

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11029

研究課題名(和文) ラマン分光を応用した膝靭帯変性の新たな診断技術開発と実用化への展開

研究課題名(英文) A new diagnostic technology for degeneration of knee ligaments using Raman spectroscopy and its development toward practical applications

研究代表者

高橋 康仁 (TAKAHASHI, Yasuhito)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60567668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では近赤外レーザーラマン分光をヒト前十字靭帯(ACL)に応用し、分子レベルで組織変性状態を非破壊検査するための光学アルゴリズムを構築した。抽出したACLのラマンスペクトルを計測後、病理スコアに基づき初期変性および高度変性群に分類した。

ACLのラマンピーク強度は両群間で有意差を認め、これらは細胞内核酸、コラーゲン、およびリン脂質に帰属される振動モードであった。ラマン強度比の分布に線形判別分析(LDA)を適応し、初期変性および高度変性組織間を識別する最適なカットオフ値を決定した。我々のラマンアルゴリズムによる組織変性度の診断精度は、最大感度100%、特異度80%、精度91%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前十字靭帯(ACL)における組織変性度の診断は、病理や生化学分析など組織切除を要する侵襲検査法に依存している。一方、非破壊検査法としてMRI画像診断も実施されているが、ACLの完全/部分断裂の有無や粘液変性の診断にその応用場面が限定されている。そこで本研究では非破壊検査法である近赤外レーザーラマン分光法を応用し、ACLの局所変性度を診断するための光学アルゴリズムを構築した。レーザー光を用いた本診断法を適応すれば、低侵襲迅速診断が理論上可能になり、特に初期変性に対する診断が可能であることから、靭帯温存または切除に際する客観的診断指標を術者に与えられるなど臨床意義の高い研究成果であるといえる。

研究成果の概要(英文)： In this study, near-infrared laser Raman spectroscopy was applied to human anterior cruciate ligament (ACL) to establish optical algorithms for non-destructively diagnosing a degeneration state at molecular level. Raman spectra of ex-vivo ACL were collected, and were subsequently classified as an early and advanced degradation groups based on the histopathological scoring system.

The significant differences in several Raman peak intensities of ACL were found between the different degeneration groups, which were assigned to the vibrational modes of nucleic acids in cells, collagens, and phospholipids. Linear discriminant analysis (LDA) was performed to identify cut-off values for the distributions of the Raman intensity ratios, which enable to best discriminate between the early and advanced degenerated tissues. Our Raman algorithm yielded a maximum diagnostic sensitivity of 100%, specificity of 80%, and accuracy of 91% for discriminating the degeneration severity.

研究分野：生体医工学

キーワード：前十字靭帯 ラマン分光 近赤外レーザー 組織診断 光バイオプシー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膝靭帯において前十字靭帯 (ACL) は最も損傷率が高く、本邦でも年間 5 万人ものスポーツ選手が受傷し、2 万件近くの靭帯再建術が行われているのが現状である。アスリートにとって、靭帯断裂は復帰までに 1 年近くのリハビリテーションを要する深刻な疾患であり、スポーツ立国を目指す我が国において、解決を急がれる外傷である。さらに靭帯断裂は経時的に軟骨損傷や変形性関節症 (OA) に発展する傾向があるため、可能な限り早期の対策が必要であり、ACL の解剖学、力学、さらに質的評価を総合的に行うことは、靭帯変性の病態解明や予防・治療法の確立において極めて重要である。

しかし、靭帯の機能評価に比べ、質的評価に関する研究は極めて少なく、その理由として高精度で局所構造を評価することが困難な点が挙げられる。靭帯の質的評価法としては、病理組織学的検査が最も有用であるが、組織の切片化やホルマリン固定などの侵襲を伴う。一方、MRI 画像評価は非侵襲的で X 線被曝がなく、コントラストや分解能に優れているため、靭帯の形態および質的評価にも有用との報告があるものの、完全・部分断裂の有無や粘液変性の診断に応用場面が限られている。一般的に靭帯組織は変性すると、コラーゲン配列が不規則となって水分含有量が高くなり、T2 値が上昇する。ただし T2 マップは、水分含有量の変化を見ているということ、またマジックアングルの影響を受けやすいなどのデメリットがあることに留意する必要がある。

こうした背景から、我々の研究グループは共焦点近赤外ラマン分光法と呼ばれる光学分析技術を応用し、軟部組織の微小変化を非破壊条件でモニタリングする高精度診断技術の開発を実施してきた [1]。ラマン分光法とは、散乱光に含まれる分子固有の振動状態を反映した波長成分の変化を波形 (スペクトル) として解析することで、分子の定性および定量分析を行う手法である。またレーザー光をプローブとして用いるため完全な非破壊測定が可能である。さらに局所構造の変化に敏感であるため、組織変性に伴う分子構造や組成の変化および同一組成を有する多系体の検出を行うこともできる。ラマンスペクトルには原子間結合の種類の違いに応じて、異なる位置に散乱強度ピークが現れるため、望みの構造ブロックや機能発現と関係した構造部位だけの情報を抽出することも可能である。レーザービームは最小 1  $\mu\text{m}$  程度に絞れるため、微小試料や微小領域ごとの評価が可能であり、また試料内における対象成分分布や分子配向、歪み状態の変化等をトレースし、画像化することも可能であるため、他の分析法には無い多くのメリットを与え、靭帯構造やその変性機序に関する新たな情報を入手できることが期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、膝前十字靭帯再建術 (ACLR) および人工膝関節置換術 (TKA) 時に採取した日本人患者由来の ACL を対象に、コラーゲン分子および他の構造部位の変性を分光学的および病理組織学的に解析し、変性に関与した構造ブロックを同定し、変性機序を調査する。さらに ACL のラマンスペクトルをバイオマーカーとして応用することで、新たな光学診断技術を開発することが目的である。

具体的に以下の 3 つの課題を設定し其々実施した。

- (1) ACL のラマン散乱スペクトルを測定し、各バンドの帰属を同定する。
- (2) 病理組織評価を用いて ACL 変性度をスコア化する。
- (3) 病理結果とラマンデータをリンクさせ、スペクトルから ACL 変性の診断モデルを作成する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

東京医科大学病院にて、ACL 損傷または末期 OA と診断された日本人患者を対象に、ACLR および TKA を施行し、術時に ACL 検体を採取した。OA 患者の内、ACL 損傷および膝関節リウマチの既往のある検体は除外した。解析対象としたのは、ACLR 21 例および TKA 23 例から採取した検体 (女性 34 名; 男性 10 名) で、手術施行時の患者平均年齢は其々  $25.9 \pm 12.2$  および  $71.1 \pm 11.2$  歳であった。ACL は大腿骨および脛骨付着部にて切除し、術時に縫合糸またはスキンマーカーを用いて脛骨付着部前方および ACL 中央 1/3 領域に目印を作成した。切除した ACL 検体は、50ml のリン酸緩衝生理食塩水に浸し、30 分以内に分光計測実験室に運んだ。なおラマン分光計測時のアーチファクトになる可能性があったことから、スペクトル計測前のホルマリン固定は行わなかった。ラマン分光による非破壊分析後、ホルマリン固定を行って病理組織学評価を実施した。

#### (2) ラマン分光

ACL 検体に対し、近赤外レーザーラマン分光分析を実施した。ラマンスペクトル計測は、 $25 \pm 2$  に温度制御した実験室内で行い、分光器は MS3504i (SOL Instruments) を使用した。検出器は高感度分光用冷却 CCD (iDus DU-420A-BR-DD, Andor Technology) 対物レンズは近赤外領域観察用 (LCPLM50XIR, Olympus; 倍率  $\times 50$ ; NA 0.65) を用いた。また励起源として、785-nm 近赤外半導体レーザー (XTRA II, Toptica Photonics) を使用した。本計測条件下では約 23mW の近赤外光が ACL 表面上に直径約  $2 \mu\text{m}$  で結像した。600 本/mm の回折格子にて散乱光を分光し、ラマンシフト  $650\text{-}1850\text{cm}^{-1}$  領域のラマンスペクトルを計測した。スペクトル積算秒数は 150 秒で、ACL の中央 1/3 領域内の前内側線維束 (AM) から 1 検体当たり 20 点以上の計測箇所をランダムに設け、スペクトルデータを平均化した。なお検体の装置への設置は、レーザー偏向方向に対して ACL の長軸方向 (コラーゲン線維方向) が垂直となるように設置した。

### (3)組織学的評価

ラマン分光法による非破壊分析後、48時間以上20%中性ホルマリン液に浸漬し、病理組織学評価を行った。ホルマリン固定した検体は、ミクロトームを用いてACL長軸方向に沿って3~5 $\mu\text{m}$ 厚に組織切片化した。光学顕微鏡用切片染色標本の作製には、hematoxylin and eosin(HE)、alcian blue(AB)、Elastica van Gieson(EVG)を用いた。ACL標本の変性度は、組織学的スコアリングにより初期(early [subclinical])変性群と高度(advanced [clinical])変性群に分類した。組織学スコアは、以下に記す~の各カテゴリー上の変化度として其々0~3点で評価した[2]: 炎症; ムコイド変性; 軟骨性化生; 嚢胞形成; コラーゲン線維配向。なお0点=変化なし; 1点=軽度変化; 2点=中等度変化; 3点=高度変化と定義し、15点満点で評価を行った。ACLの組織変性スコアの合計は、0点で完全な健常、0.5-5点で初期変性、5.5-15点で高度変性とした。ただし、コラーゲン線維配向、ムコイド変性、嚢胞形成のカテゴリーで2点以上であれば、合計点に関わらず高度変性群に分類した。

組織学的評価はラマン計測と同一領域内で行った。生体組織における785nmレーザーの侵入深さが約700 $\mu\text{m}$ であることから、スコアリングの範囲はACL表層から~800 $\mu\text{m}$ まで(100倍視野内)とした。

### (4)データ解析

計測したACLのラマンスペクトルには、バックグラウンドノイズとして検体や対物レンズからの蛍光スペクトルが含まれる。対物レンズからのガラス蛍光の除去対策として、検体のない状態における蛍光スペクトルを計測し、これをノイズデータとしてACLラマンスペクトルから差分した。さらに組織からの蛍光ノイズは、5次の多項式フィッティングによりソフトウェア上で除去した。さらにSavitzky-Golay法によるスペクトル平滑化でその他のノイズを減少させた。その後、650-1850 $\text{cm}^{-1}$ 域でスペクトル強度を規格化した。

上述のスペクトル前処理後、波数域内で計測された強度データに対して、ACLの初期変性群と高度変性群間でMann-Whitney U検定を行い有意水準 $p < 0.0005$ であった強度のみをデータ解析(診断モデル作成)対象とした。本研究では、ACLの初期および高度変性を識別するための診断モデル作成を行うため、教師あり学習(supervised learning)によるモデル作成を試みた。つまり、病理スコア結果によって変性度が事前に与えられた状態から、スペクトル上で判別パターンを数学的に探るというアプローチを採用した。この判別には、両群間を最も良く識別できるラマンスペクトル強度のカットオフ値を決定する必要があり、この同定に線形判別分析(LDA)を用いた。LDAに基づく識別モデルの汎化性の評価には、leave-one-out cross-validation(L00CV、一個抜き交差検証)を用いた。L00CVは、正解データから1つだけ抜き出してテストデータとし、残りのデータを教師データとして、交差検証を行う方法である。さらにモデルの感度(sensitivity)、特異度(specificity)、正診率(accuracy)を算出し、ROC(receiver operating curve)曲線およびAUC(Area Under the Curve)で各モデルの予測診断能を比較・検討した。

## 4. 研究成果

### (1)ACLの組織学的分類

HE、AB、EVG染色によるACL検体の分類結果をTable 1に記す。44検体の分類結果は、初期変性群(20例)、高度変性群(24例)であった。なお本研究では、手術時に切除した検体を対象としたため、完全に健常なACL(total score 0)は入手できなかった。なお両群間のbody mass index(BMI)に有意差は認めなかった。初期変性群では、ACL断裂を来した若年患者が多くを占め、断裂の影響により炎症スコアが高度変性群に比べて有意に高値であった。しかし、他の4つのカテゴリー(ムコイド変性、軟骨性化生、嚢胞形成、コラーゲン線維配向)の変化に関しては、高度変性群の方が有意に高いスコアを示した。

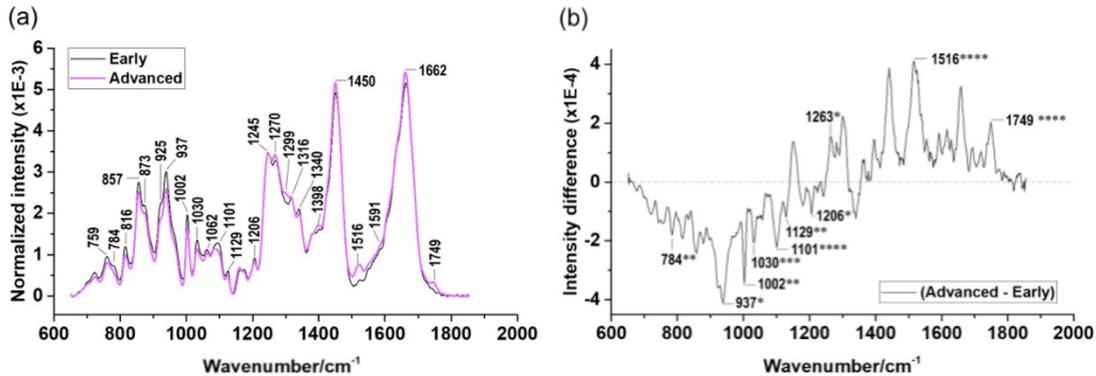
**Table 1:** Summary of human ACL specimens classified as early and advanced tissue degeneration according to the histological scoring.

| Specimens                | ACL degeneration        |                      | $p$ -value            |                       |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                          | Early                   | Advanced             |                       |                       |
| Number of specimens      | 20 (4 men, 16 women)    | 24 (6 men, 18 women) | 0.7344 <sup>a</sup>   |                       |
| Type of surgery          | 19 ACLR, 1 TKA          | 2 ACLR, 22 TKA       | < 0.0001 <sup>a</sup> |                       |
| Age at surgery (yrs)     | 29.5 $\pm$ 17.1         | 66.0 $\pm$ 18.7      | < 0.0001 <sup>b</sup> |                       |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 23.2 $\pm$ 3.4          | 24.9 $\pm$ 3.2       | 0.06 <sup>b</sup>     |                       |
| Histological scores      | Inflammation            | 1.3 $\pm$ 0.6        | 0.7 $\pm$ 0.7         | 0.0004 <sup>b</sup>   |
|                          | Mucoid degeneration     | 0.6 $\pm$ 0.3        | 1.5 $\pm$ 0.9         | 0.0002 <sup>b</sup>   |
|                          | Chondroid metaplasia    | 0.4 $\pm$ 0.3        | 1.1 $\pm$ 0.9         | 0.0049 <sup>b</sup>   |
|                          | Cystic changes          | 0.4 $\pm$ 0.4        | 1.5 $\pm$ 1.0         | < 0.0001 <sup>b</sup> |
|                          | Collagen disorientation | 0.5 $\pm$ 0.4        | 2.0 $\pm$ 0.9         | < 0.0001 <sup>b</sup> |
|                          | Total                   | 3.1 $\pm$ 1.1        | 6.8 $\pm$ 2.6         | < 0.0001 <sup>b</sup> |

ACLR: arthroscopic ACL reconstruction; TKA: total knee arthroplasty; BMI: body mass index <sup>a</sup>:  $p$ -value calculated from Fisher's exact test; <sup>b</sup>:  $p$ -value calculated from Mann-Whitney U test

## (2) ACL のラマンスペクトル

ACL のラマンスペクトルでは、変性度の違いに関連するピーク強度変化を認めた (Figure 1a-b)。Figure 1b は、高度変性群と初期変性群の差分スペクトルである。初期変性群に比べ、高度変性群では凡そ  $1250\text{cm}^{-1}$  以下の波数領域においてスペクトル強度が弱く、 $1250\text{cm}^{-1}$  以上の波数領域では強度が高いことが確認された。有意な強度変化を示したピーク位置 (帰属) は  $784(\text{DNA/RNA})$ ,  $937(\text{collagen})$ ,  $1002(\text{collagen})$ ,  $1030(\text{collagen})$ ,  $1101(\text{phospholipids})$ ,  $1129(\text{lipid})$ ,  $1206(\text{collagen})$ ,  $1516(\text{carotenoids})$ ,  $1749\text{cm}^{-1}(\text{phospholipids, denatured collagen})$  であった [3]。



**Figure 1:** (a) Comparison of the mean normalized Raman spectra from early and advanced degenerated ACLs; (b) Difference spectrum calculated from the mean normalized Raman spectra shown in the (a) (*i.e.*, advanced minus early). The symbols \*, \*\*, \*\*\*, and \*\*\*\* indicate the intensity differences between early and advanced degeneration group at a statistical significance levels of  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , and  $p < 0.0001$ .

$784\text{cm}^{-1}$  (DNA/RNA)の強度変化は、異型細胞 (軟骨化性) の形成、炎症性細胞や線維芽細胞の密度変化または活性化に由来すると考えられる。 $1002$  および  $1030\text{cm}^{-1}$  は芳香族アミノ酸である phenylalanine、 $1206\text{cm}^{-1}$  は hydroxyproline、tyrosine の分子振動モードに由来し、加齢や OA の進行に伴う細胞外マトリックスの組成変化、コラーゲンの密度変化、嚢胞形成、ムコイド変性に関連すると考えられる。またコラーゲン主鎖に由来する  $937\text{cm}^{-1}$  のピークは偏光特性を有していることから、コラーゲン線維配向の乱れに関連する。 $1101, 1129, 1749\text{cm}^{-1}$  の脂質由来のバンド変化は、細胞や脂質代謝の変化等に関連すると推測された。さらに  $1749\text{cm}^{-1}$  は変性コラーゲンの濃度にも関連している。

$1220-1280\text{cm}^{-1}$  および  $1645-1680\text{cm}^{-1}$  の波数域はコラーゲン二次構造 (  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, random coil ) に関連する peptide amide III および amide I の散乱スペクトル (N-H 振動) である。これら波数域においては両群の強度に有意差を認めなかった。さらに  $857(\text{proline})$  および  $873\text{cm}^{-1}(\text{hydroxyproline})$  は、コラーゲンのらせん構造の安定性を示すバンドであるが、これらの強度や強度比にも有意差を認めなかったことから、初期変性と高度変性群ではコラーゲン二次構造に有意差が無いと考えられた。

$394, 470, 533, 875, 1556\text{cm}^{-1}$  はいずれも hydroxyproline に由来するバンドでコラーゲンの糖化と関連するが、これらの強度も両群間で有意差は認められなかったことから、初期変性と高度変性群では糖化レベルに有意差がないことが示唆された。

## (3) ラマン分光による組織診断モデルの構築

前節では、ACL の変性度の違いが核酸、コラーゲン、脂質のバンド強度変化としてスペクトル上に現れることを示したが、本節ではこれらの強度変化を利用した組織診断モデルの構築とその精度について報告する。まず初期変性および高度変性群間のラマンスペクトル強度で  $p < 0.005$  の有意差を認めた単一ピーク  $784, 1002, 1030, 1101, 1516, 1749\text{cm}^{-1}$  を対象に、LDA および LOOCV を適応し、両群を識別する最適なカットオフ値を定め、その感度、特異度、正診率を算出した (Table 2)。次に両群の識別精度を向上するために、差分スペクトルの強度がマイナスとプラスであったバンド同士 ( $1250\text{cm}^{-1}$  以下と  $1250\text{cm}^{-1}$  以上のバンドペア) で比を取り、LDA と LOOCV を適応した。さらに異なるバンド強度比間での 2 変数 LDA を行い、カットオフ値を決定した (Figure 2)。

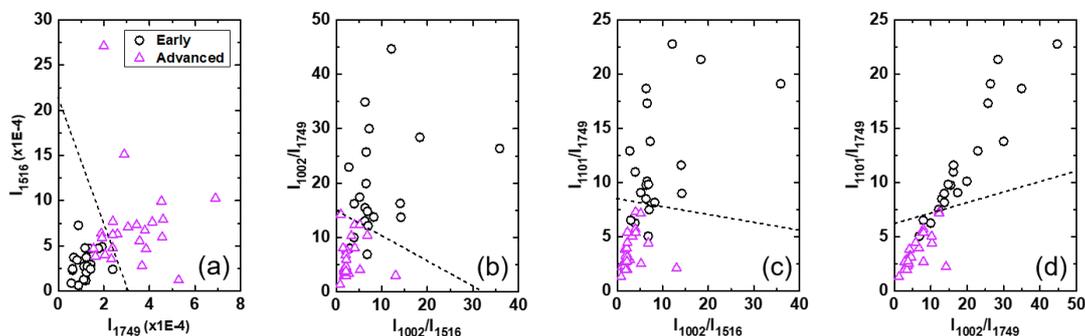
2 変数 LDA では  $[I_{784}/I_{1749}, I_{1002}/I_{1516}]$ ,  $[I_{784}/I_{1749}, I_{1002}/I_{1749}]$ ,  $[I_{1002}/I_{1516}, I_{1002}/I_{1749}]$ ,  $[I_{1002}/I_{1516}, I_{1101}/I_{1749}]$ ,  $[I_{1002}/I_{1749}, I_{1101}/I_{1749}]$  のバンドペアで感度 100%、 $[I_{1749}, I_{1516}]$  で特異度 100%、 $[I_{784}/I_{1749}, I_{1002}/I_{1749}]$ ,  $[I_{1002}/I_{1516}, I_{1002}/I_{1749}]$ ,  $[I_{1002}/I_{1516}, I_{1101}/I_{1749}]$ ,  $[I_{1002}/I_{1749}, I_{1101}/I_{1749}]$  で正診率 100% であった。ラマン分光による診断で最も有用な候補バンドペアは、特異度 100%、AUC 0.969 の  $[I_{1749}, I_{1516}]$ 、または感度 正診率共に 100%、AUC 0.981 の  $[I_{784}/I_{1749}, I_{1002}/I_{1749}]$ ,  $[I_{1002}/I_{1516}, I_{1002}/I_{1749}]$ ,  $[I_{1002}/I_{1516}, I_{1101}/I_{1749}]$ ,  $[I_{1002}/I_{1749}, I_{1101}/I_{1749}]$  であった。これらの判別式として、 $I_{1516} = -6.97 I_{1749} + 0.0002$ ,  $I_{1002}/I_{1749} = -1.20 I_{784}/I_{1749} + 17.23$ ,  $I_{1002}/I_{1749} = -0.46 I_{1002}/I_{1516} + 14.94$ ,  $I_{1101}/I_{1749} = -0.02 I_{1002}/I_{1516} + 7.48$ , and  $I_{1101}/I_{1749} = -0.10 I_{1002}/I_{1749} + 6.20$  を得ることができた。上述の判別式を用いれば、ACL のスペクトルを計測することで局所変性度の迅速診断が可能となる。本技術を応用すれば、ACL の切除・温存の術中判断の際、客観的

指標を術者に与えられるなど、実用化への展開が今後期待できる。

**Table 2:** Summary of predicted sensitivity, specificity, and accuracy for differentiating early and advanced degenerated ACLs using the selected Raman peak intensities and the intensity ratios. The gray shadows indicate the maximum values of sensitivity (100%), specificity (100%), accuracy (91%), and AUC (0.981).

| Parameters                                  |   | After leave-one sample-out cross validation (Predicted) |              |             | ROC (AUC) |
|---|---|---|--------------|-------------|-----------|
|   |   | Sensitivity   | Specificity  | Accuracy    |           |
| One-parameter LDA                           | $I_{1516}$                                  | 67% (16/24)   | 95% (19/20)  | 80% (35/44) | 0.871     |
|   | $I_{1749}$                                  | 75% (18/24)   | 95% (19/20)  | 84% (37/44) | 0.969     |
|   | $I_{1030}/I_{1749}$                         | 92% (22/24)   | 80% (16/20)  | 86% (38/44) | 0.977     |
|   | $I_{1002}/I_{1749}$                         | 96% (23/24)   | 80% (16/20)  | 89% (39/44) | 0.944     |
|   | $I_{1101}/I_{1749}$                         | 100% (24/24)  | 80% (16/20)  | 91% (40/44) | 0.981     |
| Two-parameter LDA                           | $I_{1749}$ vs. $I_{1516}$                   | 75% (18/24)   | 100% (20/20) | 86% (38/44) | 0.969     |
|   | $I_{784}/I_{1749}$ vs. $I_{1002}/I_{1516}$  | 100% (24/24)  | 60% (12/20)  | 82% (36/44) | 0.977     |
|   | $I_{1002}/I_{1749}$                         | 100% (24/24)  | 80% (16/20)  | 91% (40/44) | 0.965     |
|   | $I_{1030}/I_{1749}$                         | 92% (22/24)   | 75% (15/20)  | 84% (37/44) | 0.975     |
|   | $I_{1101}/I_{1749}$                         | 92% (22/24)   | 80% (16/20)  | 86% (38/44) | 0.975     |
|   | $I_{1002}/I_{1516}$ vs. $I_{1002}/I_{1749}$ | 100% (24/24)  | 80% (16/20)  | 91% (40/44) | 0.965     |
|   | $I_{1030}/I_{1749}$                         | 92% (22/24)   | 85% (17/20)  | 89% (39/44) | 0.979     |
|   | $I_{1101}/I_{1749}$                         | 100% (24/24)  | 80% (16/20)  | 91% (40/44) | 0.981     |
|   | $I_{1002}/I_{1749}$ vs. $I_{1030}/I_{1749}$ | 92% (22/24)   | 85% (17/20)  | 89% (39/44) | 0.971     |
|   | $I_{1101}/I_{1749}$                         | 100% (24/24)  | 80% (16/20)  | 91% (40/44) | 0.981     |
| $I_{1030}/I_{1749}$ vs. $I_{1101}/I_{1749}$ | 96% (23/24)                                 | 75% (15/20)   | 86% (38/44)  | 0.977       |           |

LDA: linear discriminant analysis; ROC: receiver operating characteristic (ROC) curve; AUC: area under the ROC curve



**Figure 2:** Two-dimensional scatter plots of peak intensities and intensity ratios of Raman spectra from early and advanced degenerated ACLs. The two-parameter LDA was applied to each plot in the pairs of  $[I_{1749}, I_{1516}]$  (a),  $[I_{1002}/I_{1516}, I_{1002}/I_{1749}]$  (b),  $[I_{1002}/I_{1516}, I_{1101}/I_{1749}]$  (c), and  $[I_{1002}/I_{1749}, I_{1101}/I_{1749}]$  (d). Their linear discrimination lines were obtained as  $I_{1516} = -6.97 I_{1749} + 0.0002$ ,  $I_{1002}/I_{1749} = -0.46 I_{1002}/I_{1516} + 14.94$ ,  $I_{1101}/I_{1749} = -0.02 I_{1002}/I_{1516} + 7.48$ , and  $I_{1101}/I_{1749} = -0.10 I_{1002}/I_{1749} + 6.20$ , respectively.

#### < 参考文献 >

- Yasuhiro Takahashi, Nobuhiko Sugano, Masaki Takao, Takashi Sakai, Takashi Nishii, Giuseppe Pezzotti, Raman spectroscopy investigation of load-assisted microstructural alterations in human knee cartilage: preliminary study into diagnostic potential for osteoarthritis, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 31 巻、2014、77 - 85
- Akihiko Hasegawa, Shuhei Otsuki, Chantal Pauli, Shigeru Miyaki, Shantanu Patil, Nikolai Steklov, Mitsuo Kinoshita, James Koziol, Darryl D D'Lima, Martin K Lotz, Anterior cruciate ligament changes in the human knee joint in aging and osteoarthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 64 巻、2012、696 - 704
- Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman, Ihtesham U. Rehman, Raman spectroscopy of biological tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 42 巻、2007、493 - 541

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ryo Matsunaga, Yasuhito Takahashi, Reisuke H Takahashi, Toshitaka Nagao, Takaaki Shishido, Toshiyuki Tateiwa, Giuseppe Pezzotti, Kengo Yamamoto | 4. 巻<br>99              |
| 2. 論文標題<br>A new method for diagnosing biochemical abnormalities of anterior cruciate ligament (ACL) in human knees: a Raman spectroscopic study          | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Acta Biomaterialia  | 6. 最初と最後の頁<br>284 - 294 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.actbio.2019.09.016   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する            |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松永 怜、高橋康仁、高橋礼典、長尾俊孝、穴戸孝明、正岡利紀、立岩俊之、山本謙吾 |
| 2. 発表標題<br>ヒト前十字靭帯の非侵襲診断に向けた近赤外レーザーラマン分光の応用        |
| 3. 学会等名<br>第34回日本整形外科学会基礎学術集会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松永 怜、高橋康仁、山本謙吾                |
| 2. 発表標題<br>ヒト前十字靭帯の非侵襲診断に向けたレーザーラマン分光の応用 |
| 3. 学会等名<br>第11回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会        |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 松永 怜<br><br>(MATSUNAGA Ryo)<br><br>(90459579) | 東京医科大学・医学部・助教<br><br><br><br>(32645) |    |

## 6. 研究組織 (つづき)

|       | 氏名<br>(研究者番号)                                  | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 澤地 恭昇<br>(SAWAJI Yasunobu)<br><br>(20571152)   | 東京医科大学・医学部・助教(特任)<br><br>(32645) |    |
| 研究分担者 | 穴戸 孝明<br>(SHISHIDO Takaaki)<br><br>(70266500)  | 東京医科大学・医学部・准教授<br><br>(32645)    |    |
| 研究分担者 | 香取 庸一<br>(KATORI Yoichi)<br><br>(40233837)     | 東京医科大学・医学部・臨床講師<br><br>(32645)   |    |
| 研究分担者 | 立岩 俊之<br>(TATEIWA Toshiyuki)<br><br>(00424630) | 東京医科大学・医学部・講師<br><br>(32645)     |    |
| 研究分担者 | 山本 謙吾<br>(YAMAMOTO Kengo)<br><br>(10246316)    | 東京医科大学・医学部・主任教授<br><br>(32645)   |    |