

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791624

研究課題名（和文）超音響顕微鏡装置を利用した関節軟骨および軟骨下骨の同時評価法の確立

研究課題名（英文）Simultaneous evaluation of the articular cartilage and subchondral bone with photoacoustic microscopy

研究代表者

萩原 嘉廣（HAGIWARA YOSHIHIRO）

東北大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90436139

研究成果の概要（和文）：

超音響顕微鏡装置はナノ秒パルスレーザー光を照射し、超音響現象により発生した超音波を超音波振動子で受信し画像化する。この装置を用いて、関節軟骨ならびに軟骨下骨の質的評価を行った。本装置によって正常軟骨では弱い信号強度を示したが、軟骨下骨では強かった。変形関節症モデルにおいては、関節軟骨と軟骨下骨に強い信号強度を示した。血流の増加と関係するものと推察された。

研究成果の概要（英文）：

Photoacoustics (PA) imaging is the conversion of nano-second pulse lasers to ultrasound (US) by thermal expansion of the material. We evaluated the articular cartilage and subchondral bone with the PA method. It can

In the normal cartilage, low signal intensity was observed in the articular cartilage but high signal intensity in the cancellous bones in PA imaging. In the OA cartilage, higher signal intensity was observed in the articular cartilage and subchondral bone in PA imaging, which might indicate an increase of blood flow of them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：超音響顕微鏡装置、変形性関節症、超音波、非侵・接触型評価、レーザー

## 1. 研究開始当初の背景

平成19年4月、政府発表の「新健康フロンティア戦略」における“介護予防対策推進”の観点から、膝痛・腰痛対策に代表される運動器疾患対策の必要性が強調された。高齢者の膝痛の主な原因は変形性膝関節症であり、自覚症状を有する患者は約1000万人、潜在的な患者（単純レントゲン写真による患

者）は約3000万人と推定されている。また変形性腰痛症では、自覚症状を有する患者は約1000万人、潜在的な患者は約3300万人と推定されている。これら運動器疾患の発症数は、都市部よりも第一次産業の多い山村部に多いと推定されている。高齢者のQOLおよびADLを維持する上で変形性関節症の予防、早期診断は非常に重要である。特に

変形性膝関節症については、早期に軟骨変性を的確に診断することでその重症化を防ぎ、疼痛による“身体活動の低下、閉じこもり”の予防は、独居老人の増加している本邦においてはきわめて重要な課題である。

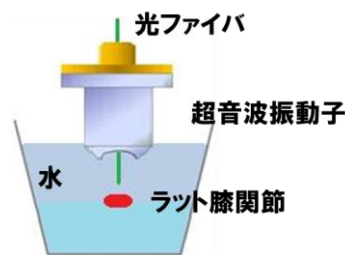
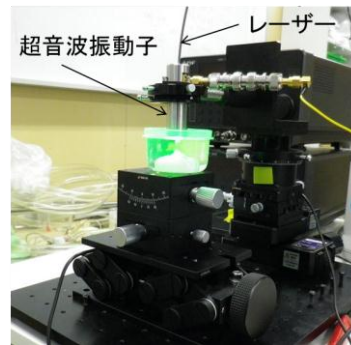
これまで研究代表者は「ラット膝関節不動化（拘縮）モデル」を独自に開発し、不動化関節における関節包と関節軟骨の変性に関する研究を行ってきた。東北大学医工学研究科・医用イメージング研究分野 西條芳文教授らが開発した、組織の弾性と深く関連する音速 (m/s) の計測が可能な「超音波顕微鏡」を用い、変性した関節包 (Ups J Med Sci 111, 303-313, 2006) および関節軟骨 (J Orthop Res, 27: 236-242, 2009) の弾性を計測し、関節包および関節軟骨の組織学的な変性と弾性の経時的な変化を明らかにしてきた。研究代表者は、平成 21 年～22 年度科学研究費 (若手 B)「三次元高周波超音波顕微鏡装置の関節軟骨評価への応用」により、ラット膝関節不動化モデルを用いて正常関節軟骨と変性関節軟骨、および軟骨下骨の性状の違いを明らかにした。西條教授らが開発した三次元高周波超音波顕微鏡装置は、非接触、非侵襲的に 10 ミクロンの高解像度で三次元構造が観察可能な装置である。しかしながら、99%の超音波が軟骨下骨表面で反射されるため、軟骨下骨の評価に関しては十分とは言えない。西條教授らが開発した「光音響顕微鏡装置」は物質にナノ秒オーダーのレーザー光を照射するときに発生する超音波を検出することをその原理とする。三次元高周波超音波診断装置を応用し、非接触的に中心周波数 40MHz の高周波数超音波振動子を組織上で二次元的に走査することで、レーザーにより発生した超音波を検出するので、距離及び方位分解能に優れたイメージングシステムである。

## 2. 研究の目的

光音響顕微鏡装置を用いて、正常な関節軟骨ならびに軟骨下骨の質的評価の基礎的なデータの収集、また独自に開発した変形性関節症モデルを用い、関節軟骨・軟骨下骨の経時的変化のデータ収集を目的とする。

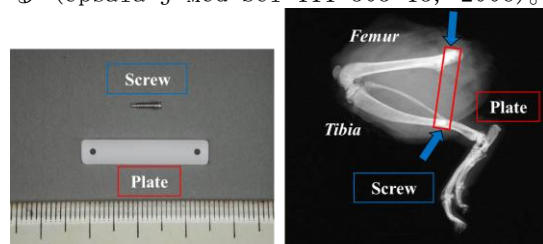
## 3. 研究の方法

(1) オス Sprague-Dawley rats (体重 380-400g) を使用する。麻酔下に膝周囲の体毛を除毛クリームで丁寧に除去後、膝関節を展開する。前・後十字靭帯、内・外側々副靭帯を切離し、骨幹部で大腿骨、脛骨を切断し、計測用のサンプルを採取する。専用の支持台で骨・軟骨柱を保持し、三次元超音波顕微鏡装置で計測する。関節軟骨、軟骨下骨の評価に最適な周波数、ビーム幅、焦点距離を決定する。



(2) 光音響顕微鏡装置で観察を終えた骨・軟骨柱を 4%パラフォルム・アルデヒド溶液で浸漬固定を行い、脱灰後にパラフィンブロック包埋を行う。5 マイクロメートルの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光音響画像と組織像の比較を行う。

(3) 独自に開発したラット膝関節不動化モデルにおいて、経時的に関節軟骨の変性を確認しており、このモデルを用いて光音響顕微鏡装置での評価を行う。具体的なモデル作成方法は、麻酔下に片側下肢へ膝関節包に触れないようにプラスチックプレートを経皮的に挿入し、膝関節屈曲 150° でプラスチックプレートの両端を大腿骨近位外側部と脛骨遠位外側部にミニスクリューで不動化する (Upsala J Med Sci 111:303-13, 2006)。



不動化期間は先行研究 (J Orthop Res, 27: 236-242, 2009) から、4, 8 週間とする。反対側をコントロールとして用い、同様に関節軟骨-骨複合体を採取する。観察を終えたサンプルをパラフォルム・アルデヒド溶液で固定し、同様にパラフィン切片を作製する。

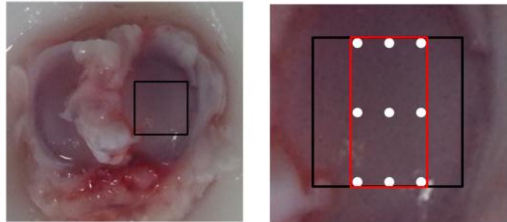
(4) 得られた光音響画像を関節軟骨と軟骨下骨に分け、不動化側、コントロール側での信号強度の比較を行う。また、三次元画像を合成する。

(5) 統計処理

3 群間の比較では多重比較に Bonferroni/Dunn post hoc multiple comparisons を用いた ANOVA 検定を行った。

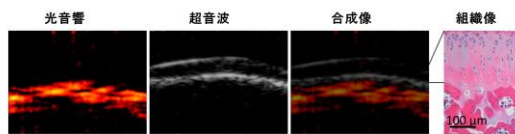
4. 研究成果

(1) 大腿骨、脛骨では関節軟骨の曲面が小さい、脛骨の方が光音響顕微鏡装置の観測に適していた。以後、脛骨での観察を行った。関節軟骨および軟骨下骨の評価に最適な半導体レーザー出力、凹面超音波振動子の設定を行った。半導体レーザーはレーザー出力：420 μJ、波長：532nm パルス幅 3.2ns、繰り返し周波数 50Hz、また超音波振動子は中心周波数 50MHz、焦点距離 15mm が最適であった。以後、この設定での観察を行った。

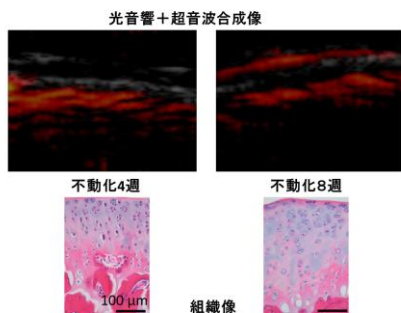


脛骨関節面に上記のごとく観察領域（黒四角）を設定し、その中で関節軟骨の比較的平坦な領域（赤四角）内の9点（白点）で海綿骨から発生する信号強度の平均をとることとした。

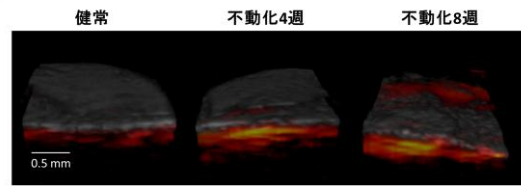
(2) 従来の超音波では軟骨および石灰化層しか描出できなかったが、光音響顕微鏡装置では軟骨下骨の描出も可能であった。



(3) 不動化 4 週において超音波で関節軟骨表層の不整が確認された。不動化 8 週では超音波での関節軟骨の描出が困難となったが、光音響では関節軟骨および軟骨下骨の描出が可能であった。

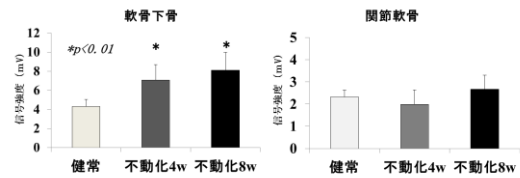


(4) 超音波、光音響の 3 次元合成像から、不動化期間とともに関節軟骨表面の不整および関節軟骨内の光音響強度の上昇が確認できた。



三次元画像：超音波：グレースケール、光音響：ホットスケール

光音響信号の比較を行うと、健常群と比較して、不動化 4, 8 週群では海綿骨の信号強度が有意に上昇していた。関節軟骨では有意差はなかった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Three-dimensional Photoacoustic Imaging of Cartilage-Bone Complex. Takuya Izumi, Mika Sato, Yutaka Yabe, Yoshihiro Hagiwara, Yoshifumi Saijo.

the International Congress on Ultrasonics (ICU 2013), May 2-5, 2013, Singapore.

2. PHOTOACOUSTIC IMAGING OF CARTILAGE-BONE COMPLEX. Yoshihiro Hagiwara, Takuya Izumi, Yutaka Yabe, Kenji Kanazawa, Akira Ando, Yoshifumi Saijo, Eiji Itoi. The 2013 Osteoarthritis Research Society

International World Congress, Philadelphia, Pennsylvania, April 18-21, 2013, USA.

3. 半導体レーザーを用いた光音響顕微鏡によるラット膝関節の評価. 和泉拓哉, 佐藤みか, 長岡亮, 萩原嘉麿, 西條芳文. 東北大学電気通信研究所 超音波エレクトロニクス研究会 (共催: 日本超音波医学会 基礎技術研究会、第四回アコースティックイメージング研究会), 2012年12月13日, 仙台.

4. 半導体レーザーを用いたマウス膝軟骨の光音響イメージング. 和泉拓哉, 三井田佑輔, 長岡亮, 佐藤みか, 松浦祐司, 萩原嘉麿, 西條芳文. 第33回超音波エレクトロニ

クスの基礎と応用に関するシンポジウム  
2012年11月13日～2012年11月15日，千葉.

5. Photoacoustic Imaging of Rat Knee Joint.  
Takuya Izumi, Mika Sato, Yoshihiro Hagiwara, Yoshifumi Saijo. 2012 IEEE International Ultrasonics Symposium, Oct 7-10, 2012, Dresden, Germany.

6. 光音響顕微鏡によるマウス膝軟骨の観察.  
和泉 拓哉, 三井田 佑輔, 長岡 亮, 佐藤 みか, 松浦 祐司, 萩原 嘉廣, 西條 芳文.  
生体医工学シンポジウム2012. 2012年09月07日～2012年09月08日，大阪.

7. 光音響顕微鏡によるマウス膝軟骨の観察.  
和泉拓哉, 三井田佑輔, 長岡 亮, 久保聖乃, 小島貴則, 佐藤みか, 萩原嘉廣, 西條芳文.  
日本超音波医学会第85回学術集会. 2012年05月25日～2012年05月27日，東京.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

萩原 嘉廣 (HAGIWARA YOSHIHIRO)  
東北大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：90436139

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

西條 芳文 (SAIJO YOSHIFUMI)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：00292277