

ウサギ血清病モデルにおける血小板活性化と骨壊死

信州大学医学部整形外科 高岡 邦夫

発表者：大阪大学医学部整形外科 中田 活也

〔伊丹〕次に、4番の「ウサギ血清病モデルにおける血小板活性化と骨壊死」を高岡先生にお願いしたいと思います。

〔高岡〕私のテーマは、大腿骨頭壊死症でありまして、この研究の大きな流れといいますのは、大腿骨頭壊死症のモデルを開発しまして、そこで起こっている病態を詳細に解析しまして、それによって、大腿骨頭壊死の予防を図ろうというのが研究の方向であります。ご存じのとおり、大腿骨頭壊死症というのは、最近ではステロイドのパルス療法とか、あるいは腎移植とか、病因の背景のオンセットというのがかなりはっきりしてきましたので、我々がいい技術を持てば、多分これを予防できるだろうというのが我々の予測であります。もちろん整形外科的には、大腿骨頭壊死症の治療法というのがあるわけですが、そうではなくて、将来的にはできるだけ予防しようというのが我々の研究の方向性であります。私は当財団から助成金を賜りましたのは2年前でありまして、そのとき私は大阪大学おりました。私のグループでそういう研究をやっていましたが、昨年8月に私は信州大学に移りまして、私自身はその研究グループから外れてしまいましたので、そのグループでそれ以後行われました研究の成果というのを中田活也先生にかわって発表していただきます。

〔中田〕スライド、お願いします。

〔はじめに〕

特発性大腿骨頭壊死症は、発症時には既に

骨頭圧潰が起こり、その病期が進行してしまっていることが多い。そこで最近では、その発生時期をMRIなどで予見的にとらえる研究が進んできており、発症よりもかなり早い時期に骨壊死が発生していることが明らかになりつつある。しかしながら、骨壊死発生前後の病態を臨床的にとらえることは、現時点では非常に困難であることも事実である。そこで我々は、骨壊死の病因病態解明のために利用できる、再現性良好な骨壊死モデルを確立すべく研究を行ってきた。

我々は1992年にウマ血清2回静脈内投与によるウサギ血清病モデルの大腿骨近位骨幹端に骨壊死が発生することを報告した。

本モデルにおいては、馬血清1回投与のみでは骨壊死は発生せず、馬血清を3週間の間隔で2回静脈内投与すると、2回目投与後1週間で骨髄壊死と骨梁壊死が発生する。

さらに骨壊死発生のメカニズムを明らかにするために、本モデルの早期病態を詳細に検討する必要があると考え、2回目の馬血清投与後72時間以内に焦点を絞って、組織学的検討を重ねた。その結果、骨壊死発生部位近傍には、赤血球の漏出と細動脈内血栓などの早期微小循環障害が発生していることが明らかになった。

〔目的〕

本研究では、本モデルの早期微小循環障害の原因を解明するために、その早期病態を血液学的観点から検討し、さらに血小板活性化と骨壊死とに関連性があるか否かを調査した。

〔実験1〕

〔方法1〕

成熟日本白色ウサギに、非動化馬血清を3週間の間隔で2回動脈内投与し、2回目投与前後で経時的に血液を採取した。2回静脈内投与後1週間で屠殺し、その大腿骨を組織学的に検討して、骨壊死の有無により、骨壊死群と非骨壊死群とに2分した。

血小板数、血球数、凝固線溶系各因子、血液粘稠度、T X B 2 及び血小板凝集能を測定し、骨壊死群と非骨壊死群の2群で経時的に比較検討した。

なお、血小板凝集能は、採取した血液を遠心分離することによって、platelet rich plasma と platelet poor plasma に分離した後、凝集惹起剤として、血小板活性化因子 P A F を用いて、血小板凝集を誘導し、血小板凝集測定器を用いて、血小板凝集進行による透過率を測定し、その最大透過率を血小板凝集能とした。

〔結果1〕

赤血球数は2回目投与後から徐々に減少したが、両群間で有意差はなかった。

白血球数は両群とも2回目投与後、1から2時間で一過性に減少したが、ともに経時的に有意差はなかった。

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時間で有意に骨壊死群が低値を示した。(図1)

T X B 2 は、骨壊死群で急速に増加し、2時間と6時間では非骨壊死群に比べて有意に高値となり、その後急激に減少した。(図2)

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時間で有意に高値となった。(図3)

フィブリノーゲンは、両群とも一過性に減少したが、有意差はなかった。

P T と A P T T はともに有意な変化はなく、有意差もなかった。また、その他の凝固因子及び血液粘稠度にも有意差はなかった。

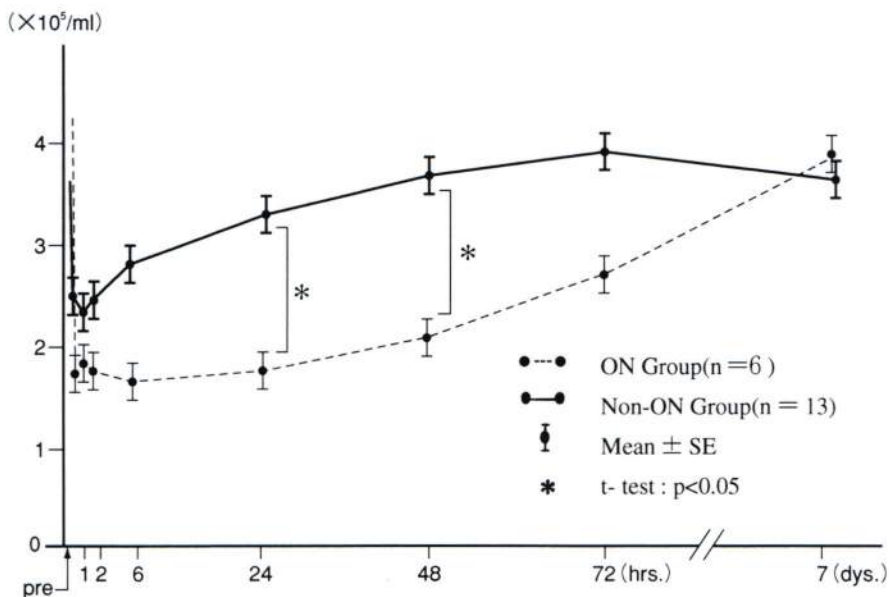


図1 血小板数の経時的変化

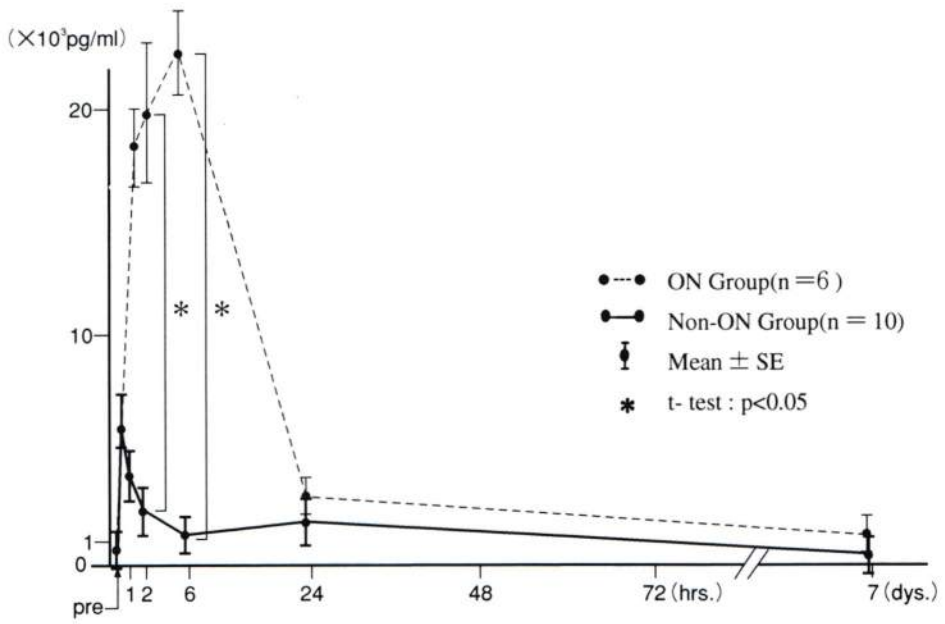


図2 TXB2の経時的変化

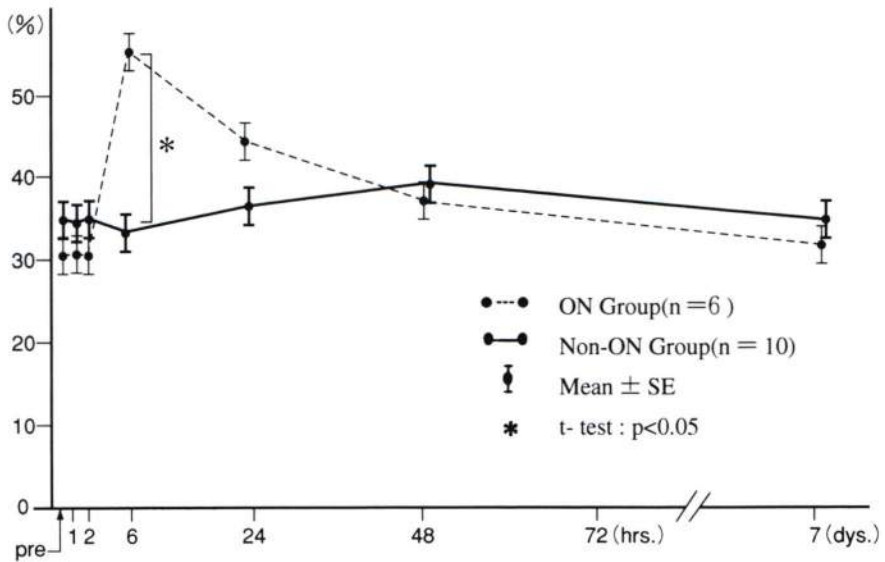


図3 血小板凝集能の経時的変化

(まとめ1)

血液学的観点から見た本骨壊死モデルの早期病態の主たる特徴は、骨壊死群における血小板の持続的な減少、TXB₂の急激な増加、さらに血小板凝集能の一過性の増加であった。これらの変化は本系において血小板の活性化が惹起されていることを示唆するものである。

[実験2]

(方法2)

血小板活性化因子(以下PAF)のレセプターアンタゴニストである抗PAF剤: E 5880, Eisai)の使用の有無により、成熟日本白色ウサギ80羽を、各群20羽ごと、対照群と抗PAF群a、b、cの4群に分類した。抗PAF剤の使用量は、a群が体重当り0.3mg、b群が1mg、c群が3mgであった。

対照群では抗PAF剤は使用せず、馬血清を3週間の間隔を置いて、2回静脈内投与した。

抗PAF群では、抗PAF剤を馬血清の2回目投与前5分に静脈内投与した。

各群とも、馬血清2回目投与後1週間で屠殺し、大腿骨骨髓内における赤血球の漏出と細動脈内血栓などの早期微小循環障害並びに骨髓壊死及び骨梁壊死を観察した。

(結果2)

赤血球漏出の頻度は、対照群が55%に対して、抗PAF-a群が50%、b群45%、及びc群30%と減少し、対照群とc群間ではその頻度に有意差があった。

細動脈内血栓の頻度は、対照群が65%に対して、抗PAF-c群で35%と低く、その頻度に有意差があった。

骨髓壊死の頻度は、対照群が45%に対して抗PAF-a群が30%、b群25%、c群10%と減少し。

骨梁壊死の頻度は対照群30%に対して、a群15%、b群10%及びC群5%であった。骨

髓壊死も骨梁壊死も、その頻度は対照群と抗PAF-c群とで有意差があった。

(まとめ2)

以上より、赤血球漏出、細動脈内血栓などの微小循環障害及び骨壊死の頻度は、対照群に比べて抗PAF群でいずれも低く、抗PAF剤の量に依存して減少していることが判明した。

(考察)

本系は、馬血清の2回投与により、免疫複合体を誘導する古典的な血清病モデルであり、血管障害モデルとして従来使用されてきた。松井らは、この血清病モデルを詳細に検討し、骨壊死の病因病態を解明するための骨壊死モデルとしても利用できることを報告した。

近年、我々は、本系の腎臓糸球体に免疫複合体の沈着が見られ、大腿骨骨髓内の早期微小循環障害と腎臓への免疫複合体との沈着とは有意な相関関係があることを報告した。

さらに大腿骨骨髓内の早期微小循環障害は、大腿骨骨髓内の免疫複合体沈着とも有意な相関関係があることを明らかにした。

一方、免疫複合体による微小循環障害のメカニズムとして、免疫複合体が血小板などを活性化することにより、血管内皮細胞の透過性を亢進させて、血球成分の漏出を助長したり、血小板や好中球の活性化により、血管内皮細胞の障害や血栓形成を促すことが明らかになっている。

これらの事実を考慮すると、実験1で証明された早期病態における血小板活性化は、免疫複合体の沈着によるものと推定できる。したがって、血小板活性化の惹起により、早期微小循環障害が発生した可能性が高いと考えられる。

さらに実験2においては、抗PAF剤により、血小板活性化を抑制して、本系の微小循環障害および骨壊死発生が抑えられた可能性

が高いと考えられる。

スライドは、本骨壊死モデルにおける一連の実験により推定される骨壊死発生メカニズムのシェーマである。つまり、大腿骨骨髄内の免疫複合体の沈着により、血小板や血管内皮細胞などが活性化されて、PAFを初めとする種々のケミカルメディエーターが、血小板や血管内皮細胞に作用し、血管内皮細胞の透過性を亢進させたり、血小板を凝集させたりして、微小循環障害及び骨壊死を引き起こすものと考えられる。

(結 論)

以上より、血小板活性化が本モデルの骨壊死の病因に深く関与している可能性があると推定できた。したがって、今後臨床的にも骨壊死発生の早期病態における血小板活性化の関与の有無や、将来的には抗PAF剤の臨床的有用性の検討が重要であると考えられる。

最後に、本研究に助成をいただきました伊丹理事長並びに日本股関節研究振興財団に感謝いたします。どうもありがとうございました。

< 討 論 >

〔伊丹〕 ありがとうございます。骨頭壊死と血小板の問題、何かご質問は……。

〔田中〕 近畿大学の田中です。ちょっと教えてほしいのですが、この馬血清で、血小板の凝固能が高まる。これはお聞きしてわかったのですが、凝固因子との兼ね合いではどうなのですか。

〔中田〕 凝固因子の働きというか、その作用を反映していると考えている、プロトロンビン時間であるとか、部分トロンボプラスチン時間などには、経時的に見て変化が出ていないということになると、やはり血小板そのものの活性化というのが、一番初めに起こっている原因で、血栓をつくっている一番の大きな主役ではないか、そのように考えております。ですから、凝固因子による異常が血液の凝固能を高めて血栓をつくるという、そういうパスウェイは、一義的なものではないと考えております。

〔田中〕 古い文献では、何番目か忘れましたが、凝固因子が高まって、オステオネクロシスをつくるという文献があるわけですけども……。

〔中田〕 症候性の壊死でしたら、凝固因子線溶系の因子の欠損があって、凝固能が高まってという報告もあるようですけども、そういう症候性のものよりも、SLEとか、腎移植のような免疫異常が発生する疾患の後に起こる壊死にターゲットを絞って、この骨壊死モデルを検討しておりますので。

〔伊丹〕 どうもありがとうございました。