

q-space MRI による再生軟骨および関節軟骨の組織評価法 [大会長賞記録]

宮田昌悟¹, 関野正樹², 大崎博之², 牛田多加志³

¹九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻

²東京大学大学院新領域創成科学研究科 ³同医学系研究科

はじめに

関節軟骨は生体における可動関節部の骨端に位置し、優れた荷重支持機能や潤滑能を有する結合組織である。軟骨は質量の70~80%を占める水や電解質からなる液相とプロテオグリカン、コラーゲン線維を主要成分とする固相で構成される。軟骨の優れた機械的機能は引張剛性をもつコラーゲン線維網と高い水和性を示すプロテオグリカンからなる高次組織構造に由来する¹⁾。一方で関節軟骨には血管網が存在しないことから、損傷や変性に対する回復能はきわめて低く、いったん損傷すると回復は困難であり最終的には変形性関節症へと進行する。このような関節軟骨疾患の治療手法として近年、組織工学的手法を用いた軟骨再生医療に関する研究が進められている。これは患者自身の細胞を採取し、生体外で3次元的に軟骨様組織を再構築した後に、患部に移植、損傷部位を置換する手法である。このような軟骨の再生医療では生体外で再生された組織が移植後の生体内環境に耐え得るか判断するための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。

上述のように関節軟骨は質量の70~80%が水分から構成されるために、組織内の水分子の運動性と軟骨組織の材料特性との間には密接な関係が存在する。軟骨内に介在する水分子の拡散はコラーゲン線維やプロテオグリカンによる

影響を受け、特に分子構造に硫酸基をもつプロテオグリカンは陰性に帯電していることから電氣的引力により周囲に水分子を引き付け制限拡散現象を生じることが予測される。そこで本研究では水分子の制限拡散現象の計測手法として q-space MRI に着目し、再生軟骨、ハイドロゲル、生体軟骨を試料として細胞や軟骨の細胞外基質が q-space MRI による制限拡散特性に与える影響を調べた。

試料および実験方法

試料は再生軟骨、ハイドロゲル、生体軟骨とした。再生軟骨はアガロースゲル包埋培養法を用いて軟骨細胞を三次元培養することで作製した。軟骨細胞はブタ膝関節より採取した軟骨組織をコラー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°C 環境下に25 min 静置して厚さ2 mm のゲルシートを作製した。このゲルシートより直径8 mm、厚さ2 mm の円盤状に採取し再生軟骨試料とした。再生軟骨は37°C、5% CO₂ 環境下で25日間培養した。培養7、25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、生体軟骨としてブタ膝関節より直径6 mm、厚さ

キーワード q-space MRI, regenerated cartilage, articular cartilage, tissue engineering

1.5~2.5 mm 程度となるように試料を採取し同様の測定を行った。q-space MRI は 4.7T の MRI 装置 (Bore size: 33 cm, ^1H Resonance: 200 MHz) を用いて行った。測定シーケンスは STEAM (stimulated echo acquisition mode), 測定条件は voxel size $3 \times 3 \times 3$ mm, TR 8000 ms, TE 55 ms, TM 70 ms, MPG の印加時間(δ)/間隔 (Δ) 20 ms/100 ms, MPG 強度 (G) 0~60 mT/m (31 steps) の可変強度とした。

結果と考察

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。再生軟骨 (培養 7, 25 日), ハイドロゲルでは b -value の増加に伴い直線性の信号減衰を示すことから, 拡散速度分布は自由拡散に近くほぼガウス分布であると考えられる。一方で, 生体軟骨では b -value の増加に伴い非線形の信号減衰を示し, 組織中の水分子の制限拡散が観察された。また, それぞれの試料において信号減衰が直線近似できる領域で拡散係数を求めたところ, 再生軟骨 (培養 25 日): $1.79 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$, 2% アガロースゲル: $1.98 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$, 生体軟骨: $1.25 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であった。

生体組織の制限拡散には細胞膜の効果があることから組織中の細胞数密度を測定したところ, 再生軟骨 (培養 7 日): 1.2×10^7 cells/ml, 再生軟骨 (培養 25 日): 1.5×10^7 cells/ml, 生体軟骨: 1.3×10^7 cells/ml であった。再生軟骨において直線性の信号減衰を示したことを考えると, 生体軟骨における非線形の信号は細胞膜に由来するものではないと考えられる。関節軟骨は引張剛性の高いコラーゲン線維網に陰性に帯電したプロテオグリカンを含む高次組織構造

からなる高含水組織である。本実験で観察された生体軟骨における制限拡散現象はコラーゲン線維網やプロテオグリカンからの電氣的引力により水分子の運動が制限されたことによるものと推測される。今後はコラーゲン, プロテオグリカンを酵素により選択的に変性する軟骨変性モデル²⁾を用いて生体関節軟骨における制限拡散現象と組織構造との関係を明らかにする予定である。

結 語

q-space MRI により再生軟骨, ハイドロゲル, 生体関節軟骨の拡散現象を測定した。その結果, 生体関節軟骨の水分子の拡散現象において細胞膜による遮蔽効果を要因としない制限拡散が存在する可能性が示された。

謝 辞

本研究の一部は, 科学技術振興調整費 (重要課題解決型研究の推進プログラム『組織医工学における材料・組織評価法の確立』) および立石科学技術振興財団の助成を受けて行われた。ここに謝意を表する。

文 献

- 1) Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG: Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments. J Biomech Eng 1980; 102: 73-84
- 2) 宮田昌悟, 古川克子, 立石哲也, 牛田多加志: 酵素処理による構造変性が関節軟骨の粘弾性に与える影響. 日本臨床バイオメカニクス学会誌 2006; 27: 23-27

Assessment of Articular Cartilage and Tissue-Engineered Cartilage Using q-space MRI [Presidential Award Proceedings]

Shogo MIYATA¹, Masaki SEKINO², Hiroyuki OHSAKI²,
Takashi USHIDA³

¹Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology
2-4 Wakamatsu, Kitakyushu 808-0196

²Graduate School of Frontier Sciences, ³Graduate School of Medicine, University of Tokyo

The application of tissue-engineered cartilage in a clinical setting requires a noninvasive method to assess the biophysical and biochemical properties of the engineered cartilage. Because articular cartilage is composed of 70 to 80% water and has dense extracellular matrices, the condition of the water molecules in the tissue is considered to correlate with its material property. Therefore, magnetic resonance (MR) imaging represents a potential approach to assess the biophysical property of the cartilage. In this study, we measured the restricted water diffusion in tissue-engineered cartilage and articular cartilage. To reconstruct the tissue-engineered cartilage, chondrocytes harvested from porcine joints were embedded in 2% agarose gel and cultured *in vitro* up to 25 days. Articular cartilage was excised from the porcine joints. q-space MR imaging measurements were performed at 4.7T. The tissue-engineered cartilage showed linear signal decay in q-space MR imaging, whereas the articular cartilage showed nonlinear decay. This result showed that factors other than the cell membrane might affect the restricted water diffusion in articular cartilage.