

伝送効率が得られた。

次に、臨床応用を考えた場合、曲げも重要なファクターとなる。今回使用したコア径 1000 $\mu\text{m}$  のファイバーは曲げにくい、かつ曲げると折れてしまった。コア径 400~800 $\mu\text{m}$  のファイバーは、使用上特に問題もなく、曲げ損失(曲げることに  
 より光が漏れてしまうこと)もなかった。

以上からマルチモード石英ガラスファイバー

(High OH; 350-1200nm で 0.48NA、コア径 400 $\mu\text{m}$ 、長さ 2m) を選択した。



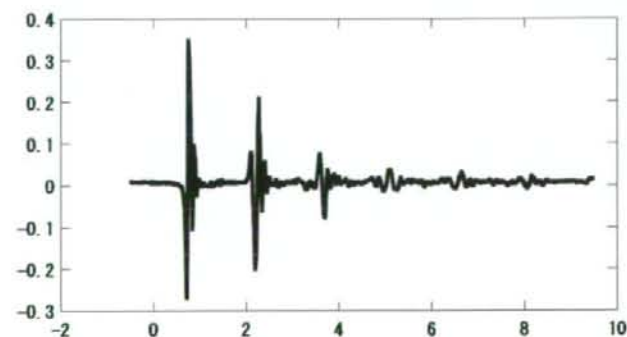
使用する光ファイバーの曲げの様子

(2) 受信側のシステムについて  
 使用したオシロスコープの特性を比較して表に示す。

オシロスコープ比較表

比較項目	TDS3054B 型	DSO8104A+DSO8004-4000
メーカー	Tektronix	Agilent Technologies
帯域幅	500MHz	1GHz
チャンネル数	4	4
サンプリングレート	5G サンプル/s	4G サンプル/s
データ取り込み数	500	400,000 (最大)
垂直分解能	9 ビット	8 ビット, $\geq 12$ ビット
垂直感度 (div)	1mV-10V	1mV-5V
寸法 (mm)	375x149x176	437x216x440
重量 (kg)	3.2	13.9

次に各々のオシロスコープで実際に測定した光音響信号の波形例を示す。



TDS3054B 型での測定例



DSO8104A+DSO8004-4000 での測定例

サンプリングの分解能の違いが、明確に波形の違いとなっている。今回の我々のシステムは、波形のピーク値から力学特性を算出する方法であるので、波形のピークが正確に抽出できる必要がある。

すなわち、波形の各ピーク ( $I_{Pi}$ ) 値を利用して、次式から力学特性値である  $\tau$  を算出するので、ピーク値である ( $I_{Pi}, t_{Pi}$ ) の精度が  $\tau$  算出の精度を決める 1 つの要因になる。

$$I_{Pi} = k \times R^{(t-t_{Pi})} \times \exp(-t_{Pi}/\tau)$$

上記の 2 つの測定した波形からピーク値を抽出するとは、以下の図のような状況と説明できる。

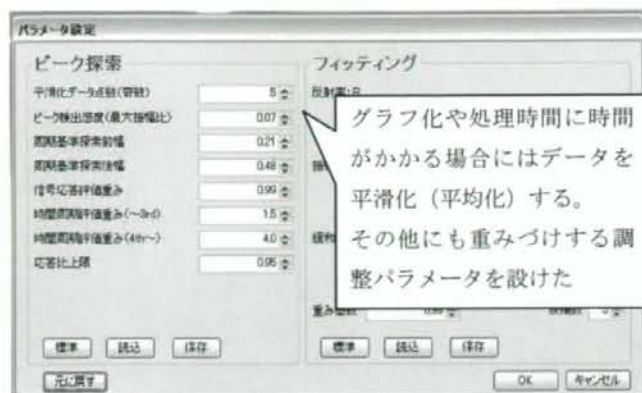


TDS3054B 型      DSO8104A+DSO8004

上図の●はサンプリングポイントである。

図から、TDS3054B 型では正確なピークが抽出できないことがわかる。つまり、力学特性値の精度を上げるためには、DSO8104A MegaZoom ロング・メモリ内蔵 Infiniium オシロスコープ 1GHz 帯域、4 チャンネルオシロスコープにオプションとして DS08004-4000 4M/ch メモリ拡張を選択する必要がある。

次に、選択したオシロスコープで獲得したデータ処理について検討した結果を報告する。サンプリングデータ数が、400,000 点であるので、データ処理時間に過大な時間がかかり、グラフ化も容易ではない。そこで、下記のようなプログラムを作成して、調整パラメータを設けた。



開発したプログラムの調整パラメータを設定する画面

以上から、受信信号のフレキシブルな処理及び解析が可能となった。現況は、上記のように調整パラメータによる受信信号の処理にとどまっているが、臨床使用時には診断結果をわかりやすく表示するための画面表示が必要である。具体的には、観測信号から力学特性を算出するための自動化プログラムの作成、算出された力学特性値と、関節軟骨の変性度を関連づけて、カラーバーなどで変性度を視覚的に理解するような表示画面の作成が必要である。このためには、関節軟骨での測定データを集積して統計的な解析も必要と考えている。

#### E. 結論

光音響システムにおいて、光ファイバーと受信側のシステムを最適化できた。

## 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

分担研究者	杵名 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 譲治	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。

#### 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。光源は市販の第3高調波QスイッチNd:YAGレーザー（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1kgの4週齢日本白色家兎（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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin (Gibco)、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fungizone (Gibco)、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ascorbic acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)にて懸濁し、500 $\text{cm}^2$  スクエアディッシュに  $1 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$  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/ $\text{cm}^2$ 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin (Gibco)、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fungizone (Gibco)、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{m}$  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。巡回培養条件では、巡回振盪器 (TAITEC 社製 70rpm、巡回半径 25mm) 上で 5 週間培養した。

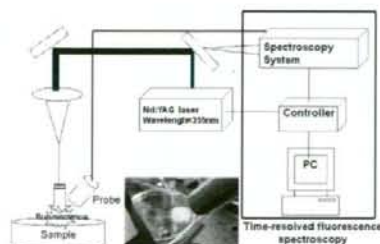


図 1

#### 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ブラニン-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. 組織工学的軟骨内眼所見

組織工学的軟骨は初期静置培養 1 週後培養液内では鋳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）巡回培養、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鋳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）厚みは巡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。厚みの増大速度は巡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）

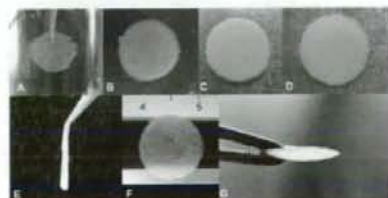


図 2

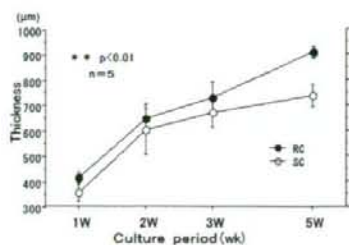


図 3

## 2. 組織学的評価

静置培養群、旋回培養群ともにサフラニン-O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、旋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、旋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旋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)

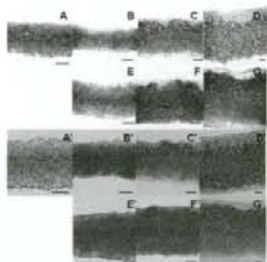


図 4

## 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。旋回培養群 (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-O、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)

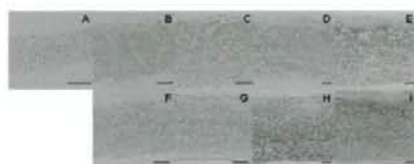


図 5

## 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旋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、旋回培養群では旋回培養群では培養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)

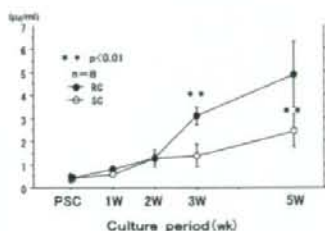


図6

### 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)

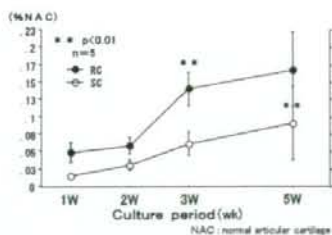


図7

### 6. 時間分解自家蛍光スペクトル分析

#### ①ピーク波長

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の二峰性で幅広いスペクトルを示した。作製した組織工学的軟骨(巡回培養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い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。一方巡回培養群では培養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)培養5週では巡回培養群のピーク波長は静置培養群と比較して正常関節軟骨のそれに近似する値を示した。

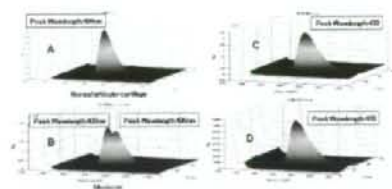


図8



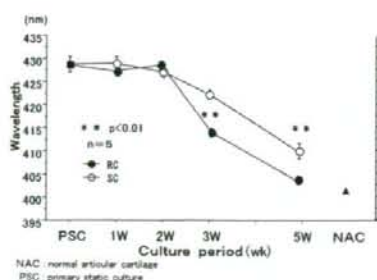


図 9

②半値幅

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)

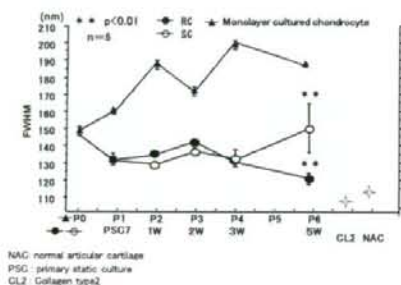


図 1 0

③減衰時間

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。(表 1) 培養法、培養週数での各波長の減衰時間は静置培養、旋回培養群ともに初期静置培養 7 日 (PSC7) は各波長で約 10ns、培養 1 週では両群ともに 360、380nm の減衰時間が短縮した。培養 2 週では両群ともに約 13ns に延長し、培養 3 週で 402nm の減衰時間のみが他の波長の減衰時間と比較して延長する正常関節軟骨と近似した減衰時間を示し、旋回培養 3 週の減衰時間が最も正常軟骨の減衰時間に近似した。(図 11) 380、402、430、450nm の 4 波長を抜粋し、減衰時間の変化をみると、380nm の減衰時間は両群ともに培養 1 週で短縮、2 週で延長、3 週以降は週数を重ねるに従い短縮した。波長 430、450nm の減衰時間は 2 週から 3 週にかけて短縮するというほぼ近似した変動を示した。波長 402nm の減衰時間は両群ともに培養 2 週で延長し、3 週以降もそれを維持した。(図 12)

Sample	Peak Emission (nm)	Time Decay T1 (ns)	Time Decay T2 (ns)
Normal Articular Cartilage	402	0.429 ± 0.038	7.976 ± 0.12
Chondrocyte (JMP)	436	6.791 ± 0.46	7.549 ± 0.15
Collagen Type1	420	0.900 ± 0.10	5.9 ± 0.29
Collagen Type2	405	4.800 ± 0.07	7.514 ± 0.008
PSC/day/Plate	428	4.413 ± 0.08	7.516 ± 0.004
BC5W/Plate	402	0.429 ± 0.03	8.720 ± 0.071
SC5W/Plate	415	8.096 ± 0.21	7.600 ± 0.025

表 1

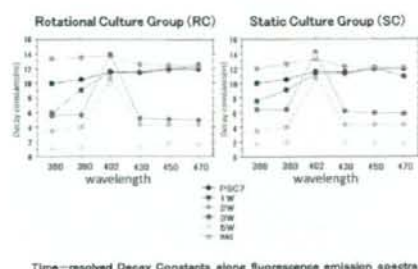


図 1 1

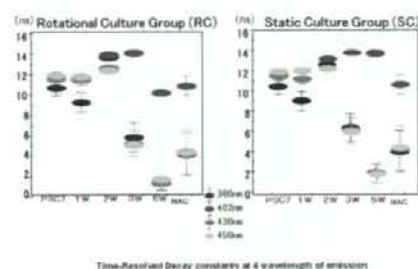


図 1 2

#### 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-0、トルイジンプルー、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してみると、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思われる。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

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 13) 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。また同じコラーゲン Type でも由来組織によってピーク波長、減衰時間が異なる。例として同じコラーゲン Type I でも bovine Achilles tendon 由来のもの (peak380nm, decay time $5.2 \pm 0.2$ ns) と calf skin 由来のもの (peak420nm, decay time $1.05 \pm 0.1$ ns) ではピーク波長も減衰時間も大きく異なる。今回ピーク波長の分析で培養週数を重ねるに従いその過程でピーク波長が短波長側へ移行することが確認されたが、ピーク波長の変動のみで組織性状を判断しようとする際に培養過程では細胞の分

化の方向性（軟骨分化あるいは骨分化かなど）を判断できない。そこで各波長における減衰時間を計測することによりリアルタイムに詳細な組織性状分析を行うことが可能となる。本実験ではピーク波長の変動は培養 3 週で初めて短波長側への移行が確認されたが、各波長の減衰時間を分析すると、培養 2 週の時点で native コラーゲン Type II のピーク波長である 402nm の減衰時間の延長を確認することができる。これは本組織の細胞の軟骨分化が進み、コラーゲン Type II を産生していることを示唆すると考えられ、ピーク波長の分析より 1 週早期に細胞の軟骨分化を確認できた (図 14)。今後は様々な type のコラーゲンなどのピーク波長や減衰時間が判明すれば、再生組織の分化の状態についても詳細に把握することが可能となると考えている。このように本計測にて得られるスペクトルにはその他の Type の異なった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蛍光の減衰時間の分析を進めている。

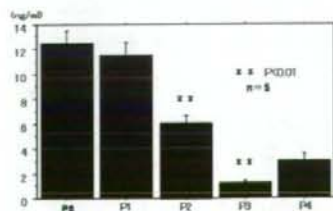


図 13

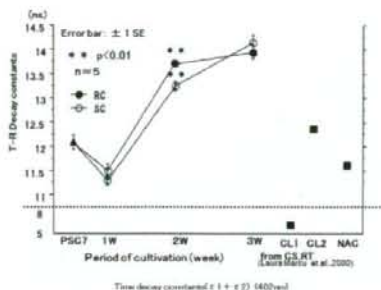


図 14

## 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

特記すべきことなし

## G. 研究発表

- 1 杓名寿治 佐藤正人 石原美弥 古川克子 長井敏洋 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  
平成19年10月26日  
第22回日本整形外科学会基礎学術集会

- 2 杓名寿治 佐藤正人 石原美弥 古川克子 長井敏洋 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  
平成19年12月7日  
第34回日本臨床バイオメカニクス学会

- 3 杓名寿治 佐藤正人 石原美弥 古川克子 長井敏洋 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  
平成20年10月23日  
第23回日本整形外科学会基礎学術集会

- 4 杓名寿治 佐藤正人 石原美弥 古川克子 長井敏洋 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  
平成21年3月6日  
第8回日本再生医療学会総会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特記すべきことなし

## Measurement of the diffusion in articular cartilage using a fluorescence correlation spectroscopy (FCS).

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

### ABSTRACT:

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) provides information about translational diffusion properties (number and size of molecule) of fluorescent molecules in tiny detection volume of homogeneous solution at the single-molecule level. On the other hand, cartilage tissue lacks blood vessels in normal states, and is thus permitting the free exchange of nutrients and gases by means of diffusion; therefore, diffusion is the key factor to maintaining the original functions and metabolism of the chondrocytes. The abundant extracellular matrix (ECM) of the cartilage has to be maintained by a limited number of chondrocytes. ECM in cartilaginous tissue has an important role of physiological activities in the regulation of chondrocyte function, the intimate communications between cells and the alteration of metabolism.

In this study, FCS was used to measure diffusion behavior of albumin, the major protein of intra-articular space, using normal and degenerated cartilage. Before measurement of albumin, preliminary investigation of fluorescence dyes including Alexa 488, Rhodamine 6G and Rhodamine 123 was conducted to evaluate their properties.

The results indicate that it is possible to observe the diffusion behavior of fluorescence-dyed albumin with FCS in both normal and chemically degenerated cartilage. This work firstly demonstrated the capability of FCS for direct measurement diffusion behavior of ECM in the cartilage tissue, which may be a potential and useful evaluation tool. If the diffusion character of ECM is clarified using FCS evaluation, FCS will be applied as an early diagnosis method of osteoarthritis which is accompanied by increased abnormalities of ECM components and also as an evaluation tool of bio-engineered artificial cartilage for autologous chondrocyte implantation.

#### A. 研究目的

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a method based on fluctuation analysis of fluorescence intensity to detect and characterize fluorophores at the single molecular level in solution. FCS allows measurement of two important physical parameters for bioscience: the average number of molecules in detection volume and the translational diffusion time of the molecules through the open volume of detection.

In general, cartilage tissue, avascular tissue, exchanges and transports the nutrients, gases, and metabolites by diffusion of continuous movements instead of blood vessel supply. Therefore, diffusion in cartilage of normal state is the radical factor to assure the physiobiological natures of the chondrocytes. The abundant extracellular matrix (ECM) of the cartilage is secreted by chondrocytes. Cartilage tissue principally consists of ECM and small number of chondrocytes. Although ECM provides environment of molecule exchange for chondrocyte survival, almost none of studies about the diffusion behavior in the ECM of cartilage is performed in the past. Pathologic changes of ECM cause

osteoarthritis (OA), which alter not only physical metabolism of chondrocyte but also normal molecular exchange of cartilage.

In this study, we conducted FCS measurement to evaluate albumin movement by the means of diffusion in cartilage. Since albumin is the major protein of synovial fluid, the tracing of albumin protein movement may reveal the difference between normal and abnormal state of cartilage.

The purpose of this study is to evaluate the feasibility of FCS measurement of diffusion in normal and chemically degenerated cartilage in relation to albumin, representative protein. To select proper fluorescent dye before application to cartilage tissue, the physical parameters of several fluorescent dyes were tested and documented. We chose the degeneration model of cartilage by chemical treatment for FCS evaluation, which denaturation of ECM in cartilage tissue may be expected.

#### B. 研究方法

##### *Sample Preparation*

Fresh swine knees (n=5) were obtained at a local slaughterhouse of Kanagawa Meat Center (Frieden Co.,

Kanagawa, Japan). Cartilage tissue of femur was prepared within 4 hours as follows. The delivered knee joints were then cut out into cylindrical cartilage plugs (5mm in diameter and 1mm deep, n=240) from patellar groove with a biopsy punch (Kai Industries Co., Seki City, Japan) and disposable scalpels (Akiyama Co., Tokyo, Japan). The porcine cartilage specimens were initially incubated under physiological condition (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in physiological saline (Otsuka Pharmaceutical Factory, Tokushima, Japan)

#### *Treatment for degenerated cartilage*

The enzyme addition was used for experimental degradation of the tissue matrix using phosphate-buffered saline (PBS; Wako Pure Chemical Co., Osakam Japan) containing 0.1% trypsin solution (1mg/ml; Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) to degrade primarily proteoglycans. The treatment time was varied up to 24 hours to control the extent of degeneration.

To stop the trypsin reaction, an equal volume of fetal bovine serum (FBS; Invitrogen Co.) was added. Since samples were digested in trypsin solution and induced biochemical changes, we performed

FCS measurement with FCS probes which demonstrated as below.

At the same time, the samples were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and embedded in paraffin, and 4-mm-thick sections were prepared. Histological staining was performed with hematoxylin and eosin (H&E) dye, toluidine blue and safranin O to visualize the degree of ECM degeneration within the specimens.

#### *FCS Measurement and Analysis*

FCS was performed with a LSM510-ConfoCor 2 system (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), as described elsewhere. Various concentrations of the fluorescent dyes as below were incubated with purified PBS at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air over 30minutes. Aliquots (100 µl) were applied on a on Lab-Tek chambered coverglass (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) with eight wells and <140-µm-thick cover glass on the bottom. To prevent nonspecific adsorption of proteins on the surface of the coverglass, position of laser focus was reset focus distance moving the focus up to 200 µm from the bottom surface of the carrier wells.

To fit and analyze the data, each acquired correlation data set was fitted to the FCS autocorrelation



function supplied by Zeiss with a fitting program (FCS Access Fit software, EVOTEC BioSystems GmbH, Hamburg, Germany), or exported to Igor Pro (IGOR Pro 5.05a; Wavemetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA).

Cartilage specimens were placed on Lab-Tek chambered coverglass with eight wells and 100  $\mu$ l of FCS probe-solutions were applied over the samples. To prevent nonspecific adsorption of proteins on the surface of the coverglass, position of laser focus was reset from the bottom surface of the carrier wells. Pinhole diameter and position concerned with focus distance was confirmed by monitoring the degree of scattering of laser. Prominent change of these scattering occur when laser focus passes the changing point of detecting areas (borders) such as between gas and coverglass, coverglass and solvents, and solvent and cartilage samples. We determined, detecting areas, the exact position of cartilage plugs 20 $\mu$ m deep from the surface of cartilage with scatter monitoring.

#### *Development of FCS probe (fluorescent dye)*

To develop properly applicable fluorescent dye (FCS probe) in cartilage tissue, commercially

available molecular probes were obtained including Rhodamine 123 (Rh123, molecular weight (MW) 380.83, ; Molecular probes<sup>®</sup>, Eugene, OR, USA), Rhodamine 6G (Rh6G, MW 479.02 ; Molecular probes<sup>®</sup>), Alexa Fluor 488 hydrazide (Alexa-hydrazide, MW 570.48, ; Molecular probes<sup>®</sup>). Firstly, optimal concentrations of the fluorescent dyes in PBS (100  $\mu$ l) were measured and analyzed, and then applicable concentration of each dyes solution (100  $\mu$ l) mixed with 100  $\mu$ l of hyaluronic acid sodium (HA) were tested. Two different molecular size of HA with an average molecular weight (MW) of  $80 \times 10^4$  (Artz<sup>TM</sup>, Seikagaku Co., Tokyo, Japan) and of  $200 \times 10^4$  (Suvenly<sup>TM</sup>, Chugai Pharmaceutical Co, Tokyo, Japan) were used in this experiment.

In addition to these measurements, albumin-conjugated fluorescent dye was adopted to evaluate the diffusion behavior of albumin protein. Alexa Fluor 488 conjugated (Alexa-albumin, albumin from bovine serum, MW approximately 66000, ; Molecular probes<sup>®</sup>) was tested and analyzed with PBS, HAs and cartilage samples.

#### C. 研究結果

### *Degeneration Model of Articular Cartilage*

Fresh swine knees (n=5) were obtained at a local slaughterhouse of Kanagawa Meat Center (Frieden Co., Kanagawa, Japan). Cartilage tissue of femur was prepared within 4 hours as follows. The delivered knee joints were then cut out into cylindrical cartilage plugs (5mm in diameter and 1mm deep, n=240) from patellar groove with a biopsy punch (Kai Industries Co., Seki City, Japan) and disposable scalpels (Akiyama Co., Tokyo, Japan). The porcine cartilage specimens were initially incubated under physiological condition (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in physiological saline (Otsuka Pharmaceutical Factory, Tokushima, Japan). **Figure 1** shows the histological appearance of trypsin-treated cartilage samples. As results of porcine articular cartilage with H&E, toluidine blue and safranin O staining demonstrated, normal cartilage tissue became changed into degenerated tissue and altered their staining patterns after enzyme treatment started, which can be explained by traits of toluidine blue and safranin O staining over time. At the starting point of enzyme digestion, cartilage samples showed entirely and uniformly stained with toluidine blue and safranin O,

however, degeneration degree of the specimens showed larger loss of these staining with a time showing an extensive loss of proteoglycans in the tissue.

After seven hours from the digestion, no staining was present in the samples with toluidine blue and safranin O stains but only H&E staining. Therefore, seven-hours-treated cartilage plugs considered as degenerated cartilage models in this study. When six hours passed, the center regions of digested samples still have a small portion of intensive staining with safranin O and metachromatic staining with toluidine blue demonstrating that normal ECM constituents are still present, compared with samples which treated over seven hours and totally disappeared ECM protein components. The degenerated cartilage and untreated normal cartilage samples were used in FCS measurements.

### *FCS Measurements*

The all diffusion motions (data of diffusion time and diffusion coefficient) of the fluorescent dyes utilized in this research were detected by the FCS monitoring in the solvent of PBS. The optimal concentrations of the fluorescent dyes were different (data not shown)

which may result from their different chemical, physical and morphological properties. The diffusion coefficients of the fluorescent dyes is arranged in the order  $PBS > HA (MW; 80 \times 10^4) > HA (MW; 200 \times 10^4)$  (Figure 2).

The changes of diffusion coefficients have a relation with molecular weight of the dyes and fields of measurement. The larger molecular weight of fluorescent dyes showed the lower diffusion coefficients among their data. At the same time, the diffusion coefficients of HAs showed decrease with increasing their molecular weight.

The fluorescent dye which was validated in HAs and cartilage tissues was accepted to FCS probe, and then selected to apply to the next tests. Since the measurable distance of FCS equipment with Alexa dyes was greater than Rhodamine dyes (data not shown), we selected Alexa Fluor 488 as a FCS probe.

FCS measurement tests were performed with Alexa-albumin to trace the diffusion motion of albumin in either of normal or degenerated cartilage. As shown in Figure 3., FCS data demonstrated that there were intimate correlation between the measurable points (depths from the superficial surface) and enzyme-treatment times. Increment of these points has a relation to

prolonging the reaction times of trypsin treatment. The FCS data was validated at the range of  $120\mu m$  when digestion conducted for nine hours, which showed that FCS monitored the certain permeation of FCS probe at the level of this depth. These points of focus distance were defined as maximum measurable depths (MMD). When focus moved over these ranges, the correlation curves were ineffective and indescribable indicating that no movements of fluorophores were detected in the testing field.

As a result of MMD detection, MMD was chosen at  $20\mu m$  deep for cartilage tissue in the present study.

FCS measurement data of FCS probe using Alexa-albumin are summarized in Figure 4., which explains the diffusion behaviors of albumin in different circumstances.

The diffusion coefficients of Alexa-albumin in PBS, trypsin-treated cartilage for 24-hours (Trypsin-24), HA, trypsin-treated cartilage for 9-hours (Trypsin-9), trypsin-treated cartilage for 6-hours (Trypsin-6) and trypsin-treated cartilage for 3-hours (Trypsin-3) were  $4.83 \times 10^{-11}$ ,  $3.64 \times 10^{-11}$ ,  $3.38 \times 10^{-11}$ ,  $2.30 \times 10^{-11}$ ,  $1.15 \times 10^{-11}$  and  $1.06 \times 10^{-11}$ . In addition, non-treated normal cartilage was  $1.97 \times 10^{-11}$ , which was ranges of between Trypsin-6 and

Trypsin-9.

An increase of diffusion coefficients showed greater according to the intensiveness of extended times of chemical digestion.

#### D. 考察

FCS is a sensitive method for determining the molecular size of proteins or complexes carrying fluorescent tags, measuring the physicochemical properties, such as concentration and diffusion constant, of bio-molecules in a small volume (femto liter) of complex mixtures with the aid of a confocal microscope. It is principally possible to detect a single fluorescent molecule movement in solutions.

Therefore, recent researches using the FCS measurement regarding material transportation and interrelationship among the molecules are now focusing on the level of single living cell, even the targets are ultra-micro level of intracellular space of small organelles. Information from FCS monitoring is expressed by (auto) correlation curve, and then the diffusion behaviors are analyzed to compare.

Osteoarthritis (OA) is caused by proteoglycans, degeneration of the collagen network, and an increase in fluid content. Experimental

treatments using specific enzymes such as trypsin can simulate these changes. In present study, trypsin treatment was used for cartilage degeneration as an OA model.

One of important cartilage proteoglycans is HA (glucuronic acid and N-acetyl-glucosamine). This molecule is one of the major components in synovial Fluid. HA molecules are also present in cartilage matrix as the backbone structure in proteoglycan aggregates. Since HA plays a major role as an organizer of the ECM, we selected HA as a test solution for FCS probe for cartilage tissue in addition to PBS as a solvent.

In present study, we tried to measure diffusion properties in cartilage tissues using FCS method, before this steps proper FCS probe was necessary to trace the motion of albumin, and preliminary investigation of several fluorescence dyes was conducted to assess their properties.

The all diffusion characters of the fluorescent dyes of the present research were detected by the FCS equipment in the solvent of PBS and HAs. Rhodamine dyes showed unstable traits when applied to cartilage tissue, therefore, these dyes were abandoned, instead, more available and valid Alexa dyes were