2B12

Dynamic Optical Coherence Straingraphy を用いた 変性関節軟骨におけるマイクロ力学断層診断法の考察

Study on Tomographic Micro-Mechanical Biopsy of Degenerated Articular Cartilage
using Dynamic Optical Coherence Straingraphy

学 ○峯松孝幸（山口大院医） 学 岡本祐太（山口大院医） 正 佐伯壮一（山口大院医）

Takayuki Minematsu, Yuta Okamoto and Souichi Saeki

Applied Medical Engineering Science, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University, 2-16-1 Tokiwadai, Ube

Key words : Articular Cartilage, Dynamic Optical Coherence Straingraphy, Tomography, Depth-dependency, Micro mechanics, Clinical diagnosis, Micro-Mechanical Diagnosis

1. 緒言

高齢化社会に伴い、変形性膝関節症(OA)に対する診断治療法の確立が望まれている。OAは軟骨の優れた粘弾性特性の損失によって発生する疾患である。しかし、奥行き依存性を有する力学特性など、軟骨組織のマイクロバイオメカニクスが不明確であり⁽¹⁾、OA臨床診断においても組織力学特性の断層可視化が求められている。近年、光コヒーレンス断層画像(OCT)が開発された。OCTは高空間分解能にて生体組織内部の非侵襲断層可視化が可能であり、カテーテル化が容易であることから臨床展開が進んでいる。著者は、生体組織内部の力学特性をひずみ断層分布としてマイクロ断層可視化するOptical Coherence Straingraphy (OCSA)の開発を行ってきた。本研究では、コラーゲンを変性させた関節軟骨に *ex vivo* 圧縮試験と動的OCSA (Dynamic OCSA)を適用し、関節軟骨内部に発生するひずみ速度分布の経時変化を非侵襲断層可視化計測し、OA臨床診断への適用可能性について考察する。

2. Optical Coherence Straingraphy(OCSA)

OCTは近赤外広帯域光の高透過性、低干渉性を利用した断層可視化技術である。試料からの後方散乱光と参照鏡からの反射光をファイバコプラにて干渉させ、生体組織内部からの後方散乱強度信号を取得する。これを組織形態分布のOCT断層像として可視化する。光源に低コヒーレンス広帯域光を用い、奥行き方向に1~10[μm]程度のマイクロオーダーの空間分解能を得ることができる。OCSA法はデジタル画像相関法に基づき、変形前後のOCT断層像から移動変形ベクトル分布を検出し、ひずみテンソル分布の断層可視化法である。高解像度の移動変形ベクトルを断層検出するため、再帰的相互相関法や隣接相互相関乗法を導入している。マイクロスケールにおける微小変形解析では、検出ベクトルのサブピクセル精度が重要となるため、輝度勾配を利用する風上勾配法と、伸縮および剪断を考慮した画像変形法の両サブピクセル解析法を併用し、微小ひずみの高精度検出を達成している。最後に、移動最小二乗法により移動ベクトルを平滑化し、二次元スプライン補間によって得られる空間微係数から空間連続性を満足させてひずみテンソルを算出している。本手法による移動量とひずみの検出精度は、0.03[pixel] (0.234[μm])と0.00050[-]まで到達可能であることを確認している⁽²⁾。

3. 実験方法

図1に圧縮試験機とOCTシステムで構成される動的OCSA実験装置を示す。軟骨試料の下骨側を圧子に固定し、高精度リニアガイドアクチュエータを用いて圧縮器内に設置したガラス窓に向けて移動させ、軟骨組織に圧縮変形を発生させ

Fig.1 Dynamic OCSA system with Compression Machine

ると共に、圧子に接続されたロードセルから荷重検出した。ガラス窓から軟骨表面に向けて入射ビームを照射し、関節軟骨のOCT断層像を取得した。本実験では、中心波長1330 [nm]、波長幅110 [nm]の波長掃引型レーザーを光源とする波長走査型OCTシステムを用い、光軸奥行きz方向と光軸垂直x方向の空間分解能を7.1 [μm]と7.5 [μm]とした。ガルバノミラーにより照射光を連続走査し、2×3 [mm] (615×384 [pixel]) の二次元xz断層像を27 [frame/sec]にて連続撮影した。生後6~7ヶ月の豚大腿骨側膝関節から軟骨下骨を含めたφ5.5 [mm]の円筒形状の軟骨組織を摘出し、計測試料として用いた。変性軟骨の模擬試料は、30 [unit/ml]のコラーゲナーゼ溶液を用いて37 [°C]の恒温槽にて2時間と4時間のコラーゲン分解酵素処理を行い準備し、OCT断層像から関節軟骨厚さを計測した。圧縮試験器を用いて、圧縮速度0.1[%/sec]、圧縮時間100[sec]にて約10[%]の圧縮変形を与えた。なお、荷重量の検出値からロードセル自体の変位も考慮して圧縮距離は補正した。また、試料表面とガラス窓との接触を補償するため、OCT断層像のxy断面から軟骨表面を観察しながら、約0.1[N]の平衡状態を検出し圧縮開始点と定めた。応力緩和試験の各時刻においてOCT断層像を連続撮影し動的OCSAを適用し、算出されるひずみ速度断層分布から力学挙動を断層可視化した。

4. 実験結果

図2に関節軟骨のOCT断層像の一例を示す。z=600[μm]付近の高輝度線は軟骨表面とガラス窓の境界を示している。軟骨組織内部からの後方散乱光がスペckルパターンとして検出され、組織形態分布が非侵襲にてマイクロ断層可視化されていることがわかる。軟骨表層は中間層に比べて輝度が低いことが観察できるが、コラーゲンやプロテオグリカンの基質量が表層に向かって減少することと対応していると考えられる⁽³⁾。圧縮中に取得したOCT断層画像から算出したz方向ひずみ速度断層分布の一例を図3に示す。正常軟骨と変性軟骨の両者共に、0~20%程度の表層部にて局所的な圧縮ひずみ

速度の集中が検出された。ひずみ速度の空間依存性は、組織のコラーゲン配向特性や水分の組織内流動に関与していると考えられる。z方向ひずみ速度断層分布をx方向に平均したz方向ひずみ速度分布の経時変化を図4に示す。正常軟骨と変性軟骨の両者共に、圧縮開始直後から圧縮ひずみ速度が急激に集中拡大し、圧縮荷重負荷の時間帯にて維持されていることが分かる。その際に、表層から中間層に移行する部分にて比較的大きな膨張ひずみが確認された。一方、応力緩和時では、表層の圧縮ひずみ速度の減少と共に、中間層にて膨張ひずみの検出が確認できる。村上ら⁽¹⁾は軟骨細胞に染色を施した関節軟骨の切断面を蛍光顕微鏡観察し、圧縮開始前と任意時刻の軟骨細胞の変位から奥行き1軸z方向ひずみ分布を算出している。表層領域に圧縮歪みの集中が同様に報告されており、本実験結果の妥当性が示唆できる。

5. 考察

軟骨組織の力学挙動について、正常軟骨と変性軟骨とを比較するため、圧縮ひずみの集中が観察された0~15%の表層領域におけるz方向ひずみ速度分布を空間平均し、その時間依存性について検討した。図5に正常軟骨と変性軟骨(2H, 4H)に対する結果を示す。正常軟骨と変性軟骨も共に、圧縮開始直後から数秒間にて圧縮ひずみ速度が急激に増加していることから、コラーゲン配向性に起因した低剛性を有する表層組織の圧縮変形を検出できていると考える。しかし、圧縮開始直後の圧縮ひずみ速度の時間変化は、正常軟骨に比べ変性軟骨は若干遅いことが観察できる。これに加えて、ひずみ速度が最大に達する時間スケールは、変性軟骨が100秒程度の時間を要しているのに対し、正常軟骨では圧縮開始から数秒程度で最大となり定常化している。前者は、酵素処理によってコラーゲン分解が促進した結果、線維配向性に起因した圧密効果が低減したことを意味していると考えられる。これに対し、圧縮開始直後に発生する圧密効果の挙動と比較して、後者の挙動は有意に時間スケールが大きいことから、間隙流体圧の上昇と圧縮ひずみの表層集中の相互作用による現象であると考えられる。すなわち、変性軟骨に認められるひずみ速度上昇の時間遅れは、粘性挙動に対応していると推測できる。これは、上記した圧密効果の低下に加えて、酵素処理によるプロテオグリカンの間接的損失が透水率の上昇⁽³⁾を引き起こし、間隙流体圧の上昇を妨げたために発生していると考えられる。一方、応力緩和中においては、表層のひずみ速度が残存し続けていることから、圧密効果によって軟骨水の浸出が恒常的に妨げられ、荷重支持の維持機構が観察できる。しかし、荷重負荷終了直後(t=100sec)からの圧縮ひずみ速度の減少は、変性軟骨と比較して正常軟骨が緩慢であることが分かる。変性軟骨の透水率は高いため、間隙流体圧は急速に低下し荷重維持機構が破綻していると考えられる。これらの結果より、表層部の圧密効果だけでなく、粘性挙動を支配する透水率の変化によっても、間隙流体圧の変動に影響を与え、圧縮ひずみ速度変化の時間遅れとして顕在化していると考えられる。

6. 結言

酵素処理を施した変性関節軟骨に *ex vivo* 圧縮試験と動的OCSAを適用することで、組織内部に発生するひずみ速度分布の経時変化を非侵襲断層可視化計測した。その結果、正常軟骨と同様に表層にて局所的に圧縮ひずみ速度の集中発生を確認した。組織内部の力学変形挙動の経時変化を観察することで、コラーゲン組織変性を評価可能であると考えられた。本手法は細胞染色も不要で非侵襲性に優れることから、OA臨床診断や再生治療診断への適用可能性が示唆された。

Fig.2 An example of OCT image of articular cartilage (control, t=50.00sec)

Fig.3 An example of tomographic strain rate distribution obtained by Dynamic OCSA (control, t=51.11sec)

Fig.4 Time-variation of depth-profile of horizontally averaged strain rate distribution (control)

Fig.5 Time-variation of spatial-averaged strain rate in surface zone (0~15%)

参考文献

- (1) T. MURAKAMI, et.al., Trans. JSME, Series C, vol.47, No.4(2004), pp.1049-1055.
- (2) Y. ISHII, et. al., OSA Technical Digest (Optical Society of America, 2012), paper BW2A.8.
- (3) K. OSAWA, et.al., Trans. JSMBE, vol.49, No.1(2011), pp.116-121.