EHDP で誘発される骨軟骨石灰化障害モデルに おける $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とカルシトニンの効果

—両薬剤の加算効果に関する検討—

九州大学整形外科

和田 文夫・江口 正雄

柴田 堅一郎・島内 卓

川村 秀哉・村尾 哲

池田 正一・柴田 直之

国立小倉病院整形外科

塩田 悦仁

The Effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and Calcitonin on the EHDP-induced
Rickets —Additive Effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and Calcitonin—

by

Fumio Wada, Masao Eguchi, Kenichiro Shibata, Takashi Shimauchi
Hideya Kawamura, Tetsu Murao, Shoichi Ikeda
and Naoyuki Shibata

Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka, Fukuoka.

Etsuji Shiota

Division of Orthopaedic Surgery, Kokura National
Hospital, Kitakyushu, Fukuoka.

We have already shown that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (D) and calcitonin ([Asu¹⁻⁷]-eel calcitonin, CT) promotes calcification of the thickened growth plate in the healing stage of EHDP-induced rickets respectively. In the experiment female weanling Wistar King-A rats of 4 weeks of age were used and the experiment period was settled to be 2 weeks. Sixty mg/kg body weight of EHDP (ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate) was dosed subcutaneously, daily for the former 7 days and then they were left alone for the latter 7 days, that is the basic model, we have settled, of EHDP-induced rickets (EHDP rat). Forty U/kg body weight of CT was given to the EHDP rat for the 14 consecutive days (2), for the former 7 days (f), and the latter 7 days (1), that makes up 3 groups. $0.5\mu\text{g/kg}$ body weight of D was given in the same 3 ways. Our previous results showed that CT (2) and CT (f) groups promoted calcification in the growth plate, and D(2) and D(1) groups did so. Now in this study, both CT and D were administered respectively either in the former 7 days or in the latter 7 days, making 4 groups. In the results, CT(f) D(f) group showed prominent calcification, whereas CT(f) D(1) group showed most massive calcification, and calcification was invisible except for the slightly narrowed plate in CT(1) D(f) group. These synergistic effects of CT and D, particularly shown in CT(f) D(1) group, are indicative of the difference of CT and D in the mode of calcification.

我々は既に、EHDP クル病の2週間経過モデルで、カルシトニン（〔Asu^{1,7}〕-eel calcitonin, elcatonin, 以下 CT）および活性型ビタミンD（ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 以下D）が石灰化促進作用を示す事、および投与時期を前半1週間と後半1週間に分ける事により、作用発現に相違のある事を報告した¹⁴⁾。即ち、EHDP 60mg/kg/日を連日1週間投与後、1週間放置する2週間経過のEHDP クル病モデルにおいて、CTの連続2週間投与および前半1週間投与により、拡大したGrowth plate内の石灰化が顕著となり、Dでは連続2週間および後半1週間投与により、石灰化が顕著となるというのが骨子であった。

今回は、CTとDの投与時期を変えた併用により、如何なる効果がもたらされるかについて検討した結果を報告する。

実験材料と方法

実験材料は、生後4週令のWistar King-A 雌ラットであり、平均体重は約80gであった。

前報告では、1) 対象群（無処置）、2) EHDP(以下P)単独投与群（EHDP 60mg/kg連日1週間投与後、1週間放置）、3) P+CT群（CTは40U/kgを、連続2週間、前半1週間、又は後半1週間投与の計3群）、4) P+D群、(Dは $0.5\mu\text{g/kg}$ を連続2週間、前半又は後半1週間投与の計3群)、以上1)~4)迄計8群に分けた(図1)。

今回は、更にCTおよびDを、各々、前半か後半のどちらかに投与して出来る組み合わせの4群、つまり1) CT前半D前半群、2) CT前半D後半群、3) CT後半D前半群、4) CT後半D後半群の4つを新たに設定した。

実験開始後2週間の経過ののち脱血屠殺し、後肢を採取し、ソフテックス、脱灰HE染色標本、Contact microradiogram (CMR) 等により、脛骨近位端の所見を検討した。

結 果

ソフテックス像では(図2)、CT前半群およびD後半群で、Growth plate内の石灰化が顕著であるのに対し、CT後半(以下、後)群およびD前半(以下、前)群では、P単独群と同様に、殆んどGrowth plate内に石灰化が見られなかった。

[Schedules]

対 照 群 $\begin{array}{|c|c|} \hline 7\text{日} & 7\text{日} \\ \hline \end{array}$

P 単 独 群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \end{array}$

CT前半群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{CT} \\ \hline \end{array}$

D 前 半 群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{D} \\ \hline \end{array}$

CT後半群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{CT} \\ \hline \end{array}$

D 後 半 群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{D} \\ \hline \end{array}$

CT連続群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{CT} \\ \hline \end{array}$

D 連 続 群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{D} \\ \hline \end{array}$

CT前半
D前半群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{CT} \\ \hline \text{D} \\ \hline \end{array}$

CT前半
D後半群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{CT} \\ \hline \text{D} \\ \hline \end{array}$

CT後半
D前半群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{CT} \\ \hline \text{D} \\ \hline \end{array}$

CT後半
D後半群 $\begin{array}{|c|} \hline \text{P} \\ \hline \text{CT} \\ \hline \text{D} \\ \hline \end{array}$

$\left[\begin{array}{l} \text{EHDP(P)} = 60\text{mg/kg/日} \\ \text{〔Asu}^{1,7}\text{〕-eel calcitonin(CT)} = 40\text{U/kg/日} \\ 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3(\text{D}) = 500\text{ng/kg/日} \end{array} \right]$

図1：実験方法。

CTとDを併用した場合、CT前D前群では、CT前半群に比し、石灰化が著明に増強された。

CT前D後群では、CT前半群、D後半群とも石灰化の顕著な群であるが、この両者の併用により、この実験系中、最大の著明な石灰化所見を示した。

CT後D前群では、CT後半群、D前半群とも、Growth plate内の石灰化を示さないが、両者を併用しても、やはり石灰化を示さなかった。しかし、Growth plateの厚さは、P単独群ならびに他の群に比し、やや狭い傾向が見られた。

CT後D後群では、D後半群と同程度か、僅かに弱い石灰化所見であった。

CMRでは、Rigolacに包埋した材料より、厚さ $150\sim 180\mu$ の切片を作製し、撮影したCMRの結果を図3に示す。まずD連続群およびD後半群では、Growth plate中間位に細い線状の石灰化像が広がっている。この部位は、proliferative zoneとhypertrophic zoneの境界附近であり、upper hypertrophic zoneと呼ばれる。この線状の石灰化像は、plateの左右の側面より、upper hypertrophic zoneに沿

図2： ソフテックス所見。

CT 連続，前半群，D 連続，後半群で石灰化所見。CT 前D 前群で著明な石灰化，CT 前D 後群で最大の著明な石灰化。CT 後D 前群で石灰化なし。

図3 CMR 所見.

CT 連続, 前半群では, Growth plate 側面や metaphysis 近傍に石灰化が多い. D 連続, 後半群では, upper hypertrophic zone に線状の石灰化. CT 前D 前群, CT 前D 後群では, 太い帯状の石灰化.

図4 光顕組織所見。(脱灰 HE 染色)

CT 連続, 前半群では, metaphysis からの capillary bud の増生が多い。D 連続, 後半群では, zone of Ranvier に, 僅かに primary spongiosa の生成。CT 前D 後群では, Growth plate の大部分は primary spongiosa に変貌。

って、中央に向かって伸びていく。D 連続群および D 後半群では、殆んど同程度の石灰化所見であった。

CT 連続群および CT 前半群では、Growth plate 側面に石灰化が見られるが、upper hypertrophic zone に沿う石灰化像は弱い。しかし、もう少し低位で、metaphysis 近傍より、石灰化像が拡がっているのが観察された。

併用群のうち、CT 前D前群では、CT 前半群や D 後半群に比し、巾の広い石灰化像が、Growth plate 中間位にわたって見られた。その石灰化像の中には、longitudinal septa を示す柱状構造が見られた。CT 前D後群では、Growth plate の大部分を占める太い帯状の石灰化像が見られた。CT 後D前群では、ソフテックス像と同様に、石灰化像が見られなかった。CT 後D後群では、D 連続群や D 後半群と同様に、upper hypertrophic zone に細い線状の石灰化像が見られた。

光顕組織所見について述べるが、図 4 は脱灰 HE 染色標本である。まず P 単独群では、D 欠乏性クル病と同様な hypertrophic zone の増大と、metaphysis 側よりのまばらな capillary bud の侵入が見られる。

CT 連続群と CT 前半群では、P 単独群ならびに他の群と比較して、metaphysis からの capillary bud の侵入が多い。そして、CMR の所見と比較して、この capillary bud の周辺には、石灰化が拡がっていると考えられた。CT 後半群は、P 単独群と同様の所見であった。

D 単独投与の 3 群でも、P 単独群とほぼ同様の所見であったが、D 連続群と D 後半群では、upper hypertrophic zone の石灰化に伴った変化として、Growth plate 側面の zone of Ranvier に、僅かな primary spongiosa の出現を見た。

併用群では、まず CT 前D前群においては、Growth plate 側面や metaphysis 側より、石灰化を生じていると思われる場所で、所々、新たな primary spongiosa の生成が見られた。

CT 前D後群では、既に Growth plate の大部分には、新たな primary spongiosa の形成が見られ、他の群では見られない著明な変貌を見せた。

CT 後D前群では、Growth plate の厚さの減少が見られた。

CT 後D後群では、特に著しい変化は見られなかつ

た。

考 按

D 欠乏性クル病に対し、ビタミン D の投与を行なった場合、まず Growth plate 中間位に石灰化の層を生じる事より、回復がはじまる。この部位は、proliferative zone と hypertrophic zone の境界附近であり、クル病の肥厚した Growth plate では、upper hypertrophic zone と呼ばれ、^{1) 2)} クル病でなかったら、本来 metaphysis の始まる部位とも形容されてきた。proliferative zone から hypertrophic zone へ移行したばかりの、この層が石灰化を受けやすい性質を持つのは、ここで、longitudinal septa 内へ、豊富に matrix vesicle が生成されていく事などに拠る。この matrix vesicle は phosphatidyl serine などの脂質に富み、Ca 分子を集めやすく、又、alkaline phosphatase, ATPase, inorganic pyrophosphatase などの酵素を含み、骨塩の晶出に重要な作用を持つ事が推定されている。¹⁾そして、この部位の石灰化を受けやすい性質は、時間が経ち、metaphysis 側へ移行するにつれ、徐々に酵素の失活などが起り、弱まっていくものとも考えられる。それから、以上述べた upper hypertrophic zone とは別に、metaphysis 側より、不規則な石灰化像も出現してくる。⁷⁾

今回の実験で、CT や D 投与各群で見られた石灰化所見は、D 欠乏性クル病の回復期の所見と類似している事がわかる。

CT と D による石灰化促進作用の機序を知る事は難しいが、今回得られた所見より検討を加える。

まず D の作用では、D 連続および D 後半投与群で、upper hypertrophic zone に鮮鋭な石灰化像が現われた。従来、EHDP クル病に対する D metabolite の効果としては、EHDP 1 週間投与の 1 週間の系で、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ や $1,24(\text{OH})_2\text{D}_3$ などの 1 週間併用投与により、Growth plate 巾の増大が軽度抑制されたという報告⁸⁾はあるが、EHDP の強い rachitogenic な作用に対し、D metabolite はあまりはっきりした作用を示さないのではないかと考えられており、今回のような Growth plate 内の石灰化という報告はなかった。今回、D 連続群、D 後半群で見られた upper hypertrophic zone の石灰化所見は、EHDP クル病においても、D 欠乏性クル病と同様に、同部が石灰化を最も

受けやすい部位である事を示している。又、D後半投与により、同部の石灰化が促進されたのは、高Ca血症による効果が大きいのではないかと思われた。D後半投与をCa剤の投与に変えた我々の実験（未発表）でも、石灰化が促進され、これを支持していると思われた。D前半群では、はっきりした作用が観察されなかった。今迄報告された EHDP とDの1週間併用投与の1週間の系では、軽度の Growth plate の狭小化が見られたのみで、EHDP には $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (=D) の単なる投与では代償されない、Dの生成の制止という作用以外の強い rachitogenic な作用を持つ事が知られたが¹⁾、その実験群から1週間経った、今回のD前半群でもあまり作用を示さない事が分かった。

次に CT の作用では、CT が Growth plate 内石灰化に強い効果をもったのは、P と同時の前半投与群であり、後半に石灰化が出現してきており、CT の投与と効果発現との間に time lag があった。CT 後半群では、はっきりした効果を示さなかった。CT には、hyper-trophic cell の肥大、成熟を促進する作用や⁴⁾ Alkaline phosphatase 活性を増大する作用⁵⁾ がある事が報告されているが、今回見られた石灰化作用に何らか関わっているかと思われた。

次に CT とDを併用した効果を述べる。

CT 前D前群では、CT 前半群の効果が、D前半投与によって著明に増強された。これはD前半投与の作用が後半迄少し残った事も考えられるが、それ以外に何か石灰化を助長する作用があるのかと思われた。又、この群では、CMRに見られた様に、Growth plate 内の広い領域に石灰化が拡がっているのに、組織像では、大部分、軟骨基質をそのまま残していた。これは、軟骨内の石灰化が、まず骨塩の沈着が longitudinal septa に起こり、それからしばらく時間の経過があった後に、プロテオグリカンの変質など軟骨基質の変化が起こり、primary spongiosa を形成していく事を示していると思われた。

CT 前D後群では、Growth plate 内に広汎に石灰化を生じ、既に Growth plate の大部分は primary spongiosa へと変化していた。これは CT とDの相乗効果を示していると思われ、CT とDの作用点の差が更に示唆された。

CT 後D前群では、plate 内石灰化が見られなかったが、これは、CT 後半群、D前半群で石灰化が現わ

れない事を、更に明確に示していると思われた。

CT 後D後群では、D後半群と同様か、やや弱い石灰化像が見られた。これはDの hypercalcemic effect に対し、CT が抑制的に働いたためではないかと考えられた。

以上 EHDP クル病における CT とDの作用を述べたが、Growth plate 内の石灰化像の出現という事象は、active に石灰化を促進していくという作用面と、EHDP からの回復が促されたために passive に石灰化が起こったという面の2面より捉えていかねばならないと思われた。

結 語

EHDP 1週間投与、1週間放置の EHDP クル病2週間の系で、カルシトニン ([Asu¹⁷] -eel calcitonin, エルカトニン, CT) と $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (D) は、投与時期を前半後半に分ける事により、CT は前半1週間投与に、Dは後半1週間投与に、Growth plate における強い石灰化促進作用を持つ事が示され、CT とDの相違が示された。

今回、CT とDの投与時期を変えた併用により、CT 前D前群では著明な石灰化像、CT 前D後群では最大の著明な石灰化像が見られ、CT 後D前群では石灰化が見られず、CT 後D後群ではD後半群と同程度か、やや弱い石灰化像が見られた。以上の結果、CT 前D後群では、CT とDの石灰化促進作用が相乗効果を持ったと考えられ、このような効果は、両者の作用機序の相違を更に示唆していると考えられた。

文 献

- 1) Anderson, H. C. and Sajdera, S. W.; Calcification of rachitic cartilage to study matrix vesicle function. Fed. Proc. 35: 148-153, 1976.
- 2) Anderson, H. C. and Hsu, H. H. T.; A new method to measure ⁴⁵Calcium accumulation by matrix vesicles in slices of rachitic growth plate cartilage. Metab. Bone Dis. & Rel. Res., 1: 193-197, 1978.
- 3) Bisaz, S. et al: The comparative effects of vitamin D deficiency and ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate administration on the histology and glycolysis of chick epiphyseal and articular cartilage. Calcif. Tiss. Res., 19: 139-152, 1975.
- 4) Burch, W. M.; Calcitonin stimulates growth and maturation of embryonic chick pelvic cartilage in in

- vitro. Endocrinology, 114: 1196-1202, 1984.
- 5) Chin, J. E., Ishikawa, Y., and Wuthier, R. E.; Effect of synthetic salmon calcitonin and 1-34 human parathyroid hormone on synthesis of alkaline phosphatase and production of calcifiable matrix vesicles by primary cultures of chicken epiphyseal chondrocytes. Calcif. Tiss. Int. (abstract), 36: 456, 1984.
 - 6) Dodds, G. S. and Cameron, H. C.; Studies on experimental rickets in rats. I. Structural modifications of the epiphyseal cartilages in the tibia and other bones. Am. J. Anat., 55: 135-165, 1934.
 - 7) Dodds, G. S. and Cameron, H. C.; Studies on experimental rickets in rats. II. The healing process in the head of tibia and other bones. Am. J. Path., 14: 273-296, 1938.
 - 8) 江口正雄ほか; 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究—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: 353-361, 1981.
 - 9) 江口正雄, 塩田悦仁; Ethane-1-1, 1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) で誘発される石灰化障害モデルにおけるカルシトニンの効果. カルシトニン—基礎と臨床—(藤田拓男, 折茂肇編), ライフサイエンス出版, p. 84-90, 1983.
 - 10) Irving, M. H.; The blood supply of the growth cartilage and metaphysis in rachitic rats. J. Path. Bact., 89: 461-471, 1965.
 - 11) Michael, W. R. et al.; Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and monkey. Toxicol. Appl. Pharmacol., 21: 503-515, 1972.
 - 12) Russell, R. G. G. and Fleisch, H.; Pyrophosphate and diphosphonates in skeletal metabolism. Clin. Orthop., 108: 241-263, 1975.
 - 13) Schenk, R. et al.; Effect of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl₂ MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. Calcif. Tiss. Res., 11: 196-214, 1973.
 - 14) 柴田堅一郎ほか; EHDP で誘発される骨軟骨石灰化障害モデルにおける活性型ビタミンD とカルシトニンの効果—投与時期による効果発現様式の相違—. 整形外科と災害外科 (投稿中)
 - 15) 島内 卓ほか; EHDP で誘発される骨軟骨石灰化障害モデルにおける Ca 剤大量投与の効果. 整形外科と災害外科 (投稿中)
 - 16) 塩田悦仁ほか; 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 (Cl₂ MDP) 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: 175-179, 1981.
 - 17) Shiota E. et al.; Effect of diphosphonate on mineralization and resorption of bone and cartilage—Morphological and serological studies on rats treated with EHDP and Cl₂ MDP—. Bone Metabolism, 15: 201-216, 1982.

質 問

鳥取大学 山本 吉蔵

内軟骨性骨化に対する CT と D の加算効果は、石灰化が単に加算的に促進されるものか、または、違った部位にも石灰化が出現するものか、もう少し詳細にお教え下さい。

解 答

九州大学 和田 文夫

ソフテックス像におけるCTとDの石灰化所見は、何か違った印象を受け、CMRでも、CTでは、metaphysis 近傍からの石灰沈着が多いようだが、Dではupper hypertrophic zone に線状により鮮明に石灰化像が現われ、両者の石灰化の部位はやや異なる。したがって、両者の併用投与も、単なる加算的な効果ではないと思われます。

質 問

琉球大学 乗松 尋道

カルシトニンとビタミンDに石灰化促進作用があり、その機序は異なっていると思われるが、EHDPの石灰化障害の緩和に対してはそれぞれどのような作用があるのか。

解 答

九州大学 和田 文夫

CTとDが、どのような石灰化促進作用があるのか、あるいは、EHDPの石灰化障害に対してどのように働いたのかという問題は、今後検討すべき課題と思われます。ただ、Dの石灰化促進作用には、高Ca血症による所が大きいのではないかと考えられました。