

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：20106

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09633

研究課題名（和文）光を用いた非侵襲的かつ低コストで行える関節診断技術の開発

研究課題名（英文）Development of low-cost and non-invasive diagnostic technique using light

研究代表者

須田 廣美（木村 須田）（Suda, Hiromi）

公立千歳科学技術大学・理工学部・教授

研究者番号：00574857

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、近赤外励起ラマン分光装置、近赤外分光装置ならび光ファイバーケーブルから構成された装置を構築し、in vivo で非侵襲的に関節を評価できる計測技術の開発を目指した。光ファイバーケーブルを接続した近赤外分光装置を用いて軟骨成分を測定した結果、いずれも物質固有の近赤外スペクトルが得られ、軟骨に含まれるコラーゲン/コンドロイチン硫酸比を得ることができた。一方、光ファイバーケーブルを接続した近赤外励起ラマン分光装置からは、軟骨成分の十分なシグナルを得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の高齢化率は著しく、要介護者数が増加するのに対し、介護する側の人口減少が問題になっている。このような急激な社会構造の変化から健康寿命を意識した運動機能の維持、特に膝関節に発症する変形性膝関節症(OA)の早期発見、早期治療が期待される。一方、膝関節の診断には単純X線や磁気共鳴画像(MRI)など、高価で利用環境が制限される診断技術が用いられている。本研究で提案する低コストの診断技術が身近な施設に設置されれば、OAの早期発見、早期治療につながる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop evaluation techniques consisting of the near-infrared (NIR) Raman spectrometer, NIR spectrometer, and optical fiber cable for non-invasive assessment of joints in vivo. Cartilage components were examined using the NIR spectrometer connected to the optical fiber cable to obtain NIR spectra of material properties and collagen/chondroitin sulfate ratio in the cartilage. On the other hand, the NIR Raman spectrometer connected to the optical fiber cable did not provide sufficient signal of the cartilage components.

研究分野：分析化学

キーワード：近赤外分光法 ラマン分光法 軟骨 光ファイバーケーブル 軟骨質 コンドロイチン硫酸 プロテオグリカン コラーゲン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1)日本の高齢化率は他の国に比べて著しく高く、既に超高齢化社会に突入している。そのため、要介護者数が増加するのに対し、介護する側の人口減少が社会問題となっている。特に都市部では、単身独居者数の増加に伴い、老々介護の世帯数も増加している。このような急激な社会構造の変化から、健康寿命を意識した運動機能の維持、特に老化に伴い膝関節に発症する変形性膝関節症(OA)の早期発見、早期治療が課題となっている。膝関節の診断には単純X線や磁気共鳴画像(MRI)を用いるが、単純X線では被曝、MRIではペースメーカー利用者を計測することができない問題を抱えている。また、いずれの装置も高価で利用環境に制限を受ける。高齢者にとっては、自宅から遠く離れた高度な医療施設より、身近な診療施設の方が通いやすく、身近な施設に診断装置を設置できれば、OAの早期発見、早期治療につながる。そのため、利用環境に制限を受けず、低コストで非侵襲的な診断が行える技術の開発が望まれる。軟骨の非侵襲的な評価法はいくつか報告されているが、臨床に用いられているMRIに関する論分が多い(Oka H 2018, Oloyede A 2013)。

(2)本研究で提案する近赤外励起ラマン分光法と近赤外分光法は、単純X線やMRIに比べて低価格で装置を作製することができ、使用環境も単純X線やMRIほどに制限を受けない。近赤外励起ラマン分光法(Morris 2009)や近赤外分光法(Pleshko N 2018, Oloyede A 2017)を用いた軟骨の評価に関する研究はいくつか報告されている。しかしながら、いずれの研究報告もどちらか一方の手法を用いた評価であり、in vivoで非侵襲的に行われたものはない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、身体的かつ経済的な患者への負担を軽減させる、光を用いた非侵襲的かつ低コストで評価できるin vivo関節診断技術の開発である。具体的には光ファイバーケーブルを接続した近赤外励起ラマン分光装置ならび近赤外分光装置を作製、二つの装置を一体化させOAモデルや健常なラットとウサギの膝関節、大腿骨、脛骨部位を評価し、マイクロCTなどのデータと比較検討しながら関節診断技術を開発し、その分析精度を高める。

3. 研究の方法

(1)既存の近赤外励起ラマン分光装置、近赤外分光装置による軟骨成分の評価

既存の近赤外励起ラマン分光装置ならび近赤外分光装置を用いて軟骨成分であるプロテオグリカン(PGs)、コンドロイチン硫酸(CS)、魚類の背骨から抽出した関節軟骨、骨の成分であるハイドロキシアパタイト(HAp)とコラーゲン(COL)を測定し、軟骨に特徴的なバンドの帰属を行うとともに各バンドの定量性、軟骨質の評価法について検討した。

(2)光ファイバーケーブルを接続した近赤外励起ラマン分光装置の構築と評価

パルスレーザーの選択：励起レーザーのパルス幅、照射エネルギー、照射時間などを検討した。

光ファイバーケーブルの検討：光ファイバーの種類、最適な距離や形状について検討した。
 光増幅器とフィルターの検討：検出器の前に光増幅器とフィルターを設置して、検出シグナルの増幅とノイズの除去を行う仕組みについて検討した。
 近赤外励起ラマン分光装置の評価：構築した近赤外励起ラマン分光装置を用いてアパタイトとコラーゲンを測定、既存の近赤外励起ラマン分光装置から得られたデータと比較し、構築した装置の評価を行った。

(3) 光ファイバーケーブルを接続した近赤外分光装置の構築と評価

既存の近赤外分光装置に接続する光ファイバーケーブルの検討：光ファイバーの種類、最適な距離や形状について検討した。

近赤外分光装置の評価：光ファイバーケーブルを接続した近赤外分光装置を用いて HAp, COL, PGs, CS, 関節軟骨を測定、光ファイバーケーブルを接続しない状態で得られたデータと比較し、構築した装置の評価を行った。

(4) 近赤外励起ラマン分光装置と近赤外分光装置による軟骨質の評価

近赤外励起ラマン分光装置と近赤外分光装置を用いて同一検体の軟骨質の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 近赤外励起ラマン分光装置による軟骨成分の評価

図 1 にはヒメマス 4 歳魚(淡水), ペニザケ 1 歳魚(淡水)ならび 4 歳魚(海水 淡水)の背骨から抽出した関節軟骨(髄核と線維輪)のラマンスペクトルを示した。1060 cm^{-1} と 1375 cm^{-1}

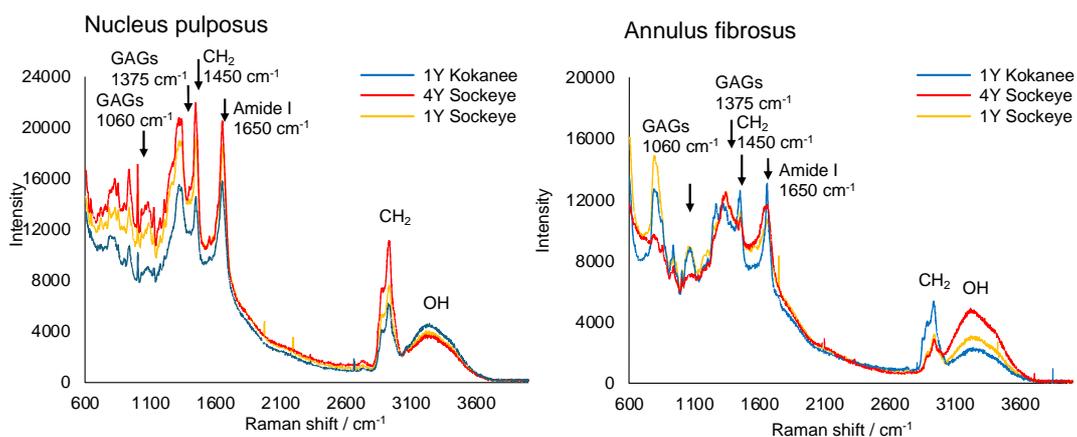


図 1 ヒメマス 4 歳魚, ペニザケ 1 歳魚, 4 歳魚の背骨から抽出した髄核(左)と線維輪(右)のラマンスペクトル

に現れるグルコサミノグリカン(GAGs)のバンドの高さを 2800 cm^{-1} ~2900 cm^{-1} 付近に観察される CH₂のバンドを用いて規格化すると、髄核に含まれる GAGs の量は、線維輪に比べて多いことが示された。また、淡水・海水など生息環境や年齢によって GAGs バンドの高が変化した

ことから、軟骨成分の定量分析には 1060 cm^{-1} と 1375 cm^{-1} のバンドの高さを用いることが有効であることが示された。

(2) 光ファイバケーブルを接続した近赤外励起ラマン分光装置の評価

骨の成分で比較的ラマンバンドの強度が高く得られる HAp を評価しながら、光ファイバケーブルを接続した近赤外励起ラマン分光装置を評価した。その結果、HAp のバンドを得ることは成功したが、定量分析を行える十分なシグナルを得られなかった。

(3) 光ファイバケーブルを接続した近赤外分光装置の評価

軟骨成分である PGs, CS, COL を測定した結果、いずれも物質固有の近赤外スペクトルが得られた(図2)。CS と COL の比率を変えながら作製したタブレットの近赤外スペクトルについて、その2次微分スペクトルを比較したところ、COL(5800 cm^{-1} と 4260 cm^{-1})とCS(5800 cm^{-1})由来バンド強度に定量性が認められた。CS と COL の濃度比(CS/COL 比)と 5800 cm^{-1} と 4260 cm^{-1} の2次微分バンド強度から検量線を作成し、シロザケの髄核を測定したところ、得られた CS/COL 比は文献値(乾燥重量比)と一致していた。

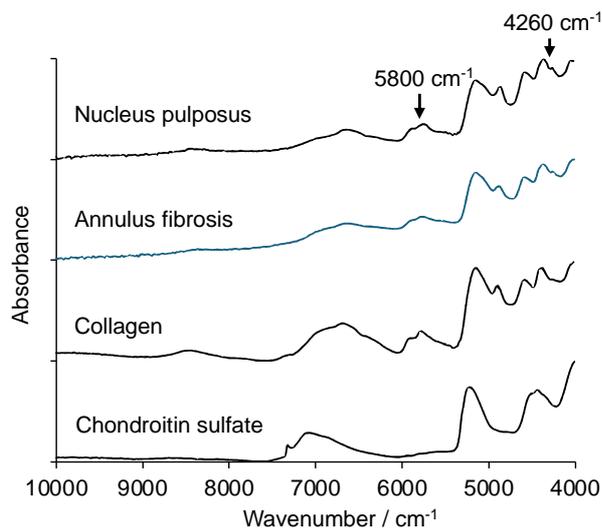


図2 サケの髄核、線維輪、コラーゲン、コンドロイチン硫酸の近赤外スペクトル

(4) 試料調整法

近赤外励起ラマン分光法ならび近赤外分光法による軟骨質評価において、試料調整法、保存法について検討した。関節軟骨を摘出後、生理食塩水で洗浄、測定したスペクトルと-60で2週間保存、自然解凍後に測定したスペクトルを比較した結果、差異は認められなかった。したがって、検体は-60で2週間程度であれば固定せずに保温可能であることが示された。

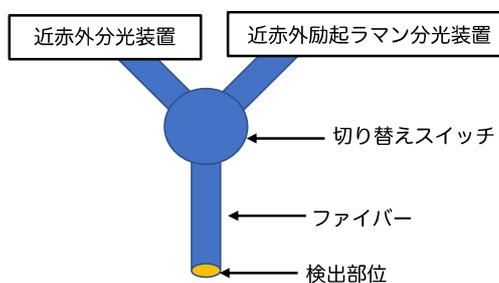


図3 申請時の装置概略図

(5) 近赤外分光法とラマン分光法による軟骨の in vivo 測定

本研究では、当初、図3に示した概略図のようなプローブを検討していたが、光ファイバ

ケーブルを接続した近赤外励起ラマン分光装置から十分なシグナルが得られなかった。

<引用文献>

- P. J. Wu, M. I. Masouleh, D. Dini, C. Paterson, P. Torok, D. R. Overby, and I. V. Kabakova, *Biomed Opt Express*, 10, 2457 (2019).
- T. N. Wight, M. G. Kinsella, and E. E. Qvarnström, *Curr Opin Cell Biol*, 4, 793 (1992).
- S. Heath, Y. Han, R. Hua, A. Roy, J. Jiang, J. S. Nyman and X. Wang, *Bone*, 171, 116751 (2023).
- A. K. Williamson, A. C. Chen, and R. L. Sah, *J Orthop Res*, 19, 1113 (2001).
- K. Potter, L. H. Kidder, I. W. Levin, E. N. Lewis, and R. G. S. Spencer, *Arthritis & Rheumatism*, 44, 846 (2001).
- I. O. Afara, and A. Oloyede, *Cartilage*, 13, 729s (2021).
- U. P. Palukuru, C. M. McGoverin, and N. Pleshko, *Matrix Biol*, 38, 3 (2014).
- Diem, M., Schubert, J., Miljković, M., et al. (2014). In: *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, Salzer, R., & Siesler, H. W., 5, Wiley-VCH: Weinheim, 181.
- T. C. O'Haver, and G. L. Green, *Analytical Chemistry*, 48, 312 (1976).
- R. Ailavajhala, W. Querido, C. S. Rajapakse, and N. Pleshko, *Analyst*, 145, 3713 (2020).
- S. Kandel, W. Querido, J. M. Falcon, D. J. Reiners, and N. Pleshko, *Tissue Eng Part C Methods*, 26, 225 (2020).
- M. Morita, *Journal of the Society of Biomechanisms*, 17, 209(1993).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Fumiya Nakamura, Tomoki Ikemizu, Takashi Isoshima, Daiji Kobayashi, Hiromi Kimura-Suda
2. 発表標題 Development of a Novel Quantitative Assessment Technique for Proteoglycans Using Near-infrared Spectroscopy
3. 学会等名 KJF- ICOMEP 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村郁哉, 池水友紀, 弘中翔大, 河本千宙, 中居豪佑, 磯島隆史, 木村-須田廣美
2. 発表標題 近赤外分光法による軟骨組織の新規定量評価技術の検討
3. 学会等名 第43回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 弘中翔大, 河本千宙, 中村郁哉, 木村-須田廣美
2. 発表標題 赤外イメージングによるシロザケの骨質解析
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村郁哉, 池水友紀, 弘中翔大, 河本千宙, 中居豪佑, 磯島隆史, 木村-須田廣美
2. 発表標題 近赤外分光法による軟骨組織中のプロテオグリカンとコラーゲンの定量的検討
3. 学会等名 第35回北海道骨粗鬆症研究会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村郁哉、池水友紀、弘中翔大、河本千宙、中居豪佑、磯島隆史、木村-須田廣美
2. 発表標題 近赤外分光法によるサケ椎間板のプロテオグリカンとコラーゲンの定量的検討
3. 学会等名 第35回代用臓器・再生医学研究会総会/日本バイオマテリアル学会北海道ブロック第7回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村郁哉、池水友紀、弘中翔大、河本千宙、中居豪佑、磯島隆史、木村-須田廣美
2. 発表標題 In situ近赤外分光法による椎間板のプロテオグリカンとコラーゲンの定量分析
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fumiya Nakamura, Shota Hironaka, Hideyo Horiuchi, Chihiro Kawamoto, Hiromi Kimura-Suda
2. 発表標題 Characterization of proteoglycan in salmon nasal cartilage using FTIR and Raman spectroscopy
3. 学会等名 KJF-ICOMEF 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	千葉 恒 (Chiba Ko) (00457574)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小田 久哉 (Oda Hisaya) (60405701)	公立千歳科学技術大学・理工学部・准教授 (20106)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関