

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591676

研究課題名 (和文) 骨組織の I 型コラーゲン架橋と骨質に関する実験的研究

研究課題名 (英文) Study of bone quality related to type I collagen cross-links

研究代表者

市村 正一 (ICHIMURA SHOICHI)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：00159849

研究成果の概要：コラーゲンの架橋形成を阻害する  $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN) を成長期家兔の脛骨の骨延長時に投与することにより、骨癒合の起こらない偽関節例が多くみられた。また、骨癒合した例の骨延長部には成熟した皮質骨に至らない石灰化の低い新生骨が増加する傾向が認められた。骨の I 型コラーゲン架橋は骨新生時における未熟な骨組織から生理的な成熟した皮質骨に代謝回転する過程や骨折治癒に重要な働きをしていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：整形外科学

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：骨延長、骨新生、 $\beta$ -aminopropionitrile、コラーゲン架橋、創外固定、家兔

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は超高齢化社会を迎えつつある我が国では、年々増加の一途である。本症による骨折も増加傾向にあり、骨折は患者や家族に大きな肉体的および経済的負担を強いるだけでなく、国民全体にかかる経済的負担も大きい。このため早急な骨折の予防対策が

重要である。骨折は骨強度の低下により生じるが、従来骨強度を規定する因子としては骨量が約 70% を占めるとされ、骨粗鬆症の骨折予防には骨量を増加することに重点が置かれてきた。しかし、実際の骨折の多くは骨粗鬆症と診断されるよりも高い骨密度で生じていることが大規模な疫学調査で明らかに

されるなど、骨量以外の骨折の危険因子の解明が緊急の課題である。現在、骨密度以外の骨強度を規定する因子をまとめて骨質と表現しているが、その中でも骨基質に最も豊富に含まれているコラーゲンが注目され、近年骨粗鬆症における量的、質的異常の重要性が報告されている。

## 2. 研究の目的

I 型コラーゲンは骨組織中に最も多く存在する蛋白質であるが、コラーゲン線維が架橋することにより骨石灰化に関与し、その強度を維持していると考えられているが、不明な点が少なくない。本研究目的は創外固定を用いた骨延長モデルを用いて、骨組織中の I 型コラーゲン架橋の量的変化が骨質や骨強度に及ぼす影響を検討することである。

## 3. 研究の方法

1. 日本白色家兎 (4-5 ヶ月齢、3kg) をペントバルビタール静脈麻酔下 (40mg/kg) に右側脛骨中央部に骨切りを行い、創外固定 (Orthofix M-100) を装着する。

2. 骨切り後 7 日間待機してから骨延長を開始し、1 日に 2 回、各 0.35mm づつ骨延長 (0.7mm/日) を行い、2 週間で 9.8mm 延長する。

3. 骨延長開始後から BAPN を 1mg/kg、2mg/kg の 2 段階の用量を設定して 1 回/日、週 4 回腹腔内投与する。対照群としては vehicle (生理食塩水) を同様に投与する。

4. 骨延長終了後 5 週まで経時的に X 線写真を撮影し、骨延長部の新生骨について観察する。その後脛骨を摘出し、二重エネルギー X 線吸収法 (DXA) による骨密度測定、末梢骨用の QCT による各種パラメータ測定、3 点曲げ試験による力学的強度試験を行う。

## 4. 研究成果

### 1) BAPN 1mg/kg、2mg/kg、週 4 回投与、骨

### 延長 2 週間、延長終了 5 週間後の評価実験

(結果) 対照群 5 羽は全例骨癒合しており、BAPN 1mg 群 6 羽も全例が骨癒合していた。一方、BAPN 2mg 群 4 羽全例骨癒合がみられなかった。このため、BAPN 2mg 群は骨密度等の評価ができなかった。

骨延長部全体の DXA による骨密度は対照群  $321.0 \pm 55.8 \text{mg/cm}^2$ 、BAPN 1mg 群  $314.2 \pm 64.4 \text{mg/cm}^2$  と有意差はなかった。

また、三点曲げによる骨強度試験 (速度 2mm/min、支点間距離 20mm) では、

最大点荷重 (N) : 対照群  $304.6 \pm 81.0$ 、

BAPN 1mg 群  $327.1 \pm 128.9$

最大点伸び (mm) : 対照群  $1.15 \pm 0.3$ 、

BAPN 1mg 群  $2.14 \pm 1.2$

最大点応力 (N/mm<sup>2</sup>) : 対照群  $5.07 \pm 1.51$ 、

BAPN 1mg 群  $5.19 \pm 2.14$

最大点歪み (%) : 対照群  $21.7 \pm 6.3$ 、BAPN

1mg 群  $43.6 \pm 24.2$  と、最大点歪みで BAPN

1mg 群で高い傾向にあったが有意差がみら

れなかった ( $p=0.08$ )。他のパラメータにも有意差はなかった。

(考察) BAPN 1mg 群は対照群と明らかな変化はみられなかった。一方、BAPN 2mg 群は全例骨癒合がみられなかったことから、BAPN 2mg は骨癒合を障害した可能性が考えられた。しかし、一部創外固定器の破損もみられたことから再実験を行った。

### 2) BAPN 2mg/kg、週 6 回投与、骨延長 2 週間、延長終了 3 週間後の評価実験

今回の実験では BAPN 投与を週 6 回に増加し、評価時期を 2 週間早くした。

(結果) 対照群 6 羽のうち、骨癒合は 5 羽で、1 例に骨癒合が得られなかった。BAPN 2mg/kg 群は 9 例で、骨癒合は 4 羽のみであったが、骨癒合しなかった 5 羽中 4 羽に創外固定器の破損を認めた。以下の検討は骨癒合

した対照群と BAPN 2mg/kg 例について行った。

骨延長部全体の DXA による骨密度は対照群  $316.3 \pm 11.0 \text{mg/cm}^2$ 、BAPN 2mg 群  $285.4 \pm 16.3 \text{mg/cm}^2$  と後者でやや低かったが有意差はなかった。また、末梢骨用の QCT (pQCT: XCT Research SA+) を用いた骨延長中央部の骨密度は、骨髓腔も含めた断面骨全体の平均は対照群  $550 \pm 36.7 \text{mg/cm}^3$ 、BAPN 2mg 群  $510.5 \pm 44.1 \text{mg/cm}^3$  と有意差はなかったが後者でやや小さかった。これを骨髓腔を含まない石灰化領域のみに限るとそれぞれ  $572 \pm 9 \text{mg/cm}^3$ 、 $553 \pm 17 \text{mg/cm}^3$  となり、やはり有意差はないが後者でやや低い傾向にあった。さらに、石灰化が成熟した皮質骨領域のみの面積はそれぞれ  $10.41 \pm 0.8 \text{mm}^2$ 、 $7.90 \pm 2.7 \text{mm}^2$  と後者で小さい傾向にあった。

一方、三点曲げによる骨強度試験 (速度  $2 \text{mm/min}$ 、支点間距離  $20 \text{mm}$ ) では、最大点荷重 (N) : 対照群  $153.4 \pm 21.0$ 、BAPN 2mg 群  $138.5 \pm 26.6$   
最大点伸び (mm) : 対照群  $1.82 \pm 0.64$ 、BAPN 2mg 群  $2.64 \pm 0.68$   
最大点応力 ( $\text{N/mm}^2$ ) : 対照群  $2.40 \pm 0.30$ 、BAPN 2mg 群  $2.21 \pm 0.49$   
最大点歪み (%) : 対照群  $38.0 \pm 14.1$ 、BAPN 2mg 群  $48.9 \pm 13.6$

エネルギー ( $\text{N} \cdot \text{mm}$ ) : 対照群  $294.2 \pm 90.4$ 、BAPN 2mg 群  $266.8 \pm 38.0$  であり、両群に有意差はなかったが後者で力学的パラメータ全体に劣る傾向にあった。

(考察) BAPN 2mg 群は今回も 9 羽中 5 羽 (55.6%) で骨癒合が得られなかった。その大部分で創外固定器の破損がみられた。骨癒合しなかったために創外固定器が破損したのか、創外固定器が破損したために骨癒合しなかったのかは不明であり、統計学的にも癒合率に有意差はなかったが、前回の実験で

BAPN 1mg 群では全羽骨癒合していることから BAPN 2mg の影響が推察される。また、今回実験数の関係で統計的に有意差はなかったが、BAPN 2mg 群は対照群よりも石灰化領域の骨密度が低く、皮質骨面積も小さいことから BAPN 投与により骨形成の成熟が障害されることが示唆された。

### 3) BAPN 2mg/kg、週 6 回投与、骨延長 2 週間、延長終了 1 週間後の評価実験

今回の実験では BAPN 投与を週 6 回のまま評価時期をさらに 2 週間早くした。

(結果)

対照群 3 羽と BAPN 2mg 群 5 羽の全例骨癒合が得られていなかった。そこで評価は末梢骨用の QCT のみを用いた。骨延長中央部の骨密度は、骨髓腔も含めた断面骨全体の平均は対照群  $415.8 \pm 73.8 \text{mg/cm}^3$ 、BAPN 2mg 群  $415.6 \pm 101.3 \text{mg/cm}^3$  であり、石灰化領域に限ってもそれぞれ  $449.9 \pm 41.9 \text{mg/cm}^3$ 、 $455.1 \pm 60.5 \text{mg/cm}^3$  と、両群間に有意差はなかった。しかし、全石灰化面積から皮質骨面積を除いた比較的低い石灰化領域はそれぞれ  $15.5 \pm 6.9 \text{mm}^2$ 、 $29.6 \pm 19.5 \text{mm}^2$  と有意差はなかったが後者で大きい傾向にあった ( $p=0.10$ )。

(考察)

今回、BAPN 投与終了から評価までの期間が長いほど BAPN の影響が出にくいことも考えられるため、延長終了 1 週後に評価した。しかし、臨床的骨癒合までに十分な時間ではなく、対照群も骨癒合がみられなかった。骨延長中央部の骨密度にも有意差はみられなかった。しかし、BAPN 2mg 群では石灰化度が未熟な領域が多い傾向にあり、骨代謝回転が遅延しているのか、何らかの力学的な代償機構なのか現時点では不明であり今後解明する必要がある。

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 6 件)

- ① 丸野 秀人、市村 正一、大畑 徹也、  
内倉 長造、里見 和彦：ウサギ骨延長  
モデルにおけるPTH間欠投与の仮骨への  
影響 (第2報)。  
第23回日本整形外科学会基礎学術集会、  
2008年10月24日、京都
- ② H. Maruno, S. Ichimura, T. Oohata,  
C. Uchikura, K. Satomi : Effects of  
Intermittent Administration of  
Parathyroid Hormone (1-34hPTH) on  
Distraction Osteogenesis in Rabbits.  
Meet. of Am. Soc. for Bone and Miner. Res  
(Targeting Bone Remodeling for the  
Treatment of Osteoporosis) ,  
Dec. 6-7, 2007, Washington, DC, USA
- ③ 丸野 秀人、市村 正一、大畑 徹也、  
内倉 長造、里見 和彦：ウサギ骨延長  
モデルにおけるPTH間欠投与の仮骨への  
影響。  
第22回日本整形外科学会基礎学術集会、  
2007年年10月26日、浜松市
- ④ H. Maruno, S. Ichimura, T. Oohata,  
C. Uchikura, K. Satomi : Effects of  
Intermittent Administration of  
Parathyroid Hormone (1-34 hPTH) on  
Distraction Osteogenesis in Rabbits.  
29th Ann. Meet. of Am. Soc. for Bone and  
Miner. Res, Sep. 17, 2007, Hawaii, USA
- ⑤ 丸野 秀人、市村 正一、大畑 徹也、  
内倉 長造、里見 和彦：PTH 間欠投  
与はウサギ骨延長モデルにおいて仮骨  
形成を促進する。

第25回日本骨代謝学会、2007年年7  
月21日、大阪市

- ⑥ 丸野秀人、市村正一、大畑徹也、里見  
和彦  
ウサギ骨延長モデルにおけるPTH間欠投  
与の仮骨への影響 (第一報)  
第8回日本骨粗鬆症学会：東京 2006年  
10月12日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市村正一 (ICHIMURA SHOICHI)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：00159849

(2) 研究分担者

丸野秀人 (MARUNO HIDETO)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：70398600

(3) 連携研究者