

家兔下肢骨外傷性骨萎縮における二重エネルギーX線吸収法による骨塩量の変化

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/2297/4566

家兔下肢骨外傷性骨萎縮における 二重エネルギーX線吸収法による骨塩量の変化

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)

勝 木 保 夫

骨折は、その経過において骨折周囲に著明な骨量の減少が発生することが知られているが、骨折による骨萎縮の原因及びその程度や回復の経過は、未だ明らかとはなっていない。これは、今までに骨折後の骨量を評価する実験モデルが確立されていなかったことに加え、これまでは骨量を正確に定量できなかったため、骨量の変化を鋭敏に評価できなかったからである。今回、骨折による骨量の変化とその回復過程を明らかにする目的で、日本白色家兔による骨萎縮の動物実験モデルを作成し、骨折後の骨量の経時的変化を骨折の治療と荷重の関わりから評価して、骨折による骨萎縮モデルとして有用か否か検討した。このモデルは、日本白色家兔の脛骨遠位端に徒手的に骨折を作成したものである。骨折後0, 2, 4, 6, 8, 12週の各群8羽ずつにつき、両側の大腿骨および脛骨の骨塩量の変化を二重エネルギーX線吸収法 (dual energy X-ray absorptiometry, DEXA) を用いて定量した。また、一旦骨折させ4週間後に同部位を再骨折させた群についても、同様に定量した。その結果、動物実験モデルとして作成が容易で経過観察中の脱落も少ないため、予定観察期間終了まで観察し得た個体の割合が94.1%と高く、外傷性骨萎縮の実験モデルとして適していると考えられた。DEXA法を用いた小動物の骨塩定量は、変動係数1%未満の高い再現性が得られ、変化しにくい骨量の変動を定量するうえで有用であった。骨折による不動、非荷重による骨量減少は、骨折後4週でもっとも大きくなり、約20%の骨密度減少として確認できた。再骨折群でも、一回骨折群と同様の経過をたどり、骨量の減少は最も多くても約20%であった。したがって、骨折による骨量減少には一定の限界があり、非骨折側に比べ20%の減少が下限であると判明した。減少した骨塩量は骨折後4週以降実験終了の12週まで増加し、荷重の再開や運動量の増加が回復と関係していると考えられた。このことは二回骨折群でも同様の変化を認め、外傷による骨萎縮とその回復は一定の経過を辿ると考えられたが、骨量の完全回復には12週以上の長期間を要することが確かめられた。

Key words osteoporosis, trauma, dual energy X-ray absorptiometry, bone mineral density

緒 言

近年、高齢化社会の進展に伴って患者数が増加している骨粗鬆症は、単位体積当たりの骨量の減少と定義されている。骨量の減少は全身的にも局所的にも発生するが、局所の骨量減少としては、骨折をはじめ、筋や腱の切断、脳あるいは脊髄や末梢神経の障害による局所不動化による場合がある。このうち、骨折はその治療過程において骨折周囲に著明な骨萎縮 (骨量の減少) を伴い、ときには難治性の激しい疼痛を伴う場合がある。しかし、骨折による骨萎縮の原因及びその程度や回復の経過については、未だ明らかとはなっていない。これは、今までに骨折後の骨萎縮状態を評価する実験モデルが確立されていなかったことに加え、これまでは骨量を正確に定量できなかったため、骨量の変化を鋭敏に評価できなかったからであろう。

これまでに開発されてきた骨萎縮の機序解明の動物実験モデルはいくつかの報告があるが^{1)~12)}、このなかには骨折後の骨萎縮を定量した報告はない。また、脊髄損傷などの神経麻痺による実験モデルでは、その侵襲が大きいため長期観察が困難であると指摘されており¹³⁾、変化に時間を要する骨量を長期にわたって検討するのは、動物実験では困難である。また、骨萎縮を評価して治療するうえで、骨量の程度やその変化を定性的にではなく定量的に測定する必要がある。今回、骨折による骨量の変化とその回復過程を明らかにする目的で、家兔下肢骨に骨折を作成し、骨折後の大腿骨および脛骨の骨塩量の経時的変化を二重エネルギーX線吸収法を用いて定量し、骨折の治療と荷重の関わりからその変化を評価して、骨折による骨萎縮モデルとして有用か否か検討した。

対象および方法

I. 実験動物

体重3.0~3.6kgの成熟した日本白色家兔を用いて実験を行った。耳静脈より静脈麻酔剤チオペンタールナトリウム (田辺、

平成13年4月20日受付, 平成13年6月26日受理

Abbreviations : BMD, bone mineral density; CV, coefficient of variation; DEXA, dual energy X-ray absorptiometry; DPA, dual photon absorptiometry; LSI, level of significance; MD, microdensitometry; SPA, single photon absorptiometry; QCT, quantitative computed tomography;

東京) 2.5%水溶液を体重1kgあたり30mg投与した。5秒後に疼痛に対する反応が消失したことを確かめた後、右下腿骨遠位五分の一の部位を金属鉗子を用いて挟んで固定しその遠位部を手動的に90度外側へ曲げて非開放性骨折を作成した。金属鉗子を用いたのは、骨折の部位と程度を等しくするためである。この過程で皮膚に創ができ、開放性骨折が疑われた家兔は感染が危惧され骨量の変化に影響があると考えられたため対象から除外した。骨折部は特に固定せず放置し通常の飼育ケージの中を自由に運動させた。飼料(ウサギ長期飼育用RM-3, 船橋農場)および水分は自由摂取とした。骨折させた群は、骨折後2, 4, 6, 8, 12週にて各群8羽ずつとした。また、骨折による骨萎縮への影響が繰り返し起こりうる可逆的变化であるか否か、骨量の減少に一定の下限があるのかを検討するために、骨折後4週のもの同一箇所を初回と同様の方法で再骨折させ、その後さらに4週および8週放置して飼育した群(二回骨折群)を作成した。骨折させないで同一条件で飼育した群8羽を対象群とし、すべての群について両側の脛骨と大腿骨の骨密度を測定して検討した。

II. DEXA法による骨密度測定法

対象群8羽および骨折後2, 4, 6, 8, 12週後に各群8羽ずつに対し、チオペンタールナトリウムを急速に耳静脈から200mg投与して屠殺後、両下肢骨を股関節で離断して摘出し、軟部組

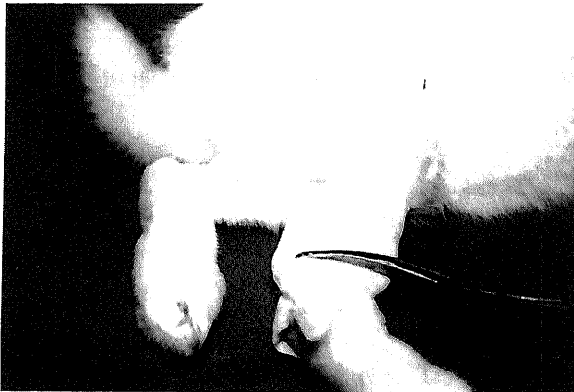


Fig. 1. Method to make the fracture, first step. The distal one fifth of the right tibia was clipped and fixed using metal forceps.



Fig. 2. Method to make the fracture, second step. Manually bent the tibia laterally by 90 degrees at the clipped point.

織を可及的に剥離切除して、二重エネルギーX線吸収法(dual energy X-ray absorptiometry, DEXA)を用いて骨密度(bone mineral density, BMD)を測定した。使用した機材は、Norland社製XR-26である。

DEXA法の測定条件は、Norland社製XR-26のsmall animal modeを用いて測定単位(resolution)を 0.5×0.5 mm, 測定速度(scan speed)を10mm/秒とした。摘出下肢骨は膝関節を90度屈曲位で固定し、大腿骨頭が上を向くように設置した。測定範囲は、大腿骨遠位部および脛骨近位部について、それぞれ膝関節面から骨代謝面積の大きい海綿骨の多い部分を含むように長軸方向で3.5cmの範囲につき骨塩量を測定した。

III. DEXAによる家兔下肢骨骨塩量測定の精密度の検討

あらかじめ、今回の測定方法の精密度につき検討した。精密度は、測定値の再現性で評価できるが、これは一般に測定値の日差再現性で現され、標準偏差を平均値で除した百分率である変動係数(coefficient of variation, CV)が指標として用いられる。そこで、対象とした家兔について同じ摘出骨を同一肢位に置い

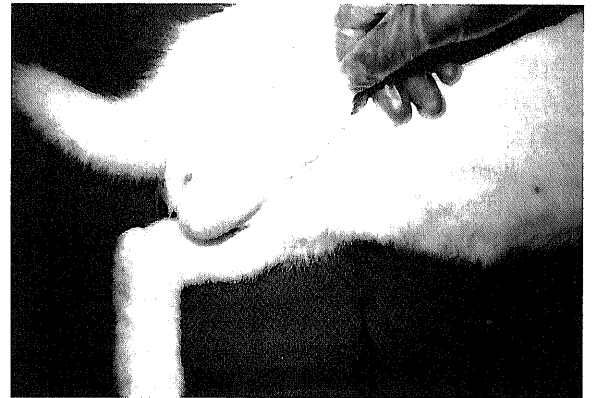


Fig. 3. Method to make the fracture, third step. A closed fracture was made.

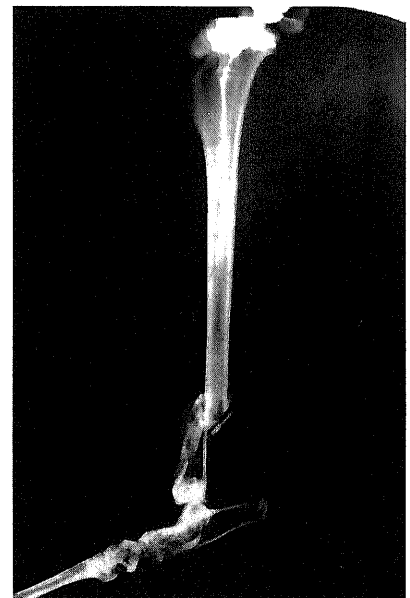


Fig. 4. The X-ray of the tibia. The X-ray shows the fractured tibia at the time of fracture.

たまま1日1回、連続8日間測定を行なった。

Ⅳ. 家兎下肢骨骨密度の左右差の検討

骨折させた下肢骨骨量の変化は、個体による骨量の差の影響を除くために左右差をもって評価する必要がある。そのため、家兎の下肢骨量に左右差がないか前もって評価しておく必要がある。測定範囲は大腿骨遠位部および脛骨近位部それぞれ膝関節面から長軸方向へ3.5cmの範囲につき、8羽の成熟日本白色家兎の左右両側を測定して比較した。

Ⅴ. 統計学的検定法

測定により得られた結果はすべて平均±標準偏差 ($\bar{x} \pm SD$) で示した。二群間比較はまずF検定により等分散であるか検定した後、各群間に有意差があるか否かについて多重比較検定 (Post-hoc test) を行った。検定には Fisher's protected least significant difference法を使用した。

結 果

Ⅰ. 骨折後の家兎の行動

骨折後の家兎の行動は、骨折させた右後足が床につかぬようにならだ全体を左に傾けており、骨折から平均10日間右後足を浮かせていた。10日目以降は、骨折部の接地に対する逃避行動が徐々に減少しはじめ、骨折後4週では右後足にも体重をかけるようになった。骨折後6週で、徒手的に骨折部位の不安定性が見られなくなり、X線でも骨癒合が得られていた。再骨折群も、初回の骨折と同様に、再骨折後の4週後に逃避行動が見られなくなり、再骨折後6週後(初回骨折後10週後)に骨折部位の徒手的不安定性が消失し、X線での骨癒合が得られてい

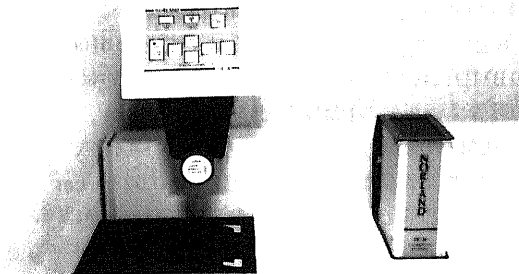


Fig. 5. Bone mineral analyzer: dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). The soft tissue was resected as much as possible and bone mineral density was measured by the DEXA (Norland, XR-26).



Fig. 7. The X-ray of the tibia 6 weeks after fracture. The X-ray shows tibia 6 weeks after the first fracture. Bone union is complete and the fracture point is stable.

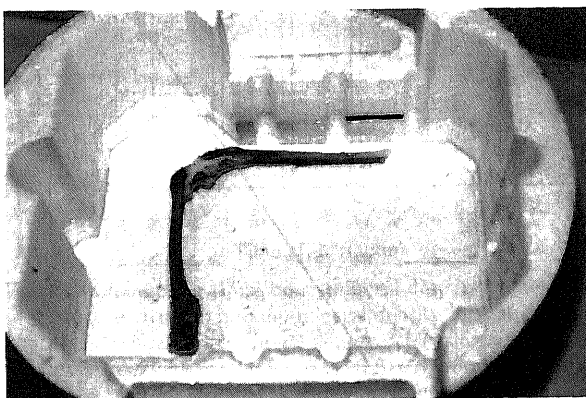


Fig. 6. Position of the bone on the bone mineral analyzer. The bones of the lower limb were placed in the styrofoam tray, which is radiolucent, filled with water up to the height of the bone. The bones of the lower limb were positioned so that the femoral head was faced up and the knee joint was fixed at 90 degrees.

Table 1. Bone mineral density of femur and tibia

No.	Femur (g/cm ²)	Tibia (g/cm ²)
1	0.249	0.282
2	0.254	0.282
3	0.248	0.279
4	0.251	0.287
5	0.252	0.281
6	0.253	0.285
7	0.251	0.281
8	0.252	0.282
\bar{x} (g/cm ²)	0.251	0.282
SD (g/cm ²)	0.002	0.003
CV (%)	0.789	0.887

BMD data of the single extepated bone kept in the same position and measured on 8 consecutive days (once per day). BMD, bone mineral density; CV, coefficient of variation.

た。

Ⅱ. DEXAによる健康家兎の骨量測定の高精度

大腿骨近位部のBMDは $0.251 \pm 0.002 \text{g/cm}^2$ 、脛骨遠位部のBMDは $0.282 \pm 0.003 \text{g/cm}^2$ であった。測定精度を表す変動係数はそれぞれ0.789%、0.887%といずれも低く、1%以下であった。

Ⅲ. 健康家兎の下肢骨塩量の左右差についての検討

日本白色家兎後肢の骨塩量の左右差を健康な8羽について検討してみると、大腿骨遠位部において、右が $0.259 \pm 0.028 \text{g/cm}^2$ 、左が $0.265 \pm 0.020 \text{g/cm}^2$ で相関係数 $R = 0.951$ と極めて強い相関関係が認められた。脛骨近位部骨塩量は、右が $0.284 \pm 0.024 \text{g/cm}^2$ 、左が $0.284 \pm 0.036 \text{g/cm}^2$ で相関係数 $R = 0.943$ と、大腿骨同様に強い相関関係が得られ、骨塩量に左右差がない事が確かめられた。

Ⅳ. 骨折後の骨塩量の変化

1. 一回骨折群

骨折後2週群における大腿骨遠位部のBMDは非骨折側 $0.261 \pm 0.011 \text{g/cm}^2$ 、骨折側 $0.230 \pm 0.008 \text{g/cm}^2$ であった。8羽の家兎の骨折側の骨塩量と非骨折側のBMDの差、すなわち骨折させた家兎の大腿骨遠位部の骨塩量の左右差は、骨折側が非骨折側の88.0%であった。すなわち、骨折後2週間で非骨折側に比べ約12%の骨塩量の減少がみられた。この減少は危険率1%以下で有意な減少であった。

4週群は、大腿骨遠位BMDは非骨折側が $0.248 \pm 0.014 \text{g/cm}^2$ 、骨折側 $0.206 \pm 0.015 \text{g/cm}^2$ であった。4週群での左右差の平均は83.2%であり、骨塩量は4週群では2週群に比較して、危険率5%以下の有意差をもってさらに低下が認められた。6週群では大腿骨遠位のBMDは非骨折側 $0.249 \pm 0.012 \text{g/cm}^2$ 、骨折側 $0.216 \pm 0.009 \text{g/cm}^2$ で左右差の平均が86.5%になった。8週

群では大腿骨遠位部のBMDは非骨折側 $0.259 \pm 0.021 \text{g/cm}^2$ 、骨折側 $0.232 \pm 0.028 \text{g/cm}^2$ で左右差の平均が89.4%であった。12週群では大腿骨遠位部のBMDは非骨折側 $0.264 \pm 0.023 \text{g/cm}^2$ 、骨折側 $0.239 \pm 0.022 \text{g/cm}^2$ であった。左右差は90.5%であった。

以上まとめると、骨量は4週群まで危険率5%以下で有意に減少して行き、その後骨量は増加していった。8週群では危険率5%以下で、12週群では危険率1%以下の有意差で最も減少していた4週群に比べて有意に骨量の増加が認められた。しかし、12週群での骨量は骨折前と比較しても危険率1%以下で有意な骨密度の低下を示し、回復が不完全であることが示された。

脛骨近位部の骨塩量については、2週群の非骨折側のBMDが $0.291 \pm 0.018 \text{g/cm}^2$ 、骨折側のBMDは $0.269 \pm 0.027 \text{g/cm}^2$ 、左右差の平均は92.3%で、大腿骨と同様に骨折後2週間で約10%の骨塩量の減少がみられ、この減少は危険率1%以下で有意な減少であった。

4週群の脛骨非骨折側のBMDは $0.275 \pm 0.018 \text{g/cm}^2$ 、骨折側のBMDは $0.230 \pm 0.018 \text{g/cm}^2$ 、左右差の平均は82.6%で、4週群で骨折後の骨塩量が最も低下していた。2週から4週への2週間での減少は危険率5%以下の有意差で有意な減少を示した。

6週群の脛骨非骨折側のBMDは $0.273 \pm 0.010 \text{g/cm}^2$ 、骨折側のBMDは $0.236 \pm 0.013 \text{g/cm}^2$ 、左右差の平均は86.6%、8週群の脛骨非骨折側のBMDは $0.284 \pm 0.023 \text{g/cm}^2$ 、骨折側のBMDは $0.251 \pm 0.020 \text{g/cm}^2$ 、左右差の平均は88.4%であった。12週群の脛骨非骨折側のBMDは $0.289 \pm 0.028 \text{g/cm}^2$ 、骨折側のBMDは $0.265 \pm 0.028 \text{g/cm}^2$ 、左右差の平均は91.7%であった。脛骨近位部の骨塩量は4週群まで危険率5%以下で有意に減少して行き、8週群では危険率5%以下で、12週群では危険率

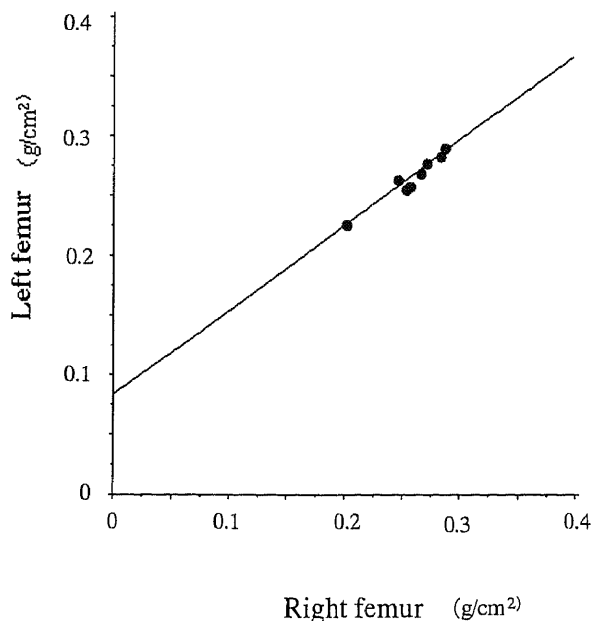


Fig. 8. Correlation of right and left femoral bone mineral density. The femoral bone mineral density of rabbits showed a positive correlation with a coefficient of 0.951. Regression equation: left femur = $0.98 + 0.71 \times$ right femur. $r^2 = 0.951$

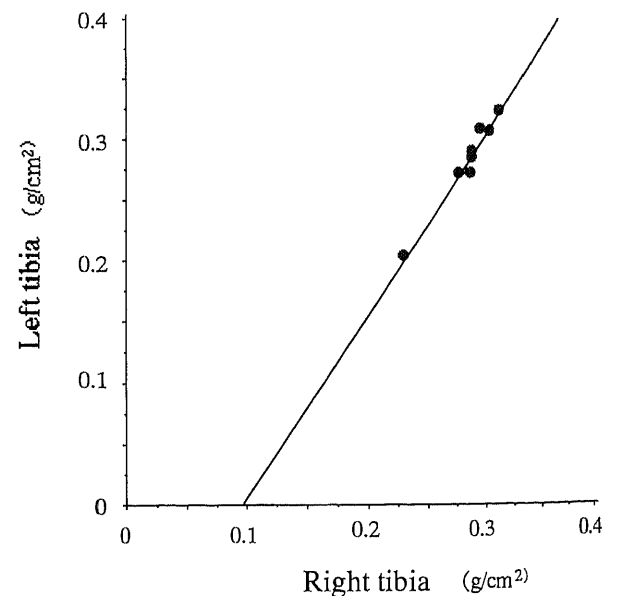


Fig. 9. Correlation of right and left tibial bone mineral density. The tibial bone mineral density of the rabbits showed a positive correlation with a coefficient of 0.943. Regression equation: left tibia = $0.12 + 1.46 \times$ right tibia. $r^2 = 0.943$

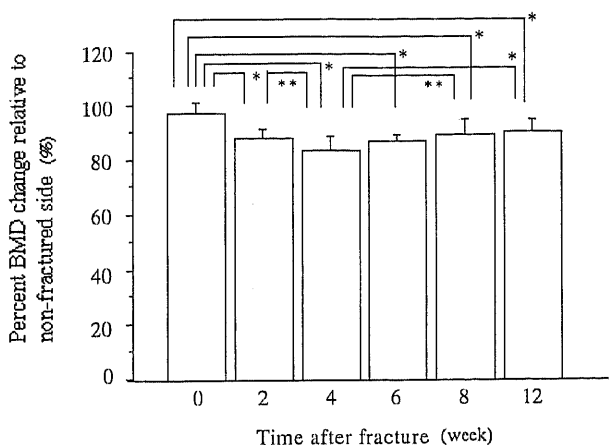


Fig. 10. Changes in femoral bone mineral density. The chart shows the changes in bone mineral density for one fracture group. Bone mineral density decreased significantly at a level of significance (LSI) of 5% until 4 weeks after the fracture, then it started to increase. Bone mineral density at 8 weeks showed an increase (LSI: 5% or less), as did bone mineral density at 12 weeks (LSI: 1% or less). However, the entire bone mass at 12 weeks was much less than that before the fracture (LSI: 1% or less). Each column represents $\bar{x} \pm SD$ (n = 8). *p < 0.01 versus control **p < 0.05 versus control.

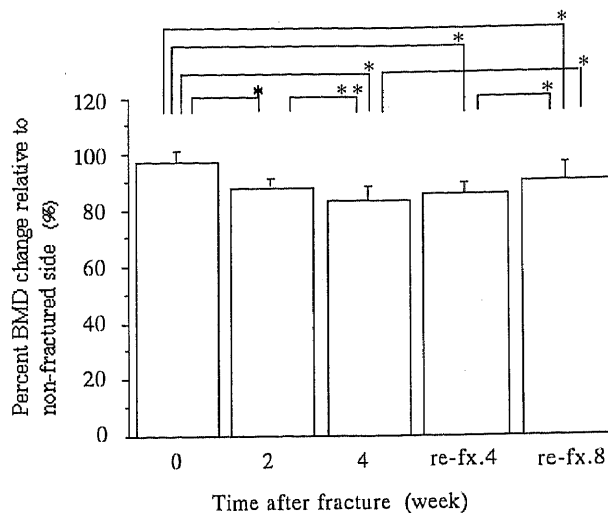


Fig. 12. Effect of re-fracture in femoral bone mineral density. The chart shows the changes in bone mineral density in re-fracture group. Bone mineral density decreased significantly at a level of significance (LSI) of 5% until 4 weeks after the fracture. Bone mineral density at 4 weeks post re-fracture showed no difference compared with bone mineral density 4 weeks after first fracture. However, after 4 weeks it started to increase, showing a similar recovery process to the one fracture group. Each column represents $\bar{x} \pm SD$ (n = 8). *p < 0.01 versus control **p < 0.05 versus control

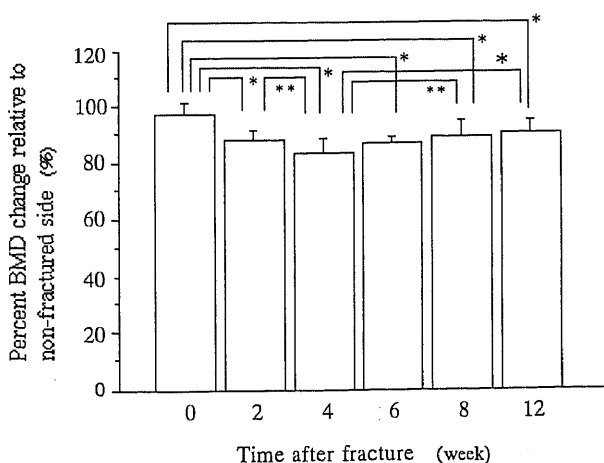


Fig. 11. Changes in tibial bone mineral density. The chart shows the changes in bone mineral density for one fracture group. It shows bone mineral density decreasing significantly until 4 weeks after the fracture (LSI: 5% or less). Bone mineral density at 8 weeks showed an increase (LSI: 5% or less) and bone mineral density at 12 weeks showed a significant increase (LSI: 1% or less) compared with that at 4 weeks after the fracture. However, the entire bone mineral density at 12 weeks was much less than that before the fracture (LSI: 1% or less). Each column represents $\bar{x} \pm SD$ (n = 8). *p < 0.01 versus control **p < 0.05 versus control.

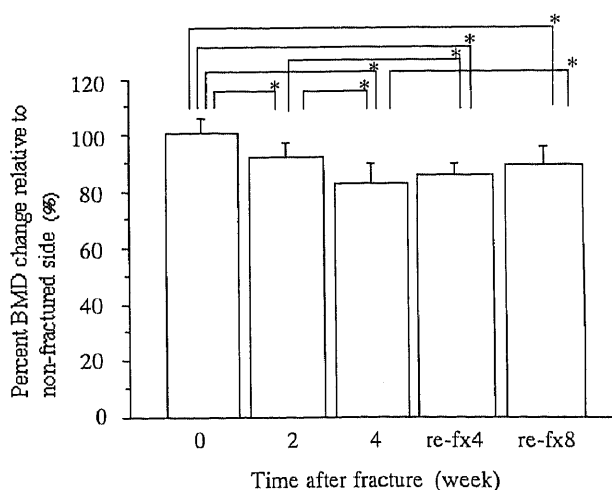


Fig. 13. Effect of re-fracture in tibial bone mineral density. The chart shows the changes in bone mineral density in re-fracture group. Bone mineral density decreased significantly at a level of significance (LSI) of 5% until 4 weeks after the fracture. Bone mineral density at re-fracture 4 weeks showed no change compare with bone mineral density 4 weeks after first fracture. However, after 4 weeks it started to increase, showing a similar recovery process to the one fracture group. Each column represents $\bar{x} \pm SD$ (n = 8). *p < 0.01 versus control **p < 0.05 versus control.

1%以下で、最も減少していた4週群に比べて有意に骨量の増加が認められた。しかし、12週群での骨量は骨折前と比較しても危険率1%以下で有意な低下を示し、回復が不完全であることが示された。この結果は大腿骨における変化と同様であった。

2. 二回骨折群

二回骨折群では、二回目の骨折後4週（一回目の骨折からは8週後）の大腿骨BMDは非骨折側が $0.252 \pm 0.017 \text{g/cm}^2$ 、骨折側のBMDは $0.216 \pm 0.018 \text{g/cm}^2$ 、左右差の平均は85.9%であった。二回骨折8週群（一回目の骨折からは12週後）の大腿骨は、非骨折側BMDは $0.273 \pm 0.011 \text{g/cm}^2$ 、骨折側が $0.247 \pm 0.018 \text{g/cm}^2$ 、左右差の平均は90.6%であった。再骨折により骨塩量は再骨折していない8週群に比べ低くなっていた。脛骨においては、二回骨折後4週群のBMDは非骨折側で $0.289 \pm 0.022 \text{g/cm}^2$ 、骨折側のBMDは $0.248 \pm 0.017 \text{g/cm}^2$ 、左右差の平均は85.8%であった。二回骨折後8週での脛骨BMDは非骨折側 $0.304 \pm 0.018 \text{g/cm}^2$ 、骨折側BMDは $0.271 \pm 0.023 \text{g/cm}^2$ 、左右差の平均は89.1%であった。二回骨折群の4週群のBMDの左右差85.9%は、一回骨折4週群の左右差83.4%とほぼ同様であった。再骨折をさせても骨塩の減少がさらに進むということにはなかった。

考 察

骨折などの外傷により骨量減少が発生することは、臨床においてはしばしばみられるが、その減少の度合いが多い場合には、易骨折性を惹起したり頑固な疼痛の原因になったりする。臨床で遭遇する骨量減少状態は種々の危険因子にさらされた結果であり、その成因については、局所の循環障害説、代謝関与説、体重負荷や筋活動の減少による物理的刺激的減少説等があり、一定の見解が得られていない。また、骨量減少については、原因を問わずその骨量減少に至る過程や減少の程度、減少からの回復の過程やその程度については、これまでに明らかにされていない。これは主に実験モデルが確立されておらず、また、骨量の定量が正確に行えなかったためである。

これまで卵巣摘出やステロイド投与などの全身的骨萎縮の実験モデルとしてはいくつかの方法が作られているが、局所での骨萎縮を呈するのは、脊椎片側切断術、坐骨神経切断術などによる神経麻痺またはギプスを用いて固定した不動化モデルがある。神経切断による方法では、その神経支配域に局限した運動麻痺を作成して骨萎縮が起こる特徴がある。しかし、この方法では骨萎縮を作成できても、一旦切断された神経を再びもとの機能を持つまでに回復させることができないため、骨萎縮状態からの回復の検討は不可能である。そのほか外科的な関節固定や腱切断等の方法も局所骨萎縮を惹起するが、手術操作による皮膚や骨膜の損傷の影響が残ったり、骨量の状態を可逆的に観察しがたい欠点がある。

ギプス固定による不動化は、筋肉、神経を損傷することなく得られる方法だが、奥村ら¹⁹⁾は筋萎縮などにより固定が緩んで2週間に1回程度の巻き換えが必要であり、巻き換えるたびに固定の程度が変動する欠点を指摘している。したがって、これらは骨萎縮の過程とその回復を研究するための応用を考えると適したモデルとは言い難い。また、今回予備実験として家兎後肢をギプスで固定してみたが、体重約3.0kgの日本白色家兎10羽中4週間のギプス装着に耐えられた個体はわずか2羽（20%）

に過ぎなかった。このうち、ギプス固定を行って2週間以内の脱落が5羽（50%）であり、仮に2週間毎にギプスを巻き換えたとしても、ギプスによる不動化モデルは脱落率が高すぎて実験モデルとしては不適当と思われる。

一方、今回の骨折によるモデルは、実験群作成中に開放骨折となった個体や骨折部に選発性の感染を起こした個体などの脱落例はわずか3羽で、51羽中48羽を実験群として利用できた。回収率は94.1%、脱落率は5.9%で、実験モデルとして効率がよかった。さらに、局所には骨折以外に神経麻痺や関節拘縮などの問題がないため、回復過程についても経時的に観察が可能であった。以上より、今回の骨折モデルは簡便に作成でき、長期の観察や骨量回復過程の観察が可能で有用であると考えられる。

ところで、骨の量に関しては、臨床においてX線写真による定性的評価で考える傾向にあった¹⁵⁾。しかし、同一X線写真における評価でも、6.1%から6.8%で違った指数で評価していたとの報告がある¹⁶⁾。また、骨量の変化は、年間1%から数%にすぎないため^{17)~19)}、骨量の変化を客観的に捉えるには高い再現性と測定精度を備えた定量法を用いる必要がある。

骨塩定量法にはこれまでに灰分重量測定法、X線写真による骨皮質幅計測、X線像の骨梁の計測、X線像の濃度計による解析、単一光子吸収法（single photon absorptiometry, SPA）二重光子吸収法（dual photon absorptiometry, DPA）、定量的X線CT法（quantitative computed tomography, QCT）、中性子放射能化分析法などがあり、それぞれ異なった特徴と意義を有する。

灰分重量測定法は摘出標本を焼却して得られた材料を測定するため、一般に電気炉で600℃ 20時間の焼却が必要で、測定に時間がかかるばかりか生体には適応出来ない。

単一光子吸収法や二重光子吸収法では皮質骨と海綿骨の評価が可能で、定量性がある。1974年、Fisher²⁰⁾が単一光子吸収法によりビーグル犬の骨量定量を行なって以来、生体のまま骨量測定が可能となった。しかし、単一光子吸収法では、骨組織以外の筋肉・脂肪組織などの軟部組織によって影響をうけて光子が減弱するため、軟部組織の少ない部位にしか利用出来ない欠点がある。

これに対して、二重光子吸収法では二種類の異なるエネルギーを骨・軟部組織に照射し、各エネルギーごとに得られた吸収率から組織の密度を算出しているため、軟部組織の影響を受けずに骨量の測定が可能である。今回の実験に利用したNorland社製XR-26は、エネルギー源にX線を用いた二重光子吸収法で、照射したX線が対象に当たっておこる減弱をそのまま計算する方法である。

一方、他のX線を用いる骨量測定法のうち、一般に用いられているマイクロデンシトメトリー法（microdensitometry, MD）などのX線単純撮影による骨皮質幅計測法では、放射線の減弱を一旦フィルムに現像したものを測定処理する方法であり、定量的X線CT法ではX線の減弱を一旦CT値として算出し、さらに定量計算する方法であるため定量化の処理に際し処理過程が多く、これらの方法では精密度の再現性が劣化する欠点がある。

現在までに報告されている骨塩定量法での再現性を示す変動係数は、MD法1~4%²¹⁾²²⁾、デジタル画像処理法（digital image processing, DIP）法1~3%²³⁾、SPA法1~3%²⁴⁾、QCT法1~5%²⁵⁾²⁶⁾などとなっている。小動物に対する応用では、

Safadiら²⁷⁾はSPA法によるラットの腰椎のBMDの変動係数を3.3%と報告した。また、Kimmelら²⁸⁾はDPAを用いて測定したラット大腿骨BMDは変動係数3~5%であったとしている。

今回の実験では、軟部組織の影響を受けず、エネルギーの吸収率を直接計算するDEXA法を用い、測定する骨の肢位を一定にしたため、家兔下腿骨の骨密度BMDは、大腿骨測定での変動係数が0.789%、脛骨測定での変動係数が0.887%と、両部位とも変動係数が1%未満であり、これまでに報告されているどの方法よりも再現性が高く、小動物における骨塩定量法として本法が優れていることが示された。

また、この実験にあたり、用いた家兔の個体差を除くため、患側の健側に対する割合で骨密度の変化を求めたが、家兔後肢の左右の骨密度は大腿骨で相関係数0.951、脛骨で相関係数0.943と極めて強い正の相関関係が得られ、左右の下肢骨の骨密度には差がないことが確かめられた。これにより、今回作成した右脛骨骨折による下肢骨の骨量の変化は、骨折させていない左下肢に比較した変化率をもって骨塩量を評価できると考えた。

今回の実験では、遠位端を骨折させた脛骨に、骨折部位とは離れた脛骨近位部に骨塩量の変化が見られたばかりでなく、同一下肢の大腿骨の骨塩量もほぼ同様の変化を示した。それは骨折後、はじめに急激に骨塩量が減少し、4週後に最大となる約20% (大腿骨遠位部18.8%、脛骨近位部17.4%)の骨塩量の低下として現れ、その後6週後から実験終了後の12週まで、ゆっくりとした骨塩量の回復が認められた。しかし、12週では対象側の骨塩量と同じ値までには回復せず、大腿骨遠位で非骨折側の90.5%、脛骨近位部で91.7%までの回復で、約10%の低下を示していた。

今回の検討で、骨折させた脛骨の変化が骨折させていない大腿骨の変化と異なっているのならば、骨密度の変化は骨折した骨単独の影響を強く受けている可能性がある。しかし、骨折後の脛骨、大腿骨両方の変化がその変化の割合や時間的経過が大変似通っており、この骨密度の変化は骨折の直接作用ではなく、骨折によって生じた下肢骨の運動量の変化、荷重量の変化、血流の変化などによっているものと考えられる。

ここまでの検討で、骨量の減少には、骨折後一定のパターンがあることを示した。しかし、骨折に伴う骨量減少は、短期間内に骨折を繰り返せば、一回ごとにさらに多くの骨量が減少して行くのか、あるいは骨量の減少には一定の下限があるのかは明らかにはなっていない。

この点に関して、2週間ないし3週間の宇宙飛行後の踵骨の骨塩量測定では、骨塩量が4.5%から7.9%減少したと報告されている²⁹⁾が、さらに長い175日間(25週間)での宇宙飛行の場合でも、骨塩量の減少は5%から8%であり³⁰⁾、2-3週間の飛行と変わりがない。動物実験でもUthoffら¹⁴⁾は、ビーグル犬の前脚をギプス固定し皮質骨量を観察したが、24週以降は40週まで健側に比べ30%低い値が維持されたと報告している。今回の骨折モデルにおいて、二回骨折群の4週後(初回骨折から8週後)では、骨密度が非骨折側に対し大腿骨で85.9%、脛骨で85.8%であり、一回のみ骨折させた場合の4週群(大腿骨83.4%、脛骨82.6%)よりは低くはならず、ほぼ同じ値を示した。したがって、この家兔後肢骨折実験モデルで示すように、骨量減少には一定の限界があり、それは骨折後4週における約20%の減少が下限であると考えられる。

さらに、これまでに明らかとなっていない点として、下限を迎えた骨量が回復するの否か、また、回復するならばどのように回復していくのかについて、明らかにした報告はない。

この点に関して、Donaldsonら³¹⁾は健康成人を30週間から36週間臥床させ、尿中カルシウム排泄量を測定したところ、実験終了後3週後によくカルシウム出納が正常化の方向に向かったが、なおも負の状態が続いていたと報告した。また、Knöflnerら³²⁾は腰痛患者を平均27日間臥床させたところ、1週間あたり平均0.9%の腰椎骨塩量の減少がみられ、4週間で減少した骨量がほぼもとに回復するには4カ月(約16週間)必要であったと述べている。

今回の実験では、骨折させてから4週以降、実験の終了に向けて骨量の回復が見られた。この現象は、一回骨折群、二回骨折群のいずれにも骨折後あるいは再骨折後4週以降から認められた現象で、骨量回復の程度や回復の期間とも類似した経過をとった。また、骨折させた脛骨のみならず、同側の大腿骨にも同様の回復の変化を認めていた。したがって、骨量の減少とその回復過程は骨折させた影響や骨折の治癒のみの影響ではなく、これによってもたらされた不動化、荷重制限が大きく関わっていると考えられる。骨折後12週の時点で骨折側の骨塩量は大腿骨で非骨折側の90.6%、脛骨で91.6%まで回復していたが、健側よりもまだ10%近く骨量が減少した状態であった。骨折後4週以降、12週にむけて緩やかに骨量は回復傾向にあったため、今回の実験系でも12週以降さらに観察を続ければ、骨折側の骨量は更に健側に近づくと考えられる。このように、一旦減少した骨量が回復するのは長期に渡る事が確かめられた。

以上より、今回の実験で使用した家兔の脛骨遠位端骨折モデルは、回収率が94.1%と高く、実験系を作成するうえで有用であった。このモデルの後肢に対し、一定の肢位をとり、DEXAを用いて測定することにより脛骨ならびに大腿骨の骨量を変動係数1%未満の高い再現性をもって評価できた。このモデルにおいて大腿骨遠位部および脛骨近位部は、非骨折側と比較して骨量の変化が大きく、回復の過程も追跡可能であることが明らかとなった。骨折により骨量が減少して行くが、骨量の減少は骨折後4週目に最大となり、非骨折側と比較して約20%の骨密度の減少が認められた。最も骨量が減少したこの時点で再骨折をさせても、骨量の減少量は20%以下にはならず、骨折による骨量減少には一定の下限があることが明らかとなった。これらの骨折後の骨量の減少は、骨折による不動や荷重制限などの外因子が取り除かれれば回復して行くことが明らかとなった。

結 論

外傷性骨萎縮の病態を検索する目的で日本白色家兔の脛骨遠位端を骨折させ、DEXA法を用いて骨塩量を測定し、骨萎縮の定量的評価と骨萎縮の回復過程の観察をおこなった。

1. 家兔下肢骨骨折モデルは、骨萎縮作成の動物実験モデルとして作成が容易で回収率もよく、外傷性骨萎縮のモデルとして適当であった。

2. DEXA法を用いた小動物の骨塩定量は変動係数1%未満の高い再現性が得られ、変化しにくい骨塩量の変動を定量するうえで最適であった。

3. 骨折による不動性、非荷重性の骨量減少には、一定の下限があり、20%の減少が下限と考えられた。

4. 骨折による不動化モデルでは、減少した骨塩量は荷重の再開や運動量の増加とともに一定の経過で回復すると考えられたが、12週以上の長期を要すると思われた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導御校閲賜りました恩師金沢大学医学部がん医科学専攻機能再建学研究分野(整形外科)富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接懇切なる御指導御助言を戴きました金沢医科大学整形外科講座松本忠美教授に深謝いたします。さらに、本研究に御協力戴きました金沢大学医学部がん医科学専攻機能再建学研究分野(整形外科)教室の諸先生方、リハビリテーション加賀八幡温泉病院放射線技師の方々に感謝いたします。

本研究の一部は、第6回日本整形外科学会基礎学術集会(1994年、東京)において発表した。

文 献

- 1) Brukhardt JM. Parathyroid and thyroid hormones in the development of immobilization osteoporosis. *Endocrinology* 81: 1053-1062, 1967
- 2) Geiser M. Muscle action, bone rarefaction and bone formation. *J Bone Joint Surg Br* 40: 282-311, 1958
- 3) Gillespie JA. The nature of the bone changes associated with nerve injuries and disuse. *J. Bone and Joint Surg.* 36-B: 464-476, 1954
- 4) Hardt AB. Early metabolic responses of bone to immobilization. *J. Bone Joint Surg Am* 54: 119-124, 1972
- 5) Izawa Y. Immobilization osteoporosis and active vitaminD: Effect of active vitaminD analogs on the development of immobilization osteoporosis in rats. *Calcif. Tissue Int* 33: 623-630, 1981
- 6) Kharmosh O. The effect of motor denervation on muscle and bone in the rabbit's hind limb. *Acta Orthop Scand* 36: 361-370, 1965
- 7) Landry M. The influence of immobilization on bone formation as evaluated by osseous incorporation of tetracyclines. *J Bone Joint Surg Br* 46: 764-771, 1964
- 8) Lindgren JU. Studies of the calcium accretion rate of bone during immobilization in intact and thyroparathyroidectomized adult rats. *Calcif. Tiss. Res.* 22: 41-47, 1976
- 9) Lindgren JU. The effect of thyro-parathyroidectomy development of disuse osteoporosis in adult rats. *Clinical Orthop* 118: 251-256, 1976
- 10) Nattsson S. The reversibility of disuse osteoporosis. *Acta Orthop Scand Supp* 144:5-10, 1972
- 11) Uthoff HK, Jaworski ZJG. Bone loss in response to long-term immobilization. *J Bone Joint Surg Br* 60: 420-429, 1978
- 12) Verhas M. Denineralization and pathological physiology of the skeleton in paraplegic rats. *Calcif. Tissue Int* 30: 83-90, 1980
- 13) 久保義信. 脊髄損傷麻痺域における急性骨萎縮に関する実験的研究. *日整会誌* 27: 421-439, 1933
- 14) 奥村秀雄, 山室隆夫, 笠井隆一, 林泰一, 松下 睦, 多田健治, 高橋 寛, 采野 進, 坪山直生, 吉田成仁. 実験的不動性骨粗鬆症. 骨の定量的分析法(乗松尋道編), 第1版, 93-99頁, 西村書店, 東京, 1986
- 15) Singh M, Nagrath AR, Maini PS. Changes in trabecular pattern of the upper end of the femurs as an index of osteoporosis. *J. Bone Joint Surg Am* 52: 457-467, 1970
- 16) 林 泰史. X線フィルムによる骨萎縮度の評価. 骨形態計測 7:139-147, 1990
- 17) 百武衆一, 後藤澄雄, 山懸正庸, 守屋秀繁. 骨粗鬆症の予防としての運動効果の縦断的研究. *臨床スポーツ医学* 11: 1271-1277, 1994
- 18) 岡野浩哉, 水沼英樹, 本庄滋一郎, 曾田雅之, 松井啓人, 伊吹令人. 閉経後骨粗鬆症に対するエストロゲン療法の実験. *THE BONE* 6: 97-104, 1992
- 19) 折茂 肇. 骨粗鬆症に対する 1α (OH) D₃の二重盲検試験. *THE BONE* 9: 117-122, 1995
- 20) Fisher GL. A phantom absorptiometer for in vivo and in vitro measurement of small animal bone density. *Biomed Eng* 5:196-213, 1974
- 21) 斉藤 宏, 中村隆一. X線写真からの定量 - Microdensitometerによる -. *日整会誌* 48: 479-486, 1974
- 22) 井上哲朗, 山下源太郎. X線像による骨萎縮度の判定. 骨形態計測(高橋栄明編), 第1版, 105-119頁, 医歯薬出版, 東京, 1981
- 23) 林 泰史, 山本吉蔵, 石橋利信. 手部X線写真の画像解析による新しい骨量測定法(DIP法: Digital Imaging Processing Method)の開発. *骨代謝*, 6: 214, 1988
- 24) 友光達志, 福永仁夫, 柳元真一. 種々の骨塩定量法の検討. *核医学技術* 8: 36-40, 1988
- 25) 福永仁夫, 大塚信昭, 曾根照喜. 脊椎骨phantomを併用したCTscanによる第3腰椎海綿骨の骨量測定法. *日医放会誌* 46: 659-664, 1986
- 26) 友光達志, 福永仁夫, 大塚信昭. シンチカメラを使用したDual Photon Absorptiometry装置の基礎的検討. *核医学* 24: 171-175, 1987
- 27) Safadi M, Shapira D, Leichter I, Reznick A, Silbermann M. Ability of different technique of measuring bone mass to determine vertebral bone loss in aging female rats. *Calcif. Tissue Int* 42: 375-382, 1988
- 28) Kimmel DB, Wronski TJ. Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int* 46: 101-110, 1992
- 29) Rambaut PC, Godde AW. Skeletal changes during space flight. *Lancet*: 9, 1050, 1985
- 30) Tavassoli M. Medical problems of space flight. *Am J Med* 8: 850, 1986
- 31) Donaldson CL, Hulley SB, Vogel JM. Effect of prolonged bed rest on bone mineral. *Metabolism* 19: 1071-1084, 1970
- 32) Kno erner B, Toft B. Vertebral bone loss; an unheeded side effect of therapeutic bed rest. *Clin Sci* 64: 537-554, 1983

Changes in Bone Mineral Density in Rabbit Lower Limb Fractures Measured by Means of Dual Energy X-ray Absorptiometry Yasuo Katsuki, Department of Restorative Medicine of the Neuro-Musculoskeletal System, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **110**, 243 — 251 (2001)

Key words osteoporosis, trauma, dual energy X-ray absorptiometry, bone mineral density

Abstract

It is known that when a bone fracture occurs, the bone mass around the fracture decreases. However, the cause and extent of bone atrophy and the process of recovery are yet to be clarified. This is due to the difficulty in measuring bone mass precisely, as well as to an absence of experimental methods for evaluating bone mass. In order to investigate changes in the bone mass and the process of recovery, rabbits were used as experimental subjects and changes in bone mass with time after a fracture were evaluated by considering the correlation between the degree of recovery and of weight-bearing capacity. The rabbits were divided into two groups; the first group having a fracture made only once and the second group (re-fracture group) having a fracture made twice. The first fracture was manually made on the distal end of the tibia, and in the re-fracture group, the second fracture was made at the same point four weeks after the first. Rabbits were divided into sub-groups (consisting of 8 rabbits each) and measured at time of 0, 2, 4, 6, 8, and 12 weeks after the first fracture, and 4 and 8 weeks after the second fracture. Changes in the quantity of bone mineral in the femur and tibia of the rabbits were measured by means of dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). This model system was suitable for the study of bone atrophy caused by trauma because it was easy to make, and the survival rate was high (91.4 %). DEXA was useful in measuring slight changes in the bone mass, giving highly reproducible data for small animals (coefficient of variation: 1% or less). The loss of bone mineral density due to the first fracture reached a maximum decrease of approximately 20 % compared to that of the control (unbroken) side at four weeks after fracture. Almost the same amount of change in bone atrophy and a similar recovery process were seen in the re-fracture group. Accordingly, it was deduced that there was a limit for bone mass reduction, 20% loss being the limit. The bone mass lost after the fracture was gradually regained during the period from 4 to 12 weeks after the fracture. We presume that the increase in weight-bearing capacity and mobility is related to the healing of the bone fracture. It was confirmed that it takes more than 12 weeks for a complete recovery of bone mineral following a fracture.