2C21 共焦点レーザー顕微鏡を用いた軟骨組織の時間依存ひずみ解析

Time-dependent Cartilage Strain Analysis by Confocal Laser Scanning Microscopy

学 ○井原 真紀(九州大) 正 村上 輝夫(九州大)

正 澤江 義則(九州大)

Maki IHARA, Kyushu University, Hakozaki6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka

Teruo MURAKAMI, Kyushu University

Yoshinori SAWAE, Kyushu University

Keywords: Articular Cartilage, Chondrocytes, Confocal Laser Scanning Microscopy

1. 緒言

軟骨組織は主にⅡ型コラーゲンとプロテオグリカンより構成される細胞外マトリックスと軟骨細胞から成る複合組織である。また、80%程度の高含水に起因する粘弾性を有し、圧縮力に対して抵抗性を示す。機械的環境の変化に伴い軟骨組織は自らを適応させていくといわれているが、その変化に対してどのようなメカニズムで対応していくかということは現在のところまだ明らかではない。軟骨組織の適応や変性に関しては軟骨細胞が大きく影響を与えていると推測され、軟骨組織全体及び軟骨細胞周りの力学的環境を知ることが重要と考えられる。しかし、軟骨組織は細胞外マトリックスに含まれるコラーゲンの配向が組織中で変化することによる異方性を有し、プロテオグリカンの量が組織中で均一でない。さらに細胞の集合方法も異なる(図1)非常に複雑な組織であるため、その応力-ひずみ状態を推測することは実験、計算ともに難しい面がある。実験に関しては現在までに組織全体の応力やひずみを測定した例^{1,2)}が数種類あるが、いずれも組織が平衡状態に達した状態での値を測定している。これは、組織の物性値を算出する試みを同時に行っていることによるためであるが、病変発生との解明につながる細胞周りの応力状態を知るためには、軟骨組織の応力-ひずみの伝達過程が非常に重要であり、平衡状態のみならず負荷直後からの経時的な観察が必要とされる。また、組織内でコラーゲンの配向、軟骨細胞の形状や分布状態が異なることから分かるように、軟骨組織は層によって果たす役割が異なると考えられ、その各層における応力-ひずみ伝達過程を調べることも必要である。現在までの研究において、軟骨細胞の影響を考慮した複合材料モデルによる有限要素解析³⁾の結果から、高含水に起因する粘弾性を有する軟骨組織は、組織全体へのひずみを負荷した直後から平衡状態にいたるまで、層ごとに時間依存のひずみ変化を示すことが予測されている。これは組織に含まれる水分の移動の影響であると考えられる。そこで、本研究では、軟骨組織に組織全体の5%量のひずみを与え、共焦点レ

ザー顕微鏡を用いて負荷直後より平衡状態に至るまで層ごとに観察し、各層のひずみ量の経時変化を測定する。さらに、測定結果と有限要素法による解析結果を比較し、軟骨組織のひずみ伝達を明らかにする。

Fig.1 Image of chondrocytes within articular cartilage by CLSM

2. 実験方法

2-1 試験片作成

本研究では、4~5ヶ月齢の豚の後肢膝関節の膝蓋溝面より採取した軟骨を試験片として用いた。目視により関節炎等の所見が見られないことを確認し、膝蓋溝面をバンドソー、マイクロカッターとパンチにより、軟骨下骨まで含む直径3mm、厚さ2.5mmの円柱状の試験片を作成した。さらに、メスで半円柱状にしPBSで洗浄した後、4.5 μ M濃度のCFMDA(5-chloromethyl fluorescein diacetate)染色液中に37℃, 15分間浸し、軟骨細胞を蛍光染色した。

2-2 厚さ測定及びひずみ量設定

共焦点レーザー走査型顕微鏡(Biorad社製)を用い、4倍の対物レンズを使用して軟骨組織の全体像を捉え、軟骨下骨を含まない軟骨の厚さを測定し平均値を算出した。その平均値から全体厚さの5%ひずみ量を算出した。

2-3 経時測定

共焦点レーザー顕微鏡を用いて軟骨組織全体を捉え、1.0枚/秒の割合で負荷直後より平衡状態になるまで経時測定した。

2-4 実験装置及び解析手法

図2に実験装置を示す。圧子部は非透水の直方体を用いた。

画像解析ソフトウェアを用いて解析を行った。軟骨組織には明確な境界がないため今回は細胞の形状に着目して、楕円体形状を有している細胞が含まれる範囲を表層、数個の細胞が連結的に集合している範囲を深層、それ以外を中間層とした。以前の研究³⁾により、全体の表層を10%、中間層を70%、深層を20%とした。層境界に最も近い所に存在する軟骨細胞をマーカーとし、その細胞の変位を用いて各層のひずみ量を測定した。軸方向以外の変位量は小さいため、軸方向変位量のみをひずみ量測定に用いた。

Fig. 2 experimental apparatus

3 結果

全体に5%ひずみを与えた場合、表層は平衡状態で平均5.46%ひずみを生じていた。以前の研究により行った、有限要素法を用いた解析結果(図4)では、ひずみ負荷直後に表層ではひずみ量がピークに達し、その後しだいに回復していくという結果が得られた。実験では、同様の挙動が表層では確認できなかったが、さらに表面に近い最表層付近では確認することができた(図3)。

Fig. 3 Time-dependent cartilage(chondrocyte) behavior (a)-time:2s, (b)-time:15s, (c)-time:30s after compression

Fig. 4 Time-dependent surface strain behavior of FEM Model

4 結言

今回の実験で、表層では軟骨組織内での時間依存のひずみ応答を確認することはできなかったが最表層では確認することができた。今後10%、15%、20%と与えるひずみ量を大きくして、更に観察を行っていく予定である。

参考文献

- 1) Robert M., et al.: Video Microscopy to Quantitate the Inhomogeneous Equilibrium Strain Within Articular Cartilage During Confined Compression. *annls of Biomedical Engineering*, 24:500-512(1996)
- 2) M. Wong, et al. Volumetric changes of articular cartilage during stress relaxation in unconfined compression. *J. of Biomechanics*, 33:1049-1054(2000)
- 3) 井原真紀, 村上輝夫, 澤江義則: 有限要素法を用いた軟骨組織の応力解析 2001年度機械学会年次大会予稿集