

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420001

研究課題名(和文) ラマン分光法を利用した分子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 Structure Analysis Using Raman Spectroscopy

研究代表者

東藤 正浩 (TODOH, MASAHIRO)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10314402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症は過剰な力学的負荷が原因で発症する関節軟骨の退行性疾患であり、高齢者の日常活動性および生活の質を阻害する最も多い原因の一つである。高齢化が進む中で、この病態を十分に把握し、適切な診断を行うことが求められている。生体組織を解析する手法の一つとしてラマン分光法がある。本研究では、コラーゲン、プロテオグリカンなどの高分子化合物から構成される膝関節軟骨の力学特性評価法として、ラマン分光法を用いた、ウシ大腿骨から膝関節軟骨試験片を採取し、顕微レーザーラマン分光装置によりラマンスペクトル解析を行い、力学的負荷に対する膝関節軟骨のラマンスペクトルの応答について調査した。

研究成果の概要(英文)：In this study, component analysis as mechanical evaluation was performed by Raman spectroscopy for cartilage consisted by macromolecule (such as collagen fiber and proteoglycan). Raman spectroscopy is a vibrational spectroscopy by Raman scattering, and allows simultaneous measurement of organic and inorganic components. The spectroscopy is suitable for measurement of biological samples because of little effect on water. The cartilage specimens were cut out from bovine knee joint and their Raman spectrum were analyzed under compressive loading. In addition, load response to cartilage by the spectroscopy. The results of Raman shift for hydroxyproline, proline, phenylalanine and Amide I show the mechanical response. Therefore, this study indicated the possibility of stress analysis for cartilage with Raman spectroscopy

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス ラマン分光 関節軟骨 コラーゲン プロテオグリカン

### 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、近年の高齢化社会の到来によ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。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の実現が望まれている。

### 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。荷重に応じてこれらが変形するとともに、関節液が基質内を移動し、潤滑機能を高めている。そのためこれらの構成成分の力学特性が測定できれば、軟骨組織の機能評価に重要な情報をもたらす。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軟骨機能評価手法の提案を目的とする。

本研究では、コラーゲン、プロテオグリカンなどの高分子化合物から構成される膝関節軟骨の力学特性評価法として、ラマン分光法を用いた。ウシ大腿骨から膝関節軟骨試験片を採取し、顕微レーザーラマン分光装置によりラマンスペクトル解析を行い、力学的負荷に対する膝関節軟骨のラマンスペクトルの応答について調査した。

### 3. 研究の方法

#### 測定試料

ウシ大腿骨の膝関節軟骨から試験片を採取した。医療用ディスポーザブルメスを用いて骨表面から軟骨のみを切り出し、その後コルクボーラーで円筒状にくり抜いた。試験片の

形状は直径4.2 mm、厚さ1.5 mmの円筒形とし、試験片数は5とした。

#### ラマン分光解析実験

単一の振動数  $\nu_1$  を持つ励起レーザーを、固有の分子振動数  $\nu$  を持つ物質に照射すると、レイリー散乱による励起レーザーと等しい振動数  $\nu_1$  の散乱光の他に、ストークス散乱による振動数  $\nu_1 - \nu$  の散乱光、アンチストークス散乱による振動数  $\nu_1 + \nu$  の散乱光が観測される。入射光とストークス散乱光との振動数の差  $\nu$  をラマンシフトと呼び、これは物質固有の値を取るため、ラマン分光測定を用いて物質の特定やその特性を知ることができる。

本研究では、北海道大学創生科学研究棟オープンファシリティの顕微ラマンマイクロスコプシステム (in Via Reflex, Renishaw) を使用し、励起レーザーとして NIR レーザ (HPNIR785, Renishaw: 波長785nm) を用いた。

#### 圧縮負荷デバイス

軟骨試験片に圧縮負荷をかけるため、図1に示すような圧縮試験機を用いた。直径4.2mmの穴をあけたアクリル土台に軟骨試験片を設置し、その両側から同じ直径の金属製圧子を挿入することで圧縮負荷をかけた。ラマン分光観測のための光の出入口として、直径0.8mmの観測窓を設けた。

圧縮負荷は軟骨表面とその対面の方向から負荷し、軟骨表面と直行する断面に対してラマン分光測定を行った。

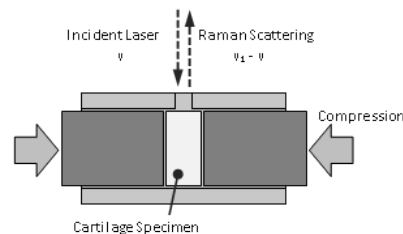


図1 軟骨ラマン分光用圧縮負荷デバイス

#### 実験条件とデータ解析

ラマン分光測定の測定条件として、レーザー波長は785 nm、レンズ倍率は×20、照射時間は10秒とした。

圧縮負荷は0 N (無負荷)、10 N (0.7MPa)、20 N (1.4MPa)、30 N (2.2MPa) の4つの条件で測定を行った。それぞれのスペクトルからピークの位置のラマンシフト  $\nu_p$  を求めるには重心法を用いた。

### 4. 研究成果

各負荷状態のスペクトルからピーク位置のラマンシフトを求め、無負荷時のピーク位置のラマンシフトと比較した変化量を図2に示す。Proline, C-C stretch, Phenylalanine, CH<sub>2</sub> bending, Amide I で圧縮負荷に対してピーク位置のラマンシフトが負方向に変化する傾

向が見られ,  $SO_3^-$  stretch, Hydroxyproline では正方向に変化する傾向が見られた。特に, Proline, Phenylalanine,  $CH_2$  bending においては変化量に有意性が認められ, その中でも Proline に関しては圧縮負荷の大きさに応じてピーク位置のラマンシフトの変化量も大きくなっていることが確認された。

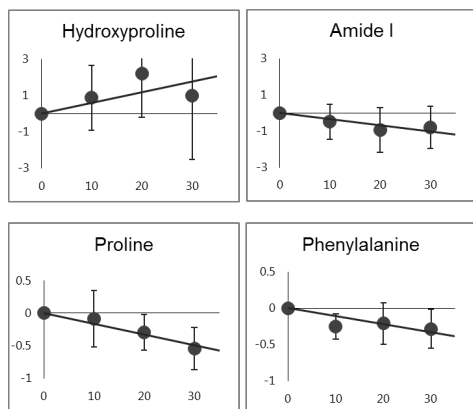


図2 圧縮負荷に対する各ラマンシフト変化

変化に有意性が見られた成分のうち, Proline, Phenylalanine は主に軟骨のコラーゲンを構成する物質であり, これらの成分は圧縮負荷に対して応答を示す軟骨中の成分として認めることができる。また, 軟骨のプロテオグリカンの成分の中で圧縮負荷に対し有意に応答を示す成分は認められなかった。

本研究では, ラマン分光測定を用いて, ウシ膝関節軟骨の圧縮負荷に対する応答を評価した。膝関節軟骨に含まれる成分を由来とするピークのうち Proline, Phenylalanine,  $CH_2$  bending のピークは圧縮負荷に対して有意な応答性を持つことが確認された。今後, 負荷条件や測定条件などの検討を行うことで, 軟骨組織の力学的評価法としての有効性をさらに向上させる可能性を示すことができた。

## 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3件)

- (1) Baba R, Onodera T, Momma D, Matsuoka M, Hontani K, Elmorsy S, Endo K, Todo M, Tadano S, Iwasaki N, A novel bone marrow stimulation technique augmented by administration of ultrapurified alginate gel enhances osteochondral repair in a rabbit model, *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 査読有, Vol. 21, 2015, 1263-1273. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0128
- (2) Tsukuda Y, Onodera T, Ito M, Izumisawa Y, Kasahara Y, Igarashi T, Ohzawa N, Todo M, Tadano S, Iwasaki N, Therapeutic effects of intra-articular ultra-purified low endotoxin

alginate administration on an experimental canine osteoarthritis model, *Journal of Biomedical Material Research Part A*, 査読有, Vol. 103, 2015, 3441-3448.

DOI: 10.1002/jbm.a.35490

- (3) Elmorsy S, Funakoshi T, Sasazawa F, Todo M, Tadano S, Iwasaki N, Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model, *Osteoarthritis and Cartilage*, 査読有, Vol. 22, 2014, 121-127.

〔学会発表〕(計14件)

- (1) 東藤正浩, 上菴義亮, 但野茂, 家兎膝関節軟骨の摩擦特性と微視構造特性, 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016年1月9-10日, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京都目黒区。
- (2) Todo M, Tadano S, Observation of mechanical response of mineral and organic phases in bone tissue by Raman spectroscopy, 12th International Conference on Flow Dynamics, October 27-29, 2015, Sendai International Center, Sendai, Japan.
- (3) Todo M, Tadano S, Mechanical analysis of bone tissue as mineral and organic composite by Raman spectroscopy, 2015 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference, June 17-20, 2015, Cliff Lodge Conference Center, Snowbird, USA.
- (4) 東藤正浩, 但野茂, 岩崎倫政, 振り子法による家兎膝関節の摩擦・粘弾性測定, 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会2014, 2014年9月24-26日, ルスツリゾート, 北海道虻田郡。
- (5) Todo M, Tadano S, Laser Raman phenomena of cortical bone under tensile loading, 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, September 1-4, 2014, Shima Kanko Hotel the Classic, Shima, Japan.
- (6) 東藤正浩, 但野茂, 膝関節軟骨の圧縮負荷とラマンシフトの関係, 日本機械学会M&M2014材料力学カンファレンス, 2014年7月18-21日, 福島大学金谷川キャンパス, 福島市。
- (7) Todo M, Tadano S, Iwasaki N, Frictional and viscoelastic properties of joint cartilage by pendulum test, 7th World Congress of Biomechanics, July 6-11, 2014, John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center, Boston, USA.
- (8) 東藤正浩, 但野茂, ラマン分光法による関節軟骨の力学挙動解析, 第34回日本骨形態計測学会, 2014年6月12-14日, さっぽろ芸文館, 札幌市。
- (9) 東藤正浩, 但野茂, ラマン分光解析による膝関節軟骨の力学挙動観察, 日本機械学会第26回バイオエンジニアリング講

演会, 2014 年 1 月 11-12 日, 東北大学片平キャンパス, 仙台市.

- (10) Todo M, Tadano S, Mechanical analysis of mineral and collagen phases in bone by Raman spectroscopy, 15th International Conference on Biomedical Engineering, December 4-7, 2013, National University of Singapore, Singapore.
- (11) 東藤正浩, 但野茂, 膝関節軟骨のラマン分光特性と圧縮負荷の関係, 日本機械学会 M&M2013 材料力学カンファレンス, 2013 年 10 月 11-14 日, 岐阜大学柳戸キャンパス, 岐阜市.
- (12) Todo M, Tadano S, Raman spectroscopy for mechanical analysis of bone tissue, International Symposium on Interdisciplinary Research and Education on Medical Device Developments, September 12-13, 2013, Hirosaki University, Hirosaki, Japan.
- (13) 飯岡秀歳, 東藤正浩, 但野茂, 岩崎倫政, 振子法による膝関節軟骨の摩擦・粘弾性特性, 日本機械学会 2013 年度年次大会, 2013 年 9 月 8-11 日, 岡山大学津島キャンパス, 岡山市.
- (14) Todo M, Tadano S, Iwasaki N, Frictional and viscoelastic properties of joint cartilage by pendulum test, 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics, August 29-31, 2013, KIST International Cooperation Building, Seoul, Korea. (2013).

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

東藤 正浩 (TODOH MASAHIRO)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：10314402