered cartilage function and biochemical properties using nanosecond pulsed laser. SPIE Photonics West, BiOS2008: Abstract Summaries(CD-ROM) 6853-A2, 172-172, 2008
- ②Ishihara M, Sato M, Mochida J, Kikuchi M, Noninvasive functional evaluation of tissue engineered

cartilage using nano-pulsed light. 2007
BMES Annual Fall Meeting, Abstract
Summaries(CD-ROM), 2007

③Ishihara M, Sato M, Kaneshiro N,
Mitani G, Nagai T, Kutsuna T, Mochida
J, Kikuchi M. Development of
fluorescent measurement system for
evaluation of articular cartilage
characteristic using nano-pulsed light:
simultaneous evaluation with
viscoelasticity. 53rd Annual Meeting of
the Orthopaedic Research Society ,
Abstract Summaries(CD-ROM), 2007

④石原美弥, 佐藤正人, 持田讓治, 菊地眞,
軟骨再生医療評価のための光計測技術開
発, 第7回日本再生医療学会総会日本再
生医療学会雑誌 7suppl, 101-101, 2008

⑤石原美弥, 光を用いた再生軟骨組織の
評価, 第34回日本臨床バイオメカニクス
学会, 204-204, 2007

⑥石原美弥, 佐藤正人, 三谷玄弥, 杳名寿
治, 持田讓治, 菊地眞, レーザー誘起光音響
法による変形性関節症診断システムの開発
第22回日本整形外科学会基礎学術集会, 日
本整形外科学会雑誌 81(8), S1077, 2007

⑦石原美弥, 佐藤正人, 持田讓治, 菊地眞,
光技術を用いた軟骨再生医療評価, 第22回
日本整形外科学会基礎学術集会, 日本整形
外科学会雑誌 81(8), S941, 2007

⑧杳名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克
子, 長井敏洋, 持田讓治, 自家蛍光時間分解
スペクトルによる旋回培養法を用いて作製
した組織工学的軟骨の非侵襲的性状評価,
第22回日本整形外科学会基礎学術集会, 日
本整形外科学会雑誌 81(8), S1061, 2007

⑨石原美弥 軟骨再生医療バリデーション

のためのナノ秒パルスレーザー光を用いた
非侵襲的多機能計測法の開発, 第28回日本
レーザー医学会総会, 日本レーザー医学学
会誌 28(3), 293-293, 2007

⑩杳名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克
子, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治 自家
蛍光時間分解スペクトルによる旋回培養法
を用いて作製した組織工学的軟骨の非侵襲
的性状評価, 第34回日本臨床バイオメ
カニクス学会

⑪李 禎翼, 小池 亮一, 森戸 崇暁, 佐藤
正人, 丑田 公規 蛍光相関分光法による
関節軟骨中の拡散現象の研究 理研シンポ
ジウム「蛍光相関分光で見る生体系の情報
伝達」

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告

光音響原理に基づく力学特性計測法を用いた

関節軟骨変性診断システムの開発に関する研究

分担研究者 石原 美弥 防衛医科大学校医用工学講座・准教授

分担研究者 菊地 眞 同 教授

分担研究者 石原 雅之 防衛医学研究センター医療工学部門・教授

本研究では、研究者らが世界で初めて原理提案及び原理実証を行なった光音響原理に基づく力学特性計測法を用いて、関節軟骨変性の診断システムの確立を目的とした。測定信号の励起源としてシステムの小型化・可搬化を可能にするナノ秒パルスレーザーとして Q スイッチ Nd:YAG レーザーの第 3 高調波を用いた。また、センサーと導光用光ファイバー一体型のプローブを試作し、ヒト骨軟骨プラグを対象として軟骨のみの力学特性が測定できることを確認した。さらに、サンプルの病理切片と計測結果を比較検討した結果、正常部と変性部の区別が本計測法で可能であった。

A. 研究目的

本研究で提案している変形性関節症の定量的かつ機能的診断方法とは、光計測技術を用いて関節軟骨本来の機能に係わる力学特性と組織性状を評価する方法である。構造を司る組織である軟骨組織は、主に力学特性、生化学的組成で特徴づけられる。特に体重の数倍以上の負荷を受け止める硝子軟骨(膝関節軟骨)の主要な機能は抗荷重機能であり、応力などによる変形から瞬時に回復する弾性体ではなく、時間とともに回復する力学特性体として特徴づけられる。よって、関節軟骨の力学機能を評価するためには、力学特性を測定、特に、加えたひずみの大きさに依存しない特徴をもつ圧縮変形からの緩和関数が軟骨組織の力学機能評価に適した指標である。一方、関節軟骨の性状に関しては、軟骨組織の機能を直接担う細胞外マトリックスの主要なコラーゲンは II 型コラーゲンであることで特徴づけられる。よって、変性に伴う細胞外マトリックスの性状の変化は

変形性関節症の有用な評価法となる。以上より、変形性関節症の診断に有用な評価パラメータが力学特性と組織の性状であることは明らかである。本研究で、軟骨の力学特性と組織性状を測定する手段に光計測技術を選択することについては以下の通りである。

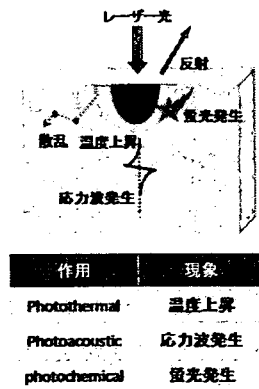
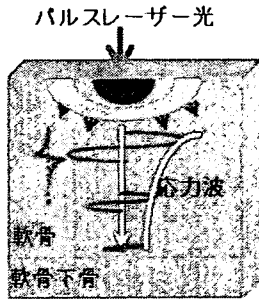


図1 レーザー光と生体の相互作用

光と生体は図1に示すように多様な相互作用であるため、光計測技術により得られる

情報量は多く、多角的な測定が可能である特長を持つ。研究者らは、既に Photoacoustic（光音響）作用を用いて力学特性を計測する方法を提案している。計測原理を図2に示す。



パルスレーザーを軟骨に照射して発生する音波の減衰 ↔ 軟骨の粘弾性
 音波の減衰時間 $(\tau) = \eta / G$
 (η :粘性, G :弾性)

図2 力学特性計測原理

レーザーで励起される応力波（生体に一定条件の光を照射すると、吸収体において熱弾性過程により応力波（光音響波）が誘起される）が媒体（生体組織）の力学特性（力学特性）の影響を受けながら伝搬することを利用して、レーザーを組織に照射して発生させたレーザー誘起応力波の強度の経時的変化から組織の力学特性を評価する原理である。この方法は研究者らが世界で初めて提案し、力学特性分析法（レオメーター）で測定される固有の力学特性（粘性と弾性の比）と一致することを世界で初めて実証した。本計測法は、我が国発の技術である。本法は、光計測の最

大の欠点である散乱の影響を受けず、また超音波計測よりも高い空間分解能が得られる特色を持つ。生体モデルとして濃度を変化させたゼラチンファントムを用いて原理検証実験を行なった。

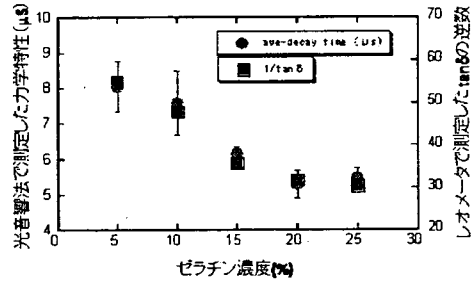


図3 生体ファントムを対象にした原理検証実験

図3に示す結果からわかるように、従来の破壊的力学特性分析法（レオメータ）の結果と高い相関を有することを確認した。NEDOプロジェクト「再生医療の早期実用化を目指した再生評価技術開発」の一貫として、組織工学的軟骨組織を対象に提案した方法の有用性を示している。

本年度は当該研究の第1年目として、大きく分けて、

- [1] 励起光源の最適化、
- [2] 実用的プローブの検討、
- [3] ヒトサンプルを対象にした計測

以上の3つの項目に関して実施し、力学特性計測システムを構成する要素・基盤技術の確立及び成熟を目指した。

B. 研究方法

当該研究の第1年目として、実施した3項目に関する研究方法に関して以下詳細に記載する。まずは開発している力学特性計測法のシステム構成を図4に示す。[1] 励起光源の最適化に関しては図4中の(a)レーザー装置と(b)光ファイバーの検討に該当し、[2] 実用的プローブの検討に関しては図4中の(c)に関しての検討に該当、[3] ヒトサンプルを対象にした計測は、システム全体での計測となる。

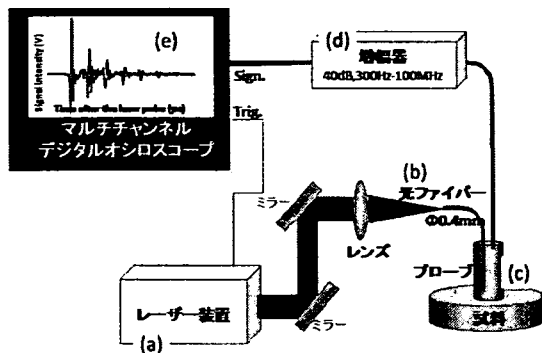


図4 システム構成図

[1] 励起光源の最適化

生体に一定条件の光を照射すると、吸収体において熱弾性過程により応力波が誘起される。この応力波を検出する方法が光音響法である。

応力波が発生する条件は、以下の通りである。

レーザー光が吸収体（吸収層）において吸収され、レーザーの光エネルギーは熱に変換されるが、レーザーのパルス幅（ τ_p ）が応力緩和時間（ τ_{str} ）よりも短い、すなわち、次式の条件を満たせば熱弾性過程により圧力波が放出される。

$$\tau_p \ll \tau_{str} = 1 / \mu_a v_s \quad (1)$$

ここで、 μ_a は吸収係数、 v_s は媒質の音速である。この(1)式の条件は、応力閉じこめ

(stress confined) 条件などによられる。生体の代表的吸収体に対して、ナノ秒のパルス幅をもつパルスレーザーで成立しうる。つまり、フェムト秒などの超短パルスレーザーなどの高価で特殊な光源はいらない。そこで、本検討事項として、レーザーのパルス幅はナノ秒に限定し、波長を変化させて、励起光源の最適化を図った。

励起光源としてまず初めに波長可変のナノ秒パルス光源であるOPO（光パラメトリック発振器）を用いた。次に、コラーゲンやその他の蛋白質を光の吸収体とした波長（250～355nm）をOPOの発振波長に設定し、さらにより実用性が高く安全性が確保可能なNd:YAGレーザーの第3高調波（355nm）も比較検討した。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ため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。OPOの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。検討事項は、濃度を変化させた（＝力学特性を変化させた）ゼラチンファントムと摘出ブタ膝関節軟骨を対象にした光音響計測である。

[2] 実用的プローブの検討

開発しているシステムを臨床使用可能にするためには、力学特性計測のためのセンサーと導光用光ファイバーを一体型にしたプローブを製作することが必須であるので、本年度、最も注力した研究項目である。NEDOプロジェクトでの開発はin vitroのみの使用を対象にしているのに対して、本研究では励起光源を導光する光ファイバーと応力波を検出するセンサーを一体化した一体型プローブを設計・試作させて臨床使用を可能にする

必要があるからである。研究者らはレーザー照射により発生した応力波（光音響信号）の

検出に圧電素子を用いた。圧電素子に関して図5、図6に示す。

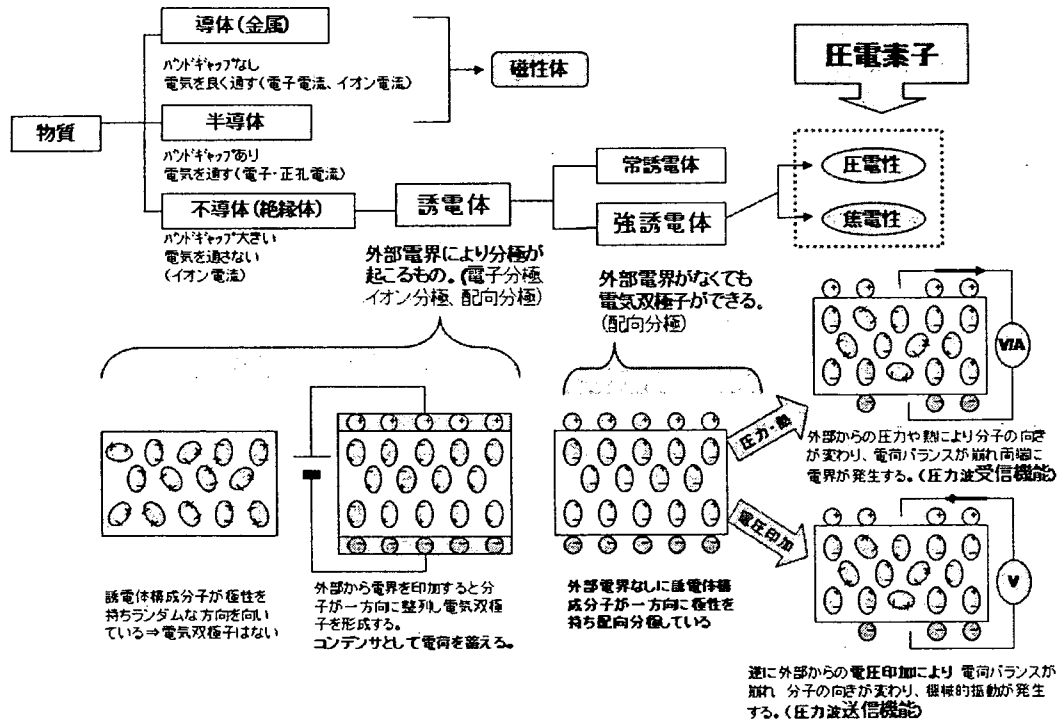


図5 圧電素子とは

圧電素子で実用的なものには、セラミックタイプと高分子フィルムタイプがある。どちらも圧力を電気に変換する、その逆に電気を圧

力に変換する。また、焦電性を持つ。
 ※超音波トランスデューサーとしては両者とも使われている。

	セラミックタイプ	高分子フィルムタイプ
素子例	PZT(ジルコニウム酸鉛)、BaTiO ₃ など	PDVF, P(VdF/TrFE)など
周波数特性	大体2MHz~30MHz(周波数帯域は狭い)	約10MHz~300MHz(周波数帯域は広い)
音響インピーダンス:Z	20~35×10 ⁶ kgm ⁻² ・s	3~5×10 ⁶ kgm ⁻² ・s
	生体のZは1.5~1.7×10 ⁶ kgm ⁻² ・s (血液1.6、骨3.8~6.7)	
圧電ひずみ定数:d	70~110×10 ⁻¹² coul/N	30×10 ⁻¹² coul/N
圧電応力定数:e	860~920×10 ⁻¹² coul/m ²	9×10 ⁻¹² coul/m ²
比誘電率:ε _r	1200~1700	13
キュリー温度	470℃~1200℃	(120℃)
現状	★感度の高い超音波トランスデューサができる。(d ₃₁ 参照) ★高出力の超音波加工、超音波探傷など、また生体外部からの超音波診断などに利用…空中超音波センサもある	★加工性は容易(クレハ)なので所望の形状は容易に得られる。 ★音響インピーダンス、比誘電率などの特性を生かした、生体内部の超音波診断等に利用 ⇒今回のプローブはP(VdF/TrFE)

図6 圧電素子の特性

開発するプローブに求められる性能に関して表1にまとめた。

表1 プローブに求められる性能

1)応力波（超音波）の受信性能が高いこと すなわち軟骨組織内の応力波の周波数帯域において高感度であること ①受信波電気信号のV _{pp} が高い ②指向角が広く、接触面角度に余裕がある ③伝播方向の分解能が高く、深さ方向の感度が高い
2) 軟骨組織からの応力波が効率よく、圧電素子に伝わること すなわちプローブ表面と軟骨組織表面の間での超音波の音響インピーダンスの整合が取れること
3)耐ノイズ性・信号伝達特性の良好なこと プローブの長さや測定器（FETアンプなど）までの同軸ケーブルによるノイズの影響や信号減衰がないこと。
4)レーザー照射による組織の温度上昇による影響が少ないこと
5)可能な限り小型でソフトな外形構造であること 軟骨組織表面に直接コンタクトするため、生体組織の破壊が無い様に清潔で、可能な限り小型でソフトな外形構造であること
6) 機械的、温度耐久的に堅牢であること
7)量産性と低価格化が図れること

なお、本研究を通して使用した測定機器として、パルサーレシーバは、パナメトリックス

社 Model 5900PR、オシロスコープはアディレイントテクノロジー社 DS08104A である。測定は外部同期トリガー（立ち上がりエッジ、DC）で施行した。

本年度は、圧電素子などの特性計測を中心に次の①~⑥について検討した。

①超音波実験系の構築及び動作確認

②P(VdF/TrFE)プローブのパルスエコー法による評価

③P(VdF/TrFE)プローブのスルー送信法による評価

④LCRメータによる特性評価

⑤同軸ケーブル経由の外来ノイズ

⑥焦電特性の評価

①超音波実験系の構築及び動作確認

PZT（セラミック）タイプの市販のトランスデューサー（パナメトリックス社 ACCUSCAN™S™シリーズ）を用いてパルスエコー法(P/E法)による超音波周波数特性を測

定することにより、今後評価するための実験系の確認と検証を行なった。図7に示す。反射板としてステンレスバッドをトランスデューサーの面から 10.0 cm 離して対向させ、蒸留水中で水深 2cm 程度に超音波伝搬路を設定した。波形観測は 1 次反射波で行った。

- i) A306S-SU 2.25/0.5 · NO.71150、
- ii) A309S-SU 5.0/0.5 NO.6908、
- iii) A311S-SU 10/0.5 F4”NO.41174・・・
 焦点距離 0.75”~8.40”

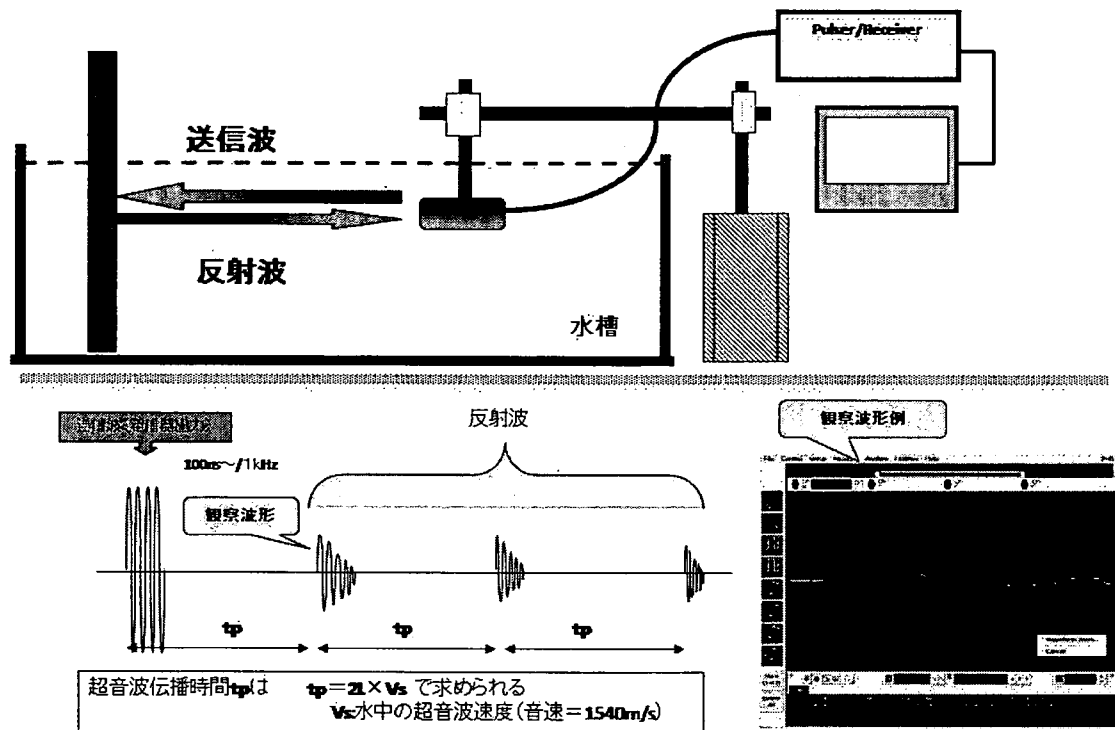
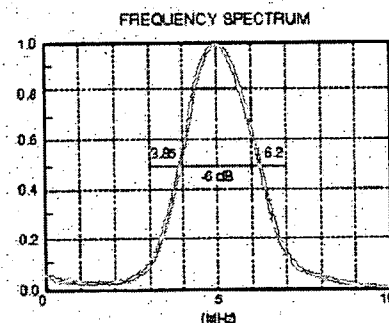
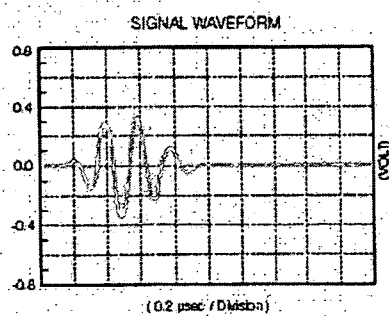


図7 パルスエコー法による超音波観察波形方法

Olympus NDT 社のトランスデューサー ACCUSCAN”S”シリーズの代表特性は下記の通りである。



②P(VdF/TrFE)プローブのパルスエコー法による評価

評価用の実験系の確認が出来たので、現在までに入手している P(VdF/TrFE)フィルム圧

電センサーを持つプローブの評価をパルスエコー法により評価する。図7に示すように

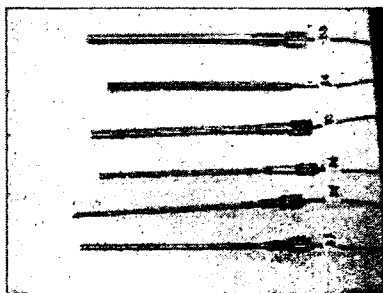
パルスエコー法で、プローブセンサー面と反射板との距離を 3cm と 10cm に設定して測定を行った。

なお、設定した条件は、トランスデューサーのエネルギー 16 μ J、ダンピング抵抗 50 Ω 、

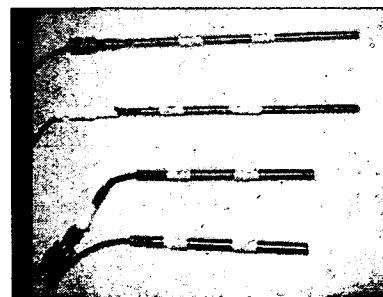
HPF:1KHz、LPF:100MHz、Gain: 54dB
 Attenuator:6.5dB、RF 位相 180° である。表 2 に本研究で使用した P(VdF/TrFE) フィルムをセンサー材料に用いたプローブを表にした。

表 2 P(VdF/TrFE) フィルムをセンサー材料のプローブのリスト

	送受信感度特性		ノイズ・信号減衰特性			共振周波数	整合特性
	ファイバー穴の大きさ(mm)	プローブ径(mm)	プローブ長(cm)	同軸ケーブル径(cm)	同軸ケーブル長(cm)		
A	なし	4	15	1.8	60	100	黒 Epoxy
B	なし	4	15	1.8	60	500	黒 Epoxy
C	なし	5.5	10	2.6	4	50	透明ラバー
D	なし	6	10	2.6	63	50	黒 Epoxy
B3	1.5	6	19	1.8	140	50	シルバー Epoxy
B4	1.0	6	14	1.8	50	50	白ラバー
B5	1.5	6	14	1.8	90	50	シルバー Epoxy
B6	1.0	4	14	1.8	90	50	シルバー Epoxy
B8	1.0	4	14	1.8	100	50	シルバー Epoxy
B9	1.0	4	15	1.8	100	50	黒 Epoxy



光レーザー用穴ありプローブ
 B3,B4,B5,B6,B8,B9



穴なしプローブ
 A,B,C,D

③P(VdF/TrFE)プローブのスルー送信法による評価

超音波特性評価法のうちのスルー送信法での評価を行うことにより、パルスエコー法でのプローブの送信出力特性の影響を

なくし、プローブの受信感度特性を評価する。PZT トランスデューサーを放射源(送信側)としてスルー送信法による超音波受