

An Experimental Study on the Ossification of Spinal Ligament in the Tiptoe Walking Yoshimura(TWY) mouse

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/2297/8592

TWY マウスの脊柱靱帯骨化に関する実験的研究

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

中 橋 謙 次

脊柱靱帯骨化自然発症モデルである TWY マウスを用いて靱帯骨化進展過程を病理学的に検討し、さらに骨の吸収と形成抑制および石灰化抑制作用を有するエチドロン酸二ナトリウム (etidronate disodium, EHDP) と、膵臓ランゲルハンス島 B 細胞を破壊し糖尿病を誘発するストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) が脊柱靱帯骨化に如何に影響を及ぼすかについて組織学的研究を行い、以下の知見を得た。TWY マウスの脊椎の組織学的変化は椎間板の靱帯附着部に強く発生した。6 週齢の TWY マウスでは前縦靱帯、後縦靱帯の肥厚および椎間板軟骨の靱帯内への突出を認め、8 週齢になると突出部の椎間板軟骨組織の中にアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP) 染色陽性の細胞を認めるようになった。10 週齢になると椎間板腹側の突出部で著しく増加した軟骨細胞が ALP 染色陽性となり、軟骨内骨化が起こっていることを示した。一方椎間板背側の後縦靱帯内には ALP 染色陽性の骨芽細胞様細胞を認め、結合組織性骨化も同時に生じていると解釈された。15 週齢以降、椎間板腹側では椎体皮質骨に連続する骨化が上下椎体から進展し、22 週齢になると靱帯は完全に骨組織に置き換わり、上下椎体間の骨性架橋が形成されていた。一方、10 週以降、頭一頸椎移行部の棘突起間および椎間板背側には壊死組織を伴う石灰化腫瘍が形成され、22 週までに大きく発達して脊柱管内に突出し、脊髓を圧迫していた。血清中の ALP 濃度の推移をみると、10 週齢および 22 週齢とも、TWY マウスはコントロールとして用いた ICR マウスより有意に高値を示し、また ICR マウスでは 22 週齢で 10 週齢より低下したのに対し TWY マウスでは 22 週齢でも高値を保った。TWY マウスにおける高い血清 ALP 濃度は、もっぱら骨原性の ALP によるものであることがわかった。22 週齢の TWY マウスで後頭部から第 2 胸椎までの脊柱管内の軟骨増生の組織像および骨化面積の合計を調べてみると STZ 群では無処置群に比べ有意に骨化面積が大きく、一方 EHDP 投与群は軟骨増生、骨化による脊髓への圧迫は軽度となり、骨化面積は無処置群に比べ小さくなる傾向にあるということがわかった。以上の脊柱靱帯骨化自然発症モデルである TWY マウスを用いた実験的研究により、その靱帯骨化には椎間板の靱帯附着部を中心に結合組織性骨化と軟骨内骨化の両方が関与していること、前縦靱帯と後縦靱帯では骨化の様子が異なることがわかった。しかも骨化進展に対して STZ は促進的に、EHDP は抑制的に作用するということが実験的に証明された。

Key words spinal ligament, ossification, TWY mouse, streptozotocin, etidronate disodium

脊柱靱帯骨化症のうち特に後縦靱帯骨化症は、脊柱管の前壁を形成する後縦靱帯に骨化がおこり、骨化巣が次第に増大して脊柱管を狭め、時に高度な脊髓圧迫症状をきたす疾患である。1975 年厚生省後縦靱帯骨化調査研究班が組織され、1981 年脊柱靱帯骨化症調査班と名称は変更されたものの、本症の成因解明のため全国的な研究が行なわれている。しかしいまだその成因と病態については不明な点が多く残されており、骨化形成に関して多方面の研究が行なわれている¹⁾。

本症の発症の原因については、全身性因子、および局所因子の両面からの研究が必要である。全身性因子には、先天性骨化素因、糖代謝異常、骨代謝性因子等が推察されている。後縦靱帯骨化症の同一家系内での発生頻度が高いことなどから、まず先天性骨化素因が脊柱靱帯骨化の発生において重要な役割を果たしていると考えられている²⁻⁶⁾。さらに臨床例では糖代謝異常が約 30~50% の頻度で合併すること⁷⁻¹⁰⁾、骨代謝に影響を与えるアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP) 活性が高値を示す傾向があること¹¹⁾、さらには他部位にも骨化を

合併する頻度が高いこと¹²⁾から全身性骨代謝異常が骨化進展に大きな役割を演じていることが考えられる。一方、局所的因子では椎間板の退行変性を基盤とし、後縦靱帯に反復的または持続的なストレスが加わり、これが後縦靱帯線維の変性と増殖を促し、さらにその過程で化生が発生して骨化が生じるとする仮説がある¹³⁾。

本研究では靱帯骨化自然発症モデルである TWY マウスを用いて、まず局所における脊柱靱帯骨化の進展様式を週齢を追って病理組織学的に詳細に観察し、さらに全身性因子として骨の吸収と形成抑制、および石灰化抑制作用を有するエチドロン酸二ナトリウム (etidronate disodium, EHDP)¹⁴⁾が靱帯骨化進展を阻止しうるか検討を行い、一方後縦靱帯骨化症患者が糖尿病を合併している臨床報告例から、靱帯骨化と糖尿病との間に関連があるのかを検討するため、膵臓ランゲルハンス島 B 細胞を破壊し、糖尿病を誘発するストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ)¹⁵⁾を用いて、脊柱靱帯骨化に対していかなる影響を及ぼすかについて実験的研究を行なった。

平成 6 年 8 月 3 日受付, 平成 6 年 12 月 22 日受理

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; D, disc; EHDP, etidronate disodium; EVG, elastica van Gieson; STZ, streptozotocin; TB, toluidine blue; VB, vertebral body

材料および方法

I. 実験動物および処置

TWY マウスは細田ら¹⁶⁾により紹介された。1978年実験動物中央研究所(神奈川)において ICR マウスより均一系をつくる目的で近親交配をおこなっている最中、8代目で発見された動物である。生後3週目頃から同腹仔の正常個体より体型が小さく四肢が硬直した様相を呈し、爪先立ちで歩くことから発見者の吉村幸夫氏の名前を得て、TWY (tiptoe walking Yoshimura) マウスと命名された。TWY マウスは全身の靭帯、特に脊柱靭帯骨化が自然に発生する(図1)。遺伝様式は常染色体劣性遺伝であることが明らかにされている¹⁷⁾。6週齢 TWY マウスを実験動物中央研究所から購入し、また対照として6週齢の ICR マウスを日本クレア(東京)から購入して用いた。食餌は日本チャールスリバー(横浜)の CRF-1 規格を、飲料水は水道水をそれぞれ自由に与え、照明時間は 8:45~20:15 の間とした。TWY マウス40匹および ICR マウス20匹を無処置群とし、22週齢まで自然経過を観察するとともに理学的検査、組織標本の作成に供した。また10週齢時において ICR マウスと TWY マウス各10匹に STZ 40mg/kg を連続5日間腹腔内投与した STZ 投与群および各10匹に EHDP 20mg/kg を週3回腹腔内投与し続けた EHDP 投与群を作成した。

1. STZ の投与量について

田中ら¹⁸⁾はマウスの腹腔内に STZ を 20mg/kg, 30mg/kg, 40mg/kg の各量の群をそれぞれ5日間連続投与し、血糖の推移を測定した結果、40mg/kg 投与では随時血糖値が 300mg/dl 以上となり、実験的糖尿病に近い状態が得られたとの知見を得た。従って本実験では STZ 投与量を 40mg/kg とした。STZ は Sigma (St. Louis, USA) より購入した。

2. EHDP の投与量について

Strates ら¹⁹⁾はラットを使って筋肉中に移植した脱灰骨組織片の石灰化に対する EHDP の抑制作用について調べた結果から、15mg/kg 皮下注射でこの石灰化をほぼ完全に抑制したと述べ、また慢性毒性試験では 30mg/kg 以上で体重増加抑制がみられたとの結果を得たことから、本実験では EHDP の投与量を 20mg/kg とした。EHDP は住友製薬(大阪)より入手した。

II. 血清の生化学的測定

10週齢および22週齢において ICR マウス、TWY マウスの各群から5匹から10匹についてネブタール(0.02mg/g)を腹腔



Fig. 1. A photograph of a TWY mouse.

内に投与し、全身麻酔を行い、脊椎のレントゲン撮影を行った後、右心室からの採血を行った。血清中の Ca, P, ALP は自動分析器 736-60E 型(日立、東京)を用いて、Ca は OCPC (o-cresolphthalein complexone) 法、P は酵素法、ALP は GSCC (german society for clinical chemistry) 改良法にて計測した。また ALP セパレーターを用いた電気泳動法(ヘレナ研究所、埼玉)により ALP2 型(肝型)と ALP3 型(骨型)を測定した。

III. 組織学的検討

ICR マウスの6週を1匹、8週を1匹、10週を2匹、15週を1匹、22週を2匹ずつ、TWY マウス各週群3匹をネブタール麻酔下に心室からの脱血により屠殺後、脊柱を採取し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。各週の匹数について EDTA で脱灰して矢状断標本を作成した。脱灰標本はパラフィン包埋の後、HE 染色、結合組織の観察を行なうためのエラスチン、ワン、ギーソン(elastic van Gieson, EVG) 染色、軟骨細胞機能を反映する基質グリコサミノグリカン分布の形態的観察として pH4.1 トルイジン青(toluidine blue, TB) 染色を行なった。

また固定した ICR マウスの6週を1匹、8週を1匹、10週を3匹、15週を1匹、22週を4匹、TWY マウス各週群4匹については靭帯の骨化進展の指標として、ALP 染色を行なった。ALP 染色は標本を 0.5M EDTA 液で 4℃ で3日から7日間脱灰し、30分水洗後ホルトの高張性ガムスクロス 20% 液に 4℃ 24時間つけ、水洗せずに濾紙で押さえて水分を取り、OCT コンパウンド包埋剤で包埋し凍結した。その凍結標本をクリオスタットで薄切し、ポリ-L-リジンでコーティングしたスライドガラスに張り付け蒸留水中に保存、アゾ色素法の渡辺変法で染色を行なった。反応液はリン酸ナフトール AS-BI 10mg, 0.05M プロパンジオール緩衝液(pH9.8) 20ml, フェースト レッド バイオレット LB ソールト 15mg で攪拌濾過した

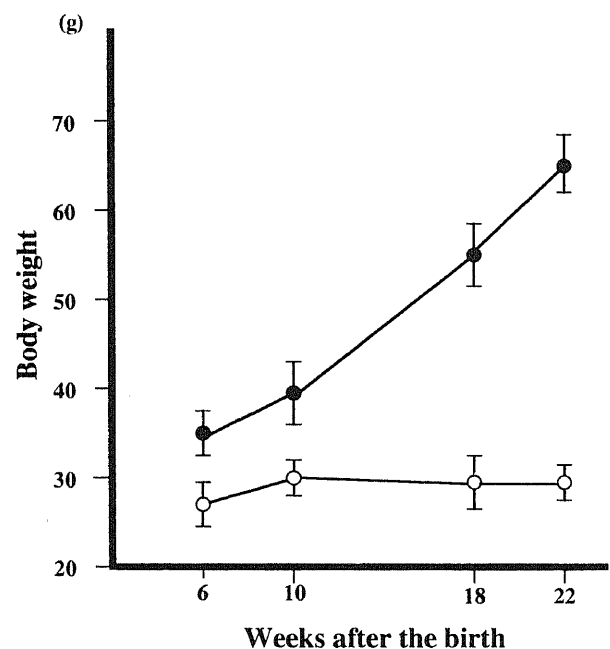


Fig. 2. Changes in the averaged body weights of ICR and TWY mice. ●, ICR mice; ○, TWY mice. Data are shown as mean±SD.

後、蒸留水に保存しておいた切片を入れて室温で20分反応させた。水洗後マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行い、水洗後蒸留水で24時間つけ、デシケーターで脱気を行いながらグリセリンで封入した。

さらに22週齢の無処置群のうち ICR マウス 3 匹, TWY マウス 5 匹は屠殺後に、脊柱の非脱灰標本作成に供した。非脱灰標本は 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定、エタノールで脱水後

メチルメタクリル樹脂包埋を行い 70 μ m の薄切標本を作成して、コンタクトマイクロラジオグラフィを行なった。撮影にはマイクロラジオグラフ装置 CMR 特別仕様型 (日本ソフテックス, 東京) を使用した。

IV. 骨化面積の測定

脊柱管内の軟骨の増生, および骨化面積の測定は、後頭部から第 2 胸椎高位にいたる部位の正中矢状断, 側方それぞれ

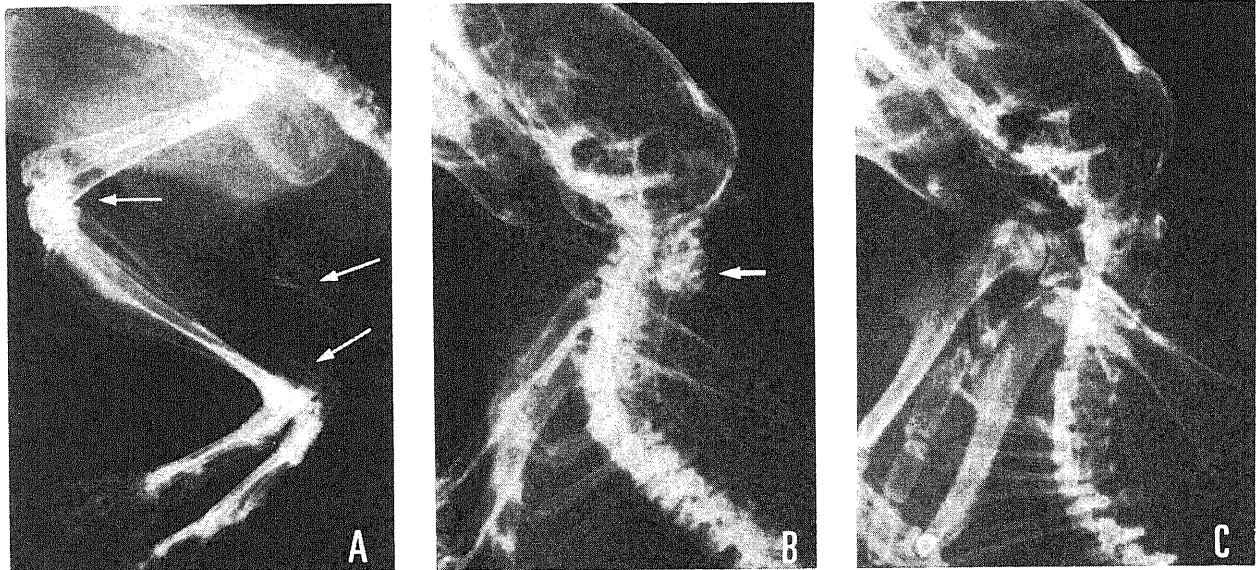


Fig. 3. Radiographs taken from a TWY mouse 22 weeks after the birth. Calcification is seen in various joints as well as in achilles tendon (A, arrows). The animal shows large calcified deposits formed dorsally to the cranio-cervical junction (B, arrow). An ICR mouse shows no such a calcification through the cervical area (C).

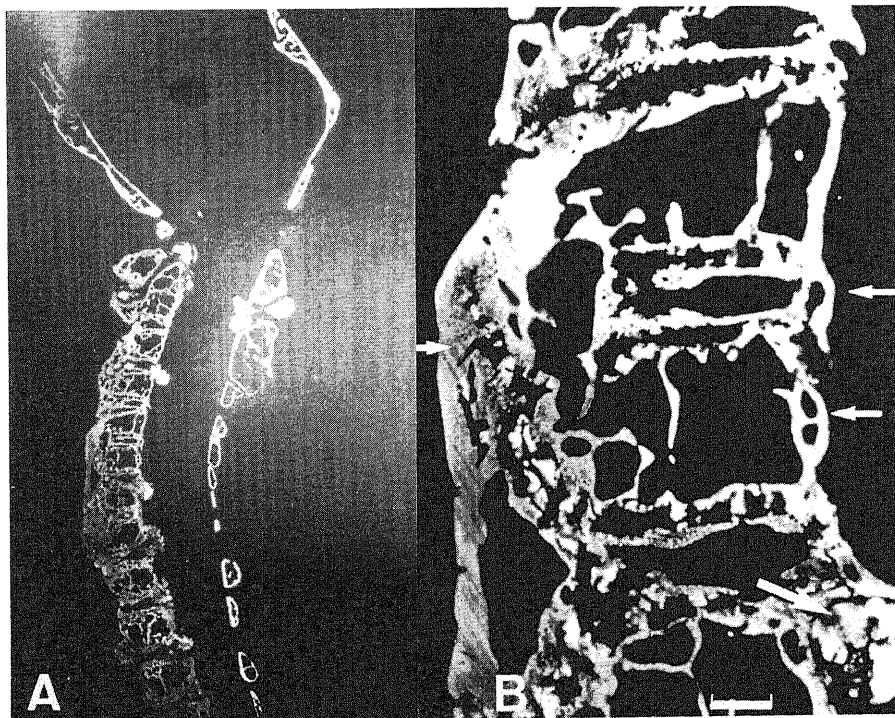


Fig. 4. Contact radiographs taken from the cervical spine of the TWY mouse 22 weeks after the birth. (A) Lateral view of the entire cervical spine showing calcification at various sites. (B) Magnified contact radiograph of the vertebral bodies showing spinal ligaments calcified anteriorly as well as posteriorly (small arrows). Calcification in the posterior wall of intervertebral discs are also demonstrated (big arrow). The bar scale indicates 0.3 mm.

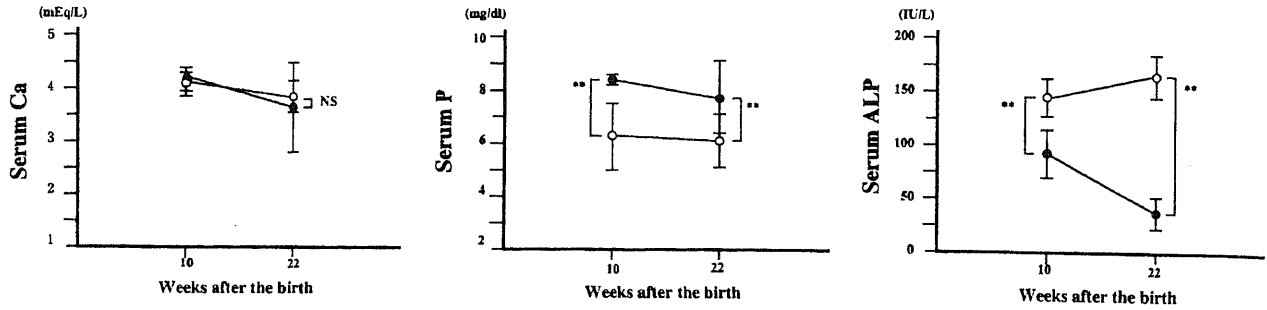


Fig. 5. Changes in the serum calcium (A), phosphate (B), and ALP (C) levels of the TWY and ICR mice. ●, ICR mice; ○, TWY mice. NS, statistically not significant. **, $p < 0.01$.

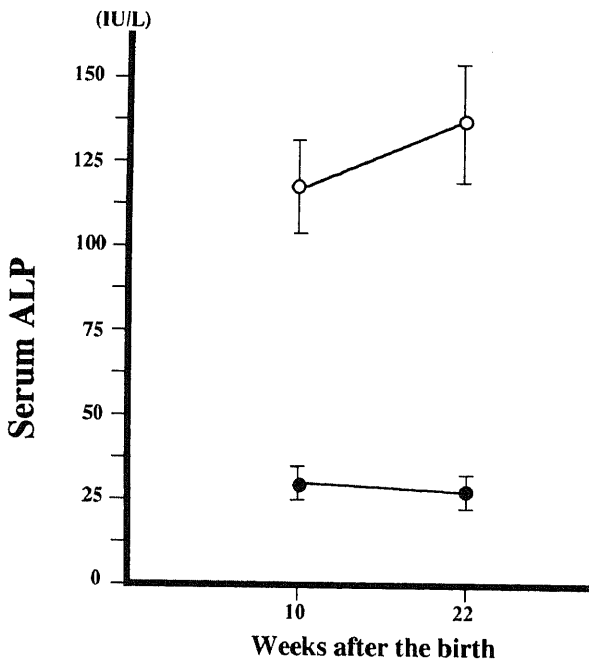


Fig. 6. Changes in the serum levels of ALP type2 and type3 in the TWY mice. ●, type2; ○, type3.

100 μ m, 200 μ m 矢状断での HE 染色標本 3 スライスの平均から、画像解析装置 XY デジタイザー (グラジイメイト SQ-3000, オスコン, 東京) を用いて行なった。

V. 統計学的検定法

得られた成績はすべて平均値±標準偏差で示した。多群間の平均値の差の検定には一元配置分散分析のち、Scheffé の多変比較変法、または二元配置分散分析のち、Tukey-Kramer の多変比較変法を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

成 績

I. 理学的所見

TWY マウスは ICR マウスにくらべ体型は小さく 10 週齢のオスの体重が TWY マウスで $29.9 \pm 1.15g$ ($n=20$) であり、ICR マウスが $39.6 \pm 3.55g$ ($n=10$) であった。22 週齢の TWY マウスの体重は $29.6 \pm 1.51g$ ($n=5$) で、ICR マウスの体重は $63.4 \pm 2.79g$ ($n=5$) であった。ICR マウスが加齢とともに体重増加がみられたのに対して、TWY マウスの体重は 10 週齢でピー

クに達した (図 2)。

TWY マウスのレントゲン像では 10 週齢で四肢の関節周囲、アキレス腱、口髭毛包部に石灰沈着を認め、加齢とともにそれが増加し、22 週齢では四肢関節は著しく硬直し、関節可動域が高度に制限されるようになった (図 3A)。また頸椎のレントゲン写真では 22 週齢の TWY マウスでは全例に後頭部-頸椎移行部の棘突起間に巨大な石灰化腫瘤を認め、靭帯の骨化により椎体は全体的に肥厚し、椎体辺縁が不鮮明になった (図 3B)。ICR マウスではそのような所見を認めなかった (図 3C)。

コンタクトマイクログラフィーでは 22 週齢の TWY マウスでは椎間板の高さは保たれているが、上下椎体間で皮質骨の架橋形成を認めるようになり、また椎間板後方に著明な石灰沈着を認めるようになった (図 4)。

II. 血清学的所見

靭帯骨化が生じない対照の ICR マウスと靭帯骨化自然発症モデルの TWY マウスの血清 Ca の値は、ICR マウスの 10 週齢が $4.18 \pm 0.25mEq/L$ ($n=5$)、22 週齢が $3.66 \pm 0.90mEq/L$ ($n=8$)、TWY マウスの 10 週齢が $4.10 \pm 0.24mEq/L$ ($n=6$)、22 週齢が $3.87 \pm 0.26mEq/L$ ($n=10$) であった。Ca の値は加齢とともに各マウスにおいて減少傾向がみられたが有意な差はなかった。また ICR マウスと TWY マウスの血清 Ca の値に有意差はなかった (図 5A)。

血清 P の値は ICR マウスの 10 週齢が $8.24 \pm 0.27mg/dl$ ($n=5$)、22 週齢が $7.86 \pm 1.26mg/dl$ ($n=8$)、TWY マウスの 10 週齢は $6.18 \pm 1.25mg/dl$ ($n=6$)、22 週齢は $6.06 \pm 1.16mg/dl$ ($n=10$) であった。血清 P の値は ICR マウス、TWY マウスともに加齢とともに減少傾向がみられたが有意な差はなかった。しかし TWY マウスの血清 P の値は ICR マウスに比べ有意に低値を示した ($p < 0.01$) (図 5B)。

血清 ALP は、ICR マウスの 10 週齢では $91.01 \pm 19.17IU/L$ ($n=5$)、22 週齢では $38.88 \pm 11.99IU/L$ ($n=8$)、TWY マウスの 10 週齢では $146.67 \pm 17.82IU/L$ ($n=6$)、22 週齢では $165.00 \pm 21.21IU/L$ ($n=10$) であった。TWY マウスは ICR マウスに比べ血清 ALP の値が各週齢で有意に高値を示し ($p < 0.01$)、また ICR マウスでは加齢とともに血清 ALP が減少するのに対し、TWY マウスは高値を維持していた (図 5C)。

血清 ALP 活性が高値を維持することが骨性由来か否かを検討するために、ALP アイソザイムを計測した。10 週齢の TWY マウスの ALP 2 型は $28.01 \pm 3.40IU/L$ ($n=4$)、ALP 3 型は $118.66 \pm 14.41IU/L$ ($n=4$) であり、22 週齢の ALP 2 型は $27.39 \pm 3.52IU/L$ ($n=4$)、ALP 3 型は $137.61 \pm 17.69IU/L$ ($n=4$) であった。加齢により肝由来の ALP 2 型が減少するの

に対して骨由来の ALP 3 型は増加傾向を示していることがわかった (図 6).

EHDP 投与群, STZ 投与群の血清 ALP 値の変化を調べた結果では, EHDP, STZ それぞれの投与前, 投与後において, ICR マウスでは有意な差はみられなかった. TWY マウスでは 10 週齢の血清 ALP が $146.67 \pm 17.82 \text{ IU/L}$ ($n=6$) であるのに対して, 22 週齢の無処置群 ($n=10$) では $165.00 \pm 21.21 \text{ IU/L}$ であり, また EHDP 投与群 ($n=10$) では $85.30 \pm 6.83 \text{ IU/L}$, STZ 投与群 ($n=10$) では $430.80 \pm 63.46 \text{ IU/L}$ であった. 各群間に有意差が認められた ($p < 0.01$) (図 7). ALP 3 型 (骨型) は無処置群 ($n=4$) が $137.61 \pm 17.69 \text{ IU/L}$ であるのに対し EHDP 群では $78.79 \pm 7.11 \text{ IU/L}$ ($n=2$), STZ 群で $367.12 \pm 35.05 \text{ IU/L}$ ($n=5$) で, 各群間に有意差が認められた ($p < 0.01$) (図 8).

Ⅲ. 組織学的所見

TWY マウスの脊椎の変化は主に椎体腹側および背側の椎間板靱帯附着部の部分に強くみられ, 背側の後縦靱帯骨化による突出は, 10 週齢からみられ, 加齢とともに脊髄圧迫を強めた. また後頭部一頸椎移行部の後方に石灰化腫瘤と考えられる組織が形成され, 脊髄を圧迫していた (図 9). 椎体腹側の椎間板靱帯附着部の経時的変化を HE 染色でみると, 6 週齢では多椎間にわたる前縦靱帯組織, 椎間板軟骨の増生による突出を認めた (図 10A). 10 週齢では椎間板靱帯附着部の軟骨細胞があたかも火山の噴火による溶岩のごとく上下椎体へと広がる所見が特徴的に認められた. しかし炎症性細胞浸潤は認められず, また血管新生もなかった (図 10B). 15 週齢では, 部位によって椎体皮

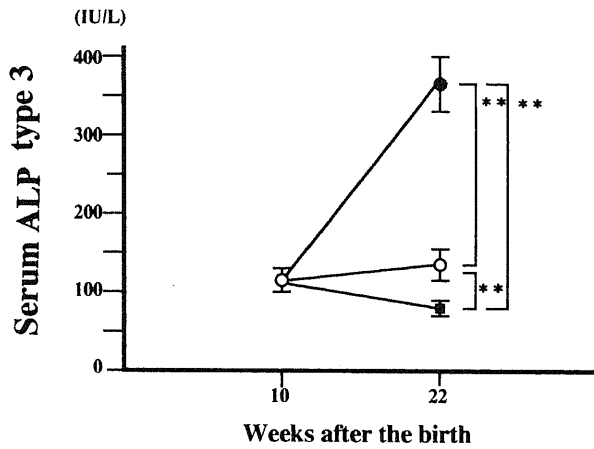


Fig. 7. Changes in the serum ALP levels of the TWY mice treated with EHDP and STZ. **, $p < 0.01$, between control (○), STZ-treated (●) and EHDP-treated animals (■).

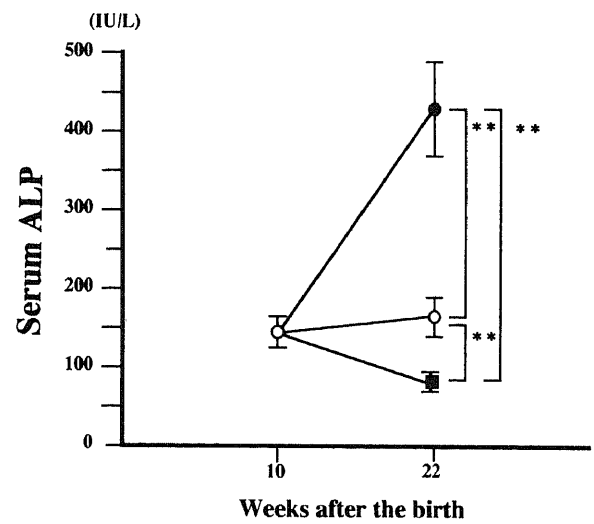


Fig. 8. Changes in the serum levels of ALP type3 in the TWY mice treated with EHDP and STZ. **, $p < 0.01$, between control (○), STZ-treated (●) and EHDP-treated animals (■).

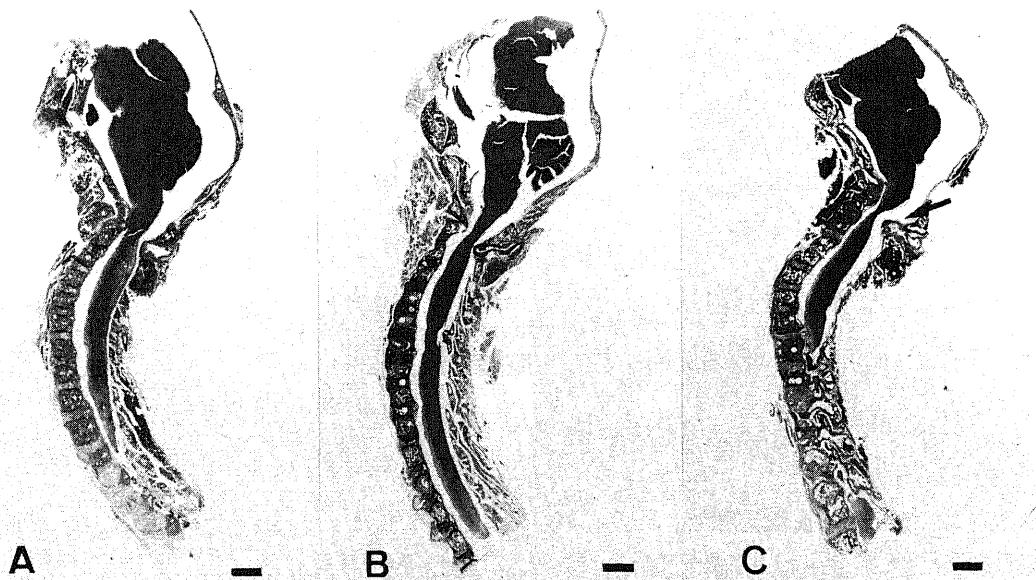


Fig. 9. Macroscopic photographs of the TWY mouse cervical spines in sagittal section. HE stain, each scale bar indicates 1 mm. (A) 10 weeks, (B) 15 weeks, (C) 22 weeks. Calcification of the cervical spine at the cranio-cervical junction compressed the spinal cord (arrow).

質骨に連続する骨化像が上下椎体から伸びはじめた。しかし椎間板の狭少化は認めなかった(図 10C)。22週齢になると上下椎体からの骨性架橋が完成された(図 10D)。一方、椎体背側の椎間板靭帯附着部の経時的変化をみると6週齢では後縦靭帯の肥厚、椎間板軟骨の増生による突出を認め、椎体腹側の所見と類似していた(図 11A)。しかし10週齢では椎間板突出部を中心とする靭帯内に細胞核の見られない無構造な組織が生じた(図 11B)。15週齢では、無構造な組織はさらに拡大していた。その中には多くの組織間隙が存在し、核を認めないため、壊死組織と考えられた(図 11C)。22週齢では、壊死組織の拡大で椎間板後部はさらに脊柱管内に突出した(図 11D)。

コンタクトマイクログラフで石灰化腫瘍のみられた TWY マウスの椎間板背側部、および後頭部-頸椎移行部に EVG 染色を行なうと、10週齢で出現する無構造組織は、フクシンにより

赤く染まる膠原線維をもたないため、石灰化を伴う壊死組織であると考えられた(図 12A)。22週齢になると無構造組織が拡大し、その外側を薄く骨化した靭帯が覆っていた(図 12B)。一方椎間板の腹側の椎間板靭帯附着部では無構造組織を示さず、上下の椎体から連続する骨化層で架橋されていた(図 12C)。これに対し ICR マウスは22週齢になっても無構造組織や骨化はみられなかった(図 12D)。

TB 染色では10週齢の TWY マウスにおいて腹側および背側の椎間板靭帯附着部にみられる軟骨細胞(図 13A, B)は ICR マウスの軟骨細胞(図 13C)に比べ線維軟骨様小細胞が多数みられ、この部位での石灰化が線維軟骨形成を介して進展することが示唆された。また TWY マウスは椎間板の突出部で染色性は著明に低下するが、本来の椎間板に相当する部位では染色性は保たれており、椎間板変性を示す所見は認めなかった(図

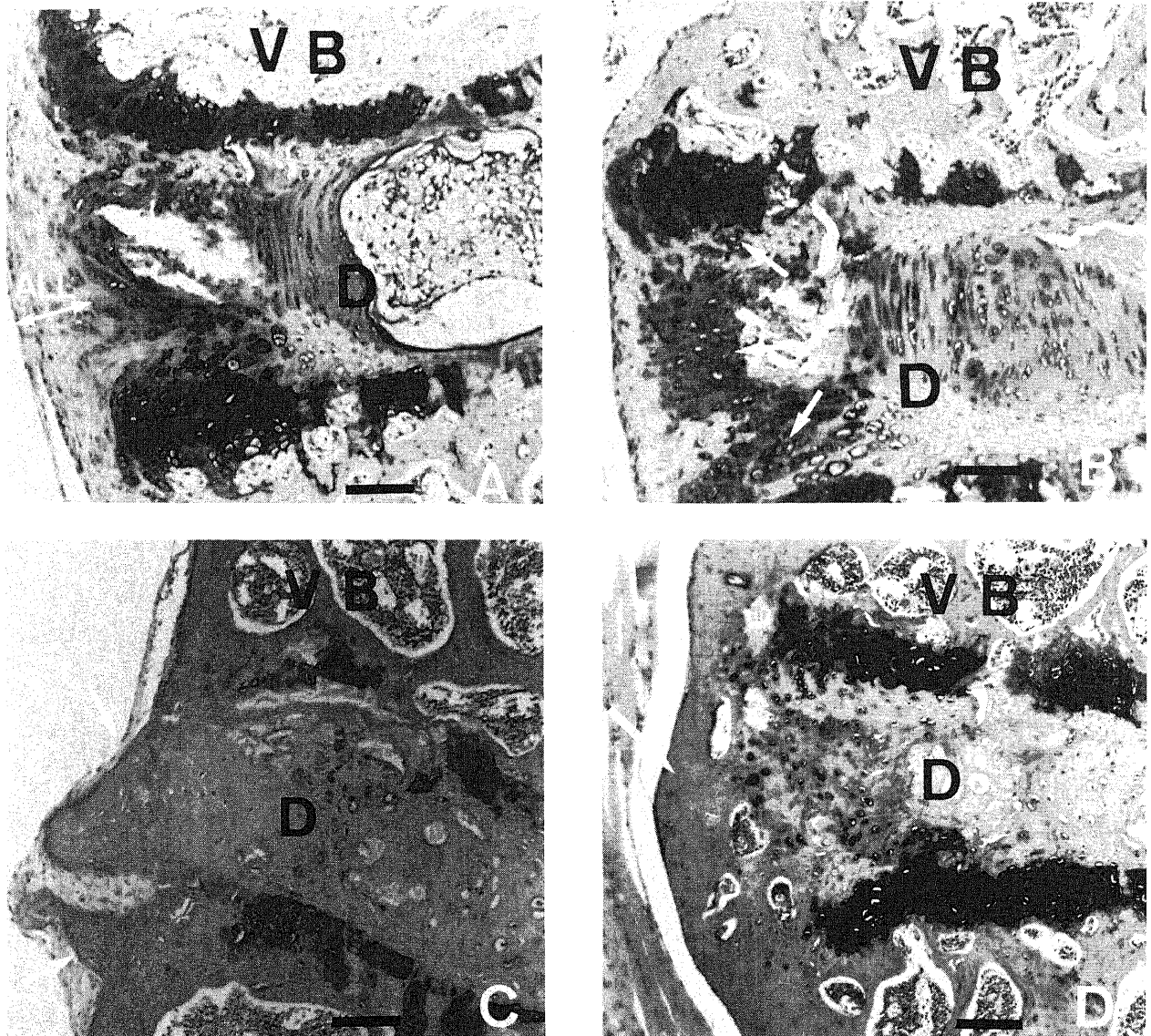


Fig. 10. Microscopic photographs of the ventral enthesis portion of the cervical spine of TWY mouse in sagittal section. HE stain, each scale bar indicates 40 μ m. (A) 6 weeks. Hypertrophy of the anterior longitudinal ligament (ALL) is noted. (B) 10 weeks. Hyperplastic projection of the disc cartilage (arrows) is observed. (C) 15 weeks. Enchondral ossification (arrow) is observed around the corner of the vertebral body. (D) 22 weeks. Bony bridge formation (arrow) is seen between the vertebral bodies. VB, vertebral body; D, disc.

13A, B).

靭帯の骨化進展をみる指標として用いた ALP 染色では、8週齢の TWY マウスでは腹側の椎間板軟骨組織に染色陽性細胞を認めた (図 14A)。10週齢になると腹側の椎間板の染色陽性軟骨細胞は著しく増加して、前縦靭帯内に侵入した。すなわち HE 染色で火山の噴火のごとき様相を呈した軟骨増生は ALP の発現を伴うため、骨化の前段階であることが示された (図

14B)。しかし22週齢では椎間板および前縦靭帯の骨化した架橋部ともに ALP 染色陽性細胞の数は著しく減少した (図 14C)。一方8週齢の後縦靭帯内には、すでに明らかな染色陽性の骨芽細胞様細胞が列をなしており (図 15A)、10週齢になると増生した椎間板軟骨組織の中に染色陽性細胞が多数みられるとともに軟骨中心部が壊死に陥った (図 15B)。15週齢になると壊死組織の周囲に染色陽性の軟骨細胞がみられ (図 15C)、22週齢では壊

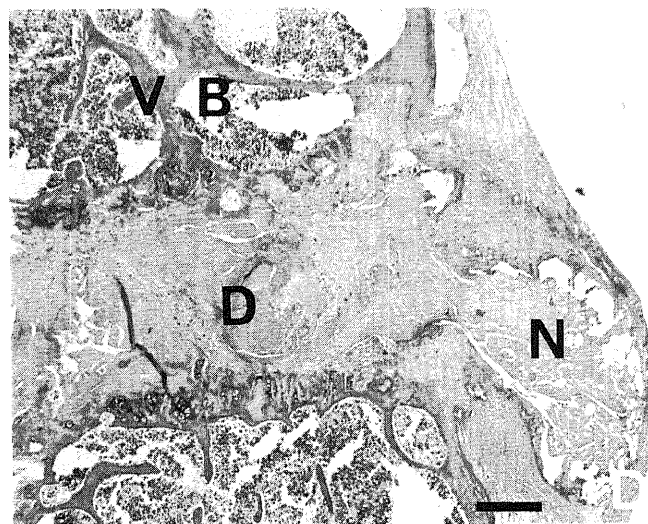
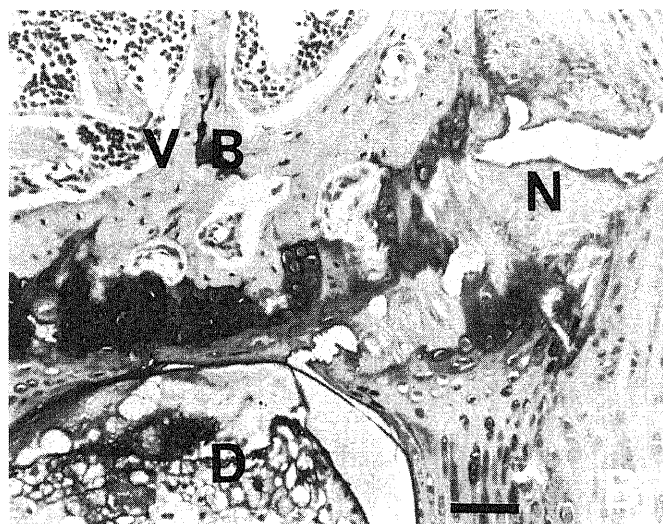
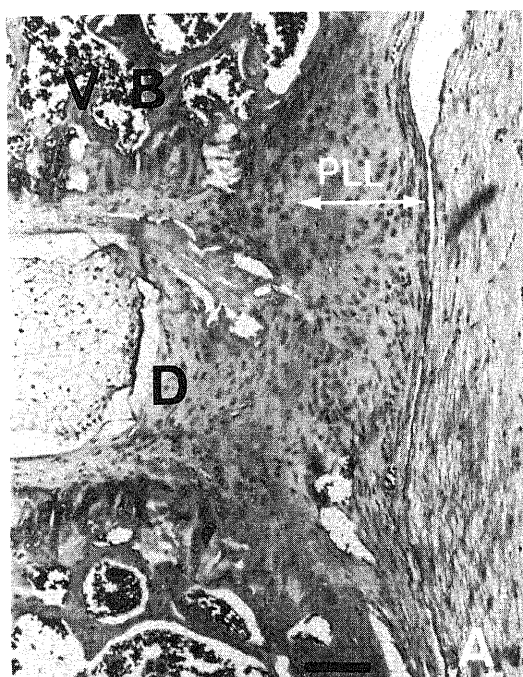


Fig. 11. Microscopic photographs of the dorsal enthesis portion of the cervical spine of TWY mouse in sagittal section. HE stain. (A) 6 weeks. Hypertrophy of the posterior longitudinal ligament (PLL) is noted. Scale bar, 40 μ m. (B) 10 weeks. Necrotic tissue (N) is observed. Scale bar, 25 μ m. (C) 15 weeks. Necrotic tissue is increased in volume. Scale bar, 40 μ m. (D) 22 weeks. Necrotic tissue protrudes remarkably. Scale bar, 40 μ m. VB, vertebral body; D, disc.

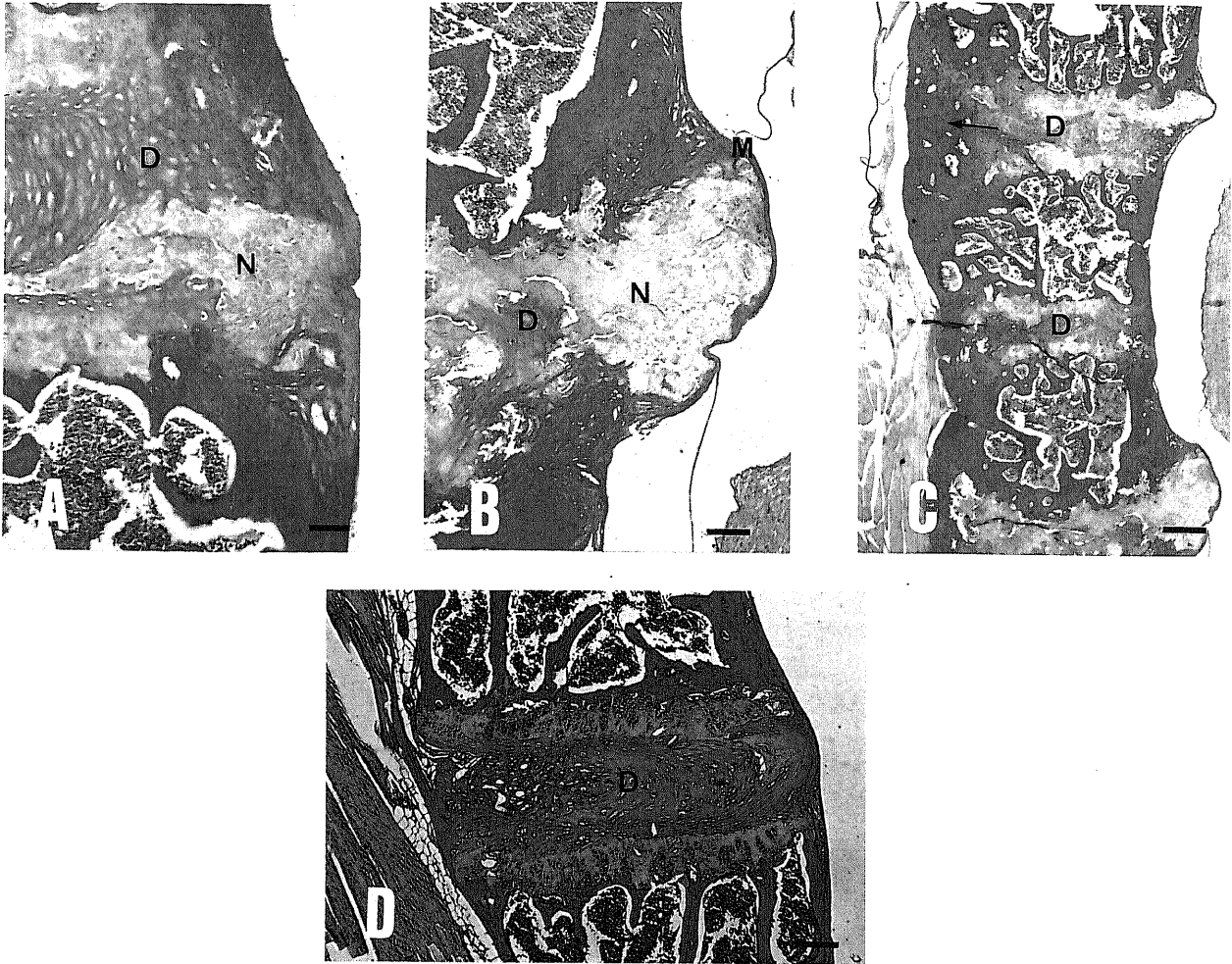


Fig. 12. Microscopic photographs of the dorsal enthesis portion of the cervical spine in sagittal section. EVG stain. (A) TWY mouse, 10 weeks. Necrotic tissue (N) is observed in the posterior longitudinal ligament. Bar scale, $30\ \mu\text{m}$. (B) TWY mouse, 22 weeks. Membranous ossification (M) surrounds the necrotic tissue. Bar scale, $40\ \mu\text{m}$. (C) TWY mouse, 22 weeks. Vertebrae are connected by bony bridge in the anterior spinal ligament area (arrow). Bar scale, $130\ \mu\text{m}$. (D) ICR mouse, 22 weeks. No abnormal ossification is seen. Bar scale, $65\ \mu\text{m}$. D, disc.

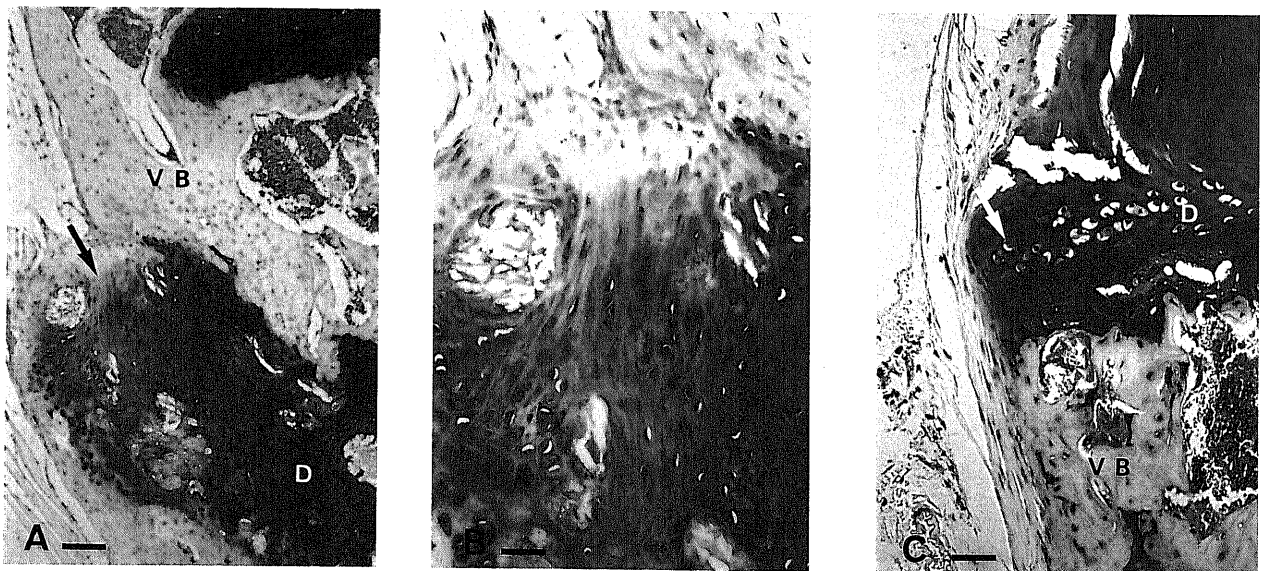


Fig. 13. Microscopic photographs of the ventral enthesis portion of the cervical spine in sagittal section. TB stain. (A) TWY mouse, 10 weeks. Many small fibrocartilage-like cells are seen (arrow). Bar scale, $30\ \mu\text{m}$. (B) Magnified photograph of a part indicated by an arrow in A. Bar scale, $20\ \mu\text{m}$. (C) ICR mouse, 10 weeks. Only large hyaline cartilage cells (arrow) are seen. Bar scale, $40\ \mu\text{m}$. VB, vertebral body; D, disc.



Fig. 14. Microscopic photographs of the ventral enthesis portion of the cervical spine of the TWY mouse in sagittal section. ALP stain. (A) 8 weeks. Abundant ALP-positive cells (arrow) are found. Bar scale, 65 μ m. (B) 10 weeks. The ALP-positive cells demonstrate an extensive increase in number. Bar scale, 40 μ m. (C) 22 weeks. The ALP-positive cells (arrow) are decreased in number. Bar scale, 40 μ m. VB, vertebral body; D, disc.

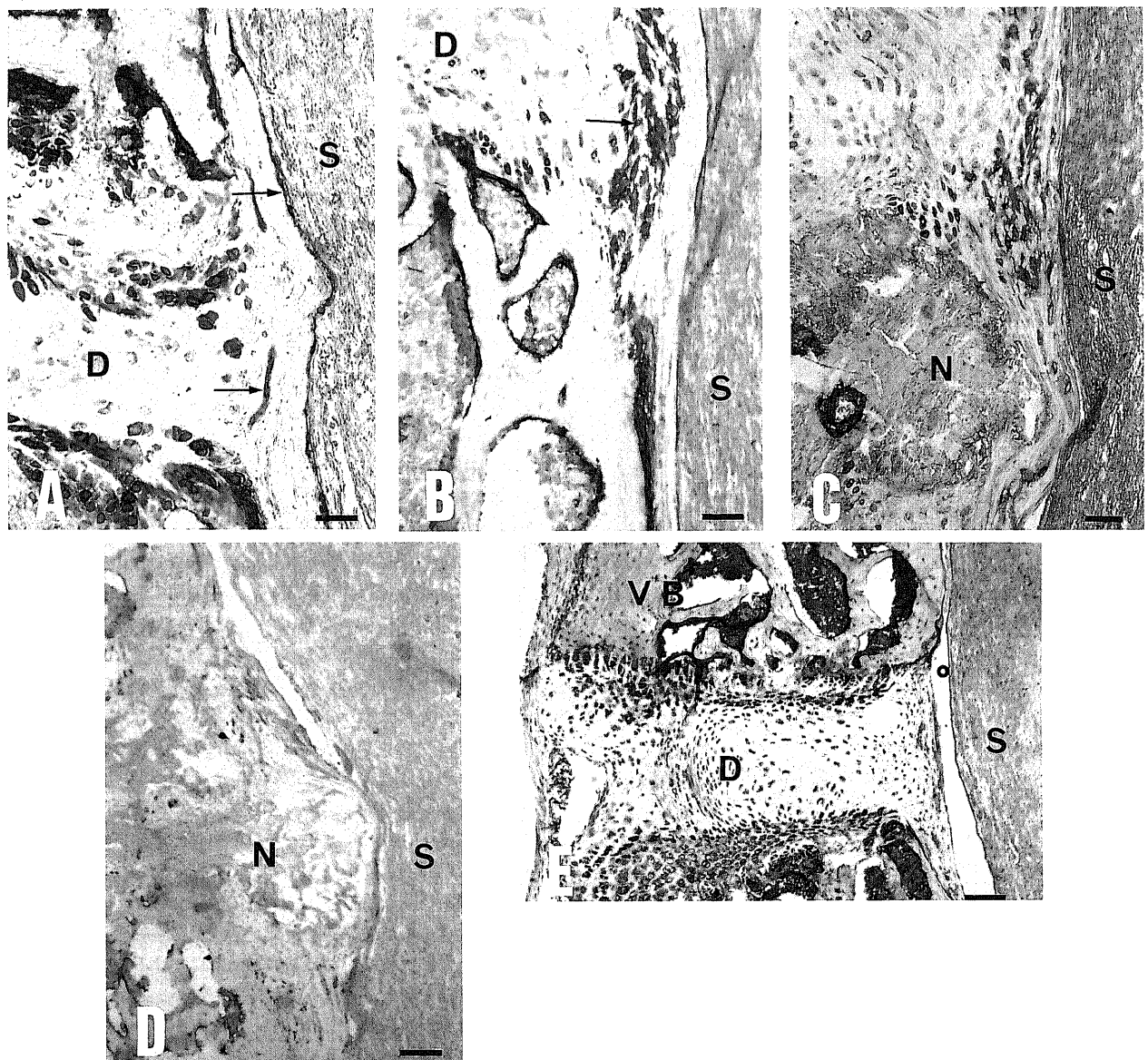


Fig. 15. Microscopic photographs of the dorsal enthesis portion of the cervical spine in sagittal section. ALP stain. Each bar scale indicates 25 μ m. (A) TWY mouse, 8 weeks. ALP-positive osteoblast-like cells (arrows) are found on the surfaces of the posterior longitudinal ligament. (B) TWY mouse, 10 weeks. Abundant ALP-positive cartilage cells (arrow) are found in the vertebral disc. (C) TWY mouse, 15 weeks. ALP-positive cells surround a necrotic tissue (N). (D) TWY mouse, 22 weeks. ALP-positive osteoblast-like cells remain on the surface of necrotic tissue. (E) ICR mouse, 10 weeks. No ALP-positive cells are present in the anterior or posterior longitudinal ligament. Bar scale, 65 μ m. D, disc; N, necrotic tissue; S, spinal cord.

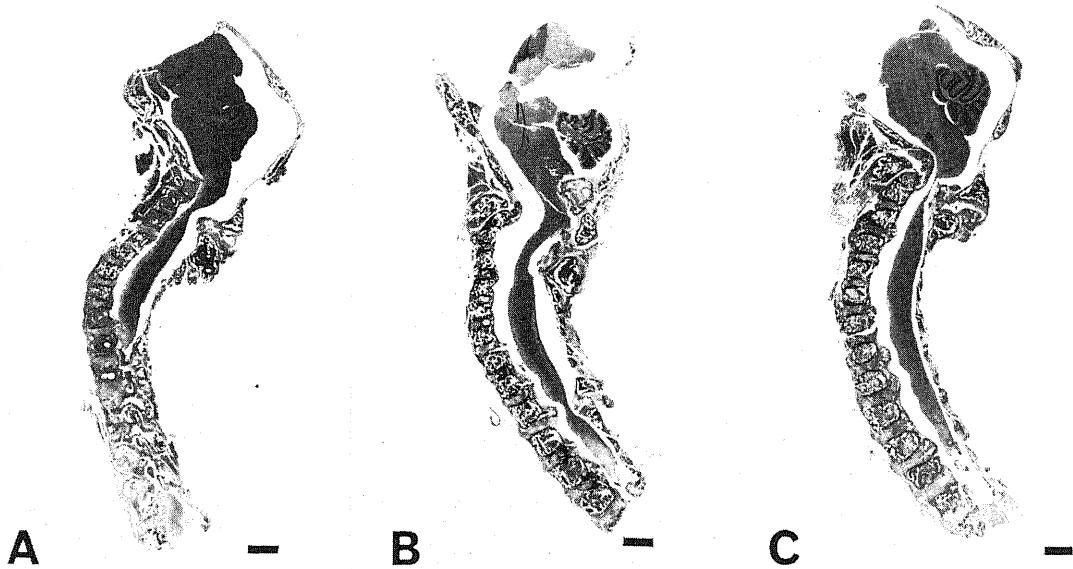


Fig. 16. Macroscopic photographs of the TWY mouse cervical spines in sagittal section 22 weeks after the birth. HE stain. Each bar scale, 1 mm. (A) Control group, (B) EHDP-treated group, (C) STZ-treated group.

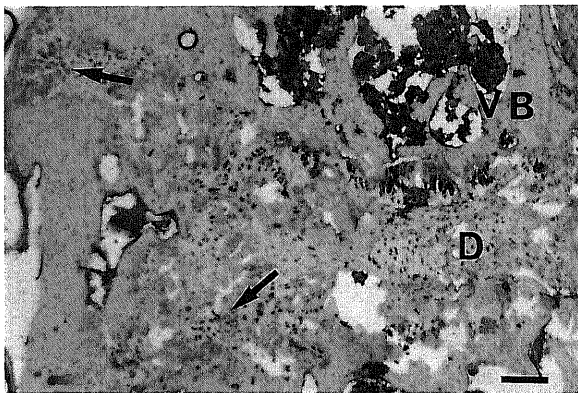


Fig. 17. Microscopic photograph of the ventral enthesis portion of STZ-treated TWY mouse 22 weeks after the birth. A large number of ALP-positive cells (arrow) is noted. ALP stain. Bar scale, 40 μ m. VB, vertebral body; D, disc.

死組織を中心とした突出を被うように後縦靭帯内に染色陽性の骨芽細胞様細胞が認められた(図 15D)。しかし ICR マウスでは椎間板や前縦靭帯、後縦靭帯組織の中に ALP 染色陽性細胞は全く認めなかった(図 15E)。

次に22週齢 TWY マウスの STZ および EHDP 投与群での組織学的所見をみると、無処置群に比較して椎間板靭帯附着部前後の骨化および後頭部-頸椎移行部の石灰化腫瘤のいずれも EHDP 投与群ではより軽度であり、STZ 投与群ではより著しく脊髄を圧迫していた(図 16)。ALP 染色では EHDP 投与群で、腹側の椎間板靭帯附着部に染色陽性細胞は認めなかったが、STZ 投与群では染色陽性細胞が認められ、無処置群で骨化が終了する週齢でも骨化が進行していることがわかった(図 17)。

IV. 骨化面積

22週齢の後頭部から第2胸椎までの脊柱管内の軟骨増生およ

び骨化面積を TWY マウスで調べると、無処置群 ($n=10$) では、 $1.29 \pm 0.35 \text{ mm}^2$ 、EHDP 投与群 ($n=10$) では $1.08 \pm 0.31 \text{ mm}^2$ 、STZ 投与群 ($n=10$) では $1.74 \pm 0.49 \text{ mm}^2$ であった。STZ 投与群は自然経過群にくらべ有意に骨化面積は大きく ($p < 0.05$)、一方 EHDP 投与群は自然経過群にくらべ小さい傾向を示した。

考 察

本邦における後縦靭帯骨化症の報告は1960年月本¹⁹⁾が「頸部後縦靭帯骨化により脊髄圧迫症候を呈した1剖検例」として報告したのが最初である。続いて1964年寺山²⁰⁾は後縦靭帯骨化症の臨床的、病理学的検討を行い、椎間板の後方突出により損傷された後縦靭帯線維の断裂、および周囲の静脈叢、結合織の断裂の修復過程によって骨化が起こるのではないかと推論した。一方外国では1838年に Key²¹⁾が2例の剖検例を脊椎靭帯の疾患に対する対麻痺についてと題し、世界で最初に報告しているが、独立した疾患として認識されるようになったのは、1969年 Breidahl²²⁾が日本人病として3例を報告して以来である。日本では、月本の報告以来多数報告されているが、人種間で明かな差があり、Breidahl 以後の諸外国からの報告は数編散見される程度である。1975年厚生省後縦靭帯骨化研究班が組織されて以来後縦靭帯骨化についての系統だった研究がなされるようになり、臨床病態、治療体系については確立されつつあるが、疫学調査をはじめ放射線学的研究、病理組織学的研究、生化学的研究から動物実験にいたる基礎的分野における研究はまだその成因の解明を明らかにするに至っていない。しかしながら後縦靭帯骨化の成因には局所的因子となんらかの全身の因子が存在し、これらが複雑に関連し合って靭帯の機構と組成を変え、骨化を発生し増大させるものと考えられる。

局所的因子として佐々木²³⁾は後縦靭帯および骨膜の椎体辺縁附着部の損傷が骨化発生機転の始まりであり、損傷部位の修復機転としてまず間葉系細胞が賦活化され、軟骨形成→石灰化→骨形成という軟骨内骨化の過程を経て本症が発生するのではな

いかと推論している。また都築²⁰は椎間板変性によって起こる構築学的弱点が後縦靭帯付着部の靭帯線維になんらかの骨化誘因を引き起こし、骨化素因と相まって靭帯骨化が発生すると推論している。

一方局所的因子のほかになんらかの全身的素因が関与しているという報告も多数あり、糖尿病、遺伝的素因、全身的退行変性、骨代謝異常などが指摘されている²⁰⁻²²。

そこで、脊柱靭帯骨化自然発症モデルともいえる実験動物 TWY マウスを検討し、自然に局所発生する骨化進展様式を病理学的に観察し、さらに全身的因子として糖尿病を誘発するとされる STZ、および骨化抑制作用があるとされる EHDP が脊柱靭帯骨化にいかなる影響をおよぼすかを検討することは、前述の全身性、局所性因子の病態解明に有意義な研究と考える。

TWY マウスにおける脊柱靭帯骨化の初期像はまず椎体隅角部に認められる。椎体隅角部は脊柱靭帯線維の付着部で、この部位での変化が重要と考えられる。本研究により、TWY マウスにおける骨化は6週齢で椎体腹側の靭帯の肥厚、靭帯付着部の椎間板軟骨の増生として始まること、10週齢以降増殖した椎間板軟骨細胞が活発に靭帯内に侵入するとともに骨化していくこと、22週齢までに椎間板腹側を中心に上下椎体からの骨性架橋が癒合して靭帯骨化が完成されることがわかった。一方椎間板背側部での靭帯肥厚も8週齢には椎間板靭帯付着部を中心に広がり、すでに後縦靭帯内には骨芽細胞様細胞がみられた。10週齢以降椎間板軟骨細胞が活発に靭帯内に侵入して来るが、徐々に壊死組織の広がりや靭帯骨化が完成されていった。後頭部一頸椎移行部棘突起間にみられた突出物や椎間板背側の靭帯付着部の膨腫は組織の壊死を伴う石灰化腫瘍であり、脊椎の腹側とは靭帯の骨化様式が異なることがわかった。

TWY マウスの血清 Ca 値は ICR マウスとの間に有意差は無く、血清 P 値は有意に低値を示した。Genant ら²³は低リン血症を有する一群に軟部組織の異常石灰化や骨硬化症を生じる症例を報告しており、Ca, P の代謝異常が靭帯骨化の全身的な背景因子であることを想定させる。血清 ALP 値は ICR マウスに比べ常に高値を示し、ICR マウスではその値が加齢とともに減少するのに対し TWY マウスは高値を維持した。このことは TWY マウスの靭帯骨化に伴い椎間板および靭帯内に ALP 染色陽性の軟骨細胞および骨芽細胞様細胞が多数みられた組織学的所見と一致し、TWY マウスの骨形成が亢進していることを示した。

靭帯骨化に関与する細胞の起源に関しては、靭帯の未分化間葉系細胞であるとの考えがある²⁰。この未分化間葉系細胞は多分化能を有し、線維芽細胞や骨原性未分化間葉系細胞へと分化し、さらに骨原性未分化間葉系細胞は前骨芽細胞または前軟骨芽細胞のいずれにも分化しうると考えられる²¹。

ヒトの後縦靭帯骨化症にみられる骨化形成について佐々木²⁰は、軟骨内骨化が主体であると述べ、山浦²¹は結合組織性骨化が主体であると述べているが、骨化の発生する部位により骨原性未分化間葉細胞が前骨芽細胞となれば結合組織性骨化となり、前軟骨芽細胞が主体であれば軟骨内骨化がおこるという可能性も考えられる。本研究では TWY マウスの靭帯骨化様式は脊椎腹側において、まず椎間板靭帯付着部に線維軟骨様小細胞が増加して靭帯内に侵入するとともに、石灰化軟骨形成が活発となり骨化へと進展する軟骨内骨化が主体であることがわかった。一方脊椎背側では早期より後縦靭帯内に骨芽細胞様細胞が

存在し、10週齢以降椎間板靭帯付着部に線維軟骨様小細胞が増加し始めていた。結合組織性骨化と軟骨内骨化の両方が関与していることが示唆される。また軟骨組織が壊死に陥って石灰化腫瘍を形成することも脊椎背側の特徴であった。

靭帯内における ALP 陽性細胞は椎間板由来の軟骨内骨化時の軟骨細胞の他に靭帯自身の間葉系細胞に由来する骨芽細胞様細胞にみられることが知られており^{20,21}、TWY マウスの靭帯骨化過程には軟骨内骨化と結合組織性骨化の両方が関与している可能性が高い。いずれにせよ TWY マウスの椎間板靭帯付着部で間葉系細胞を骨化に向かわせる素因があるものと思われる。

寺山²⁴は後縦靭帯骨化症患者711例に糖負荷試験を実施し、17.7%が境界型、26.2%が糖尿病型であったと述べた。これは一般住民の糖代謝異常の頻度と比較して、各年齢層とも有意に高率であった。

この結果から後縦靭帯骨化症は糖代謝異常と関連があることが示唆される。実験的には糖尿病ラットの骨基質に骨軟骨形成を刺激する非コラーゲン蛋白質が蓄積されやすいとの報告がある²⁵。

本研究では TWY マウスに STZ の投与を行い、糖尿病状態において調べた結果、非常に興味深い事実が示された。即ち STZ 投与を行なうと非投与群に比べ血清 ALP 値が有意に高くなり、しかも骨化面積が有意に増大するということがわかった。全身性素因が靭帯骨化の局所素因に大きく影響するという事実を照明しえた。

EHDP は無機ピロリン酸と同様の薬理作用を持ちリン酸カルシウムの結晶化を抑制すると同時に、結晶リン酸カルシウムの溶解を阻止する二面性を持っている。このため異所性骨化、異所性石灰化の防止とともに、骨溶解の亢進を阻止する目的で骨ペーজেット病などの治療に使用され、最近では骨粗鬆症の治療薬としても興味を持たれている薬剤である。EHDP の作用の特徴は低用量は骨吸収が抑制され、同時に核の増加した大型の破骨細胞が増加していることである。骨のハイドロキシアパタイトに高い親和性を有する EHDP が骨に特異的に分布し、骨内のハイドロキシアパタイト結晶の溶解を物理化学的に抑制すること、さらに破骨細胞の形成を抑制し、酸性フォスファターゼ染色性の低下といった破骨細胞の不活性化をもたらすことがその薬理作用として重要である。その結果 EHDP 低用量使用により骨吸収から骨形成へのフィードバックの情報伝達がブロックされ、結果的に骨形成が抑制される。一方 EHDP の高用量では骨吸収の抑制に加えて骨石灰化抑制も現れ、両作用がともに発現すると報告されている²⁶。

この EHDP を TWY マウスに10週齢から22週齢まで投与し続けると、22週齢の非投与群に比べ EHDP 投与群の ALP の値は有意に減少していた。ALP 染色陽性細胞は認めず、また脊柱管内骨化面積は非投与群に比べ、EHDP 投与群は小さい傾向にあり、全身性因子としての骨化抑制作用が局所に働いたと考えられた。

結 論

脊柱靭帯骨化自然発症モデルの TWY マウスを用い、その骨化進展様式を病理組織学的に観察するとともに、実験的に糖尿病を誘発する STZ、骨化抑制作用を有する EHDP の両薬剤を全身性に投与し、骨化進展がどのように修飾されるか調べた結果、次の結論を得た。

1. TWY マウスの靭帯骨化様式は、まず椎体腹側の椎間板靭帯付着部で線維軟骨様小細胞が増加し、石灰化軟骨形成が活発となり、次いで骨化へと進展していく軟骨内骨化形態をとっていた。一方椎体背側の後縦靭帯においては ALP 染色陽性の骨芽細胞様細胞の増殖が認められ、結合組織性骨化もおこっていることが示された。また壊死を伴う石灰化が椎間板背側および頸椎移行部にみられ、これが主に脊髄を圧迫していることが示された。

2. TWY マウスに STZ を投与し、実験的糖尿病状態にすると、血清 ALP 値が有意に高くなり、骨化巣も大きく進展していくことがわかった。

3. TWY マウスに EHDP の投与を行なうと、血清 ALP 値は低値にとどまり、ALP 染色陽性細胞が消失すると同時に骨化面積も小さくなった。EHDP は靭帯骨化の進展に抑制的に作用することが実験的に示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師金沢大学整形外科講座富田勝郎教授に衷心より深甚の謝意を表わします。また本研究の遂行にあたり御助言、御教示を戴きました金沢大学第1解剖学講座の井岡尚一教授、衛生学講座の橋本和夫名誉教授をはじめ福井医科大学整形外科講座の馬場久敏助教授、金沢大学整形外科講座川原範夫講師に深謝いたします。また実験遂行に御協力戴いた湯上 博文部技官、久富元治文部技官に感謝致します。なお本論文の一部は第7回日本整形外科学会基礎学術集会(1992年、東京)、第6回 SIROT(1993年、ソウル)において発表した。

文 献

- 1) 茂手木三男: 脊柱後縦靭帯骨化の成因をめぐって. 臨整外, 18, 583 (1983).
- 2) 齊鹿 稔: 脊柱後縦靭帯骨化の形態からみた成因および進展に関する検討. 日整会誌, 61, 1059-1072 (1987).
- 3) 寺山和雄, 和田光司, 大塚訓喜, 津山直一, 黒川高秀, 大谷 清, 山内裕雄, 山浦伊姿吉, 三浦幸雄, 金田清志, 原田征行, 国分正一, 井上駿一, 茂手木三男, 宮崎和躬, 小野啓郎, 片岡 治, 井形高明, 服部 奨, 酒匂 崇, 古庄敏行: 頸椎後縦靭帯骨化症患者を発端者とした家系調査による脊柱靭帯骨化症の遺伝学的分析. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班昭和58年度研究報告書, 17-27 (1984).
- 4) 山内裕雄, 伊沢和光, 藤原 稔: 頸椎後縦靭帯骨化症を中心とする米国における頸椎X線調査について. 整形外科, 28, 757-765 (1977).
- 5) Chin, W. S. & Oon, C. L.: Ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Brit. J. Radiol., 52, 865-869 (1979).
- 6) 佐々木和義, 山内裕雄, 伊沢和光: ドイツにおける頸椎の加齢変化のX線調査. 整形外科, 31, 585-590 (1980).
- 7) 森山明夫, 原田征行: 頸椎後縦靭帯骨化と糖尿病. 臨整外, 9, 906-907 (1974).
- 8) 佐々木正, 里見和彦, 堀内 光, 北村信一, 田中剛二, 松岡健平: 糖尿疾患の頸椎後縦靭帯骨化. 整形外科, 25, 1075-1081 (1974).
- 9) 後藤澄雄, 丹野隆明: 後縦靭帯骨化症における骨化の病態, 病因. 脊椎脊髄, 2, 647-652 (1989).
- 10) 渡辺秀男, 桐田良人, 宮崎和躬, 林 達雄, 山村 紘, 広藤英一: 頸椎後縦靭帯骨化症に対する手術療法とその成績. 日整会誌, 46, 919-921 (1972).
- 11) 酒匂 崇, 今村健志, 武富栄二, 松永俊二, 山口正男, 古賀公明, 園田俊郎, 藤吉利信, 屋敷伸治: 後縦靭帯骨化症患者から分離した靭帯組織の培養細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性の検討. 厚生省特定疾患後縦靭帯骨化症調査研究班平成2年度報告書, 142-145 (1990).
- 12) 寺山和雄: 頸椎の後縦靭帯骨化について. 整形外科, 15, 1083-1095 (1964).
- 13) 鈴木康正: 脊柱前縦靭帯ならびに後縦靭帯の解剖学的研究—特にその微細構造と骨化病態について—. 日整会誌, 46, 179-195 (1975).
- 14) Fleisch, H.: Biphosphonates: Mechanisms and clinical applications. In W. A. Peck (ed.), Bone and Mineral Research Annual, 1st ed., p319-357, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princepton, 1983.
- 15) 田中俊一, 中島 茂, 井上修二, 高邑裕太郎, 青木一郎, 奥田研爾: ストレプトゾトシンによるマウス自己免疫性糖尿病における主要組織適合抗原遺伝子の関与. 糖尿病, 30, 377-379 (1987).
- 16) 細田泰弘, 吉村幸夫, 檜垣昇三, 上山義人, 玉置憲一: 新たに発見された遺伝性骨軟骨異常マウスの形態学的所見(予報). 厚生省特定疾患難病の疾患モデル調査研究班昭和55年度研究報告書, 166-169 (1981).
- 17) 加藤秀樹: ICR マウス由来の疾患モデル系統. Medical Immunology, 17, 353-361 (1989).
- 18) Strates, B. S., Firschein, H. E. & Urist, M. R.: Alkaline phosphatase and failure of calcification under the influence of a diphosphonate. Biochem. Biophys. Acta, 244, 121-124 (1971).
- 19) 月本裕国: 頸部後縦靭帯骨化により脊髄圧迫症候を呈した1剖検例. 日外宝函, 29, 1003-1007 (1960).
- 20) 寺山和雄, 丸山俊一郎, 宮下雷平, 葉袋 健, 木下雅夫, 清水良夫, 望月一郎: 頸椎の後縦靭帯骨化症について. 整形外科, 15, 1083-1095 (1964).
- 21) 津山直一: 脊椎靭帯の疾患に対する対麻痺について—OPLL 世界最初の報告—C. Aston Key: On paraplegia depending on disease of the ligaments of the spine. 整形外科, 32, 1335-1342 (1981).
- 22) Breidahl, P.: Ossification of the posterior longitudinal ligament in cervical spine: "Japanese disease" occurring in patients of British descent. Australasian Radiol., 13, 311-312 (1969).
- 23) 佐々木正: 頸椎後縦靭帯骨化症の病態について. 災害医学, 18, 663-669 (1975).
- 24) 都築暢之: 頸椎後縦靭帯骨化の病理組織学的所見とその意義. 日整会誌, 55, 387-397 (1981).
- 25) Genant, H. K., Barton, J. M., Straus, F. H. & Jowsey, J.: Osteosclerosis in primary hyperparathyroidism. Am. J. Med., 59, 104-113 (1975).
- 26) 石田洋一郎: 培養細胞からみた脊柱靭帯骨化の発生機序に関する検討. 日整会誌, 62, 1019-1027 (1988).
- 27) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. & Yamamoto S.: Establishment of a clonal osteogenesis cell

line from new born mouse calvaria. *Jpn. J. Oral. Bio.*, **23**, 899-901 (1981).

28) 山浦伊姿吉: 頸椎後縦靭帯骨化の発生進展機序. *災害医学*, **18**, 651-662 (1975).

29) 五関正江, 大井田新一郎, 佐々木哲: 骨のアルカリフォスファターゼの構造と生理機能. *日本骨代謝学会誌*, **8**, 9-19 (1990).

30) 宮本紳平, 米延策雄, 小野啓郎: 靭帯骨化の免疫組織学的検討. 厚生省特定疾患後縦靭帯骨化症調査研究班平成2年度報告書, 86-91 (1990).

告書, 86-91 (1990).

31) 寺山和雄: 後縦靭帯骨化症の病態. *日整会誌*, **62**, 679-695 (1988).

32) Landesman, R. & Reddi, A. H.: Induction of enchondral bone by demineralized bone matrix from diabetic rats. *Calcif. Tissue Int.*, **37**, 630-634 (1985).

33) 加藤義治: Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) の成長期骨端軟骨板, 骨幹端に及ぼす形態変化ならびに代謝変調に関する研究. *日整会誌*, **60**, 529-545 (1986).

An Experimental Study on the Ossification of Spinal Ligament in the Tiptoe Walking Yoshimura (TWY) mouse
Kenji Nakahashi, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **103**, 959—971 (1994)

Key words spinal ligament, ossification, TWY mouse, streptozocin, etidronate disodium

Abstract

TWY (tiptoe walking Yoshimura) is a mouse strain that shows a spontaneous ossification of the spinal ligaments and is used as a model of OPLL (ossification of posterior longitudinal ligament). In the present study the natural process of ossification of spinal ligaments in TWY mice was investigated histologically. Also, the effects of etidronate disodium (EHDP) and streptozotocin (STZ) on the ligament ossification in TWY mouse were examined. EHDP inhibits bone formation and calcification and streptozotocin (STZ), causes experimental diabetes. The abnormal changes in the histology of vertebra of TWY mice, as compared with ICR mice, was recognized mainly in the portion where the ligament contacts the intervertebral disc (entheses portion). At 6 weeks after birth, a thickening of anterior and posterior longitudinal ligaments as well as a protrusion of disc cartilage into the ligaments were first observed. At 8 weeks, some chondrocytes of the proliferating cartilage in the ligaments became positive for alkaline phosphatase (ALP) staining. At 10 weeks, the cartilage tissue proliferated further into the ligaments and most chondrocytes were ALP positive, showing active enchondral ossification. From 15 weeks to 22 weeks, the anterior longitudinal ligament was progressively replaced by bone tissue, which finally connected the vertebral bodies in a thick bony bridge. In contrast, in the posterior longitudinal ligament, as well as in the skull-vertebral joint, large necrotic and calcified tumors were formed around 10 weeks, protruding progressively into the vertebral canal and compressing the spinal cord at 22 weeks. In the posterior longitudinal ligament, the ALP-positive osteoblast-like cells were recognized, implying that the intramembranous ossification process was also progressing. The serum level of ALP activity, which might represent the ossification process, was significantly higher in the TWY mouse than in the ICR mouse at both 10 and 22 weeks. Also, the ALP level in the TWY mouse remained as high at 22 weeks as at 10 weeks, in contrast with that in the ICR mouse which decreased during this period. When the effect of EHDP on the TWY mouse was examined, it reduced the serum ALP level, the area of ligament ossification, as well as the abnormal histological changes, indicating that the pathogenesis in TWY mouse can be ameliorated by general inhibition of ossification. The effect of STZ on the TWY mouse was examined: it increased all these markers of ligament ossification, indicating that the general state of diabetes can augment pathogenesis in TWY mice.