

氏名（本籍地）	水藤 飛来（埼玉県）		
学位の種類	博士 （健康スポーツ学）		
報告・学位記番号	第 546 号（甲（健ス）第 1 号）		
学位記授与の日付	2024/03/25		
学位記授与の要件	本学学位規程第 3 条第 1 項該当		
学位論文題目	発育期ラットの脛骨粗面の構造に及ぼす種々の物理刺激の影響に関する研究 —Osgood-Schlatter 病の機序解明と予防法の検討—		
論文審査委員	主査	教授	大迫 正文
	副査	教授	齋藤 恭平
	副査	教授	今 有礼
			寺島 達夫
	副査	教授	（元東京医科歯科大学准教授、 元東洋大学大学院非常勤講師）

学位論文審査結果報告書〔甲〕

【論文審査】

1. 研究の目的

若年期には、膝の真下に位置する脛骨粗面が突出して、日常生活に支障をもたらすほどの強い痛みを生じることがある。これは、Osgood-Schlatter 病（以下、オスグッド病）と呼ばれ、激しいスポーツの経験者にしばしば発症することから、スポーツ障害の一つとして考えられている。

脛骨粗面は胎児から小児の時期には未だ軟骨でできており、それが膝の真下で下方に垂れ下がるように存在することから、「舌状骨端」とも呼ばれる。脛骨粗面には大腿前面の強大な大腿四頭筋の腱が付着し、膝の伸展時にはこの筋が脛骨粗面を強く牽引する。正常状態であれば、脛骨粗面は発育に伴って軟骨から骨に変化（石灰化）するため、突出もせず、痛みも生じない。しかし、過度な運動を行うと脛骨粗面が強く筋によって牽引され続け、骨への変換（石灰化）が遅れて軟骨が残存し、それが突出して痛みをもたらす日常生活に支障を来す。これがオスグッド病の簡単な発症機序である。このように、オスグッド病においては軟骨で構成される脛骨粗面の「石灰化」が適切に行われるか否かが、発症や治癒、予防において重要な鍵となる。

今日、スポーツ活動を行わなくてもオスグッド病を発症するという報告がみられる。オスグッド病は運動を活発に行う児童の約 20%に発症するが、同年代の運動をしない児童の約 5%にも認められ、必ずしも運動によるものとは断言できず、そのためスポーツ障害よりもむしろ発育障害とすべきであろうとする見解もある。また、オスグッド病は男児に多く発生すると報告されてきたが、これには競技参加者の男女比が関与する可能性が指摘されている。事実、近年における若年層では、女性アスリートの積極的なスポーツ参加によって、オスグッド病の発症率が高まり、そのため顕著な性差がみられないとする報告もある。また、発症年齢にも男女間に違いが認められ、女兒は 8～13 歳であるのに対して、男児は 12～15 歳と女兒よりも遅い。治療に関しても、最も多い（90%）のは保存療法であり、これは膝関節の運動制限を目的とした運動休止である。しかし、発育期における運動刺激は成長促進に関わる重要な要因であり、そのためこの時期における長期の保存療法には問題もあるとされている。そのほか薬物療法や、冷却刺激のような物理刺激を用いた治療も行われるが、それらのいずれにおいても完璧なものではなく、併用されることもしばしばである。

このようにオスグッド病の発症要因や、それらに対するいくつかの治療法が先行研究に示されているが、詳細な組織学的所見を根拠に検討した研究は未だない。また、その基盤となり得る脛骨粗面の基本的な構造の発育変化も明らかにされていない。オスグッド病の発症機序を明らかにすることや、そのために発育期の正常な構造変化を検討することは意義

あるものと思われる。しかし、脛骨粗面の正常な構造変化の検討には、人から標本を採取することは不可能であるため、実験動物でシミュレートして実験を行うことは大きな意味を持つと思われるが、オスグッド病の病態モデルも作製されていない。水藤院生はそのようなオスグッド病に関わる問題を認識し、それを本論文のテーマとする研究に取り組み、その成果を本論文にまとめた。

本報告書では、これ以降、水藤院生が提出した論文を本論文とし、その研究によって得られた成果および評価について以下に報告する。

2. 研究の構成

本論文の構成は以下の通りである。

第1章 序論

第2章 ラット脛骨粗面の石灰化と骨化には ENPP1 の下方制御と FGF23 の上方制御が関与する

第3章 脛骨粗面の形成には Chondromodulin-1 の発現衰退が関連する
— 深層軟骨組織の構造に着目して —

第4章 下り走運動はラット脛骨粗面にオスグッド病を発症させる

第5章 ラット脛骨粗面の石灰化に及ぼす荷重軽減の影響

第6章 ラットにおける大腿四頭筋の求心性収縮は脛骨粗面の石灰化を促進する s

第7章 ベクトルポテンシャルは関節軟骨の石灰化を抑制し、軟骨細胞の増殖を促す

第8章 結論

3. 研究結果の概要

以下に本論文の全体的な流れと、各章の相互的な関連性を示すとともに、各章の内容と概要を示す。

まず、本論文は8章で構成され、そのうち第1章は序論でオスグッド病を本論文のテーマとした背景と、研究の目的が示され、第8章では第2～7章（本論）の研究成果をまとめて結論としている。第2～7章では、結論を導き出すまでの過程で、6本の研究がどのように関連しているかが示されている。前述のごとく、オスグッド病では脛骨粗面が石灰化するか否かが、発症の重要なポイントとなる。そのため第2章および第3章では、脛骨粗面における石灰化の促進または抑制または促進する因子の発現状態を明かにしている。第4～6章においても、脛骨粗面の石灰化に焦点を置いているが、過剰な運動を想定して脛骨粗面への牽引力上昇（第4章および第6章）と、逆に、保存療法の効果をみるために牽引力低下（第5章）の実験を行った結果が示されている。なお、第4章の牽引力上昇実験ではオスグッド病を動物実験によって再現し、これが病態モデルとされている。最後の第7章は、同じ軟骨でも脛骨粗面ではなく関節軟骨を取り上げて、治療法としての通電刺激の効果を論じている。

第1章(序論)では、オスグッド病に関わる現在の問題点を探り、その実態が明らかにされている。この疾患は1903年にOsmond氏によって提唱されたもので、現在でもその症状に苦しむ子どもは多く、これまでにさまざまな研究が行われてきた。しかし、これは発育期の激しい運動によって引き起こされるものであるのか、または、発育変化の中で自然に発生するものであるかについてはいずれも否定できず、見解が分かれている。そのため今日ではスポーツ障害と発育障害の両方に含めて考えられている。スポーツ障害という立場から考えれば、まず、安静を続ける保存療法という方法が選択される。しかし、発育期の児童にとって、長期の安静は健全な身体の成長には必ずしも良好な影響をもたらさないため、この方法については検討が必要である。また、オスグッド病を引き起こす、脛骨粗面の正常構造については組織学的な研究がなく、ミクロレベルから病態や治療の効果の検証もなされていない。そのような様々な問題に対処するために、本章では動物実験によって発育ともなう脛骨粗面の構造変化を明かにし、その上で脛骨粗面に及ぼす過度な加重の影響について検討がなされている。

第2章では、脛骨粗面の石灰化の状況とオスグッド病発症との関連性に関する実験結果が示されている。発育期の脛骨粗面には表層(膝蓋靭帯の線維が埋入されている層)と深層(硝子軟骨で構成されている)が観察されるが、深層は発育期を過ぎると骨組織に置換されるために消失する。生体の石灰化は、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ-1(ENPP1)によって抑制され、Tissue non-specific alkaline phosphatase(TNAP)によって促進されることが知られている。したがって、脛骨粗面はENPP1のダウンレギュレーションとTNAPのアップレギュレーションを介して成長するが、これらのプロセスの理解は未だ得られていない。

この章においては、3、7および13週齢の雄性ラットを用いて、発育に伴う脛骨粗面の構造変化と、それをもたらす遺伝子発現の変化を解明した成果が示されている。Fibroblast growth factor 23(FGF23)は筋腱埋入部の骨化を促進するが、この遺伝子発現はヒトで成人に相当する13週齢になると急激に増加した。また、ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1(ENPP1)の発現は3週齢ラットで最も高く、成長とともに減少した。しかし、TNAPの遺伝子発現は群間で有意差はなかった。また、脛骨粗面におけるENPP1の発現は成長とともに減少したが、TNAPの発現は変化せず、その結果、13週齢では肥大軟骨細胞層の軟骨基質は石灰化していた。したがって、脛骨粗面は成長とともに石灰化および骨化し、この過程にはENPP1のダウンレギュレーションとFGF23のアップレギュレーションが関与していると推測される。オスグッド・シュラッター病は脛骨粗面に発症するスポーツ障害という立場から、これらの所見は本病態の解明に役立つと考えられる。

第3章では、骨端板下縁に局在し、血管侵入の抑制因子であるChondromodulin-1(Chm-1)が、骨髄腔側から脛骨粗面への血管侵入を制御することが明らかにされている。発育初期の脛骨粗面全体にはChm-1が存在するが、それは発育に伴って消失し、また、アルシ

アンブルー-PAS 染色における PAS 反応は発育に伴い広く観察されるのみならず、その反応は Chm-1 の局在と類似していた。一般的に、アルシアンブルー染色は酸性、PAS 反応は中性領域で反応が陽性となる。これらのことから、脛骨粗面の発育に伴う成熟には、Chm-1 の消失が関与し、それは軟骨基質中の水酸化イオン濃度が関連することを示した。

第 4 章では、24 匹のラットを下り走運動群 (DR) と対照群 (CO) に分けて 3 週間のランニングプログラムを実施した結果が示されている。DR では、脛骨粗面の深層が CO よりも大きくなり、炎症性サイトカインが DR で上昇した。また、DR の前方関節軟骨と深部領域はサブスタンス P に対して免疫反応性を示した。さらに、DR の深層に存在する軟骨細胞は CO に比べて小さなサイズの軟骨細胞が観察された。DR の深層には運動に伴い太い基質が形成され、そのことが軟骨細胞の小型化をもたらしたと水藤院生は推測している。このように、DR では炎症性サイトカインの仲間である PGE2 の活性化によって軟骨細胞の分化が抑制され、これに大腿四頭筋のエキセントリック収縮がオスグッド病発症に関与している可能性を示唆している。

第 5 章では、オスグッド病発症には脛骨粗面の石灰化抑制関係することを突き止め、報告している。ここでは機械的刺激の軽減が脛骨粗面の組織構造と石灰化メカニズムに及ぼす影響を調べることを目的として、7 週齢の Wistar 系雄性ラット 20 匹を後肢懸垂群 (HS) と対照群 (CO) に分け、加重軽減が脛骨粗面の石灰化に及ぼす影響が検証されている。HS の脛骨粗面は CO に比べて深層の領域が狭く ($p = 0.000539$)、HS では軟骨組織に加えて未熟な骨組織も観察された。さらに、ENPP1 遺伝子 (Enpp1) の発現は群間で有意な差は認められなかったが ($p = 0.804$)、HS では ALP 遺伝子 (Alpl ($p=0.001$)) と MMP3 遺伝子 (Mmp3 ($p=0.006$)) の発現が増加した。その一方で、TIMP3 遺伝子 (Timp3) の発現は減少した ($p=0.002$)。このような遺伝子発現は、関節軟骨の石灰化と骨化を伴う変形性関節症モデルラットが示す傾向に類似して、HS の脛骨粗面には未熟な骨組織が認められた。水藤院生はこの章の結論として、機械的刺激の減少は脛骨粗面の異常な石灰化による病理学的な変化を引き起こすことから、機械的刺激の減少が適度な運動が重要であると結論づけている。

第 6 章では、上り走行が脛骨粗面の石灰化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、6 週齢のラット 24 匹を上り走行群 (UR) と対照群 (CO) に分類し、走運動実験を行った。UR は予備走行期間の後、速度 17m/分、角度+15°、時間 60 分 (1 回)、頻度 5 日/週の本走行を 3 週間行った。いずれの群でも脛骨粗面に表層と深層が識別されたが、UR の深層の面積は CO より狭かった。さらに、UR における ENPP1 遺伝子の発現は、CO よりも低かったが、Alpl は両群とも有意に示さなかった。ENPP1 は「石灰化の抑制」として知られているが、TNAP (遺伝子名 ALPL) は「石灰化の促進」として報告されている。したがって、上り坂を走ることは脛骨結節の石灰化を促進することから、この所見はオスグッド病予防には有効な示唆となり得ると思われる。

第 7 章では、変形性関節症の新たな理学療法としてベクトルポテンシャル (VP) が関節軟骨の構造に及ぼす効果について検討している。VP は、専用の特種装置から発生するもので、

低周波治療器に類似する効果を発揮する。しかし、既存の装置では電極を皮膚に貼るために皮膚炎を起こすことがあるが、VP 通電刺激装置の場合、電極は使わず、装置内に生体を置いて非接触性の通電刺激が可能である。そのため皮膚炎などの危険性もまったくなく、この点が既存の装置と大きく異なる。また、生体内にペースメーカーある場合や、骨折や捻挫の治療用のギプスやシーネのような金属製のものがある場合には MRI 検査は不可である。しかし、VP 装置の場合、それらを装着したままでも通電が可能となる。そのため骨折治療では、かなり早期のうちから VP 装置を用いることが可能となる。ここでは、6 週齢の Wistar 系雄性ラット 24 匹を、対照群 (C0, n=12) と VP 刺激群 (n=12) に分け (VP 条件: 電圧 67mV、周波数 20kHz、電流 0.12mA、実験頻度 30 分/日、5 日/週、3 週間)、1 週間の予備飼育の後に本実験を行った。VP 群の関節軟骨の軟骨細胞数は、C0 群より多く、石灰化層は VP 群の方が薄かった。さらに、「がん細胞の増殖力 (増殖スピード)」を示す指標として用いられる KI67 タンパク質の遺伝子 (MKi67) の発現は VP 群が C0 群よりも高く、ENPP1 は C0 群で発現が低下した。この結果は、VP が関節軟骨の軟骨細胞増殖に好結果をもたらし、石灰化を抑制したことを示している。したがって、VP 刺激は、OA を予防するための新しい戦略の開発に役立つ可能性がある。

第 8 章 (結論) では、脛骨粗面の構造は発育に伴い石灰化および骨化するが、その変化には深層に存在する酸性軟骨基質が消失し、そこに中性多糖類が合成されていくことが示唆された。また、発育初期から発育期における脛骨粗面の石灰化には Enpp1 の下方制御が、発育期から発育後期における脛骨粗面の骨化には FGF23 の上方制御が関連することが理解された。

【審査結果】

水藤飛来氏による学位請求論文の各章における研究の目的、方法、結果、考察の内容について審査した。その結果、それぞれの章に若干の課題は残すものの、本研究によって主テーマであるオスグッド病の症状と発症機序に関する貴重な成果が得られていると判断し得る。それらの研究デザインが綿密に計画され、その点については問題ないものと思われる。しかし、その成果を適格に出すためには、本研究で用いられた解剖・組織学および生化学的な分析の精度が求められる。そのような観点で本論文中の標本を確認すると、特に、アーチファクトのないきれいな標本が作られ、それらから正確かつ緻密な所見が得られている。このことは研究や実験以前の問題であり、データの信頼性を担保する上で、非常に重要なことである。ここまで研究手法の技術レベルを上げるのにはかなりな時間と労力を要したと思われる、本論文におけるこの点は高く評価される。

内容的には、本論文の主旨に沿ってオスグッド病の症状や発症の機序を、近年新たに分かってきた FGF23、ENPP1、TNAP、Chm-1 のようなパラメータを使って追求している。また、オスグッド病では一般に通電刺激療法も行われているが、それを新たな通電刺激法として未だ開発段階にある VP 装置を使った方法も取り入れるなど、ここにも本研究の独創性や発展

性が認められる。

オスグッド病に関する先行研究には、動物実験によるものがなく、解剖組織学的なものはほとんどないのが現状で、そのほとんどはヒトのX線写真や、生化学的な手法によるものである。そのような観点から、本論文は動物実験（ラット）によって行っているために、病態をシミュレートしたモデルを用いて、患部の標本をえることができた。しかしながら、ラットは哺乳動物であっても、ヒトとは異なり、四足歩行運動を行う。そのため、ヒトとラットでは大腿の筋の付着部位が異なり、両者では脛骨粗面の牽引され方はまったく同じとは言えない。そのため、本論文ではラットの脛骨粗面にもたらされる機械的刺激の増減の影響が調べられているが、そのデータの解釈には注意を要することを忘れてならない。

また、このような動物実験の組織学的な研究手法では、研究者自身が多く動物の標本を観察し、それらの多くの組織像から「平均的な形態」を求め、プレゼンする方法がとられている。しかし、それには主観が入る可能性があるため、形態計測学的な手法によって、統計処理することも近年多く行われている。しかし、電子顕微鏡写真の分析も含め、測定部位や項目によっては、数値化できないもある。そのようなパラメータに関しては、プレゼンする際に観察したすべての写真を提示すべきであったと思われる。

本論文にはこのような研究の限界や改善点があることが改めて認識された。しかし、前述のように、各章の結果を導くに至る本論文の論理的構成や、各章の研究方法によって得られた成果と考察のいずれも、ライフデザイン学研究科（ヒューマンライフ学専攻）の博士学位審査基準に照らしても妥当な研究内容であると認められる。

以上のことから、本審査委員会は、水藤飛来氏の博士学位請求論文について、所定の試験結果と上述の論文審査結果に基づき、全員一致をもって本学博士学位を授与するに相応しいものと判断した。