

《原 著》

骨シンチグラフィーによるラット移植関節の 骨生着に関する評価

藤森 研司* 佐久間 隆** 伊藤 和夫* 古館 正従*

三浪 明男** 荻野 利彦**

要旨 ラットの膝関節移植後の骨シンチグラフィーの経時的变化を定量的に解析し、移植関節の生着に関する影響を移植法と主要組織適合抗原の2点より検討した。

主要組織適合抗原 (RT1) の異なる純系ラット5系を用い、対象を血管柄付自家関節移植群 (I群, n=8), 非血管柄付自家関節移植群 (II群, n=10), 非血管柄付同種関節移植群 (III群, n=26) の3群に分けて検討した。膝関節部の集積はI群では1週目で高値が観察され、II群とIII群ではともに低値であった。II群ではIII群よりも骨集積はやや早く上昇はじめ、この時期の組織学的変化として revascularization が観察された。骨接合部に関してはI, II群では骨の remodeling を反映した集積像が観察され、I群では集積亢進が持続した。一方、III群では2-4週目に一過性の集積亢進が観察され、この現象は組織学的対応から拒絶反応を示唆するものと考えられた。

骨シンチグラフィーは関節移植の評価に有用であり、経時的な観察により術後の血管閉塞や拒絶反応を評価し得ると考えられる。

I. はじめに

近年、重要臓器の移植がさかんに行われるようになり、整形外科の分野においても、外傷や腫瘍摘出後の大きな欠損部位を置換するために骨移植、あるいは関節移植が行われるようになってきた¹⁻⁴⁾。これら臓器移植の評価のためには、非観血的かつ繰り返し行うことが可能な検査が望ましく、また術後早期にその予後を推定することが必要である。このような検査法として、腎臓移植においては腎シンチグラフィーの有用性が高く評価されている^{5,6)}。一方、骨シンチグラフィーは古くより骨腫瘍や骨折の診断、治療効果の判定に利用され、その有用性は高く評価されている^{7,8)}。

骨移植後あるいは関節移植後の骨の生着に関しては多くの要因が関与すると報告されているが^{9,10)}、骨生着の組織学的変化を骨シンチグラム所見から経時的に評価した報告は非常に限られている。

今回、著者らはラットを用いた関節移植実験にて、関節移植の術法の相違と、主要組織適合抗原の相違が骨生着にどのような影響を与えるか、骨シンチグラムを用いて検討し、その経時的变化を定量的な方法で評価した。

II. 実験方法

1. 実験動物

実験動物として同一条件下で飼育した体重約350gの5系の純系雄ラットを用いた。これら5系の純系ラットのもつ主要組織適合抗原 (RT1)¹¹⁾の subregion をTable 1に示した。

2. 関節移植

関節移植は一側の膝関節に行った。手技は、膝蓋骨を含む膝関節構成体を周囲軟部組織より遊離し、大腿骨、脛骨、腓骨をそれぞれ膝関節面より

* 北海道大学医学部核医学講座

** 同 整形外科学講座

受付：61年2月3日

最終稿受付：61年6月2日

別刷請求先：札幌市北区北15条西7丁目（☎060）

北海道大学医学部核医学講座

藤森 研司

Table 1 Five strains of inbred rat and their major histocompatibility antigen (RT1) subregions

Strain	RT1	A		B		D		E	
		Aa-1	Ba-1	Da-1	Da-2	MLR	Ea-1		
WKA	k	8	2	3	7	7	—		
W/H	k	8	2	3	7	7	—		
TO	t	2	1	1	2	2	—		
LEJ	i	2	2	3	6	6	—		
BUF	b	6	2	3	6	6	—		

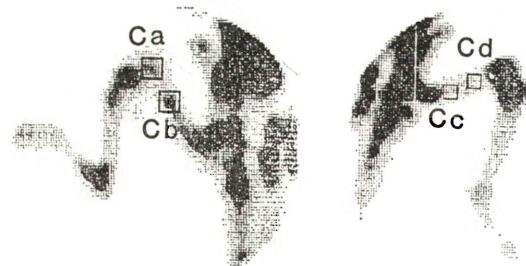
WKA: Wister-King-Aptekman/HoK

W/H: Wister/HoK

TO: Tokyo

LEJ: Long-Evans/Jackson

BUF: Buffalo



$$KUI = \frac{Ca}{(Cc+Cd)/2}$$

$$BRI = \frac{Cb}{(Cc+Cd)/2}$$

Table 2 Barriers between the donor and recipient rats in 3'sub-groups of group-III

Sub-group	Donor	Recipient	Barrier
a	BUF	LEJ	RT1-A
b	TO	LEJ	RT1-B&D
	LEJ	WKA	whole RT1
c	W/H	WKA	non RT1

Fig. 1 Schema of ROI and formulas of KUI and BRI.**Table 3a** Result of knee uptake index (KUI) of serial studies

Group	Weeks after transplantation			
	1	3	5	10
I	4.4±1.2	5.8±0.3	8.6±1.8	6.4±0.8
II	1.0±0.2	1.3±0.3	1.1±0.2	1.7±0.1
IIIa	0.7±0.2	1.0±0.3	1.1±0.2	1.6±0.4
b	0.6±0.2	0.9±0.1	1.0±0.1	1.1±0.2
c	1.0±0.2	1.3±0.3	1.1±0.2	1.7±0.1

mean±S.E. n=2-7

Table 3b Result of bone reaction index (BRI) of serial studies

Group	Weeks after transplantation			
	1	3	5	10
I	5.3±0.5	9.2±1.9	8.6±1.8	4.2±0.2
II	4.0±0.4	3.7±0.7	2.1±0.1	2.4±0.1
IIIa	1.5±0.3	2.9±0.5	2.0±0.3	1.6±0.2
b	1.6±0.2	3.6±0.5	3.5±0.9	2.4±0.3
c	4.0±0.4	3.7±0.7	2.1±0.1	2.4±0.1

mean±S.E. n=2-7

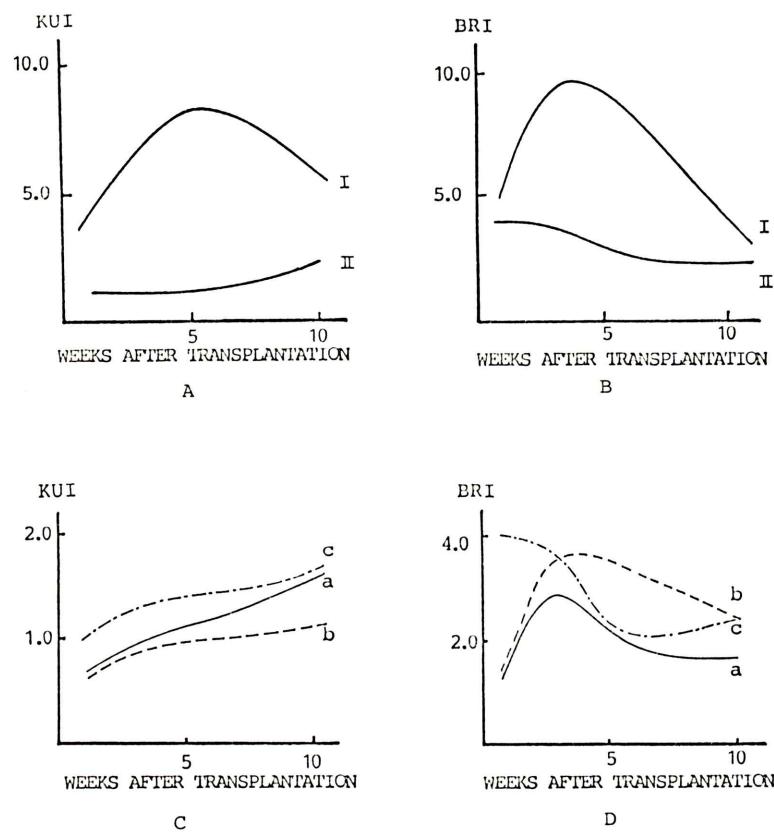


Fig. 2 Serial analysis of grafted knee joints.

- A: KUI of group-I and II,
- B: BRI of group-I and II,
- C: KUI of sub-group of group-III,
- D: BRI of sub-group of group-III.

Table 4 Appearance of periosteal reaction and bridging callus in the grafted bones on roentgenograms

Group	Periosteal reaction	Bridging callus
I	2-3*(2.6)	2-3 (2.6)
II	3-6 (4.8)	3-6 (4.6)
IIIa	no**	4-6 (5.2)
b	no	3-7 (4.7)
c	3-6 (4.8)	3-6 (4.6)

* weeks (mean)

** No periosteal reaction was seen until 10 weeks

1.5 cm 離れた部位で切断し移植関節とした。移植後の固定には ϕ 1.0-1.5 mm の Kirschner 鋼線を髓内釘として用い、初めの一週間はギップスによる外固定を行った。

3. 実験動物群

実験群は、以下の 3 群で行った。

I) 血管柄付自家関節移植群(8匹)：自家の移植関節を膝窩動脈を切断しないで同じ部位に移植した群(以下 I 群、group I とする)。

II) 非血管柄付自家関節移植群(10匹)：自家の移植関節をすべての血管を切断して同じ部位に移植した群(以下 II 群、group II とする)。

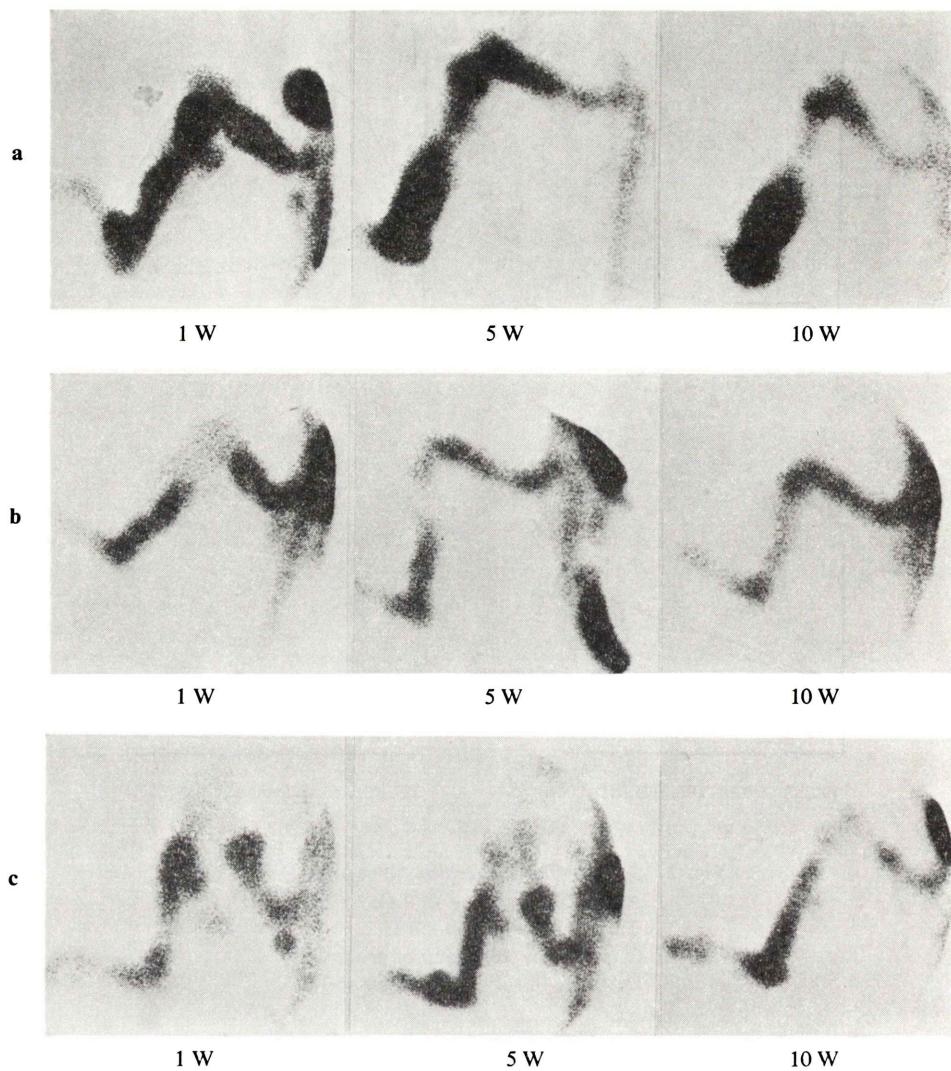


Fig. 3 Scintigrams of grafted knee joint of each groups.

a: group-I, b: group-II, c: group-III.

The number indicates weeks after transplantation.

III) 非血管柄付同種関節移植群(26匹):ある純系のラットの移植関節(donor)を系の違う純系ラット(recipient)の膝関節部に血管の吻合は行わないで移植した群(以下 III群, group IIIとする)。この群はさらに, donorとrecipientに用いたRT1のsubregion(A, B, D)の相違によりa-cの3つの亜群に分類した。IIIA群はRT1-Aのみが異なり, IIIB群は2つ以上のRT1 subregionが

異なり, IIIC群はRT1以外の組織適合抗原が異なる(Table 2).

4. 骨シンチグラフィーと骨X線写真

骨シンチグラフィーおよび軟X線写真的撮影を, 関節移植後1週目より行った。骨シンチグラフィーは $^{99m}\text{Tc-MDP}$ 2 mCiを尾静脈より静注し, 3時間後に両側の下肢をそれぞれ同一のプリセッタタイムにてガンマカメラ(Σ410S, Ohio社製)で

撮影し、同時に核医学専用コンピュータ Scintipac 1200(島津社製)にデータを収集した。コリメータはピンホールコリメータを用いた。

移植関節の生着は recipient との骨接合部の癒合と donor の関節軟骨の変性の程度がその成否をわかる。そこで、骨接合部の癒合程度を評価するため recipient 側の骨反応の指標として骨接合部の集積比を用い、Bone reaction index; BRI と略した。また、関節軟骨の変性度を評価するため donor の膝関節部の集積比を用い、Knee uptake index; KUI と略した。移植関節生着の状態を定量的に評価するため、この 2 つの指標を以下の方針にて算出しそれぞれの経時的变化を観察した。

Recipient 側の骨接合部の単位ピクセル当たりのカウントを Ca, donor の膝関節部のそれを Cb, 健側の大脛骨幹部近位 1/3 および遠位 1/3 の部位をそれぞれ Cc, Cd とし、BRI と KUI を Fig. 1 に示す式で求めた。

KUI の対照として、健側の膝関節部のカウントを Cb として同様に求めた。

骨 X 線写真は Softex HS(富士フィルム社製)を用い、移植骨の骨膜肥厚と recipient 側の仮骨の出現時期を観察した。

5. 組織学的所見

関節移植後経時にラットを解剖し、移植関節の軟骨と骨の顕微鏡標本を作成し組織学的な検討を行った。

III. 結 果

3 群の KUI と BRI の経時的变化、骨膜肥厚と仮骨の出現時期は以下の結果を得た(Table 3a, 3b, 4, Fig. 2)。

I) 血管柄付自家関節移植群 (Fig. 3a)

健側での KUI の平均は 3.9 であったのに対し、移植後 1 週目ですでに 5.3 と高値が観察され、5 週目にピークを示し 10 週目まで高値を持続した。BRI は 1 週目から高値が観察され、3 週目にピークに達した後下降した。X 線学的には移植骨の骨膜肥厚は 2, 3 週で認められ、recipient 側の仮骨出現時期とほぼ同じであった。組織学的には 2 週目



Fig. 4 Roentgenogram of non-vascularized allogeneic graft (group-IIIb) ten weeks after transplantation. Only bridging callus was seen.

の関節軟骨は軟骨細胞と軟骨下層の細胞構造が保たれ、その後も軟骨の退行変化はほとんど認められなかった。

II) 非血管柄付自家関節移植群 (Fig. 3b)

KUI は 1 週目から 4 週目までは 1.0 前後の低値であったが、次第に上昇した。BRI は 1 週目が 4.0 と最高値を示し、その後漸減した。X 線学的には移植骨の骨膜肥厚は 3-6 週で認められ I 群よりやや遅延したが、recipient 側の仮骨出現時期は I 群とほぼ同時期であった (Fig. 4)。組織学的には術後 5 週目までは I 群と著変はないが、6 週以降は関節軟骨の変性が強まり、骨皮質部では内骨膜側に血管の増生、線維芽細胞の出現、単核炎症細胞の侵潤を認めた。

III) 非血管柄付同種関節移植群 (Fig. 3c)

KUI は IIIa 群、IIIc 群では II 群と大きな差異は認めないが、IIIb 群では 10 週目まで低値を示した。BRI は IIIa, IIIb 群では 2-4 週目に最高値を示しその後漸減した。その最高値を比較すると 2 つ以上 subregion が異なる IIIb 群が、subregion A のみ異なる IIIa 群より大きかった。

RT1 の一致する IIIc 群では II 群と同様に 2 週目まで高値を示した後漸減した。X 線学的には IIIa, IIIb 群では 10 週までの観察では donor 側の

骨膜肥厚を認めなかった。しかし IIIc 群では 3-6 週(平均 4.8 週)で骨膜肥厚を認めた。recipient 側の仮骨出現はいずれの亜群でも 5 週前後に認められており、RT1 subregion の相違による差異は認められなかった。組織学的には、いずれの亜群でも 9 週前後で関節軟骨は層構造を失い、軟骨下組織の強い壊死が認められた。骨髓には軽度の線維芽細胞と血管の増生が認められた。同時期の骨接合部では、骨皮質中央部に広い骨壊死が認められ、周辺部で骨新生像が目立った。

IV. 考 察

骨あるいは関節移植の成否には骨接合部の接触面積の大きさが重要であるほか、臓器移植一般にいわれる組織適合性抗原、血行など多くの要因が関与する。今回のラットを用いたモデル実験では、移植部位として膝関節を用い、血行の影響を見るために膝窩動脈の血流の有無と、組織適合抗原として RT1 の相違で 3 群にわけて実験を行った。ラットには RT1, RT2 などの組織適合抗原があるが、RT1 は主要組織適合抗原でありヒトの HLA (Human leukocyte antigen), マウスの H-2 に相当する。

術後の骨の生着を検討するため、従来より骨あるいは関節移植の評価に骨シンチグラフィーを用いた報告はみられるが、いずれも定性的な評価が多く¹²⁾、また経時的な変化について検討した報告は少ない¹³⁾。今回のわれわれの研究では、核医学専用コンピュータを用いて健側の大脛骨骨幹部と移植骨との集積比を用いることで定量的な評価を試みるとともに、移植様式の相違に伴う骨集積の経時的な変化を観察した。

移植膝関節部の経時的变化を KUI を指標に観察すると、血管柄付の I 群では移植後早期より強い集積がみられ経時に上昇傾向が認められた。一方、他の群では移植後早期には集積が低く経時に漸増した。また、II 群と III 群を比較すると、II 群および RT1 の一致した IIIc 群で KUI の上昇が早く観察された。この結果から RT1 の一致した群では血行の再交通が早いことが推測される。

この現象は組織学的にも II 群では、KUI が上昇を始める頃より内外骨膜に revascularization が観察された点より裏づけられる。これらのことより膝関節部の集積には血行の有無が大きく関与し、血行の再交通に主要組織適合性抗原の相違が関与していることが考えられる。

自家移植の I 群と II 群の間で骨接合部の癒合を観察すると、軟 X 線写真では donor 側の骨膜肥厚は I 群で早く認められた。骨接合部の経時的变化を BRI を指標に観察すると、I 群では移植後 2-3 週より急激に増加し、同時期の骨 X 線像で認められた仮骨形成の推移と一致していた。II 群では、BRI の経時的上昇は認められず次第に減少傾向を示した。これらの群では I 群に比し、組織学的にも骨膜反応の出現時期が遅かった。この点から BRI は骨の remodeling を反映するものであり、BRI の経時的变化は骨折の治癒過程の所見とほぼ同じものと推定される。一般的に骨への血流は主として骨膜を介して供給されるが、今回の術式では I 群は膝窩動脈は保たれているのに対し、II 群は移植後早期の移植骨への血行はわずかに周囲軟部組織から供給されるのみである。したがって、I 群と II 群における骨癒合の時期の差は移植骨への血流量の差が大きな要因であると考えられる。以上の結果は血管柄付骨移植に対する評価にも有用であり、術後に血管が閉塞した場合、移植骨の集積は経時に漸減することが示唆される。

次に同種移植の III 群では、軟 X 線写真で RT1 subregion の異なる IIIa, IIIb 群の骨癒合開始時期は、RT1 subregion が一致する IIIc 群に比較し遅延を示した。骨シンチグラフィーでは、IIIa, IIIb 群では移植後 2-4 週に BRI の一時的な上昇を認めたが、同時期の骨 X 線像および組織像では骨癒合傾向が認められなかった。また、RT1 subregion が一致している IIIc 群および自家移植の II 群では BRI の一時的な上昇を認めなかったこと、RT1 subregion が 1 つのみ異なる IIIa 群と 2 つ以上異なる IIIb 群では後者の BRI の最高値がより高かった ($p < 0.05$) ことより、この一時

的な BRI の上昇は RT1 subregion の不一致による拒絶反応を示しているのではないかと推察された。

この現象は同時期の詳細な組織学的検討と、ステロイドやサイクロスボリンA等の免疫抑制剤使用時の BRI の変化の検討により、明らかにし得ると考えられる。以上のことから関節移植後の骨シンチグラフィーにおいては、ある一時期の骨接合部の高い集積は必ずしも骨の生着過程における骨の remodeling のみを示すものではなく、拒絶反応を示唆する可能性が類推され、経時的な検討によりその変化を捉え診断することが重要と考えられる。

今後さらに実験を重ね、血管柄付同種関節移植群における血行と主要組織適合抗原の影響についても検討を加える所存である。

V. 結 語

ラットを用いた関節移植実験を行い、骨シンチグラフィーを用いて移植関節を経時に観察し、以下の結論を得た。

1) 主要組織適合抗原が一致した関節移植後の骨シンチグラムは移植部への血行状態と最も関連があることが示され、血行状態の指標として KUI が有用である。

2) 主要組織適合抗原の異なる組み合わせでは、RT1 subregion の違いによって骨接合部の経時的变化が異なる。不一致の多い群では 2-4 週に骨接合部の一過性の集積亢進が観察され、この現象は拒絶反応によると推定される。

なお、本論文の要旨は第25回日本核医学会総会において発表した。

本研究は文部省科学研究費補助金の援助を受けた。

最後に、本研究にご協力頂いた北海道大学医学部付属

病院放射線部、鈴木幸太郎、勝浦秀則、荒井博史各位に感謝致します。

文 献

- 1) William G: Experiences with boiled cadaveric cancellous bone for fracture of long bones. *J Bone Joint Surg* **46-B**: 398-403, 1964
- 2) Urist MR: Surface-decalcified allogeneic bone implants. A preliminary report of 10 cases and 25 comparable operations with undecalcified hypophosphatized bone implants. *Clin Orthop* **56**: 37-50, 1968
- 3) Ottolenghi CE: Massive osteo- and osteoarticular bone grafts. *Clin Orthop* **87**: 156-164, 1972
- 4) Parrish FF: Allograft replacement of all or part the end of a long bone following excision of a tumor. *J Bone Joint Surg* **55-A**: 1-22, 1973
- 5) Kirchner PT, Rosenthal L: Renal transplantation evaluation. *Semi Nucl Med* **12**: 370, 1982
- 6) Dietleman AG, Dubovsky EV, Whelchel JD, et al: Diagnosis of impaired renal function after kidney transplantation using renal scintigraphy, renal plasma flow, and urinary excretion of hippurate. *Ann Surg* **191**: 604, 1980
- 7) Schirazi PH, Rayudu GVS, Fordham EW: ¹⁸F bone scanning. Review of indications and result of 1,500 scans. *Radiology* **112**: 361-368, 1974
- 8) Schirazi PH, Rayudu GVS, Fordham EW: Review of solitary ¹⁸F bone scan lesions. *Radiology* **112**: 369-372, 1974
- 9) Heslop BF, Zeiss IM, Nisbet NW: Studies on transference of bone. 1. A comparison of autologous and homologous bone implants with reference to osteocyte survival, osteogenesis and host reaction. *Brit J Exper Path* **41**: 269-289, 1960
- 10) Langer F, Gross AE: Immunogenicity of allograft articular cartilage. *J Bone Joint Surg* **56-A**: 267-304, 1974
- 11) Gunter E, Stark O: The major histocompatibility system of the rat. *Transplant Proc* **11**: 1550-1553, 1979
- 12) Yaremchuk MJ, Sedacca T, Schiller AL, et al: Vascular knee allograft transplantation in a rabbit model. *Plast Reconstr Surg* **71**: 461-471, 1983
- 13) Lipson RA, Dief H, Greyson ND, et al: Bone scanning in assessing viability of vascularized skeletal tissue transplants. *Clin Orthop* **160**: 279-289, 1981

Summary

Evaluation of Survival of Grafted Joint by Bone Scintigraphy: Experimental Studies Using Rat Models

Kenji FUJIMORI*, Takashi SAKUMA**, Kazuo ITOH*, Masayori FURUDATE*,
Akio MINAMI** and Toshihiko OGINO**

*Department of Nuclear Medicine, **Department of Orthopedics,
University of Hokkaido, School of Medicine, Sapporo, Japan

To evaluate survival of grafted joint, bone scintigraphy with ^{99m}Tc -MDP was performed in using five inbred rats. These rats were further grouped to three according to different bone implantation, vascularized autogenic grafts (Group-I), non-vascularized autogenic grafts (Group-II) and non-vascularized allogenic grafts (Group-III).

Bone scintigraphy of Group-I showed immediately high uptake throughout the grafted joint and the junction of the femur after the transplantation which was persisted until 10 weeks. In Group-II and Group-III, bone uptake at the end of the femur were gradually elevated in time after the transplantation. A subgroup in Group-III

which had the most different combination in the major histocompatibility antigen showed transient high bone uptake at the junction of recipient femur at 2 to 4 weeks after the transplantation. This phenomena could be related to rejection due to difference of the major histocompatibility which was also seen histologically.

Bone scintigraphy is useful to evaluation of survival of grafted joint and it could be able to evaluate accidents after bone graft such as vascular occlusion and rejection by serial studies.

Key words: Bone scintigraphy, Joint transplantation, Vascularization, Major histocompatibility antigen.