慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	磁気共鳴緩和を応用した関節軟骨の制限拡散現象の解明とマイクロ構造評価技術の開発
Sub Title	Assessment of micro-structure in articular cartilage and using q-space MRI
Author	宮田, 昌悟(Miyata, Shogo)
Publisher	
Publication year	2010
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2009.)
JaLC DOI	
Abstract	組織工学的手法を用いて軟骨細胞を生体外または生体内で3次元的に再構築する軟骨の再生医療では, 非侵襲的な組織形成度の評価法の確立が必要不可欠である. 関節軟骨は質量の70 - 80%が水分から構成されるために, 組織内の水分子の制限拡散現象と軟骨の材料特性との間には密接な関係が存在すると考えられる. 軟骨内部の水分子は細胞膜や細胞外基質(コラーゲン, プロテオグリカン)によって運動が複雑に制限されるため複数の拡散成分を示す. 本研究課題では軟骨組織中の水分子の制限拡散現象に着目した, 再生軟骨のマイクロスケールでの組織構造評価法の開発を行った.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2008～2009 課題番号：20700381 研究分野：総合領域 科研費の分科・細目：人間医工学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20700381seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：2008～2009
課題番号：２０７００３８１
研究課題名（和文）　磁気共鳴緩和を応用した関節軟骨の制限拡散現象の解明とマイクロ構造評価技術の開発

研究課題名（英文）　Assessment of Micro-Structure in Articular Cartilage and Using q-space MRI

研究代表者
宮田　昌悟（MIYATA　SHOGO）
慶應義塾大学・理工学部・講師
研究者番号：70376515

研究成果の概要（和文）：
組織工学的手法を用いて軟骨細胞を生体外または生体内で 3 次元的に再構築する軟骨の再生医療では，非侵襲的な組織形成度の評価法の確立が必要不可欠である．関節軟骨は質量の 70－80%が水分から構成されるために，組織内の水分子の制限拡散現象と軟骨の材料特性との間には密接な関係が存在すると考えられる．軟骨内部の水分子は細胞膜や細胞外基質（コラーゲン，プロテオグリカン）によって運動が複雑に制限されるため複数の拡散成分を示す．本研究課題では軟骨組織中の水分子の制限拡散現象に着目した，再生軟骨のマイクロスケールでの組織構造評価法の開発を行った．

研究成果の概要（英文）：
Applying tissue engineered cartilage in a clinical setting requires non-invasive evaluation method to assess biophysical property of tissue-engineered cartilage as well as biochemical property. Articular cartilage is made up of 70%-80% water, and has dense extracellular matrixes (ECM). Because of this high rate of water content, it is considered that diffusion condition of water molecules in tissue is correlated with material properties. The movements of water molecules in cartilaginous tissue are restricted by cell membranes and the ECM (collagen, proteoglycan). In this study, we focused on the restricted diffusion of water molecules in the cartilage, and established the assessment method of micro-structure of the cartilaginous tissue using q-space MRI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：人間医工学
キーワード：バイオメカニクス

１．研究開始当初の背景

関節疾患は 65 歳以上の人口の約半数が罹患しているとされ，運動機能が制限され QOL：Quality of Life を低下させる点で，超高齢化社会の招来とともに大きな問題となりつつある．関節軟骨の組織構造と物理的機能の関係のマイクロスケールレベルからの解明は，関節疾患の早期発見を目指す次世代の診断技術や再生軟骨に代表される新規な治療手法の開発において非常に重要である．

関節軟骨は軟骨細胞と細胞外基質と呼ばれるプロテオグリカン凝集体やコラーゲン繊維網及び間質液から構成されており，特にプロテオグリカンには強い陰性の固定電荷を持つ硫酸化グリコサミノグリカンが含まれる．また，関節軟骨は質量の 70～80%が水分で構成されており，組織内部の水分子の運動は上記のコラーゲン繊維網や陰性に帯電するプロテオグリカンからの電気的引力によって制限される．このように水分子の拡散運動が制限されることで，軟骨の変形に伴う組織内部の水分の流動が抑制され，関節軟骨は優れた潤滑能や荷重支持機能を実現している．

研究代表者はこれまでに軟骨疾患の再生医療のための組織評価技術の開発を目的として研究を行ってきた．具体的には再生軟骨の静的・動的粘弾性と生化学的な組織構成成分との関係を明らかにし，磁気共鳴緩和現象に基づく測定手法（MRI/MRS：Magnetic Resonance Imaging/Spectroscopy，NMR：Nuclear Magnetic Resonance）を応用した再生軟骨や生体軟骨の非侵襲的な組織評価法の開発を行っている．研究代表者らはこれらの研究成果から「関節軟骨や再生軟骨では，組織の物理的機能や生化学的特性と軟骨内部の水分子の自己拡散係数との間に強い相関関係が存在する」ことを知見として得ており，本申請課題で主眼とする，『磁気共鳴緩和現象に基づく水分子の制限拡散の観測』という新たな測定技術を応用した関節軟骨のマイクロ組織構造評価システムの着想にいたった．

２．研究の目的

研究代表者は『軟骨内部の水分子の運動（拡散現象など）が，プロテオグリカンの持つ強い陰性の固定電荷からの電気的引力によって制限され，変形に伴う液体成分の流動に影響を与えることで関節軟骨に特有の物理的機能が実現されている』という新たな視点を持っている．

そこで本研究課題では関節軟骨及び再生軟骨内部の水分子の拡散現象を q-space MRI（MRI による制限拡散測定法）を用いて観測し，軟骨組織における水分子の制限拡散と組織のマイクロ構造との関係を解明することを目的とした．さらに得られた知見から「関節軟骨及び再生軟骨のマイクロ組織構造の非侵襲評価システム」の開発を行うことを目指した．

３．研究の方法

(１) 軟骨細胞の単離とアガロースゲルによる三次元細胞分散モデル

関節軟骨の試料として，生体軟骨，軟骨細胞-アガロースゲル三次元培養体，アガロースゲルの３種類とした．生体軟骨は生後 2～3 ヶ月の仔ウシの足関節より無菌的に採取した．また，軟骨細胞-アガロースゲル三次元培養体は，仔ウシ軟骨細胞をアガロースゲルに包埋して培養することで作製した．軟骨細胞は仔ウシ膝関節より採取した軟骨組織をコラゲナーゼ溶液により溶解し抽出した．細胞の懸濁液と低融点の 4%アガロース溶液を同体積で混合して軟骨細胞・アガロース溶液を調製し，4℃環境下に 25min 静置して厚さ 2mm のゲルシートを作製した．このゲルシートより直径 8mm，厚さ 2mm の円盤状に採取し軟骨細胞-アガロースゲル試料とした（図 1）．培養試料は 37℃，5%CO_2 環境下で 25 日間培養した．培養 0，7，21，28 日において試料を取り出して q-space MRI による測定を行った．また，ハイドロゲルとして細胞を含まない同形状の 2%アガロースゲル採取し同様の測定を行った．

(2)q-space MRI による制限拡散現象の観測

q-space MRI は 4.7T の MRI 装置（Bore size：33cm，1H Resonance：200 MHz）を用いて行った．測定シークエンスは STEAM(stimulated echo acquisition mode)，測定条件は Voxel size 3×3×3 mm, TR 8000 ms, TE 55 ms, TM 70 ms, MPG の印加時間（δ）/間隔（Δ）20 ms/100ms, MPG 強度（G）0-60 mT/m（31 steps）の可変強度とした．測定概念図を図 2 に示す．

４．研究成果

q-space MRI により再生軟骨，アガロースゲル，生体軟骨のそれぞれの組織中の水分子の拡散速度分布を測定することができた．

軟骨細胞-アガロースゲル三次元培養体では信号減衰は培養日数に関わらず bi-exponential な変化を示し，拡散成分に fast component と slow component が存在することが明らかになった．また，培養日数の経過に応じて，各成分の拡散係数は低下する傾向に

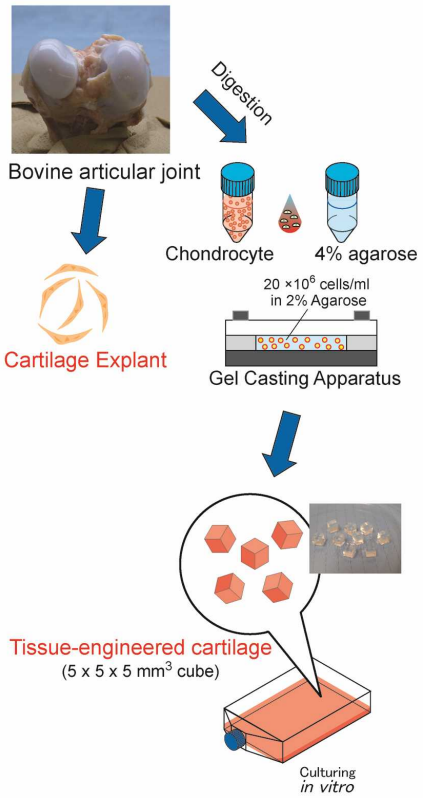

図 1　軟骨細胞単離とアガロースゲルによる三次元培養

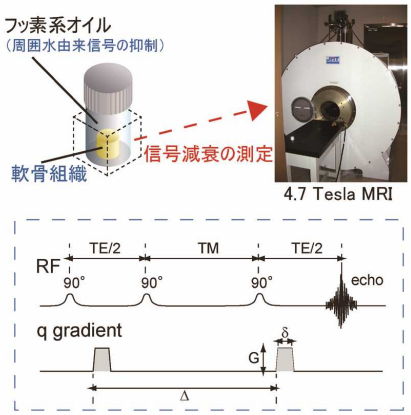

図 2　q -space MRI による制限拡散現象の観測

あった（図 3）．一方で，アガロースゲルのみの試料では mono-exponential な信号減衰が観測された．また，培養 0 日の三次元培養体では fast component が 1.52 x 10^{-3} mm^2/s，slow component が 1.11 x 10^{-4} mm^2/s であったのに対し，培養 28 日では fast component が 1.36 x 10^{-3} mm^2/s，slow component が 0.98 x 10^{-4} mm^2/s に低下することが明らかになった（図 4a，b）．これら 2 種の拡散成分の存在は，組織再生過程においてゲル内部に再構築される軟骨組織が細胞周囲に存在する細胞外基質（pericellular ECM）と細胞遠位部に再構築される細胞外基質の再生を示すものと考えられる．

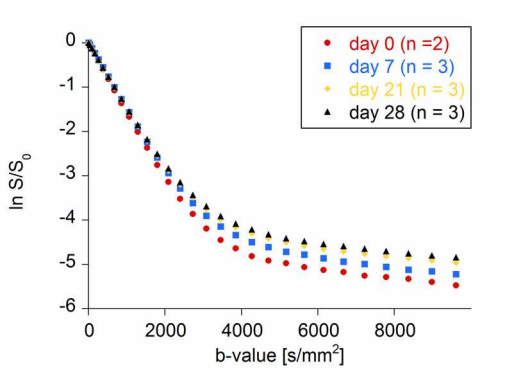

図 3　軟骨細胞 -アガロース培養体の組織再構築に伴う信号減衰の変化

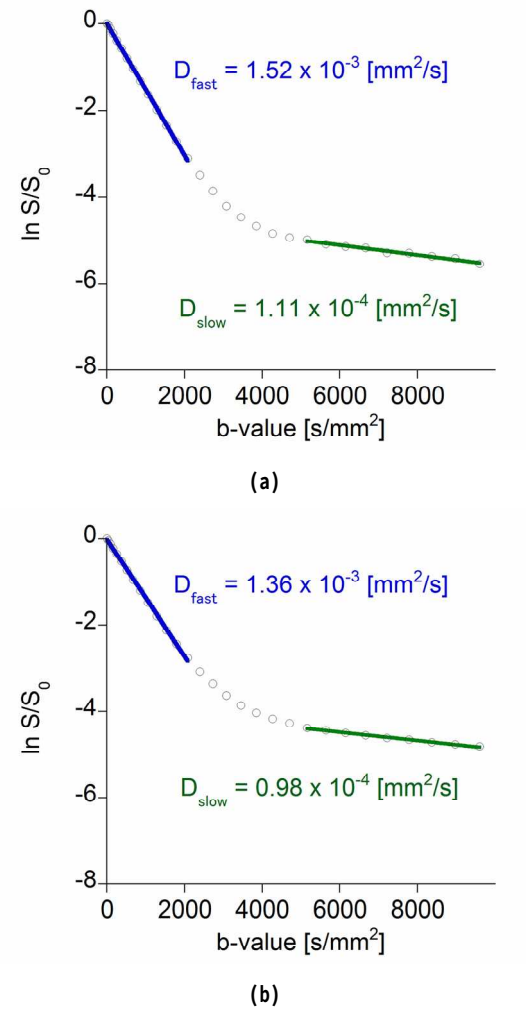

図 4　軟骨細胞 -アガロース培養体の組織再構築に伴う fast component，slow component の拡散係数の変化（a：培養 0 日，b：培養 28 日）

一方で生体軟骨では，非線形な信号減衰を示し，複数の拡散成分が存在することが明らかになった（図 5）．これは，軟骨基質中のコラーゲン繊維網の空間的な制限拡散効果やプロテオグリカンの持つ陰性の固定電荷のクーロン力が水分子に働くことによる制限

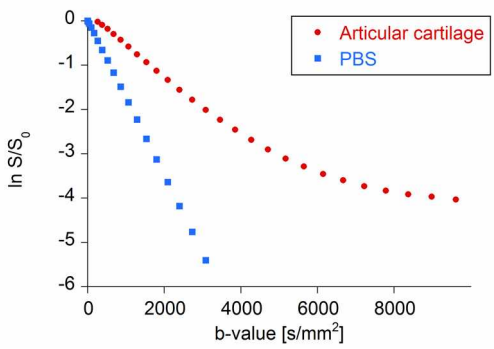

図 5　生体関節軟骨の制限拡散に由来する信号減衰

拡散効果が要因として推測される．

本研究成果より q-space MRI により生体関節軟骨，再生軟骨の拡散現象が観測可能であることが明らかになった．生体軟骨中の水分子は複数の要因に由来する制限拡散状態にあり，これを詳細に検討することで軟骨組織中のマイクロ構造が観測できる可能性が示唆された．さらに，再生軟骨では bi-exponential な信号減衰を示したことから，fast component, slow component の 2 種類の拡散成分を観測することで，組織工学的に再構築された再生軟骨の微細構造を評価できる可能性が示唆された．

関節軟骨疾患の早期発見や再生軟骨組織の詳細な非侵襲評価法の必要性は，近年の高齢化社会への急速内向とともに高まっており，本研究で確立した『水分子の制限拡散現象の観測に基づく軟骨の微細組織構造の評価技術』は，上述の要求を満たす評価・診断手法として期待される．

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〕（2 件）

1. S. Miyata, K. Homma, T. Numano, T. Tateishi, and T. Ushida, “Evaluation of Negative Fixed-Charge Density in Chondrocyte/Agarose Construct by Quantitative MRI and Relationship with Dynamic Compressive Properties”, Trans. ASME J. Biomech. Eng., 査読有，掲載決定(2010)

〔学会発表〕（計 10 件）

1. S Nakatani, M. Sekino, H. Ohsaki, M. Ohsaki, S. Miyata, "Control of Fiber Alignment in Collagen Gel by Static Magnetic Field and Effect of That on ECM Synthesis of Articular Chondrocytes", Proc. of 56th Annual Meeting on Orthopaedic Research Society, (March 7, 2010, New Orleans, USA)
2. 中谷駿介，宮田昌悟，大崎博之，関野正樹，"軟骨細胞含有コラーゲンゲルに対する磁場印加の組織再構築に与える影響"，第 36 回日本臨床バイオメカニクス学会講演論文集，（松山，2009 年 10 月 16 日）
3. 宮田昌悟，関野正樹，大崎博之，"ADC 測定における biexponential な信号減衰に着目した再生軟骨の微細構造評価の基礎的検討"，第 37 回磁気共鳴医学会大会講演論文集，（横浜，2009 年 10 月 2 日）
4. 中谷駿介，宮田昌悟，大崎博之，関野正樹，"コラーゲンゲルの微細組織構造が軟骨細胞の細胞外基質産生に及ぼす影響"，第 58 回日本材料学会総会・学術講演会講演論文集，（松山，2009 年 5 月 23 日）
5. 宮田昌悟，関野正樹，大崎博之，牛田多加志，"MRI を用いた再生軟骨の力学特性及び微細構造評価の可能性"，第 48 回日本生体医工学会大会講演論文集，2（東京，2009 年 4 月 24 日）
6. 中谷駿介，関野正樹，大崎博之，宮田昌悟，"磁場を用いたコラーゲンゲルの微細構造制御と再生軟骨への応用"，第 8 回日本再生医療学会総会講演論文集，2（東京，2009 年 3 月 5 日）
7. 宮田昌悟，関野正樹，大崎博之，牛田多加志，"細胞・細胞外基質が軟骨における制限拡散現象に与える影響: q-space MRI 測定による基礎的検討"，第 36 回日本磁気共鳴医学会大会講演論文集，（旭川，2008 年 9 月 12 日）

〔その他〕

ホームページ：

http://www.miyata.mech.keio.ac.jp/index.html

６．研究組織

(1)研究代表者

宮田　昌悟（MIYATA　SHOGO）

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：70376515

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし