

血小板活性化因子による骨壊死モデル確立 とその病因・発生機序の解明

大阪厚生年金病院整形外科
増原 建作

目 的

骨壊死の病因・病態については不明な点が多いがこれには再現性に優れた実験系の確立が有用である。我々はウサギ血清病モデル（馬血清 2 回静脈内投与）において大腿骨近位骨幹端に比較的高頻度に骨壊死が発生することを報告してきた（1, 2）。

本モデルにおける骨壊死発生にいたる早期の病理像で細動脈内血栓および赤血球の漏出（出血）などの微小循環障害が高頻度に認められ、血小板の活性化が示唆される。そこで以下の目的で本研究を行った。

- (1)ウサギ骨壊死（血清病）モデルの血液学的検討
- (2)ウサギ骨壊死（血清病）モデルへの血小板活性化因子（PAF）阻害剤の影響
- (3) PAF を用いた新しい骨壊死モデルの確立と PAF 阻害剤の影響

方 法

(実験1) 成熟日本白色家兎 20 羽に 56 °C、30 分間加熱し非動化した馬血清（10ml / kg）を静脈内投与し、3 週間後に同量の馬血清を静脈内投与した。2 回目の投与前後に経時的に血液を採取し血球数、

血小板数、血小板凝集能、TXB₂、フィブリノーゲンを測定した。

(実験2) 成熟日本白色家兎 80 羽に馬血清を 2 回静脈内投与し（対照群 20 羽、図 1）、2 回目の投与 5 分前に抗 PAF 剤（E5880, Eizai）を投与したもの（抗 PAF 群 60 羽）を抗 PAF 剤の用量に応じて 3 群に分割した（A 群：0.3mg / kg 20 羽、B 群：1mg / kg 20 羽、C 群：3mg / kg 20 羽、図 2）。2 回目の投与後 1 週間で屠殺し病理学的検討を加えた。

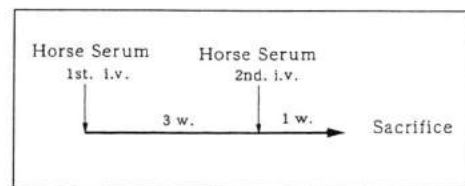


図 1 Control

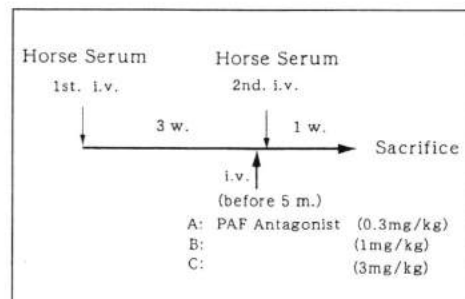


図 2 Anti PAF - Group A, B, C.

(実験3) 免疫賦活作用を有する Lipopolysaccharides (LPS) と PAF を組み合わせることにより新しい骨壊死モデルを模索した。LPS (50g / kg) を静脈内投与し、24 時間後に同量の LPS を静脈内投与した群 (A 群: 5 羽)、LPS (50g / kg) を静脈内投与し、24 時間後に PAF(10g / kg) を静脈内投与した群 (B 群: 5 羽)、LPS (50g / kg) を静脈内投与し、1 週間後に再度同量の LPS を静脈内投与した群 (C 群: 15 羽)、LPS (50g / kg) を静脈内投与し、24 時間後に PAF(10g / kg) を静脈内投与するクールを 1 週間おいて再度繰り返す群 (D 群: 15 羽)。また PAF 阻害剤の影響を検討する目的で C 群において 2クール目の PAF 投与 5 分前に抗 PAF 剤 (E5880, Eizai) を投与した。抗 PAF 剤の用量に応じて 2 群に分割した (E 群: 0.3mg / kg 15 羽、F 群: 3mg / kg 15 羽)。

結果

(実験1) 20 羽中 7 羽 (35%) に骨壊死を認め、13 羽には骨壊死を認めなかった。両群間で血清学的な差異を検定した。赤血球数は馬血清 2 回目投与から徐々に減少したが両群間で有意差は認められなかった。(図3)。

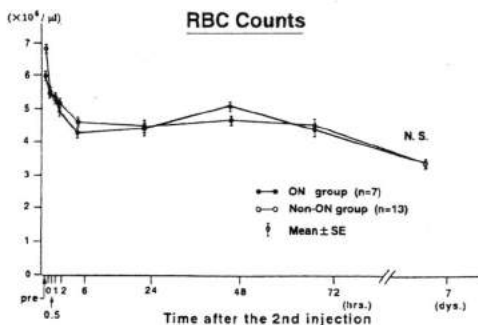


図3

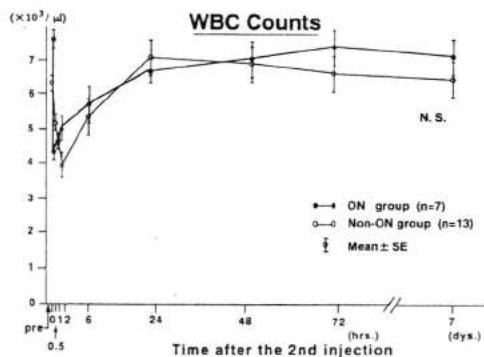


図4

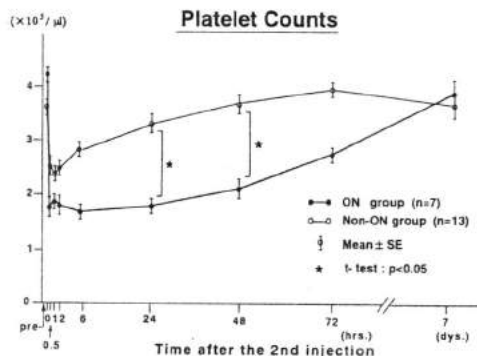


図5

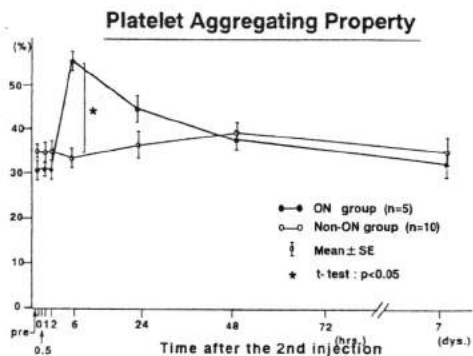


図6

白血球数は両群とも馬血清 2 回目投与から 1 ~ 2 時間で一過性に減少したが有意差は認められなかった (図4)。血小板数は両群とも 2 時間以内に急速に減少したが骨壊死群ではその後も低値が持続し、2 回目投与後 24 時間と 48 時間

で有意に低かった (図5)。

血小板凝集能は骨壊死群で一過性に上昇し、2回目投与後6時間で有意に高かった (図6)。

TBX2も骨壊死群で一過性に上昇し、2回目投与群2時間と6時間で有意に高かったがその後急激に減少した (図7)。

フィブリノーゲンは両群とも一過性に減少したが有意差は認められなかった (図8)。

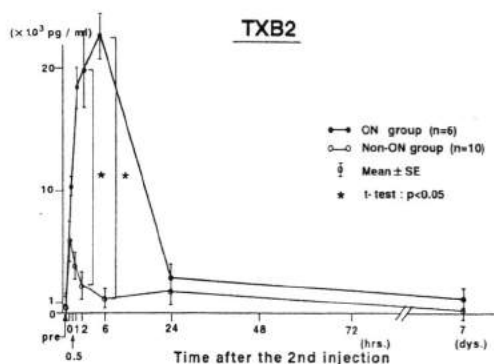


図7

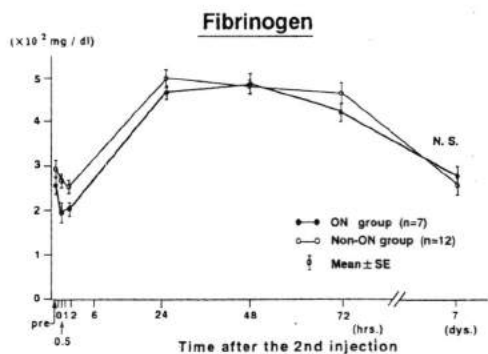


図8

(実験2) 赤血球漏出 (出血) の頻度: 対照群 55% に対して抗 PAF-A 群 50%、抗 PAF-B 群 45%、抗 PAF-C 群 30% で抗 PAF-C 群は対照群より有意に低かった (図9)

Extravasation of Erythrocytes

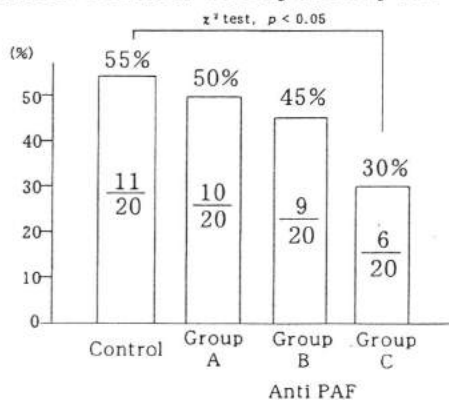


図9

Microthrombi in Arterioles

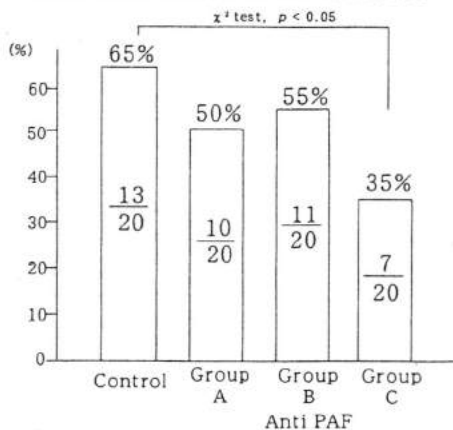


図10

細動脈内血栓の頻度: 対照群 65% に対して抗 PAF-A 群 50%、抗 PAF-B 群 55%、抗 PAF-C 群 35% で抗 PAF-C 群は対照群より有意に低かった (図10)。

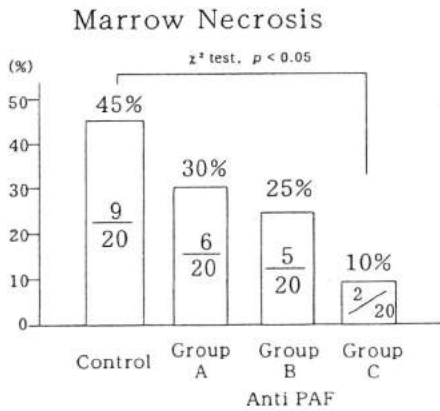


図 11

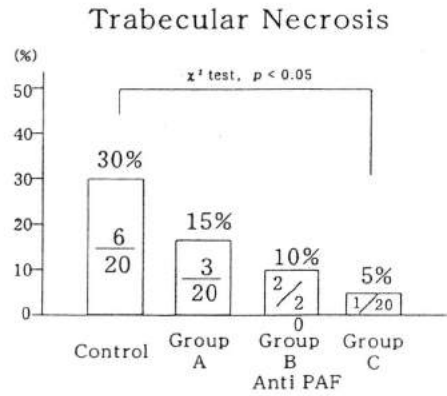


図 12

図 13 LPS・PAF (・抗 PAF) 投与

群	投与方法	N	Sacrifice	Osteonecrosis	Marrow necrosis	Extravasation	Microthrombi
A	LPS(50g/kg) (24h) LPS(5g/kg)	5	1W	0	0	5	5
B	LPS(50g/kg) (24h) PAF(10g/kg)	5	1W	0	0	3	4
C	[LPS(50g/kg)] (1w後) [LPS(50g/kg)]	15	2W	1	3	6	8
D	[LPS(50g/kg) (24h)PAF(10g/kg)] (1w後) [LPS(24h)PAF]	15	2W	7	8	11	11
E	[LPS(50g/kg) (24h)PAF(10g/kg)] (1w後) [LPS(24h)抗PAF(0.3mg/kg)+PAF]	15	2W	0	3	8	6
F	[LPS(50g/kg) (24h)PAF(10g/kg)] (1w後) [LPS(24h)抗PAF(3mg/kg)+PAF]	15	2W	0	4	10	10

骨髓壊死の頻度：対照群 45% に対して抗 PAF-A 群 30%、抗 PAF-B 群 25%、抗 PAF-C 群 10% で抗 PAF-C 群は対照群より有意に低かった (図 11)。

骨梁壊死の頻度：対照群 30% に対して抗 PAF-A 群 15%、抗 PAF-B 群 10%、抗 PAF-C 群 5% で抗 PAF-C 群は対照群より有意に低かった (図 12)。

(実験3) A 群、B 群とも細動脈内血栓および赤血球の漏出 (出血) などの微小循環障害は高頻度に認められたが骨梁壊死、骨髓壊死は認めなかった。C 群では微小循環障害とともに骨梁壊死、骨髓壊死を認めたがその頻度は低かった。D 群では高頻度に微小循環障害 (73%)、骨梁壊

死 (47%)、骨髓壊死 (53%) を認めた。D 群に PAF 阻害剤を使用した E 群、F 群では微小循環障害の発生を抑制できず骨髓壊死の発生 (D 群: 20%、E 群: 27%) も認めたが、骨梁壊死は認めなかった。以上をまとめると図 13 の如くである。

考 察

ウサギ骨壊死 (血清病) モデルの血液学的検討 (実験 1) より明らかとなった骨壊死群での血小板数の持続的な減少、TXB₂ や血小板凝集能の一過性の増加は血小板の活性化が惹起されていることを示唆する。またウサギ

骨壊死（血清病）モデルにおける PAF 阻害剤の影響（実験 2）が明らかとなり、抗 PAF 剤により微小循環障害および骨壊死の発生を抑制した事実は血小板の活性化が骨壊死の発生に深く関与していることを示唆しており興味深い。これらの知見をもとに免疫賦活作用を有する LPS と PAF を組み合わせて新しい骨壊死モデルを確立した（実験 3）。さらに 1 週間の間隔において LPS-PAF を投与することにより約半数に骨壊死を発生させるこの実験系に PAF 阻害剤を投与して骨（梁）壊死を認めなかった事実も実験 2 と同様に血小板の活性化と骨壊死の発生の関連を示唆するものと考えられた。

まとめ

ウサギ骨壊死（血清病）モデルにおける血液学的検討および血小板活性化因子（PAF）阻害剤の影響より血小板の活性化が骨壊死の発生に深く関与していることが示

唆された。またこれらの知見をもとに免疫賦活作用を有する LPS と血小板活性化因子（PAF）を組み合わせて新しい骨壊死モデルを確立した。

文 献

1. Matsui M., Ohzono K., Nakamura N., Sugano N., Masuhara K., Nakata K., Takaoka K., Ono K., Ochi T.: The immune reaction to heterologous serum causes osteonecrosis in rabbits. *Virchows Archiv*, 427: 502-211, 1995
2. Nakata K., Masuhara K., Nakamura N., Shibuya T., Sugano N., Matui M., Ochi T., Ohzono k.: Inducible osteonecrosis in a rabbit serum sickness model: Deposition of immune complexes in bone marrow. *Bone* 18:609-615, 1996