

(第3号様式)

学位論文要旨

氏名 清松 悠

論文名 変形性関節症モデルにおける診断的応用を目的とした
第二次高調波発生 (SHG) イメージングによる
軟骨変性過程の定量的評価

学位論文要旨

背景】 変形性関節症 (OA: osteoarthritis) は、軟骨破壊や骨の異常増殖に特徴づけられる炎症性慢性疾患であり、その早期診断が実現すれば患者の QOL (quality of life) 向上につながることを期待される。しかしながら、従来のレントゲンや CT スキャンによる画像診断法では、軟骨組織を直接造影することはできず、MRI においても軟骨の変性を高感度で検出することは困難である。近年、疾患モデル動物を用いた病態解明や診断・治療法開発のための研究ツールとして、光イメージング技術が注目されている。特に、先端的光学技術を駆使した多光子励起顕微鏡を用いた非線形光学光イメージングを用いることにより、生体組織を傷つけずに高い空間分解能で細胞・組織の形態変化や生体分子の動態をリアルタイムかつ、多次元的に捉えることが可能である。なかでも、第二次高調波発生 (second harmonic generation: SHG) イメージングは、光と分子の非線形相互作用によって、生体組織中のコラーゲン分子を標識せずに無染色で描出できるため、軟骨基質中の II 型コラーゲンの分子構造や組成変化に着目して、軟骨変性の過程を定量的に評価することによって、OA の新たな診断指標となり得る。

【目的】 本研究では、病理組織学的な裏付けに基づいた軟骨組織の形態学的特徴や変性の程度を SHG イメージングと画像解析法および統計解析法によって定量化し、診断的応用を目指した多光子励起顕微鏡の基盤技術を確立する。

【方法】 全身の細胞核が蛍光で確認できる H2B-GFP マウスを用いて、靭帯切除により OA を誘発する動物モデル (変形性関節症モデル) を作成した。術後 8 週で、大腿骨を摘出し、その関節面

氏名 清松 悠

を多光子励起顕微鏡によって観察し、対照群との比較を行った。また、観察した軟骨組織は、ホルマリン固定後、脱灰組織切片を作成し、再び多光子励起顕微鏡による観察を行い、病理組織学的な検討を行った。さらに、これらの組織標本を多光子励起顕微鏡で観察し、次に若年マウスと老齢マウスの観察を行った。また、老齢マウス（雄 25 ヶ月齢）における老化に伴う軟骨変性の観察を行い、若齢マウス（雄 3 ヶ月齢）との比較を行った。

【結果】多光子励起顕微鏡を用いて、軟骨基質の SHG イメージと軟骨細胞における GFP の 2 光子励起蛍光イメージを取得して軟骨変性の評価を行ったところ、定量的画像解析によって関節軟骨表面の不整像、軟骨基質の微細な構造破壊、シグナル強度分布の不均一化、軟骨細胞数の有意な減少が明らかとなった。各々の検体の画像視野中の SHG シグナルの分布を標準偏差 (standard deviation: SD) によって定量化したところ、SD が高い値を示す群と低い値を示す群に分類された。一方で、病理組織学的には、SD 低値群では、軟骨層の菲薄化、硝子軟骨の異所性増生が見られ、SD 高値群では繊維軟骨増生や軟骨下骨の露出が認められ、SD 値と形態学的特徴の相関が確認された。また、SD をシグナル平均強度で補正した変動係数 (coefficient of variations: CV) について、統計学的な比較を行ったところ SD と同様の傾向を示し、対照群と OA 群で有意差が見られた。同様に、自然発症の変形性関節症を模した老齢マウスにおいても軟骨変性の評価を行った結果、軟骨基質の SHG イメージにおいて、12 検体中 4 検体で、OA モデルと同様の形態学的な変化を認め、SD および CV は高値を示した。若齢マウスでは SD、CV とともにほぼ一定であった。

【結論】多光子励起顕微鏡を用いた SHG イメージングによって、実際のヒト OA の病態に比較的近い動物 OA モデルの解析を行い、病理組織学的な所見を反映した軟骨基質の形態変化を定量的に評価することに成功した。本研究成果は、変形性関節症によって誘発される軟骨変性の過程を生体組織中で 3 次元かつリアルタイムで可視化できるだけでなく、SHG シグナルの分布を定量的に示す統計量が診断指標となりうることを強く示唆している。今後は、OA における定量的 SHG イメージング技術の診断的応用を実現するために、in vivo での計測を試みるとともに、関節内視鏡などの診断機器への搭載も検討し、生体中で軟骨基質中のコラーゲン分子の構造・組成の変化を無染色で可視化することで、OA の病態解明や軟骨再生治療の研究に応用していく。

キーワード (3~5)	変形性関節症 軟骨 2光子励起顕微鏡 SHG
-------------	---------------------------------