

**Fig. 1A–C.** Effect of Arg-Gly-Asp motif (RGD) peptides on the viability of cultured chondrocytes and synovial cells. Cells were incubated in serum-free medium supplemented with 1 or 5 mM RGD, RGDS, GRGDSP, GRGDNP, and RGE5 for 48 h. Survival rate was expressed as the percentage of live cells. **A** Fluorescence microscopy of chondrocytes treated with 5 mM GRGDSP and stained using the Live/Dead Double Staining Kit (MBL). Live cells were stained only with CYTO-Dye (MBL), and dead cells were stained with both CYTO-Dye and propidium iodide (PI). Thus, the dead cells were seen

in yellow in a merged image. **B** Viability of cultured chondrocytes. The viability was significantly decreased in cells treated with 1 and 5 mM GRGDSP and GRGDNP. **C** Viability of cultured synovial cells. The viability was significantly decreased in cells treated with 5 mM of four of the five peptides and in cells treated with 1 mM of RGDS and GRGDSP. Results are shown as means and SD;  $n = 5$ . The value of  $*P < 0.05$  was considered significant when compared to RGE5-treated cells and control. **A**,  $\times 100$

synovial cells. The labeled peptide was incorporated into the cytoplasm, but not the nucleus (Fig. 3).

#### Caspase activity induced by RGD peptides

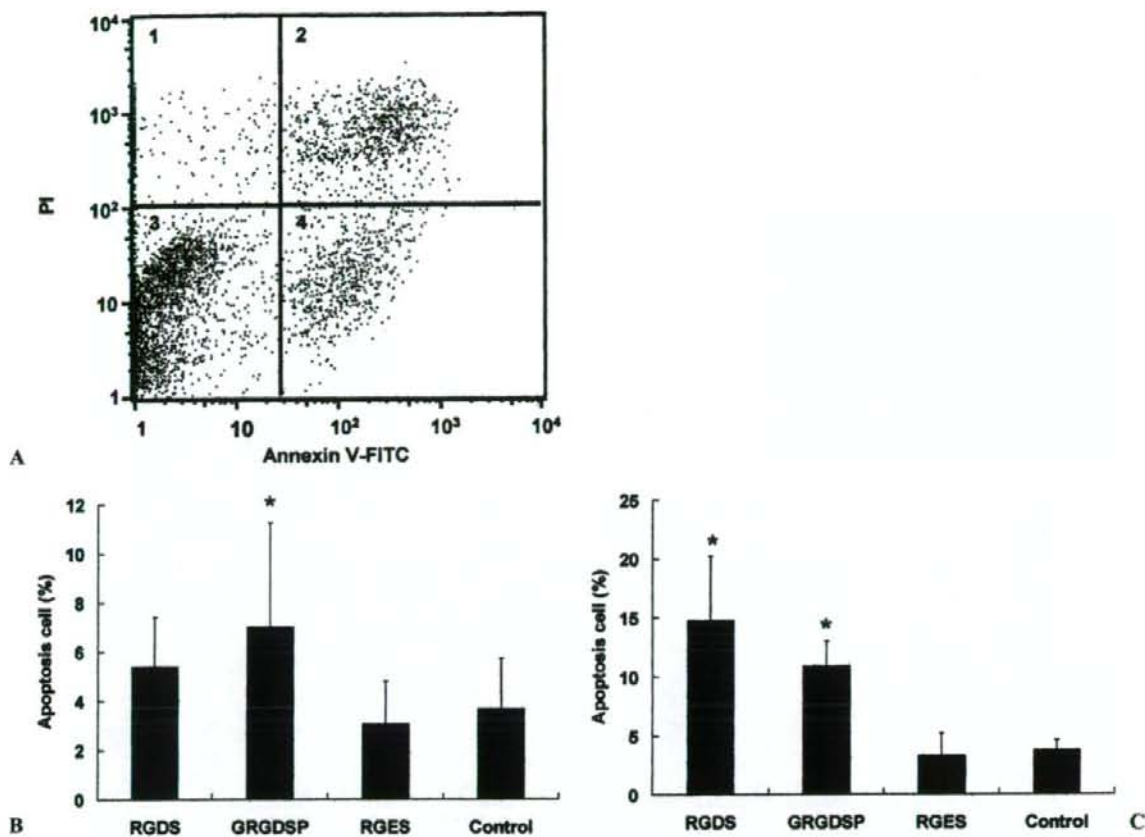
The activity of caspase-3 was significantly elevated in chondrocytes treated with 5 mM GRGDSP for 4 h compared to control (Fig. 4A;  $215 \pm 74 \mu\text{M}$  pNA and  $32.7 \pm 6.9 \mu\text{M}$  pNA, respectively). However, no significant activation of caspase-8 and -9 was detected in chondrocytes.

The activity of caspase-3 was significantly elevated in synovial cells treated with 5 mM RGDS and GRGDSP for 4 h compared to control (Fig. 4B,  $143 \pm 64 \mu\text{M}$  pNA,

$210 \pm 107 \mu\text{M}$  pNA, and  $48.6 \pm 12.7 \mu\text{M}$  pNA, respectively). However, the activity of caspases-8 and -9 in synovial cells was not elevated.

The activity of caspase-3 was significantly elevated in chondrocytes treated with 1 mM GRGDSP for 24 h compared to control (Fig. 4C,  $57.3 \pm 3.1 \mu\text{M}$  pNA and  $35.4 \pm 11.5 \mu\text{M}$  pNA, respectively). However caspases-8 and -9 were not activated.

The activity of caspase-3 was significantly elevated in synovial cells treated with 1 mM RGDS or GRGDSP for 24 h compared to control (Fig. 4D,  $133 \pm 16 \mu\text{M}$  pNA,  $155 \pm 43 \mu\text{M}$  pNA, and  $87.0 \pm 22.0 \mu\text{M}$  pNA, respectively). However caspases-8 and -9 were not activated.



**Fig. 2A–C.** Flow cytometric analysis with Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC). Cells were incubated in serum-free medium supplemented with 5 mM of RGDS, GRGDSP, and RGES for 4 h. Then, cells were treated with the MEBCYTO apoptosis kit (MBL) and analyzed with a FACScan cytometer (Beckton-Dickinson). **A** Representative result of FACScan (synovial cells treated with RGDS). *Quadrants 2, 3, and 4* represent necrotic cells, live cells, and apoptotic cells, respectively. In this case, the percentage of apoptotic cells was 11.8%. **B** The percentage of apoptotic cells in chon-

drocytes ( $n = 5$ ). The percentage of apoptotic cells was significantly higher in the cells treated with GRGDSP, compared to RGES-treated cells and control. **C** The percentage of apoptotic cells in synovial cells ( $n = 4$ ). The percentage of apoptotic cells was significantly higher in the cells treated with both RGDS and GRGDSP, compared to RGES-treated cells and control. Results are shown as means and SD. The value of  $*P < 0.05$  was considered significant when compared to RGES-treated cells and control

#### Viability of chondrocytes in osteochondral explants

A confocal microscopic image of an osteochondral explant treated with RGD peptide is shown in Fig. 5A. There was no difference in survival rate between the medial and the lateral condyle (data not shown). The survival rate in the superficial layer was significantly decreased in cartilage treated with all three RGD peptides (Fig. 6; RGDS,  $76.5 \pm 5.2\%$ ; GRGDSP,  $77.3 \pm 4.1\%$ ; and GRGDNP,  $78.8 \pm 12.2\%$ ), compared to control ( $95.0 \pm 2.9\%$ ). In the middle layer the survival rate was significantly decreased in the GRGDSP-treated

group only ( $79.8 \pm 3.6\%$ ). There was no significant difference in survival rates between the superficial and middle layer.

#### Discussion

##### *RGD peptide-induced apoptotic cell death and its pathway*

The present study demonstrated that RGD peptides were incorporated into the cytoplasm of both chondro-

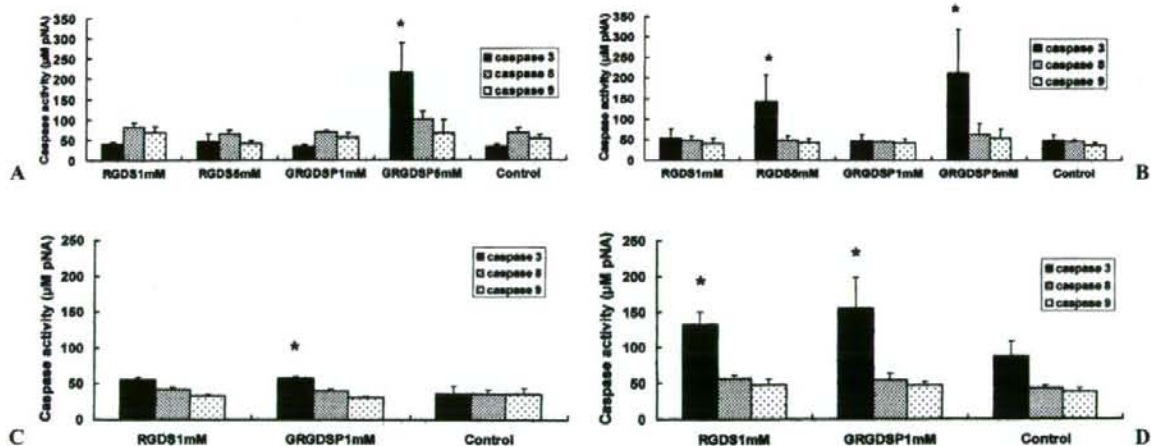
cytes and synovial cells, and they induced cell death by activating caspase-3, presumably not by disturbing integrin-mediated attachment on the cell surface (anoikis). The cell death pathway appeared to be the same in both types of cells, where caspases-8 and -9 were skipped and caspase-3 was directly activated. In



**Fig. 3.** Fluorescence microscopy of synovial cells treated with FITC-labeled RGDS. Cells were incubated in serum-free medium supplemented with 5 mM of peptide for 2 h. The fluorescence was confined to the cytoplasm, while the nucleus was void of the labeled peptides (arrow).  $\times 100$

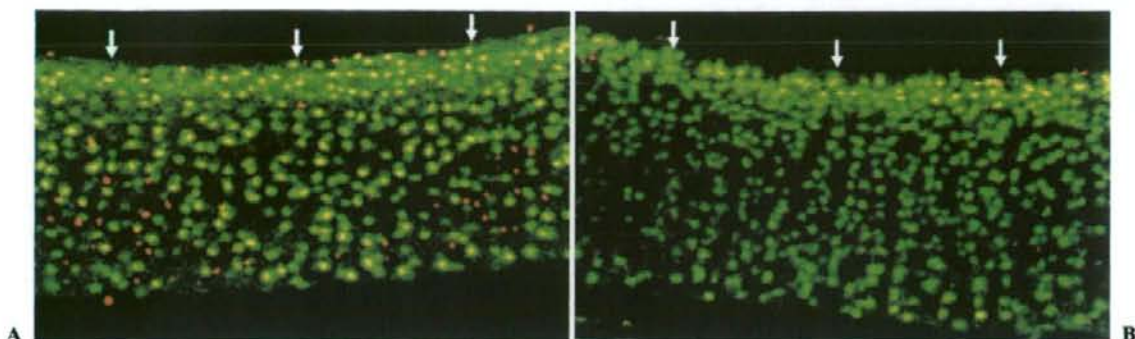
the caspase activity assay, only caspase-3 was highly activated, while caspases-8 and -9 were inactive after 4-h and 24-h incubation with RGD peptides. Although we presented data at only two time points, this finding implied that caspase-3 was the only caspase that was activated by RGD peptide in the first 24 h, because previous studies demonstrated that elevated activities of caspases induced by administering RGD peptide persisted for more than 24 h.<sup>11,12</sup> Buckley et al.<sup>5</sup> reported that RGD peptides bound to a DDM sequence of pro-caspase-3 and promoted auto-processing to activate caspase-3 in lymphocytes. The same mechanism could be operating in chondrocytes and synovial cells. On the other hand, Aguzzi et al.<sup>13</sup> suggested that RGDS peptide induced early activation of caspases-8 and -9 with 4-h treatment and late activation of caspase-3 with 24-h treatment in endothelial cells. Caspases-8 and -9 are thought to be activated prior to caspase-3 in the caspase cascade.<sup>14</sup> The difference in cell type might explain the difference in the manner of caspase-3 activation.

No previous report has examined the effect of RGD peptides on chondrocytes in an explant system. According to the results with cultured chondrocytes, we



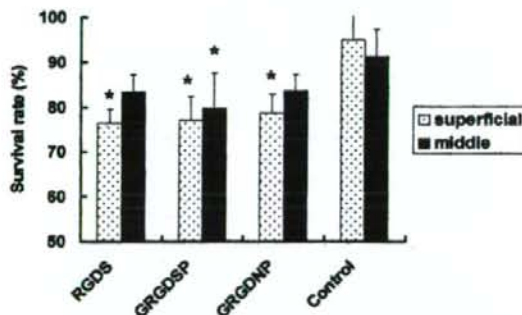
**Fig. 4A–D.** Effect of RGD peptides on caspase activity. Cells were incubated in serum-free medium supplemented with 1 or 5 mM of RGDS and GRGDSP for 4 or 24 h. The activity of caspases-3, -8, and -9 was measured with the APOPCYTO (MBL) colorimetric assay kit. Caspase activity was calculated by measuring the amount of free p-nitroanilide (pNA) released from the substrates with a microplate reader. **A** Activity of caspases-3, -8, and -9 in chondrocytes after 4-h treatment. The activity of caspase-3 was significantly elevated in the cells treated with 5 mM of GRGDSP, compared to control. The activity of caspases-8 and -9 was not elevated in cells treated with any of the peptides. **B** Activity of caspases-3, -8, and -9 in synovial cells after 4-h treatment. The activity of caspase-3 was significantly elevated in the cells treated with 5 mM of

RGDS and GRGDSP, compared to control. The activity of caspases-8 and -9 was not elevated in cells treated with any of the peptides. **C** Activity of caspases-3, -8, and -9 in chondrocytes after 24-h treatment. The activity of caspase-3 was significantly elevated in the cells treated with 1 mM of GRGDSP, compared to control. The activity of caspases-8 and -9 was not elevated in cells treated with any of the peptides. **D** Activity of caspases-3, -8, and -9 in synovial cells after 24-h treatment. The activity of caspase-3 was significantly elevated in the cells treated with 1 mM of RGDS and GRGDSP, compared to control. The activity of caspases-8 and -9 was not elevated in cells treated with any of the peptides. Results are shown as means and SD;  $n = 4$ . The value of  $*P < 0.05$  was considered significant when compared to control



**Fig. 5A,B.** Confocal microscopy of cartilage stained using the Live/Dead Double Staining Kit (MBL). Live cells are stained green and dead cells are seen in yellow. Arrows indicate the surface of cartilage. **A** Cartilage harvested from lateral condyle

of tibia treated with 5 mM of GRGDSP. Dead cells are seen in both the superficial and middle layers. **B** Control cartilage from lateral condyle. Very few dead cells are observed. **A** and **B**  $\times 50$



**Fig. 6.** Effect of RGD peptides on the viability of chondrocytes in osteochondral explants. Osteochondral explants were incubated in serum-free medium supplemented with 5 mM of RGDS, GRGDSP, and GRGDNP for 48 h. Survival rate was expressed as the percentage of live cells. In the superficial layer, the viability of chondrocytes was decreased in cartilage treated with all three peptides. In the middle layer, the viability was decreased in cartilage treated with GRGDSP. Results are shown as means and SD;  $n = 4$ . The value of  $*P < 0.05$  was considered significant

speculated that administering RGD peptides into an osteochondral explant would induce chondrocyte cell death by entering the cytoplasm and activating caspase-3. Furthermore, as fibronectin fragments of 29-, 50-, and 450 kDa in the synovial fluid were reported to penetrate cartilage tissue and cause cartilage damage,<sup>15,16</sup> RGD peptides, which are much smaller than fibronectin fragments, must be capable of penetrating cartilage tissue. Therefore, we studied the effect of RGD peptides on chondrocytes in an explant system, especially with an intact cartilage surface instead of using pieces of carti-

lage. As a result, significant cell death was detected. The same pathway as that in cultured chondrocytes might work in an explant system. However, we did not demonstrate direct evidence of caspase-3 activation.

#### Sequence dependent sensitivity

Chondrocytes showed different sensitivities to the RGD sequences. In cultured chondrocytes, GRGDSP and GRGDNP showed strong induction of cell death but RGD and RGDS did not. This difference was also observed in the caspase activity assay, where GRGDSP activated caspase-3, but RGDS did not. In contrast, RGD, RGDS, GRGDSP, and GRGDNP significantly decreased the survival rate of cultured synovial cells, in accordance with caspase-3 activation by both RGDS and GRGDSP. This suggests a sequence-dependent difference as well as a cell-type-dependent difference in the induction of cell death. The results of the present study on cultured chondrocytes were consistent with a previous report,<sup>10</sup> while no report has referred to the RGD-induced apoptosis of synovial cells. Further investigations are required to examine the mechanisms of sequence-dependent induction of cell death.

#### Significance of RGD peptide-induced cell death

The structural changes observed in osteoarthritis (OA) are complex and of multifactorial origin, including matrix degeneration and morphological changes of chondrocytes. Many reports have indicated that chondrocyte apoptosis plays an important role in the initiation and progression of OA.<sup>17-22</sup> Chondrocytes are known to decrease while apoptotic cells increase with age in animal models and humans.<sup>17,22,23</sup> Several factors

have been proposed as inducers of chondrocyte apoptosis, such as nitric oxide (NO).<sup>24,25</sup> Degradation of the cartilage matrix occurs during the development of OA.<sup>18,19</sup> These processes produce small fragments of ECM proteins. Fibronectin fragments have been found in the synovial fluid of OA patients,<sup>26</sup> and these fragments have been reported to cause chondrolysis of articular cartilage in bovine articular cartilage.<sup>15,16</sup> Fragments containing the RGD sequence must be present among them and may be one of the main inducers of apoptosis of chondrocytes. This may be an important process in the development or progression of OA and has implications for treatment in preventing the progression of OA. Morphological changes in the synovial membrane were observed in an experimental model of OA joints.<sup>27</sup> Apoptosis of synovial cells was also observed in OA joints.<sup>28</sup> An anterior cruciate ligament (ACL) transection model and meniscectomized model are commonly used as animal models for OA knees.<sup>20,22</sup> However, these models lead to post-traumatic secondary OA and are not ideal for studying primary OA, which is an important problem in an aged society. Our results indicate that cartilage matrix is permeable to RGD peptides and these peptides induce apoptotic cell death of chondrocytes. Administering RGD peptides into the knee joint may possibly produce a new animal model suitable for studying primary OA. Attendant synovial cell death may also enhance OA changes. On the other hand, RGDS, which preferentially induced cell death in synovial cells, might be useful for treating synovial proliferating conditions such as rheumatoid arthritis or pigmented villo-nodular synovitis.

## Conclusion

In conclusion, we investigated RGD-peptide-induced apoptosis of chondrocytes and synovial cells. RGD peptides induced apoptotic cell death in cultured chondrocytes and synovial cells, as well as in chondrocytes in explants via the activation of caspase-3.

The authors did not receive and will not receive any benefits or funding from any commercial party related directly or indirectly to the subject of this article.

## References

- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984;309:30-3.
- Vitale M, Matola TD, Fenzi G, Illario M, Rossi G. Fibronectin is required to prevent thyroid cell apoptosis through an integrin-mediated adhesion mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3673-80.
- Watanabe Y, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor inhibits anchorage-disruption-induced apoptosis in microvessel endothelial cells by inducing scaffold formation. *Exp Cell Res* 1997;233:340-9.
- Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:555-62.
- Buckley CD, Pilling D, Henriquez NV, Parsonage G, Threlfall K, Scheel-Toellner D, et al. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* 1999;397:534-9.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.
- Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-6.
- Straub RH, Gunzler C, Miller LE, Cutolo M, Scholmerich J, Schill S. Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *FASEB J* 2002;16:993-1000.
- Perlot RL Jr, Shapiro IM, Mansfield K, Adams CS. Matrix regulation of skeletal cell apoptosis II: role of Arg-Gly-Asp-containing peptides. *J Bone Miner Res* 2002;17:66-76.
- Huang TC, Huang HC, Chang CC, Chang HY, Ou CH, Hsu CH, et al. An apoptosis-related gene network induced by novel compound-cRGD in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 2007; 581:3517-22.
- Adderley SR, Fitzgerald DJ. Glycoprotein IIb/IIIa antagonists induce apoptosis in rat cardiomyocytes by caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000;275:5760-6.
- Aguzzi MS, Giampietri C, De Marchis F, Padula F, Gaeta R, Ragone G, et al. RGDS peptide induces caspase 8 and caspase 9 activation in human endothelial cells. *Blood* 2004;103:4180-7.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998;1:949-57.
- Homandberg GA, Meyers R, Xie DL. Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *J Biol Chem* 1992;267:3597-604.
- Xie DL, Homandberg GA. Fibronectin fragments bind to and penetrate cartilage tissue resulting in proteinase expression and cartilage damage. *Biochim Biophys Acta* 1993;1182:189-96.
- Adams CS, Horton WE Jr. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec* 1998; 250:418-25.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995;146:75-85.
- Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, DeToro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. *Arthritis Rheum* 1998;41:284-9.
- Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1266-74.
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1632-8.
- Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 2000;43:1290-9.
- Mitrovic D, Quintero M, Stankovic A, Ryckewaert A. Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest* 1983;49:309-16.
- Horton WE Jr, Feng L, Adams C. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biol* 1998;17:107-15.

25. Lotz M, Hashimoto S, Kühn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:389-91.
26. Homandberg GA, Wen C, Hui F. Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:231-44.
27. Lukoschek M, Schaffer MB, Burr DB, Boyd RD, Radin EL. Synovial membrane and cartilage changes in experimental osteoarthritis. *J Orthop Res* 1988;6:475-92.
28. Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest* 1995;96:1631-8.

## MRIを用いた重症度評価法に基づく 変形性膝関節症に対する治療法の選択

千葉大学大学院 整形外科

佐粧 孝久, 鈴木 昌彦, 中川 晃一, 落合 信靖,  
松木 恵, 高橋 和久

鹿島労災病院

守屋 秀繁

## Treatment Choice for Osteoarthritis of the Knee Joint According to Semi-automatic MRI based Assessment of Disease Severity

Takahisa SASHO, et al.

Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University

### *Abstract*

**Introduction:** Objective assessment of disease severity of osteoarthritis of the knee joint (OA knee) is fundamental to establish adequate treatment system. Regrettably, there is no such a reliable system. Grading system based upon X-ray findings or measurement of joint space narrowing is widely used method for this purpose but they are still far from satisfaction. Our previous study elucidated that measuring irregularity of the contour of the femoral condyle on MRI (irregularity index) using newly developed software enabled us to assess disease severity of OA objectively. Advantages of this system are expressing severity by metric variable and semi-automatic character. In the present study, we examined relationship between treatment selection and irregularity index.

**Material and Methods:** Sixty-one medial type OA knees that received total knee arthroplasty (TKA), arthroscopic surgery (AS), and conservative treatment (CT) were involved. Their x-ray grading, irregularity index were recorded at the time of corresponding treatment. Irregularity index of each group were compared. As for AS group, pre- and post-operative knee score employing JOA score were also examined to study relationship between irregularity index and improvement of knee score.

**Results:** 1) All the four parameters that represent irregularity of femoral condyle were significantly higher in TKA group than in AS group, whereas no significant difference was observed between AS

---

**Keywords:** MRI, Osteoarthritis of the knee, irregularity, severity, software  
(受理 : 2008.3.25)

group and CT group. 2) Negative correlation was observed between irregularity index and improvement of knee score after arthroscopic surgery.

**Discussion:** Although treatment selection was determined by skillful knee surgeon in this series, irregularity index could indicate adequate timing of TKA. It also served as an indicator to predict outcome of arthroscopic surgery, and could be used as to show limitation of arthroscopic surgery.

**Conclusion:** Our new system to assess disease severity of OA knee can serve as an index to determine treatment options.

## はじめに

高齢社会となった現在、変形性膝関節症（以下膝OA）に対する適切な治療体系を確立していくことが求められている。そのためには客観的な重症度の評価法が必要となる。またこうした評価法は、治療効果や予後予測などに応用できると考えられる。

画像検査も評価法のひとつであり、レントゲン検査が汎用されている。しかし客観的な重症度の指標としての信頼度は決して高いものではない<sup>1)</sup>。さらには、1) 汎用されているレントゲンによるグレーディングシステムはさまざまな状態を呈する患者を単に4段階や5段階に分類するものであること、2) 関節裂隙を測定する方法では、関節裂隙自体が1年に0.1から0.2 mm程度しか変化しないものであるため鋭敏な検査であるとはいえないこと<sup>2)</sup>、などの問題点がある。そこで、われわれは膝OAが進行するに従い明らかとなってくるMRIで描かれる大腿骨顆部の輪郭の不整に着目し、不整度を数値化し、重症度の指標とできないかをこれまでに検討してきた。その結果、大腿骨顆部輪郭の不整度が膝OAの客観的な重症度の指標となりえることを明らかにした<sup>3)</sup>。現在では計測するソフトウェアを改良し、半自動的に不整度の計測が可能となっている<sup>4)</sup>。

将来的な治療体系の確立を考えた場合、大腿骨顆部輪郭の不整度を評価する方法を応用し、各症例の客観的な重症度を評価することで、個々の症例に対し適切な治療法の選択肢を提示することが可能になっていくことが期待できる。そのための端緒として、今回は不整度と実施され

た治療法の関係を検討し、不整度が治療法を選択する際の指標となりうるかどうかを検討してみた。

## 対象と方法

### 1) 対象

平成15年9月から平成17年4月までの間に、当施設において人工膝関節（TKA）、関節鏡手術（AS）、保存的治療法（CT）を受けた膝OA症例のうち、レントゲン分類のKellgren & Lawrence分類（K/L）でグレードがⅢ以上であった62膝を対象とした。

TKA群は31膝、女性25膝、男性6膝である。平均年齢は72.8歳であった。K/LグレードはⅢが4膝、Ⅳが27膝であった。AS群は18膝、女性12膝、男性6膝であった。平均年齢は69.6歳である。K/LグレードはⅢが3膝、Ⅳが15膝であった。CT群は13膝、女性10膝、男性3膝で平均年齢は70.2歳である。K/LグレードはⅢが8膝、Ⅳが5膝であった。

### 2) 不整度の計測

不整度を計測する手順であるが、第一にMRIの元の画像データ（DICOM data）をコンピュータに取り込み、白黒画像化し、大腿骨内側化の輪郭のみを抽出する。その後専用開発されたソフトウェアにより、抽出された輪郭に対し、自動的に輪郭の厚みの平均（Average Thickness of Subchondral plate: ATS）、厚みのばらつき（Standard Deviation of the thickness of the Subchondral plate: SDS）、厚みの2乗の平均（Average Squared Thickness of the Subchondral plate: ASTS）、輪郭の上縁の長さ下縁の長さの比（Ratio of



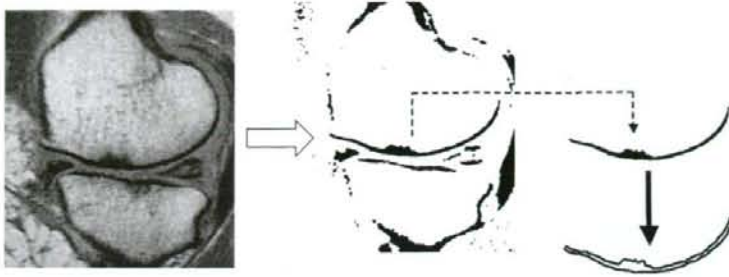


図1 MRIによる大腿骨内側顆の輪郭の評価法

MRI画像のデータ (DICOM) をコンピュータの取り込み、白黒画像へと変換する (⇔)。その後大腿骨内側顆の輪郭のみを抽出し (---▶), 抽出された輪郭の上縁と下縁をトレースしたのち、ピクセル毎に輪郭の幅 (上縁と下縁の間の距離) と上縁と下縁の長さの比が計測される。

表1 各治療群の不整度

	TKA (N=31)	AS (N=18)	CT (N=13)
ATS	8.2±2.6	* 5.8±1.2	5.4±2.5
			N.S.
RUL	1.21±0.12	* 1.114±0.07	1.09±0.11
			N.S.
ASTS	96.7±70.1	* 40.0±16.3	60.9±60.1
			N.S.
SDS	4.1±1.5	* 2.7±0.8	2.1±1.4
			N.S.

the length of Upper surface and the Lower surface of the subchondral plate: RUL) が計算される<sup>4)</sup> (図1)。

### 3) 不整度と治療法の関係

検討1としてTKA, AS, CT群の不整度の計測と比較を施行した。また検討2として関節鏡手術を受けた群の術後成績と術前の不整度の関係を調べた。なお, AS群の術後成績はJOAスコアと4段階の満足度調査で行った。4段階とは, 大変満足である, 満足である, どちらともいえない, 不満である, である。

4) 統計学的検討にはMann-WhitneyのU検定, 相関係数を用いた。

## 結 果

### 検討1

各治療群の不整度を表1に示した。ATS, SDS, ASTS, RULの4つの不整度をあらゆるパラメータもTKA群とAS群間では有意差があった。しかし, AS群とCT群間では有意差がなかった (表1)。各群への治療の振り分けは, 患者の要望, 社会的背景, 身体所見な

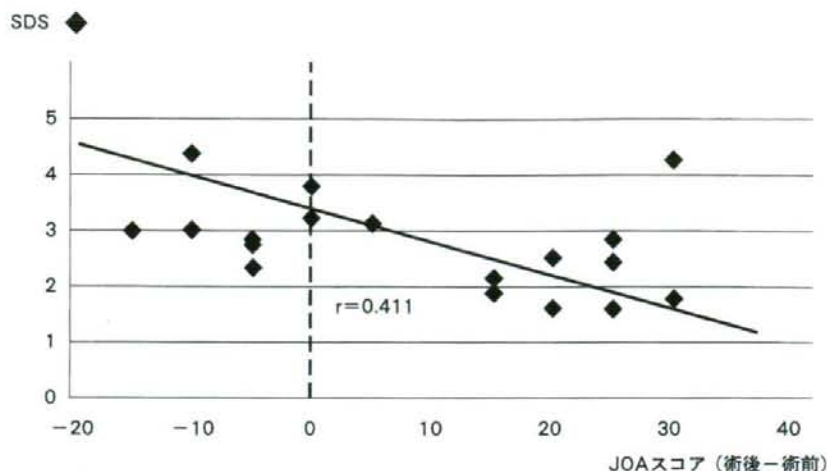


図2 不整度 (SDS) とJOAスコアの変化  
AS群を縦軸にSDSとし横軸にJOAスコアの変化 (術後-術前) としてプロットすると、負の相関があることがわかった。

どの各種要素を勘案した上で経験ある整形外科医が決定していたわけだが、結果として不整度はTKA群においては明らかに高くなっていった。すなわち不整度はTKAの適応を決める指標となり得ると言えそうである。

## 検討 2

検討 2 では関節鏡手術症例の不整度と術後成績の関係を調べた。術後観察期間は1年9ヵ月から3年8ヵ月で、平均で2年9ヵ月であった。

全症例のJOAスコアは術前平均63.1点が術後平均71.9点に改善していた。

JOAスコアの改善点と不整度の4つのパラメータとの関係を調べたところSDSにのみ弱いながら負の相関のあることがわかった (図2)。すなわち不整度の高かった症例ほど術後成績の改善が見られないことを意味する。

ついでSDSの値で2群に分けてみると、満足度の調査でも不整度の少ない群において満足度の高いことがわかった (図3)。

図4に代表的な4つの症例を提示するが、左の2膝は改善のよかった症例であり、右の2膝は改善の得られなかった症例である (図4)。

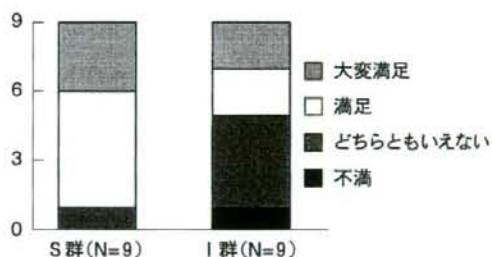


図3 不整度と満足度  
SDSの値により症例を半分に分け、低値の群 (S群)、高値の群 (I群) とするとS群において9症例中、3症例が「大変満足」、5症例が「満足」と回答しており満足度の高いことがわかった。一方I群では満足度が低かった。

いずれの症例も内側型膝OAであり、レントゲン所見上は症例1の関節症性変化が少ないことがわかるが、症例2, 3は同程度の変化である。また4症例いずれも内側コンパートメントの矢状断像MRIにおいては大腿骨内側顆の前方に同程度の骨棘の形成が見られる。症例1のみは内側半月板が描出されているが、症例2, 3, 4では描出されていない。また、今回計測した大腿骨内側顆の不整度であるが、症例1では不整度が軽度であることは肉眼的に判断できるが、



図4 不整度 (SDS) と代表例の画像所見

代表症例を4例、左からSDSの少ない順に並べ提示した。いずれも内側型膝OAであるが、不整度の差異を肉眼的に判定することが困難であることがわかる。

症例2, 3, 4では不整度の大きさを肉眼的に判定するのは困難である。

## 考 察

今回の検討の結果、大腿骨内側顆の不整度はTKAを適応する際の指標として、また関節鏡手術を適応とする際の指標となり得ることが示唆された。我々はこれまでに、不整度がJOAスコア、Lysholmスコア、JKOMと負の相関のあること、疼痛の強さのVisual analogue scale (VAS) スコアとは正の相関を持つことを示してきた<sup>4)</sup>。すなわち、不整度が膝OAの客観的な重症度の指標となることを示してきたのである。従って今回の結果はある程度までの重症度であれば関節鏡手術で対応でき、ある一定の段階を超えた場合はTKAを適応するのがよいのであるという、ある意味では当たり前のことであろうが、この事実を数字で示した新しい知見である。手術の適応に関しては医師の裁量に負うところが大きいのが現実であろうが、適切な治療体系の確立にはある程度の客観的な指標が必要であり、不整度はその一つの手段となり得ると考えられる。

今回は関節鏡手術と保存療法群の間には不整度の差がなかった。この理由として、ひとつには関節鏡手術が適応となるような症例では、変性断裂した半月板が症状の発現に関与している可能性があるが、不整度計測では半月板を無視していることが挙げられる。また、ふたつめとして保存療法を受けることとなった症例の中にはMRI検査が必須の検査項目ではなく、未実施の症例が存在する。今回の検討の保存療法群はMRI検査が施行された症例に限られているためバイアスがかかっていることが考えられる。いずれにしろ不整度という単一の指標のみにて各種治療法の適応を決めることは困難ではあり、他の方法と組み合わせることがよりよい指標作りには必要となることが考えられる。Peterfyらが報告したWhole Organ Magnetic Resonance Imaging (WORMS) 法は半月板、滑膜、靭帯などの要素も評価する方法であり、不整度計測の欠点を補うものである可能性がある<sup>5)</sup>。

輪郭が不整となることについての病理学的な意義であるが、MRIでの顆部の輪郭とは軟骨下骨領域に相当すると考えられる。われわれは

これまでにOA罹患膝の軟骨下骨の免疫組織学的検討を行っており、不整度の強い部位では、軟骨下骨領域にCOX-2, TNF- $\alpha$ , サブスタンスPなどが高率に存在することを示してきた<sup>6,7)</sup>。Suriらも指摘するように軟骨下骨が疼痛の原因組織の一つと考えられるのである<sup>8)</sup>。すなわち、不整度の高低は軟骨下骨が疼痛を生ずる組織へと変化している程度を表しているものと考えられる。

こうしたことからわれわれはTKAによる除痛のメカニズムとして、骨切りにより病的な状態に陥った軟骨下骨を取り去るデブリードマン効果と考えている。よって不整度の計測は骨を温存する治療法の限界を表しているのかもしれない。

### ま と め

内側型OAの客観的な重症度を評価する方法である大腿骨内側顆の不整度計測法が治療法の適応を決定する際の指標となり得ることを示した。

### 文 献

- 1) Vilalta C., Nunez, M., Dequr, J. M., et al.: Knee osteoarthritis: interpretation variability of radiological signs. Clin. Rheumatol., 23:501-504, 2004.
- 2) 山田治基, 金治有彦, 伊藤秀樹, 他: 関節マーカーによる変形性関節症の病態評価とその臨床応用. 日整会誌 81:22-28,2007.
- 3) Iwasaki, J., Sasho, T., Nakagawa, K., et al.: Irregularity of medial femoral condyle on MR imaging serves as a possible indicator of objective severity of medial-type osteoarthritic knee-a pilot study. Clin. Rheumatol., 26:1705-1708,2007.
- 4) 佐樫孝久, 中川晃一, 鈴木昌彦, 他: MRIを用いた変形性膝関節症の客観的な重症度評価指数の確立. 日整会誌, 81:29-35,2007.
- 5) Peterfy, C. G., Guermazi, A., Zaim, S., et al.: Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage, 12:177-190,2004.
- 6) Ogino, S., Sasho, T., Suzuki, M., et al.: Origin of osteoarthritic knee pain -immunohistochemical analysis of subchondral bone Trans. O.R.S., 246, 2006.
- 7) Ogino, S., Sasho, T., Suzuki, M., et al.: Origin of osteoarthritic knee pain -immunohistochemical analysis of subchondral bone -second report- Trans. O.R.S., 134, 2007.
- 8) Suri, S., Gill, S. E., Massena, C. S., et al.: Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis., 66:1423-1428,2007.

# 変形性膝関節症に対するMRIを用いた重症度評価法に基づく治療法の選択

佐粧孝久, 落合信靖, 松木 恵, 高橋和久

千葉大学大学院医学研究科整形外科

中口俊哉, 三宅洋一

千葉大学工学部

変形性膝関節症(膝OA)は国内の患者数が1,000万人を超えると推定されるほど非常に頻度の高い疾患である。高齢者の日常生活動作に大きな影響をもつ疾患であるため、高齢社会においてますます重要性を増している。ありふれた疾患ともいえるが、わが国でも大規模コホートを用いた研究がなされるなど、本疾患に対する医療側の取り組みも盛んになってきた。一般的にも関心の高い疾患であり、膝によいとのうたい文句で多数の健康食品が宣伝されており、しばしばマスコミにも取り上げられている。

膝OAは長い目でみると徐々に進行していく疾患であるため、進行の過程をなんらかの形でステージ分けすることや、重症度をグレーディングすることなどが可能となるはずである。重症度を客観的に評価することは、疾患の状態を把握するために必要となるものであり、治療が必要な際には治療法を選択するための指標となりえるものと考えられる。

疼痛を主訴とすることが多い疾患であるために、症状の程度を患者自身が主観的に評価する方

法も重要ではあるが、治療指針を確立していくためには客観的な重症度の評価法を確立することが必須となる。その方法として屈曲拘縮の程度や膝可動域といった身体所見、血液・尿・関節液を試料とするバイオマーカー、歩行分析、X線像を始めとする画像検査などが考えられる。

このなかで緊用されているのがX線検査に基づくグレーディング法である。グレーディング法にはいくつかの種類があるが、代表的なものはKellgren & Lawrenceのグレーディング法であり、国際的にも広く使われている。この方法は簡便な方法であるという大きな利点をもつが、重症度を評価する方法として信頼性があるかどうかとなると議論のあるところである。

より信頼度の高い画像評価法を確立することを目的に、著者らはこれまでにMRIを用いた重症度評価法の作成に取り組んできた。以下、この方法をを紹介するとともに、本法に基づく治療法を選択につき症例を提示し、また、今後の展望や問題点についても記す。

## 開発の経緯

膝OAに対して客観的な重症度の評価法が必要であるとの認識から、著者らがMRIを用いて膝OAの重症度評価法に取り組み始めたのは2000年からである<sup>1)</sup>。この検討により、内側型膝OAにおいて、大腿骨内側顆の軟骨下骨領域に現れる変化が重症度の指標となりえるという結論が得られた。この検討を施行するにあたり、コンピュータによる画像解析の手法を取り入れ始めた。また、鏡視下後内側分離術(postero-medial release; PMR)の術後成績を検討した際にも、MRIに基づく評価法が有用であることを示した<sup>2)</sup>。ここでも膝OAが進行してくると明らかになってくるMRI上の大腿骨内側顆の軟骨下骨領

域に相当する部位にみられる変化に着目したのである。

こうした変化は換言すると大腿骨顆部の輪郭の不整像といえる。平たくいうと輪郭がどの程度ギザギザしてきているかということになる。この不整の程度はフィルムとなったMRIの画像から肉眼的にグレーディングすることも可能ではあったが、よりわかりやすくするために最も単純な画像処理をした。

すなわち最も低輝度にみえている部位のみを抽出したのである。こうすることで肉眼的には最も黒い(低輝度の)と認識される部位のみを取り出し、検者間での差異の低減や再現性を高めることができると考えられた。

しかし、こうした方法によっても検者間の差異や再現性の問題が皆無となるわけではない。

そこで、抽出した輪郭の不整の程度を自動的に計測し、数値として表現できる方法を模索していたところ、ほかの目的に開発されたソフトウェアが応用できそうであったため、試用することとなった。その結果、計測された不整度と膝機能スコアに負の相関関係が認められた<sup>3)</sup>。しかし、この方法ではいくつかの問題点があったため、さらに精度の高い測定法を確立するために専用のソフトウェアを開発するに至った<sup>4)</sup>。その後も改良を重ね現在に至っている。

## 撮像準備

不整度を測定するためのソフトウェアであるが、Matlab6.5(サイバーネットシステム社)を用いてプログラミングした。このソフトウェアが施行する計測法の概要を示す。

第1段階は撮像したデータ(DICOM data)をPCに取り込むことである。当初はMRIフィルムをスキャナーに通してからPCに取り込んでいたが、フィルムとなることで生じる誤差を低減するために、MRIのデータを直接取り込めるようにした。

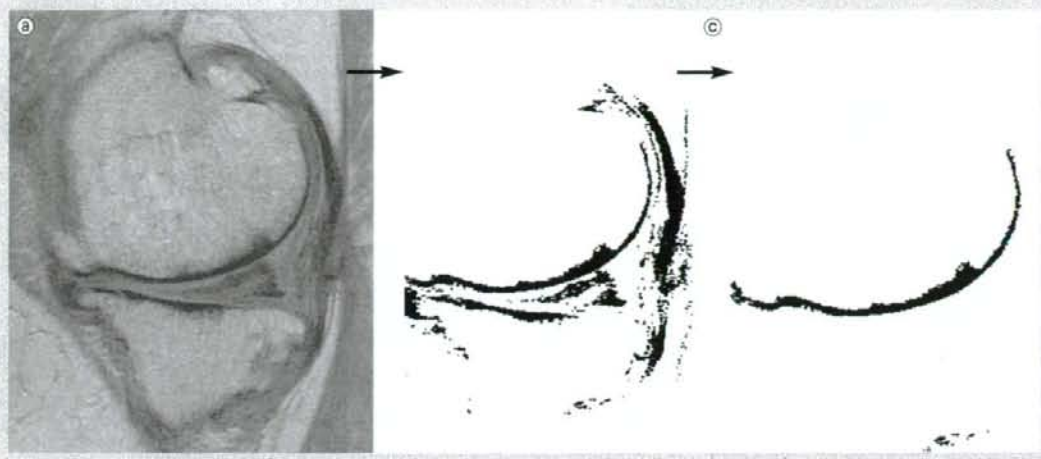
第2段階では、取り込んだ画像を白黒画像に変換する(図1①→②)。そのためにMRIを構築するピクセルの濃淡の程度と頻度をヒストグラムに提示する。すると症例による差はあるものの主に3つのピークが現れる(図2)。これはMRIが低輝度、中間輝度、高輝度の3つの輝度のピクセルからなることを表すが、低輝度と中間輝度のピクセルを消去することで白黒画像が得られる(図1③)。得られた白黒画像では肉眼的に確認できる大腿骨の顆部の輪郭線と半月板などが残存する。

ここから、第3段階として輪郭のみを抽出し(図1④)、輪郭の上縁と下縁をトレースする。上縁を青色の線が下縁を赤色の線が示している(図3)。

その後不整度に関係する4つのパラメータが計測される。つまり、輪郭の厚みの平均(ATs:これは青線と赤線の間距離の平均ともいえる)、厚みのばらつき

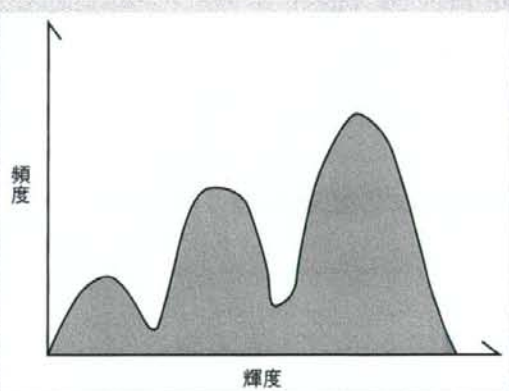
### 図1 輪郭の不整度の測定法

DICOMデータから取り込んだMRIの元画像を白黒画像に変換し、大腿骨顆部の輪郭のみを抽出する過程を示した。



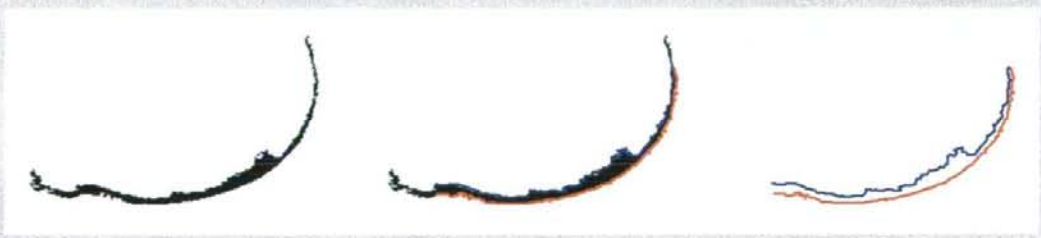
### 図2 MRIを構成するピクセルの分布(概念図)

図1で行った白黒画像への変換であるが、元画像を構成するピクセルの頻度を縦軸に輝度を横軸(右にいくほど明るい)とすると、典型的には3つのピークが現れる。このうち最も左のピークを残すようにして、ほかのピクセルを消去することで白黒画像への変換がなされる。必ずしもピークが3つに限るわけではないため、概念図とした。典型的な3つのピークとならない場合には最も左のピークのみ残すように画像処理をする。



### 図3 抽出した輪郭の画像処理(概念図)

抽出した輪郭の上縁(赤線)と下縁(青線)は自動的にトレースされ、抽出される。実際にはより細い線での抽出であるが、ここでは理解しやすくするために太めの線で示した。



(SDS), 厚みの2乗の平均(ASTS), 輪郭の上縁の長さと同下縁の長さの比(RUL:これは青線と赤線の長さの比である)などが計算されるのである。なお, 輪郭の厚みはピクセルごとに測定される。

## ● 撮像

### ✳ MRI撮像

MRI撮像に使用したのはシグナ1.5テスラ(GE medical system)である。プロトン密度強調矢状断像を検討に用いた。撮像に用いたパラメータは2,000/16ms(TR/TE), FOV: 14cm×14cm, matrix number: 512×512, number of excitation: 2, slice thickness: 3mm, slice gap: 0mm, である。この撮影法では内側コンパートメントは8枚程度となる(骨棘の存在や膝の大きさによる個体差はある)。



各症例においてPCLの大腿骨側の付着部を捉えたスライスから内側に向かって2枚目からの3スライスを測定に用いた。こうすることで内側コンパートメントの中央に相当する部位を検討することが可能となる。

3スライスの平均値が当該膝の値となる。

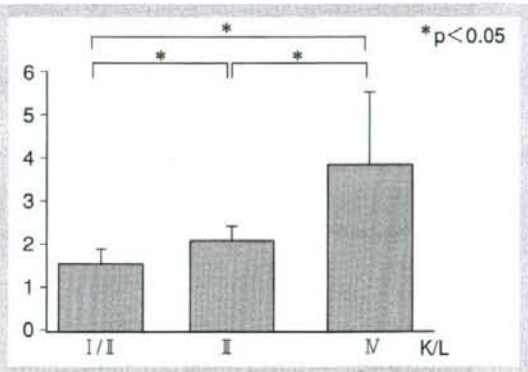
### 不整度による重症度評価 ◆不整度と重症度の関係

こうして計測された不整度と膝機能スコアの関係であるが, 4つのパラメータのいずれもがJOAスコア, JKOM<sup>5)</sup>と負の相関のあることがわかっている。すなわち不整度が大きくなると膝機能スコアが低下する。痛みの程度を調べたVAS(visual analogue scale)の値においても不整度と負の相関のあることが確かめられている<sup>4)</sup>。

さらにX線グレードとの関係であるが, X線のグレードが上昇するに従い, 不整度が上昇することがわかっている(図4)。

図4 X線グレードと膝スコア

Kellgren & Lawrence (K/L)のX線グレードとSDSの関係を示した。グレードが上がるとSDSも上昇し, ばらつきも大きくなっていく。





#### ◆不整度を測定する意義

不整度を測定することはある時点での重症度を評価する方法の1つである。したがって、得られた値は治療法を選択する際の目安となると考えられる。実際に鏡視下後内側分離術の適応としてSDSは有用であることがわかっている。すなわち、不整度がある数値以内であれば鏡視下手術により疼痛の改善が十分に期待できるが、ある値を超えた場合には人工膝関節置換術が望ましいということがわかったのである<sup>9)</sup>。

また、経時的に測定することで膝OAの進行程度をモニターできるものと考えられる。とくに本法では連続する数値として重症度を評価測定できるため、経時的なモニタリングには適していると考えられる。

### FINE SHOT

#### 【代表症例と不整度の関係】

図5に不整度を表す指数の1つであるSDSとMRIの関係を示した。【症例1, 2】のようにX線グレードはともにK/L IVと同様であるが、不整度に大きな差のある症例が存在する。現在までにヒアルロン酸製剤を投与した成績や関節鏡手術の術後成績などから、SDSで3以上であることがTKAの適応と考えられ、2.5以下であることが鏡視下手術または保存療法の適応であると考えられる。ただし症例数がまだ十分ではなく暫定的な値ではある。

図5 X線グレードならびにMRIと不整度指数(SDS)

代表的な症例のX線像とMRIと計測された数値の関係を示した。

㊸：【症例1】75歳、男性。TKAとなった症例で、K/L IV、SDSは4.709と高値である。

㊹：【症例2】66歳、女性。K/L IV、SDSは2.476。

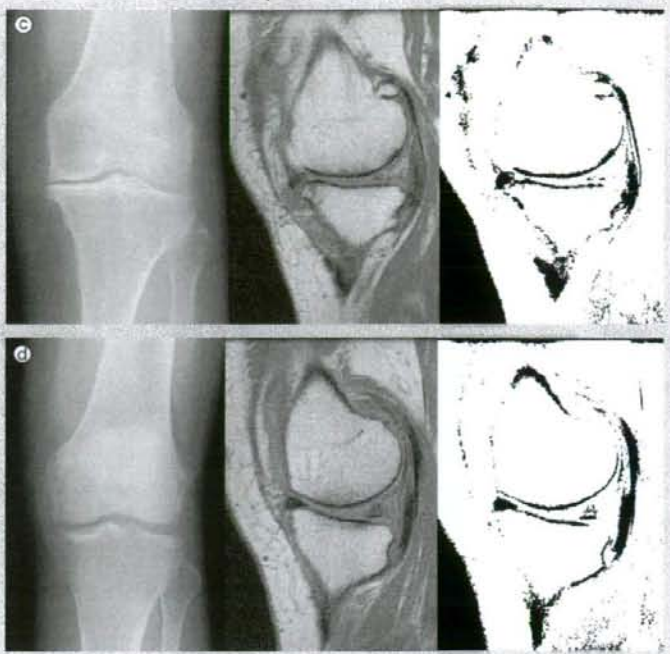


図5 つづき

◎：【症例3】72歳，女性。K/L II，SDSは1.985。

④：【症例4】76歳，女性。K/L II，SDSは1.574。

⑥～④はヒアルロン酸製剤の関節内注入で治療効果が得られた保存療法症例である。



### ● 今後の展望とリミテーション ●

まだまだ改善の余地の多い方法であるが，客観的な重症度評価法が必要とされるなかで臨床的にも有用な方法であると考えている。今後の展望として，現在は二次元での解析であるが，将来的には三次元的な解析ができるようなソフトウェアを開発する所存である。これにより詳細かつ全体的な不整度の程度を測定することが可能になると思われる。このためにはMRI撮像装置が進化する必要があると思われる。また，現在は大腿骨側のみの測定であるが，脛骨側も取り入れることを考慮している。

また本方法のリミテーションであるが，評価の

対象となっているのは軟骨下骨のみであり，ほかの関節内の構成体が評価されていない。一方，最近評価法として使われ始めたWORMS法(Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score of the knee in osteoarthritis)では，半月板，滑膜，骨棘などより広く関節内の組織を評価している<sup>7)</sup>。どちらの方法が優れているか現時点では明らかではないが，比較検討する必要があり，現在検討中である。WORMS法は肉眼的なグレーディングが基本となっているが，自動的な計測という点では不整度法が優れている。

## 文献

- 1) 佐粧孝久, 和田佑一, 中川晃一ほか: 内側型変形性膝関節症の臨床的重症度とMRI所見. 膝, 25: 222-225, 2001.
- 2) Moriya H, Sasho T, Sano S, et al: Arthroscopic posteromedial release for osteoarthritic knees with flexion contracture. Arthroscopy, 20(10): 1030-1039, 2004.
- 3) Iwasaki J, Sasho T, Nakagawa K, et al: Irregularity of medial femoral condyle on MR imaging serves as a possible indicator of objective severity of medial-type osteoarthritic knee-a pilot study. Clin Rheumatol, 26(10): 1705-1708, 2007.
- 4) 佐粧孝久, 中川晃一, 鈴木昌彦ほか: MRIを用いた変形性膝関節症の客観的な重症度評価指数の確立. 日整会誌, 81(1): 29-35, 2007.
- 5) Akai M, Doi T, Fujino K, et al: An outcome measure for Japanese people with knee osteoarthritis. J Rheumatol, 32(8): 1524-1532, 2005.
- 6) 佐粧孝久, 鈴木昌彦, 中川晃一ほか: MRIを用いた重症度評価法に基づく変形性膝関節症に対する治療法の選択. 日本関節病学会誌, 2008, in press.
- 7) Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S, et al: Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage, 12(3): 177-190, 2004.