

Modification of measurement methods for evaluation of tissue-engineered cartilage function and biochemical properties using nanosecond pulsed laser

Miya Ishihara^{a,b}, Masato Sato^b, Toshiharu Kutsuna^b, Masayuki Ishihara^c,
Joji Mochida^b, Makoto Kikuchi^a

^aDept. of Medical Engineering, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama, Japan 359-8513; ^bDept. of Orthopaedic Surgery, Tokai University School of Medicine, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, Japan 259-1193; ^cNational Defense Medical College Research Institute, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama, Japan 359-8513;

ABSTRACT

There is a demand in the field of regenerative medicine for measurement technology that enables determination of functions and components of engineered tissue. To meet this demand, we developed a method for extracellular matrix characterization using time-resolved autofluorescence spectroscopy, which enabled simultaneous measurements with mechanical properties using relaxation of laser-induced stress wave. In this study, in addition to time-resolved fluorescent spectroscopy, hyperspectral sensor, which enables to capture both spectral and spatial information, was used for evaluation of biochemical characterization of tissue-engineered cartilage. Hyperspectral imaging system provides spectral resolution of 1.2 nm and image rate of 100 images/sec. The imaging system consisted of the hyperspectral sensor, a scanner for x-y plane imaging, magnifying optics and Xenon lamp for transmissive lighting. Cellular imaging using the hyperspectral image system has been achieved by improvement in spatial resolution up to 9 micrometer. The spectroscopic cellular imaging could be observed using cultured chondrocytes as sample. At early stage of culture, the hyperspectral imaging offered information about cellular function associated with endogenous fluorescent biomolecules.

Keywords: regenerative medicine, tissue engineering, articular cartilage, fluorescence, hyperspectral, multispectral, tissue characterization, chondrocyte,

INTRODUCTION

1.1 Regenerative medicine of articular cartilage

There has been an increasing demand for development of technology that enables determination of the functions and components of engineered tissues in comparison to those of native tissues in order to establish reliable regenerative medicine, that is, the validation of regenerative medicine. The technology for validation should enable noninvasive evaluation of engineered tissues. It also requires that the validation of the repair process after transplantation and diagnosis of a disease before regenerative medicine is applied.

Regenerative medicine for articular cartilage, which is expected to be an effective therapy for osteochondral defect, osteoarthritis and rheumatism, is a very proactive clinical approach. Extracellular matrix of articular cartilage is responsible for the major functional properties of cartilage. Consequently, characterization of extracellular matrix should be performed for evaluation of regenerative medicine for articular cartilage.

Articular cartilage is composed of scattered chondrocytes embedded in an abundant extracellular matrix. The matrix is mainly composed of proteoglycans and type II collagen, which consists of endogenous biomolecules. Fluorescence measurement can provide information about endogenous fluorescent biomolecules. We have developed a laser-induced auto-fluorescent spectroscopy system using the same excitation laser pulse as that used for viscoelastic measurement

system for characterization of extracellular matrix, which has a possibility of simultaneous measurement together with the viscoelastic measurement system^{1,2}. We proved that the auto-fluorescent spectrum enables discrimination of type II and type I collagen based on the principle that endogenous biomolecules have their own auto-fluorescent features³.

1.2 Hyperspectral imaging

Hyperspectral imaging devices are common in remote sensing reconnaissance. It captures both spatial and spectral information in a single pixel⁴. Hyperspectral data sets are generally composed of over several hundreds continual spectral bands, whereas, multispectral data sets are usually composed of about 5 to 10 discrete bands of relatively large bandwidths (70-400 nm).

Hyperspectral imaging collects the same picture on many bands of the light spectrum to generate a "datacube" that can reveal objects and information that more limited scanners cannot pick up. Another advance of this form of imaging is that different elements leave unique spectral signatures behind in various bands of the spectrum. Using these specific signatures, it is possible to identify the materials that make up a scanned object. As the hyperspectral remote sensing combines imaging and spectroscopy in a single system, it often includes large data sets and require new processing methods.

The purpose of this study is to investigate the potential of the hyperspectral sensor technology for evaluation of effectiveness, validity and confirmation of regenerative medicine of articular cartilage.

MATERIALS AND METHOD

1.3 Hyperspectral imaging system

The hyperspectral imaging system is shown in Fig.1. The system mainly consisted of a hyperspectral sensor (AISA Eagle, Spectral Imaging Ltd.)⁵, a scanner, magnifying optics, Xenon light (MAX-302, Asahi Spectra Co., Ltd) for transmissive lighting and computer for control of image acquisition. The specification of hyperspectral sensor is summarized in Table 1. Relay lens, combination of lenses used to magnify the image obtained by the hyperspectral sensor. A scanner was set at 5.4 frames per second and the step-angle of 0.0375°.



Fig.1 Hyperspectral imaging system

Table 1 Hyperspectral sensor specification

Parameter	Performance
Spectral range	400-1000 nm
Spectral bands	512
Spatial pixels	1024
FOV	0.029° (0.51 mrad)

1.4 Sample target for hyperspectral image

(a) Transparent sheet for fundamental experiment

Transparent sheet printed with various color (blue, green, red et al.) by a printer, set resolution to 600 dpi (dots per inch) was used as sample, shown in Fig.2.

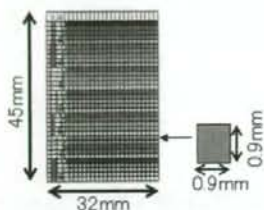


Fig.2 Imaging target for fundamental experiments using transparent sheet

(b) Cultured cells for actual cellular imaging

Articular cartilage separated from a knee joint obtained from a Japanese white rabbit weighing about 2.5 kg was digested for 4 hour in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.0125% (w/v) collagenase P and 0.05% actinase E. The digested tissue was passed through a cell strainer with a pore size of 40 μm . The cells were then seeded and cultured in DMEM-F12 supplemented with 10 % fetal bovine serum. The part of cultured cartilage cells (chondrocytes) dyed with CSFE (absorption peak at 496 nm and fluorescence peak at 516 nm), which was purchased from DOJINDO and used without further purification. CSFE is deacetylated into a fluorescein derivative in a living cell and binds covalently to the amino group of the cellular components.

For the hyperspectral measurements, the cells were cultured in a chamber slide (LAB-TEK) at least one day in an incubator with air containing 5% CO_2 at 37°C. Just before the measurement, the unstained chondrocytes were washed with PBS and sealed without drying by a cover glass. As for the CSFE stained chondrocytes, 1mg/ml CSFE in dimethyl sulfoxide was added and left for 30-60 minutes. The chondrocytes were then washed and sealed as in the preparation of the unstained cells.

RESULTS AND DISCUSSION

1.5 Fundamental experiments

This experiment was performed to ensure the improvement of spatial resolution and retaining inherent spectral resolution. Precise alignment using the magnifying optics including a pair of relay lens achieved that it could be identified individual printer's dot at the printed transparent sheet for each color in the case of 600 dpi (dots per inch), showing Fig.3. The obtained image had 100 pixels per 0.9-mm-square at the sheet. Thus, the spatial resolution was finally calculated to be approximately 0.9 micrometer.



Fig.3 Obtained hyperspectral image of the imaging target. The image is converted into gray scale.

Spectrum per pixel could be obtained. The obtained spectra could be explained as follows. The illuminating light was absorbed at the printed sheet, and the hyperspectral sensor detected the absorption for each color. The performance of the obtained image is summarized in Table 2.

Table 2 Performance of the hyperspectral image

Parameter	Performance	Comments
Spatial resolution	9 μm	Comparable microscopic image with x20 objective lens
Spectral resolution	1.2 nm	Inherent resolution
Homogeneous image area	3 mm x 3 mm	Improve by the scanner position

1.6 Cellular Experiments

Hyperspectral images could be obtained even though actual cultured cells were used as imaging targets. The CSFE-stained chondrocytes with monolayer culture are shown in Fig.4. Individual cell enable to be recognized without loss of the spatial resolution, as the size of chondrocytes are around 10-20 micrometer. The obtained image was comparable to fluorescence microscopic image with x20 objective lens. The obtained spectra reflected by the absorption and fluorescence of CSFE.



Fig.4 Obtained hyperspectral image of the CSFE-stained chondrocytes.

In the case of unstained chondrocytes with monolayer culture, the imaging enabled to be obtained as well as the CSFE-stained cells showing Fig.4. However, intrinsic fluorescent spectra, which contained autofluorescent features of endogenous fluorescent biomolecule such as NADH and collagen as pericellular matrix, were unable to be observed. On the other hand, the intrinsic spectra could be recognized in the case of multilayer culture.

CONCLUSION

Hyperspectral sensor is revealed to be useful for evaluation of regenerative medicine of articular cartilage. This technique has a potential not only in vitro cultivation, but also in vivo application. In the case of in vivo application, monitoring after transplantation of engineered tissue would be valuable.

ACKNOWLEDGMENTS

Development of the hyperspectral imaging system has been supported by Dr. Minoru Doshida and MS. Mamoru Iwasa (Electro-Optical Sensors Research Section Sensor Research Division, Electronic Systems Research Center, Technical Research & Development Institute, Ministry of Defense). The authors thank Ms. Saito, Mr. Bansaku, Ms. Tanikawa, Ms. Mayumi and Ms. Kitaguchi for their important contributions to the experiments. The authors also thank Laboratory Center, National Defense Medical College. This study was partially supported by NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization) and Health and Labour Sciences Research Grants for Comprehensive Research on Aging and Health.

.REFERENCES

- [1] Ishihara, M. et al., "Multifunctional evaluation of tissue engineered cartilage using nano-pulsed light for validation of regenerative medicine," IFMBE Proc. WC2006, 3187 (2005).
- [2] Ishihara, M. et al., "Development of a noninvasive multifunctional measurement method using nanosecond pulsed laser for evaluation of regenerative medicine for articular cartilage," Proc. SPIE 6084, 60840V (2006).
- [3] Ishihara, M. et al., "Usefulness and limitation of measurement methods for evaluation of tissue-engineered cartilage function and characterization using nanosecond pulsed laser," Proc. SPIE 6439, 643909 (2007).
- [4] D. Killinger, "Remote Sensing, Detecting Chemical, Biological, and Explosive Gents," <http://spie.org/x8602.xml>
- [5] <http://www.specim.fi/products/airborne-hyperspectral-systems/aisa-systems.html>

●別冊整形外科 No.53

〈変形性関節症 — 最近の知識〉

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 沓名寿治
三谷玄弥 菊地 真 持田讓治

南 江 堂

2008年₉₉

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 杵名寿治 三谷玄弥 菊地 眞 持田讓治**

[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期待されている（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 → 超音波法 (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. フローピング (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学 (Dept. of Orthop. Surg., Surgical Science, Tokai University, School of Medicine, Isehara) ; M. Ishihara (准教授) : 防衛医科大学校医工学 ; T. Kutsuna, G. Mitani : 東海大学外科学系整形外科学 ; M. Kikuchi (教授) : 防衛医科大学校医工学 ; J. Mochida (教授) : 東海大学外科学系整形外科学。

- width measurement ; an experimental study of the influence of radiographic procedure and joint positioning. *Br J Rheum* **35** : 761-766, 1996
- 6) Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S et al : Whole-organ magnetic resonance imaging score (WORMS) of the knee in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12** : 177-190, 2004
- 7) Akai M, Doi T, Fujino K et al : An outcome measure for Japanese people with knee osteoarthritis. *J Rheumatol* **32** : 1524-1532, 2005
- 8) Zanetti M, Bruder E, Romero J et al : Bone marrow edema pattern in osteoarthritic knees ; correlation between MR imaging and histologic findings. *Radiology* **215** : 835-840, 2000
- 9) Felson DT, Chaisson CE, Hill CL et al : The association of bone marrow lesions with pain and knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* **134** : 541-549, 2001
- 10) Felson DT, McLaughlin S, Goggins J et al : Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* **139** : 330-336, 2003
- 11) Martig S, Boisclair J, Konar M et al : MRI characteristics and histology of bone marrow lesions in dogs with experimentally induced osteoarthritis. *Vet Radiol Ultrasound* **48** : 105-112, 2007

* * *

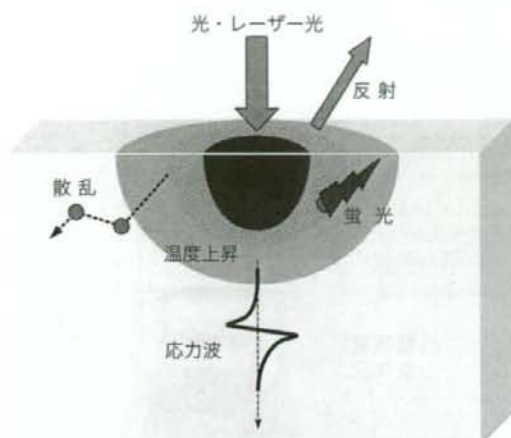


図1. 光と生体の相互作用

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最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250~355nmで設定し、この範囲のどの波長においても光音響信号の計測は可能であった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355nm, パルス幅5~6ns)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400nm)で導光し、光音響波の検出には圧電性高分子フィルムのポリフッ化ポリビニリデン共重合体[P(VdF/TrFE)]を用いたプローブを開発した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355nm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 μ J/mm²×30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 μ J/mm²×30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 μ J/mm²×1,500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

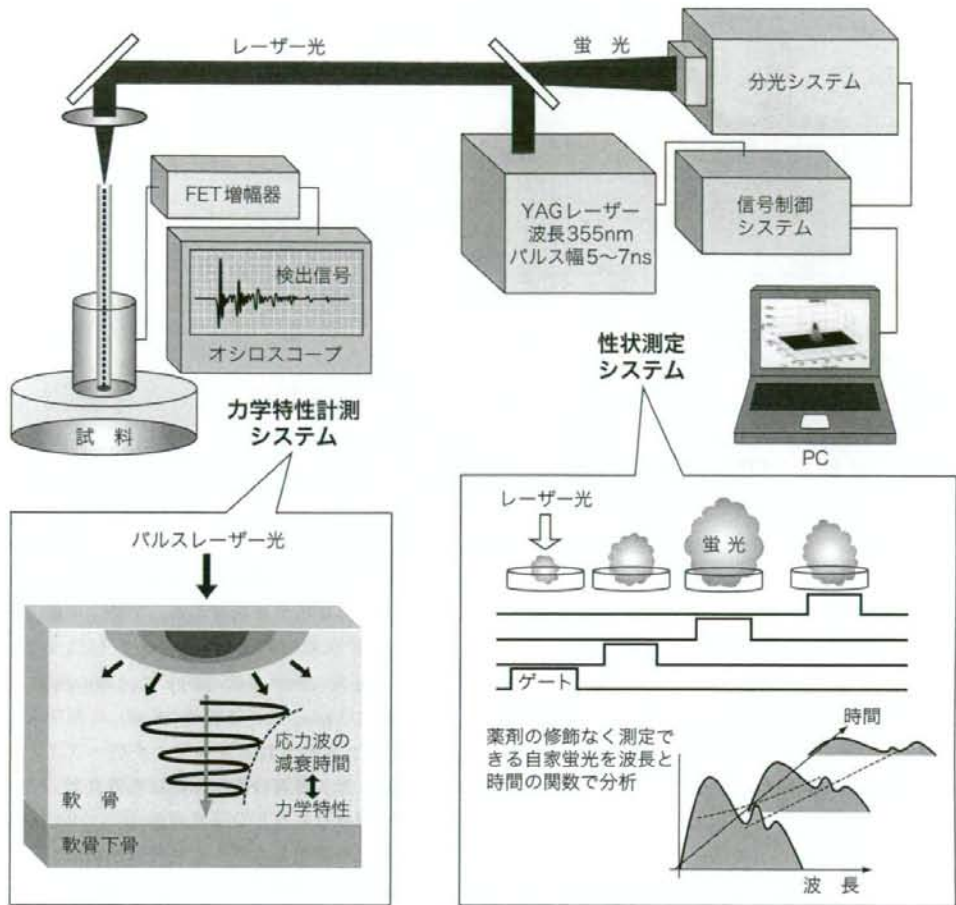


図2. 計測システム. 光音響原理に基づく光学特性計測法と時間分解自家蛍光スペクトル分析による性状評価法の同時計測

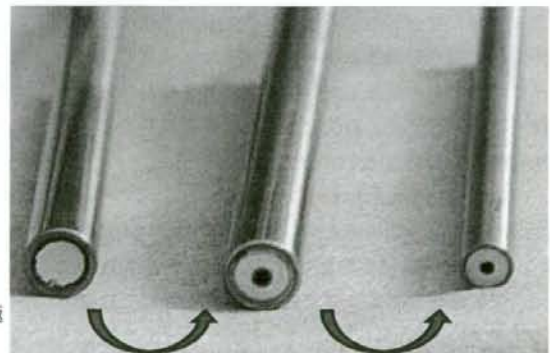
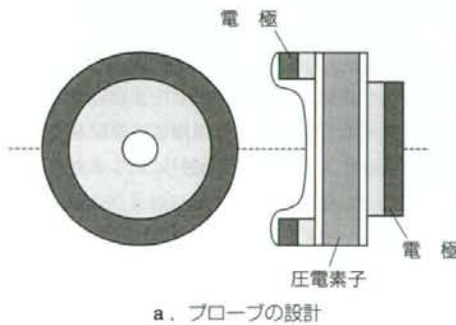


図3. プローブの開発

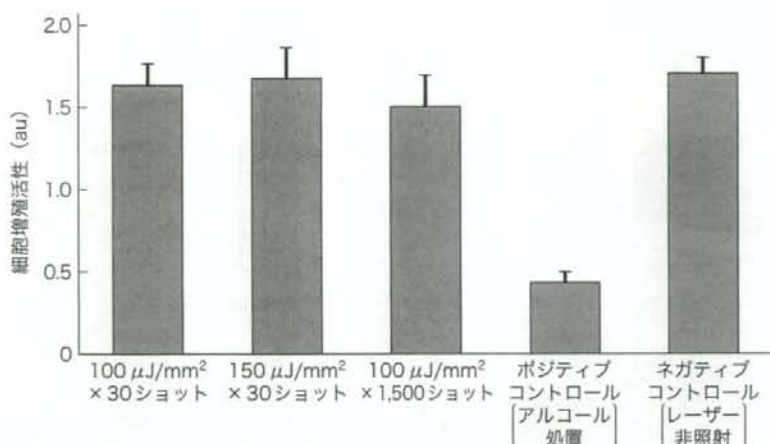
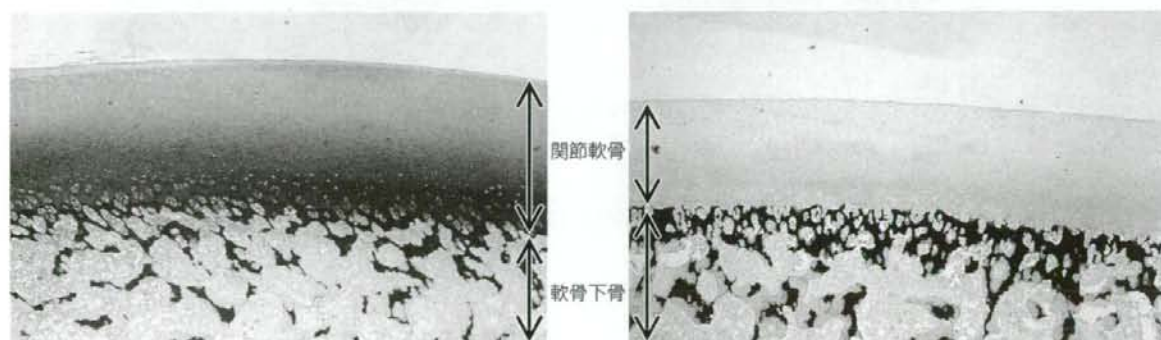
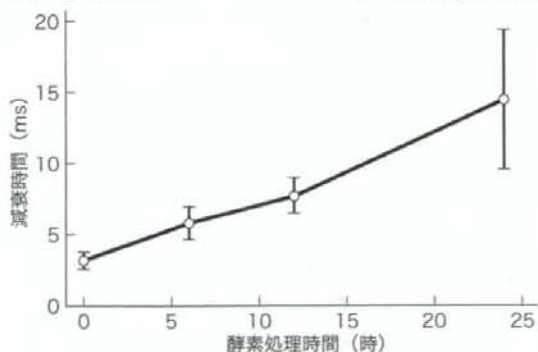


図4. レーザー強度 (単位面積当たりのエネルギー \times ショット数) の細胞増殖活性への影響 (文献 14 より引用改変)



a. 酵素処理前, トルイジンプール染色, 20 倍

b. 12 時間酵素処理後, トルイジンプール染色, 20 倍

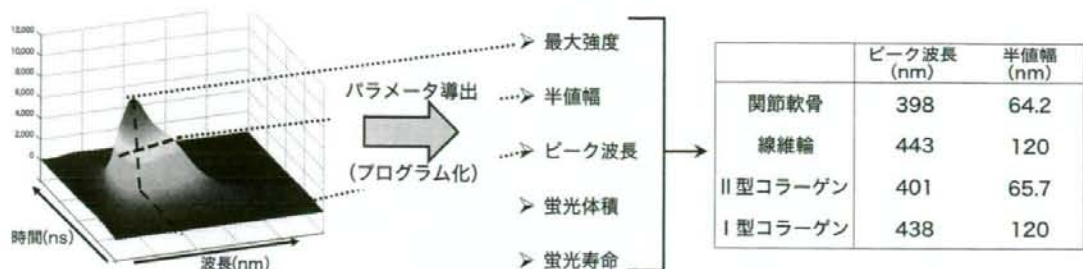


c. 酵素処理による緩和時間の変化

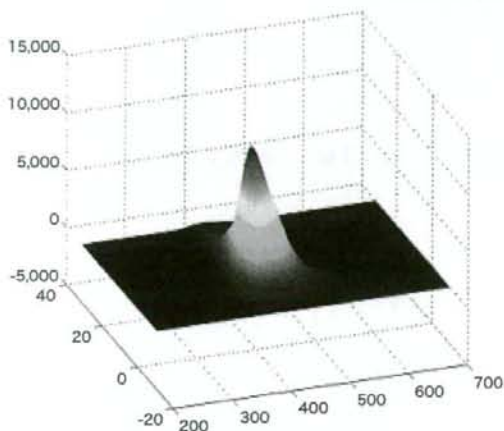
図5. 超音響法による軟骨変性に伴う力学特性変化の評価

コントロール添加群, 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

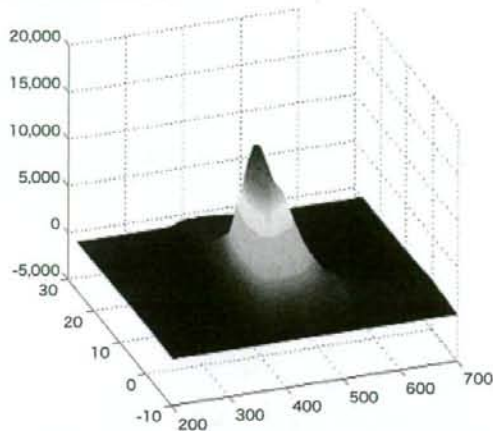
る. 細胞増殖活性試験には WST-8 アッセイ (キシタ化学社, 大阪市) を用いた. 96 Well プレート (Falcon 社, New Jersey) に播種した培養細胞に上記条件を適用し, 37°C , 5%



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、日本白色家兎の関節軟骨、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、非侵襲的な強度のパルスレーザーを用いて関節鏡視下に関節軟骨の力学特性と性状評価を同時に施行可能であることを示した。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) 非侵襲的なナノ秒パ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・バリデーションのための非侵襲的計測法. 生物工学会誌 **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

* * *

再生医療を光で評価する

石原美弥, 菊地眞

防衛医科大学校医用工学講座

〒359-8513 所沢市並木 3-2

Phone: (04)2995-1596, Fax: (04)2996-5199

Internet: kobako@ndmc.ac.jp

あらまし 再生医療で重要な役割を果たす工学技術の一つとして、用いる細胞・組織の機能が生来の細胞・組織と比較してどの程度で、所望の条件を満たしているかどうかを非侵襲的かつ経時的に評価する計測技術がある。我々は、形態情報だけでなく生理学的・生化学的な情報の取得が非侵襲的、経時的かつ選択的に可能で、かつ医療現場に優位に持ち込み、広く有効に活用出来る光技術に着目し、応力波の伝搬を利用する粘弾性計測法と、軟骨組織の自家蛍光を利用して細胞外マトリックスの性状を評価する方法を独自に開発した。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(再生医療の実用化を目指した再生評価技術開発)並びに厚生労働省科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)の助成を受け実施された。

キーワード 再生医療, 応力波, 自家蛍光, 軟骨組織, 細胞外マトリックス

Validation of regenerative medicine using optical measurement technology

Miya ISHIHARA, Makoto KIKUCHI

Department of Medical Engineering, National Defense Medical College

3-2 Namiki, Tokorozawa, 359-8513, Japan

Phone: (04)2995-1596, Fax: (04)2996-5199

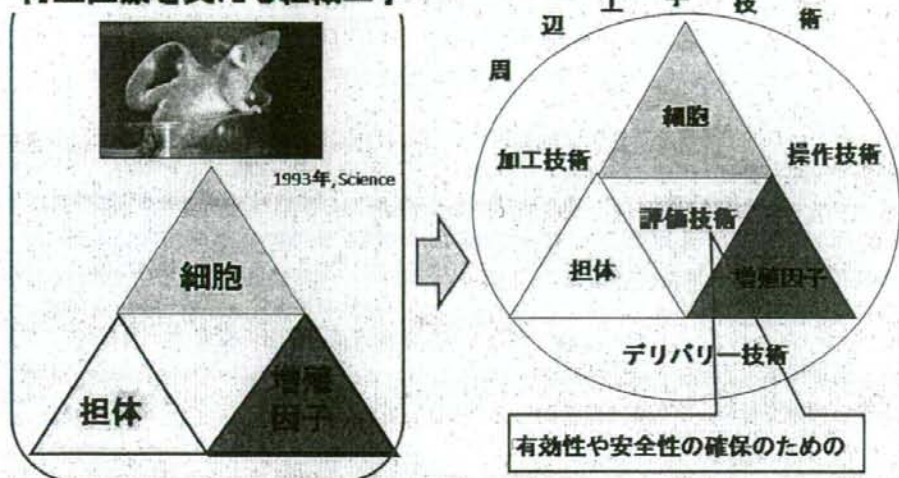
Internet: kobako@ndmc.ac.jp

Abstract An optical measurement technology that enables determination of functions of engineered tissues and cells in comparison with functions of native tissues and cells has come to play an important role in regenerative medicine. We proposed a method for viscoelastic characterization of tissue engineered cartilage based on photoacoustic measurement. A laser-induced auto-fluorescent spectroscopy system using the same excitation laser pulse as that used for the photoacoustic measurement system was developed for characterization of extracellular matrix of cartilage. This study was partially supported by NEDO and Health and Labour Sciences Research Grants for Comprehensive Research on Aging and Health.

Key words regenerative medicine, stress wave, autofluorescence, cartilage, extracellular matrix

周辺工学技術の重要性

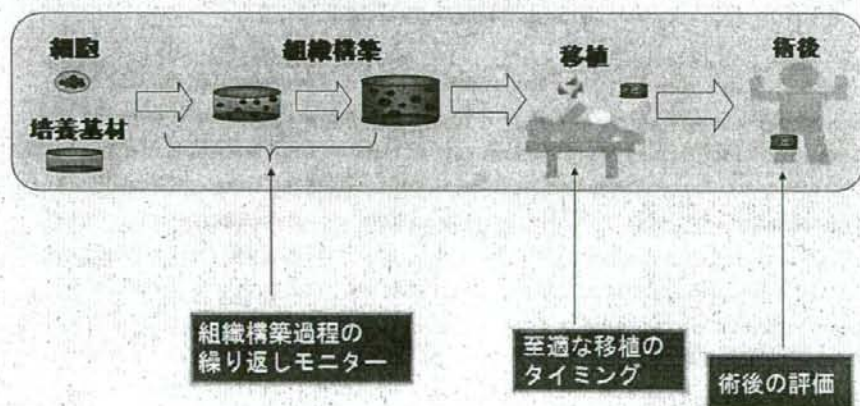
再生医療を支える組織工学



立石, 田中編 再生医療工学, 工業調査会 2004

求められる計測概念

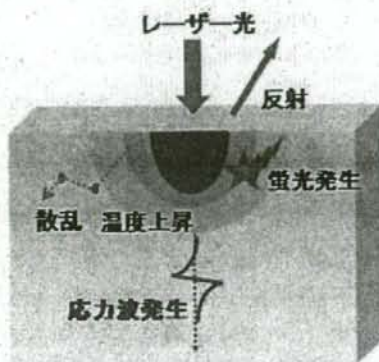
× バリデーションを可能にする計測技術



バリデーションとは：
再生医療が有効であることを立証する

石原美弥, 再生医療 2003

レーザー光と生体の相互作用



作用	現象
Photothermal	温度上昇
Photoacoustic	応力波発生
photochemical	蛍光発生

多様な相互作用=情報量の多い→多角的評価の可能性

関節軟骨の診断方法



現行の方法

軟骨機能に直接関係

1. レントゲン 
2. 関節鏡観察 
3. 関節鏡視下触感 
4. バイオプシー 

1. 力学特性
→ 光音響法による力学特性計測
2. 細胞外マトリックス性状
→ 自家蛍光による組織性状測定
3. 摩擦係数

東海大学医学部整形外科
佐藤正人先生のスライド

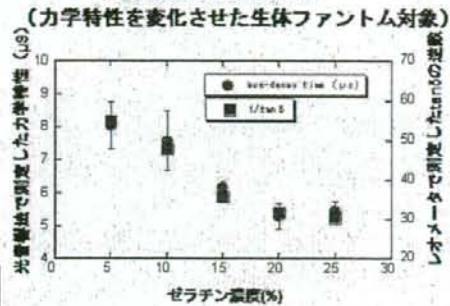
粘弾性計測原理提案と実証



パルスレーザーを軟骨に照射して発生する音波の減衰 ↔ 軟骨の粘弾性

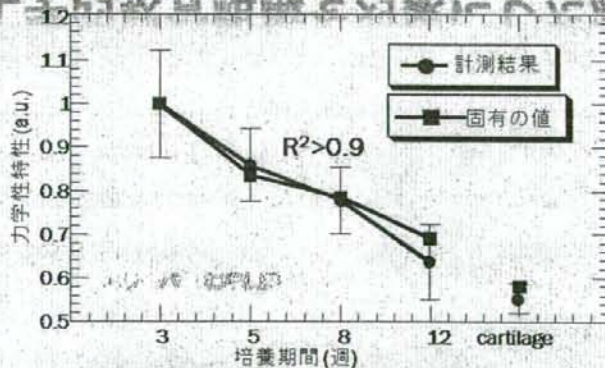
音波の減衰時間 (τ) = η/G
 (η : 粘性, G : 弾性)

原理実証実験結果



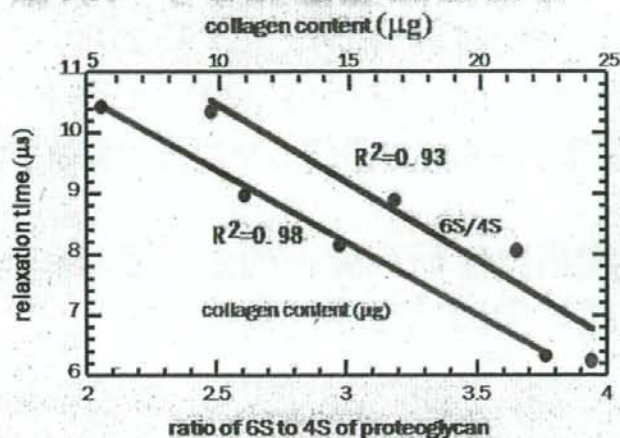
Miya, Ishihara, et al., JJAP (2003)

組織工学的軟骨組織を対象にした測定



Miya, Ishihara et al., Tissue Engineering (2005)

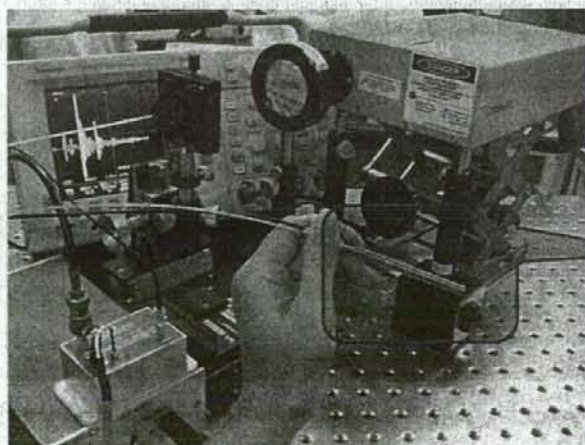
分子生物学的分析結果と 本計測法による粘弾性測定結果



細胞外マトリックスの構成 ↔ 粘弾性の要諦

Miya, Ishihara, Tissue Engineering, 2005

可搬、小型、簡便計測が可能なシステム



光ファイバーと
センサーを
組み合わせた
顕微鏡視下に適用
可能なプローブ

東海大学臨床研究審査委員会認可の下、ヒト軟骨変性診断に適用 (2005~)

Miya, Ishihara, Lasers Surg Med, (2006)

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
（再生医療の実用化を目指した再生評価技術開発）
並びに
厚生労働省科学研究費補助金（長寿科学総合
研究事業）の助成を受け実施された。