

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：34507

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890234

研究課題名（和文）

造影剤を用いた関節軟骨超音波評価法の開発

研究課題名（英文）

Ultrasonic assessment of articular cartilage using contrast medium

研究代表者

服部 耕治 (HATTORI KOJI)

甲南女子大学・教授

研究者番号：30382310

研究成果の概要（和文）：これまで我々は超音波を用いた関節軟骨定量評価システムを開発してきた。しかしながら、このシステムでは、軟骨表層の変性をとらえることができても、関節軟骨全層を評価することはできなかった。そこで我々は関節軟骨超音波評価システムにおいて超音波造影剤が有効に作用するかどうか調査した。関節軟骨試料からの超音波反射波は A モードエコーとして表示される。この A モードエコーのピークピーク値を評価の指標とした。軟骨試料を造影剤に浸透後、生理食塩水中で超音波計測を行った。超音波造影剤によって最大ピークピーク値は 5.3～9.8 倍に増強された。また、超音波造影剤は、生理食塩水に浸透後 2 分で最大となり、その後徐々に低下していく造影動態を示した。我々の研究は関節軟骨の超音波評価に造影剤を用いることで、関節軟骨の生体力学的な特性を予測できることを示した。

研究成果の概要（英文）：We have developed the ultrasonic evaluation system for articular cartilage. However this system could detect degeneration of cartilage surface, but could not detect biomechanical properties of all layers of articular cartilage. We investigated the effectiveness of ultrasonic contrast medium for the evaluation system of articular cartilage. The reflex echogram from articular cartilage was shown as A-mode echogram. The peak-peak value was used as a quantitative index of articular cartilage. Cartilage sample was immersed into contrast medium for 10 minutes and after that, the sample was immersed in saline and analyzed by the ultrasonic evaluation system. The maximum peak-peak value of samples with contrast medium was 5.3 to 9.8 times higher than the sample without contrast medium. The peak-peak value of sample with contrast medium show the maximum within 2 minutes and decreased as the duration of saline immersion increased. Our finding indicated that ultrasound analysis using contrast medium can predict the biomechanical behavior of articular cartilage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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：関節軟骨、超音波、造影剤

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は一旦損傷すると完全に治癒しないと言われており、治療手段も無ければ、軟骨の定量的評価技術も無かった。再生医療技術の進歩に伴い、新たな関節軟骨の治療方法として損傷部への細胞や組織の移植治療が開発された。例えば、関節非荷重部の軟骨組織の一部を採取し、酵素処理によって細胞を単離し、体外で培養・増殖した後に、軟骨損傷部に移植をする自己培養軟骨細胞移植術治療は、1994年にBrittbergらによって良好な臨床成績が報告された。さらに、1995年には米国Genzyme社によって事業化され、欧米を中心に全世界に普及し、全世界で1万例以上の軟骨損傷へ臨床応用されてきた。他に、関節非荷重部から骨軟骨柱を専用の機器で採取し、軟骨損傷部に移植する骨軟骨移植術（モザイクプラスチック）も世界的に行われている。これら軟骨再生医療が臨床応用されているにもかかわらず、関節軟骨を定量的に評価する検査技術は立ち遅れている。

2. 研究の目的

これまで関節軟骨を定量的に評価することは困難であった。整形外科領域では、関節鏡による軟骨表面の観察や、probe hookを押し当てることでの軟骨のかたさ判定、あるいは病理組織生検といった侵襲的方法による評価しかなかった。我々はこれまで超音波を用いた関節軟骨定量評価法を研究・開発してきた。In vitro studyでウェーブレット変換を用いた超音波反射波解析を行い、超音波を用いた関節軟骨の定量化に成功した。さらに、単一の超音波素子を搭載した超音波プローブを作製し、ヒト生体関節軟骨を評価できる

ことを確認した。2006～2007年度は若手研究(B)の助成を得て、測定機器の改良に努め、操作性が容易な機器となった。

しかし、超音波は大部分関節表面（関節軟骨と検査に使用する生理食塩水との境界）で反射されるため、関節軟骨の表層の状態のみを定量評価できるにすぎず、関節軟骨全体を評価を行うことができない。そこで、それらの問題を解決すべく、超音波用造影剤を活用した関節軟骨定量評価法を提案し、これまで開発してきた方法に超音波用造影剤を併用することで、ヒト生体関節軟骨全体の定量評価を目指した。

3. 研究の方法

2011年度、これまでの研究によって構築してきた超音波関節軟骨測定装置を用いて、超音波造影剤の効果について検討した。まず、実験のために使用を計画した医療用造影剤のうち、ペルフルブタンは購入できたが、ガラクトースパルミチン酸混合物は（市場への供給不足により、病院施設へ優先的に供給されたため）入手できなかった。それなので、ペルフルブタンのみで実験を開始した。超音波関節軟骨測定装置での計測を開始したが、造影剤の周囲への遊離・拡散が予想していたよりも早く、測定のための生理食塩水の入った水槽へすぐに拡散して、超音波反射信号へのアーチファクトが著しくなり、データ取得ができなかった。そのため、灌流法により遊離造影剤を排出させて測定する方法へ変更を余儀なくされた。そこで試料の超音波計測を行う実験槽に生理食塩水で灌流出来る装置を作製し、計測できるように装置を改良した。改良後の予備的検討により、1000ml/hourの生理食塩水の灌流を測定水槽にすることでアーチファクトが著しく低減できた。

そこで、2011年度末から造影剤浸含した関

節軟骨の超音波測定を開始した。①造影剤による超音波関節軟骨測定の有効性については、関節軟骨試料をペルフルブタンに浸漬する前後で、超音波反射波計測を行い、どの程度超音波反射波が増強されるかどうか確認した。②造影剤の最適な浸漬時間については、関節軟骨を造影剤に浸漬させる時間条件をさまざまに変えて試料を作製し、超音波検査を行い、反射波増強データを採取した。③造影剤浸漬の諸条件を決定後、造影剤浸漬後の関節軟骨試料の経時的な計測を行い、その造影特性について調査した。①～③の実験の指標として、関節軟骨からの超音波反射波のピークピーク値と相対的ピークピーク値（計測時のピークピーク値/最大ピークピーク値）を使用した（図1）。

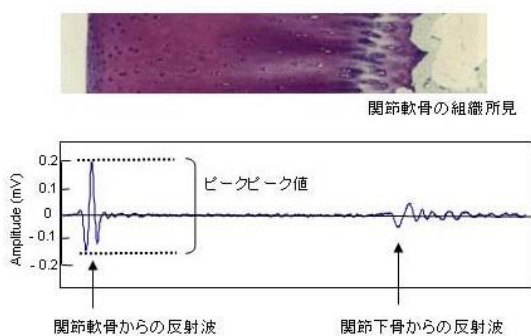


図1 超音波計測データ

4. 研究成果

①超音波造影剤の関節軟骨への増強効果について：軟骨試料を造影剤ペルフルブタンに浸透させることで、超音波反射波信号は 5.3～9.8 倍（平均 7.5 倍）の増強効果が得られた。②造影剤の最適な浸透時間と浸透度について：造影剤への軟骨試料への浸透時間条件を振って検討した。直径 6mm 厚さ 1.5mm の軟骨試料の場合、10 分以上浸透時間を延長しても、結果にそれ程の違いはなく、約 10 分間の浸透時間で十分な造影効果を得ることを

確認した。③造影剤の軟骨試料からの遊離動態について：軟骨試料を 10 分間造影剤に浸けた後、灌流装置付きの水槽に試料を設置し、超音波計測を経時的に行ったところ、最初の約 2 分で軟骨表面の超音波反射波（ピークピーク値）は最大となり、その後約 20 分かかけて急減し、以降約 40 分間程度漸減するという造影剤の遊離動態の結果を得た（図2）。

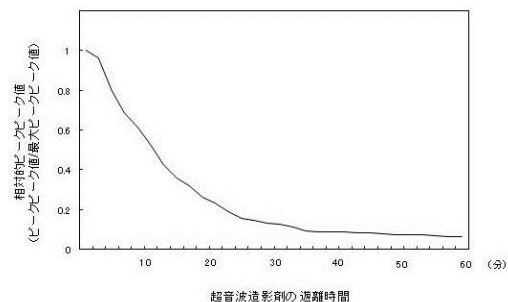


図2 関節軟骨における超音波造影剤の信号増強動態

この造影剤の遊離動態は関節軟骨の水の移動を反映していると考えられ、関節軟骨の状態を評価するための一指標となると考える。超音波造影剤ペルフルブタンの関節軟骨への造影効果・浸透特性や関節軟骨からの遊離特性を明らかにできたため、次に臨床を模擬して、豚膝関節腔内に造影剤を注入し、超音波プローブを関節腔内に入れて関節軟骨の超音波特性の計測を行った。しかし灌流がうまく行かず、計測精度が著しく低下した。生体でも同様に計測に適した新しい灌流システムの開発が必要であると考え、研究を継続している。

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 4 件）

① Mizuta N, Hattori K, Suzawa Y, Iwai S, Matsumoto T, Tadokoro M, Nakano T, Akashi M, Ohgushi H, Yura Y, Mesenchymal stromal cells improve the osteogenic capabilities of mineralized agarose gels in a rat full-thickness cranial defect model, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 査読有, 7 巻, (2013), 51-60

② Yokoi M, Hattori K, Narikawa K, Ohgushi H, Tadokoro M, Hoshi K, Takato T, Myoui A, Nanno K, Kato Y, Kanawa M, Sugawara K, Kobo T, Ushida T, Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 査読有, 6 巻, (2012), 550-558

③ Ohnishi H, Oda Y, Aoki T, Tadokoro M, Katsube Y, Ohgushi H, Hattori K, Yuba S, A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 査読有, 6 巻, (2012), 261-271

④ Tadokoro M, Matsushima A, Kotobuki N, Hirose M, Kimura Y, Tabata Y, Hattori K, Ohgushi H, Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and β -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 査

読有, 6 巻, (2012), 253-260

[学会発表] (計 1 件)

① 服部耕治、日進月歩の関節軟骨評価技術開発、第 27 回日本整形外科基礎学術集会 2012.10.27 名古屋国際会議場