

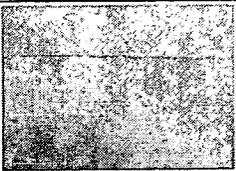
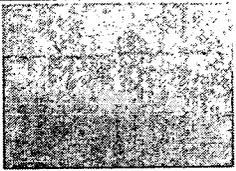
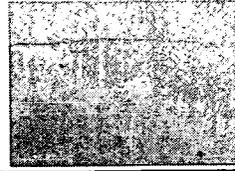
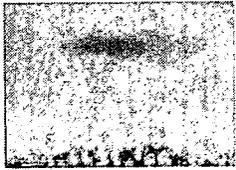
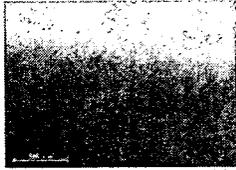
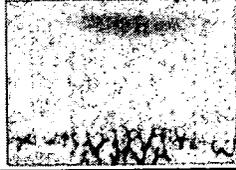
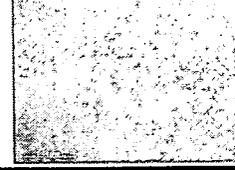
トリプシン 処理時間 染色色素	0時間	6時間	7時間
H&E			
toluidine blue			
safranin O			

図2. トリプシン処理時間と軟骨片の組織学的な観察所見 (bar は 500 μ m)

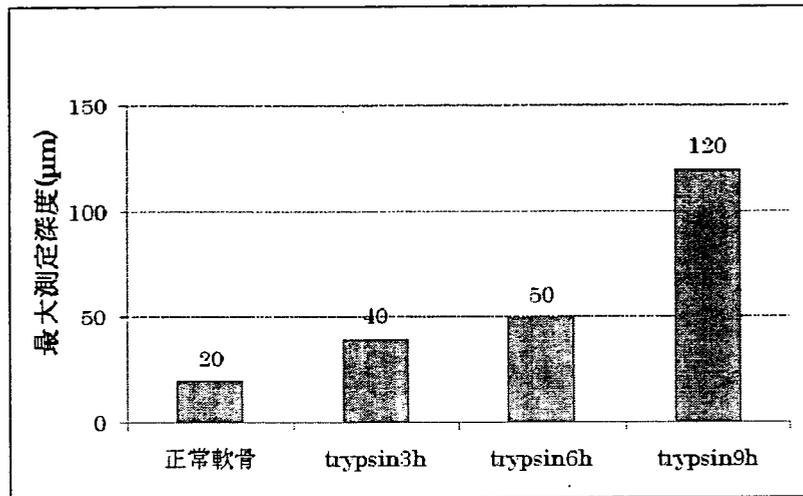


図3. 各軟骨サンプルにおける測定可能領域

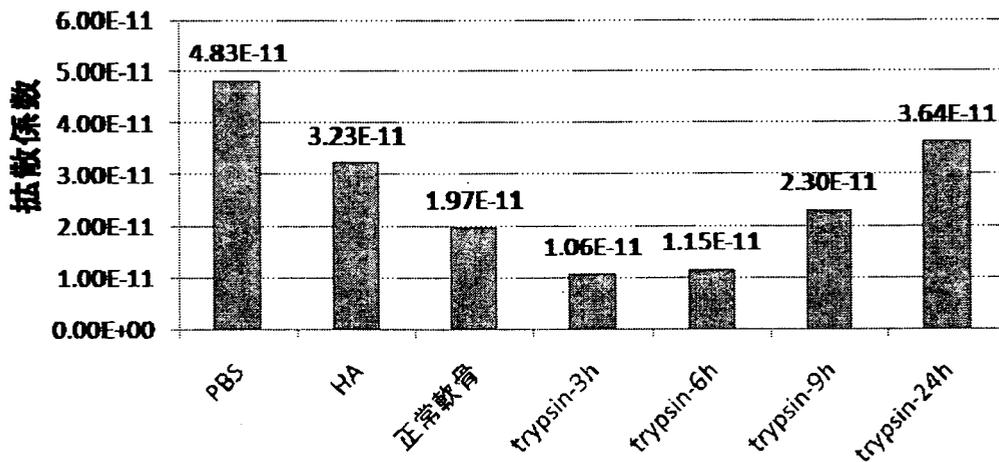


図4. 各サンプルにおける Alexa-albumin の拡散係数

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

著書	著書名・出版社	タイトル	著者
2007年6月	再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性 シーエムシー出版 123-137	レーザーを用いた培養軟骨評価	石原美弥, 佐藤正人, 持田讓治, 菊地眞, 大串始(監訳)
2007年5月	再生医療技術の最前線 シーエムシー出版 61-68	第2章 再生医療基盤技 6. バイオメディカルイメージング	石原美弥, 佐藤正人, 菊地眞, 岡野光夫(監修), 大和雅之(監修)
2007年4月	再生医療のためのバイオエンジニアリング コロナ社 147-167	再生医療の基盤技術としての計測・画像工学について総説	菊地眞, 石原美弥, 小林英司, 遠山育夫, 赤池敏宏(編著)
学術論文	雑誌名	タイトル	著者
2008年3月	変形性関節症 別冊整形外科 53 南江堂 変形性関節症の最近の知識 76-82, 2008	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	佐藤正人, 石原美弥, 杓名寿治, 三谷玄弥, 菊地眞, 持田讓治
2008年2月	Proceeding of SPIE 6858, 685804-1-685804-5, 2008	Modification of measurement methods for evaluation of tissue-engineered cartilage function and biochemical properties using nanosecond pulsed laser.	Ishihara M, Sato M, Kutsuna T, Mochida J, Kikuchi M.
2007年12月	電気学会論文誌, 127-C(12), 2166-2170, 2007	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	石原美弥, 佐藤正人, 三谷玄弥, 長井敏洋, 杓名寿治, 持田讓治, 菊地眞
2007年8月	IFMBE Proceedings WC 2007 14, 3187-3189	Multifunctional evaluation of tissue engineered cartilage using nano-pulsed light for validation of regenerative.	Ishihara M, Sato M, Ishihara M, Mochida J, Kikuchi M.
2007年4月	生物工学会誌 85(10), 438-441	再生医療評価・バリデーションのための非侵襲的計測法	石原美弥, 佐藤正人, 持田讓治, 菊地眞

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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めざして*

佐藤 正人 石原 美弥 杏名 寿治 三谷 玄弥 菊地 眞 持田 譲治**

[別冊整形外科 53:76~82, 2008]

はじめに

東京大学 22 世紀医療センターの調査では、2,400 万人がすでに罹患していると推測されている変形性膝関節症（膝 OA）¹⁾は、生命を直接脅かすものではないが、日常生活動作（ADL）を下げるばかりか生活の質（QOL）の低下も招き、人的・社会的損失は計りしれない。疾患の本質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。すなわち、膝 OA の保存的治療あるいは手術的治療の予後の評価は患者の自覚症状や X 線像での関節裂隙の狭小化の程度から推察しているにすぎず、関節軟骨本来の機能に基づく客観的指標が欠如している。関節軟骨本来の機能である力学特性（粘性、弾性、潤滑）と組織性状を正確に計測し定量的に評価することが、より詳細な病態把握と治療効果判定に重要であり、OA に対するこのよう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）。また、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、膝 OA 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およびその遂行が可能となるばかりか、新薬などの治験の際の客観的評価法としても有用であると考えている。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も可能となり、ADL の向上ひいては国民の健康寿命の延伸に

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 (X 線像)	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 → <i>in vivo</i> では計測困難
4. 組織像 (生検)	

寄与するものと考えている。われわれは、再生軟骨（組織工学的軟骨）の *in vitro* の非侵襲評価技術として培った独自の計測評価法^{2~13)}の軟骨変性診断への応用を提案する。

I. なぜ光? : 光を用いる優位性

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、および吸収に伴う温度上昇、さらには蛍光や音響波発生などが主な作用としてあげられる（図 1）¹²⁾。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、このような光と生体との相互作用を利用した技術に立脚している。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に取得することが可能であることから、超

Key words

OA, articular cartilage, laser, photoacoustic measurement method, time-resolved autofluorescence spectroscopy

*Development of a diagnostic system for osteoarthritis using a photoacoustic measurement method and time-resolved autofluorescence spectroscopy

**M. Sato (准教授) : 東海大学外科学系整形外科 (Dept. of Orthop. Surg., Surgical Science, Tokai University, School of Medicine, Isehara) ; M. Ishihara (准教授) : 防衛医科大学校医用工学 ; T. Kutsuna, G. Mitani : 東海大学外科学系整形外科 ; M. Kikuchi (教授) : 防衛医科大学校医用工学 ; J. Mochida (教授) : 東海大学外科学系整形外科.

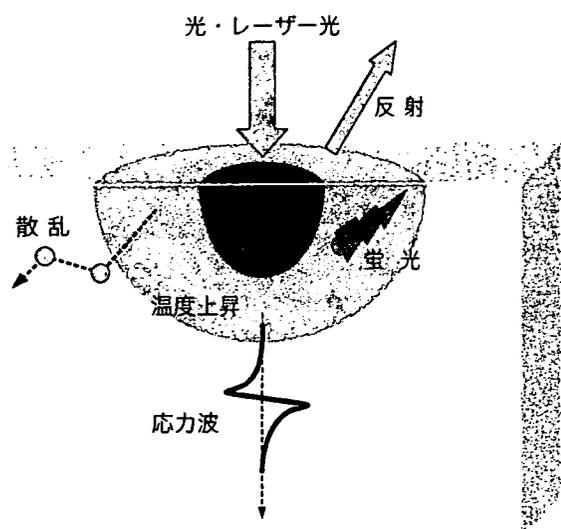


図1. 光と生体の相互作用

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

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。現在注目されているレーザー光を利用した生体計測やイメージングには表2に示すような特長があり、医療現場に活用し始められたゆえんとなっている。われわれは、光と生体の相互作用のうち特に光音響波と蛍光に着目し、同一のレーザーから誘起されるこれらに関連した種々のパラメータを計測し、力学特性評価と組織性状評価を同時に施行しうるシステムを開発した(図2)³⁻⁵⁾。

II. 光音響法による力学特性評価法

われわれは、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 は次の式で表される¹²⁾。

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

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、光パラメトリック発振器(OPO)を用いてコラーゲンや蛋白を光の吸収体として発振波長を250~355 nm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¹¹⁾。この波長範囲内では短い波長のほうが

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(Continuum An Excel Technology社, California)の第3高調波(波長355 nm, パルス幅5~6 ns)を使用したシステムとした^{13,14)}。出力光は石英光ファイバー(コア径400 nm)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¹⁴⁾。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、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3)。

III. 安全性試験

光音響法を用いた計測法の安全性を確認するために、培養家兎軟骨細胞を対象に細胞増殖活性試験を施行し、光音響信号を誘起するレーザー光照射による軟骨細胞への影響を検討した。使用したレーザー(波長355 nmのQスイッチNd:YAGレーザーの第3高調波)の照射条件として以下の条件を設定した。①臨床使用照射条件(100 $\mu\text{J}/\text{mm}^2 \times 30$ ショット)群、②臨床使用照射条件よりもパルスエネルギーが1.5倍大きい条件(150 $\mu\text{J}/\text{mm}^2 \times 30$ ショット)群、③臨床使用照射条件よりもパルスショット数が50倍大きい条件(150 $\mu\text{J}/\text{mm}^2 \times 1,500$ ショット)群、④ポジティブコントロールとして、細胞が完全に死滅する条件のアル

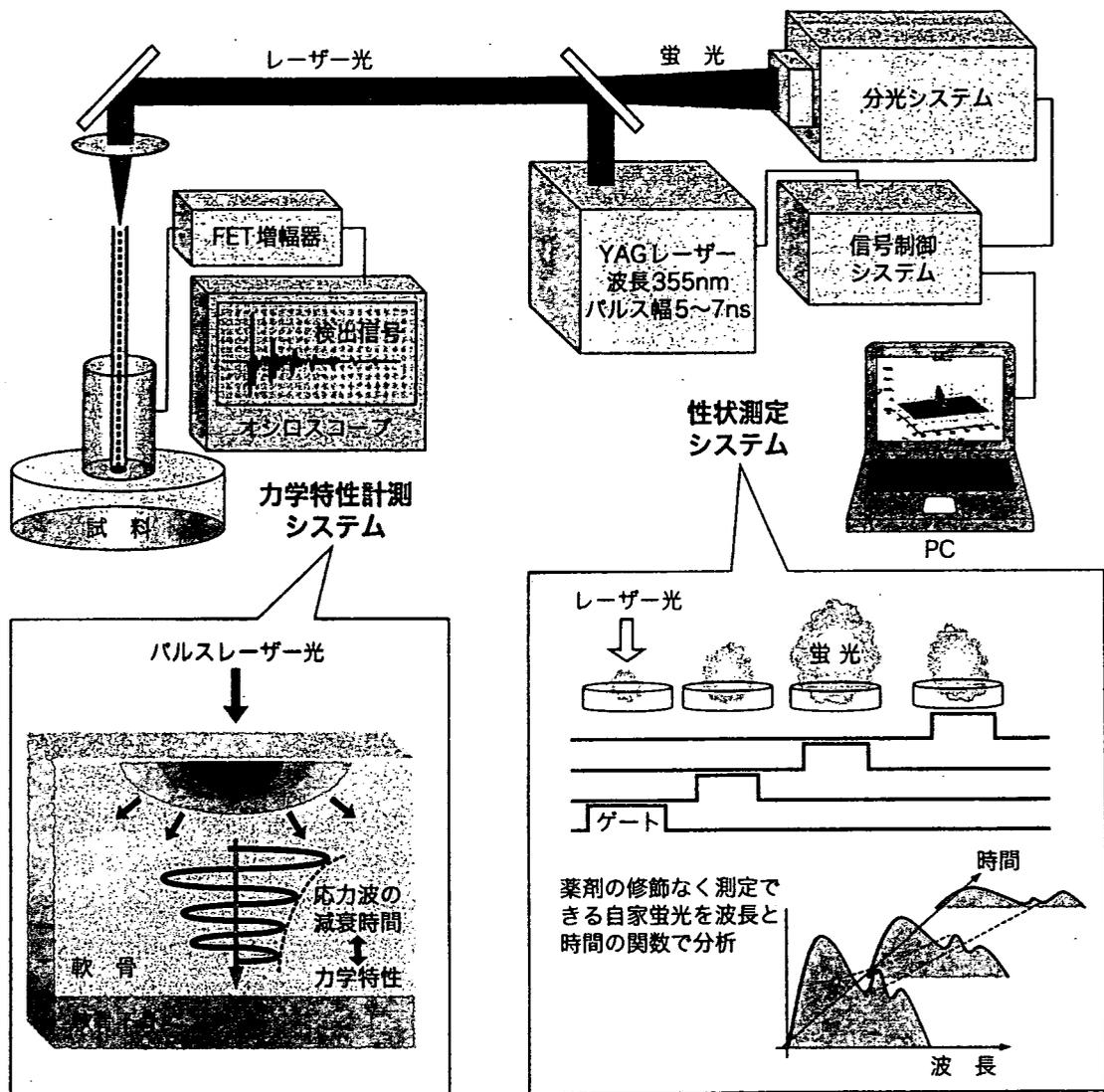


図2. 計測システム. 光音響原理に基づく力学特性計測法と時間分解自家蛍光スペクトル分析による性状評価法の同時計測

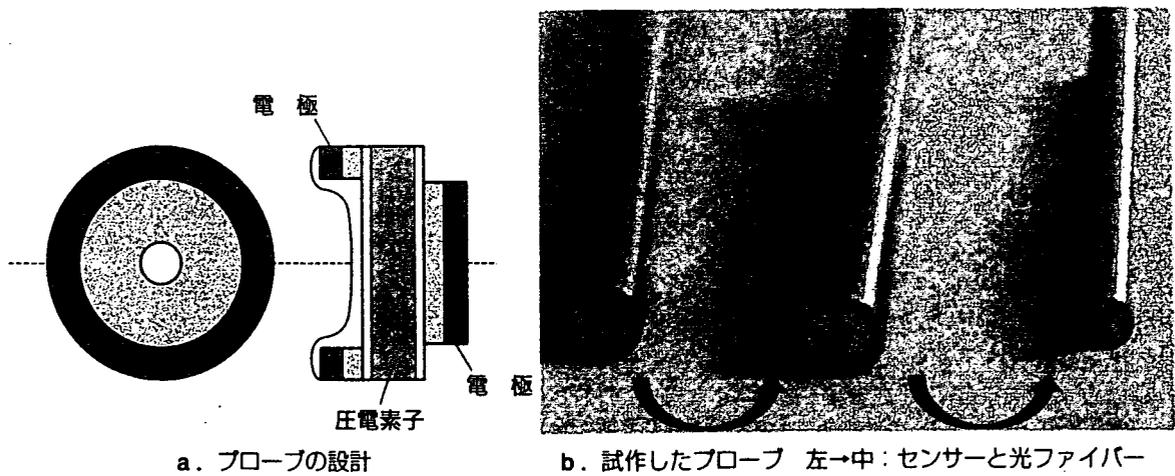


図3. プローブの開発

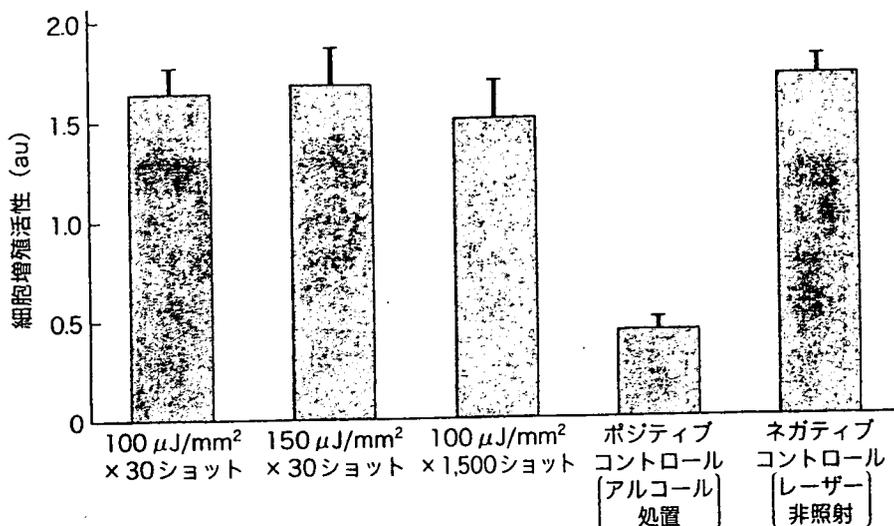
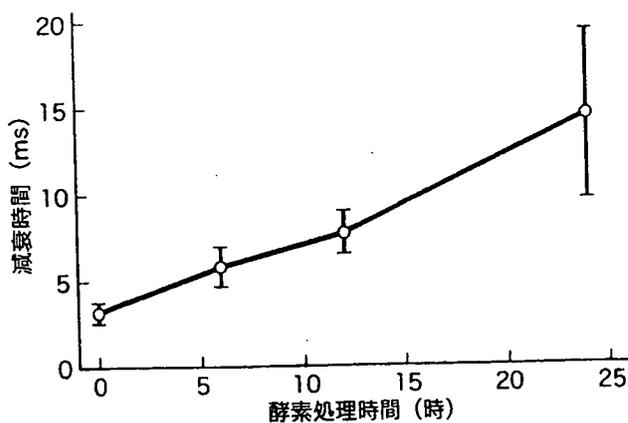
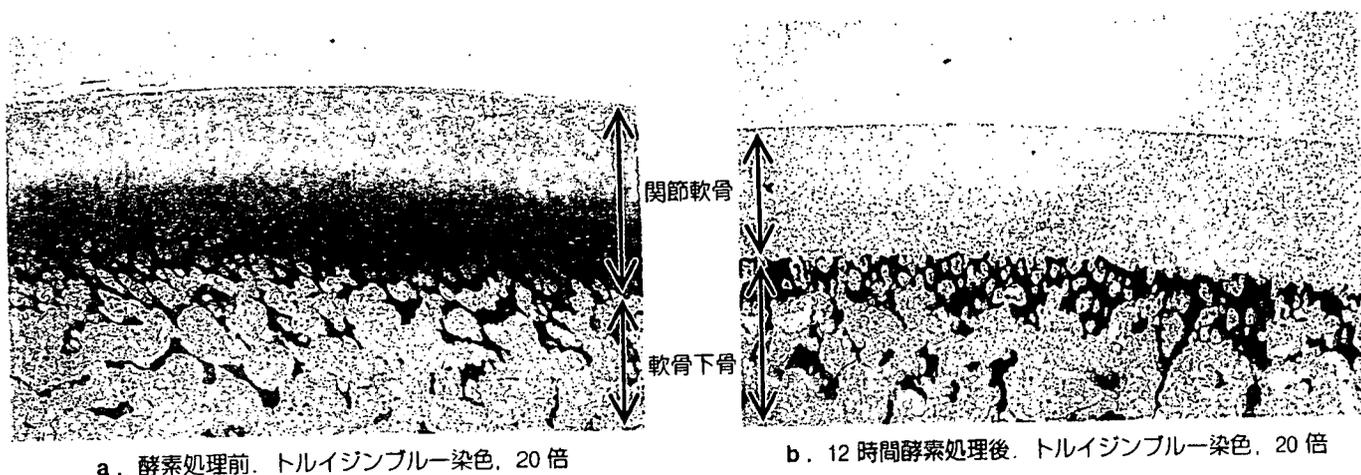


図4. レーザー強度 (単位面積当たりのエネルギー×ショット数) の細胞増殖活性への影響 (文献14より引用改変)

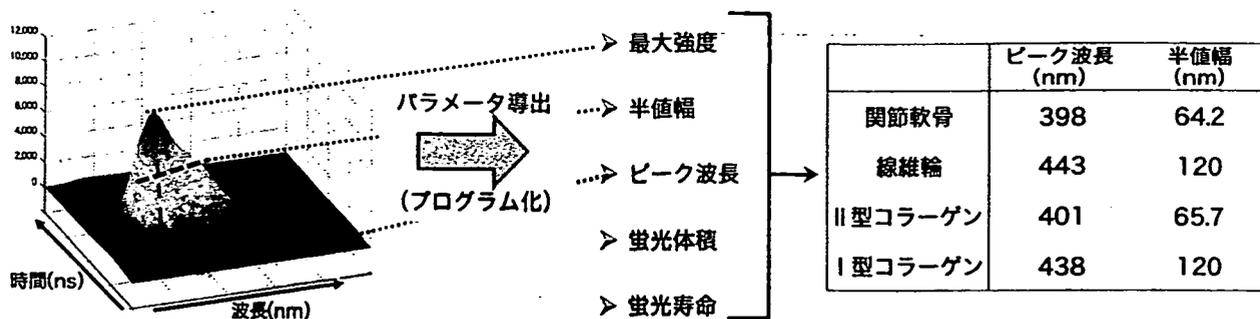


c. 酵素処理による緩和時間の変化

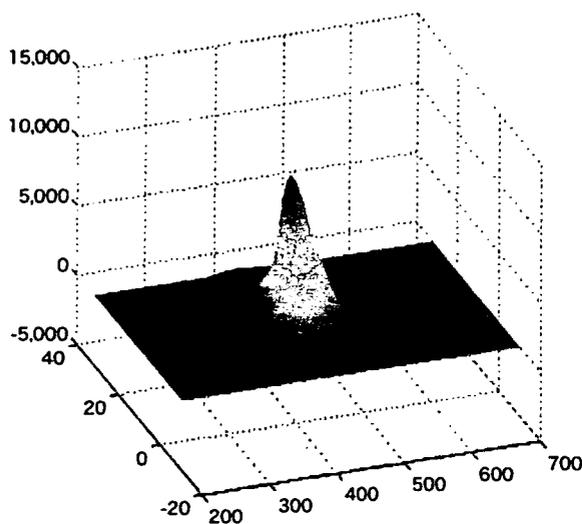
図5. 超音響法による軟骨変性に伴う力学特性変化の評価

コール添加群, ⑤ネガティブコントロールとして, レーザー非照射群を作製し, これら5群について検討した. なお, ②のパルスエネルギーが本装置による最大出力であ

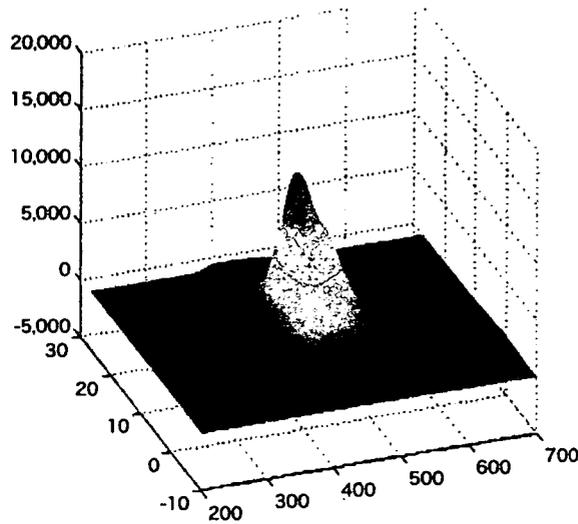
る. 細胞増殖活性試験にはWST-8アッセイ (キシダ化学社, 大阪市) を用いた. 96 Wellプレート (Falcon社, New Jersey) に播種した培養細胞に上記条件を適用し, 37°C, 5%



a. 取得した蛍光データは波長と時間の関数



b. 関節軟骨



c. 線維輪

図6. 時間分解自家蛍光スペクトル解析. 複数のパラメータから多角的に性状を評価

CO₂下で培養し1時間後に計測した。いずれのレーザー照射も非照射群と有意差はなく、レーザー照射による細胞増殖活性の影響はないことが確認された(図4)¹⁴⁾。

Ⅳ. 変性軟骨の評価試験

実験的な変性軟骨の作製方法として、ブタ膝蓋軟骨から直径12mmの骨軟骨プラグを摘出し、トリプシン酵素処理によってプロテオグリカンを流出させ、生体力学特性を変化させることで異なる変性度を有する変性軟骨を作製した。トリプシン濃度は1mg/mlで24時間まで処理した。変性軟骨を光音響法で計測し、計測後ただちにホルマリン固定して組織学的な評価をトルイジンブルー染色で行った。図5は減衰時間とトリプシン処理時間との関係を示しているが、正の相関が得られている¹⁴⁾。すなわちトリプシン処理時間が長くなるほど減衰時間も長くなる。つまり粘性が増加し、弾性が減少することを示している。またトリプシン処理にて組織学的にもトルイジンブルーでの染色性は低下することからも、軟骨変性に伴う組織変化の過程を

光音響法でモニタリングできることが示唆された。

Ⅴ. 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き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型および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、ピーク波長および半値幅も近似した。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、同様にピーク波長および半値幅も近似した(図6)^{2,12)}。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。

VI. 医療への応用をめざして

「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OA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を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、OA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。OAでは保存的治療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、人工関節全置換術など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。

本稿では、非侵襲的な強度のバ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した。そして、われわれは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、OAの正確な病態把握ときめ細かな治療計画およびその遂行が可能となる。さらに、各種の薬剤など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、新薬など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、まった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的治療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。

ま と め

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

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。

本研究の一部は新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)プロジェクト健康安心プログラム再生医療評価研究開発事業、厚生労働科学研究費補助金長寿科学総合研究事業、ならびに日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究の助成を受け実施された。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) 吉村典子, 村木重之, 岡 敬之ほか: 都市部, 山村部における変形性膝関節症および腰椎症の有病率と地域差—Research on Osteoarthritis Against Disability (Road) プロジェクト. 第51回日本リウマチ学会学術集会, プログラム抄録集: 265, 2007
- 2) Ishihara M, Sato M, Mochida J et al: Usefulness and limitation of measurement methods for evaluation of tissue-engineered cartilage function and characterization using nanosecond pulsed laser. Progress in Biomedical Optics and Imaging; Proceedings of SPIE 6439: 643909-1-4, 2007
- 3) Ishihara M, Sato M, Mochida J et al: Modification of measurement methods for evaluation of tissue-engineered cartilage function and biochemical properties using nanosecond pulsed laser. Progress in Biomedical Optics and Imaging; Proceedings of SPIE 6858: 2008 (in press)
- 4) Ishihara M, Sato M, Ishihara M et al: Multifunctional evaluation of tissue engineered cartilage using nano-pulsed light for validation of regenerative medicine. IFMBE Proceedings WC 2006 World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 14: 3187-3189, 2006
- 5) Ishihara M, Sato M, Kaneshiro N 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; The International Society for Optical Engineering 6084: 60840V1-4, 2006
- 6) Ishihara M, Sato M, Sato S et al: Usefulness of photoacoustic measurements for evaluation of biomechanical properties of tissue-engineered cartilage. Tissue Eng 11: 1234-1243, 2005
- 7) Ishihara M, Sato M, Sato S et al: Usefulness of the photoacoustic measurement method for monitoring the regenerative process of full-thickness defects in articular cartilage using tissue-engineering technology. Progress in Biomedical Optics and Imaging; Proceedings of SPIE 5695: 288-291, 2005
- 8) 菊地 眞, 石原美弥, 小林英司ほか: 再生医療の基礎技術としての計測・画像工学. 再生医療のためのバイオエンジニアリング, 赤池敏宏(編著), コロナ社, 東京, p147-167,

2007

- 9) 石原美弥, 佐藤正人, 持田譲治ほか: 再生医療評価・バリテーションのための非侵襲的計測法. 生物工会誌 85: 438-441, 2007
- 10) 石原美弥, 佐藤正人, 三谷玄弥ほか: 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: 2166-2170, 2007
- 11) Ishihara M, Sato M, Sato S et al: Viscoelastic characterization of biological tissue by photoacoustic measurement. Jpn J Appl Phys 42: 556-558, 2003
- 12) 石原美弥, 佐藤正人, 持田譲治ほか: 軟骨再生における評価—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, 大串 始 (監修), シーエムシー, 東京, p123-137, 2007
- 13) 石原美弥, 佐藤正人, 金城永俊ほか: 軟骨再生医療の評価に用いる光音響法の開発. 日レーザー医学会誌 26: 53-59, 2005
- 14) Ishihara M, Sato M, Kaneshiro N et al: Development of a diagnostic system for osteoarthritis using a photoacoustic measurement method. Lasers Surg Med 38: 249-255, 2006

*

*

*

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

正員 石原 美弥* 非会員 佐藤 正人**
 非会員 三谷 玄弥** 非会員 長井 敏洋**
 非会員 沓名 寿治** 非会員 持田 讓治**
 非会員 菊地 眞*

Monitoring of Extracellular Matrix Formation using Nanosecond Pulsed Laser

Miya Ishihara*, Member, Masato Sato**, Non-member, Genya Mitani**, Non-member, Toshihiro Nagai**, Non-member, Toshiharu Kutsuna**, Non-member, Joji Mochida**, Non-member, Makoto Kikuchi*, Non-member

There is a new demand in the field of tissue engineering for evaluation technology of extracellular matrix because the extracellular matrix plays an important role in the function of skeletal tissue such as articular cartilage. We previously proposed a noninvasive method of viscoelastic characterization of tissue phantom, based on the photoacoustic measurement. The purpose of this study was to verify the applicability of the photoacoustic measurement method for monitoring of the development of extracellular matrix using tissue engineering technology. The decay times measured by the photoacoustic method were varied with culture periods when tissue-engineered articular cartilages with various culture periods (-12 weeks) were used as samples. Tissue-engineered cartilage cultured for a long period showed shorter decay times, indicating that the samples approached an elastic solid from a rheological viewpoint. By comparison between biochemical analyses and biomechanical studies, we proved that the photoacoustic signal was a good indicator for evaluating extracellular matrix formation because the change of the photoacoustic decay times would reflect the production of an extracellular matrix.

キーワード：組織工学，光音響，軟骨組織，粘弾性，

Keywords : tissue engineering, photoacoustics, cartilage, viscoelasticity

1. 緒言

再生医療は失われた臓器・組織・器官の再生や機能の回復を目的とした医療のことである。先端医療として着目され、現在、臨床応用に向けての研究が盛んに行われている。再生医療の基盤技術としての組織工学 (Tissue Engineering) は細胞と細胞の分化・増殖用の足場 (担体)，そしてシグナル伝達系 (調節因子) の生物学的構成 3 要素を組み合わせ、培養細胞を用いて組織を人工的に再構築する技術である⁽¹⁾。組織工学の 3 要素の 1 つである担体は人工的な細胞外マトリックスとしての役割を果たす。一方、以前の細胞生物学の分野では細胞外マトリックスは細胞と細胞の間、あるいは細胞集団と細胞集団の間のすきまを構築している物質と

いう程度の認識であった。しかし、細胞外マトリックスは細胞の生存環境を形成する機能を持つこと、細胞の活性、移動、接着、分化に大きな役割を果たしている事が判明し、近年関心が集まっている。

軟骨組織は、2%程度の軟骨細胞と豊富な細胞外マトリックスから構成され、血管、リンパ管、神経がない。これにより、細胞外マトリックスが軟骨細胞へ代謝成分や情報伝達物質を供給する役割を果たす。軟骨組織には硝子軟骨 (関節軟骨や肋軟骨等)、線維軟骨 (半月板、椎間版等)、そして弾性軟骨 (気管、鼻、耳介等) がある。なかでも、力学的に最も高度に分化した組織で、かつ高い粘弾性を有する硝子軟骨の細胞外マトリックスの構成は約 70%が水分、約 20%をコラーゲン、約 10%をプロテオグリカンが占める。また、コラーゲンの主要成分は II 型コラーゲンで、他の軟骨組織に比べプロテオグリカン量が多いのが特徴である⁽²⁾。硝子軟骨の代表的な疾患である関節リウマチや高齢者の変形性関節症の治療として関節軟骨 (硝子軟骨) の再生医療は期待されている。関節軟骨の再生医療では、組織工学的

* 防衛医科大学校 医用工学講座
 〒359-8513 埼玉県所沢市並木 3-2
 Dept. of Medical Engineering, National Defense Medical College

3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513
 ** 東海大学医学部外科学系 整形外科
 〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143
 Dept. of Orthopaedic Surgery, Tokai University School of Medicine
 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193

に作製した軟骨組織を移植し、失われた関節軟骨の荷重負荷機能と潤滑機能の回復を図る。すなわち、組織工学的技術で細胞外マトリックス構築を促し、力学機能を回復させる。

本研究では、関節軟骨再生医療に用いる組織工学的に作製した軟骨組織の評価のために、筆者らが開発したナノ秒パルスレーザーによる力学特性計測法による細胞外マトリックス構築モニターが有効か検討した。

2. 計測原理

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を光音響法と呼ぶ。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ある。計測深さが2~3mmに制限されているOCT (Optical Coherence Tomography) に対して、光音響法は深部診断が可能である。これは、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からである。さらに、光音響法は光と超音波の特長を併せ持つことから、医学・医療の分野にニーズの大きい有力な診断・計測法として着目されている⁽¹⁾。光音響法で力学特性を計測できる基本原理は、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を利用する。線形粘弾性体(スプリングとダッシュポットから構成)である生体に作用した応力の緩和時間は、粘性と弾性の比に相当する。筆者らはナノ秒パルスレーザー光を照射して発生させた応力波についてもこれが当てはまると考えた。まずは原理実証実験として生体ファントムを測定対象に光音響法を用いて計測された粘弾性特性値と、既存の侵襲的粘弾性分析装置から得られる物質固有の粘弾性特性を比較した。その結果、両者が相関した⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

時刻 t における応力波の強度の時間変化(I_s)は次式で表される⁽⁴⁾。

$$I_s = I_0 \times R \times \exp\left(-\frac{t_s}{\tau}\right) \dots \dots \dots (1)$$

τ は応力波の減衰時間、 t_s はレーザーパルス後の時間、 R は反射率の積(試料の前反射面と後反射面を通過した分の反射率の積)、 I_0 は $t=0$ のときの応力波の強度である。

3. 実験方法及び測定試料

(3-1) 力学特性評価のための光音響法 励起光源としてまず初めにOPO(光パラメトリック発振器)を用いた。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。OPOの出力光は石英ファイバー(コア径600 μ m,長さ1m)で導光する。光ファイバーの出射エネルギーは、いずれの波長においても生体損

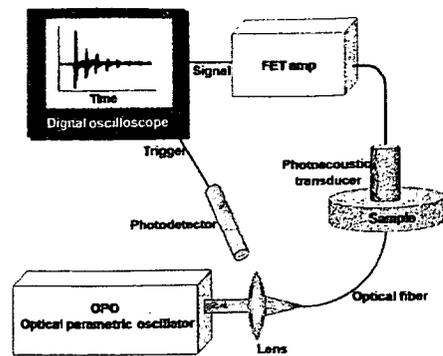


Fig. 1. Experimental Setup⁽⁴⁾⁽⁵⁾

傷閾値よりも十分に小さい約30~50 μ J/pulseに調整した。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。本法開始当初は、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⁽⁴⁾⁽⁵⁾。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ある。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、これを設計・試作した⁽⁶⁾。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(バンド幅,1GHz)で観測した。光検出器(バイプレーナ光電管)を用いて集光用レンズでの励起光の散乱光を検出し、測定信号のトリガーとした。計測系の全体図をFig.1に示す。

医療の現場で使用するためには、可搬式のシステムに構成する必要がある。そのためには、最適な波長を設定し、可搬式レーザー装置を使用しなくてはならない。現在、Nd:YAGレーザーの第三高調波(355nm)を励起源とし、より細径の光ファイバーを用いた可搬式システムを構築している⁽⁶⁾。

(3-2) 組織工学的手法を用いて作製する軟骨組織⁽⁷⁾

組織工学的(ティッシュエンジニアリング)手法を用いた培養軟骨組織の作製は以下の手順に従った。日本白色家兔(体重1kg)12羽から膝関節軟骨を摘出し、酵素処理(コラーゲナーゼとアクチナーゼ処理)により軟骨細胞を単離した。培養用担体には、我々が開発した膜付アテロコラーゲンハニカムスポンジ(ACHMS-scaffold)を使用した⁽⁸⁾⁽⁹⁾。本担体はアテロコラーゲンからなり、ハニカム状の構造で、外径11mm厚さ2mmで、48ウェルプレートにあわせた大きさである。細胞保持のために片面がコラーゲン膜でシールドされている。組織工学における培養担体は、細胞を保持し分化誘導する極めて重要な役割を担う。我々は既に本担体を培養担体として椎間板線維輪細胞を培養した実験で、高密度かつ3次元培養が可能で、軟骨としての形質を維持しながら長期間培養が可能であることを示してい

る⁽¹⁰⁾。今回の実験では、酵素処理により単離した家兎膝関節軟骨細胞を高密度 (1×10^6 細胞/担体) で播種し、3 次元培養を行った。F12/DMEM に 10%FBS (fetal bovine serum) を添加した培地内で、37°C、5%CO₂ 気相の条件で ~12 週間培養した。培養過程において位相差顕微鏡を用いて細胞増殖の様子を観察した。

(3.3) 組織学的検討 (走査型電子顕微鏡)⁽⁷⁾ 担体と共に培養させた関節軟骨細胞走査電顕の試料として以下の通りに作成した。担体内でマトリックスを形成した関節軟骨細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した後、2.5%グルタルアルデヒド及び 1%オスミウム酸で二重固定した。エタノールによる脱水系を行った後、酢酸イソアミルを通し、HCP-2 (日立) で臨界点乾燥を行った。標本はイオンスプッター JFC1100 (日本電子) による金蒸着を行った後、走査型電子顕微鏡 JSM-840 (日本電子) による観察を行った。

(3.4) 生化学的分析

(1) コラーゲンアッセイ⁽¹¹⁾

コラーゲンアッセイは、Burgeson らによる方法に準じて測定した。各サンプルに 4M 水酸化ナトリウム 0.1ml を加えて 120°C で 30 分反応させた後、1.4N クエン酸 0.1ml を加えて pH6.0 に調整し、クロラミン-T 溶液 500ul を加えた。その後アルデヒド-過塩素酸溶液 0.5ml を加え、70°C で 20 分反応させた後、上清をプロパノールで希釈して、96 well プレート上で spectrophotometer (Labsystem) を用いて、550nm の吸光値を測定した。ヒドロキシプロリンを用いた検量線から、サンプルのコラーゲン濃度を算定した。

(2) HPLC によるプロテオグリカンの分析⁽¹²⁾

軟骨内のプロテオグリカン (PG) を構成するグリコサミノグリカン (GAG) には、コンドロイチン硫酸 (CS) とケラタン硫酸 (KS) がある。新名らの方法に準じて HPLC と蛍光光度法をあわせて、培養軟骨の CS と KS を分別定量した。具体的には、2.5%プロナーゼ E による消化後、不活性化させた。その後、セファロースのカラムに注入後、洗浄して塩化リチウム含有トリス塩化水素緩衝液にて GAG を溶解させた。CS の定量分析のためにはコンドロイチナーゼ ABC を、KS 分析のためにはケラタナーゼを用いた。

4. 実験結果

Fig. 2 に培養軟骨組織の培養期間をパラメータとして、

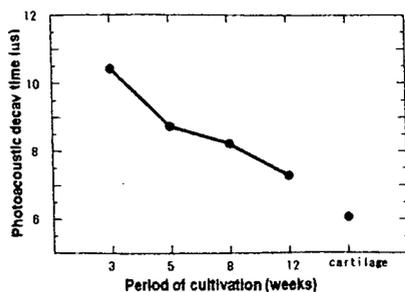


Fig. 2. Photoacoustic decay times as a function of culture time⁽⁷⁾

(1)式を用いて算出した応力波の減衰時間をプロットした。幼弱家兎の摘出膝関節軟骨を対象にした結果も比較のために示した。

培養期間が長くなるにつれて、応力波の減衰時間は短くなり、正常軟骨の値に近づいていった。しかし、培養期間が 12 週の培養軟骨組織でさえも正常軟骨に比べて粘弾性パラメータ (粘性と弾性の比) は約 88% にしか到達しなかった⁽⁷⁾。

Fig. 3 に、培養期間が 3 週の培養軟骨組織と 12 週の培養軟骨組織の走査型電子顕微鏡像 (scanning electron microscopic; SEM) 像を示す。

ここでは担体 (ACHMS-scaffold) のハニカム 1 個分の大きさが観察できるような倍率 (400 倍) での像と細胞 1 個分を観察できるような倍率 (800 倍) での像をそれぞれ示した。培養期間が短い 3 週では 400 倍の SEM 像から観察できるように、ハニカム内に形成された細胞外マトリックスはルーズな状態である。一方、12 週の 400 倍の SEM 像からはハニカム内全体に密でタイトな細胞外マトリックスが構築されているのが観察できる。

培養軟骨組織の GAG 量を HPLC (high performance liquid chromatography) によって培養期間をパラメータとして分析した結果、トータル CS 量は培養期間の増加に伴って増加した。異性体であるコンドロイチン 4 硫酸とコンドロイチン 6 硫酸の増加傾向には差異が見られた。一方、KS 量の培養期間に対する変化は、CS 量の変化とは異なった特性を示した。培養開始から 5 週までは急激に増加し、その後 8 週までは増加傾向にあるが、12 週では KS 量が減少した。また、CS 量に比べて KS 量は少なく 1% に満たなかった⁽⁷⁾。

コラーゲンアッセイで求めた培養軟骨組織のコラーゲン量 (このアッセイ法では、コラーゲンのタイプまでは分別できないので全コラーゲン量である) は、培養期間の増加に伴い単調増加する傾向が見られた。また、培養開始時 (コラーゲンからなる担体と細胞) に比べて培養 3 週でも有意なコラーゲン産生が認められ、軟骨細胞が担体を足場として新たにコラーゲンが産生することが確認できた⁽⁷⁾。

Fig. 4 に、培養過程において、細胞外マトリックスの形成と粘弾性の獲得にどのような関係があるか、光音響法によ

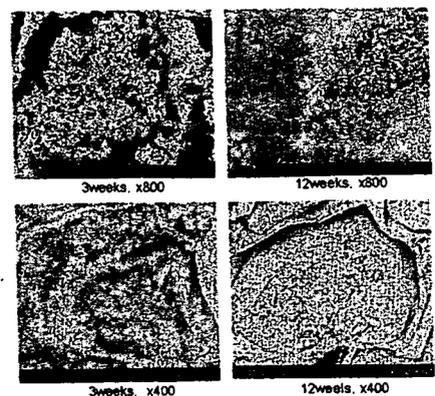


Fig. 3. Extracellular matrix formation in SEM images⁽⁷⁾

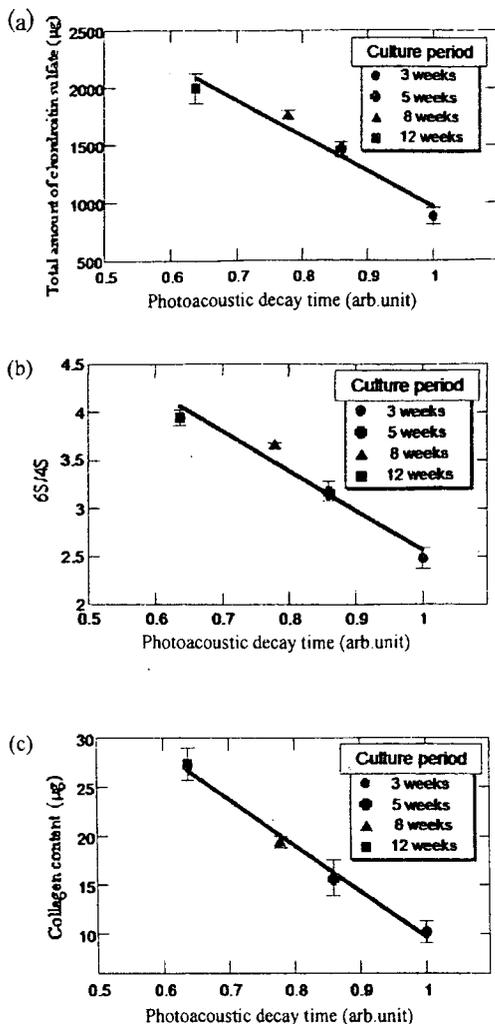


Fig. 4. (a) Relationship between decay times and total amount of chondroitin sulfate. The correlation coefficient is 0.95. (b) Relationship between decay times CS-4S-to-CS-6S ratio (6S/4S). The correlation coefficient is 0.97. (c) Relationship between decay times and total amount of collagen. The correlation coefficient is 0.97⁽⁷⁾

り計測した減衰時間をパラメータとして、生化学的分析で得られた結果をグラフにした⁽⁷⁾。

減衰時間に対して、①全コンドロイチン硫酸量、②6s/4s (コンドロイチン 6 硫酸とコンドロイチン 4 硫酸の比)、及び③コラーゲン量をそれぞれプロットしたグラフである。いずれのグラフも単調減少の傾向が観察され、線形のフィッティングを行ったところ、各グラフとも相関係数が 0.9 以上と、ほぼ同様の相関が得られた。なお、6s/4s は軟骨の成熟度の指標、全コンドロイチン硫酸とコラーゲンは細胞外マトリックスの主要成分である。

5. 考察

今回実施した培養期間 (3~12 週) 内での粘弾性の変化は、光音響法で評価できることが確認できた。培養期間が長くなるにつれて、減衰時間は小さくなっているが、これはレ

オロジーの分野では、弾性固体に近づいていることに相当する。つまり、生化学的分析結果より明らかなように培養期間が経つにつれて播種した軟骨細胞が次第に細胞外マトリックスを形成する。細胞外マトリックスは力学機能を担っているため、弾性固体に近づくことになる。これより培養期間が長くなるにつれて光音響法で計測した減衰時間は、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反映していると認めることができる。

培養期間内ではほぼ単調減少の傾向となる光音響減衰時間の特性を有した軟骨の力学特性に対して、コラーゲンの量も同様の傾向を示したが、プロテオグリカンに関してはグリコサミノグリカンの種類や異性体によって培養期間に対する変化量が異なっていた。強い親水性を示し、粘弾性の亢進に寄与するコンドロイチン硫酸においては、4 硫酸が未熟アグリカン、6 硫酸が成熟アグリカンを反映しており成熟アグリカンは増加しつづけるが、未熟アグリカンはある期間を過ぎると一定値を保つという結果は、成熟細胞外マトリックスが形成されている様子を反映していると考えられる。

実際に細胞外マトリックスの重要なパラメータと粘弾性パラメータを比較すると、軟骨組織の成熟度の指標となる 6s/4s、前述したように粘弾性に関係のある全コンドロイチン硫酸量とコラーゲンのパラメータにおいても、減衰時間とは相関係数 0.93 以上が得られているが、特に強い相関があるパラメータがあるということもなかった。軟骨組織の培養過程において、培養時間に伴って細胞外マトリックスが形成されていく、つまりプロテオグリカン、コラーゲンが共に形成されるのに伴って力学特性が同時に獲得されていくことを今回の一連の計測で確認できた。すなわち、光音響法により細胞外マトリックスの構築過程を反映した粘弾性パラメータを測定することができ、組織工学的手法を用いて作製した軟骨組織を評価するための指標として、光音響法の減衰時間は有用であることがわかった。

同時に、今回作製した培養軟骨組織に関して、培養期間が長くなるにつれて力学特性及び生化学特性はともに増加、つまり培養に伴って細胞の増加や細胞外マトリックスの形成が順調に行われていることが確認できた。これは担体によっては必ずしも順調に培養できないケースが報告されている中、膝関節軟骨の培養担体としてはアテロコラーゲンハニカムスポンジ (ACHMS-scaffold) は有用であることが示された。

6. 結 言

我々が開発したナノ秒パルスレーザー光を用いた力学特性評価法を用いて、組織工学的手法を用いて作製した再生軟骨組織を対象に測定したところ、細胞外マトリックスの構築過程を反映した結果が得られ、本法の有用性が示された。

謝 辞

本研究の一部は独立行政法人新エネルギー・産業技術総

合開発機構のプロジェクト（再生医療の早期実用化を目指す再生評価技術開発）並びに厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）の助成を受け実施された。ここに謝意を表す。

（平成 19 年 4 月 27 日受付，平成 19 年 7 月 6 日再受付）

文 献

- (1) R. Langer and JP. Vacanti : "Tissue engineering", *Science*, Vol.260, p.920 (1993)
- (2) M. Ishihara, M. Sato, M. Ishihara, J. Mochida, and M. Kikuchi : "Multifunctional evaluation of tissue engineered cartilage using nano-pulsed light for validation of regenerative medicine", *IFMBE Proceedings WC 2006*, Vol.14, p.3187 (2006)
- (3) 佐藤俊一・山崎睦夫・小原 實 : 「超音波法による医用モニタリング, 診断技術」, Vol.30, No.10, p.658 (2001)
- (4) M. Ishihara, M. Sato, S. Sato, T. Kikuchi, K. Fujikawa, and M. Kikuchi : "Viscoelastic characterization of biological tissue by photoacoustic measurement.", *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol.42, p.556L (2003)
- (5) M. Ishihara, M. Sato, S. Sato, T. Kikuchi, K. Fujikawa, and M. Kikuchi : "Biomechanical characterization of cartilages by photoacoustic measurement", *Proc. of SPIE* 4961, p.221 (2003)
- (6) M. Ishihara, M. Sato, N. Kaneshiro, G. Mitani, S. Sato, J. Mochida, and M. Kikuchi : "Development of a diagnostic system for osteoarthritis using a photoacoustic measurement method", *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol.38, No.3, p.249 (2006)
- (7) M. Ishihara, M. Sato, S. Sato, T. Kikuchi, J. Mochida, and M. Kikuchi : "Usefulness of photoacoustic measurements for evaluation of biomechanical properties of tissue-engineered cartilage", *Tissue Engineering*, Vol.11 (7-8), p.1234 (2005)
- (8) M. Sato, T. Asazuma, M. Ishihara, T. Kikuchi, K. Masuoka, S. Ichimura, M. Kikuchi, A. Kurita, and K. Fujikawa : "An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc", *J. Biomed. Mater. Res.* 64A, p.248 (2003)
- (9) M. Sato, M. Kikuchi, M. Ishihara, M. Ishihara, T. Asazuma, T. Kikuchi, K. Masuoka, H. Hattori, and K. Fujikawa : "Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured annulus fibrosus cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS scaffold)", *Med. Biol. Eng. Comput.*, Vol.41, p.365 (2003)
- (10) M. Sato, T. Asazuma, M. Ishihara, M. Ishihara, T. Kikuchi, M. Kikuchi, and K. Fujikawa : "An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method", *Spine*, Vol.28, p.548 (2003)
- (11) RE. Burgeson and DW. Hollister : "Collagen heterogeneity in human cartilage: identification of several new collagen chains", *Biochem Biophys Res Commun*, Vol.87, p.1124 (1979)
- (12) M. Shinmei, S. Miyauchi, A. Machida, and K. Miyazaki : "Quantitation of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in pathologic joint fluid", *Arthritis Rheum.*, Vol.35, p.1304 (1992)

石原美弥 (正員) 1994年慶応義塾大学大学院理工学研究科修了。1996年防衛医科大学校医用電子工学講座助手。2006年同助教授。2007年同准教授。同年東海大学医学部非常勤准教授。日本生体医学学会代議員, 2002年国際組織工学会優秀発表賞, 2006年日本生体医学学会荻野賞受賞。



佐藤正人 (非会員) 1991年防衛医科大学校卒業。2001年防衛医科大学校医学教育部医学研究科修了。同年自衛隊横須賀病院整形外科科長。2002年防衛医科大学校医用電子工学兼務講師。2003年東海大学医学部外科学系整形外科学講師。2007年同准教授。



三谷玄弥 (非会員) 1993年東海大学医学部卒業。東海大学外科学系整形外科学助教。日本オリンピック委員会強化スタッフ, 日本テニス協会女子ナショナルチーム Dr, 日本セーリング連盟医事科学委員, 神奈川県体育協会スポーツ医科学委員。



長井敏洋 (非会員) 2002年東海大学医学部医学科卒業。同年東海大学医学部付属病院臨床研修医。2004年東海大学医学部付属病院外科学系整形外科学入局。同年東海大学医学部大学院医学研究科外科学専攻入学。2007年東海大学医学部付属病院勤務。



杓名寿治 (非会員) 1995年東海大学医学部卒業。東海大学外科学系整形外科学助教。専門(臨床)は股関節外科。



持田譲治 (非会員) 1975年慶応義塾大学医学部卒業, 1984年医学博士(慶応義塾大学), 1995年東海大学医学部整形外科学助教授, 2001年東海大学医学部外科学系整形外科学教授, 2004年東海大学医学部付属病院副院長, 2005年東海大学医学部副学部長。



菊地眞 (非会員) 1974年慶応義塾大学大学院理工学研究科修了(工博), 東京女子医大講師を経て1980年防衛医科大学校医用電子工学講座教授, 2003年同防衛医学研究センター長, 2007年同副校長。バイオ光技術のME研究に従事。日本ハイパーサーミア学会会長, 日本生体医学学会前副会長, 国際ME連盟(IFMBE)会長など。



未来医療に向けたセルプロセッシングと インフォマティックスの利用

特集によせて

紀ノ岡正博^{1*}・高木 睦²・井藤 彰³

種々の組織疾患に対し、従来の薬剤投与や人工素材を用いた機能代替による対症的治療法に代わって、細胞の増殖・分化・代謝などの潜在能力を利用し、患者自身もしくは提供者の細胞を増幅・分化させて移植する再生医療が急速に普及しつつある。これまで数多くの培養組織を用いた疾患の修復方法が提案され、多くの実績が得られてきた。自家（患者自身の細胞を由来とする）もしくは同種（提供者の細胞を由来とする）の培養組織を対象とした生産において、今後、培養組織（製品）の安全性だけでなく有効性に対する品質保証が顧客である医師および患者に信頼を生み、普及へと続く重要な懸案の一つと考えられる。

製剤生産の場合、図1に示すように、規格を満たした原料から製造工程、品質保証を経て製品を得る。製造における工程管理ならびに製品の品質管理は独立して実施される。工程は、ロットごとに变化しない手順にて実施され、安全性・有効性（力価、純度など）に関し、固定された基準にて製品の品質管理がなされる。顧客である医師や患者は、本製剤を使用し、十分な顧客満足度を得る。ここで、固定された規格による製品の普遍化は顧客への安定供給を実現し、さらに投与量の調整により患者の適用範囲を拡大できる。この考え方は、製造の際に大

ロットを可能とする工程において適用でき、製剤の工程に類似した同種組織培養製品の生産もこの範疇に含まれると考えられる。

一方、自家培養組織製品の生産では、患者からの採取細胞の質・量や患部の程度が変化し、製造工程の原料側と製品側での変動を許容しなければならない。また、顧客と原料提供者が一致するなどの特徴を有する。現時点で明確な指針はなく、原料から製品、顧客まで一貫した流れを考慮し、新規な生産概念の構築が必要となる。特に、製造工程での調整（培養日数など）が有効性向上を導くことや患者固有の価値判断が存在することなどを鑑み、個別供給を目指した柔軟な規格設定が、顧客の満足度を向上させると思われる。その際、製品は安全性に対しては製剤の品質評価と同様、固定された基準により評価されるべきであるが、有効性に関しては、患者に適した柔軟な基準で評価されることが望ましいと考えられる。

現時点で、培養組織製品の品質評価は安全性に関する指標が多く、ものづくりの観点からは、力価や純度のような効能に関する指標づくりが今後、真のものづくりに貢献すると考えられる。効能に関する品質評価構築は、細胞（原料）や組織（製品）に対する指標探索、指標測定ツールの開発、解析手法の構築などが不可欠であり、生物学領域の知識と技術は、これら一貫した方法論構築に貢献できると考えられる。セル&ティッシュエンジニアリング研究部会では、再生医療に貢献すべく活動を行ってきた。将来、このような基準により、培養組織製品の品質安定性や治療効果の向上、さらには医療機関における治療方針、手術日などの治療計画の策定が可能となるであろう。

本特集では、平成18年度大会における部会シンポジウムで議論したトピックスを、特に細胞モニタリング可能な培養装置、モニタリング指標、新規モニタリング手法、インフォマティックスの利用（新規解析システム）の観点から紹介する。生物工学会の会員の皆様のものづくりに対する新しいトピックとなることを確信しております。

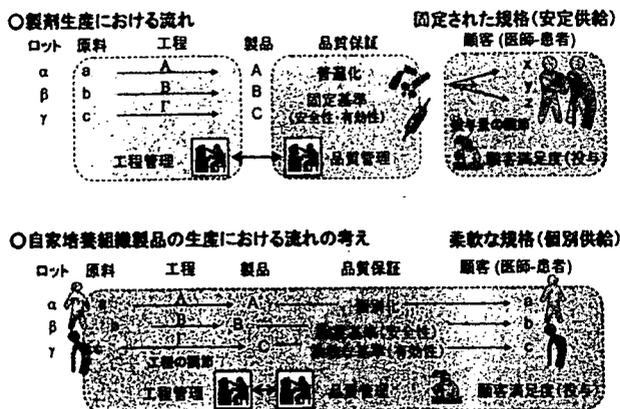


図1. 工程・品質管理の特徴と今後の課題

* 著者紹介 ¹大阪大学大学院基礎工学研究科化学工学領域（准教授） E-mail: kino-oka@cheng.es.osaka-u.ac.jp
²北海道大学工学研究科生物機能高分子専攻、³九州大学大学院工学研究院化学工学部門

再生医療評価・バリデーションのための非侵襲的計測法

石原 美弥^{1*}・佐藤 正人²・持田 譲治²・菊地 眞¹

1993年、VacantiとLangerが提案した生分解性高分子を用いて作製したヒトの耳の形をした軟骨をマウスの背中に移植した写真がScienceに掲載されて以来、再生医療や組織工学に熱い注目が集まるようになった¹⁾。再生医療とは、組織工学(Tissue Engineering)の技術を利用して、失われた臓器・組織・器官の再生や機能の回復を目的とした医療のことで、先端医療として着目されている。組織工学は再生医療の基盤技術で、細胞と細胞の分化・増殖用の足場(バイオマテリアル)、そしてシグナル伝達系(調節因子)の生物学的構成3要素を組み合わせ、培養細胞を用いて組織を再構築する技術で、現在は、ほぼすべての組織・臓器の再生が臨床応用を目指して研究され、血管、骨、軟骨などの臨床応用が日本国内でも一部開始されているが、多くの患者に適用するには至っていない。再生医療は典型的な融合境界領域で、発生生物学・細胞生物学だけではなく、分子生物学、材料工学、さらには安定かつ自在に組織形成を制御できる技術を担う種々の周辺工学技術が再生医療で重要な役割を果たしている(図1)。その他にも見落としてならない周辺工学技術に計測・イメージング技術が挙げられる²⁻⁴⁾。

再生医療における計測・イメージング技術とは、再生医療に用いる細胞・組織の形態や機能が、生来の細胞・組織と比較してどの程度なのか、再生医療に用いるのに所望の条件を満たしているかを非侵襲的かつ経時的に評価する技術であり、この技術により再生医療の質の担保

が確立され、同時に安全性が確保されることになる。これを再生医療が安全で有効であることを立証する、再生医療のバリデーションと呼び、再生医療の標準化とあわせて再生医療を実現させるために重要な役割を担う基盤技術として研究が進められている。バリデーションを可能にする評価法には、図2に示すように再生医療の一連の過程において同一の計測法で繰り返し、一貫して評価できることが求められるが、従来の組織学的、生化学的、分子生物学的な分析による評価法を用いると、再生組織の一部を、あるいはすべてをサンプルとして提供しなければ評価できないため、非侵襲的、非破壊的計測方法の確立が課題となっている⁵⁻⁹⁾。

ここで、再生医療の一連の過程における評価とは以下のことを示す。(A)治療前診断、すなわち機能障害や機能不全を起こしている組織・臓器の障害度(変性度)の診断、(B)組織・細胞移植手術モニター、すなわち周囲組織の状態、移植組織・細胞の状態のリアルタイムモニター、(C)組織・細胞の品質管理、すなわち組織工学の基本構成三要素である①細胞、②バイオマテリアルおよび③調整因子を組み合わせ、組織工学的に構築された移植用再生組織・細胞やその構築過程の評価、(D)経過観察および医療評価としては、移植後の組織・細胞を*in vivo*で観察することや、移植後の周囲組織との生着状態を評価する。ここでいう医療評価とは、再生された組織・臓器の機能が生来のものと比べてどの程度機能が修復されたかを経時的に測定することである。

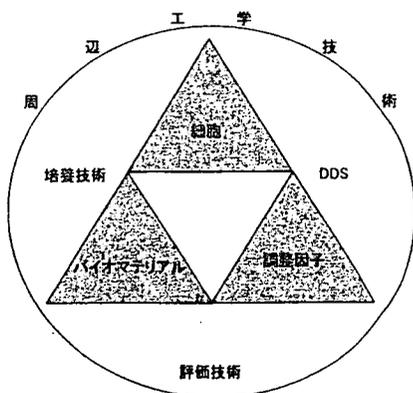


図1. 再生医療を実現するための基本3要素(図中の網かけ部分)を取り巻く周辺工学技術²⁻⁴⁾

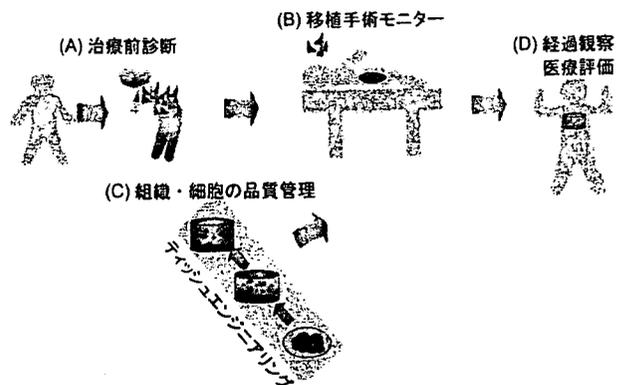


図2. 再生医療のための一連の過程における診断・評価技術のコンセプト⁵⁻⁹⁾

*著者紹介 ¹防衛医科大学校医用工学講座(准教授) E-mail: kobako@ndmc.ac.jp
²東海大学医学部外科学系整形形成外科

関節リウマチや高齢者の変形性関節症の治療として期待されている関節軟骨（硝子軟骨）の再生医療では、組織工学的に作製した軟骨組織を移植し、失われた関節軟骨の荷重負荷機能と潤滑機能の回復を図る。軟骨組織は、2%程度の軟骨細胞と豊富な細胞外マトリックスから構成されているのが特徴で、細胞外マトリックスが軟骨の機能を担っている。すなわち、組織工学的手法で細胞外マトリックスの成熟を促し、力学機能を回復、再建させる。よって、真に重要な機能評価は軟骨の力学特性評価である。軟骨組織は、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粘弾性体であるので¹⁰⁾、力学機能を評価するためには粘弾性特性を測定する必要がある。リラクゼーション、クリープ、ヒステリシスなどの力学的現象が粘弾性に相当するが、軟骨組織の粘弾性挙動を評価するには、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リラクゼーション（relaxation）関数が適したパラメータである。

筆者らは、非侵襲的・光吸収体の選択的な診断を可能にするバイオフォトンクス（BioPhotonics）技術に着目し、臨床応用が一部に開始されている軟骨再生医療のバリデーションを可能にする非侵襲的に軟骨の力学特性、特にリラクゼーション関数が測定できる手法を開発したので以下に紹介する。

光音響法による粘弾性計測

医療現場に持ち込める実用性にすぐ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¹¹⁾。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。筆者らは、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¹²⁻¹⁶⁾。その計測原理を図3に示す⁷⁾。

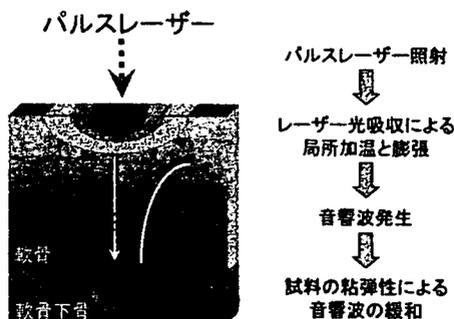


図3. レーザー誘起応力波による粘弾性計測原理⁷⁾

これは、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モデルにおいて、作用する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の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。

このとき、時刻 t における応力波の強度 I_t の時間変化は次式で表される¹²⁻¹⁵⁾。

$$I_t = I_0 \times R \times \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1)$$

ここで、 I_0 は $t=0$ のときの応力波の強度、 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_0 はレーザーパルス照射後の時間、 τ は応力波の減衰時間で、粘性（ η ）と弾性（ G ）の比（ η/G ）に相当する。

筆者らは原理実証実験として、力学特性を変化させた生体ファントムを測定対象に、光音響原理により測定された応力波の時間変化から算出した減衰時間と、既存の侵襲的粘弾性分析装置から得られる物質固有の粘弾性特性値に相関があることを示し、提案した方法で粘弾性特性が測定できることを実証している¹²⁻¹⁵⁾。

実験方法および測定試料

光音響法による粘弾性計測システム 励起光源として、まず初めにOPO（光パラメトリック発振器、パルス幅：5～7 ns）を用いた。OPOの発振波長は、コラーゲンやその他のタンパクの光吸収波長（250～355 nm）に設定した。この波長の範囲内では、波長が短いほど吸収が大きくなるので、発生する光音響波のピーク値を高くできるとともに光音響波の発生深度を浅く（0.1 mm以下）できる。設定した波長について計測を実施した結果、いずれの波長においても光音響信号は計測可能であった。実用性を考慮し、小型、可搬、安価な励起光源として実現可能なQスイッチNd:YAGレーザーの第3高調波（波長：355 nm、パルス幅：5～6 ns）を使用した光音響測定システムを作製した。レーザー出力光は、石英ファイバー（コア径600 μm 、長さ1 m）を用いて試料に導光する。レーザーの照射エネルギーは生体に影響のない条件である100 $\mu\text{J}/\text{mm}^2$ を設定した¹⁷⁾。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。検出信号をFET増幅器（バンド幅1 kHz-100 MHz、ゲイン46 dB）で増幅し、マルチチャンネルデジタルオシロスコープ（バンド幅1 GHz）で観測した。光音響法計測系の概要図を図4に示す¹⁷⁾。

組織工学的手法を用いて作製する軟骨組織 組織工