

波数とほとんど同じ値である。またプローブDおよびBシリーズはほとんど同じ程度の共振周波数（5.3MHz～5.9MHz）を示している。しかし、送信側のトランスデューサーのパルスエコー法による1次反射波の共振周波数4.93MHzであることよりどちらが真値かが問題となる。しかしここでは評価目的が違うので別途測定方法を検討する。Fig.1に示されているパルスエコー法でのVpp（P/E法Vpp）とスルー法でのVpp（スルー法Vpp）を比較した結果の要点を以下にリストする。

- ・出力Vppの大きさすなわち送信・受信感度はプローブ径が大きい方が大きく、4mmφに対し6mmφはほぼ面積比だけ大きい。これは圧電フィルム面積が両電極間に蓄積される総電荷量や機械的強度に関係することによるからであると推定される。

- ・P/E法Vppとスルー法Vppの相関は実線で示されるようにパルスエコー法のVppがスルー法のVppよりほぼ1V大きい。パルスエコー法での受信側増幅度はスルー法の54dBより低い54dB-6.5dBとしていることから、送信側振動子の違いがあるにせよ送信側振動子への印加エネルギーの差（16μJと1μJ）による影響も考慮すべきものと考ええる。

LCRメータによる特性結果をプローブ間での比較をするとVppの傾向と一致するのはRpである。そしてRpの値に関係するQ

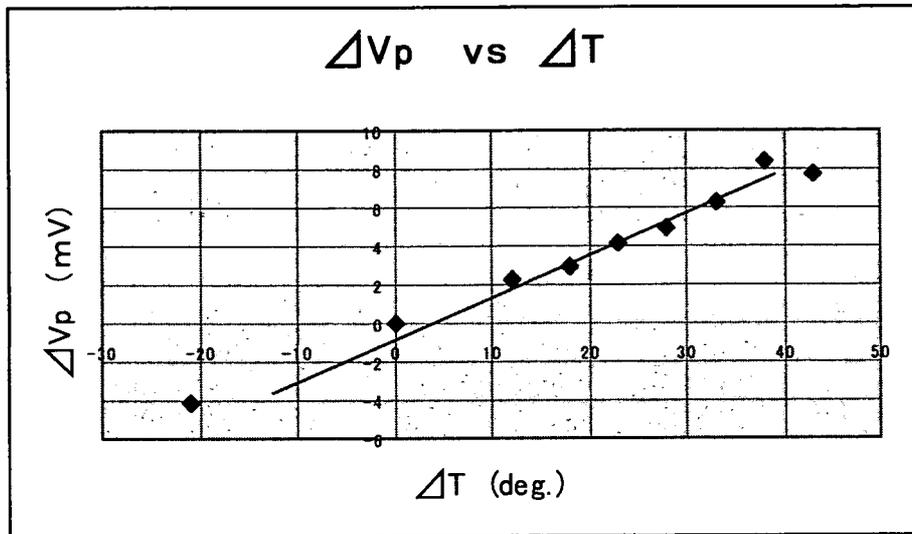
及びGが類似の傾向を示している。よって、この比較においてRpが感度と相関のあるパラメータと見える。

- ・Cpに周波数依存性がないのは、同軸ケーブルの性能による影響によるものである。なお同軸ケーブルはJIS等の規格などで決められた、インピーダンスが50Ω（@10KHz）または75Ωのものと考えられるが、それらは周波数依存性が少ないと考えられるのでこの結果は妥当である。

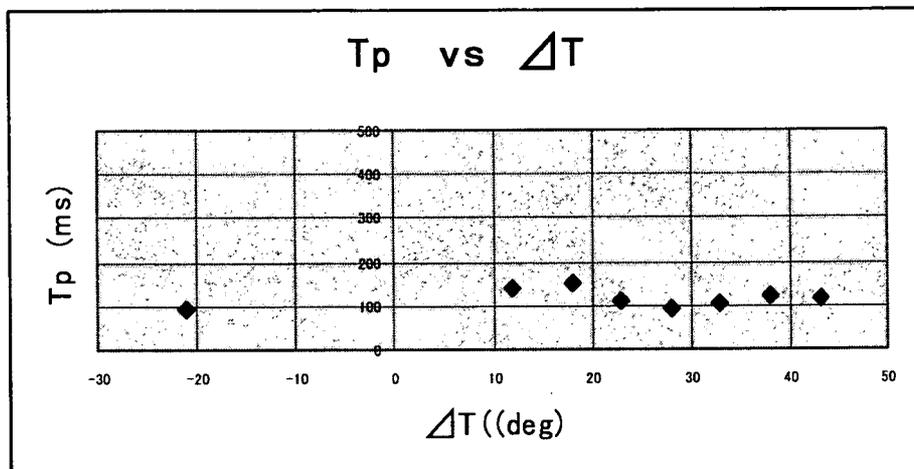
- ・Rpの周波数依存性は、センサー素子（高分子センサー構成構造）そのものの要因によるものと断言できる。また、高分子膜厚の影響は大きい。

同軸ケーブル経由の外来ノイズの調査より、同軸ケーブルの終端は圧電センサーでありセンサーは小容量のキャパシタであるので、プローブのケーブルは極力短い方がよいとの結論となった。追加調査としてアンプからのケーブル長による影響の調査を行う必要がある。

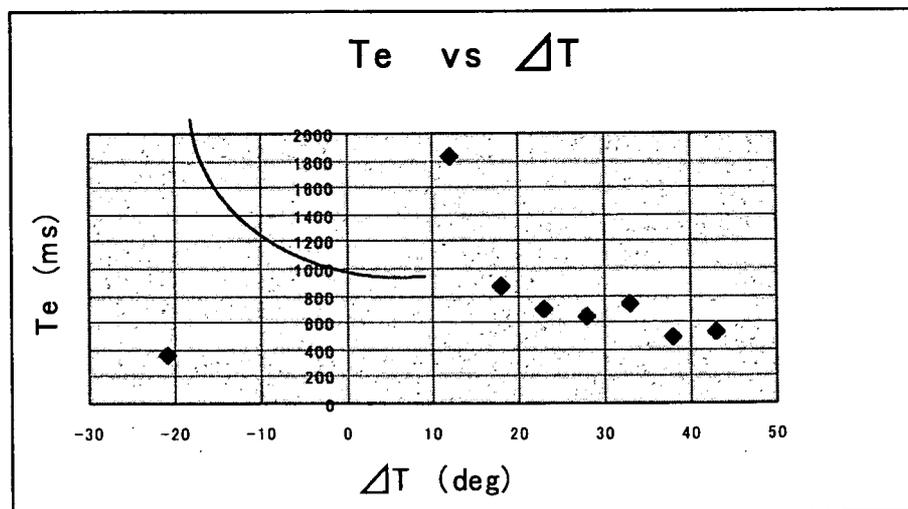
焦電特性の評価実験結果より以下が得られた。



焦電電圧変化  $\Delta V_p$  は温度変化量  $\Delta T$  に比例している。



$T_p$  は  $\Delta T$  とはほとんど関係しない。



$\Delta T$  のプラス側だけに当てはめると  $T_e$  は上記の外挿線に沿っている。

黒体放射実験による焦電性実験のプロープ C(プロープ D では黒エポキシ樹脂保護膜のため焦電出力が得られなかった)での OFF⇒ON でも ON⇒OFF でも  $V_p$  の  $1/e$  の値までの時間 ( $T_e$  相当) は 200msec~400msec であり、今回の液相実験での  $T_e$  とほぼ同等の値を示している。すなわち液相でも気相でも  $V_p$  にまで達した後は発生電荷間が電氣的にまた熱的に消滅していく時間は同じと考えられる。

電圧波形について以下に箇条書きにする。

・  $T_p$  のスタートポイントでは保護膜表面を通してセンサーフィルム表面に熱が到達した時である。よって厳密に測定すれば、保護膜の熱伝導特性がわかるのではないか。

・  $V_p$  に達する時は保護膜が表面の温度（液相温度）をセンサーフィルム表面に完全に伝えた時である。すなわちセンサーフィルムの表面と裏面の温度差が最大の場合である。

### [3] ヒトサンプルを対象にした計測

人工関節置換術の際に入手可能なヒト骨軟骨プラグを対象とした計測では、骨の影響を受けずに力学特性が計測できること、測定した正常部と変性部の力学特性を病理切片と比較検討したところ、変性に基づく力学特性の変化が観察できたので、関節軟骨変性診断への可能性が示された。

### E. 結論

関節軟骨変性の診断システムの確立を目的として、システムを構成する要素技術の成熟を図ったところ、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 高調波を測定信号の励起源として使用すること、センサーと導光用光ファイバー一体型のプロ

ープを試作し、軟骨下骨の影響を受けずに軟骨の測定が可能になったこと、ヒト骨軟骨プラグを対象として正常部と変性部の区別が可能であることが結論づけられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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. Proceeding of SPIE 6858, 685804-1-685804-5, 2008

②石原美弥, 佐藤正人, 三谷玄弥, 長井敏洋, 杳名寿治, 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

③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

④Ishihara 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

⑤Ishihara 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, 沓名寿治, 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沓名寿治, 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

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 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

分担研究者 杓名 寿治 東海大学医学部外科学系整形外科学・助教  
分担研究者 三谷 玄弥 同 ・講師  
分担研究者 持田 讓治 同 ・教授

研究要旨：旋回培養法にて構築した組織工学的軟骨の組織性状を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り、非侵襲的、経時的に計測した。従来の組織学的評価、生化学的、分子生物学的評価法、物理学的特性評価法と比較検討した。本法で計測した自家蛍光のピーク波長の変動はコラーゲン Type II の変動と近似し、半値幅、減衰時間は、それぞれ軟骨細胞の分化の状態と、組織性状を反映した。

#### A. 研究目的

再生医療の現場において、再生組織作製のために臨床で得られる細胞数や、作成できる再生組織には限りがある。また、移植時には再生組織自体の物理学的特性や組織性状の評価が必要となるため、非侵襲的な評価法が不可欠である。当グループの石原らはパルスレーザー照射により発生した応力波の伝播と減衰が組織の粘弾性に影響されることを発見し、生体組織の粘弾特性評価のためにこの原理を用いた光音響法を使用することを提案した。本研究はこの光音響法に用いるパルスレーザーをサンプルに照射し、励起された自家蛍光を測定することで非侵襲的粘弾特性評価と同時にリアルタイムで非侵襲的な組織性状評価が可能かどうかを検討するものである。本検討では、in vitro での検討を行う目的で、組織工学的手法を用いて作製した軟骨組織を対象に測定を施行した。

#### B. 研究方法

##### 1. 自家蛍光測定システム

実験装置は図1の通りである。自家蛍光の励起にはナノ秒パルス光を使用した。ビームはレンズにより集光し、コア径 600  $\mu\text{m}$  の石英ファイバーと連結した。光源は市販のQスイッチNd:YAGレーザー第3高調波（波長 355nm、周波数 5Hz）を使用した。パルス光によって励起された自家蛍光は photonic multi-channel analyzer with ICC-D（波長範囲 200～860nm、分解能 3nm、露光時間 19ms、ゲート時間 10ns）を用いて時間分解自家蛍光スペクトル測定を行った。計測した自家蛍光は Mat Lab 社製計算ソフトを用いて3次元表示し、パラメータとしてピーク波長、半値幅、減衰時間を計算した。

## 2. 細胞培養

体重約 1 kg の 4 週齢日本白色家兔 (12 羽) の肩、膝関節軟骨細胞を採取し、4% (W/V) アクチナーゼ E (Kaken Pharmaceutical Inc., Tokyo, Japan) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 F12 (F12/DMEM; Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) にて 1 時間、続いて 0.016% (W/V) bacterial collagenase P (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 含有 F12/DMEM にて 3 時間の酵素処理を行った。酵素処理を行った軟骨組織を 70  $\mu$ m のセルストレイナー (Becton Dickinson Labware Co. Ltd, Franklin Lakes, NJ) にて濾過し、1500 rpm で 5 分間遠心分離を行った。得られたペレットを DMEM/F12、10% fetal bovine serum (Gibco)、100 U/mL penicillin (Gibco)、100  $\mu$ g/mL streptomycin (Gibco)、0.25  $\mu$ g/mL fungizone (Gibco)、50  $\mu$ g/mL ascorbic acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) にて懸濁し、500cm<sup>2</sup> スクエアディッシュに  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 気相、95% 湿度の条件で培養した。約 1 週間後 70% コンフルエンスの初代単層培養細胞を 0.05% trypsin/EDTA (Gibco) にて 37°C リン酸緩衝液 (PBS; phosphate-buffered saline) にて洗浄後、培養液にて再度懸濁し、 $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> にて 2 継代した。

## 3. 組織工学的軟骨作製

2 継代した軟骨細胞を DMEM/F12、20% fetal bovine serum (Gibco)、100 U/mL penicillin (Gibco)、100  $\mu$ g/mL

streptomycin (Gibco)、0.25  $\mu$ g/mL fungizone (Gibco)、50  $\mu$ g/mL ascorbic acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) にて懸濁し  $1.0 \times 10^7$  cells/mL に調整した。市販の酸素、栄養の拡散を許容したポアサイズ 0.4  $\mu$ m のカルチャーインサートフィルム上に円筒形の硝子製鋳型 (径 10mm、高さ 10mm) を設置し、カルチャーインサート下層に 15ml の培養液を、次いでカルチャーインサート上に 15ml の培養液を加え調整した細胞懸濁液を鋳型に 0.6ml 播種した後 30 分間放置した。細胞懸濁液が重力に従い鋳型内でインサートフィルム上に沈殿していることを確認後、鋳型が完全に満たされるまで、カルチャーインサート内に約 30ml の培養液を加え、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 気相、95% 湿度の条件で 8 時間培養した。その後、鋳型を除去し、円形の鋳型に一致した細胞塊 (軟骨細胞プレート) を 7 日間同条件で培養した。次いでインサートフィルム上で鋳型に一致した形態を維持した細胞プレートを葉さじにて剥離し、非接着性の 6 穴培養皿に移し、1 プレートにつき 6ml の培養液にて培養した。旋回培養条件では、旋回振盪器 (TAITEC 社製 70rpm、旋回半径 25mm) 上で 5 週間培養した。

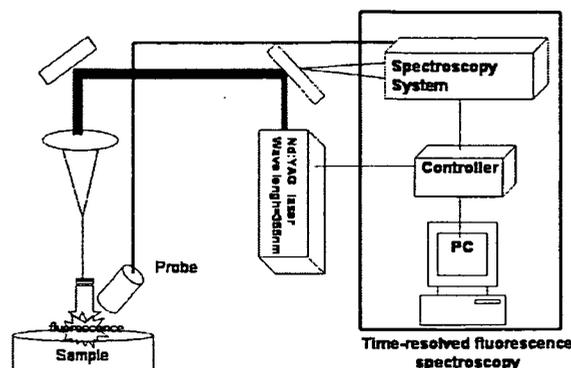


図1 自家蛍光測定システム

#### 4. 組織学、免疫組織化学

採取したサンプルは PBS にて洗浄し、各々10ml の 4%ホルマリン溶液にて固定し、エタノール脱水後、イソアミルアルコールにて浸潤しパラフィン包埋した。5  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、プロテオグリカンに対してサフラニン-O 染色とトルイジンブルー染色を行った。免疫組織化学的分析は、切片を標準操作法に従って脱パラフィンし、コラーゲン Type I と Type II（第一ファインケミカル社、日本）抗体で染色した。横断面像を倒立顕微鏡とデジタル・カメラにて観察し記録した。

（対物レンズ 20 $\times$ ）

#### 5. 生化学的分析

作製したサンプルの湿重量と、凍結乾燥後の重量を計測し、水分含有量を計算した。凍結乾燥したサンプルをペプシンにて 4 $^{\circ}\text{C}$  で 72 時間、続いてエラスターゼにて 24 時間酵素処理し、キットのプロトコールに従い ELISA 法（Chondrex 社 ELISA

Kit）にてコラーゲン Type II を定量した。ELISA のサンプルは分光光度計にて 490nm の光学濃度を測定し、キット内のコラーゲン Type II の標準曲線と比較した。

#### 6. 厚さ計測、強度計測

サンプルの厚さはデジタルマイクロメーター（最小表示 0.001mm、器差  $\pm 1\mu\text{m}$ 、平行度  $1\mu\text{m}$  以下）にて計測した。引っ張り試験はサンプルを把持デバイスにセットし、4mm/min のスピードにて引っ張り、荷重-変異曲線の直線部分の傾きからヤング率を計算した。

#### 7. 統計解析

サンプルは静置培養群と巡回培養群に分類し、各週で比較した。すべてのデータは平均値  $\pm$  標準誤差で表した。比較には要因分散分析（factorial ANOVA）を行った。ANOVA が有意であった場合、個々の有意差はシェフェ検定を用いて多重比較

検定を行った。  $p < 0.001$  をもって有意差ありと判定した。

C. 結果

1. 組織工学的軟骨肉眼所見

組織工学的軟骨は初期静置培養1週後培養液内では鑄型に一致した形態が維持された（図2—A）、しかし培養液から取り出すとその形態を維持することが出来なかった。（図2—E） 旋回培養、静置培養

ともに培養週数に従って厚みを増し（図2—B-D）、培養期間2週ではピンセットにて把持しても鑄型に一致した形状を維持することが可能な強度を得た。（図2—F） 厚みは旋回培養群静置培養群ともに1週から2週にかけて急速に増大した。厚みの増大速度は旋回培養群では培養期間5週まで維持されたが静置培養群では減少する傾向が認められた。（図3）

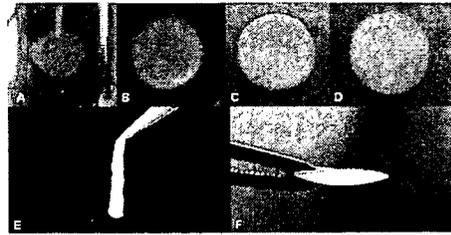


図2 組織工学的軟骨肉眼所見

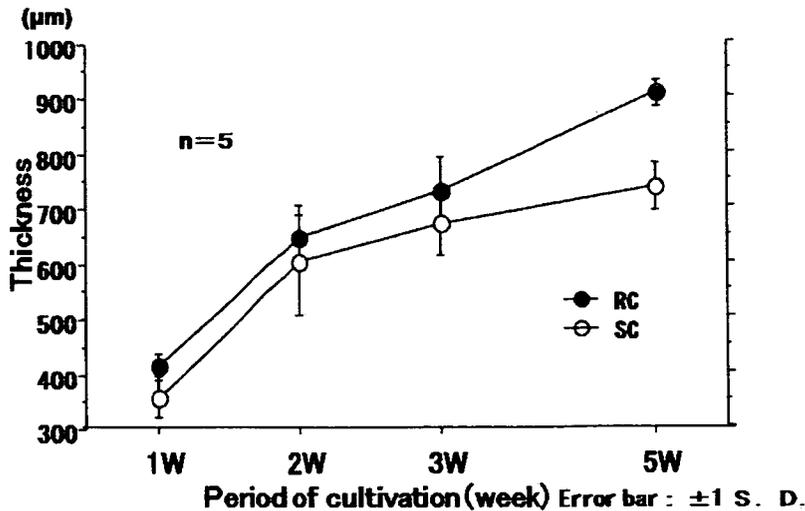


図3 組織工学的軟骨の厚み

## 2. 組織学的評価

静置培養群、巡回培養群ともにサフラニン-0染色、トルイジンブルー染色での染色性は良好であったが、巡回培養群の染色性は静置培養群に比べて均一で強い傾向が認められた。特に静置培養群は組織表層付近での染色性が不均一であった

のに対して、巡回培養群は全層にわたって均一な染色性を示した。どちらにも染色されない最表層の成分は線維芽細胞様であり、静置培養群と比較して巡回培養群では培養週数とともにその厚みが増大する傾向が認められた。（図4）

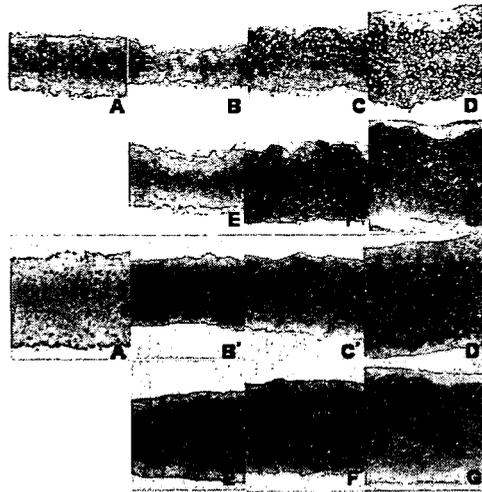


図4 組織工学的軟骨のサフラニン-0染色、トルイジンブルー染色結果

## 3. 免疫組織化学的評価

コラーゲン Type II に対する免疫染色の結果は静置培養群（図5B-E）では培養3週までの染色性に明らかな差を認めず、培養5週（図5-E）で染色性の増強が認められた。巡回培養群（図5F-I）では培養2週までの染色性に明らかな差を認めなかったが、培養3週（図5-H）で染

色性の増強が認められ、5週でも染色性は維持されていた。また全体的なコラーゲン Type II に対する染色性は静置培養群と比較すると均一で強い傾向が認められ、サフラニン-0、トルイジンブルーでの染色性との近似性が認められた。（図5）

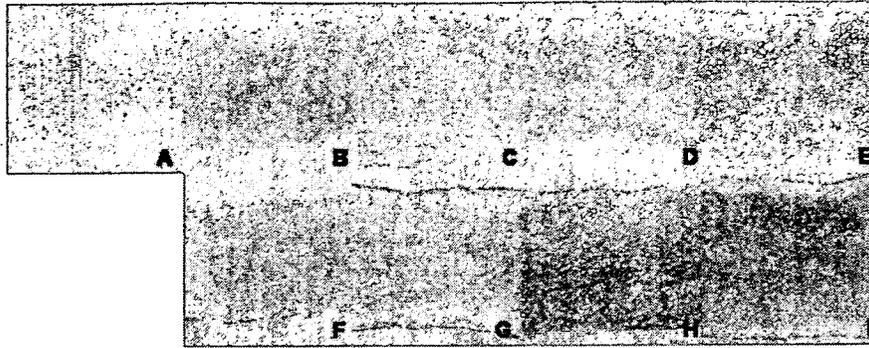


図5 コラーゲン Type II に対する免疫染色の結果

#### 4. 生化学的評価

コラーゲン Type II の定量結果は培養 2 週まで両群に有意差を認めなかったが、3 週以後有意に静置培養群と比較して巡回培養群のコラーゲン Type II 含有量が多い結果となった。各群での増加傾向を見

ると、静置培養群では培養 3 週まで有意な増加を認めなかったが、培養 5 週で有意な増加を認めた。一方、巡回培養群では巡回培養群では培養 2 週まで有意な増加を認めなかったが培養 3 週で有意な増加を認めた。(図 6)

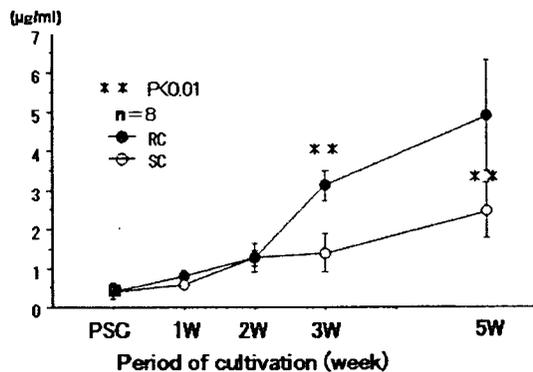


図6 コラーゲン Type II の定量結果

#### 5. 引っ張り強度評価

ヤング率は静置培養群と比較して巡回培養群で各週において高い傾向を示した。各群における増加傾向を見ると静置培養群では培養 3 週まで有意な増加を認めな

かったが培養 5 週で有意な増加を認めた。一方巡回培養群では培養 2 週まで有意な増加を認めなかったが培養 3 週で有意な増加を認めた。(図 7)

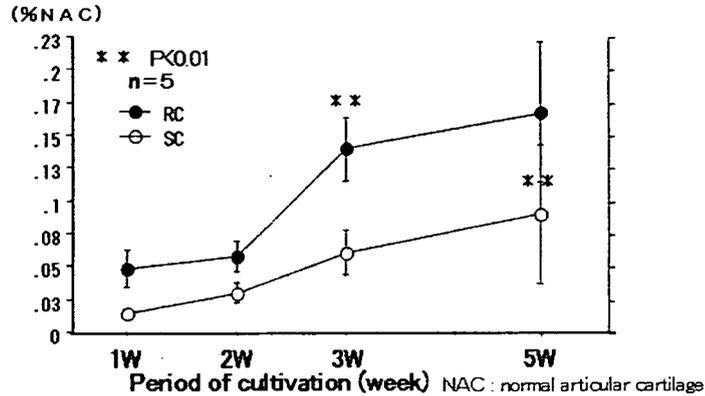


図7 引っ張り強度試験結果

6. 時間分解自家蛍光スペクトル分析  
 ウサギ正常関節軟骨 (図8-A)、ウサギ正常半月板 (図8-B) の自家蛍光スペクトルの3次元表示を示す。正常関節軟骨はピーク波長 404nm の単峰性で先鋭なスペクトルを示した。一方、正常半月板のスペクトルはピーク波長 400nm と 430nm の二峰性で幅広なスペクトルを示した。作製した組織工学的軟骨(旋回培養5週)の最表層 (図8-C) と、内層 (図8-D) のスペクトルは最表層ではピーク波長 433nm、内層ではピーク波長 405nm の単峰性でどちらも正常関節軟骨と比較して幅広なスペクトルを示した。組織工学的軟骨の各週におけるピーク波長の変動を見ると、静置培養群では培養3週まで有意な変動を認めなかったが培養5週で有意

な変動を認めた。一方旋回培養群では培養2週まで有意な変動を認めなかったが培養3週で有意な変動を認めた。(図9) 半値幅は両群ともに培養3週まで有意な変動を認めなかったが、培養5週では静置培養群で有意な増加を認め、旋回培養群で有意な狭小化を認めた。また、 $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>で播種し、単層培養した軟骨細胞の半値幅は継代を繰り返すたびに増大する傾向を認めた。さらに市販の精製コラーゲン Type II の半値幅は最も狭小で、それに続いて正常関節軟骨の半値幅が狭小な値を示した。(図10) 各組織のピーク波長における自家蛍光の減衰時間は様々であったが、旋回培養5週の組織工学的軟骨の減衰時間が正常軟骨のそれと非常に近似していた。

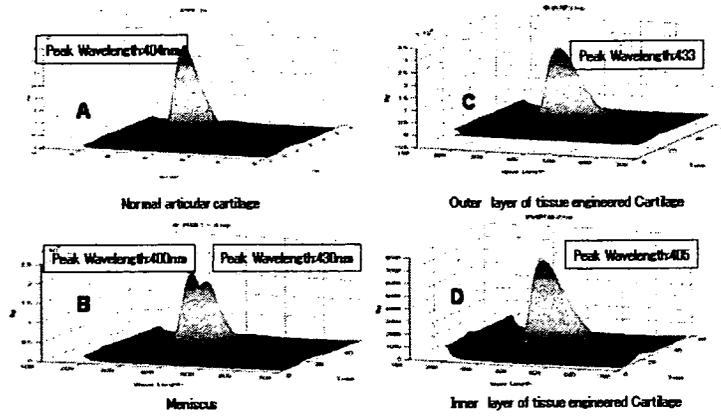


図8 自家蛍光測定データの3次元表示

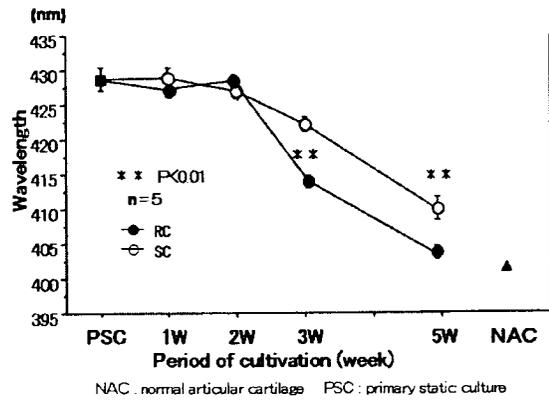


図9 自家蛍光ピーク波長

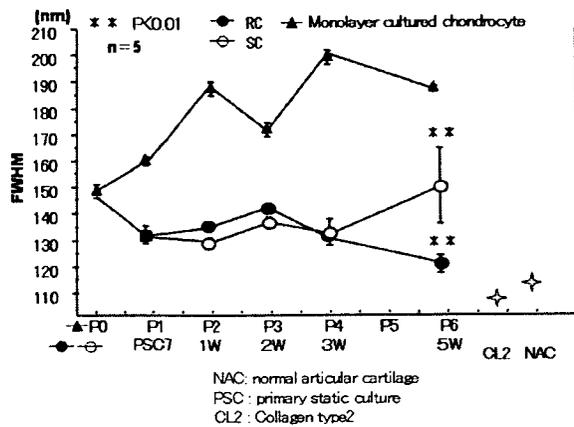


図10 自家蛍光半値幅

#### D. 考察

再生医療の進歩に伴い臨床応用の現実化が進んでいるが、セルソースの問題は未だに残存し、貴重な移植組織を作製段階から移植直前までの間、また術中や移植後においても一貫してリアルタイムに繰り返しモニターするためには非侵襲的な評価法が不可欠である。非侵襲的な組織性状評価は超音波やMRIを中心とした画像診断技術も発達し、近年ではMRIの撮像方法として three-dimensional spoiled gradient-recalled MRI(3D-SPGR)や、遅延相軟骨造影MRIが組織学的評価として報告され有用であり今後普及すると思われる。しかし術中のリアルタイムな評価に関しては装置の特性上不可能である。本研究にて使用したパルスレーザーは経ファイバー的な計測が可能で、内視鏡下での使用が可能のため、術中のリアルタイムな組織性状評価が可能となる。また当グループの石原らが考案した光音響法にて生体組織の非侵襲的粘弾特性評価に用いるパルスレーザーを使用するため、移植組織の物理学的特性と組織性状を非侵襲的かつ同時に、またリアルタイムな評価が可能となる。レーザー励起自家蛍光スペクトル分析は基礎研究、バイオテクノロジー、臨床医学などで既に応用され、臨床医学では血管病変や、皮膚病変、歯牙病変また腫瘍病変の検出などに用いられ、多数報告されているが再生医学の領域においては歴史が浅く報告も少ない。本研究は軟骨の再生医療において、当グループの古川、長井らによって報告された scaffold free 組織

工学的軟骨に本計測法を適用し、従来の組織学的評価、生化学的、分子生物学的評価、物理学的特性評価と比較検討し、軟骨再生医療への応用の可能性を検討した。

本研究で対象とした scaffold free 組織工学的軟骨は、高密度細胞培養による細胞間接着と細胞間相互反応により脱分化した軟骨細胞が再分化すること、また軟骨細胞の再分化にメカニカルストレスが必要なことを背景とした簡便でシンプルな旋回培養法にて作製された組織である。旋回培養法の有用性は古川、長井らの報告にてプロテオグリカン定量、DNA定量、コラーゲン定量、コラーゲン Type I、II の mRNA 定量の分析、物理学的特性評価(引張り試験)がなされ証明されている。本研究においては5週間の培養を行い、自家蛍光物質であり、軟骨細胞の粘弾特性において重要な役割を担うコラーゲン Type II に注目し、自家蛍光スペクトル分析を経時的におこなった。関節軟骨は硝子軟骨であり、その組成は2パーセント程度の軟骨細胞と豊富な細胞外マトリックスより構成されている。マトリックスの約70%は水分であり、20%がコラーゲン、10%がプロテオグリカンや細胞成分である。さらにその軟骨を構成するコラーゲンの80~90%がコラーゲン Type II である。つまり関節軟骨組織のほとんどがコラーゲン Type II といっても過言ではない。この組織構成のうち自家蛍光物質はコラーゲンと、細胞成分の補酵素 NADH や NADPH である。よって軟骨組織から励起される自家蛍光はほとんどが

コラーゲン Type II によるものであるはずである。正常関節軟骨の自家蛍光スペクトルをみるとピーク波長は 400nm 付近で、再生組織と比較して狭小なスペクトルである。また、データとして表示していないが、市販のコラーゲン Type II の自家蛍光もピーク波長 400nm 付近で狭小なスペクトルを呈する。また半月板や椎間板は線維軟骨組織で、また組織学的に外縁と内縁に相違性があり、どちらも内縁は硝子軟骨様の組織性状を示すことがわかっている。半月板のスペクトルを見ると 400nm 付近と 430nm 付近に 2 つのピークを持つ幅広なものであり、椎間板の線維輪のスペクトルも同様の 2 峰性である。このことよりスペクトルは組織性状を反映していると考えられる。組織工学的軟骨のスペクトルを見ると細胞成分の豊富な最表層のピーク波長は 430nm 付近をピークに持ち、サフラニン - O、トルイジンブルー、コラーゲン Type II の染色性が良好な豊富な細胞外マトリックスも持つ内層のスペクトルは波長 400nm 付近にピークを持つ。また組織工学的軟骨のコラーゲン Type II の定量結果と自家蛍光のピーク波長の変動を見てみると、旋回培養法では 3 週で有意な増加を示し、静置培養では 5 週で有意な増加を示した。一方自家蛍光のピーク波長の変動も旋回培養法では 3 週有意な変動（短波長側に推移）を示し、静置培養では 5 週で有意な変動を示した。このことから旋回培養法が静置培養と比較して有意にコラーゲン Type II の産生を促し、その時期は 2 週から 3 週にかけてであることがピーク波長の変動から読み取れると考えられる。ま

た物理学的特性を見てみると。組織の引っ張り強度はコラーゲン量と、また圧迫強度はプロテオグリカン量との相関性を持つことから本研究では組織工学的軟骨の引っ張り強度も計測した。その結果はコラーゲン量の変動と近似し、ピーク波長の変動とも近似した。この変動はコラーゲン Type II の免疫染色の結果からも裏付けられる。

半値幅の測定結果は、精製コラーゲン、正常関節軟骨では約 100nm と狭小で、精製コラーゲンのほうが正常関節軟骨に比べて狭小である。これはサンプルの均一性を反映すると考えられる。一方単層培養軟骨細胞は継代に従い拡大し、第 6 継代では 170nm に拡大した。これは本来コラーゲン Type II を産生していた軟骨細胞が単層培養にて脱分化し、その population の不均一性が生じたため、産生されるコラーゲンを中心とした自家蛍光物質の変化が反映されたと考えられる。これは単層培養における CD-RAP MIAELISA の結果 (図 11) をみても継代を重ねるごとに軟骨細胞の脱分化が進んでいることから裏付けられる。組織工学的軟骨では静置培養群の半値幅は週数に従って増大し、旋回培養群の半値幅は狭小化している。このことは静置培養では軟骨細胞の分化の制御が得られず、旋回培養法によって軟骨細胞の再分化、分化状態が維持されていることを示唆し旋回培養の有用性が現れていると考えられた。

減衰時間の分析に関しては現在進行中であるが、ピーク波長における減衰時間を見てみると旋回培養 5 週の組織工学的軟骨の減衰時間が正常軟骨のそれと非常

に近似していた。これは組織性状の近似性を示唆していると考えられる。軟骨組織のコラーゲンにはそのほかに Type I、XI、VI、IX、X などがあり、各々固有のピーク波長を持つ。本計測にて得られるスペクトルにはこれらの Type の異なる

コラーゲンから励起された自家蛍光の成分も含まれている。よって固有の波長の分析を進めることでさらに詳細な組織性状分析が可能となると考えられ、現在各波長における傾向の減衰時間の分析を進めている。

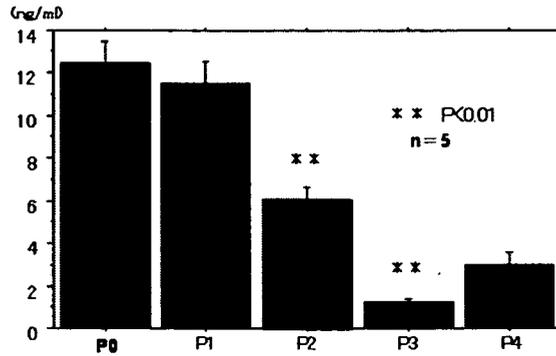


図 1 1 MIAELISA の結果

E. 結論

1. 時間分解自家蛍光スペクトル分析により旋回培養3週以降の scaffold free 組織工学的軟骨ではコラーゲン Type II を豊富に含有していることを証明した
2. 時間分解自家蛍光スペクトル分析により、非侵襲的に組織工学的軟骨のコラーゲン組成のモニターが可能であった。
3. 光音響法と併せて非侵襲的な物理学的特性評価、組織性状評価の同時計測法の構築が可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会 アクトシティ浜松  
平成19年10月26日

杓名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克子, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治

演題名; 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

2. 第34回日本臨床バイオメカニクス学会 早稲田大学国際会議場

平成19年12月7日

杓名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克子, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治

演題名; 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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

分担研究者 李 禎翼 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員  
長寿科学振興財団・リサーチ・レジデント  
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

研究要旨：蛍光相関分光法(fluorescence correlation spectroscopy ; FCS)は、計測対象中の分子の運動から単一分子レベルの観察をし、分子の数やサイズを検出する方法である。一方、軟骨組織には、物質移動は主に拡散に依存し、その中の細胞外基質(ECM)は軟骨細胞同士の緊密な情報交換や細胞自体の代謝変更などの細胞内の生理活性に重要である。FCS を用いて正常および変性軟骨内を対象とし、蛍光色素と関節液の代表的なタンパクであるアルブミンの拡散挙動を測定する基礎的な検討を行った。本研究は FCS を用いた関節軟骨中の拡散現象に関する最初の報告であり、今後、ECM の変化に伴う変形性関節症などの疾患の早期診断法や、組織工学的に作製された人工軟骨の性状判断などに応用が期待される。

### A. 研究目的

蛍光相関分光法(fluorescence correlation spectroscopy ; FCS)は、顕微鏡下の極微小領域に出入する蛍光分子を観測し、蛍光の強度揺らぎから、分子数と運動挙動(拡散時間、拡散係数)を測定する方法である。一方、正常の軟骨組織には、血管が分布せず、物質移動は主に拡散に依存している。軟骨細胞から豊富に産生される細胞外基質(ECM)は軟骨内の物質拡散に影響を受けるため、ECM は、細胞同士の緊密な情報交換や細胞自体の代謝変換などの細胞内の生理活性維持に重要である。我々は、FCS を用いて正常および変性軟骨内を対象とし、FCS プローブの開発を行い、蛍光色素と関節液の代表的なタンパクであるアルブミンの拡散挙動(プローブ

分子の動き、拡散係数)を測定する基礎的な検討を行った。

本研究の FCS を用いることで軟骨内の拡散現象を把握することで変形性関節症の病態把握および早期診断につながる可能性があり、正常と変性の軟骨の拡散動態を標準化することで、細胞移植後治療効果判定および組織工学的に作製した人工軟骨を可能にする機能診断システムとして性状判断に使用できる可能性があると思われる。

### B. 研究方法

本研究で用いた FCS 計測装置は LSM-ConfoCor2 Combi(Carl Zeiss co. Ltd) であり、FCS プローブの開発のため、ECM の一成分であるヒアルロン酸(HA : MW 80 万および 200 万)溶液

中の蛍光色素の拡散係数を測定した。測定には、光安定性が高い、牛血清アルブミン複合体 Alexa Fluor<sup>®</sup> 488(Alexa-albumin)、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 hydrazide、Rhodamine 6G(Rh6G)、Rhodamine 123(Rh123)の色素を用い、リン酸緩衝液(PBS)を溶媒として適切な濃度に調製した。基礎測定として、PBS 及び2種の HA の 1wt%溶液に各色素を用いて測定し、比較検討した。

次に軟骨片の計測に用いた軟骨は、死後間もなく屠畜場から4時間以内に搬送された豚大腿骨(n=5)の膝蓋大腿関節面から採取した。

正常軟骨は生検用パンチ(直計5mm)を用いて厚さ1mm以下の軟骨片を作製し、また、変性軟骨は、正常軟骨に7~24時間のトリプシン処理(1mg/ml)を施行し、化学的に変性(1~24時間)させて作製した。各試料は H&E、toluidine blue、safranin O 染色法により、変性程度を評価した。軟骨片を対象とした FCS 計測には、Alexa Fluor<sup>®</sup>488 を蛍光プローブとして選択し、軟骨界面での散乱を確認して、そこから焦点を軟骨方向に移動させ、軟骨表層から 20 $\mu$ m 深部に焦点を合わせて測定した。

### C. 研究結果

本研究で使用した全ての色素について FCS 測定を行ったところ、各色素の拡散係数は PBS > HA(80万) > HA(200万)の順に小さくなった(図1.)。

正常軟骨と化学的に変性させた変性

軟骨は H&E 染色と、ECM を特異的に観察可能な toluidine blue、および safranin O 染色法を用いた組織学的な観察を行い、変性軟骨の程度を判定した。その結果(図2.)、トリプシン処理6時間後には、軟骨片の中心にわずかであるが ECM のタンパクがトリプシンにより完全に分解されていない部分が観察できた。しかし、トリプシン処理7時間後の軟骨組織標本からは ECM タンパクの確認ができず、タンパク分解酵素7時間以上処理の軟骨片は、ECM タンパク消失による変性軟骨と判断し、FCS 計測に用いた。

Alexa-albumin を用いた、正常および時間経過によるトリプシン処理の変性軟骨片の最大計測深度の計測(図3.)では、測定可能領域を計測した。より深部に焦点を移動させると蛍光プローブが拡散されておらず、蛍光プローブから相関関数のグラフを示す事が不可能であった。トリプシン処理時間が長くなるほど測定可能領域が広がり、より深い部位での測定が可能であった。

相関関数のグラフを示す事が出来なくなり、蛍光プローブが適切に浸透されなくなったと思われる深度を最大測定深度として結果を示した。その結果、正常および変性軟骨片の計測において、共通に計測可能であった軟骨表層から 20 $\mu$ m 深部を測定可能領域として計測基準点とした。

また、Rhodamine 系の蛍光色素は、同様な計測実験を行ったが、軟骨片の計測には Alexa Fluor<sup>®</sup>488 系の色素が適していると判断し、蛍光プローブと

して用いた。

Alexa-albumin を用いて、FCS により正常軟骨および変性軟骨の組織内部のアルブミン拡散現象を *in vitro* で確認した結果(図 4.)では、各サンプルにおける Alexa-albumin の拡散係数は PBS( $4.83 \times 10^{-11}$ ) > 24 時間トリプシン処理変性軟骨( $3.64 \times 10^{-11}$ ) > HA( $3.38 \times 10^{-11}$ ) > 9 時間トリプシン処理変性軟骨( $2.30 \times 10^{-11}$ ) > 6 時間トリプシン処理変性軟骨( $1.15 \times 10^{-11}$ ) > 3 時間トリプシン処理変性軟骨( $1.06 \times 10^{-11}$ ) > 正常軟骨( $1.97 \times 10^{-11}$ )の順に低下した。拡散係数はトリプシン処理時間が長くなるほど大きかった。

#### D. 考察

FCS は、その検出感度の高さから、単一分子検出法に分類されている。しかし、他の単一分子検出法とは異なり、単に1つ1つの分子の動きを画像としてみたり、追跡したりする方法ではない。

FCS は、標的となる分子の『動き』と測定領域内の『分子の数』を定量化し、そこで起こっている分子間相互作用を単一分子レベルで高感度に検出する手法である。FCS から得られる結果は、相関関数と呼ばれるグラフ(蛍光強度の揺らぎの変化)であり、これを解析し、求めたい情報を引き出すことで対象物質の拡散挙動が把握可能である。

FCS は、主に溶液中の分子の動きを計測するが、制限なしに顕微鏡下の任意の場所での測定が可能であることから、理論的には細胞や組織の中を対象

として、計測も可能である。極微小領域(直径 400 nm、容積として femto L= $10^{-16}$ L)の計測が可能なることから最近では、細胞内における物質輸送や分子間相互作用の解析も研究されはじめている。

装置の構成は共焦点レーザー顕微鏡とほぼ同じだが、FCS は、高精度の対物レンズで焦点を光の回折限界まで絞った領域をピンポイントで観察する。その為、本来の共焦点レーザー顕微鏡とは違い、画像化することはできない。

蛍光分子が測定領域内をランダムな動きで出入りすると、装置へは蛍光強度の揺らぎとして観測される。この蛍光強度揺らぎの中からは、分子の『動き』と領域内の『分子の数』の重要な情報が含まれている。実際の測定結果は、この蛍光強度の揺らぎの変化から、自己相関関数に変換して(アインシュタインストークスの関係式などから求めるが、詳細は省略する。)、蛍光分子が測定領域内を通過する平均時間である拡散時間(diffusion time)、拡散係数、蛍光分子の総数などを求めることができる。拡散挙動を表す拡散係数は、例えば、拡散時間と分子のサイズにおいては、分子の大きさが小さいと、拡散係数は大きくなり、拡散時間は短くなり、逆に分子が大きいと拡散係数は小さくなり、拡散時間が長くなるといった特性を持つ。

以上の FCS における特徴などを考慮して、本研究では、軟骨組織の中の拡散について情報を得るため FCS を用いた。

ECM は、人体のおよそ 50%を占めており、コラーゲンなどの蛋白質、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などの糖類から構成されている。最近の研究では、細胞同士の緊密な情報交換や細胞自体の代謝変更などの細胞内の生理活性に関与しているとされる。特に、軟骨組織は全体のわずかな数%を占める軟骨細胞と他は軟骨細胞から産生される ECM で構成される。血管が分布しない正常の軟骨組織は、ECM を通じて生理活動のための物質交換をし、これは拡散という手段に頼っている。

軟骨組織の生理活動に拡散は必須であるが、未だ軟骨組織に対する拡散動態は正確に計測されておらず、本研究は、FCS を用いて軟骨組織の拡散挙動を計測した初めての報告である。

本実験では、軟骨組織の中の FCS を計測するため、軟骨の ECM の中でも自由に動くことが可能な蛍光色素に関して検討した。Rhodamine 系と Alexa Fluor<sup>®</sup>488 系では共に PBS と HA の FCS 計測が可能だったが、Rhodamine 系の蛍光色素は、正常軟骨に対する計測で、測定可能領域の値が不規則であったため、軟骨組織には Alexa Fluor<sup>®</sup>488 系蛍光色素が蛍光プローブと適していると判断した。

蛍光プローブの各候補色素の結果(図 1.)では、拡散係数の低下が 1~2 割にとどまっていることから、HA の中で各色素は目立った化学反応や吸着をすることがなく、比較的自由に拡散していることがわかる。また、1%HA は PBS と比べて、ごくわずかな HA の添

加であるが、拡散係数が低下したことは、HA の網目構造に遮られていることを示していると思われる。各候補色素のうち Alexa は分子半径が大きいにもかかわらず比較的自由に HA 中を拡散することが可能で、これは、解離基が多くしかも負電荷を帯びていることが理由であると思われる。

トリプシン処理による、軟骨組織の化学的な変性は、軟骨組織内糖タンパクの分解に起因する。この変性モデルは、我々の以前の研究でもその有用性を報告している。今回の実験でも、7 時間以上のトリプシン処理後の顕微鏡下の組織学的な観察(図 2.)では ECM の完全な消失が確認できたので、トリプシン処理 7 時間以上の軟骨片を変性軟骨として、時間経過に伴う変化を観察した。

一方、アルブミンは、約 600 個のアミノ酸からできた分子量約 66,000 の比較的小さなタンパク質であり、アルブミンは血漿タンパクのうち 60%を占める。関節液中成分の代表的なタンパクでもあり、関節液のアルブミンは血漿濃度の 40~45%程度と知られている。アルブミンはカルシウムや亜鉛など微量元素や、脂肪酸、酵素、ホルモンなどと結合し、運搬されるなど、生理的に重要な役割を行っている。関節液の中のアルブミンは、関節液の潤滑・粘度に関連し、軟骨の摩擦を低減にも働くなどの役割が示唆されている。

本実験に使用したアルブミン複合体色素(Alexa-albumin)は、このアルブミンに Alexa Fluor<sup>®</sup>488 をラベルさせた

色素であり、この色素の軟骨内の拡散挙動は関節内のアルブミンの動きを *in vitro* の状態で再現させたことになる。

各条件の軟骨片を対象とし、FCS 計測するためには測定領域の基準を決めなければならなかったが、測定領域の中心である顕微鏡焦点を、軟骨表層から軟骨片の深部へと移動させながら相関関数のグラフを作ることが出来る領域を測定可能領域とした。蛍光プローブは深部へ移動するほど 30~60 分の浸透時間では十分に拡散せずに相関関数のグラフを示す事が出来なくなった。すなわち、この相関性の失われた深度を最大測定深度とした(図 3.)。その結果、トリプシン処理時間が長いほど、測定可能領域が広がり、軟骨のより深部に到達することが分かった。以上の結果から軟骨組織における FCS の計測は、表層から 20  $\mu\text{m}$  深部を基準領域として決めることが可能であった。

Alexa-albumin を用いた正常軟骨および変性軟骨の測定結果(図 4.)では、変性軟骨における蛍光プローブの拡散係数が正常軟骨の場合よりも増加している。これは、変性軟骨内の蛍光プローブが正常軟骨内より自由に動いている事を示しており、変性軟骨はトリプシンの蛋白分解作用のため、経時的に複雑な ECM 構造が段階的に消化され変性軟骨は複雑な ECM 構造を失い、正常軟骨より大きな隙間が生じたため、拡散係数が段階的に大きくなるものと推察した。

今後、ECM の変化に伴う変形性関節症などの疾患の早期診断法や、組織工

学的に作製された人工軟骨の性状判断などに応用が期待される。

#### E. 結論

関節軟骨中の拡散現象を FCS により、捉えることが可能であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

李 禎翼、小池 亮一、森戸 崇暁<sup>3</sup>、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、2008. 2.22 (埼玉県和光市)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

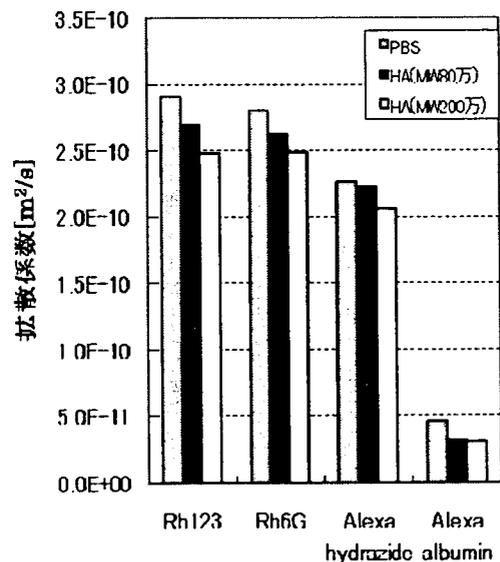


図1. 各色素の拡散係数 ( $E-10 = \times 10^{-10}$ )