

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890194

研究課題名（和文）

変性関節軟骨内部における荷重応答の解析

研究課題名（英文）

Analysis of response for weightbearing in the degenerative articular cartilage

研究代表者

生駒 和也 (IKOMA KAZUYA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50516044

研究成果の概要（和文）：

【研究の目的】変性関節軟骨における内部構造変化を、MR 画像を用いて可視化することを目的にウシ変性関節軟骨の荷重動態を MR 画像で解析した。

【方法】新鮮な成牛後肢大腿骨膝蓋骨の関節軟骨を実験材料として用いた。ウシ膝蓋骨の関節軟骨および海綿骨を一塊として、直径約 8mm の円柱状に摘出し、これを試料とした。摘出した試料をコラーゲン減少モデルとして Collagenase 処置を行い、変性モデルを作成した。Collagenase 処置：試料を collagenase (70 units/mL) 溶液中に 36 時間、37°C で漬け、コラーゲン変性モデルを作成した。圧迫試験器は関節軟骨に 1MPa の加圧が可能な装置を作成し、荷重を行った。

MR 画像撮影 MR 画像撮影 a.正常および変性軟骨を下記条件で非荷重・荷重で撮像
b.T1 計算画像：IR 法で TR=2.1s, TE=4.0ms, TI=0.01～1s まで 8 条件で撮像し計算画像を作成
c.T2 計算画像：SE 法で TR=3.0s, TE=6～1000ms まで 8 条件で撮像し計算画像を作成

【結果】T1 計算画像では変性により T1 値が有意に短縮し、圧迫によっても有意に短縮したことがわかった。また深層部ほど T1 値が有意に短縮した。また T2 計算画像では圧迫で T2 値が有意に延長し、変性でも T2 値が有意に延長した。また、深層部では T2 値の有意な低下を認めた。

【考察】T1 値は組織の水分含有量に関係し、水分含有量が高いほど T1 値は長い。変性、圧迫により T1 値は有意に短縮しており、水分含有量の低下を認めたと考える。特に変性軟骨では深層部の水分低下が著しく圧迫によりさらに低下した。T2 値はコラーゲンの配向性と水分含有量に関係している。軟骨の変性で T2 値は上昇しており、圧迫により大幅に上昇した。コラーゲナーゼによりコラーゲン線維の配向性が低下し、圧迫により構造の破壊が生じていると考えられる。以上により、変性軟骨の内部構造変化では特にコラーゲン線維の配向性に起因している T2 計算画像を可視化することが有効であり、深層部では特にコラーゲン線維の配向性が強く、MR 画像で可視化できていない。より TE の短い撮像法の開発が必要である。

研究成果の概要（英文）：

The load dynamic state of the bovine degenerative articular cartilage was analyzed by MR image for the purpose of visualizing the internal structure change in a degenerative articular cartilage using MR images. The articular cartilage of the fresh bovine patella was used as an experimental material. It extracted about 8 mm in diameter in the shape of a cylinder by having made the articular cartilage and cancellous bone of the cow patella into the masses, and this was made into the sample.

Collagenase disposal was performed by having made the extracted sample into the collagen reduction model, and the denaturation model was created.

Collagenase disposal: The sample was soaked at 37 °C into collagenase (70 units/mL) solution for 36 hours, and the collagen degeneration model was created.

The pressure examination machine created the equipment which can pressurize 0.1 MPa to the articular cartilage, and performed load. MR images were picturized the normal and degenerative cartilage by non-load and load by the following conditions.

T1 calculation images: they took on eight conditions by the IR method till TR=2.1s, TE=4.0ms, and TI=0.01-1s, and the calculation image was created.

T2 calculation images: they took on eight conditions by the SE method till TR=3.0s and TE=6-1000ms, and the calculation image was created.

By T1 calculation images, it turned out that T1 value was intentionally shortened by degenerative and it was intentionally shortened also by pressure. Moreover, T1 value shortened the depths part intentionally. Moreover, by T2 calculation picture, T2 value extended intentionally by pressure and T2 value extended intentionally also by degeneration. Moreover, the significant fall of T2 value was accepted in the depths part. T1 value is so long that T1 value of moisture content is high with regards to the moisture content of an organization. T1 value was shortened intentionally by degenerative and pressure, and think that the fall of moisture content was accepted. In a degenerative cartilage, the moisture fall of a depths part is especially remarkable, and it fell further by pressure. T2 value is related to anisotropy and moisture content of collagen. T2 value was rising by the degeneration of the cartilage and it went up sharply by pressure. The anisotropy of collagen fiber falls by collagenase and it is thought that destruction of structure has arisen by pressure.

By the above, in particular by internal structure change of a degenerative cartilage, it is effective to visualize T2 calculation image resulting from the anisotropy of collagen fiber, the anisotropy of collagen fiber is strong in especially a depths part, and it has not visualized by MR picture. The short method of imaging TE needs to be developed.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
| 2009年度 | 1,040,000 | 312,000 | 1,352,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,380,000 | 714,000 | 3,094,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節軟骨、変性、MR画像

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨組織はわれわれの運動機能に極めて重要であり、多くの人達の QOL が変形性関節症により損なわれ、多大な医療費が費やされている。関節軟骨組織の基本的役割は荷重に対する動的応答である。しかし、荷重にともなう組織変化については、走査型電顕や位相差顕微鏡等による静的組織学研究しかなく、動的組織研究は皆無と言ってよい。核磁気共鳴画像法 (MRI) は、無侵襲で解剖学的構造を測定でき、X線では見ることのできない軟骨を画像化でき、関節領域の測定・診断に用いられてきた。これまでにわれわれは正常関節軟骨を荷重部と非荷重部に分けて MR マイクロイメージング測定を行い、荷重部の深層部で T2 緩和時間が短縮すること、荷重部と非荷重部で T1 緩和時間に有意差を認めなかったことを報告してきた (Ikoma K et al: Trans Orthop Res Soc 2003)。すなわ

ち荷重部で深層部のコラーゲン線維の配向性が強いことを示している。また、正常関節軟骨では荷重負荷により T1 緩和時間は浅層部で短縮し、深層部で延長したことを報告した (Ikoma K et al: Trans Orthop Res Soc 2003)。荷重負荷により水分含有率が、浅層部では減少し深層部では上昇したことを示している。しかし変性関節軟骨内のコラーゲン線維の配向性はこれまでに十分な研究はなされていないのが現状である。

われわれが研究を行ってきた二量子フィルター MRI 法を用いると、組織のコラーゲン線維に配向した水分子 (結合水) を選択的に画像化が可能であり (Seo Y et al. Magnetic Res Med 1999, Ikoma K et al: Magn Reson Imaging 2001)、またコラーゲン線維の走行方向と配向度を測定することが可能である (Ikoma K et al: J Orthop Res 2003)。この手法を用いて、まずは重水を用いて図 1~5 の

ように四極子相互作用を chemical shift imaging で画像化し、関節軟骨内のコラーゲン線維配向性を画像化してきた(Seo et al: Jpn J Physiol 2001)。さらにこの手法をプロトンに応用し、水分子の双極子相互作用を画像化することにより、MRI を用いてコラーゲン線維の配向性を可視化してきた(Ikoma K et al: Magn Reson Imaging 2001)。

2. 研究の目的

酵素処理を行った変性関節軟骨モデルを作成し、この NMR パラメーターを解析することにより変性初期の関節軟骨の内部構造の変化を明らかにする。次いで荷重負荷時の正常軟骨と変性初期軟骨内のコラーゲン線維の荷重応答の違いを NMR パラメーターで解析することである。

3. 研究の方法

新鮮な成牛後肢大腿骨膝蓋骨の関節軟骨を実験材料として用いる。同部位から軟骨および海綿骨を一塊として、直径約 8mm の円柱状に摘出し、これを試料とした。

【変性モデルの作成】

摘出した試料をコラーゲン減少モデルとして Collagenase 処置を行い、変性モデルを作成した。

Collagenase 処置：試料を collagenase (70 units/mL) 溶液中に 36 時間、37°C で漬け、コラーゲン変性モデルを作成した。

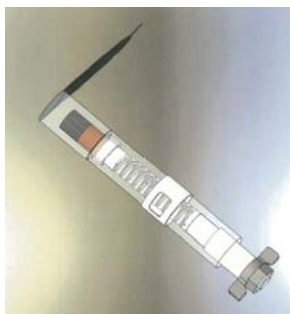


図 1：圧迫試験機

【実験装置】

測定には MRI 装置として本学が現有する超伝導核磁気共鳴装置 (7.05tesla, Varian 社製) を用いる。

この装置は 100 μm x 100 μm のマイクロイメージングが可能であり、関節軟骨のマイクロイメージングを行う予定である。

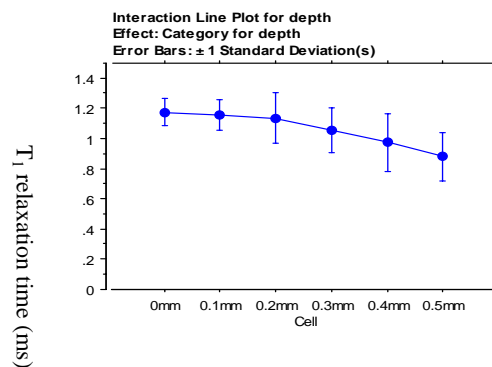
【非荷重時における測定】

まず非荷重時における軟骨組織内水分子の分布とコラーゲン線維の走行方向と配向度を測定するために、作成した各モデルを直径 10mm の NMR 試料管に関節面を長軸方向に垂直に固定する。H-1 RF コイル内に試料を封入した NMR 試料管を固定し、静磁場に対して関節面が垂直方向に T1・T2 計算画像を測定する。当大学所有のサンマイクロシステムズ

社製ワークステーションを用いて計算画像を作成した。直径 10mm の H-1 RF コイル、マイクロイメージングプローブを用い、室温 (25°C) で MR 画像の撮像を行った。

4. 研究成果

非荷重状態における関節軟骨の内部での深さによる T1 緩和時間の変化を (n=5)、荷重部軟骨で示す (Fig. 2)。T1 緩和時間は緩やかな変化を示した。すなわち、荷重部では軟骨最表層が最大値を示し、深層にかけて緩やかに短縮し、軟骨最深層で最低値を示した。



2 Layer dependent changes in the T1 relaxation time of the articular cartilage obtained from weight bearing regions with the articular surface. (mean value \pm standard deviation)

非荷重状態における変性関節軟骨の内部での深さによる T1 緩和時間の変化を、荷重部軟骨で示す (Fig. 3)。T1 緩和時間は正常軟骨と比して急激な変化を示した。すなわち、変性関節軟骨では軟骨最表層が最大値を示し、正常軟骨より延長していた。深層にかけて急激に短縮し、軟骨最深層で最低値を示し、正常関節軟骨より短縮していた。

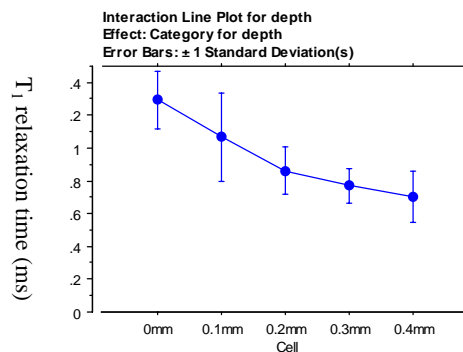


Fig. 3 Layer dependent changes in the T1

relaxation time of the degenerative articular cartilage obtained from weight bearing regions with the articular surface. (mean value \pm standard deviation)

非荷重状態における関節軟骨の内部での深さによる T2 緩和時間の変化を、荷重部軟骨で示す (Fig. 4)。荷重部軟骨における T2 緩和時間はほぼ一定の値を呈していた。

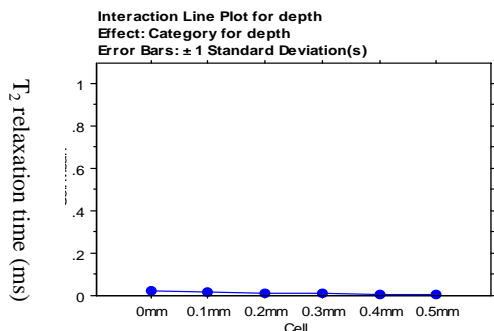


Fig. 4 Layer dependent changes in the T2 relaxation time of the articular cartilage obtained from weight bearing regions with the articular surface. (mean value \pm standard deviation)

非荷重状態における変性関節軟骨の内部での深さによる T2 緩和時間の変化を、荷重部軟骨で示す (Fig. 5)。変性関節軟骨では T2 緩和時間はほぼ一定の値を呈し、全層にわたって正常関節軟骨より延長していた。

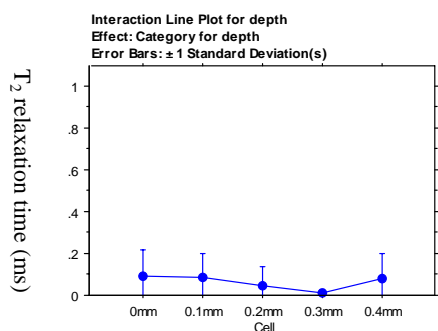


Fig. 5 Layer dependent changes in the T2 relaxation time of the degenerative articular cartilage obtained from weight bearing regions with the articular surface. (mean value \pm standard deviation)

Fig. 6 に荷重部の関節軟骨のプロトン強調 spin echo 画像を示す。非荷重状態で、関節面を静磁場に対して垂直に設置した。荷重部軟骨表層直下の信号強度が高く、深層で低下していた。荷重部では軟骨深層の信号強度がきわめて低く、軟骨下骨との識別は肉眼的に困難であった。

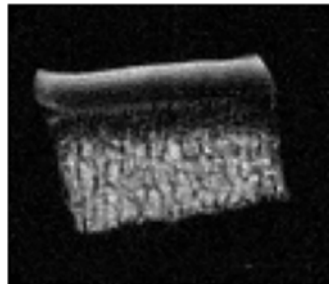
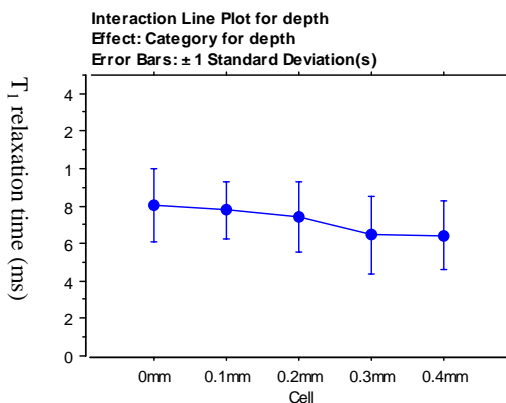


Fig. 6 Different appearance of the weight bearing region of cartilage on the proton-weighted spin echo MR image with the articular surface in a direction perpendicular with the static magnetic field.

荷重部軟骨に関して (n=5)、荷重負荷による関節軟骨内部での T1 緩和時間の変化を検討した (Fig. 7)。荷重部軟骨は関節軟骨への荷重負荷により、軟骨表層直下の部分での T1 緩和時間の短縮が大きかった。これに対して、最深層部では、T1 緩和時間の変化が比較的少ない傾向にあった。荷重負荷により正常関節軟骨は全層にわたってほぼ 0.7 ms の一定の値であった。0.1 MPa の荷重負荷では軟骨内部の T1 緩和時間の分布はほぼ均一化していた。



T₁ relaxation time (ms)

Fig. 7 Effects of external load of 0.1 MPa on the T1 profiles from the bottom to the surface layer of the articular cartilage obtained from weight bearing regions. (mean value \pm standard deviation)

荷重負荷による変性関節軟骨内部での T1 緩和時間の変化を検討した (Fig. 8)。荷重部軟骨の変性関節軟骨への荷重負荷では、正常関節軟骨と比して深層部で T1 緩和時間の短縮を認められた。正常関節軟骨とは違い変性関節軟骨では荷重負荷にともない全層にわたって短縮した。

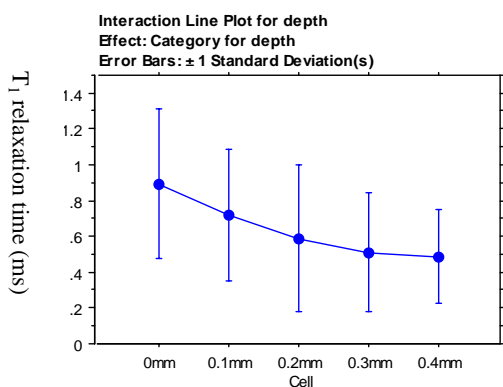


Fig. 8 Effects of external load of 0.1 MPa on the T1 profiles from the bottom to the surface layer of the degenerative articular cartilage obtained from weight bearing regions. (mean value \pm standard deviation)

T2 緩和時間に関しても同様の荷重条件下で正常関節軟骨において測定し、荷重部に関して荷重負荷にともなう T2 緩和時間の部位別変化に関して検討した (Fig. 9)。荷重部における T2 緩和時間は、荷重負荷により大きく延長した。

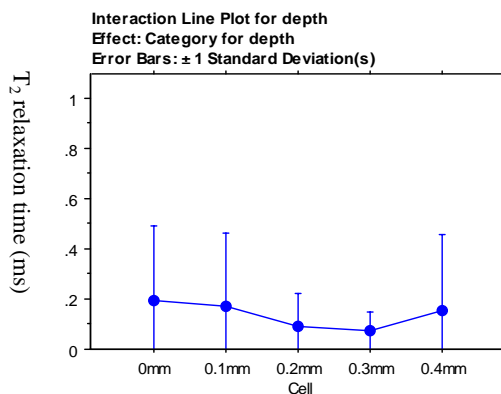


Fig. 9 Effects of external load of 0.1 MPa on the T2 profiles from the bottom to the surface layer of the articular cartilage obtained from weight bearing regions. (mean value \pm standard deviation)

変性関節軟骨に関しても同様の荷重条件下で測定し、荷重部に関して荷重負荷にともなう T2 緩和時間の部位別変化に関して検討した (Fig. 10)。変性関節軟骨ではすべての条件下において T2 緩和時間は延長していた。関節内では全層にわたってなだらかに短縮した。

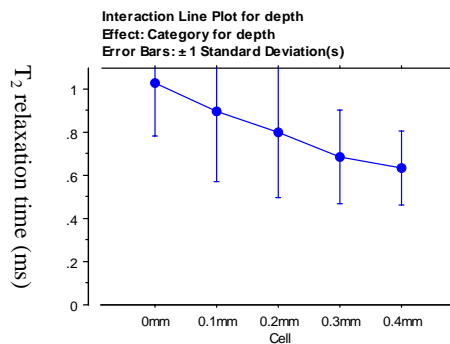


Fig. 10 Effects of external load of 0.1 MPa on the T2 profiles from the bottom to the surface layer of the degenerative articular cartilage obtained from weight bearing regions. (mean value \pm standard deviation)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生駒 和也 (IKOMA KAZUYA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50516044

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

城戸 優充 (KIDO MASAMITSU)

京都府立医科大学・医学部・大学院

研究者番号：