

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462269

研究課題名(和文) 光を用いた離断性骨軟骨炎に対する新たな画像診断システムの開発

研究課題名(英文) Development of a novel diagnostic system for osteochondritis dissecans of the knee using optical coherence tomography

研究代表者

石川 正和 (ISHIKAWA, Masakazu)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：60372158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：光干渉断層計(optical coherence tomography: OCT)システムを用いて3次元培養した軟骨細胞、マウス変形性膝関節症モデルから得られたサンプルで画像解析を行った。また、得られたOCT画像を開発したソフトウェアを用いて解析し、OCT値の定量的評価を行った。3次元培養軟骨細胞のOCT画像と組織染色の比較から軟骨基質の有無をOCT画像で判定できることが示された。マウス変形性膝関節症モデルのOCT画像からは変性の程度をOCT画像により定量的に評価できることが示された。

今後、光干渉断層計は関節軟骨の非接触かつリアルタイム定量評価を可能とする技術になると考える。

研究成果の概要(英文)：Samples from atelocollagen embedded chondrocytes and mouse knee osteoarthritis (OA) model were harvested and images were obtained by optical coherence tomography (OCT) system. Obtained images and their OCT values were evaluated quantitatively by originally developed software. Using our method, OCT could demonstrate articular cartilage matrix deposition in the sample of atelocollagen with chondrocytes comparing with histological evaluation. From the animal study, it was demonstrated that femur articular cartilage in mouse OA model presented significantly lower OCT value compared to normal articular cartilage. These our data show the great potential of OCT system in orthopaedic field for quantitative evaluation of articular cartilage with noncontact manner. Moreover, the OCT probe system that enable real-time optical biopsy will be helpful to diagnose articular cartilage pathology quantitatively in clinical practice.

研究分野：整形外科学

キーワード：光干渉断層法 軟骨組織 定量評価 離断性骨軟骨炎 光診断

1. 研究開始当初の背景

離断性骨軟骨炎は関節軟骨の限局した部位において特発性に軟骨下骨の異常を呈する疾患である。特にスポーツをしている若年者に好発し、人口10万人あたり15-30人の発症率とも報告されている。この疾患で問題となるのは病変部の不安定性である。この不安定性が放置されると病変部が遊離し、関節軟骨が破壊され、非常に早期に変形性関節症に移行するため若年者のQOLを著しく低下させる。よって、不安定性が明らかな症例に関しては病変部の強固な固定が必要となってくる。

これまで不安定性の評価にはMRIによる軟骨下骨の評価が使われている。実際、病変部のT2高信号領域が不安定性を表す指標として利用されてきているが、最近の報告ではMRI(断層画像、静止画)と関節鏡所見(軟骨表面像、動画)の比較で病変部の不安定性の評価が非常に難しいことが示されている(Heywood *et al.*, *Arthroscopy*. 2011 27: 194-199)。特に、直接軟骨表面を観察でき、触診も可能な関節鏡を用いても病変部の不安定性評価が難しいという事実から、MRIと関節鏡検査だけでは十分に病変部の不安定性を評価できないことが明らかになってきている(図1)。

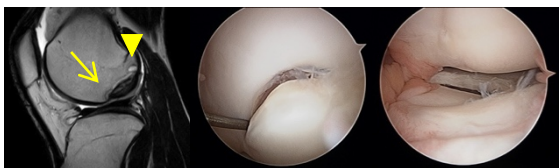


図1.
左：病変部のMRI像。病変部前方には高信号領域(-) (矢印)
後方には高信号領域(+) (矢頭)。
中：病変部の関節鏡所見。病変部前方に裂隙認める(MRI偽陰性)。
右：病変部の関節鏡所見。病変部後方に裂隙

さらに、日本のグループからは、関節鏡による離断性骨軟骨炎の病変部の病期分類と病理学的所見(組織断層像による所見)の詳細な比較検討が報告されている(Uozumi *et al.*, *Am J Sports Med* 2009 37: 2003-2008)。重要な病変部の病理組織所見としては、病変部と健常部に介在する裂隙が挙げられ、病変部の不安定性に関与することが示されている。しかし、この裂隙に関する情報は関節鏡所見からは全く得られず、関節鏡による病期分類と病理所見は全く一致していないことが明らかにされている。従って、術中にリアルタイムに裂隙の有無が確認できれば、病変部の不安定性を確実に評価でき、術式決定に非常に有用な情報となることが考えられる。

光干渉断層計 (Optical Coherence

Tomography: OCT)は光の干渉原理により近赤外線を用いて非侵襲的かつリアルタイムに断層画像を取得する機器である。その画像分解能は従来の超音波の約10倍であり、組織の断面を高速かつ高精度にスキャンし、立体的に把握することを可能とする。このシステムは特に眼科領域で実用化が進んでおり、その高い画像分解能から臨床で必須の診断機器となっている。また、循環器領域においては超音波を用いた血管内病変の診断が行われてきたが、超音波では観察不可能であった異常を描出できることから、超音波検査に換わる新しい診断ツールとして注目を集めている(図2)。

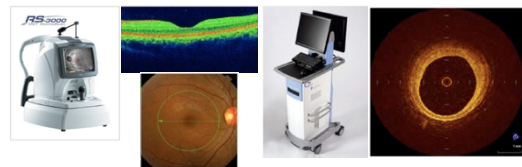


図2.
左：眼科領域で使用されているOCT及び眼底OCT断層像と眼底像。
右：循環器領域で使用されているOCT及び心臓冠動脈のOCT画像。

そこで、申請者はこのOCTを用いて得られる病変部の断層像から、不安定性を非侵襲的に、より高解像度かつリアルタイムに評価できれば術中における適切な術式の決定、それに伴う若年者の関節軟骨温存が可能であると考え本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は光を用いた画像診断システムである光干渉断層計で、①離断性骨軟骨炎の骨軟骨病変の画像を取得し、病変部の不安定性の評価に有用であるかを検証し、②軟骨の非侵襲性、高解像度かつリアルタイムに観察可能なシステムの開発を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) アテロコラーゲンゲル包埋軟骨細胞におけるOCT画像解析

まず、軟骨組織のOCT画像の取得が可能であること、解析の流れを構築するために、アテロコラーゲンゲルに包埋したラット、ウサギの関節軟骨細胞を培養し実験を行った。

ヒトにおけるアテロコラーゲンゲル包埋自家培養軟骨移植術は2013年より保険適用となっている。そこで本研究では、同様の技術を用いて、ラット及び家兔の軟骨細胞をアテロコラーゲンゲルに包埋、3次元培養を3週間行い、OCTシステムで解析を行った。細胞を包埋してないゲルを対照群とし作製し、同様

に OCT システムで解析を行った。得られた OCT 画像の表層部分の 100 x 200 μ m の範囲を 5 カ所無作為に選択し、ピクセル当たりの OCT 値を数値化するソフトによって OCT 値へと変換し、比較検討した。また、画像取得後、パラフィン包埋後、組織切片を作製し、サフラニン 0 染色を行った。

(2) マウス変形性関節症モデルの作製と OCT 画像解析

OCT で骨軟骨組織の観察における有用性を確認するためにマウスを用いて検証を行った。離断性骨軟骨炎の動物モデルは確立されていないため、既に確立され、分担研究者の味八木も利用しているマウス変形性膝関節症モデルを使用した (Miyaki S. *et al.*, *Genes Dev.* 2010 24(11): 1173-1185)。外科的に膝の内側半月靭帯を切離し、8 週間後に大腿骨を採取した。外科的処置を加えていない大腿骨を採取し対照群とした。採取した大腿骨は 10%ホルマリン固定を 1 日行い、リン酸緩衝液に置換し 4 $^{\circ}$ C で保存する。近江研究室の OCT システムで分担研究者の近江とともに画像を取得した。画像データは bitmap 形式で USB に保存し広島大学病院に持ち帰り、アテロコラーゲンゲル同様、ソフトウェアにて OCT 値を数値化して解析を行った。

4. 研究成果

(1) アテロコラーゲンゲル包埋軟骨細胞における OCT 画像解析

近江研究室の OCT 画像システムを用いて、アテロコラーゲンゲルの OCT 画像の取得可能であることが確認された (図 3)。

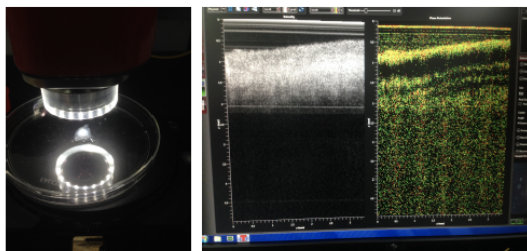


図 3.
左：OCT 画像構築システム
右：アテロコラーゲンゲルの OCT 画像

ラット、家兎軟骨細胞を包埋したゲルでは細胞を含まないゲルと比較してその OCT 画像の濃淡に差があることが確認できた。また、組織学的評価では、サフラニン 0 染色による軟骨基質の染色性は家兎軟骨細胞にのみ確認できた (図 4)。

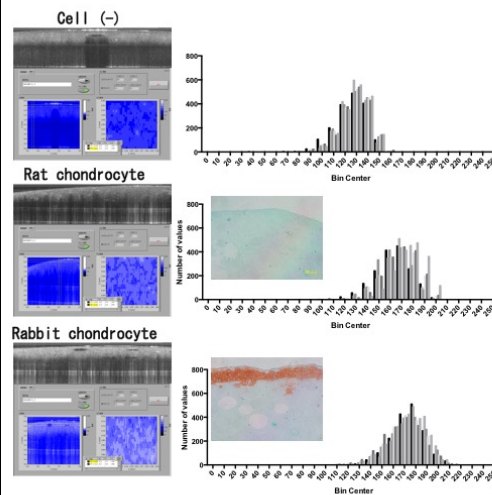


図 4.
細胞無し、ラット軟骨細胞、家兎軟骨細胞を包埋したアテロコラーゲンゲルの OCT 画像とその OCT 値

得られた OCT 値から統計科学的解析を行い、ラット、家兎軟骨細胞を包埋することにより細胞無し群と比較して OCT 値が高くなることが明らかとなった。また、ラットと家兎軟骨細胞の比較においても有意な差を認めた。組織学的評価からサフラニン 0 染色で家兎軟骨細胞を包埋しているアテロコラーゲンゲルにのみ軟骨基質が確認できていることから、OCT 画像により、軟骨基質産生の有無が評価できることが推察された (図 5)。

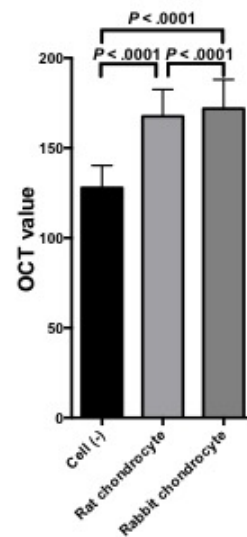


図 5. OCT 値の比較

(2) マウス変形性関節症モデルの作製と OCT 画像解析

マウス変形性関節症モデルは特に問題なく作製可能であった。モデル作製後 4 週の個体から大腿骨を摘出し、固定後、近江研究室の OCT 画像システムによる画像取得を行った。取得した画像から表層の形状の描出が可能であると共に、開発したソフトによる解析で変形性関節症モデルでは OCT 値の低下を認めた (図 6)。

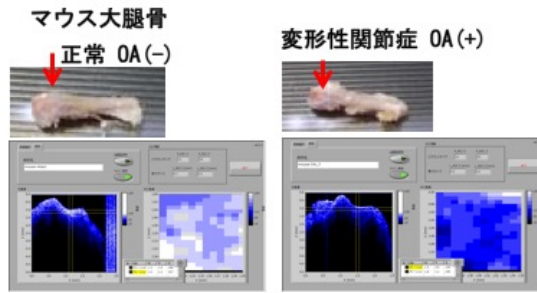


図6. マウス変形性関節症モデルの大腿骨サンプルとOCT画像

得られたOCT値のソフトウェアによる解析から、正常軟骨組織ではOCT値は 201.2 ± 27.9 、変形性関節症モデルでは 141.8 ± 29.3 と変形性関節症モデルで有意に低い値を示していた($p < 0.001$) (図7)。

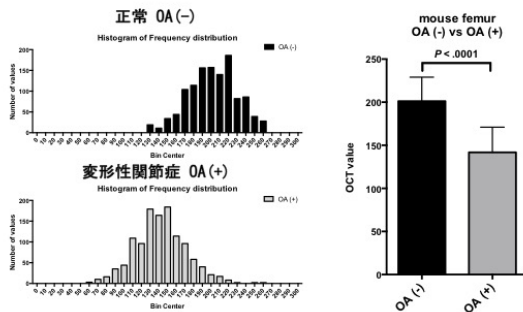


図7. 正常マウス大腿骨及びマウス変形性関節症モデル大腿骨のOCT画像から得られたOCT値とその変化。

変形性関節症モデルとしては4週モデル(中期モデル)を使用しており、まだサンプル数も少ないが軟骨組織のOCT画像解析の標準化の可能性を示唆する研究結果を得ることができた。

本研究では、膝離断性骨軟骨炎の臨床サンプルのOCT画像取得及び解析はその発生頻度及び損傷形態から困難であったが、アテロコラーゲンの解析からはOCT画像で軟骨基質の有無が評価できる可能性、マウス変形性関節症モデルからは変形性関節症における変性軟骨の定量的評価の可能性が示された。

このことから、プローブタイプのOCT画像取得装置の開発によって、関節鏡視下に関節軟骨の質の非接触かつリアルタイム評価が可能となる。

今後の機器開発のための重要な研究となったと考える。

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 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 正和 (ISHIKAWA MASAKAZU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号: 60372158

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・その他部局等・学長

研究者番号: 70177244

近江 雅人 (OUMI MASATO)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60273645

安達 伸生 (ADACHI NOBUO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 30294383

味八木 茂 (MIYAKI SHIGERU)

広島大学・病院・講師

研究者番号: 10392490

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 60467769

(平成26年4月1日～平成27年3月31日まで研究分担者)