

主論文の要旨

Prediction of progression of damage to articular cartilage 2 years after anterior cruciate ligament reconstruction: use of aggrecan and type II collagen biomarkers in a retrospective observational study

前十字靭帯再建手術 2 年後の関節軟骨損傷の進行予測：
アグリカン及びⅡ型コラーゲンバイオマーカーを用いた
後ろ向き観察研究

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野
(指導：西田 佳弘 准教授)

祖父江 康司

【緒言】

関節軟骨の破壊は変形性関節症（OA）の特徴の1つであり、X線撮影の変化が現れたら、軟骨損傷の進行を防止することはできない。したがって、OAの進行を防ぐために、早期の軟骨損傷の検出が必要である。

関節軟骨基質は、主にⅡ型コラーゲンおよびアグリカンなどのプロテオグリカンから構成される。Ⅱ型コラーゲンのコラゲナーゼ生成ネオエピトープ（C2C）は、Ⅱ型コラーゲンの切断を反映するバイオマーカーである。アグリカンはケラタン硫酸（KS）とコンドロイチン硫酸（CS）のグリコサミノグリカン側鎖が結合したコアタンパク質から成る。正常成人関節軟骨において、アグリカンの側鎖として、コンドロイチン 6 硫酸（C6S）および KS が豊富に存在する。一方、OA 軟骨において、C6S、KS の代わりにコンドロイチン 4 硫酸（C4S）を側鎖とすることが多い。

我々は以前、前十字靭帯（ACL）損傷患者の関節液の C2C および KS が、関節鏡に基づく軟骨損傷の程度と関連することを報告した。本研究では、ACL 再建手術後の軟骨損傷の進行が ACL 再建手術時に測定されたバイオマーカーと関連するか検証した。

【対象及び方法】

2001 年 1 月から 2003 年 3 月までに三菱名古屋病院にて施行された ACL 再建手術患者の中で、抜釘を行い関節内のフォローアップが可能だった 62 人を対象とした。関節鏡評価は、ACL 再建手術時と抜釘時（初回手術から平均約 2 年後）に行った。大腿骨内外側顆部、脛骨内外側顆部、膝蓋骨、大腿骨滑車溝の 6 か所の軟骨損傷を Outerbridge grading system（Grade I：軟骨の軟化および腫脹。Grade II：直径 1.27cm 以下の領域の断片化および亀裂の存在。Grade III：直径 1.27cm を超える領域を占める断片化および亀裂の存在。Grade IV：骨露出を伴った軟骨のびらん。）を用い評価した。Grade III 以上を高度軟骨損傷とし、高度軟骨損傷を認めた個所の数の変化（ACL 再建手術時→抜釘時）により進行群（1 以上）15 人と不変群（0 以下）47 人に分け比較した。

ACL 再建手術時に、関節液を採取し、試料を 4℃で 10,000rpm で 20 分間遠心分離し、上清を -80℃で保存した。バイオマーカーとして C2C、KS、C4S、C6S を、ELISA（C2C）または高速液体クロマトグラフィー（KS、C4S、C6S）によって測定した。

バイオマーカーと高度軟骨損傷の進行との関連を評価するために、Receiver operating characteristic（ROC）分析およびロジスティック回帰分析を行った。

【結果】

表 1 に各群の特徴を示す。再建手術時の年齢は 31.1 歳／26.5 歳（進行群／不変群）、受傷から ACL 再建手術までの期間は 39.7 か月／21.8 か月、再建手術時に Grade III 以上の数が 1 以上であった割合 46.7％／31.9％であり、いずれも有意差はなかった。抜釘時に X 線撮影上の OA 変化（Kellgren-Lawrence 分類 Grade I 以上）は観察されなかった。Grade III 以上の数が 1 以上であった割合 100％／21.3％であった（ $p < 0.001$ ）。

表 2 に各群のバイオマーカー値を示す。C6S は 53.4nmol/ml／73.5ng/ml（進行群／不

変群)、KS は $9.9 \mu\text{g/ml}$ / $11.9 \mu\text{g/ml}$ 、C6S/C4S 比は 3.9 / 4.4 であり、いずれも進行群で有意に低かった。C2C、C4S、C2C/KS 比について、有意差は認められなかった。

図 1 に高度軟骨損傷の進行と C6S、C4S、KS、C6S/C4S 比に対する ROC 分析を示す。ROC 曲線下面積について、C6S は 0.746 (95%信頼区間[CI] 0.612-0.880) (図 1A)、C4S は 0.618 (95%CI 0.478-0.758) (図 1B)、KS は 0.699 (95%CI 0.526-0.872) (図 1C)、C6S/C4S 比は 0.689 (95%CI 0.546-0.833) (図 1D) であった。カットオフ値について、C6S は 55.7nmol/ml (感度 60.0%、特異性 83.0%)、C4S は 19.0nmol/ml (感度 93.3%、特異性 46.8%)、KS は $10.6 \mu\text{g/ml}$ (感度 73.3%、特異度 70.2%)、C6S/C4S 比は 4.6 (感度 93.3%、特異度 40.0%) であった。

表 3 に高度軟骨損傷の進行と C6S、C4S、KS、C6S/C4S 比の関連を検証したロジスティック回帰分析を示す。ROC 分析にて得られたカットオフ値を使用した。ACL 再建手術時の年齢、受傷から ACL 再建手術までの期間、性別、および高度軟骨損傷の数 (Grade III 以上) にて調整した。調整後の、軟骨損傷の進行に対するオッズ比は、C6S : 0.231 (95%CI 0.061-0.879)、C4S : 0.081 (95%CI 0.008-0.763)、KS : 0.114 (95%CI 0.024-0.529)、C6S/C4S 比 : 0.060 (95%CI 0.005-0.737) であり、いずれも有意差を認めた。

【考察】

C6S、C4S、KS および C6S/C4S 比と高度軟骨損傷の進行が有意に関連することを示した。今回、関節鏡による縦断的な観察を行い、関節液のバイオマーカーが早期軟骨損傷の進行を予測できることを最初に報告した研究である。

ROC 分析によって決定されたカットオフ値 (C6S : 55.7nmol/ml 、KS : $10.6 \mu\text{g/ml}$ 、C6S/C4S 比 : 4.6) は、以前の報告に基づく Kellgren-Lawrence 分類 Grade II - IV 相当であった。これは、今回の研究において高度軟骨損傷の進行を示した症例 (進行群) は、X 線撮影上の OA 変化を示さなかったが、OA 患者と同様の軟骨アグリカン代謝を示したことを示唆する。新しく合成されたアグリカンは、正常軟骨と異なり、C6S および KS の代わりに C4S に置換されている。今回の結果は、C6S、KS および C6S/C4S 比が軟骨損傷の進行と負の相関がある点で、以前の報告と一致する。

一方、C4S に関して、進行群と不変群で有意差は認められず (表 2)、C4S の ROC 曲線下面積は他のバイオマーカー (C6S、KS、C6S/C4S 比) の ROC 曲線下面積に比べて低かったが (図 1)、ロジスティック回帰分析にて C4S が 19.0nmol/ml を超えた場合、 19.0nmol/ml 以下と比べ軟骨損傷が進行しないという結果が得られた (表 3)。通常、C4S は OA 軟骨において高度に発現されるため、今回の研究結果と矛盾するようである。しかし、今回の研究において、C4S および C6S は Pearson 積率相関係数にて有意な正相関 (相関係数=0.838 [95%CI 0.744-0.899]) を示したことを考慮すると、外傷後の早期変化に関して、C6S の合成が C4S の合成よりも高い限り、軟骨損傷が進行しないと言えるかもしれない。従って、軟骨損傷の進行の予測バイオマーカーとして、C6S/C4S 比を考慮することが適切である。

年齢は C6S/C4S 比と負の相関があり、男性よりも女性において C6S/C4S 比は低い

と報告されている。したがって、年齢や性別は、軟骨損傷の進行を予測する際に考慮されるべきである。表 3 に示すように、C6S、KS、C6S/C4S 比は、ACL 再建手術時の年齢、受傷から ACL 再建手術までの期間、性別、および高度軟骨損傷の数（Grade III 以上）の調整後でさえ、高度軟骨損傷の進行と有意に関連していた。したがって、C6S、KS、C6S/C4S 比は、軟骨損傷の予測バイオマーカーとして役立つ可能性がある。

この研究にはいくつかの限界点がある。まず、限られたバイオマーカーのみが評価されたこと、ACL 再建手術時から抜釘時までの期間が患者によって異なること、サンプルサイズが小さいことがあげられる。また、今回の ACL 損傷患者の軟骨損傷が X 線撮影上の OA 変化に進行するかについて検討する必要がある。

【結論】

関節鏡で評価された高度軟骨損傷の進行は、アグリカン代謝のバイオマーカー、つまり、C6S、KS および C6S/C4S 比と有意に関連していた。今回の研究で得られたカットオフ値は、軟骨損傷の進行を予測する上で有用である可能性が示唆された。