

結核性脊椎炎における骨破壊の組織学的検討

井澤 一隆

要旨：〔目的・対象・方法〕結核症の骨破壊の機序について免疫組織学的に検討した。結核性脊椎炎に対し手術施行した30例を対象（結核群）とし、術中検体の永久組織標本を検体とした。対照群は人工膝関節置換術施行例30例であり、術中に切除された骨を検体とした。免疫染色はRANK, RANKL, osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OCN) について行い、2群間を比較検討した。〔結果・考察〕結核群の組織では炎症細胞が広範に浸潤し、それに一致して間質細胞、リンパ球と骨表面の骨芽細胞にRANKL陽性細胞が多数認められた。また同部位に破骨細胞の前駆細胞と考えられるRANK染色陽性の単核細胞が認められた。対照群ではRANK, RANKLの発現は乏しかった。骨吸収抑制の機序となるOPGの発現は両群で有意差がなかった。一方、骨形成マーカーであるOCNの発現は結核群で乏しいことが観察された。以上より、結核性脊椎炎の骨組織ではRANK-RANKL系の活性化による骨破壊が発生する一方で、その抑制系の活性化と骨形成の機序が十分に働いていないと考えられ、臨床像と一致していた。

キーワード：骨関節結核、骨代謝、RANK/RANKL、破骨細胞

目 的

骨関節感染症は進行すると骨破壊をきたすが、特に結核感染においては骨新生を伴わない骨吸収性の骨破壊が進行することが多い¹⁾。骨吸収を担う破骨細胞の分化は、分化誘導因子であるreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) によって制御されている。骨芽細胞や活性化されたT細胞の細胞表面に発現したRANKLや骨細胞等から分泌された可溶性RANKLは、その受容体であるreceptor activator of NF- κ B (RANK) を発現する破骨細胞の前駆細胞を刺激して、成熟した破骨細胞へと分化誘導する。一方、骨形成を担う骨芽細胞はosteocalcin (OCN) などの骨基質タンパクを分泌するほか、osteoprotegerin (OPG) というRANKLのおとり受容体を分泌することにより、RANKLとRANKの結合を阻害し、破骨細胞分化を抑制している。こうした骨代謝系はT細胞を中心とした免疫系と密接に関連しているため²⁾、結核感染においても結核免疫応答からの影響があると考えられる。

結核菌による骨破壊の機序についての研究は十分に進

んでおらず、特に近年著しい進歩がみられる骨代謝に関して詳細に検討した報告はない。本研究の目的は結核性脊椎炎における骨破壊の機序について、骨代謝像に焦点を当てて免疫組織学的に検討することである。

対象および方法

(1) 対象患者 (Table 1)

対象は当院で結核性脊椎炎に対し脊椎前方固定術を施行した症例のうち、事前に本臨床研究に対する同意を得た30例（男13例、女17例）、平均年齢67.6（29～84）歳であり（結核群）、術中に得られた病巣椎体の一部を検体として用いた。いずれも喀痰あるいは病巣からの結核菌が証明され診断が確定した症例であり、抗結核薬導入後約1カ月後に手術を施行し、9～18カ月の抗結核薬治療後に良好な治癒を得ている。多剤耐性結核例は認めず、抗結核薬は標準治療導入後に副作用で継続不能となった薬種が生じた例を除いて9カ月間内服継続とし、リファンピシンが継続できなかった症例については18カ月間の内服継続を行った。対照群は変形性膝関節症に対

し人工関節置換術を施行された30例（男12例，女18例），平均年齢70.2（54～84）歳であり，それらにおいて人工関節手術中に切除された大腿骨の一部（非荷重部の海綿骨）を検体として用いた。対照群には結核治療歴のある症例はなかった。結核群，対照群共に術前に骨粗鬆症治療は行われていなかった。

（2）方法

組織検体はホルマリン固定後にEDTAで脱灰したものをパラフィン包埋し，ミクロトーム（Leica SM2000R）にて厚さ4 μ mに薄切した。免疫染色標本は抗RANK抗体，抗RANKL抗体，抗OCN抗体（以上，Chemicon International, MA, USA），抗OPG抗体（R&D Systems, MN, USA）を用いて作製した。組織像の検討は2群共に海綿骨の典型的な骨梁構造が観察できる視野で行い，特に結核群では骨組織の細胞（骨細胞，骨芽細胞，破骨細胞）が死滅している部位（腐骨）は検討対象から除外した。骨組織の細胞の種類はその形態および存在部位により推定した。各群間における結果の統計解析法は，免疫染色の陽性率の差はFisherの正確確率検定を，免疫染色陽性細胞数の比較と患者背景に示した白血球数・リンパ球数の比較についてはMann-Whitney検定を用いて検討し，p値が0.05未満であったものを有意差ありと判定した。

結 果

結核群の組織では炎症細胞の広範な集簇が確認され，それに一致してRANKL染色陽性のリンパ球および間質細胞が認められた。また骨組織の多核破骨細胞による侵食がみられ，骨表面にはRANKL染色陽性の骨芽細胞が認められた（Fig. 1A）。同じく炎症細胞の集簇部位では，破骨細胞の前駆細胞と考えられるRANK染色陽性の単核細胞が認められた（Fig. 2A）。炎症細胞の集簇部位には結核性肉芽腫，ラングハンス巨細胞，乾酪壊死等の結核症に特異的な所見が認められる箇所もあったが，それらの特異的所見がみられる部位において特に免疫染色陽

性細胞が多くみられることはなかった。またラングハンス巨細胞はいずれの免疫染色でも陽性所見を示さなかった（Fig. 4A）。一方，対照群では炎症細胞の浸潤はみられず，RANK/RANKLの発現もごく一部に認めるのみであった（Fig. 1B, Fig. 2B）。OPG染色に関しては，両群とも骨芽細胞や間質細胞に陽性細胞が認められた（Fig. 3A, 3B）。またOCN染色に関しては，骨芽細胞や骨基質の一部に陽性細胞/陽性部位が認められ，対照群で陽性率が高かった（Fig. 4A, 4B）。RANKL/RANK/OPG/OCN染色陽性細胞の出現率は，結核群で93.3/60.0/53.3/46.7%，対照群で36.7/26.7/46.7/86.7%であり，RANKL/RANK/OCN染色で両群間に有意差を認めた（Table 2）。染色陽性例での1 mm²あたりの細胞数でも，RANKL/RANK/OCN染色で有意差を認めた（Table 3）。

考 察

結核性脊椎炎の古典的臨床像としては，緩徐かつ著明な骨破壊による脊椎変形，大きな膿瘍の形成，またそれらの劇的な病変像と比して自覚症状は軽微で，炎症反応は低く白血球増多もみられないなどが挙げられ¹⁾，それらは化膿性脊椎炎と対照的である。また画像所見においても，結核性脊椎炎では骨溶解が優位で骨増生に乏しいのに対し，化膿性脊椎炎では骨溶解に引き続いて骨増生もみられ，これも対照的である。そして骨関節結核において結核治療が奏効し骨病巣が沈静化すると，骨溶解が止まるだけではなく旺盛な骨増生がみられるようになることは，脊椎病変であれば罹患椎体が高度に癒合する「塊椎」としてよく知られている³⁾。こうした骨病変の臨床像は，結核感染とその免疫反応が骨代謝系に影響し骨吸収の促進と骨形成の抑制をきたしていることを示唆している。結核感染に対する免疫反応の過程にTNF- α やIFN- γ などのサイトカインが重要な役割を果たすが⁴⁾，結核免疫反応の骨関節に対する影響という観点からみると，結核患者における反応性関節炎はポンセ病として古くか

Table 1 Clinical characteristics of tuberculosis group and control group

Characteristics	Tuberculosis group (n=30)	Control group (n=30)	P value
Age, years (Mean $\pm$ S.D.)	67.6 $\pm$ 16.3	70.2 $\pm$ 8.7	0.82
Immunocompromised	3	2	
Diabetes mellitus	2	4	
Receiving systemic steroids	3	1	
Chronic hepatitis	1	0	
Pulmonary tuberculosis	21	—	
Cavitary lesion	2	—	
Non-cavity lesion	8	—	
Miliary	10	—	
Pleural	1	—	
WBC count, cells/ μ l	6118.3 $\pm$ 2144.33	5446.1 $\pm$ 1058.9	0.32
Lym count, cells/ μ l	1056.6 $\pm$ 559.1	1620.4 $\pm$ 508.3	0.0002

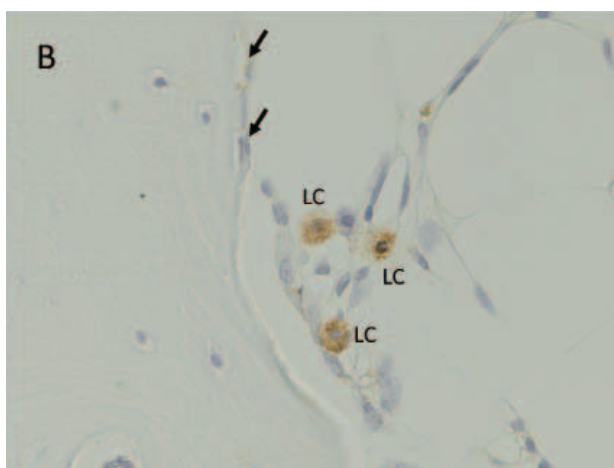
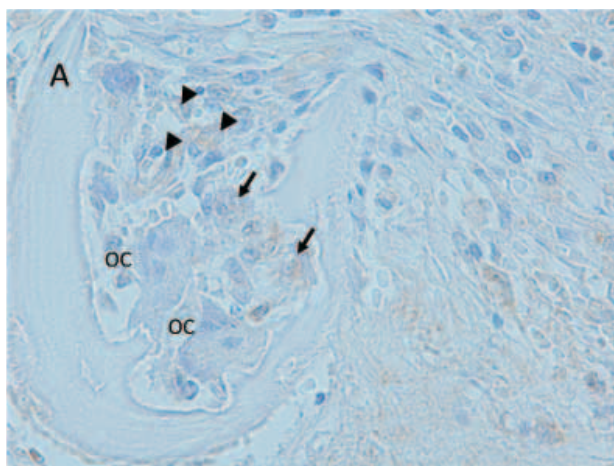


Fig. 1 Immunohistochemical staining for receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) in spinal tuberculosis specimen (A, $\times 400$) and control specimen (B, $\times 400$). Positive staining on stromal cells (arrowheads) and osteoblasts (arrows) that were adjacent to multinucleated osteoclasts (OC) on the bone surface in spinal tuberculosis specimen (A). Fewer positive staining on osteoblasts (arrows) and lymphocyte (LC) in control specimen (B).

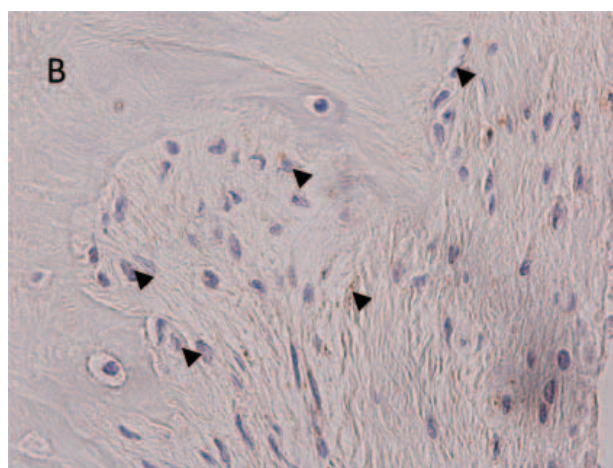
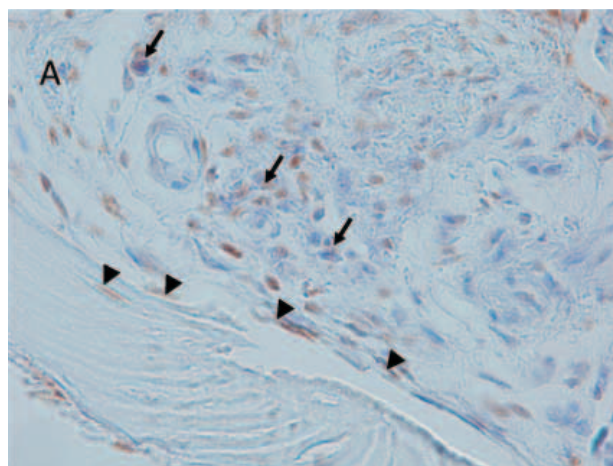


Fig. 2 Immunohistochemical staining for receptor activator of NF- κ B (RANK) in spinal tuberculosis specimen (A, $\times 400$) and control specimen (B, $\times 400$). Positive staining on mononucleated osteoclast precursors (arrows) and osteoclasts (arrowheads) in spinal tuberculosis specimen (A). Fewer positive staining on osteoclasts (arrowheads) in control specimen (B).

ら知られていた⁵⁾。近年ではBCGを用いた膀胱癌治療の際に反応性関節炎が発症することも報告されている⁶⁾。また結核死菌を免疫増強剤として用いたアジュバント関節炎モデルは、関節リウマチの動物実験モデルとして確立しており、そこでみられる骨吸収はRANK-RANKL-OPG系によって制御されていることも報告されている⁷⁻⁹⁾。RANK-RANKL-OPG系の制御はTNF- α やIL-6などのサイトカインが関与しており¹⁰⁾、それらは同時に結核免疫にも関与しているため、結核免疫の活性化は同時に破骨細胞も分化・活性化すると考えられる。過剰な免疫反応が臓器細胞を傷害するのと同様に、炎症細胞が浸潤した骨髄炎では、同時にサイトカインによる破骨細胞の活性化も誘導するため、それが長期にわたると骨破壊へとつながると考えられる。

ヒトの生体骨組織における結核菌感染の骨代謝系への

影響について検討した報告は少なく、佐々木らは感染性脊椎炎9例（うち脊椎結核2例）における抗RANKL抗体、抗CD3抗体による免疫組織学的検討を報告しており、多数認められたRANKL発現細胞のほとんどがT細胞（CD3陽性）であったため、感染性脊椎炎の骨破壊にT細胞のRANKL発現が関与していると考察している¹¹⁾。ただし脊椎結核と他の感染性脊椎炎との所見の差異については検討されていない。本研究においても結核群の骨組織ではRANKL発現が著明である一方で、骨吸収抑制の機序となるOPGの発現が対照群と有意差ないことや、骨形成マーカーであるOCNの発現に乏しいことが観察され、骨吸収優位の骨破壊を示す脊椎結核の臨床像と一致していた。しかし本研究では他の感染性脊椎炎については検討しておらず、今回得られた結果が結核性骨破壊に特有のものであるか否かは明らかにできなかった。今

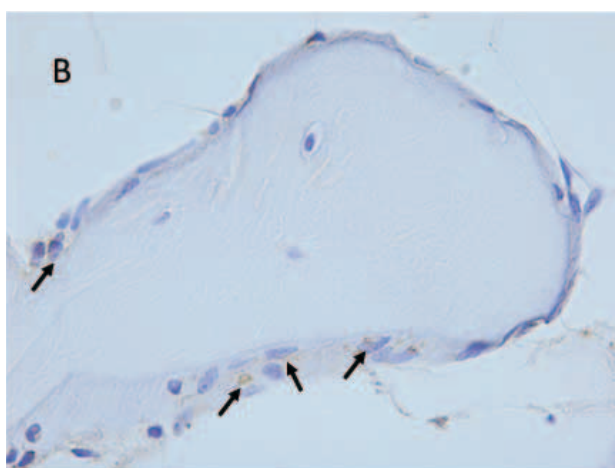
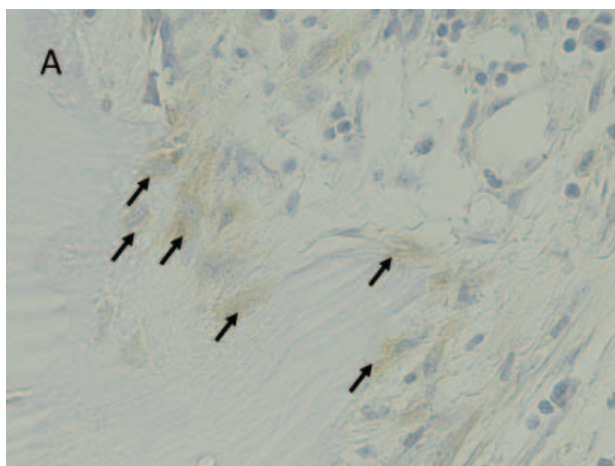


Fig. 3 Immunohistochemical staining for osteoprotegerin (OPG) in spinal tuberculosis specimen (A, $\times 400$) and control specimen (B, $\times 400$). Positive staining on osteoblasts (arrows) on the bone surface (A, B).

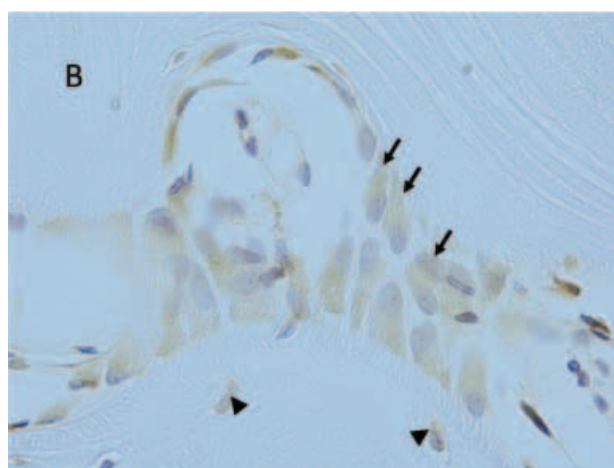
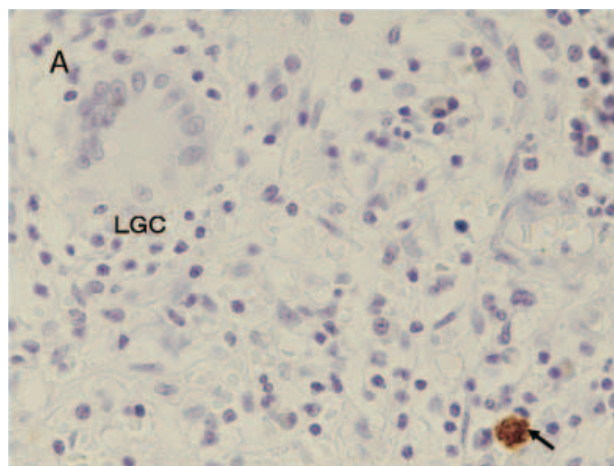


Fig. 4 Immunohistochemical staining for osteocalcin (OCN) in spinal tuberculosis specimen (A, $\times 400$) and control specimen (B, $\times 400$). Positive staining on an osteoblast precursor (arrows) and no staining on a Langhans giant cell (LGC) (A). Positive staining on osteoblasts (arrows) and osteocytes (arrowheads) (B).

Table 2 Comparison of positive rate of RANKL/RANK/OPG/OCN staining between TB group and control group

	TB group	Control group	P value
RANKL positive	28/30 (93.3%)	11/30 (36.7%)	0.000004
RANK positive	18/30 (60.0%)	8/30 (26.7%)	0.009
OPG positive	16/30 (53.3%)	14/30 (46.7%)	0.61
OCN positive	14/30 (46.7%)	26/30 (86.7%)	0.001

RANKL: receptor activator of NF- κ B ligand, RANK: receptor activator of NF- κ B, OPG: Osteoprotegerin, OCN: Osteocalcin

Table 3 Comparison of average positive cell counts of RANKL/RANK/OPG/OCN staining between TB group and control group

	TB group (cells/mm ²)	Control group (cells/mm ²)	P value
RANKL positive	112.4 $\pm$ 67.5	16.0 $\pm$ 13.6	0.000003
RANK positive	91.2 $\pm$ 48.2	11.0 $\pm$ 8.9	0.0001
OPG positive	62.7 $\pm$ 31.6	57.6 $\pm$ 24.6	0.95
OCN positive	31.3 $\pm$ 16.7	49.3 $\pm$ 24.2	0.03

RANKL: receptor activator of NF- κ B ligand, RANK: receptor activator of NF- κ B, OPG: Osteoprotegerin, OCN: Osteocalcin

後結核以外の感染性脊椎炎についても検索し、比較検討する必要がある。

結核を含む骨関節感染症における骨破壊進行の抑制は重要な課題であり、適切な化学療法による病原菌の制圧に加えて、免疫反応・骨免疫の制御の併用も補助療法として検討されている。Verdrenghらはブドウ球菌による実験的化膿性関節炎による骨吸収が、副腎皮質ステロイドやビスフォスフォネート剤の投与により抑制されると報告しており¹²⁾、これはサイトカインの抑制や破骨細胞の抑制が感染性関節炎の骨吸収を抑制することを示している。同グループはさらにRANKLの拮抗抗体であるRANK-FcやOPG-Fcの投与によっても、骨吸収が抑制されたことを報告しており¹³⁾、より標的を絞った治療の可能性を示唆している。感染により発生した骨吸収・骨破壊の回復は困難であるため骨破壊を予防する治療は重要であり、本研究の結果からもRANK-RANKL-OPG系の制御はその一助となる可能性が示唆された。

本研究の限界としては以下の点が挙げられる。まず対象の年齢については、両群間に有意差はみられなかったが結核群では年齢層が幅広く、それに対して対照群では若年層が全く含まれておらず、組織像の違いに影響を及ぼした可能性がある。また骨代謝の状態は個人差があるため、骨代謝マーカーも測定すれば詳細な検討が行えると考えられる。次に骨組織の採取部位が結核群では脊椎椎体であるのに対し対照群では大腿骨であるので、骨代謝の様式が部位によって異なっていた可能性がある。しかし健常人の椎体海綿骨標本を一定数得るには屍体標本から得る以外に方法がないため、今回われわれの施設で施行可能な方法として今回の部位を選択した。また屍体標本では骨粗鬆症治療の状況や死亡する直前の活動性についての情報が得られないため、それらの骨代謝に対する影響因子は統一できないと考えられた。免疫組織学的検討については、本来陽性細胞の種類の同定は二重染色を行うべきであるが、形態的な診断のみで行っている点については不十分であり、今後さらに検討を要する点と考えられる。最後に抗結核薬治療が骨代謝に及ぼす影響についてであるが、結核群に対して抗結核薬開始後約1カ月で手術を施行しており、その間に抗結核薬が奏効して炎症細胞浸潤や骨破壊の進行（破骨細胞の活性化）が軽減している可能性が考えられる。一般的に脊椎結核は化膿性脊椎炎と異なり薬物治療の反応が遅いため、1カ月程度の薬物治療では画像上明らかな改善を示さないこと、今回の結核群は手術症例のためある程度の大きさの病巣を有していたことから、抗結核薬開始後1カ月の骨組織標本でも治療開始前の状態を反映できると判断した。

結 語

結核性脊椎炎の骨組織ではRANK-RANKL系の活性化による骨破壊がみられるが、骨吸収抑制の機序となるOPGの発現は対照群と有意差なく、骨形成マーカーであるOCNの発現に乏しいことが観察され、骨吸収優位の骨破壊を示す脊椎結核の臨床像と一致していた。

謝 辞

この論文の発表の機会を与えていただいた当科 井本一彦部長に深謝いたします。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) Watts G, Liles M: Current concepts review: Tuberculosis of bones and joints. *J Bone Joint Surg.* 1996; 78-A: 288-298.
- 2) Takayanagi H: Osteoimmunology; shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 292-304.
- 3) Tuli SM: Tuberculosis of the spine. *Clin Orthop Relat Res.* 2007; 460: 29-38.
- 4) 岡田全司: 結核免疫 (序論). *結核.* 2010; 85: 501-508.
- 5) Abdulaziz S, Almoallim H, Ibrahim A, et al.: Poncet's disease (reactive arthritis associated with tuberculosis): retrospective case series and review of literature. *Clin Rheumatol.* 2012; 31: 1521-1528.
- 6) Pancaldi P, Van Linthoudt D, Alborino D, et al.: Reiter's syndrome after intravesical Bacillus Calmette-Guérin treatment for superficial bladder carcinoma. *Br J Rheumatol.* 1993; 32: 1096-1098.
- 7) Pearson CM: Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956; 91: 95-101.
- 8) Ronaghy A, Prakken BJ, Takabayashi K, et al.: Immunostimulatory DNA sequences influence the course of adjuvant arthritis. *J Immunol.* 2002; 168: 51-56.
- 9) Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al.: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999; 402: 304-309.
- 10) Graves DT, Li J, Cochran DL: Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res.* 2011; 90: 143-153.
- 11) 佐々木裕美, 井尻幸成, 永吉隆作, 他: 感染性脊椎炎の骨破壊. *西日本脊椎研究会誌.* 2008; 34: 14-16.
- 12) Verdrengh M, Carlsten H, Ohlsson C, et al.: Addition of bisphosphonate to antibiotic and anti-inflammatory treatment reduces bone resorption in experimental *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. *J Orthop Res.* 2007; 25:

304–310.

- 13) Verdrengh M, Bokarewa M, Ohlsson C, et al.: RANKL-targeted therapy inhibits bone resorption in experimental

staphylococcus aureus-induced arthritis. *Bone*. 2010 ; 46 : 752–758.

Original Article

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF BONE DESTRUCTION IN SPINAL TUBERCULOSIS

Kazutaka IZAWA

Abstract [Purpose] To investigate the mechanism of bone destruction in spinal tuberculosis (TB) by immunohistochemical analysis of the pathway that includes receptor activator of NF- κ B (RANK), receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), and osteocalcin (OCN) in affected tissues.

[Materials and methods] TB bone specimens were obtained from 30 surgically treated spinal TB patients (13 males and 17 females; average age, 67 years). Normal bone specimens were also obtained from 30 osteoarthritis patients (12 males and 18 females; average age, 70 years) who had undergone knee arthroplasty, wherein a piece of the non-weight-bearing part of the femur was obtained as a part of the resected bone for surgery. The two groups of specimens were examined for the expression of RANK, RANKL, OPG, and OCN by immunohistochemistry.

[Results] Spinal TB specimens were significantly infiltrated by inflammatory cells, and bone resorption by multinucleated osteoclasts was observed. RANKL was predominantly expressed in lymphocytes and osteoblasts, whereas RANK was expressed in mononucleated osteoclast precursors among the inflammatory cells. In contrast, there was no infiltration of the inflammatory cells, and the expression of RANKL/RANK was poor in the control specimens. OCN, a bone formation marker, was expressed in the osteoblasts and in part of the bone matrix in normal tissues; however, it was poorly expressed in the tissues of the spinal TB patients. OPG, a neutralizer of the RANK–RANKL pathway, was expressed in the osteoblasts and stromal cells, and there was no signifi-

cant difference in the expression between the two groups.

[Discussion] In the tissues from spinal TB patients, the RANK–RANKL pathway was strongly activated, whereas the expression of its neutralizer OPG was not sufficiently induced. In addition, the bone formation marker OCN was poorly expressed, indicating a paucity of reactive bone formation. These findings are consistent with bone-resorption-predominant destruction, which is commonly observed in osteoarticular TB. Activation of the RANK–RANKL pathway has been considered to be caused by cytokines such as tumor necrosis factor- α and interleukin-6, which also play important roles in the immune response against TB. In severe pulmonary TB, an intense and prolonged immune reaction sometimes leads to tissue destruction and the formation of cavity lesions. Therefore, such an immune reaction against spinal TB may also cause activation of the RANK–RANKL pathway, thereby leading to bone destruction.

Key words: Osteoarticular tuberculosis, Bone metabolism, RANK/RANKL, Osteoclast

Department of Orthopaedic Surgery, National Hospital Organization Toneyama National Hospital

Correspondence to: Kazutaka Izawa, Department of Orthopaedic Surgery, National Hospital Organization Toneyama National Hospital, 5–1–1, Toneyama, Toyonaka-shi, Osaka 560–8552 Japan. (E-mail: izawakaz@toneyama.go.jp)