

ジニアリングに求められている。

ティッシュエンジニアリングにおいては、コラーゲン、ヒアルロン酸などの生体組織由来のマトリックスが用いられているが、これらのマトリックスは細胞膜のインテグリンやレセプターと相互作用するサイトを有しており、細胞にシグナルを送ることが可能であるが、機械的強度が十分でないという欠点をもつ。一方、ポリ乳酸(PLLA)、ポリグルコール酸(PGA)、そしてその共重合体であるPLGAに代表される生分解性高分子もティッシュエンジニアリングにおいて重要な材料である。

この生分解性と組織形成とを時間軸方向にマッチングさせることは、ティッシュエンジニアリングにおける技術目標の一つである。これらの生分解性高分子は機械的強度があり scaffold のフレームとしては適当であるが、概して疎水性であり、細胞と相互作用するサイトがないという欠点がある。

そこで、生体材料と生分解性高分子のそれぞれの欠点を補完し、長所を共有する一つの解決法として、両者のハイブリッド化が進められた。すなわち、オープンポア有するPLGAの多孔体のポアの内部にコラーゲンマイクロ

スポンジを複合化させる方法<sup>11-13)</sup>や、PLGAメッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化させる方法<sup>14)</sup>、さらに多孔質アパタイトマイクロビーズと複合化させる方法<sup>15)</sup>、軟骨細胞を内包化したコラーゲングルと複合化させる方法<sup>16)</sup>などである。このように、生分解性高分子のメッシュや多孔質体のフレームとコラーゲンマイクロスポンジなどの生体高分子をハイブリッド化させることにより、軟骨細胞の播種性や接着性が向上するだけでなく、ひいては軟骨様組織の形成能をも向上させることが可能となる。図2は、PLGA

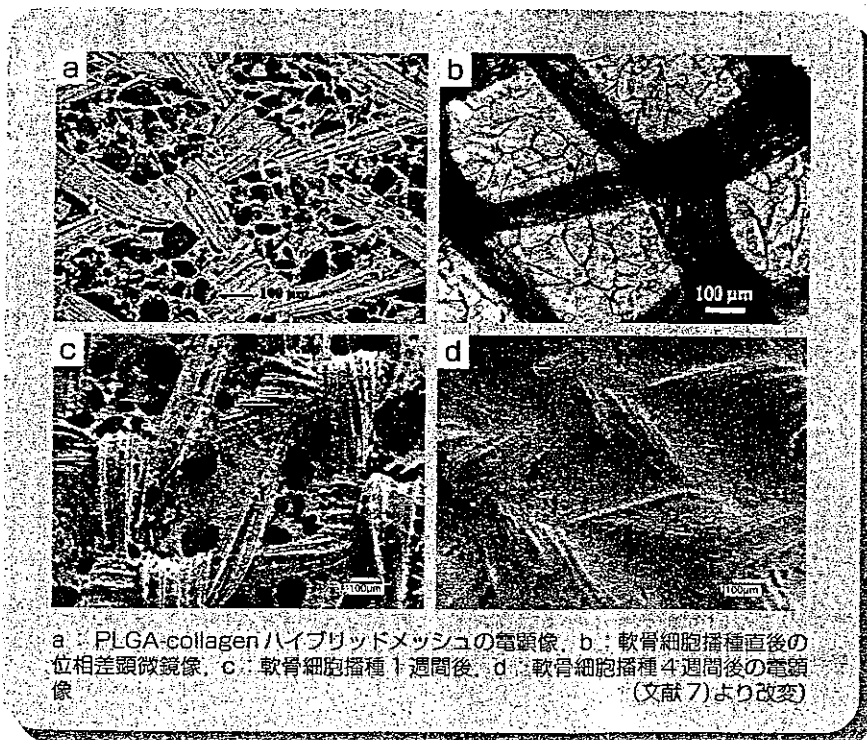


図2-1 PLGA-collagen ハイブリッドメッシュとウシ関節軟骨細胞播種

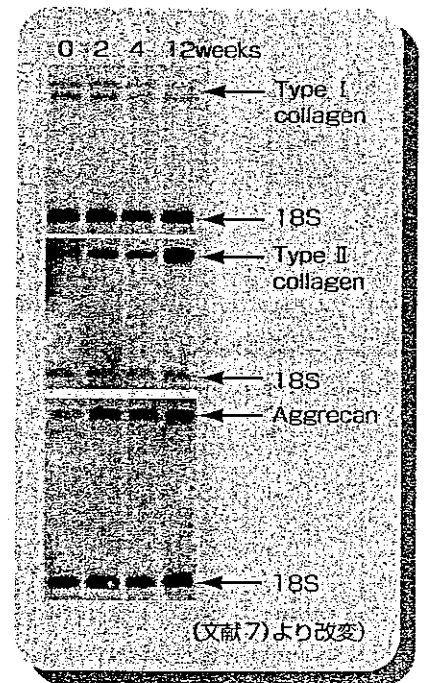


図2-2 PLGA-collagen ハイブリッドメッシュに2 継代後のウシ関節軟骨細胞を播種し、*in vitro* 培養したときの遺伝子発現の Northern Blot 解析(0, 2, 4, 12 週)

メッシュにコラーゲンマイクロスポンジを複合化させた三次元培養担体に、2継代目のウシ関節軟骨細胞を播種し長期培養したものである。4週ほどで培養担体がマトリックスで被われる。マトリックスに埋め込まれた軟骨細胞はround shapeを回復するだけでなく、II型コラーゲンおよびアグレカンの発現が増加し、I型コラーゲンの発現が減少する。このことは、このような三次元培養担体が組織形成と同期して、脱分化した軟骨細胞を再分化させる機能をもつ可能性を示していると考えられる<sup>7)</sup>。軟骨組織は前述のようにシンプルな組織であり、このような発想の三次元培養担体を用いても組織形成と分化制御がある範囲で可能である。さらに、より複雑な組織においても、未分化細胞の分化制御と組織形成を、マトリックスからのシグナルと担体の三次元構造から実現できる可能性があると考えられる<sup>8)9)</sup>。

### 物理的刺激による細胞分化、組織形成コントロールの試み

生体内ではさまざまな物理的刺激が生理的な条件下で組織・細胞に負荷されている。たとえば、大腿骨には歩行などにより圧縮・引張応力が負荷されており、骨組織の微小変形や骨組織内の微小な体液移動による流動電位が生じている。また、血管系には血流によるすり応力が血管内皮細胞に、拍動によるストレッチが血管平滑筋細胞、血管内皮細胞に負荷されている。した

がって、このような生理的な刺激をシミュレーションして、生体組織を生体外で三次元再構築しようとする研究が始まっており、たとえば培養液の灌流を制御することにより、再生血管にすり応力やストレッチを与えながら再構築する研究が進められている。一方で、軟骨組織の再構築のために軟骨組織に生理的に負荷されている静水圧を負荷する研究が行われている。ここでは後者に絞って、軟骨組織形成と静水圧負荷に関して概説する。

軟骨組織(ここでは股関節や膝関節における関節軟骨組織)は大腿骨と同様、歩行などにより負荷を受けている。軟骨組織は高いスティフネスを示す硬い組織であることに加え、プロテオグリカンなど荷電性高分子により水分子が保持されており、高い含水率を保っている。そのため、加重は主として静水圧という物理量として軟骨細胞に負荷されると考えられている。関節軟骨は互いに面接触ではなく線接触しているため、生理的に負荷されている静水圧は予想以上に高く、実測値によれば歩行時には3~4 MPaも負荷されている。したがって、関節軟骨細胞の場合には静水圧が軟骨細胞の機能維持に積極的にかかわっているのではないかと、この考えのもと研究が進められている。

静水圧負荷方法は加圧方式により次の三つに分けることができる。まず、気相を介しての加圧方式である。気相を介しての方法では、圧力が高くなった場合、溶存ガス濃度の変化が問題になると考えられる。次に、液相を介し

ての加圧方式である。これまでの研究では、閉鎖系の実験系が主に行われ、短期培養によって評価されていた。軟骨組織は、軟骨細胞自身から産生され、蓄積される細胞外マトリックスに関して、他の組織に比べて著しい特徴がある。生体を模倣した条件下で静水圧の影響をみるためには細胞外マトリックスの蓄積は無視できず、その蓄積を考慮した培養システムを開発することから必要であると考えられる。そこで、静水圧の実質的な影響をみるという目的で、液相を介して加圧ができ、生理的な圧力条件をカバーし、さらに細胞間物質の蓄積が行われる期間、培養を可能とするために培養液を灌流させることができる機能を兼ね備えたシステムが必要である<sup>10)11)</sup>。

軟骨細胞が静水圧にตอบสนองするかどうかも含めて、そのメカニズムは解明されていない。しかしながら、コラーゲンスポンジに播種した軟骨細胞に間欠的に静水圧を負荷しながら三次元培養すると、グリコサミノグリカンの産生が上昇し、軟骨様組織の再構築が促進される<sup>12)</sup>(図3)。このように、静水圧負荷は生体外で軟骨細胞を培養し軟骨組織を再生するための一つの重要なファクターとして捉えるべきであると考えられる。さらに敷衍して、血管の再構築を含め生理的に負荷されている物理的刺激を、組織の再構築さらには細胞の分化制御のための一つの手段として適用することは意味があると考えられる。培養フラスコによる旧来からのシンプルな培養法から、よりティッシュ

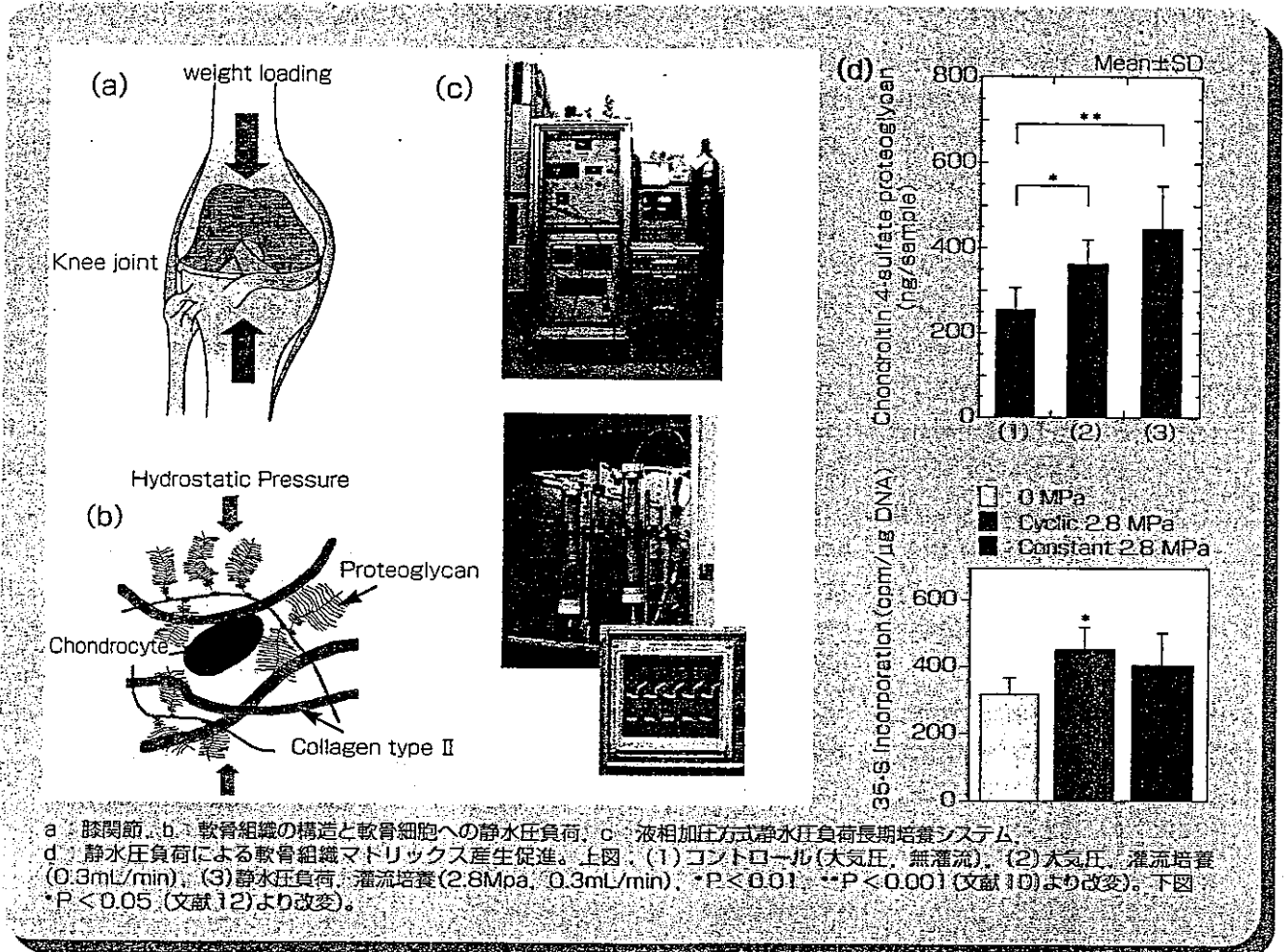


図3 軟骨組織マトリックス産生に及ぼす静水圧負荷の効果

エンジニアリングとしての目的を指向した組織培養法は、軟骨再生にとどまらず、今後生体外における組織再生にとって必要不可欠な重要な基盤技術になるものと考えられる。

### 細胞凝集による細胞分化、 組織形成コントロール の試み

細胞凝集というステップは、たとえ

ば軟骨形成など発生の段階でしばしばみられる現象であり、このような細胞-細胞相互作用は細胞の分化、組織形成にある役割を果たしていると考えられている。In vitroにおいても細胞凝集体(スフェロイド)の形成は、たとえば肝細胞やある種の神経細胞では、それらの細胞の機能維持、分化制御にとって重要な意味をもつことが知られている。これらのスフェロイドは、材

料表面処理または旋回流れなど能動的な流体流れの場で形成させることができるが、この方法は初代培養細胞を含め通常の培養細胞にも適用可能である。たとえば、線維芽細胞は酸素要求性、栄養要求性が高い細胞であるが、適切な旋回流れの場合において中心部の細胞が壊死することのない適当な径をもったスフェロイドを形成させることができる<sup>11)</sup>。スフェロイドの形成条件

は単に流体力学的な場の作用のみならず、細胞-細胞相互作用の強さによって大きく左右され、これらの相互作用は生化学的的刺激によって変化し、形成条件も異なることがわかっている<sup>14)</sup>。これらのスフェロイドは、たとえば培養皮膚に適用可能である。培養皮膚は細胞とマトリックスのみで形成させる方法がある一方で、その機械的強度やハンドリングの面から生分解性高分子を素材とするメッシュなどを培養担体として用いる場合がある。このケースにスフェロイドは適用可能であり、数百ミクロン程度の隙間をもつメッシュにはこのスフェロイドはトラップされ、迅速な真皮組織の形成が可能である<sup>15)</sup>。

軟骨細胞はその発生段階で細胞凝集がみられ、その細胞凝集が軟骨細胞分化に大きな役割を果たしていると考えられている。また、成熟した軟骨細胞

は *in vitro* 培養系では脱分化しやすく、その脱分化を抑制し、軟骨細胞としての機能を維持するためにも細胞凝集が必要であると考えられている。そこで、軟骨細胞のサスペンションを遠心することにより細胞凝集体を作製し、上述の機能を実現する方法が研究されている。これはペレット培養と呼ばれ、軟骨細胞の分化維持のみならず、間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化の必須ステップとして用いる研究も行われている。しかしながら、この方法の欠点は1本の遠心管で1つのペレットしか作製できないため、基礎研究のツールとしては有用であるが、臨床研究としては非現実的な側面をもっている。そこで、ペレット培養の利点を備え、欠点を補う方法として、同じく旋回培養法によるスフェロイド形成を試みたところ、線維芽細胞と同様、軟骨細胞においても可能であることが示された<sup>16)</sup>。

このスフェロイド形成は間葉系幹細胞でも可能であることが確認されている。したがって、ペレット培養と同等の機能、すなわち軟骨細胞の分化維持、未分化間葉系細胞の軟骨細胞への分化制御機能を備えていると考えられる。また、このスフェロイドは分化制御のインキュベータとしての役割を果たすだけでなく、組織形成のためのエレメントとして、すなわちマイクロ組織エレメントとして組織再構築にそのまま適用可能であるという点で、多くの組織の再構築に可能性が開かれていると考えられる(図4)。もとより、組織形成には微小血管網の同時形成が必須であるが、このような壊死を免れたぎりぎりのサイズでのマイクロ組織エレメントを出発材料とする方法は一つの可能性であると考えられる。

### おわりに

冒頭で述べたように、cell transplantationではなく tissue transplantation, tissue regenerationを実現させるためには、乗り越えなくてはならない巨大な障壁がティッシュエンジニアリングには立ちだかっている。このような状況の中で、biochemicalな視点からのアプローチが細胞分化制御、組織形成制御に大きな役割を果たしていることはもとより、本稿で取り上げた scaffoldに代表される materialからのアプローチも同様に重要な役割を果たすと考えられる。是非、この後者からの

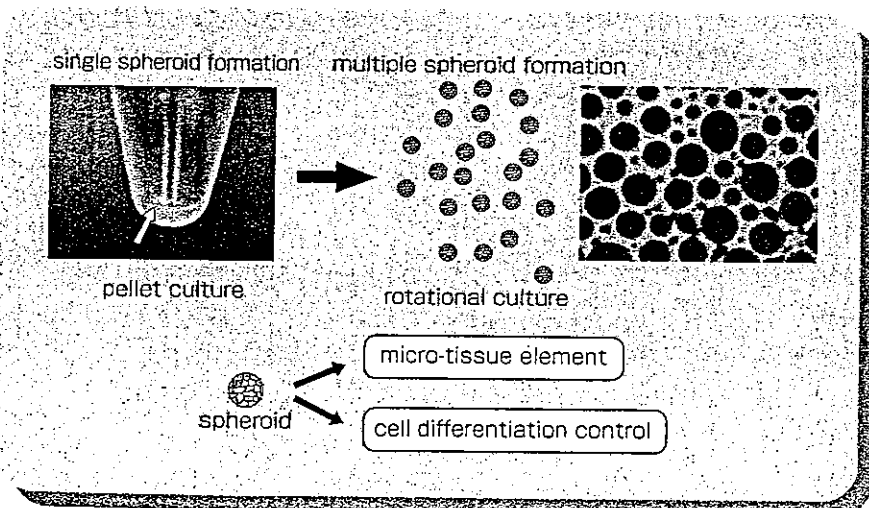


図4 細胞分化制御、マイクロ組織エレメント形成のための細胞凝集体(スフェロイド)の同時多形成(旋回流れによる)(→巻頭 Color Gravure 参照)

アプローチを推進する研究者が多く再生医療研究に参加し、医と工の連携のみならず、biochemicalなアプローチに匹敵する工学的なアプローチを実現させ、両輪の一輪としての役割を果たし、越えがたき峰を越えていくことを期待したい。

## ●文 献

- 1) Chen G, Ushida T, Tateishi T : Fabrication of PLGA-Collagen Hybrid Sponge. *Chem Lett* : 561-562, 1999
- 2) Chen G, Ushida T, Tateishi T : A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. *J Biomed Mater Res* 51(2) : 273-279, 2000
- 3) Chen G, Ushida T, Tateishi T : Hybrid Biomaterials for Tissue Engineering ; A Preparative Method for PLA or PLGA-Collagen. *Adv Mater* 12(6) : 455-457, 2000
- 4) Chen G, Ushida T, Tateishi T : A Hybrid Network of Synthetic Polymer Mesh and Collagen Sponge. *J Chem Soc Chem Comm* 16 : 1505-1506, 2000
- 5) Chen G, Ushida T, Tateishi T : Poly (DL-lactic-co-glycolic acid) Sponge Hybridized with Collagen Microsponges and Deposited Apatite Particles. *J Biomed Mater Res* 57 : 8-14, 2001
- 6) Ushida T, Furukawa K, Toita K, et al : Three dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds. *Cell Transplant* 11(5) : 489-494, 2002
- 7) Chen G, Sato T, Ushida T, et al : Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured *in vitro* in a PLGA-collagen hybrid mesh. *FEBS Lett* 542 : 95-99, 2003
- 8) Furukawa K, Ushida T, Toita K, et al : Hybrid of gel-cultured smooth muscle cells with PLLA sponge as a scaffold towards blood vessel regeneration. *Cell Transplant* 11(5) : 475-480, 2002
- 9) Ochi K, Chen G, Ushida T, et al : Use of isolated Mature Osteoblasts in Abundance Acts as Desired-Shaped Bone Regeneration in Combination with a Modified Poly-DL-Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA)-Collagen Sponge. *J Cell Physiol* 194 : 45-53, 2002
- 10) Murata T, Ushida T, Mizuno S, et al : Proteoglycan synthesis by chondrocytes cultured under hydrostatic pressure and perfusion. *Material Science & Engineering C6* : 297-300, 1998
- 11) Mizuno S, Ushida T, Tateishi T, et al : Effects of physical stimulation on chondrogenesis *in vitro*. *Material Science & Engineering C6* : 301-306, 1998
- 12) Mizuno S, Tateishi T, Ushida T, et al : Hydrostatic Fluid Pressure Enhances Matrix Synthesis and Accumulation by Bovine Chondrocytes in Three-dimensional Culture. *J Cell Physiol* 193 : 319-327, 2002
- 13) Furukawa K, Ushida T, Sakai Y, et al : Formation of Human Fibroblast Aggregates (Spheroids) by Rotational Culture. *Cell Transplant* 10 : 441-445, 2001
- 14) Furukawa K, Ushida T, Kunii K, et al : Effects of hormone and growth factor on formation of fibroblast-aggregates for tissue-engineered skin. *Materials and Science & Engineering C17* (1-2) : 59-62, 2001
- 15) Furukawa K, Ushida T, Sakai Y, et al : Tissue-engineered skin using aggregates of normal human skin fibroblasts and biodegradable material. *J Artif Organs* 4(4) : 353-356, 2001
- 16) Furukawa K, Suenaga H, Toita K, et al : Rapid and Large-Scale Formation of Chondrocytes Aggregates by Rotational Culture. *Cell Transplant* 12(5) : 475-479, 2003



## The development of a three-dimensional $T_1$ image calculation program in proportion to the DICOM data of any marketing clinical MRI systems

Hiroo Ikehira<sup>a,b,\*</sup>, Atsuya Watanabe<sup>a,b</sup>, Takayuki Obata<sup>a</sup>, Hiroshi Tsujii<sup>c</sup>, Kenneth M. Jones<sup>c</sup>, Li Shun<sup>c</sup>, Hideshige Moriya<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Medical Imaging, Informative Molecular Section, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan

<sup>b</sup>Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

<sup>c</sup>ITTC Co. Ltd., Kobe, Japan

Received 25 October 2003; accepted 28 January 2004

### Abstract

Contrast media such as gadolinium-diethylene-triamine pentaacetic acid (Gd-DTPA) is used for MRI. Recently there have been some reports about diagnosis using contrast media for the MRI  $T_1$  image for the quantitative evaluation of articular cartilage degeneration. This may be a useful method to evaluate the lesion of the articular cartilage or to confirm therapeutic progress. Whether or not contrast is used, the use of the calculated  $T_1$  image is effective for the quantitative evaluation of the degeneration of knee joint cartilage. However, our system copes with the format of every MRI image even if software of the calculated  $T_1$  image isn't often prepared in the commercial MRI device. So, we developed general purpose image data processing software that can be processed on the preexisting three-dimensional image data processing system. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** MRI; Calculated  $T_1$  image; Three-dimensional image; Cartilage

### 1. Introduction

There have been some recent reports about diagnostic trials using the effect of MRI contrast media with  $T_1$  image for the quantitative diagnosis of articular cartilage degeneration. The effect of contrast media to visualize the degeneration of articular cartilage is strong, and confirms that the  $T_1$  value is very useful for the clinical evaluation of the degree of lesion [1–4]. If we want to make this diagnostic procedure a common clinical diagnostic method, we must evaluate a quantitative  $T_1$  image for articular cartilage degeneration after making a three-dimensional  $T_1$  image.

However, even if data on the kind of clinical MRI device being used at present are used, a general-purpose three-dimensional  $T_1$  calculation image data processing system doesn't exist. Currently, researchers themselves may make individually necessary image data processing software by

using MTLAB to evaluate their research. This diagnostic method should be remarkably safer than invasive joint examination like arthroscopy, and we believe that it should be an effective evaluation method for the clinical examination. Therefore, we report that we developed a system that can make a three-dimensional  $T_1$  calculation image using the DICOM data from any kind of commercialized MRI device.

### 2. Protocol for $T_1$ calculated image

An MRI imaging protocol for the  $T_1$  measurement was not a usual two-dimensional image, but it used two dimensions multi-slice imaging. The parameter of the image is as follows:

All studies were performed using a commercial MRI device Philips Gyroscan Intera 1.5T, and an imaging protocol in the following way.

The imaging sequence is a multi-slice (seven slices) sagittal inversion recovery (IR) turbo spin echo  $T_1$  series, 1800-ms repetition time (TR) and 35-ms echo time (TE). For  $T_1$  series the inversion times (TI) were 50, 100, 200,

\* Corresponding author. Tel.: +81-0-43-206-4067; fax: +81-0-43-206-3276.

E-mail address: ikehira@nirs.go.jp (H. Ikehira).

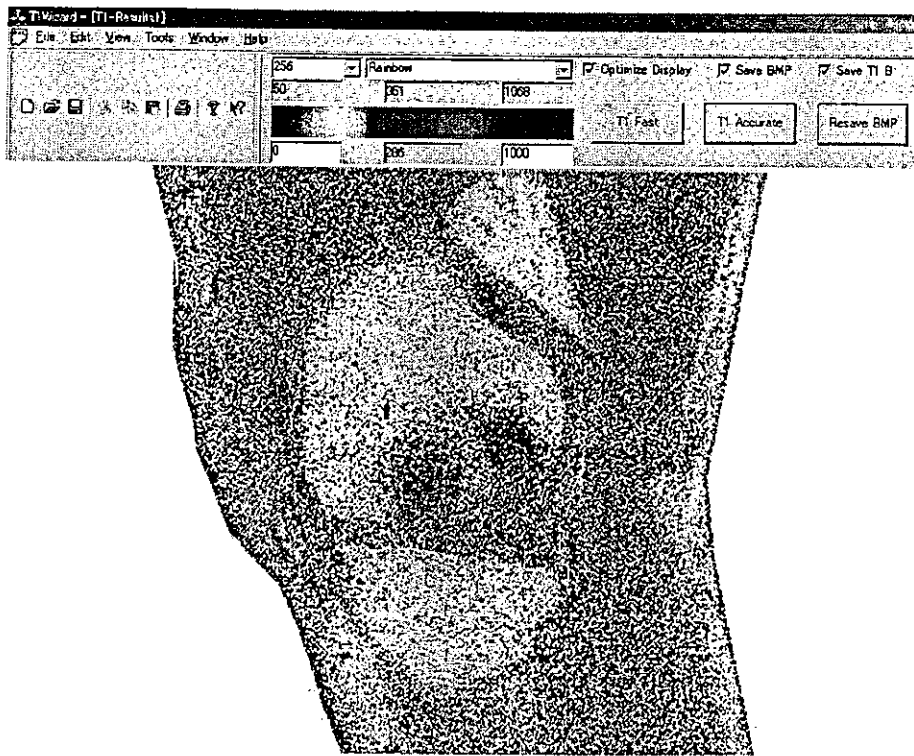


Fig. 1. The calculated  $T_1$  image of the knee joint analyzed by our software.

400, 800, 1200 and 1600 ms. Field-of-view (FOV) was 150 mm  $\times$  150 mm. Thickness of the slice was 3.0 mm, imaging matrix was 512  $\times$  512 and echo factor was 7. Total scan time was 40 min. The set of  $T_1$  images was transferred to PC (Windows 2000).  $T_1$  maps were calculated with our own software ( $T_1$ -Wizard, ITTC, Kobe, Japan). We used a least-square method curve-fitting to get  $T_1$ -calculated images using a three-parameter exponential fit. Then other calculation parameters were as follows:

$$SI = M_0(1 - 2Ae^{-TR/T_1} + e^{-TR/T_1}) \quad (3)$$

There is no limitation for number of pixels, but our images

are always 512  $\times$  512 and the square summation  $e$  is less than certain value; then the current value is 0.001 in this case. Applicable operating systems should be Windows OS, NT4.0, 2000, XP.

### 3. Three-dimensional color display of $T_1$ -calculated image

We show the calculated  $T_1$  image of the knee joint analyzed by our software. This  $T_1$  image shows beautiful  $T_1$  distribution pattern using a rainbow color map.  $T_1$  values

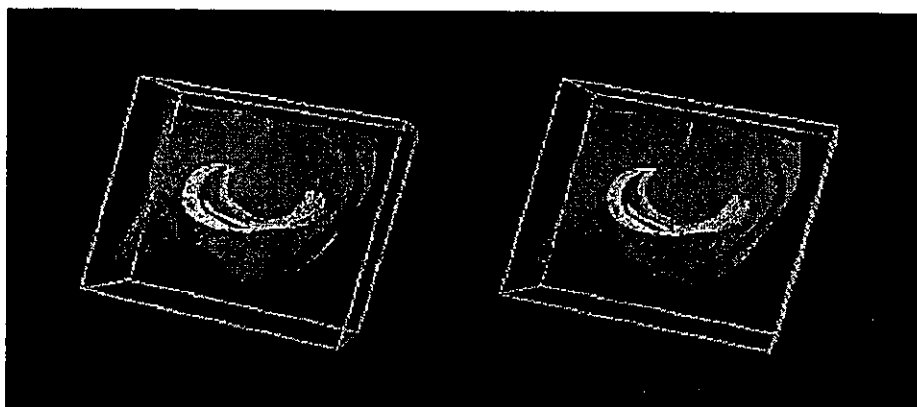


Fig. 2. Stereo image views of the knee joint cartilage with fixed three dimensions using VGStudio.

are indicated in ms. The upper values are the containing range of  $T_1$  values in this image and lower values are the indicated imaging scale in Fig. 1.

Figure 2 shows the three-dimensional  $T_1$  image of the knee joint cartilage in three dimensions with VGStudio (Volume Graphics, Heidelberg, Germany). These images look three-dimensional by using a stereo projection.

#### 4. Summary and discussion

It becomes easier to diagnose the spatial distribution of degenerated cartilage and the progress conditions of the disease by making three-dimensional calculated  $T_1$  images.

This time, we developed the software with which we can calculate three-dimensional  $T_1$  images from DICOM images that were supplied by any kind of MRI device. Furthermore, this system is thought to be the analytic system that has the possibility of application in other fields, because it can be applied to the analysis of drug delivery system (DDS) and the diagnosis of metabolic disorder and so on by using a suitable algorithm.

#### 5. Order of software

For our developed  $T_1$  imaging software, please contact Dr. Ikehira [ikehira@nirs.go.jp](mailto:ikehira@nirs.go.jp); we would like to distribute this software free for the use of a non-profit experiment. Please contact Volume Graphics or ITTC in Japan directly regarding the commercially available three-dimensional image analysis software, VGStudio.

#### References

- [1] Nieminen MT, Rieppo J, Silvennoinen J, et al. Spatial assessment of articular cartilage proteoglycans with Gd-DTPA-enhanced T1 imaging. *Magn Reson Med* 2002;48:640–8.
- [2] Tiderius CJ, Olsson LE, de Verdier H, Leander P, Ekberg O, Dahlberg L. Gd-DTPA<sup>2-</sup>-enhanced MRI of femoral knee cartilage: a dose-response study in healthy volunteers. *Magn Reson Med* 2001;46:1067–71.
- [3] Burstein D, Velyvis J, Scott KT, et al. Protocol issues for delayed Gd(DTPA)<sup>2-</sup>-enhanced MRI (dGEMRIC) for clinical evaluation of articular cartilage. *Magn Reson Med* 2001;45:36–41.
- [4] Bashir A, Grat ML, Hartke J, Burstein D. Nondestructive imaging of human cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI. *Magn Reson Med* 1999;41:857–65.



## 特集

## 変形性関節症の病態と治療—最近の進歩—

# 変形性膝関節症に対する 鏡視下手術\*—鏡視下後 内側解離術の適応と成績—

佐 粧 孝 久\*\*  
和 田 佑 一\*\*  
守 屋 秀 繁\*\*

Key Words : osteoarthritis, arthroscopy, MRI, subchondral bone

## はじめに

変形性膝関節症(OA)に対する外科的治療法として、①鏡視下デブリードマン、②高位脛骨骨切り術、③人工膝関節置換術、などがあげられる。①や②の治療法は年齢が60歳以下の患者で術後成績が良いとするむきもある<sup>1)2)</sup>。しかし高齢社会の到来により、手術対象となる患者の年齢も高くなってきている。このことを考えると、OAに対する手術的な治療法は今や人工膝関節置換術(TKA)が主役といえよう。手術手技の確立、バイオメカニクスからみた人工関節自体のデザイン、材料の研究など多方面からの知識、技術が統合され、TKAは発展し続けている。手術自体にもロボットが使われるようになりつつあり、より正確な骨切りに基づく精密な手術が実現しつつある。一方でTKAはいわゆるメジャーサージェリーであり、一般的に高齢であることが多い患者に加わる侵襲は大きなものである。OAの治療法として、保存療法に限界が生じたときの選択肢がTKAのみであるとする、手術を受ける側からみてもまた手術を施行する側からみても手術に踏み切る決断をするのは、客観的な手術適応の指標が曖昧な現状においては英断を要

するものであるというのは過言であろうか。TKAに限った問題ではないが、こうした手術には血栓症や、感染といった問題が常につきまとうものであり、またTKA自体にも耐久性、再置換術、骨折などの問題点がある。さらには本来の関節機能に比較すると可動域の獲得が不十分であることや、耐久性を増すためには日常生活動作を制限すべきであると考えられていることなどまだまだ克服されるべき課題も存在している。こうした要素を考慮すると手術に踏み切るかどうかの判断は易しいものではない。保存的療法とTKAの中間に位置するような治療法があるとすると治療の選択肢を広げる意味から患者側にも膝関節外科医側にも意義あるものとなるであろう。このような位置づけとなる得るかと思われる鏡視下デブリードマンは変形性膝関節症に対する治療法としては広く普及している手術ではあるが、手技が確立していないこと、適応が曖昧であることなどから、真の意味での有効性は常に議論的である。Moseleyらによる鏡視下デブリードマンにはプラセボ効果しかないという研究は衝撃的でしたらあったのは記憶に新しいことである<sup>3)</sup>。これに対抗するかのごとく鏡視下デブリードマンの有効性を論じた発表がいくつかなされたが<sup>4)5)</sup>、鏡視下手術は初期のOAには有用であるが、進行した症例では有効性が低下するというのが共通した事実のようであり、以前

\* Arthroscopic procedure for osteoarthritic knee — Indication and outcome of postero-medial release —.

\*\* Takahisa SASHO, M.D., Yuichi WADA, M.D. & Hideshige MORIYA, M.D.: 千葉大学医学部整形外科(☎260-8670 千葉市中央区亥鼻 1-8-1) ; Department of Orthopaedic Surgery, Chiba University, Graduate School of Medicine, Chiba 260-8670, JAPAN

から複数の研究者により指摘されていたことでもあった。つまりある段階(明確な目安は欠けている)までの症例には鏡視下デブリードマンという選択肢があるがこれを越えると人工関節置換術しかないということになるようである。このような状況下で、われわれは1997年より鏡視下後内側解離術(PMR)という関節鏡を用いた手術を内側型のOAに施行し、比較的良好な短期成績が得られることを発表してきた<sup>6)</sup>。この手術は1960年にLoefflerが発表したいわゆるLoefflerの内側解離術にヒントを得たこと、またしばしば屈曲拘縮を伴うようなOAに対し鏡視下デブリードマンを施行すると内側から後内側の関節包が脛骨高原に癒着している所見を認め、これが屈曲拘縮の一因あるいは疼痛の一因であると考えられたことに端を発する。Loefflerの内側解離術に関しては報告数が少ないものの中長期に良好な成績を残すとされている。また2001にAraらは二十数年の長期成績に関する術後成績をまとめ、フォローアップ率が低いものの良好であったとした<sup>7)</sup>。こうした中、われわれがPMRを始めたのと同じような時期にLeonらがarthroscopic decompressive medial release (ADM) という術式を開始し大変良好な術後成績が得られたとした<sup>8)</sup>。われわれの症例はKellgren & Lawrence分類にてグレードⅢまたはⅣであり屈曲拘縮を伴う膝、またLeonらの症例はAhlbach分類でグレードⅢ以上であることから、両者において対象となったのは鏡視下デブリードマンのものはや適応ではないか、あるいはその境界線上にある症例と考えて良い。こうした症例にはTKAを施行するのが一般的であろう。しかし少なくとも従来の鏡視下デブリードマンでは良好な術後成績が望めないことが予想されるような対象群であったにもかかわらず良い成績が得られている。ここではPMRの概説から術後成績、またMRIによる適応決定が有効であるとの知見を得たのでこれらにつき述べていく。

## 対象と方法

### 1. 鏡視下後内側解離術(図1, 2)

膝関節鏡手術で一般的に用いる内側および外側の膝蓋下ポータルを用い、手術を行う。本手

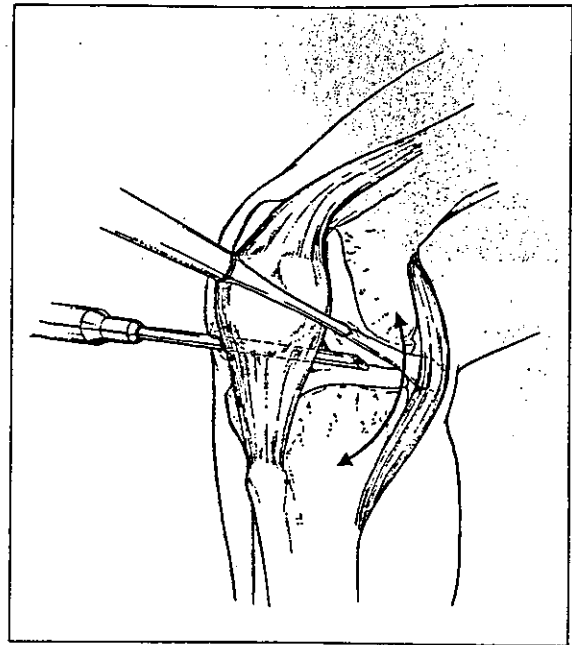


図1 鏡視下後内側解離術

鏡視下後内側解離術を図示する。本術式では鏡視下にデブリードマンを施行した後に、骨膜剥離鉗子などを使用し脛骨から内側の関節包、内側々副靭帯(MCL)を剥離する。(屈曲拘縮を呈するOA膝ではこの部位に癒着性の変化を認めることが多い。)

術は変性断裂した内側半月板の切除、不安定な軟骨フラップの切除などの従来のデブリードマンと同様の操作を施行した後に骨膜剥離子などを用いて内側の関節包と内側副靭帯(MCL)を脛骨高原から剥離していくものである。その後に外反および伸展ストレスを膝関節に加え解離の仕上げとする。通常この操作にはポップ音が聞かれる。この時点で後内側に十分なスペースができないようなときには半月様筋腱を切離するが、これでもなお不十分なときにはMCLの後方1/2を横切する。術後の後療法としてはヒアルロン酸製剤を週に1度、5週間使用した。また外側楔状足底板を装用してもらうようにしたが、半数以上の症例で術前より足底板の装用歴があった。

### 2. 対象

当科においてPMRを受けた後、2年以上の経過観察可能であった52膝である。両側例が6例含まれるため46症例、52膝である。手術時の年齢、性別、膝関節可動域、立位正面レントゲンより計測した膝外側角(FTA)、Kellgren & Lawrence (K/L)分類によるレントゲングレードを全症例で

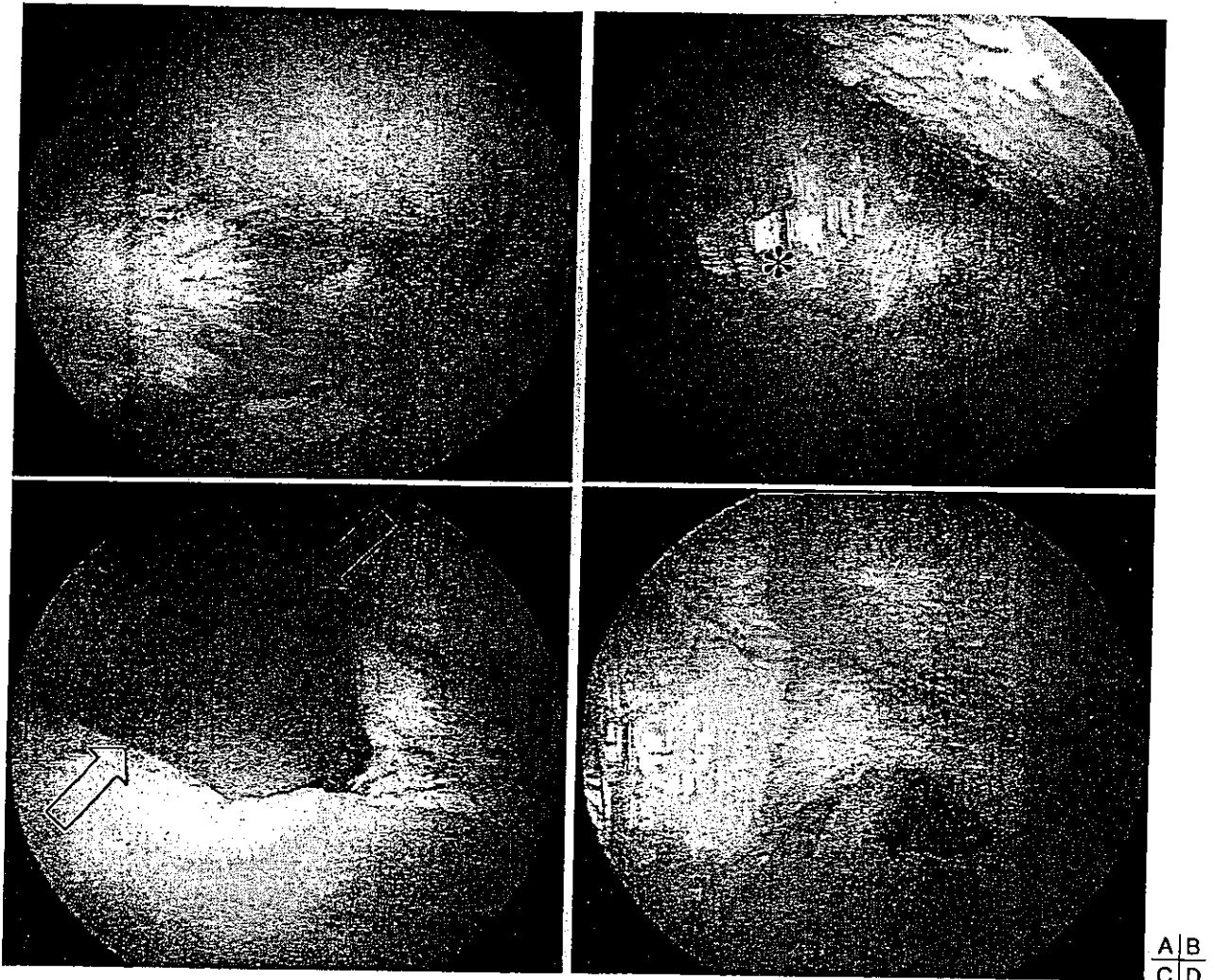


図2 鏡視下後内側解離術

内側コンパートメントに高度に軟骨が変性(eburnation)し、内側半月板の高度な変性断裂を認める(A)。内側半月板を垂全摘したのち(B)、内側関節包(\*)を剥離していく(C)。この操作には骨膜剥離鉗子(矢印)などを用いる。内側コンパートメントの後内側部には関節裂隙が開大し、半膜用筋腱が見える(D)。

記録した。経過観察は術後 6, 12, 24, 30, 36, 42, 48か月で施行し、おのおの経過観察時に日整会膝治療成績判定基準(JOAスコア)、術前の膝の痛みを10としたときの経過観察時の膝痛を0から10(ときに10以上)で表したVerval rating scale (VRS)、患者の満足度を調べた。臨床評価は全対象で表すほかに、①レントゲングレード別、②術前のMRIの所見に基づく分類にも調べ、JOAスコアを用い施行した。このMRI所見による分類であるが内側コンパートメントの中央を通るようなプロトン強調像矢状断をコンピュータに取り込み、画像処理した後に大腿骨内側顆の輪郭のみを抽出し(図3)、この輪郭に不整がないかあるいはわずかな不整を認める群(S群)、と輪郭が

中等度から明らかに不整な群(IR群)とに分類したものである(図4)。撮影に使用したのはSigna 1.5T(GE Medical Systems)で撮像条件はFSE TR : 2000, TE 12ms, BTL 4, Time 4m24sである。統計処理はWilcoxonの符号順位検定を用いた。 $p < 0.01$ を統計学的に有意と判断した。

### 3. 病理学的検査

人工膝関節置換術となった症例より、大腿骨内側顆の荷重部に相当する切除骨の病理検査を施行した。標本は採取後ただちに10%ホルマリンに48時間浸したのち、20%EDTAに10日間浸け脱灰し、マイクロトームにて6 $\mu$ mの厚さに切り出したのちヘマトキシリン・エオジン染色を施行、光学顕微鏡にて観察を行った。

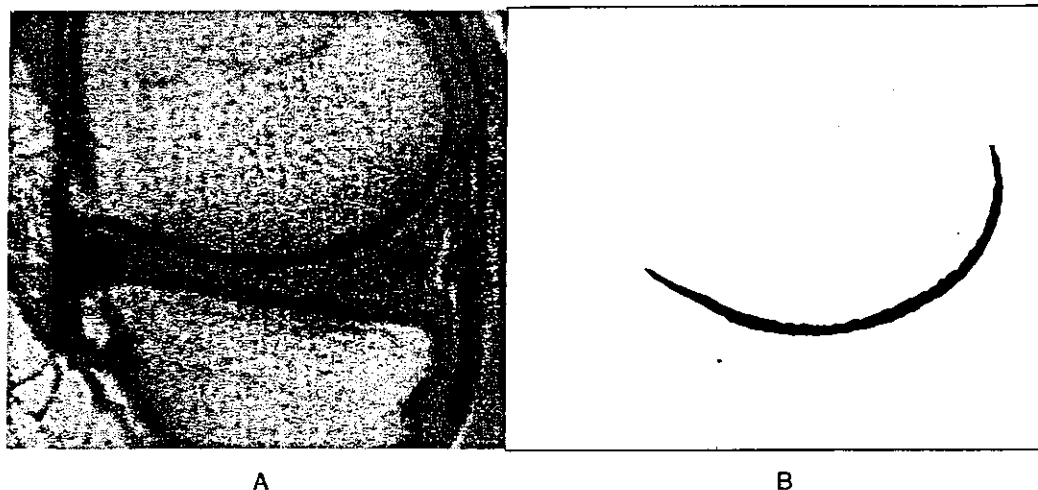


図3 大腿骨内側顆の輪郭の抽出  
内側コンパートメントの中央を通るMRI矢状断プロトン強調像(A)からコンピュータ画像処理により大腿骨内側顆の輪郭を抽出する(B).

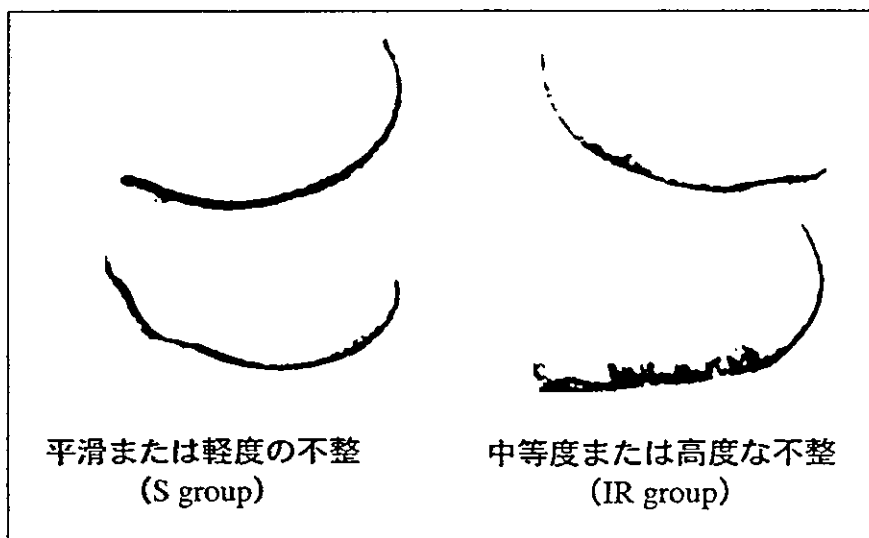


図4 大腿骨内側顆の不整度による分類  
図3に示したように抽出された大腿骨内側顆の輪郭は平滑または軽度の不整であるS群と中等度から高度に不整なIR群に分類した。

### 結 果

手術時の患者の平均年齢は71.6(47-84)歳であった。ROMは平均で13度から129度であった。女性が37膝、男性が15膝であった。6症例が両側であるが2症例が両側同時手術、4症例は10か月から1年4か月の間を空けて手術を受けていた。K/L分類では1膝がグレードII、16膝がグレードIII、35膝がグレードIVであった。1例あったグレードIIの症例はレントゲン上の骨棘はごく軽度に認めるのみであったが10度の屈曲拘縮がありPMRを受けた。全例が内側型の変形性膝関節症であ

り、FTAは平均で182.5度であった。

患者の満足度では大変満足、ひとに勧めたいほど満足、勧めるほどではないが満足という3項目を併せると46症例中35症例であった。すなわち76%が多かれ少なかれ満足しているという結果であった(図5)。術後の可動域は平均で6度から130度であった。

VRSであるが5以下であるものは併せると52膝中34膝(65%)であり、ほぼ3人のうち2人は痛みが半分以下となったと回答した(図6)。

JOAスコアは術前平均56.3点が71.6点へと約15点の改善をみた(図7)。

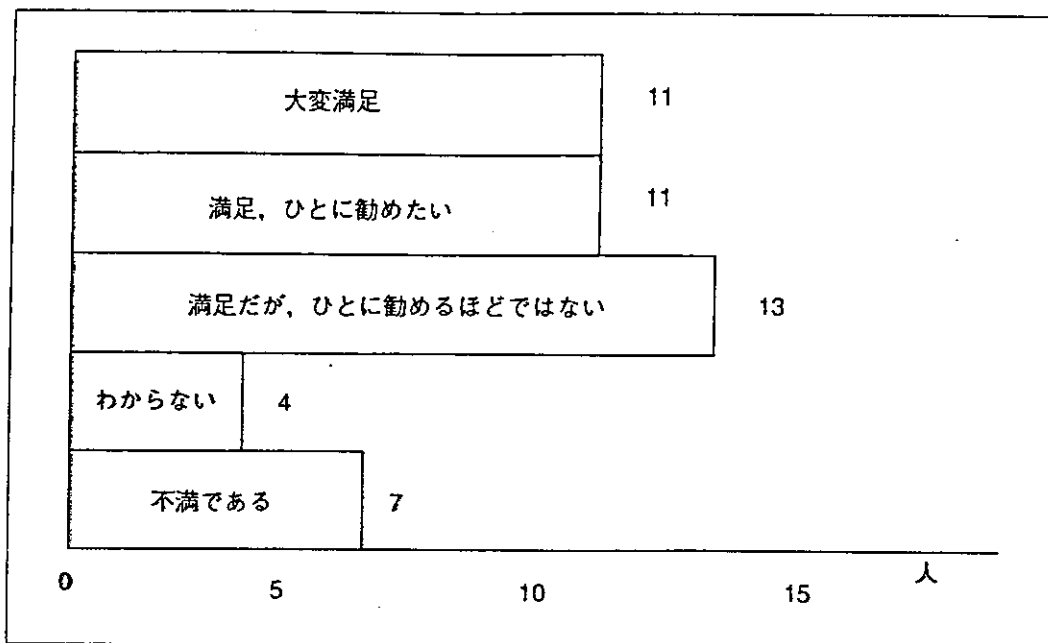


図5 患者の満足度  
最終経過観察時の患者の満足度を5段階にて示した。各バーの右にある数字は人数である。

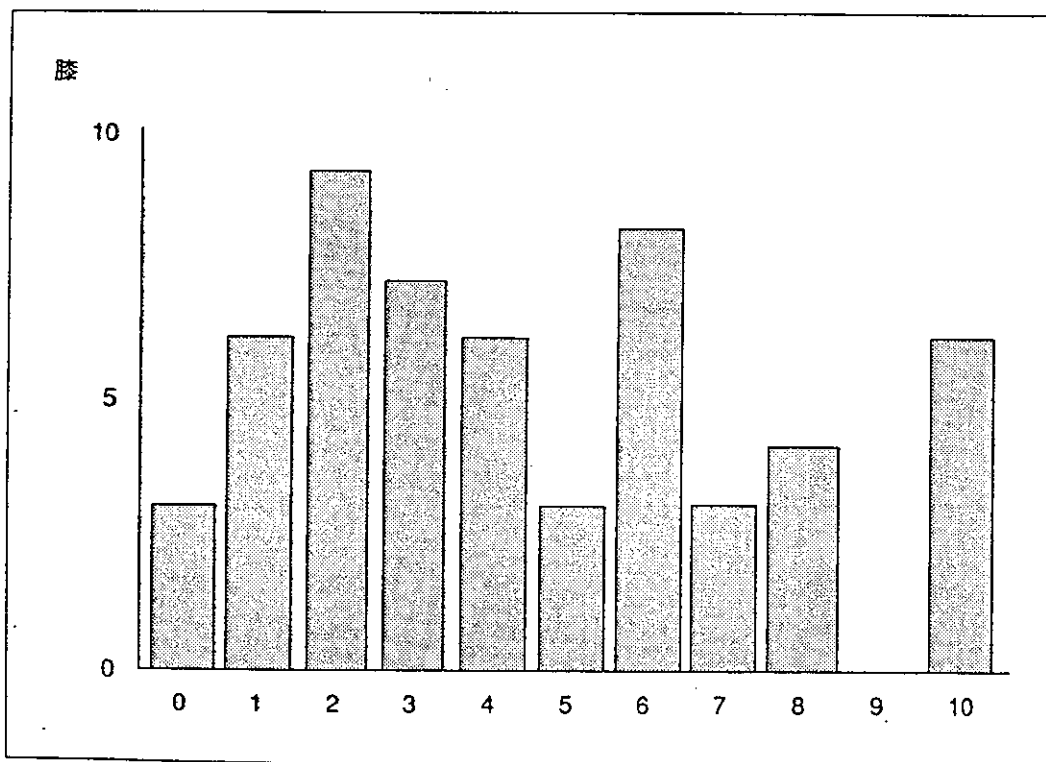


図6 Verval Rating Scale (VRS)  
最終経過観察時の患者の膝の痛みに関し、術前の痛みを10とした場合に観察時の膝痛がどの程度であるかを問診し、1~10の数字(10以上と回答したものは10に含めて示した)にて回答を得た。

膝のグレード別にみたJOAスコアであるが、K/LグレードⅢ群では術前の60.4点から76.9点へと改善を認め、K/LグレードⅣ群では術前55.3から69.5点へと改善をみた(図7)。グレードⅡは

1例のみであったため除外してある。いずれの群でも改善は統計学的に有意であった。一方、MRIによる群分けの成績であるが、IR群では術前54.5点が66.2点へ、S群では術前62.3点が79.6点と

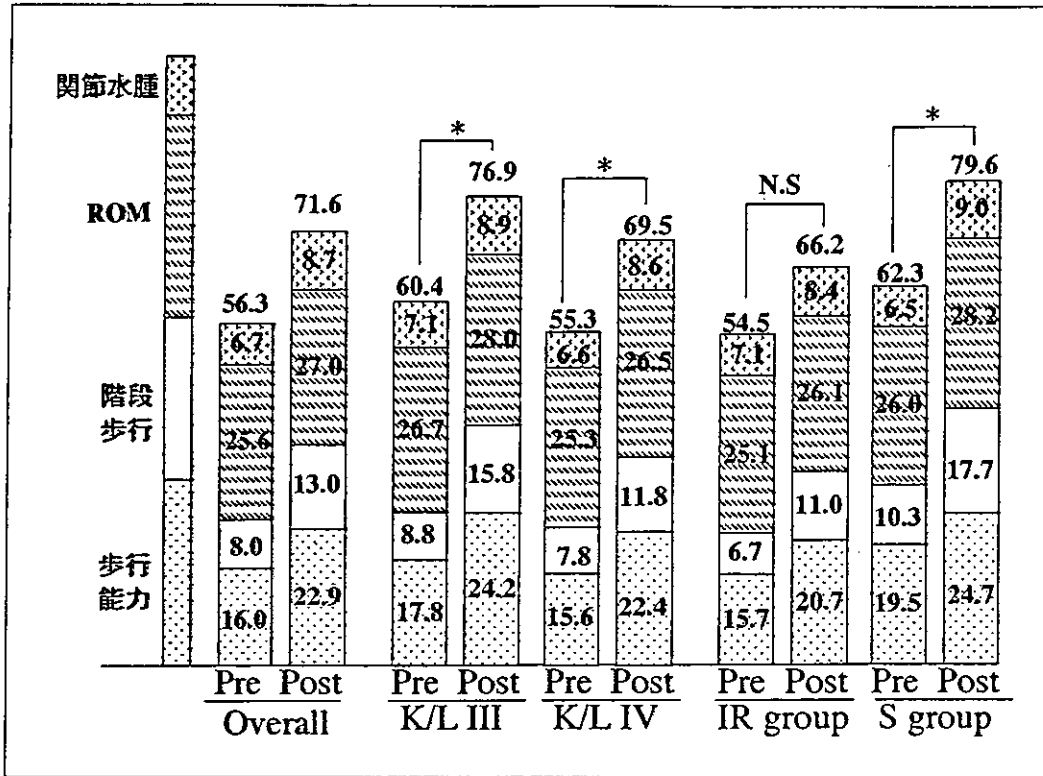


図7 後内側解離術の成績 (JOA score)

全52症例の術前後のJOAスコアは56.3が71.6点へ改善していた。レントゲングレード別にみるとK/LグレードⅢでは60.4から76.9へK/LグレードⅣでは55.3から69.5への改善を見た。MRI所見による分類では大腿骨内側顆の輪郭が不整な群 (IR群) では54.5から66.2へと改善は小幅であった。一方輪郭がスムーズな群 (S群) では62.3から79.6へと改善が大きかった。(統計学的検討はWilcoxon符号付き順位検定で行い  $p < 0.01$  を有意であるとみなした。\*:  $p < 0.01$ , N.S.: Not significant)

改善していた(図7)。S群の改善のみが統計学的に有意であった(IR群の  $p$  値は0.011である。)患者の背景をみるとS群の患者の方が5歳ほど高齢であるが、FTAやレントゲングレードの分布には大きな差異はなかった(表1)。

全部で6膝が膝痛の軽快がみられなかったことから、人工関節置換術を要した。5膝はIR群の、1膝はS群の症例であった。

IR群のなかで人工関節置換術となった症例から手術時に採取した大腿骨内側顆荷重部の病理標本を調べたところ、軟骨下骨には偽嚢包が多数みられた(図8)。

考 察

変形性膝関節症に対する鏡視下手術には限界があると考えられている。初期の症例には有効であるが、ある程度進行してしまった症例では有効な成績は望めない。この初期症例という目安としては60歳以下、FTAが180度以下といった

表1 S群とIR群の患者の背景

	S group	IR group
年齢	68.6(47-82)	73.7(58-90)
FTA	181.8(177-185)	182.5(177-190)
X-ray grading	I	0
	II	1
	III	9
	IV	16

S群の患者は5歳ほど年齢が低かったがFTAやレントゲングレードの分布には大きな差がなかった。

指標や<sup>2)9)</sup>、Jacksonらが述べた彼らの分類によるステージⅢまでの症例といったものがある<sup>4)</sup>。こうした症例は実際には変形性膝関節症としてはごく初期の症例であり、半月板の変性断裂に起因する症状が表に出ているような症例もあり、鏡視下デブリードマンの意味が半月板損傷に対する半月板切除術になっている可能性や、あるいは関節内洗浄の効果だけに終わっている可能性は否定できない。このような初期状態を越え

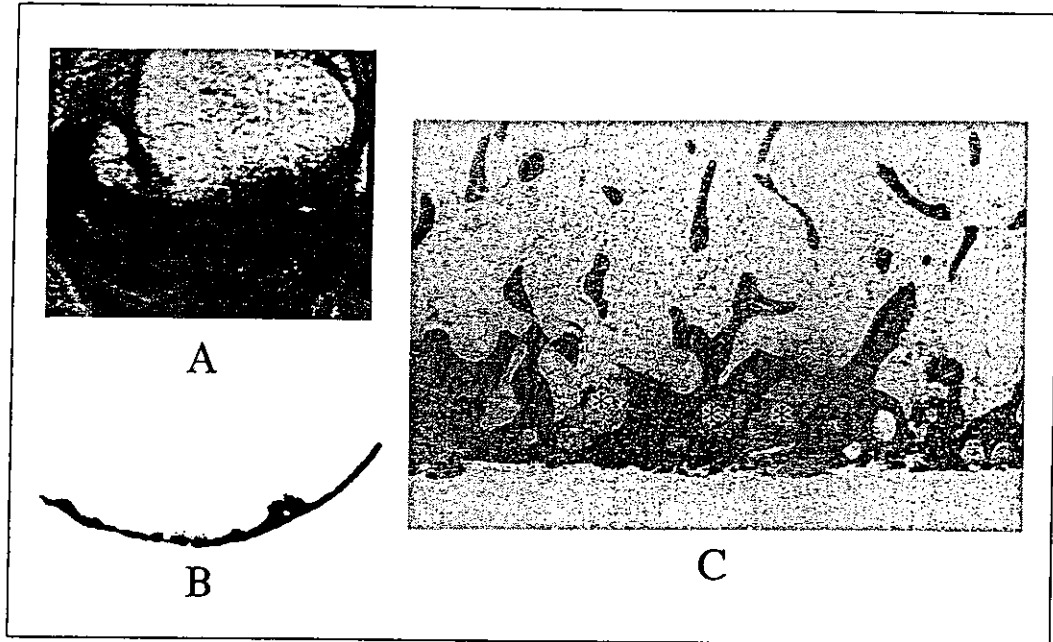


図8 IR群の病理像

IR群のうち人工関節置換術となった症例から大腿骨内側顆の荷重部に相当する部の組織標本を製作したとこと、多数の偽嚢包を認め、軟骨下骨の構造の不規則な配列が観察できた。

た症例に対する手術的療法としてはTKAが一般的になってきている。しかしより低侵襲で効果の期待できる手術があるとすると、手術を受ける側にも施行する側にも得るものは大きい。こうしたなか、今回まとめた鏡視下後内側分離術は鏡視下デブリードマンをするには進行し過ぎてしまっているが、TKAにはまだ早いといった症例や、全身状態から判断してTKAによる侵襲が大きくなり過ぎる例に対して有用な手術であると言える。とくにMRIによりS群に分類された症例については術後にJOAスコアが79.6となっておりこの結果自体はわれわれの施設でのTKAの術後成績と遜色ないものである。われわれの施設ではTKA症例の80膝の平均2.5年の経過観察期間でのJOAスコアは80.0点であった<sup>10)</sup>。(ただし術前のJOAスコアはS群では62.3であったのに対しTKA症例は46.2点であったという相違はある。) S群でさえ①平均年齢が68.6歳であること、②FTAは180度を超えていること、③屈曲拘縮を有していること、などから従来の鏡視下デブリードマンでは良好な術後成績が望めない群であると思われた。本術式により全体としても約15点の改善が期待できることを考えると症例に応じては適応の価値がある術式であると考えられる。JOA

スコアの改善に関してはレントゲングレードより以上にMRI所見上、大腿骨内側顆が不整であるか否かが大きな因子となることがわかった。検討用に抽出した大腿骨内側顆の輪郭は軟骨下骨に相当すると考えられるので、軟骨下骨の病的な状態が術後の臨床成績に影響しているのではないかということが推察された。本研究では輪郭が整であるか不整であるかの判定は視認による主観的な分類によった。したがって分類の基準が曖昧となることは事実である。そこで今後われわれはこの不整度の測定をコンピュータで自動的に施行しより客観的に行うようなシステムを考慮中である。そこでプレリミナリーな研究として、22名の内側型変形性膝関節症の症例のMRI像より大腿骨内側顆の輪郭を抽出してコンピュータソフトウェアを用いて不整度を計測してみた。使用したソフトウェアは元々、実験的な骨軟骨片移植術の結果を評価するために開発されたもので、母床と移植骨軟骨の適合性などを計測するものである<sup>11)</sup>。そのなかの項目に母床側からみた理想的な軟骨表面と実際に修復された軟骨面がどれほどの差異があるかを評価するものがあり、この計測法を応用し、計測した数値は不整指数(Irregularity Index)と称することと

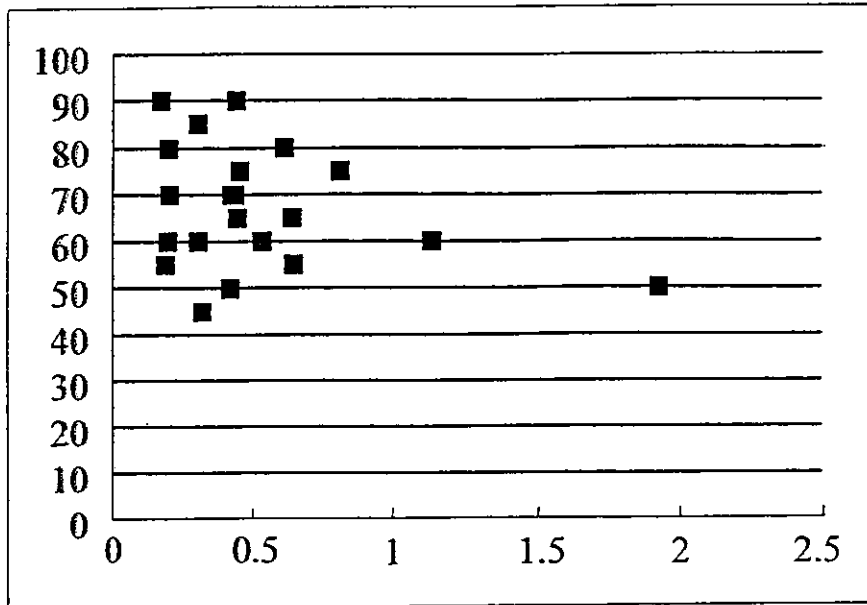


図9 JOA scoreとIrregularity Index

JOA scoreとIrregularity Indexの関係を調べると-0.31の弱い負の相関が見られた。

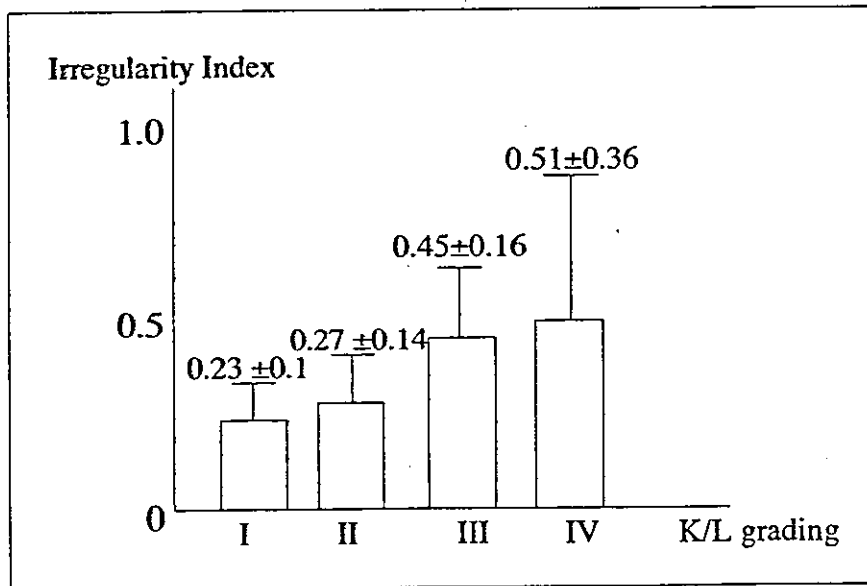


図10 Irregularity IndexとX-ray grading

K/Lグレード別にみたIrregularity Indexはグレードが高くなるほど大きかった。またばらつきもグレードが上がるにつれ大きくなっていった。

した。この指数とJOAスコアの関係プロットしてみた。すると指数が増加する(不整度が上がる)につれてJOAスコアが低下するという負の相関性がみられた。相関係数は-0.31と弱いものではあったがこの指数が罹患膝の状態を表すひとつの指標となりうるものと考えられた(図9)。またK/Lのレントゲングレード別にみた指数を計算してみるとグレードが上がるにつれて指数が上昇し

ていくということがわかり、やはりこの指数が疾患の進行度に関係しているものと考えた(図10)。また指数のばらつきはレントゲングレードが上がるにつれて大きくなっており、レントゲングレードがⅢやとくにⅣとなるとさまざまな軟骨下骨の状態の罹患膝が存在するものと想定された。今後はより客観的に不整度を計測できるようなシステムを作り上げ、患者の評価および治



療法の選択の指標としていく所存である。鏡視下後内側解離術の対象となった症例は1例を除き、レントゲングレードでⅢないしⅣに属するものであったが、その中には軟骨下骨の病的状態が進行してしまったものといまだにそれほど進行していないものが混在していたものと考えた。すなわち、鏡視下手術のように骨軟骨組織を保存するような術式の場合、保存される組織の状態が悪いと術後成績の良くないということが想定できる。このことは高位脛骨骨切り術についても骨軟骨組織を保存する術式であることから当てはまるものかもしれない。他方、TKAにおいては手術時にこの病的な軟骨下骨を切除するものであるため、効果が大きいとも考えられた。

### まとめ

年齢、理学所見などから人工膝関節置換術が適切な治療法と考えられるような症例に対し鏡視下後内側解離術を施行した。その結果全体としてJOAスコアで15点の改善が見られた。対象となった症例のうちMRI像からみた大腿骨内側顆の輪郭が整であることが本術式の術後成績が良好となるための条件であった。大腿骨内側顆の輪郭は軟骨下骨に相当するため、軟骨下骨の状態が良好であることが好成績を得る条件とも言えると考察した。

### 文 献

- 1) Matthews LS, Goldstein SA, Malvitz TA, et al. Proximal tibial osteotomy. Factors that influence the duration of satisfactory function. *Clin Orthop* 1988; 229 : 193.
- 2) Harwin SF. Arthroscopic debridement for osteoarthritis of the knee : Predictor of patient satisfaction. *Arthroscopy* 1999 ; 15 : 142.
- 3) Moseley JB, O'Malley K, et al. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *New Engl J med* 2002 ; 347 : 81.
- 4) Jackson RW, Dieterichs C. The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration : A 4- to 6-year symptomatic follow-up. *Arthroscopy* 2003 ; 19 : 13.
- 5) Fond J, Rodin D, Ahmad S, et al. Arthroscopic debridement for the treatment of osteoarthritis of the knee : 2- and 5-year results. *Arthroscopy* 2002 ; 18 : 829.
- 6) 佐粧孝久, 和田佑一, 守屋秀繁. 屈曲拘縮を伴う内側型変形性膝関節症に対する鏡視下後内側解離術. *膝* 1998 ; 24 : 38.
- 7) Ara Y, Koshino T, Takagi T, et al. Modified Loeffler's medial capsulotomy for osteoarthritis of the knee : 20 year's follow-up. *Int Orthop* 2001 ; 24 : 327.
- 8) Leon HO, Blanco CER, Guithrie TB. Arthroscopic decompressive medial release of the varus arthritic knee : Expanding the functional envelope. *Arthroscopy* 2001 ; 17 : 523.
- 9) Salisbry RB, Nottage WM, Gardner V. The effects of alignment on results in arthroscopic debridement of the degenerative knee. *Clin Orthop* 1985 ; 198 : 268.
- 10) 李 松, 鈴木昌彦, 常泉吉一, ほか. Hi-tech knee IIの術後臨床成績. *日本膝関節学会誌* 2002 ; 26 : 180.
- 11) Hacker SA, Healey RM, Yoshioka M, et al. A methodology for the quantitative assessment of articular cartilage histomorphometry. *Osteoarthritis Cartilage* 1997 ; 5 : 343.

\* \* \*

## Deficiency of Insulin Receptor Substrate-1 Impairs Skeletal Growth Through Early Closure of Epiphyseal Cartilage

Kazuto Hoshi,<sup>1</sup> Naoshi Ogata,<sup>2</sup> Takashi Shimoaka,<sup>2</sup> Yasuo Terauchi,<sup>3</sup> Takashi Kadowaki,<sup>3</sup> Shin-Ichi Kenmotsu,<sup>4</sup> Ung-Il Chung,<sup>5</sup> Hedehiro Ozawa,<sup>6</sup> Kozo Nakamura,<sup>2</sup> and Hiroshi Kawaguchi<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** Morphological analyses in and around the epiphyseal cartilage of mice deficient in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) showed IRS-1 signaling to be important for skeletal growth by preventing early closure of the epiphyseal cartilage and maintaining the subsequent bone turnover at the primary spongiosa.

**Introduction:** IRS-1 is an essential molecule for intracellular signaling by IGF-I and insulin, both of which are potent anabolic regulators of cartilage and bone metabolism. To clarify the role of IRS-1 signaling in the skeletal growth, morphological analyses were performed in and around the epiphyseal cartilage of mice deficient in IRS-1 (IRS-1<sup>-/-</sup>), whose limbs and trunk were 20–30% shorter than wildtype (WT) mice.

**Materials and Methods:** The epiphyseal cartilage and the primary spongiosa at proximal tibias of homozygous IRS-1<sup>-/-</sup> and WT male littermates were compared using histological, immunohistochemical, enzyme cytohistochemical, ultrastructural, and bone histomorphometrical analyses.

**Results:** In and around the WT epiphyseal cartilage, IRS-1 and insulin-like growth factor (IGF)-I receptors were widely expressed, whereas IRS-2 was weakly localized in bone cells. Chronological observation revealed that height of the proliferative zone and the size of hypertrophic chondrocytes were decreased in WT mice as a function of age, and these decreases were accelerated in the IRS-1<sup>-/-</sup> cartilage, whose findings at 12 weeks were similar to those of WT at 24 weeks. In the IRS-1<sup>-/-</sup> cartilage, proliferating chondrocytes with positive proliferating cell nuclear antigen (PCNA) or parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor immunostaining had almost disappeared by 12 weeks. Contrarily, TUNEL<sup>+</sup> apoptotic cells were increased in the hypertrophic zone, at the bottom of which most of the chondrocytes were surrounded by the calcified matrix, suggesting the closure of the cartilage. In the primary spongiosa, bone volume, alkaline phosphatase (ALP)<sup>+</sup> osteoblasts, TRACP<sup>+</sup> osteoclasts, and the osteopontin-positive cement line were markedly decreased. Bone histomorphometrical parameters for both bone formation and resorption were significantly lower in IRS-1<sup>-/-</sup> mice, indicating the suppression of bone turnover.

**Conclusion:** The IRS-1<sup>-/-</sup> epiphyseal cartilage exhibited insufficient proliferation of chondrocytes, calcification of hypertrophic chondrocytes, acceleration of apoptosis, and early closure of the growth plate. Thus, the data strongly suggest that IRS-1 signaling is important for the skeletal growth by preventing early closure of the epiphyseal cartilage and by maintaining the subsequent bone turnover at the primary spongiosa.

J Bone Miner Res 2004;19:214–223. Published online on December 16, 2003; doi: 10.1359/JBMR.0301221

**Key words:** insulin receptor substrate, cartilage, chondrocyte, growth plate, skeletal growth

### INTRODUCTION

LONGITUDINAL SKELETAL GROWTH is primarily regulated at the epiphyseal cartilage or the growth plate. During this process, chondrocytes first proliferate and then progressively differentiate into hypertrophic chondrocytes. Once fully differentiated, these hypertrophic cells undergo apo-

ptosis and calcify the surrounding matrix. The opening of chondrocyte lacunae to the bone marrow cavity leads to local recruitment of blood vessels and bone cells that replace the cartilage by bone. Thus, in the process of skeletal growth, proliferation, hypertrophy, apoptosis, and calcification of chondrocytes followed by the recruitment of blood vessels and bone cells must be properly coordinated.

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) plays important roles in the anabolic regulation of cartilage and bone metabo-

The authors have no conflict of interest.

<sup>1</sup>Department of MENICON Cartilage and Bone Regeneration, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan; <sup>3</sup>Department of Metabolic Diseases, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan; <sup>4</sup>Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan; <sup>5</sup>Division of Tissue Engineering, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan; <sup>6</sup>Institute of Dental Science, Matsumoto Dental University, Nagano, Japan.

lism.<sup>(1,2)</sup> Chondrocytes and osteoblasts produce this growth factor, have its receptor, and respond to it.<sup>(3-5)</sup> IGF-I seems to be essential for skeletal growth as indicated by mouse models in which deletion of IGF-I or its receptor leads to a reduction in size at birth.<sup>(6,7)</sup> Clinically, patients with Laron syndrome caused by IGF-I deficiency exhibit growth retardation and osteoporosis.<sup>(8)</sup> IGF-I is also reported to be expressed during fracture healing and to stimulate it, suggesting its role as an autocrine/paracrine factor to potentiate cartilage and bone regeneration.<sup>(9-12)</sup> Insulin also plays an important part in the anabolic regulation of cartilage and bone metabolism.<sup>(1)</sup> Although the anabolic effect of insulin on bone may be primarily related to its ability to stimulate osteoblast proliferation,<sup>(1)</sup> that on cartilage may involve the acceleration of chondrocyte differentiation.<sup>(13,14)</sup> Patients with insulin deficiency as exemplified by type 1 diabetes mellitus are associated with osteoporosis.<sup>(15,16)</sup> Diabetes is also known to impair fracture healing, and insulin application restores it in both humans and animals.<sup>(17-19)</sup>

Both IGF-I and insulin initiate cellular responses by binding to distinct cell surface receptor tyrosine kinases that regulate a variety of signaling pathways that control metabolism, growth, and survival. Insulin receptor substrates (IRSs) are essential substrates of both the receptor tyrosine kinases, which integrate the pleiotropic effects of IGF-I and insulin on cellular function.<sup>(20,21)</sup> The mammalian IRS family contains at least four members: ubiquitous IRS-1 and IRS-2, adipose tissue-predominant IRS-3,<sup>(22)</sup> and IRS-4, which is expressed in thymus, brain, and kidney.<sup>(23)</sup> We previously reported that IRS-1 and IRS-2 are expressed in bone.<sup>(24,25)</sup> To learn the endogenous roles of IRS-1 and IRS-2 in bone, we analyzed the bone of mice lacking the *IRS-1* gene (*IRS-1*<sup>-/-</sup> mice) or the *IRS-2* gene (*IRS-2*<sup>-/-</sup> mice).<sup>(26,27)</sup> Both mice exhibited osteopenia with different cellular mechanisms: *IRS-1*<sup>-/-</sup> mice showed a low bone turnover in which both bone formation and resorption were decreased,<sup>(24)</sup> whereas *IRS-2*<sup>-/-</sup> mice showed decreased bone formation and increased bone resorption.<sup>(25)</sup> It therefore seems that IRS-1 is important for maintaining bone turnover, whereas IRS-2 is important for maintaining predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts. Regarding the role of these molecules on skeletal growth, IRS-1, but not IRS-2, seems to be involved in the function of epiphyseal cartilage, because *IRS-1*<sup>-/-</sup> mice were about 20–30% shorter in limbs and trunk, whereas *IRS-2*<sup>-/-</sup> mice were normal in size compared with wildtype (WT) littermates.<sup>(26-29)</sup> To clarify the cellular mechanism of skeletal growth by IRS-1 signaling, morphological analyses in and around the epiphyseal cartilage of *IRS-1*<sup>-/-</sup> mice were performed in this study.

## MATERIALS AND METHODS

### *Tissue preparation*

All experiments were reviewed and approved by the University of Tokyo, Faculty of Medical Animal Care and Use Committee, before the study. Mice with the original C57BL6/CBA hybrid background were generated and maintained as reported previously.<sup>(26)</sup> In each experiment,

homozygous WT and *IRS-1*<sup>-/-</sup> male mice that were littermates generated from the intercross between heterozygous mice were compared.

After anesthetization with diethyl ether and an intraperitoneal administration of sodium pentobarbiturate at a rate of 30 mg/kg (Dainabot, Osaka, Japan), mice at age of 0, 3, 5, 7, 9, 12, and 24 weeks were examined by soft X-ray (type SRO-M50; Sofron, Tokyo, Japan). They were perfused through the left ventricle with 20-ml doses of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for paraffin sections or a mixture of 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.067 M cacodylate buffer (pH 7.4) for epoxy resin sections. The tibias were removed and immersed in the same fixative for 4 h at 4°C. After decalcification with 4.13% EDTA at 4°C for 1 or 2 weeks, some specimens were dehydrated with an increasing concentration of ethanol and embedded in paraffin. For epoxy resin embedding, after postfixation with 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), the specimens were dehydrated in a graded ethanol series, replaced with propylene oxide, and embedded in Poly/Bed 812 resin (Polysciences, Warrington, PA, USA). For bone histomorphometry, tibias from 12-week-old WT and *IRS-1*<sup>-/-</sup> mice were excised, fixed with 100% ethanol, and embedded in methyl methacrylate. For double labeling, mice were injected subcutaneously with 8 mg/kg body weight of calcein at 10 and 3 days before death.

### *Histological, ultrastructural, and bone histomorphometrical studies*

The lengths of WT and *IRS-1*<sup>-/-</sup> tibias were measured in the soft X-ray images by caliper (each *n* = 12). Three-micrometer-thick paraffin sections were stained in HE for histological examinations. The height of the proliferative zone in the epiphyseal cartilage in proximal tibias was measured with the HE-stained paraffin sections (each *n* = 6–12). Employing an Ultracut UCT Microtome (Leica, Wien, Austria), Poly/Bed-embedded specimens were sliced into either 0.5- $\mu$ m sections and stained with both von Kossa and toluidine blue-O or into 60- to 80-nm sections for electron microscopic analysis. For ultrastructural analysis, these sections were observed under a transmission electron microscope (TEM), H-7100 (Hitachi, Tokyo, Japan) or JEM-100CX II (JEOL, Tokyo, Japan), after staining with tannic acid, uranyl acetate, and lead citrate. For bone histomorphometry, tibias (each *n* = 6) were sectioned in 6- $\mu$ m slices and stained in Villanueva-Goldner staining. The specimens were subjected to histomorphometric analyses under a light microscope with a micrometer using an image analyzer (System Supply Co., Nagano, Japan). Parameters were measured in an area 1.2 mm in length from 0.1 mm below the epiphyseal cartilage at the proximal tibias.

### *Immunohistochemistry*

Immunohistochemical localizations of IRS-1, IRS-2, IGF-I receptor, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor, type X collagen, alkaline phosphatase (ALP), and

osteopontin were observed in 3- $\mu$ m dewaxed paraffin sections. The sections were treated with 0.3% hydrogen peroxide in PBS for 30 minutes at room temperature. After being blocked by PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA; Seikagaku, Tokyo, Japan) for 1 h at room temperature, they were incubated in rabbit polyclonal antibodies against mouse IRS-1 (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA) and IRS-2 (Upstate Biotechnology Inc.), chicken polyclonal IgY against human IGF-I receptor (Upstate Biotechnology Inc.), monoclonal antibody against PCNA (Oncogene Research Products, Boston, MA, USA), rabbit polyclonal antibodies against PTH/PTHrP receptor (kindly provided by A Kasei, Tokyo, Japan), bovine type X collagen (LSL, Tokyo, Japan), human tissue-nonspecific ALP (kindly provided by Dr Y Ikehara, Department of Biochemistry, Fukuoka University School of Medicine), and mouse osteopontin (kindly provided by Dr M Fukae, Department of Biochemistry, Tsurumi University School of Dental Medicine) at a dilution of 1:100 for 24 h at 4°C, as previously reported.<sup>(30,31)</sup> The sections were rinsed in PBS and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat antibodies against rabbit IgG (Dakopatts, Glstrup, Denmark), HRP-conjugated rabbit anti-chicken IgY (Boxtan Express, Quincy, MA, USA), HRP-conjugated goat antibody against mouse IgG (EY Laboratories, Inc., San Mateo, CA, USA), or HRP-conjugated goat antibody against mouse IgG (EY Laboratories), respectively, for 1 h at room temperature. After washing with PBS, the sections were immersed in a diaminobenzidine solution for 10 minutes at room temperature to detect the immunoreactivity. In the test for type X collagen, sections were treated with 2.5% hyaluronidase (Sigma, St Louis, MO, USA) for 10 minutes at room temperature after blocking the endogenous peroxidase. As a negative control, we used non-immune rabbit IgG, chicken IgY, or mouse IgG of the same dilution instead of the primary antibodies. For the evaluation of cell death, TUNEL (ApopTag, Intergen, Purchase, NY, USA) was examined in 3- $\mu$ m dewaxed paraffin sections as previously reported.<sup>(32)</sup> The sections were faintly counterstained with hematoxylin or methyl green.

#### Enzyme cytohistochemistry

TRACP activity was detected by Azo staining as reported.<sup>(30)</sup> After osteopontin-immunostaining, 3- $\mu$ m paraffin sections were incubated with a mixture of 5 mg of naphthol AS-BI phosphate as a substrate and 18 mg of red violet LR salt (Sigma) diluted in 30 ml 0.1 M acetate buffer (pH 5.2) containing 0.5 mM tartrate (pH adjusted to 5.2  $\times$  1N HCl) at 37°C for 10 minutes. Sections were faintly counterstained with methyl green.

#### Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

For the detection of IRS-1 and IRS-2 expression, samples of the epiphyseal cartilage of 5-week-old WT mouse proximal tibias ( $n = 5$ ) were chopped with a feather cutter under a binocular microscope, followed by rapid freezing in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using an ISOGEN kit (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan), 1  $\mu$ g of which was reverse transcribed (RT) using Super Script reverse transcrip-

tase (Takara Shuzo Co., Ltd., Shiga, Japan) with random hexamer (Takara Shuzo), and 5% of the reaction mixture was amplified with LA-Taq DNA polymerase (Takara Shuzo) using specific primer pairs: 5'-GCAGCCCCACCTGCCTCGAAAGGTAGACAC-3' and 5'-CAGCAATGCTGTCCGCATGTCAGCATAGC-3' for IRS-1, and 5'-GAAGACAGTGGGTACATGCGAATG-3' and 5'-CCTCATGGAGGAAGGCACTGCTG-3' for IRS-2. Up to 25 cycles of amplification were performed with a Perkin Elmer polymerase chain reaction (PCR) thermal cycler (PE-2400; Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA) at 94°C for 30 s, 55°C for 60 s, and 72°C for 90 s.

#### Statistical analysis

Means of groups were compared by ANOVA, and significance of differences was determined by post hoc testing using Bonferroni's method.

## RESULTS

#### Localization of IRS-1, IRS-2, and IGF-I receptor in and around the epiphyseal cartilage of WT mice

We first examined the expression of IRS-1, IRS-2, and IGF-I receptor in and around the epiphyseal cartilage of 5-week-old WT mice. Immunohistochemical analysis (Fig. 1A) revealed that IRS-1 was localized in chondrocytes of various differentiation stages and bone cells in the primary spongiosa. IRS-2, however, could not be detected in the epiphyseal cartilage but was faintly immunostained in the bone cells including osteoclastic cells. IGF-I receptor was widely immunolocalized, indicating that the cells in and around the epiphyseal cartilage are targets of IGF-I. RT-PCR analysis of the epiphyseal cartilage confirmed the expression of IRS-1, but not IRS-2 (Fig. 1B). These findings strongly support the hypothesis that IGF-I signaling uses IRS-1, but not IRS-2, in the cartilage, as has been implicated from the difference in body size between IRS-1<sup>-/-</sup> and IRS-2<sup>-/-</sup> mice.<sup>(26-29)</sup>

#### Morphological findings in and around the epiphyseal cartilage of IRS-1<sup>-/-</sup> mice

The length of the IRS-1<sup>-/-</sup> tibias was confirmed to be shorter than WT tibias, especially at 5 weeks and thereafter (Fig. 2A). We therefore performed morphological analyses in and around the epiphyseal cartilage of the proximal tibias of IRS-1<sup>-/-</sup> mice and compared them with those of the WT littermates. In WT mice, the height of this cartilage decreased because of reduction in the height of the proliferative zone (Fig. 2B) and the size of hypertrophic chondrocytes as a function of age up to 24 weeks when the cartilage was almost closed (Fig. 2C, top). In IRS-1<sup>-/-</sup> mice, although the cartilage height was similar at 3 weeks, its decrease with age thereafter was more accelerated than WT (Fig. 2C, bottom). This was accompanied by the reductions of the proliferative zone height (Fig. 2B) and the hypertrophic chondrocyte size, and the findings at 12 weeks were similar to those of WT mice at 24 weeks (Fig. 2C).