

# 臨床における骨組織形態計測の実際

山本智章 島倉剛俊 高橋栄明 田邊春美

新潟リハビリテーション病院整形外科/新潟骨の科学研究所

key words : 骨形態計測, 腸骨生検, 骨リモデリング, 臨床

## 要 旨

骨形態計測法は骨量, 骨微細構造および骨代謝動態を定量的に評価する方法として始まり, 骨代謝研究に大きな役割を果たしてきた。骨組織の代謝メカニズムを評価するために骨標識剤の投与や非脱灰標本の作製が特徴となっている。臨床では腸骨生検が標準的な骨組織評価部位として確立しており, 大規模臨床試験のさいには腸骨の骨形態計測データが重視されている。骨粗鬆症や骨代謝性疾患の病態を解明するとともに, 様々な薬剤の効果, 全身疾患による骨への影響など, 骨形態計測によって重要な情報が得られる。

## はじめに

骨形態計測法は骨量, 骨微細構造および骨代謝状態を定量的に評価する方法として始まり, 臨床では腸骨生検が標準的な骨組織評価部位として確立している。骨粗鬆症や骨代謝性疾患の病態を解明する研究手法として長年に渡って骨形態計測学は大きな役割を果たしてきた。本稿では骨形態計測法の歴史的背景と実際の方法および意義について解説する。

### 1 骨格の特徴：皮質骨と海綿骨

皮質骨は多数の強固な層板構造を持ち, 骨格の部位によって厚みは異なり, 骨端～骨幹部では皮質は薄く内部に連続した海綿骨が豊富に存在するが, 骨幹部皮質骨は厚く強靱であり, 同心円状の骨単位を有した層板構造からなる (図1)。皮質骨は骨量に比して表

面積が小さいことからその代謝回転 (turnover) はゆっくりと進行しており, 力学的機能が主体と考えられている。海綿骨は骨皮質に覆われて骨梁構造を内部に展開し, 骨単位は形成されない。海綿骨は表面積が大きく, turnoverが高いことから代謝機能の役割が大きいと考えられている (表1)。

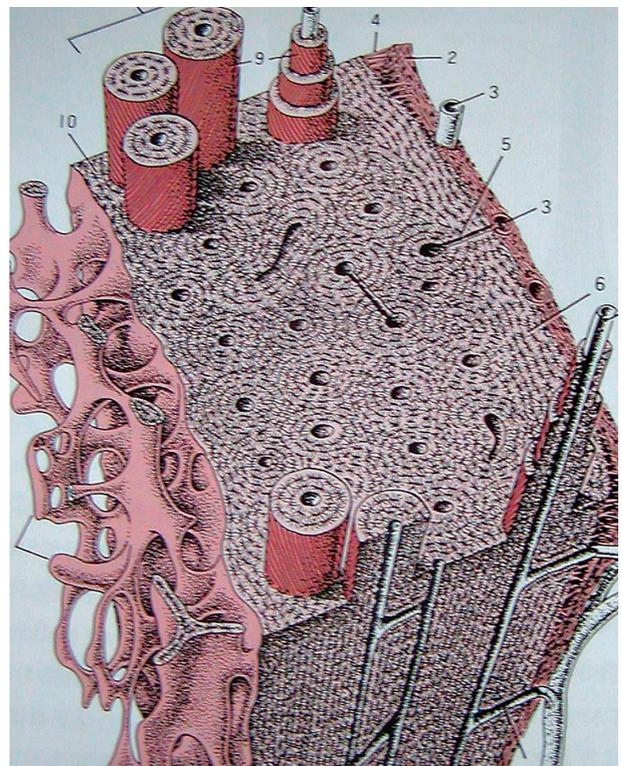


図1 皮質骨と海綿骨の構造  
(新骨の科学, 医歯薬出版, 2007より引用)

表1 皮質骨と海綿骨

	Cortical	Trabecular
Fractional volume (mm <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.95	0.20
Total bone volume (mm <sup>3</sup> )	1.4 × 10 <sup>6</sup>	0.35 × 10 <sup>6</sup>
Total internal surface (mm <sup>2</sup> )	3.5 × 10 <sup>6</sup>	7.0 × 10 <sup>6</sup>
Surface/bone volume (mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> )	2.5	20

Jee WS: Cell and Tissue Biology より引用一部改変.

## 2 骨形態計測学の歴史的背景

1950年代に米国 Utah 大学では、Webster Jee らによって、骨組織研究の新たな研究手法としてプラスチックに包埋した非脱灰状態での光学顕微鏡による観察が始まった<sup>1)</sup>。1960年に、Henry Ford Hospital で整形外科医の Harold M Frost は、テトラサイクリン標識を用いて人の骨形成速度を報告し、臨床における骨形態計測学の扉を開いた<sup>2)</sup>。1983年、クレイトン大学の内分泌医 Robert Recker は、骨形態計測学のテキストを刊行し、基本的な手法とその理論を発表した<sup>3)</sup>。一方、日本において1985年、新潟大学整形外科の高橋榮明は骨形態計測ハンドブックを刊行した<sup>4)</sup>。1987年、American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) nomenclature committee は、骨形態計測用語の統一と標準化を検討し学術誌である JBMR に公開した<sup>5)</sup>。2012年には改訂版が示されている<sup>6)</sup>。

## 3 骨形態計測法の実際

骨形態計測法は直接的に骨組織を観察し、顕微鏡視下に見える組織的な変化を定量化することができる。組織を一定の基準で計測することにより疾患の病態や薬剤のメカニズムの定量的評価が可能となる。ヒト腸骨生検の方法について解説する<sup>7)</sup>。

### 3-1 骨標識

生検前に、骨標識剤として、テトラサイクリン系の抗生物質（アクロマイシン V、レダマイシン）を間隔をあけて2回実施する。

例：アクロマイシン V 250 mg × 3 回/日 × 2 日間投与（1 回目標識）の後 14 日間休止，2 日間投与（2 回目標識），7 日間の休薬の後に生検を実施する。

### 3-2 腸骨採取

腸骨生検は仰臥位で上前腸骨棘から背側に 2 cm、



図2 新潟骨の科学研究所式腸骨生検器

腸骨稜から尾側に 2 cm の部位に皮膚，皮下組織，骨膜に局所麻酔を行い，約 2 cm の皮切で軟部を鈍的に展開し外板骨膜に達する。専用トレフィンや中空のドリルを挿入し，愛護的にゆっくりと外板から内板まで貫いて組織を採取する。腸骨生検による合併症として血腫や感染に特に注意して無菌的な手技を行う。新潟骨の科学研究所では安全にかつ容易に安定した腸骨生検実施のための生検器を製作している（図2）。

### 3-3 標本作成

摘出骨は 70% エタノールで固定し組織染色が施される。続いてプラスチック樹脂に包埋して薄切標本または研磨標本が作製される。通常の病理標本と異なり，脱灰しない硬組織標本が基本である（図3）。

### 3-4 計測

主な計測部位は海綿骨が観察される。正確な計測データを得るために骨梁構造が保たれた十分な海綿骨領域が確保されていることが重要である。皮質骨内膜面から一定の距離を置き，面積として 30 mm<sup>2</sup> 以上の計測領域が望ましい（図4）。「画像計測システム」では顕微鏡に接続したデジタルカメラとコンピューターが連動し，ディスプレイ上に表示された標本を普通光，蛍光，偏光の3種類で観察する（図5）。

骨組織の特徴として，類骨と石灰化骨，骨芽細胞と

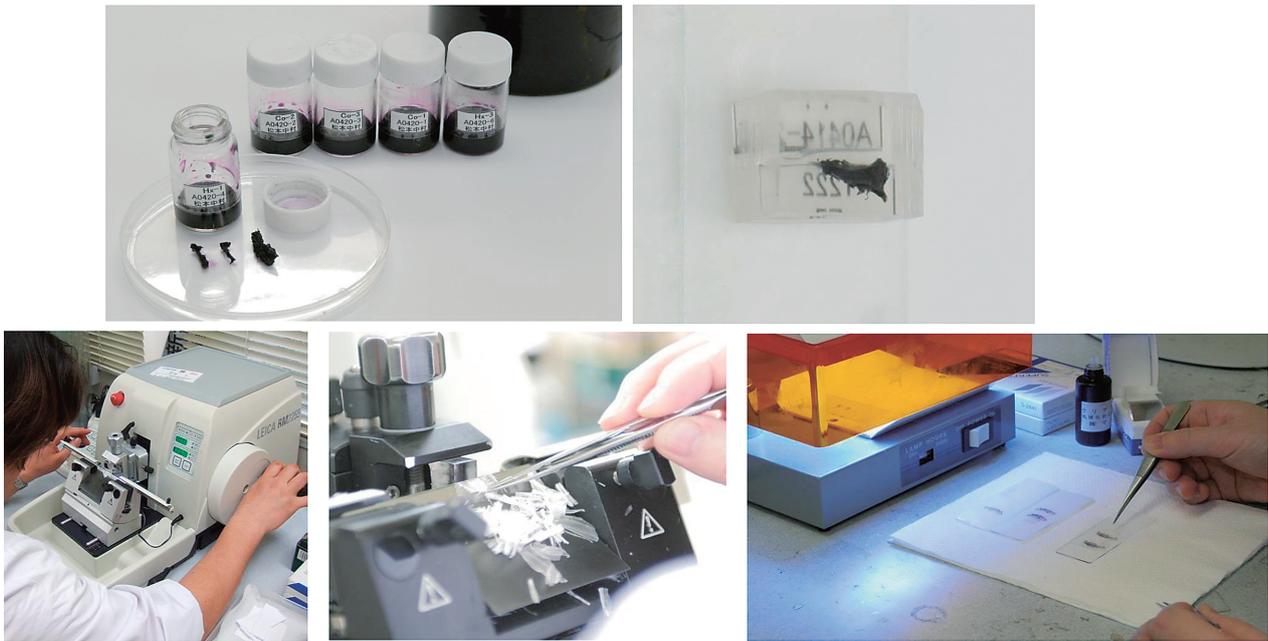


図3 非脱灰薄切標本作製

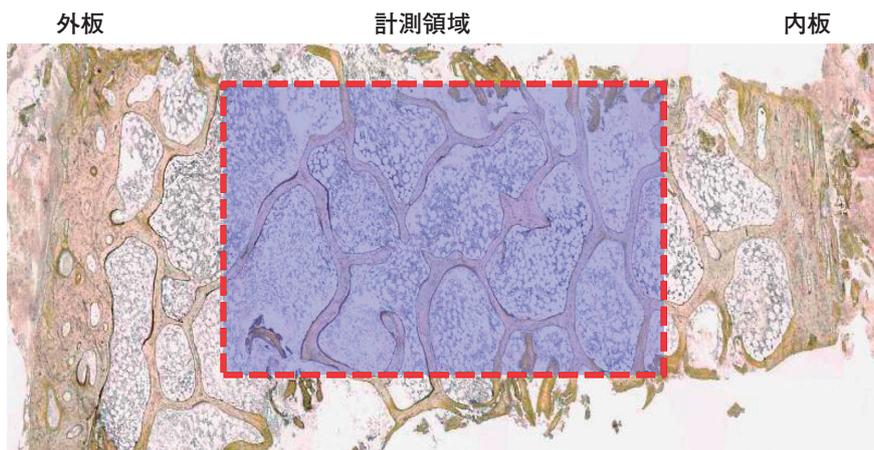


図4 腸骨と海綿骨形態計測



株式会社システムサプライ Histometry RT CAMERA

図5 骨形態計測システム

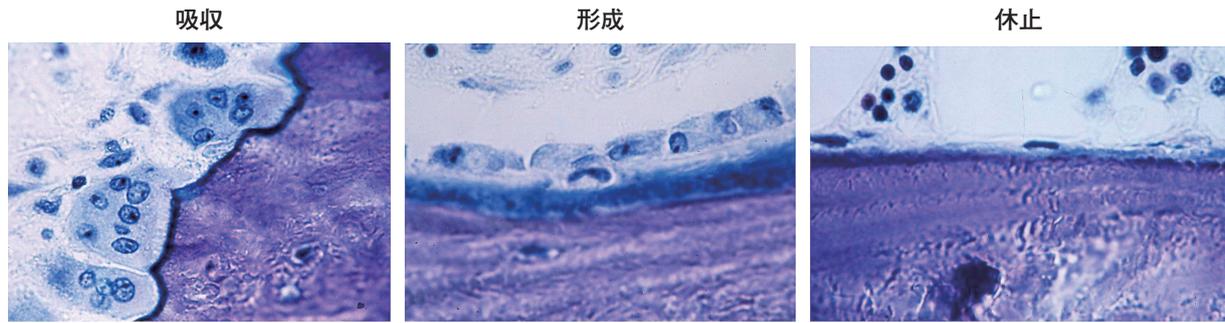


図6 骨表面の細胞と活動

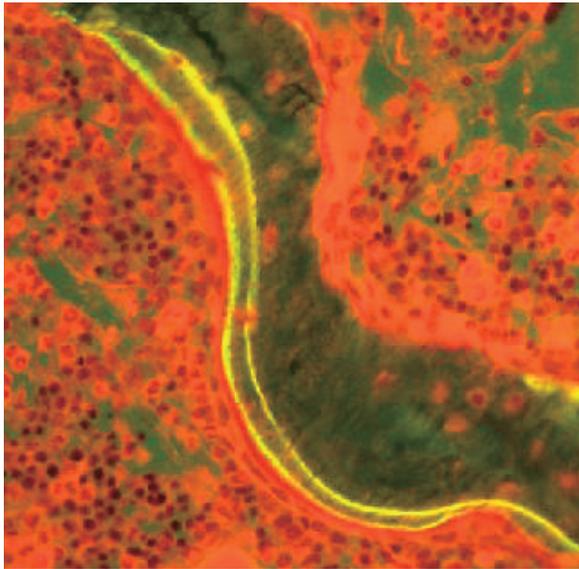


図7 2重骨標識と石灰化速度

破骨細胞、骨標識、骨浸食面、骨髄脂肪組織や線維組織、未熟骨、セメント線など、一定の基準にて計測を実施する(図6)。

石灰化の進行部位にキレート結合したテトラサイクリン標識が蛍光で発光するため、2本の線の間隔から、骨石灰化速度および骨形成速度が算出される(図7)。

### 3-5 計測パラメーター

骨形態計測パラメーターは、2012年のASBMRからのアップデートに基づいて、日本骨形態計測学会から2014年に日本語用語の改定版が報告されている<sup>8)</sup>。

海綿骨では構造指標と動的指標に分類され、二重標識の間隔と標識面の割合から骨形成速度と代謝回転が数値化することが可能となる。骨梁表面での形成と吸収が連動しているバランス状態では距離と時間は比例することから、リモデリングに要する時間配分が算出され、休止期を含めた全リモデリング時間の逆数として骨単位活性化率(activation frequency; Ac.f)が示さ

れ、活性化率は1年間のリモデリングの頻度を表す重要指標となっている。骨梁面でリモデリングが行われている区画をremodeling packetと呼び、古い骨領域とセメント線によって境界されている。packetの厚みは壁幅(wall thickness; W.Th)と呼び、リモデリングでの骨形成量を評価する指標として重要である<sup>9)</sup>。

## 4 骨粗鬆症治療における骨組織評価の意義

ヒト腸骨生検のデータでは閉経前から閉経後にAc.fの上昇があり、骨粗鬆症患者ではさらに高い状態で推移する<sup>10)</sup>。骨粗鬆症患者ではW.Thの低下が認められ、個々のリモデリングの骨吸収と骨形成のnegative balanceがあり、Ac.fの上昇による代謝回転亢進は結果的に閉経後の骨量減少を加速する原因になる。

骨組織の骨形成過程では骨芽細胞によって類骨基質が形成されて、最初に一次石灰化が急速に進行し、続いて時間をかけて二次石灰化によって成熟した骨組織に変化する。骨軟化症は一次石灰化障害によって類骨が増加し、臨床的に骨脆弱性や筋力低下などの症状をもたらす疾患である。骨軟化症の原因は様々な原因が存在し、生化学的検査では診断が難しい場合に骨生検による組織診断が最終診断になるとされている<sup>11)</sup>。骨軟化症の組織学的診断では類骨幅(osteoid thickness; O.Th)の増加と石灰化遅延時間(mineralization lag time; Mlt)の延長が基準になっている<sup>12)</sup>。2016年に我が国の骨軟化症診断マニュアルが発表されたが<sup>13)</sup>、骨軟化症の鑑別診断として骨形態計測の役割りは依然として大きい。

## 5 薬剤の効果と副作用の評価

米国FDAは臨床試験の段階でヒト腸骨生検データを求めており、これまで各薬剤の骨形態計測データによって骨の変化を組織学的に観察評価することを重視

している<sup>14)</sup>。

骨吸収抑制剤であるアレンドロネートなどビスホスホネート製剤はいずれも活性化率の低下が報告されている<sup>15)</sup>。デノスマブでは極端な活性化率の低下はあるが、休薬後に早期に回復していることが示されている<sup>16)</sup>。一方、テリパラチドでは骨形成が広範囲に認められ、活性化率を増加させている<sup>17)</sup>。薬剤効果についての腸骨生検から得られた結果では、アレンドロネートの投与で W.Th の増加と A.cf の低下<sup>9)</sup>、PTH によって W.Th の増加と A.cf の増加が示されており<sup>18)</sup>、これらの薬剤が、明らかに代謝動態が異なる作用によって骨量を変化させているメカニズムを示している。

DXA や骨代謝マーカーのデータの解釈や各骨粗鬆症治療薬の特徴を深く知るうえで骨形態計測は重要な情報をもたらす。ビスフォスフォネート製剤の副作用である非定型大腿骨骨折および顎骨壊死については骨形態計測学的に検討されている。非定型大腿骨骨折の病態は腸骨生検から初めて明らかにされ、過剰な骨代謝抑制による悪影響の存在が臨床的に示された<sup>19)</sup>。これらの合併症のメカニズムを考えるうえで、薬剤の影響や骨の部位特異性、力学的環境への適応など、骨形態計測学はその解明に今後大きな役割を果たしていくことが期待される。

## 6 疾患における骨形態計測

様々な全身疾患が骨代謝に影響し、脆弱性骨折や骨関節障害を発症することがある。透析患者など chronic renal disease (CKD) 患者では骨病変が多発することが知られており、深刻な合併症として患者の ADL を阻害し、QOL を低下させることから、骨代謝状態の正確な把握が重要であるため、腸骨生検による骨形態計測が比較的多く施行されている<sup>20)</sup>。

CKD では骨代謝回転の変化に伴って類骨の増加や線維組織の増加などの特徴的な変化が出現することがわかっており、定量的な評価から病態が分類されてきた<sup>21)</sup>。2006 年の KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) committee によって登場した TMV 分類では、骨代謝回転 (turnover)、骨石灰化 (mineralization)、骨量 (volume) の三つのパラメーターに基づいた新しい分類が提唱されている<sup>21)</sup>。

## おわりに

骨形態計測法は長い歴史を持つ研究手法であり、骨代謝研究に大きな貢献をしてきた。一方、腸骨生検は侵襲的であるため、DXA および骨代謝マーカーの登場によって臨床では稀な検査方法となっている。しかしながら様々な疾患が骨代謝に影響していることや、あらたな薬剤によって骨代謝は大きく変動した時に骨組織がどのように変化しているのかを検証する方法として、骨形態計測はその重要な役割を果たすことが求められる。

臨床における骨形態計測のテキストとして『ヒトの骨組織を見る、知る、学ぶ』を 2019 年に刊行した (図 8)。腎疾患の基礎研究および臨床に関わる先生方にお勧めする 1 冊である。書籍の購入については以下を参照のこと。[https://www.wenet.co.jp/webapp/products/detail.php?product\\_id=2505](https://www.wenet.co.jp/webapp/products/detail.php?product_id=2505)

## 利益相反自己申告

山本智章 (中外製薬 (株)、日本イーライリリー (株)、UCB Japan : 講演料)、その他の著者に申告すべきものなし。



図 8 骨形態計測学の臨床テキスト

([https://www.wenet.co.jp/webapp/products/detail.php?product\\_id=2505](https://www.wenet.co.jp/webapp/products/detail.php?product_id=2505))

## 文 献

- 1) Jee WS : The past, present, and future of bone morphometry : its contribution to an improved understanding of bone biology. *J Bone Miner Metab* 2005; 23(Suppl) : 1-10.
- 2) Frost HM : Measurement of bone formation in a 57 year old man by means of tetracyclines. *Henry Ford Hosp Med Bull* 1960; 8 : 239-254.
- 3) Recker RR : *Bone Histomorphometry : Techniques and Interpretation*. Boca Raton FL : CRC Press, 1983.
- 4) 高橋榮明編 : 骨形態計測ハンドブック. 新潟 : 西村書店, 1985.
- 5) Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. : Bone histomorphometry : standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987; 2 : 595-610.
- 6) Dempster DW, et al. : Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry : a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013; 28 : 2-17.
- 7) 山本智章 : 臨床におけるラベリングから腸骨生検まで, ヒトの骨組織を見る, 知る, 学ぶ. 新潟 : ウィネット出版, 2019; 19-21.
- 8) 田中伸哉, 他 : 骨の組織学的形態計測法における日本語用語 (2014年改訂追補版). *日骨形態誌* 2014; 25 : 1-8.
- 9) Recker RR : *Bone Biopsy and Histomorphometry in Clinical Practice*, 7th ed. *Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism*. ASBMR 2008; 180-186.
- 10) Recker R, et al. : Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *JBMR* 2004; 19 : 1628-1633.
- 11) Bhan A : Bone histomorphometry in the evaluation of osteomalacia. *Bone Rep* 2018; 8 : 125-134.
- 12) Parfitt AM : Effects of Ethnicity and age or menopause on osteoclast function, bone mineralization and osteoid accumulation in iliac bone. *JBMR* 1997; 12 : 1864-1873.
- 13) 日本内分泌学会, 日本骨代謝学会 : くる病・骨軟化症の診断マニュアル. *内分泌学会雑誌* 2015; 91 : 1-11.
- 14) Silverman SL, et al. : Recommendations for the clinical evaluation of agents for treatment of osteoporosis : consensus of an expert panel representing the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), the International Society for Clinical Densitometry (ISCD), and the National Osteoporosis Foundation (NOF). *J Bone Miner Res* 2008; 23 : 159-165.
- 15) Chavassieux PM, et al. : Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 1997; 100 : 1475-1480.
- 16) Reid IR, et al. : Effects of denosumab on bone histomorphometry : the FREEDOM and STAND studies. *J Bone Miner Res* 2010; 25 : 2256-2265.
- 17) Lindsay R, et al. : Short-term response to parathyroid hormone in human iliac crest bone using a unique quadruple tetracycline labeling regimen and single biopsy. *J Bone Miner Res* 2003; 18 : 554.
- 18) Recker RR, et al. : Issues in modern bone. *Histomorphometry Bone* 2011; 49 : 955-996.
- 19) Odvina CV, et al. : Severely Suppressed Bone Turnover : A Potential Complication of Alendronate Therapy. *J Clin Endocrinol Mrtab* 2005.
- 20) 風間順一郎 : 慢性腎臓病患者の骨組織. ヒトの骨組織を見る, 知る, 学ぶ. 新潟 : ウィネット, 2019; 66-71.
- 21) Moe S, et al. : Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from kidney disease; Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006; 69 : 1945-1953.