

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K03744

研究課題名（和文）ラマンイメージングによる分子・結晶スケール構造解析に基づく関節軟骨力学機能評価法

研究課題名（英文）Mechanical evaluation for articular cartilage based on molecular and crystal scaled structural analysis by Raman imaging

研究代表者

東藤 正浩（Masahiro, Todoh）

北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：10314402

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：変形性膝関節症の罹患者が高齢化とともに増加しており、早急な原因の究明と治療法の確立が求められている。本研究では、軟骨の応力による内部構造変化を解析することで、変形性膝関節症進行度の定量的評価を行うことを目的とした。ラマン分光法は物質に可視光を当てた際に発するラマン散乱を利用し、それをラマンシフトというスペクトルとして出力する方法である。実験では軟骨成分であるコラーゲン成分のピークが、圧縮前後で移動することを確認できた。また、変性処理の有無により、圧縮負荷をかける前後のラマンスペクトルを比較すると、ピークの位置変化に違いがあることが確認され、軟骨の変性状態を取得する可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、ラマン分光法と力学負荷を組み合わせることで、通常軟骨と変性軟骨を区別できることを示すことができた。また、応力緩和中の軟骨表面組織の状態をラマンスペクトルから読み取れることが示された。これらの結果より、ラマン分光法と力学負荷を組み合わせることで、OA 初期段階における軟骨の異常診断、プロトタイプ等の臨床応用にも有効となる可能性が示された。このことは、低侵襲かつ定量的な関節軟骨機能評価手法によって、初期関節症の早期発見の可能性を示すものであり、本手法に基づく医療診断装置が実現できれば、患者への負担も大幅に抑制できるものである。

研究成果の概要（英文）：The number of people suffering from knee osteoarthritis is increasing with the aging of the population, and there is an urgent need to investigate the cause and establish a treatment method. The purpose of this study was to quantitatively evaluate the progression of knee osteoarthritis by analyzing changes in the internal structure of cartilage due to stress. Raman spectroscopy is a method that uses the Raman scattering that is emitted when a material is exposed to visible light and outputs it as a spectrum called Raman shift. In the experiment, it was confirmed that the peak of the collagen component, which is a cartilage component, shifted before and after compression. Furthermore, when we compared the Raman spectra before and after applying a compressive load with and without degeneration treatment, we confirmed that there was a difference in the change in the peak position, indicating the possibility of obtaining the degeneration state of cartilage.

研究分野：生体機械工学

キーワード：生物・生体工学 生体分子 医療・福祉 関節軟骨 ラマン分光

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) は生活機能を著しく低下させる疾患の一つである。その有病率は 1 千万人以上に上り、今後もその患者数は増加すると予想される。関節軟骨は関節において、骨端を覆い、荷重の伝達と潤滑という二つの大きな機能を担っている。軟骨は乏血行性により自然修復がほとんど期待できず、損傷を受けた場合、徐々に変性が進行し重篤な症状になる危険性を有している。しかし、初期の関節症であれば、高分子ゲルの関節内注射、リハビリなどの保存的治療が有効であり、患者への負担も大幅に抑制できる。そのため早期の関節軟骨変性の特定が極めて重要である。しかし現在の診断手法では、内視鏡による軟骨表面外観観察にとどまり、一定の変性進行後の特定に制限され、早期発見は難しい。また染色による軟骨基質の組織学的診断法もあるが、組織採取の必要があり、侵襲的手法という制約がある。それゆえ低侵襲かつ定量的な関節軟骨機能評価手法の実現が望まれている。

これまで X 線回折を用いた生体骨組織の応力測定法に関する研究に取り組んできた。骨組織内のミクロなアパタイト結晶およびコラーゲン分子のひずみ情報に基づくマクロ応力測定に関する研究を行ってきた。一方、関節軟骨の摩擦特性評価手法に関する研究にも取り組んできた。振り子摩擦試験機を作製し、OA 膝関節ならびに高分子ゲル薬剤投与膝関節のマクロな定量的摩擦特性評価手法を考案した。これらの研究成果から、関節軟骨の分子スケールでの力学的検討が詳細な軟骨機能特性評価に極めて有効であると認識し、本研究課題を実施するに至った。現在、高度に変性が進んだ症例には、損傷した関節を切除し、金属や高分子材料で代替する人工関節置換術が広く行われている。また近年では、再生軟骨の移植に関する基礎研究も行われている。しかし、初期の関節症であれば、高分子ゲルの関節内注射、リハビリなどの保存的治療が有効であり、患者への負担も大幅に抑制できる。そのため早期の関節軟骨変性の特定が極めて重要である。しかし現在の診断手法では、内視鏡による軟骨表面外観観察にとどまり、一定の変性進行後の特定に制限され、早期発見は難しい。また染色による軟骨基質の組織学的診断法もあるが、組織採取の必要があり、侵襲的手法という制約がある。そのため、低侵襲かつ定量的な関節軟骨機能評価手法が望まれているが、実現には至っていない。そこで本研究では、軟骨基質内のコラーゲンおよびプロテオグリカンの組成およびその力学挙動を測定可能とするラマン分光測定系を構築し、その微視的力学挙動観察から分子スケール軟骨力学モデルを提案し、新たな低侵襲軟骨機能診断システムの提案を目的とする。

2. 研究の目的

微視的には関節軟骨は、80%の水分と約 12%のコラーゲン、6%のプロテオグリカンからなる複合体である。そこで、光学的手法を用いた非侵襲的な関節軟骨診断手法の開発を最終的な目的とし、本研究課題の核心をなす学術的「問い」を「軟骨基質内コラーゲンおよびプロテオグリカンの分子スケール力学特性が、関節軟骨の組織的な機能特性に対してどのように寄与しているか」におき、ラマン分光測定により、その微視的力学挙動観察から分子スケール軟骨力学モデルを提案するとともに、そのモデルを用いラマン分光測定により同定された特性パラメータからマクロな力学特性を推定する新たな低侵襲軟骨機能診断システムの提案をすることを目的とする。

3. 研究の方法

研究に使用した試験片は、寸法約 $3 \times 3 \times 1.5$ mm で、ブタ膝関節より以下の手順で取得した。

- (1) 膝関節周りの骨から大腿骨を取得し、大腿骨外側・内側の軟骨部位を切り出した。
- (2) 採取した部位を、ダイヤモンドソー (MODEL 650: South Bay Technology, USA) で厚さ約 3 mm に輪切りにした。
- (3) 軟骨表面が比較的平らな部位を再び幅 3 mm で切除し、軟骨下骨より表層の部分 1.5 mm を切り出した。
- (4) 無処理のままのものを健常な通常軟骨の試験片、2.5%のトリプシン溶液にて恒温炉で 12 時間反応させ、軟骨内のプロテオグリカンを分解させたものを変性軟骨の試験片として用いた。トリプシンには、ウシ膵臓由来のトリプシン 500mg (富士フィルム和光純薬) を用いた。
- (5) 通常・変性試験片どちらも、生理食塩水ですすいだ後、別の容器に同液で浸した状態で、計測まで冷蔵庫にて保存した。

ラマン分光装置内という限られた空間内で、レーザー照射方向から試験片に徐々に負荷をかけながらスペクトル測定をするために、本研究では、軟骨を圧縮する治具を製作し、計測に使用している。本体は軽量で加工のしやすいアルミニウムを使用した。試験片を上から押さえるためにプラスチックカバーを使用した。はりの片側に設置したロードセル (LMB-A-200N, Kyowa) をマイクロメーターヘッド (MHT-6.5, Mitutoyo) で押すことで試験片を下から圧縮する。この治具により段階的に圧縮応力をかけながら、ラマンスペクトルを計測することが可能となった。

まず、実験 1 では、軟骨試験片を段階的に圧縮していき、それぞれの圧縮段階ごとにラマンスペクトルを取得していった。その後、スペクトル内の軟骨成分特有のピークが、加えた圧縮荷重ごとにどう変化していくかを解析した。最終的に、通常軟骨と変性軟骨での結果の相違を調べた。以下に計測の手順を記す。

(1) 試験片を治具に載せた状態で、マイクロメーターヘッドの位置を調整し、梁・試験片・プラスチックカバーがそれぞれ変形せずに接触している位置で止めた。その時のマイクロメーターの目盛りを基準値とし、圧縮変位ゼロの状態とした。

(2) ロードセルに加わる荷重の記録を開始した。

(3) マイクロメーターヘッドを止めた状態で、軟骨試験片のラマンスペクトルを取得した。

(4) マイクロメーターの位置を、目盛りを基準として 1~5mm で昇順に変化させ、1mm 間隔毎に(3)の計測を繰り返した。

(5) (4)の計測終了後、ロードセルに加わる荷重の記録を停止した。

計測では、顕微ラマンマイクロスコープで、レンズ倍率 5 倍、焦点は軟骨表面に合わせ、785 nm レーザーを用いたラマンマッピングを用いた。一つの試験片につき 210×210 [μm]の範囲で 8×8 の計 64 点の測定点でスペクトルを得た。測定点 1 つにつき、レーザーパワーは 100%、照射時間は 10 秒とした。ノイズ除去や軟骨表面のコラーゲンの配向性を 39 ならすため、解析では、この 64 個のスペクトルを平均化したものを用いた。

実験 2 では、軟骨試験片を特定の変位で圧縮していき、それぞれの圧縮段階ごとに、圧縮負荷をかけた直後から経過時間を考慮したラマンスペクトルを取得した。その後、スペクトル内の軟骨成分特有のピークが、加えた圧縮荷重ごとにどう変化していくかを解析した。最終的に、通常軟骨と変性軟骨での結果の相違を調べた。以下に計測の手順を記す。

(1) 試験片を治具に載せた状態で、マイクロメーターヘッドの位置を調整し、梁・試験片・プラスチックカバーがそれぞれ変形せずに接触している位置で止めた。その時のマイクロメーターの目盛りを基準値とし、圧縮変位ゼロの状態とした。

(2) ロードセルに加わる荷重の記録をはじめた。

(3) マイクロメーターヘッドを止めた状態で、軟骨試験片のラマンスペクトルを取得した。変位ゼロの場合、はじめに記録したスペクトルを 0 秒経過後のスペクトルとした。計測が終わって 10 秒経過後に、再度同じ地点、同じ条件で軟骨試験片のスペクトルを取得した。計測時間は約 20 秒なので、先のスペクトルを 30 秒経過後のスペクトルとした。同様に、60、90、120、150、180 秒経過後のスペクトルを取得した。

(4) マイクロメーターの位置を、目盛りを基準として 2mm、5mm と昇順に変化させ、それぞれの変位毎に の計測を繰り返す。2mm、5mm それぞれの変位において、マイクロメーターヘッドを動かし、圧縮負荷をかけた直後に計測し始めたラマンスペクトルを、0 秒経過後のスペクトルとした。

(5) (4)の計測終了後、ロードセルに加わる荷重の記録を停止した。

計測では、顕微ラマンマイクロスコープで、レンズ倍率 5 倍、焦点はプラスチックカバー表面に合わせ、785 nm レーザーを用いたシングルポイントラマンを用いた。応力緩和は、負荷をかけてから 1 分以内に顕著に変化するので、一つの試験片につき照射時間 20 秒のシングルポイントでスペクトルを得た。

4. 研究成果

軟骨試験片を段階的に圧縮していき、負荷ごとに、圧縮方向から軟骨表面のラマンスペクトルを取得した実験では、計測したスペクトルから、軟骨成分特有のピークが現れるラマンシフトを、重心法を用いて同定した。その値から、負荷ごとのピーク位置の変化を軟骨成分ごとにまとめた。結果、複数の軟骨成分のピークにおいて、通常軟骨と変性軟骨で異なるピークの推移が確認された。波数 920 付近に現れる成分ピークにおいては、通常軟骨と変性軟骨の最大圧縮におけるピーク位置総変化量の T 検定を行い、P 値が 0.05 未満となった。

一定の圧縮負荷における応力緩和中の軟骨のラマンスペクトルを経過時間ごとに計測した実験では、計測したスペクトルデータから、実験 1 と同様に軟骨成分のピーク位置の挙動を計測した。結果として、一部の軟骨成分のピークにおいて、応力緩和中に特徴的なピーク推移が確認された。Amide I は応力緩和中、経過時間毎にピークが緩やかに増加していくが、応力負荷を変え前後でピークが大きく変化している。しかし、通常軟骨と変性軟骨で、応力緩和中での明確な挙動の違いは確認できなかった。

これらの結果から、ラマン分光法と力学負荷を組み合わせることで、通常軟骨と変性軟骨を区別できることが示された。また、応力緩和中の軟骨表面組織の状態をラマンスペクトルから読み取れることが示された。これより、ラマン分光法と力学負荷を組み合わせることで、OA 初期段階における軟骨の異常診断、プローブ等の臨床応用にも有効となる可能性が示された。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 SAKAI Yuma, TODOH Masahiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Assessing the friction properties of synovial joint lubrication by tracking pendulum motion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 22-00199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1299/jbse.22-00199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 酒井佑実, 東藤正浩
2. 発表標題 振り子試験における関節瞬間中心の算出と摩擦特性評価
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会北海道支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水孝通, 東藤正浩
2. 発表標題 ラマン分光法による膝関節軟骨圧縮拳動計測法の検討
3. 学会等名 日本機械学会北海道支部第59回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuma Sakai, Masahiro Todoh
2. 発表標題 Friction properties of synovial joint lubrication by tracking pendulum motion
3. 学会等名 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立川圭悟, 東藤正浩
2. 発表標題 ラマン分光法による変性軟骨の圧縮負荷下における力学挙動計測
3. 学会等名 日本機械学会M&M2023材料力学カンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Bilgili HK, Todoh M
2. 発表標題 3D printing and mechanical characterization of dynamic bone tissue scaffolds with commercialized filaments
3. 学会等名 12th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関