
変形性関節症診断のための近赤外線水分計による
関節軟骨の含水量測定法の開発

16560063

平成 16 年度～平成 18 年度科学研究費補助金
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者 田邊裕治

新潟大学 自然科学系 教授

はしがき

軟骨の剛性や硬さを調べた従来の *in vitro* の実験によれば、これらの力学特性は軟骨の水分量に強く依存することが報告されている。また、Mow らの先駆的研究によれば、軟骨に対して圧密試験を行った際の軟骨の変形能は透水率によって変化することが明らかにされている。したがって、軟骨内の水分量を計測することができれば軟骨変性の定量的診断、すなわち変形性関節症の診断で鍵となる正常軟骨と変性軟骨との識別が行える可能性がある。

そこで、近赤外線水分計を用いて軟骨内の水分量を計測することにより軟骨変性を定量的かつ低侵襲的に診断する方法を確立することを目的とした研究を実施した。そして「変形性関節症診断のための近赤外線水分計による関節軟骨の含水量測定法の開発」と題し、平成 16 年度～平成 18 年度にわたり科学研究費補助金、基盤研究(C) (課題番号: 16560063) の交付を受けて研究を行った。以下に主要な成果をまとめて報告する。

研究代表者 田邊 裕治

研究組織

研究代表者： 田邊 裕治 (新潟大学自然科学系教授)
研究分担者： 坂本 信 (新潟大学医歯学系教授)
大森 豪 (新潟大学超域研究機構教授)
小林 公一 (新潟大学医歯学系助教)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2,200	0	2,200
平成 17 年度	900	0	900
平成 18 年度	600	0	600
総計	3,700	0	3,700

研究発表

(1) 学会誌等

1. 濱田一成, 田邊裕治, 菊池達哉, 小林公一, 坂本信, 古賀良生, 近赤外線水分計を用いた軟骨内水分量の定量評価, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 27 巻, 35-38, 2006 年.

(2) 口頭発表

1. 田邊裕治, 濱田一成, 菊池達哉, 坂本信, 小林公一, 大森豪, 古賀良生, 軟骨変性の低侵襲的診断法の開発 (in vitro study), 日本実験力学学会講演論文集 2004 年度年次講演会, 15-17, No.4-2, 2004 年.

2. 濱田一成, 田邊裕治, 菊池達哉, 小林公一, 坂本信, 古賀良生, 近赤外線センサを用いた軟骨含水量の測定, 日本機械学会 2004 年度年次大会講演論文集, Vol.5, 105-106, 2004 年.

3. 濱田一成, 田邊裕治, 菊池達哉, 坂本信, 小林公一, 大森豪, 古賀良生, 近赤外線水分計を用いたブタ関節軟骨の含水量評価, 日本非破壊検査協会平成 17 年度春季大会講演概要集, 117-119, 2005 年.

4. 濱田一成, 田邊裕治, 菊池達哉, 坂本信, 小林公一, 大森豪, 古賀良生, 近赤外線水分計を用いた軟骨含水量の測定 (第 2 報) - 正常関節軟骨の検量線作成 -, 日本機械学会 2005 年度年次大会講演論文集, 107-108, 2005 年.

5. 濱田一成, 田邊裕治, 菊池達哉, 小林公一, 坂本信, 古賀良生, 近赤外線水分計を用いた軟骨内水分量の定量評価, 第 32 回日本臨床バイオメカニクス学会講演抄録集, 126, 2005 年.

6. K. Hamada, Y. Tanabe, T. Kikuchi, M. Sakamoto, K. Kobayashi, G. Omori, and Y. Koga, Measurement of Water Content in Articular Cartilage Using Near Infrared Spectroscopy, Proceedings of the 12th International Conference on Biomedical Engineering, December, 2005 Singapore, Paper#4A-5.

7. K. Hamada, Y. Tanabe, T. Kikuchi, M. Sakamoto, K. Kobayashi, and Y. Koga, Measurement of Water Content in Articular Cartilage Using Near Infrared Spectroscopy, Proceedings of the International Symposium on Advanced Fluid/Solid Science and Technology in Experimental Mechanics, September, 2006 Sapporo, Japan, pp.242-246.

8. 佐藤真也, 濱田一成, 菊池達哉, 田邊裕治, 小林公一, 坂本信, 古賀良生, 近赤外線水分計を用いた軟骨含水量の測定 - 吸光度に関する基礎的検討 -, 日本機械学会北陸信越支部 第 44 期総会・講演会 講演論文集, 345-346, 2007 年.

Abstract

The purpose of this study is to develop the method for the determination of mechanical properties of the degenerated articular cartilage. Previous studies found differences in permeability between normal articular cartilage (hyaline cartilage), and OA cartilage (fibrocartilage), and therefore different time-dependent water content after indentation testing was expected between these two cartilages.

First, this study deals with the two aspects of the detailed relations between recovery of absorbance and degeneration of human cartilage, that is, 1) relation between the degeneration of human articular cartilage and pattern of absorbance with respect to time after removal of indentation load, 2) relation between the degeneration of human articular cartilage graded by Mankin Score and variation of absorbance with time after removal indentation load.

Second, this study discusses the decreases of absorbance for cartilages and koya-tofu during compression.

The recoveries of absorbance after indentation were classified into 3 patterns. Initial decrease and the subsequent increase of absorbance (pattern 1), immediate increase of absorbance after removal of indentation load (pattern 2), and no recovery of absorbance (pattern 3) were observed. In the most of specimens graded as "normal", the recovery pattern of absorbance was "pattern 1". In the specimens of "pattern 1", the Mankin Score was able to be related to the time when absorbance had the minimum value. In the specimens of "pattern 2", the mean \pm S.D. of Mankin Score was 3.6 ± 2.0 .

Cartilages showed the increase of absorbance during compression, while koya-tofu showed the decrease of absorbance during compression.

目次

はしがき	i
Abstract	iii
第1章 緒論	1
1.1 背景	1
1.2 本研究の目的	4
1.3 本論文の構成	4
第2章 従来 of 関節疾患の評価法	7
2.1 臨床での評価	7
2.2 軟骨の組織学的評価	9
2.3 その他の軟骨物性の評価法	11
第3章 関節軟骨	12
3.1 緒言	12
3.2 軟骨の組成	12
3.2.1 コラーゲン	14
3.2.2 プロテオグリカン	17
3.2.3 自由水	19
3.3 軟骨同士の相互作用	19
3.4 関節軟骨の生体力学的挙動	23
3.4.1 成熟関節軟骨の粘弾性	23
3.4.2 外周拘束圧縮試験	24
3.4.3 圧縮を受ける関節軟骨の biphasic クリープ応答	25
3.4.4 圧縮を受ける関節軟骨の biphasic 応力緩和応答	28
3.4.5 関節軟骨の透過性	30
3.5 軟骨変性に関する生体力学的仮定	33
第4章 近赤外分光分析法	35

4.1	緒言	35
4.2	スペクトル測定法	35
4.3	近赤外線成分計	38
第5章 軟骨含水量の測定に関する基礎実験		40
5.1	緒言	40
5.2	実験方法	43
5.2.1	近赤外線水分計	43
5.2.2	試料－プローブ間の角度の測定	45
5.2.3	近赤外線の到達深度の検討	45
5.2.4	押し込み荷重除荷後の吸光度回復曲線の測定	45
5.3	結果	48
5.4	考察	52
5.4.1	試料－プローブ間の角度について	52
5.4.2	近赤外線の到達深度について	52
5.4.3	押し込み荷重除荷後の吸光度回復曲線について	52
5.5	結言	57
第6章 組織学的評価と吸光度回復曲線との関係		58
6.1	緒言	58
6.2	試料および実験方法	59
6.2.1	ブタ膝蓋骨軟骨およびブタ肋軟骨を用いた実験	59
6.2.2	ヒト関節軟骨を用いた実験	59
6.3	結果	61
6.3.1	ブタ膝蓋骨軟骨およびブタ肋軟骨の 吸光度回復曲線	61
6.3.2	ヒト関節軟骨の吸光度回復曲線	61
6.4	考察	67
6.5	結言	70

第7章 臨床応用を想定した吸光度測定実験	71
7.1 緒言	71
7.2 実験方法	72
7.2.1 原理	72
7.2.2 試料	72
7.2.3 実験装置および実験方法	75
7.3 結果	78
7.4 考察	81
7.4.1 自由水の滲出について	81
7.4.2 応力分布の影響について	81
7.4.3 高野豆腐での実験結果について	85
7.4.4 今後の課題	85
7.5 結言	88
第8章 結論	89
参考文献	92
謝辞	93

第1章 緒論

1.1 背景

現在，高齢化社会が進み，延命医療の発展に伴う平均寿命の延長に伴い，多くの高齢者が寿命と引き換えに，様々な疾患を抱えているといった状況にある．整形外科領域に関して言えば，40代以降に人々に多く見られるのが変形性関節症である．変形性関節症は全可動関節に発生しうるが，特に膝や股関節，手指などの関節での発生率が高い．主な臨床症状としては，関節軟骨の変性，摩耗，また疼痛，関節腫脹，可動域制限である．初期の頃は動作開始時に疼痛を感じる程度であるが，症状の進行と共に，安静時にも疼痛を感じるようになる．

臨床上特に多く見られる変形性膝関節症においては，関節面に作用する荷重の不均衡が大きな原因のひとつと考えられており，治療を考えるに当たっては，関節接触圧力分布を元に戻すことが原則である（図 1.1）．そこで初期の症状に対しては，種々の保存療法¹⁾が行われている．

1. 薬物療法

痛みという刺激を介した神経反射による筋緊張や筋萎縮などによる障害の悪循環を断ち切るため，非ステロイド性抗炎症薬などの痛み止めの投与が行われる．また，水腫などの症状に対しては，関節内注射による排水も行われる．

2. 理学療法

変形性膝関節症では，痛みによる結果として筋の萎縮が観察されるが，これはまた関節内の接触圧力を変化させ，症状を悪化させる悪循環の原因となる．そこで，楔形足底挿板などによって膝関節の傾きを調整し，関節内の圧力分布のバランスを整える方法が行われている（図 1.2）．

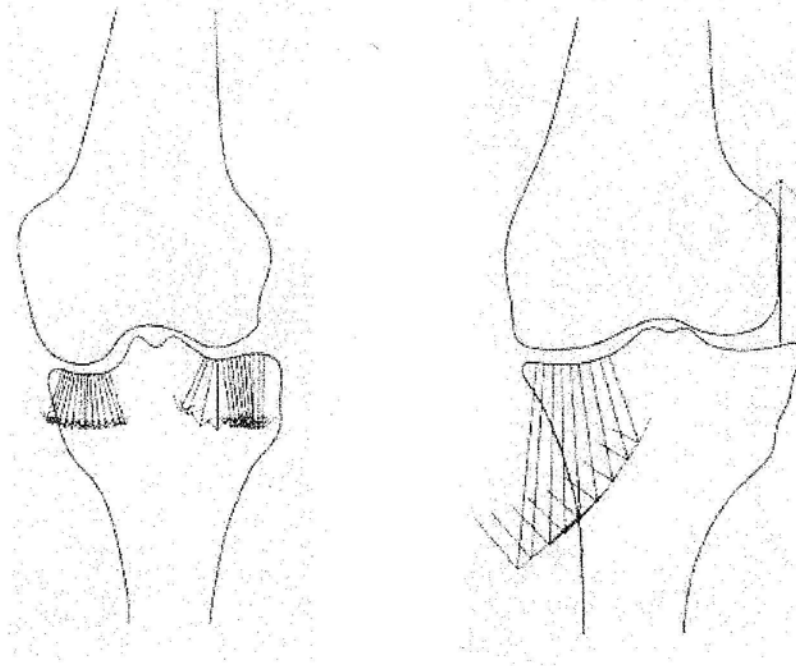


図 1.1 正常膝関節（左）と変形性関節症膝（右）の圧力分布

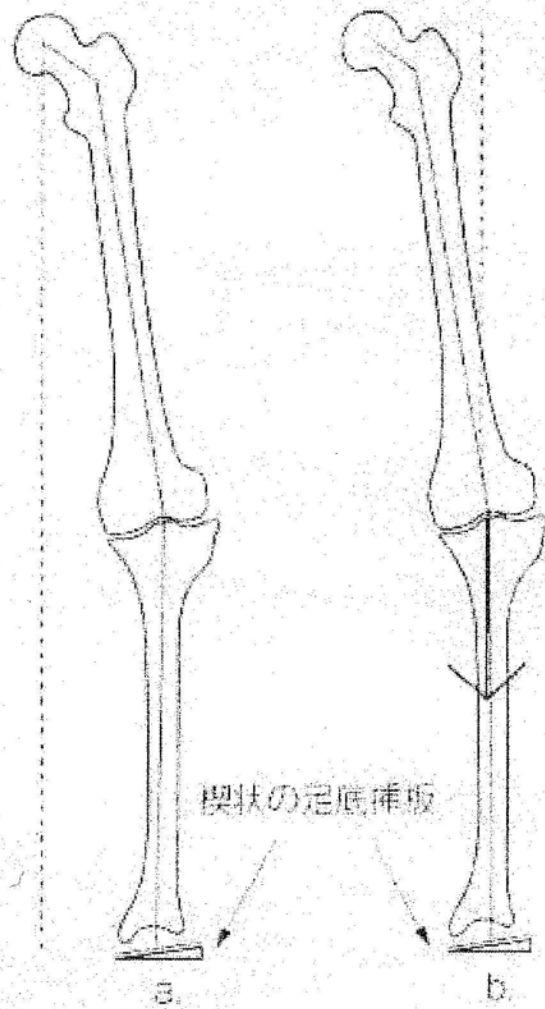


図 1.2 理学療法における，楔形測定挿板

しかし、症状が進み、関節の力学環境を根本的に改善する必要がある場合には、高位脛骨骨切術（high-tibial-osteotomy；THO）や人工膝関節置換術（total-knee-arthroplasty；TKA）などの手術的治療によらざるを得ない。高位脛骨骨切術は、脛骨の脛骨粗面より近位で骨切し、下肢のアライメントを補正する手術である（図 1.3）¹⁾。

さらに、関節軟骨の摩耗がひどく、関節面の陥没が見られるような場合には、関節面そのものを切除し、ポリエチレンおよび金属製の人工関節を装着する人工関節置換術が行われる。

1.2 本研究の目的

現在行われている変形性関節症の診断はすべて臨床医の主観によるものであり、客観的な評価法は未だ確立されていない。そこで本研究では、近赤外線水分計を用いて、変形性関節症に見られる軟骨変性を評価する方法について研究を行い、実験を行った。

材料の力学特性や内部亀裂の非破壊的評価、またエコーによる様々な臨床診断に超音波が利用されているのに対し、近赤外線は食品や果物などの成分の直接測定に利用されており、医療分野においては、近赤外線が特定成分に吸収される性質を利用した脳の診断などが行われている。

本研究ではこの近赤外線を用いて軟骨内の水分量移動を計測し、正常関節軟骨と変性関節軟骨の違いを調査する方法を開発することを目的としている。

1.3 本報告書の構成

本報告書は、8章から成っており、第2章では従来行われてきた変形性関節症の診断法とその問題点について述べている。第3章では、本研究で扱う関節軟骨の組成および力学的性質について述べている。第4章では、軟骨内の水分量を測定する方法として使用した近赤外分光分析法について述べている。第5章、第6章では関節軟骨に対して押込み試験を行い、押込み荷重除荷後における正常関節

軟骨と変性関節軟骨の内部の水分量変化を測定した結果について述べている。また第 6 章では、軟骨変性の程度と水分量変化の関係について比較検討した実験について述べている。第 7 章では、臨床応用を想定し、押込み荷重付与時における試料内部の水分量変化の測定を試みた実験について述べている。第 8 章では結論として、本研究で得られた結果の総括を述べる。

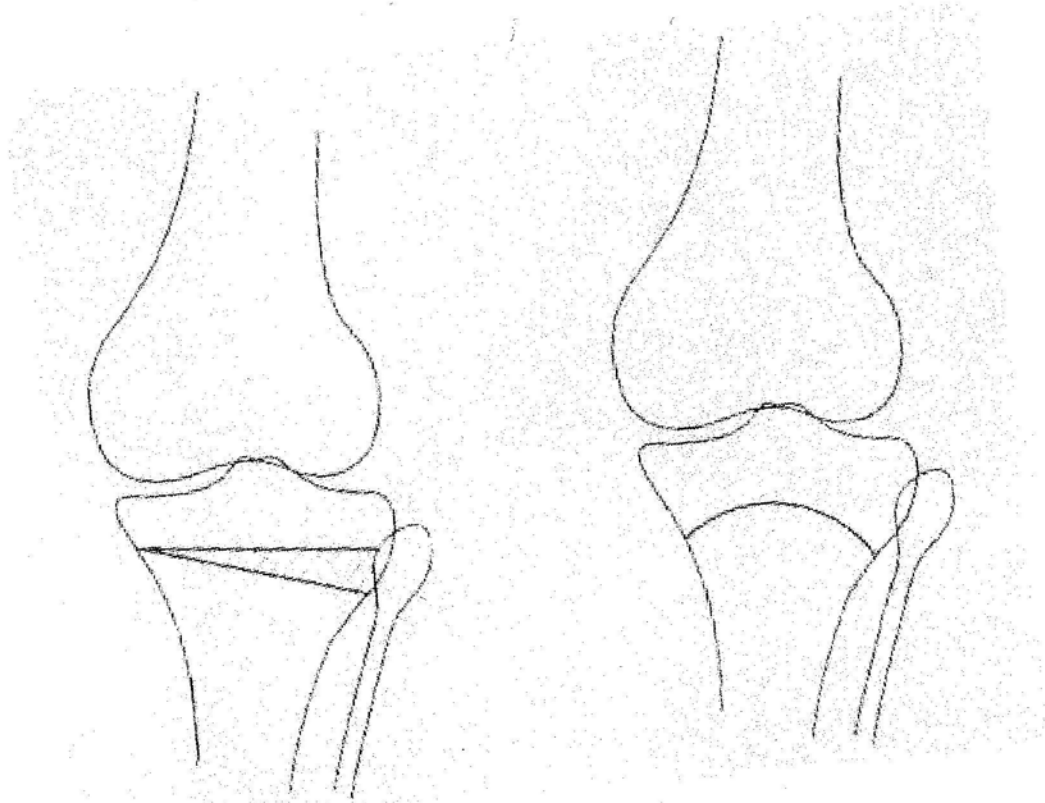


図 1.3 高位脛骨骨切術の概略図.

第2章 従来の関節疾患の評価法

2.1 臨床での評価

変形性関節症の診断法として現在用いられている方法としては、X線撮影像¹⁾による所見と関節鏡による肉眼所見がある。X線像で見られる変化では、関節裂隙の狭小化および消失、軟骨の菲薄および欠損、また軟骨下骨の硬化像が見られる(図2.1)。さらに、X線像ではわからない関節表面や半月板の状態を見るために、内視鏡の一種である関節鏡を利用した関節鏡所見(arthroscopy)による評価が行われている。有名な分類法のひとつとして、以下に紹介するOuterbridgeによる分類法がある²⁾。

Type I : 関節軟骨の軟化 (softening), 膨化 (swelling)

Type II : 直径 1/2 インチ以下の分断 (fragmentation), 亀裂 (fissuring)

Type III : 直径 1/2 インチ以上の分断, 亀裂

Type IV : 軟骨下骨に達する関節軟骨の糜爛 (erosion)

しかし、この評価法はあくまで臨床医の主観によって行われるもので、医師の経験によって結果は大きく左右される。また、染色試験などの方法で組織学的に評価し直すと、実際には見た目以上に組織変性が進んでいることもある。

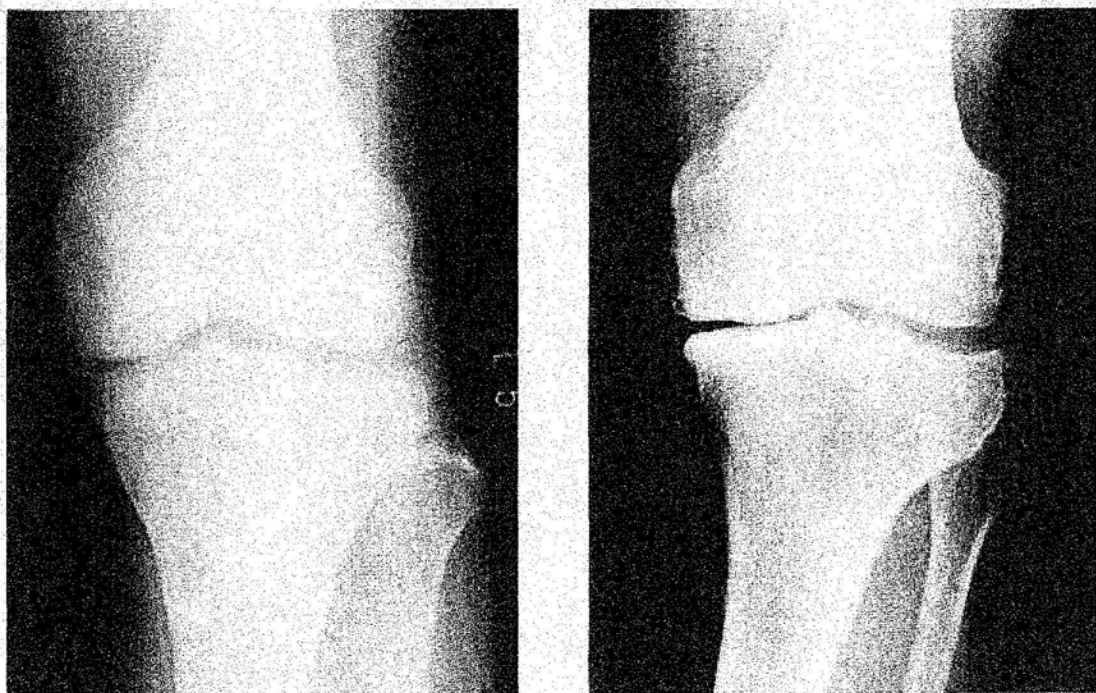


図 2.1 正常膝関節（左）と変形性関節症膝（右）の X 線撮影像

2.2 軟骨の組織学的評価

関節軟骨の変性の程度や再生軟骨の組織構造等の評価する方法として、Mankin Score³⁾をはじめとする組織学的評価法がある。これらの方法は、軟骨下骨を含む軟骨組織から切り出した厚さ 0.1 μm 程度の薄切切片を薬品によって染色し、軟骨の細胞外基質に含まれるプロテオグリカンの染色性や軟骨細胞の数などに基づいて組織を評価する方法である。特に Mankin Score は、軟骨組織中で最も重要な働きをするプロテオグリカンの染色性をはじめ、細胞数や表面状態を含め、正常組織を 0 点、もっとも変性の進んだ組織を 14 点とする 15 段階での細かい評価が可能ではあるが、組織を採取する必要があり、臨床における評価として使用することはできない。図 2.2 に、Mankin Score の評価法を示す。

	Grade
I. Structure (構造)	
a. Normal (正常)	0
b. Surface irregularities (表面の不規則構造)	1
c. Pannus and surface irregularities (関節内の滑膜細胞内層に生じる滲出物と表面の不規則構造)	2
d. Clefs to transitional zone (表層までの亀裂)	3
e. Clefs to radial zone (中間層までの亀裂)	4
f. Clefs to calcified zone (石灰化層までの亀裂)	5
g. Complete disorganization (完全な組織の破壊)	6
II. Cells (細胞)	
a. Normal (正常)	0
b. Diffuse hypercellularity (拡散型細胞過形成)	1
c. Cloning	2
d. Hypocellularity (低細胞性)	3
III. Safranin-O staining (サフラニン O 染色)	
a. Normal (正常)	0
b. Slight reduction (染色性のわずかな低下)	1
c. Moderate reduction (染色性の中程度の低下)	2
d. Severe reduction (染色性の重大な低下)	3
e. No dye noted (染色されず)	4
IV. Tidemark integrity (タイドマークの保全性)	
a. Intact (インタクト)	0
b. Crossed by blood vessels (血管の横断)	1

図 2.2 Mankin Score による組織の採点表

2.3 その他の軟骨物性の評価法

臨床において、医師の主観によらず定量的に関節軟骨の力学的特性を評価する用法が、古くから研究されている。

関節軟骨を、細胞外基質を主とした固体相と関節液の液体相の2相からなる (biphasic model) と考えた Mow らは、土質工学で用いられる圧密試験を応用し、正常関節軟骨の透水率を測定した⁴⁾。さらに秋月らは Biphasic Indentation 試験によって、ヒト膝脛骨関節面各部の aggregate modulus や剛性率 (shear modulus)、透水率 (permeability)、ポアソン比 (poisson ratio) を算出した。しかし、一回の Indentation 試験が完了するまでには 5000~30000 秒もの長い時間が必要である^{4), 5)}。

また、超音波を利用して関節軟骨の力学特性を測定する方法では、短時間のうちに非接触で Aggregate modulus などの軟骨の力学的特性を評価できるという報告もあるが、測定端子を測定面に対して垂直に保つ必要がある、軟骨の表面形状に大きく影響を受けるなどの問題があり、臨床応用には困難が予想される⁶⁾。

第3章 関節軟骨

3.1 緒言

通常ヒト可動関節において、骨頭（関節側の先端）は、厚さ1～6 mm の、硝子関節軟骨と呼ばれる密度の高い、白色半透明なやわらかい組織で覆われている。軟骨組織内には血管や神経、リンパ管は通っておらず、人体各部の他の組織と比べて低細胞性である。

また軟骨組織は、組織を構成するもっとも重要な要素であるコラーゲン線維の不規則な配列によって層構造を成し、異方性を有することが知られている。

関節軟骨の主な役割は、相対する関節面同士において、極めて小さな摩擦で相対運動を許すこと、および、関節面に作用する衝撃荷重を分散させることである。

また、変形性関節症をはじめとする関節疾患においては、関節軟骨の変性が見られ、関節そのものの機能を低下させる。

本章では、関節内において重要な役割を果たす関節軟骨の組成および性質について述べる。

3.2 軟骨の組成

軟骨組織内に存在する軟骨細胞は非常に少なく、全細胞の体積は、軟骨組織の全体積に対して10%以下である。図3.1に、軟骨組織の各層ごとにおける軟骨細胞の分布を示す。軟骨細胞は、その数は少ないが、細胞外基質の有機構造を構築し、維持する役割を果たす。

正常関節軟骨では、質重量の15～22%のコラーゲン線維 (collagen fiber)、4～7%のプロテオグリカン (proteoglycan) が存在し、残り60～85%は水分で構成されている。このコラーゲン線維とプロテオグリカンが共に網目構造を構築し、関節に荷重が作用したときの内部応力を支持する。本節では、コラーゲン線維およびプロテオグリカンについて、詳細に述べる。

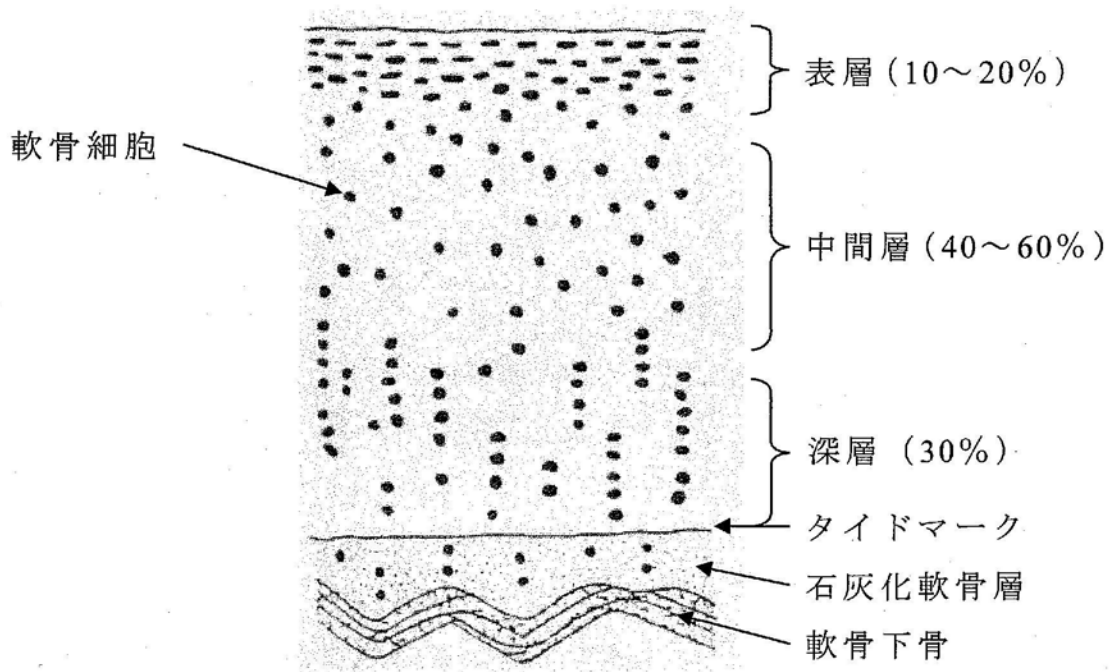


図 3.1 軟骨細胞の層状分布

3.2.1 コラーゲン (collagen)

コラーゲンは生体内にもっとも多く存在するタンパク質で、非常に微細な線維性の構造を有する。コラーゲンの生理学的基本単位は、3つのプロコラーゲンポリペプチド鎖 (procollagen polypeptide chain) からなる三重螺旋構造で、トロポコラーゲン (tropocollagen) と呼ばれる。関節軟骨内では、このトロポコラーゲンの重合によって直径 25~40nm のコラーゲン線維が得られ、また、トポコラーゲン同士の共有結合によって、コラーゲン線維は大きな引張り強さを得る。

関節軟骨内のコラーゲン線維の配列には異方性があり、各層ごとの配列を図 3.2 に示す。全層の厚さの 10~20% を占める表層では、密に詰め込まれた線維が関節表面と平行に配列されている。全層の厚さの 40~60% を占める中間層では、線維同士の間隔は広がり、線維は無秩序に配列する。もっとも深くにある深層では、コラーゲン線維の束が形成され、関節軟骨と石灰化軟骨の境界であるタイドマーク (tide mark) に直角に配列される。この深層部におけるコラーゲン線維の束が、軟骨とその下床にある軟骨下骨を結合する役割を果たしている。このように複数の層が組み合わさった構造が、軟骨組織に作用する応力を分散する役割を担っている。

骨と同様に、関節軟骨も荷重に対する異方性を有する。これは、コラーゲン線維の網目構造におけるその架橋 (cross-link) の密度変化や関節面に平行な層のコラーゲン-プロテオグリカンの相互作用の働きなどの特性の中に方向性、すなわち異方性 (anisotropy) を有するためである。引張りにおいては、この異方性はしばしば関節表面での割線として現れる。割線とは、関節表面を小さな円錐状の錐で突いたときに生じる拡大亀裂のことであり、図 3.3 にヒト大腿骨頭部の割線の例を示す。割線の方法は関節軟骨の異方性に関連したものと考えられているが、詳細な原因に関しては未だ明らかになっていない。

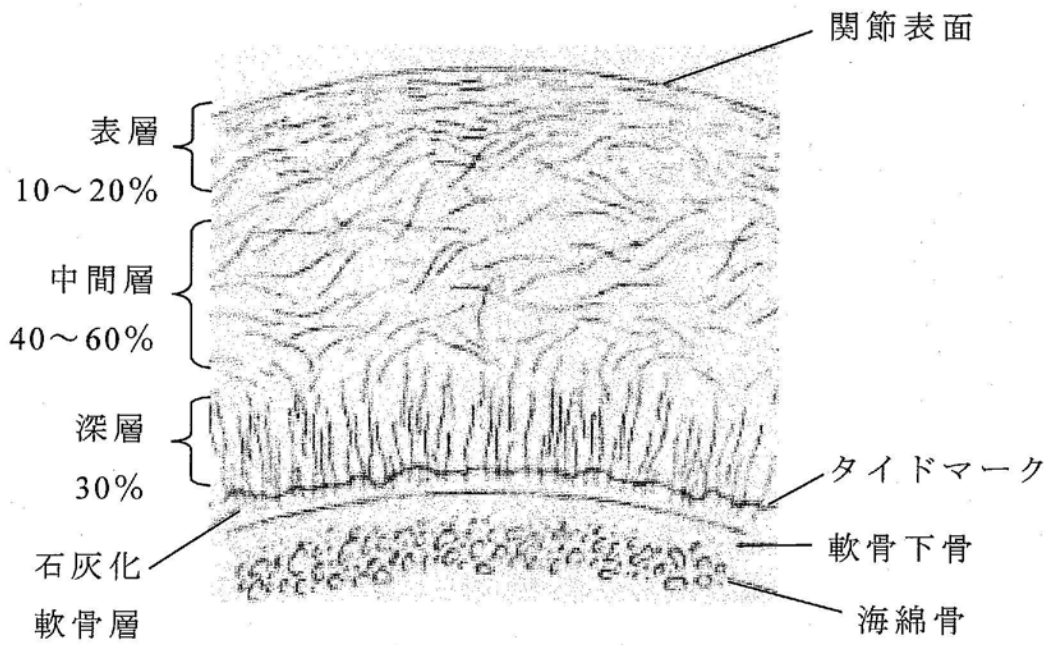


図 3.2 各層のコラーゲン線維の配列

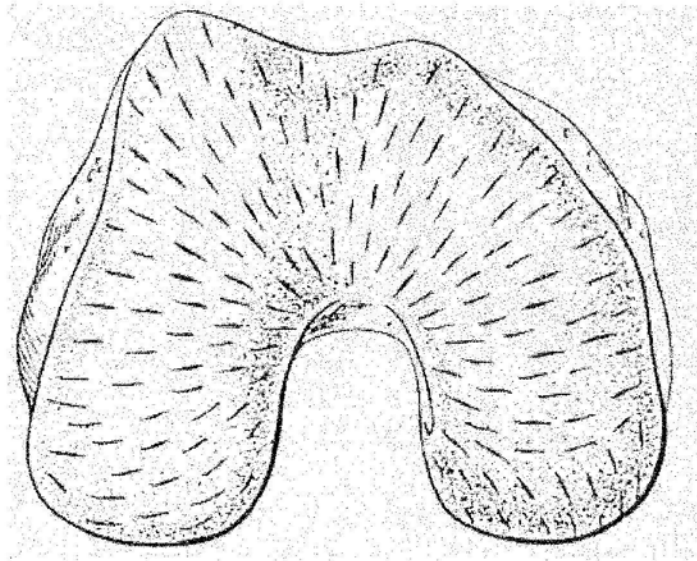


図 3.3 ヒト大腿骨顆部の割線の模式図

3.2.2 プロテオグリカン

軟骨内には、多種のプロテオグリカン (proteoglycans, PGs) が存在する。プロテオグリカンは基本的には、タンパク質のコアにグリコサミノグリカン (glycosaminoglycans, GAGs) が付属した大型のタンパク質重合分子である。プロテオグリカンの中でもアグリカン (Aggrecan) は非常に大きく、特定のヒアルロン酸結合分子 (HA binding region, HABR) を経由してヒアルロン酸 (hyaluronan, HA) と結合し、結合タンパク質 (link protein, LP) が、この結合を安定させる。このことは軟骨の機能に関して非常に重要なことであり、もし結合が不安定であれば、プロテオグリカン分子は組織内の構造体からすぐに分離してしまう。

アグリカンは、150 本程度のグリコサミノグリカン、すなわちコンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate, CS) およびケラタン硫酸 (keratan sulfate, KS) とオリゴ糖が共有結合した約 200nm のタンパク質のコアで構成される。(図 3.4A)。

本来軟骨内では、ほとんどのアグリカンはヒアルロン酸と結合してプロテオグリカン群を作る。これらの群は時として、ヒアルロン酸のコアに対し、結合分子を介して非共有結合し、それぞれ結合タンパク質によって固定される。

プロテオグリカンがコラーゲンの網目構造に固定されることで、細胞外基質の構造に安定性および剛性が生じる。さらに、デルマタン硫酸プロテオグリカン (dermatan sulfate PG) の2つの追加形態が関節軟骨の細胞外基質内で確立される。腱においては、デルマタン硫酸プロテオグリカンはコラーゲン線維の表面に非共有結合によって固定されているが、関節軟骨内での役割に関しては未だわかっていない。

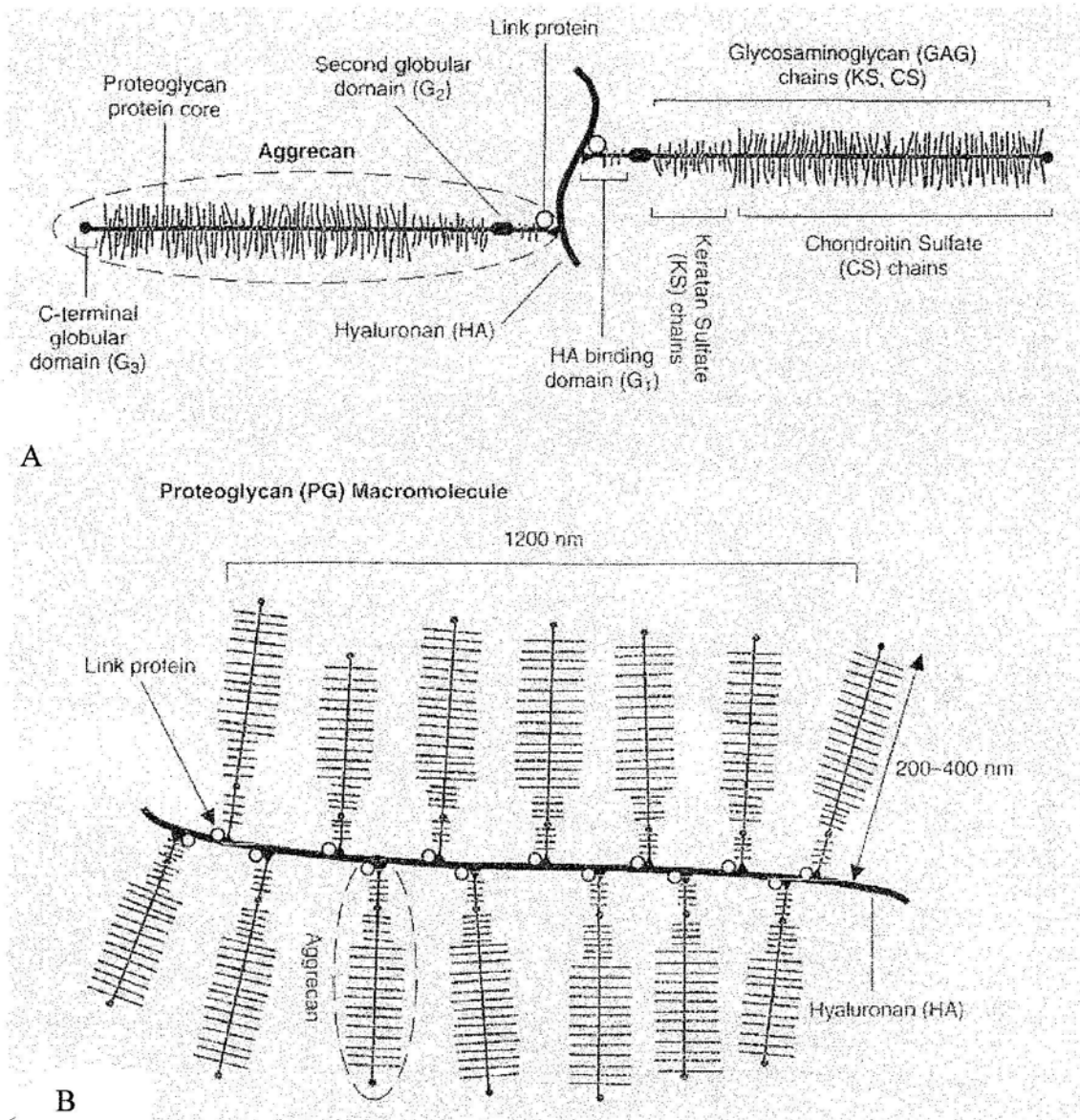


図 3.4 プロテオグリカン分子の構造の模式図

3.2.3 自由水

関節軟骨内にもっとも豊富に存在する自由水の濃度は関節面でもっとも高く（～80%）、深層の約 65%までの深さでは、水分濃度は深さに対してほぼ線形に減少する。この液体は、自由に動きうる多くの陽イオン（ Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、等）を含み、これらのイオンが軟骨の機械的・物理的挙動に大きな影響を及ぼす。またこの液体は血管が通っていない組織に対して、酸素や栄養分、老廃物を軟骨細胞と周囲の栄養豊富な関節液の間でやり取りし、軟骨の健康において重要な役割を果たす。

軟骨内の水分の数%は細胞内に存在し、約 30%はコラーゲン線維と強く結合している。コラーゲン、プロテオグリカン、水分間の、浸透圧（osmotic pressure）相互作用は、細胞外基質の構造と摩耗特性を調整する重要な機能を有すると考えられている。したがって、水分のほとんどは細胞外基質の原線維間の空間を占め、荷重や圧力勾配、その他電氣的力が組織に作用したとき自由に動きうる。圧縮荷重が作用したときは、約 70%の水分が動くと考えられている⁵⁾。このような細胞間の液体流動は、関節の機械的挙動や関節の潤滑を調整する上で重要である

3.3 軟骨同士の相互作用

プロテオグリカン巨大分子の化学構造や物理的相互作用は、細胞外基質の特性に影響を与える。コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸側鎖上に密に配列された硫酸電荷群やカルボキシル（carboxyl）電荷群は、溶液を生理学的 pH に分離し、固定陰電荷を高いままに保ち、分子内、分子間における電荷同士の強い反発力を生じさせる。組織を生理食塩水に浸したとき、これらの合力は浸透圧に等しくなる。構造的には、これらの電荷間反発力は、周囲を取り巻くコラーゲンの網目構造によって構成される原線維間の空間を拡大し、プロテオグリカン巨大分子はここに固定される。

自然界では、荷電物質は放電するか逆の電荷を持つイオンを引き

付けるかして電氣的に中性にならない限り，長時間存在できない．したがって，関節軟骨内のプロテオグリカンに沿って結合した硫酸基やカルボキシル基群は，逆の電荷を持つイオン（主に Na^+ ， Ca^{2+} ， Cl^- ）を組織内に取り込んで電氣的に中性にならなければならない．組織の内部では，浮遊するイオンが固定された硫酸基やカルボキシル基を取り囲み，これらの電荷を互いに保護しあう．そして，浸透圧の法則により，圧力が増大する．Starling の法則によると，この増加圧力はコラーゲンネットワーク内に生じる張力に対抗して平衡を保ち，プロテオグリカンを自由溶液領域のわずか 20% に制限する．結果この増加圧力は，外力が作用しない状況下にあるコラーゲンの網目構造に大きな「プレストレス (pre-stress)」を与える．

軟骨のプロテオグリカンは基質内で，中間層と表層のもっとも深い部分および深層の全体に凝縮され，不規則に分配される．関節軟骨の不規則な膨張という生体力学的な結果は，組織の深さ方向に対するプロテオグリカンの含有量変化に由来し，最近定量的に評価されるようになった．また，不規則なプロテオグリカン配列を組み込んだモデルを用いた有限要素解析によって，組織の深層全体における細胞間の逆イオン配列が完全な効果を有することが示された．

軟骨表面に圧縮応力が作用すると，即座にプロテオグリカン分子領域より変形が生じる．この外部応力は基質内に内圧を生じさせて増加圧力を上回ると，組織内の液体は組織外に流出する．液体の流出に伴ってプロテオグリカン濃度は高まり，浸透性膨張圧，あるいは電荷間の反発力および大量の圧縮応力は，外部応力と釣り合うまで順次増大する．このようにして，コラーゲン網目構造内に固定されたプロテオグリカングルは圧縮に抵抗する．コラーゲンが果たす役割を補うメカニズムは引張りには強いが圧縮には弱いため，プロテオグリカンが圧縮に抵抗する能力は，(1) グリコサミノグリカンに結合した，固く詰まった非イオン群による浸透性膨張圧，(2) コラーゲン-プロテオグリカン固形基質の強い圧縮剛性という 2 つの原因に由来する．

プロテオグリカンの一部にはコラーゲンとの間に密接な連携があり，コラーゲンの架橋（cross-link）では届かない距離にあるコラーゲン線維間をつなぎ，構造の秩序やコラーゲン線維の機械的性質を保持すると考えられる．さらに，網目構造を構築する相互作用箇所の濃度や強度は，コラーゲンと同様に，アグリカンと集合分子間の結合タンパク質の存在に依存する．関節軟骨の表層に存在する集合分子はアグリカンより少ない．したがって，プロテオグリカンとコラーゲン線維間の相互作用は，表層と深層では異なるはずである．確かに，プロテオグリカンとコラーゲン線維の間の相互作用は，細胞外基質の組織内の直接的な役割のみでなく，組織の機械的性質にも直接影響する．

コラーゲン-プロテオグリカンの相互作用特性に関しては，未だ十分に検証されていない．それでも，これら巨大分子構造の相互作用によって，多孔質透過性の，線維が強化された混成基質が形成され，この固形基質が水やイオンによって膨張してあらゆる機械的特性を有し，可動関節における高い応力やひずみに耐えうるということは確かである．コラーゲン-プロテオグリカン相互作用には，アグリカン，ヒアルロン酸単線維，type II コラーゲン，その他希少種のコラーゲン，何らかの結合物質，type IX コラーゲンのような少数軟骨コンポーネント，グリコプロテイン（glycoprotein），ヒアルロン酸重合体が含まれることがすでに判っている．図 3.5 に，関節軟骨の一部に関して，その構造の概略図を示す．

関節軟骨が外力を受けると，コラーゲン-プロテオグリカン固形基質と間質水分の機能はともに独特の方法で細胞外基質内部の高い応力とひずみに抵抗する．さらに，変形性関節症などによって軟骨の組成や組織構造の生化学的に変化すると，それに伴って生体力学的性質も変化する．次節では，荷重を受ける関節軟骨の挙動と，液体の流動機構について詳細に述べる．

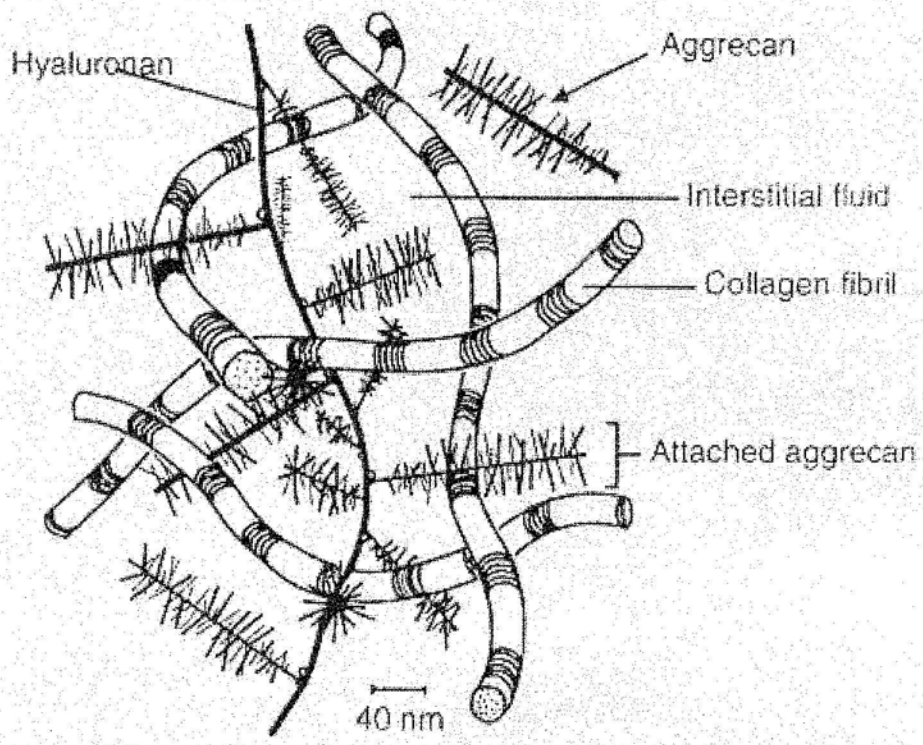


図 3.5 軟骨組織内部における線維の網目構造

3.4 関節軟骨の生体力学的挙動

関節軟骨の生体力学的挙動を理解するため、関節軟骨は非圧縮性で混ざり合うことのない2つの異なる相、すなわち、間質液体相と多孔質透過性の固体相（細胞外基質等）で構成された **biphasic** な材質として扱われている。特に水分が軟骨の機械的性質にどのような影響を与えるかを考える場合、関節軟骨を液体で満たされた多孔質透過性（非荷電性）の **biphasic** な素材として捉え、それぞれの構成要素が軟骨の機能的挙動を果たすと考えられる。

可動関節内で関節表面に作用する荷重の大きさは、ほぼ0の時もあれば、最大では体重の10倍以上である。接触領域もまた複雑に変化するが、この面積はわずか数平方センチメートルである。椅子から立ち上がる時に股関節に作用する最大接触応力は約20MPa、階段を上るときは約10MPaに達すると概算されている。したがって、生理的荷重下にある関節軟骨は極めて高い応力を受ける素材である。この組織がどのようにして高い生理学的荷重に耐えているのかを理解するためには、圧縮、引張、剪断における固有の力学的性質を調べる必要がある。これらの性質のうち、細胞外基質が荷重を分散する機能を有している事がわかる。本節では、荷重を受ける関節軟骨の挙動について述べる。

3.4.1 成熟関節軟骨の粘弾性

材料が、時間によって変化しない一定の荷重や変形を受けるとき、その応力またはひずみが時間とともに変化する場合、この材料の機械的性質を粘弾性という。多くの場合、このような材料の応答は、粘性流体（dashpot）と弾性固体（spring）の複合モデルとして扱われ、それ故に粘弾性と呼ばれる。

粘弾性体に見られる基本的な応答は、クリープ（creep）と応力緩和（stress relaxation）である⁴⁾。クリープは、粘弾性を有する固体に静荷重が作用するとき起こる。一般に粘弾性固体ははじめ急速に変形し、やがて変形速度は遅くなり、平衡に達して変形は終了す

る。応力緩和は粘弾性固体が一定の変形を受けたときに起こる現象で、粘弾性固体には初め高い応力が急速に生じ、時間とともに応力は徐々に減少し、変形によって生じた応力が平衡に達するまで続く。

クリープ現象と応力緩和現象は、異なるメカニズムによって生じる。単一相の重合固体材料では、これらの現象は、応力を受ける材料内の長鎖重合分子同士のすべりに起因する内部摩擦の結果である。間質水分の流動によって生じる関節軟骨の粘弾性は、**biphasic** 粘弾性挙動として知られ、また、流れに依存しない巨大分子の運動、すなわちコラーゲン-プロテオグリカン固形基質の特有の粘弾性挙動として知られている。しかし、弾性体や粘弾性体の変形挙動には線形な期間があり、これらのモデルには粘弾性挙動における水の役割および関節の荷重支持や軟骨の潤滑という、流体圧縮の重大な影響が欠落している。荷重が作用したとき、即座に間質水分が圧縮されて軟骨表面に作用する荷重の 90%以上が支持されることが実験的な測定で明らかになっている。この効果は 1000 秒以上持続し、関節に荷重が作用したときの高い応力 (20MPa) によって、細胞外基質や軟骨細胞が変形破壊しないよう保護する。

3.4.2 外周拘束圧縮試験

生体内における軟骨の負荷は非常に複雑である。荷重下にある組織の変形挙動をより理解するために、**explant loading configuration** が利用されている。円筒、すなわち半径方向の変位と液体の流出を阻止するための滑らかな外壁を有する固定輪の中に、円柱状の軟骨試料をぴったりとはめ込む。多孔質透過性の剛体円盤によって軸方向の荷重を作用させると、組織内の液体は多孔質透過性の円盤に向かって流出し、軟骨試料は圧縮クリープ変形する。十分な時間圧縮が加えられた後では、水も細胞外基質も非圧縮性なので、流失した液体の体積は一定となる。制限圧縮試験が好都合な点は、1次元での流体の流れや組織の変形を生じさせることであり、組織の異方性、すなわち半径方向の物性に依存しないことである。

3.4.3 圧縮を受ける関節軟骨の biphasic クリープ応答

1次元の単純圧縮試験における関節軟骨の biphasic クリープ応答を図 3.6 に示す。この場合、時刻 0 からクリープによるひずみが平衡に達するまで、一定の圧縮応力が組織に作用する。関節軟骨のクリープは間質水分の滲出によって起こる。最初期の変位増加率がもっとも高いことから、間質水分の滲出は明らかに最初もっとも急速で、液体流動が終了するまで徐々に減少する。クリープ中表面に作用する荷重は、圧縮応力によってコラーゲン-プロテオグリカン固形基質と間質水分の段階的滲出による摩擦によって生じる内部の圧縮応力と釣り合う。固形基質内に生じる圧縮応力のみで作用する圧縮力と釣り合うようになると、クリープは終了する。このとき水分の滲出はなく、ひずみは平衡に達する⁴⁾。

クリープが平衡に達するまでの時間は、組織の厚さの 2 乗に反比例するとされている。一般にヒトおよびウシの関節軟骨の厚さは 2 ~ 4 mm であるが、クリープが平衡に達するまでには 4 ~ 16 時間かかる。ウサギの関節軟骨では厚さは総じて 1.0mm 以下で、クリープが平衡に達するまでの時間は約 1 時間である。1.0MPa 以上の高荷重下においては、組織内部に含まれる水分全体の約 50% が滲出する。さらに *in vitro* の研究で、組織を生理食塩水に浸すと、荷重を取り除いた後で、滲出した水分は十分回復することが示されている。

クリープ率は液体の滲出率に支配されるので、組織の透水係数を求めることができ、ヒト、ウシ、犬の膝蓋面における正常関節軟骨の透水率 k はそれぞれ $2.17 \times 10^{-15} \text{ M}^4/\text{N}\cdot\text{s}$ 、 $1.42 \times 10^{-15} \text{ M}^4/\text{N}\cdot\text{s}$ 、 $0.9432 \times 10^{-15} \text{ M}^4/\text{N}\cdot\text{s}$ である。平衡に達すると液体は滲出しなくなり、コラーゲン-プロテオグリカン固形基質の固有圧縮係数 (H_A) が測定できる。ヒト、ウシ、犬の膝蓋面関節軟骨の圧縮係数平均値はそれぞれ、0.53, 0.47, 0.55MPa である。これらの係数は固形基質固有の物性値を測定したものであり、これらが基質の圧縮に伴ってどのように変化するかを調べることは重要である。K は線形に変化する一方で、HA は含水量に反比例しプロテオグリカンの含有量に

比例して変化する。

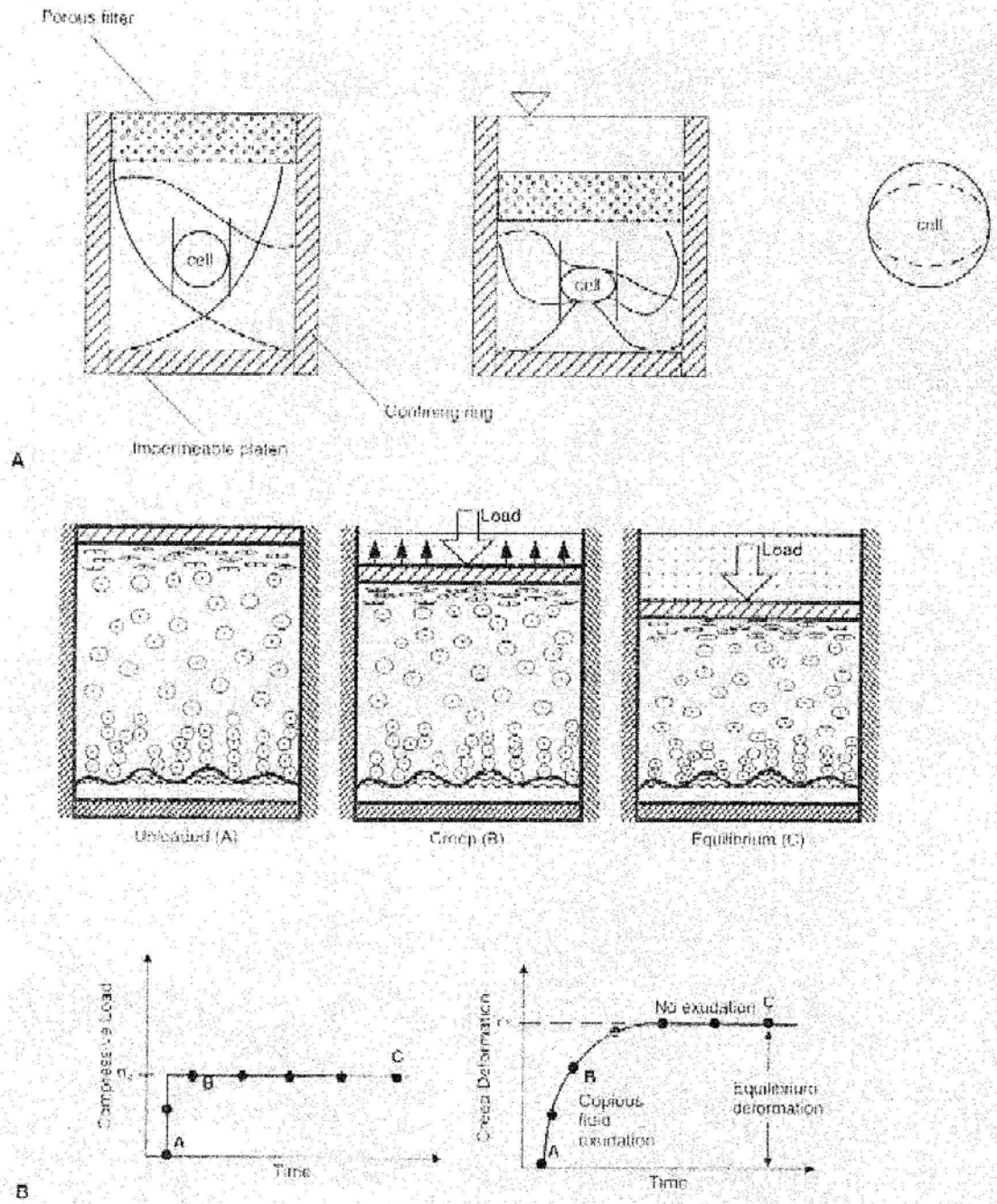


図 3.6 軟骨におけるクリープの原理 (A) とクリープ応答 (B)

3.4.4 圧縮を受ける関節軟骨の biphasic 応力緩和応答

関節軟骨の 1 次元圧縮試験における biphasic 粘弾性応力緩和を図 3.7 に示す。この場合、一定の圧縮比（図左下の直線 t_0 -A-B）で、組織が u_0 に達するまでひずみを与えられ、点 B 直下より、変位 u_0 は一定となる。関節軟骨では、右下の図に見られるような変形を受けるため、典型的な応力応答を示す。圧縮期には、応力は σ_0 になるまで漸増し、応力緩和期に入ると、応力は B-C-D-E の曲線を描いて減少し、平衡応力 (σ_∞) に至る。

応力の増加と応力緩和のメカニズムは、図 3.7 の上に示すとおりである。図の上に描いたイラストで、圧縮期には間質水分の強制滲出によって高い応力が発生し、表層付近の固形基質の密度が高まる。応力緩和期には表層付近の固形基質の圧縮が弱まり、あるいは圧縮力に対する反発が起こり、多孔質の固形基質内部での液体再分布によって応力が緩和する。この応力緩和の段階は、固形基質内部に生じた応力による内部圧縮ひずみ (intrinsic compressive modulus) が u_0 に一致したとき終了する。生理学的荷重下において計算された応力緩和行程の解析より、組織内に生じた応力はすぐに応力緩和によって減衰されるため、過度の応力状態を保つことは困難であるといえる。これより必然的に、関節面同士の接触領域は急速に広がるのがわかる。

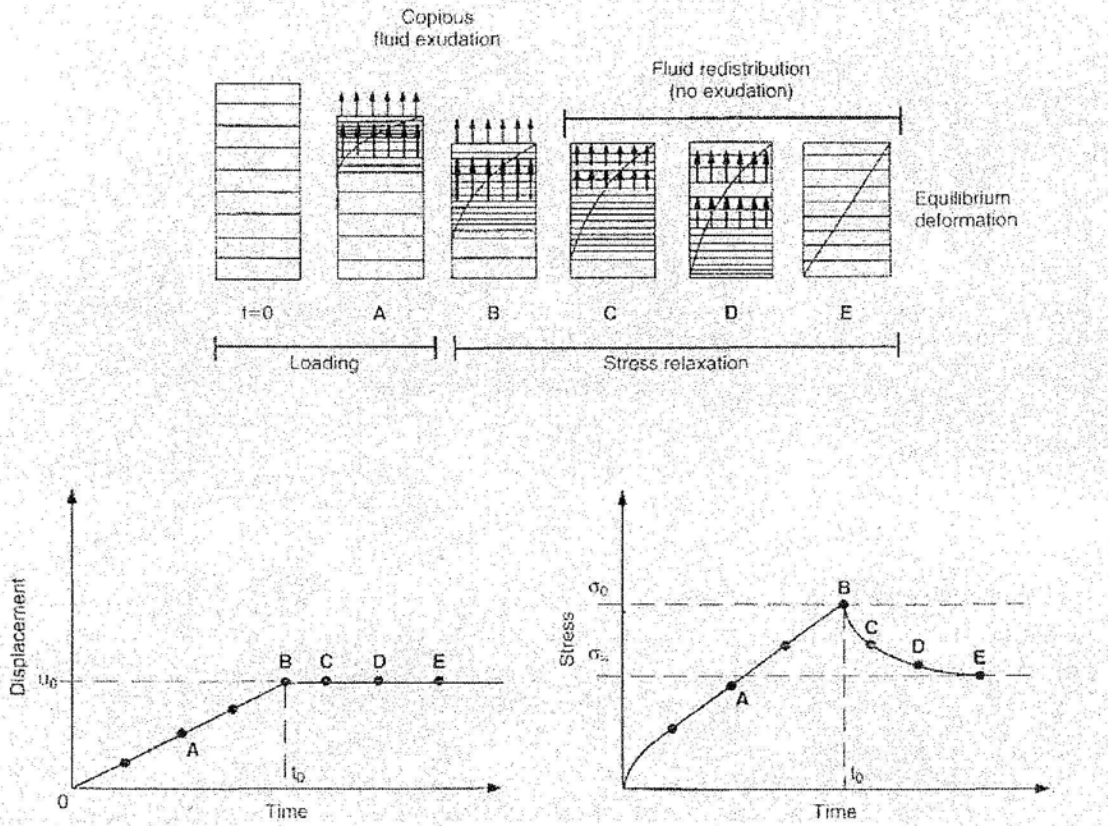


図 3.7 軟骨試料の応力緩和現象

3.4.5 関節軟骨の透過性⁴⁾

液体を含んだ多孔性材料は、透過性であることもあれば、非透過性であることもある。全体積 (V_t) に対する液体体積 (V_f) の比 ($\beta = V_f/V_t$) は、間隙率として知られる幾何学的概念である。そして、関節軟骨は高い間隙率 (80%) を有する素材である。もし間隙が互いにつながっていれば、その多孔質は透過性である。したがって、透過性というのは物理的概念である。透水係数とは多孔性材料を流れて流れる流体の流れやすさを示す量であり、多孔質の透過性材料を通る液体流れの摩擦抵抗に反比例する。この摩擦抵抗は、間質水分と多孔質透過性材料の細孔間の相互作用によって生じる。透水係数 k は摩擦係数 K を用いて、

$$k = \frac{\beta^2}{K}$$

と表される。関節軟骨の透過性は非常に低く、液体が多孔性の固形基質内を流れると高い摩擦抵抗が生じる。

図 3.7 に、実験方法の図を示す。ここで、組織の試料は圧力勾配を受ける室内に固定されている。上流の圧力 P_1 は下流の圧力 P_2 より大きい。この簡単な実験装置に基づいて、試料の厚さを h とすると、Darcy の法則から透水係数

$$k = \frac{Qh}{A(P_1 - P_2)}$$

が得られる。ここで Q は単位時間あたりに試料を通過する流量であり、 A は透過領域の面積である。この方法では、0.1MPa 程度の低い圧力差で初めて関節軟骨の透過性が確認された。この方法によって、 $1.1 \times 10^{-15} \text{m}^4/\text{N}\cdot\text{s}$ から $7.6 \times 10^{-15} \text{m}^4/\text{N}\cdot\text{s}$ までの範囲で透水係数の値が求められた。また、均一な直管モデルを用いた実験より、間隙の平均直径は 6nm と概算される。すなわち、関節軟骨内の間隙は分子の大きさである。

この研究における高い生理的荷重 (3MPa) および圧縮ひずみの状態での実験は、可動関節の荷重に見られる状態により類似している。

これらの実験から、 k は試料を挟んでの圧力差と試料に作用する圧縮ひずみという2つの変数によって決定される関数であることがわかった。この実験の結果を図 3.7B に示す。透過性は、圧縮ひずみと圧力差の増加に対して指数関数的に減少する。透過流体による摩擦抵抗が生じた結果、 k は圧力差によって起こる固形基質の圧密のせいで変化するのである。多孔質構造と言う観点から見れば、圧密によって固形基質内の平均間隙直径は減少し、摩擦抵抗は増大する。

間質水分の流れに対抗して摩擦抵抗が増大すると、組織は固さを増し、液体は滲出しにくくなる。この概念によって関節軟骨の圧縮時の応力緩和挙動が説明でき、荷重を支持する間質水分の能力の重要性を示した。さらに、この概念は関節の潤滑においても重要である。

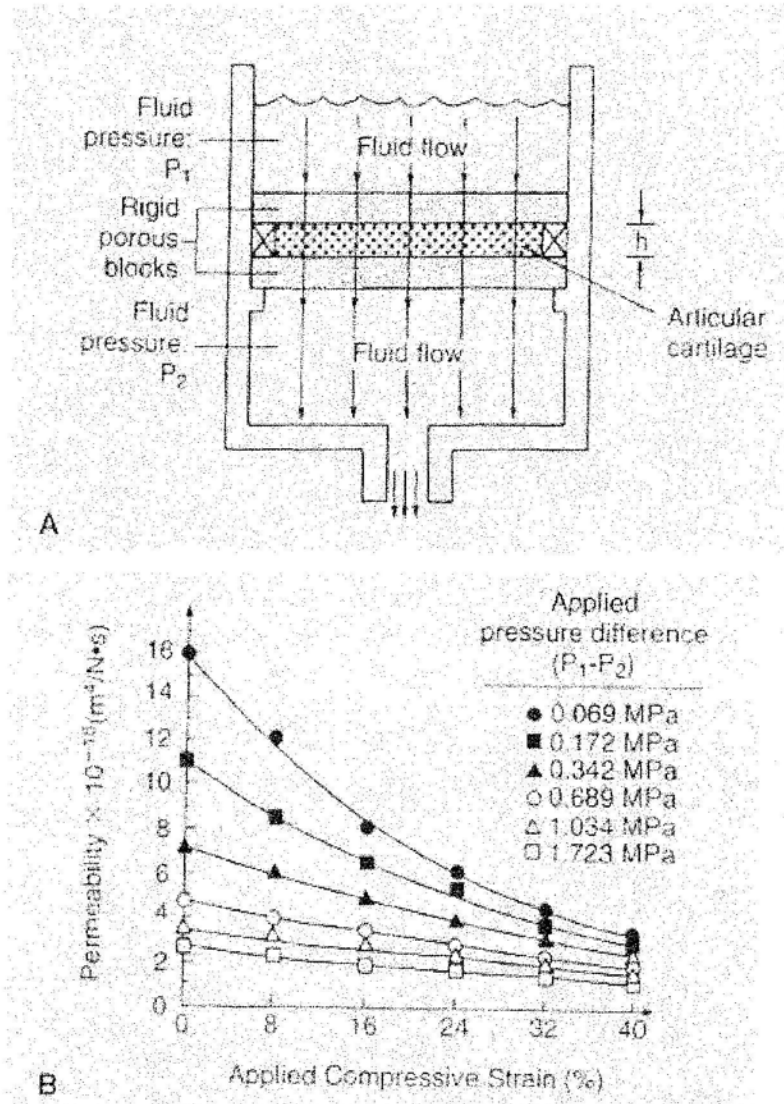


図 3.8 軟骨の透水試験 (A) と、圧力・ひずみの増加に伴う透水係数の減少 (B)

3.5 軟骨変性に関する生体力学的仮定

関節軟骨の修復，再構築の能力は非常に限られたものであり，異常に大きな応力を受けると，関節軟骨はその機能を損なう．軟骨が機能を損なうのは，以下のようにして起こると考えられている．

1. 過度の応力の作用
2. 繰り返し応力の最大値の総数
3. コラーゲン-プロテオグリカン基質の内部の分子や微小構造の変性
4. 組織内部の機械的性質の変化

機能を損なう最も重要な要因は，コラーゲンの網目構造の緩みによるプロテオグリカンの拡大であり，これによって組織が腫脹する．このような変化によって関節軟骨の剛性は低下し，透過性が高くなる．

関節軟骨が支持する応力の大きさは，関節に作用する全荷重およびその荷重が関節面の接触領域にどのように広がるかによって決まる．接触領域に激しい応力が作用することは，関節軟骨の変性の大きな要因である．このような応力の作用が関節表面の不調和を引き起こし，接触面積が異常に狭小化する．このような関節面の不調和は，臼蓋形成不全，大腿骨頭のすべり，関節内骨折などにつづく変形性関節症においても見られる．半月板切除によって半月板の免荷機能が損なわれたり，靭帯断裂による過度の運動や，これに伴って作用する異常な応力によっても同様の症状が見られたりする．

巨視的には，関節面における応力集中が大きく影響する．関節表面のざらつき同士が接触することで微視的な応力集中が生じ，さらなる組織の損傷の増大に寄与する．

フットボール選手の膝やバレエダンサーの踵など，繰り返し作用する大きな荷重を支持する関節において，関節の変形が顕著に見られる．変形性関節症は，関節に作用する最大荷重を最小化するために引き起こされるものと考えられる．関節の屈曲や筋肉の伸び，軟骨下骨や半月板による衝撃荷重の吸収も，これらの機構に含まれる

と考えられる。

関節軟骨の変性によって、組織の異常な膨張や生体力学的機能特性の低下が引き起こされる。このような状況下で軟骨の超微細構造は、通常の関節運動による応力を受けて徐々に破壊される。変形性関節症はまた、コラーゲン-プロテオグリカン基質の内在分子や微細構造の損傷によっても発生する。多くの状況によって、このような基質の破壊が起こる。

第4章 近赤外分光分析法

4.1 緒言

ある測定対象物に関して、内部に含まれる成分の量や動態、力学的性質を非破壊的に測定する方法として、近赤外線 (near infrared ray) を利用した測定法がある。

近赤外線を用いた測定の長所としては、

- ①エネルギーの低い電磁波を用いるので、試料を損傷することがほとんどない
- ②固体、粉体、繊維、ペースト、液体、溶体、気体などいろいろな状態にある試料に適用することができる

などがあり、食品業界では果物の糖度測定や茶葉、小麦粉・そば粉等粉体の水分量測定⁷⁾、工業分野ではフィルムや塗膜などの厚さ測定⁸⁾、医療関連では血管内の血液量変化測定による脳の活動の診断⁹⁾などに幅広く利用されている。

本章では、近赤外線を利用して測定対象物中の成分量を同定する方法である近赤外分光分析法 (near infrared spectroscopy) について述べる。

4.2 スペクトル測定法

近赤外線は、波長が 800~2200nm の範囲にある電磁波で、赤外線の中でも可視光に近い領域に存在する。また、各種の物質の中には特定の波長帯域における光線を吸収する働きを有するものがある。最初一定の強度を保っていた光は測定対象物に照射されると、特定の波長帯域のみが吸収され、それ以外の光線は反射、および透過される。図 4.1 にスペクトル解析の一例として、ゴマ種子に含まれるリノール酸の吸収スペクトル⁷⁾を示す。波長 1708 μm 付近の波長帯域の光線が多く吸収されていることがグラフからわかる。このように、ある波長に関して、試料に照射されるとき光強度と、試料から反射または試料を透過する光強度の差から光の吸収量である吸

光度を計算することが可能であり、この吸光度と化学分析等によって計算した実際の成分量を比較したグラフ（検量線）をあらかじめ作成しておくこと、試料に照射した光の吸光度を測定することで、試料中の成分の非破壊的な測定が可能となる。

測定する方法としては、試料を挟んで近赤外線を透過させて測定する透過法、試料表層の薄膜の測定に用いる正反射法、試料内部で反射、屈折、散乱を繰り返して拡散した反射光を測定する拡散反射法等¹⁰⁾があり、それぞれ目的や試料の性質によって使い分けられる。

特に拡散反射法（diffuse reflectance spectroscopy）は、触媒、表面装飾シリカ、小麦粉やそば粉など有機物質の粉体、繊維など、比較的粗い表面を持つ試料の簡便な測定法として広く利用されている。

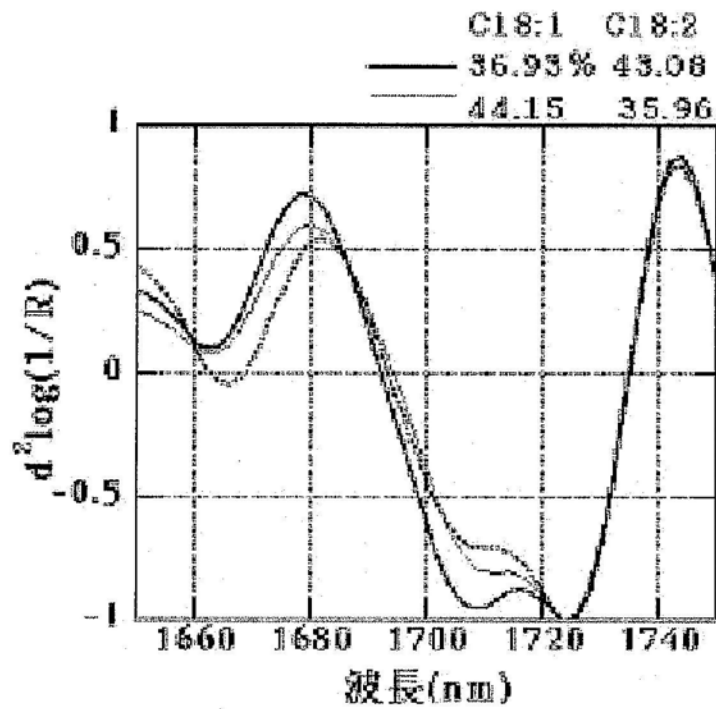


図 4.1 ゴマ種子の近赤外 2 次微分スペクトル

4.3 近赤外線成分計

現在様々なメーカーから、近赤外分光分析法，すなわち近赤外線領域におけるスペクトル測定法を利用した近赤外線成分計が市販され，また様々な現場で利用されている。

近赤外線成分計での測定対象となる試料は粉体，粒体，フレーク状，およびシート状のものが一般的であり，大抵測定試料の粒径は近赤外線の波長よりも大きい。

拡散反射の原理を図 4.2 に示す。粉体試料の表面に入射した光は，波長よりも小さな粒子では散乱し，大きな粒子に当たると，光線は粒子表面で正反射するか，粒子内部へ屈曲，透過する。前方に対する散乱光と屈曲透過光は試料内部へと入っていき，散乱，反射，屈曲透過を繰り返して拡散され，最終的に拡散反射光として試料表面から再放射される。試料中に吸収を持つ粒子が含まれる場合，その吸収波長における拡散反射光強度が弱まるため，スペクトル測定を行うことが可能となる。

試料の光吸収を表す量を一般に吸光度という。試料に対する入射光強度を I_0 ，試料からの反射光強度を I とすると，吸光度は入射光強度と反射光強度の差であり，吸光度 A は

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

の式で表される。

また，吸光度はその測定成分の濃度に比例するので，測定成分濃度と吸光度の関係をあらかじめ求め，相互関係をグラフにまとめた「検量線」を作成しておけば，測定した吸光度から未知試料の成分濃度を求めることができる。

なお，生体組織は光の散乱が強く⁹⁾，近赤外線では生体組織を測定する場合には透過法は使用できず，拡散反射法を用いることになる。

また，拡散反射法では試料表面における正反射光が吸光度測定感度を低下させることがあるので，注意が必要である¹⁰⁾。

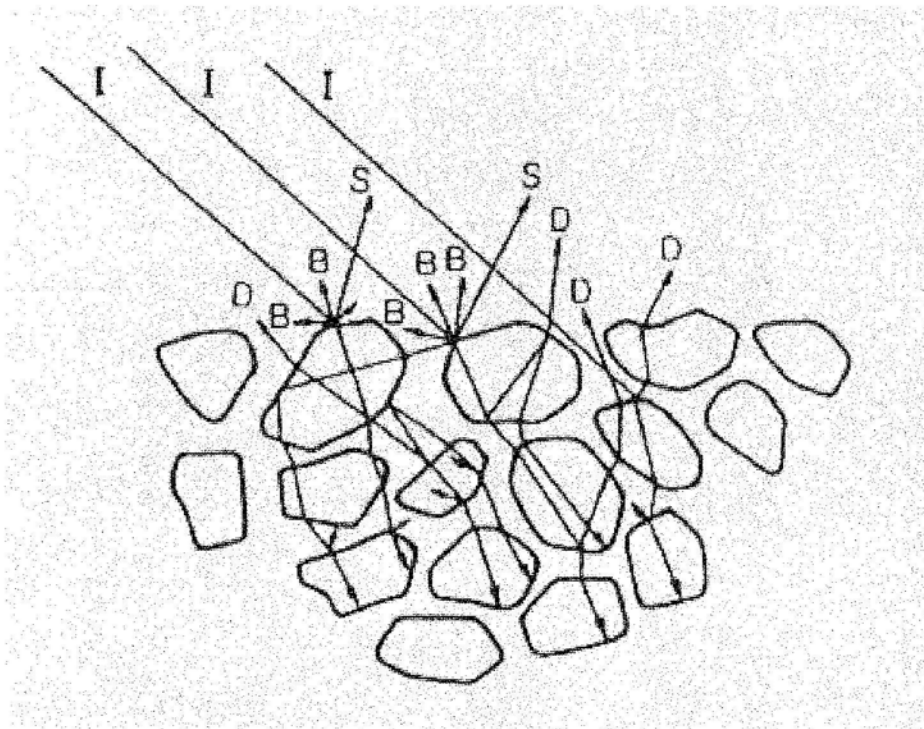


図 4.2 粉体試料に入射した近赤外線的光路
I: 入射光, B: 後方反射光, S: 正反射光,
D: 拡散反射光

第5章 軟骨含水量の測定に関する基礎実験

5.1 緒言

関節軟骨は組織学的には硝子軟骨 (hyaline cartilage) と呼ばれるもので、成人の関節軟骨には血管、神経、リンパ管は存在しない。関節軟骨の大部分は、主にコラーゲンおよびプロテオグリカンからなる細胞外基質で構成され、その中に少量の軟骨細胞が存在する。また軟骨組織内には血管、リンパ管が存在せず、細胞数も少ないため、関節軟骨が機械的に損傷され部分的欠損が生じた場合、軟骨組織の自然修復、すなわち骨臼体による修復機序 (intrinsic repair) は発生せず、修復されない。軟骨下骨組織にまで達する軟骨損傷では、欠損部は骨髄由来の間葉系細胞により、線維軟骨 (fibrocartilage) 様組織として修復 (extrinsic repair) されるが、元の硝子軟骨となることはない。したがって、硝子軟骨と線維軟骨の違いを調査し、これらを簡単に判別することができれば、変形性関節症の判別方法にも応用できると考える。

ところで、Mow (1980) らは軟骨を、多孔性 (porous)、透過性 (permeable)、非圧縮性 (incompressible) と仮定された固体相と、自由に動きうる非粘性体と仮定された間質水分の液体相の2相としてとらえ、負荷および2相間の相互作用 (摩擦) が、時間依存性などの粘弾性的挙動を決定するとした biphasic model を提唱した⁴⁾。また Mansour と Mow (1976) による実験によると、正常関節軟骨の透水率 (permeability) は圧力が増加するときおよび変形するときには劇的に減少する。一般に病的状態にある軟骨組織では、コラーゲン-プロテオグリカンの固形基質の連続性は機械的ストレスの作用で断裂される。そのため、たとえば変形性関節症の軟骨組織では、コラーゲン線維の網目構造の欠陥やプロテオグリカン巨大分子の損失によって正常組織よりも透水率が大きくなる。すなわち、正常関節軟骨 (硝子軟骨) と変性関節軟骨 (線維軟骨) の間には透水率の違いが存在する。したがって、これらに押し込み試験を行った場合、

押し込み荷重除荷後の含水量が回復する様子には違いが生じるものと考えられる（図 5.1）。

本章では、ヒト正常関節軟骨およびヒト変形性関節症軟骨に対して押し込み試験を行い、押し込み荷重除荷後の吸光度変化を経時的に測定した。そして、吸光度の時間変化を示すグラフである吸光度曲線と軟骨の変性程度との関係を検討した実験およびその結果について述べる。

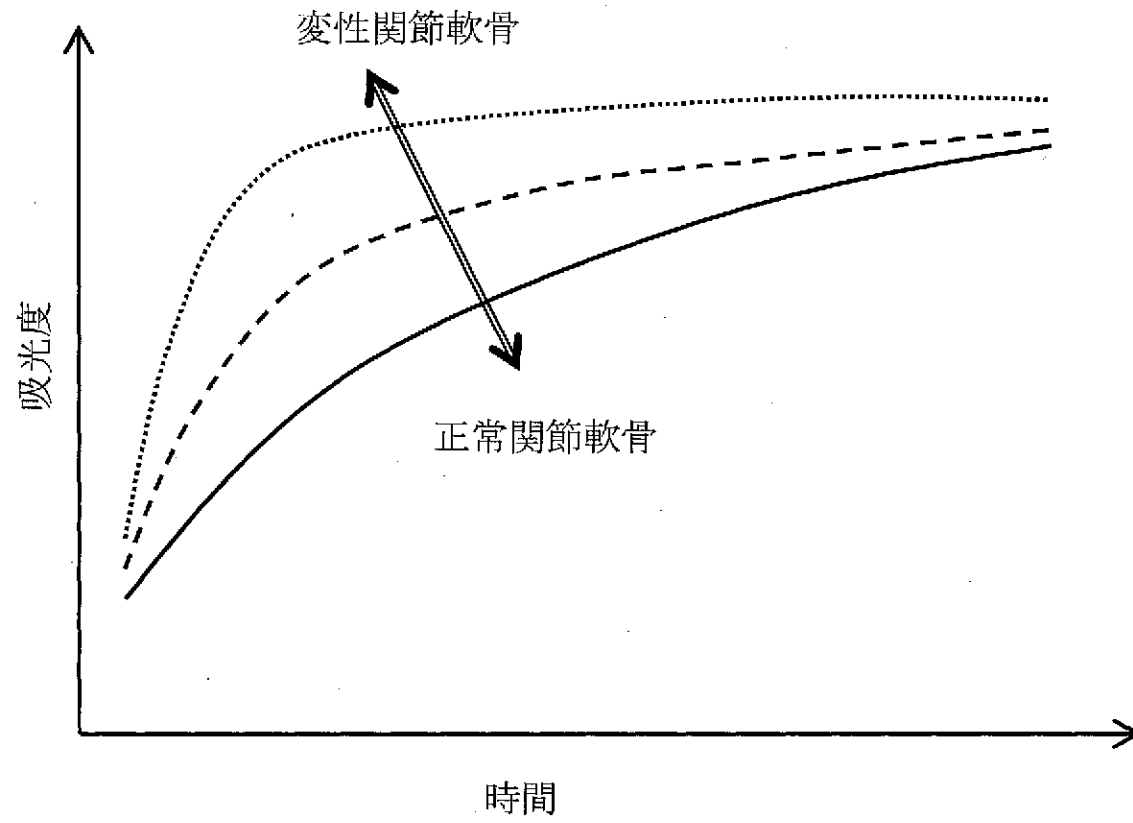


図5.1 正常関節軟骨と変性関節軟骨の、押し込み荷重除荷後の吸光度回復曲線

5.2 実験方法

5.2.1 近赤外線水分計

本研究では、第3章で述べた近赤外分光分析法を応用した市販の近赤外線水分計IRM-V（株式会社CHINO製、以下単に「近赤外線水分計」と呼ぶ；(図5.2)）を使用して実験を行った。この近赤外線水分計は、近赤外線吸収を利用して被測定物の水分量を非破壊的に測定する装置で、被測定物に近赤外線を照射し、その表面より拡散反射してくる近赤外線の強度（反射光強度）を測定することで水分量を同定する装置である。本研究で測定する水分（遊離OH基）に吸収される波長帯は、 $1.46\mu\text{m}$ 及び $1.96\mu\text{m}$ 周辺であるが、今回は $1.46\mu\text{m}$ 付近において、照射光強度と反射光強度との差に相当する量、すなわち以下の式で定義される吸光度を求め、これを試料に含まれる水分量の指標とした。

$$A = \log \frac{I_0}{I_{1.46}}$$

ここで、 I_0 は入射光の強度、 $I_{1.46}$ は波長 $1.46\mu\text{m}$ の光（近赤外線）の反射光強度である。

なお、本研究で使用した近赤外線水分計は、0.2秒間隔で本体の表示部に吸光度を表示するが、付属のパソコンに測定値を取得することができる最短の時間間隔は10秒間隔なので、グラフに表すことができるのは、10秒より短い時間間隔で起こる吸光度の変化をグラフで表すことはできない。

また、吸光度の測定値は0.001までの桁で測定が可能である。

Light Source & Detector

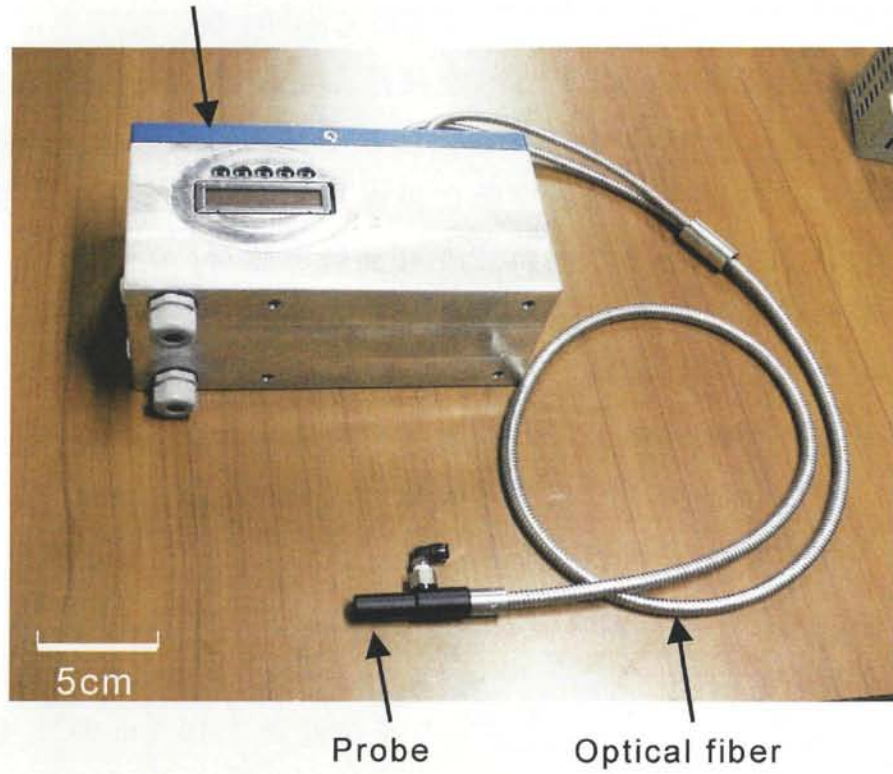


図 5.2 近赤外線水分計 IRM-V (株式会社 CHINO)

5.2.2 試料－プローブ間の至適角度の測定

近赤外線水分計を用いた測定では、測定試料の表面が平滑な場合、この試料表面で反射される正反射光が測定感度を低下させ測定不能に陥らせる要因となる。そこで、正反射光の影響を低減して最大の感度が得られる至適なプローブ照射角度を調べるため、高野豆腐、再生セルロース、ブタ膝蓋骨軟骨を対象として、これらの試料表面に対するプローブの照射角度を 5°間隔で増加させながら吸光度を測定する実験を行った（図 5.3）。

5.2.3 近赤外線の到達深度の検討

近赤外線の到達深度を明らかにするため、ウシ大腿骨遠位部関節軟骨を軟骨下骨側から削り、0.1~1.5mm の厚さの試料を作製し、試料厚さと吸光度の関係を検討した（図 5.4）。

5.2.4 押込み荷重除荷後の吸光度回復曲線の測定

押込み試験と近赤外線水分計による吸光度測定を併用し、押込み荷重除荷後の吸光度回復曲線の違いから、硝子軟骨と線維軟骨の違いを評価できる可能性を調べるために、正常関節軟骨モデルとしてブタ膝蓋骨軟骨、変性関節軟骨モデルとしてブタ肋軟骨を用いて実験を行った。これらの試料に対し、先端が直径 10mm の球の indenter を使用して 196N の荷重で押込み試験を行い、押込み荷重除荷後の吸光度変化を測定した。

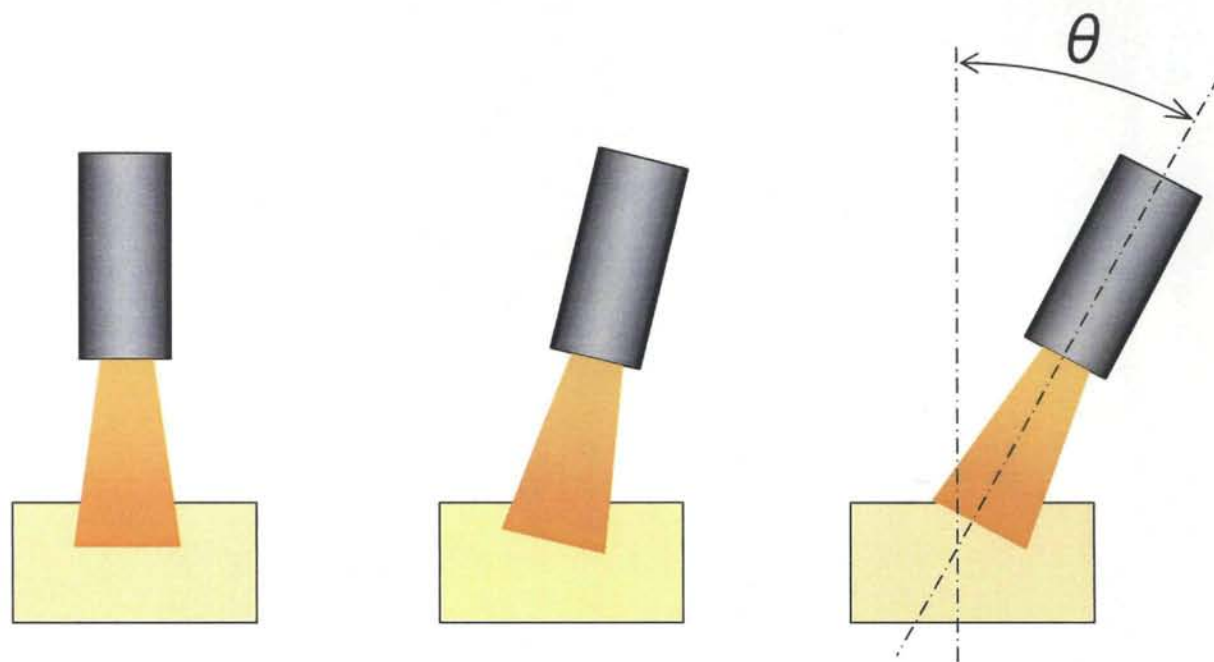


図5.3 試料に対するプローブの照射角度

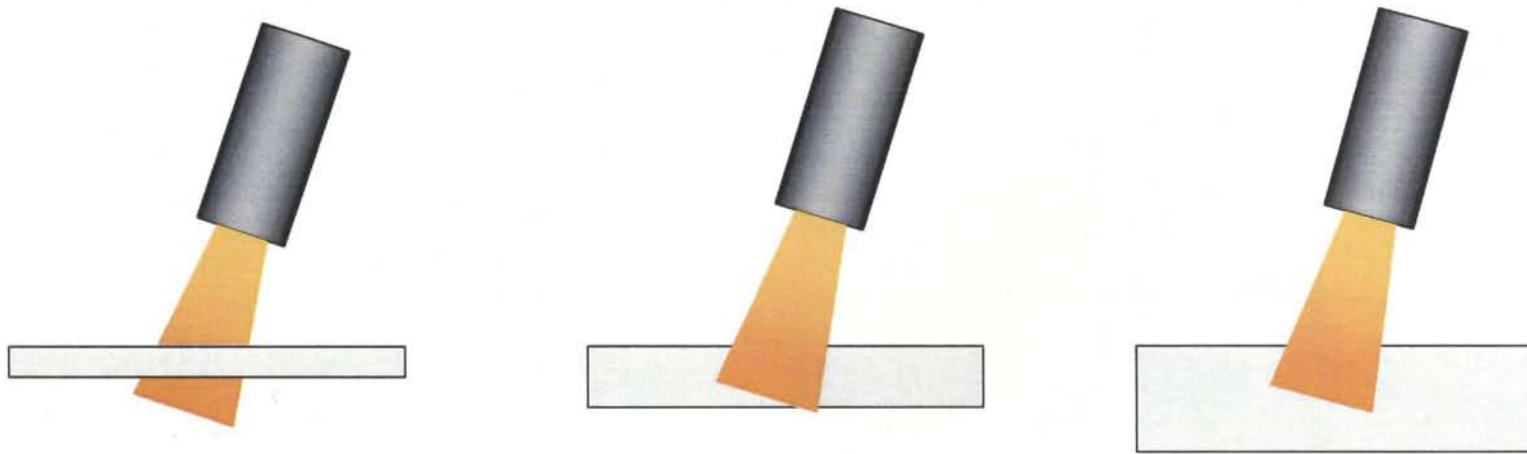


図5.4 試料の厚さに対する吸光度の変化

5.3 結果

高野豆腐，再生セルロースでは，照射角度の変化による吸光度の変化は認められなかった．ブタ膝蓋骨軟骨では， 10° 以上の照射角では測定エラーが発生し，測定不能となった（図 5.5）．

軟骨の厚さと吸光度の関係では，の厚さ 1.0mm 以上では吸光度はほぼ一定となり，厚さ 1.0mm 以下では，吸光度と厚さに比例関係が認められた（図 5.6）．

押込み荷重除荷後の吸光度回復曲線は仮定と逆の形状となった．すなわち，硝子軟骨であるブタ膝蓋骨軟骨が，線維軟骨であるブタ肋軟骨よりも吸光度回復が迅速であった（図 5.7）．

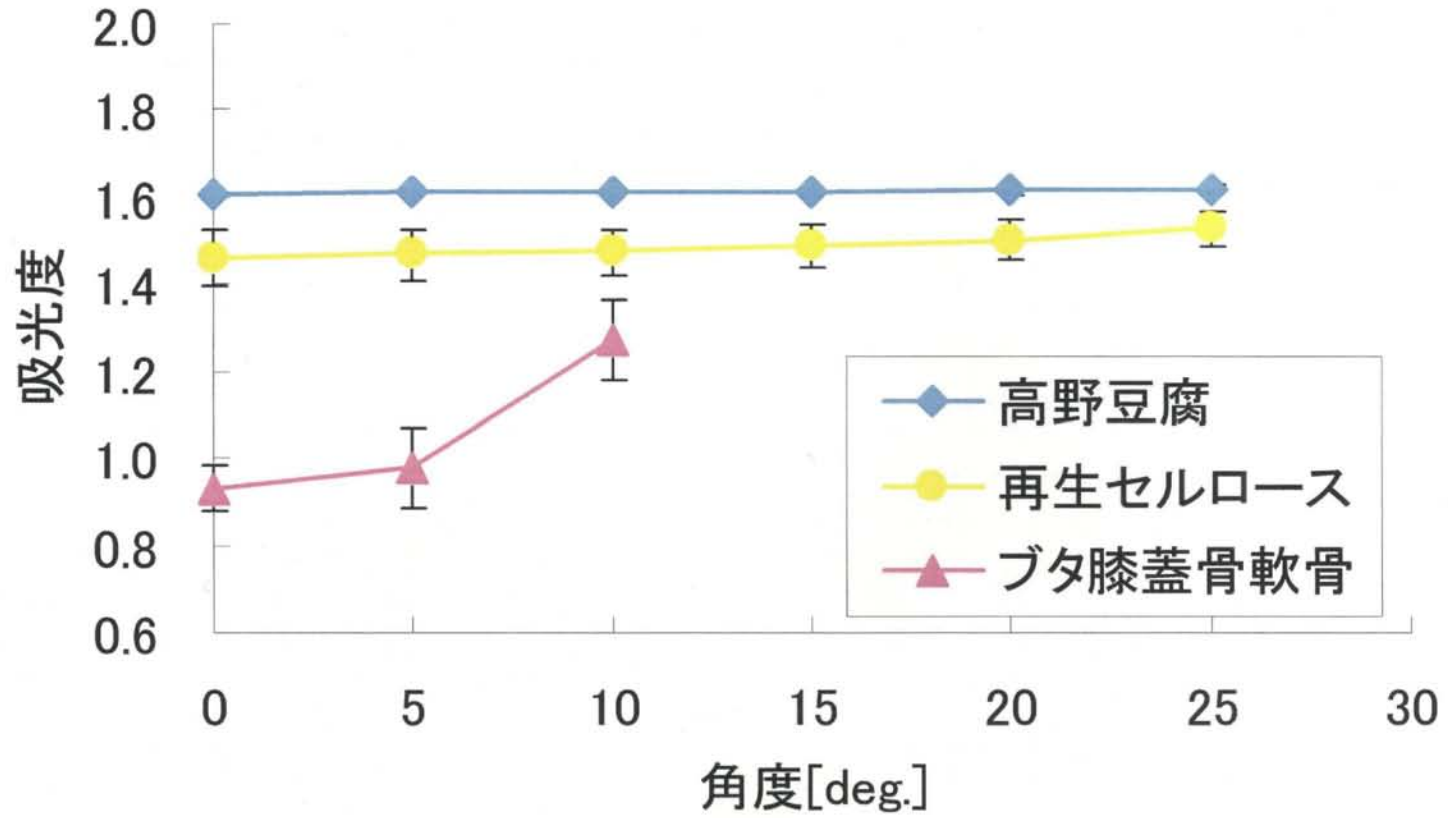


図5.5 プローブの照射角度に対する吸光度変化

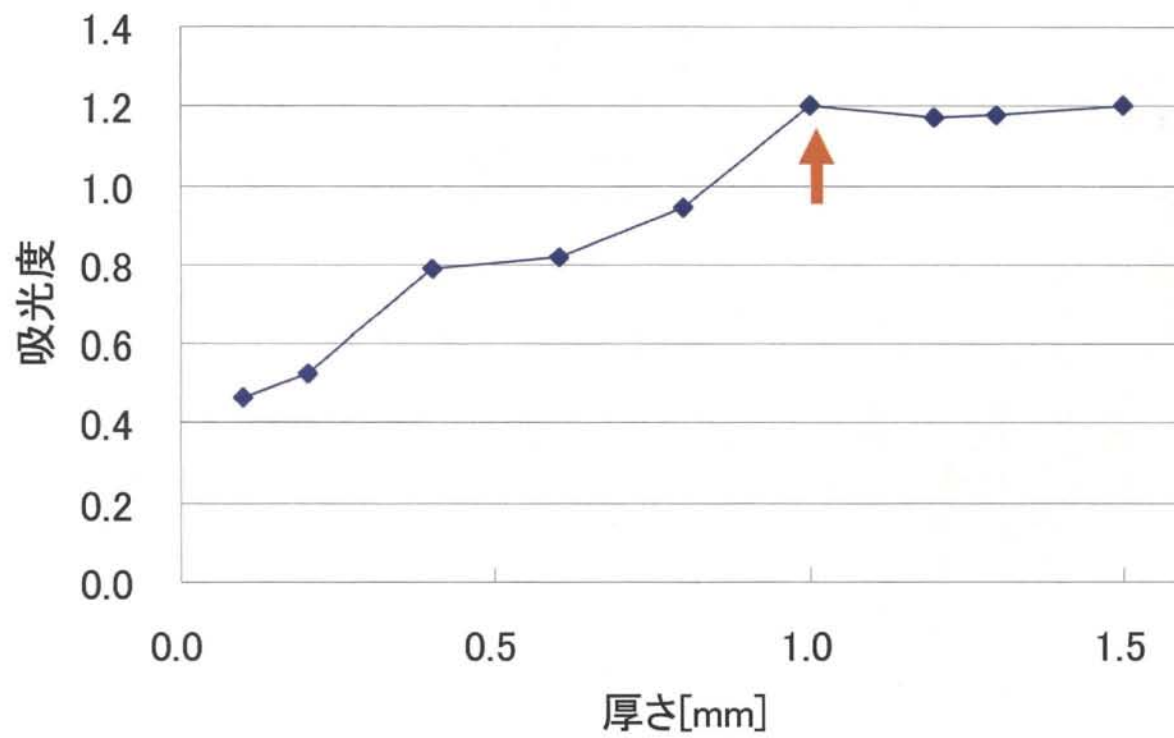


図5.6 試料の厚さ変化に対する吸光度変化

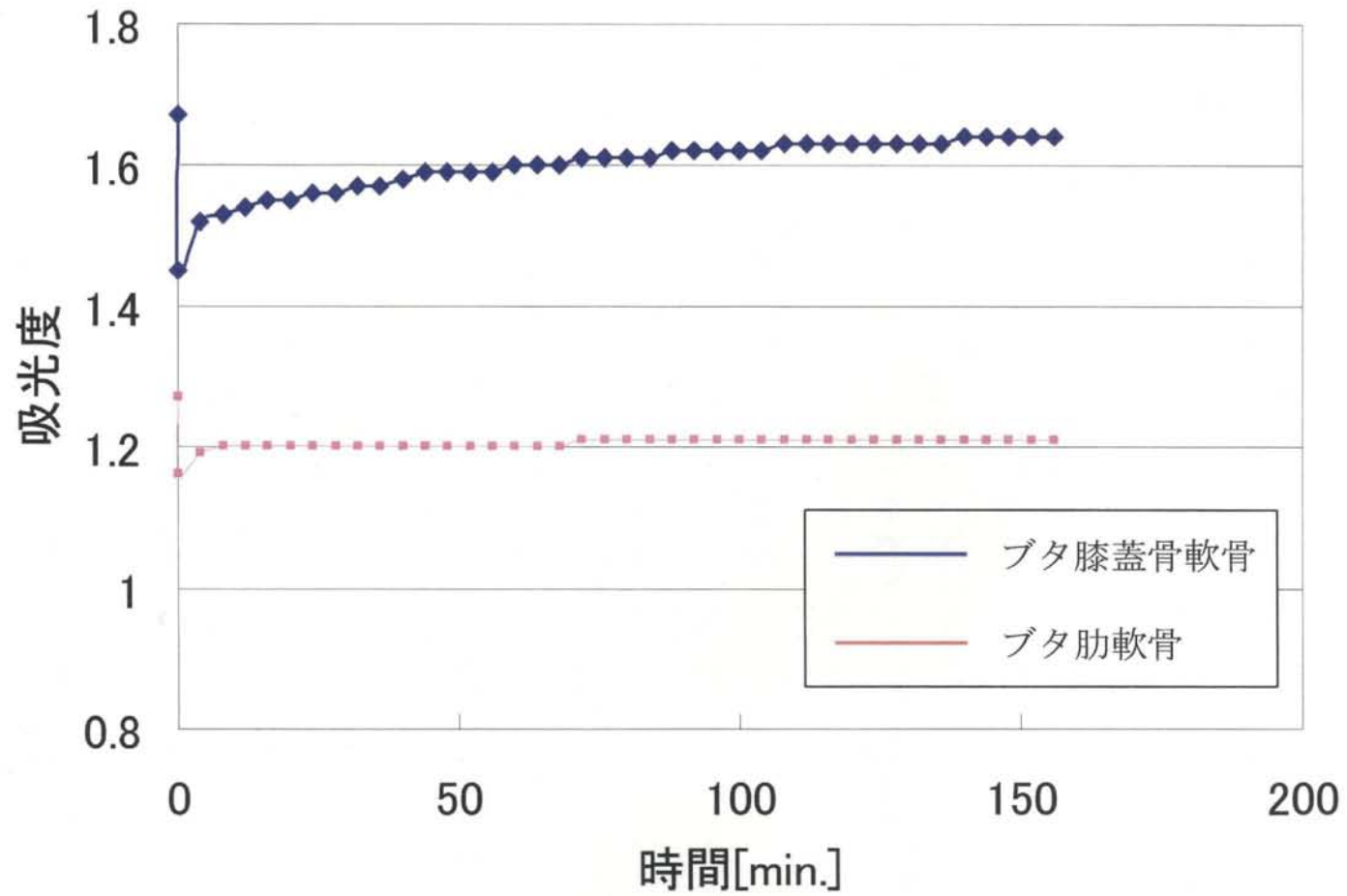


図5.7 ブタ膝蓋骨軟骨とブタ肋軟骨の吸光度変化

5.4 考察

5.4.1 試料－プローブ間の角度について

高野豆腐および再生セルロースは表面が粗く，試料表面で反射される正反射光が少ないため，照射角の変化に対する吸光度変化が小さいものと考えられる．一方，表面が滑らかなブタ膝蓋骨軟骨では，入射光が試料表面で反射される割合が高いと考えられる．特に，直角に照射した場合は，入射光の大部分は試料表面で反射され，正反射光としてプローブに再入射するため吸光度が最も小さくなると考えられる．そして，照射角の増加とともに正反射光の割合が減少し，吸光度も増加するものと考えられる．照射角が 10° 以上では，反射光量の減少に起因する感度低下のために測定が不可能となったものと考えられる．

5.4.2 近赤外線 の到達深度について

実験の結果から，本研究で使用する近赤外線水分計の関節軟骨に対する測定深度は，厚さ方向で 1.0mm であると考えられる．したがって，測定対象の試料厚さは 1.0mm 以上必要であり，もし試料厚さが 1mm 未満だとすると，吸光度の測定値には厚さの影響が反映されることになり，誤差が大きくなるといえる．

5.4.3 押込み荷重除荷後の吸光度回復曲線について

ブタ膝蓋骨軟骨で迅速な吸光度の回復が得られ，ブタ肋軟骨ではほとんど吸光度の回復が得られなかったのは，測定箇所周囲の状態が結果に影響を与えたためと考えられる（図 5.8）．すなわち，押込み荷重除荷後の周囲から測定箇所に対する自由水の流入の有無によって，吸光度の回復の仕方が変わると考えられる．このことを確認するため，ブタ膝蓋骨軟骨に対して 196N の荷重で押込み試験を行い，押込み試験前後の押込み部とその周辺の吸光度を測定した（図 5.9）．その結果，押込み部では吸光度が減少したのに対し，押込み試験を行った周辺部では吸光度の増加が確認された（図 5.10）．こ

のことから、硝子軟骨では押し込み試験によって測定領域内の自由水が測定領域外に排出されて周辺の軟骨組織内に貯留され（図 5.8A）、押し込み荷重を取り除くと同時に、周辺で貯留されていた自由水が測定領域内に流入するため、迅速な吸光度の回復が得られるものと考ええる。また透水率の高いブタ肋軟骨（線維軟骨）では、押し込み部の周辺に自由水が貯留されないため、周辺からの自由水の供給が得られず、吸光度が回復しなかったものと考えられる（図 5.8B）。したがって、硝子軟骨であっても測定部の周囲に軟骨組織が存在しなければ、押し込み試験によって排出された自由水を貯留し測定箇所にも再吸水することができず、線維軟骨と同様に押し込み荷重除荷後の吸光度の回復はほとんど得られない。すなわち、測定領域周囲の環境によっては、硝子軟骨と線維軟骨の違いを評価できない可能性があると考えられる。

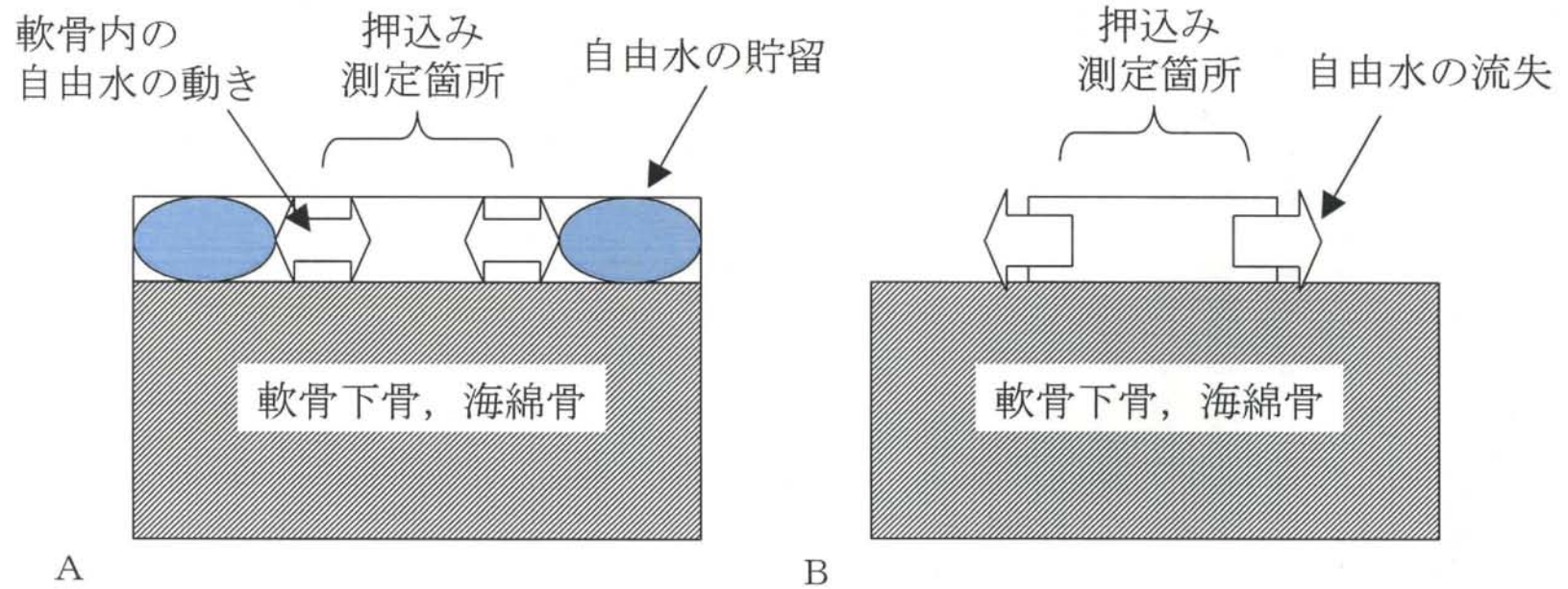


図5.8 押し込み試験に伴う軟骨内の自由水の動き
 A：正常関節軟骨
 B：線維軟骨および周囲に欠損を伴う軟骨



図5.9 ブタ膝蓋骨軟骨試料. 斜線部が押し込み箇所.

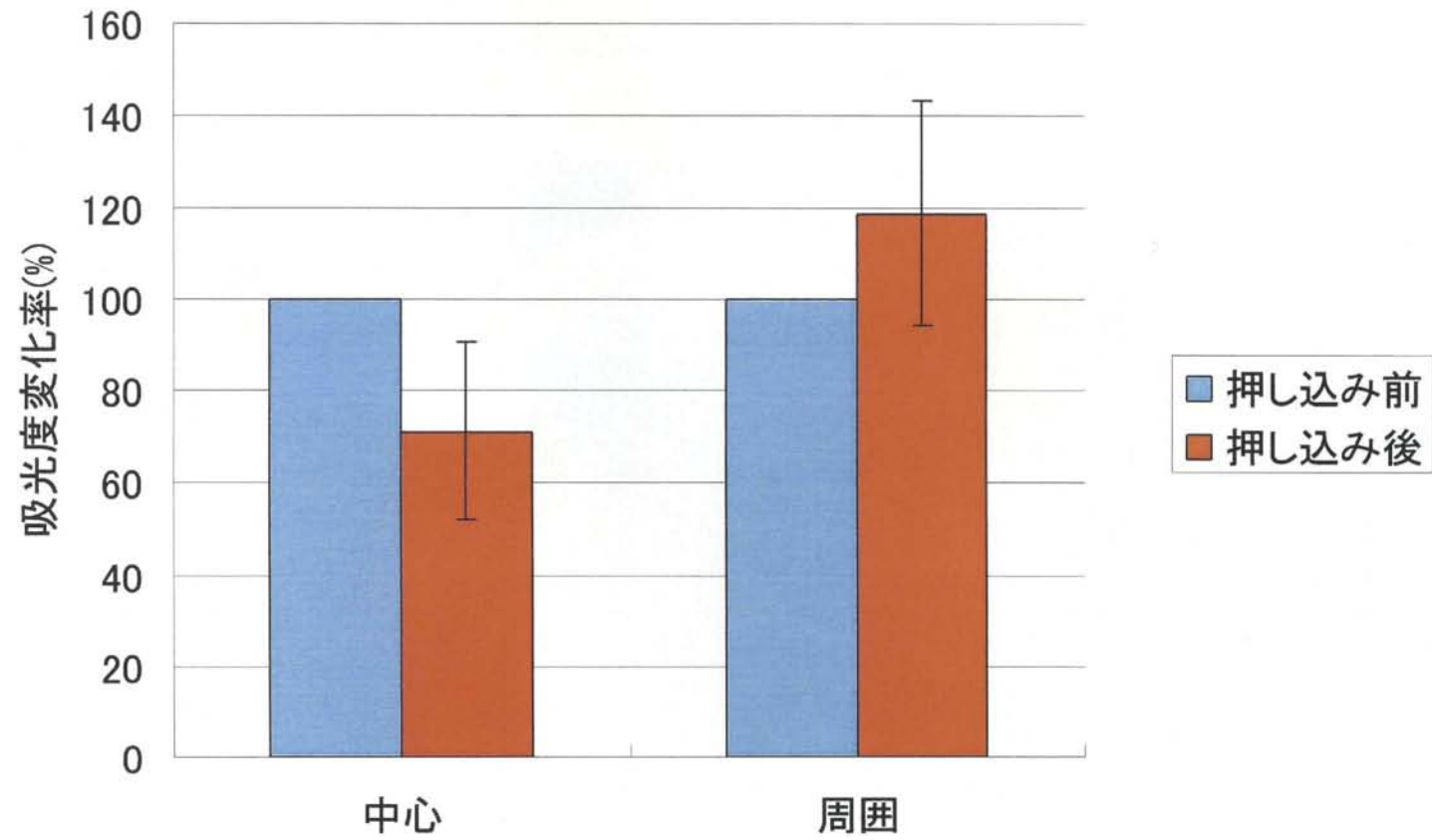


図5.10 押し込み前後における押し込み箇所と、その周囲（図5.9の白丸箇所）の吸光度変化

5.5 結言

軟骨試料に対する近赤外線のに至適な照射角度および吸光度測定深度を調べた。さらに、ブタ膝蓋骨軟骨とブタ肋軟骨に対して押込み試験を行い、押込み荷重除荷後の吸光度変化を測定した。

これらの実験の結果、以下のことが明らかになった。

1. 近赤外線水分計で軟骨組織の吸光度を測定する場合、正反射光の影響を取り除くために、試料に対して 10° の傾斜を付与する必要がある。
2. 軟骨試料に対する吸光度の測定深度は、試料表面から 1.0mm である。すなわち近赤外線水分計による測定領域は、
測定領域 = (近赤外線の照射面積 \times 深さ 1.0mm)
であると言える。
3. 押込み荷重除荷後の吸光度変化は試料の透水率によって異なるが、測定領域周囲の状況にも大きな影響を受ける。したがって、何らかの方法で、測定領域周囲の状況による影響を除去する工夫が必要である。

次章では以上の結果を踏まえ、押込み荷重除荷後の吸光度変化と軟骨変性との関係について詳細に検討した実験結果について述べる。

第 6 章 組織学的評価と吸光度回復曲線との関係

6.1 緒言

軟骨試料に対して押し込み試験を行い、押し込み荷重除荷後の吸光度変化を測定する場合、測定領域周囲の状況が大きな影響を与える。そこで押し込み荷重除荷後の測定領域に対し、周辺の状態に依らずに自由水が供給される状況で測定するため、試料を骨軟骨円柱とし、押し込み荷重除荷後は十分な量の生理食塩水を含む脱脂綿で試料の周囲を包み、外部から再吸水させながら吸光度の測定を行った。さらに、軟骨試料を肉眼分類ならびに組織学的に評価し、吸光度回復曲線との関係を検討した。

6.2 試料および実験方法

6.2.1 ブタ膝蓋骨軟骨およびブタ肋軟骨を用いた実験

骨軟骨移植システム(Sulzer Medical 社)を使用してブタ膝蓋骨軟骨とブタ肋軟骨から採取した直径 7.45mm の骨軟骨円柱を作製した。

各円柱試料に対して、直径 7.5mm の円柱状 indenter で 196N (4.5MPa) の圧力まで押し込み荷重を付与し、indenter を取り除いて試料の上下面および側面から漏出した水分を脱脂綿で拭き取った後、周囲を十分な水を含んだ脱脂綿で包み再吸水させ、吸光度の経時的変化を測定した。またブタ肋軟骨を用いて、押し込み荷重を取り除いた後に水を含んだ脱脂綿で試料を包まず、すなわち再吸水させずに吸光度の変化を測定した (図 6.1)。

6.2.2 ヒト関節軟骨を用いた実験

ヒト関節軟骨は大腿骨頸部骨折手術時に摘出されたヒト大腿骨頭 (n=3)、変形性膝関節症による人工膝関節置換術時に摘出されたヒト大腿骨膝関節面およびヒト脛骨膝関節面 (n=9) を使用した。試料は臨床医の肉眼所見によって normal, softening, fibrillation の 3 段階にあらかじめ分類し²⁾、自作の工具を用いて肉眼分類した各部から直径 7.0mm の骨軟骨円柱を作製した。

試料に対して、秋月らが行った biphasic indentation test⁵⁾ での荷重を参考として、 ϕ 7.5mm のステンレス製 indenter で 10N (0.226MPa) の静荷重を 30 秒間負荷し、試料の上面および側面から漏出した水分を乾燥した脱脂綿で拭き取った。その後、荷重を取り除くとともに周囲を十分な水を含んだ脱脂綿で包み再吸水させ、吸光度の経時的変化を測定した。そして、軟骨変性の肉眼分類と吸光度曲線の回復パターンを比較検討した。さらに各試料の組織を臨床医 2 名による Mankin Score³⁾ によって評価し、吸光度回復曲線との関係を比較検討した。

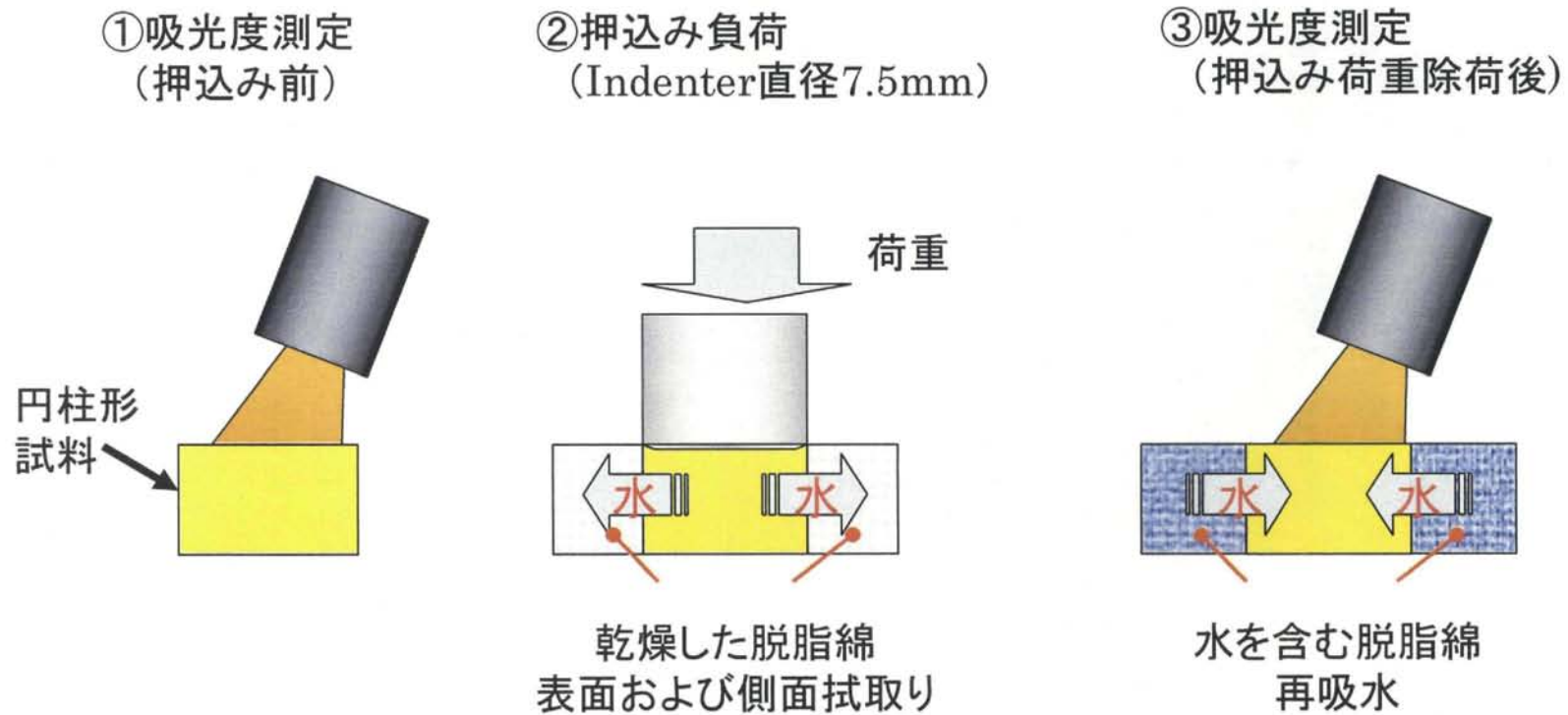


図6.1 骨軟骨円柱を使用した，押し込み後の吸光度変化測定の実験系

6.3 結果

6.3.1 ブタ膝蓋骨軟骨およびブタ肋軟骨の吸光度回復曲線

押し込み荷重除荷後の経過時間と吸光度の関係を調べた。吸光度回復曲線は、ブタ肋軟骨では上に凸、ブタ膝蓋骨軟骨では下に凸となった(図 6.2)。吸光度の時間変化率(吸光度の回復速度)は、ブタ肋軟骨では押し込み後 10 ± 6 min で最大となり、ブタ膝蓋骨軟骨では 34 ± 6 min で最大となった(図 6.3)。また、押し込み後再吸水させなかったブタ肋軟骨では、体積は回復しても吸光度の回復は見られなかった(図 6.4)。

6.3.2 ヒト関節軟骨の吸光度回復曲線

押し込み荷重除荷後のヒト関節軟骨の吸光度回復パターンは、一旦減少した後増加に転じる(パターン1)、急速に増加する(パターン2)、増加しない(パターン3)の3種類に分類可能であった(図 6.5)。軟骨変性の肉眼分類と吸光度曲線の回復パターンを比較検討すると、正常関節軟骨ではパターン1が多く見られた。また、吸光度の回復が得られなかったパターン3の試料は全体の約 31%あったが、これらの試料は何らかの理由で再吸水が起きなかったものと考え、検討の対象から外した。

そして、吸光度曲線の回復パターン毎に、パターン1の試料については、Mankin Score の値と吸光度が最下点に到達するまでの時間との関係を、パターン2の試料については Mankin Score の平均値をそれぞれ検討した。

パターン1の試料では、Mankin Score の値と吸光度が最下点に到達するまでの時間との間に負の相関($R=0.363$)が見られた(図 6.6A)。パターン2の試料では、全試料 15 個中 9 個で Mankin Score の値は 4 以上で、全体の平均値 \pm S.D. は 3.6 ± 2.0 であった(図 6.6B)。

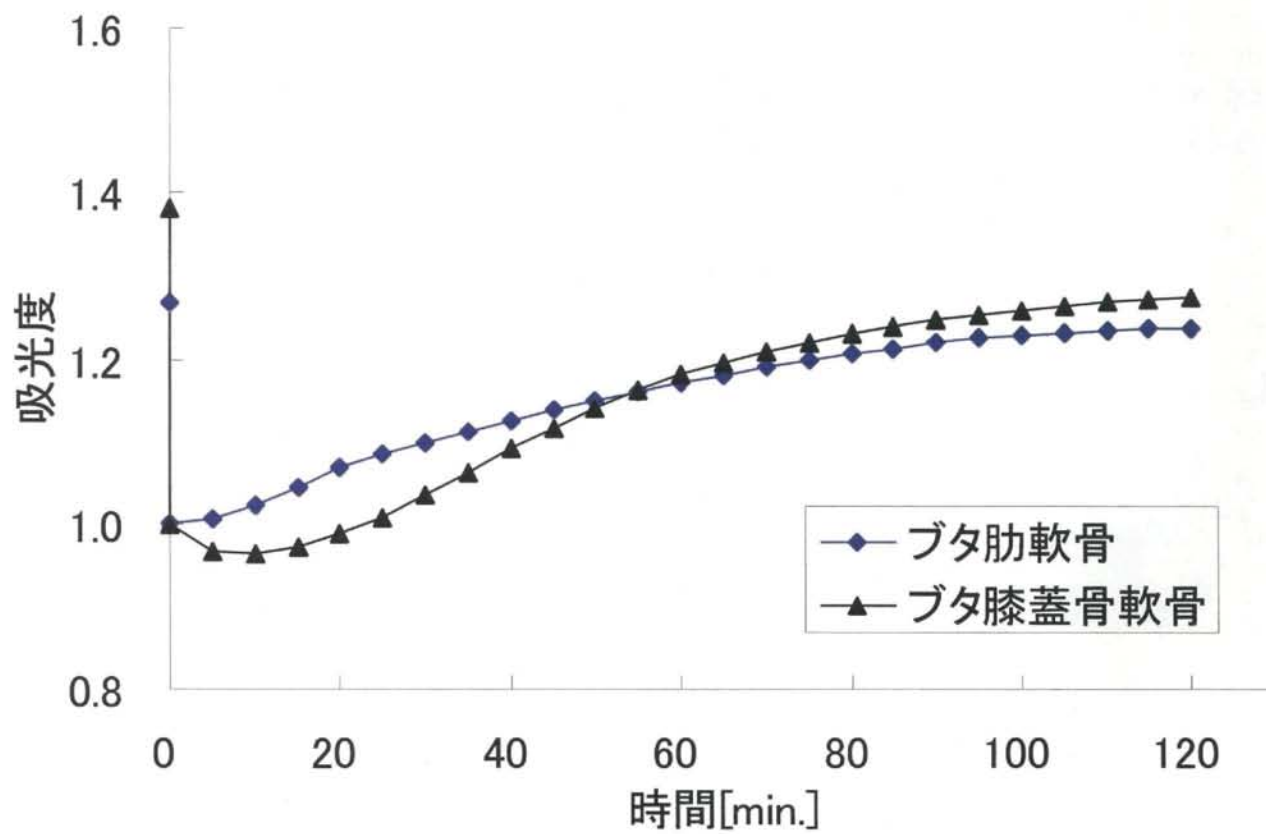


図6.2 ブタ膝蓋骨軟骨およびブタ肋軟骨における
押し込み荷重除荷後の吸光度回復曲線

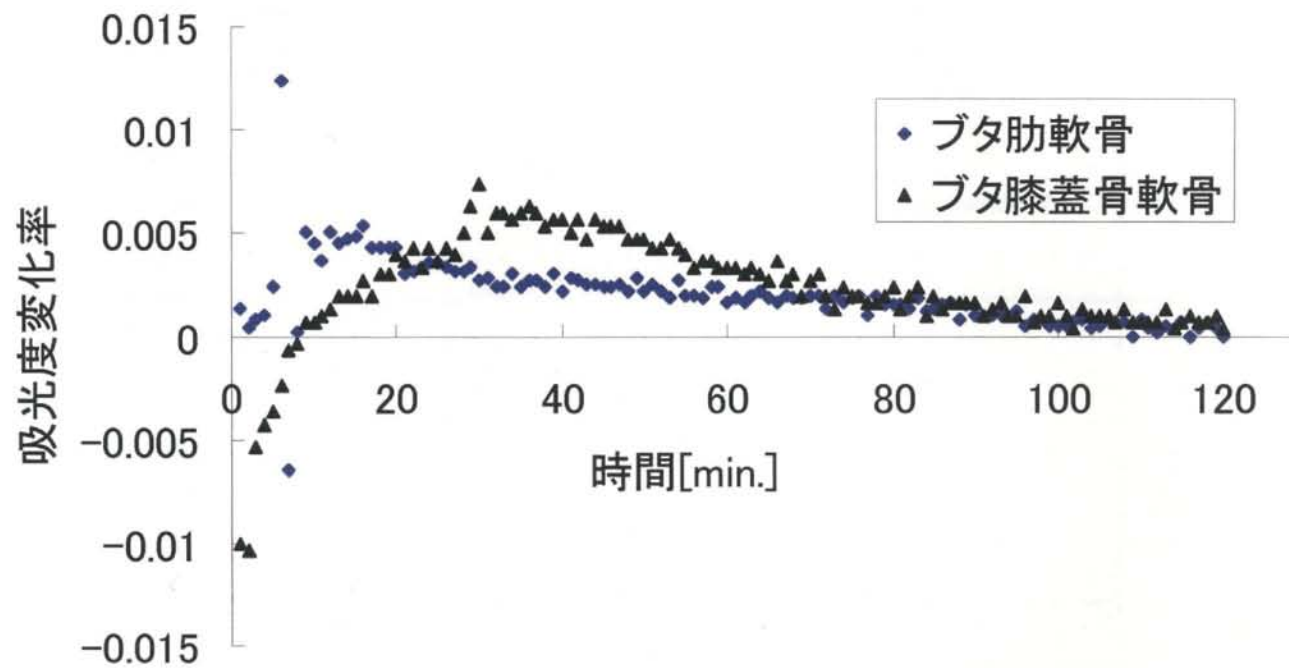


図6.3 ブタ膝蓋骨軟骨およびブタ肋軟骨の吸光度変化率曲線

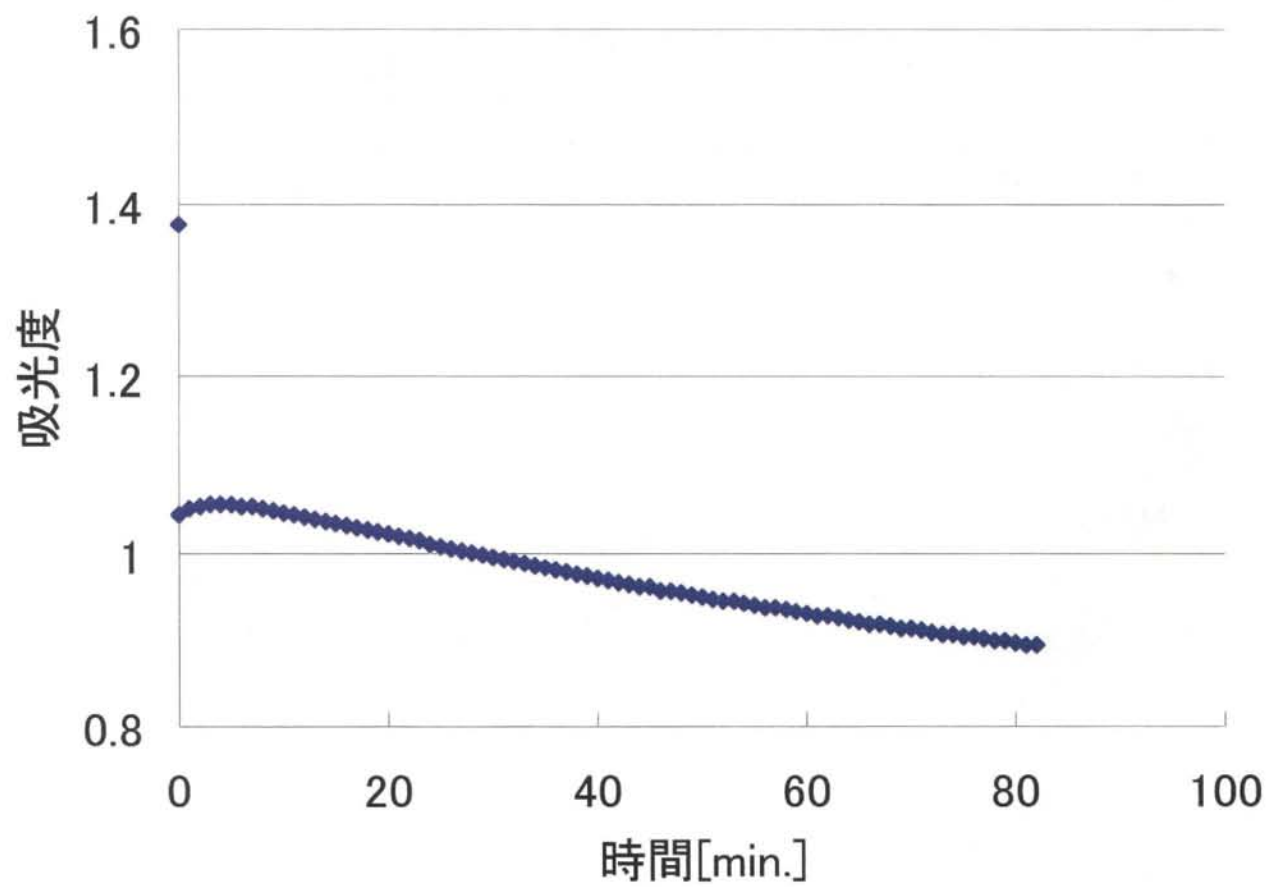


図6.4 試料外部から再吸水させない場合の吸光度変化 (試料: ブタ肋軟骨)

	パターン1	パターン2	パターン3
Normal	18	1	9
Softening	5	5	3
Fibrillation	9	9	10

図6.5 押し込み荷重除荷後の吸光度回復パターン

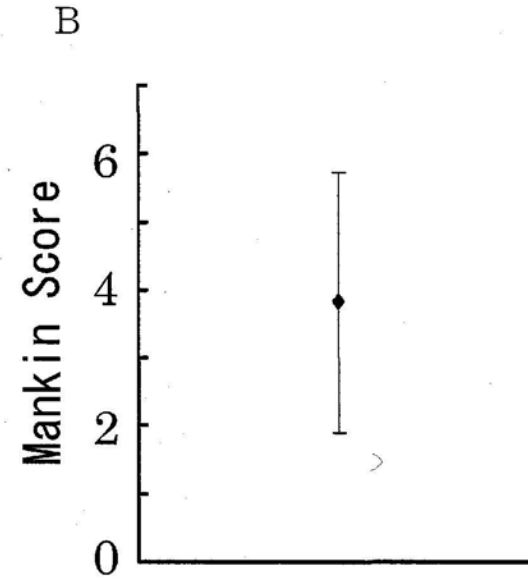
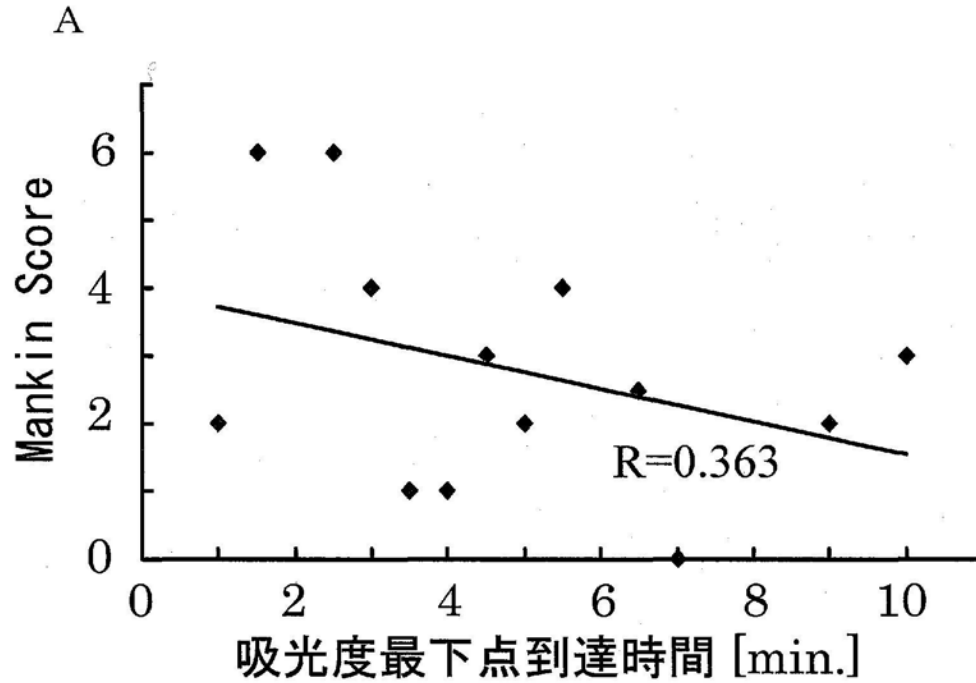
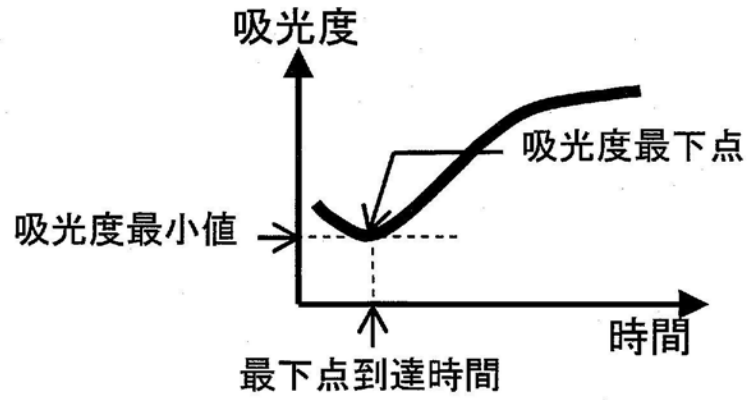


図6.6 回復パターン1の試料における、吸光度最下点到達時間とMankin Scoreの関係 (A)
回復パターン2の試料における、Mankin Scoreの平均値±S.D. (B)

6.4 考察

硝子軟骨であるブタ膝蓋骨軟骨およびヒト正常関節軟骨では、押し込み荷重除荷後も吸光度が減少し続けるという特徴的なパターンが見られた。これは、押し込みによって組織内の水分が漏出したために押し込み直後の吸光度は一旦減少し、押し込み荷重除荷後5~10分の間は組織のひずみは回復するものの、組織の透水率が低いため外部からの水分の供給が追いつかず、測定領域内の水分密度が低下するためと考えられる(図6.7)。一方、硝子軟骨に比べて透水率が高い線維軟骨、すなわちブタ肋軟骨およびヒト変性関節軟骨では、押し込み荷重除荷直後より、組織のひずみ回復と同時に水分が内部に浸透するため、迅速な吸光度の回復が見られるものと考えられる(図6.8)。ここで得られた結果は線維軟骨の透水率が硝子軟骨の透水率より高いことを示すものと考えられ、Mowらの理論結果⁴⁾と一致する。

一方、押し込み荷重除荷後の吸光度回復について、軟骨組織のひずみが回復し、プローブと試料の間の距離が狭まるのが原因ではないかという議論もあるが、測定領域内に自由水が供給されない状況で吸光度を測定した結果より、押し込み後の吸光度変化は測定領域内の水分量変化によるところが大きいことがわかる。

またヒト関節軟骨において、パターン1の試料について Mankin Score と押し込み荷重除荷後の吸光度最下点到達時間の関係を検討したところ、Mankin Score の値が小さい試料、すなわち正常軟骨に近い試料ほど、吸光度が最下点に到達するまでに要する時間は長かった。また吸光度の回復が迅速なパターン2の試料に関しては Mankin Score の値も大きく、全体的に軟骨変性が進んでいた事がうかがえる。この結果は、軟骨変性に伴い透水率が増大する軟骨物性の変化を示唆しているものと考えられる。

□ : 測定領域 ● : 水分

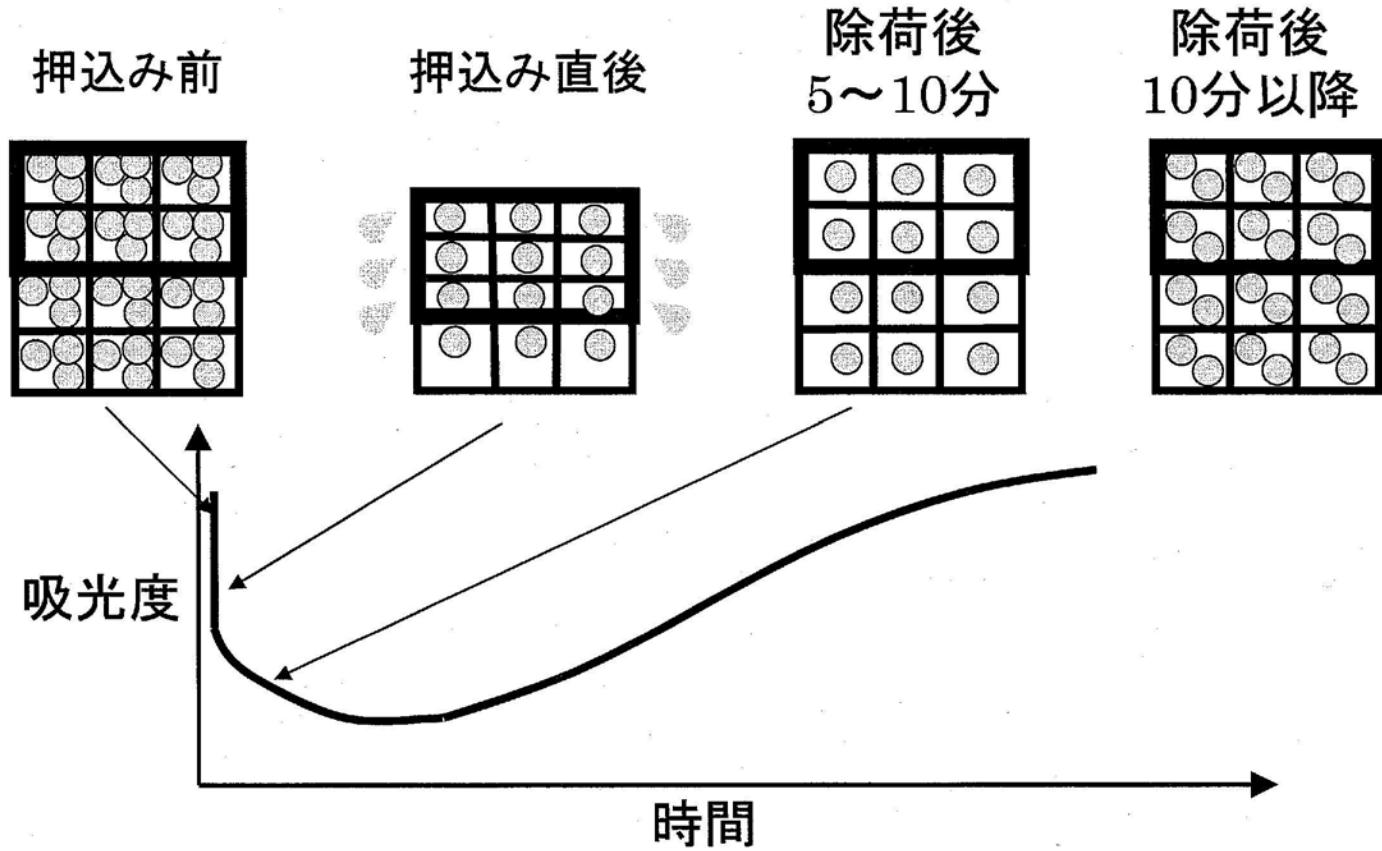


図6.7 正常関節軟骨の吸光度回復原理

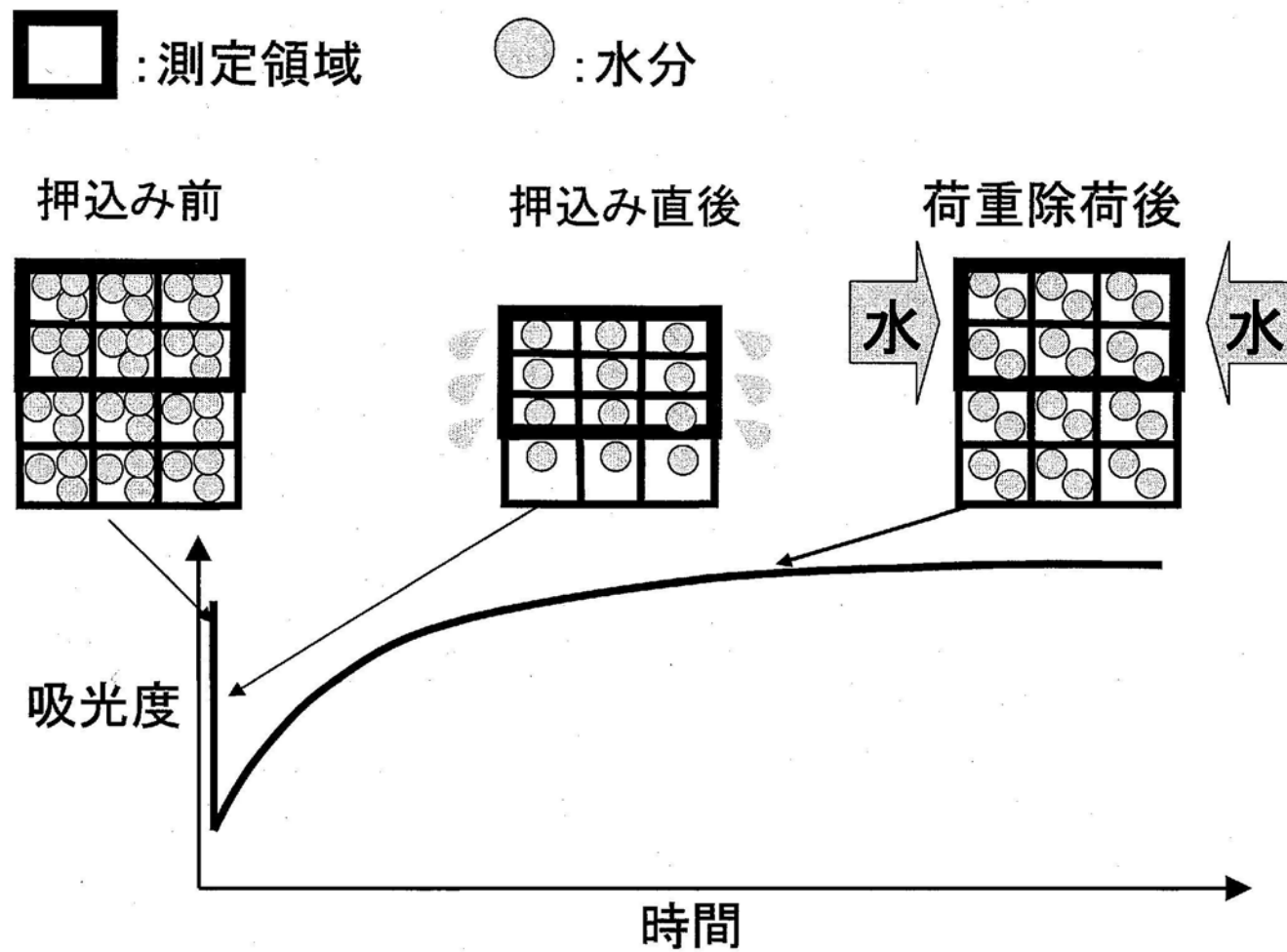


図6.8 変性関節軟骨の吸光度回復原理

6.5 結言

円柱状の軟骨試料に対して押し込み試験を行い、押し込み荷重除荷後測定領域周囲の状況を一定化して吸光度の時間変化を測定した。その結果、以下の知見が得られた。

1. 軟骨試料の透水性の違いを、吸光度回復曲線のパターンの違いとして捉えることができた。すなわち、押し込み荷重除荷後の吸光度回復は、透水性の低いブタ膝蓋骨軟骨では緩慢であり、透水性の高いブタ肋軟骨では迅速であった。
2. 透水性の低い硝子軟骨では、押し込み荷重除荷後もさらに吸光度が減少し続けるという、特徴的な吸光度回復曲線が得られた。
3. 押し込み試験後に試料の周囲から再吸水しなかった場合、試料の体積は回復したが、吸光度の回復は得られえなかった。
4. ヒト関節軟骨では、Mankin Score の値が高い試料ほど吸光度最下点が短時間で表れた。さらに変性が進んだ軟骨では吸光度最下点は表れなかった。すなわち、軟骨変性の進行に伴って軟骨の透水性が高くなる傾向を、近赤外線水分計を用いて確認することができた。

第 7 章 臨床応用を想定した吸光度測定実験

7.1 緒言

第 6 章で行った実験は，押し込み荷重除荷後の吸光度回復曲線から軟骨物性の違いの評価を試みたものであった．しかし，一箇所について測定を開始してから結果が得られるまで最低 20 分程度の時間が掛かる上，測定部の周囲の影響を考慮して円柱状にくり抜いた試料を使用しなければ一定の結果を得ることができなかつた．すなわち，臨床応用は困難である．そこで，測定部の周囲の状態に依存しない，すなわち試料をくり抜くことなく吸光度変化を測定できる実験系を考案し，より臨床応用に近づけるための実験を行った．

7.2 実験方法

7.2.1 原理

2.4 節で述べたとおり，関節軟骨に圧縮応力が作用すると，固形基質内部の水分は外部に滲出し，軟骨組織内の含水量は低下する。

また秋月らの実験でも，金属製の indenter で関節軟骨に圧縮荷重を作用させると，荷重付与部の水分が周囲に逃げ，indenter の周囲の軟骨表面から軟骨内の水分が漏出するという現象が確認されている（図 7.1）¹¹⁾。すなわち，押し込み荷重を付与している間は押し込み部の含水量は減少し続ける。したがって，一定の押し込み荷重が作用している箇所の吸光度を測定すれば，吸光度は時間とともに減少すると考えられる。さらに透水率の違いから，正常関節軟骨（硝子軟骨）では吸光度の現象は短時間で終了し，変性関節軟骨（線維軟骨）では長時間にわたって吸光度が減少し続けると考えられる（図 7.2）。

7.2.2 試料

試料は，ブタ肋軟骨（n=2），変形性関節症による人工膝関節置換術時に摘出されたヒト大腿骨膝蓋面軟骨（ヒト OA 軟骨，n=1），および十分な水を含んだ高野豆腐（n=1）を使用した。

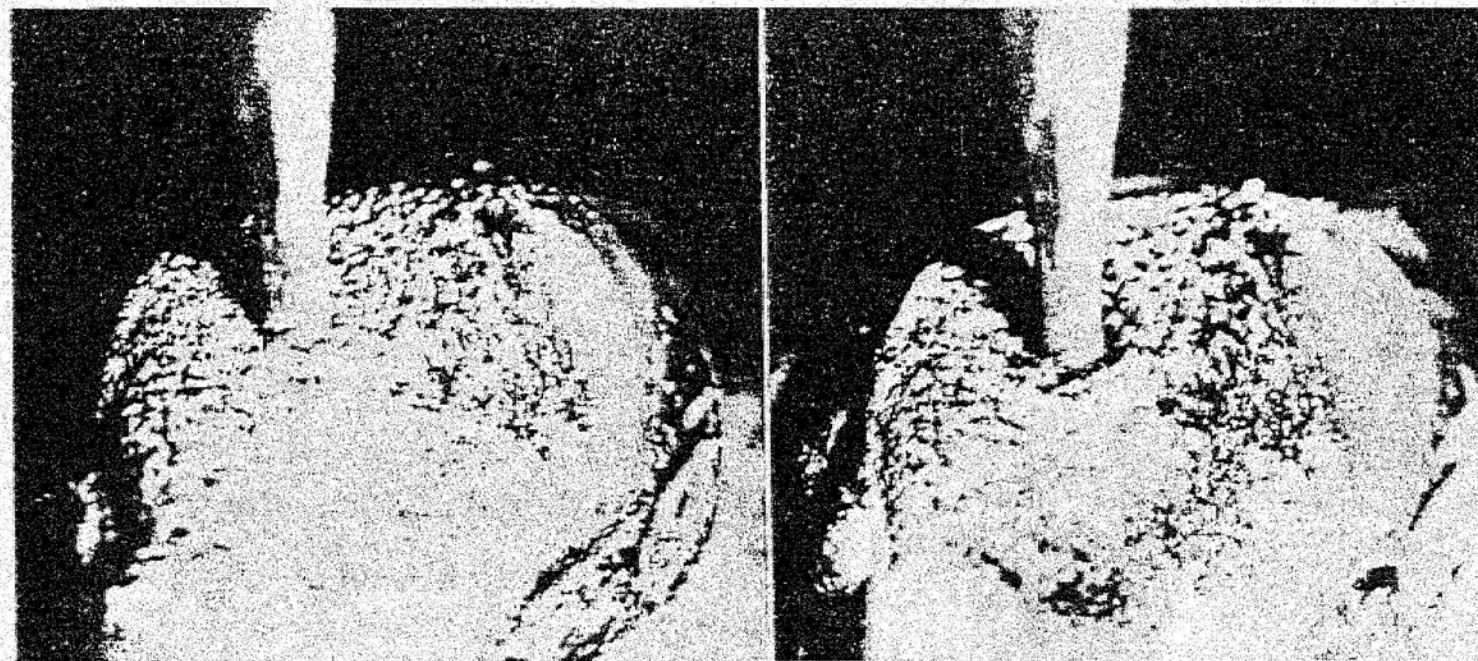


図7.1 左：関節軟骨に対する押し込み荷重付与直後
右：荷重付与5秒後. Indenter周囲でのヨードでんぷんの発色によって、水の
滲出が確認できる.

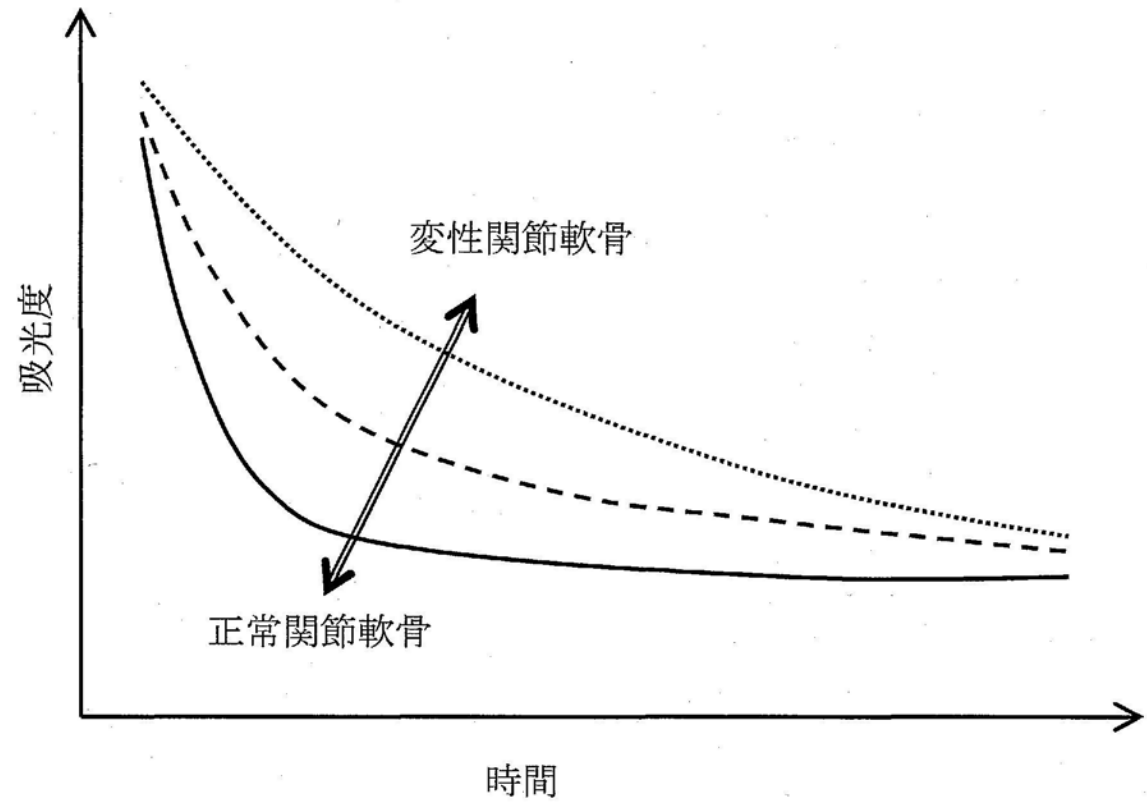


図7.2 正常関節軟骨と変性関節軟骨の、押し込み荷重付与時の吸光度変化

7.2.3 実験装置および実験方法

図 7.3 に、押し込み荷重を付与しながら同時に吸光度を測定できる indenter 一体型のプローブの概略図を示す。今回は、これまでの実験に使用していた近赤外線水分計のプローブの先端に、直径 4.6mm、厚さ 5.0mm の両端が平らな石英ガラス円柱を取り付け、先端の石英ガラス部で試料に対して押し込み荷重を付与した。試料は、測定面が indenter の先端と平行になるように置いて測定した。

また図 7.4 は、indenter 一体型プローブを使用して、一定の静荷重を付与しながら吸光度を同時測定する装置を示す。Head 部はリニアガイドを介して支柱に取り付けられ、スムーズに上下運動できる。また、head 部自身の自重は約 500g あるため、indenter の下に試料を置くだけで 0.3[MPa]の静荷重を作用させることができる。今回の実験では、荷重は head 部の自重のみを作用させ、吸光度を設定可能なもっとも短い時間である 10 秒間隔で測定した。測定は、吸光度測定値が 2 分以上一定値を保つ状態になるまで行った。

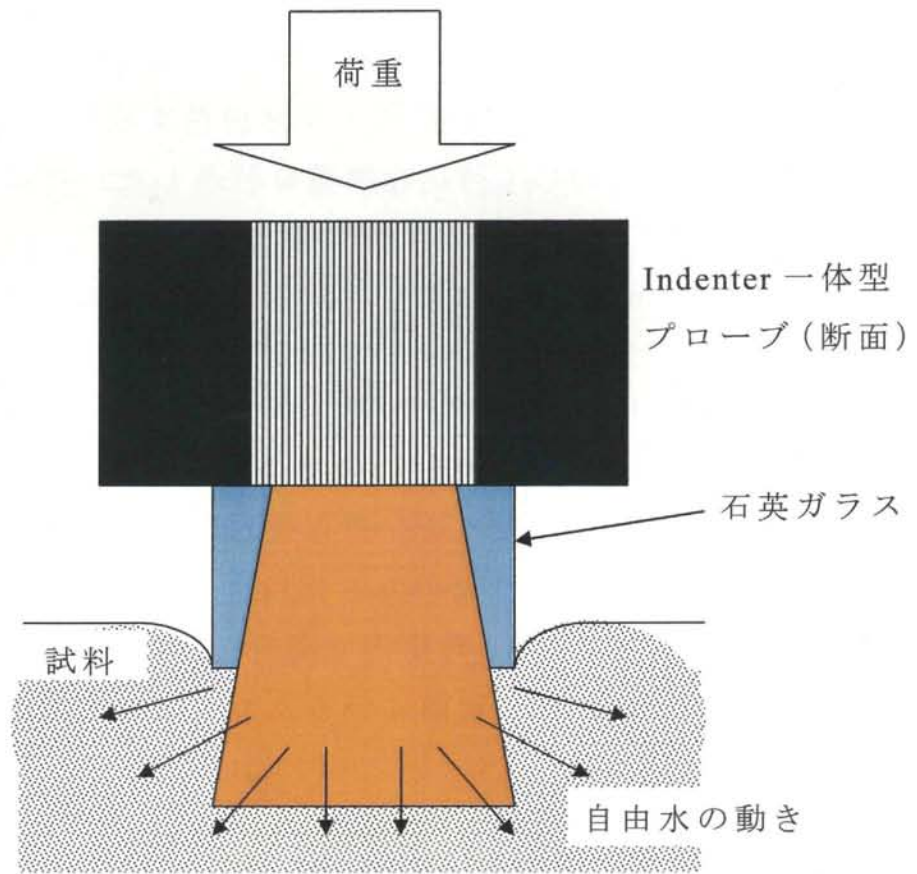


図 7.3 圧縮荷重付与時の吸光度測定法

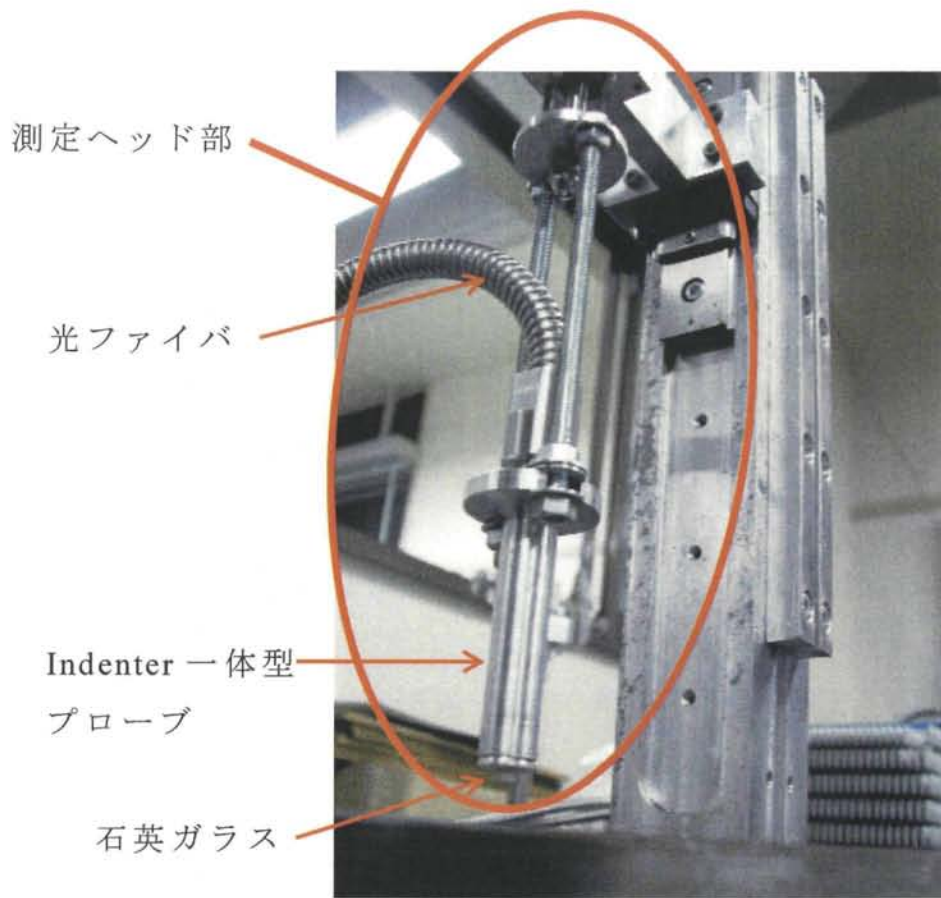


図 7.4 Indenter 一体型プローブを用いた実験装置

7.3 結果

図 7.5 に、吸光度を測定した結果を示す。ブタ肋軟骨では静荷重の付与を開始した瞬間から 60 秒まで、ヒト OA 軟骨では静荷重の付与を開始した瞬間から 20 秒までの間に吸光度が急速に増加し、その後時間と共に漸増した（図 7.5A, B）。グラフ中の矢印は、荷重（自重）の付与を開始した瞬間を表す。一方、高野豆腐では indenter が接触した瞬間から数秒の間、すなわち、図 7.6 の写真に示すように、大きく変形するまでの間吸光度は急速に増加し、その後時間と共に吸光度は徐々に減少した（図 7.5C）。吸光度変化は、荷重を付与してから 230 秒間続いた。しかし、最初の吸光度増加は 10 秒以内であったため、その間の吸光度をパソコンに取得することができず、図 7.5C のグラフでは最初から吸光度が減少するような形となっていることを付け加えておく。

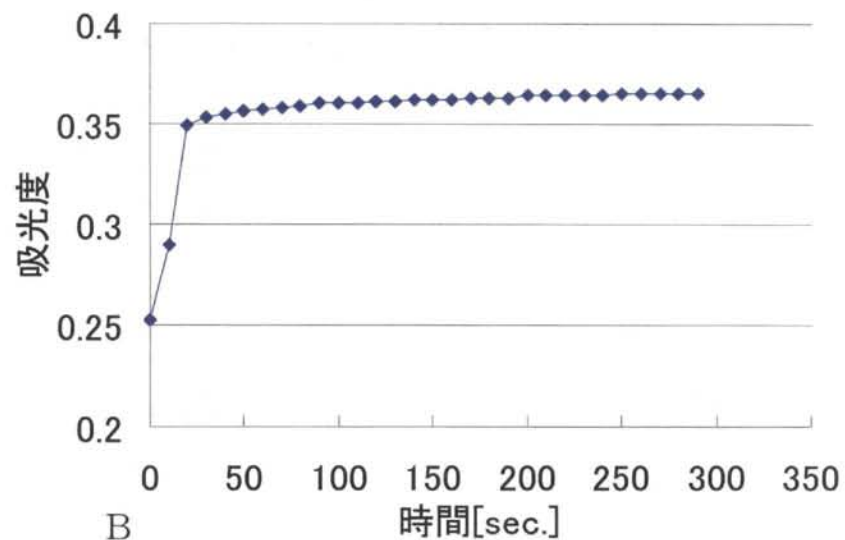
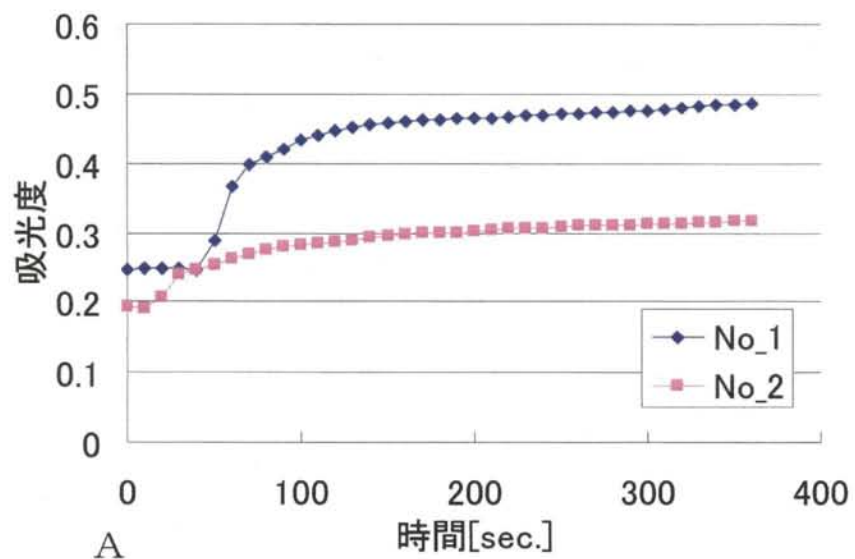
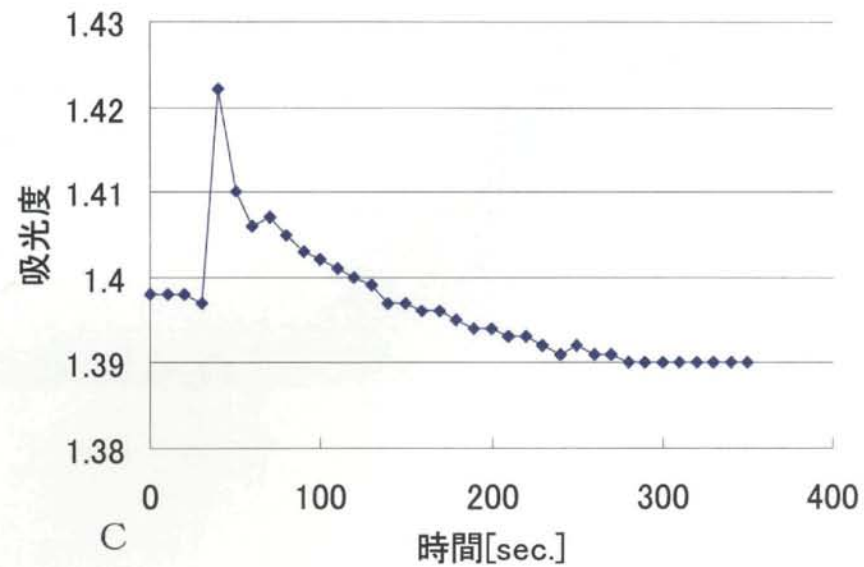


図7.5 押し込み荷重付与時の吸光度変化
 A：ブタ肋軟骨
 B：ヒトOA関節軟骨
 C：高野豆腐



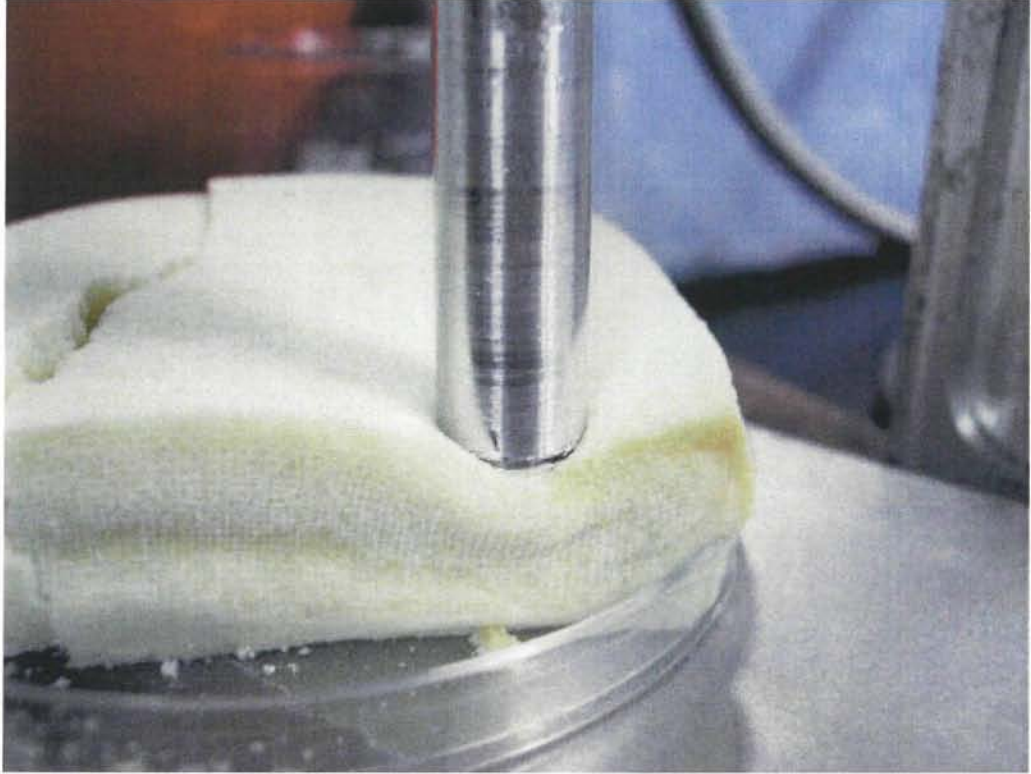


図 7.6 吸光度測定中の高野豆腐

7.4 考察

これまでに述べたとおり，軟骨試料に圧縮荷重を付与すると，その直下において含水量は低下するので，圧縮荷重を付与しながらその部分の吸光度を測定すれば，時間と共に吸光度は減少し続けるはずである．にもかかわらず，今回軟骨試料において吸光度が時間と共に増加し続けた．この理由として，

(1) Indenter と試料との間への，自由水の滲出 (図 7.7)

(2) 接触領域の応力分布に由来する，測定対象内への自由水の流入 (図 7.8)

の 2 点が考えられる．また今回の実験では，近赤外線照射角度は試料に対して直角であったため，正反射光の影響なども考えられる．

7.4.1 自由水の滲出について

軟骨表面に肉眼では確認できない程度の範囲で自由水の滲出があったかどうかを確かめる方法として，ヨードーでんぷん反応の利用がある．しかし，indenter と軟骨表面の間にヨードーでんぷん溶液を塗布した場合としない場合とでは，明らかに力学環境が異なるため，現在この点に関する確認はできていない．

7.4.2 応力分布の影響について

仮説 2 に関する概略図を，図 7.8 に示す．Indenter と軟骨表面の接触領域 (直径 4.6mm) において，接触面は互いにほぼ平面であり，ここに圧縮荷重が作用した場合，軟骨試料の内部には図 7.8A に示すような応力分布^{1,2)}が生じ，応力の高い測定対象外領域から比較的応力の低い測定対象領域に自由水が流れ込み，その結果吸光度が増加したということが考えられる (7.8B)．また，indenter と試料は直角に接触するように設置したが，実際にはわずかな傾きがあったとすると，測定領域外である indenter の端部と測定対象領域である indenter 中心部の応力差はさらに大きくなり，測定対象領域に対する更なる自由水の流入が考えられる (図 7.9)．

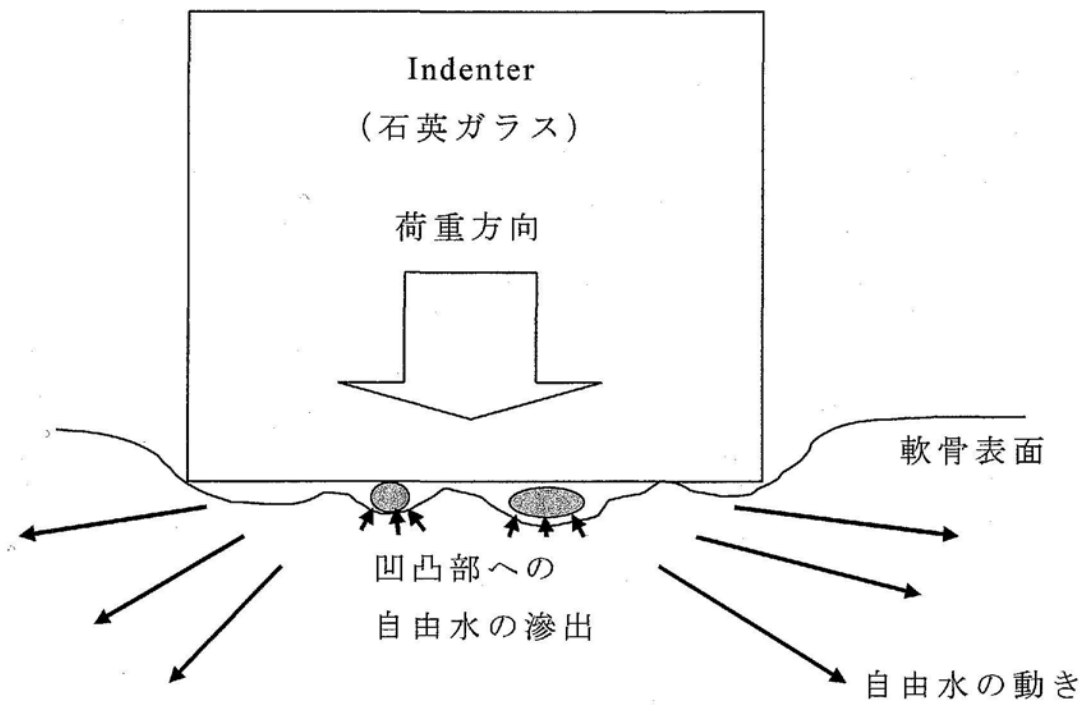


図 7.7 凹凸を有する試料表面に対する自由水の滲出

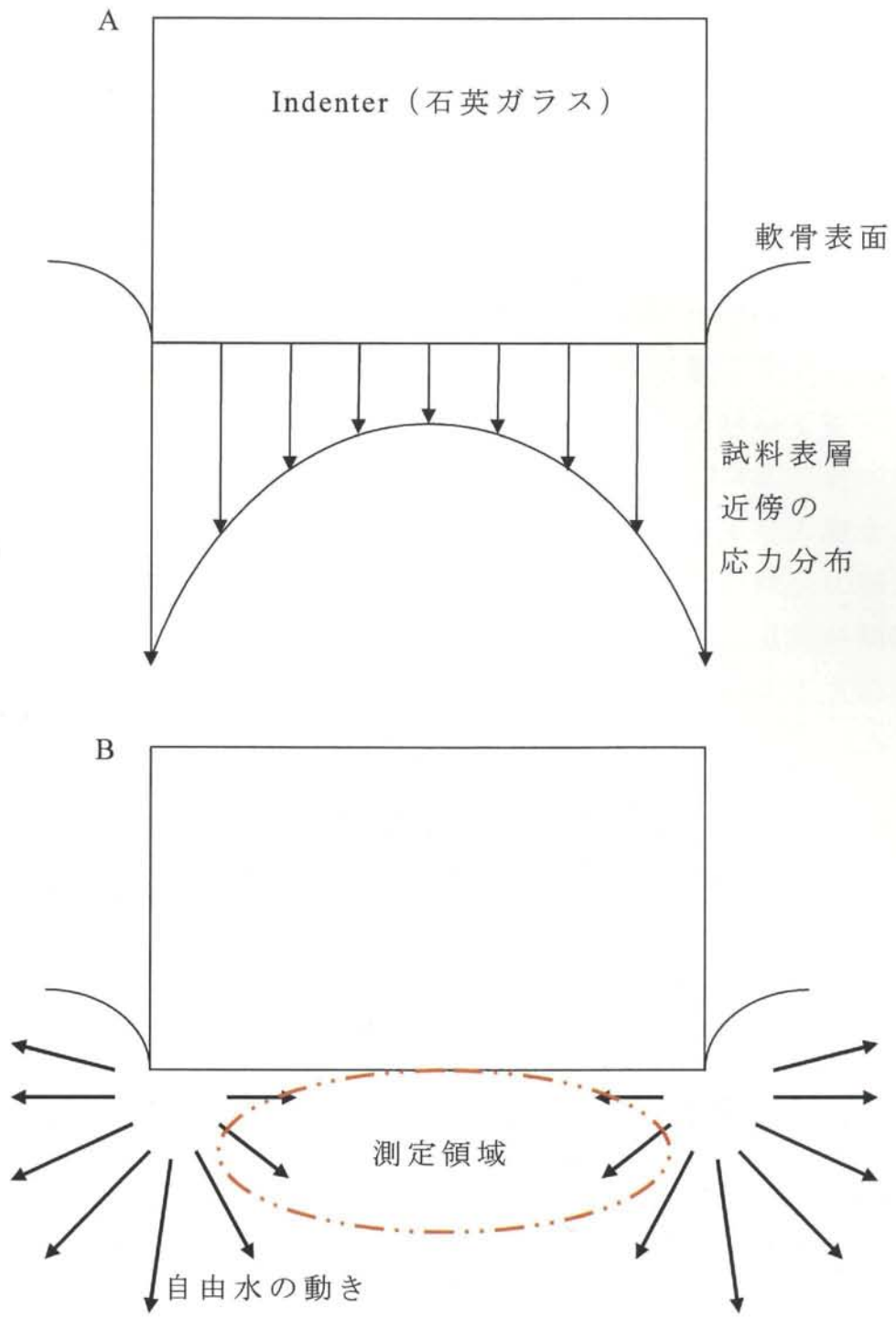


図 7.8 荷重付与による応力分布 (A) と
 応力分布に伴う自由水の動き (B)

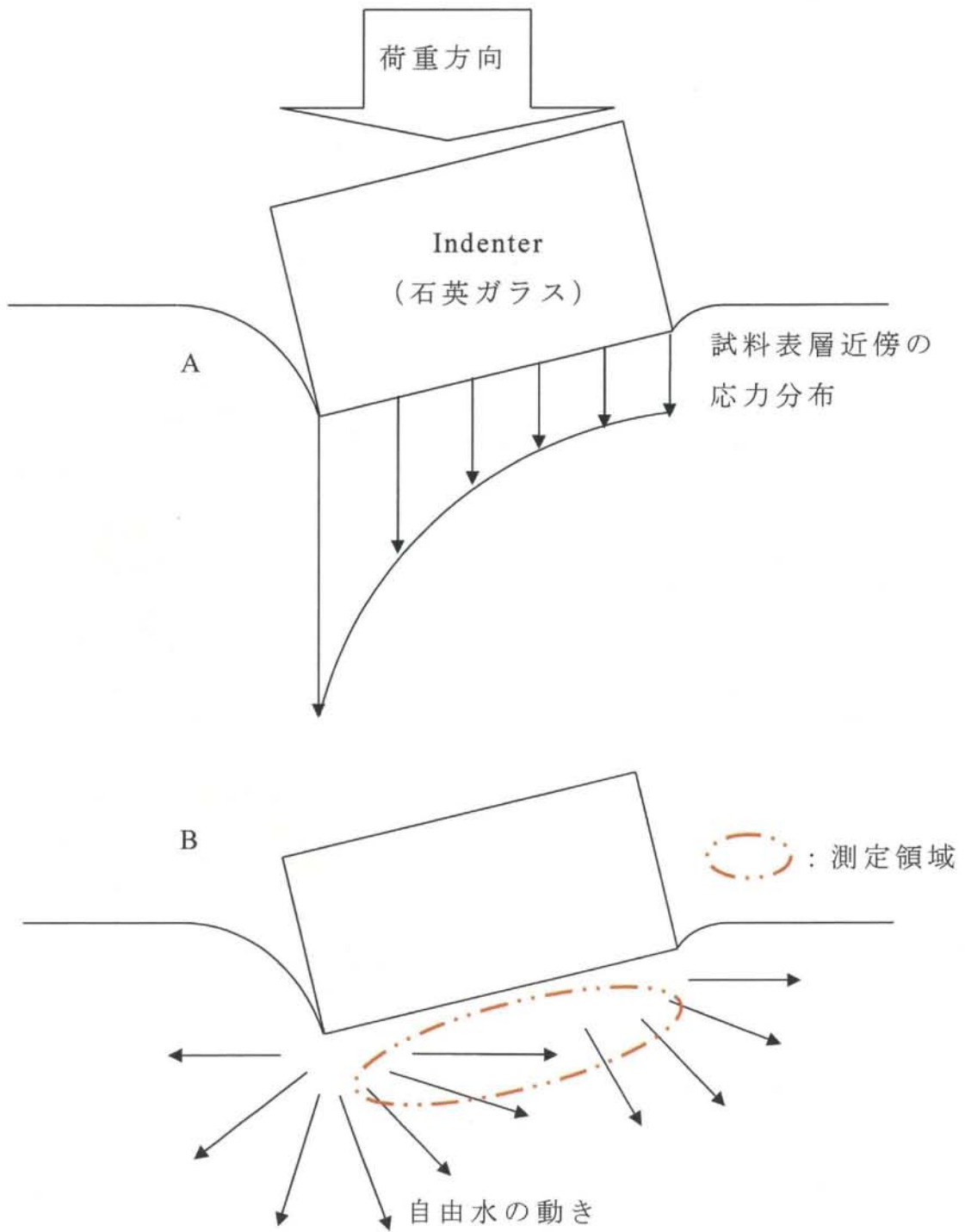


図 7.9 indenter に傾きがある場合の荷重付与による応力分布 (A) と応力分布に伴う自由水の動き (B)

7.4.3 高野豆腐での実験結果について

高野豆腐に対して圧縮荷重を付与しながら測定した吸光度変化は、図 7.5C を見るとわかるように、最初はともかく、時間が経つにつれて 7.2.1 で述べたように吸光度は減少する。これは、十分な水を含ませた高野豆腐を指で押してみてもわかるとおり、荷重の付与にしたがって、直下の自由水が周囲に流出するためであると考えられる。また、荷重を付与した直後に吸光度が増加しているのは、7.4.1 で述べたように、indenter と試料との間の自由水が一定量に達し、そこで吸光度の増加は終了し、あとは自由水の流出にしたがって吸光度が減少し続けたためと考えられる（図 7.10）。一方、7.4.2 で述べたように、測定対象領域の圧力が試料表面近傍に分布する応力差を上回り、自由水の流入量よりも流出量が上回り、吸光度が減少に転じたものとも考えられる（図 7.11）。あるいはこの両方の現象が同時に発生しているのかもしれないが、現在そのことを確かめる方法は確立できていない。

7.4.4 今後の課題

今回の実験結果より、ブタ肋軟骨、ヒト OA 軟骨、高野豆腐の 3 種の試料に関して得られた吸光度変化曲線を見ると、3 つの中で比較的透水率が低いと考えられるヒト OA 軟骨では吸光度は急激に変化し、また比較的透水率が高い高野豆腐では、長時間にわたって緩やかな吸光度の変化が続いた。これは各試料の透水率の違いに由来するものと考えられる。今後荷重や indenter 先端の形状などの条件を様々に変えて、引き続き実験を行う予定である。また、この実験系で試料表面の正反射光の影響を取り除く方法や装置の小型化についても、更なる検討が必要である。今後さらに試料の圧縮変位を同時に測定しながら実験を行うことで、関節軟骨の変性に伴って組織の物性が変化していく様子を捉えられるようになるものと考えられる。

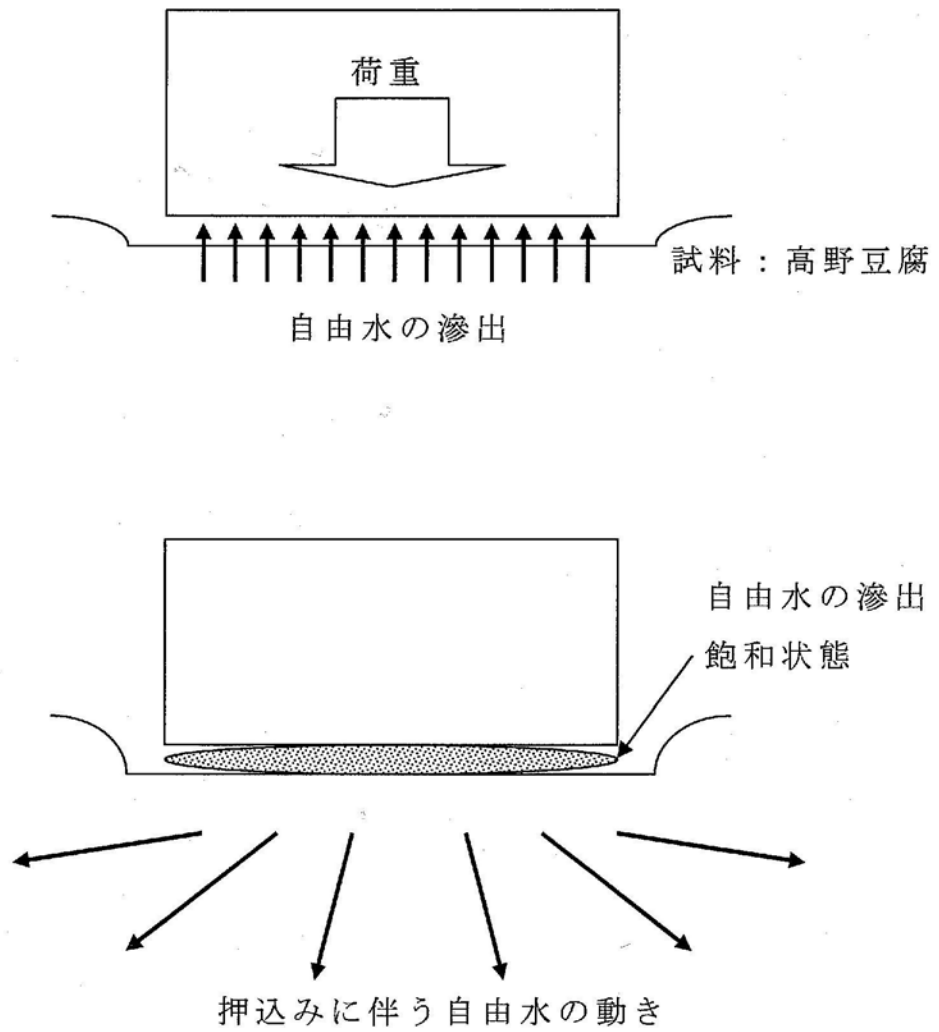


図 7.10 押し込みに伴う高野豆腐表面への自由水の滲出（上）と
滲出量が飽和した後の自由水の動き（下）

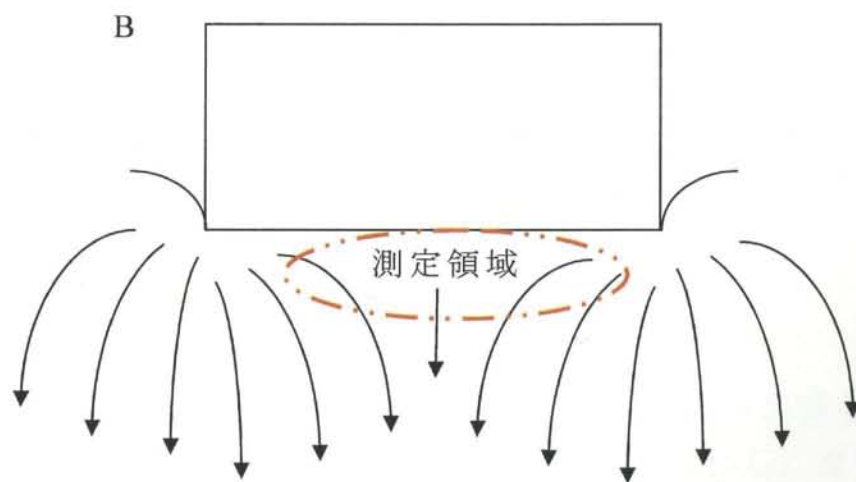
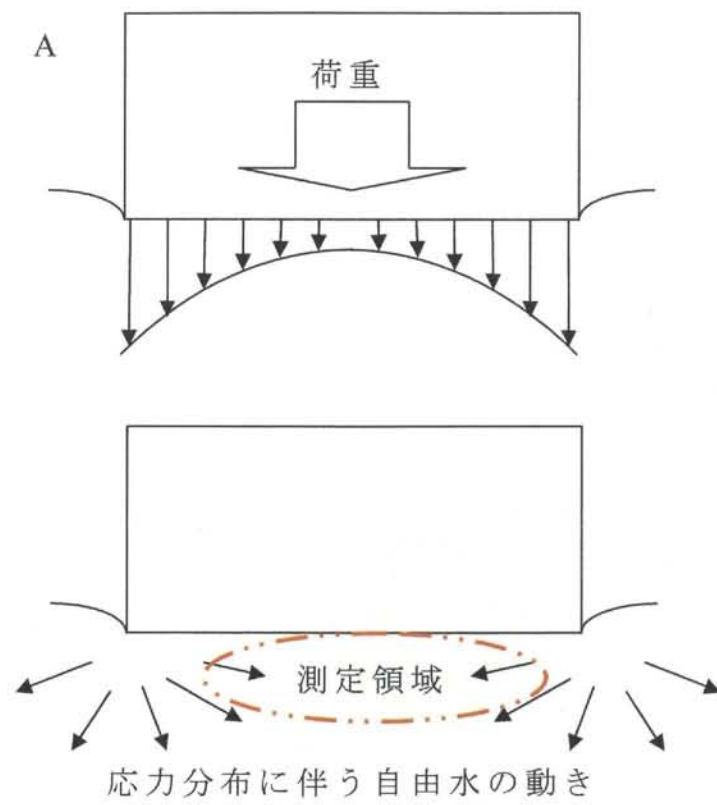


図 7.11 荷重付与開始直後の、応力分布に伴う自由水の動き (A) と、一定以上ひずんだ後の自由水の動き (B)

7.5 結言

本章では，ブタ肋軟骨，ヒト OA 関節軟骨，高野豆腐に対し，押し込み荷重付与時における試料の吸光度変化を測定した．その結果，以下の知見が得られた．

- 1．近赤外線水分計を用いて，静荷重を受ける軟骨試料内部の水分移動の様子を，リアルタイムで測定できることが確認された．
- 2．荷重を付与した瞬間から吸光度の変化が終了するまでの時間は，ブタ肋軟骨では 60 秒，ヒト OA 軟骨では 20 秒，高野豆腐では 230 秒であった．
- 3．静荷重を受ける試料内の吸光度が時間と共に変化する様子を捉えることが可能であること，また吸光度の変化が終了するまでの時間は，試料の透水率によって異なることが確認された．

第 8 章 結論

本報告書では，変形性関節症等の関節疾患に見られる軟骨変性の程度を，客観的かつ非破壊的に評価する方法について前章までに述べた。

変形性関節症に見られる変性関節軟骨は，正常関節軟骨組織に比べて透過性が高く，組織の内外を通して水分が出入りしやすい状態にある。本研究では近赤外線水分計を用いて，軟骨変性に伴う軟骨内の水分量変化の測定を試みた。

実験によって得られた結果は各章の結言に述べたが，以下に一連の研究を通して得られた結果を総括し，本報告書のまとめとしたい。

第 1 章から第 4 章では本研究の背景と目的，関節軟骨に対する従来の知見，および近赤外分光分析法の基礎について述べた。

第 5 章では，近赤外線水分計の至適なプローブ照射角度，および測定深度を調べた。そして，硝子軟骨および線維軟骨に対する押込み試験後の吸光度変化を測定した。これらの実験から，

1. 近赤外線水分計の軟骨に対する至適なプローブの照射角度は 10° である。したがって，実際の測定では， 10° 以下の範囲でできるだけ角度を大きくとる必要がある。
2. 正常関節軟骨について，水分量変化の正確な測定を行うためには 1.0mm 以上の試料厚さが必要である。
3. 近赤外線水分計で測定した押込み荷重除荷後の吸光度変化は，試料の透水率の違いを示す指標となりうる。しかし，吸光度の変化の仕方は測定領域周辺の状況に大きく影響される。

ということが明らかとなった。

第6章では、ブタ膝蓋骨軟骨、ブタ肋軟骨、およびヒト関節軟骨の試料を骨軟骨円柱とし、押し込み荷重除荷後は十分な水を含む脱脂綿で試料を包むことによって、測定領域周囲の状況を一定にして吸光度変化の測定を行った。その結果、以下の知見が得られた。

1. 透水率の高いブタ肋軟骨では、透水率が低いブタ膝蓋骨軟骨よりも吸光度の回復が迅速である。
2. 透水率の低い正常関節軟骨では、押し込み荷重除荷後も吸光度が減少し続けるという特徴的な吸光度回復曲線が得られる。
3. 測定対象領域周囲からの水の供給がなければ、吸光度は回復しない。
4. 押し込み荷重除荷後の吸光度最下点到達時間と組織の Mankin Score との間に、負の相関が認められた。また、吸光度最下点は、Mankin Score の値が大きい、すなわち変性の進んだ試料ほど短時間で出現し、Mankin Score の値が小さい、すなわち正常に近い試料ほど長時間で出現した。

第7章では、押し込み荷重付与時の吸光度変化を測定した。この実験から、以下のことが明らかとなった。

1. 押し込み荷重付与時における吸光度の時間変化の測定が可能であることが明らかになった。
2. 透水率が低い使用では吸光度変化は短時間で終了し、透水率が高い試料では吸光度の変化が長時間に及ぶことが確認された。しかし、軟骨に対する押し込み荷重付与時に吸光度が減少する様子を捕捉することはできなかった。

実験を通して得られたこれらの結果から、近赤外線水分計を用いて荷重を受ける軟骨組織の吸光度変化を測定する方法は、変形性関節症における関節軟骨の変性度を直接的、かつ直感的に評価できる

手法として使用出来る可能性が示された。

今後さらに議論を重ね、臨床応用が可能な方法および装置の開発に取り組む予定である。

参考文献

- 1) 寺山和雄, 片岡治, 他, 膝と大腿部の痛み, 整形外科 痛みへのアプローチ 2, 南江堂, p.178-p.191
- 2) Outerbridge, R.E., The etiology of chondromalacia patellae. *J.Bone Joint Surg. Br* 1961; 43:752-757
- 3) Mankin J.H.: Biomechanical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *The journal of bone and joint surgery* 52-A No3. 523-537, 1971.
- 4) Mow V. C., Proctor, C.S., et al.: Biomechanics of articular cartilage. In: Margareta Nordin, Victor H. Frankel (Ed.), *Basic biomechanics of the musculoskeletal system*, Lippincott Williams & Wilkins: 31-58, 1989.
- 5) 秋月章, 和田忠彦, 他: ヒト膝関節軟骨の組成および力学的特性の機能的意義 - Biphasic Indentation 試験からの考察 - . 整形外科バイオメカニクス, Vol.11 : 91-98, 1989.
- 6) 森浩二, 服部耕治, 他: 超音波を利用した関節軟骨の力学特性の測定. 日本臨床バイオメカニクス学会誌 ; 23 : 97-105, 2002.
- 7) 佐藤哲生, Maw, A.A., 他: 近赤外分光分析法によるゴマ種子の油分量・脂肪酸組成比の非破壊測定, *Biosci. Biotechnol.Biochem.* 66:2453-2458, 2002.
- 8) 赤外線成分計 MODEL IRM-V ハンドブック, 株式会社 CHINO
- 9) 片山容一, 酒谷薫: 臨床医のための近赤外分光法, 日本脳代謝モニタリング研究会編, 新興医学出版社, 1-3, 2002.
- 10) 田中誠之, 寺前紀夫: 赤外分光法, 日本分析化学会編, 共立出版株式会社 ; 62-80, 1993.
- 11) 秋月章, 武井経憲: 関節軟骨および関節液に対する物理的アプローチ, 整形外科 MOOK No.32. 38-47, 1984.
- 12) 村上敬宜: 弾性力学, 養賢堂, 161-162, 1985.

謝辞

本研究の遂行にあたっては新潟大学大学院自然科学研究科の濱田一成君（現 日本精機（株））ならびに同医歯学総合研究科の菊池達哉医師に多大なるご協力をいただいた。また、新潟大学工学部技術部の田村隆技術職員には実験装置の試作、改良にご尽力いただいた。さらに、平成16年度～平成18年度に新潟大学工学部機械システム工学科衝撃工学・バイオメカニクス研究室に所属した学部生諸氏には卒業研究として実験に協力いただいた。これらの方々に衷心より感謝申し上げる次第である。