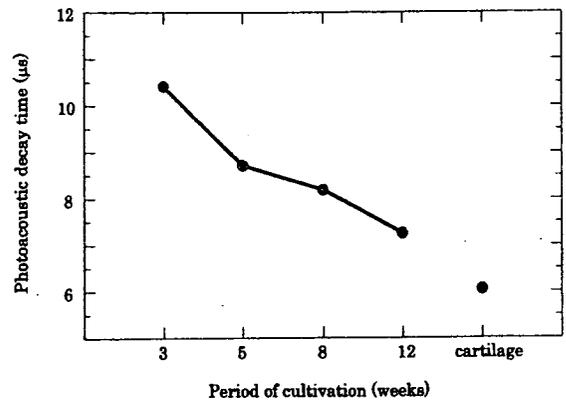


図4. 光音響法による粘弾性計測システム<sup>17)</sup>



学的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。培養担体には、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<sup>18-21)</sup>。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、大きさは48ウェルプレートに合わせた外径11 mm、厚さ2 mm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きわめて重要な役割を担う。我々はすでに本担体を培養担体として椎間板線維輪細胞と関節軟骨細胞を培養した実験で、高密度かつ3次元培養が可能であり、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<sup>18-21)</sup>。本研究の実験では、日本白色家兎 (体重1 kg) 12羽から摘出した膝関節軟骨を酵素処理 (コラーゲナーゼとアクチナーゼ処理) し、得られた軟骨細胞を高密度 ( $1 \times 10^6$  細胞/担体) で培養担体に播種し、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%CO<sub>2</sub> 気相の条件で12週間培養した。位相差顕微鏡を用いて培養過程における細胞増殖の様子を観察した。

**生化学的分析** 培養軟骨組織の生化学的分析は、Burgeson らによる方法に準じてコラーゲンアッセイによりコラーゲン量を<sup>22)</sup>、新名らの方法に準じてHPLCによりプロテオグリカンのコンドロイチン硫酸量をそれぞれ求めた<sup>23)</sup>。

**実験結果**

図5に培養軟骨組織の培養期間をパラメータとして、(1)式を用いて算出した減衰時間をプロットした<sup>24)</sup>。日本白色家兎 (体重1 kg) の摘出膝関節軟骨を対象にした計測結果と組織工学的手法を用いて作製した培養3週と12週の軟骨組織の走査型電子顕微鏡像を比較のために併せて示した。

光音響法を用いて計測した粘弾性パラメータである減

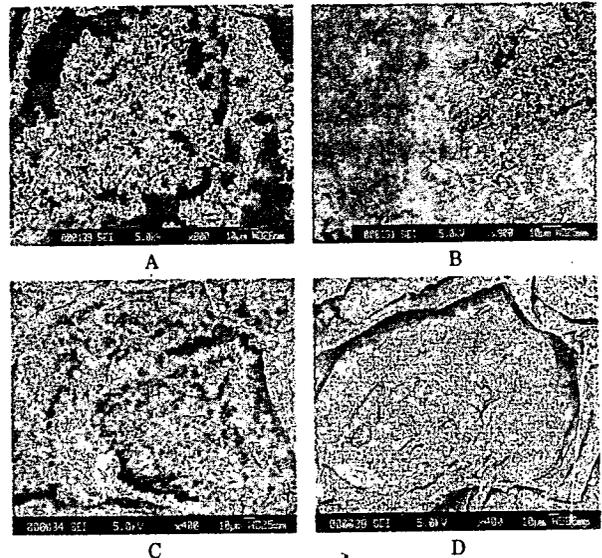


図5. 軟骨組織の培養過程で光音響法により測定した粘弾性パラメータと測定対象である培養軟骨組織の走査型電子顕微鏡像。(A) 培養3週, 800倍, (B) 培養12週, 800倍, (C) 培養3週, 400倍, (D) 培養12週, 400倍<sup>24)</sup>。

衰時間は、培養期間が長くなるにつれて短くなった。培養期間が12週の軟骨組織の粘弾性パラメータは、正常軟骨に比べて約88%であった。走査型電子顕微鏡像に関しては、培養期間が短い3週では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週の走査型電子顕微鏡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。細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンとコンドロイチン硫酸は、共に培養期間が長くなるにつれて単調増加している様子が生化学的分析より確認された。

**考 察**

本研究で実施した培養期間内での粘弾性値は、光音響法で評価できる範囲内であることが確認できた。培養期間が長くなるにつれて測定された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。本研究で組織工学的手法を用いて作製した培養軟骨組織では、走査型電子顕微鏡像や生化学的分析結果からも分かるように、培養期間の経過とともにコラーゲンやコンドロイチン硫酸を含むプロテオグリカン为主要構成成分とする細胞外マトリックスが構築された。光音響法で測定した減衰時間とコラーゲン量、コンドロイチン硫酸量には相関係数 0.9 以上が得られた。すなわち、軟骨細胞の培養により細胞外マトリックスが形成され、これに伴い粘弾性値は正常軟骨組織に近づく変化を示した。軟骨組織の粘弾性は細胞外マトリックスが担っているので、本研究で培養した軟骨組織は生来の軟骨組織様に構築されていることがわかる。以上より、軟骨組織の培養過程において粘弾性計測のための光音響法は経時的に測定でき、細胞外マトリックスの構築を反映した粘弾性パラメータが計測できることがわかった<sup>24-25)</sup>。よって、再生組織のバリデーションのための指標として光音響法で求められる減衰時間は有用で、その役割を十分に果たすことが示された。

我々はすでに本研究で作製した培養軟骨組織を家兔の膝関節軟骨欠損部に移植する疑似軟骨再生医療において、移植前後の光音響計測を実施している。この計測では移植後の導入組織の粘弾性の変化や周囲組織との生着過程を経時的に計測し、治療後の経過観察や治療効果の評価が可能であることも確認している<sup>26)</sup>。

一方で、関節軟骨の変性に伴う粘弾性の変化を評価可能かどうかの検討も実施している。2005年より、東海大学臨床研究審査委員会認可のもと、ヒト関節膝軟骨の変性診断に適用している<sup>17)</sup>。

## 結 言

再生医療の最重要基盤技術の1つであるバリデーションを可能にする計測・イメージング技術として我々は光音響法を用いた力学特性評価法を開発した。この計測法

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。

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した再生評価技術開発）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。

## 文 献

- 1) Langer, R. and Vacanti, J. P.: *Science*, **260**, 920 (1993).
- 2) 石原美弥ら：ティッシュエンジニアリング 2006, p.189, 日本医学館(2006).
- 3) 石原美弥ら：再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性, p.123, シーエムシー (2007).
- 4) 石原美弥ら：再生医療技術の最前線, p.61, シーエムシー (2007).
- 5) 石原美弥ら：再生医療の基礎シリーズ 4 再生医療のためのバイオエンジニアリング, p.147, コロナ社 (2007).
- 6) 石原美弥ら：遺伝子医学 MOOK 再生医療へのプレイクスルー, p.228, メディカルドゥ (2004).
- 7) 石原美弥ら：再生医療, **2** (4), 47 (2003).
- 8) 石原美弥ら：O Plus E, **25** (5), 523 (2003).
- 9) 石原美弥ら：図解再生医療工学, p.225, 工業調査会 (2004).
- 10) Mak, A. F. et al.: *J. Biomech.*, **20**, 703 (1987).
- 11) 佐藤俊一ら：光学, **30**, 658 (2001).
- 12) Ishihara, M. et al.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42**, 556 (2003).
- 13) Ishihara, M. et al.: *Proc. SPIE*, **4961**, 221 (2003).
- 14) 石原美弥ら：レーザー研究, **32**, 640 (2004).
- 15) 石原美弥ら：レーザー医学会誌, **26**, 53 (2005).
- 16) 石原美弥：医学のあゆみ, **208**, 1069 (2004).
- 17) Ishihara, M. et al.: *Lasers Surg. Med.*, **38**, 249 (2006).
- 18) Sato, M. et al.: *J. Biomed. Mater. Res.*, **64A**, 248 (2003).
- 19) Sato, M. et al.: *Spine*, **28**, 548 (2003).
- 20) Masuoka, K. et al.: *J. Biomed. Mater. Res.*, **75B**, 177 (2005).
- 21) Sato, M. et al.: *Med. Biol. Eng. Comput.*, **41**, 365 (2003).
- 22) Burgeson, R. E., and Hollister, D. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 1124 (1979).
- 23) Shinmei, M. et al.: *Arthritis Rheum.*, **35**, 1304 (1992).
- 24) Ishihara, M. et al.: *Tissue Eng.*, **11**, 1234 (2005).
- 25) 石原美弥ら：電気学会論文誌C, in press.
- 26) Ishihara, M. et al.: *Proc. SPIE*, **5695**, 288 (2005).

# 再生医療に用いられる細胞・ 再生組織の評価と安全性

*Assessment and Safety of Cells and Tissue  
Engineered Products for Regenerative Medicine*

監修：大串 始

*Supervisor : Hajime Ohgushi*

シーエムシー出版

### 3 レーザーを用いた培養軟骨評価

石原美弥\*<sup>1</sup>, 佐藤正人\*<sup>2</sup>, 持田譲治\*<sup>3</sup>, 菊地 眞\*<sup>4</sup>

#### 3.1 はじめに

再生医療が学際的な研究の成熟により初めて実現可能となる医療であることは周知の事実となっている。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出来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。そのほかに周辺工学技術で見落としてならないのは、再生した細胞・組織の形態と機能の情報を非侵襲・経時的かつ定量的に計測・イメージング出来る工学技術である<sup>1,2)</sup>(図1<sup>2)</sup>。

組織工学的に作製したいわゆる再生軟骨の評価は、再生医療を実際の臨床へ移行する場合の重要課題であるが、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全てをサンプルとして提供しなければ評価できない。真に求められている評価法とは、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返し、一貫して評価できる非侵襲的方法である<sup>3~6)</sup>。

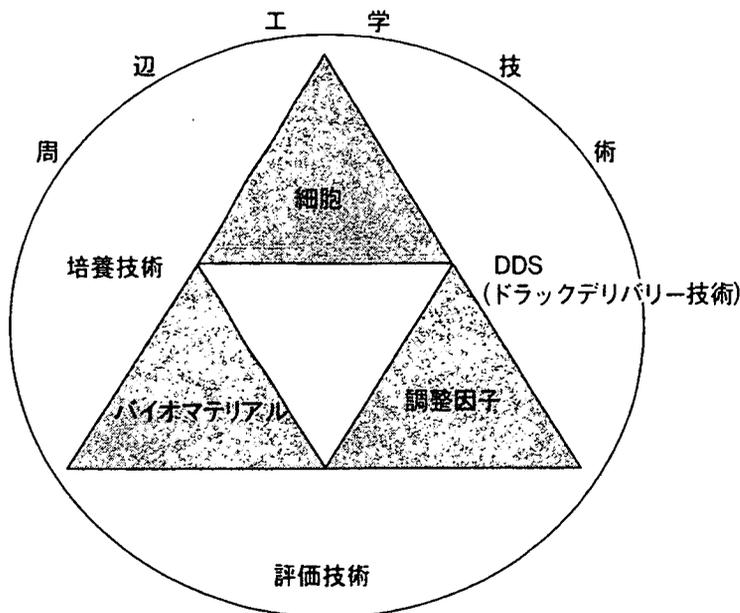


図1 再生医療を実現するための基本3要素(細胞, バイオマテリアル, 調整因子)を取り巻く周辺工学技術<sup>2)</sup>

- \* 1 Miya Ishihara 防衛医科大学校 医用工学講座 准教授
- \* 2 Masato Sato 東海大学 医学部 外科学系 整形外科学 准教授
- \* 3 Joji Mochida 東海大学 医学部 副学部長; 整形外科学 教授
- \* 4 Makoto Kikuchi 防衛医科大学校 副校長; 医用工学講座 教授

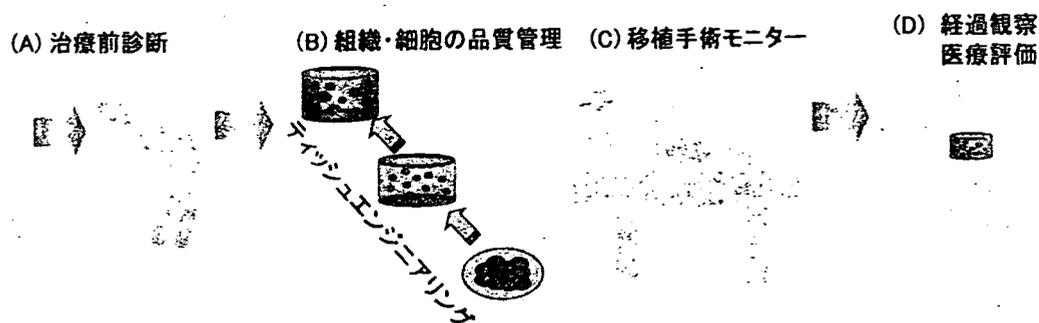


図2 再生医療のための一連の過程における診断・評価技術のコンセプト  
文献 3~6) より一部改編

以下、各過程における評価について記載する。

**(A) 治療前診断**

再生医療が必要か否かの判断のために、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)を診断する。

**(B) 組織・細胞の品質管理**

生物学的構成三要素である細胞、人工細胞外マトリックスとしての担体(Scaffold)、及びシグナル伝達系(調整因子)を組み合わせて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を評価する。これにより再生組織・細胞の有効性などが管理可能となる。

**(C) 組織・細胞移植手術モニター**

周囲組織の状態、移植組織・細胞の状態を術中リアルタイムモニターし、適切な手術が施行されるようにコントロールする。

**(D) 経過観察**

移植後の組織・細胞を *in vivo* で観察し、周囲組織との生着状態並びに移植した組織の性状を評価する。

同時に、非侵襲的に評価する指標、すなわち、再生医療の正当性や有効性を正確に判断するための指標を明確にする必要がある。的確な指標が決定していないと、細胞から軟骨組織を構築する過程における移植の至適なタイミング、すなわち培養中の軟骨組織を移植するのに至適な成熟度を決定できない。再生組織の成熟度は、移植後の生着や機能の発現に重要な要素で、例えば組織が成熟しきった状態では移植後の生着に問題がある可能性あるいは未熟な状態で移植すると本来の機能発現が乏しくなる可能性がある。よって、軟骨再生医療を評価するための指標に成熟度が関連するパラメータは評価に必須と考えられる。

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

## 第6章 軟骨再生における評価

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<sup>7)</sup>ので、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(relaxation)、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、計測する粘弾性パラメータは軟骨組織の粘弾性挙動を反映するパラメータが適していて、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関数が軟骨組織の力学機能評価に適したパラメータとなる。軟骨組織には、硝子軟骨、線維軟骨、弾性軟骨があるが、特に関節軟骨に代表される硝子軟骨は、最も高度に分化した組織で、細胞外マトリックスの約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、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く、高い粘弾性を有するのが特徴である<sup>8)</sup>。関節軟骨の再生医療では硝子軟骨組織再生ではなく線維軟骨組織としての再生されることが問題となり得る。こうした過程のモニタリングとして、軟骨組織を構成するコラーゲンの自家蛍光は、軟骨組織の生化学的組成に関する成熟度の指標となる可能性がある。すなわち、軟骨再生医療の評価には形態情報も重要だが、力学特性や生化学的組成に関する情報の方がより有効的な指標(パラメータ)となる。

一方、経ファイバー的・非侵襲的・選択的な診断を可能にする光・レーザー計測技術の再生医療への応用が着目されている。光・レーザー計測技術を用いた診断は光・レーザー光と対象である生体あるいは、計測・診断のために導入したプローブとの相互作用を利用するもので、図3<sup>2)</sup>に

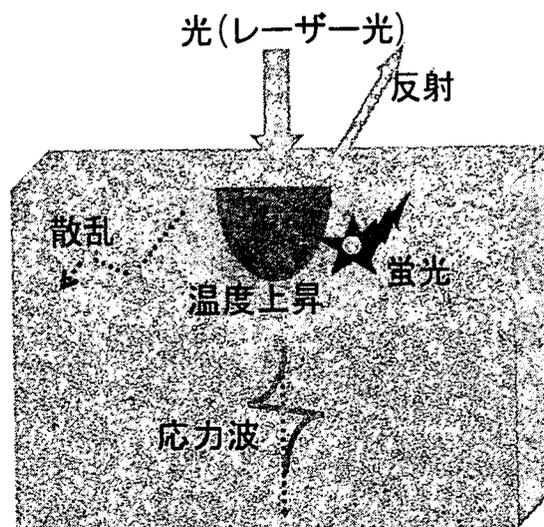


図3 光(レーザー光)と生体の相互作用<sup>2)</sup>

示すように散乱、反射、吸収に伴う発熱、蛍光及び音波等が主な作用に挙げられる<sup>1~3, 9, 10)</sup>。これらの作用を利用することにより、形態情報だけでなく生理学的・生化学的な情報などを取得することができる光・レーザー光を用いた生体計測やイメージングは下記のような特長を有し、これらの特長が医療現場に幅広く有効に活用される所以となっている。

- ① 傷害性のない光・レーザー光を選択することで、計測・イメージングの非侵襲性が確保できる。
- ② 光と生体の相互作用の観点から、細胞・組織の測定対象の性状分析が可能である。
- ③ 経ファイバー的計測が可能であり、すなわち装置のスペースに融通がきく。
- ④ 汎用性・簡便性・迅速性を実現できる。

### 3.1.1 光音響法による粘弾性計測法

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ため深部診断が可能で、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<sup>11)</sup>。脳内血管イメージング<sup>12, 13)</sup>、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<sup>14)</sup>、熱傷の深度診断<sup>15, 16)</sup>、皮膚移植の生着モニタリング<sup>17)</sup>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。

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。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。

時刻 $\delta$ における応力波の強度の時間変化( $I_\delta$ )は次式で表される<sup>18~21)</sup>。

$$I_\delta = I_0 \times R \times \exp\left(-\frac{t_\delta}{\tau}\right) \quad (1)$$

$I_0$ 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)、 $t_\delta$ はレーザーパルス後の時間で、 $\tau$ は応力波の減衰時間であり、粘性( $\eta$ )と弾性( $G$ )の比( $\eta/G$ )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

性特性が相関があることを既に示し、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。

### 3.1.2 時間分解自家蛍光スペクトルによる細胞外マトリックス性状評価

筆者らは、細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンやエラスチンが自家蛍光物質であること、自家蛍光は生体内に内在する物質からの発生する蛍光であるため生体内の性状を反映すること、蛍光の特性は蛍光物質の種類により異なることから、自家蛍光による組織性状評価の可能性を提案した<sup>22~24)</sup>。蛍光法は、前述の光音響法よりも一般的な非侵襲的計測・イメージング法として広く知られている。蛍光計測には自家蛍光計測と導入したプローブからの蛍光を計測する方法に大別される。いずれの計測でも蛍光物質に特定の波長の光(励起光)を照射すると励起光より波長の長い蛍光が発光する。励起光および蛍光の波長が蛍光物質の種類により異なることを利用して蛍光物質の特性が把握できる。光音響計測法で用いるパルスレーザー光を自家蛍光の励起光とし、時間分解自家蛍光スペクトル測定により波長と時間を関数とするパラメータから細胞外マトリックスの性状を評価する方法を光音響法とあわせて開発している<sup>18,19)</sup>。

軟骨組織には構成成分・機能が異なる硝子軟骨、線維軟骨、弾性軟骨があり、硝子軟骨は前述通りⅡ型コラーゲンとプロテオグリカンが主要な成分、線維軟骨は細胞間質に豊富なⅠ型コラーゲン、弾性軟骨はコラーゲンとともにエラスチンを多く含む。既に筆者らは、時間分解自家蛍光スペクトルの測定結果が、コラーゲンの分子種で異なることを基礎実験で検証している<sup>22~24)</sup>。

## 3.2 実験方法および測定資料

### 3.2.1 光音響法と時間分解自家蛍光スペクトル測定法

励起光源としてまず初めにOPO(光パラメトリック発振器、パルス幅:5~7ns)を用いた。コラーゲンやその他のタンパク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。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計測可能であった。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 $\mu$ 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。本法開発当初は、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

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<sup>25)</sup>。図4aに示す。プローブの出力信号をFET増幅器(バンド幅, 1 kHz-100 MHz; ゲイン, 46 dB)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(パイプライン光電管)を用いて集光用レンズで

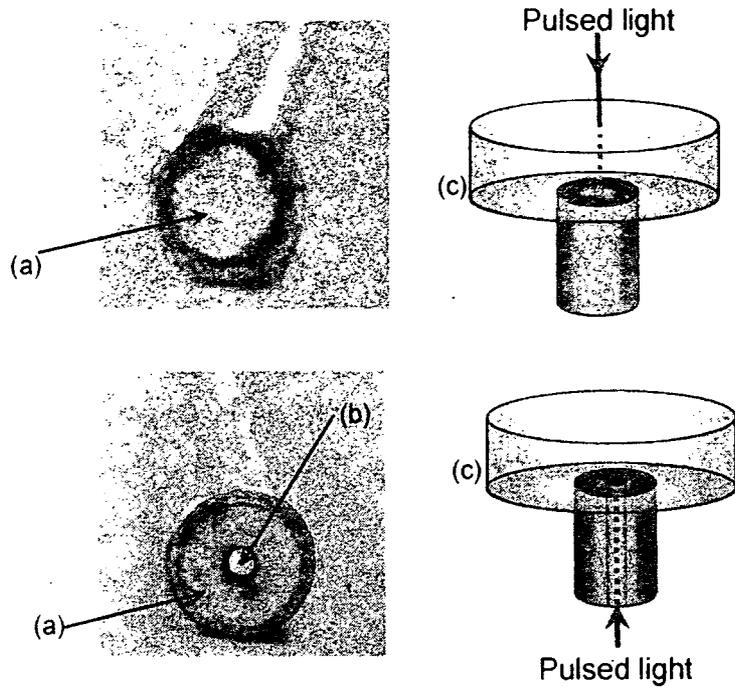


図4a 透過型プローブ(上)と反射型プローブ(下)<sup>25)</sup>

(a)圧電性高分子フィルム (b)光ファイバー (c)試料

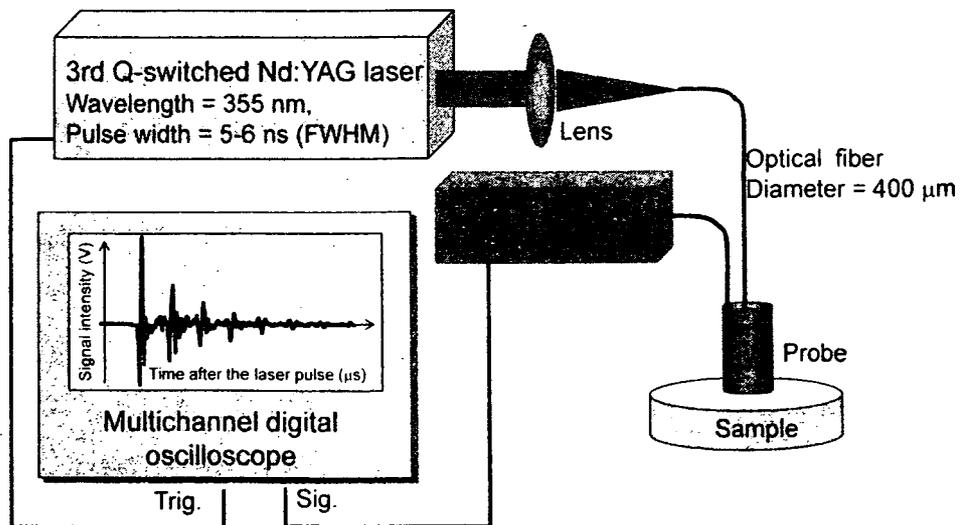


図4b 光音響法による粘弾性計測システム<sup>3, 4, 18, 25, 26)</sup>

の励起光の散乱光を検出し、測定信号のトリガーとした。光音響法計測系の全体図を図4bに示す。

時間分解自家蛍光計測は、励起光は光ファイバーで導光したNd:YAGレーザーの第3高調波を用い、イメージインテンシファイア付CCDセンサを光検出器として、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て施行した。計測パラメータは、蛍光強度、波長の関数としてピーク波長と蛍光スペクトル半値幅、時間の関数として蛍光寿命を算出した。

### 3.2.2 組織工学的手法を用いて作製する軟骨組織

組織工学的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。日本白色家兎(体重1kg)12羽から膝関節軟骨を摘出し、酵素処理(コラ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。培養担体には、筆者ら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<sup>27~29)</sup>。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、大きさは48ウェルプレートにあわせて外径11mm厚さ2mm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。筆者ら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<sup>30)</sup>。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( $1 \times 10^6$ 細胞/担体)で播種し、3次元培養を行なった。F12/DMEMに10%FBS(fetal bovine serum)を添加した培地内で、37℃、5%CO<sub>2</sub>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。

### 3.2.3 走査型電子顕微鏡による組織学的検討

組織工学的手法を用いて作製した培養軟骨組織の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なった後、酢酸イソアミルを通し、HCP-2(日立)で臨界点乾燥を行なった。標本はイオンスプッターJFC1100(日本電子)による金蒸着を行なった後、走査型電顕顕微鏡JSM-840(日本電子)による観察を行なった。

### 3.2.4 生化学的分析

#### (1) コラーゲンアッセイ<sup>31)</sup>

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。すなわち、各サンプルに4M水酸化ナトリウム0.1mlを加えて120℃30分たった後、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を加える。その後アルデヒド-過塩素酸溶液0.5mlを加え、

70℃ 20分の後、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。ただしこのアッセイ法では、コラーゲンの分子種までは分別できない。

### (2) HPLC によるプロテオグリカンの分析<sup>32)</sup>

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た方法で、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、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。CS と KS からの不飽和 2 糖誘導体量を HPLC と分光学的定量法で求めた。

### 3.2.5 安全性試験<sup>25)</sup>

筆者らが開発している測定法の安全性を確認するために、細胞増殖活性試験によりレーザー照射による軟骨への影響を検討した。細胞増殖活性試験に使用する軟骨細胞は〈3.2.2〉と同条件とした。波長 355nm の Q スイッチ Nd:YAG レーザーの第 3 高調波の照射条件は、以下の条件を設定した。①臨床照射条件 ( $100\mu\text{J}/\text{mm}^2$ , 30shots), ②臨床照射条件よりもパルスエネルギーが 1.5 倍大きい ( $150\mu\text{J}/\text{mm}^2$ , 30shots), ③臨床照射条件よりもパルス数が多い ( $100\mu\text{J}/\text{mm}^2$ , 1500shots), ④細胞が死滅する条件として、アルコールを各 well に  $20\mu\text{l}$  ずつ滴下する群, ⑤レーザーを照射しない群の 5 群で実験した。なお、②群のパルスエネルギーは本実験で使用したレーザーの最大出力であった。つまり、本システムを臨床に使用する際の最大出力となる。

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上記 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%  $\text{CO}_2$ , 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。

### 3.3 実験結果

図 5 に培養軟骨組織の培養期間をパラメータとして、(1)式を用いて算出した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ったが、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% に過ぎなかった<sup>33)</sup>。

図 6 に、培養期間が 3 週と 12 週の組織工学的手法を用いて作製した軟骨組織の走査型電子顕

第6章 軟骨再生における評価

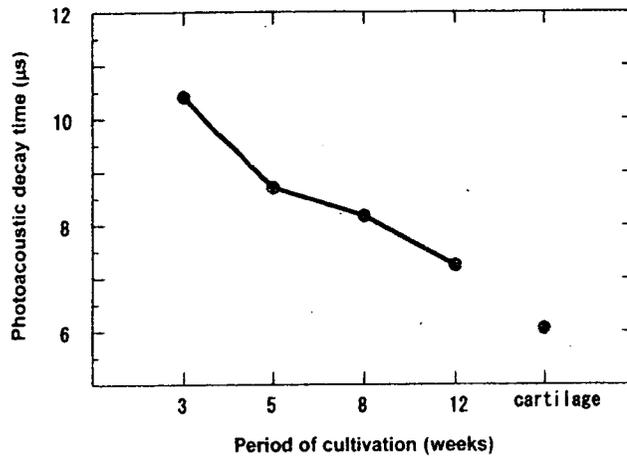


図5 培養過程における組織工学的手法を用いて作製した軟骨組織の光音響法で測定した粘弾性パラメータ<sup>33)</sup>

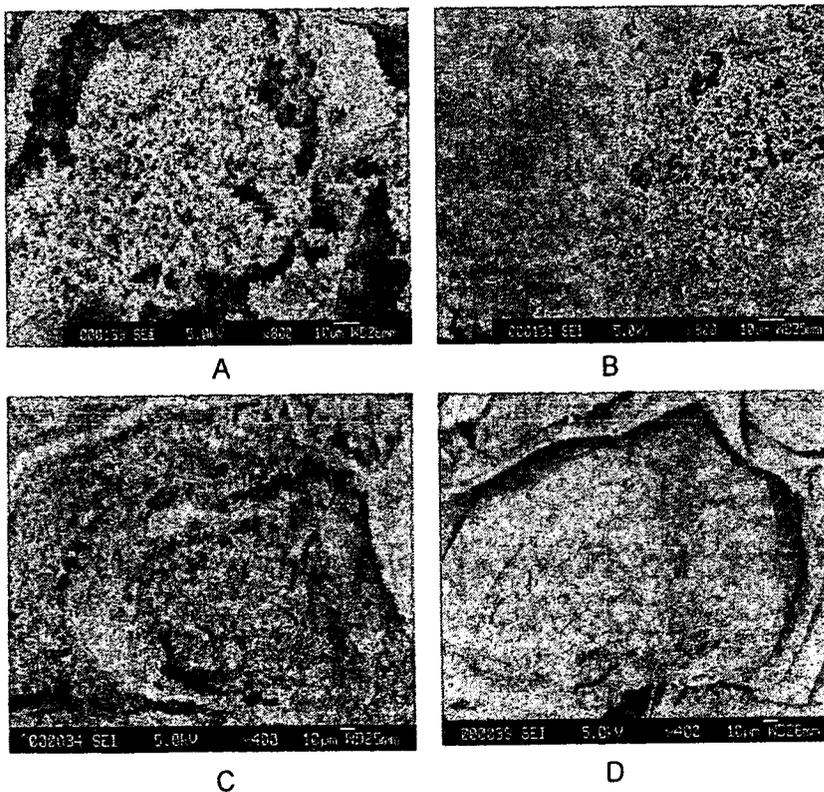


図6 組織工学的手法を用いて作製した培養軟骨組織の走査型電子顕微鏡像<sup>33)</sup>

A 培養3週, ×800 B 培養12週, ×800  
C 培養3週, ×250 D 培養12週, ×250

微鏡像 (SEM 像) が示されている<sup>33)</sup>。ここでは培養担体のハニカム1個分の大きさが観察できるような倍率 (250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250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

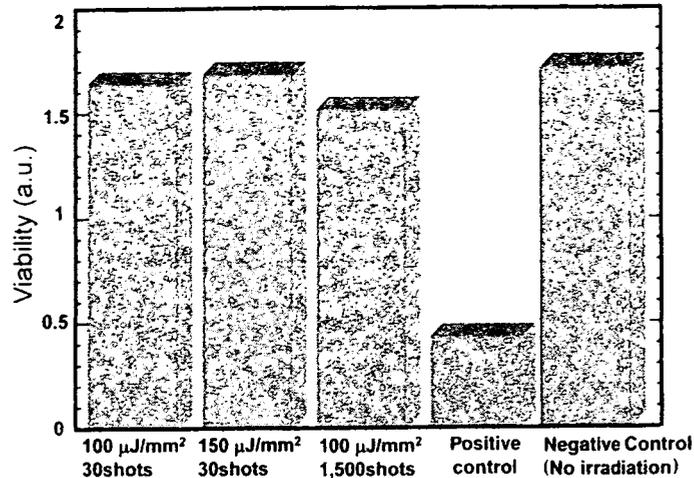


図7 WST-8 アッセイによる増殖活性試験の結果<sup>25)</sup>

細胞外マトリックスはルーズな状態である。一方、12週のSEM像(250倍)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。

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(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<sup>7)</sup>。

培養軟骨組織のGAG量をHPLCによって培養期間をパラメータとして分析した結果、全CS量は培養期間の増加に伴って増加した。CSの異性体であるコンドロイチン4硫酸(4S)とコンドロイチン6硫酸(6S)の増加傾向には差異が見られた。なお6Sと4Sの比(6s/4s)は軟骨の成熟度の指標である。CS量に比べてKS量は少なく1%に満たなかった<sup>33)</sup>。

増殖活性試験の結果を図7に5群で比較して示した<sup>25)</sup>。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、④Positive controlであるアルコール滴下群と増殖活性が異なった。また、⑤Negative controlであるレーザー非照射群とは有意差がなかった。

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、光音響法により計測した減衰時間を粘弾性パラメータとして、生化学的分析で得られた結果をグラフにした。図8は減衰時間に対して、6S/4S及び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増加の傾向が観察され、線形のフィッティングを行なったところ、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<sup>33)</sup>。

硝子軟骨、線維軟骨の自家蛍光特性をコラーゲンの分子種と比較して、表1に示す<sup>34, 35)</sup>。それぞれが構成成分を反映した特性である。組織工学的手法を用いて作製した軟骨組織を対象にして自家蛍光を測定したところ、培養担体(ACHMS-scaffold)に軟骨細胞を播種した培養開始時

の状態より有意に自家蛍光が認められ、自家蛍光強度は培養期間に対して単調増加した。培養期間に対する自家蛍光強度の変化はコラーゲンアッセイで得られた培養期間に対するコラーゲン量の変化とほぼ一致した。

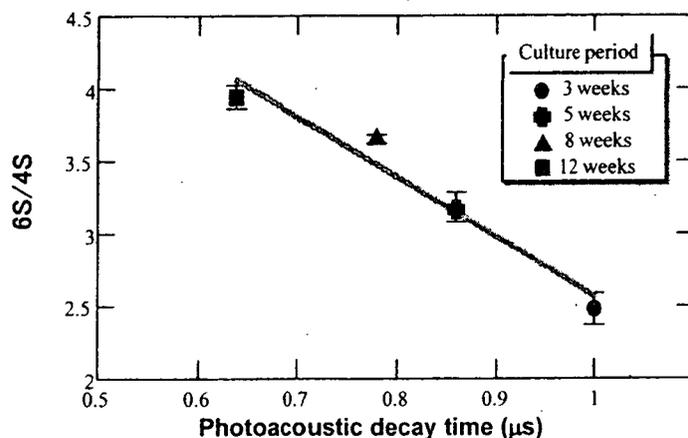


図 8a 光音響法で測定された粘弾性パラメータと 6S/4S<sup>33, 34)</sup>  
6S:コンドロイチン6 硫酸 4S:コンドロイチン4 硫酸

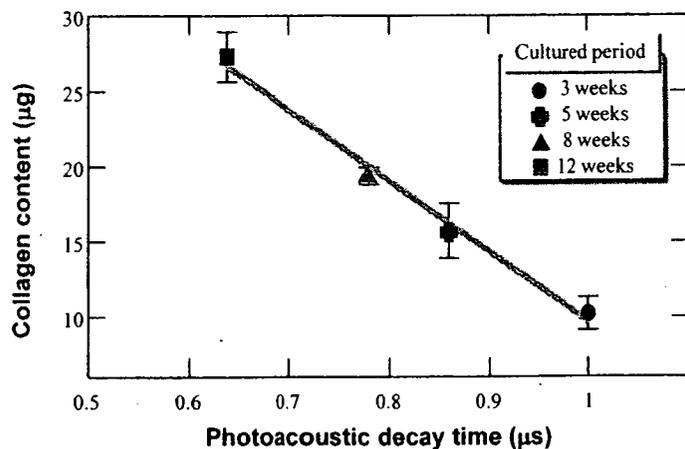


図 8b 光音響法で測定された粘弾性パラメータとコラーゲン量<sup>33, 34)</sup>

表 1 硝子軟骨, 線維軟骨, II型コラーゲン, I型コラーゲンの自家蛍光パラメータ<sup>34, 35)</sup>

	peak wavelength (nm)	FWHM (nm)
articular cartilage	400	64
intervertebral disc	440	121
collagen type II	400	66
collagen type I	440	120

\*FWHM (nm); fluorescent spectral bandwidth at half-maximal amplitude

### 3.4 考察

今回実施した培養期間(3~12週)内での粘弾性値は、超音響法で評価できる範囲内であることが確認できた。培養期間が長くなるにつれて、粘弾性パラメータである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、コラーゲンアッセイやHPLCの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し、その細胞外マトリックスによって弾性を獲得し、弾性固体に近づくことになる。一方で、図8に示すように細胞外マトリックスの重要な生化学的パラメータ(コラーゲン, 65/45)と粘弾性パラメータを比較すると、相関係数0.9以上が得られているが、特にどちらのパラメータがあるということもなかった。以上より超音響法で計測した減衰時間は、軟骨組織の培養過程において経時的に測定でき、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実証した。よって、再生組織のバリデーションのための指標として、超音響法で計測した減衰時間は有用で、その役割を十分に果たすことが示された。

観点を変えると、超音響法を用いて測定される粘弾性パラメータの変化から、今回使用した培養担体アテロコラーゲンハニカムスポンジを用いると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なわれていることが確認できた。これは培養担体によっては必ずしも順調に培養できない例が報告されている中、関節軟骨細胞を用いた組織工学的軟骨の培養担体としてアテロコラーゲンハニカムスポンジは有用であることが示された。すなわち、組織工学的軟骨作製に有用なバイオマテリアル(培養担体)の評価という展開も可能であることになる<sup>33)</sup>。

自家蛍光測定による性状評価では、コラーゲンの分子種(I型, II型)間の蛍光パラメータとこれらの分子種を主成分とする硝子軟骨と線維軟骨はほぼ一致した。さらに培養過程での繰り返し計測結果により細胞外マトリックスの構築モニターが可能であった。また、本計測システムの非侵襲性に関しては、レーザー照射の細胞への傷害性を検討した実験結果より、現在使用している照射条件では、全く問題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ている。

以上により、超音響法と時間分解自家蛍光スペクトルによる組織工学的軟骨の評価は、関節軟骨本来の機能を適正に反映した。臨床における現状では、関節軟骨の機能評価は、レントゲンでの関節裂隙の大きさ、関節鏡での目視やプローブ越しの触感、あるいは生検による組織学的評価という非科学的あるいは侵襲的な評価に甘んじているが、将来的に本計測システムによる同時計測が可能となれば、*in vitro*でも*in vivo*でも一貫した計測法での繰り返し計測が可能である。すなわち*in vitro*では非侵襲的な組織工学的軟骨の評価により、至的移植時期の評価が可能になり、他方*in vivo*では低侵襲の関節鏡視下で術前術後の診断、治療の経過観察評価を軟骨本来の

機能に基づいて定量的な比較が可能となり、治療効果の客観的診断方法として軟骨再生医療の評価に有用な計測診断システムとなることを確信している。

## 謝 辞

本研究の一部は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)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。ここに謝意を表する。

## 文 献

- 1) 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
- 2) 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)
- 3) 菊地眞, 石原美弥, 小林英司, 遠山育夫, 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
- 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 —その革新技术と今後の方向性—」, 再生医療を具現化するための基盤技術としての光計測・評価技術, (株)メカルドゥ, p. 228 ~ 232, 2004
- 5) 石原美弥, 佐藤正人, 菊地眞, 立石哲也他編著: 臓器の評価技術, 図解再生医療工学, 工業調査会, 225-232, 2004
- 6) 石原美弥, 佐藤正人, 菊地眞, 再生医療における機能評価とバリデーションのための計測・画像技術, 再生医療, 2(4), 47-54, 2003
- 7) A. F. Mak, W. M. Lai, and V. C. Mow : Biphasic indentation of articular cartilage-I. Theoretical analysis, J. Biomech. 20 (7) : 703 14,1987.
- 8) 岩田久: 間接疾患の生化学的診断と関節マーカー, 関節マーカー, 岩田久, 新明正由 編著, XX-XXX, メディカルレビュー, 1997
- 9) 石原美弥: 高齢社会におけるレーザー計測・診断技術の役割: 再生医療への応用を中心に, 医学のあゆみ, 208 (13), 1069, 2004
- 10) 石原美弥, 佐藤正人, 菊地眞, 光を用いた細胞・組織のバリデーションの再生医療における重要性, O Plus E 25 (5), p. 523-527 (2003)
- 11) 佐藤俊一, 山崎睦夫, 小原 實: 光音響法による医用モニタリング, 診断技術, 光学, 30 (10), 658-662, 2001
- 12) Hao F Zhang, Konstantin Maslov, George Stoica Lihong V Wang, Functional

- photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging *Nature Biotechnol.* 24, 848–51 (2006)
- 13) Wang, X., Pang, Y., Ku, G., Xie, X., Stoica, G., and Wang, L. V., Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain, *Nat. Biotechnol.* 21, 803, 2003
  - 14) 加藤寛史, 佐藤俊一, 川内聡子, 藤岡直子, 石原美弥, 菊池 眞, 芦田 廣, 荒井恒憲. 模擬組織中の腫瘍集積性薬剤に由来する光音響信号の計測, *日本レーザー医学会誌*, Vol. 25, No. 1, pp. 15–21 (2004)
  - 15) Sato S., Yamazaki M., Saitoh D., Tsuda H., Okada Y., Obara M., Ashida H., Photoacoustic diagnosis of burns in rats., *J. Trauma.* 59 (6): 1450–56, 2005
  - 16) Yamazaki M., Sato S., Ashida H., Saito D., Okada Y., Obara M., Measurement of burn depths in rats using multiwavelength photoacoustic depth profiling, *J. Biomed. Opt.* 10 (6): 064011, 2005
  - 17) Yamazaki M., Sato S., Saitoh D., Okada Y., Ashida H., Obara M., Photoacoustic monitoring of neovascularities in grafted skin, *Lasers Surg. Med.* 38 (3): 235–9, 2006
  - 18) 石原美弥他: 軟骨再生医療の評価に用いる光音響法の開発, *レーザー医学会誌*, 26 (1): 53–59, 2005
  - 19) 石原美弥他: 軟骨再生医療のための光音響法を用いた粘弾性評価システムの開発, *レーザー研究*, 32 (10): 640–644, 2004
  - 20) M.Ishihara et al.: "Viscoelastic characterization of bio
  - 21) Ishihara, M., Sato, M., Sato, S., Kikuchi, T., Ishihara, M., Mochida, J., Fujikawa, K., Kikuchi, M. : Applicability of photoacoustic measurement for biomechanical characterization. From in vitro engineered tissue characterization to in vivo diagnosis., *Proceedings of SPIE*, 5319, p. 11–14 (2004)
  - 22) M. 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–p.643909–4, 2007
  - 23) Ishihara, M., Sato, M., Ishihara, M., Mochida, J., and Kikuchi, M. : "Multifunctional evaluation of tissue engineered cartilage using nano-pulsed light for validation of regenerative medicine", *IFMBE Proceedings WC 2006*, 14, pp. 3187 (2006)
  - 24) Ishihara Miya, Sato Masato, Kaneshiro Nagatoshi, Mitani Genya, Sato Shunichi, Ishihara Masayuki, Mochida Joji, Kikuchi Makoto : "Development of a noninvasive multifunctional measurement method using nanosecond pulsed laser for evaluation of regenerative medicine for articular cartilage.", *Proceedings of SPIE*, 6084, 60840V–1–p. 60840V–4, 2006
  - 25) Ishihara Miya, Sato Masato, Kaneshiro Nagatoshi, Mitani Genya, Sato Shunichi, Mochida Joji, Kikuchi Makoto : "Development of Diagnostic System for Osteoarthritis Using the Photoacoustic Measurement Method.", *Lasers in Surgery & Medicine*, 38, 249–255, 2006
  - 26) 石原美弥, 菊池 眞, 佐藤正人, 金城永俊, 三谷玄弥, 長井敏洋, 持田譲治: 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, p. 7-10, 2006

- 27) Sato, M., Asazuma, T., Ishihara, M., Kikuchi, T., Masuoka, K., Ichimura, S., Kikuchi, M., Kurita, A., Fujikawa, K., 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.*, 64, pp. 248-56 (2003)
- 28) Sato, M., Asazuma, T., Ishihara, M., Ishihara, M., Kikuchi, T., Kikuchi, M., and Fujikawa, K : "An experimental study of the regeneration of the Intercertebral disc with and allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method, *Spine* 28, pp. 548-53 (2003)
- 29) Masuoka K., Asazuma T., Ishihara M., Sato M., Hattori H., Ishihara M., Yoshihara Y., Matsui T., Takase B., Kikuchi M., Nemoto K., Tissue engineering of artioular cartilage using an allograft of outlured chondrocytes in membrane-sealed atelocollagen honey comb-shaped scaffold (ACHMS-scaffold) , *Journal of biomedical materials reseach, Part B, Applied Biomaterials*, 75 (1) , pp. 177-184 (2005)
- 30) Sato, M., Kikuchi, M., Ishihara, M., Ishihara, M., Asazuma, T., Kikuchi, T., Masuoka, K., Hattori, H., Fujikawa, K., 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.* 41, pp. 365-71 (2003).
- 31) Burgeson RE, and Hollister DW : "Collagen heterogeneity in human cartilage : identification of several new collagen chains" , *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87 (4) , pp. 1124-31 (1979)
- 32) Shinmei, M., Miyauchi, S., Machida, A., and Miyazaki, K : "Quantitation of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in pathologic joint fluid" , *Arthritis Rheum.* 35, pp. 1304 (1992)
- 33) Ishihara, M., Sato, M., Sato, S., Kikuchi, T., Mochida, J., Kikuchi, M., Usefulness of photoacoustic measurements for evaluation of biomechanical properties of tissue-engineered cartilage, *Tissue Engineering*, 11 (7-8) , pp. 1234-43 (2005)
- 34) 石原美弥, 佐藤正人, 三谷玄弥, 長井敏洋, 杳名寿治, 持田譲治, 菊池 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 C*, in print, 2007
- 35) Ishihara M., Sato M., Mitani G., Kaneshiro N., Nagai T., Kutsuna T., 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 : p. 643909-1-643909-4, 2007

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

Regenerative  
Medicine

創立80周年記念出版

(創立1927年)

コロナ社

## 再生医療の基盤技術としての 計測・画像工学

### 8.1 はじめに

近年、組織工学的手法を駆使して消失、または機能不全に陥った生体組織や臓器を修復、再建する再生医療への期待が高まっている。再生医療を実現させるためには、未分化細胞の採取とその効率的増殖、組織・臓器への分化誘導などの基盤である発生生物学と細胞生物学のほかに、安定かつ自在に組織形成を制御できる技術を確立する種々の工学技術が必要になる。それらの多くは、遺伝子、細胞、組織に関連した生物工学の範囲にあるが、そのほかに見落としてならない重要な工学要素として、再生した細胞・組織の形態・機能情報を非侵襲・経時的かつ定量的に計測できる工学技術がある。さらには、再生した組織の異常な分化、増殖や感染などの情報も計測して、その結果を臨床医に直感的にわかりやすい画像情報として描出することが望まれる。そのような計測・画像技術が確立されてこそ、初めて再生医療の質の担保（バリデーション）が確立することになり、同時に安全性が確保される。再生医療の基盤技術としての計測・画像工学は従来あまり注目されてこなかったが、じつは再生医療を実現させるためにはきわめて重要な役割を担っている。

再生医療に関心を集める以前から、生体組織や臓器を計測、あるいは画像診断する技術は多く開発されており、超音波、X線CT、MRI等の画像診断技術、さらにPET、SPECTなどの核医学診断装置が開発されてきた。また、最近では生体内部の分子レベルの挙動を実時間で描出する分子イメージングにまで進化しつつある。ただし、それらの多くは再生組織の計測、監視を目的にして開発された計測技術ではないので、再生医療のバリデーションに適切に応えられるものは意外に少ない。本章では、再生医療に求められる計測・画像工学とは何か、それを実現するための主要な技術について取り上げることにする。

### 8.2 再生医療におけるバリデーションの必要性と意義

計測・画像技術は再生医療を具現化するための基盤技術として、機能評価やバリデーション