

る。ここではその問題点と限界について述べる。

変形性膝関節症の治療

OA 膝治療は2つの要素から成立している。臨床ではOA 膝患者の受診動機は痛みで、決して軟骨破壊ではない。軟骨消失を主訴に来院する患者はいない。したがって、臨床上の主眼は疼痛対策におかれる。しかし、OA には軟骨の破壊による症状出現という面があって、軟骨破壊を抑制することは症状悪化を防止し、予後に大きな影響をもつことは明らかである。OA 治療での真の目標は軟骨破壊の抑制にあるといっても過言ではない。OA 治療は、①関節(炎)症状に対する治療、すなわち、疼痛抑制治療(symptom modifying effect)と、②関節軟骨破壊抑制治療(structure modifying effect)とに分けられる。前者には経口薬ではアセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬などが使用される。後者にはいわゆる DMORD (Disease modifying anti-OA drug, または SMORD, Structure modifying anti-OA drug)といわれる薬剤の可能性が検討されている。しかし、現在軟骨破壊抑制効果を臨床的に十分に証明できた薬剤は存在しない。

OA に対する関節注入治療

過去には多くの薬剤が関節内注入治療薬として用いられてきた。副腎皮質ステロイドは強力な抗炎症効果を有し、水腫や炎症を伴うOA 患者治療には有効であるが、頻回投与による軟骨のプロテオグリカンやコラーゲン合成抑制などによる軟骨変性の加速が懸念される。一方、HA は生体内で広く分布し、特に関節軟骨ではアグリカン分子が結合し軟骨組織の粘弾性に関与する。関節液では濃度と分子量が粘張度に関係し、関節の潤滑に貢献する。HA の産生低下と低分子化は関節の潤滑機能低下に直結し、摩擦や関節軟骨破壊の大きな原因となる。したがってOA 膝患者へのHA の局所注入は、軟膏や関節液の粘張性を回復させる効果が期待できる。

また、もともと生体分子であるので副作用も少なく、注射手技での化膿性関節炎発症を除けば安全な治療法と考えられている。以上の理由からわが国では、高分子HA の関節内注入は広く利用されている。ステロイドはその消炎・除痛効果については、有効性は広く知られている。しかし、一方で頻回投与による副作用の問題が指摘されている。特に中止すべき問題として、①関節症の増悪、②全身的な影響の2点を強調したい。用いられる薬剤によっても異なるが、特に後者の全身的影響は無視されがちであるが、極めて大きく副腎機能不全を起し得ることを強調したい。

HA 関節内注射の有効性

関節液中では、HA は関節液粘張性の保持に重要である。関節内に投与されたHA の作用機序として、関節液の粘性改善は大きな要素と思われる。関節液の粘張度は関節表面での潤滑に関わり、潤滑能力の低下は関節表面の摩擦を引き起こす。欧米でのHA 関節注入薬の位置づけはViscosupplement (lubricant)による治療、したがって医薬品よりむしろdeviceとして考えられている。しかし、動物実験では薬理作用が認められ、アグリカンの分解抑制やプロテオグリカン・コラーゲン合成促進作用などの軟骨保護作用、軟骨細胞のアポトーシスの抑制、炎症性サイトカインの産生抑制、MMP などの破壊酵素の産生抑制など、多岐にわたることが示されている。また、活性酸素類やNO などに対するスカベンジャー作用など、新たなHA の作用もみつかっている。

HA の有用性については、プラセボ対照二重盲検比較試験をはじめとする多くの臨床試験からmeta analysis が発表されている。Wang らは12 のプラセボ対照盲検臨床試験のmeta analysis 結果から、HA 関節注入治療はプラセボ治療に対してOA の疼痛と機能での症状改善効果が有意に優れると結果を得ている(図1)²。しかし、同時に臨床試験間での結果のばらつきや方法論での質的に低い単盲検試験や単施設試験で、

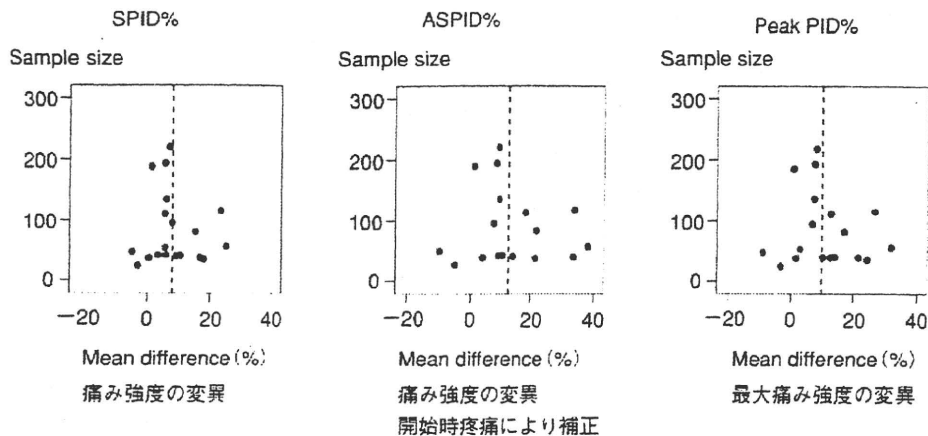


図1 HA関節注入治療の効果を efficacy scoresとして評価したFunnel plots(文献3より改変引用)
 HA治療群とplacebo群との平均的相違を横軸に示す。それぞれ dots は個別の trialsを示す。波線は placebo群と比較して効果の違いの平均値を示す。個別では placebo群を超えないものもあるが、平均的には placebo群より優れることが理解できる。
 SPID%：痛み強度の変異の総和/最大の痛み強度×研究期間；臨床研究期間の全般改善度を示す。
 ASPID%：痛み強度の変異の総和/baselineの痛み強度×研究期間；症例組込み時の痛みにより補正した値。 peak PID%：最大の痛み強度変異/最大の痛み強度；最大の痛みに対する効果。

HA治療に良好な結果が得られている点を指摘している。この解析で興味深いのは、65歳以上の患者とX線での高度な関節裂隙狭小化を示す例では、効果が少ないと結論している点である。分子量の違う薬剤間での相違については解析に至っていない。Bellamyらは、やはり疼痛と機能、患者全体評価での改善効果がHA関節注入治療にあると結論している⁹。特に、注射終了後5~13週においてその効果が著しいとしている。Arrichらもほぼ同等な結論で、OA治療での有用性を強調している¹⁰。Loらはいわゆる publication biasの関与が大きいかとして、HA関節注入治療はプラセボ対照に対してわずかな有効性しか見出せないと結論した¹¹。およそ効果の80%が関節注射手技によるプラセボ効果であると結論づけている。さらに、高分子HA薬は低分子薬より治療効果があると推定されるが、それも試験間のばらつきが大きく結論には至らないとしている。種々の議論があるが、X線評価で関節裂隙狭小化が進んだ進行例や高齢者には、HA関節注射のみでは疼痛、機能改善効果は限られると考えるのが妥当であろう。

HAとステロイド薬関節注射との比較

ステロイド薬関節内単回もしくは複数回投与とHA薬剤の週1回3週の複数回投与の臨床症状の改善効果を、中期的に比較した臨床試験結果が複数報告されている¹²。いずれの結果もステロイド薬と比較して疼痛症状、機能改善の面でHA薬剤複数回投与は勝るとも劣らない効果が3カ月、6カ月後に得られたというものである。これらの研究では、治療開始後3カ月ないし6カ月後に評価するという点が大きく関与している可能性を指摘したい。短期的には劇的な症状改善が期待できなくとも、やや長い目でみればステロイド関節投与と同等な効果が期待できることになる¹³。Bannuruらは meta-analysisにおいて時間経過を中心に検討して、2週までの短期的にはステロイドが高い有効性を示すが4週でほぼ同等、それ以降はHA薬剤の効果が勝ると結論している(図2)¹⁴。合併症ではHA薬剤と比較して多く、関節症の増悪はよく知られている¹⁵。以上を考え合わせると、ステロイド関節注射の使用はできるだけ少なく、かつ間

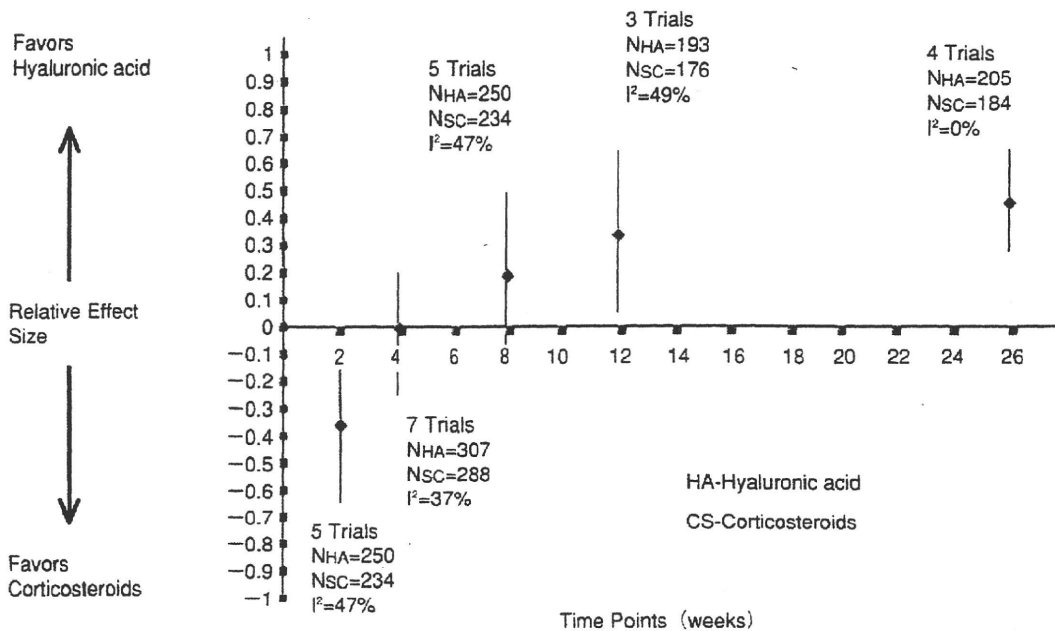


図2 HAとステロイド関節内注射の効果の時間経過(文献9より改変引用)

過去のRCTの結果を時間経過に関わる症状変化としてとらえてMeta analysisを行った結果、横軸を時間経過として両治療の優位性を示している。当初はステロイドが優位であるが(下方にあるのがステロイド優位)、4週以降になると同等もしくはHA関節内注射が効果の点で優っていることがわかる。最大6か月後でもステロイドに比較して優位な効果がみられている。

隔を十分に空ける必要(最低でも6週以上)がある。HA関節注射はEBMの観点からみると、X線で関節列隙の狭小化が比較的軽度であって、若年の患者(65歳以下が望ましい)の疼痛と機能の改善に効果がある治療として推奨できる。

筆者の勤める治療法

筆者は一般的には1~2週に1回の割合で、6回までの関節注射を行っている。リドカインとの併用により除痛効果の増強も考えられるが、HA自体にも除痛効果が期待できる。リドカインの使い回しは感染の原因となり得るから使用していない。関節炎症が強く水腫、局所熱感を伴う症例には、ステロイドの合併症(感染、血糖上昇、結晶性関節炎)につき説明して、排液などの処置後に難溶性のステロイドエステル結晶を製剤化した長時間作用型の懸濁性ステロイド薬をリドカインと併用して初回に限り使用し

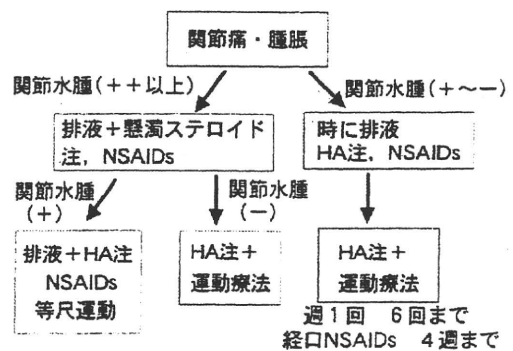


図3 HA, ステロイド関節内注射の使い分け 炎症状態が強く、高度な水腫を伴う場合のみ初回にステロイドの関節内注射を行っている。

ている(図3)。この場合、リドカインは5mLバイアルを使用して残りは破棄する。それ以降では排液は必要時行うが、HA薬剤のみを関節注入薬として使用している。一般的に回数を重ねると、関節液貯留の減少と関節液曳糸性の改

善が観察される。関節液曳糸性は粘張性回復のよい指標である。排液した関節液を注射器から膿盆に極少量垂らせば観察できるので、ぜひ実施していただきたい。合併症としての、①感染性関節炎、②関節血症、③投与時反応などが挙げられるが、③は稀である。化膿性関節炎は短時間で関節機能を廃絶に至らしめる。したがって注射後関節局所の熱感、腫脹、疼痛が生じればただちに来院するように指導することが必要である。

- 消毒薬にはヨウ素系などの殺菌効果が強く、持続性のあるものを選択する。
 - 注射部位周辺の十分に広い範囲に消毒を行う。
 - 皮膚に外傷や湿疹のある患者には避ける。
 - 器具はディスプレイザブル(使い捨て)を用い、再利用しない。
 - 注射後は入浴を避け、穿刺部位の清潔を保つよう指導する。
- などの原則を守るようにしている。

■ おわりに ■

HAの関節内注入療法は副作用が少なく、関節疼痛、機能改善を目的とする有効な治療法である。患者全体評価からも有用性は高いと判断される。ステロイド関節注射は頻度と回数に制限を設ける必要がある。合併症の点から繰り返し行われる治療手段ではない。変形性関節症に対するHA注入療法は、EBMの点からも推奨できる治療の1つである。

文 献

- 1) Altman RD et al ; Group for Respect of Excel-

- lence and Ethics in Science (GREES) ; Total joint replacement of hip or knee as an outcome measure for structure modifying trials in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13(1) : 13-19, 2005.
- 2) Habib GS ; Systemic effects of intra-articular corticosteroids. *Clin Rheumatol* 28(7) : 749-756, 2009.
- 3) Wang CT et al ; Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am* 86-A(3) : 538-545, 2004.
- 4) Bellany N et al ; Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev* 18(2) : CD005321, 2005.
- 5) Arrich J et al ; Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee : systematic review and meta-analysis. *CMAJ* 172(8) : 1039-1043, 2005.
- 6) Lo GH et al ; Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis : a meta-analysis. *JAMA* 290(23) : 3115-3121, 2003.
- 7) Caborn D et al ; A randomized, single-blind comparison of the efficacy and tolerability of hylan G-F 20 and triamcinolone hexacetonide in patients with osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 31 : 333-343, 2004.
- 8) Leopold SS et al ; Corticosteroid compared with hyaluronic acid injections for the treatment of osteoarthritis of the knee : a prospective, randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 85 : 1197-1203, 2003.
- 9) Bannuru RR et al ; Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis : a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 61(12) : 1704-1711, 2009.
- 10) Tehranzadeh J et al ; Cartilage metabolism in osteoarthritis and the influence of viscosupplementation and steroid : a review. *Acta Radiol* 46(3) : 288-296, 2005.

(執筆者連絡先) 石黒直樹 〒466-8550 愛知県名古屋市長区鶴舞町 65 名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学運動形態外科学整形外科

4. 最新の薬物治療で手術は減ったのか？

石黒 直樹*
いしぐろ なおき

薬物治療の進歩により

- 関節リウマチ外科治療は全体として減少した。
- 関節機能の回復を目的とした関節形成術特に人工関節置換術は明らかに減少したといえない。
- 症状改善を目的とした滑膜切除は適応が縮小し減少している。
- 人工関節置換術の減少には治療介入時期の早期化が必要であろう。
- 生物学的製剤の早期使用は関節形成術を減少させる可能性がある。

Key Words

関節形成術, 人工関節置換術, 滑膜切除術, ACR (2008) recommendation

□ 外科的治療としての手術

関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) は全身性の消耗性疾患であるとともに、関節炎を主体とする運動器疾患の特徴を併せ持つ。運動器の破壊は身体障害に結びつくこととなる。RA に対する外科手術は全体的に減少しているとの報告がある¹⁾。それとともに外科手術の内容が変化していることに注目したい。外科的な治療手段の目的として、①障害関節の機能回復、②関節障害の発生・進行予防、③関節疼痛の緩和などがある。

①障害が起こった関節の機能回復には主に関節形成術が適応される。そのなかでも近年は人工関節が好んで選択される。これは人工関節が耐久性と無痛性、運動性に優れる結果である。特に人工膝関節、人工股関節は長期に渉り十分なデータが蓄積され、ほぼ確立された治療手段である。その他人工肘関節、人工足関節なども飛躍的な成績向上がみられ、RA 外科治療においては標準的な選択肢となりつつある。

一方、関節を固定するデメリットが強く認識されるようになり、関節固定術は適応範囲が狭くなりつつある。これは後に述べる RA 患者のニーズ変化が関係している可能性がある。②関節障害の発生・進行予防については滑膜切除術が期待されて行われた。しかし、その後関節障害を抑制する効果は乏しいとの報告が相次ぎ、現在は治療

手段として限られた適応となっている。滑膜切除術は③関節疼痛の緩和においても薬物治療の成否によっては、一度抑えられた滑膜炎が再燃し当初の目的を達成できない例も多い。したがって、関節障害予防、疼痛の緩和といった手術目的には慎重な対応となっているのが一般的な認識であろう。

□ 手術は減ったのか？

滑膜切除術を始めとする関節破壊進行抑制・疼痛の緩和といった目的の手術は薬物治療の進歩により当然のごとく適応範囲が限定される。手術という侵襲を伴う治療の前提条件は、十分な薬物治療が実施されていることとなる。DMARDs 特に MTX の使用は明らかに滑膜切除の頻度を減少させた。今後生物学的製剤の一般的使用により滑膜切除術の必要性は限定的なものになると考えられる。今や薬物治療に関節破壊抑制効果が期待できる以上、敢えて滑膜切除を優先させる必要性は乏しい。活動性関節炎部位での活動性滑膜病変を外科的に切除することによって、薬物効果の増強を期待する考え方がある。しかし、抗 TNF 治療薬が複数存在し、さらに一部とはいえ増量という選択が可能となった今、薬物治療を尽くしたうえでの選択となるであろう。以上より、滑膜切除術の適応は確実に減っている。これはわが国における

*名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学運動・形態外科学整形外科

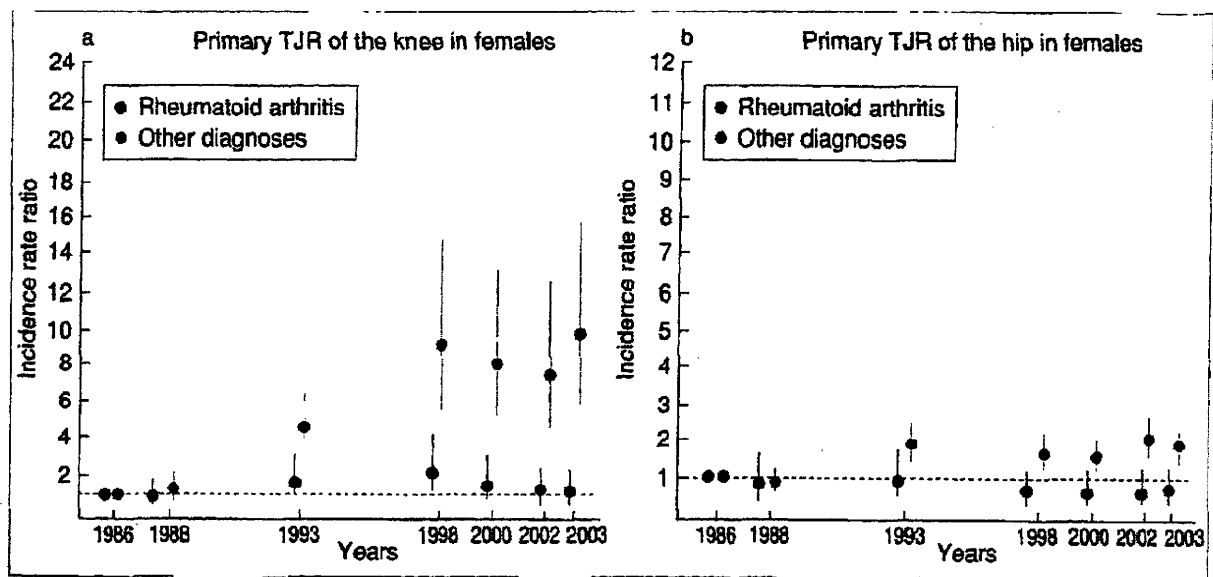


図1 Finlandにおける人工関節置換術数の推移

人工膝関節手術数はRA以外では大きく増加しているが、RA患者では一定数に留まっている。人工股関節でも非RA症例は増加しているが、RA症例では大きな変化がない。人工関節手術の一般化に伴い適応拡大があるとすれば、症例数に変化がないことは薬物治療による関節破壊軽減化があるかもしれない。もし適応がほぼ同一ならば関節破壊は防止できていないことになる。

(Tuulikki S. et al. Ann Rheum Dis 66 : 341-344, 2007³⁾より抜粋)

コホート研究からみても明らかとされている²⁾。

□ 人工関節置換手術を取り巻く環境

人工関節手術のなかで特に人工膝・股関節手術は頻度も高く、広く行われている。ここではこれを中心に話を進める。関節の基本的な要件として①無痛性、②可動性、③支持性があげられる。この3つの要件のバランスが下肢と上肢ではやや異なる。以前は下肢では無痛性と支持性が重視され、可動性がともすれば軽視されていた。関節固定術はまさにその極端な例である。この3つの要件を高いレベルで並立させる目的で人工関節は開発された。改良を重ねられ、人工関節置換術は整形外科医のみならずリウマチ専門医(Rheumatologist)からも関節症治療法の選択肢として高い評価を得ている。薬物治療で疼痛症状がコントロール不能となり、関節障害がADLに大きな影響を持ったときには必ずや選択肢にあがるほぼ確立された治療法である。None RA患者における人工関節置換術はすでに2003年までで2倍から10倍に増加したとのFinlandの報告例もある(図1)³⁾。同報告では興味深いことに人工関節の一般化にもかかわらず、RA患者の関節置換は増

えていないとしている。さらに2003年という時期からみても明らかのように、生物学的製剤が広く行き渡る以前のデータであることに注目したい。一般化には技術の改善による治療成績向上があること、それによる医療的側側の患者に対する推薦という事実がある。当然RA患者においても多少なりとも増加がみられても不思議ではない。

これを説明するには薬物治療の進歩以外に、RAの軽症化という議論がある⁴⁾。過去20年といった長期の観察では以前と比較して最近のRAは軽症化がみられるという議論である。リウマチ結節、XPでの骨びらん像、リウマチ因子等の指標によるRA軽症化の報告例がある⁵⁾。これに従えば、RA患者に対する人工関節置換術は減少している可能性がある。これには常に最新薬物治療の提供体制が改善させているという反論があることを指摘したい⁴⁾。

患者ニーズの変化という点も大きい。人工関節の一般化には当然のことながら患者の意識の変化が必要である。優れた治療成績であろうが、これを受け入れる患者のニーズに一致しなければ普及しない。わが国を始めとする多くの国で見られる人工関節手術の普及は、それを必要とする(受け

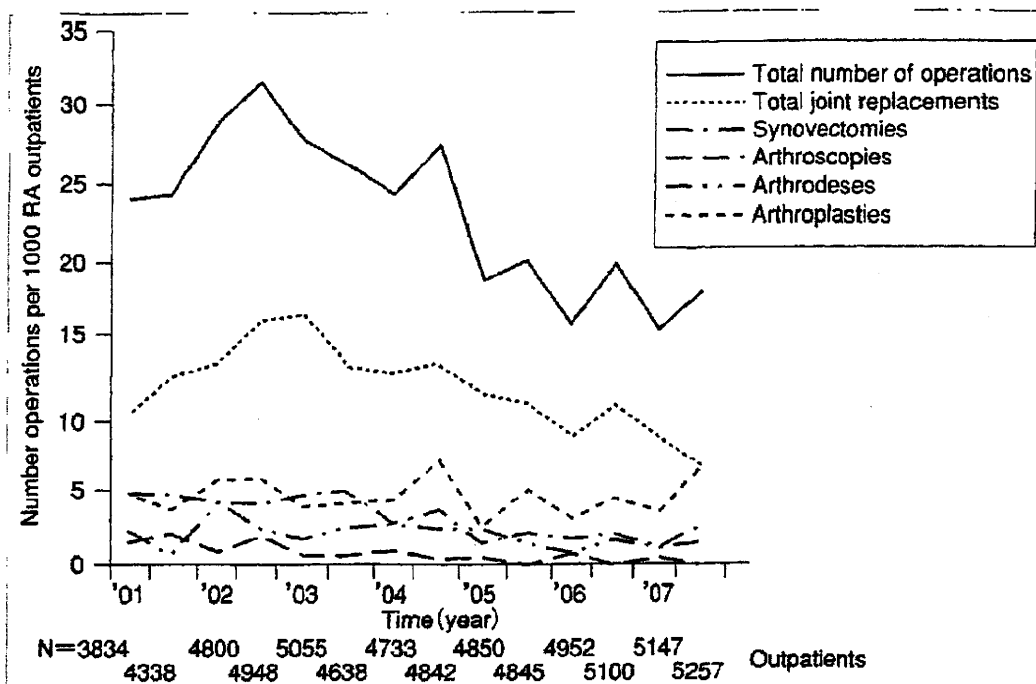


図2 わが国での単一施設からの手術件数の推移

単一施設の場合、治療計画の統一が図られて内容変化の画一性が期待できる。これによる手術数の減少であるとするならば、治療内容の変化が関節手術を減少させたこととなる。Arthroplasty (手関節, MP 関節, 肘関節, MTP 関節の手術を含む) の増加に注意が必要。QOL 向上を目指した小手術の増加がある。

(Momohara S. et al. Ann Rheum Dis 69 : 312-313, 2010⁷⁾より抜粋)

入れる) ヒトが増えているという面があることを忘れてはならない。RA 患者のみならず、多くの関節症患者はより積極的(快適かつ活動的)な生活を望む状況になっている。これは RA 薬物治療の選択にも当てはまるのではないかと考えている。

□ 外科的治療手段としての手術は

減ったのか？

以上述べたように、人工関節置換術の場合は滑膜切除術に比較して手術を決定する要因が複雑である。現在の病態を改善すれば、手術が減るという簡単な議論ではない。さらに、関節症(関節障害)に対する治療法とすれば人工関節置換術は一般化している(増加傾向)という事実がある。すなわち、RA に対する手術は薬物療法の進歩により比較的短期間に減らせても、RA に起因して起こった関節症(関節障害)に対する手術としての人工関節置換術は長期に涉れば、減らないかもしれないということになる。そもそも生物学的製剤

の一般化に期待される面は構造的破壊の減少による関節機能障害発生の抑制である。しかし、これは抑制であって、回復ではないことが重要で、一度起こった障害は最終的には悪化し、手術に至る可能性が高い。このことはすでにわが国の疫学研究でもその可能性が指摘されており、生物学的製剤を使用しても手術が減らないという点から、治療開始時期が遅れている点を問題としている⁶⁾。逆に人工関節が減っているとの単一施設からの報告もある(図2)⁷⁾。単一施設の場合、治療に対する画一性も比較的高く、専門性を生かした治療が可能であるから、より理想に近い治療体系の構築が可能と想像する。この環境では人工関節置換術は減少するかもしれないが、多施設疫学研究では減少がみられないことは興味深い。やはり治療は開始する時期がもっとも大切であることを示す好例である。

さらには上肢手術に目を向けると、上肢の手術では RA 関連の手術は全体数では減少しているにもかかわらず、人工関節置換術では人工肘関節

表 COX 回帰分析の結果示された RA 患者を長期観察した場合に人工関節置換術が必要となる要因

Predictive factors	p Value	HR (95% CI)
Age at onset	0.506	1.009 (0.982 to 1.037)
Gender	0.614	1.193 (0.601 to 2.367)
HAQ at inclusion [†]	0.037	1.741 (1.035 to 2.929)
Larsen score at year 1 ^{**}	<0.001	1.469 (1.222 to 1.767)
CRP at at inclusion ^{**}	<0.001	1.338 (1.228 to 1.458)
ESR at at inclusion ^{**}	<0.001	1.245 (1.134 to 1.368)

十分に検証されたデータではないが、非常に興味深い。対象患者が当該施設初診時まで DMARDs 治療を受けていない症例である。分析結果からは治療に当たる医師としては初診時の CRP、ESR については改善の余地はない。悪化する前に専門医にという理解が広まるのを期待するしか術がない。逆に一年以内に関節破壊を抑制することが最終的に人工関節を減らすことができることを示している。当に確実な治療を早期（必要な）にという治療原則が示されている。

(M C Kapetanovic et al. Ann Rheum Dis 67 : 1412-1416, 2008¹⁰⁾より抜粋)

手術が減っているものの手関節、肩関節の人工関節手術が増えていて、結果として総数に大きな変化がないとの報告もある⁹⁾。この結果には滑膜切除が減ったことと、関節症（関節障害）に対する人工関節の認知度の高まりが大きく影響している可能性がある。RA 人工関節置換手術の必要性を規定している因子は多く、もっとも大きいものが治療介入の時期である⁶⁾。

□ 人工関節置換術は減らせるのか？

RA 治療において人工関節置換術は関節障害の印である。疾患活動性が高い症例に人工関節が必要となりやすい⁹⁾ことはよく知られている。

ACR (2008) recommendation では「人工関節置換術の必要性を増幅される病態がある」と判断される状態は予後不良因子として生物学的製剤の使用が推奨されている。生物学的製剤を始めとする強力な治療が荷重関節を含めて関節機能予後を変えうるとの判断であるが、根拠となるデータは示されていない。今後の疫学調査に待つところが大きいと思われる。Kapetanovic らは大関節の関節置換術の予測因子としては治療開始時の CRP、ESR、一年後の Sharp Score をあげてい

る(表)¹⁰⁾。検証が必要であるが、このなかで医師として改善が可能なのは Sharp Score のみで、他の2つについては早期に専門医に受診していただく以外にない。早期かつ確実な治療介入のみが大関節の関節置換術を減らすことができるのかもしれない。患者の全身管理や状態の改善により手術にかかわる入院期間の短縮が認められている¹¹⁾。この点からも安定化した治療手段との評価が下されよう。

最後に

生物学的製剤の導入は RA 治療を根本から変えた。まず明らかなのは、治療効果が予測できるようになり、患者に対して将来の希望を持たせることができるようになったことである。しかし、一方で外科的治療、特に人工関節置換術は RA の病態改善ではなく関節障害回復のために行われる機会がむしろ増えている。これが RA 手術件数は減っているにもかかわらず、人工関節置換術が減らない理由である。人工関節置換術が関節機能の回復として確立された評価を受け、QOL 向上を希望する患者ニーズに一致することも見逃せない点である。

文 献

- 1) Ward MM : Decreases in rates of hospitalizations for manifestations of severe rheumatoid arthritis, 1983-2001. Arthritis Rheum 50 : 1122-1131, 2004
- 2) Momohara S, Ikari K, Mochizuki T, et al : Declining use of synovectomy surgery for patients with rheumatoid arthritis in Japan. Ann Rheum Dis 68 : 291-292, 2009
- 3) Sokka T, Kautiainen H, Hannonen P : Stable occurrence of knee and hip total joint replacement in Central Finland between 1986 and 2003 : an indication of improved long-term outcomes of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 66 : 341-344, 2007
- 4) Uhlig T, Heiberg T, Mowinckel P, et al : Rheumatoid arthritis is milder in the new millennium : health status in patients with rheumatoid arthritis 1994-2004. Ann Rheum Dis 67 : 1710-1715, 2008
- 5) Jacobsson LT, Hanson RL, Knowler WC, et al : Decreasing incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in pima indians over a twenty-five-year period. Arthritis Rheum 37 : 1158-1165, 1994
- 6) Yasui T, Nishino J, Kadono Y, et al : Impact of biologics on the prevalence of orthopedic surgery in the National Database of Rheumatic Disease in Japan. Modern

Rheumatology Published online 8 January, 2010

- 7) Momohara S, Inoue E, Ikari K, et al : Decrease in orthopaedic operations, including total joint replacements, in patients with rheumatoid arthritis between 2001 and 2007 : data from Japanese outpatients in a single institute-based large observational cohort (IOR-RA). *Ann Rheum Dis* 69 : 312-313, 2010
- 8) R. J. Weiss, A. Ehlin, S. M. Montgomery, et al : Decrease of RA-related orthopaedic surgery of the upper limbs between 1998 and 2004 : data from 54 579 Swedish RA inpatients. *Rheumatology* 47 : 491-494, 2008
- 9) Wolfe F, Zwillich SH : The long-term outcomes of rheumatoid arthritis : a 23-year prospective, longitudinal study of total joint replacement and its predictors in 1600 patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41 : 1072-1082, 1998
- 10) M C Kapetanovic, E Lindqvist, T Saxne, et al : Orthopaedic surgery in patients with rheumatoid arthritis over 20 years : prevalence and predictive factors of large joint replacement. *Ann Rheum Dis* 67 : 1412-1416, 2008
- 11) Weiss RJ, Stark A, Wick MC, et al : Orthopaedic surgery of the lower limbs in 49802 rheumatoid arthritis patients : results from the Swedish National Inpatient Registry during 1987 to 2001. *Ann Rheum Dis* 65 : 335-341, 2006

心療内科ケーススタディ

プライマリケアにおける心身医療

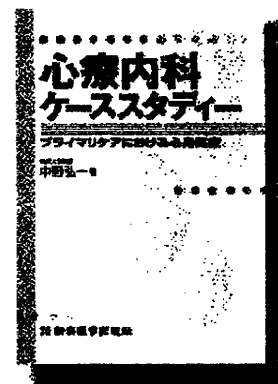
中野 弘一 (東邦大学教授) : 著

著者の心療内科30年の経験をまとめたケーススタディ。心身医学的な知識と心身症における各機能的疾患や周辺疾患の診断と治療をQ&A方式でわかりやすく解説。通読すれば内科的領域、各科領域の身体疾患を心身両面からの診療技術が一段と向上します。

本書は各内科医はもちろん研修医、学生、開業医やプライマリ・ケア医にとっても日常診療の指標となる一冊である。

主要目次

心身症とは…持続する頭痛…なかなか止まらないめまい感…なかなか寝付けない…かゆみによる不眠…脳血管障害後のうつ…摂食障害としての拒食…不定愁訴ということ…中年期クライシスをむかえて…ひきこもり、ほか



A5判 210頁
定価3,675円
(本体3,500円+税5%)
ISBN978-4-88002-803-3



株式会社 新興医学出版社
〒113-0033 東京都文京区本郷6-26-8

TEL. 03-3816-2853 FAX. 03-3816-2895
http://www.shinkoh-igaku.jp
e-mail: shinkoh@viola.ocn.ne.jp

単純X線所見を用いた関節リウマチ関節破壊の評価方法

The radiographic evaluation of rheumatoid arthritis— Interpretation of radiographic findings in plain X ray films



石黒直樹

Naoki ISHIGURO

名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学運動形態外科学整形外科

◎経過観察、治療評価には、共通尺度での評価が必要である。関節リウマチ(RA)患者に対するX線を利用した画像診断法としては単純X線写真、断層写真、造影X線写真、X線CTなどがあげられる。RAにおいて画像診断の基礎となるのは単純X線写真である。骨関節を対象とするX線診断法の原理は、カルシウム沈着集積度の違いによるX線吸収度の違いによる画像化である。骨変化の描出に優れ、非カルシウム沈着組織の評価には向かない。逆に軟骨下骨、骨の形状把握では、単純X線写真による評価に勝るものはない。多数の関節を簡便に評価するときにはSteinbrocker分類が広く用いられている。RA関節病変では骨破壊と軟骨破壊が同時進行するので、関節裂隙狭小化と骨破壊像(骨びらん像、骨萎縮像)の組合せによって進行程度が評価可能となる。Larsen分類、Steinbrocker分類ともにこの組合せによる評価方法と考えることができる。Sharp score(正確にはmodified Sharp score)では病態の把握という点で優れる。手関節～手と足部の正面X線写真を用いる。従来の評価法に比較して初期病変を細かく評価できる点から薬効検定に用いられることが多い。



Key word : modified Sharp score, X線評価, HAQ(health assessment questionnaire), Larsen分類, Steinbrocker分類

関節リウマチ(RA)の画像診断では、①病態を正確に反映した画像データを得ること、②その内容を共通の尺度で評価し比較可能な形にすること、が要点となる。経過観察、治療評価にはこの共通尺度での評価が必要である。このために数値化、グレード分類といった試みが行われている。一方、画像データの取得は、ハードウェアの発達をもたらした画像化技術である。MRIがそのよい例である。X線画像診断は成熟した技術で、ハードウェアの今後の進歩は限られている。位置づけとしては標準検査法で、普遍性が高く、かつ安価、容易という点が特徴となる。なによりも簡便さがX線単純画像診断の最大の利点である。

RA患者に対するX線を利用した画像診断法としては単純X線写真、断層写真、造影X線写真、X線CTなどがあげられる。基本は単純X線写真であり、注意深い読影により多くの情報が得られる。詳細な病態・鑑別診断には種々の画像診断法の長所と欠点を考慮して、これらを組み合わせること

が必要である。X線画像はRAの疾患評価では重要であるが、万能ではない。限界を知ったうえで使用することが必要である。

Modified Sharp score(mSharp score)のような評価方法がもたらす利用面での標準化は、臨床研究を進めるうえで大きな柱となる。一方で、詳細な評価には時間がかかり、日常臨床としては有用性が限られる。しかし、多くの新規薬がこれら構造的破壊を評価できる画像診断法を採用する現在、知識としてもつことは重要である。

単純X線像による画像診断

RAにおいても画像診断の基礎となるのは単純X線写真である。骨変化の描出に優れるが、軟部組織の変化、関節液の貯留、滑膜炎、関節周囲の浮腫などの評価には困難が伴う。また、X線の方角により描出能力に差が出る点が問題となる。検査としての感度はかならずしも高くないものの、軟骨下骨、骨の形状把握では単純X線写真による

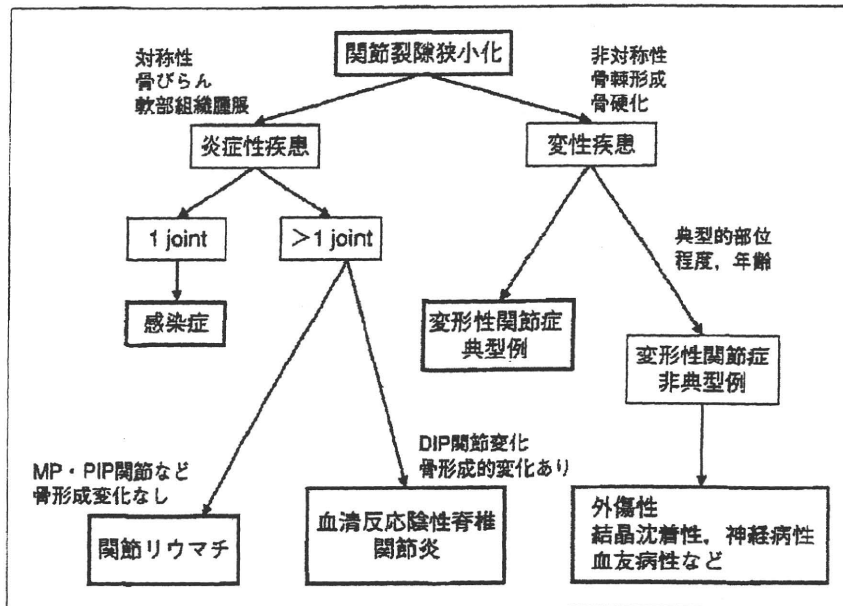


図1 関節炎の手単純X線診断フローチャート¹⁾

単純 X 線画像において関節裂隙の狭小化を認めた場合、変性と炎症性の2つの原因に大別し、それぞれについて特徴的变化を考慮して診断に至る過程を示した図。骨棘、軟骨下骨の硬化に代表される変性性関節症の特徴的所見と、骨びらん、骨破壊に代表される炎症性関節炎との区別をすることが診断の第一歩となる。

評価が一般的である。その簡便性から、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、病態把握にもっとも広く用いられている。とくに初期では触診上腫れている関節を中心に丁寧な読影が要求される。関節裂隙狭小化を伴う他の関節疾患との鑑別が求められるが、炎症性疾患である点を基本にして診断すれば、比較的容易である(図1)¹⁾。RAは炎症性関節疾患であるから、X線画像読影のポイントは炎症性破壊所見を確実にみつけたことである。

読影のポイント

炎症に伴う関節破壊であることを念頭において特徴的所見を見逃さないことが大切である。とくに早期症例では X 線画像のみで診断が困難な症例も存在するので、MRI などの他の画像診断を選択することが必要である。

1. 骨萎縮(osteopenia)

骨萎縮は RA でもっとも早期から出現する X 線所見である。関節近傍の骨での X 線透過性が亢進して観察される。正常・同年齢との比較が必要である。長期の罹病患者では全身性の骨萎縮(骨粗

鬆症, osteoporosis)が観察される。定量化困難である。

2. 関節裂隙狭小化

軟骨下骨と軟骨下骨に挟まれた関節列隙は軟骨組織の厚みを近似することになる。したがって、関節列隙の狭小化は軟骨組織の破壊を示す。関節裂隙の狭小化をきたす疾患としては変形性関節症などがある。RAでは関節裂隙の狭小化が均等に起こること、骨破壊を伴う点などが特徴的である。下肢関節では正確な評価には荷重位での撮影が必要で、荷重位での X 線撮影は残存軟骨組織量を知るのに有用である。関節症状の著しい場合には、手術必要性の判定に加重位 X 線撮影は有用である。

3. 骨破壊

骨破壊は RA にきわめて特徴的な所見である。RAでは増殖性滑膜炎の結果、増殖した滑膜組織の一部がパンヌス(pannus)組織となり、いわゆる関節の bare area から浸潤することにより骨軟骨破壊を起こす(辺縁びらん像, marginal erosion)。単独に丸く骨を打ち抜いたように見える変化を、打ち抜き像(punched out)とよんでいる。進行例では関節面(軟骨下骨)の不整像が観察される。関節びら

表 1 Steinbrockerによるstage分類(Steinbrockerら, 1949)

病期 stage	X線所見	筋萎縮	皮下結節 腱鞘炎	関節変形	強直
I. 初期	軽い骨多孔症があってもよい 骨破壊なし	なし	なし	なし	なし
II. 中等度進行	骨多孔症あり 軽度の軟骨, あるいは軟骨下 骨破壊しばしばあり	関節周囲のみ	たぶんあり	なし	なし
III. 高度進行	骨多孔症, 軟骨, 骨破壊あり	広範	たぶんあり	亜脱臼 尺側偏位 過伸展	なし
IV. 末期	IIIに骨性強直が加わる	広範	たぶんあり	同上	線維性または骨性強直あり

表 2 Larsenによるgrade分類(Larsenら, 1977)

Grade 0	正常, 変化はあっても関節炎とは関係ないもの
Grade I	軽度の異常, 関節周囲の軟部腫脹, 関節周囲の osteoporosis, 軽度の関節裂隙狭小化のうち, 1つ以上が存在する
Grade II	初期変化, Erosion との関節裂隙狭小化(standard film 参照). Erosion は非荷重関節では必須
Grade III	中等度の破壊, Erosion との関節裂隙狭小化(standard film 参照), Erosion は荷重関節では必須
Grade IV	高度の破壊, Erosion との関節裂隙狭小化(standard film 参照)
Grade V	ムチランス変形

注: standard film は関節ごとに添付されている. ここでは手関節のみ表示する. 基本的には, Grade III では関節裂隙は消失, 骨変化は早期よりみられ, 打ち抜き像, 辺縁びらん像にとどまる. Grade IV では軟骨下骨の不整がめだつ.

ん(joint erosion)とよび, この状態では一般にその上面に軟骨組織の残存は期待できない. ときに骨内に嚢包状の陰影(円形の骨吸収像)をみることがある. これを geodes とよんでいる. これは骨内に侵入した pannus 組織(リウマチ性肉芽組織)などが巨大化したものと考えられる.

4. 関節変形・動揺性

骨・軟骨破壊と炎症による関節包, 靭帯の弛緩を伴う RA では, 特有の変形を生じる. もっとも高度な骨破壊と関節の弛緩を伴う変形をムチランス変形とよんでいる. 一般に関節の高度な弛緩は動揺性関節障害を起し, 機能障害が大きい. MCP 関節の脱臼に伴う尺側偏位は有名である. また, 頸椎での関節動揺性は麻痺の原因となり, 早期からの変形予防が必要とされる. とくに環軸椎での動揺性は早期から起こることもあるので, 症状があれば機能撮影での評価を必要とする.

5. 軟部組織腫脹

増殖性滑膜炎・関節水腫による関節軟部組織の腫脹を小関節などではとらえることができる. 触

診可能な手関節・手指関節などでは, 肉眼で認める腫脹と差異はない. そもそも X線画像診断には向いていない項目である.

● 単純X線像による評価法と種類

関節症の進行に合わせて X線写真での分類が従来から広く行われ, 日常臨床のうえでも利用されている. RA 関節病変では骨破壊と軟骨破壊が同時進行するので, 関節裂隙狭小化と骨破壊像(骨びらん像, 骨萎縮像)の組合せによって進行程度が評価できる.

現在汎用されている 2 種類の Larsen 分類, Steinbrocker 分類ともに, この組合せによる評価方法と考えることができる. Larsen 分類は Steinbrocker 分類と比べ, ①詳細である点, ②基準となる写真がある点, ③病状の進行に沿っている点などが評価されている. Larsen 分類の grade III と grade IV の区別では, 関節裂隙の有無と軟骨下骨びらんが大きな参考となる. 一方, 多数の関節を簡便に評価するときには, 簡便性などから Steinbrocker 分類

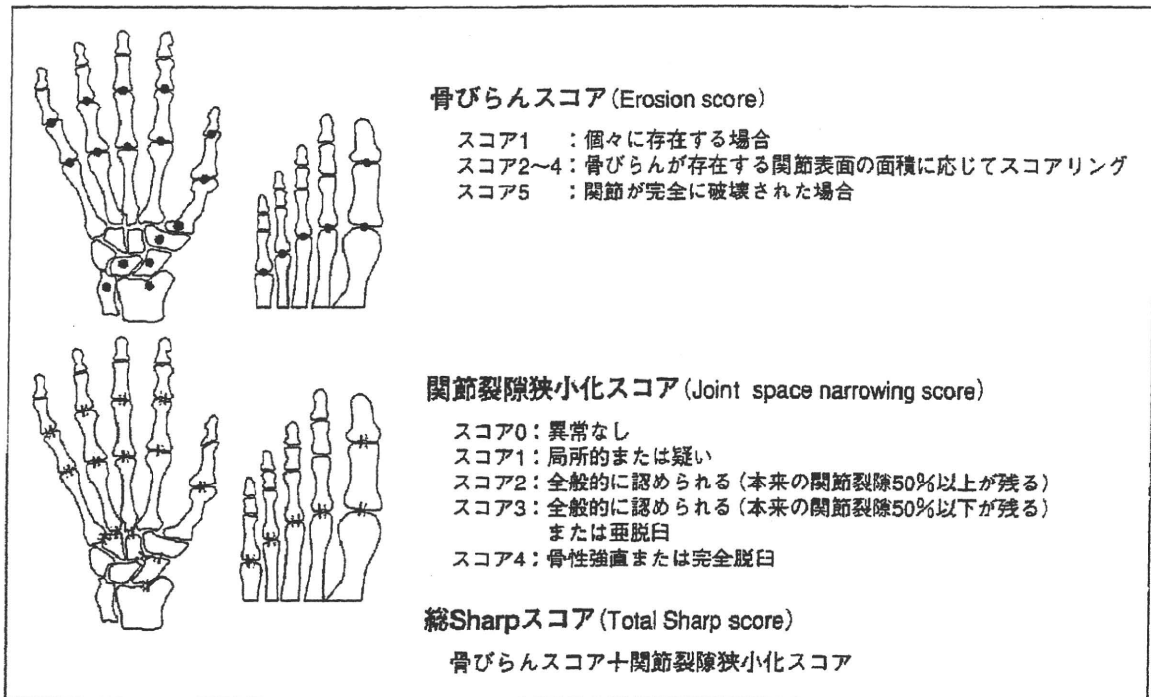


図 2 Sharp法による画像評価²⁾

1971年にSharpらにより提唱されたSharp法は、両手正面X線画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である。

現在、足正面X線画像を評価対象として加えたvan der HeijdeによるmSharp scoreが汎用されている。現在、薬剤の開発治験などでは骨関節破壊防止効果判定基準として汎用されている。

が使用されている。これらの分類はグレード分類であるから診断書作成など現状把握には役立つが、短期間の観察による治療効果判定に用いるには感受性に問題がある。

そこで経過観察・薬効評価には、好んでSharp score(正確にはmSharp score)が使用される。Sharp scoreは当初、手関節正面単純写真による評価法であった¹⁾が、これをvan der Heijdeらに変更し、足正面単純写真を評価に加えることとして今の形になった²⁾。mSharp scoreでは、病態の把握という点で手関節~手と足部の正面X線写真を用いる。手~手関節、前足部の多数の関節に起こる変化をスコア化し、その総点数を求めて経過による変化をみる方法である。初期変化に向くとされている。変化が微細であるので、十分に個々の関節・周辺の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(図2)。手・足以外の関節は評価されないの、かなら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かぎ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えない選択ともいえる。また、この評価法は大関節破壊とも相関を示すことが報告されている(図3)³⁾。この評価法の画期的な点は、骨びらんに代表される骨破壊と、関節裂隙狭小化に代表される軟骨破壊の2つの要素に分解して関節破壊を定義づけたことにある。定量的測定法とはいいがたい面もあるが、汎用されつつある。

これら3種の画像評価法の比較では、画像診断の有用性は変わらないが、細部の描出という点でmSharp scoreが優れる。しかし、正確にmSharp scoreを毎回評価することは時間と労力を要する作業である。臨床的にはLarsen分類で十分とする意見もある⁴⁾。

● X線画像評価の問題点

関節機能は大きく関節軟骨や骨組織に依存しているの、X線学的に破壊が認められる状態となれば、当然機能は障害されている。関節機能はX線写真で観察される関節破壊進行につれて低下することになる。X線評価以外に関節機能を定量化

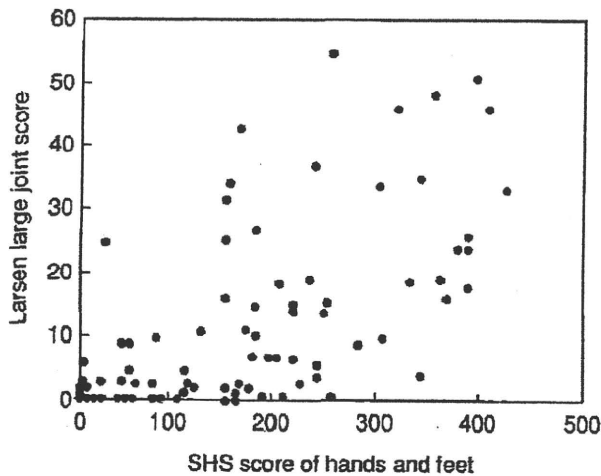


図3 Sharp scoreとLarsen large joint scoreによって示される大関節の変化を示す分散図 (scatter plot) 105例のRA患者を前向きに12年間フォローアップした研究データからの検討結果⁹⁾ Sharp scoreで示される小関節にびらんを認めない患者には、大関節障害がみられないことが理解できる。

するデータを見出すことは困難である。そこで、構造的な破壊をX線学的に評価してRA患者での進行程度を評価し、これを治療計画に役立てる目的に使用するのが一般的である。このX線学的に関節破壊の進行を評価した検討は多く、感度を問題とする意見もあるが、コストと汎用性の点でこれに勝るものはないため、多くの患者を扱う研究では標準的手法となっている。

さきにも述べたように、X線学的な破壊を評価するには種々の評価項目が考えられる。関節裂隙の狭小化、軟骨下骨の破壊、軟部組織の腫脹などの項目が使用されるが、研究ごとに評価の配分、重みづけが異なっている⁵⁾。すなわち、関節破壊の進行といっても従来は進行を図る尺度が研究ごとに違うのである。したがって、関節破壊評価研究それぞれを比較することはできないし、当然結果の解釈においてばらつきが生じる。過去のある研究ではRA関節破壊は直線的に進行すると結論し⁶⁾、あるものではS字カーブを描くということになる⁷⁾。さらに、これに研究のデザイン(横断研究か、縦断か、コホート研究か)、患者の背景などが加味されて結論を導くこととなる。今後、mSharp scoreが汎用されるようになれば、以上のような問題は多少解決に向かうかもしれない。しかし、mSharp scoreの特徴として破壊の初期段階

では比較的感度が高いとされるが、進行例では感度の低下が起こることが知られている。

近年では早期の関節破壊に焦点が当てられ、これが生物学的製剤を早期から使用する必要性のひとつの根拠となっている。もし関節破壊の進行が複数の研究結果にあるように直線的進行を示す⁸⁾とすれば、生物学的製剤などの開始時期について進行度合いを予想してから治療法を決めることができる。しかし、その根拠は曖昧さが残るものである。関節破壊は一度起これば回復は困難であるから、高度な骨関節破壊を抑制するためにも定期的なモニタリングを行いつつ、治療法を選択する必要があるのは、ひとつには上記の理由もある。

mSharp scoreと機能障害の評価

RAの究極的な問題点である機能障害とX線学的な評価とを結びつけようとする考えが生まれた。RA機能障害の評価法としてHAQ(health assessment questionnaire)はよく知られている。このHAQを究極的に単純化した場合、その構成要素として2つの要素が考えうる。すなわち、疾患活動性関連(disease activity related component)HAQ(ACT-HAQ)と、関節障害関連(damaged related component)HAQ(DAM-HAQ)の2つの要素からHAQが成立するとの考え方である⁹⁾。このうちACT-HAQは疾患活動性に由来する部分なので、治療により腫脹・疼痛が改善すれば回復が可能であるともいえる。残りのDAM-HAQはSharp scoreに代表される関節障害に関連した機能障害である。これは回復が不可能な部分と定義される。経験的には関節破壊による機能障害は関節症状沈静後も続くわけであるから、この考えに共感する部分もある。

この試みはX線画像評価にあらたな考え方を提供するものである。たとえば、ある薬剤を使用すればそれなりのリスクはあるが、完全に臨床的寛解が導入できるとして“どの程度関節破壊進行すると機能障害に重度な影響をもちうるのか”、この答えが、生物学的製剤をはじめとする新規治療を絶対的にはじめるべき時期をわれわれに知らせてくれることになる。mSharp scoreをはじめとする画像評価がこのような使用目的にふさわしいの

か、今後の検証が必要であるが、あらたな可能性が検討される時代となっている。

● おわりに

X線画像はその安価と利便性の高さから日常診療での基本検査として受け入れられている。X線画像による病態評価法では Larsen 分類, Steinbrocker 分類, mSharp score などは基本的知識として必要事項である。とくに臨床研究の分野では多くの施設で実施が可能で比較データを取りやすい点から、mSharp score に代表される X線画像のスコアリングによる画像評価が選択される。mSharp score に弱点があるにもかかわらず薬効評価に汎用されるのはこの点が多い。一方、日常臨床に用いる画像評価法として、利便性・経済性から Larsen grade をお勧めする。近年、mSharp score を画像診断にとどまらず、機能障害を推計するひとつの変数としてとらえる試みが始まっている。

文献

1) Jacobson, J. A. et al. : Radiographic evaluation of arthritis : inflammatory conditions. *Radiology*, **248** :

378-389, 2008.

- 2) van der Heijde, D. M. : Plain X-rays in rheumatoid arthritis : overview of scoring methods, their reliability and applicability. *Baillieres Clin. Rheumatol.*, **10** : 435-453, 1996.
- 3) Drossaers-Bakker, K. W. et al. : Radiographic damage of large joints in longterm rheumatoid arthritis and its relation to function. *Rheumatology*, **39** : 998-1003, 2000.
- 4) Pincus, T. 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.
- 5) Van der Heijde, D. M. et al. : Methodological issues in radiographic scoring methods in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, **26** : 726-730, 1999.
- 6) Fuchs, H. A. et al. : Evidence of significant radiographic damage in rheumatoid arthritis within the first two years of disease. *J. Rheumatol.*, **16** : 585-591, 1989.
- 7) Sharp, J. T. : Radiographic evaluation of the course of articular disease. *Clin. Rheum. Dis.*, **9** : 541-557, 1983.
- 8) Van der Heijde, D. M. : Radiographic imaging : the 'gold standard' for assessment of disease progression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, **39** : 9-16, 2000.
- 9) Smolen, J. S. et al. : Estimation of a numerical value for joint damage-related physical disability in rheumatoid arthritis clinical trials. *Ann. Rheum. Dis.*, **69** : 1058-1064, 2010.

* * *

さらに先へ —リウマチの苦痛を除くために—

名古屋大学医学部附属病院 整形外科 リウマチ科

リウマチ治療はおもしろい!

名古屋大学整形外科には、リウマチ、股関節、脊椎・脊髄、腫瘍、小児、膝肩の専門診療グループがあり、石黒教授以下教員8名、医員15名、大学院生21名が所属している。

リウマチ診療スタッフは、石黒直樹（教授）、小嶋俊久（講師）、金山康秀（医員）、塩浦朋根（医員）、林 真利（医員）、舟橋康治（医員）の6名で、薬物療法と手術療法とをあわせて、積極的にリウマチ治療をおこなっている。診療実績は、登録リウマチ患者約1,000名、生物学的製剤使用患者はこの1年でも20%から30%ほどへ増加し、リウマチ患者さんに対する手術件数は数年前の週1~2件から現在週2~3件と増加し、年間約100件となっている。また、全身合併症、積極的薬物療法に伴う有害事象に対応するための呼吸器内科、腎臓内科、消化器内科、血液内科などと良好な連携、集学的な診療環境がある。そして若い人から、リウマチ治療をより深く学びたいという声が多く届くようになった。

さらに先へ進むために

1) 多施設大規模臨床研究

名古屋大学整形外科には、約75あまりの関連病院があり、リウマチ専門外来をもつ病院も15ほどある。このチームワークを生かし、“Tsurumi Biologics Com-

munication (TBC)”と名づけた生物学的製剤使用患者データベース構築を開始し、現在1,059名の登録を得た。登録数を増やしていくとともに、参加施設からの疑問、アイデアを検討し、整形外科の視点をもった臨床研究をおこなっていきたいと考えている。またリウマチの肺病変、消化器病変については、呼吸器内科、消化器内科との共同臨床研究も進めている。

2) 新しい治療に向けての基礎的研究

関節リウマチ、変形性関節症における細胞外マトリックスの分解、再生のメカニズムの探究が大きなテーマであり、グループに所属する5名の大学院生を中心におこなっている。今後も分子標的治療薬はつきつぎと開発され、それぞれの薬剤を理解し、治療を有効かつ効率的に進めるためには、基礎的研究により得られる知識は不可欠と思われる。

3) 地域基幹病院としての社会的活動

「名古屋リウマチネットワーク」という名古屋地区の開業医の先生方との病診連携、患者さんへの情報提供を目的としたグループもつくり、市民公開講座、療養相談、症例検討など情報交換をおこなっている。

めざすべきもの

変わっていく治療環境を積極的に先取りし、これからリウマチで困る患者さんをなくすため、いま困っている患者さんの苦痛を取り除くために、薬物療法、手術療法とともに最高水準の治療をすべて提供できるよう、研究、診療をおこなっていききたいと思っている。

(小嶋俊久)



名古屋大学医学部附属病院整形外科 リウマチ科
(名古屋大学大学院医学系研究科運動・形態外科学整形外科学)
診療科長：石黒直樹（教授）
構成：総数45名/教授1名/准教授2名/講師2名/助教3名/助手1名/
医員15名/大学院生21名
【連絡先】住所：〒466-8550 愛知県名古屋市長和区鶴舞町65
TEL：052-744-1908/FAX：052-744-2260
E-mail：toshik@med.nagoya-u.ac.jp（小嶋俊久）
URL：http://www.med.nagoya-u.ac.jp/hospital/202/c20212.html
http://ortho.med.nagoya-u.ac.jp/

Morphological differences during *in vitro* chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes

Shizuko Ichinose^{1,6}, Takeshi Muneta^{2,3}, Hideyuki Koga², Yuko Segawa², Motoki Tagami⁴, Kunikazu Tsuji³ and Ichiro Sekiya^{5,6}

Mesenchymal stem cells (MSCs) from a variety of mesenchymal tissue contain common features, but distinguishing properties dependent on their origin are emerging. We investigated morphological differences of human bone marrow-MSCs, synovium-MSCs, and chondrocytes during *in vitro* chondrogenesis. Two hundred thousands cells were pelleted after centrifugation and cultured in chondrogenic media that contained BMP-2, TGF- β 3, and dexamethasone. The pellets were analyzed histologically, immunohistologically, and electron microscopically. Before chondrogenic induction, trypsinized MSCs and chondrocytes looked similar. At day 1, the structure of the three masses was divided into two layers, and the most obvious differences in the three populations were observed in the deep zone. In bone marrow-MSCs, round cells accumulated without intercellular space, and the cells were mainly connected through intermediate junctions. In synovium-MSCs, elongated cells accumulated with small desmosomes and intercellular spaces could occasionally be seen. In chondrocytes, separated oval and polygonal cells connected only in a narrow spotty area through a small desmosome. At day 7, the structure of the three masses was divided into three layers, and the most obvious differences in the three populations were observed in the middle zone. In bone marrow-MSCs, the middle zone consisted of dense smaller cells and apoptotic cells. In synovium-MSCs, the middle zone consisted of dense arrayed wider cells and apoptotic cells. In chondrocytes, the middle zone was acellular without apoptotic cells. At day 21, the morphology of cells and extracellular space became similar in that each cell was located separately with abundant extracellular matrix. The superficial zone was still obvious in bone marrow-MSCs, but hardly seen both in synovium-MSCs and chondrocytes. In this study, we revealed morphological differences of bone marrow-MSCs, synovium-MSCs, and chondrocytes during *in vitro* chondrogenesis. The most obvious differences in the three populations were observed at day 1 in the deep zone.

Laboratory Investigation (2010) 90, 210–221; doi:10.1038/labinvest.2009.125; published online 14 December 2009

KEYWORDS: mesenchymal stem cells; chondrogenesis; bone marrow; synovium; chondrocytes

Toward the development of cell therapy for cartilage regeneration, mesenchymal stem cells (MSCs) are attractive because of their chondrogenic potential.^{1–4} MSCs can be obtained from a variety of mesenchymal tissues including bone marrow,⁵ which seems to be the most popular MSC source at present. Synovium, a thin membrane covering the inside of joints, is another promising MSC source due to its high chondrogenic potential.^{6–8} MSCs derived from various

mesenchymal tissues contain common features, but distinguishing properties due to their origin are emerging.^{9–12} However, morphological differences of MSCs dependent on the source, especially during chondrogenesis, remain unknown.

Chondrocyte transplantation is currently one of the prevailing methods for cartilage regeneration therapy.¹³ The digested and expanded chondrocytes produce cartilage

¹Instrumental Analysis Research Center, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ²Section of Orthopaedic Surgery, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ³Global Center of Excellence Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ⁴Department of Medicine, Sanraku Hospital, Tokyo, Japan and ⁵Section of Cartilage Regeneration, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Correspondence: Dr I Sekiya, MD, PhD, Section of Cartilage Regeneration, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan.

E-mail: sekiya.orj@tmd.ac.jp

⁶These authors contributed equally to this work.

Received 21 May 2009; revised 21 September 2009; accepted 24 September 2009

matrix again when cultured in a proper condition. This process seems to contain some similarities to that in MSCs, and it would be intriguing to compare the morphology of MSCs and chondrocytes during their chondrogenesis.

Ectopic cartilage formations such as chondrophyte, free body, and metaplasia are one of the pathological conditions in articular joints.¹⁴ Cell sources and the pathophysiology of ectopic cartilage formations are poorly understood. We speculate that cell sources for the ectopic cartilage formations are stem cells in bone marrow and synovium, in addition to chondrocytes.

In this study, we compared the morphology of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes during *in vitro* chondrogenesis. Our results shed light on some aspects of both the mesenchymal stem biology and pathophysiology of ectopic cartilage formations.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Bone Marrow-, Synovium-MSCs, and Chondrocytes

The study was approved by an institutional review board, and informed consent was obtained from all study subjects. Human bone marrow, synovium, and cartilage were harvested from three patients during total knee arthroplasty with medial compartment osteoarthritis. The patients were all females, 68, 70, and 73 years old. Bone marrow was aspirated from the tibia with an 18-gauge needle during the operation. Synovial tissue was harvested from the suprapatellar pouch. Cartilage was obtained from resected lateral femoral condyle. Nucleated cells from bone marrow were isolated with Ficoll density gradient (Ficoll-Paque, Pharmacia Biosystems, Uppsala, Sweden). Synovium and cartilage were minced into small pieces, digested in a collagenase solution, and filtered. Nucleated cells from synovium and cartilage were plated at 10^3 , 10^4 , or 10^5 cells/60-cm² dish (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA), and those from bone marrow at 10^4 , 10^5 , or 10^6 cells/60-cm² dish. The cells were plated in six dishes and cultured in 10 ml complete culture medium: α MEM containing 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 units/ml penicillin (Invitrogen), 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen), and 250 ng/ml amphotericin B (Invitrogen) for 14 days as passage 0. Three dishes for each cell concentration were stained with 0.5% crystal violet. The optimal initial cell density was determined based on the following criteria: (1) the colony size was not affected by contact inhibition, and (2) the greatest number of colonies was obtained. We then harvested the cells plated at optimal densities from the three remaining dishes. Passage 0 cells were replated at 50 cells/cm² in a 145-cm² dish and cultured for 14 days for the analyses.¹¹

Surface Epitopes

One million cells were suspended in 200 ml PBS containing 20 mg/ml of antibody, incubated for 30 min at 48°C, and

resuspended in 1 ml of PBS. Fluorescein isothiocyanate (FITC)- or phycoerythrin (PE)-coupled antibodies against CD90 and CD45 were from Becton Dickinson; CD44 was from eBioscience (San Diego, CA, USA); and CD105 was from Ancell Corporation (Bayport, MN, USA). For the isotype control, FITC- or PE-coupled nonspecific mouse IgG (Becton Dickinson) was substituted for the primary antibody. Cell fluorescence was evaluated by FACSCalibur instrument (Becton Dickinson), and data were analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson).^{11,15}

Chondrogenesis

Two hundred thousands cells at passage 2 were placed in a 15-ml polypropylene tube (Becton Dickinson) and centrifuged at 450 g for 10 min. The pellets were cultured at 37°C with 5% CO₂ in 400 μ l chondrogenic media that contained 500 ng/ml bone morphogenetic protein 2 (Astellas Pharm, Tokyo, Japan), 10 ng/ml transforming growth factor- β 3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 100 nM dexamethasone, 50 μ g/ml ascorbate-2-phosphate, 40 μ g/ml proline, 100 μ g/ml pyruvate (Sigma-Aldrich), and 50 mg/ml ITS + Premix in high-glucose Dulbecco modified Eagle medium (Invitrogen). The medium was replaced every 3–4 days for 21 days.^{15–18}

Histology

The cultures were ended by fixing the pellets with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PBS for 2 h. The cells were washed overnight at 4°C in the same buffer and post-fixed with 1% OsO₄ buffered with 0.1 M PBS for 2 h. The pellets were dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Epon 812. Semi-thin (1 μ m) sections for light microscopy were collected on glass slides and stained for 30 s with toluidine blue.¹⁹

Transmission Electron Microscopy

Ultrathin (90 nm) sections were collected on copper grids, double-stained with uranyl acetate and lead citrate, and then examined by transmission electron microscopy (H-7100, Hitachi, Hitachinaka, Japan).¹⁹

Immunohistochemistry

The micromasses were fixed in 4% paraformaldehyde, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections were cut at a thickness of 5 μ m and deparaffinized in xylene, dehydrated through graded alcohol, and pretreated with 0.4 mg/ml proteinase K (DAKO, Carpinteria, CA, USA) in Tris-HCl for 15 min for optimal antigen retrieval. Residual enzymatic activity was removed by washing in PBS, and nonspecific staining was blocked with PBS containing 10% normal horse serum for 20 min. Mouse monoclonal antibodies against human type I and type II collagen (Daiichi Fine Chemical, Toyama, Japan; 1:100 dilution with PBS containing 1% BSA) were applied for 1 h. After extensive washing with PBS, a secondary antibody of biotinylated horse anti-mouse (1:200;

Vector Laboratories, MA, USA) was applied for 30 min. Immunostaining was detected by Vectastain ABC reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), followed by diaminobenzidine staining.¹⁹

TUNEL and Ki67 Staining

Immediately after fixation in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS for 1 h, the micromasses were immersed in 1.8 M sucrose containing 20% polyvinylpyrrolidone in 0.1 M PBS for 24 h at 4°C, mounted on a holder, and quickly frozen in liquid nitrogen. Frozen sections were cut on an ultracut S microtome (Reichert, Wien, Austria) equipped with a low-temperature sectioning system (Reichert) at a thickness of 1 μ m at -80°C.

For TUNEL staining, an apoptosis *in situ* detection kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) was used. The frozen semi-thin sections were incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase for 10 min at 37°C in a moist chamber. The sections were washed with 0.1 M PBS for 15 min. Peroxidase-conjugated antibody was then applied to the specimens at 37°C for 10 min in a moist chamber. The sections were developed with 3,3-diaminobenzidine, and counterstained with methyl green.

For Ki67 staining, the frozen semi-thin sections were blocked with 1% BSA in 0.1 M PBS for 1 h at 4°C. Mouse monoclonal anti-Ki67 antibody (Zymed, South San Francisco, CA, USA; 1:100 dilution with PBS containing 1% BSA) was then incubated with the sections for 24 h at 4°C. After extensive washing with 0.1 M PBS, the sections were incubated for 10 min with biotinylated secondary antibodies. Immunostaining was detected with a Zymed Histostain kit (Zymed). Counterstaining was performed with methyl green.

Immunocryo-ultramicrotomy

The frozen ultrathin (90 nm) sections were collected on formvar-coated nickel grids and then placed on droplets of 1% BSA in 0.1 M PBS. The sections were subsequently transferred to droplets of mouse antibody against collagen type I, II, X (Cosmo Bio, Japan), and chondroitin sulfate proteoglycan (Seikagaku Kogyo, Japan) for 12 h at 4°C. The dilution of antibody against collagen type I, II, X, and chondroitin sulfate proteoglycan was 1:20, 1:20, 1:20, and 1:50 with 1% BSA in 0.1 M PBS, respectively. Each section was then washed with 0.1 M PBS and incubated with goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG + IgM conjugated with 10 nm Φ gold colloidal particles (diluted 1:20, 1:20, 1:20, and 1:50 with 1% BSA in 0.1 M PBS, respectively; British Bio Cell International, UK) for 12 h at 4°C. The sections were stained with 1% uranyl acetate, washed with distilled water, and then embedded with a mixture of 3% polyvinylalcohol and 0.3% uranyl acetate. The sections were examined by transmission electron microscopy (H-7100, Hitachi).¹⁹

RESULTS

Characterization of Bone Marrow-, Synovium-MSCs, and Chondrocytes

We first analyzed the colony-forming capacity. When nucleated cells were plated at the same density, the number of developed colonies was highest in synovium-MSCs, was second highest in chondrocytes, and was the least highest in bone marrow-MSCs (Figure 1). To prepare colony-forming cells unaffected by colony-to-colony contact inhibition, we harvested bone marrow-MSCs plated at 10⁶/dish, synovium-MSCs plated at 10⁴/dish, and chondrocytes plated at 10⁵/dish for further analyses.

Flow cytometric analysis showed that each population of cells was negative for CD45 and positive for CD44, CD90, and CD105 (Figure 2). Bone marrow- and synovium-MSCs were calcified when cultured in medium containing β -glycerophosphate²⁰ and differentiated into adipocytes when cultured in medium containing isobutylmethylxanthine (data not shown).²¹

In Vitro Chondrogenesis

MSCs were pelleted into micromasses and then cultured in chondrogenic medium. Immediately after centrifugation, they appeared to be fragile and flat at the bottom of the tube (data not shown). One day later, they became substantial masses (Figure 3a). At day 7 and thereafter, they became round or elongated spheres, and their size and weight increased along with the culture period in the three populations (Figure 3b).

Morphology of Cells Before Chondrogenic Induction

Microscopically, the cells were dissociated and round in the three populations (Figure 4a). Transmission electron microscopy demonstrated a large number of elongated thin processes at the cell surface. The cells contained well-developed cell organelles, including mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosomes, and large quantities of free ribosomes. Their nuclei were euchromatic and notched (Figure 4b). The bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes looked similar before chondrogenic induction.

Aggregation

One day later, the cells aggregated into a firm pellet. Histological sections embedded in Epon showed that the structure of the three masses was divided into two layers: the superficial zone and the deep zone (Figure 5a). The superficial zone consisted of spindle cells parallel to the surface. In the deep zone, obvious morphological differences were observed in the three populations. In bone marrow-MSCs, pale-stained round cells accumulated without intercellular space. In the synovium-MSCs, the deep zone consisted of elongated cells, and intercellular spaces could occasionally be seen. In chondrocytes, oval and polygonal cells with abundant intercellular spaces comprised the deep zone. At this stage, type I

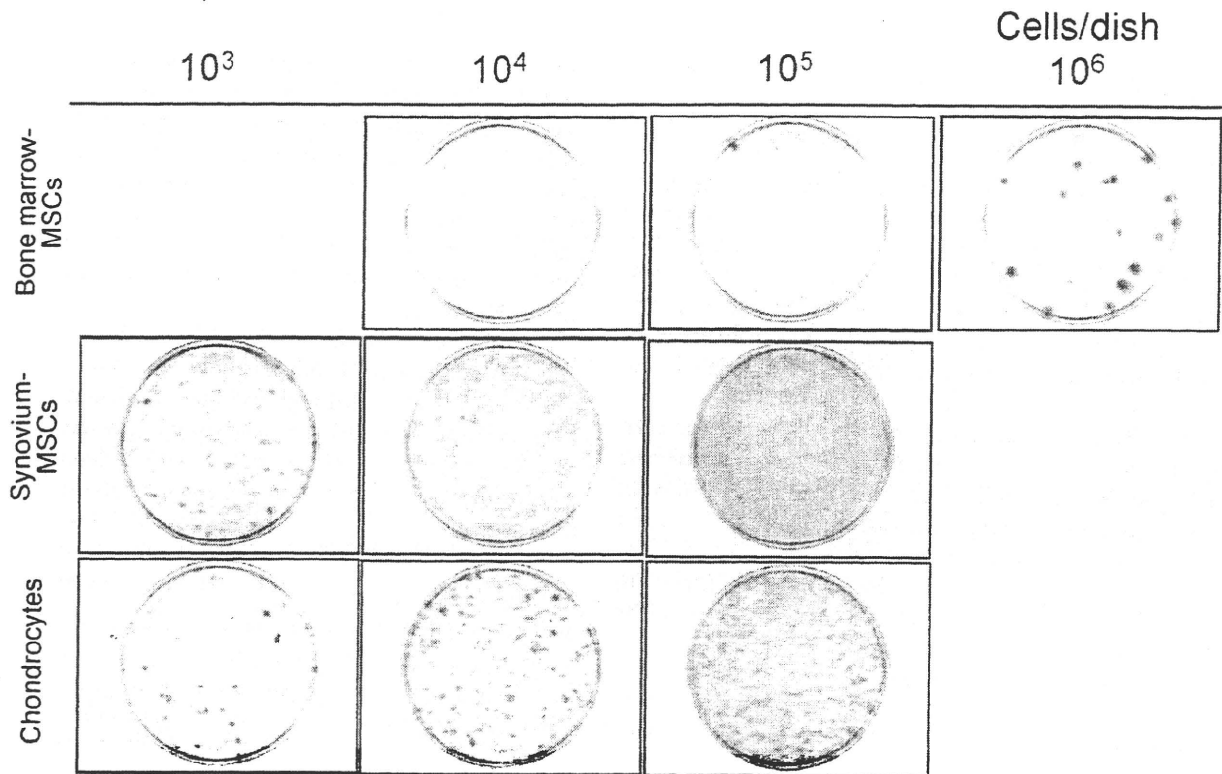


Figure 1 Colony formation of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes. Nucleated cells were plated at indicated cell number per 60-cm² dish and cultured for 14 days. Culture dishes were stained with crystal violet.

collagen was detected in the intercellular spaces, whereas type II collagen was absent in the three populations (Figure 5b).

Morphological differences in the deep zone were analyzed by transmission electron microscopy (Figure 5c). In bone marrow-MSCs, round clear cells were attached to each other in a wide area. Cell-cell junctions mainly consisted of intermediate junctions (arrow heads), and desmosome (arrow) also existed. Extracellular matrix could not be seen. In synovium-MSCs, a small desmosome (arrow) was observed between oval cells. The contact area between each cell was smaller than that in bone marrow-MSCs. Collagen fibers (asterisk) existed in extracellular space. In chondrocytes, spindled cells appeared to be separated from each other or connected only in a narrow spotty area through a small desmosome (arrow). Extracellular space was larger than that in others. Collagen fibers (asterisk) could be seen.

Early Phase of Differentiation

At day 7, the structure of the three masses appeared to be divided into three layers: the superficial zone, the middle zone, and the deep zone (Figure 6a). The superficial zone consisted of spindle-shaped cells organized along the surface of the pellet. The deep zone was composed of unorganized polygonal cells with intercellular space, which was narrow in synovium-MSCs, large in chondrocytes, and intermediate in

bone marrow-MSCs. The middle zone could be distinguished between the superficial and the deep zone. In bone marrow-MSCs, the middle zone consisted of smaller cells, and cell density was higher than in other zones. In synovium-MSCs, the middle zone appeared to be more obscure, but it consisted of more arrayed wider cells than superficial cells. In chondrocytes, the middle zone appeared to be almost acellular. Immunostaining demonstrated that bone marrow- and synovium-MSCs expressed type I collagen in the periphery. The three populations of MSCs expressed type II collagen diffusely (Figure 6b). TUNEL positive cells (Figure 6c) and apoptotic cell death (Figure 6d) were observed sporadically in the middle zone of bone marrow- and synovium-MSCs, but could hardly be seen in chondrocytes. Ki67 expressions were also examined for proliferation but not observed in bone marrow- and synovium-MSCs (Figure 6e), and chondrocytes (data not shown).

Late Phase of Differentiation

At day 21, the intercellular spaces and their metachromasia became more prominent in the deep zone (Figure 7a). The superficial zone was still obvious in bone marrow-MSCs, but hardly seen both in synovium-MSCs and chondrocytes. The three populations increased both type I and type II collagen expression (Figure 7b). Mature chondrocyte-like cells were