

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462320

研究課題名(和文) NIR-Raman分光によるコラーゲン変性機序解明と新規光学生検システムの開発

研究課題名(英文) Clarification of collagen degeneration mechanisms by NIR-Raman spectroscopy and development of a novel optical biopsy system

研究代表者

高橋 康仁 (TAKAHASHI, Yasuhito)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60567668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：NIR-Raman分光を利用し、関節軟骨における細胞外マトリックスの生化学的構造を非侵襲評価し、変形性関節症(OA)に対するin-vivo診断への応用を目指した。Collinsスケールに基づき、ヒト軟骨表面のOA重症度を光学顕微鏡所見によりGrade0-IVの5段階に分類し、各領域のスペクトルを収集した。1241および1269 cm⁻¹のバンド強度比は、OA進行に伴い増大する傾向が観察され、コラーゲン配列の無秩序化(ランダムコイル形成の促進)との関連性が示唆された。さらに我々は、光バイオプシーシステムとして、局所のOA重症度をその場解析可能な直径3mmのファイバースコープを開発した。

研究成果の概要(英文)：Near-infrared (NIR) Raman microprobe spectroscopy was applied to non-invasive characterization of biochemical structure of extracellular matrix (ECM) in human articular cartilage, a step forward along the path of in-vivo diagnostic application of osteoarthritis (OA). OA severity was microscopically classified into five grades (Grade 0-VI) on cartilage surfaces, according to the Collins scale. NIR-Raman spectra were collected from the selected surface regions with different OA severity. A systematic increase in relative intensity ratio between the Raman bands located at 1241 and 1269 cm⁻¹ (amide III ratio) was observed with increasing degradation grades, which could be associated with disordered collagen orientation (increased formation of random coil). In addition, we developed 3-mm diameter fiber Raman probe which can perform the in-situ characterization of local OA severity as optical biopsy system.

研究分野：生体材料学、分光学

キーワード：ヒト軟骨 細胞外マトリックス 微細構造 ラマン分光

1. 研究開始当初の背景

(1) 厚生労働省は変形性関節症 (OA) に代表される軟骨変性に関して、自覚症状を有する国内患者数で約 1000 万人、潜在患者数で約 3000 万人と推定し、日本を含む高齢化社会を迎えた先進国において患者数および医療コスト増大は大きな社会問題となっている。軟骨は、約 70%の水分、20%の II 型コラーゲン線維および 10%のプロテオグリカンで構成される軟組織であり、荷重分散、衝撃緩和作用を有するとともに弾性変形効果により流体潤滑膜の形成を容易化し、吸着膜やゲル膜による表面保護作用も有している。しかし上述の微細構造が変性・破綻した場合、OA 進行に繋がる可能性がありバイオケミカルの観点から OA 研究を実施することは極めて重要である。しかしながら国内外の現況として軟骨細胞に関する研究が中心であり、コラーゲン変性に関する知見は乏しいのが実情である。特にヒト軟骨を検体として用いた研究報告は少ない。

(2) 生体組織の研究において、生体内分子のイメージングを行うためには、通常、観察対象の分子を蛍光などで標識することが必要とされる。また分析に際し、組織のホルマリン固定や凍結処理などを必要とするものも多い。しかし蛍光標識法や組織固定には、いくつかの欠点があり、これらの処理を行うことによって、組織成分の流出などのアーチファクトや分子が本来の機能を失う可能性も懸念される。そこで我々は無染色・無標識で分子を見るための新しい手法として、「近赤外ラマン分光法」を利用し、ヒト軟骨中の細胞外マトリックス (ECM) を対象に、非侵襲構造分析を実施した。本事業では、変形性関節症 (OA) の進行に伴うラマンスペクトルの変化を調査し、OA 診断のマーカーとなりえる分子構造ブロックの探索を行った。さらに光ファイバーを用いたラマンプローブの細径化により、術中迅速評価用の光バイオプシーシステムの構築を試み、関節軟骨の質を分子構造レベルで in-situ 分析できる新たな診断技術として発展させることを目的とした。

2. 研究の目的

前述の通り、本事業では以下 4 項目の研究が目的であった。

- ・研究 I: ヒト正常軟骨の近赤外ラマンスペクトルの帰属の同定
- ・研究 II: 組織固定 (10%中性緩衝ホルマリン液、冷凍[-80°C]) がもたらす分析精度への影響
- ・研究 III: OA 重症度と近赤外ラマンスペクトルの関連性
- ・研究 IV: OA 診断用の細径ラマンプローブの開発

3. 研究の方法

(1) 研究 I

軟骨 ECM の主成分は、水分、II 型コラーゲン、グリコサミノグリカン/プロテオグリカン (GAG/PG) である。主な GAG 分子には、ヒアルロン酸 (HA)、コンドロイチン 4 硫酸 (C4S)、コンドロイチン-6 硫酸 (C6S)、ケラタン硫酸 (KS) などが含まれ、各成分を抽出した高純度試料を購入し、標準サンプルとしてそれぞれの近赤外ラマンスペクトルを計測した (励起波長 785nm)。各純物質およびヒト軟骨のラマンスペクトルを比較することで、各バンドの帰属の同定を行った。

(2) 研究 II

大腿骨頭壊死の診断にて人工股関節置換術 (THA) が施行された 20 歳女性の軟骨を用い、MRI 所見により局所の正常軟骨部位を同定し、 $\sim 7 \times 7 \times 7 \text{ mm}^3$ のブロック状のサンプルを 3 個作製した。その内 1 個はコントロール・サンプルとして、作製後直ちにラマンスペクトルを計測した。残りの 2 個は 10% 中性緩衝ホルマリン液または -80°C の deep freezer 内で 1 ヶ月間保存し、その後ラマンスペクトル計測を行った。さらに各固定試料は、50ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて複数回洗浄した後、再びラマン計測を行った。各サンプルのラマン分析後、hematoxylin-eosin (H&E) と safranin-O (SO) 染色を実施し、組織学的に正常であることを確認した。

(3) 研究 III

変形性膝関節症の診断にて、人工膝関節置換術 (TKA) 施行時に切除した脛骨軟骨を採取し、 -80°C にて冷凍保存した。解凍後、PBS にて洗浄し、近赤外ラマン分光分析 (785nm 励起) を実施した。OA 重症度は、Collins scale を用い、光学顕微鏡所見にて以下の 5 段階に分類した (Grade 0: 正常; Grade I: 表層剥離; Grade II: 広範な損傷; Grade III: 軟骨の欠損; Grade IV: 軟骨の完全な欠損および軟骨下骨の露出)。正常膝脛骨の内外側で分類した各 OA 重症度領域にてラマン分光分析を実施し、Collins grade とラマンスペクトルの強度、波数、半値幅の関連性を解析した。さらにラマンバンドの変化から、OA に伴う変性機序を分子構造レベルで検討した。

(4) 研究 IV

I-III で得た知見を臨床応用する目的で、ラマンプローブの細径化を行い、よりハンディなデバイスとして、in-situ で迅速に軟骨の質の評価を実現できるような光学設計を検討した。さらに試作機を製作し、ラマンスペクトル計測が実施可能であるか検証を行った。

4. 研究成果

(1) 研究 I

軟骨では ECM 由来のラマンバンドを、

400-1800 cm^{-1} に複数認められた(図 1a)。高純度 II 型コラーゲンのスペクトル(図 1b)と軟骨スペクトルの比較では、同一波数域に共通のバンド帯を認めたことから、多くのバンドがコラーゲン構造に帰属できることが示された。軟骨の主なラマンピークは、856, 875, 934, 1006, 1062, 1254, 1450, 1661 cm^{-1} に現れた。856, 875 cm^{-1} は、proline, hydroxyproline に帰属され、これら構造部位はコラーゲンの三重螺旋構造の安定化に寄与する。1262 cm^{-1} (C-N, N-H modes; amide III)および 1664 cm^{-1} (C=O stretch; amide I)は、ともにコラーゲン α 螺旋構造に関連するラマンバンドであった。また 1062, 1125, 1340, 1376 cm^{-1} は、コラーゲンスペクトルでは認められないバンドであり、図 1c より GAG 由来のシグナルであることが示された (~1005 [KS, C6S], 1060, 1125, 1340, 1375 cm^{-1} [C4S, C6S, KS, HA])。~1060, 1125, 1375 cm^{-1} の GAG ピークは、 SO_3^- 対称伸縮、ピラノース環、および CH_3 対称曲げ振動に帰属された。

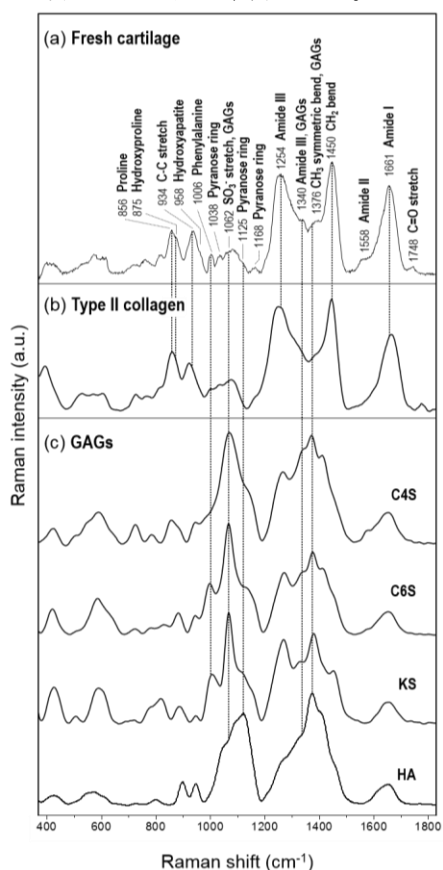


図 1: Average near-infrared (NIR) Raman spectra from the fresh cartilage specimens (a), and from the reference specimens of type II collagen (b) and GAGs (c).

(2) 研究 II

検体保存法が及ぼすスペクトルへの影響調査では、組織固定後にスペクトル強度の変化が認められた(図 2a-c)。特に、10%中性緩衝ホルマリン液による固定後、amide I, III 由来のバンド強度の低下が顕著であり、一方 1038, 1062 cm^{-1} では強度増加が観察された。

強度増加を認めたバンドは、ホルマリンのラマンバンド帯と一致し、組織内のホルマリン浸潤が軟骨スペクトル計測の妨げとなる可能性が示唆された(図 2c)。さらに強度低下の要因は、ホルマリン固定に伴う脱水および PG/GAG の溶出が一因と推察された。特に、PBS 洗浄後にスペクトルが、固定前の波形にある程度復元されることから(図 2a)、強度低下は脱水の影響が大きいものと考えられた。しかし、波形の復元には限界があり、特に amide I, III, SO_3^- 由来のバンド強度には、有意な計測誤差が残った。一方、冷凍組織においては、amide III, GAG バンドの僅かな低下を認めたものの、1回の PBS 洗浄で、amide I バンドを除き、ほぼ完全に固定前の波形まで復元可能であることが示された(図 2b)。近赤外ラマン分光を応用した過去の人体組織分析の殆どが、ホルマリン固定後に実施されているのが現況であるが、本結果より、分光計測においてホルマリン固定は精度低下の要因となるため、冷凍保存(-80 $^{\circ}\text{C}$)の実施がより推奨される。ただし、冷凍保存の場合でも冷解凍の繰り返しにより組織変性を招く可能性があるため、留意が必要である。

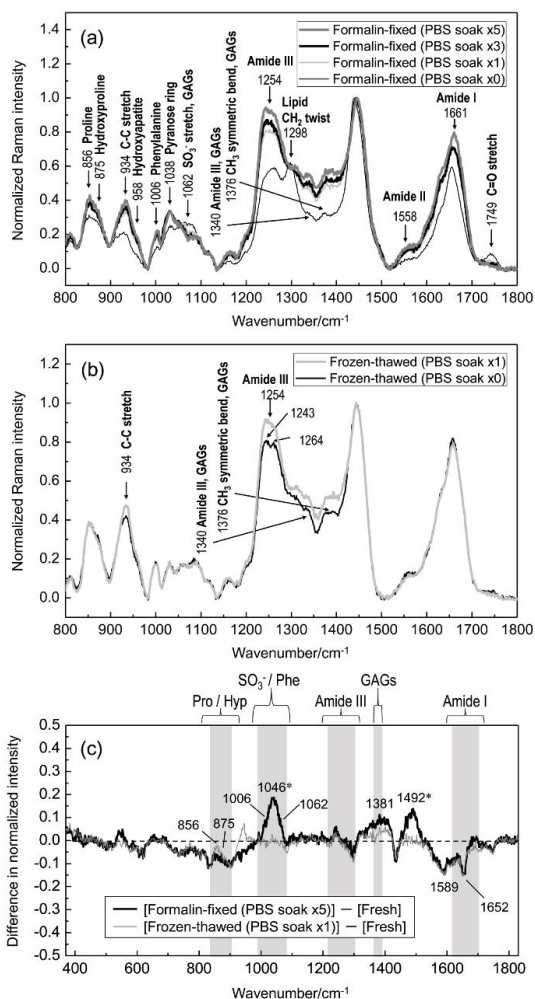


図 2: Average NIR Raman spectra from saline-soaked specimens after formalin fixing (a), and freeze-thawed specimens (b). Raman intensities were normalized to the peak at 1450 cm^{-1} . In (c), difference between spectra from fresh and

saline-soaked cartilage specimens after formalin fixing and freeze-thawing. Asterisks represent formalin-induced Raman biases.

(3) 研究 III

脛骨軟骨表面の各 OA 重症度 (Collins Grade 0-IV) 領域から得られる典型的な amide III ラマンバンド帯の変化を図 3 に示す。バンド (A) は、無秩序配向を有するコラーゲン分子 (ランダムコイル) の NH₂ 曲げ振動に帰属される。バンド (B) は、秩序的配向を有するコラーゲン分子 (α 螺旋構造) の NH₂ 曲げ振動に帰属される。バンド (C) は、脂質に由来し、(D)、(E) の帰属は未解明である。本事業では (A)、(B) のバンド強度比 (amide III ratio) を計測し、秩序的な α 螺旋構造に対する無秩序なランダムコイル構造の存在比率を評価した。図 4a に示す通り、OA 重症度の進行とともに amide III ratio が著明に増大することを認めた。したがって、OA 進行に伴う軟骨変性は、コラーゲン配向のランダム化に深く関与していることが示唆された。さらに、(A) バンドの半値幅は OA 重症度とともに増加傾向を示した (図 4b)。また半値幅増加も、構造の無秩序さの進行を表す。以上より、(A) バンドの強度および半値幅の増加は、OA 診断のカギになる現象であると考えられる。特に、Grade 0-II の初期の軟骨変性を、コラーゲン分子配向の無秩序化として分光学的に評価可能である点は、OA 診断技術開発にきわめて重要な知見であると考えられた。

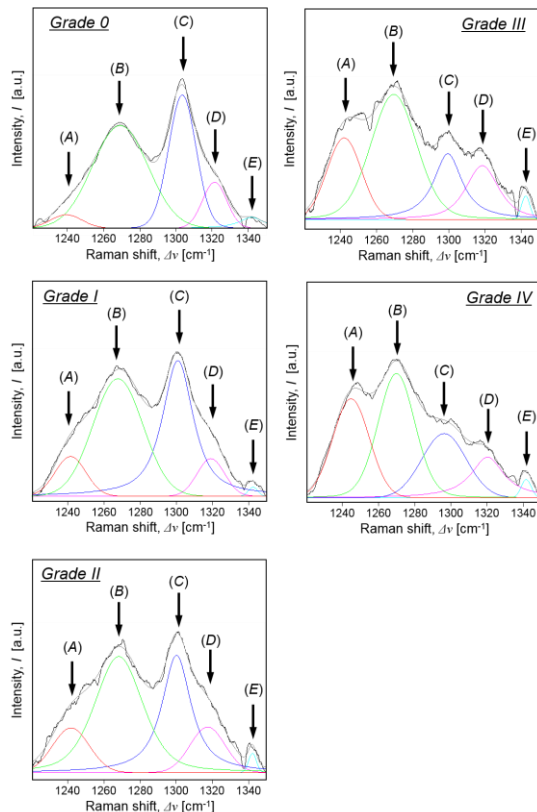


図 3: Typical Raman spectral variations in knee cartilage with different OA severity as defined according to Collins scale.

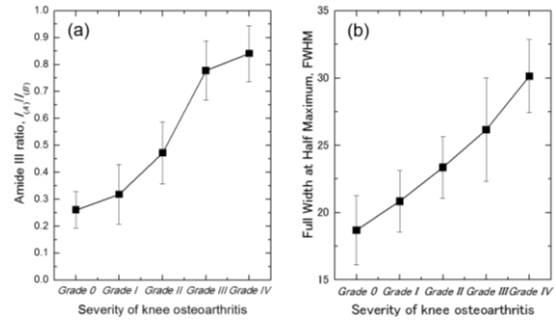


図 4: Dependence of the amide III ratio and full width at half maximum of Raman band (A) as defined according to the Collins scale.

(4) 研究 IV

関節鏡視下の OA 重症度評価を目指し、図 5 の細径ラマンプローブを試作した。本プローブは、直径 3mm、長さ 300mm のステンレス製外筒内に、直径 200 μ m の純石英ファイバーを計 10 心挿入し、光ファイバー先端部にバンドパスおよびロングパスフィルターを接着した。光ファイバーは 1 心をレーザー入射用、残り 9 心を受光用とし、入射ファイバーに対して円周上に配置した。またプローブ遠位端にはサファイヤボールレンズを装着することで、軟骨表面とボールレンズの接点で光が結像するような設計とした。励起波長 785nm レーザーを 500mW で出力し、プローブ先端部でおよそ 250mW が得られた。また分光器は Holospec-F/1.8i-NIR、CCD は Andor iDus420BR-DD を使用した。ファイバーカップリングは、レーザー出射側を FC/APC 規格、集光側を SMA 規格とした。

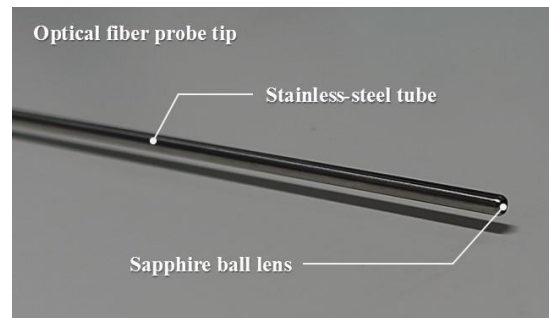


図 5: Photograph of optical fiber probe tip for biomedical Raman spectroscopy

本設計のプローブを用いて、脛骨軟骨のスペクトル計測を試み、約 60 秒で軟骨 ECM の明瞭なラマンシグナルを得ることに成功した (図 6)。今後、さらに検体数を増やし、OA の組織学的病態とラマンバンドの相関に関する知見が深まれば、光バイオプシーシステムとして迅速術中診断への応用が期待できる。本事業は、ラマン分光を用いた診断ツール開発と実用化の可能性を探る研究であったが、当初の目標通り研究 I-IV の全てにおいて成果が得られており、本診断技術の実用化への足がかりとなる非常に有益な成果が得られた。

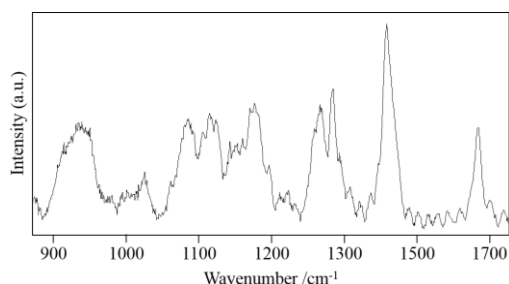


図 6: Raman spectrum of knee cartilage collected with the fiber Raman probe

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 1 件)

- ① Takahashi Y, Shishido T, Yamamoto K, Sawaji Y, Nishida J, Pezzotti G. Do formalin fixation and freeze-thaw affect near-infrared Raman spectroscopy of cartilaginous tissue? – A preliminary ex vivo analysis of native human articular cartilage. *Journal of Raman Spectroscopy* 2015;46(11):1166-1172.
DOI: 10.1002/jrs.4748 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山本謙吾.「関節リウマチ及び変形性関節症に対する人工股関節置換術 -現状と成績向上のための留意点-」 第 8 回秋田リウマチ治療セミナー, 2016.10.20, 秋田ビューホテル (秋田県、秋田市)
- ② Yamamoto K. Recent progress and challenges in biomaterials used for total hip arthroplasty. Italy meets Asia: Scientific Venue in Kyoto 2014. 2014.04.23, The Sodoh Higashiyama Kyoto (京都府、京都市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 康仁 (TAKAHASHI, Yasuhito)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号： 60567668

(2) 研究分担者

宍戸孝明 (SHISHIDO, Takaaki)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 70266500

正岡利紀 (MASAOKA, Toshinori)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号： 70256270

立岩俊之 (TATEIWA, Toshiyuki)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号： 00424630

山本 謙吾 (YAMAMOTO, Kengo)
東京医科大学・医学部・主任教授