

## MRIによる自家培養軟骨細胞移植術後の修復軟骨の質的評価

渡辺 淳也<sup>1,2</sup>, 小島 隆行<sup>2</sup>, 植田 琢也<sup>3</sup>, 田村 充<sup>2</sup>,  
和田 佑一<sup>1</sup>, 守屋 秀繁<sup>1</sup>, 池平 博夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>千葉大学整形外科 <sup>2</sup>放射線医学総合研究所 <sup>3</sup>筑波大学放射線科

## はじめに

関節軟骨は豊富な細胞外基質を特徴とする硝子軟骨であり、力学的負荷に対する強い耐性をもつ。しかし血管組織を有さず、また細胞密度が非常に低いことなどから自己修復能に乏しく、一度広範な損傷を受けると自然治癒は困難である<sup>1)</sup>。軟骨損傷は放置されると二次的に周囲や反対側の軟骨変性を惹起し、最終的には日常生活上大きな障害となる変形性関節症へと進行することがあるため、その治療は臨床で極めて重要である<sup>2)</sup>。

近年軟骨損傷に対する治療法として、患者自身の軟骨組織を採取し、これを培養増殖させた後に軟骨欠損部に移植する自家培養軟骨細胞移植術 (autologous chondrocytes implantation: 以下, ACI) が臨床応用されるようになった<sup>3)</sup>。この方法は従来の軟骨修復法と比較し、より正常硝子軟骨に近い修復組織が得られるとされ期待されている。しかし、ACIによる修復を行った症例においても、一部では必ずしも良好な硝子軟骨では修復されず、硝子軟骨と比較し力学的、構造的に弱い線維軟骨や線維組織で修復されるとの報告がある<sup>4)</sup>。線維軟骨又は線維組織による修復された組織は、繰り返される負荷により早期に変性、崩壊し、臨床症状の

再燃や修復軟骨の脱落を生じる可能性がある。したがって、このような症例では早期に修復軟骨の詳細な質的評価を行い、適切な運動制限などの対応を行う必要があるが、現在まで修復軟骨の質的評価は組織生検などの侵襲的評価法しかなく、非侵襲的な評価法の確立が望まれていた。

遅延相軟骨造影 MRI (delayed gadolinium-enhanced MR imaging of cartilage) は、関節軟骨機能に重要な役割を果たす基質構成高分子である glycosaminoglycan (以下, GAG) 濃度を評価することが可能な新しい MRI 撮影法である<sup>5)</sup>。この方法の原理は GAG が陰性荷電するカルボキシル基やスルホニル基を有するため、同じく陰性荷電する MRI 用造影剤である Gd-DTPA<sup>2-</sup> を投与すると静電気による反発力により、軟骨中の GAG 濃度と反比例して造影剤が分布することを応用している。GAG は硝子軟骨中に豊富に含まれる一方、線維軟骨や線維組織中にはほとんど分布しない。したがってこの方法を用いて ACI 後の修復軟骨中の GAG 濃度の評価が可能となれば、修復軟骨の修復像の評価や、関節軟骨としての機能を評価する重要な指標になるものと考えられる。本研究の目的は、遅延相軟骨造影 MRI を用いて ACI 後の修復軟骨の質的評価を行うことである。

キーワード autologous chondrocytes implantation, cartilage, qualitative imaging, magnetic resonance imaging

## 対象および方法

千葉大学整形外科において ACI を施行した膝関節軟骨損傷症例のうち、術後に遅延相軟骨造影 MRI による MRI 撮影と、組織生検による修復軟骨の組織学的評価が可能であった 7 例 (男性 5 例, 女性 2 例) を対象とした。軟骨損傷に至った原疾患は離断性骨軟骨炎 5 例, 外傷性骨軟骨欠損 2 例で, 欠損部面積は平均  $4.0 \pm 1.1$  ( $2.2 \sim 6.0$ )  $\text{cm}^2$  であった。移植時年齢は  $21.1 \pm 8.5$  ( $13 \sim 35$ ) 歳, 移植部位は大腿骨内顆 5 例, 大腿骨外顆 2 例, 術後再鏡視までの期間は  $12.4 \pm 0.5$  ( $12 \sim 13$ ) か月, 術後 MRI 撮影までの期間は  $22.1 \pm 9.1$  ( $13 \sim 38$ ) か月であった。

ACI は Britberg ら<sup>3)</sup>の術式に準じた二期的手術により施行した。簡略に述べると, 初めに関節鏡視下に非荷重部の健常軟骨を一部採取し, 米国 Genzyme 社に移送し細胞培養を行う。次に約 4 週後, 直視手術下に軟骨欠損部を搔爬して母床を作成し, 骨膜組織をパッチ縫合しフィブリン糊で周囲をシールドした後, 培養増殖された浮遊液状の軟骨細胞を注入し移植する。術後は翌日より免荷のまま可動域訓練を開始し, 術後約 4 週後より部分荷重を開始した。

遅延相軟骨造影 MRI は Burstein らのプロトコル<sup>6)</sup>に準じて行った。MRI 撮影の約 2 時間前に造影剤 0.2 mmol/kg を経静脈投与し, 投与直後から約 10 分間の歩行を指示した。この造影剤投与後の歩行は, 造影剤の関節軟骨への浸透に必要とされる。MRI 装置は, Philips 社製 Gyroscan Intera 1.5T および膝専用コイルを使用した。T<sub>1</sub> 値の計測には, 現在関節軟骨の T<sub>1</sub> 値計測に最も一般的に使用されている inversion recovery 法を用い, TI のみを変えた 6 シリーズの修復軟骨中心部を通る矢状断像を撮影した。(TR 1800 ms, TE 28 ms, TI 50 ms,

100 ms, 200 ms, 400 ms, 800 ms, 1600 ms, FOV 130×130 mm, section thickness 3.0 mm, matrix 512×512, TSE factor 6)。

得られた画像シリーズは LINUX 上で作動する画像処理ソフトウェア (Dr. View) 上で位置合わせを行った後, 関節軟骨の緩和時間測定用に作成したプログラムを使用し, three-parameter exponential fit を用いて造影後の T<sub>1</sub> 計算画像を作成して T<sub>1</sub> 値を測定した。T<sub>1</sub> 値測定の関心領域は, 修復軟骨は全周に, 健常軟骨は修復軟骨より約 2 センチ離れた大腿骨顆部上の荷重部軟骨に, 表層から軟骨下骨に至るまで全層性に約 1 センチの長さにわたって設定した。

術後 1 年で関節鏡視下に移植軟骨部より組織生検を行い, 採取した組織をヘマトキシリン・エオジン (haematoxylin and eosin : HE) およびトルイジンブルー (toluidine blue : TB) で染色し組織像を検討した。組織学的評価には ICRS score<sup>7)</sup> を用いた (Table 1)。また術前と術後約 1 年の時点で Lysholm knee score<sup>8)</sup> により臨床症状を評価した。統計学的比較には Student t 検定を用い, 有意差の判定は危険度  $p < 0.05$  とした。

本研究の実施に際しては, すべての症例に当施設の基準に従った適切インフォームドコンセントを行い, 書面での了解を得た。

## 結 果

造影後の T<sub>1</sub> 値の平均は修復軟骨  $437.0 \pm 25.0$ , 健常軟骨  $475.3 \pm 29.8$  で, 修復軟骨で有意に低かった (ms, 平均 ± 標準偏差) ( $P < 0.05$ )。また全例とも修復軟骨の方が健常軟骨より T<sub>1</sub> 値が低かった。代表的症例の T<sub>1</sub> 計算画像を示す (Fig. 1)。矢印で示した移植部の修復軟骨は, 周囲健常軟骨と比較し T<sub>1</sub> 値は低値であり, 修復軟骨では GAG 濃度がより低いこ

2005 年 9 月 12 日受理 2005 年 11 月 17 日改訂

別刷請求先 〒260-8677 千葉市中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学医学部整形外科 渡辺淳也

Table 1. ICRS Visual Histological Assessment Scale

Feature	Score
I. Surface	
Smooth/continuous	3
Discontinuities/irregularities	0
II. Matrix	
Hyaline	3
Mixture : hyaline/fibrocartilage	2
Fibrocartilage	1
Fibrous tissue	0
III. Cell distribution	
Columnar	3
Mixed/columnar-clusters	2
Clusters	1
Individual cells/disorganized	0
IV. Cell population viability	
Predominantly viable	3
Partially viable	1
<10% viable	0
V. Subchondral Bone	
Normal	3
Increased remodeling	2
Bone necrosis/granulation tissue	1
Detached/fracture/callus at base	0
VI. Cartilage mineralization	
Normal	3
Abnormal/inappropriate location	0

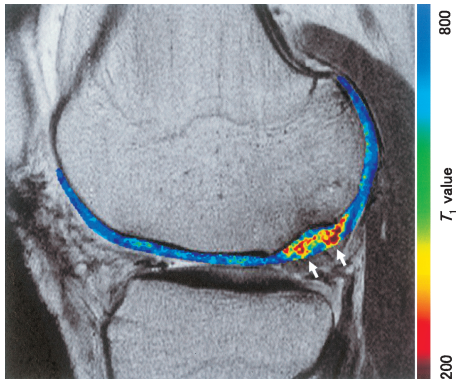


Fig. 1. T<sub>1</sub> calculated map of cartilage. In color scale, blue represents areas of high T<sub>1</sub>, and red represents areas of low T<sub>1</sub>. The T<sub>1</sub> of repair cartilage (arrows) appears lower than that of normal cartilage.

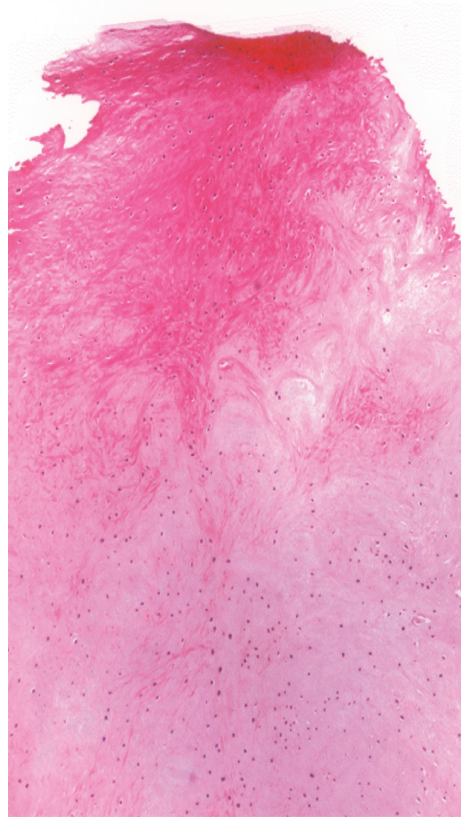


Fig. 2. Histology of repair cartilage stained by haematoxylin and eosin in this case (magnification was 100). Repair cartilage was a mixture of hyaline cartilage and fibrocartilage.

とが示唆された。術後1年での再鏡視では、いずれもプロービングで周囲健全軟骨とはほぼ同等の硬さを有する軟骨様組織で再生されていた。MRIを提示した症例のHE染色による組織像を示す (Fig. 2)。修復軟骨のICRSスコアの平均は、I :  $1.3 \pm 1.5$ , II :  $2.6 \pm 0.5$ , III :  $1.7 \pm 0.5$ , IV :  $1.3 \pm 0.7$ , V :  $2.0 \pm 0.0$ , VI :  $3.0 \pm 0.0$ , total :  $11.9 \pm 2.0$ 。(点, 平均 $\pm$ 標準偏差)であり、硝子軟骨としては不完全な組織像を呈していた。各症例の修復軟骨のT<sub>1</sub>値とICRSスコアを示す (Table 2)。移植軟骨のT<sub>1</sub>値とICRSスコアには、明らかな相関は見

Table 2. T<sub>1</sub> Value of Repair Cartilage and ICRS Score

Patient	Repair cartilage T <sub>1</sub> (ms)	ICRS Score						total
		I	II	III	IV	V	VI	
1	432.9	3	3	2	1	2	3	14
2	478.4	3	2	2	1	2	3	13
3	470.0	0	3	1	1	2	3	10
4	411.5	0	2	1	1	2	3	9
5	433.7	0	2	2	1	2	3	10
6	417.3	0	3	2	3	2	3	13
7	414.9	3	3	2	1	2	3	14

られないようであった。Lysholm score を用いた臨床的評価では、術前平均 74.7±9.6 から術後 1 年時において 95.9±3.2 (点, 平均±標準偏差) と有意な改善を認めた。また術前よりスポーツ活動を行っていた 4 例では、ほぼ受傷前のレベルでのスポーツ復帰がなされていた。

## 考 察

一般に MRI は有用な非侵襲検査法と考えられるが、従来の MRI による関節軟骨の評価は主として形態診断であり、軟骨の質的な情報をとらえることは困難であった。近年、関節軟骨の質的評価を目的として新しい撮像シーケンスが開発され、臨床での応用が試みられている<sup>9)~11)</sup>。今回我々の用いた遅延相軟骨造影 MRI は、現在まで様々な基礎実験においてその有用性が検証されており、臨床応用が最も現実的な撮像法の一つであると考えられる<sup>12)</sup>。T<sub>1</sub> 値の計算法としては IR 法のほか、より高速な撮像法<sup>13)</sup>や 3D による撮像法<sup>14)</sup>などいくつかの方法が知られる。しかし、これらの撮像シーケンスは、関節軟骨に用いる際には精度や再現性に関して問題も指摘されているため、今回は遅延相軟骨造影 MRI に最も一般的に使われている IR 法を用いた。IR 法の欠点としては magnetization transfer contrast (MTC) 等の関与<sup>15)</sup>による計算誤差を抑えるため、シングル

スライス撮影を行う必要があること、撮像にやや時間がかかることなどが挙げられるが、精度や再現性に関しては優れた方法の一つとされる。

現在まで遅延相軟骨造影 MRI を用いて臨床評価を行った報告は、主に早期軟骨変性の検知を目的としており、この方法は従来の画像診断法と比較し非常に有用であるとされている。遅延相軟骨造影 MRI を ACI 後の修復軟骨の評価に用いた本研究において、MRI による評価では修復軟骨の T<sub>1</sub> 値は健常軟骨と比較し有意に低く、軟骨組織中の GAG 濃度が低いことが示唆された。一方、組織学的評価でも修復軟骨は健常軟骨のように良好な硝子軟骨ではなかったことから、軟骨組織中の GAG 濃度は低値であるものと予想され、MRI による評価と一致した。しかし、症例が少ないため統計学的検討は行っていないが、個々の症例における移植軟骨の T<sub>1</sub> 値と ICRS スコアによる組織学的評価との間には明らかな関連性は認めなかった。この原因としては、いくつかの可能性が考えられる。今回は造影後の T<sub>1</sub> 値のみを検討しているが、本来組織中に浸透した造影剤濃度は、造影前と造影後の T<sub>1</sub> 値の関数として表される。現在まで本法を用いて行われている早期変性軟骨の評価では、造影後の T<sub>1</sub> 値測定のみを行うことが一般的であったが、移植後の修復軟骨では早期変性軟骨と異なり、造影前の T<sub>1</sub> 値が健常軟骨と大きく異なっている可能性があることから、造影前の T<sub>1</sub> 値測定も考慮すべきかもしれない。また、ICRS スコアによる組織学的評価は修復軟骨の組織像を様々な基準で評価するものであり、必ずしも遅延相軟骨造影 MRI の結果と相関する GAG 濃度の評価に主眼をおいていないことも原因と考えられた。今回の結果から遅延相軟骨造影 MRI は、ACI 後の修復軟骨の評価にも適応可能である可能性が示唆されるものの、この方法の有用性を調べるためには、造影前の T<sub>1</sub> 値の評価を加えたり、また組織中の実際の GAG 濃度測定を行うなどして、今後さらなる検討を行う必要があると考えられた。

損傷軟骨を硝子軟骨で再生し得る ACI は軟骨損傷に対する有効な治療法であり、その臨床成績に関してはおおむね良好とする報告が多い。しかしながらその修復軟骨は必ずしも正常硝子軟骨と同様ではないことが知られている。ヒトにおける ACI 後の修復軟骨の組織像に関する報告では、Peterson らは修復組織は、硝子軟骨 71%、硝子軟骨と線維軟骨の混合組織 10%、線維軟骨 19% で、比較的良好的な成績あったとする一方、Roberts らは、硝子軟骨 7%、混合組織 43%、線維軟骨 50% と報告している。本研究においても、術前と術後 1 年の時点の比較では臨床成績の改善は非常に良好であるのに対し、生検修復軟骨の組織学的評価では、硝子軟骨としては不完全であり必ずしも良好ではなかった。このような軟骨組織では、術後早期には良好な結果が得られるものの、長期経過では修復組織の変性変化により臨床成績が悪化する可能性がある。

動物において ACI 後の修復組織の経時的検討を行った報告によると、ウサギでは移植後約 3 か月程度で修復軟骨の成熟が完成した後、良好な組織像が長期に維持されるのに対し<sup>16)</sup>、イヌでは移植後 3~6 か月程度で修復軟骨の成熟が完成するものの、以降は変性変化が進行するとされる<sup>17)</sup>。これらの結果から ACI の成績には種依存性がある可能性が示唆されるが、ヒトにおける ACI 後の修復組織の経時的変化に関しては、現在まで有効な非侵襲的評価法がなかったため十分には検討されていない。しかし、ACI の対象となる症例は 10 代から 20 代までの若年者が多いことから、修復軟骨の長期耐性は非常に重要であり、軟骨変性の進行の有無を含めた長期的経過観察が重要であると考えられる。

現在多くの研究機関において、長期耐性を改善するため、より硝子軟骨に近い修復軟骨での再生を目指し、スカフォードを用いた三次元培養<sup>18)</sup>、間葉系幹細胞を用いた修復法の開発<sup>19)</sup>などが試みられている。これらの新しい

技術が臨床応用される際にも、遅延相軟骨造影 MRI など関節軟骨の質的評価を非侵襲的に行い得る方法は、修復組織像やその長期成績を知る上で非常に有用であると考えられる。

## 結 語

遅延相軟骨造影 MRI を用いて ACI による修復軟骨の質的評価を行った。本撮影法は修復軟骨の有効な非侵襲的評価法として治療効果の判定や長期予後の予測の指標となる可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Newman AP: Articular cartilage repair. *Am J Sports Med* 1998; 26: 309-324
- 2) Messner K, Maletius W: The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand* 1996; 67: 165-168
- 3) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-895
- 4) Briggs TW, Mahroof S, David LA, Flannelly J, Pringle J, Bayliss M: Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 2003; 85: 1077-1083
- 5) Bashir A, Gray ML, Boutin RD, Burstein D: Glycosaminoglycan in articular cartilage: *in vivo* assessment with delayed Gd(DTPA)(2-)-enhanced MR imaging. *Radiology* 1997; 205: 551-558
- 6) Burstein D, Velyvis J, Scott KT, Stock KW, Kim YJ, Jaramillo D, Boutin RD, Gray ML: Protocol issues for delayed Gd(DTPA)(2-)-enhanced MRI (dGEMRIC) for clinical evaluation of articular cartilage. *Magn Reson Med* 2001; 45: 36-41
- 7) Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, et al.:

- Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am* 2003 ; 85-A Suppl 2 : 45-57
- 8) Lysholm J, Gillquist J : Evaluation of knee ligament surgery results with special emphasis on use of a scoring scale. *Am J Sports Med* 1982 ; 10 : 150-154
  - 9) Akella SV, Regatte RR, Gougoutas AJ, Borthakur A, Shapiro EM, Kneeland JB, Leigh JS, Reddy R : Proteoglycan-induced changes in T<sub>1</sub> rho-relaxation of articular cartilage at 4T. *Magn Reson Med* 2001 ; 46 : 419-423
  - 10) Miller KL, Hargreaves BA, Gold GE, Pauly JM : Steady-state diffusion-weighted imaging of *in vivo* knee cartilage. *Magn Reson Med* 2000 ; 51 : 394-398
  - 11) Smith HE, Mosher TJ, Dardzinski BJ, Collins BG, Collins CM, Yang QX, Schmithorst VJ, Smith MB : Spatial variation in cartilage T<sub>2</sub> of the knee. *J Magn Reson Imaging* 2001 ; 14 : 50-55
  - 12) Bashir A, Gray ML, Burstein D : Gd-DTPA<sup>2-</sup> as a measure of cartilage degradation. *Magn Reson Med* 1996 ; 36 : 665-673
  - 13) Lin M, Fletcher J, Donati R. Two-point T<sub>1</sub> measurement: Wide-coverage optimizations by stochastic simulations. *Magn Reson Med* 1986; 3: 518-533
  - 14) Henderson E, McKinnon G, Lee TY, Rutt BK : A fast 3D look-locker method for volumetric T<sub>1</sub> mapping. *Magn Reson Imaging* 1999 ; 17 : 1163-1171
  - 15) Yao L, Gentili A, Thomas A : Incidental magnetization transfer contrast in fast spin-echo imaging of cartilage. *J Magn Reson Imaging* 1996; 6 : 180-184
  - 16) Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L : Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res* 1996 ; 326 : 270-283
  - 17) Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Shortkroff S, Spector M : Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res* 2001 ; 19 : 482-492
  - 18) Ochi M, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M : Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs* 2001 ; 25 : 172-179
  - 19) Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994 ; 76 : 579-592

## Qualitative MR Assessment of Repair Cartilage after Autologous Chondrocyte Implantation

Atsuya WATANABE<sup>1,2</sup>, Takayuki OBATA<sup>2</sup>, Takuya UEDA<sup>3</sup>,  
Mitsuru TAMURA<sup>2</sup>, Yuichi WADA<sup>1</sup>, Hideshige MORIYA<sup>1</sup>,  
Hiroo IKEHIRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University  
Chiba-shi, Chiba 260-8677*

<sup>2</sup>*National Institute of Radiological Sciences*

<sup>3</sup>*Department of Radiology, Clinical Institute, University of Tsukuba*

Autologous chondrocyte implantation (ACI) is widely used to treat articular cartilage lesions. It has been known as an effective, essential treatment, especially for the large osteochondral defects of the articular cartilage of the knee, but the qualitative aspect of its use in repairing cartilage has not been well documented. The aim of our study was to evaluate the quality of reparative cartilage after ACI using gadolinium-enhanced magnetic resonance (MR) imaging.

The study group comprised 7 knees from 7 patients who had undergone ACI and second-look arthroscopy with biopsy. Gadolinium-enhanced MR imaging was performed to assess the concentration of glycosaminoglycan (GAG) in repair cartilage.  $T_1$  value was calculated using an inversion recovery sequence (TR 1800 ms ; TE 28 ms ; TI 50 to 1600 ms ; FOV  $130 \times 130$  mm ; section thickness 3.0 mm ; matrix  $512 \times 512$  ; TSE factor 6), the most prevalent method for calculating the  $T_1$  value of the cartilage. Histological evaluation of repair cartilage was made at second-look arthroscopy to assess how closely the repair cartilage resembled normal cartilage. Lysholm scoring quantified the clinical status of the patients before ACI and one year after ACI.

The  $T_1$  value of repair cartilage was lower than that of normal cartilage, signifying lower concentration of GAG in repair cartilage than in normal cartilage. Repair cartilage was classified as hyaline-like cartilage in 4 patients and mixed cartilage in threes. This finding was consistent with MR evaluation. Lysholm scores before ACI improved significantly one year after ACI.

Qualitative evaluation of repair cartilage after ACI is important in assessing treatment results and predicting outcomes, such as the presence or absence of long-term degenerative changes. This MR imaging method may be useful as a noninvasive evaluation of quality in repair cartilage after ACI, but studies on additional cases are necessary.