

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462386

研究課題名(和文) 関節鏡視下色彩色差計測による関節軟骨評価法の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation method for cartilage using endoscopic color difference meter

研究代表者

高井 信朗 (Takai, Shinro)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10226730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)は高齢社会において患者数が増加し大きな社会問題となっている。病態の進行を抑制する有効な保存療法のエビデンスは少なく早期に(OA)を診断し進行抑制のための治療を行う方法の開発が必用である。われわれは終末糖化産物(AGEs)の軟骨内の蓄積がOAの軟骨変性と関連し、AGEsの褐色を測定することによってAGEsの軟骨内の含有量を評価できるのではないかと仮説をたてた。本研究の目的は色彩色差を測定にすることで軟骨変性を評価可能か解析することである。しかし軟骨の褐色性と軟骨変性およびAGEsの含有量の関連を確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis is becoming one of the most serious public health issues as the population continues to age. There is limited evidence for effective conservative treatment to prevent the progression of pathogenesis in late-stage osteoarthritis. There is an urgent need to develop interventions to diagnose osteoarthritis early and prevent its progression. We hypothesised that accumulation of advanced glycation end products(AGEs), which usually turn brown, correlate with cartilage degeneration in osteoarthritis (OA) and that AGEs content could be evaluated by brown colour difference. The purpose of this study was to determine if any colour difference is associated with cartilage degeneration. As results, there was no correlation between brown colour and AGEs content. Cartilage degeneration was neither able to detected by color difference meter.

研究分野：整形外科

キーワード：軟骨 最終糖化産物 変性 変形性関節症 色差

1. 研究開始当初の背景

これまで、研究代表者らは、変形性関節症(OA)患者の関節軟骨再生を目指して、関節軟骨損傷に対する骨髄細胞移植 (Oshima Y. et al., Osteoarthritis Cartilage, 2004)、骨軟骨移植 (Oshima Y. et al., Microscopy Research Technique, 2002)、抗アポトーシス PTD-FNK 蛋白の投与した骨軟骨片の移植 (Nakachi N. et al., J Histochemistry Cytochemistry, 2009) など、再生医療に関連した一連の研究を行い、成果を公表してきた。また、関節への細胞・組織移植後にドナー細胞を *in vivo* で追跡する方法を確立するという基礎研究も行ってきた (Watanabe N. et al., Cell Tissue Research, 1999)。諸家によっても様々な組織工学的手法を用いて関節軟骨再生に関する基礎研究および臨床応用がなされてきたが、いずれの方法によっても、いまだ正常関節軟骨の再生には至っていない。したがって、早期に本疾患を予測・診断して治療を開始することは、本邦における健康年齢の改善において極めて重要である。

OA に対しては、単純 X 線や MRI 画像などの非侵襲的な検査があるが、これらで診断が困難な場合は関節鏡を用いて直視下に関節軟骨の診断を行う。しかし、早期 OA で肉眼的には正常硝子軟骨と同様の所見の場合は確定診断に難渋し、以後の治療方針の決定が困難となる。一方軟骨基質の骨格にあたるコラーゲン線維の間には、しなやかで弾性のある基質を維持するために「架橋」がかかっている。これに対し初期 OA では糖化反応 (glycation) による Advanced Glycation End Products (AGEs) が蓄積することが知られている。AGEs の蓄積は分子内に生理的架橋以外の糖化架橋を形成する。糖化架橋は軟骨の弾性を失わせ、OA の下地をつくる (DeGroot J. et al., Arthritis Rheuma, 2004)。AGEs は黄褐色の物質である。

一方、研究分担者の齋藤は骨の老化過程で

AGEs による非生理的架橋ペントシジンが増加し、これが骨質を低下させ骨折リスクを高めることを一連の研究によって明らかにしている (Saito M. et al., Osteoporosis International, 2006)。本研究では齋藤が行ってきた骨に対する AGEs の解析手法を軟骨に応用し褐色性との関連を明らかにする。

色を用いる分析法は簡易で迅速に定性と定量を行うことができ、様々な分野で用いられている。

AGEs の黄褐色の蛍光を色彩色差計を用いて定量することは理論的に可能である。色の分析で AGEs の蓄積を判定することができれば、超早期からでも OA 治療を開始できることから、予防医学の観点から極めて有用である。また、OA の進行度に応じた AGEs の局在を経時的に解明することが可能となるため、AGEs に関連した OA の発生、進行のメカニズムの解明につながると考える。

2. 研究の目的

我々は膝 OA 関節軟骨の褐色化の原因は軟骨基質に蓄積された AGEs であると仮説をたてた。

本研究の目的はヒト膝関節軟骨において AGEs の褐色性を可視化することにより低侵襲に OA 発生・進行を予測可能な臨床機器の開発を目指すことである。

そのため、関節軟骨の AGEs 量と褐色性の相関性を検証し、間接的な軟骨変性度の評価法として有用性があるかを検討した。さらに関節軟骨における褐色性の局在と軟骨変性を調査することにより、色度による早期変性部位の同定が可能であるかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 色彩色度計測装置の開発

予備実験として色彩色度に影響する温度・湿度の関連を調査し測定条件を決定した。

色彩色度計測装置の作成は共立電機株式会社へ依頼し、完成した装置での再度測定条件

の設定、バリデーションを評価した。

(2) ヒト OA 膝関節検体での色彩色度計測・AGEs の生化学的定量・組織学的検討

ヒト軟骨組織の採取・解析を日本医科大学倫理委員会の承認のもとに施行した。手術適応は従来通り、臨床症状、画像所見、患者の希望などから総合的に判断した。

TKA 術中に採取したヒト膝関節軟骨から肉眼的変性度 (ICRS grade) の異なる検体を用いて以下の検討を行った。既に軟骨下骨露出している Grade4 は採取から除いた。検体のサイズは 4×4 mm とし、軟骨下骨直上で分離した。

1. 色彩色度計測

採取した膝関節軟骨の色彩色度を(1)で作成した装置を用いて定量化する。色度は xyz 座標系で表示し、褐色性を表す指標として褐色度 x/y を定義した。測定値は軟骨表面の 9 ヶ所の x, y を 3 回測定し、その平均値を採用した。

2. AGEs の生化学的定量

色彩色度計測を行ったものと同検体を共同研究者である斎藤らの方法を用いて、関節軟骨中のペントシジン量を定量した。

3. 検量線の作成

1, 2 で得られた結果よりペントシジンと軟骨の色度の重回帰式を作成し、検量線を作成した。

4. 研究成果

(1) 色彩色度計測装置の開発

< 予備実験 >

製作仕様書

1. 恒温器本体

2. デジタルカメラ Canon Powershot SX170IS

温度・湿度が調節可能な恒温恒湿装置でのデータ採取

恒温恒湿装置を作成し、指定した環境下での温度・湿度の推移を計測した。装置の設置場所である実験室内は温度、湿度の条件は温度 25.8、湿度 60% と日時にかかわらず、一定条件が得られていた。

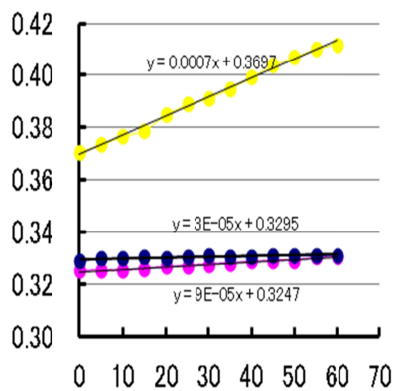
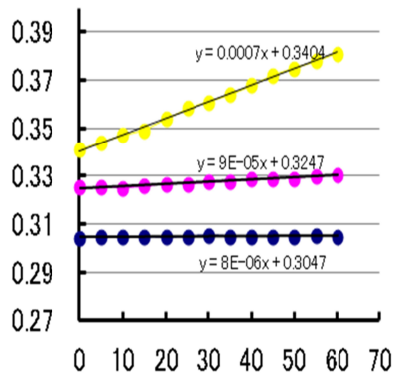
また、その環境下での関節軟骨の色彩色度の ICC(1,1) は 0.34 であった。その原因としてカメラ表面の水滴による撮影条件のずれが大きいことが判明した。

実験室内の温度、湿度が一定であったことより恒湿機能は導入せずに装置を作成することとした。

< 装置の製作 >

測定条件の設定

検体の色度測定を大気中、水中および温度制御の有無で施行した。水中、温度制御をおこなわない場合が最も測定値がばらつきなく安定している結果となった。測定値に対する温度・湿度の影響を因子分析を行い評価したが、湿度の影響は温度の 1/100 以下であり、先行実験通り無視できることを明らかにした。



温度制御	検体
● (+)	大気中
● (-)	大気中
● (-)	水中

ヒト軟骨検体でのバリデーション

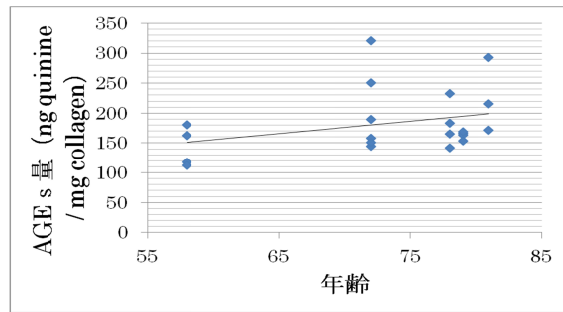
ICC(1,1), ICC(1,2), ICC(2,1)がいずれも 0.8 以上と高い測定値の再現性・信頼性が得られることを明らかにした。

さらに、3 回以上の繰り返し測定で 99 %以上の測定値の信頼性が得られることを明らかにした

(2) ヒト OA 膝関節検体での色彩色度計測・AGEs の生化学的定量・肉眼的軟骨変性度の検討

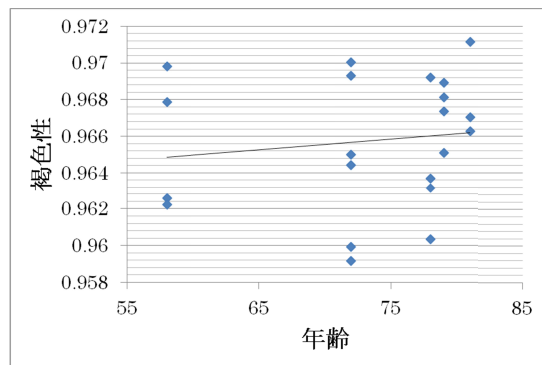
対象は H26 年 7 月～12 月に人工膝関節置換術を施行した変形性膝関節症の 7 例 24 検体 (平均年齢 74.4 歳、男性 1 例、女性 6 例) である。採取検体の ICRS grade は Grade1 3 検体、Grade2 11 検体、Grade3 10 検体であった。

加齢と関節軟骨中の AGEs 量との関連性：



関節軟骨中の AGEs 量は加齢と弱い正の相関関係 (Rs=0.322) を認めた。

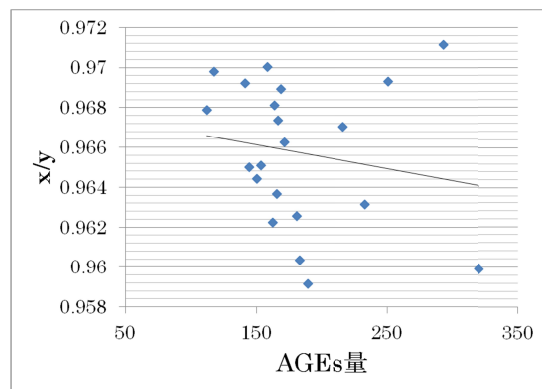
②加齢と関節軟骨の褐色性との関連性



年齢と褐色性は弱い正の相関関係 (Rs=0.261) を認めた。

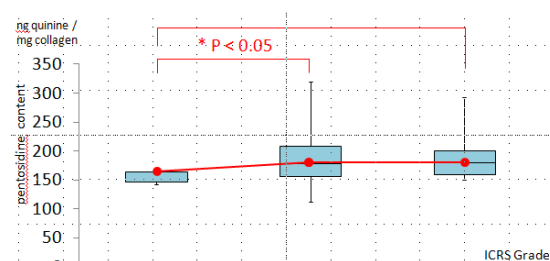
関節軟骨の褐色性と AGEs 定量との関連性

関節軟骨の褐色性と AGEs 量は弱い逆相関 (rs= -0.564) を認めた。



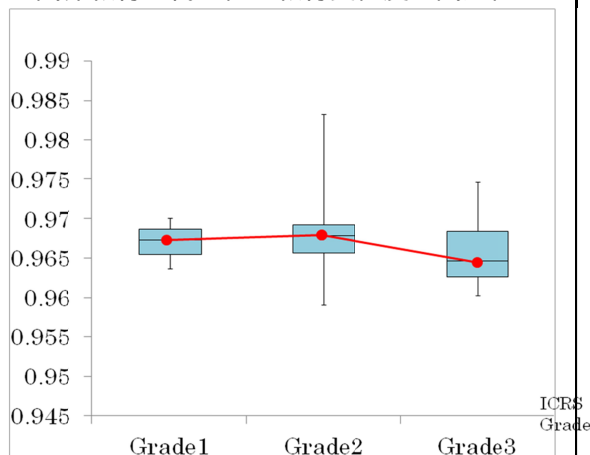
さらに重回帰分析を施行したが重相関係数 R は 0.03864、重決定係数 R2 0.001493 と極めて低い相関しか認めず、ペントシジンと軟骨の色度の検量線の作成は困難と判断した。

関節軟骨中の変性進行度と AGEs 量との関連性



肉眼的軟骨変性の進行に伴い軟骨中の AGEs 量が増加する傾向があることを確認した。

関節軟骨の褐色性と軟骨変性度の関連性



Grade2 までは肉眼的軟骨変性の進行に伴い褐色性が増加したが、Grade3 では低下した。

(3) まとめ

膝 OA 関節軟骨の褐色化の原因は軟骨基質に蓄積された AGEs であるという仮説を立て当該研究を実施したが、ヒト関節軟骨における褐色性と AGEs 量の関連性は確認できなかった。本研究の結果からは加齢に伴う軟骨への AGEs 沈着と褐色性増加は互いに関連なく増加している可能性が示唆された。しかし、本研究で AGEs として測定したペントシジンは全 AGEs 量の 1% 以下であり、AGEs の全体を表していない可能性や軟骨表面の色の原因が AGEs ではないということはこの実験結果からは否定できない。

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

高井 信朗 (TAKAI SHINRO)

日本医科大学 / 医学(系)研究科(研究院) /

教授

研究者番号：10226730

(2) 研究分担者

高橋 謙治 (TAKAHASHI KENJI)

日本医科大学 / 医学部 / 准教授

研究者番号：30347447

斎藤 充 (SAITO MITSURU)

東京慈恵会医科大学 / 医学部 / 准教授

研究者番号：50301528

(3) 連携研究者 なし