

図 7. RA に伴う骨粗鬆症の評価基準

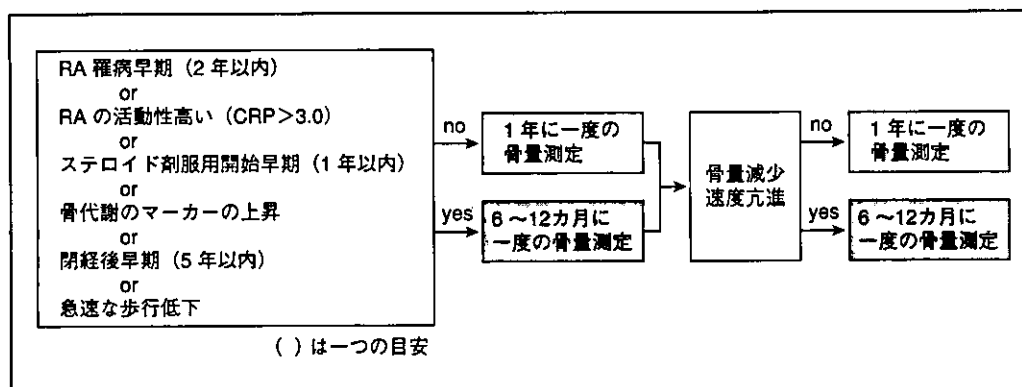


図 8. 骨量測定時期の目安

めから多部位での測定が望まれる。

3. ステロイド使用に伴う骨粗鬆症

ステロイドに伴う骨粗鬆症は広く認識され、また骨粗鬆症の治療薬が種々使用可能となりながらも、

現在ステロイドを投与開始する際に同時に骨粗鬆症の予防的治療が行われることはまだまだ少ない。1998年と2002年に英国から²⁶⁾²⁷⁾、また1996年と2001年にアメリカリウマチ学会からステロイド性骨粗鬆症の予防・治療のための指針が報告されてい

表 8. glucocorticoid-induced osteoporosis の予防, 治療指針

<p>3 カ月以上の投与予定で prednisone で 5 mg/日以上 の glucocorticoid 投与開始の患者 生活習慣の改善：禁煙, 過度のアルコール摂取を減らす 荷重運動の指導 カルシウム補充 ビタミン D 補充 bisphosphonate の処方</p> <p>prednisone で 5 mg/日以上 で glucocorticoid 長期投与中の患者 生活習慣の改善：禁煙, 過度のアルコール摂取を減らす 荷重運動の指導 カルシウム補充 ビタミン D 補充 性腺ホルモン低下の場合はホルモン補充療法 腰椎, 大腿骨の骨密度が T score < -1 以下の場合 bisphosphonate の処方 bisphosphonate が不適切である場合はカルシトニン 骨密度が正常の場合 半年あるいは 1 年後ごとの骨密度測定</p>
--

る²⁸⁾²⁹⁾。2001 年の ACR の予防治療指針を表 8 に示すが, 3 カ月以上 5 mg/日以上 のグルココルチコイド (glucocorticoids) を服用開始するすべての患者にカルシウムあるいはビタミン D の補充を勧め, 6 カ月以上の長期投与予定の場合は全例投与開始前に腰椎, 大腿骨の骨密度を測定することを勧めている。また治療としては bisphosphonate が椎体骨折の発生頻度を低下させること, 骨密度の減少を防止することがすでに示されており, 推奨される治療であること, また予防・治療は glucocorticoids の服用が続く限り継続することが勧められている。

一方, 2002 年の英国の治療指針では glucocorticoids の服用を 3 カ月以上予定する 65 歳以上患者では全例何らかの薬物療法を開始することを勧めており, また 65 歳未満では全例投与開始前に腰椎, 大腿骨の骨密度測定を行い, その値により予防的治療を開始することを勧めている。

このように医原性の骨粗鬆症であるステロイド性骨粗鬆症に関しては, 欧米の流れは明らかに投与開始前からの評価に基づく早期の予防的治療の方向にあり, 今後日本でもこの方向性に向かうであろう。

IX. 治療

1. 骨折時の治療

背部痛, 腰痛に際しては, 安静臥床を行うが疼痛が軽減し次第, 坐位, 立位, 歩行を早期に行い, 廃用性の筋力低下や骨量低下を防ぐ。通常急性背部痛, 腰痛は 1 カ月程度で疼痛は軽減する。早期除痛ために, カルシトニンの筋注, 消炎鎮痛薬の処方を行う。立位, 歩行時の除痛の目的で硬性あるいは軟性のコルセットを用いるが, 疼痛がとれ次第コルセットは早期に除去し, コルセット着用による廃用性筋萎縮を起こさないようにする。疼痛が軽い場合にコルセットは不要である。

大腿骨頸部骨折, 遅発性の脊髄麻痺をきたした圧迫骨折は通常手術の絶対適応であるが, 最近椎体の圧迫骨折に対する新しい治療として経皮的椎体形成術 percutaneous vertebroplasty³⁰⁾³¹⁾が行われるようになってきた。椎体骨折後の保存的治療に抵抗する疼痛に対して行い, 2 方向透視下, 局所麻酔下に骨折椎体内骨セメント充填による局所の安定化で直後から除痛が得られる。もともと血管腫などの椎体の良性腫瘍や多発性骨髄腫などの悪性腫瘍に伴う椎体

圧迫骨折に対してフランスで行われ始めた方法である。その後米国で骨粗鬆症に伴う圧迫骨折にも行われるようになり急速に普及しつつあり本邦でも徐々に行う施設が増加している。さらに全身麻酔下、圧迫骨折の椎体内でバルーンを用いて変形を矯正したのち骨セメントを充填する kyphoplasty³²⁾も次第に行われつつある。これは除痛だけではなく変形矯正が可能であるので椎体骨折後の QOL 低下を防止しうる効果も期待できる。いずれも長期的成績や適応に関してははまだ十分明らかとなっていないわけではないが、今後骨粗鬆症治療の中で重要な治療の選択肢となることが期待できる。

2. 運動療法

自宅での運動療法を指導するが、これまでの患者自身の運動量や運動機能に応じた指導が必要である。背筋と臀部、大腿の抗重力筋の強化が重要であるが、高齢者では軽いトレーニングを日に2~3回行う程度から開始して、運動負荷に伴う疼痛の発生を避けることが重要である。椎体骨折を有する患者の体幹筋力トレーニングに際しては、新たな椎体骨折の危険を避けるためまず背筋力強化を行い、その後腹筋力訓練の手順で行う。

3. 生活指導

日光曝露と歩行能維持のために屋外歩行を勧めるが、急激な歩行量増加をさせず、少しずつ段階的に行う。

大腿骨頸部骨折のほとんどは転倒を機に生ずるので、生活の場である自宅での歩行に関する環境改善(段差をなくす、座布団などの躓きやすいものを整理する、夜間歩行時の照明の確保、手すりをつけるなど)など、転倒に対する注意喚起を行う。

4. 薬物療法

薬物療法の効果に関してここ数年間で多くの大規模前向き二重盲検試験の結果が出された。このような新しいデータは退行期骨粗鬆症に関しての evidence based medicine (EBM) の考え方を急速に普

及させつつある。薬物療法に関しては新規骨折を防止するのに効果的であるかどうかという観点での理解が重要である。これまでに骨吸収抑制効果を持つアミノビスフォスフォネートの alendronate³³⁾, riserodronate³⁴⁾と PTH(1-34)連日皮下注(20 µg, 40 µg)³⁵⁾の3剤が大規模前向き二重盲検試験で椎体骨折と大腿骨頸部骨折の両者の発生率を低下させることが示されている。いずれも大腿骨頸部骨折は対照群の約半分に減少する。またビタミンD, etidronate, ラロキシフェン(ストロゲン作用を有する SERM のひとつ)³⁶⁾, 添鼻サケカルシトニン(200 IU/日, カルシウム 1000 mg/日, ビタミンD 400 IU/日併用)³⁷⁾は新規椎体骨折発生の減少効果があることが確認されている。しかし大腿骨頸部骨折に関しては有意差がないかあるいは未検討である。一方、ホルモン補充療法に関しては米国で行われた冠動脈疾患への影響をみる検討で、心血管系疾患、深部静脈血栓症、乳癌、子宮内膜癌の危険度を上昇させる効果が示されると同時に、大腿骨頸部骨折の発生頻度は低下させることが始めて明らかとなった³⁸⁾。骨粗鬆症治療においては総合的な利益/不利益のバランスの観点からのホルモン補充療法の適応を考える必要性が示されている。

おわりに

原発性骨粗鬆症の治療に関して、特に薬物療法の効果に関しての検討結果が次々と報告されつつあり、骨粗鬆症の治療方法はこれまでよりもより積極的に行えることが期待される。また椎体の圧迫骨折に対しても percutaneous vertebroplasty や kyphoplasty などが新たに行えるようになってきた。一方、その診断や治療効果評価に必要な骨密度測定や骨代謝マーカーの精度管理に関してはまだまだ体制が十分とはいえない状況であり、精度管理の重要性の認識などの基本的な理解が広まることで平均的医療の向上がはかられることが期待される。さらにステロイド服用や関節リウマチに伴う二次性骨粗鬆症のように、より重篤な骨粗鬆症の予防の重要性の一般的な認識も今後さらに深まる必要がある。

文献

- 1) Consensus development conference : diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 94(6) : 646-650, 1993.
- 2) NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*, 285(6) : 785-795, 2001.
- 3) Michel BA, Bloch DA, Wolfe F, et al : Fractures in rheumatoid arthritis : an evaluation of associated risk factors. *J Rheumatol*, 20 : 1666-1669, 1993.
- 4) Ross PD : Clinical consequences of vertebral fractures. *Am J Med.*,103 : 30 S-42 S, 1997.
- 5) Cooper C, Atkinson EJ, O'Fallon WM, et al : Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures : a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *J Bone Miner Res*, 7 : 221-227, 1992.
- 6) Silverman SL Minshall ME, Shen W, et al : The relationship of health-related quality of life to prevalent and incident vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis : results from the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation Study. *Arthritis & Rheum*, 44 : 2611-2619, 2001.
- 7) Martin AR, Sornay-Rendu E, Chandler JM, et al : The impact of osteoporosis on quality-of-life : the OFELY cohort. *Bone*, 31 : 32-36, 2002.
- 8) Ethgen O, Teller V, Sedrine WB, et al : Health-related quality of life and cost of ambulatory care in osteoporosis : how may such outcome measures be valuable information to health decision makers and payers? *Bone*, 32 : 718-724, 2003.
- 9) Cooper C, Atkinson EJ, Jacobsen SJ, et al : Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epi demiol*, 137 : 1001-1005, 1993.
- 10) Singh M, Nagrath AR, Maini PS : Changes in trabecular pattern of upper end of the femur as an index of osteoporosis. *J Bone Joint Surg*, 52-A : 457-467, 1970.
- 11) Barnett E, Nordin BEC : The radiological diagnosis of osteoporosis : A new approach. *Clin Radiol*, 11 : 166-174, 1960.
- 12) Genant HA, Wu CY, Kujik C, et al : Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Min Res*, 8 : 1137-1148, 1993.
- 13) Black DM, Cummings SR, Karpf DB, et al : Genant HK, Haskell WL, Marcus R, Ott SM, Torner JC, Quandt SA, Reiss TF, Ensrud KE. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. *Fracture Intervention Trial Research Group. Lancet*, 348 : 1535-1541, 1996.
- 14) 折茂 肇, 林 泰史, 福永仁夫, 他 : 原発性骨粗鬆症の診断基準(2000年度改訂版). *日骨代謝誌*, 18 : 76-82, 2001.
- 15) Wu CY, Li J, Jergas M, et al : Comparison of semiquantitative and quantitative techniques for the assessment of prevalent and incident vertebral fractures. *Osteoporos Int*, 5 : 354-370, 1995.
- 16) Yuh WT, Zachar CK, Barloon TJ, et al : Vertebral compression fractures : distinction between benign and malignant causes with MR imaging. *Radiology*, 172 : 215-218, 1989.
- 17) Baker LL, Goodman SB, Perkash I, et al : Benign versus pathologic compression fractures of vertebral bodies : assessment with conventional spin-echo, chemical-shift, and STIR MR imaging. *Radiology*, 174 : 495-502, 1990.
- 18) Naul LG, Peet GJ, Maupin WB : Avascular necrosis of the vertebral body : MR imaging. *Radiology*, 172 : 219-222, 1989.
- 19) Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, et al : The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 9 : 1137-1141, 1994.
- 20) Lauritzen JB, Petersen MM, Lund B : Effect of external hip protectors on hip fractures. *Lancet*, 341 : 11-13, 1993.
- 21) Dargent-Molina P, Favier F, Grandjean H, et al : Fall-related factors and risk of hip fracture : the EPIDOS prospective study. *Lancet*, 20 : 348 : 145-149, 1996.
- 22) Meunier PJ, Delmas PD, Eastell R, et al : Diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women : clinical guidelines. *International Committee for Osteoporosis Clinical Guidelines. Clin Ther*, 21(6) : 1025-1044, 1999.
- 23) Osteoporosis Task Force : American association of clinical endocrinologists 2001 medical

- guideline for clinical practice for the prevention and management of postmenopausal osteoporosis. *Endocrine Practice*, 7 : 293-312, 2001.
- 24) Brown JP, Josse RG : Scientific Advisory Council of the Osteoporosis Society of Canada. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ*, 167 : S 1-34, 2002.
- 25) 橋本 淳 : RA にみられる骨粗鬆法. 整形外科外来シリーズ4 リウマチ外来. 越智隆弘編, p 57-67, *MEDICAL VIEW*, 1997.
- 26) Eastell R, Reid DM, Compston J, et al : A UK Consensus Group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis : an update. *J Intern Med*, 244 : 271-292, 1998.
- 27) Glucocorticoid-induced osteoporosis. : guidelines for prevention and treatment. Royal College Physicians of London, 2002.
- 28) Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. American College of Rheumatology Task Force on Osteoporosis Guidelines. *Arthritis Rheum*, 39 : 1791-1801, 1996.
- 29) American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis : Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis 2001 Update. *Arthritis Rheum*, 44 : 1496-1503, 2001.
- 30) Gangi A, Kastler BA, Dietemann JL : Percutaneous vertebroplasty guided by a combination of CT and fluoroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*, 15 : 83-86, 1994.
- 31) Cortet B, Cotten A, Boutry N, et al : Percutaneous vertebroplasty in the treatment of osteoporotic vertebral compression fractures : an open prospective study. *J Rheumatol*, 26(10) : 2222-2228, 1999.
- 32) Lieberman IH, Dudeney S, Reinhardt MK, et al : Initial outcome and efficacy of "kyphoplasty" in the treatment of painful osteoporotic vertebral compression fractures. *Spine*, 26 : 1631-1638, 2001.
- 33) Black DM, Cummings SR, Karpf DB, et al : Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet*. 348 : 1535-1541, 1996.
- 34) McClung MR, Geusens P, Miller PD, et al : Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. Hip Intervention Program Study Group. *N Engl J Med*, 344 : 333-340, 2001.
- 35) Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al : Effect of parathyroid hormone(1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 344 : 1434-1441, 2001.
- 36) Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, et al : Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene : results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation(MORE) Investigators. *JAMA*, 282 : 637-645, 1999.
- 37) Chesnut CH 3rd, Silverman S, Andriano K, et al : A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis : the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am J Med*, 109 : 267-276, 2000.
- 38) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al : Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288(3) : 321-333, 2002.
-

Journal of Joint Surgery

関節外科

基礎と臨床

別刷

〒162-0845 東京都新宿区市谷本村町2-30
TEL 03-5228-2052 FAX 03-5228-2062 (編集部)
<http://www.medicalview.co.jp>

 メジカルビュー社

Ⅲ.足関節

HAブロック充填を併用した人工足関節置換術

橋本 淳 史 賢林 林田賢治 藤井昌一 西川昌孝 富田哲也
大脇 肇 菅本一臣 越智隆弘 吉川秀樹

Key words : hydroxyapatite, rheumatoid arthritis, total ankle arthroplasty, subtalar realignment arthrodesis

はじめに

人工足関節の長期成績は、これまで必ずしも満足のいくものではなかった。とくに関節リウマチ(RA)患者での成績は、変形性足関節症患者での結果に比較して合併症も多く、成績は安定していない。しかし、欧米では1980年代の経験をもとに、1990年代からさまざまな改良を加えた人工足関節がつくられ、その長期成績も明らかとなりつつある。Agility total ankle arthroplastyや Scandinavian Total Ankle Replacement (STAR), Buechel-Pappas meniscal bearing total ankle replacementの10年前後の長期成績^{1)~3)}をみても、1980年代の報告に比較すると長期成績の改善は著しい。

わが国でも1990年代までの経験をもとに、いくつかの施設でさらにより成績をめざした改善が試みられている。

著者らの施設でも、RA患者の足関節破壊に伴

う歩行機能障害に対して人工足関節置換術を行ってきたが、これまでの経験をもとに現在いくつかの方針を立てて、人工足関節のよりよい長期成績をめざしている。ここでは、そのなかで脛骨コンポーネント近位の脛骨骨髓内にhydroxyapatite (HA)ブロック充填を併用した人工足関節置換術を中心に紹介する。

人工足関節の長期的問題点

著者らの施設では、1984年から京セラTNK人工関節置換術を脛骨、距骨ともcement fixationを用いて行ってきた。その27関節の平均6年の経過をみると、臨床症状上は疼痛の軽減、消失が得られ、67%に臨床的改善が維持されていたが、X線像上は脛骨コンポーネントの沈み込みと距骨の圧壊がそれぞれ54%、38%にみられ⁴⁾、多くの改善点を著者らに要求する結果であった。この結果から問題点として、以下の3点を考えて

Total ankle replacement with hydroxyapatite augmentation for fragile bone in rheumatoid arthritis

0286-5394/05/¥400/論文/JCLS

J. Hashimoto, M. Nishikawa, T. Tomita, K. Sugamoto, H. Yoshikawa : 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科) ; K. Shi, K. Hayashida : 星が丘厚生年金病院整形外科 ; M. Fujii : ガラシア病院整形外科 ; H. Owaki : 大阪厚生年金病院整形外科 ; T.Ochi : 国立相模原病院

いる。

①セメント使用による長期固定性の問題点：同じデザインのインプラントでcementedとuncementedで比較をしたrandomized studyはないが、これまでいくつかのhistorical cohortを用いた検討でセメント非使用のほうが長期的に優れることが示され^{5), 6)}, cementless implantがよいことが広く受け入れられるに至っている^{7), 8)}。

②RAに伴う関節周辺の著しい骨脆弱性：RAでは、炎症に伴う傍関節性骨粗鬆症が起こることが知られ、さらに下肢関節障害に伴う歩行能力の低下は廃用性骨萎縮、不動性骨粗鬆症をもたらす。また、RAにみられる手や大腿骨の骨密度の低下は、その後の関節破壊の進行と密接に関連することが示されており^{9), 10)}、足関節局所の骨粗鬆症の程度も手術するしないにかかわらず、関節破壊の進行に関与していると考えられる。したがって、人工関節置換術を行ったものの長期の安定性にも骨脆弱性に対する対応が必要であると考えられる。

③足関節より遠位の距骨下関節のアライメント異常：人工足関節の長期成績に関して、人工足関節の設置角度で評価した内外反の変形残存は、予後不良因子であることが指摘されている^{11)~13)}。このことは術後の人工関節への力学的なストレスの分布様式が長期成績に影響することを示している。したがってRAでは足関節のアライメントだけではなく、足関節を通る荷重線の内外側へのシフトをもたらす距骨下関節のアライメント異常は長期成績に影響すると考える。

現在欧米では、セメントレスでbone in-growthやon-growthが期待できるデザインがほとんどであるにもかかわらず、残念ながらわが国ではセメントレスでbone in-growthが期待できるデザインが認可されておらず、この点はすぐには改善不可能である。またこの脛骨・距骨コンポーネントの沈み込みはセメントを用いた著者らの例だけではなく、これほど高頻度ではないにせよ、RAに対するセメントレス人工足関

節の最近の報告でも、依然として存在する問題点である。Andersonらは、uncemented STARを用いた3~8年(中央値52カ月)の成績を報告しているが、そのなかのRA患者の成績は28例中5例(18%)が脛骨、距骨コンポーネントの弛みによるrevisionとなった¹⁴⁾。SuらはBuechel-Pappas meniscal bearing total ankle replacementの平均5年の経過で19例中2例(11%)に内反あるいは外反を伴う脛骨コンポーネントの沈み込みをきたしたことを報告している¹⁵⁾。

以上の点より、前述のRAに伴う関節周辺の著しい骨脆弱性と距骨下関節のアライメント異常に対する対応は、セメント使用の有無にかかわらず、RA患者で人工足関節置換術を行う場合に、普遍的に有用である可能性を考えている。

RAで人工足関節置換術を行う場合に著者らの行っている対応

●骨脆弱性に対する対応

脛骨に関しては、脛骨コンポーネントの沈み込み防止のための支持性をもち、かつ優れた骨親和性により固定されるHAブロックを充填したうえでコンポーネントを設置する。また、距骨に関しては距骨下関節の炎症に伴う傍関節性骨粗鬆症、骨脆弱性の進行を防止する目的で距骨下関節固定術を行い、距骨踵骨が一体となった大きな骨に脛骨コンポーネントを設置する。

●距骨下関節のアライメント異常に対する対応

術前に立位距骨下関節撮影で荷重位での脛骨踵骨角を評価し、距骨下関節に内外反のアライメント異常がある場合は、術後荷重線が足関節中央を通過する矯正位にするための距骨下関節固定術を行う。また距骨下関節が不良アライメントで強直している例では、強直した距骨踵骨の矯正骨切りを行いアライメントを整える。

一方、RA患者での三関節固定術の長期経過観

察により、後足部の固定術後に足関節変形が軽度進行することが報告されており¹⁶⁾、疼痛も炎症もアライメント異常もない距骨下関節は温存を考えることも必要である。しかし、距骨下関節に疼痛も炎症もアライメント異常もない例で、人工足関節を必要とする足関節破壊を生じている例は経験上あまりない。論文上もRA足の関節破壊の経年的評価を行った検討により、足関節破壊が進行している例では全例距骨下関節破壊が先行していたことが報告されている¹⁷⁾。

さらに、人工足関節置換術後も、距骨下関節変性が19%に距舟関節変性が15%にKellgren-

Moore scaleが2段階以上進行することが、変形性足関節症を主とした対象で報告されており¹⁾、RA患者ではこれに加えてさらにRAの経過に伴う関節破壊も重なることも含めて考えると、距骨下関節温存の必要性を判断する例は少ない。

以上のような対応のなかで、次にHAブロック充填に関して述べる。

HAブロックの具体的な充填方法

図1のような人工足関節置換術の際の脛骨挿入用に形成した住友製薬ポーンセラム®-PAB-02をすでに用意している。RA患者の骨髓腔の前後径、横径を計測のうえ、術中操作しやすい形状を考案し、HA成形加工体として作製したものである。この専用ポーンセラム®-Pは全長を挿入するのではなくおよそ2/3程度挿入し、はみ出した部分をあとで削り取るように意図的に長くしている。専用テンプレート(図2)を用いて足関節側面X線像で全長の2/3程度を骨髓内に挿入できるサイズを確認する。

術中操作に関しては、脛骨遠位の骨切りが終了した時点で、曲がりの鋭匙で脛骨骨切り断端の中央から海綿骨を押し込みながらHAを挿入するスペースをつくる。

この際に、著者らの施設では図3のような特注のラスプを用いているが、これがなくてもこの操作は容易である。海綿骨は取り出さずすべて押し込むようにする。HAを削るミニター(HAとともに業者持ち込み機器)を用いて、挿入し

図1 住友製薬ポーンセラム®-P AB-02

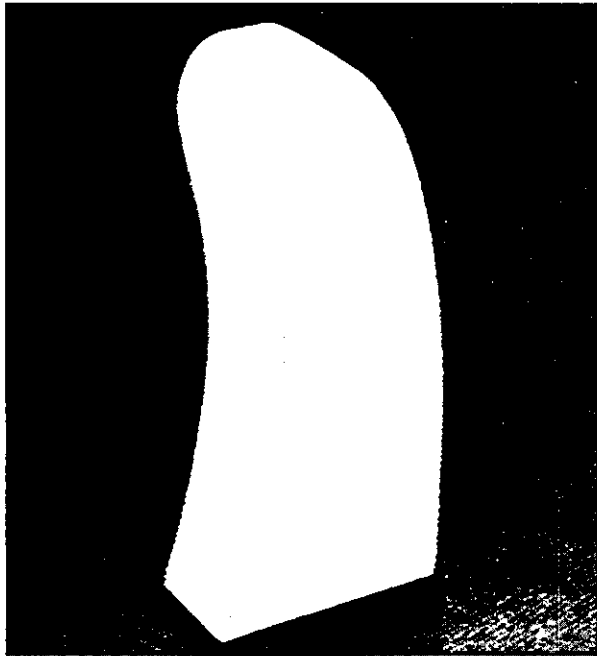
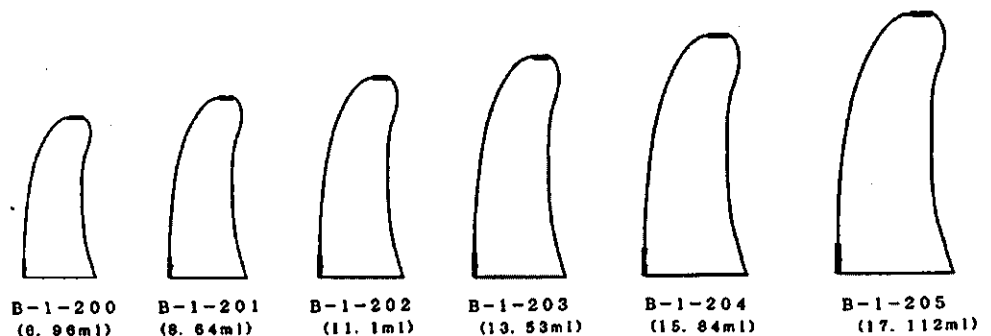


図2 住友製薬ポーンセラム®-P AB-02のテンプレート



やすいようにHAのすべての角に丸みをつける。挿入方向は円弧状HAの凹側が脛骨前方(術野手前)にくるように挿入するので、HA遠位後方の角を大きく削り落とし、距骨の骨切り面にあたらないようにしておく。図4のような専用の打ち込み器をHA遠位前方の角にあてて、打ち込み軌跡が弧を描くように挿入する。HAブロックがそれ以上入らなくなる位置まで打ち込んだあと、出ている部分をポーンソーとミニターで除去する。FINE prosthesisを用いる場合は、このあとさらにHAに脛骨コンポーネントのベグ部分が入る孔をサージャートームで作製する。またTNK ankleを用いる場合もセメント固定用

にHAの遠位端にいくつかの孔を掘っておく。

手術症例の画像

基本的に、距骨下関節の固定術を行う場合は、人工足関節置換術と同時に行っている。また、前足部の変形矯正も必要な患者の場合は、まず前足部変形矯正と距骨下関節固定術を同時に行い、骨癒合が得られたあとに二期的に人工足関節置換術を行うようにしている。それぞれの例の画像を示す。

図3 著者らの施設で使用する特注ラスプ

- ㊸：専用ラスプ。
- ㊹：専用ラスプが入った像。
- ㊺：骨髓腔にHAが充填されている。

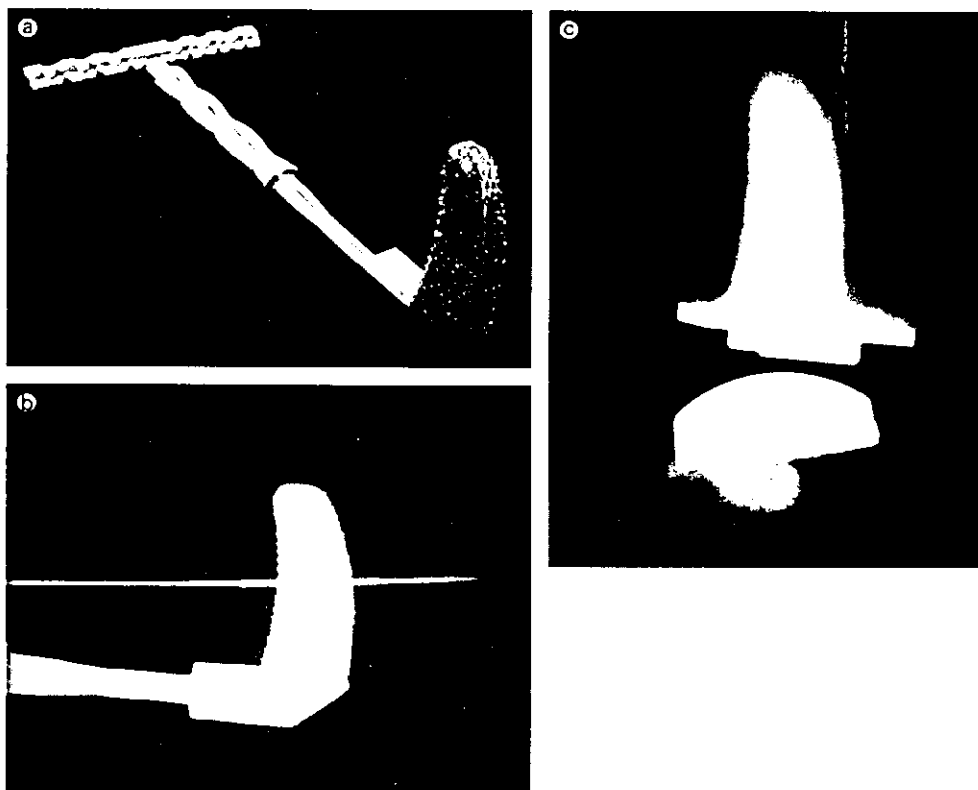
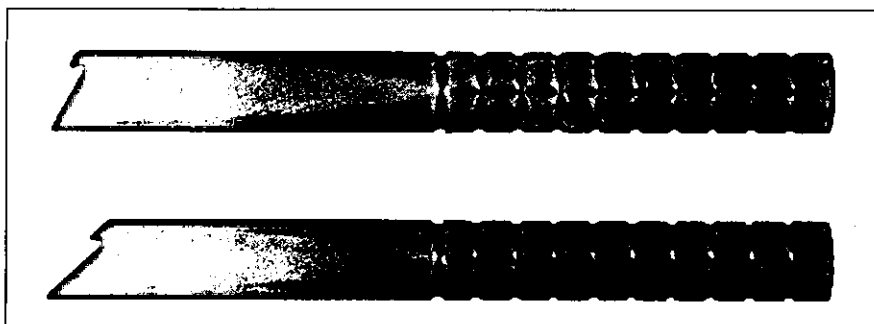


図4 専用の打ち込み器



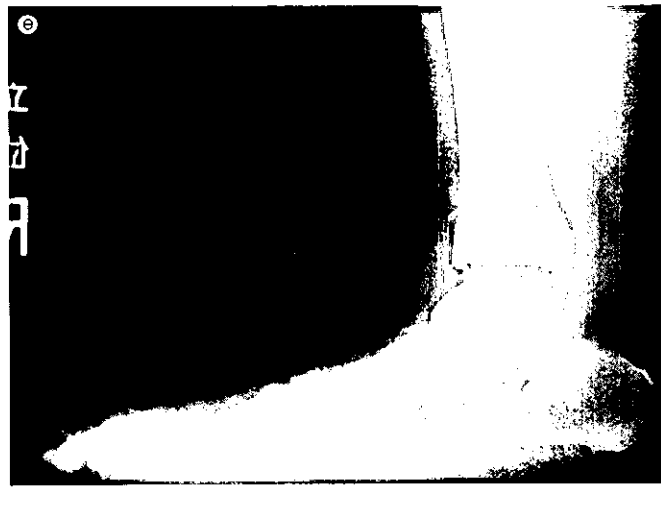
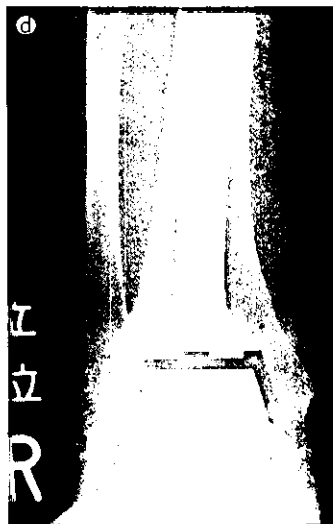
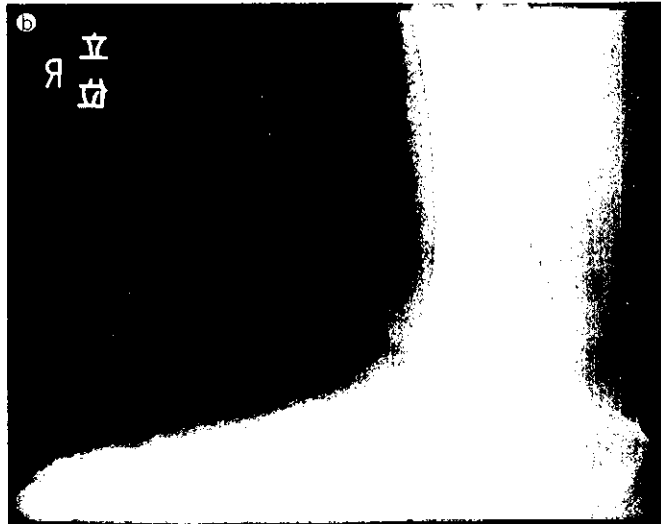
【症例1】(図5)

患者：71歳，RA女性。

経過：距骨下関節での外反変形を有していた例である(図5③～⑤)。人工足関節置換術と距骨下関節矯正位での三関節固定術を同時に行った。HAが挿入された下にTNK ankleの脛骨コンポーネントをセメント使用で設置している。立位距骨下関節撮影で，術前の踵骨の外反が矯正され，tibio-calcaneal angleはほぼ0°となっている。手術後3年のX線像である(図5④～⑥)。

図5 【症例1】

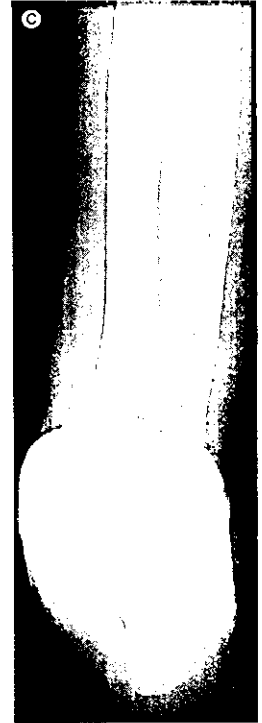
- ③：術前足関節立位正面像。
- ④：術前足立位側面像。
- ⑤：術前立位距骨下関節撮影。脛骨軸に対して，踵骨軸が外反している。
- ⑥：術後3年時の足関節立位正面像。脛骨コンポーネント近位にHAブロックが挿入されている。
- ⑦：術後足立位側面像。
- ⑧：術後立位距骨下関節撮影。踵骨の外反はない。



【症例2】(図6)

患者：62歳，RA女性。

経過：足関節と距骨下関節両方の外反変形に伴い，腓骨の骨折も生じていた例である(図6③～⑤)。矯正位への二関節固定術と前足部変形



矯正のための中足骨短縮骨切り術をまず行った。立位距骨下関節撮影像上踵骨の外反が矯正され、立位足側面像では縦アーチが改善し、足

立位正面像では前足部の変形が矯正されている(図6㉔~㉖)。骨癒合が得られたあとに、cemented FINE total ankle systemをHA充填併用で行っている(図6㉗, ㉘)。

図6 【症例2】

- ㉔：術前足関節立位正面像。
- ㉕：術前足立位側面像。
- ㉖：術前立位距骨下関節撮影。脛骨軸に対して、踵骨軸が外反している。
- ㉗：術前立位足正面像。
- ㉘：術後立位足関節正面像。
- ㉙：術後立位足側面像。
- ㉚：術後立位距骨下関節撮影。踵骨の外反は約10°弱に矯正されている。この外反は足関節での外反である。
- ㉛：術後立位足正面。
- ㉜：二期的に行ったHAブロック充填併用人工足関節置換術後の立位足関節正面像。
- ㉝：二期的に行ったHAブロック充填併用人工足関節置換術後の立位足関節側面像。

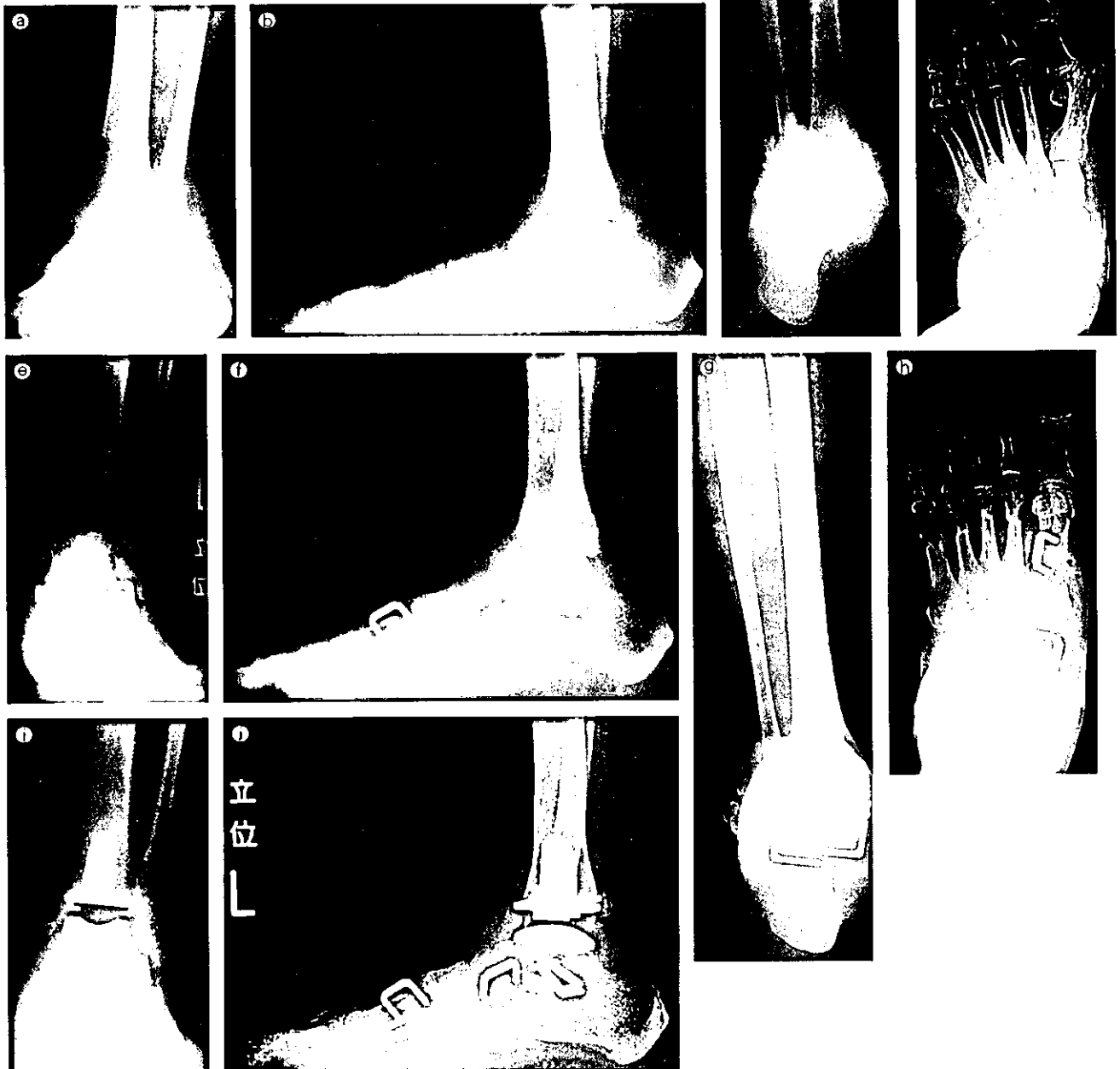
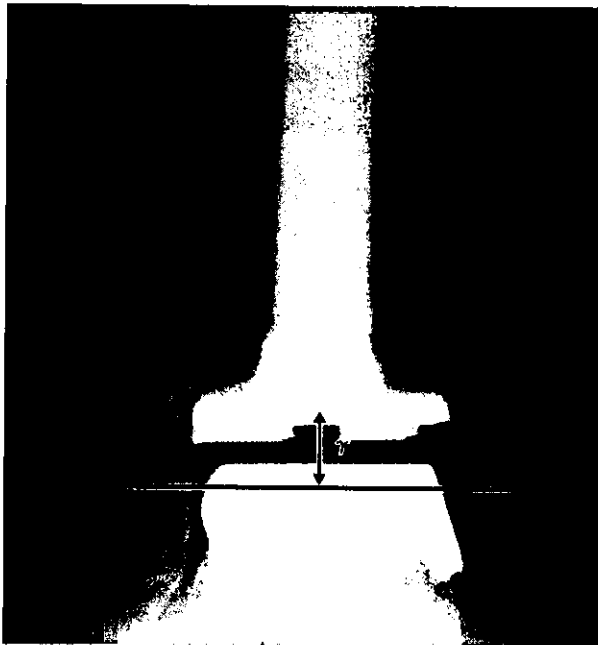


図7 術後X線像上の評価法

正面X線像で内果の最突出部を通る脛骨軸に垂直な線から脛骨コンポーネント中央までの距離 γ を計測した。



術後成績

脛骨にHAブロック充填併用で行った人工足関節置換術14例16足の平均23カ月の短期成績を調査した。術直後と最終フォロー時の、正面X線像で内果の最突出部を通る脛骨軸に垂直な線から脛骨コンポーネント中央までの距離(図7)を測定して比較した。その結果、脛骨コンポーネントの沈み込みを生じた例はなく、平均値の比較でも有意な差はみられず(表1)、HAが短期的には沈み込み防止に有用である可能性が確認された。しかし、HAと脛骨コンポーネント間のradiolucent zoneが術直後より38%にみられ、また1例で不十分なセメンティングによる脛骨コンポーネントの前方脱転を経験した。現在はHA表面にくぼみあるいは孔を作製してセメンティングするようにしている。

表1 術後成績

術後平均23カ月の経過中に脛骨コンポーネントの沈み込みはみられていない。

	手術直後	最終調査時	
γ 値	11.8mm	12.0mm	有意差なし

おわりに

関節リウマチ患者が足関節障害に伴うQOL低下をきたすことはまれではない。炎症性の症状に伴う機能障害を生物学的製剤により非常によくコントロールすることが可能となってきた現在、RA患者の機能維持や機能回復もより高いゴールをめざすことが可能となりつつある。足関節破壊による機能障害に対してより高い機能回復をめざして行う人工足関節置換術の成績も、欧米の報告では1980年代に比較すると非常に改善してきており、まさに今、よりよい人工足関節の手術方法をめざした継続的な関節外科医の努力が求められる時期である。

しかし関節リウマチでは、足局所に関しても多関節罹患であることや、強い骨脆弱性を有するなど、人工足関節置換術を行うには多くの不利な条件を有している。

人工足関節置換術の長期に安定した成績を得るためにはimplant designが最も重要であると考えられるが、関節リウマチ患者独特の不利な状況を十分理解したうえでの対応を行うことも同時に大切である。関節リウマチ患者の足関節障害の治療の際に、このような方針が参考になれば幸いである。

◆ 文 献 ◆

- 1) Knecht SI, Estin M, Callaghan JJ, et al : The Agility total ankle arthroplasty : Seven to sixteen-year follow-up. J Bone Joint Surg, 86-A (6) : 1161-1171, 2004.
- 2) Kofoed H : Scandinavian Total Ankle Replacement (STAR). Clin Orthop, 424 : 73-79, 2004.
- 3) Buechel FF Sr, Buechel FF Jr, Pappas MJ : Twenty-year evaluation of cementless mobile-

- bearing total ankle replacements. Clin Orthop, 424 : 19-26, 2004.
- 4) Nishikawa M, Tomita T, Fujii M, et al : Total ankle replacement in rheumatoid arthritis. Int Orthop, 28 : 123-126, 2004 .
 - 5) Takakura Y, Tanaka Y, Sugimoto K, et al : Ankle arthroplasty : A comparative study of cemented metal and uncemented ceramic prostheses. Clin Orthop, 252 : 209-216, 1990.
 - 6) Kofoed H : Comparison of cemented and cementless ankle arthroplasty. Current Status of Ankle Arthroplasty, Kofoed H , ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1998, p47-49.
 - 7) Saltzman CL : Total ankle arthroplasty : state of the art. Instr Course Lect, 48 : 263-268, 1999.
 - 8) Gill LH : Challenges in total ankle arthroplasty. Foot Ankle Int, 25 : 195-207, 2004.
 - 9) Forslind K, Keller C, Svensson B, et al : Reduced bone mineral density in early rheumatoid arthritis is associated with radiological joint damage at baseline and after 2 years in women. J Rheumatol, 30 : 2590-2596, 2003.
 - 10) Forsblad D, Elia H, Larsen A, Waltbrand E, et al : Radiographic joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis is strongly associated with generalised osteoporosis. Ann Rheum Dis, 62 : 617-623, 2003.
 - 11) Wood PL, Deakin S : Total ankle replacement : The results in 200 ankles. J Bone Joint Surg, 85-B (3) : 334-341, 2003.
 - 12) Haskell A, Mann RA : Ankle arthroplasty with preoperative coronal plane deformity : short-term results. Clin Orthop, 424 : 98-103, 2004.
 - 13) McIff TE, Alvine FG, Saltzman CL, ET AL : Intraoperative measurement of distraction for ligament tensioning in total ankle arthroplasty. Clin Orthop, 424 : 111-117, 2004.
 - 14) Anderson T, Montgomery F, Carlsson A : Uncemented STAR total ankle prostheses : Three to eight-year follow-up offifty-one consecutive ankles. J Bone Joint Surg , 85-A (7) : 1321-1329, 2003.
 - 15) Su EP, Kahn B, Figgie MP : Total ankle replacement in patients with rheumatoid arthritis. Clin Orthop, 424 : 32-38, 2004 .
 - 16) Vahvanen VA : Rheumatoid arthritis in the pantalar joints : A follow-up study of triple arthrodesis on 292 adult feet. Acta Orthop Scand, 107 (Suppl) : 1-157,1967.
 - 17) Belt EA, Kaarela K, Maenpaa H, et al : Relationship of ankle joint involvement with subtalar destruction in patients with rheumatoid arthritis : A 20-year follow-up study. Joint Bone Spine, 68 : 154-157, 2001.

Original articles

Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone

AKIHIDE NAMPEI¹, JUN HASHIMOTO¹, KENJI HAYASHIDA¹, HIDEKI TSUBOI¹, KENRIN SHI¹, ISAMU TSUJI⁴, HIDEAKI MIYASHITA⁴, TAKAO YAMADA⁴, NAOMICHI MATSUKAWA², MASAYUKI MATSUMOTO³, SHIGETO MORIMOTO³, TOSHIO OGIHARA², TAKAHIRO OCHI¹, and HIDEKI YOSHIKAWA¹

¹Department of Orthopaedics, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

²Department of Geriatric Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

³Department of Geriatric Medicine, Kanazawa Medical University, Kanazawa, Japan

⁴Pharmaceutical Research Division, Takeda Chemical Industries, Osaka, Japan

Abstract The matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) gene is highly expressed in tumors that cause oncogenic hypophosphatemic osteomalacia (OHO). MEPE is also known as one of the bone-tooth matrix proteins and is associated with bone mineralization. We developed a rabbit polyclonal antibody directed against recombinant human MEPE (rhMEPE) after cloning its cDNA from the cDNA library of a nasal tumor tissue causing OHO. Using this antibody, we analyzed the distribution of MEPE in human bones by immunohistochemistry. In bone specimens from normal subjects, MEPE was predominantly expressed by osteocytes and not by osteoblasts. In bone specimens from patients with osteomalacia, however, MEPE was focally expressed by deeply located osteocytes. We also compared the MEPE positivity of osteocytes in mineralized bone and non-mineralized osteoid obtained from patients with osteomalacia and osteoporosis. Among osteomalacia patients, MEPE positivity was seen in $87.5 \pm 8.6\%$ of the osteocytes from mineralized bone compared with $7.8 \pm 6.4\%$ of those from osteoid. Among osteoporosis patients, MEPE positivity was found in $95.3 \pm 0.5\%$ of the osteocytes from mineralized bone compared with $4.9 \pm 5.7\%$ of those from osteoid. MEPE was mainly expressed by osteocytes embedded in the matrix of mineralized bone from patients with osteomalacia or osteoporosis. Our data provide the first histological evidence that MEPE is predominantly expressed by osteocytes in human bone, with significant expression by osteocytes within mineralized bone.

Key words MEPE · osteocyte · immunohistochemistry · mineralization · human

Introduction

Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is a glycosylated protein that was originally cloned from the

tumors of patients with oncogenic hypophosphatemic osteomalacia (OHO) [1]. Because of its high expression in tumors that cause OHO, MEPE is regarded as a candidate phosphatonin, a putative humoral factor causing hypophosphatemic osteomalacia [2]. The MEPE gene has similarities with the genes of bone-tooth mineral matrix phosphoglycoproteins called SIBLINGs (small integrin-binding ligand with N-linked glycosylation) which contain RGD sequences that have been proposed as essential for integrin-receptor interactions [3]. This group of proteins includes osteopontin (OPN), dentin sialo phosphoprotein (DSPP), dentin matrix protein 1 (DMP1), and bone sialo protein (BSP).

MEPE also appears to be associated with the mineralization of bone. Petersen et al. [4] reported that osteoblast/osteocyte factor 45 (OF 45), which is identical to MEPE, was specifically expressed in bone tissue and that its expression was increased during matrix mineralization mediated by rat bone marrow-derived osteoblasts. They also showed that this protein was highly expressed by osteocytes embedded within the bone matrix. Argiro et al. [5] reported that murine MEPE mRNA was expressed by fully differentiated osteoblasts in vitro and that its expression was markedly increased during murine osteoblast-mediated matrix mineralization in normal and Hyp mice. Recently, Gowen et al. [6] reported that OF 45 knockout mice showed an increase in bone mass due to an increase in osteoblast numbers and activity. These findings suggest that MEPE may have a direct influence on bone metabolism, not only on renal phosphate handling but also on the mineralization of osteoid.

Although MEPE expression at the protein level has been demonstrated in mice [6] and rats [4], MEPE expression in human bone remains unproven. We developed a rabbit polyclonal antibody directed against recombinant human (rh)MEPE, which was obtained by the expression of MEPE cDNA in *Escherichia coli*. In

Offprint requests to: J. Hashimoto
(e-mail: junha@ort.med.osaka-u.ac.jp)

Received: May 23, 2003 / Accepted: September 12, 2003

this study, we demonstrated the expression of MEPE histologically in bone tissue from normal subjects, patients with several types of osteomalacia (OHO, Fanconi's syndrome, and vitamin D-deficient rickets), and patients with osteoporosis.

Subjects, materials, and methods

Preparation of polyclonal anti-MEPE antibody

We constructed a cDNA library from the nasal tumor of a patient with OHO [7], and cloned human MEPE cDNA using primers designed from the reported MEPE DNA sequence [1]. Then we obtained rhMEPE by expression in *E. coli* and developed a rabbit polyclonal antibody against rhMEPE. Briefly, a rabbit was immunized with rhMEPE (1mg) in Freund's complete adjuvant (Wako, Osaka, Japan) injected at multiple subcutaneous sites on the back and intramuscularly into both thighs. After 2, 4, 6, and 8 weeks, the rabbit was given a half dose (0.5mg) of rhMEPE in Freund's incomplete adjuvant (Wako). One week after the final booster injection, the rabbit was killed to obtain 70ml of antiserum. The anti-serum had a titer of around 10^6 – 10^7 when assayed by enzyme immunoassay (EIA), using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (Wako). The anti-serum (6ml) was diluted twofold with MAPSII binding buffer (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan), and applied to a column of Protein A-Sepharose FF (1.6×5.0 cm, 10ml; Amersham Biosciences, Tokyo, Japan). An IgG fraction was eluted from the column with MAPSII elution buffer (Bio-Rad Laboratories), followed by neutralization. After dialysis against phosphate-buffered saline (PBS), the IgG fraction was chromatographed on a column of MEPE-coupled NHS-Hitrap (1ml, containing 3mg of coupled rhMEPE; Amersham Biosciences). The specific antibody fraction was eluted with 0.5M NaCl–0.1M glycine-HCl (pH 2.7). After neutralization and dialysis against PBS, the affinity-purified anti-MEPE IgG fraction was stored at 4°C until use. Starting from 6ml of anti-serum, 16mg of rabbit polyclonal anti-MEPE antibody was obtained. To confirm the specificity of this anti-rhMEPE antibody, a Western blot was performed of a crude cell lysate of *E. coli* expressing rhMEPE, using anti-MEPE IgG and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Wako) as the primary and secondary antibodies, respectively. To confirm the detectability of rhMEPE expressed by a mammalian host, immunoblotting with the anti-MEPE antibody of the culture medium of rhMEPE-transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells was also performed.

Clinical profile of the subjects

Samples of normal bone tissue were obtained intraoperatively from two patients: intact bone was obtained from a site away from a traumatic fracture of the tibia in a healthy 18-year-old man (NC1), and intact fibula was obtained from a 2-year-old boy who underwent below-knee amputation for fibrosarcoma of the tibia (NC2). Informed consent was obtained in both cases.

Iliac bone samples affected by osteomalacia (OM1-4; $n = 4$) and osteoporosis (OP1-4; $n = 4$) were obtained from patients who were diagnosed on the basis of bone mineral density, laboratory data, and iliac bone biopsy findings. Of the patients with osteomalacia, two had OHO (OM1, 2), one had Fanconi's syndrome (OM3), and one had vitamin D-deficient rickets (OM4). The clinical characteristics of all patients are summarized in Table 1.

Preparation of specimens

Paraffin sections

Decalcified paraffin sections were prepared for immunohistochemistry to detect MEPE. Bone samples from NC1, NC2, and OM1 were fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4) at 4°C for 24 h, decalcified in 20% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (pH 7.4), dehydrated through an ethanol series, and finally embedded in paraffin. The specimens were then cut into serial sections (5- μ m-thick) on a microtome, mounted on slides, and prepared for immunohistochemistry. One of the sections was stained with hematoxylin and eosin to assess the histological features of each bone specimen.

Methylmethacrylate (MMA) sections

Sections were also prepared from undecalcified tissue to distinguish between the calcified and noncalcified areas. Iliac bone samples from the four osteomalacia patients (OM1-4) and the four osteoporosis patients (OP1-4) were fixed in 70% ethanol, prestained with Villanueva bone stain for 7 days, dehydrated through an ethanol and acetone series, and embedded in MMA, as described [8]. To distinguish noncalcified osteoid as Villanueva-positive areas, dry sections (5- μ m-thick) were cut, using a Jung Supercut 2065 Microtome (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) equipped with a tungsten carbide knife. For immunohistochemistry, serial wet sections (5- μ m-thick) were cut with the same machine while applying 30% ethanol to the block and knife. These sections were carefully stretched using 70% ethanol, mounted on gelatin-coated slides, using a mixture of carbolic acid crystals and glycerol, flattened with a rubber roller, pressed with a slide press, and dried on a hot plate at 40°C.

Table 1. Characteristics of patients

Patient	Age (years)	Sex	Diagnosis	Bone histomorphometric data				Serum data				
				OS/BS (%)	O.Th (μm)	MAR ($\mu\text{m}/\text{day}$)	Calcium (8.4–10.0 mg/dl)	Phosphorous (2.9–4.8 mg/dl)	ALP (69–135 IU/l)	1,25(OH) ₂ vitD (20–60 pg/ml)	25(OH)vitD (10–55 pg/ml)	
NC1	18	M	Tibial fracture	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NC2	2	M	Amputation	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
OM1	53	F	Oncogenic osteomalacia	83.6	42.8	CND	8.5	1.8	356	12.5	NA	NA
OM2	58	F	Oncogenic osteomalacia	80.1	38.0	CND	8.0	1.6	472	18.0	29	24
OM3	35	F	Fanconi's syndrome	90.2	50.0	CND	8.2	2.4	947	9.2	24	16
OM4	53	F	Vitamin D deficiency	97.3	117.5	CND	7.1	2.4	264	23.5	16	6
OP1	53	M	Osteoporosis	16.7	10.2	0.78	8.3	4.6	118	61.3	21	25
OP2	54	F	Osteoporosis	20.2	9.4	NM	8.9	4.6	101	61.7	21	25
OP3	65	M	Osteoporosis	12.1	13.1	0.66	9.8	3.6	147	67.4	25	NA
OP4	45	F	Osteoporosis	20.2	9.4	0.61	9.4	4.9	99	66.0	NA	NA

OS/BS, osteoid surface/bone surface; O.Th, osteoid thickness; MAR, mineral apposition rate; CND, calculation not done; NM, no measurement; NA, not available; NC, normal control; OM, osteomalacia; OP, osteoporosis

Immunohistochemical staining

Paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized, and MMA-embedded sections were deacrylated twice in acetone, for 8 min each time, and then decalcified in 20% EDTA (pH 7.4) for 1 h. After being rinsed with water for 10 min, the sections were incubated in 0.3% H₂O₂ in 90% methanol for 30 min at room temperature to block endogenous peroxidase activity, and then the sections were incubated in 10% normal goat serum to minimize nonspecific background staining. Next, the rabbit polyclonal antibody directed against human MEPE was applied to each section, followed by incubation overnight at 4°C. An isotype-matched IgG was used for control staining. Detection was then performed using the streptavidin biotin-peroxidase complex technique (Histofine SAB-PO Kit; Nichirei, Tokyo, Japan) before the sections were developed in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) and counterstained with hematoxylin.

Analysis of MEPE expression by osteocytes

MEPE expression by osteocytes was analyzed in mineralized bone and non-mineralized osteoid from all bone samples. Sections immunostained for MEPE, as well as Villanueva-stained MMA-embedded sections, were examined under a light microscope (ECLIPSE E1000; Nikon, Tokyo, Japan). Five randomly chosen visual fields within the trabecular bone area were examined at 200 \times magnification. The number of osteocytes was counted in the mineralized and non-mineralized areas of the Villanueva-stained section. Then the number of MEPE-positive cells was counted in the immunostained serial section in the areas that corresponded to those characterized as mineralized or non-mineralized by Villanueva staining. Subsequently, the ratio of MEPE-positive osteocytes to the total number of osteocytes in the mineralized bone and the non-mineralized osteoid was calculated. Values for results are presented as means \pm SDs. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U-test, and statistical significance was established at the $P < 0.05$ level.

Results

Western blotting of rhMEPE using the anti-MEPE polyclonal antibody

The specificity of the anti-MEPE antibody was examined by the Western blotting of both a crude lysate of *E. coli* expressing rhMEPE and of the culture medium of CHO cells transfected with a MEPE expression plasmid (Fig. 1). When the *E. coli* lysate was tested, rhMEPE

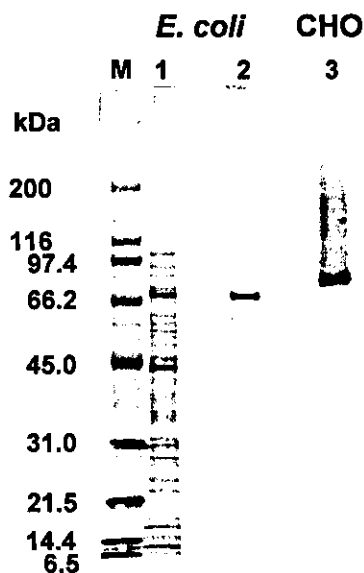


Fig. 1. Western blot analysis of recombinant human matrix extracellular phosphoglycoprotein (rhMEPE) expressed in *Escherichia coli* and Chinese hamster ovary (CHO) cells. A cell lysate prepared from *E. coli* expressing rhMEPE was stained with Coomassie Blue (lane M, molecular weight markers; lane 1, the *E. coli* lysate) and the lysate was also immunostained (lane 2) with anti-MEPE antibody. Culture medium from CHO cells transiently expressing rhMEPE was also analyzed by Western blotting (lane 3)

immunoreactivity was visualized as a single band at 67 kDa (lane 2; Fig. 1), demonstrating high specificity of the anti-MEPE antibody. When CHO cells were tested, a secreted protein of 70 kDa was selectively detected (lane 3; Fig. 1), confirming the specificity of the antibody. A broad, faint band was also observed at 100–150 kDa, indicating the secretion of heavily glycosylated forms of MEPE by the CHO transfectants.

Uniform MEPE expression in normal bone

MEPE expression was examined in normal bone tissue. Figure 2 shows MEPE expression in adult bone (NC1, tibial fracture), and Fig. 3 shows its expression in bone from a child (NC2, intact fibula). MEPE was strongly expressed by osteocytes in both cortical bone and trabecular bone (Fig. 2B, F), but it was not expressed by osteoblasts (Fig. 3C). Strong MEPE expression was observed in dendritic processes, as well as in the pericellular bone matrix of these bone-embedded osteocytes (Fig. 2D, H).

Focal MEPE expression in bone from osteomalacia patients

Bone specimens from osteomalacia patients were also examined. Figure 4 shows the bone specimen from a patient with OHO (OM1). MEPE expression was predominant in the osteocytes of cortical bone, although focal expression was also seen in trabecular bone (Fig. 4B); expression was more abundant in the central area

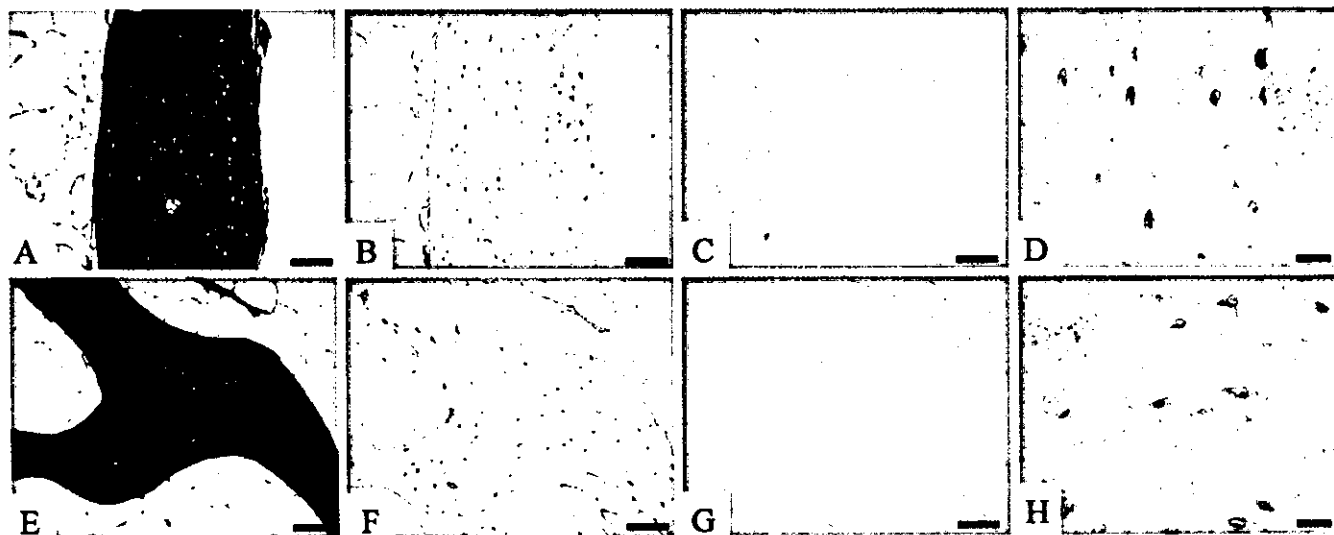


Fig. 2. Immunohistochemical detection of MEPE in normal human bone tissue (subject, NC1); A–D cortical bone; E–H trabecular bone from the tibia. A, E Staining with H&E. B, D, F, H Immunolocalization of MEPE; C, G negative control, and D, H higher magnifications of B and F, respectively. B, F

MEPE is uniformly expressed by osteocytes embedded in the matrix of both cortical and trabecular bone. D, H The dendritic processes and pericellular bone matrix of osteocytes are also positive. Bar, 100 μm in A–C and E–G; bar, 20 μm in D and H

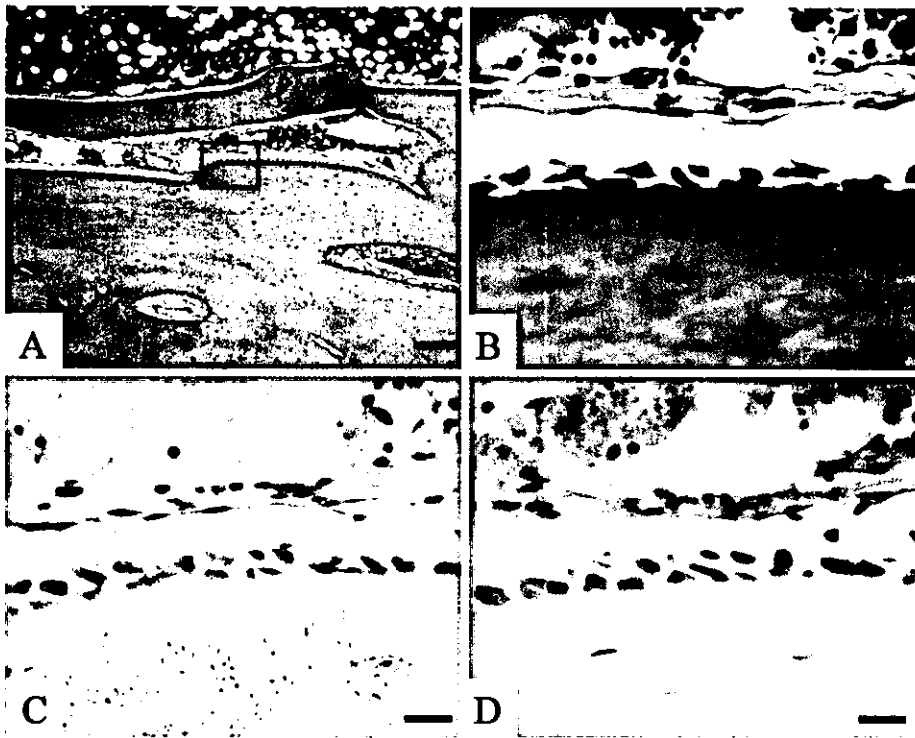


Fig. 3. Immunohistochemical detection of MEPE in immature bone (subject, NC2); **A, B** H&E staining; **C** anti-MEPE antibody; **D** negative control. **B** Higher magnification of the boxed area in **A**. **C** Osteoblasts are not stained, but osteocytes, pericellular bone matrix, and dendritic processes are stained, as was the case in mature bone (Fig. 2). *Bar*, 150 μ m in **A**; *bar*, 20 μ m in **B-D**

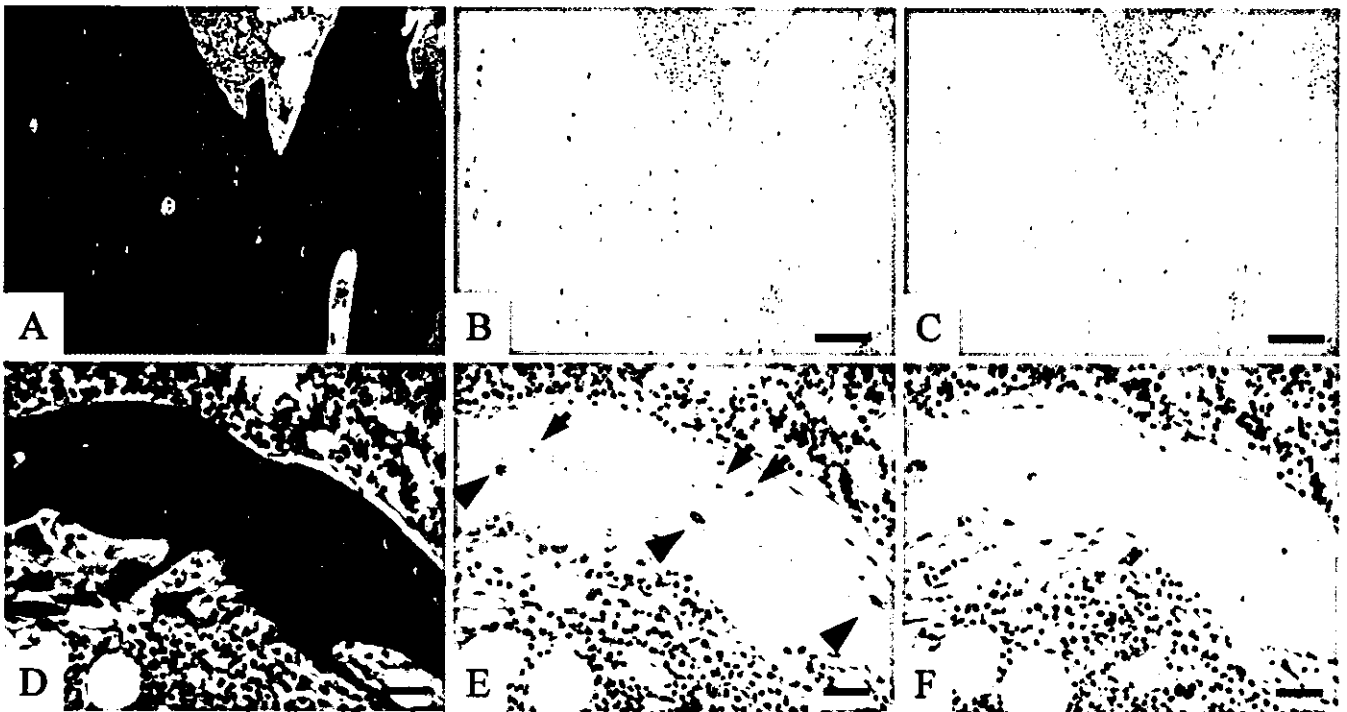


Fig. 4. Immunolocalization of MEPE in bone tissue from a patient with osteomalacia (OM1); **A, D** H&E; **B, E** anti-MEPE antibody; **C, F** negative control. **B** MEPE is expressed heterogeneously by osteocytes, and there is more positive staining in

cortical bone (*CB*) than in trabecular bone (*TB*). **E** In trabecular bone, MEPE-positive cells are more abundant in the central area (*arrowheads*) than at the boundary zone (*arrows*). *Bar*, 100 μ m in **A-C**; *bar*, 40 μ m in **D-F**

of bone than at the boundary zone, which could be regarded as osteoid (Fig. 4E).

Abundant MEPE expression in mineralized bone in patients with osteomalacia and osteoporosis

To assess the expression of MEPE in osteoid, we performed Villanueva staining and MEPE immunostaining of bone specimens from osteomalacia patients, using serial sections. In the specimen from osteomalacia patient 1 (OM1), Villanueva staining revealed prominent osteoid at the boundaries of trabecular bone (Fig. 5A, B), and MEPE expression was mainly observed in the Villanueva-unstained mineralized bone area (Fig. 5C). In the other three osteomalacia patients, similar findings were obtained. In order to make a comparison with the pattern of MEPE localization in patients with osteoporosis, iliac bone specimens from the four osteoporosis patients were examined by the same method (Fig. 6). MEPE-positive osteocytes were mainly observed in the mineralized bone area (Fig. 6C), as was the case in the osteomalacia patients. All four osteoporosis patients showed a similar pattern of MEPE expression.

The MEPE-positive osteocyte ratio was calculated separately for mineralized bone and non-mineralized osteoid. In mineralized bone from the osteomalacia and osteoporosis patients, MEPE positivity was seen in $87.5 \pm 8.6\%$ and $95.3 \pm 0.5\%$ of the osteocytes, respectively (Table 2). In contrast, in the osteocytes in the non-mineralized osteoid of osteomalacia patients, MEPE positivity was shown in $7.8 \pm 6.4\%$, while in the osteocytes in osteoid from osteoporosis patients MEPE positivity was shown in $4.9 \pm 5.7\%$ (Table 2). These findings show that there is significantly increased MEPE expression in the osteocytes within mineralized bone ($*P < 0.05$) in both osteomalacia and osteoporosis patients, and that there are no significant differences in MEPE expression between these two metabolic bone diseases.

Discussion

In the present study, we developed a rabbit polyclonal antibody that targeted rhMEPE expressed in *E. coli* and then used it to prepare an affinity-purified anti-MEPE antibody. Specific detection of crude rhMEPE from *E. coli* and CHO cells by Western blotting with the anti-MEPE antibody (Fig. 1) demonstrated its high specificity for MEPE. The difference in the molecular weight of MEPE obtained from *E. coli* and CHO transformants suggested that glycosylation of this molecule occurred in CHO cells.

Using this antibody, we investigated the distribution of MEPE in normal human bone by immunohistochem-

istry and recognized its predominant expression in bone-embedded osteocytes, a finding compatible with the results already obtained in mice [6] and rats [4]. Furthermore, MEPE expression was observed in the dendritic processes and pericellular bone matrix of the osteocytes, but not in osteoblasts.

Previous *in vitro* studies have suggested a correlation between MEPE expression and bone mineralization. Petersen et al. [4] showed that MEPE mRNA was expressed by fully differentiated osteoblasts and that its expression increased markedly during osteoblast-mediated mineralization of the bone matrix. Argiro et al. [5] reported a correlation between MEPE expression and bone mineralization after the addition of glycerophosphate to osteoblast culture medium. We found abundant MEPE expression by osteocytes in mineralized bone matrix, but more limited expression in non-mineralized osteoid (Figs. 5, 6), using a previously reported combination of histomorphometry and immunohistochemistry [8]. In normal bone, the non-mineralized osteoid area is too small to allow the detection of osteocytes in the non-mineralized matrix by standard histological examination. This may account for the fact that previous immunohistochemical studies of normal rodent bone did not detect osteocytes without MEPE expression. Our results, combined with previous *in vitro* data, suggest that MEPE is strongly expressed during the mineralization of bone as osteoblasts undergo maturation into osteocytes. However, it is not clear whether MEPE expression precedes the onset of mineralization of the bone matrix or whether it is preceded by mineralization.

Osteocytes are easily defined by their location and typical stellate morphology, and they have a relatively small number of organelles, which are necessary for the production and secretion of bone matrix [9,10]. Several non-collagenous matrix proteins have been found in and around osteoblasts and osteocytes, including OPN [11–16], osteocalcin [17–19], BSP [20–22], biglycan [23–25], osteonectin [26], and DMP1 [27–29]. These proteins are thought to play various roles in promoting bone mineralization [30] and in facilitating the attachment of osteocytes to the bone matrix [31], and genetic studies with knockout animal models have supported such hypotheses [32–36]. Some of these proteins belong to the SIBLING family, sharing many characteristic motifs and structural features (such as the RGD motif and ASARM motif encoded on chromosome 4q), and are considered to have similar functions [3]. Because most of these proteins are expressed by both osteocytes and osteoblasts, few osteocyte-specific markers have been established, apart from DMP1 [29] and several monoclonal antibodies directed against avian osteocytes (mAb OB7.3 [37], mAb OB37.11 [38], and mAb SB5 [39]). Recently, mAb OB7.3 was shown to target