EHDP くる病に対するカルシウム製剤と parent Vit. D₃ 効果の比較検討

九州大学医学部整形外科

島 内 卓・江 口 正 雄
和 田 文 夫・柴 田 堅一郎
塩 田 悦 仁・川 村 秀 哉
村 尾 哲・池 田 正 一
柴 田 直 之・高 杉 紳一郎
高 村 和 幸・白 石 浩 一
渡 辺 浩 一

The effect of high dose of parent vitamin D₃ and
calcium gluconate on EHDP iduced rickets

by

Takashi Shimauchi, Masao Eguchi, Kenichirou Shibata,
Hidya Kawamura, Tetu Murao, Shiyouchi Ikeda,
Naoyuki Shibata, Shinichirou Takasugi,
Kazuyuki Takamura, Kouichi Shiraishi
and Kouichi Watanabe

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

We have reported that $1\alpha, 25-(\text{OH})_2 \text{D}_3$ and calcium gluconate promote calcification in the widened growth plate of EHDP induced rachitic rats. In this report, EHDP induced rickets, the comparative study of the promotion of calcification by parent vitamin D₃ and calcium gluconate was performed. Single administration of 30×10^4 unit/kg vitamin D₃ promoted bone formation rather than calcification in the widened growth plate. On the other hand, consecutive administration of calcium gluconate enhanced calcification.

With regard to the volume of hydroxy appatite in the widened epiphyseal plate, vitamin D₃-injected groups were much larger than calcium-injected groups.

These results suggested that the promotion of calcification by vitamin D₃ was attributed to not only hypercalcemia but also the other effect of its own.

我々は、EHDP 大量投与にて発生する石灰化障害モデルにおいて、 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2 \text{D}_3$ とカルシウム製剤がそれぞれ石灰化促進効果を呈しその効果発現様式が類似する事を報告してきた。今回われわれは parent Vit. D₃ とカルシウム製剤による石灰化促進作用について、比較検討する機会を得たので報告する。

方 法

実験動物として Fisher-344 female rat を用いた。体重は約 60 g-70 g である。実験期間を 14 日間とし、水、食餌は自由に摂取させ、これらを以下の 4 群に分けた。1) 対照群、2) EHDP 単独投与群、3) EHDP+カルシウム製剤投与群、4) EHDP+VitaminD₃ 投与群である。EHDP は 60 mg/kg を前半 7

日間 連日皮下投与し、カルシウム製剤は Calcium gluconate を用いカルシウム量として 10 mg/rat を後半 7 日間連日皮下投与し、parent VitaminD₃ は 30 万単位/kg を実験開始後 8 日目に 1 回投与した (図 1)。実験終了時に脱血屠殺し、脛骨を採取し、Softex 撮影後、塩化シヌアル固定脱灰し、HE 染色にて光顕組織学的に検討を加えた。また非脱灰薄切片を作成し Contact Microradiogram を撮影した。

結 果

Softex 像を観察すると、EHDP 群では対照群に比して、growth plate の拡大が著しい。またその外側端に僅かに石灰化を認める。EHDP+Ca 群では拡大した growth plate 内に線状に石灰化を認める。EHDP+Vit.D₃ 群では growth plate 内に濃厚な石灰化陰影を認める (図 2)。

塩化シヌアル固定脱灰 HE 染色像では、EHDP 投与群では、growth plate が拡大してその外側下方には、エオジンで濃染する楔状の Osteoid tissue の堆積を認めるのみで、Softex で観察された石灰化の部分には著変を認めない。EHDP+Ca 群では、EHDP 単独投与群に見られた楔状の Osteoid tissue の上方の、Softex 像で認められた石灰化像に一致して、矢印の部に僅かに血管および osteoblast をともなう骨梁の形成が認められる。EHDP+Vit.D₃ 群では、拡大した growth plate の外側に旺盛な骨の外側に旺盛な骨の

Materials & Methods

Fisher-344 female rat

4 weeks of age

図 1 実験のプロトコール

新生を認める (図 3)。カルシウム投与群および Vit.D₃ 投与群共にその骨の新生部位は類似している。

約 100 μ の硬組織標本を作成し、Contact Microradiogram を撮影した。EHDP 群では、Softex と同様に、拡大した growth plate の外側上方に僅かに石灰化を認める。EHDP+Ca 群では、拡大した growth plate の外側上方より中央にまで伸びる石灰化陰影を認め、石灰化の亢進が観察される。EHDP+Vit.D₃ 群では、growth plate の外側に扇状の石灰化

図 2 脛骨近位部の Softex 像

EHDP 群では growth plate の拡大が見られ、その中に僅かに石灰化を認める。EHDP+Ca 群では拡大した growth plate 内の石灰化が亢進している。EHDP+Vit.D₃ 群では拡大した growth plate 内に massive な石灰化を認める。

図 3 脛骨近位部塩化シアヌル固定脱灰H E染色像

EHDP 群では拡大した growth plate の外側にエオジンで濃染する Osteoid tissue を認める。EHDP+Ca 群では osteoid tissue の上方に僅かに骨の形成を認める。EHDP+Vit. D₃ 群では拡大した growth plate 外側に扇状の骨状の骨形成を認める。

を認め、H E 染色像で観察された旺盛な骨新生部と一致する (図 4)。

考 察

EHDP 大量投与により、石灰化障害が発生する⁵⁾が、その作用機序としては、Hydroxy apatite の Crystallization の抑制により説明されているが、その他にも、活性型 Vit.D₃ の生成阻害や、直接の cell effect の可能性も示唆されており、未だ議論のある所である。

我々は EHDP 大量投与による石灰化障害モデルにおいて、1 α , 25-(OH)₂D₃ がその回復過程を促進することを報告したが²⁾、その作用機序の一つとして高カルシウム血症による石灰沈着の促進があるのではな

いかと考え、カルシウム製剤の投与実験を行ない、第 67 回 本学会にてカルシウム製剤により石灰化の促進が見られ、またその作用発現様式が 1 α , 25-(OH)₂D₃ と類似する事を報告した⁴⁾。しかし両薬剤についての比較検討は行なっていない。今回我々は parent Vit.D₃ とカルシウム製剤による石灰化促進作用について比較検討した。両薬剤ともに、その石灰化促進部は、拡大した growth plate の外側であり、EHDP くる病の回復過程における通常の石灰化部位と同様の部位である。この部分は Softex 像と組織像から類推されるように、円筒状に拡大した growth plate を輪状にとりまいている。EHDP 群では、その石灰化は未だ僅かであるが、EHDP+Ca 群では軟骨細胞の周囲の軟骨基質における石灰化が亢進し、更に僅かでは

図 4 約 100 μ の硬組織 Contact Microradiogram 像

EHDP 群では拡大した growth plate の外側に僅かに石灰化を認める EHDP +Ca 群では石灰化が促進している。EHDP+Vit. D₃ 群では同部に旺盛な石灰化を見る。

あるが骨の形成も認められる。一方 Vit. D₃ 投与群では、軟骨基質の石灰化の次の段階である骨の新生が主な所見であり、また沈着せる石灰の量的なものも前二者と比較して格段に多い、カルシウム製剤投与による石灰化の亢進がいかなる機序のものかについては、更に検討を加える必要があるが、それがカルシトニンを介するものでないことは、その作用発現様式が異なる事より推定される³⁾。一方 Vit. D₃ とカルシウム製剤という、共に高カルシウム血症を起こす薬剤が、同様の効果発現様式を持って石灰化促進作用を示し事により、我々は高カルシウム血症をその一つの機序と考えている。EHDP くる病モデルにおいてカルシウム製剤および Vit. D₃ 投与によりどの程度の高カルシウム血症が生じるかについては、我々は未だ確実な Data を得るに致っていないが、両薬剤における石灰化の格段の差異は、Vit. D₃ による石灰化促進作用が、単なるカルシウム血症だけでないことを示唆するものである。

ま と め

EHDP くる病モデルに対しカルシウム製剤および parent Vit. D₃ を投与する事により石灰化促進作用を認めた。Vit. D₃ による石灰化はカルシウム製剤に比して著しく、旺盛な骨の形成を見るに致った。

文 献

- 1) Eguchi, M. et al.: Evidence for the promotion of calcification and bone formation by [Asu]-eel-calcitonin in the EHDP induced rickets. Bone metabolism 15: 71-80, 1982.
- 2) 江口正雄: Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) による骨軟骨石灰化障害および吸収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.
- 3) 柴田堅一郎・他: 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—, 第67回西日本整形災害外科学会 投稿中 1984.

- 4) 島内 卓・他: EHDP で誘発される骨軟骨石灰化障害モデルにおけるカルシウム剤大量投与の効果. 第67回西日本整形災害外科学会, 投稿中, 1984.

- 5) 塩田悦仁・他: Diphosphonate による骨軟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 (EHD P) 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: 175-179, 1981.