

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	辛 風
<p style="text-align: center;">EFFECT OF VITAMIN K₂ ON THE LUMBAR VERTEBRAL BONE:</p> <p style="text-align: center;">HISTOMORPHOMETRIC ANALYSES OF EXPERIMENTAL OSTEOPOROTIC RATS</p> <p style="text-align: center;">(実験的骨粗鬆症脊椎に対するビタミンK₂の作用について ——組織学および骨形態計測分析——)</p> <p style="text-align: center;">竹光 正和 熱田 裕司</p> <p style="text-align: right;">Journal of Orthopaedic Science 6:535-539</p> <p style="text-align: right;">2001</p> <p style="text-align: center;">研 究 目 的</p> <p>ビタミンK₂は血液凝固系の cofactor として知られるが、近年骨代謝にも関わりをもつ因子であることが明らかとされた。骨形成に関与するグラ(GIa)化蛋白は骨基質に存在し、ビタミンK₂は蛋白のグラ化に必要である。またビタミンK₂は破骨細胞を抑制し骨吸収を抑制する。これらの作用をもとにビタミンK₂は骨粗鬆症の治療薬としてすでに臨床応用されるに至っている。しかし、ビタミンK₂の骨組織形態に及ぼす作用については未だ十分に明らかとされていない。</p> <p>骨の組織学的研究においては、最近となって骨の構成要素を判別するための手技が開発</p>			

され、さらにコンピュータを利用した骨形態計測法を応用する方法が確立されてきた。私は本研究において卵巣切除による実験的骨粗鬆症モデルを対象とし、骨形態計測法を用いてビタミン K₂ が腰椎骨組織変化に及ぼす影響を詳細に解析した。

材 料 ・ 方 法

動物モデルの作製

8 週令の雌 Wistar ラット(体重 260-300g) 18 匹を 6 匹ずつ以下の 3 群に分けた。手術的処置はフロセン麻酔下に無菌的に施行した。卵巣摘出群(OVX)は両側卵巣を切除し 8 週間飼育した。Sham 手術群(SHAM)では処置を卵巣露出にとどめて切除せず 8 週間飼育した。さらに卵巣切除後ビタミン K₂ 投与群(OVX+VK₂)では卵巣切除翌日から 30mg/kg のビタミン K₂ を 8 週間にわたり連日皮下投与した。

組織標本作製

各群の動物は処置後 8 週間経過後に屠殺し、10%緩衝ホルマリンで灌流固定した。第 3 腰椎を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで 48 時間追加固定した。さらに摘出腰椎は EDTA による 10 日間の脱灰処理を行い、パラフィン包埋した後前額面方向に 14 μ m 厚で薄切した。切片はテトラクローム変法、すなわちヘマトキシリン、アニリンブルー、ピクロオレンジとボンソー混合液で順次染色した。

組織形態計測

染色標本は光学顕微鏡を用いてデジタル写真撮影し、コンピュータに取り込んだ。画像ソフトを用いて、色調の差から骨面積(B. Ar)、骨髓面積(Ma. Ar)、ミネラル化骨面積(M. Ar)、類骨および非ミネラル化骨面積(O. Ar)のそれぞれを識別して計測した。これらの数値について、動物 3 群間の比較を行った。統計的解析には Tukey 法を用いた。

成 績

今回用いた染色法によって、ミネラル化骨部分は赤に、非ミネラル化骨部分はピンクに、類骨は濃青に染色され、画像ソフトによって明瞭に区別して面積を計測することが可能であった。これをもとに各群の B. Ar、Ma. Ar、M. Ar、O. Ar の値を算出できた。

B. Ar は OVX 群で $0.45 \pm 0.11 \text{ mm}^2$ 、OVX+VK₂ 群で $0.47 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ 、SHAM 群では $0.48 \pm 0.10 \text{ mm}^2$ となり、3 群間に有意の差を認めなかった。Ma. Ar もそれぞれ順に $0.56 \pm 0.11 \text{ mm}^2$ 、 $0.54 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ 、 $0.52 \pm 0.10 \text{ mm}^2$ であり 3 群間に差を認めなかった。一方、M. Ar は SHAM 群で $0.43 \pm 0.10 \text{ mm}^2$ に対して OVX 群では $0.32 \pm 0.13 \text{ mm}^2$ となっており有意な減少が見られた。逆に O. Ar は SHAM 群で $0.06 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ に対して OVX 群では $0.13 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ となっており有意な増加が見られた。これに対して、OVX+VK₂ 群における M. Ar と O. Ar はそれぞれ $0.40 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ と $0.06 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ となっていた。OVX+VK₂ 群における M. Ar と O. Ar の値はいずれも SHAM 群との間には有意差を認めなかったが、OVX 群との比較ではいずれも有意な差を認めた。骨の各構成要素の割合として評価した場合も傾向は同様であり、SHAM 群を対照とすると OVX 群では B. Ar の割合が有意に減少し、O. Ar の割合は有意に増加した。OVX+VK₂ 群では SHAM 群と比較してわずかに B. Ar の割合が減少し、O. Ar の割合は増加したがその変化は有意ではなかった。

考 案

骨粗鬆症は女性の閉経を契機とするエストロゲン低下にもとづき骨代謝が負に傾くことで発症するとされる。骨粗鬆症では骨脆弱性により骨折発生の危険率が增大することが問題であり、骨量のみならず骨の組織形態変化にも注目する必要がある。

本研究では骨代謝の研究領域で最も一般的な卵巣切除による骨粗鬆症モデルを用いた。また、本研究で組織標本作製に用いたテトラクローム変法は比較的最近に確立された方法

であり、骨組織を硬組織切片とせずに脱灰処理標本によってミネラル化骨と非ミネラル化骨を判別できることが利点である。

本研究の結果からすると、卵巣切除から8週間の経過したOVX群においても骨量を反映するB.Ar値自体の有意な減少には至らなかった。しかし骨構成要素の形態の定量的解析から、OVX群ではミネラル化骨の割合は有意に減少し、逆に非ミネラル化骨と類骨の割合が増加することが明らかとなった。一方、卵巣摘出後にビタミンK₂を投与したOVX+VK₂群の場合には骨構成要素の割合はSHAM群と同等であることから、ビタミンK₂は卵巣摘出の影響を抑制したと考えることができる。骨基質に存在するグラ(Gla)化蛋白はコラーゲンマトリックスに対するカルシウム沈着を促進し骨成熟を促すとされる。ビタミンK₂はこの蛋白がグラ化する過程でco-factorとして必要とされる。従って、本研究においてビタミンK₂投与が骨構成要素のミネラル化骨の割合を増大させる作用を示したことは矛盾しない結果と言える。さらにこのことは骨強度の面からも脆弱化を防止する作用を示唆するものである。

本研究では上記の結果からビタミンK₂の骨形成促進作用を示したが、卵巣切除モデルが顕著な総骨面積減少を示さなかったことから骨吸収過程に対する作用については評価できず、今後の課題として残された。

結 論

1. ラット腰椎について、骨構成要素を識別しながら組織形態計測法による解析を行った。
2. 卵巣摘出後8週間経過時の評価において骨量の有意な低下は見られなかったが、骨構成要素としてミネラル化骨割合の増加、非ミネラル化骨の増加を認めた。
3. ビタミンK₂の投与は、卵巣摘出後に生じる骨構成要素の変化を抑制した。

引用文献

1. Hamulyak K, Vermeer C. Osteocalcin: a vitamin K-dependent protein in bone. *Neth J Med* 1985; 28:305-6.
2. Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:3925-29.
3. Ralis ZA, Watkins G. Modified tetrachrome method for osteoid and defectively mineralized bone in paraffin sections. *Biotech Histochem* 1992; 67:339-45.

参考文献

1. Xin Feng, Takemitsu M, Atsuta Y, Matsuno T. Effect of Vitamin K₂ on the Lumbar Spianl Bone of Experimental Osteoporotic Rats - Histomorphometric Analyses-. *日本整形外科学会雑誌*, 2000; 74(8):pS1544.
2. Feng Xin, Masakazu Takemitsu, Yuji Atsuta. Effect of vitamin K₂ on the lumbar vertebral bone: histomorphometric analyses of experimental osteoporotic rats. *日本整形外科学会雑誌*, 2001; 75(12):p700.
3. 辛 風, 熱田 裕司, 竹光 正和, 松野 丈夫. 骨粗鬆症ラットの長幹骨におけるビタミン K₂ の生体力学的影響の検討. *日本整形外科学会雑誌*, 2002; 76(8):pS1141.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	辛 風
<p>審査委員長 <u>松野 丈大</u> (印)</p> <p>審査委員 <u>石川 隆男</u> (印)</p> <p>審査委員 <u>北 進一</u> (印)</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Effect of vitamin K₂ on the lumbar vertebral bone:</p> <p>histomorphometric analyses of experimental osteoporotic rats</p> <p>(実験的骨粗鬆症脊椎に対するビタミン K₂ の作用について</p> <p>組織学および骨形態計測分析)</p>			
<p>ビタミン K₂ は血液凝固系の cofactor として知られるが、近年骨代謝にも関わりをもつ因子であることが明らかとなった。骨形成に参与するグラ (Gla) 化蛋白は骨基質に存在し、ビタミン K₂ は蛋白のグラ化に必要である。しかし、ビタミン K₂ の骨組織形態に及ぼす作用については十分に明らかにされていなかった。</p> <p>本研究は卵巣切除による骨粗鬆症モデルを対象として骨形態計測分析に行なったものである。組織標本作製に用いたテトラクローム変法により、脱灰処理標本によってミネラル化骨と非ミネラル化骨を判別して検討することが可能であった。その結果、以下の知見を得た。</p>			

- 1) 卵巣切除から8週間の経過した卵巣摘出群において、骨量を反映する骨面積値自体の有意な減少には至らなかった。
- 2) 骨構成要素の形態の定量的解析から、卵巣摘出群ではミネラル化骨の割合は有意に減少し、逆に非ミネラル化骨と類骨の割合が増加した。
- 3) 卵巣摘出後にビタミン K₂ を投与した OVX+VK₂ 群の場合には骨構成要素の割合は SHAM 手術群と同等であることから、ビタミン K₂ は卵巣摘出の影響を抑制したと考えることができた。

本研究においてビタミン K₂ 投与は卵巣摘出による骨構成要素のミネラル化骨減少を抑制する作用を示した。このことは骨強度の面からも脆弱化を防止する作用を示唆するものである。以上の結果はビタミン K₂ の骨形成促進作用と示したが、卵巣切除モデルが顕著な総骨面積減少を示さなかったことから、骨吸収過程に対する作用については今後の課題として残された。

本研究の成果は、実験における骨粗鬆症に対するビタミン K₂ の骨形成促進作用を客観的かつ数量的に示し、臨床的治療法の展開、進展に大きく貢献し得ると考えられる。なお、各審査委員より、本論文ならびに関連分野に関する試問の結果からも適切との回答が得られた。よって、本審査委員会は、本論文が学位論文に十分値するものと判定した。