Diphosphonate による骨, 軟骨石灰化障害及び 骨吸収障害に関する実験的研究

——異所性石灰化に及ぼす Ethane-1-Hydroxy-1,
1-Diphosphonate (EHDP) の影響——

九州大学医学部整形外科

塩田悦仁・江口正雄
山口司・島内卓
黒木健文・柴田堅一郎
河野洋一・和田文夫
川村秀哉・橋口重明

九州大学医学部中央臨床電子顕微鏡室

金丸孝昭

The Effects of Ethane-1-Hydroxy-1,1-Diphosphonate (EHDP) on the Local Calcergy in Rats

by

E. Shiota, M. Eguchi, T. Yamaguchi, T. Shimauchi,
T. Kuroki, K. Shibata Y. Kawano, F. Wada,
H. Kawamura and S. Hashiguchi

Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of
Medicine, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi,
Higashi-ku, Fukuoka, 812, Japan

The effects of high doses of EHDP on the local Pb-acetate induced calcergy were studied in young female rats.

A plaque of hydroxyapatite crystals was produced by local subcutaneous injection of a lead acetate dilution. Reactions at injection site of dilution were evaluated by the mean diameter and the dry weight of the calcified wheals.

At high doses of EHDP (above 20 mg/kg/day), the hydroxyapatite crystal deposition were inhibited significantly.

はじめに

1962年, Hans Selye の報告以来, ある種の金属塩が, 軟部組織において異所性石灰化を惹起する事実は, よく知られている⁷⁾.

我々は, 昭和55年より骨代謝の基礎を理解することを目的として, Diphosphonate 投与の, 幼若ラット脛骨近位部骨端軟骨板に及ぼす影響, その骨代謝調節ホルモンとの関連, マウス胎仔の骨格形成に及ぼす

影響などについて検討し, 一部は既に報告してきた.
(11-5)7)-13)

今回は, この薬剤が軟部組織の石灰化に関してどのような影響を及ぼすかを, Selye の Local Calcergy の実験モデルを用いて検討し, 若干の知見を得たので報告する.

実験材料及び方法

実験動物として生後3週令の Wistar-King A の

メスラット (BW: 60-70 g) を使用し、日本クレア CE-2 固型飼料 (Ca=1.16% P=0.96%, Vit D₃=2000 IU/kg) で、恒温及び恒湿下で飼育した。(九州大学医学部動物実験施設 SPF) 食餌及び水は自由に摂取させた。Pentobarbital (1 ml/kg) の全麻下に Calcergen として酢酸鉛 500 mEq/l の 10 倍希釈液を 0.2 ml ずつ、背部皮 4 か所に注入した。Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) は生食に溶解して pH=7.4 に調整し、5, 10, 20, 30, 40, 60,

100 mg/kg を 5 日間連日皮下投与した。実験終了後、脱血と殺し、背部皮膚を採取して、肉眼的観察、Softex (C-SM) 撮影、Von Kossa, HE 染色による光顕組織、生じた石灰分の乾燥重量測定及び元素分析などにより検討を加えた。

結果及び考察

Calcergen 注入後、5日目において Control 群では背部皮膚の酢酸鉛注入部に一致して、直径約 13

表 1 Effect of EHDP on Local Calcergy

Reactions at Injection Site of Dilution§		
EHDP	0mg/kg	12.90±0.19 (28)
EHDP	5mg/kg	12.72±0.32 (16)
EHDP	10mg/kg	12.40±0.23 (16)
EHDP	20mg/kg	11.24±0.33*(12)
EHDP	30mg/kg	11.34±0.17*(15)
EHDP	40mg/kg	10.37±0.19*(15)
EHDP	60mg/kg	10.30±0.38*(18)
EHDP	100mg/kg	8.62±0.32*(16)

§ Data represent the mean diameter (mm) of the Calcified wheals±standard error. Lead acetate (1.625 mg in 0.2 ml water, sc) was injected as a calcergen.

Significance of difference from control:

*P<0.005

Effect of EHDP on Local Calcergy
Reactions at Injection Site of Dilutions§

§ Data represent the mean dry weight (mg) of the calcified wheals. Lead acetate (1.625 mg in 0.2 ml water, sc) was injected as a calcergen.

図 2

図 1—A EHDP 投与による dose-response

- a : Control
- b : EHDP 20 mg/kg
- c : EHDP 30 mg/kg
- d : EHDP 60 mg/kg
- e : EHDP 100 mg/kg

図 1—B EHDP 投与による影響 (×3.3)

- a : Control
- b : EHDP 60 mg/kg

mm、厚さ約 1.6 mm の白色 plaque 状隆起が再現性よく認められた。これに対し EHDP 投与では、その用量に応じた plaque の直径と厚さの減少が観察された。図 1A に、代表例の Softex 所見を示した。Control 群では、肉眼的に白色隆起としてみられた部位に一致して、濃厚な石灰化陰影が認められる。EHDP 5 mg/kg 及び 10 mg/kg 投与群では、Control とほぼ同等であったが、20 mg/kg 以上の投与群では石灰化陰影の大きさが減少するとともに、石灰化度も少ないことがわかる。図 1B は、plaque の Von Kossa, HE 染色の所見で、Control 群では皮下に厚さ約 1.6 mm の石灰沈着を認めるが、EHDP 60 mg/kg の場合は、約 400 μ であり、Control の 1/4 程度に減少している。

表 1 は、レ線から plaque の平均直径を測定し、統計処理を施したもので、EHDP 20 mg/kg 以上の投与群では、その石灰化陰影の大きさは、Control に比ベ有意に減少し

ていた。更に石灰化度の差を明確にするために、生じた plaque から石灰分を採取し、凍結乾燥の後、その重量を測定し、plaque 1個当りの平均乾燥重量を求めたものが、図2である。平均直径の場合と同様、EHDP 20 mg/kg 以上の投与群では、その石灰分は著明に減少していることがわかる。

なお、得られた石灰沈着物の性状を知るため、元素分析を行なった結果、Control と EHDP 投与群とで Ca, P の組成パターンに差異は認められず、石灰分の内容は同一であることが確認された。

以上のように、EHDP 投与群では、軟部組織の石灰化に対して dose dependent な石灰化抑制が認められたが、今まで報告してきた脛骨近位部骨端軟骨板に対する効果⁴⁾⁸⁾¹¹⁾とは若干異なり、大量投与によっても、その石灰化を完全に抑制するには至らなかった。この差は、EHDP という薬剤が、骨組織にきわめて親和性があり、肝臓や脾臓を除き、皮下など他の臓器には蓄積されず、投与後比較的すみやかに尿中へ排泄されるという事実⁹⁾によるものではないかと思われる。従って本実験の結果からは、EHDP を異所性石灰化などの疾患に臨床応用する場合、少なくとも全身投与では、石灰化を完全に抑制することは困難ではないかと推察された。

ま と め

異所性石灰化に及ぼす EHDP の影響を検討し、次の結果を得た。

EHDP 5 及び 10 mg/kg 5 日間の少量投与群では、Control とほぼ同等な石灰化を呈したが、EHDP 20 mg/kg 以上の大量投与群では、明らかな石灰化抑制を認めた。

文 献

- 1) 江口正雄・他: Ethane-1-Hydroxy-1, 1-Diphosphonate (EHDP) による骨、軟骨石灰化障害に関する実験的研立—EHDP 大量投与ラットに発生する骨、軟骨石灰化障害におよぼす活性型ビタミン D₃ の影響—. 整形外科基礎科学 8: 353 1981.
- 2) Eguchi, M., et al.: Evidence for the Promotion of Calcification and Bone Formation by [Asu^{1,7}]-eel-Calcitonin in EHDP Induced Rickets. Bone Metablism 15: 27, 1982.
- 3) Eguchi, M., et al.: Fault of Ossification and Calcification and Angular Deformities of Long Bones in the Mouse Fetuses Caused by High Doses of Ethane-1-Hydroxy-1, 1 Diphosphonate (EHDP) During Pregnancy. Cong. Anom., 22: 47, 1982.
- 4) 橋口重明・他: EHDP による骨、軟骨石灰化障害及び吸収障害に関する実験的研究—マイクロラジオグラフィーからみたラット脛骨の変化—. 整形外科基礎科学 9: 313, 1982.
- 5) 奥田隆司・他: Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) の脛骨々端軟骨石灰化障害に関する電顕的研究. 整形外科基礎科学 9: 309, 1982.
- 6) Rohlin, M.: Whole-Body Autoradiography of 99 Tcm-Labelled Ethane-1-Hydroxy-1, 1-Diphosphonate (EHDP) In Young Rats. Acta Radiol., 15: 410, 1976.
- 7) Selye, H.: Calciphylaxis. Chicago, University of Chicago Press, 1962.
- 8) 塩田悦仁・他: Diphosphonate による骨、軟骨石灰化障害及び骨吸収障害に関する実験的研究—Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) 及び Dichloromethylene diphosphonate (Cl₂MDP) 投与によるラット骨、軟骨変化のX線学的及び光顕組織学的検討—. 整形外科と災害外科, 30: 175, 1981.
- 9) 塩田悦仁・他: Ethane-1-Hydroxy-1, 1-Diphosphonate (EHDP) による骨、軟骨石灰化障害及び吸収障害に関する実験的研究—EHDP 1 回大量投与後のラット骨の経時的变化—. 中部整災誌, 24: 224, 1982.
- 10) 塩田悦仁・他: Diphosphonate による骨、軟骨石灰化障害及び骨吸収障害に関する実験的研究—Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) 短期大量投与のラット骨成長に及ぼす影響—. 整形外科と災害外科, 30: 816, 1982.
- 11) Shiota, E., et al.: Effect of Diphosphonate on Mineralization and Resorption of Bone and Cartilage-Morphological and Serological Studies on Rats Treated with Ethane-1-Hydroxy-1, 1-Diphosphonate (EHDP) and Dichloromethylene Diphosphonate (Cl₂MDP) -. Bone Metabolism 15: 57, 1982.
- 12) 塩田悦仁・他: Diphosphonate による骨、軟骨石灰化障害及び骨吸収障害に関する実験的研究—Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) 短期大量投与後に発生する骨成長障害及び骨格変形の経時的観察—. 中部整災誌, 24: 1228, 1981.
- 13) 山口司・他: EHDP による石灰化障害及びその回復過程におけるラット骨幹端部の微細血管動態. 整形外科基礎科学 9: 73, 1982.

回 答	九大整形 塩田 悦仁	と $P < 0.005$ で有意差が出ておりますので，問題ない
御指摘のように，多少ばらつきはありましたが，ス		と考えます。
テイドにも示しましたように，統計処理をいたします		