

## 光による再生医療に用いる組織・細胞の評価

Evaluation of tissue and cell for regenerative medicine using optical technology

石原美弥, 菊地 眞

Ishihara, Miya Kikuchi, Makoto

防衛医科大学校医用工学講座

Department of Medical Engineering , National Defense Medical College

359-8513 所沢市並木 3-2

3-2 Namiki, Tokorozawa, 359-8513

E-mail: kobako@ndmc.ac.jp

あらまし パルスレーザー光照射により発生した応力波の伝搬を利用する粘弾性計測法と、同じパルスレーザー光を照射して発生する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軟骨再生医療評価のために独自に開発しているので紹介する。

**Abstract** We proposed a noninvasive method for determination of the viscoelasticity using laser-induced stress wave. We also proposed a method for characterization of the extracellular matrix using time-resolved auto-fluorescence spectroscopy, which could be performed simultaneously with laser-induced stress wave.

### 1. はじめに

再生医療が大きな可能性のある次世代の医療として期待され、特に 2007 年後半より日本では追い風になっている。この要因は、ここ数年の再生医療技術のめざましい進歩により一部の機関で試験的に再生医療が実施されていること、日本発の再生医療製品として製造承認が認可されたこと、そして iPS 細胞の国をあげての研究促進などが挙げられる。このように、いよいよ医療行為として現実になってきた再生医療では、工学技術の新たなニーズが生まれている。それは、移植する細胞の安全性や組織の有効性を評価する技術の開発である。すなわ

ち、再生医療に使用する細胞・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の開発が急務とされている<sup>(1-8)</sup>。

光イメージング/計測技術を医療に用いる場合、MRI や PET などの他のモダリティと比べて高空間分解能かつ高時間分解能が実現でき、かつ大規模設備を必要とせず簡便に計測できる。我々は、これらの特長を持つ光計測技術を用いて再生医療の有効性を評価する方法を開発している。本稿では、一部で臨床応用が開始されている軟骨再生医療に関して、組織工学に基づく軟骨再生医療を想定して、組織の成熟

度を判定する技術を主に紹介する。軟骨再生医療の場合、組織の成熟度の評価とは、軟骨組織の主要な機能である粘弾性とこれを担う細胞外マトリックスの性状が正常組織と比べてどの程度かを評価することである。我々は、パルスレーザー光照射により発生した応力波の伝搬を利用する粘弾性計測法と、同じパルスレーザー光を照射して発生する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ている。

## 2. 軟骨再生医療を評価する技術

本研究は東海大学医学部外科学系整形外科持田讓治教授、佐藤正人准教授との共同研究によるものである。

### 2-1. 光音響法による軟骨の粘弾性計測法

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計測技術の1つに光音響法がある。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、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など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的には受けなため深部診断が可能であり、光と超音波の特長を併せ持つ医学・医療分野に幅広く役立つ有力な診断・計測法として近年注目されている<sup>(9-13)</sup>。我々は、パルスレーザー光照射により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<sup>(14-17)</sup>。この方法は上記の音響信号をイメージングする光音響法とは異なるが、パルスレーザー光を生体に照射して発生する応力波を利用する計測法という意味で「光音響法」を用

いている。我々が提案した粘弾性計測法は、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。その計測原理を図1に示す<sup>(6,14-15)</sup>。

我々はゼラチンの濃度を5~25%と変化させた力学特性の異なる生体ファントムを測定対象に、原理実証実験を施行した。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(レオメータ)から得られる物質固有の粘弾性特性値には図2に示す通り相関があり、提案した方法で粘弾性特性が測定できることが示されている<sup>(14-15)</sup>。

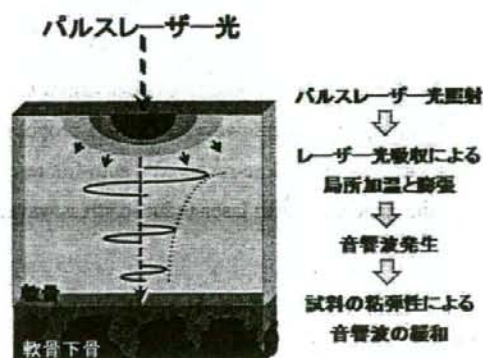


図1 光音響法による軟骨の粘弾性計測原因<sup>(6他)</sup>

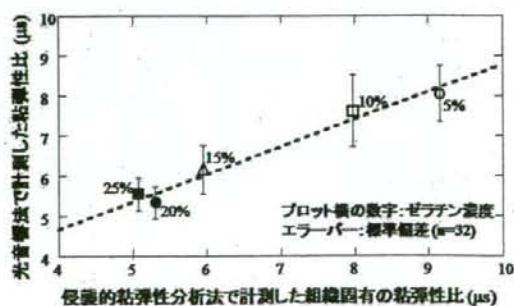


図2 光音響法と従来法の測定値を比較した結果<sup>(1,4)</sup>

次に本測定法の生体への安全性を確認するために、細胞増殖活性試験(WST-8アッセイ)



によりレーザー光照射による軟骨細胞への影響を検討した。培養した軟骨細胞に異なる5群(レーザー光照射群①100  $\mu\text{J}/\text{mm}^2$ , 30shots, ②150  $\mu\text{J}/\text{mm}^2$ , 30shots, ③100  $\mu\text{J}/\text{mm}^2$ , 1500shotsと, ④アルコール滴下群, ⑤レーザー光非照射群)の条件で比較検討した。結果は, 図3の通り, ①, ②, ③の増殖活性は④の増殖活性とは有意差を持って異なっていた。また, ⑤とは有意差はなかった<sup>(18)</sup>。以上の結果より, 現在本方法で使用している照射条件では, レーザー光照射により軟骨の増殖活性に影響はなく, 安全な方法であることが示された。

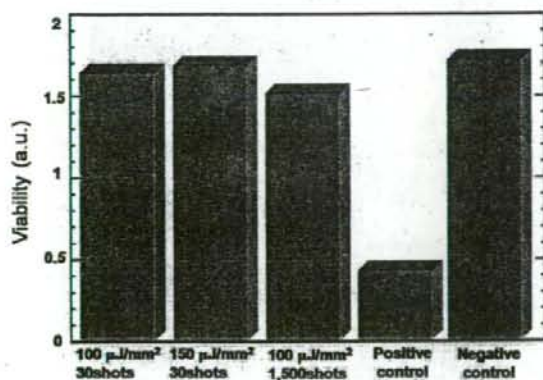


図3 WST-8 アッセイを用いた レーザー照射による細胞障害試験<sup>(18)</sup>

軟骨の変性に伴う粘弾性的変化も本方法で評価できることを基礎実験より確認し<sup>(18)</sup>, 2005年より東海大学臨床研究審査委員会認可のもと, ヒト軟骨変性診断に適用している。既にヒト膝関節軟骨を対象に計測した結果から, 組織学的変化と粘弾性パラメータの変化が相関することを確認している。現在は, 関節鏡視下での計測を可能にするためのプローブを開発中である。

発表では, 組織工学的手法を用いて作成した培養軟骨組織や, 軟骨再生医療を模擬した動物実験の測定結果から, 本法の有効性を示す<sup>(19-25)</sup>。

## 2-2. 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

細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンなど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ので, 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。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(色素)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スペクトル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が同定できる。我々は, 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>(26-29)</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, 膝関節軟骨などの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, 椎間板などの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。既に我々は, 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。その結果を表1に示す<sup>(26-27)</sup>。我々はこの結果を基に, 細胞外マトリックスの主要成分, すなわち組織性状を評価している。

表1 関節軟骨, 椎間板, II型, I型コラーゲンの自家蛍光パラメータ(26,27より改変)

	ピーク波長 (nm)	FWHM (nm)
関節軟骨	400	64
椎間板	440	120
II型コラーゲン	400	66
I型コラーゲン	440	120

FWHM: Fluorescent spectral bandwidth at half-maximal amplitude

発表では, 培養細胞を対象にした結果や, 各種組織工学的手法を用いて作成した培養軟骨の測定結果を示す。

### 3. 細胞評価技術

有効性の評価と同様に求められているのが再生医療の安全性を確保するための方法である。すなわち, 再生医療に用いる細胞を対象に安全性に関して評価できる計測法が求められている。この目的を達成するには, ①安全な細胞を抽出するために, 単一細胞で評価ができる②ハイスループットで評価できるなどの条件が挙げられる。我々は, リモートセンシング分野において物質の同定などに利用されて発展してきた技術であるハイパースペクトルセンサーに着目した。画像情報および連続的なスペクトル(分光)情報を同時に取得できるハイパースペクトルセンサーは, 現在, 生物医学分野への応用が期待されている。生体医学分野に適用するためには, 微小なものを精細に撮像可能にする必要がある。我々は, 分光光学系に波長分散素子を用いたハイパースペクトルセンサーの視野前面に, 複数のレンズで構成した拡大光学系を組んだシステムを構成した。構築したシステムは, 高波長分解能, 高空間分解能かつダイナミックレンジの大きいイメージングが可能となっている<sup>(30)</sup>。現在, 本システムによ

る単一細胞の評価を進めている。

### 4. おわりに

軟骨評価法としての光音響法と時間分解自家蛍光スペクトルは, 関節軟骨本来の機能を適正に反映し, 有用であることが示された。

### 5. 参考文献

- (1) 石原美弥, ほか: 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, ほか: 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, ほか: 再生医療の基盤技術としての計測・画像工学, 再生医療のためのバイオエンジニアリング, コロナ社: p.147-167, 2007
- (4) 石原美弥, ほか: 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, 「遺伝子医学」MOOK 「再生医療へのブレイクスルー -その革新技術と今後の方向性-」メディカルドゥ: p.228-232, 2004
- (5) 石原美弥, ほか: 臓器の評価技術, 図解再生医療工学, 工業調査会: p.225-232, 2004
- (6) 石原美弥, ほか: 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): p.47-54, 2003
- (7) 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): p.1069, 2004
- (8) 石原美弥, ほか: 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
- (9) 佐藤俊一, ほか: 光音響法による医用モニタリング, 診断技術, 光学, 30(10): p.658-662, 2001



- (10) X Wang et al.:  
Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional *in vivo* imaging of the brain. *Nature Biotechnol.* 21(7): p.803-806, 2003
- (11) S. Sato et al.:  
Photoacoustic diagnosis of burns in rats. *J. Trauma*, 59: p1450-1456, 2005
- (12) M. Yamazaki et al.:  
Measurement of burn depth in rats using multiwavelength photoacoustic depth profiling. *J. Biomed. Opt.* 10: p064011, 2005
- (13) M. Yamazaki et al.:  
Photoacoustic monitoring of neovascularities in grafted skin. *Lasers in Surgery & Medicine*, 38: p.235-239, 2006
- (14) M. Ishihara et al.:  
Viscoelastic characterization of biological tissue by photoacoustic measurement. *J. Journal of Applied Physics*, 42(5B): p.556-558, 2003
- (15) 石原美弥, ほか:  
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): p.640-644, 2004
- (16) M. Ishihara et al.:  
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
- (17) 石原美弥, ほか:  
軟骨再生医療の評価に用いる光音響法の開発, *レーザー医学雑誌*, 26(1): p.53-59, 2005
- (18) M. Ishihara et al.:  
Development of Diagnostic System for Osteoarthritis Using the Photoacoustic Measurement Method, *Lasers in Surgery & Medicine*, 38: p.249-255, 2006
- (19) 石原美弥, ほか:  
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
- (20) 石原美弥, ほか:  
再生医療評価・パリアレーションのための非侵襲的計測法. *生物工学会誌*, 85(10): p.438-441, 2007
- (21) M. Sato, et al.:  
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(2): p.248-256, 2003
- (22) M. Sato et al.:  
An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method, *Spine*, 28(6): p.548-553, 2003
- (23) K. Masuoka et al.:  
Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS-scaffold), *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 75(1): p.177-184, 2005
- (24) M. Sato et al.:  
Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured annulus fibrosus cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS scaffold), *Medical & Biological Engineering & Computing*, 41(3): p.365-371, 2003
- (25) M. Ishihara et al.:  
Usefulness of photoacoustic measurements for evaluation of the biomechanical properties of tissue-engineered cartilage., *Tissue Engineering*, 11(7-8): p.1234-43, 2005
- (26) M. Ishihara et al.:  
Multifunctional evaluation of tissue engineered cartilage using nano-pulsed light for validation of regenerative medicine, *IFMBE Proceedings WC 2006*, 14: p.3187, 2006
- (27) M. Ishihara et al.:  
Development of a noninvasive multifunctional measurement method using nanosecond pulsed laser for evaluation of regenerative medicine for articular cartilage, *Proceedings of SPIE*, 6084: p.60840V-1-4, 2006
- (28) 石原美弥, 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*, 127(12): p.2166-2170, 2007
- (29) 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: p.643909-1-4, 2007
- (30) 土志田実, ほか:  
バイオメディカル分野に役立つハイパースペクトルセンサーの技術紹介 *O plus E*, 30(4): p.369-374, 2008

## 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。

番作氏，谷川氏，真弓氏，北口氏には実験に全面的にご協力いただいた。

ハイパースペクトルセンサーの技術開発は，防衛省技術研究本部電子装備研究所 土志田技官をはじめ光電研究室の岩佐技官，長島技官，木部技官の多大なる尽力により遂行された。

心より感謝いたします。