

術前放射線照射が延長仮骨形成に及ぼす影響について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4533

術前放射線照射が延長仮骨形成におよぼす影響について

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能再建学
(旧講座名：整形外科学)
(主任：富田勝郎教授)

上原 健治

近年骨延長術という治療法が確立され広く行われている。しかし、放射線照射後の延長仮骨形成障害についてはよく知られていない。本研究では術前放射線照射が延長仮骨形成に与える影響について検討を行った。日本白色家兎の下腿内側よりX線15 Gyを一回照射した後に片側型創外固定器を設置し骨幹部で骨切りを行った。7日間の待機期間の後に1日0.5 mmの速度で4週間、計14 mmの延長を行った。毎週撮影した単純レントゲン、延長終了時と延長終了後4週で屠殺して得た組織標本、および微小血管造影を用いて検討を行った。組織標本はHE染色と血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) に対する免疫組織染色を行い観察した。単純レントゲン像では延長中に仮骨形成はほとんど見られなかった。成熟期になり仮骨は徐々に出現し始めたが、その形態は通常見られる3層構造ではなく、散在性の骨化巣であった。また、延長終了4週でも仮骨の成熟は見られなかった。組織標本では、延長終了時の延長部は非常に疎な組織で構成されており、一部に線維組織の延長方向への配列を認めた。延長終了4週時の標本では単純レントゲン上透亮像であった部分は軟骨組織が大半を占めており散在性の内軟骨性骨化を認めた。免疫組織染色標本では、延長部の血管は非常に限局していた。また、骨芽細胞によるVEGFの強い発現を認めた。微小血管造影においても延長部の血管分布は非常に疎であった。以上の成績から術前の15 Gy照射により延長仮骨形成はその速度のみならず、形態までも障害されることが明らかになった。照射後早期に骨前駆細胞のほとんどが損傷を受けるが、後に散在性の内軟骨性骨化巣が出現することから、これらの一部は軟骨芽細胞に分化、増殖すると考えられた。骨芽細胞でのVEGFの強い発現と内軟骨性骨化は局所の低酸素状態を示唆するとされており、微小血管造影の低血管形成もこれを支持すると考えた。以上より、放射線照射後早期の骨延長における仮骨形成障害は、骨前駆細胞の障害だけではなく血管新生障害が関与していることが示唆された。したがって、臨床的には延長部への骨前駆細胞の導入を行い、さらに血管新生を促進することができれば放射線照射後の骨延長が可能になると考えた。

Key words irradiation, distraction osteogenesis, endochondral ossification, angiogenesis

近年、骨延長術という治療方法が確立され広く行われるようになった。これにより脚短縮、変形、偽関節、骨髄炎など従来まで困難であった治療の多くが可能になった^{1)~4)}。また最近では骨腫瘍切除後に生じる骨欠損の再建にも使われるようになってきている⁵⁾⁶⁾。骨延長術の最大の利点は、生きている骨を再生することができ、その骨はある程度の時間が経てば生体にとって元どおりの十分な容量と強度を獲得できることである。この点において、骨腫瘍切除後に腫瘍用人工関節や、骨移植で再建する方法よりも耐久性や機能において優れた方法であるといえる^{7)~9)}。ただし、骨腫瘍の治療過程において、手術前に放射線治療が併用されることがある。また、悪性リンパ腫、白血病などの小児癌に対しての放射線治療が骨端線を障害した場合に脚長差が生じることがあり、これに対して治療を行う機会がある¹⁰⁾¹¹⁾。放射線照射を受けた骨における骨形成能や骨折時の仮骨形成能は著しく低下していることが知られている。従って骨腫瘍の補助療法に放射線照射が施行された場合は、仮骨が形成されない可能性が大きいため骨延長術による再建は行われてい

ない。しかし、放射線照射による延長仮骨形成障害を克服できれば照射後も骨延長による再建が可能になる。近年、延長仮骨形成を促進させるべく様々な研究がなされ、成果も報告されている^{12)~14)}。放射線照射による延長仮骨形成障害の機構、原因を解明することにより放射線照射後も良好な延長仮骨が形成される方法を見いだすことにつながると考えて検討を行った。

材料および方法

I. 放射線照射後骨延長の動物実験モデルの作成

1. 実験動物及び放射線照射方法

実験動物には体重約3.0 kgの成熟雄性日本白色家兎を用いた。塩酸ケタミン (三共, 東京) 150 mgを筋肉内投与し鎮静化させた後、ペントバルビタール (大日本製薬, 東京) 100 mgによる静脈麻酔を行った。麻酔後、家兎を固定台上に右側臥位とし左下肢を伸展させ、右下腿内側が上方を向くように固定した。小動物用X線照射装置 (MBR-1520, 日立メディコ, 東京) 内で照射門より25 cmの距離で下腿内側中央が照射門の直下になる

平成14年5月20日受付, 平成14年6月28日受理

Abbreviations: ROI, region of interest, VEGF, vascular endothelial growth factor

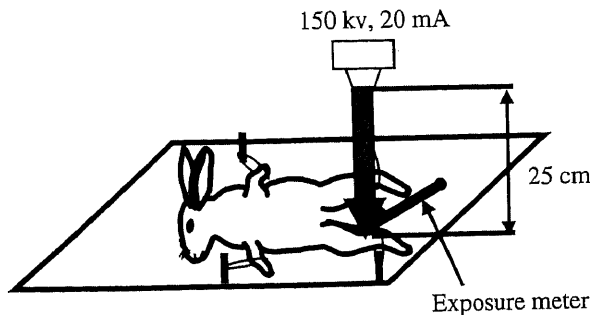


Fig. 1. Schema of preoperative irradiation. The irradiation was applied in a medial-to-lateral direction to the right leg at a focus-skin distance of 25 cm.

ように固定台を置き、下腿中央後方に照射装置付属のプロープ型線量計を設置した(図1)。20 mA, 150 kVの出力でX線を照射した。線量計での計測が以下の3群の予定線量に達した時点で照射を終了した。右下腿以外は厚さ0.5 mmの鉛板で遮蔽を行い全身への照射を防御した。放射線照射群を3群に分け、それぞれ10, 15, 20 Gyの一回照射を行った。

2. 創外固定器の設置と延長方法

放射線照射後上述の静脈麻酔を継続した状態で直ちに手術を行った。手術はTsubotaら¹⁴⁾の方法に準じて行った。イソジン液(明治製薬, 東京)にて右下肢を消毒し、術野以外は滅菌覆布で被覆した。下腿前内側中央に5 cmの皮切を行い前脛骨筋と長趾屈筋の間より脛骨に達した。骨膜は5 cm縦切し筋の裏側に付着させた状態で脛骨より全周性に剥離した。下腿長軸方向の中央部で脛骨と腓骨が癒合する部分を骨切り部に定め、その近位と遠位に直径2 mmのハーフピン(OR-HM65-5020, Jaquet Orthopedie S.A., Geneva, Switzerland)を2本ずつ平行に刺入し、当科で作製した延長機能を有する片側型創外固定器を装着した。骨切りは直径0.36 mmのスレッドワイヤーソー(越屋, 金沢)を用いて行った。ワイヤーによる摩擦熱が局所に損傷を与えないように生理食塩水で十分冷却しながら、愛護的な操作で行った。骨切り終了後カナマイシンスプレー(明治製薬, 東京)を噴霧し、5-0針付きナイロン糸(ケイセイ医科工業, 東京)を用いて前脛骨筋と長趾屈筋の間を骨膜が付着した状態で縫合し、皮膚は連続縫合を行った。術後手術側の免荷は行わず、ケージ内では自由に行動させた。術後7日の待機期間の後延長を開始した。延長方法は1日0.5 mmずつ28日間、計14 mmの延長を行った。放射線照射を行わず延長のみを行った群を対照群とした。

II. 検討方法

1. 単純レントゲン撮影

延長開始後から7日毎に標本採取にて屠殺するまで下腿正面像を撮影し、延長部の仮骨が形成され始める時期や形成の速度、およびその形態を観察した。10, 15, 20 Gyを一回照射した3群のうち、延長仮骨形成の形態が対照群に比べて最も異なる像を呈する照射群を選択し、以下の検討を行った。

2. 組織標本の作製

対照群と検討1で決定した15 Gy照射群ともに延長終了時および延長終了4週後に各5羽ずつ延長部の標本を採取した。塩酸ケタミン150 mgを筋肉内投与した後、ペントバルビタール

による静脈麻酔を行い、家兔を仰臥位に固定した。開腹の上、腹部大動脈と下大静脈を露出させ、大動脈の腎動脈分岐部より末梢で18G静脈留置針を末梢に向けて刺入し固定した後、下大静脈を切断し開放した。約38℃に加温したヘパリン加生理食塩水(生理食塩水100 mlに対しヘパリン1000単位添加)を用いて十分に灌流を行った。灌流開始後ペントバルビタールを100 mg投与し安楽死させた。開放した下大静脈から血液成分が流出しなくなったことを確認し、直ちに4%パラホルムアルデヒド0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)溶液を用いて灌流固定を行った。固定後直ちに右脛骨を摘出し、創外固定器とハーフピンを除去した後、更に2日間同液にて固定を行った。この標本を0.2 M EDTA液にて約4週間脱灰を行った。脱灰終了後、パラフィン包埋を行いマイクロトームにて冠状断で3 μmの切片を作製し、HE染色を行い光学顕微鏡下に観察した。延長終了4週後の標本はさらに、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)に対する免疫組織染色を行い光学顕微鏡下に観察した。免疫組織染色はパラフィン切片をキシレン-エタノール系列にて脱パラフィンした後、0.3%過酸化水素水により内因性ペルオキシダーゼ反応を阻害した。1%ウシ血清アルブミン(和光純薬工業)により非特異的反応を阻止した後、一次抗体であるマウス抗ヒトVEGFモノクローナル抗体(NeoMakers, Fremont, USA)を4℃の冷蔵室にて一晚反応させた後、二次抗体であるビオチン標識抗マウスIgG+IgA+IgM抗体(ニチレイ, 東京)を60分間室温で反応させ、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ(streptavidin-peroxidase)反応を30分間室温で行った。発色はジアミノベンジン(3,3'-diaminobenzidine)(和光純薬工業)溶液にて1~2分間反応させた。

3. 微小血管造影

微小血管造影は堀井¹⁵⁾の方法に準じて行った。対照群と検討1で決定した15 Gy照射群を延長終了4週後に各5羽ずつ使用した。造影剤には、粒子の径が1~2 μm以下と微細でかつ均一であり¹⁶⁾、微小なレベルまで充溢可能なマイクロフィル(Flow Tek, Carver, USA)の赤色を使用し、これに専用の希釈液を同量加えて、更に注入直前に硬化剤を少量添加したものをを用いた。検討2と同様の方法で家兔を開腹し灌流を行った。開放した下大静脈から血液成分が流出しなくなったことを確認し灌流を中止して、直ちに造影剤を注入した。下大静脈から造影剤が十分に流出した後、下大静脈の流出部をクランプしてさらに10 mlを注入して注入部もクランプして終了した。約5時間室温で放置して造影剤が硬化したことを確認した後右下腿骨を摘出し付着する軟部組織を完全に除去した。この下腿骨を10%ホルマリンにて2日間浸漬して固定し、プランクリュクロ液で約4週間脱灰の後Spalteholz法を用いて透明標本とした。Spalteholz法も堀井の方法に準じ、50%から100%の希釈系列のアルコールで各々一昼夜ずつ脱水した後、ベンゼンにて2日、次いでベンゼンと安息香酸ベンジルを同量ずつ混合した溶液にて2日以上浸漬し、骨組織の透明化が起こった状態で観察した。

4. 延長部の血管占拠率の測定

微小血管造影法で得られた透明標本を医用フィルム観察器の光を透過させて、デジタルカメラ(DSC-F55V, SONY, 東京)による撮影を行った。この画像を画像処理装置(Macintosh, Adobe Photoshop 3.0J)にて造影剤の赤色以外の色相を除外した。さらに、画像解析装置(Macintosh, NIH Image 1.61)を用

いて関心領域 (region of interest, ROI) 内の赤色部分の占拠率を測定した。ROIは延長中央部、延長部近位端および遠位端のそれぞれ内側、外側、中央部の計9カ所に設定しこれらにおける占拠率の平均値を求め、対照群と15 Gy照射群に分けて平均占拠率±標準偏差を求めた。両群間の比較検定はt検定 (Macintosh, Statview J 4.5) を用い、 $p < 0.01$ を有意とした。

成 績

I. 単純レントゲン撮影

対照群は、延長2週頃より骨切り部に接して仮骨が出現し始めた。延長4週では延長中央部から骨切り断端にむかい骨透亮帯、骨硬化帯、管腔形成帯の3層構造を認め、以後、骨透亮像の幅が狭くなり、成熟した部分の拡大を認めた。延長終了4週

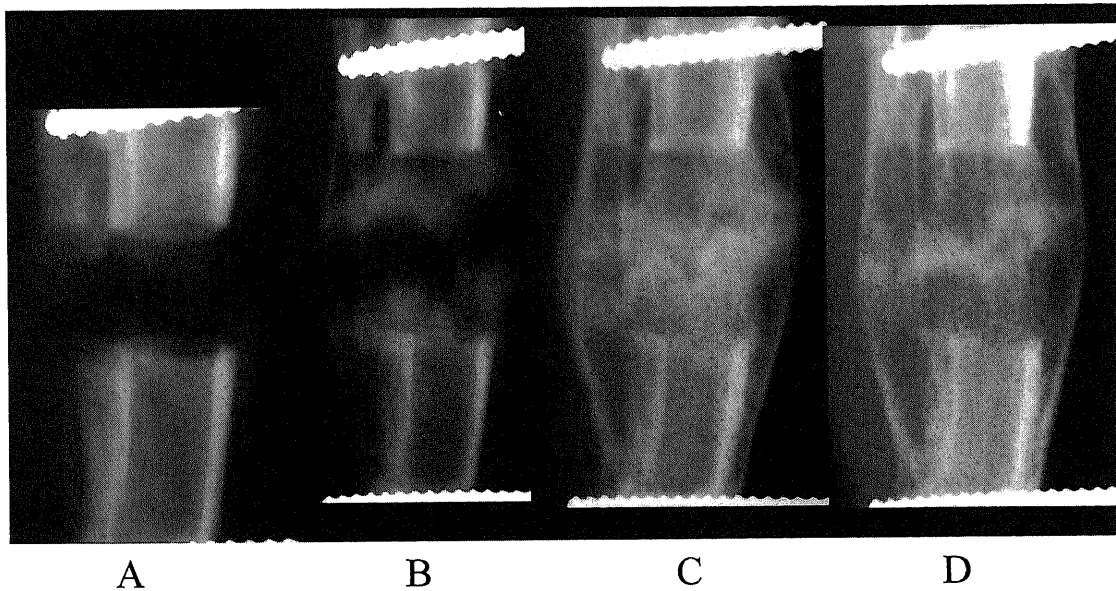


Fig. 2. Radiographs of tibiae from control group. (A) After 14 days of distraction. (B) After 28 days of distraction. (C) 14 days after completion of distraction. (D) 28 days after completion of distraction. The distracted callus was observed early on during distraction with three distinct zones.

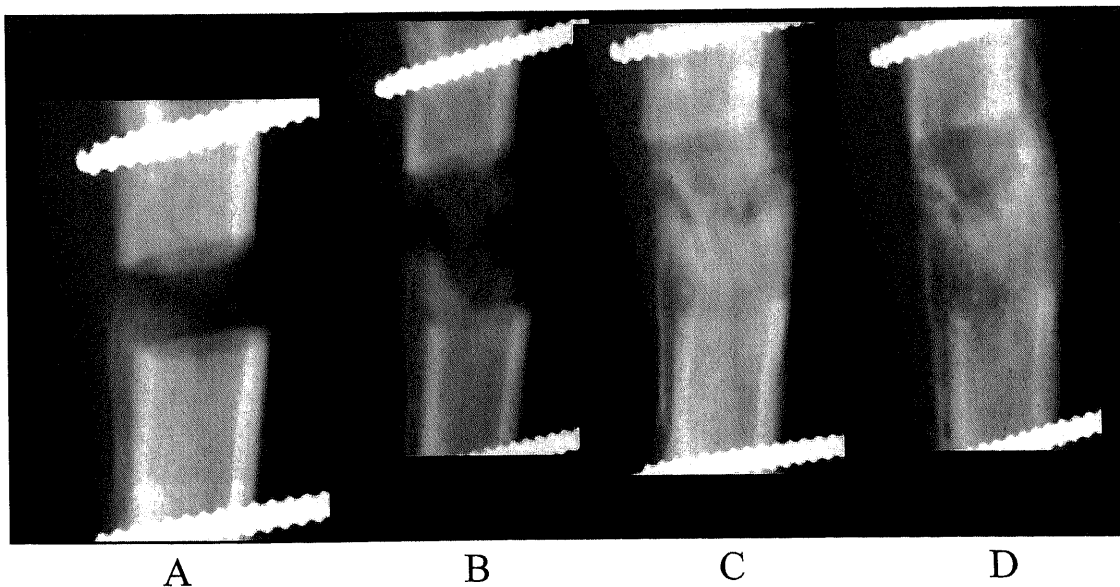


Fig. 3. Radiographs of tibiae from 10 Gy irradiation group. (A) After 14 days of distraction. (B) After 28 days of distraction. (C) 14 days after completion of distraction. (D) 28 days after completion of distraction. The distracted callus formation of 10 Gy group was similar to that of control group.

で仮骨はほぼ成熟し、皮質骨化も明瞭になった(図2)。放射線照射群において、10 Gy照射群は全経過を通じて対照群と著変のない経時的变化であった(図3)。15 Gy照射群では延長4週までに仮骨はほとんど認められず延長部は透亮像のままであった。延長終了後の成熟期間になり散在性に骨化巣が出現し始めたが、これらに規則性は認められず、個体間でその部位、数、大きさにばらつきがあった。散在性の骨化巣は次第に大きく成熟するが、延長終了4週の時点においても、透亮像は残存していた(図4)。20 Gy照射群では全過程を通じて仮骨の形成を認

めなかった(図5)。以上の結果を踏まえて、15 Gy照射群を本実験の照射群とした。

II. 延長部の組織学的観察

対照群の延長終了時ではレントゲンでの透亮帯は線維組織が延長方向に平行な配列をなしており、硬化帯との境界部では膜性骨化を認めた(図6)。硬化帯は密な骨梁が形成されていた。これらは骨切り断端に向かうに従い吸収され、皮質骨へと再構築され管腔を形成し始めていた。延長終了4週では延長中央部の膜性骨化部は認められず、骨梁形成部も狭小化した管腔形成

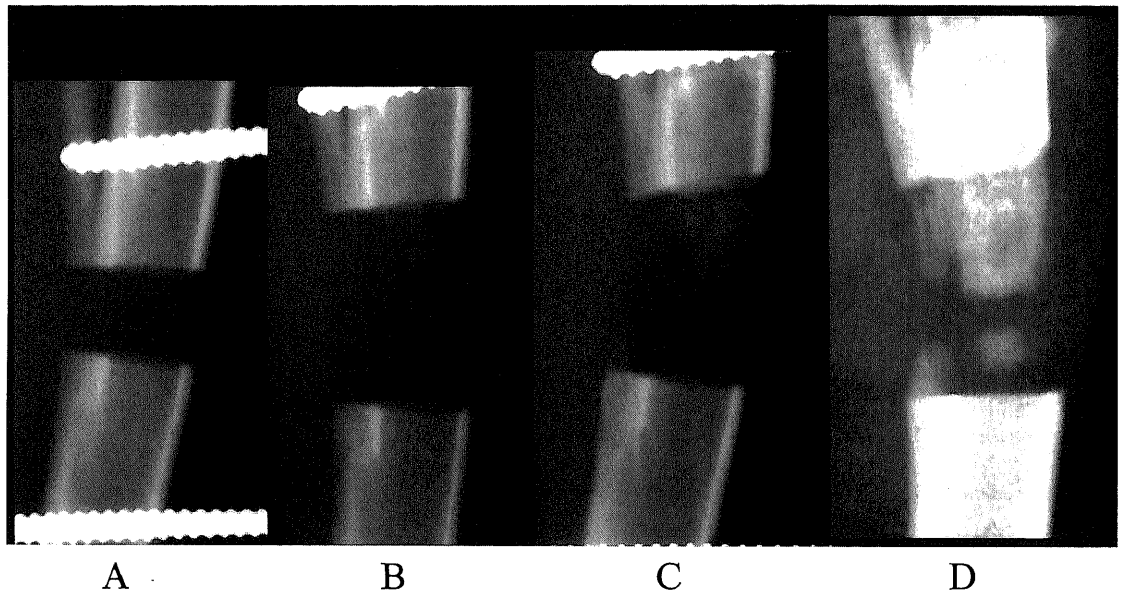


Fig. 4. Radiographs of tibiae from 15 Gy irradiation group. (A) After 14 days of distraction. (B) After 28 days of distraction. (C) 14 days after completion of distraction. (D) 28 days after completion of distraction. The callus appeared very slowly during maturation phase, and it showed spotty formation. The regeneration was not completed until the 28th days of the maturation period.

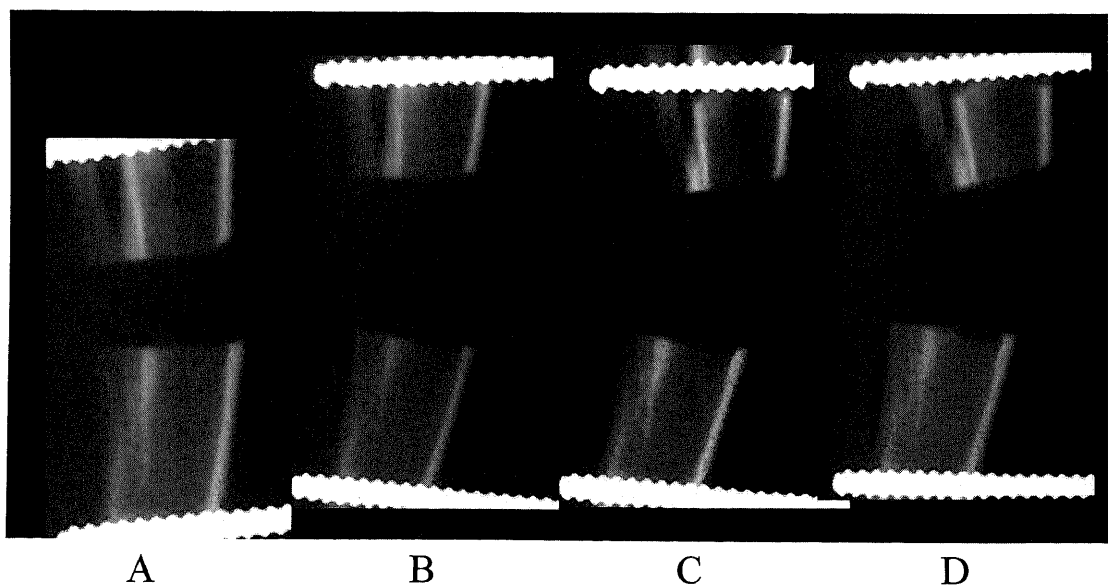


Fig. 5. Radiographs of tibiae from 20 Gy irradiation group. (A) After 14 days of distraction. (B) After 28 days of distraction. (C) 14 days after completion of distraction. (D) 28 days after completion of distraction. The radiographs showed little regeneration until the 28 days after completion of distraction.

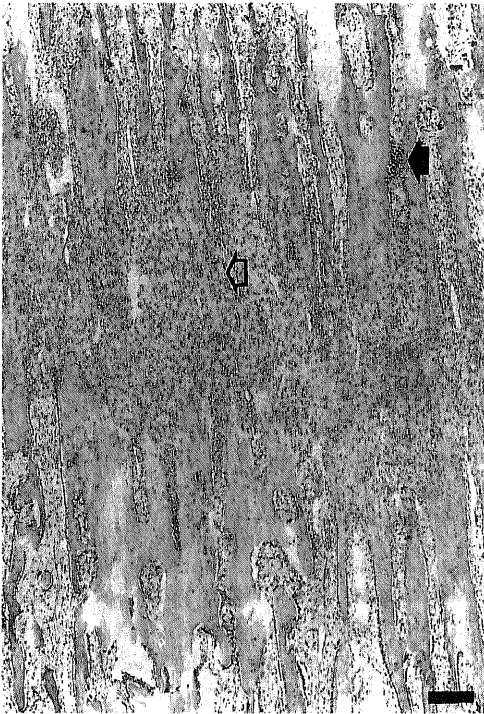


Fig. 6. Longitudinal section from control group after 28 days of distraction. In the radiolucent zone, parallel collagen bundles were arranged longitudinally (\longleftrightarrow). At the adjacent sclerotic zone, the callus formed by intramembranous ossification (\blackleftarrow). HE. Scale bar indicates 200 μ m.

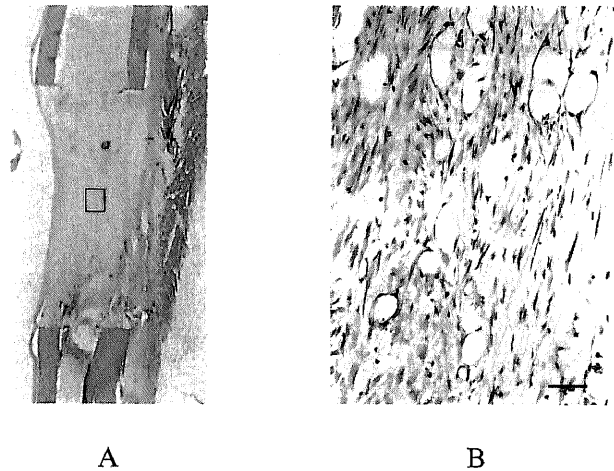


Fig. 8. Longitudinal section from 15 Gy irradiation group after 28 days of distraction. (A) Total longitudinal section. (B) Close-up of the boxed area in (A). The gap in the distraction was consisting of loose connective tissue with a part of the fibrous tissue oriented longitudinally. HE. Scale bar indicates 50 μ m (B).

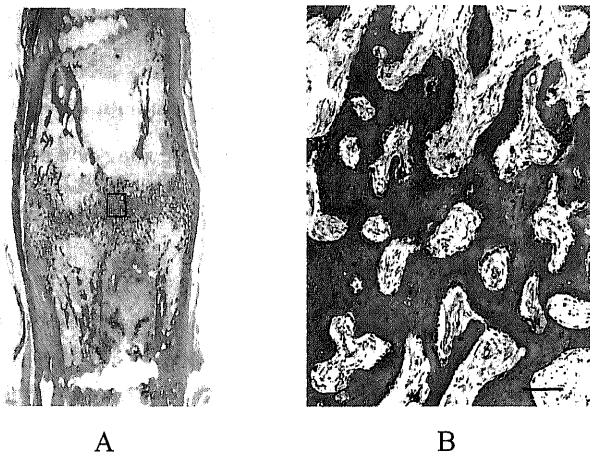


Fig. 7. Longitudinal section from control group 28 days after completion of distraction. (A) Total longitudinal section. (B) Close-up of the boxed area in (A). Histological examination showed a mature trabecular network and neocorticalization. HE. Scale bar indicates 100 μ m.

の完成に近い像を認めた(図7)。照射群の延長終了時では延長部は非常に疎な細胞成分の乏しい組織で構成されており、線維組織の延長方向への配列を一部に認めた(図8)。延長終了後4週ではレントゲン上透亮像であった部分は軟骨組織が大半を占めており、延長方向に平行な線維組織は一部に認めるのみであった(図9)。散在性に観察された骨化巣の骨形成はほとんどが内軟骨性骨化によるものであり、膜性骨化はごく一部に認める

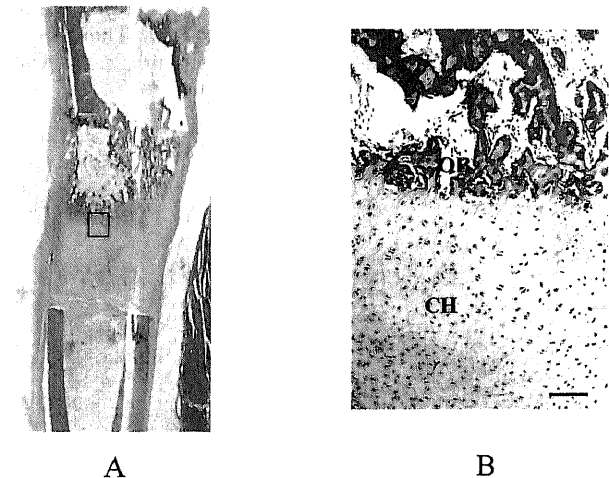


Fig. 9. Longitudinal section from 15 Gy irradiation group 28 days after completion of distraction. (A) Total longitudinal section. (B) Close-up of the boxed area in (A). The major part of the radiolucent region consisted of cartilage. The spotty osteogenesis was identified as endochondral ossification. OB: osteoblasts; CH: chondrocytes. HE. Scale bar indicates 100 μ m (B).

のみであった。

Ⅲ. 延長部の免疫組織学的観察

抗VEGF抗体を用いた免疫染色において延長終了4週の対照群では延長部全体にわたって染色された血管内皮細胞とそれが形成する血管の分布を認めた。また、延長中央部に残存する骨梁の表面には骨芽細胞が染色されていた(図10)。照射群においては血管の存在が限局しており、軟骨組織はほとんどが無血管領域であった。骨化巣では骨梁の表面での骨芽細胞の染色が認められ、内軟骨性骨化の軟骨-骨移行部での骨芽細胞の染色性が特に強かった(図11)。

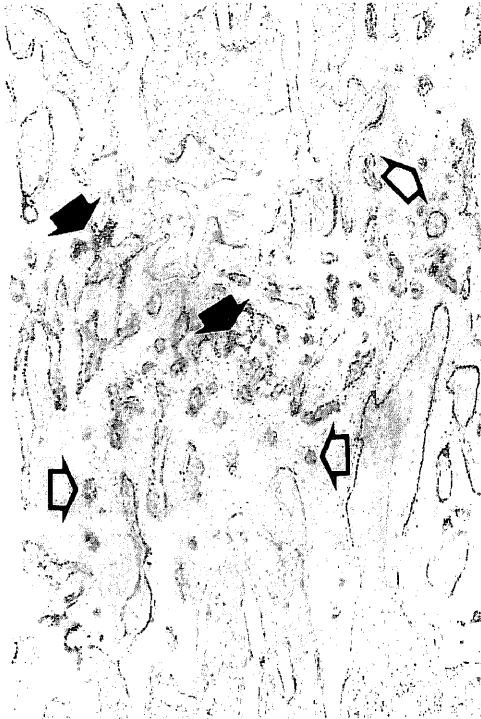


Fig. 10. Immunohistochemical staining of VEGF of the control group 28 days after completion of distraction. There were diffuse vascularization with positive staining (⇔). The osteoblasts at the trabecula were positive, too (←).

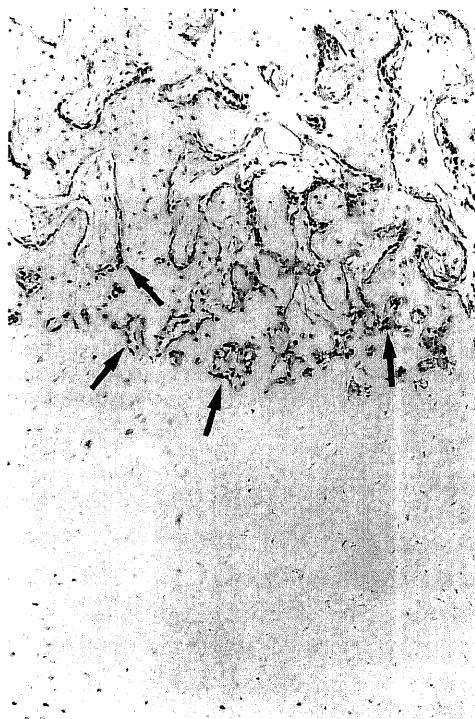


Fig.11. Immunohistochemical staining of VEGF of 15 Gy irradiation group 28 days after completion of distraction. The vascularization was very localized, and that presence of VEGF in the osteoblasts was stronger than of the control group (arrows).

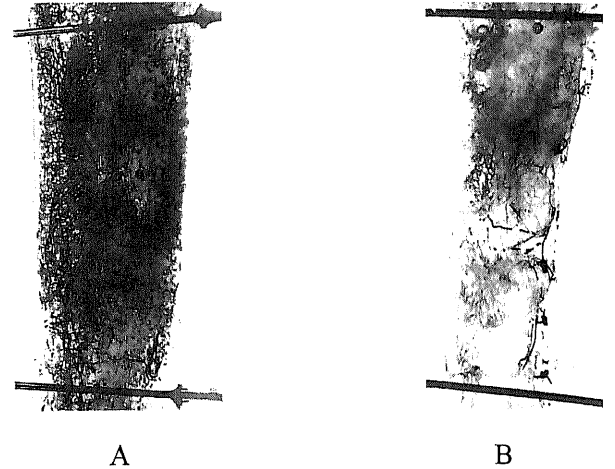


Fig. 12. Microangiograms of the distracted site. (A) Control group. (B) 15 Gy irradiation group. Control group showed diffuse and dense vascular network. But vascularization of irradiated group was very thin.

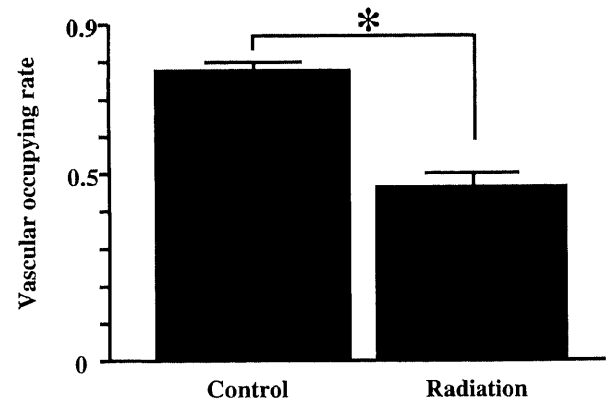


Fig. 13. The average of the vascular occupying rate at the distracted site. Values are expressed $\bar{X} \pm SD$. $p < 0.001$

Ⅳ. 微小血管造影

延長終了4週後の微小血管造影後の透明標本の観察では、対照群において、延長部全体、およびその近位、遠位共に均一かつ緊密な血管網を認めた(図12A)。これに対して照射群では、血管の分布は全体的に非常に疎であり、一部密な血管網を認めた(図12B)。延長部より近位、遠位においても血管の分布は非常に疎であった。

Ⅴ. 微小血管造影による延長部の血管占拠率の測定

延長部内9カ所のROIでの血管占拠率の平均値は、対照群が77.3 ± 3.5%，照射群が46.1 ± 9.7%であった。照射群において有意に血管占拠率が少なく(p<0.001)、血管新生が障害されることがわかった(図13)。

考 察

創外固定器を用いて骨を形成しながら伸ばしていくという骨延長術は1950年代に旧ソビエト連邦のIlizarov¹⁷⁾により考案された方法である。この方法は骨移植など他の部位からの補填を行うことなく、延長部に生きている骨を再生できることが最大

の利点である。また、骨のみではなく、延長に伴い周囲の皮膚や血管、神経などの軟部組織も再生されることも大きな利点である。1980年代になりこの方法が西側諸国に紹介されて以来、脚短縮、変形、偽関節、骨髄炎など、様々な疾患に対して応用されるようになった¹¹⁻⁹⁾。当講座の土屋ら⁵⁰⁾は、これら骨延長術の利点が従来の人工関節や骨移植術を用いた腫瘍再建術における機能、強度および耐久性などの問題点⁷⁻⁹⁾を解決できるとして、四肢の骨腫瘍切除後骨欠損の再建に骨延長法を応用し良好な成績を報告している。しかし、すべての再建に骨延長術が応用できるわけではなく、骨形成を障害するといわれている放射線を照射した場合は、延長仮骨が形成されない可能性が大きい。そのため、延長術は行われていない。放射線感受性のある腫瘍に対し補助療法として術前あるいは術中に放射線照射を行い、さらに骨延長術で再建を行えるようになれば機能温存術の適応はさらに広がるといえる。このほかにも悪性リンパ腫、白血病などの小児癌に対する放射線治療では骨端線が障害されることがあり、後に生ずる脚長差の治療が問題となる^{100,11)}。従来までは補高装置などの保存療法以外は、正常側の成長抑制や短縮が主たる治療法であったが、放射線照射後の骨延長が可能になれば正常側を犠牲にする必要がなくなる。

放射線照射後の骨形成に関しては骨折や骨欠損の治療に関する研究が多くなされており¹⁸⁰⁻²⁰⁰⁾、概ね仮骨形成及びその成熟遅延が報告されている。この結果から放射線照射により延長仮骨形成が障害されることは予想できるが、実際は放射線照射後の骨延長に関する報告はGantousら²¹¹⁾のものがあるのみである。彼らは犬の下顎に50 Gyを20回に分割して照射した。その6か月後に骨延長を行い5例中4例に良好な仮骨形成が得られたと述べている。しかし、Takahashiら²⁰⁰⁾は照射から骨傷までの期間が骨癒合に大きく影響すると報告しており、照射後6か月あけて延長を行っている彼らの方法は放射線照射と近い時期に行う腫瘍再建術のモデルには実用的ではないと考える。また、詳細な組織学的検討はなされておらず放射線照射の影響は考察されていない。

従って放射線照射後の骨延長に関してはほとんど解明されていないのが現状であることから、放射線照射後の骨延長を可能にするためにはまず、放射線照射後の骨延長モデルを作製し、その障害の状態、原因に関する基礎的実験を行い、検討することが必要であると考えた。

放射線照射による組織損傷の機構はDNA損傷による細胞死であり²²⁾、修復や発達過程にある組織は感受性が高い。したがって、骨折や骨延長に関与する骨芽細胞や骨前駆細胞は容易に損傷を受け仮骨形成が障害されると考えられる。しかし、放射線照射が骨癒合に及ぼす影響に関する報告は数多くなされているが、放射線照射の時期、照射量、照射回数、評価方法も一定していないため、その結果も様々であった。これらの多くは骨延長モデルには適用が困難なものであった。Arnoldら¹⁸⁰⁾は10, 15, 19, 22 Gyの一回照射を行い、24時間後に骨孔を作製してその治癒過程について検討するという簡素な方法を行っていた。その結果は10 Gy照射群では治癒初期の遅延はあるものの最終像に差はなく、15 Gy照射群では初期の治癒過程に加えその後の仮骨形成にも著明な遅延を認め、19, 22 Gy照射群では欠損部の治癒は認められなかったとしている。この結果を参考にして本実験では10, 15, 20 Gyの一回照射を行うことに決定した。

骨延長の方法に関して、Ilizarov²³⁾は待機期間7～10日の後1日1 mmの速度が至適と述べ、Liら²⁴⁾は1日0.7 mmが最適であり0.3 mmでは骨切り部の早期癒合が生じる可能性があるとして報告している。本実験では放射線を照射することにより延長仮骨の形成が障害されると予測されたため、至適範囲といわれる速度よりさらに遅い延長速度を選択した。この延長方法で対照群の早期癒合は見られなかったことから、本実験に適した条件であると考えた。

異なる照射量のうち詳細を検討する上で最も適した照射群を決定するために、単純レントゲンにて経時的な検討を行った。10 Gy照射群では延長仮骨形成の遅延は認められず、20 Gy照射群は延長仮骨が全く形成されなかった。これは、先述のArnoldら¹⁸⁰⁾の報告に矛盾しない結果であった。これに対して15 Gy照射群は延長仮骨の出現が非常に遅延し、さらにその形成、成熟の形態が対照群と全く異なり、規則性が認められなかった。このことから照射により延長仮骨形成が正常とは異なる過程を経ていると考え、15 Gy照射群を検討の対象に決定した。

組織学的検討では対照群は単純レントゲン所見と同様で諸家が報告している通り、延長中央部から骨切り端に向けて膜性骨化が徐々に成熟していく状態が観察された²⁵⁾²⁶⁾。これに対して照射群では、延長終了時になっても非常に疎な組織が延長部を占拠しているのみで、膜性骨化に見られる密な線維組織の配列は見られなかった。しかし延長終了後に仮骨が形成されたことから、照射後早期に骨前駆細胞は障害され、その増殖と骨芽細胞への分化が著しく阻害されたが、時間の経過と共にそれらは少しずつ修復されたと考えた。また、照射群での散在性の内軟骨性骨化は、対照群のように延長と共に徐々に仮骨が形成される連続した過程を経るのではなく、仮骨形成が生じないままに延長が終了し、その領域に骨前駆細胞が修復され誘導されたところから徐々に骨化が始まるためであると考えた。延長仮骨が内軟骨性骨化を経る要因として、ウサギの種の性質²⁷⁾²⁸⁾、延長部の不安定性²⁵⁾²⁹⁾以外に局所の低酸素状態²⁴⁾³⁰⁾が報告されている。また、Shawら³¹⁾は骨前駆細胞は低酸素状態では骨ではなく軟骨に分化すると報告している。本実験では対照群において内軟骨性骨化はほとんど見られなかったことより、前二者の要因は除外できると考えた。また、Takahashiら³²⁾は放射線照射後の骨癒合障害に既存の血管と血管新生の障害による局所の虚血が関与すると述べており、これは局所の低酸素状態が要因であることを支持するものと考えた。

VEGFは血管内皮細胞に特異的なサイトカインであり、この細胞に有糸分裂や遊走を働きかけ、さらに血管新生を誘導することが報告されている³³⁾。従って抗VEGF抗体を用いた免疫染色にて陽性であった血管内皮は延長部に新生された血管内皮であると判断することができる。また、Steinbrechら³⁴⁾は低酸素状態で骨芽細胞はVEGFを産生し血管新生を誘導することを報告している。本実験の照射群ではVEGF陽性の血管が対照群に比し少なく、軟骨-骨移行部において骨芽細胞内に強くVEGFが染色されたことから、延長部の血管新生が抑制され、低酸素状態が生じていることを支持できると考えた。さらに、Steinbrechら³⁴⁾は低酸素状態において骨芽細胞の分化は促進されるが、増殖は抑制されるとも述べている。従って本実験においても延長部の低酸素状態により骨芽細胞増殖は抑制され、仮骨形成がさらに遅延したと考えた。

本実験では粒子の直径が1～2 μm以下と極めて微細でかつ

均一であり¹⁶⁾、毛細血管までの造影が可能なマイクロフィルムを使用して微小血管造影を行った。Choiら³⁵⁾は血管鑄型法にて延長部の血管新生を三次元的に観察し、延長終了後の細かく密な血管網を示した。本実験の対照群も同様の像が得られ、延長部のみならずその近位、遠位共に非常に細かく密な血管分布を認めた。これに対し、照射群の血管分布は疎であり、細かい血管網は認められず、不規則な走行を認めた。また、両群間の血管占拠率も照射群で有意に少なく、血管新生が明らかに阻害されていた。Ilizarov²⁹⁾は骨延長により血管新生が促進され血流が増加することを報告した。また、Aronson³⁶⁾は血流の変化を経時的に検討し、骨切り後2週では非手術側の10倍に増加し、延長中は4~5倍を推移して、延長終了後は仮骨成熟まで2~3倍を維持すると述べた。Lira³⁷⁾も組織学的に血管内皮細胞の増殖を検討し、これらを支持する報告をしている。従って照射により骨前駆細胞同様に血管芽細胞やその前駆細胞も障害を受け、本来最も血管新生が促進される延長期にその分化増殖能が著しく抑制されていると考えた。

15 Gy照射による延長仮骨形成障害の原因が単に骨前駆細胞の障害とその分化増殖の遅延であるならば、その成績は対照群の仮骨形成の形態を時間的に遅延させたものであったはずである。しかし、本実験では骨前駆細胞が修復される前に延長が終了してしまったため、通常の連続した仮骨形成過程が起こらず不規則な形成が生じたと考えた。また、仮骨の形成、成熟過程は血管分布が少なく内軟骨性骨化であることから、放射線照射による血管新生障害とそれに伴う局所の虚血が仮骨成熟過程に大きく影響していると考えた。以上より延長早期に延長部に骨髓幹細胞が注入などの方法により誘導されれば延長に伴い仮骨が形成され始める可能性が示唆された。また、虚血性疾患に対するVEGFを用いた遺伝子治療が報告されており³⁸⁾、これが応用できれば延長部の血管新生を促進することができ、仮骨形成の促進が期待できると考えた。

結 論

放射線照射後の延長仮骨形成障害の機序を明らかにする目的で、日本白色家兎を用いて15 Gy照射後延長モデルを作製した。本実験モデルの延長部を単純レントゲン、組織標本、微小血管造影にて検討し、以下の結論を得た。

1. 照射群では対照群に比し、延長仮骨の出現が著しく遅延した。延長終了時には仮骨形成は全く見られず、非常に疎な組織を認めるのみであることから、骨芽細胞や、骨前駆細胞が分化、増殖できない状態にあることが明らかになった。
2. 延長終了後仮骨形成が認められるようになるが、その様式は対照群のように規則性は認められず、延長部内に散在性の骨化巣として認められた。また、その骨化巣では膜性骨化はほとんど認めず内軟骨性骨化であった。以上より、骨前駆細胞の分化、増殖能は時間の経過と共に修復されるが、その分化は骨ではなく軟骨に誘導されることが明らかになった。
3. 抗VEGF抗体を用いた免疫染色では、延長終了4週の延長部の血管は照射群で対照群に比べて少なく、限局していた。また、照射群の骨芽細胞は対照群に比べVEGFの強い染色性を認めた。
4. 延長終了4週時の微小血管造影において、対照群の血管分布は非常に細かく密であった。これに対して、照射群の血管分布は非常に疎で、その径も大小不同であり、血管新生は著し

く障害されていた。

以上の成績から、術前の放射線照射により骨芽細胞やその前駆細胞が障害を受け、骨新生が遅延するだけでなく、血管新生の障害が仮骨形成の過程に大きく影響を及ぼすと結論した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能再生学講座機能再建学富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接の御指導を賜りました同講座土屋弘行助教授に心より感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は、第14回日本創外固定・骨延長学会(東京, 2001), 2nd International Meeting of The A.S.A.M.I. (Rome, 2001), 第16回日本整形外科学会基礎学術集会(広島, 2001)において発表した。

文 献

- 1) Paly D, Herzenberg JE, Tetsworth K, McKie J, Bhav A. Deformity planning for frontal and sagittal plane corrective osteotomies. *Orthop Clin North Am* 25: 425-465, 1994
- 2) Uehara K, Tsuchiya H, Kabata T, Sakurakichi K, Shimozaki E, Tomita K. Ankle arthrodesis and tibial lengthening for congenital sensory neuropathy with anhidrosis. *J Ortop Sci* 6: 430-434, 2001
- 3) 上原健治, 土屋弘行, 森永敏生, 加畑多文, 櫻吉啓介, 富田勝郎. 下肢変形短縮に対するイリザロフ創外固定器を用いた変形矯正延長術の治療成績. *整災外* 43: 737-744, 2000
- 4) 安竹秀俊, 赤碓外志也, 土屋弘行, 峰松康治, 鹿野尚英, 沼田仁成. Bone transportによる感染性偽関節の治療. *OS Now* No.25: 133-137, 1997
- 5) Tsuchiya H, Tomita K, Minematsu K, Mori Y, Asada N, Kitano S. Limb salvage using distraction osteogenesis. A classification of the technique. *J Bone Joint Surg Br* 79: 403-411, 1997
- 6) 土屋弘行, 上原健治, 富田勝郎. 骨肉腫切除後の再建法—骨延長術による再建—. *整災外* 43: 1105-1114, 2000
- 7) Kavanagh BF, Fitzgerald RH. Multiple revisions for failed total hip arthroplasty not associated with infection. *J Bone Joint Surg Am* 60: 1144-1149, 1987
- 8) 松田秀一, 田仲和宏, 岩本幸英. 骨肉腫切除後の再建法—人工関節を用いた再建—. *整災外* 43: 1097-1103, 2000
- 9) 矢部啓夫, 中西忠行, 根本哲夫, 中澤秀夫, 谷戸祥之, 花岡英弥. 骨腫瘍における同種保存骨移植の治療成績. *整形外科* 43: 1701-1707, 1992
- 10) 太田吉雄, 佐本敏秋, 川路博之, 井田英雄. 放射線照射による片側骨盤大腿骨成長障害の1例. *東北整災紀要* 35: 368-370, 1991
- 11) Robertson WW Jr, Butler MS, D'Angio GJ, Rate WR. Leg length discrepancy following irradiation for childhood tumors. *J Pediatr Orthop* 11: 284-287, 1991
- 12) Hagino T, Hamada, Y. Accelerating bone formation and earlier healing after using demineralized bone matrix for limb lengthening in rabbits. *J Orthop Res* 17: 232-237, 1999
- 13) Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K, Matsushita T, Mamada K, Kawaguchi H. Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotasis bone lengthening of rabbits. *Calcif Tissue Int* 64: 542-546, 1999
- 14) Tsubota S, Tsuchiya H, Shinokawa Y, Tomita K, Minato H.

Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 81: 125-129, 1999

- 15) 堀井健志. ステロイド投与家兎における大腿骨内血管系の変化 -特に類洞から中心静脈に着目して-. *十全医会誌* 107: 95-105, 1998
- 16) Lopez-Curto JA, Bassingthwaighte JB, Kelly PJ. Anatomy of the microvasculature of the tibial diaphysis of the adult dog. *J Bone Joint Surg Am* 62: 1362-1369, 1980
- 17) Ilizarov GA, Deviatov AA. Operative elongation of the leg with simultaneous correction of the deformities. *Ortop Travmatol Prot* 30: 32-37, 1969
- 18) Arnold M, Kummermehr J, Trott KR. Radiation-induced impairment of osseous healing: Quantitative studies using a standard drilling defect in rat femur. *J Radiat Res* 143: 77-84, 1995
- 19) Pelker RR, Friedlaender GE. Fracture healing. Radiation induced alterations. *Clin Orthop* 341: 267-282, 1997
- 20) Takahashi S, Sugimoto M, Kotoura Y, Sasai K, Oka M, Yamamuro T. Long-term changes in the haversian systems high-dose irradiation. *J Bone Joint Surg Am* 76: 722-738, 1994
- 21) Gantous A, Phillips JH, Catton P, Holmberg D. Distraction osteogenesis in the irradiated canine mandible. *J Plast Reconstr Surg* 93: 164-168, 1993
- 22) Hall EJ. Sensitivity of tissues. In Hall EJ. *Radiobiology for the radiologist*, 3rd ed, p357-364, J.B.Lippincott, Philadelphia, 1988
- 23) Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues, Part II; the influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop* 239: 263-285, 1989
- 24) Li G, Simpson W, Kenwright J, Triffitt JT. Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. *J Orthop Res* 15: 765-772, 1997
- 25) Aronson J, Harrisos BH, Stewart CL, Harp JH. The histology of distraction osteogenesis using different external fixators. *Clin Orthop* 241: 106-116, 1989
- 26) Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues, Part I; The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop* 238: 249-281, 1989
- 27) Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S, Shimomura Y. Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of

periosteum and endosteum. *J Bone Joint Surg Br* 70: 543- 549, 1988

- 28) Li G, Simpson W, Triffitt JT. The role of chondrocyte in intramembranosus and endochondral ossification during distraction osteogenesis in the rabbit. *Calcif Tissue Int* 64: 310-317, 1999
- 29) Ilizarov GA. Clinical appreciation of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop* 250: 8-26, 1990
- 30) Robledo JM, Salto VV, Parra EG, Fuente JS, Arevalo RL, Baena AE. Histologic analysis of distraction osteogenesis in the femoral shaft of the immature rabbit. *Acta Orthop Belg* 64: 125-130, 1998
- 31) Shaw JL, Bassett CAL. The effect of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage in vitro. *J Bone Joint Surg Am* 49: 73-80, 1967
- 32) Takahashi S, Sugimoto M, Kotoura Y, Nishimatsu H, Shibamoto Y, Abe M, Yamamuro T. The effects of intraoperative radiotherapy on bone-healing ability in relation to different doses and postradiotherapy intervals. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30: 1147-1152, 1994
- 33) Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 8: 1309-1312, 1989
- 34) Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Chin G, Dudziak ME, Gerrets RP, Gittes GK, Longaker MT. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg* 104: 738-747, 1999
- 35) Choi IH, Ahn JH, Chung CY, Cho TJ. Vascular proliferation and blood supply during distraction osteogenesis: A scanning electron microscopic observation. *J Orthop Res* 18: 698-705, 2000
- 36) Aronson J. Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 301: 124-131, 1994
- 37) Li G, Simpson W, Kenwright J, Triffitt JT. Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 17: 362-367, 1999
- 38) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner J. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97: 1114-1123, 1998

Distraction osteogenesis after irradiation in a rabbit model Kenji Uehara, Department of Restorative Medicine of Neuro-Musculoskeletal system, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **111**, 173 – 182 (2002)

Key words irradiation, distraction osteogenesis, endochondral ossification, angiogenesis

Abstract

Little is known about how preoperative irradiation delays distraction osteogenesis. The purpose of this study is to investigate the effect of preoperative irradiation on distraction osteogenesis. A single dose of 15 Gy irradiation was applied in a medial-to-lateral direction to the right rear legs of Japanese white rabbits. This was followed immediately by application of a unilateral external fixator and diaphyseal osteotomy of the tibia. Seven days later, lengthening of the tibia was initiated at a rate of 0.5 mm/day and continued for 4 weeks, with a total elongation of 14 mm. Radiographic and histological findings and microangiography were examined. Radiographs of the legs were obtained once a week. The animals were sacrificed at 0 and 4 weeks after completion of lengthening, and the tibia were subjected to histological examination and microangiography. Routine staining was performed with hematoxyline and eosin, and immunostaining with a vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody. The radiographs showed little regeneration during the elongation phase. Although the callus appeared very slowly during the maturation phase, it did not show the usual three distinct zones, but only spotty callus formation. Furthermore, regeneration was not completed until the 4th week of the maturation period. The histological examination at the end of distraction showed a gap in the distraction, consisting of loose connective tissue with part of the fibrous tissue oriented longitudinally. There was no evidence of new mineralization. Four weeks after completion of distraction, the major part of the radiolucent region consisted of cartilage. There was no evidence of the normal regeneration pattern described in many previous reports. The spotty osteogenesis was identified as endochondral ossification. Immunohistochemical examination of the regeneration area revealed that the blood vessels were extremely localized, and that expression of VEGF in the osteoblasts was very high. Microangiograms showed vascularization at the distracted sites was very poor. These results demonstrate that distraction osteogenesis was markedly decreased by 15 Gy of preoperative irradiation in terms of both the rate and the process. Since the pattern of regeneration showed spotty ossification, it is suggested that the majority of stem cells were damaged immediately after irradiation, but that some of them were still able to proliferate and differentiate into chondroblasts. The high level of VEGF in the osteoblasts and the endochondral ossification suggest a hypoxic state in the distracted region due to the poor vascularization as shown by microangiogram. In conclusion, preoperative irradiation interferes with distraction osteogenesis by damaging the osteoprogenitor cells and by inducing a state of poor angiogenesis.