

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11023

研究課題名(和文) 応力緩和OCT (SR-OCSA) を用いた早期変形性関節症軟骨の粘弾性測定

研究課題名(英文) Development of Tomographic Micro Mechanical Diagnosis Technology for Early Osteoarthritic Cartilage using Optical Coherence Tomography

研究代表者

池淵 充彦 (Ikebuchi, Mitsuhiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70453131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：荷重負荷デバイスと連続光コヒーレンス断層画層(Optical Coherence Tomography, OCT)画像撮影システムを組み合わせたStress Relaxation Optical Coherence Straingraphy (SR-OCSA)を用い、家兎膝関節を用いて変形性軟骨症(OsteoArthritis, OA)における関節軟骨の力学的特性を経時的に可視化し、評価を行った。

SR-OCSAはOAの早期発見のみならず、OAの進行において解剖学的に新しい知見をもたらすことが可能であった。SR-OCSAは関節軟骨の力学的特性を可視化し、評価するのに有益な測定機器であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としては、SR-OCSAは関節軟骨の力学的特性を可視化することが可能であり、関節軟骨に関する新しい知見が得られることが期待できる。

また社会的意義としては、iPS細胞に代表される再生治療の発展は、早期の段階からの関節症への治療介入を可能とするが、MRIや超音波診断機のような現行の診察機器では早期の関節症変化を捉えることは困難である。さらに、再生軟骨の臨床応用には、一定以上の粘弾性力学特性の保証など、再生軟骨の力学的評価も必要となる。SR-OCSAはこれらの必要性にも対応可能なシステムであり、有用性が高く移植治療の発展にも大きく寄与するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：We developed Stress Relaxation Optical Coherence Straingraphy (SR-OCSA), a new tomographic detection method for the microscale mechanical properties using digital image correlation method adapted to OCT (optical coherence tomography) image. The aim of this study is to evaluate mechanical properties and visualize mechanical properties distribution in degenerative articular cartilage of rabbit osteoarthritis (OA) model by SR-OCSA.

SR-OCSA revealed degradation of mechanical properties as cartilage degeneration progresses. SR-OCSA was a useful measurement instrument which could detect and visualize the change of the mechanical properties distribution in degenerative cartilage.

研究分野：整形外科学 リハビリテーション医学

キーワード：変形性関節症 関節軟骨 力学的特性 光干渉断層画像法(OCT) SR-OCSA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節炎に伴う軟骨の変性については、組織学的には多くが解明されてきているが力学的な解明は進んでいない。組織学的には、関節軟骨は軟骨細胞と軟骨細胞を取り囲む軟骨基質から構成され、さらに軟骨基質はコラーゲンのネットワークと水和性に富むプロテオグリカンとから構成される。力学的には、コラーゲンは弾性変形効果を有し引張荷重支持を担うのに対し、プロテオグリカンには極めて高い水和性を有するため粘性効果を有し圧縮荷重支持を担うと考えられている。

解剖学的には、軟骨は表層・中層・深層・石灰化層の4層に分けられ、関節炎においては表層から破壊されコラーゲンネットワークの損傷とプロテオグリカンの流出が生じ、その結果として軟骨の粘弾性は失われるとされている。このコラーゲンネットワークの損傷は不可逆的であるとされているが、その過程において粘弾性の低下が軟骨のどの層でどの程度低下するのか、そのような知見は得られていない。

近年、iPS細胞を始めとする再生医療の進歩は目覚ましく、軟骨移植についても多くの研究・報告がなされている。軟骨移植の臨床応用を考えた場合、軟骨の組織学的・力学的評価は必須であり、その手法は可能な限り低侵襲であり、客観性を有していることが必要とされる。

一般的には、軟骨変性の評価はKellgren-Lawrence分類のように画像での軟骨厚さの計測によって行われる。しかし、レントゲン撮影やMRIなどの画像において計測可能なレベルの軟骨厚さの消失は、組織学的には軟骨破壊が相当に進行している状態であり、近年では軟骨の質的評価としてMRIにおけるT2Mappingや超音波による評価が行われるようになってきている。しかしこれらの評価手法は空間分解能や検出感度が低く、軟骨のようなマイクロスケールでの組織変化・力学的変化は把握できない可能性がある。さらに、初期変形性関節症においては組織学的変性の進行度合いよりも力学的な劣化の度合いは著しいとの報告もあり¹⁾、MRIなどによって評価された質的な変化は力学特性の変化とは等価ではなく、質的評価だけでは不十分と考えられる。

2. 研究の目的

光コヒーレンス断層画像(Optical Coherence Tomography, 以下OCT)は、高透過性と低干渉性に優れた近赤外広帯域光を対象に投射し、得られる散乱光と参照鏡からの反射光との低コヒーレンス干渉から対象内部の形態分布をマイクロ断層画像として可視化する手法である。OCTは非破壊・非侵襲に5 μ m程度の高空間分解能にて生体組織内部の屈折率変化を形態分布として断層可視化できることから、眼底網膜の三次元解析や冠動脈血管壁断層評価などで臨床応用されている。光学技術の発達によって近赤外広帯域光を投射するプローベは細径化が進み、現在では直径1mm径未満となっており、関節鏡視下での軟骨評価を想定され研究が行われており、Han, Rogowska, Cernohorskyらは顕微鏡下での軟骨厚さ計測とOCTによる軟骨厚さ計測とを比較し、高い相関を示したと報告している。²⁾³⁾⁴⁾ OCT以外の計測機器との比較の報告としては、PuhakkaらはOCTによる計測と鏡視下での超音波デバイスによる軟骨厚さの計測との比較・評価を行っているが、OCTによる計測はCalcificationの存在下でも高い相関性を持って鏡視下計測と相関しており、また超音波デバイスでは相関性に劣った薄い軟骨層に対しても鏡視下計測と良好な相関を示していたことを報告している。⁵⁾ またChuらはより臨床に踏み込んだ報告を行っており、関節鏡視所見とT2Mappingの結果、鏡視時にOCTによって得られた断層画像を用いた検者によるスコアリング、及び画像ソフトによるOCT断層画像スコアリングとを比較し、OCTを用いた軟骨の質的評価の可能性を報告している。⁶⁾

これらの報告では、OCTを用いて軟骨の断層画像を取得し、その画像から軟骨の質的評価を行うという手法を試みている。しかし、これは軟骨の一瞬の状態を切り取った静的な評価であり、生体関節内に持ち込むことのできる顕微鏡もしくはMRIの代替機械という扱いであると言える。本来であれば、軟骨の力学的評価、特に粘弾性力学特性の評価では、荷重負荷状態での経時変化を評価することが必要であるが、OCT・超音波計測・MRIによる評価も含め、既存の手法ではこれを行うことは不可能である。

共同研究者の佐伯らは、組織変形前後のOCT断層画像にデジタル相互相関法を適用し、計測対象内部の微小変形を変形ベクトル分布及び歪み速度分布としてマイクロ断層可視化するOptical Coherence Strainography法を開発し⁷⁾、さらにこれを生体組織の力学的評価に応用すべく、荷重負荷デバイスと連続OCT画像撮影システムを組み合わせたStress Relaxation Optical Coherence Strainography(以下SR-OCSA)を開発した。⁸⁾ 具体的には、荷重負荷デバイスを対象物に接触させ圧縮負荷を与え、変形させた後の緩和過程すなわち応力緩和試験における組織変形の断層画像をOCTにより撮影する。緩和過程の間OCT断層画像を連続撮影し、対象断面の経時変化を動画として取得し、これを画像解析することにより粘弾性力学特性の評価を行う。これは、OCTによる断層画像という静止画像に組織変形の空間分布と時間分布という2つの評価軸(時空間)を加えることで、OCTによる評価を静的・質的な評価から動的・力学的な評価へとステップアップさせたことを意味する。

我々はこのSR-OCSAを用いて軟骨の粘弾性力学特性を計測し、軟骨の力学的特性の客観的評価を試みることを目的に、本研究を行った。

3. 研究の方法

本研究において、我々は家兎の ACL 離断 OA モデルを対象とし、この SR-OCSA を用いて荷重時における軟骨の動的かつ力学的な評価を試みた。無処置の家兎膝関節軟骨を 0 週(control)とし、ACL 離断後 2 週、4 週、6 週、8 週に達した ACL 離断 OA モデル家兎をサクリファイし、得られた家兎膝関節軟骨に対し SR-OCSA による軟骨評価と小型卓上力学試験機による粘弾性評価、そして HE/Safranin-O 染色による組織学的評価を行い、SR-OCSA の有用性を検討した。

SR-OCSA の応力緩和試験における圧縮条件としては、対象軟骨に 2.5%/sec の圧縮速度にて 10% 圧縮歪みまで荷重負荷を与え、圧縮終了後の歪み状態からの緩和過程 60 秒間における OCT 断層画像の連続撮像と SR-OCSA による解析・計測を行った。組織学的評価は SR-OCSA による計測後、プローブの接触部分と一致したスライス標本に HE/Safranin-O 染色を行い、顕微鏡視下で OARSI のスコアリング分類に基づき評価を行った。軟骨組織の力学特性については、SR-OCSA とは別に小型卓上力学試験機(島津製作所製 EZ-LX)を用い応力緩和試験を実施し、緩和過程における Relaxation Time を計測、これを粘弾性評価の指標とした。

4. 研究成果

軟骨組織の OCT 断層像と組織標本を示す。(Fig.1a, c) OCT によって得られた断層像は、顕微鏡によって得られる所見と同様に表層・中間層・深層の各層を境界可能であった。OCT で得られた軟骨断層像の経時変化から解析された歪み速度を用い、歪み速度の緩和減衰係数を算出し、これをマッピングする。これにより得られたのが緩和減衰係数の断層分布図になる。(Fig.1b) これにより、マイクロレベルで軟骨のどの層に粘弾性力学特性の変化が発生するのかを視覚的に把握することが可能になる。

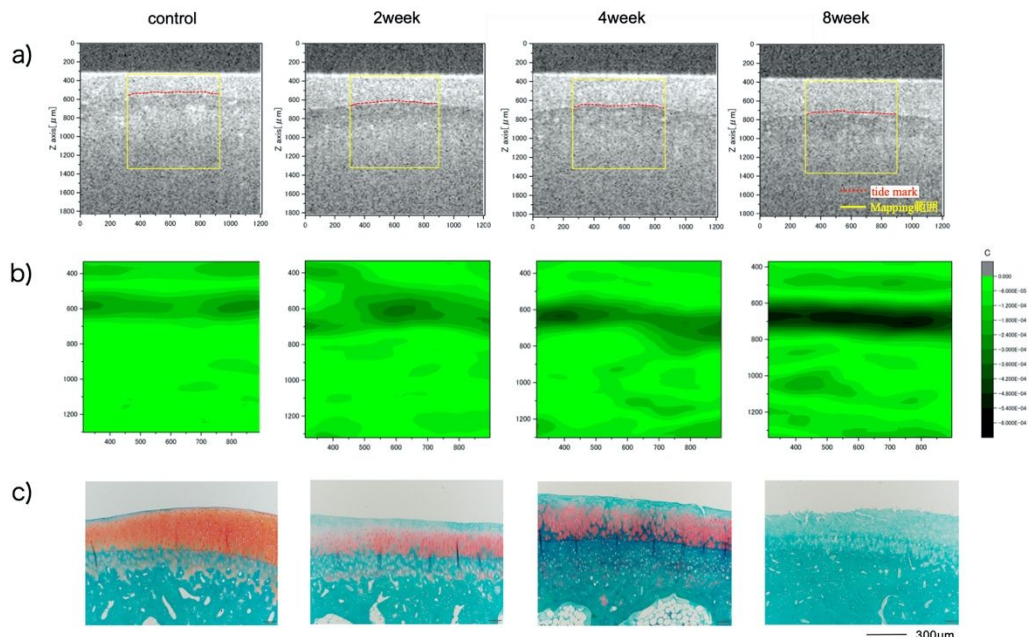


Fig.1 a)OCT 断層画像 b) 緩和減衰係数断層像 c) HE/Safranin-O 染色組織標本

次に、組織学的評価、小型卓上力学試験機による応力緩和試験結果(Relaxation Time), さらに SR-OCSA を用いた粘弾性力学特性評価の結果(緩和減衰係数)を示す。(Fig.2) 組織学的評価は、週数を経るにつれ OARSI スコアが統計学的有意に高得点となっている。応力緩和試験の結果として、Relaxation Time は週数を経るにつれて統計学的有意に短縮する傾向にあった。SR-OCSA による評価結果は、歪み速度断層分布の経時変化から緩和減衰係数の断層マッピングを算出し(Fig.1b)これを用いて数値化しており、週数を経るにつれて統計学的有意に増加する傾向にあった。

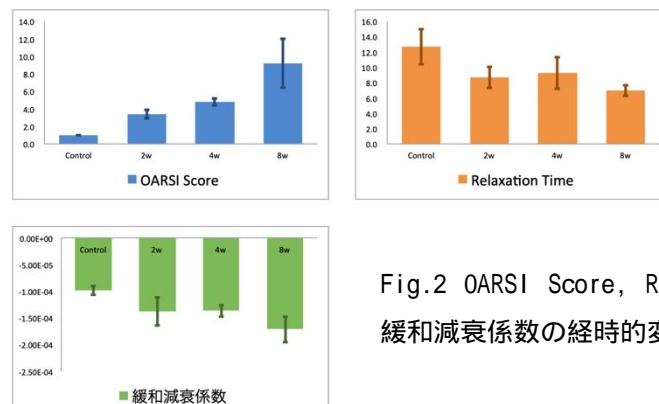


Fig.2 OARSI Score, Relaxation Time, 緩和減衰係数の経時的変化

各計測結果の相関については、応力緩和試験における Relaxation Time は OARS1 スコアと負の相関を、SA-OCSA における緩和減衰係数は OASRI スコアと正の相関を、SA-OCSA における緩和減衰係数と小型卓上力学試験機から得られた Relaxation Time は負の相関を示していた。このように、SR-OCSA によって解析・計測された軟骨の粘弾性力学特性変化は、組織学的評価及び応力緩和試験によって別途計測された力学特性変化と高い相関を示していた。

SR-OCSA により得られた所見としては、粘弾性の力学特性は軟骨全層で均等に生じるのではなく層に応じて分布し、更に軟骨変性の進行によってその力学特性は局所的に劣化することが判明した。Desrochers らは、13 週経過の犬軟骨の OA モデルに対し原子間力顕微鏡を用い、コラーゲンネットワークの損傷とプロテオグリカンの喪失が軟骨表層で生じることを報告している。⁹⁾ 今回我々は 2 週経過の家兎軟骨において変性を確認しており、これは SR-OCSA が初期 OA の診断に有用であることを示している。これらの変化は組織学的評価では検出し得なかったデータであり、SR-OCSA は軟骨の力学的評価、特に初期 OA 軟骨の粘弾性力学特性の評価に有用性が期待できると考えている。

本研究の結果として、SR-OCSA により、軟骨の粘弾性力学特性を非侵襲的に、かつ高精度に計測できる可能が示唆された。現在、我々が SR-OCSA を用いて計測している粘弾性力学特性を表す数値は、画像解析によって得られる歪み速度分布から算出された歪み速度の緩和減衰係数である。サンプル数は少ないが、家兎 OA 軟骨を用いた小型卓上力学試験機による応力緩和試験と SR-OCSA による緩和減衰係数の傾向から、早期の変形性関節症軟骨では、弾性特性に比べ粘性特性の劣化が顕著であることが示唆されている。我々が収集し得た限りでは、早期 OA において関節軟骨の粘性・弾性の力学特性を分離して計測・評価した報告はない。我々は SR-OCSA に続いて、動的粘弾性試験と OCT 連続撮影とを組み合わせることにより粘性・弾性を分離して計測・評価が可能な粘弾性力学特性の分離マイクロ断層可視化計測手法を既の実現しており、今後さらに研究を進める計画である。

現在当施設で使用している SR-OCSA システムは、in vitro で使用することを前提としているが、我々は in vivo での使用も想定し開発研究を行っている。上述したように、OCT は直径 1mm 径未満のプロベによって使用することが可能で、組織の採取も染色も不要で非侵襲性に優れており、前述の幾つかの報告は関節鏡視下の使用を想定したものである。SR-OCSA では圧縮荷重を加える必要があるが、軟骨厚さの 10% 程度の圧縮歪み負荷である為、これにより軟骨破損をきたすものではないと判断している。

臨床応用で問題となる点としては、SR-OCSA プロブだけでは計測点を確認できない点が挙げられる。これに関しては鏡視下で確認するのが最良であるが、現行の関節鏡では侵襲性・コストから日常検査としては不相当である。我々はディスプレイを前提とした直径 0.6mm の針関節鏡(特許第 6103630 号)の開発に成功しており、これと組み合わせた計測システムの構築を目指している。

また、解剖学的にヒト関節軟骨は家兎関節軟骨よりも厚い為、ヒト関節軟骨においては近赤外広帯域光を軟骨全層に投射できず、本研究結果をそのまま李承応用することができない可能性も問題点として挙げられる。これを検証するべく、本研究立案時には変形性膝関節症に対し人工膝関節置換術を施行された症例から採取されるヒト膝関節軟骨を用いた計測実験を計画していたが、研究開始後、個人情報保護強化の為医学部外への検体の持ち出しが禁止され、ヒト膝関節軟骨を用いた計測実験を断念せざるを得ず、SR-OCSA を用いたヒト関節軟骨における粘弾性力学特性評価実験は未実施となっている。しかし関節炎においては関節軟骨は表層から破壊されることから、初期 OA 軟骨の粘弾性力学特性の評価は期待できるものと考えている。

【まとめ】

今後高齢化社会は進行し、それに伴い関節症の患者も増加することが予想される。iPS 細胞に代表される再生治療の発展は、今後早期の段階からの関節症への治療介入を可能とする。しかし、MRI・超音波などの診察機器では早期の関節症変化を捉えることは困難である。また、再生軟骨の臨床応用には、一定以上の粘弾性力学特性の保証など、再生軟骨の力学的評価も必要となる。SR-OCSA はこれらの必要性に対応可能なシステムであり、有用性が高く移植治療の発展にも大きく寄与するものと考えている。

【References】

- 1) 大澤恭子,内藤 尚, 田中正夫 他:変性軟骨における力学・材料特性の機能領域別評価, 生体医工学, 47(6), pp.554-559, (2009)
- 2) Han CW, Chu CR, Adachi N, et al. Analysis of rabbit articular cartilage repair after chondrocyte implantation using optical coherence tomography. Osteoarthritis Cartil.
- 3) Rogowska J, Bryant C M, Brezinski M E. Cartilage thickness measurements from optical coherence tomography. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis 2003; 20 (2): 357-67.
- 4) Cernohorsky P, de Bruin D M, van Leeuwen T G et al. In-situ imaging of articular cartilage of the first car- pometacarpal joint using co-registered optical coherence tomography and computed tomography. J Biomed Opt 2012; 17 (6): 060501.

- 5) Puhakka PH, Te Moller NCR, Tanska P, et al. Optical coherence tomography enables accurate measurement of equine cartilage thickness for determination of speed of sound. *Acta Orthop.* 2016;3674(June):1-7.
- 6) Chu CR, Bruno S, Irrgang JJ et al. Clinical optical coherence tomography of early articular cartilage degeneration in patients with degenerative meniscal tears. *Arthritis Rheum.* 2010;62(5):1412-1420.
- 7) 佐伯壮一, 坂田義太郎, 石井勇氣, Optical Coherence Strainography (光コヒーレンスひずみ断層法)による生体組織ひずみ断層計測, *レーザ研究*, 41 巻, 8 号, pp.591-595, (2013).
- 8) 佐伯壮一, 古川大介, 池淵充彦 他, 低コヒーレンス干渉計を用いた関節軟骨における粘弾性挙動の非侵襲マイクロ断層可視化法 (Optical Coherence Strainography), *非破壊検査*, 2018 年, 67 巻 4 月号, pp.166-173.
- 9) J. Desrochersy, M.W. Amrein, J.R. Matyas Viscoelasticity of the articular cartilage surface in early osteoarthritis/ *Osteoarthritis and Cartilage* 20 (2012) 413-421

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 池淵 充彦, 中村 卓, 箕田 行秀, 中村 博亮, 佐伯 壮一, 古川 大介, 新実 信夫, 塚原 義人	4. 巻 7
2. 論文標題 応力緩和OCT(SR-OCSA)を用いた早期変形性関節症軟骨の粘弾性力学特性マイクロ断層診断(5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 別冊Bio Clinica: 慢性炎症と疾患	6. 最初と最後の頁 128-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 池淵充彦, 中村卓, 箕田行秀, 中村博亮, 古川大介, 佐伯壮一	4. 巻 75
2. 論文標題 多機能OCT(MF-OCT)を用いた早期変形性関節症軟骨の粘弾性力学特性マイクロ断層診断	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 別冊整形外科	6. 最初と最後の頁 27-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Suguru, Ikebuchi Mitsuhiro, Saeki Souichi, Furukawa Daisuke, Orita Kumi, Niimi Nobuo, Tsukahara Yoshito, Nakamura Hiroaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Changes in viscoelastic properties of articular cartilage in early stage of osteoarthritis, as determined by optical coherence tomography-based strain rate tomography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1186/s12891-019-2789-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 卓, 池淵 充彦, 中村 博亮, 佐伯 壮一
2. 発表標題 応力緩和型optical coherence straingraphy(SR-OCSA)を用いた変形性関節症軟骨の粘弾性測定
3. 学会等名 第33回日本籍計外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 池淵充彦, 中村卓, 箕田行秀, 中村博亮, 古川大介, 佐伯壮一, 松田 秀一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 230
3. 書名 整形外科診療における最先端技術	

1. 著者名 池淵 充彦, 中村 卓, 箕田 行秀, 中村 博亮, 佐伯 壮一, 古川 大介, 新実 信夫, 塚原 義人, 竹下 克志	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北陵館	5. 総ページ数 154
3. 書名 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	折田 久美 (Orita kumi) (40748597)	大阪市立大学・大学院医学研究科・博士研究員 (24402)	
研究分担者	佐伯 壮一 (Saeki Souichi) (50335767)	名城大学・理工学部・教授 (33919)	