

綿骨の骨密度が上昇して、海綿骨の荷重分担能が高くなり、より海綿骨全体で荷重を支えることができるようになって、応力の集中がなくなり、ひずみ分布が改善したものと考える。すなわち、ビスフォスフォネートの内服は、椎体内部の骨密度分布を改善し、脊椎の荷重支持構造を強固にさせることで、脊椎骨の構造的なひずみ分布を改善し、骨折予防につながるといえる。

NIH (National Institutes of Health) の骨粗鬆症の定義では、骨強度の低下によって骨折のリスクが高くなる骨障害が骨粗鬆症であり、骨強度は骨密度と骨質で決まるとされている。骨質には骨の微細構造、骨代謝回転、微小ダメージの蓄積、石灰化の程度、コラーゲンなどの器質的特性がある。今回の結果から、これらの要素に加えて、椎体内の骨密度分布(荷重支持構造)も骨強度を左右する重要な因子と考える。

骨折リスクを予想するには、骨強度の測定が理想的であるが、これまでは実際の患者で骨強度を測定することは不可能であり、骨密度や骨代謝マーカーを測定して骨折リスクを予測していた。しかし、骨折の危険性を評価するためには骨密度や骨代謝マーカーだけでは不十分であることが分かっている。今回用いた有限要素解析による骨強度の評価は、今後、より生体に近いモデルに改良されることで、骨粗鬆症治療への応用が期待される。

結 語

ビスフォスフォネートの内服は、骨粗鬆症性脊椎の骨密度を改善するのみならず、力学的に脊椎全体のひずみ分布を改善し、力学的強度を向上し、骨折を抑制する。

文 献

- 1) Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1437-43.
- 2) Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, et al. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet* 1996;348:1535-41.
- 3) Cummings SR, Black DM, Thompson DE, Applegate WB, Barrett-Connor E, Musliner TA, et al. Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures: results from the Fracture Intervention Trial. *JAMA* 1998;280:2077-82.
- 4) Imai K, Ohnishi I, Bessho M, Nakamura K. Nonlinear finite element model predicts vertebral bone strength and fracture site. *Spine* 2006;31:1789-94.

骨粗鬆症の発生率と骨代謝マーカー, 内因性ホルモンとの関連

—漁村コホート 10年間の追跡—

吉村典子¹⁾・岡 敬之¹⁾・村木重之²⁾・阿久根 徹²⁾・馬淵昭彦³⁾
川口 浩⁴⁾・中村耕三⁴⁾

はじめに

平成18年版高齢社会白書によると¹⁾,平成17年10月1日現在のわが国の人口は1億2,776万人と戦後初めて減少に転じたのに対して,65歳以上の高齢者人口は過去最高の2,560万人となった。また高齢化率(総人口に占める65歳以上の高齢者の割合)が初めて20%を超えたとも報告されており,わが国の高齢化はまさに世界に類のない早さで進行し続けている。

このように超高齢化が目前に迫る状況の中で,高齢者の生活の質(quality of life: QOL)を著しく阻害する骨粗鬆症とそれによる骨折の予防は,まさに焦眉の課題であるといえる。しかしながら骨粗鬆症の発生率や発生を予測する要因については,まだ明らかになっていない点も多く,骨粗鬆症予防対策遅延の原因となっている。

今回,われわれは,漁村在住中高年男女を対象としたコホートの10年間の追跡調査の解析を行い,漁村における骨粗鬆症の発生率を明らかにした。さらに発生率の予測因子としての骨代謝マーカーおよび内因性ホルモンの影響を検討したの

で報告する。

1 対象と方法

和歌山県一漁村T町では住民台帳に基づき40~79歳の全住民2,261人(男1,028人,女1,233人)を対象にコホートを設定し,1993年から総合的健康管理を行っている。この集団から男女各年代50人,計400人をランダムに選んで,dual energy X-ray absorptiometry (DXA: Hologic QDR-1000)にて同年,腰椎および大腿骨近位部の骨密度を測定した(ベースライン調査)。さらに3年後,7年後,10年後に再度同対象者に同部位の骨密度を同機種種のDXAで測定した。ベースライン調査時に採血した血清,尿を用い骨代謝マーカーを測定した。測定したのは骨形成マーカーとして,血清 intact-osteocalcin (i-OC, Osteocalcin IRMA kit, Mitsubishi Kagaku BCL), total osteocalcin (total OC, Elecsys N-MID Osteocalcin (Roche Diagnostics GmbH)), 骨型アルカリフォスファターゼ (bone-specific alkaline phosphatase; BAP, enzyme immunoassay), I型プロコラーゲンN末端プロペ

Association between Incidence of Osteoporosis and Bone Turnover Markers Parathyroid Hormone Levels and Endogenous Sex Steroids—10 Years Follow up of Taiji Cohort—

Noriko Yoshimura: Department of Joint Disease Research 22nd Century Medical Center, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, *et al.*

Key words: 骨粗鬆症, 発生率, 骨代謝マーカー, 副甲状腺ホルモン, 内因性性ホルモン

¹⁾ 東京大学医学部附属病院 22世紀医療センター関節疾患総合研究講座 ²⁾ 東京大学医学部附属病院 22世紀医療センター臨床運動器医学講座 ³⁾ 東京大学人類遺伝学 ⁴⁾ 東京大学医学部整形外科

表1 ベースライン調査および10年目の追跡調査参加者の性・年齢別分布

年代(歳)	男性		女性	
	ベースライン	10年後	ベースライン	10年後
40~49	50	43	50	47
50~59	50	46	50	47
60~69	50	41	50	44
70~79	50	23	50	31
総数	200	153	200	169

プチド (N-terminal propeptide of type I procollagen; PINP, radioimmunoassay (Orion Diagnostica)) であり、骨吸収マーカーとしては血清 I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (C-terminal propeptide of type I procollagen; PICP, radioimmunoassay (Orion Diagnostica)), I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (N-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen; NTX, Osteomark NTX serum (Ostex international. inc)), I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド (C-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen; CTX) の β 異性体 (β -CTX, Elecsys β -CrossLaps (Roche Diagnostics GmbH)), I 型コラーゲン C 末端テロペプチド (C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteinase; ICTP, radioimmunoassay (Orion Diagnostica)), pyridinoline (PYR, high-performance liquid chromatography (HPLC)), deoxypyridinoline (DPD, HPLC) を測定した。さらに血清 intact parathyroid hormone (i-PTH, electrochemiluminescent immunoassay), および性ホルモンとして、血清フリーテストステロン (FT, DPC-free testosterone kit (Mitsubishi Kagaku)) およびエストラジオール (E2, 男性: DPC-free estradiol kit (Mitsubishi Kagaku), 女性: HPLC-immunoradiometric assay) を測定した。

骨粗鬆症の診断は WHO の診断基準²⁾に従い、Peak bone mass の 2.5SD 以上の低下をもって骨粗鬆症と判定した。

2 結 果

ベースライン調査時における対象者 400 人のうち、10 年後の調査に参加したものは 322 人 (80.5%) であった。これら対象者の性・年代別分布を表 1 に示す。

この対象者の 10 年間の追跡結果を用いて、ベースライン時において骨粗鬆症と診断されたものを除き、骨粗鬆症の新規発生率を推定したところ、腰椎では男性で 23.8 (/10,000 人年)、女性で 179.5 (/10,000 人年) となり、大腿骨頸部では男性で 17.1 (/10,000 人年)、女性で 114.5 (/10,000 人年) となり、女性のほうが約 7 倍高率であった。骨粗鬆症の発生率を年代別にみると女性では、高齢者よりも閉経後に多かったのに対し、大腿骨頸部では高齢者に多かった。

次に、10 年間の腰椎、大腿骨頸部それぞれの新規骨粗鬆症発生と、骨代謝マーカー値、i-PTH, FT, E2 値との関連を求めた。まず対象者のベースライン時の骨代謝マーカー値の性別の平均値を表 2 に示す。i-PTH の平均値 (標準偏差) は男性 28.8 (28.4), 女性 28.8 (12.6) (ng/mL), FT は男性 9.45 (2.93), 女性 0.76 (0.30) (pg/mL) (ただし測定感度以下であった男性 1 人, 女性 141 人を除く), E2 値は男性 22.4 (7.6), 女性 12.5 (31.5) (pg/mL) であった。

骨粗鬆症発生の有無を目的変数とし、骨代謝マーカー値、i-PTH, FT, E2 値をそれぞれ説明変数として、ベースライン時の年齢、体格指数 (body mass index; BMI (kg/m^2)) を調整して、Cox の比例ハザードモデルによる解析を行った。その結

表2 ベースライン時における骨代謝マーカー値の平均値(標準偏差)

骨代謝マーカー		単位	男性	女性
血清	i-OC	ng/mL	3.60 (2.54)	5.60 (3.01)
	total OC	ng/mL	18.5 (11.1)	26.0 (11.6)
	BAP	U/L	26.5 (10.7)	28.6 (10.4)
	PINP	ng/mL	38.2 (19.5)	50.1 (21.9)
	PICP	μg/L	119.3 (33.3)	126.4 (40.0)
	NTX	nmolBCE/L	13.6 (4.23)	15.2 (4.04)
	β-CTX	ng/mL	0.187 (0.121)	0.234 (0.145)
	ICTP	μg/L	2.96 (1.24)	3.16 (1.06)
尿	PYR	pmol/μmolCr	19.3 (6.8)	27.5 (9.0)
	DPD	pmol/μmolCr	3.06 (1.53)	4.76 (1.91)

i-OC: intact osteocalcin, total OC: total osteocalcin, BAP: bone-specific alkaline phosphatase, PINP: N-terminal propeptide of type I procollagen, PICP: C-terminal propeptide of type I procollagen, NTX: N-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen, β-CTX: C-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen, ICTP: C-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteinase, PYR: pyridinoline, DPD: deoxypyridinoline

果、腰椎では男性のPINP、女性のCTX、PYR、DPDは、骨粗鬆症のリスクを有意に上昇させていた。大腿骨頸部では、男性のPYRが1SD高いと骨粗鬆症のリスクが2倍となっていた。骨粗鬆症の発生とi-PTHおよび女性ホルモン値との間に有意な関連は認められなかったが、男性の血清テストステロン値とが大腿骨頸部骨粗鬆症の間には有意の負の関連が認められた。

3 考 察

わが国において、一般住民における骨粗鬆症の発生率についてはまだ報告がほとんどない。今回の研究で、われわれは、和歌山県漁村住民の10年間の追跡から骨粗鬆症の発生率を推定した結果、男性よりも女性に7倍多いこと、部位によって年齢別発生率に違いがみられることを明らかにした。

骨粗鬆症発生率のわが国における地域差についてはまだ明らかになっていないが、われわれは同じく山村住民の10年間の追跡調査から、山村住民の骨密度は漁村住民に比べて低い傾向にあることを報告してきた³⁾。今回の骨粗鬆症発生率

についても、山村住民の発生率⁴⁾と比べて低い傾向にある。しかしこの傾向が、地域特性など環境的な要因からきたものか、あるいは測定機器やサンプリングの違いの影響を受けているのかについてはさらなる検証が必要となる。

骨粗鬆症診断における骨代謝マーカーの意義について、日本骨粗鬆症学会骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会では、骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2006年度版において、そのエビデンスレベルと臨床上の有用性のグレードを明らかにしている⁵⁾。それによると、骨代謝マーカーは、完全ではないにせよ骨折リスクの有用な代用指標としての意義が認められる⁶⁾とされている。今回の研究から、骨代謝マーカー値が、骨折だけではなく骨粗鬆症の発生そのもののリスクにも関連があることが明らかにされた。これは骨代謝マーカー値が、診断治療の指標としてのみならず、骨粗鬆症の予防の場でも活用されうる余地があることが示すものであると考える。

骨粗鬆症と血清PTHレベルの関連については、Von Muhlenらは大腿骨頸部骨密度が、血清PTHと有意な負の関連にあることを報告してい

る⁷⁾。また Daplas らも施設入所者において最も低いBMDの集団は二次性副甲状腺機能亢進症を合併していることを報告している⁸⁾。高齢者にビタミンD欠乏が起こりやすいことを考慮すると、血清PTH値が骨粗鬆症の予測要因となる可能性はあると考えられるが、今回の研究では、ベースライン時のi-PTH値と骨粗鬆症の発生については、明らかな関連を得ることができなかった。今後栄養調査の結果などを解析し、ビタミンD摂取量などを加味した検討が必要となると考える。

内因性女性ホルモンの低下が骨量低下に影響を及ぼしていることはさまざまな報告から明らかであるが^{9~17)}、男性ホルモンも骨粗鬆症との関連が報告されている^{16,18,19)}。男性骨粗鬆症の予防を目的として行われている国際共同研究であるMrOS studyでは、血清FTが大腿骨頸部骨密度の予測因子となり、さらに過去の骨折とも関連していたと述べている。今回の研究では、E2もFTは骨粗鬆症発生の有意なリスクとはなり得なかった。E2についてはその影響が最も大きい閉経前後の集団が少なかったこと、今回の目的変数を骨密度低下率ではなく骨粗鬆症の発生としたため、発生者が骨密度がもともと低い60歳以降の高齢女性に偏ったことが結果に影響を及ぼした可能性がある。またFTについては女性に感度以下の測定値を示すものが多かったこと、男性では骨粗鬆症の発生率が低かったことが関連を明確にしえなかった要因の一つであるかもしれない。

今後観察期間をさらに延長し、骨密度よりも容易に変動をとらえやすいこれらマーカーの骨粗鬆症予測因子としての有用性について、有望なマーカーの閾値の設定まで視野に入れて検討を重ねていく予定である。

結 論

漁村地域における10年間の観察から中高年男女の骨粗鬆症発生率を推定し、骨代謝マーカー高値が骨粗鬆症発生の予測因子となる可能性を示した。

文 献

- 1) 内閣府：平成18年版高齢社会白書。http://www.8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2006/zenbun/18index.html
- 2) Kanis JA, Melton LJ III, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1137-41.
- 3) 吉村典子, 橋本勉. 骨密度の地域差—和歌山県の山村, 漁村におけるコホート調査より. *Osteoporosis Jpn* 1999;7:12-3.
- 4) 吉村典子, 岡敬之, 村木重之, 馬淵昭彦, 川口浩, 中村耕三. 骨粗鬆症の有病率の推移と発生率の推定. *Osteoporosis Jpn* 2006;14(suppl1):149.
- 5) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会(代表 折茂肇). 骨代謝マーカー測定. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006年版. 東京:ライフサイエンス出版:2006. p.25-7.
- 6) Miller PD, Hochberg MC, Wehren LE, et al. How useful are measures of BMD and bone turnover? *Curr Med Res Opin* 2005;21:545-53.
- 7) Von Muhlen DG, Greendale GA, Garland CF, Van L, Barrett-Connor E. Vitamin D, parathyroid hormone levels and bone mineral density in community-dwelling older women: The Rancho Bernardo Study. *Osteoporos Int* 2005;16:1721-6.
- 8) Deplas A, Debais F, Alcalay M, Bontoux D, Thomas P. Bone density, parathyroid hormone, calcium and vitamin D nutritional status of institutionalized elderly subjects. *J Nutr Health Aging* 2004;8:400-4.
- 9) Slemenda C, Longscope C, Peacock M, Hui S, Johnston CC. Sex steroids, bone mass and bone loss. *J Clin Invest* 1996;97:14-21.
- 10) Stone K, Bauer DC, Black DM, Sklarin P, Ensrud KE, Cummings SR for the study of osteoporotic fractures study group. Hormonal predictors of bone loss in elderly women: a prospective study. *J Bone Miner Res* 1998;13:1167-74.
- 11) Yoshimura N, Kasamatsu T, Sakata K, Hashimoto T, Cooper C. The relationship between endogenous estrogen, sex hormone binding globulin and bone loss in female residents of a rural Japanese community: The Taiji study. *J Bone Miner Metab* 2002;20:303-10.
- 12) Cauley JA, Gutai JP, Black Sandler R, La Porte RE, Kuller LH, Sashin D. The relationship of endogenous estrogen to bone density and bone area in normal postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1986;124:752-61.

- 13) Steinberg KK, Freni-Titulaer LW, DePuey EG, Miller DT, Sgoutas DS, Coralli CH, Phillips DL, Rogers TN, Clark RV. Sex steroids and bone density in premenopausal and perimenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:533-9.
- 14) Murphy S, Khaw KT, Sneyd MJ, Compston JE. Endogenous sex hormones and bone mineral density among community-based postmenopausal women. *Postgrad Med J* 1992;68:908-13.
- 15) Krahe C, Friedman R, Gross JL. Risk factors for decreased bone density in premenopausal women. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:1061-6.
- 16) Greendale GA, Edelstein S, Barrett-Connor E. Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 1997;12:1833-43.
- 17) Khosla S, Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Klee GG, Riggs BL. Relationship of serum steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2266-74.
- 18) Center JR, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Hormonal and biochemical parameters in the determination of osteoporosis in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3626-35.
- 19) Melstrom D, Johnell O, Ljunggren O, Eriksson AL, Lorentzon M, Mallmin H, Holmberg A, Redlund-Johnell I, Orwoll E, Ohlsson C. Free testosterone is an independent predictor of BMD and prevalent fractures in elderly men: MrOS Sweden. *J Bone Miner Res* 2006;21:529-35.

Alteration of *N*-glycans related to articular cartilage deterioration after anterior cruciate ligament transection in rabbits¹

T. Matsushashi M.D.†, N. Iwasaki M.D., Ph.D., Associate Professor†*, H. Nakagawa Ph.D., Associate Professor‡, M. Hato‡, M. Kuroguchi Ph.D.‡, T. Majima M.D., Ph.D., Associate Professor‡, A. Minami M.D., Ph.D., Professor† and S.-I. Nishimura Ph.D., Professor‡

† Department of Orthopaedic Surgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan

‡ Graduate School of Advanced Life Science, Frontier Research Center for Post-Genome Science and Technology, Hokkaido University, Sapporo, Japan

Summary

Objective: Osteoarthritis (OA) is the most common of all joint diseases, but the molecular basis of its onset and progression is controversial. Several studies have shown that modifications of *N*-glycans contribute to pathogenesis. However, little attention has been paid to *N*-glycan modifications seen in articular cartilage. The goal of this study was to identify disease specific *N*-glycan expression profiles in degenerated cartilage in a rabbit OA model induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT).

Methods: Cartilage samples were harvested at 7, 10, 14, and 28 days after ACLT and assessed for cartilage degeneration and alteration in *N*-glycans. *N*-Glycans from cartilage were analyzed by high performance liquid chromatography and mass spectrometry.

Results: Histological analysis showed that osteoarthritic changes in cartilage occurred 10 days after ACLT. Apparent alterations in the *N*-glycan peak pattern in cartilage samples were observed 7 days after ACLT, and overall *N*-glycan changes in OA reflected alterations in both sialylation and fucosylation. These changes apparently preceded histological changes in cartilage.

Conclusion: These results indicate that changes in the expression of *N*-glycans are correlated with OA in an animal model. Understanding mechanisms underlying changes in *N*-glycans seen in OA may be of therapeutic value in treating cartilage deterioration.

© 2007 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Cartilage, Osteoarthritis, *N*-Glycan.

Introduction

Chondrocyte metabolism is controlled by genetic and environmental factors, such as extracellular matrix (ECM) composition, soluble mediators, or mechanical factors^{1,2}. Osteoarthritis (OA), which results from a breakdown in the balance of these factors, is the most common joint disease. To date, numerous studies have investigated its pathogenesis^{1–8}. However, factors mediating onset and aggravation of OA are still controversial.

Glycobiology, defined as the analysis of biological function of sugar chains covalently bound to proteins and lipids, has been recently applied to molecular-based investigations⁹. Sugar chains attached to proteins (glycoproteins) and lipids (glycolipids) are commonly referred to as glycans.

Glycoprotein glycans are found on the cell surface, in the ECM, and in serum. These glycans act as an interface on the cell surface and modulate protein properties, including folding, secretion, targeting, and protease resistance^{10,11}. Several studies show that glycan modifications of proteins contribute to the pathogenesis of some diseases^{12,13}. One characteristic of cartilage is that some chondrocytes reside in areas rich in ECM. In addition, it is well known that glycoproteins are abundant on the cell surface and in cartilage ECM. These observations lead to a working hypothesis that sugars attached to proteins contribute to chondrocyte metabolism.

Glycans attached to proteins are classified into two groups: glycans attached to an asparagine residue through a nitrogen atom (*N*-glycans) and those attached to a serine or threonine oxygen (*O*-glycans)¹¹. Both types have been intensively studied, and many studies report structural and functional analyses of *N*-glycans¹⁴. Based on these data, a relationship between *N*-glycan alteration and disease has recently been emerged^{12,13,15–18}. For example, several studies of *N*-glycans of serum immunoglobulin G (IgG) molecules associated with the rheumatoid arthritis (RA) indicate that changing *N*-glycan structure contributes to RA^{19–21}. However, little attention has been paid to *N*-glycan alterations occurring in articular cartilage in a diseased condition.

Glycans have five major functions: (1) providing cell wall and ECM structural components, (2) modifying protein

¹Supported by a grant for the National Project on "Functional Glycoconjugate Research Aimed at Developing New Industry" from the Ministry of Education, Science, Sport and Culture of Japan, and SENTAN from the Japan Science and Technology Agency and Uehara Memorial Foundation.

*Address correspondence and reprint requests to: Dr Norimasa Iwasaki, Department of Orthopaedic Surgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine, 060-8638, North 15, West 7, Kitaku, Sapporo, Hokkaido, Japan. Tel: 81-11-706-5936 ext. 5937; Fax: 81-11-706-6054; E-mail: niwasaki@med.hokudai.ac.jp

Received 11 November 2006; revision accepted 17 November 2007.

properties, (3) directing glycoconjugates, (4) mediating and modulating cell adhesion, and (5) mediating and modulating signaling. Thus, we hypothesized that cartilage *N*-glycans would be altered in parallel with cartilage degradation in OA and would vary according to the degree of deterioration. Particularly, *N*-glycan alterations should occur at early phases of OA aggravation. To test this hypothesis, we analyzed *N*-glycans of rabbit OA cartilage explants induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT). The specific aims of this study were to clarify the alterations in cartilage *N*-glycans with OA aggravation and to identify *N*-glycan structures correlated with cartilage deterioration.

Materials and methods

ANIMALS AND SURGICAL PROCEDURES

Seventy-eight adult female Japanese white rabbits (15–16-week-old) weighing 2.6–3.1 kg purchased from a professional breeder (Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Japan) were used for this study according to the established ethical guidelines approved by the local animal care committee. Rabbits were anesthetized with 0.6 ml pentobarbital sodium (50 mg/ml) injections and then maintained on isoflurane. To induce osteoarthritic changes of articular cartilage, the right knee ACL was sectioned through a medial parapatellar incision (OA group). As a sham control, arthrotomy without ACLT was performed in sham group. Rabbits were housed in plastic cages and allowed to move freely after the operation. At days 0, 7, 10, 14, and 28, animals were euthanized by an intravenous injection of overdose pentobarbital to obtain cartilage samples for histological and glycostructural analyses. Serum samples were harvested prior to euthanasia. Here, day 7 is defined as 7 days after the operation, and day 0 means the day prior to the operation.

HISTOLOGICAL ANALYSIS (*N* = 36)

To determine osteoarthritic changes in OA and sham groups, cartilage samples (*n* = 4) were analyzed histologically at days 0, 7, 10, 14, and 28. Each sample, including the tibial plateau and femoral condyle, was fixed in 10% neutral buffered formalin. Tissue blocks were decalcified with 14% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), cut in a sagittal plane, and stained with hematoxylin and eosin (HE) and Safranin O—fast green. To avoid observer bias, slides were coded prior to microscopic analysis. Osteoarthritic changes in each sample were quantified using the modified Mankin score²².

PREPARATION OF PYRIDYLAMINATED (PA)-*N*-GLYCAN (*N* = 42)

Cartilage samples of the tibial plateau and serum were obtained from each animal at days 0, 7, 10, and 28. Cartilage minced by a razor and serum was heated to 90°C for 15 min. After lyophilization, each sample was digested sequentially with trypsin, chymotrypsin, *N*-glycosidase F, and pronase as described²³. *N*-Glycan fractions were purified on a gel-filtration column (Bio-Gel P-4, 1 × 38 cm, water, Nippon Bio-Rad Laboratories KK, Tokyo, Japan), and tagged by fluorescent labeling using 2-aminopyridine to increase sensitivity for analysis²⁴. Excess reagents were removed by gel-filtration on Sephadex-G-15 (Amersham Bioscience, Tokyo, Japan). PA-*N*-glycans were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS).

HPLC ANALYSIS

HPLC analysis using the L-7000 HPLC system (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) was performed under conditions previously described^{25,24,26}. PA-*N*-glycans were separated on an octadecylsilica (ODS) column (HRC-ODS, 6 × 150 mm, Shimadzu, Kyoto, Japan), and each peak on the ODS column was applied individually to an amide column (TSK-gel Amide-80, 4.6 × 250 mm, Tosoh, Tokyo, Japan). The relative amount of PA-*N*-glycans was calculated based on the peak area analyzed by attached software on the HPLC system. Elution positions of PA-*N*-glycan on the ODS and amide columns were converted to glucose units (GU), which corresponded to relative degree of polymerization of α 1,6-glucose oligosaccharides, for increasing reproducibility. *N*-Glycan structures were suggested by comparing elution positions with data reported in the same analytical conditions, and confirmed with further HPLC analysis combined with partial digestion, and/or MS. Elution positions and code numbers of approximately 500 kinds of oligosaccharide are described in these

references^{24,25}. The validity of the elution positions and partial digestions was confirmed using well-known standard PA-*N*-glycans and previous studies^{27,26}.

N-Glycans can form various structures, but have a common core structure and some rules in linkages¹¹. To determine the detailed *N*-glycans' structure related to OA, PA-*N*-glycans were digested sequentially with β -*N*-acetylhexosaminidase (HexNAcase, Jack bean, Seikagaku Co., Tokyo, Japan) which removed β -linked GalNAc and GlcNAc, α 1,3/4-fucosidase (α 3/4-Fase, Takara Co., Shiga, Japan) and weak hydrochloric acid to hydrolyze sialic acids. After each digestion, PA-*N*-glycans were individually analyzed by HPLC on both columns to confirm elution positions^{23,25}.

MS

To identify the PA-*N*-glycan structure, some PA-*N*-glycans separated by HPLC were further analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS (MALDI-TOF MS) using an Ultraflex TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). As matrices, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) were used. PA-*N*-glycans fractionated on HPLC were dissolved and applied to MALDI-TOF MS as described²⁵. Based on results from HPLC and MS, each precise *N*-glycan structure was determined.

All measurements were performed using an Ultraflex TOF/TOF mass spectrometer equipped with a reflector and controlled by the FlexControl 2.2 software package (Bruker Daltonics). In MALDI-TOF MS reflector mode, ions generated by a pulsed UV laser beam (nitrogen laser, λ = 337 nm, 5 Hz) were accelerated to a kinetic energy of 23.5 kV. Meta-stable ions generated by laser-induced decomposition of the selected precursor ions were analyzed without any additional collision gas. In MALDI-LIFT-TOF/TOF mode, precursor ions were accelerated to 8 kV and selected in a timed ion gate. The fragments were further accelerated by 19 kV in the LIFT cell (LIFT indicates "lifting" the potential energy for the second acceleration of ion source), and their masses were analyzed after the ion reflector passage. Masses were automatically annotated by using the FlexAnalysis 2.2 software package. External calibration of MALDI mass spectra was carried out using singly charged monoisotopic peaks of a peptide mixture of human angiotensin II (*m/z* 1046.542), bombesin (*m/z* 1619.823), ACTH-(18–39) (*m/z* 2465.199), and somatostatin 28 (*m/z* 3147.472).

STATISTICAL ANALYSIS

Data were represented as means \pm standard deviation (SD). Significant differences between groups were assessed by unpaired *t* tests. *P*-values of less than 0.05 were considered significant.

Results

HISTOLOGICAL FINDINGS

After the operations, rabbits exhibited a normal gait pattern by footprint analysis (data not shown). Also, infections were not seen macroscopically in any knee joint (data not shown). At day 7, no histological changes of the tibial plateau were seen in HE-stained samples of the OA group [Fig. 1(b)]. Samples evaluated at day 10 showed common OA changes, including deterioration of the superficial cartilage layer and a reduced number of chondrocytes in superficial and middle cartilage layers [Fig. 1(c)]. At day 28, a reduced number of chondrocytes were observed in whole layers [Fig. 1(e)], and cloning of chondrocytes was apparent in these damaged areas [Fig. 1(e)]. While Safranin O—fast green staining showed no significant change from day 7 to day 14 [Fig. 1(g–i)], both showed significant reduction at day 28 [Fig. 1(j)]. In the sham group, from day 7 to day 28 no histological indications of OA changes were observed in any samples (data not shown). Histological changes of the femoral condyle were observed later than histological changes of the tibial plateau (data not shown). After day 10, mean histological scores of the tibial plateau were significantly higher in the OA group than in the sham group (3.6 ± 0.5 vs 2.3 ± 0.5 at day 10, $P < 0.05$; 7.0 ± 0.6 vs 2.4 ± 0.4 at day 28, $P < 0.05$, Fig. 2).

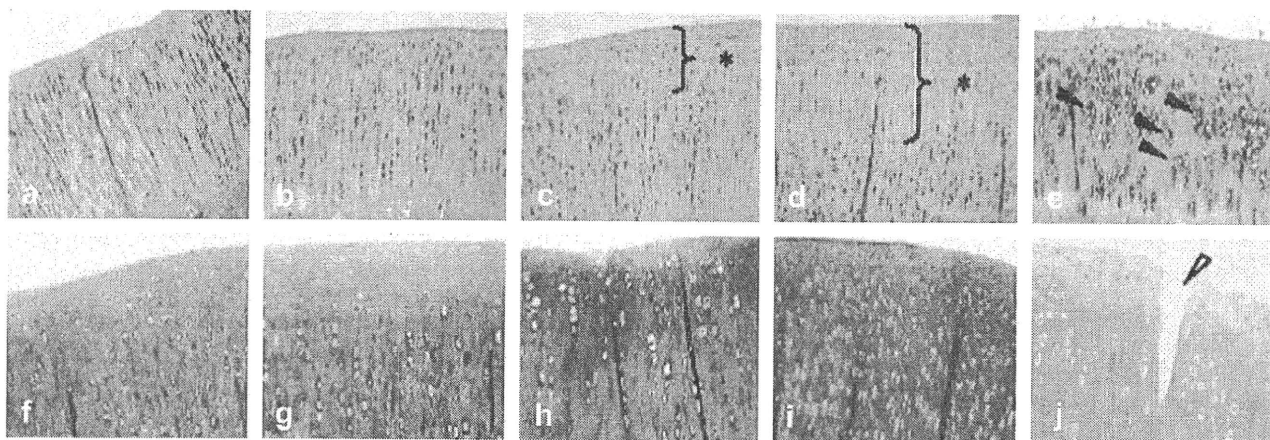


Fig. 1. Histology of cartilage after ACLT in medial tibial plateau in the rabbit knee joint. (a–e) HE-stained sections. (f–j) Safranin O-fast green stained sections. (a) Control articular cartilage shows a smooth surface. (b) At day 7, no significant changes compared with control cartilage were observed. (c) At day 10, superficial diffuse loss of chondrocytes (*) with surface irregularity was observed. (d) At day 14, diffuse loss of chondrocytes from superficial and middle zones (*) with surface irregularity was observed. (e) At day 28, diffuse loss of chondrocytes in the whole zone with clone formation (solid arrow) was observed. (f) Control articular cartilage with Safranin O-fast green stain. (g–i) At days 7, 10, and 14, no significant change of Safranin O-fast green staining was observed. (j) At day 28, severe loss of Safranin O-fast green staining and clefts (empty arrow) was observed.

ALTERATION IN N-GLYCAN PROFILES

We found no significant alterations in the N-glycan peak pattern of serum from day 7 to day 28 in the OA group (Fig. 3). In cartilage analysis, there were no apparent alterations in the N-glycan peak pattern from day 7 to day 28 in the sham group. By contrast, significant alterations in the N-glycan peak pattern in cartilage were observed in the OA group from day 7 postoperatively (Fig. 4). Alterations in peak shape suggested a change in the composition of N-glycans contained in the peak. To confirm this, we purified peaks by HPLC on an ODS column and analyzed each on an amide column in a different chromatographic mode. Each altered peak on the ODS column was separated into three peaks on the amide column, referred to as N-glycan A (a), B (b), and C (c) in the order of separation time (Fig. 4*). We then calculated each area ratio. The mean ratio

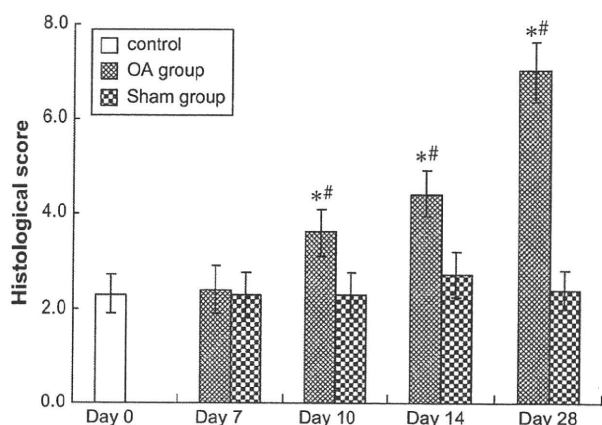


Fig. 2. Histological scores of medial tibial plateau. Values are means \pm SD. Shown are scores for histological parameters with comparisons between groups. Histological analysis revealed that slightly degenerative changes in cartilage occurred in all cases starting 10 days after ACLT. *Denotes statistical significance ($P < 0.05$) vs sham group. #Denotes statistical significance ($P < 0.05$) vs control.

of N-glycan A in the OA group significantly decreased from day 7 to day 28 compared to the sham group (40.6 ± 1.80 vs 36.0 ± 1.40 at day 7, $P < 0.05$; 39.8 ± 1.54 vs 35.6 ± 1.97 at day 28, $P < 0.05$, Fig. 5), while the value of N-glycan C in the OA group significantly increased from day 7 compared to the sham group (44.7 ± 1.91 vs 40.8 ± 1.28 at day 7, $P < 0.05$; 46.0 ± 2.67 vs 40.2 ± 1.03 at day 28, $P < 0.05$, Fig. 5). The mean ratio of N-glycan B did not significantly change (data not shown). The mean ratio of N-glycans A–C after day 7 was significantly higher in the OA group than in the sham group (1.25 ± 0.11 vs 1.01 ± 0.04 at day 7, $P < 0.05$; 1.32 ± 0.11 vs 1.01 ± 0.04 at day 28, $P < 0.05$, Fig. 5).

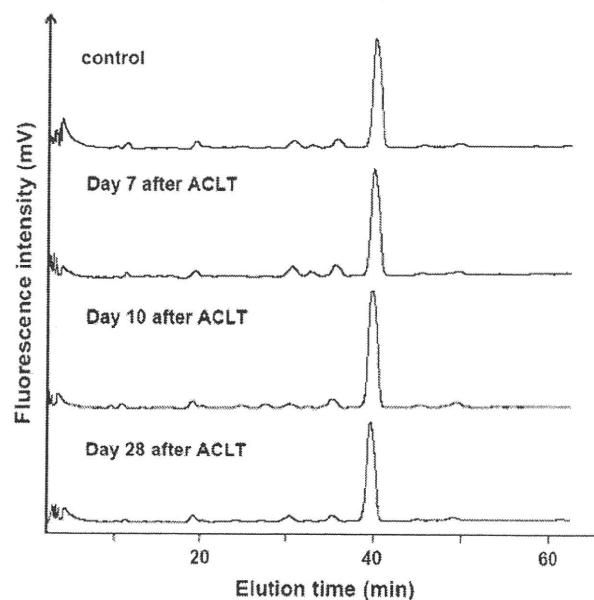


Fig. 3. Chromatograms of PA-N-glycans obtained from rabbit serum glycoproteins on an ODS column. There were no significant alterations in the N-glycan peak pattern of serum from day 7 to day 28 in the OA group compared with controls.

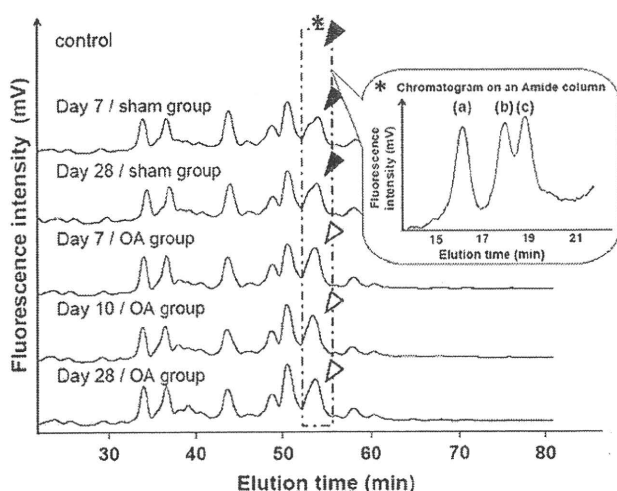


Fig. 4. Chromatograms of PA-*N*-glycans obtained from rabbit cartilage glycoproteins on an ODS column. Two peaks (solid arrow) in the chart of day 0 and the sham-operated group were seen as one peak (empty arrow) from day 7 after ACLT. Those peaks included three peaks on an amide column, referred to as *N*-glycan A (a), B (b), and C (c), in the order of separation time (*).

STRUCTURAL ANALYSIS OF *N*-GLYCANS RELATED TO OSTEOARTHRITIC CHANGES

MALDI-TOF spectra of *N*-glycans A and C with DHB as a matrix indicated a molecular mass of 2239.6 and 2094.6, respectively (Fig. 6). Each MALDI-TOF/TOF spectra showed constituents of *N*-glycans A and C (Fig. 7). MALDI-TOF and TOF/TOF spectra of *N*-glycans with CHCA as a different matrix indicated almost the same mass fragmentation compared with DHB (data not shown). Molecular mass of 2239.6 and 2094.6 corresponds with a protonated PA-glycan which consists of 3 Hex, 6 HexNAc and *N*-acetylneuraminic acid (NANA); and 3 Hex, 6 HexNAc and Fuc, respectively. These compositions and abundant fragment peaks of di-HexNAc (406.9 and 407.1) and peaks devoid of di-HexNAc, 1542.1 and 1542.2, indicate these *N*-glycans which include GalNAc-GlcNAc units instead of Gal-GlcNAc units in their outer arms. After sequential partial digestion, elution positions of both *N*-glycans on the two-dimensional map coincided with 110.4a GalNAc β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,3-(Man α 1,6-)Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-(Fuc α 1,6-)GlcNAc which confirmed from a previous study combining HPLC, NMR and methylation analyses³¹. The elution position on the amide column was smaller than the one of a similar structure, 110.4, which includes Gal β 1,4-GlcNAc units in their outer arms²⁵. Based on these results, the final form of *N*-glycan digested partially was assigned as 110.4a, and elution positions and suggested structures of digested *N*-glycans A and C are shown in Fig. 8. This indicated that NANA of *N*-glycan A and Fuc of *N*-glycan C was attached to the same α 3Man branch of the outer arm and di-HexNAc is GalNAc β 1,4-GlcNAc³¹. The NANA to GalNAc linkage was determined to be α 2,6 based on an observed reduction in GU on the amide column²⁷. α 2,3 NeuAc was reduced to about 0.5 GU on the amide column; on the other hand α 2,6 NeuAc increased by about 0.2 GU on the amide column according to the two-dimensional mapping technique^{32,33}. The linkage of Fuc in the outer arm of *N*-glycan C was determined to be

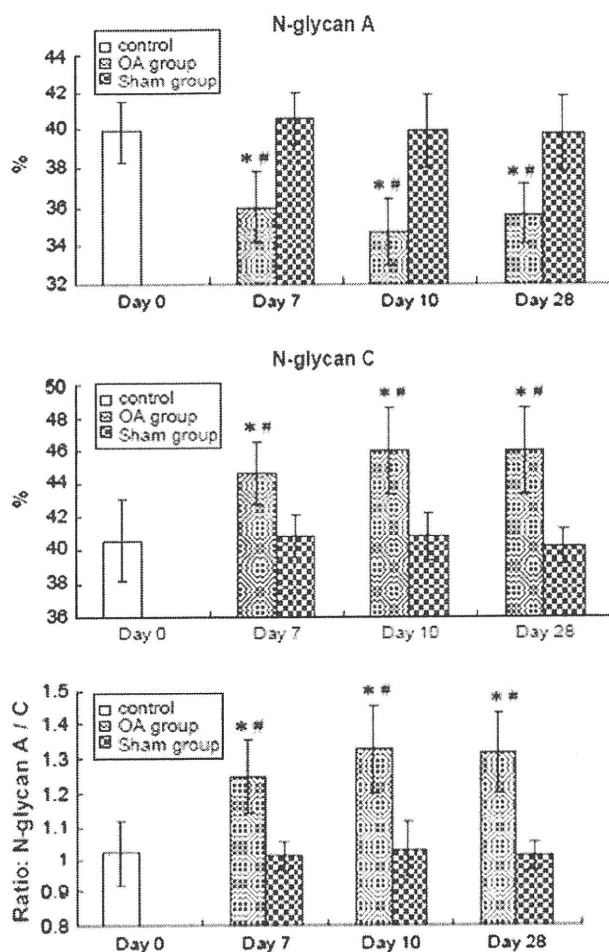


Fig. 5. The ratio in the peak area of *N*-glycans related to OA. Values are means \pm SD. The mean ratio of *N*-glycan A decreased significantly from 7 days in the OA group. The mean ratio of *N*-glycan C increased significantly from 7 days in the OA group. The mean ratio of *N*-glycan A-C increased significantly from 7 days in the OA group. *Denotes statistical significance ($P < 0.05$) vs sham group. #Denotes statistical significance ($P < 0.05$) vs control.

an α 1,3 linkage to GlcNAc because it was digested with α 3/4-Fase and the GalNAc bound to 4 position of GlcNAc. Changing of elution positions with partial digestion is already confirmed in a previous report^{32,33}. In this way, structures of *N*-glycans A and C were finally determined as in Fig. 9.

Discussion

The goal of this study was to determine potential alterations in cartilage *N*-glycans with aggravated OA. We first showed alterations in the *N*-glycan peak pattern of articular cartilage between normal rabbit cartilage (sham group) and OA cartilage induced by ACLT (OA group). Then, by comparing peaks obtained from both groups, we showed that the composition of cartilage *N*-glycans was significantly altered in the OA group prior to apparent histological changes. This observation indicates that *N*-glycan alterations in cartilage occur at very early phases of OA aggravation. It is well known that alterations in *N*-glycans are associated with specific disease-related mechanisms^{12,13,15}. Several studies of rheumatic diseases report

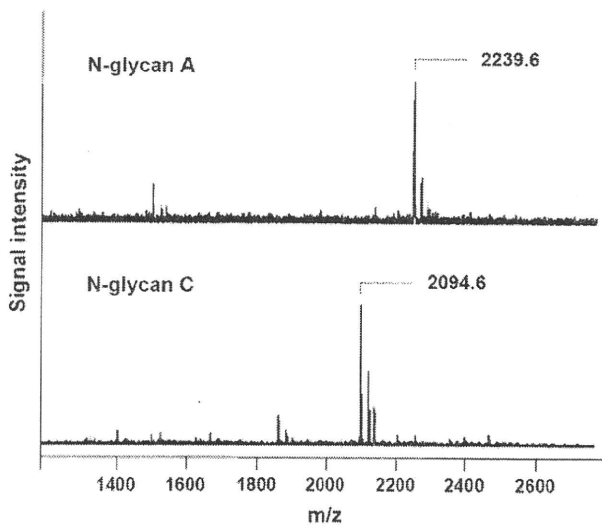


Fig. 6. MALDI-TOF mass spectra. Mass spectrometric analysis of N-glycans A and C by the MALDI-TOF/TOF method using DHB as a matrix.

alterations in the N-glycan pattern of serum IgG¹⁹⁻²¹. However, little attention has been given to similar alterations in articular cartilage. OA, a chronic degenerative joint disease characterized by articular cartilage deterioration and damage to subchondral bone, is a major cause of disabilities affecting patients' daily activities. Unlike RA, OA is primarily considered a local disease caused by abnormal loading on the articular cartilage. Therefore, analysis of cartilage N-glycans may facilitate the understanding of OA pathogenesis. To our knowledge, this is the first study to determine the structure of cartilage N-glycans and show alterations in the composition of the cartilage N-glycans with OA aggravation.

In early stages of OA aggravation, the macromolecular structure of the ECM is disrupted⁵. Early in this process, chondrocytes begin secreting enzymes that can disrupt ECM macromolecules^{1,2}. In particular these enzymes decrease proteoglycan aggregation and concentration of

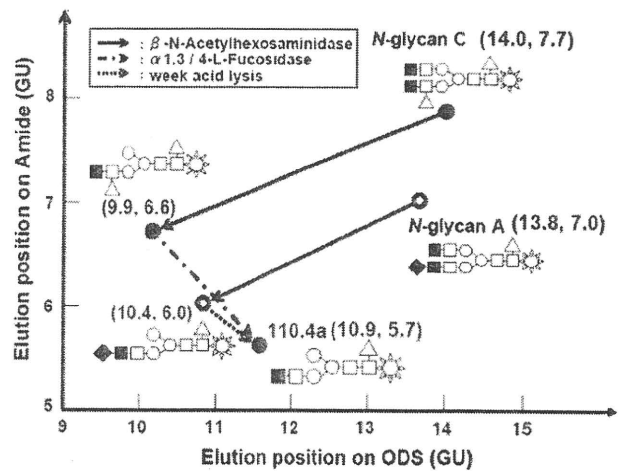


Fig. 8. Structural characterization of N-glycans A and C by a combination of exoglycosidase digestion and two-dimensional mapping. A portion of N-glycans A and C was digested with exoglycosidases. The elution times on ODS and amide-silica columns of N-glycans and their exoglycosidase digests are plotted on a two-dimensional sugar map (expressed as GU). Arrows indicate the direction of changes in the coordinates of N-glycans A and C after digestion with: → β-N-Acetylhexosaminidase, ----→ α1,3/4-fucosidase, - - -> weak acid lysis.

cartilage ECM, and their release is accompanied by an increased rate of chondrocyte apoptosis in areas of cartilage regeneration. Our analysis indicates that cartilage N-glycans undergo changes in the early phases of OA aggravation. N-glycans are abundant on the cell surface and in the ECM, and they commonly interact with protein receptors known as lectins. Through this interaction, N-glycans mediate cell-cell and cell-ECM interactions and intra- and extracellular signaling. The current study showed alteration in the representation of two kinds of N-glycan whose branch has sialic acid and fucose. Although we suppose that these N-glycans relate to OA initiation or progression in early phase, their biological functions remain unclear. Further studies will be performed to elucidate their functional roles in OA progression. Therefore, alterations in the composition of 1A1-210.4b (N-glycan A) and 210.41b (N-glycan C), whose structures are identified here, likely play crucial roles in the response of chondrocytes or

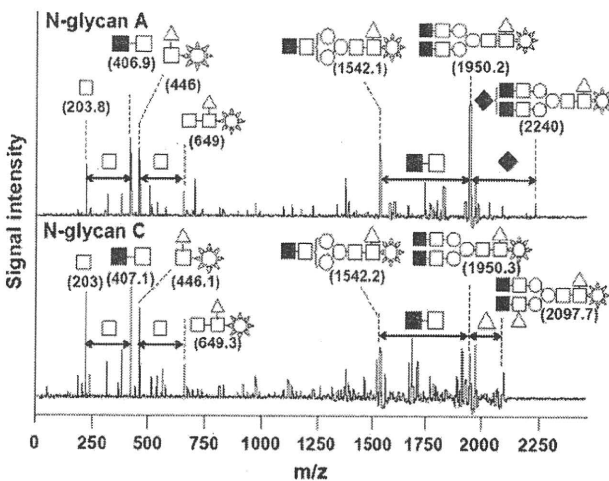


Fig. 7. MALDI-TOF/TOF mass spectra. Structural analysis of N-glycans A and C by the MALDI-TOF/TOF method using DHB as a matrix. Structures of fragments of N-glycan in each peak are indicated. Mannose, ○; Fuc, △; GalNAc, ■; GlcNAc, □; NANA, ◆; PA, ☆.

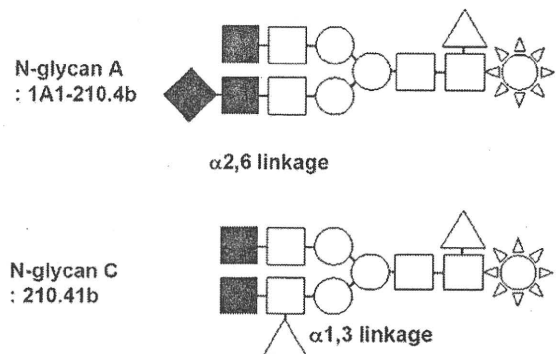


Fig. 9. Structure of N-glycans A and C. Indicated are structures of N-glycans related to OA. Mannose, ○; Fuc, △; GalNAc, ■; GlcNAc, □; NANA, ◆; PA, ☆.

the ECM to changes in the cartilage environment responsible for initiating OA. Here, we did not identify the localization of these *N*-glycans. Future studies are required to determine the biological roles of *N*-glycans identified here in early phases of OA. We observed no significant alterations in the serum *N*-glycan pattern with OA aggravation. Watson *et al.*²⁰, however, showed alterations in the *N*-glycan pattern of serum IgG with rheumatic diseases, including RA, systemic lupus erythematosus, ankylosing spondylitis, Sjögren's disease, juvenile chronic arthritis, and psoriatic arthritis. In addition to RA, Parekh *et al.*²¹ analyzed the *N*-glycan pattern of serum IgG in patients with primary OA and showed that IgG isolated from patients with primary OA contained different distributions of bi-antennary complex-type *N*-glycans. They concluded that primary OA may be a disease related to changes in intracellular processing of *N*-glycans or in their post-secretory degradation. Differences between their results and ours may be due to differences in the *N*-glycan source, to serum or purified IgG, or to mechanisms that induce OA disease. Our current model is a secondary OA model, in which disease is caused by joint instability. Pathological changes must be localized in tissues constituting the joint with cartilage deterioration. Therefore, we conclude that alterations in the *N*-glycan pattern occur in cartilage, not in serum. The results obtained from analysis of both serum and cartilage confirm that OA aggravation following joint instability mainly results from local pathogenesis.

These results and analytical methods can now be applied to clinical studies. The *N*-glycan pattern of articular cartilage may be used as a diagnostic indicator of OA or a predictable indicator of disease aggravation. Although we focus on early phases of OA aggravation, the *N*-glycan pattern of articular cartilage obtained from rheumatic diseases and at advanced stages of OA should now be addressed. By comparing these results, the utility of the *N*-glycan pattern as disease indicators will be established. Also, it is likely that 1A1-210.4b (*N*-glycan A) and 210.41b (*N*-glycan C) identified here play crucial roles in regulating cartilage deterioration following joint instability, but the localization and functional roles of these *N*-glycans are unknown. We are now determining the identities of proteins with specific *N*-glycan structures. When that analysis is complete, we will use knock-out or knock-down of either glycosyltransferase genes or the carrying proteins, followed by a functional analysis of *N*-glycans to further analyze their roles in cartilage deterioration. Finally, the *N*-glycan pattern likely depends on species. For this analysis we used rabbit cartilage, but *N*-glycans altered in human OA cartilage may differ from the *N*-glycans identified here. Thus, the *N*-glycan pattern of degenerative articular cartilage in humans will be analyzed in future studies.

Based on results presented here, we predict that *N*-glycans of human cartilage will alter with cartilage deterioration in diseases such as OA and RA. We will likely observe changes in the linkage of saccharides such as sialic acid and fucose, which is attached to the outer arm of *N*-glycan. Complex combinations of glycosyltransferases and glycosidases control *N*-glycan composition. Therefore, further analysis of expression of glycosyltransferases and glycosidases related to cartilage *N*-glycans should lead to elucidation of the pathogenesis of these diseases.

Regarding the biological and biochemical functions of *N*-glycans obtained in this study, we cannot study any further rabbit model. The reason is that DNA sequences of glycosyltransferases and glycosidases related with cartilage *N*-glycans of rabbit are little known. In our future studies,

using human cartilages and conditional model mice, we should determine the functional roles of the *N*-glycans. This should lead to a novel strategy for the treatment of OA.

Recent studies suggest that changes in glycosylation, defined as the addition of sugars to proteins and lipids, have a direct role in the etiology of various diseases, including congenital disorders of glycosylation, von Willebrand factor deficiency, rheumatic diseases, cancers, and emphysema^{12,13,19,20,28-30}. Regarding joint diseases, ours is the first study to determine the structure of the cartilage *N*-glycans and analyze potential alterations in damaged cartilage and may provide diagnostics and further insight into OA pathogenesis.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Ms Satomi Kudo very much for excellent technical assistance.

References

1. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1916-26.
2. Bluteau G, Conrozier T, Mathieu P, Vignon E, Herbage D, Mallein-Gerin F. Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 2001;1526:147-58.
3. Hamerman D. Aging and osteoarthritis: basic mechanism. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:760-70.
4. Quasnicka HL, Anderson-MacKenzie JM, Tarlton JF, Sims TJ, Billingham ME, Bailey AJ. Cruciate ligament laxity and femoral intercondylar notch narrowing in early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:3100-9.
5. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002;277:22201-8.
6. Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, *et al.* Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:818-31.
7. Kouri JB, Rojas L, Perez E, Abud-Lozoya KA. Modifications of Golgi complex in chondrocytes from osteoarthritic (OA) rat cartilage. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1333-40.
8. Bluteau G, Gouttenoire J, Conrozier T, Mathieu P, Vignon E, Richard M, *et al.* Differential gene expression analysis in a rabbit model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament (ACL) section. *Biorheology* 2002;39:247-58.
9. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3:97-130.
10. Wong CH. Protein glycosylation: new challenges and opportunities. *J Org Chem* 2005;70:4219-25.
11. Kobata A. Structure and function of the sugar chains of glycoprotein. *Eur J Biochem* 1992;209:483-501.
12. Yamashita K, Ideo H, Ohkura T, Fukushima K, Yuasa I, Ohno K, *et al.* Sugar chains of serum transferrin from patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. Evidence of asparagine-N-linked oligosaccharide transfer deficiency. *J Biol Chem* 1993;268:5783-9.
13. Wang X, Inoue S, Gu J, Miyoshi E, Noda K, Li W, *et al.* Dysregulation of TGF- β 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15791-6.
14. Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, *et al.* N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 2002;298:1790-3.
15. Jaeken J, Carchon H. Congenital disorders of glycosylation: the rapidly growing tip of the iceberg. *Curr Opin Neurol* 2001;14:811-5.
16. Landberg E, Pahlsson P, Lundblad A, Arnetorp A, Jeppsson JO. Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients

- with high alcohol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210:267–74.
17. Reitter JN, Means RE, Desrosiers RC. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat Med* 1998;4:679–84.
 18. Xiping W, Julie MD, Shuyi W, Huxiong H, John CK, Xiaoyun W, *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003;422:307–12.
 19. Chou CT. Binding of rheumatoid and lupus synovial fluids and sera-derived human IgG rheumatoid factor to degalactosylated IgG. *Arch Med Res* 2002;33:541–4.
 20. Watson M, Rudd PM, Bland M, Dwek RA, Axford JS. Sugar printing rheumatic diseases: a potential method for disease differentiation using immunoglobulin G oligosaccharides. *Arthritis Rheum* 1999;42: 1682–90.
 21. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, *et al.* Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 1985; 316:452–7.
 22. Tiraloché G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, *et al.* Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52: 1118–28.
 23. Nakagawa H, Kawamura Y, Kato K, Shimada I, Arata Y, Takahashi N. Identification of neutral and sialyl N-linked oligosaccharide structures from human serum glycoproteins using three kinds of high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1995;226:130–8.
 24. Hase S, Ikenaka T, Matsushima Y. Structure analyses of oligosaccharides by tagging of the reducing end sugars with a fluorescent compound. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;85:257–63.
 25. Tomiya N, Awaya J, Kurono M, Endo S, Arata Y, Takahashi N. Analyses of N-linked oligosaccharides using a two-dimensional mapping technique. *Anal Biochem* 1988;171:73–90.
 26. Kuroguchi M, Nishimura S-I. Structural characterization of glycopeptides by matrix-dependent selective fragmentation of MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2004;76:6097–101.
 27. Takahashi N, Nakagawa H, Fujikawa K, Kawamura Y, Tomiya N. Three-dimensional elution mapping of pyridylaminated N-linked neutral and sialyl oligosaccharides. *Anal Biochem* 1995;226: 139–46.
 28. Sakuma K, Fujimoto I, Hitoshi S, Tanaka F, Ikeda T, Tanabe K, *et al.* An N-glycan structure correlates with pulmonary metastatic ability of cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:829–35.
 29. Peracaula R, Tabares G, Royle L, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, *et al.* Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology* 2003;13:457–70.
 30. Mohlke KL, Purkayastha AA, Westrick RJ, Smith PL, Petryniak B, Lowe JB, *et al.* Mvwf, a dominant modifier of murine von Willebrand factor, results from altered lineage-specific expression of a glycosyltransferase. *Cell* 1999;96:111–20.
 31. Tomiya N, Awaya J, Kurono M, Hanazawa H, Shimada I, Arata Y, *et al.* Structural elucidation of a variety of GalNAc-containing N-linked oligosaccharides from human urinary kallidinogenase. *J Biol Chem* 1993;268:113–26.
 32. Tomiya N, Takahashi N. Contribution of component monosaccharides to the coordinates of neutral and sialyl pyridylaminated N-glycans on a two-dimensional sugar map. *Anal Biochem* 1998;264: 204–10.
 33. Takahashi N, Wada Y, Awaya J, Kurono M, Tomiya N. Two-dimensional elution map of GalNAc-containing N-linked oligosaccharides. *Anal Biochem* 1993;208:96–109.
 34. Takahashi N, Tomiya N. Analysis of N-linked oligosaccharides: application of glycoamidase A. In: Muramatsu T, Takahashi N, Eds. *Handbook of endoglycosidases and glycoamidases*. Boca Raton: CRC Press; 1992: 199–332.
 35. <<http://www.glycoanalysis.info/>>; 1992.
 36. Nakagawa H, Deguchi K. Structural analysis of sialyl N-glycan using pyridylation and chromatography followed by multistage tandem mass spectrometry. In: Fukuda M, Ed. *Methods in Enzymology*. San Diego: Elsevier 2006;415:87–104.

《特集/関節リウマチの新しい治療指針》

Ⅱ. 関節リウマチの最新薬物療法と理学療法

1. 薬物療法の基本原則と効果判定法

石 黒 直 樹



1. 薬物療法の基本原則と効果判定法*

石黒直樹**

[整形外科 59 巻 8 号 : 870~875, 2008]

●●●●● はじめに ●●●●●

関節リウマチ (RA) の治療目標は大きな変貌を遂げている。以前は症状改善が目標とされていたことから思えばその違いに驚かされる。現在の治療目標は寛解導入といっても差し支えない。RA の薬物治療を行う医師はそれを強く意識すべきである。生物学的製剤という新領域の薬剤を使いこなす前提として、治療の基本原則の理解と個々の疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs), 特にメトトレキサート (MTX) に精通することが重要である。生物学的製剤が優れた治療薬であるとしても第一選択薬にはならない。さらに抗腫瘍壊死因子 (TNF) 治療に代表される生物学的製剤がむしろ MTX との組み合わせで最大の効果を発揮することはよく知られている。

基本原則を理解したうえで、患者一人ひとりに最適化した治療戦略と段階段階においての効果判定が必要である。第一選択薬としての DMARDs の位置づけと限界を十分に知ってこそ、その後に使用される生物学的製剤の実力を引き出すことができる。生物学的製剤導入によって、RA 治療はより厳密な治療原則と効果判定が求められる時代となった。

I RA 治療目標の変化

生物学的製剤導入後には治療目標としていわゆる image remission, すなわち完全な骨関節破壊抑制がかかげられることが多い。従来型治療では、関節破壊抑制について大規模な検討が行われなかった点も考慮に入れる必要があるが、やはり薬剤効果の面からも関節破壊抑制を治療目標とすることが困難であった点は否定できない。仮に薬物治療では骨関節破壊が抑制できないとすると、薬物治療の選択によって機能予後をかえることはできないことになる。関節破壊が予防できない (予防できることを支持するデータがない) 環境では治療に対して確実性、迅速性を求められることはない。

最終的な予後が変更できない以上は、当然対症的な治療に終始して症状改善のみを追い求めることになる。したがって症状改善に重きがおかれる。もちろん関節炎症の抑制が結果として関節破壊抑制に働く可能性がある。しかし、結果として得られる関節破壊抑制と目標として達成される関節破壊抑制とでは大きな相違がある。臨床症状の改善と関節破壊抑制とは必ずしも一致しないこと¹⁾を理解したうえで、治療目標を関節破壊抑制におくことが大切である。以

Key words : disease activity score, Sharp score, DMARDs

* Therapeutic approaches in the rheumatoid arthritis

** N. Ishiguro (教授) : 名古屋大学大学院整形外科 (Dept. of Orthop. Surg., Graduate School of Medicine, Nagoya University, Nagoya).

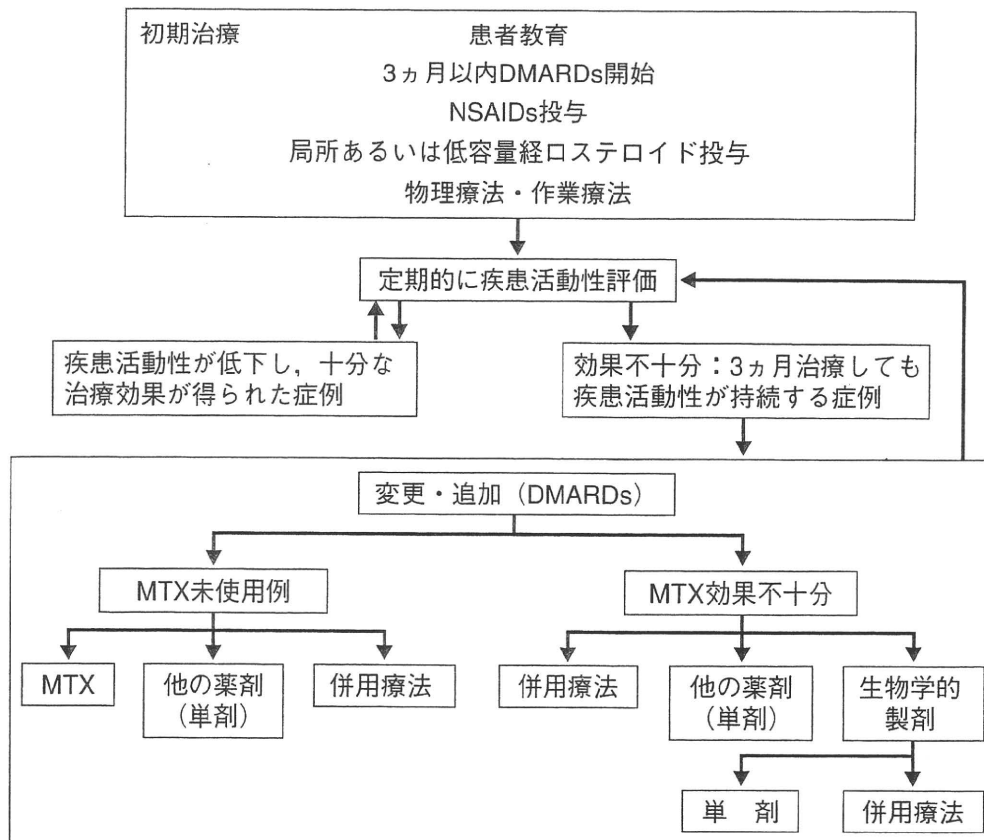


図 1. ACR ガイドラインによる治療 (文献 2 より引用改変). 早期からの DMARDs 治療開始と 3ヵ月ごとの疾患活動性評価が特徴である. 診断後 3ヵ月以内に DMARDs を開始すること, 薬剤変更にあたっては MTX の使用を常に考慮すること, 生物学的製剤の使用を選択肢で入れていることなど現在でも十分に通用する内容である.

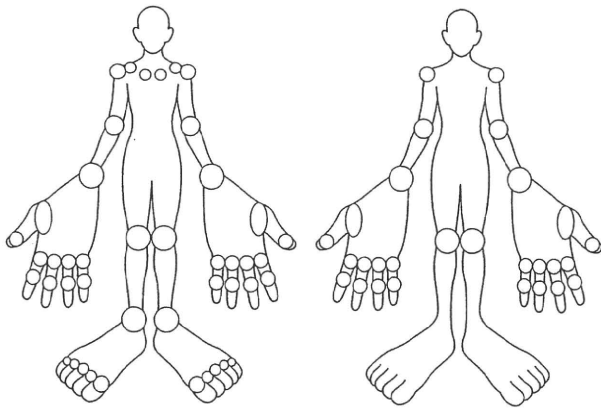
前の治療環境では医師は関節破壊を正確に評価する必要がない. 結果として起こる関節破壊に対して外科的治療の時期と種類を考えるのみでよかった. また, RA 治療が時間との戦いであることを認識する必要がない. 対症的な症状改善を図るのみで, 機能維持を期待しない治療環境である. 現在でも安易なステロイド使用がこれに当てはまる.

しかし, 薬物治療の高度化に伴って治療成功例すべてではないにせよ, かなり高頻度に骨関節破壊抑制が期待できるとすれば, 考え方を根本からかえる必要がある. また, 患者ニーズの変化を考えれば, 関節破壊の予防を念頭においた治療が必要である. 一度起こった関節破壊は人工関節を用いる以外に機能回復すら困難であること, RA の関節破壊が病早期に起こることなどを考えると, 治療目標として早期から確実な骨関節破壊抑制をあげる必要性が理解でき

る.

II 基本原則の変化

目標の変化に応じて治療原則の変化も考えられる. RA 診療においては骨関節破壊抑制効果のエビデンスをもつ薬剤を使用し, なおかつ十分な治療効果を達成し, そのうえで定期的な画像評価により抑制効果を確認することが求められる. ガイドラインに従った治療法はその治療選択に客観性をもたせるうえで重要である. 現在, 治療計画におけるガイドラインはアメリカリウマチ学会 (ACR) ガイドライン (2002 年発表) [図 1] がもっとも広く受け入れられている²⁾. 治療の迅速性と再評価が求められていることに注意が必要である. 当然のことながら薬剤選択にも骨関節破壊抑制効果のエビデンスをもつ薬剤の選択が必要となる. しかし evidence-based medicine (EBM) による治療と



a. DAS による評価 関節. 44 関節 b. DAS28 による評価 関節. 28 関節

図 2. Original DAS と DAS28 で評価される関節. Original DAS では全身 44 関節の評価を行う. DAS28 では上半身を中心に 28 関節について評価する. 圧痛と腫脹の有無だけで評価するため DAS28 は習熟すれば外来診療で十分に使用可能である.

いえども、個々の症例すべてにおいて適切とはいえない。疾患の活動性を客観的に評価し、これに基づいて治療法を変更・選択することが重要である。さらにこれに従い治療をすすめるには疾患活動性評価と定期的 X 線評価による検証が必要である。

III 治療効果判定法

普通、医師は臨床検査値、臨床所見、X 線評価、患者の印象などを組み合わせて薬剤の効果判定を行っている。具体的には ESR, Alb, α_1 -Glb, α_2 -Glb, γ -Glb, Hb, RBC, PLT, CRP, IgM-RF, マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP)-3, 朝のこわばり, 患者による痛みの評価 (visual analogue scale : VAS), 患者による全般的健康状態 (VAS), 握力 (左右), Ritchie articular index, 圧痛関節数, 腫脹関節数, HAQ, mHAQ などである。

医師によって各項目に対する重みづけが異なるので、こういった方法では疾患活動性評価基準が変化し、統計データとして使用できない。臨床的な疾患活動性の評価を公式化できれば、異なる治療法による違いが比較可能となるので臨床研究や一般臨床にも有用である。臨床的治療効果を公式化して判定するには現在、二つの方法、すなわち disease activity score (DAS),

ACR コアセットが国際的に用いられている。RA の疾患活動性を一つの変数で評価することは困難であるから、これらの活動性判定基準は種々の項目を対象に判定するように設計されている。

IV ACR コアセットと DAS

治験をはじめとする薬効検定では ACR コアセットを用いた ACR 改善基準が世界的な基準である。ACR 改善基準はある薬剤の有効性を検討するのに、観察母集団の中で一定の症状改善がどの程度の割合で観察されるかをみるものである³⁾。ACR20%改善基準を満たすことがはたして個々の患者での症状改善を要求される臨床で意味をもつのか疑問である⁴⁾。したがって、集団としての効果予測には有用であるが、個々の症例の観察に用いることに必ずしも向くとはいえない。ACR 改善基準は、個々の患者のある時点での RA 活動性の評価をするというよりは、治療法による改善度の違いを患者母集団において検出することを目的としている³⁾。すなわち薬効 (治療法) 判定の基準である。

一方 DAS は、患者個々の疾患活動性を計算式で算出することにより、治療法選択の基準を与えようとするもので、目的がまったく異なる⁵⁾。DAS は大きく DAS28 と original DAS に分類され (図 2), それぞれに CRP 版と ESR 版とが用意されている。さらに VAS を除いた 3 変数の版も用意されている。Original DAS では観察対象関節は 44 関節であった。これが煩雑ということで上肢を中心とした 28 関節に絞り込み、腫脹関節数と圧痛関節数のみを計算式に使用する DAS28 が提唱された。診察法は簡素化され、関節腫脹と圧痛の有無だけ記載し程度は評価しない。対象関節は ① 近位指節間 (PIP), ② 中手指節 (MCP), ③ 手関節, ④ 肘, ⑤ 肩, ⑥ 膝の 28 関節である。計算式は $DAS28 = 0.56 * \sqrt{\text{tender28}} + 0.28 * \sqrt{\text{swollen28}} + 0.70 * \ln(\text{ESR}) + 0.014 * GH$ と定義されている。計算機でも可能ではあるが、<http://www.das-score.nl/www.das-score.nl/index.html> にアクセスするとプログラムがダウンロードできる。DAS ではその絶対値によって疾患活動性の high/moderate/low を定義し

表 1. DAS28 を用いた EULAR 改善基準. DAS28 で疾患改善をみるための基準. 到達した改善レベルと変化量の二つから改善基準が決められている. 改善幅のみでなく, 達成した症状改善状態も評価に加えているところが特徴である.

現在の DAS28	DAS28 改善		
	1.2 <	1.2 ≤ かつ < 0.6	≤ 0.6
DAS28 ≤ 3.2	good response	moderate response	no response
3.2 < DAS28 ≤ 5.1			
DAS28 > 5.1			

DAS 寛解規準 < 2.6

ている.

基準の決定方法は臨床経験に基づくもので臨床医が①病状から DMARDs 治療の開始が必要, または② DMARDs の治療無効のため変更が必要と考える状態を想定し, それら患者群の 25 パーセントイルに相当する DAS 値 3.7 を high disease activity の下限とした. 逆に①寛解状態のため DMARDs の中止を検討する, ②同一 DMARDs の治療を 1 年以上継続している, ③良好な経過で DMARDs 治療を 1 年以上中止しているなどの状態を想定し, これに含まれる患者群の 75 パーセントイルに相当する DAS 値 2.4 を low disease activity の上限と設定した. この間の中間帯が moderate と決められている. 臨床医の感覚によって設定し, それを統計学的に処理したものである.

別にヨーロッパリウマチ学会議 (EULAR) から治療による改善基準が設定されており, 改善基準には, ①治療反応性がみられること, ②治療後の疾患活動性が低いことの両方が求められた. 治療前後の DAS の改善値を 0.6 と 1.2 に境界値として, 治療後の DAS 値の high/moderate/low と組み合わせを行い, EULAR 改善基準が作られている (表 1). DAS は CRP と ESR どちらからも求めることができる. 一般的にこの二つの値には高い相関が認められるが, CRP を用いた場合の値はやや低めに計算される. 個々の症例に対して継続的に DAS-CRP を用いて, 疾患活動性を評価するときには問題はないと思われるが, ESR との混用は避けるべきである.

V 関節破壊抑制が最終目標

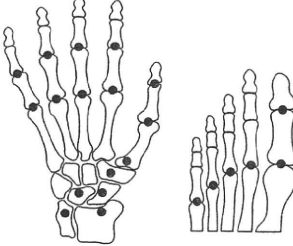
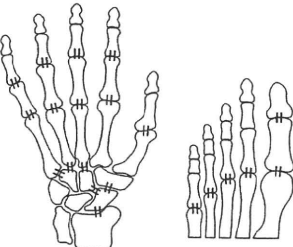
現在 RA 治療における最終目標は骨関節破壊

抑制にある. したがって, 治療効果判定には骨関節破壊の抑制を確認することが必要となる. RA 画像診断の基礎となるのは単純 X 線像である. 軟骨下骨, 骨の状態は単純 X 線像による評価に優るものはない. 逆に関節液貯留, 滑膜炎, 関節周囲の浮腫などの評価には困難が伴う. 関節破壊の進行程度評価をはじめとして, 診断, 手術時期決定, 病態把握に広く用いられている. 近年の治療技術の進歩により最終目標が関節破壊抑制におかれているため, X 線像分析による治療効果判定が重視されている. 初期変化をとらえるという点では MRI と比較すると劣るものの, 簡便・安価という利点を生かして関節破壊抑制効果を判定することは重要である.

RA では関節症の進行に合わせて X 線像での分類が従来から広く行われている. Larsen による分類は Steinbrocker による分類と比べ, ①詳細である点, ②基準となる X 線像がある点, ③病状の進行に沿っている点などが評価されている. これら分類は grade (stage) 分類であるから診断書作成など現状把握には役立つが, 経過観察による治療判定に用いるには感受性において問題がある. そこで治療効果判定には Sharp スコア (正確には modified Sharp スコア) が使用される⁶⁾. 画像評価法の比較では画像診断の有用性はかわらないが, 細部の描出という点で Sharp スコアは優れる. しかし, 正確に Sharp スコアを毎回評価することは時間と労力を要する作業であるから, 臨床的には Larsen の grade 分類で十分とする意見もある⁷⁾.

Sharp スコアでは初期診断, 病態の把握という点で手関節~手と足部の正面 X 線像を用い

表 2. Modified Sharp スコアによる画像評価 (文献 6 より引用改変). 1971 年に Sharp らにより提唱された Sharp 法は, 両手正面 X 線像での骨びらんと関節裂隙狭小化のスコアから関節を評価する方法. 現在, 足 X 線正面像を評価対象として加えた van der Heijde による modified Sharp 法⁹⁾が汎用されている.

	<p>骨びらんスコア</p> <p>スコア1: 個々に存在する場合 スコア2~4: 骨びらんが存在する関節表面の面積に応じてスコアリング スコア5: 関節が完全に破壊された場合</p>
	<p>関節裂隙狭小化スコア</p> <p>スコア0: 異常なし スコア1: 局所的または疑い スコア2: 全般的に認められる (本来の関節裂隙の50%以上が残る) スコア3: 全般的に認められる (本来の関節裂隙の50%以下が残る) または亜脱臼 スコア4: 骨性強直または完全脱臼</p>
<p>総Sharpスコア 骨びらんスコア+関節裂隙狭小化スコア</p>	

る. 変化が微細であるので十分に個々の関節・周辺骨について関節裂隙と骨のびらん像に注目し, 評価を行うことが要求される (表 2). 手, 足以外の関節は評価されないので必ずしも全身の関節症変化の評価とはいいがたいが, 逆に代表的関節を可能な限り厳密に評価することで判断材料とする方法は, RA のような非常に多くの関節障害を伴う疾患ではやむを得ない選択ともいえる.

VI 治療結果を高める基本原則

RA の治療効果を測る物差しとして二つの指標, 症状改善指標 (DAS) と X 線評価指標 (modified Sharp スコア) が一般的に用いられる. 治療効果を高めるには薬剤選択もさることながら, 時期の問題が大きい.

治療開始時期と結果としての関節破壊抑制効果との関連については多くの報告がある. EBM としてもっとも確実な関節破壊抑制効果が示されている薬剤は MTX であるが, その MTX 治療ですら進行例では, 長期の観察においては MTX 治療の成否にかかわらず, 一部の症例を除いて大多数の症例で関節破壊の進行が

観察される⁸⁾. また, 従来十分であると考えられていた炎症抑制状態でも関節破壊が進行することを示す報告もある¹⁾. 逆に発症直後の治療から MTX が選択されるような早期例を対象とした研究では, ほとんどの症例で新たな破壊が起こらないなど, 有意に関節破壊の遅延が観察されている⁹⁾. MTX と生物学的製剤との併用でも早期例 (発病後 3 年以内) では症状改善, 関節破壊抑制の点で明らかに違いがみられ, 早期例に有効例が多い¹⁰⁾. 早期からの確実な治療は大きな症状改善をもたらす可能性がある.

寛解導入, 治癒といった観点ではさらに差が明確となる. 確かに診断が確定できないような超早期の症例では自然経過において寛解となる症例が一部にはある. しかし, 12 週以上多発関節炎症状が持続した場合, 自然経過における症状消退は期待できず, RA と診断される可能性が高い¹¹⁾. ACR の分類は診断に時間がかかりすぎる点が指摘されており, 早期例に適応するにはしばしば遅延などの問題が起こる. 診断の遅れは治療の遅れにつながるため積極的な診断が必要である. このとき抗 cyclic citrullinated peptide (CCP) 抗体陽性, リウマトイド因

子 (RF) 陽性, MRI 所見などを診断根拠とする厚労省研究班の早期診断基準が公表されている¹²⁾。早期診断を心がける必要性から, ぜひともこれの使用を考慮すべきである。ACR 診断基準 (1987 年) は臨床研究など診断の正確性を求めるには向いているが, 早期における感受性には問題がある。

さらに, DMARDs 治療は早期に開始する必要があるのと同時に, 効果が不十分であればすみやかに追加・変更が行われるべきである。早期から関節破壊所見を認める一群の症例は, たとえ MTX 治療を行っても関節破壊が予想される¹⁾との研究結果がある。急速破壊例の診断を下すには RF, MMP-3 高値などの所見や X 線像による経過観察に基づく方法しかないが, できるだけ個々の症例の経過を予想して, 必要と判断されるなら早期に生物学的製剤など強力な治療を行うべきである。

●●●●● おわりに ●●●●●

今後, RA の治療には迅速性と確実性が求められる。迅速性はいうまでもなく, 早期の診断と治療開始・選択によって実行可能である。一方の確実性は EBM に基づく治療だけでは不十分で, 個々の症例に対しての治療最適化が必要となる。当然, 骨関節破壊抑制を目的として評価と治療見直しが継続的に行われる必要がある。したがって, 高い治療目的を達成するには血液検査, DAS などの病状把握に加えて, 主要関節に対する X 線検査を行い, 正確な骨関節病変の進行をとらえることが重要である。骨関節破壊が予防できる可能性が示された今こそ, 従来に増して X 線像診断の重要性は高まったといえる。

文 献

1) Smolen JS, Van Der Heijde DM, St Clair EW et al, Active-Controlled Study of Patients Receiving Infliximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis of Early Onset (ASPIRE) Study Group: Predictors of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with high-dose methotrexate with or without concomitant infliximab; results from the ASPIRE trial. *Arthritis Rheum* **54**: 702-710, 2006

2) American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis 2002 update. *Arthritis Rheum* **46**: 328-346, 2002

3) Falson DT, Anderson JJ, Boers M et al: American college of rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Rheum* **36**: 729-740, 1993

4) Pincus T, Stein CM: ACR 20; clinical or statistical significance? *Arthritis Rheum* **42**: 1572-1576, 1999

5) Fransen J, van Riel PL: The disease activity score and the EULAR response criteria. *Clin Exp Rheumatol* **23** [5 Suppl 39]: S93-S99, 2005

6) van der Heijde DM: Plain X-rays in rheumatoid arthritis; overview of scoring methods, their reliability and applicability. *Baillieres Clin Rheumatol* **10**: 435-453, 1996

7) Pincus T, Larsen A, Brooks RH et al: Comparison of 3 quantitative measures of hand radiographs in patients with rheumatoid arthritis; Steinbrocker stage, Kaye modified Sharp score, and Larsen score. *J Rheumatol* **24**: 2106-2112, 1997

8) Borchers AT, Keen CL, Cheema GS et al: The use of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* **34**: 465-483, 2004

9) Weinblatt ME, Weissman BN, Holdsworth DE et al: Long-term prospective study of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. 84-month update. *Arthritis Rheum* **35**: 129-137, 1992

10) Bresnihan B: Preventing joint damage as the best measure of biologic drug therapy. *J Rheumatol Suppl* **65**: 39-43, 2002

11) Green M, Marzo-Ortega H, McGonagle D et al: Persistence of mild, early inflammatory arthritis; the importance of disease duration, rheumatoid factor, and the shared epitope. *Arthritis Rheum* **42**: 2184-2188, 1999

12) 江口勝美, 折口智樹: 関節リウマチの早期診断一定義, 診断基準, 課題. *リウマチ科* **34**: 237-243, 2005