

琉球大学学術リポジトリ

[原著] 実験的脊椎椎体間骨移植の骨癒合過程： MRIおよび組織所見の比較

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): bone graft, magnetic resonance imaging, Gd-DTPA, fat suppression 作成者: 棚原, 豊, 佐藤, 栄, 金谷, 文則, Tanahara, Yutaka, Sato, Sakae, Kanaya, Fuminori メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015935

**実験的脊椎椎体間骨移植の骨癒合過程
— MRIおよび組織所見の比較 —**

棚原 豊, 佐藤 栄, 金谷文則

琉球大学医学部整形外科学講座

(1996年11月29日受付、1996年12月16日受理)

**Experimental study for bone union process of the
grafted bone for spondylointerbodyfusion
— comparison between MRI findings and histological findings —**

Yutaka Tanahara, Sakae Sato and Fuminori Kanaya

Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the bone union process of a grafted bone using magnetic resonance imaging (MRI). Two similar iliac bone blocks (2cm×3cm in size) were removed from bilateral rabbit iliums. Each block was replaced with the other as a grafted bone. The MRI and specimens of the grafted bone were obtained periodically after surgery. MRI findings: At 2 weeks after surgery, low intensity area (LIA) appeared at the junction of the grafted bone and recipient ilium, on T1 weighted image (T1WI) and fat image. The grafted bone was enhanced at the junction on Gd-DTPA enhanced T1WI (Gd-T1) and Gd-DTPA enhanced fat suppression image (Gd-FS). At 4 weeks, LIA on T1WI and fat image had enlarged into the whole area of the grafted bone. The grafted bone had been entirely enhanced on Gd-T1 and Gd-FS. The enhanced area on Gd-T1 and Gd-FS coincided with LIA on T1WI and fat image. At 9 weeks, LIA on T1WI and fat image had been recovering gradually. Enhanced effects on Gd-T1 and Gd-FS had been diminishing. At 15 weeks, LIA on T1WI and fat images had obtained isointensity, and enhanced effects on Gd-T1 and Gd-FS had vanished completely. Histological findings: At 2 weeks after surgery, vascular rich connective tissue extended into the intertrabecular space of the grafted bone from the junction. The hematopoietic marrow had been replaced with connective tissue and inflammatory cells. Bone resorption and appositional new bone formations were seen at the junctional area. At 4 weeks, bony continuity and extensive bony callus formation along the surface were observed at the junction. The hematopoietic marrow had been entirely replaced with vascular rich connective tissue. Appositional new bone formations extended to trabecula area. At 9 weeks, the connective tissue diminished and was replaced with hematopoietic marrow in some areas. At 15 weeks, the connective tissue had vanished with complete recovery of hematopoietic marrow. The comparison between the MRI and the histological findings of the grafted bone indicated that sequential changes of LIA on T1WI and fat image mainly depended on the change of fat volume, and that sequential changes of enhanced effect on Gd-T1 and Gd-FS mainly represented extension or withdrawal of the vascular rich connective tissue. This experimental study suggests that bone union process and nonunion can be evaluated using MRI. *Ryukyu Med. J., 16(4)195~201, 1996*

Key words: bone graft, magnetic resonance imaging, Gd-DTPA, fat suppression, histological finding

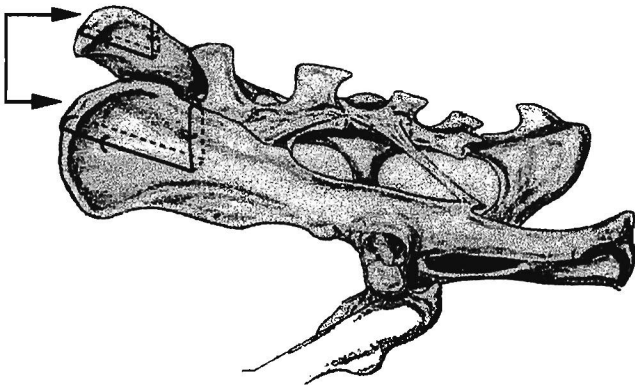


Fig. 1 Bilateral ilium is cut in a triangular shape. The separated bone is replaced with the other as the grafted bone. Each graft is fixed by tying two nylon strings.

緒言

脊椎椎体間骨移植におけるX線写真による骨癒合判定は、母床と移植骨間の骨梁形成を指標としている。しかし実際には判定に苦慮し外固定期間、偽関節手術の決定に難渋する場合も少なくない。佐藤ら¹⁾は脊椎椎体間骨移植における骨性癒合以前に軟部組織が重要な役割を果たすことに注目し、骨癒合判定にMagnetic resonance imaging (MRI) が有用であることを報告した。しかし臨床例であるためMRI所見と骨癒合過程を明らかにすることはできなかった。本研究は、移植骨の実験的骨癒合過程において経時的にMRIを撮像し、各段階に対応する組織像を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

1. 材料および手術

10~20週齢の体重2.8~3.0kgの日本白色家兎32羽(すべて雄)を用い、Pentobarbital Sodium 静脈麻酔下(20~30mg/kg)にsham群と接触群を作製した。両群とも完全な除痛を得る目的で両側腸骨部に1.0% Lidocain hydrochlorideの局所麻酔を行い両側の後方腸骨稜を露出した。Sham群は両側腸骨を露出したのみで閉創した。接触群は稜部を底辺とする一辺2cmと3cmの三角骨片を両側腸骨から切離し、左右を入れ替えて各々の接触面を一針ずつ縫合固定した(Fig. 1)。

2. MRI

Pentobarbital Sodium 静脈麻酔下(20~30mg/kg)に撮像した。装置はGeneral Electric社製Signa-advantage(1.5Tesla)で、人体膝用コイルを用い両方の骨片を含んだ骨盤の冠状断を撮像した。spin echo法のT1強調画像(以下、T1像)、T2強調画像(以下、T2像)、および化学シフト法である3-point Dixon法^{2, 3)}またはPresaturation pulse法⁴⁾を用いて脂肪抑制画像(以下、FS像)および脂肪画像(以下、Fat像)を撮像した。次にGadolinium Diethylenetriamine pentaacetic acid(以下、Gd-DTPA)静注(0.2mmol/kg)後の造影T1像(以下、Gd-T1像)および造影脂肪抑制T1像(以下、Gd-FS像)を撮像した。撮像時期はsham群は術後9週まで1、2週ごとに撮像し、接触群は術後1週から16週まで1、2週ごとに撮像した。MRIのPulse SequenceはTable 1の通りである。移植骨

Table 1 Pulse sequences

	T1WI	T2WI	FS*	Fat image*
TR(ms)	500	3000	500	500
TE(ms)	20	80	20	20
Slice thickness (mm)	3	3	3	3
FOV(cm)	8	8	8	8
Matrix	256×192	256×256	256×192	256×192
NEX	2	4	2	2

*FS and Fat image are calculated by dixon or presaturation pulse method.

の信号強度(移植骨とほぼ一致する長方形の関心領域を設定して計測した)を手術の影響の及んでいない腸骨の信号強度(白蓋直上で移植骨とほぼ同一の大きさを関心領域とした)と比較し、信号強度比として評価した。信号強度比は術後1週と15~16週の値を最高値(T2像、FS像、Gd-T1像、Gd-FS像)または最低値(T1像、Fat像)と比較した。有意差判定はStudent t-testを用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

3. 組織

術後4週までは各週、5~16週で2週毎に2または3羽ずつ屠殺し、骨片を含めて腸骨を採取した。精密標本切断器(ISOMET)にて移植骨と母床の接触面が同一スライスに含まれるように4mmスライス標本を作製した。

脱灰標本は10%ホルマリンにて48時間以上固定後、10%蟻酸にて48~72時間脱灰し、その後5%硫酸ナトリウムにて12時間中和した。パラフィン包埋後マイクロトームにて3 μ の厚さに薄切し、Hematoxylin-Eosin (HE)染色、Azan-Mallory染色および免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は抗ヒトCD31抗体⁵⁾を用い血管内皮細胞を染色することで血管の新生を観察した。

非脱灰標本は標本採取2週前にテトラサイクリン(50mg/kg)筋注、1週前にカルセイン(15mg/kg)筋注で骨をlabellingした。摘出新鮮標本は直ちにVillanueva bone stain⁶⁾液に7日間浸して固定・染色を行い、methyl methacrylateに包埋しブロックを作製した。ブロックからJung社K型マイクロトームにて10 μ の厚さで薄切切片を作製し、蛍光顕微鏡にて骨改変を観察した。

実験動物の飼育・管理法ならびに本研究は琉球大学動物実験委員会で承諾された。

結果

1. Sham群

1) MRIおよび組織所見

T1像、T2像、FS像、Fat像、Gd-T1像およびGd-FS像、全ての撮像法で9週まで観察したが、腸骨骨髄に信号変化を認めず、組織学的にも腸骨骨髄の変化は認めなかった。即ち腸骨露出操作のみでは骨髄信号は変化しないことが確認できた。

2. 接触群

1) MRI所見

T1像では術後2週で接触面から低信号部位が出現し移植骨の腸骨稜部に向かって徐々に拡大し、4週には移植骨全体に拡がった。信号強度比は7~8週まで漸減した後、9~10週以後は増大

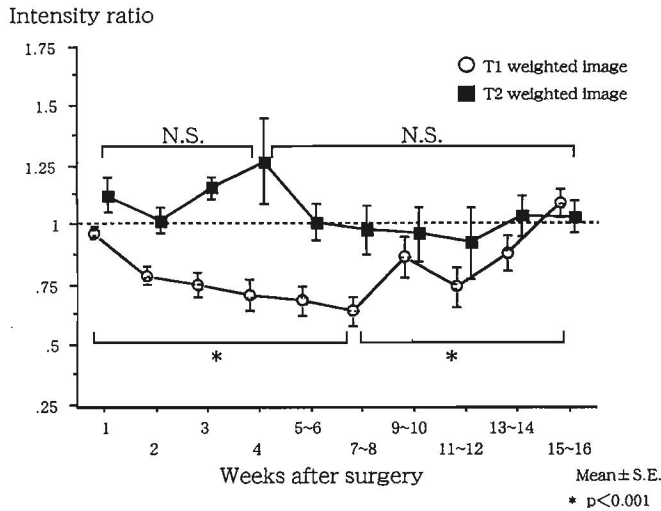


Fig. 2 Sequential changes of signal intensity ratio (Intensity of grafted bone/Intensity of ilium) on T1 and T2 weighted images.

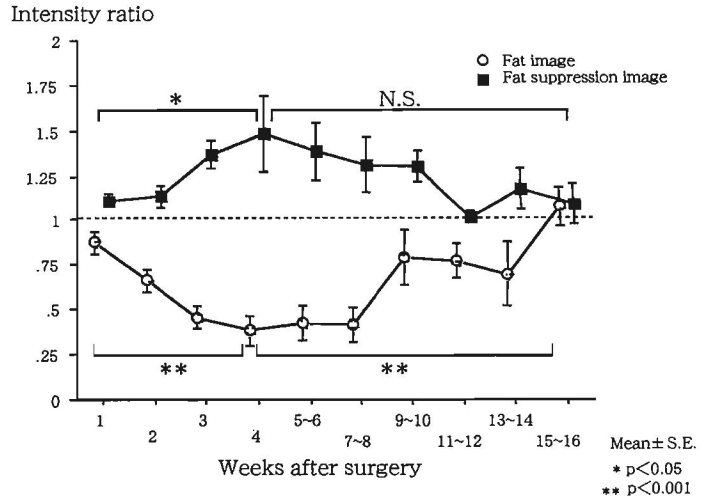


Fig. 3 Sequential changes of signal intensity ratio (Intensity of grafted bone/Intensity of ilium) on fat suppression and fat images.

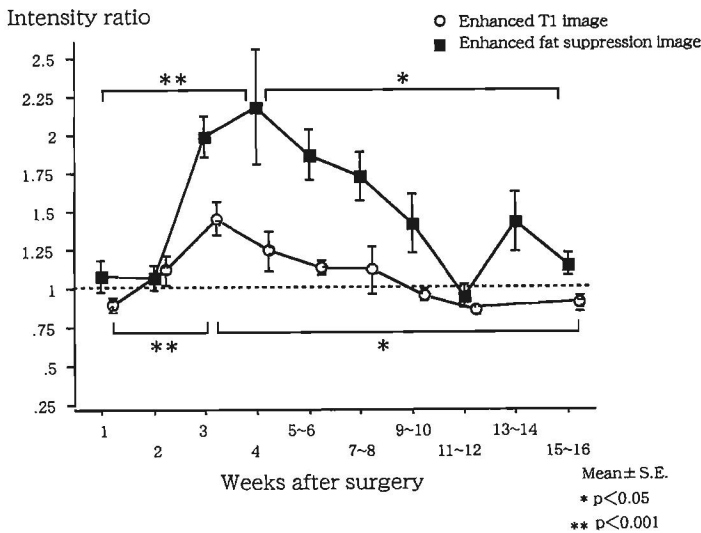


Fig. 4 Sequential changes of signal intensity ratio (Intensity of grafted bone/Intensity of ilium) on enhanced T1 and enhanced fat suppression images.

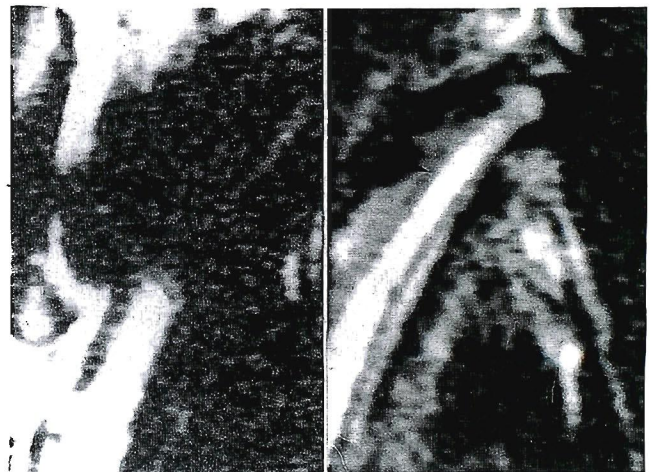


Fig. 5 Sequential changes of fat image. (Left) 4 weeks after surgery : Fat signal is shown disappearing from the junction. The signal vanished area coincides with the enhanced areas of Gd-DTPA enhanced T1 weighted image and fat suppression image. The vanished area of the fat signal enlarges and finally fat signal completely disappears. (Right) 15 weeks after surgery: Recovery of the fat signal

に変わり、15~16週では手術の影響の及んでいない腸骨部とほぼ等信号に復帰した (Fig. 2)。T2像では信号強度比の増減に有意差はなかった (Fig. 2)。

FS像では術後2週から接触面に高信号部位が出現し、4週には高信号部位が移植骨全体に拡がった。術後15~16週以降は等信号に復帰したが最高値と15~16週値間には有意差はなかった (Fig. 3)。Fat像では術後2週以降信号が接触面から消失し始め、信号消失部位は移植骨の腸骨稜部へ漸次拡大し4週で全体の信号が消失した。9~10週以降信号は回復し始め、15~16週で術後1週と同じ信号強度比に復帰した (Fig. 3, 5)。

Gd-T1像では術後2週以降接触面から造影がみられ、その範囲は移植骨の腸骨稜部に漸次拡大し3週で移植骨全体が造影された。この造影効果は約6週間持続し、9~10週から減弱し始め15~16週で完全に消失した (Fig. 4)。Gd-FS像では術後2週以降接触面から造影がみられ、その範囲は移植骨の腸骨稜

部に漸次拡大し3週で移植骨全体が造影された。この造影効果は約6週間持続し、9~10週から減弱し始め15~16週で完全に消失した (Fig. 4, 6)。

2) 組織所見

手術~術後1週では移植骨全体の巨核球等の造血組織は減少していたが、脂肪組織は細胞の軽度の変形がみられたのみで大きな変化はなかった。

術後2週では血管に富んだ密な結合組織が接触面から移植骨内に増生していた。しかし移植骨内の造血・脂肪組織はいまだ減少した状態であったが、壊死骨梁が吸収され、その表面には付加骨が新生していた。移植骨片と母床間には内軟骨性骨化により形成された骨梁が連続していた。結合組織が増生し

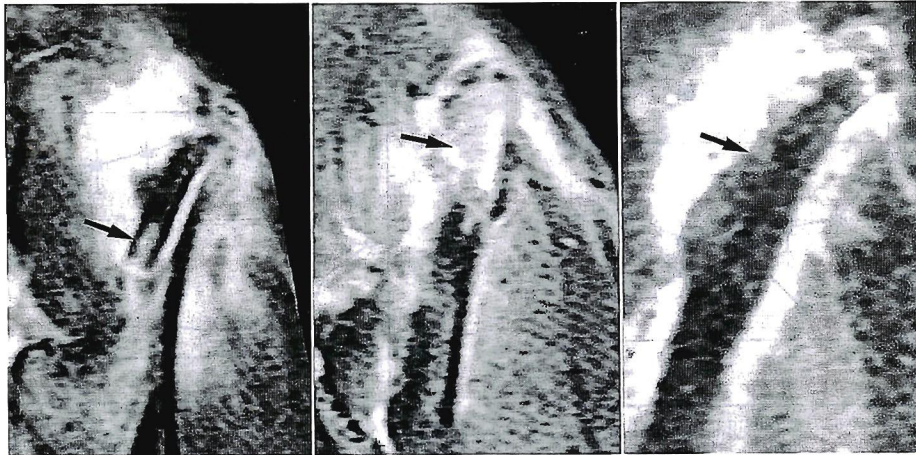


Fig. 6 Sequential changes of Gd-DTPA enhanced fat suppression T1 weighted image. (Left) 2 weeks after surgery: The grafted bone is enhanced from the junction. (Center) 3 weeks after surgery: The enhanced area gradually enlarges into the grafted bone and as a result the whole grafted bone is enhanced. (Right) 9 weeks after surgery: The enhanced effect diminishes.

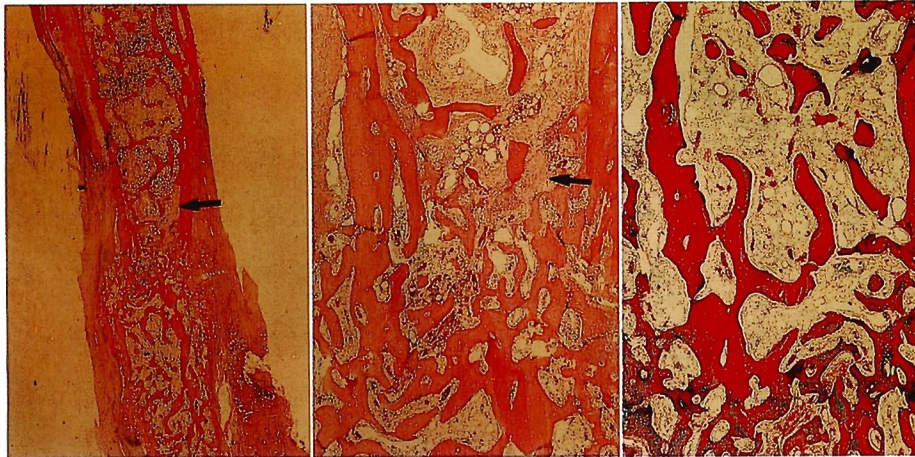


Fig. 7 Histological findings at 2 weeks after surgery. (Left) Connective tissue extends into the intertrabecular space of the grafted bone from the junction (HE stain; $\times 10$). (Center) The hematopoietic marrow of the grafted bone is replaced with connective tissue and inflammatory cells (HE stain; $\times 40$). (Right) The junctional area shows the vascular rich connective tissue and appositional new bone formation (Azan-Mallory stain; $\times 100$).

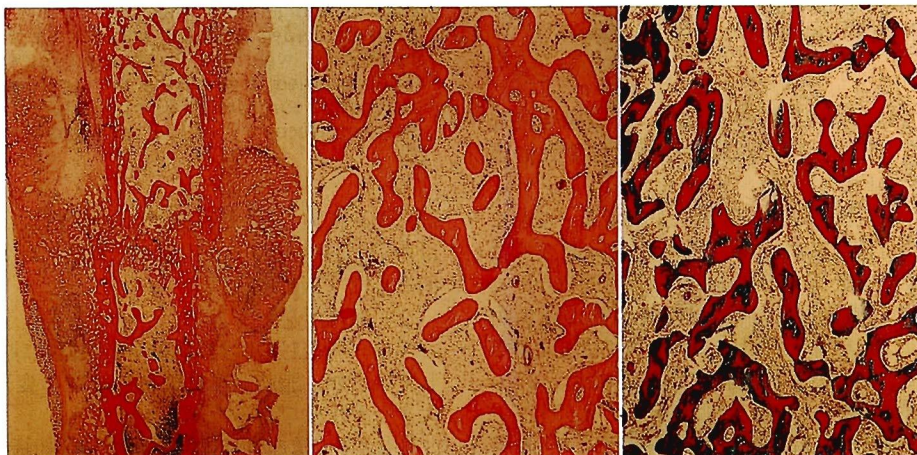


Fig. 8 Histological findings at 4 weeks after surgery. (Left) The junction indicates bony continuity and extensive bony callus formation along the periosteal surface (HE stain; $\times 10$). (Center) The marrow is entirely replaced with vascular rich connective tissue (HE stain; $\times 100$). (Right) The appositional new bone formations extend to the trabecula area (Azan-Mallory stain; $\times 100$).



Fig. 9 Histological findings at 4 weeks after surgery. (Left) Double labelling with tetracycline and calcein demonstrates remodeling of trabecula bone (Villanueva bone stain; ×200). (Right) Immunochemical staining with CD31 identifies many new vessels extending into the grafted bone (×100).

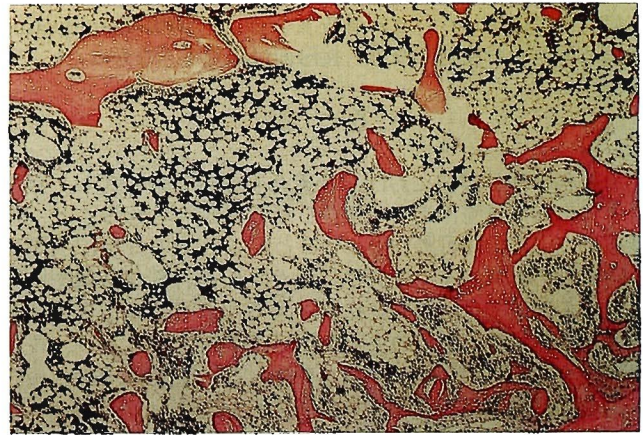


Fig. 10 Histological findings of 10 weeks after surgery. Connective tissue diminishes and hematopoietic marrow is recovering in some areas (HE stain; ×40).

Table 2 Comparison between MRI findings and histological findings

	2 weeks after surgery	4 weeks	15~16 weeks	
MRI findings	<p>T1 WI</p> <p>appearance of low S.I. area</p>	<p>enlargement</p>	<p>recovery to isointensity</p>	<p>isointensity area</p> <p>low intensity area</p> <p>enhanced area</p> <p>no signal area</p>
	<p>Gd-T1 WI</p> <p>appearance of enhanced area</p>	<p>enlargement</p>	<p>vanishment of enhanced area</p>	
	<p>Fat image</p> <p>appearance of no signal area</p>	<p>enlargement</p>	<p>recovery to isointensity</p>	
Histological findings	Vascular rich connective tissue extends into the grafted bone. Hematopoietic marrow vanishes and appositional new bone formation begins.	The marrow of the grafted bone is replaced with vascular rich connective tissue. Bony callus formation is observed on periosteal surface of the junction.	Connective tissue diminishes and hematopoietic marrow recovers as before. Periosteal callus changes into lamellar bone.	

S.I.:signal intensity
WI:weighted image

ていない移植骨遠位腸骨稜では造血・脂肪組織が残存していた (Fig. 7)。

術後3~8週では移植骨と母床の接触面では新生骨梁が連続していた。接触面の骨皮質の表面上には架橋の形成を認めた。血管性結合組織は移植骨全体に拡がり造血・脂肪組織は完全に消失し、ほぼ全体で骨改変が認められた。Azan-Mallory染色では移植骨に増生した結合組織が淡青色に、接触面の新生骨

梁が青色に染まり線維軟骨組織の存在が確認された (Fig. 8)。Villanueva bone stainでは骨梁が二重線となり骨の改変を確認し得た。免疫組織化学染色では骨片内への多数の血管の新生が観察できた (Fig. 9)。

術後9~14週では血管性結合組織は一部に残存するのみで、その中に造血・脂肪組織が再出現していた (Fig. 10)。

術後15~16週では移植骨内の結合組織は完全に消失し骨髄は

ほぼ完全に復帰していた。骨皮質表面上の架橋はremodelingされ成熟した骨皮質となり、接触面は同定できなかった。

考 察

脊椎椎体間骨移植における骨癒合判定はX線写真上、移植骨と母床間に透亮像がなく連続した骨梁がみられること、機能撮影により椎間可動性がないこととされているが、実際には可動性の有無判定や頸胸移行部や腰仙移行部など肩や腸骨と重なる部位ではその判定に難渋する場合がある。X線写真の所見から脱外固定具の決定や偽関節が判定されるが、佐藤は骨癒合判定にMRIの有用性を報告した。著者はその骨癒合順調例の経時的MRI所見と組織所見とを比較し、MRIが骨癒合の重要な情報になりうるか否かを検討した。

1. 本実験結果 (Table 2) と臨床報告との比較検討

佐藤ら¹⁾は臨床例では椎体間に移植した自家腸骨をMRIで観察し骨癒合順調群では血行が再開し血行豊富な状態となり、骨髄の正常化がみられるとした。

本実験では術後2週で、母床と移植骨の接触面にT1像では低信号部位、これと同一部位にGd-T1像では造影部位、Fat像では信号消失部位が出現した。組織学的には母床と移植骨の接触面では血管性結合組織が増生し、造血・脂肪組織は消失し、骨新生と骨改変が認められた。結合組織の増生していない移植骨内には造血・脂肪組織が残存していた。

術後4週では、T1像での低信号部位、Gd-T1像での造影部位、Fat像での信号消失部位は移植骨全体に広がっていた。組織学的には移植骨全体で造血・脂肪組織は血管性結合組織に置換され、骨改変が起こっていた。母床と移植骨の接触面との骨皮質表面上には架橋が形成されていた。

術後15~16週では、T1像で低信号を呈していた部位は正常な腸骨と等信号に復帰していた。Gd-T1像の造影効果は消失していた。Fat像では消失した信号が等信号に復帰していた。組織学的には移植骨全体に拡大していた血管性結合組織は消失し、同部では造血・脂肪組織が回復していた。骨皮質表面上の架橋はremodelingされ成熟した骨皮質を形成していた。母床と移植骨は成熟した骨梁により連続し、接触面は同定できなくなっていた。

実験結果と臨床報告を比較すると、T1像での低信号部位の出現と拡大、その後の信号増強と等信号への復帰、Gd-T1像における造影部位の出現と移植骨全体への拡大、その後の造影減弱と消失、T2像では一定の傾向なしという点で一致した。しかし臨床例で観察された術直後T1像での高信号部位は、本実験ではみられなかった。これはヒトでは移植骨は加齢による造血組織の減少と脂肪組織の増加すなわち黄色髄化の影響が考えられるのに対し、家兎は若い個体であったため造血組織の多い赤色髄であったためと考えた。

2. MRIにおけるT1像、T2像、FS像、Fat像、Gd-T1像およびGd-FS像の検討

MRIは軟部組織を描出でき、さらに種々の撮像方法を用いて特定の組織を描出できる利点がある。

T1像における主な信号源は水分と脂肪である。脂肪組織はT1像で短いT1値を持つため著しい高信号として描出されるが、水分に富んだ造血組織は比較的低信号に描出されるため椎体骨髄の信号強度はこれらの総和として表現される⁷⁾。よって

T1像は水分成分を表現するFS像と脂肪組織を表現するFat像に分けられる。今回T1像は信号の減少とその後の増強、最終的には等信号へ回復した。この変化を左右する要因を考えると、FS像が一定の傾向を示さず、Fat像がT1像とほぼ同様な傾向を示したことから、T1像の信号変化は、脂肪の増減に左右されていると考えられた。次にT1像とFat像の信号強度比の最大変化をみると、T1像の0.667に比べFat像は0.344とより大きな低下を示したため、脂肪の増減をみるにはFat像がT1像に比べより有用と考えられた。

T2像では臨床報告および本実験でも一定の傾向を示さなかった。T2像では水分は高信号を示し脂肪は中等度の信号強度を示すが、結合組織の増生に伴う水分量増加による高信号と脂肪減少による低信号とが相殺されるためT2像では一定の傾向を示さなかったと考えられた。

Gd-DTPAは血行豊富な組織で血管透過性が亢進し、造影剤に十分反応できるだけの水分の量が間質側に存在する状態では造影効果は大きくなり、腫瘍、炎症、梗塞、脱髄疾患などが疑われる場合はその局在、質的診断、および病変の活動性が一層明らかになると言われている^{8,9)}。本実験では移植骨のGd-DTPAにより造影される部位は組織学的に血管性結合組織が増生し血行豊富な部位であり、造影の消失は血管性結合組織が消失し、造血・脂肪組織の回復を示すことを明らかにできた。T1像でGd-DTPAにて造影する場合、臨床例でも脂肪髄の割合の高い移植骨の場合、脂肪が高信号を呈するため造影効果の判定が困難となることがある。この場合脂肪抑制法を併用すると造影効果が鮮明になる。本実験においてもGd-T1像の信号強度比の最高値が1.570であったのに比べ、脂肪抑制をかけたGd-FS像においては2.181とより大きな値をとり造影効果が鮮明に表現されていた。よって移植骨の造影効果をみるにはGd-FS像が最も有効な方法と考えられた。

臨床において脊椎椎体間の移植骨が経時的MRIで上記のような信号変化をとれば順調な癒合過程にあると判断できる。また、偽関節が疑われる場合でもT1像で移植骨辺縁が低信号で、その低信号域がGd-FS像で造影されれば移植骨への血行は存在すると考えられ、経過観察で骨癒合が得られるものと予想される。

要 約

1. 日本白色家兎の腸骨を部分切離し相互に入れ替え、これらの骨癒合過程を経時的にMRIを撮像し、それに対応する組織所見を比較検討した。

2. 移植骨のMRI所見は、T1像では等信号から低信号、その後等信号に復帰した。Fat像では等信号から信号消失、その後等信号に復帰した。Gd-T1像とGd-FS像では造影開始から移植骨全体への造影拡大、その後造影効果は減弱し消失した。T2像とFS像には一定の傾向は認めなかった。

3. 移植骨の組織所見は、血管性結合組織が母床と移植骨の接触面から移植骨内に増生し徐々に移植骨全体に広がった。結合組織の増生に伴い造血・脂肪組織は消失した。骨癒合完成後は血管性結合組織の中に造血・脂肪組織が再出現した。

4. 骨髄の脂肪量の変化をみるにはT1像よりFat像が有用と考えられた。造影効果をみるには移植骨の脂肪量(黄色髄化)に影響されないGd-FS像がGd-T1像より有用と考えられた。

5. 臨床的には移植骨の血行が確認できれば経過観察で骨癒合は得られると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました琉球大学医学部整形外科学教室茨木邦夫教授に深謝致します。また、御指導いただきました同附属病院放射線部山口慶一郎助教授に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 佐藤 栄, 中村敬彦, 中台 寛: 脊椎前方自家腸骨移植術後の骨癒合過程に対するMRIによる評価. 整形外科 46: 1686-1693, 1995.
- 2) Dixon, W.T.: Simple proton spectroscopic imaging. Radiology 153: 189-194, 1984.
- 3) Lodes, C.C., Felmlee, J.P., Ehman, R.L., Sehgal C.M., and Greenleaf J.F., Glover G.H., Gray J. E.: Proton chemical shift imaging using double and triple phase contrast acquisition method. J. Comput. Assist. Tomogr. 13: 855-861, 1989.
- 4) Keller, P.J., Hunter, W.W.J., and Schmalbrock, P.: Multisection fat-water imaging with chemical shift selective presaturation. Radiology 164:539-541, 1987.
- 5) Parums, D.V., Cordell, J.L., Micklem, K., Heryet, A.R., and Gatter, K.C.: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. J. Clin. Pathol. 43: 752-757, 1990.
- 6) Villanueva, A.R.: Preparation and staining of mineralized sections of bone: 骨形態計測ハンドブック 高橋栄明編, 45-55, 西村書店, 新潟, 1983.
- 7) Moore, S.G., and Dawson, K.L.: Red and yellow marrow in the femur; Age-related changes in appearance at MR imaging. Radiology 175: 219-223, 1990.
- 8) Weinmann, H.J., Brasch, R.C., Press, W.R., and Wesby, G.H.: Characteristic of gadolinium-DTPA complex; A potential NMR contrast agent. A.J.R. 142: 619-624, 1984.
- 9) Brasch, R.C., Weinmann, H.J., and Wesby, G.E.: Contrast-enhanced NMR imaging: Animal studies using gadolinium-DTPA complex. A.J.R. 142: 625-630, 1984.