

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

鳥井 康義

論文題目

骨折治癒における軟骨内骨化に
ビスホスホネート製剤が与える影響

I. 緒 言

矯正治療に大きく関わる骨の成長発育の様式は、膜性骨化と軟骨内骨化に分類されている。特に、下顎骨の成長には成長軟骨板における軟骨内骨化が必須と言われている。また、同様に軟骨内骨化が短時間に起こるものとして、骨折治癒の過程が報告されている。

現在、骨粗鬆症の骨折予防のために、ビスホスホネート製剤が第一選択薬として頻用されている。ビスホスホネート(以下 BP)は、骨破壊性骨吸収に対する強い吸収抑制効果のため、増加した破骨細胞活性を有する代謝性骨疾患の治療や予防のために広く用いられている。これまでに骨粗鬆症治療のため、骨量の増加と骨折の予防を目的とし、様々な研究がなされてきた。しかし、BP が骨折の治療を目的とした、いわゆる骨折の治療薬として用いた際に、骨折治癒過程における軟骨内骨化に与える影響に焦点を合わせた研究は、ほとんど行われていない。

そこで本研究において、骨折治癒における軟骨内骨化に BP 製剤が与える影響の検討、また、骨折予防薬としてのみではなく、骨折治療薬としての BP 製剤の可能性を検討することを目的として、以下に示す実験を行った。骨折治癒を軟骨内骨化のモデルとして、マウス脛骨を骨折後、BP の一種であるアレンドロネートを投与し、骨折の治癒過程における軟骨内骨化に対する BP の効果を骨形態的变化、組織学的変化について検討した。

II. 実験材料及び方法

1. 動物及び試薬

本研究は、実験動物に生後8週齢の雄性マウス (C57BL/6J) を使用し、生理食塩水を連続投与する群 (以下control群 n=8) とBPを連続投与する群 (以下BP群 n=8) の2群に対し、マウス脛骨に実験的閉鎖性横骨折を作製した。全身麻酔下で脛骨上端部をスチールバーにて露髄させ、直径0.016inch (0.4064mm) 長さ約1.5mmの β -Tiワイヤーを脛骨骨髓内に髓内釘として刺入し、傷面を閉鎖した。その後、スリージョープライヤーにて脛骨中央部に加重を加えた。加重は手指の感覚にて骨折に必要な最小限の力で行った。BPはアレンドロネートであるテイロック (帝人ファーマ, 東京) を用い、1.25mg/kg of weightの用量で3週間、骨折直後より1日に1回の割合で腹腔内投与した。処置後10日目、21日目にジエチルエーテルにて屠殺し、脛骨を大腿部ごと採取した。

2. 評価方法

軟X線写真による仮骨面積計測と骨折治癒のスコア評価、マイクロCT像による仮骨石灰化度、病理組織学的観察、血清骨代謝マーカーにて評価を行った。

軟X線写真は軟X線発生装置OMC-403 (株式会社オーミック, 滋賀) を使用し、撮影した。得られた画像は、画像解析ソフトImageJ64を用いて処置後10日目、21日目における仮骨形成面積を計測した。Wardenらの論文を参考

に、画像コントラストを任意で調整し、新たに形成された仮骨面積の計測を行った。また同一画像でSmithamらの論文を参考に骨折治癒スコアによる評価を行った。

マイクロCT像は、脛骨からホープライヤーにて髓内釘を抜釘した後、マイクロCT (実験動物用3D マイクロX線CT R_mCT, 株式会社リガク, 東京) にて撮影した。仮骨石灰化度計測には画像解析ソフトTRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング株式会社, 東京) を使用し、Wardenらの論文を参考に骨折平面を中心とした長さ 5 mmの領域に存在する髓腔を除くすべての構造物を仮骨として計測した。control群の非骨折側の皮質骨のCT値を閾値と設定し、それ以上であれば石灰化仮骨として定義し、仮骨石灰化度として総仮骨体積あたりの石灰化仮骨体積の割合を算出した。

病理組織学的観察は、採取した脛骨を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、10%EDTA (pH7.2) で約 4 週間、4℃の条件下で脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋を行い、5 μ m の矢状断方向の連続組織切片を作製した。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色) およびトルイジンブルー染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。

血清骨代謝マーカーの測定は、血清ALPと血中TRAPを計測した。

3. 統計的処理

得られた実験データは平均値と標準誤差で示し、統計的な有意差検定は t -検定および多重比較検定 (Turkey' s multiple comparison test) を用

いた。全ての統計解析は、GraphPad Prism v. 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。p<0.05 を統計的有意差ありと判定した。

III. 結 果

軟 X 線写真による仮骨面積は、10 日目、21 日目の両日において BP 群は control 群に比べ有意に仮骨面積が大きかった。10 日目と 21 日目での比較では、control 群では有意な差は認められないものの、仮骨面積の大きさが小さくなる傾向が認められたのに対し、BP 群ではほとんど変化を認めなかった。

骨折治癒スコア評価では、BP 群、control 群ともに 10 日目と比較して 21 日目では骨折治癒のスコアが高くなり、骨折が治癒に向かっていることが示唆された。また、10 日目においては両群間に有意差を認めなかったのに対し、21 日目では control 群に対し BP 群が有意に低いスコアとなった。

μ CT 画像による仮骨石灰化度は、10 日目において BP 群は control 群と比較し有意に仮骨石灰化度が高くなっていた。しかし、21 日目においては両群間に有意な差を認めなかった。10 日目と 21 日目の比較では control 群は有意に仮骨石灰化度が高くなったのに対し、BP 群では有意な差を認めなかった。

仮骨の組織学的観察の H. E. 染色より、control 群は 10 日目において骨折部に軟骨、結合組織、類骨が形成されていた。21 日目では骨折部に軟骨は

僅かに存在するも、そのほとんどが線維性結合組織であった。また層板構造をもつ皮質骨様骨組織による架橋結合が進んでいた。一方、BP群の10日目では盛んな硝子軟骨の形成を認めた。21日目では軟骨様組織が残存し、それらを取り囲むよう類骨が存在し、これにより架橋形成が進んでいた。

また、トルイジンブルー染色でもBP群は10、21日目においてメタクロマジーを示し、軟骨の形成、残存が認められた。

血清中ALP活性、血中TRAP濃度においてBP群はcontrol群に対し有意差な差をもって低下していた。

IV. 考 察

1. 実験デザインについて

骨代謝疾患(骨粗鬆症)動物に対し、骨折前からBPが投与された状況下で、BPが骨折後の骨癒合に影響を与えるか否かの研究については、様々な報告がなされている。しかし、BPが骨折前から投与されているため、BPによる影響を受けていない状態の骨組織に対して、骨折を行い、その治癒過程にBP投与が及ぼす影響については、明らかとなっていない。また、骨折直後からのBP投与が骨癒合を促進するのか遅延するのかを検索した研究はあまりなされておらず、骨折に対するBP投与が骨折の治癒の促進に有効であるとする確固たるエビデンスがこれまでに得られていない。そこで本実験では、骨折直後からBPを投与し、骨折治癒過程の軟骨内骨化への影響とともに骨癒合に対する影響を明らかとすることを目的とした。

骨折治癒における実験方法において、骨折片の偏位が起こりにくい再現性のある骨折モデルを作製するため、本実験では歯科矯正用の β -Tiワイヤーを髓内釘として応用した。 β -Tiワイヤーはステンレススチールより弾性限が大きいことにより髓内釘として利用した際、変形力が加わっても永久変形が起こりにくい。したがって、骨折片どうしの偏位が生じにくくなると考えられる。また、軟組織を切開し、鋸で骨折させる方法よりも、プライヤーによりできた、わずかな皮下出血を呈する程度の挫傷にとどまり、軟組織を介して骨折させる本方法を用いることで感染のリスクや周囲組織への侵襲による結果への影響を最小限にとどめることができた。以上より、再現性の高い骨折モデルを作製することができたと考えられた。

2. 骨折治癒過程の軟骨内骨化における破骨細胞活性の影響について

本実験ではBPの投与により、通常の治癒過程に見られるような仮骨の縮小がなされなかった。また、骨折治癒スコアにおいて、骨の架橋結合は認められるが、骨折線の残存が多く認められ、スコアが低値となり、骨折治癒が遅延していると考えられた。

組織所見より、BP投与による破骨細胞活性の抑制に伴い相対的に軟骨細胞の増殖分化が優位となり、軟骨が増殖するも、その分解、吸収がなされないためにその組織像は未成熟のままとなり、骨折治癒における正常な軟骨内骨化の進行が妨げられたと考えられた。

現在、骨粗鬆症など骨代謝疾患がある場合において、骨折予防のためにBPは頻用されている。しかし、発生頻度は低いが、これらの副作用として顎骨壊死との関連が指摘されており、長期間にわたるBP服用に関し注意が必要である。さらに今回の結果より、骨折直後からのBP投与は軟骨内骨化が遅延され、骨折の治癒所見の遅延が認められたことから、骨折治癒過程におけるBPの投与は細心の注意が必要であると示唆された。

V. 結 論

骨折後のアレンドロネート投与は、仮骨が大きく形成されるが、骨折線は残存し、組織学的には長期間にわたり軟骨の吸収が阻害され、骨折治癒における軟骨内骨化を遅延させる可能性が示唆された。