

学 位 論 文 の 要 旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 乙 生命医科学専攻 臨床医学系講座 運動器外科学・腫瘍集学治療学分野	氏 名	眞弓 徳大 ^{まゆみ のりひろ}
<p>主論文の題名</p> <p>Association of bisphosphonate with bone loss and pain-related behaviour in an adjuvant-induced osteoporosis model</p> <p>主論文の要旨</p> <p>【目的】関節リウマチ（RA）は滑膜炎と進行性の骨軟骨破壊を伴う疾患であり、続発性骨粗鬆症を呈する。関節炎所見が乏しいにも関わらず症状を訴えることがあり、炎症関節が周囲関節に影響を及ぼす可能性がある。本研究の目的は、足関節炎モデルを用いて近隣関節である膝関節の骨形態計測および組織学的検討を行い、炎症周囲関節の影響を評価することと、確立した動物モデルを用いて骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネートによる治療効果を検討することである。</p> <p>【方法】第一の研究は関節炎誘発性骨粗鬆症モデル（以下 AO モデル）の確立である。8週齢の雌 ddY マウスを用いて、右足背に完全フロイントアジュバント（CFA）20μl を皮下注射した AO 群、右足背に生理食塩水 20μl を皮下注射した対照群の右膝関節における骨形態計測を行い、CFA もしくは生理食塩水を注射後 3 日、7 日、14 日、21 日、28 日と経時的に評価した（各群 5 匹）。骨形態計測はマイクロコンピュータ断層撮影（μCT）を用いて、当該膝関節の大腿骨遠位骨幹端および脛骨近位骨幹端を計測した。また、組織学的検討として当該膝関節の HE 染色を行い、膝蓋下脂肪体炎症スコアにて関節炎の程度を評価した。</p> <p>第二の研究では、AO モデルの疼痛関連行動の評価とビスホスホネート（アレンドロネート：ALN）投与による治療効果の検討を行った。8週齢の雌 ddY マウスを用いて、CFA 20μl を右足背に投与した AO 群に CFA 投与後 7 日目から 14 日目までビスホスホネート 40μg/kg を週 2 回皮下注射した AO-ALN 群と生理食塩水を同量皮下注射した未治療群（AO-生食群）、そして生理食塩水 20μl を右足背に投与し、投与後 7 日目から 14 日目まで生理食塩水を ALN と同量皮下注射した対照群を作成した。ALN もしくは生理食塩水を注射後 14 日後に当該膝関節の骨形態計測評価、疼痛評価、組織学的評価を行った。疼痛関連行動の評価は von Frey filament を用いた逃避行動を起こす最小刺激強度（閾値）、up-down method を用いた 50%閾値にて行った。直接膝関節を刺激する事でより正確に膝関節における疼痛を評価した。組織学的評価は膝蓋下脂肪体炎症スコアに加え、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色を施行</p>			

し、当該膝関節の脛骨近位骨幹端における TRAP 陽性細胞数を計算し、破骨細胞数とした。また免疫組織学的検討として膝関節の知覚を支配している L4 後根神経節におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の染色を行い、その発現割合を評価した。

【結果】第一の研究における μ CT による骨形態計測では、CFA もしくは生食を投与後 7 日および 14 日目において AO 群では対照群と比較して骨密度 (BV/TV)、骨梁数 (TB.N) が有意に低下すると共に骨梁間隔 (Tb.Sp) が有意に増加し、骨量の減少を認めた。一方、投与後 3 日、21 日、28 日目では AO 群と対照群では有意差を認めなかった。AO 群での膝関節における膝蓋下脂肪体炎症スコアは CFA 投与側では非投与側と比較し、CFA 投与 3 日から 14 日まで有意に上昇していたが、投与 21 日目以降では有意差を認めなかった。

第二の研究における μ CT による骨形態計測では、AO-ALN 群は未治療群である AO-生食群と比較し、BV/TV および TB.N が有意に増加するとともに Tb.Sp は有意に低下し、骨量の改善が認められた。また当該膝関節周囲の閾値、50% 閾値は AO-生食群と比較し、AO-ALN 群で有意に改善していた。組織学的検討では、当該膝関節における膝蓋下脂肪体炎症スコアは AO-生食群では対照群と比較し有意に増加し、AO-ALN 群では AO-生食群と比較し有意に低下していた。また発症後 14 日目の脛骨近位骨幹端における TRAP 染色陽性細胞数は、AO-生食群では対照群と比較して有意に増加していた。一方 AO-ALN 群では AO-生食群と比較し有意に減少していた。また L4 後根神経節における CGRP 染色を用いた免疫組織学的検討では、CGRP 陽性ニューロンの割合は AO-生食群において、対照群よりも有意に多く、また AO-ALN 群では AO-生食群よりも有意に少なかった。

【考察】動物モデルは、疾患病理のメカニズムを解明し、潜在的な生物学的標的を特定するために広く使用されている。今回の研究により、関節炎を惹起した部位の隣接関節の骨量減少および炎症の波及を明らかにした。また、ビスホスホネート治療は破骨細胞増加を抑制することで骨量減少を抑制し、疼痛関連行動と組織学的評価により痛覚過敏を抑制することを見出した。続発性骨粗鬆症を有し、関節症状残存を認める RA などの関節炎疾患患者の疼痛に対し、ビスホスホネートが有効である可能性を示した。