

ステロイド投与家兎における骨病変の病理組織学的検討 (第3報)

～ステロイド継続投与による影響～

加畑 多文、堀井 健志、柳下 信一 (金沢大学整形外科)
松本 忠美、西野 暢、二見 智子 (金沢医科大学整形外科)

種々の期間にわたりステロイドを投与した家兎骨壊死モデルを作成し、骨壊死発生率や病理組織像、壊死範囲などを検討した。ステロイドを継続的に投与しても、初回投与後2週以降では骨壊死発生率は増加せず、新たな骨壊死や壊死範囲が拡大した形跡は認められなかった。このことより、骨壊死は初回ステロイド投与後1、2週で生じ、その後はステロイドを継続的に投与しても新たな骨壊死が生じる可能性は低いと考えた。血液生化学的検索では、骨壊死が生じたと考えられる時期に一致して脂質系と凝固系の急激な変動が認められた。

はじめに

パルス療法などのステロイド大量投与は、骨壊死発生の重要なrisk factorであるが、ステロイド大量投与後、どのくらいの期間を経て骨頭内の虚血が起こり壊死が発生するのかを知ることは、骨壊死発生のメカニズムを解明しかつ予防する上で非常に重要である。またパルス療法などの後に、継続的に投与されるステロイドが骨壊死発生にどのような影響を与えるのか、例えば骨壊死発生率を増加させるのか、壊死範囲を拡大させるのか、繰り返し骨壊死を引き起こすのか、など点については現在のところはっきりしてしない。

そこで今回は、種々の期間にわたりステロイドを投与した家兎モデルを作成して、その病理組織像や骨壊死発生率、壊死範囲などを調査・比較し、ステロイドを継続投与した場合のそれらに対する影響を検討した。

対象と方法

体重約3.5kgの成熟日本白色家兎を用いて、ステロイド投与家兎モデルを作成した。家兎モデルは、メチルプレドニゾン 4mg/kgを筋注し、3日後、1週後に屠殺したモデルをそれぞれ3日群、1週群、週1回筋注し、2週間、4週間、8週間投与したモデルをそれぞれ2週群、4週群、8週群とし(図1)、それぞれ15羽づつ作成し、コントロール群(10羽)

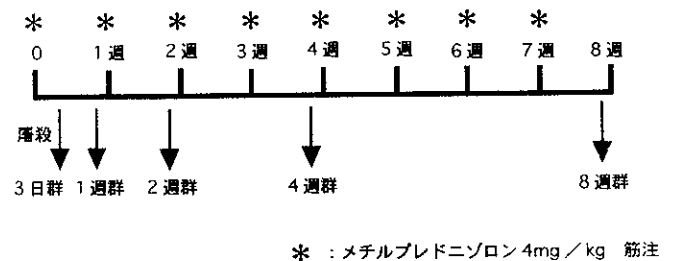


図1 各群におけるメチルプレドニゾンの投与方法

を加え計6群で比較検討した。これらを屠殺後、骨壊死が比較的再現性よく得られる大腿骨近位部のH-E染色標本を作成し、骨壊死の発生頻度および発生部位、標本内における壊死部のfocus数とその病理組織像、大腿骨近位1/3に占める壊死部の面積を比較検討した。壊死部の面積は画像解析ソフトを用いてMacintoshコンピュータ上で計測した。また、処置前および初回ステロイド筋注後1日、3日、1週間、2週間、4週間、8週間の時点で耳動脈より採血を行い、脂質系や凝固系の変動を検討した。なお、骨壊死の定義はYamamotoら¹⁾に従い、骨髄の造血細胞壊死および脂肪細胞壊死を伴い、骨梁の骨細胞がempty lacunaeまたはpycnotic nuclei of osteocyteを呈するものとした。

結果

骨壊死の発生率：

表 1 骨壊死の発生頻度および壊死部のfocus数と大腿骨近位 1/3 における壊死部の面積

Group	骨壊死発生率	骨壊死部 focus 数	骨壊死部面積 (mm ²)
3 日群	0/15 羽 (0%)	0	0
1 週群	7/15 羽 (47%)	1.38 ± 0.51	5.58 ± 1.79
2 週群	9/15 羽 (60%)	1.27 ± 0.47	3.80 ± 2.64
4 週群	11/15 羽 (73%)	1.46 ± 0.66	5.11 ± 5.04
8 週群	10/15 羽 (66%)	1.23 ± 0.44	5.12 ± 2.53

骨壊死はコントロール群、3 日群には認められなかったが、1 週群で15羽中7羽 (47%)、2 週群で15羽中10羽 (66%)、4 週群15羽中11羽 (73%)、8 週群15羽中10羽 (66%) に認められた。1 週群から 8 週群までの 4 群で壊死発生率に統計学的な有意差はなかったが、壊死発生率はステロイド投与後 1 ~ 2 週で増加しその後プラトーになる傾向がみられた (表 1)。

骨壊死発生部位：

ほとんどの骨壊死は大腿骨近位内側の転子間から転子下にかけて発生しており、壊死部の分布状態も

各群間で変化はなかった。

壊死部のfocus数：

一大腿骨あたりの壊死部のfocus数も各群間で有意差は認めなかった (表 1)。

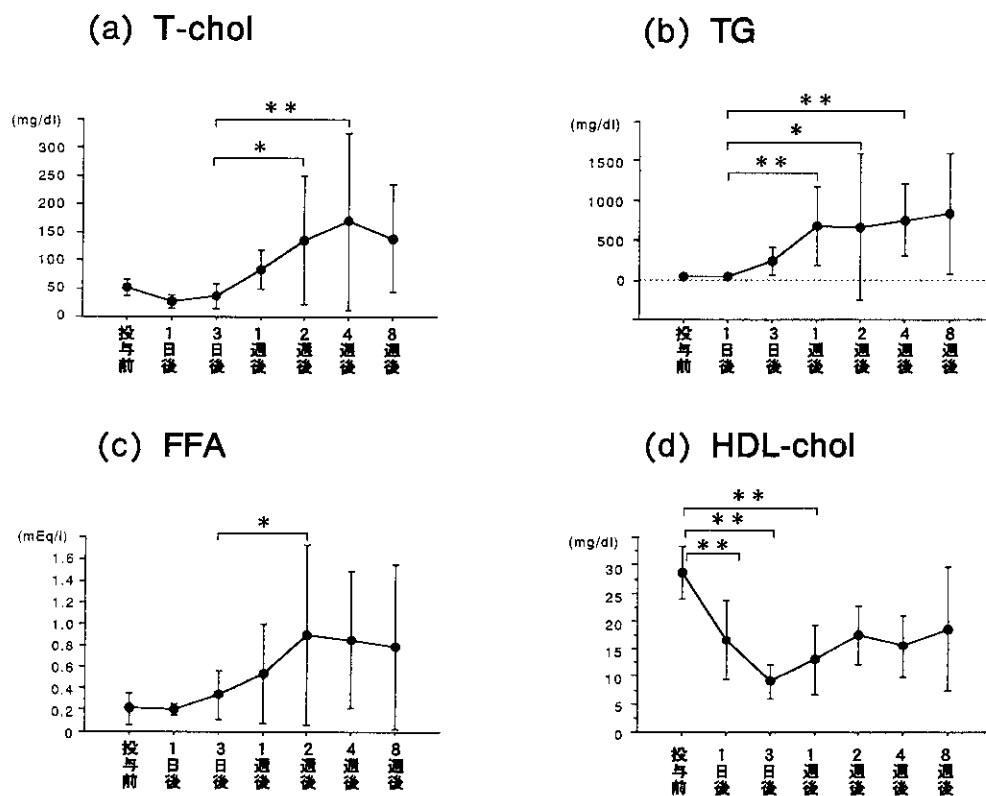
壊死部面積：

大腿骨近位 1/3 に占める壊死部の面積も壊死の認められた各群間で有意差はなかった (表 1)。

病理組織像：

コントロール群および 3 日群には特に著変を認めなかった。

1 週群では、壊死部は正常骨髄と比べ若干好酸性が上昇しており、容易に検出できた。骨梁はempty lacunaeまたはpycnotic nuclei of osteocyteを呈しており、その周囲の骨髄造血細胞は壊死に陥った細胞と変性した細胞とが混在した状態であった。脂肪細胞は壊死に陥っているもののその細胞構築は保たれていた。壊死部周囲にはしばしば出血がみられ、正常



* < 0.05
** < 0.01

図 2 脂質系検査値の経時的な変動

(a) Total cholesterol (b) Triglyceride (c) Free fatty acid (d) HDL cholesterol

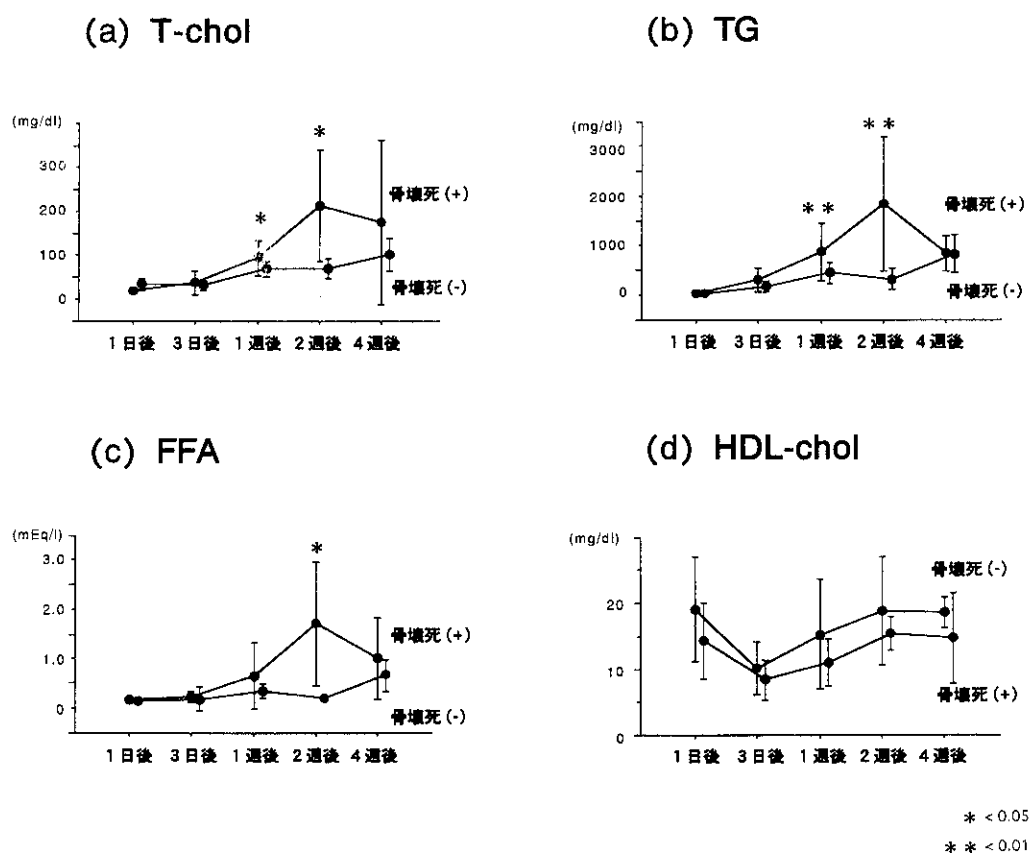


図3 骨壊死発生例と非発生例における脂質系検査値の経時的な変動
 (a) Total cholesterol (b) Triglyceride (c) Free fatty acid (d) HDL cholesterol

骨髄との境界には軽度の浮腫がみられた。

2週群では、1週群に比べ壊死部の好酸性は増強し、壊死骨梁周囲の骨髄造血細胞はほぼ完全に壊死に陥っていた。また、1週群においてみられた変性細胞はほとんど認められなくなり、核の破砕物がめだつようになっていた。壊死した脂肪細胞はその構築を失いcollapseに陥っていた。壊死部周囲の充血や浮腫は1週群よりも強くなっていた。

4週群では、壊死部の好酸性はさらに増強し、壊死した造血細胞は完全にcytolysis、karyolysisを呈して細胞影が不明瞭となっていた。脂肪細胞の変形は2週群に比べさらに著しくなっていた。また壊死部周囲には新生血管やfibroblast、組織球の出現を認めるものもあったが、明らかな添加骨形成は認められなかった。

8週群では、壊死部の好酸性は低下して淡明化するようになり、壊死部周囲にfibroblastや組織球の出現が明らかとなっていた。また一部の標本には、幼弱な添加骨形成が認められた。

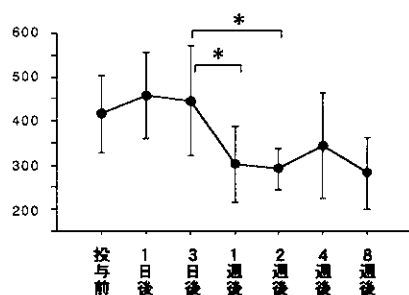
これらの組織像は各群で特徴的であり、4週群や

8週群に1週群の組織像が認められることはなかった。また両側に壊死がある場合や、一つの標本内に2つ以上の壊死focusがある例においても、それらの病理所見が時間的に大きく異なることはなかった。

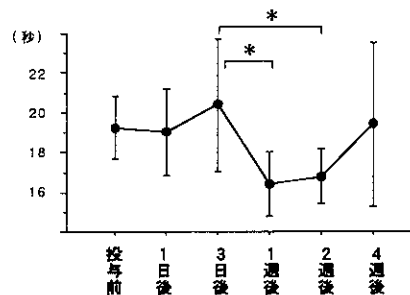
血液生化学的所見：

ほぼ全例においてT-cho、TG、FFAなどの脂質系の著明な上昇が、初回ステロイド投与後1週から2週にかけて認められ、その後高値を維持したままプラトーとなっていた。一方で、HDLは初回ステロイド投与後3日～1週で著明に減少していた(図2)。これを骨壊死発生例と非発生例に分けて比較すると、1週から2週にかけて有意差がみられた(図3)。一方、凝固系の変化としては、同時期に一時的な血小板数の減少傾向、APTTの短縮、AT-III値の低下がみられた(図4)。FDP-DDはステロイド投与前はほとんどが基準値以下であったが、投与後は比較的早期から計測され増加していた。しかし凝固系のデータは骨壊死発生例と非発生例で有意差は認められなかった。

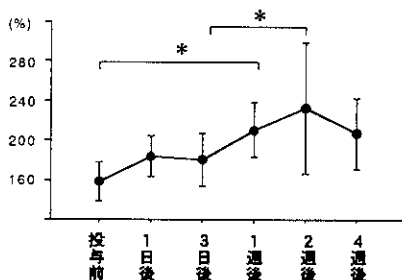
(a) 血小板数



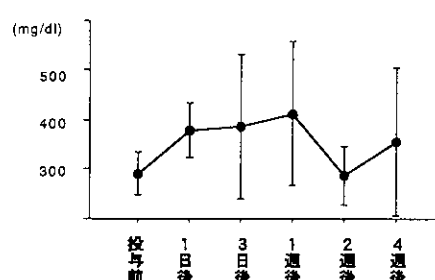
(b) APTT



(c) AT-III



(d) Fibrinogen



* < 0.05

図4 凝固系検査値の経時的な変動

(a) 血小板数 (b) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (c) Anti-thrombin III (d) Fibrinogen

考察

従来大腿骨頭壊死症においては、摘出標本でしばしば修復組織に部分的な壊死巣が見られることから、繰り返し虚血エピソードが生じることにより壊死が完成するのではないかと考えられていた^{2,3)}。しかし最近の病理組織学的研究やMRIでの研究では、大腿骨頭壊死を引き起こす虚血エピソードは繰り返し生じるものではなくほとんどの場合1回ではないかと推察されており^{4,5)}。さらにMRIによる経時的な調査では、生じた壊死範囲は縮小することはあっても拡大はしなかったと報告されている^{5,6,7)}。また、その虚血エピソードが起こる時期についてはステロイド投与後2～6週以内の極めて早い時期であると考えられている⁵⁾。今回の病理組織学的な結果では、ステロイドを継続的に投与しても2週以降骨壊死発生率は増加せずプラトーとなっており、各群の病理所見が時間的に大きく異なることはなく、新たな骨壊死が発生した形跡も認められなかった。また壊死範囲が拡大した形跡も認められなかった。これらの

ことから本モデルの骨壊死のonsetは、初回ステロイド投与後1週前後で1回のみ生じ、その後ステロイドを継続投与したにもかかわらず新たな虚血エピソードは生じなかったものと推測できる。この結果は、近年のMRIや病理組織学的研究の結果と同様のものであり、やはりステロイド性大腿骨頭壊死症はステロイド投与後早期に突然起こり、かつ繰り返すことのない骨頭の虚血エピソードにより生じるのが病態ではないかと考えた。

また血液生化学的所見では、脂質系の急激な変化が骨壊死発生時期に一致して認められ、同時期に骨壊死発生例と非発生例で有意差がみられていたことから、従来より骨壊死のリスクファクターであるといわれていた高脂血症がなんらかのトリガーとなっている可能性が強く示唆された。それに伴った凝固系の変動も認められたが、骨壊死発生との関係は明らかにすることはできなかった。おそらく、ステロイド投与に伴う高脂血症と凝固亢進状態が複雑な因果関係をなして骨壊死発生の一因を形成していると予想できるが、詳細に関しては今後の検討を要する。

まとめ

・種々の期間にわたりステロイドを投与した家兎骨壊死モデルを作成して、その骨壊死発生率や病理組織像、壊死範囲などを検討した。

・ステロイドを継続的に投与しても、初回投与後 2 週以降では骨壊死発生率増加せず、新たな骨壊死が発生した形跡や壊死範囲が拡大した形跡は認められなかった。

・本モデルの骨壊死は、初回ステロイド投与後 1 週前後で生じ、その後はステロイドを継続的に投与しても新たな骨壊死は生じなかったと考えた。

・血液生化学的検索では、骨壊死が生じたと考えられる時期に一致して脂質系の急激な変動が認められた。

参考文献

- 1) Yamamoto T, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: Corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis & Rheumatism* 40: 2055-64, 1997.
- 2) Inoue A, et al. A histological study of idiopathic avascular necrosis of the head of the femur. *J Bone Joint Surg.* 61-B: 138-43, 1979.
- 3) Saito S, et al. Early arteriopathy and postulated pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head. The intracapsular arterioles. *Clin Orthop.* 277: 98-110, 1992.
- 4) Yamamoto T, et al. The prevalence and clinicopathological appearance of extension of osteonecrosis in the femoral head. *J Bone Joint Surg.* 81-B: 328-32, 1999.
- 5) Kubo T, et al. Initial MRI findings of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in renal allograft recipients. *Magn Reson Imaging.* 15: 1017-23, 1997.
- 6) Shimizu K, et al. Prediction of collapse with magnetic resonance imaging of avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg.* 76-A: 215-23, 1994.
- 7) 飯田 哲ら. ステロイド性骨壊死の prospective study. *Hip joint* 21: 525-30, 1995.

LPS家兎骨壊死モデルに及ぼすNOの影響

— 早期病変について —

山下 彰久、入佐 隆彦、中川 和憲、居石 克夫
(九州大学大学院医学系研究科病理病態学分野)

【目的】 LPS誘発家兎骨壊死モデルを用いL-NAME及びSNP投与の早期影響を検討。【方法】 通常飲料水、L-NAME、SNP (各10羽) 投与 2 週後にLPSを投与。LPS投与 5 時間後および24時間後に屠殺し骨壊死の有無および血液学的検索を施行。【結果】 1. LPS 投与 5 時間後で LPS+L-NAME群に骨髄壊死が存在。2. 24時間後の壊死発生は、L-NAME で亢進、SNPで抑制の傾向。3. 骨壊死群では血清脂質が有意に高値。【まとめ】 1. LPS 誘発骨壊死はLPS 投与24時間以内にも発生。2. NO の抑制及びドナーは LPS 誘発骨壊死の発生に重要。

はじめに

前回我々は、Lipopolysaccharide (LPS) 家兎骨壊死モデルに及ぼすNitric Oxide (NO) の影響について報告し、LPS投与4週後における骨壊死発生を非選択的NOS阻害剤であるNG-nitro-L-arginine-Methyl Ester (L-NAME) 投与は促進し、sodium nitropurusside (SNP) 投与は抑制することを明らかにした¹⁾。

今回の目的は、L-NAME及びSNP投与の早期影響を検討し、骨壊死発生時期を病理学的に同定することである。

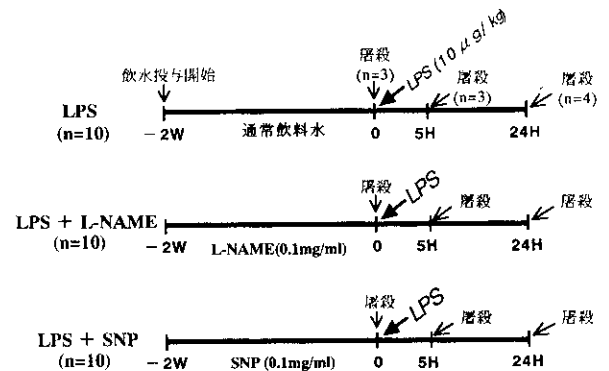


図1 実験群と実験系

材料と方法

実験群および実験系

成熟日本雄白色家兎(体重3.0~4.0kg) 30羽を用い、図1に示す3群に分類した。1群は通常飲料水、2群はL-NAME (0.1mg/ml) 飲料水、3群はSNP (0.1mg/ml) 飲料水をそれぞれ投与した。3群すべてにおいて飲水投与開始後2週目にLPS (10 μ g/kg) を静脈内注射し、LPS投与 5 時間後にそれぞれ 3 羽、24時間後にそれぞれ 4 羽を屠殺した。また、コントロールとしてLPS未投与の各処置群3羽ずつを屠殺した。

骨壊死の判定

両大腿骨および両上腕骨のHE標本を用いた。今回は早期骨壊死の病理組織像として、骨細胞のempty lacunaeやpyknosisなどの変化は必須とせず、核破砕産物を伴う造血細胞壊死、脂肪細胞壊死の有

無を示標にした。

血液生化学検査

採血は飲水投与開始直前 (-2W)、LPS投与直前、LPS投与 5 時間後 (5H)、LPS投与24時間後 (24H) に施行した。

結果

病理組織学的所見

LPS+L-NAME群の LPS投与24時間後の骨髄組織においては、造血細胞は壊死に陥り、脱核、あるいは核破砕産物の出現を認め、脂肪細胞も枠組みだけが残存する明らかな骨髄壊死を認めた(図2)。LPS投与 5 時間後においては、骨髄内の高度の鬱血あるいは出血性部位の一部に、造血細胞は胞体が腫大し、核の染色性が低下、また核は断片化あるいは核破砕

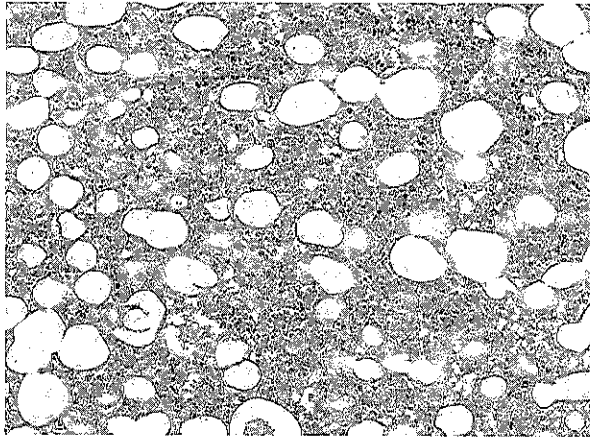


図2 LPS+L-NAME群のLPS投与24時間後における骨髓組織

造血細胞は完全に脱核を認め、脂肪細胞も壊死に陥り碎組みだけが残存。

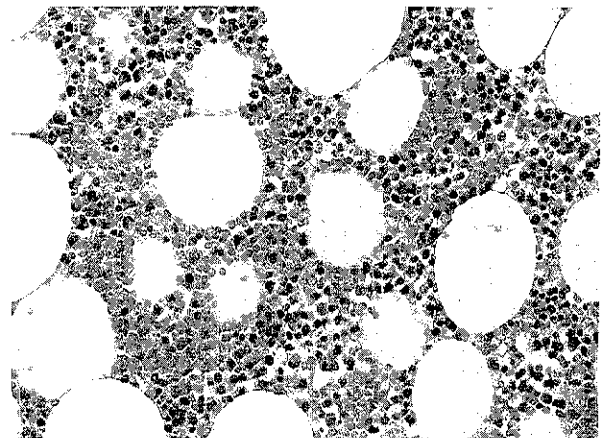


図3 LPS+L-NAME群のLPS投与5時間後における骨髓組織

鬱血が強く造血細胞は腫大し、核は濃縮、一部に核破碎産物の出現を認める。

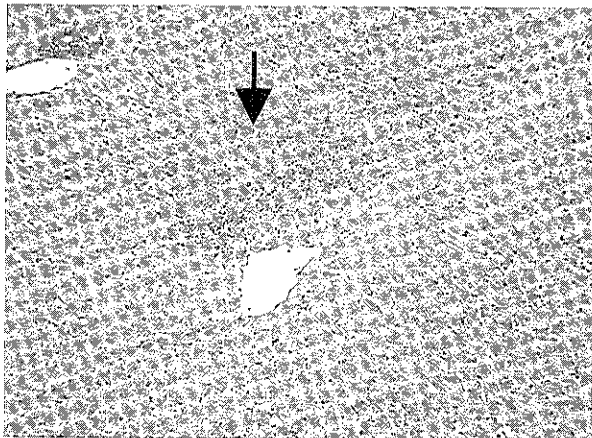
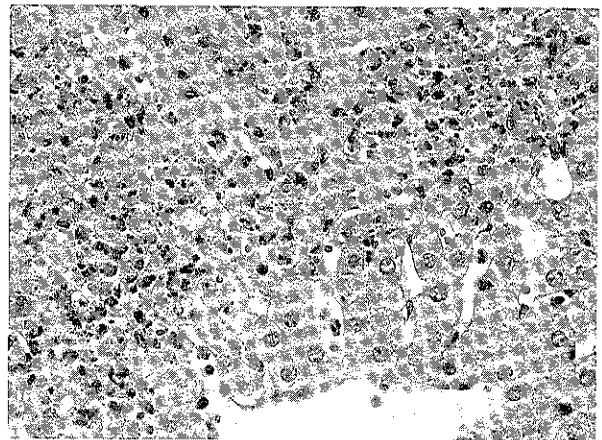


図4 LPS+L-NAME群のLPS投与24時間後における肝臓

肝細胞は腫大し、小壊死巣が散在している。



産物を伴う細胞の崩壊過程と考えられる病変を散在性に認めた(図3)。この病変は骨壊死発生における極めて早期の組織像であると考えられた。なお、この組織像は3群に共通する所見であった。他の臓器では、3群の一部の肝臓において、肝細胞の腫大、散在する小壊死巣を認めた(図4)。

骨壊死発生部位および発生率

LPS投与5時間後における大腿骨、上腕骨の骨壊死発生率を表に示す(表1, 表2)。壊死はLPS+L-NAME群の上記骨近位部にのみ認められた。次に、LPS投与24時間後における壊死発生率を表に示す(表3, 表4)。大腿骨近位部及び上腕骨近位部での壊死発生は、LPS+L-NAME群で亢進、LPS+SNP群で

抑制の傾向が認められた。LPS単独群及びLPS+L-NAME群では遠位部にも壊死を認めたが統計学的な差は認めなかった。

血液生化学検査

はじめにLPS投与24時間後における検査結果について3群間で比較検討した。血清総コレステロール、血清中性脂質はLPS+SNP群で低い傾向にあった(図5)。血清GOT、血清GPTはLPS+L-NAME群で高い傾向にあった(図6)。血小板数はLPS+L-NAME群で低値、APTTはLPS+L-NAME群で亢進、LPS+SNP群で遅延の傾向にあった(図7)。またLPS投与24時間後における検査結果について骨壊死の有無で比較検討した。血清中性脂質及び遊離脂肪酸は壊死

表1 LSP投与5時間後における骨壊死発生率
(大腿骨)

群	調査骨数	壊死骨数	
		近位部	遠位部
LPS	6	0	0
LPS + L-NAME	6	2 (33.3%)	0
LPS + SNP	6	0	0

表2 LSP投与5時間後における骨壊死発生率
(上腕骨)

群	調査骨数	壊死骨数	
		近位部	遠位部
LPS	6	0	0
LPS + L-NAME	6	1 (16.7%)	0
LPS + SNP	6	0	0

表3 LSP投与24時間後における骨壊死発生率
(大腿骨)

群	調査骨数	壊死骨数	
		近位部	遠位部
LPS	8	2 (25%)	3 (37.5%)
LPS + L-NAME	8	3 (37.5%)	3 (37.5%)
LPS + SNP	8	0	0

表4 LSP投与24時間後における骨壊死発生率
(上腕骨)

群	調査骨数	壊死骨数	
		近位部	遠位部
LPS	8	2 (25%)	1 (12.5%)
LPS + L-NAME	8	3 (37.5%)	2 (25%)
LPS + SNP	8	1 (12.5%)	0

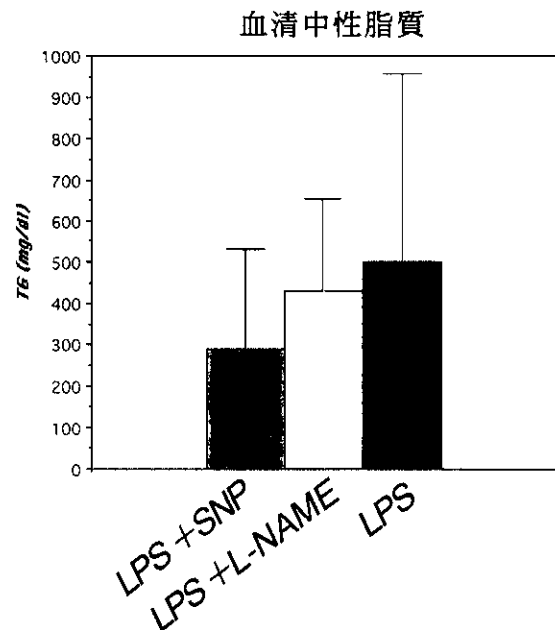
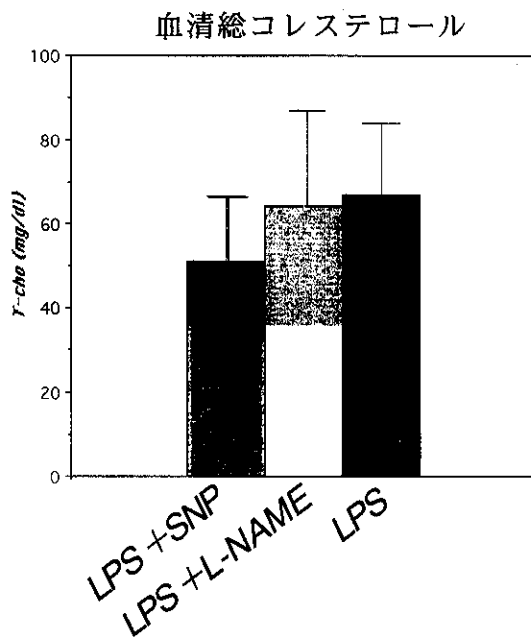


図5 LSP投与24時間後における3群間での比較(1)

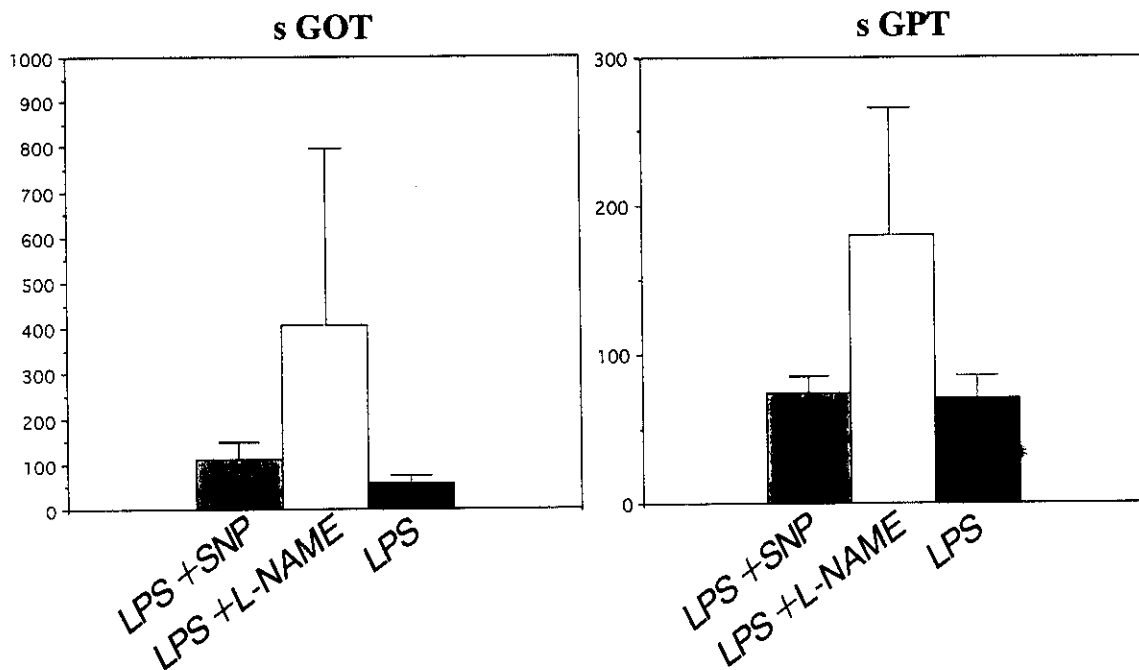


図6 LPS投与24時間後における3群間での比較(2)

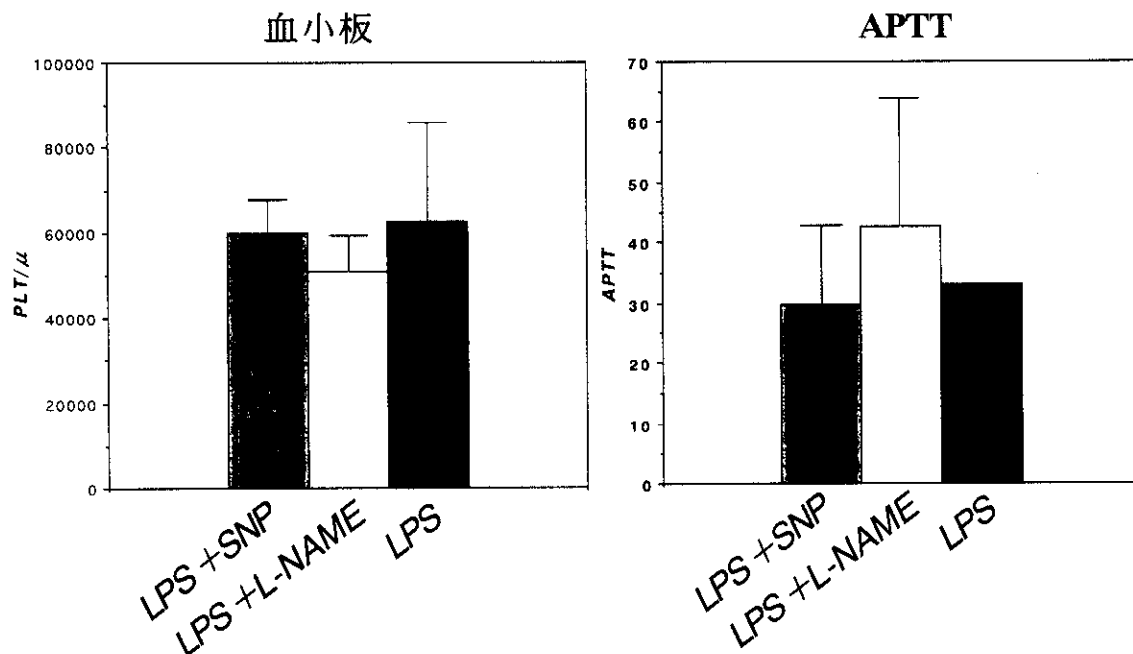


図7 LPS投与24時間後における3群間での比較(3)

群で有意に高値であった(図8)。血清GOT、血清GPTは壊死群で高い傾向にあった(図9)。血小板数はほとんど差を認めず、APTTは壊死群で亢進傾向にあった(図10)。次に、NO産生の指標として血清NOx値の変動について検索した。LPS投与前におい

て有意差を認めず、LPS投与により3群とも大きく増加したものの統計学的傾向は認めなかった(図11)。

結果のまとめ

1. LPS投与5時間後において、LPS+L-NAME群の一部に骨髄壊死が認められた。
2. 24時間後における

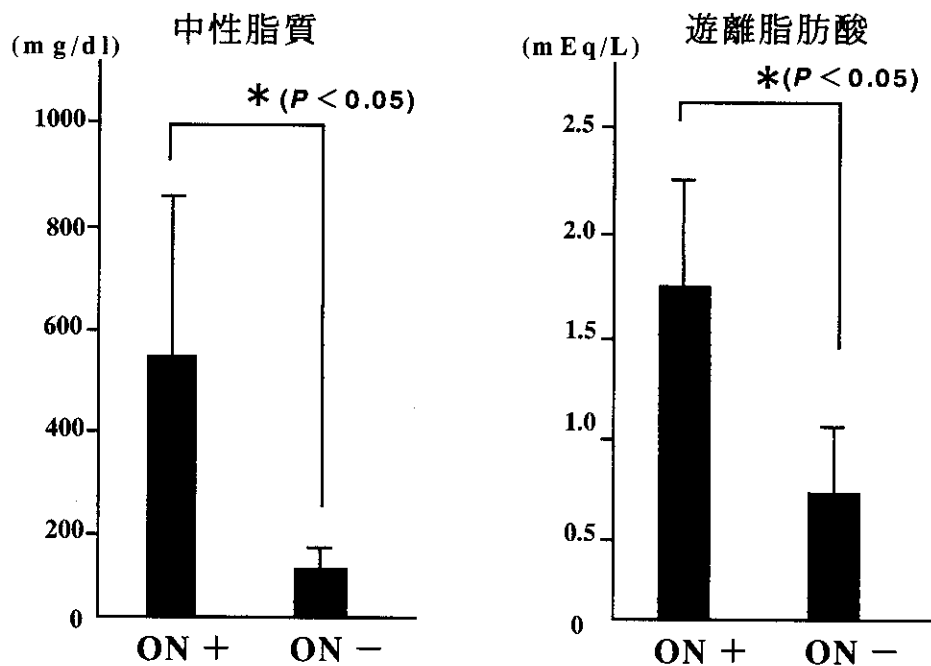


図8 LPS投与24時間後における壊死の有無での比較 (1)

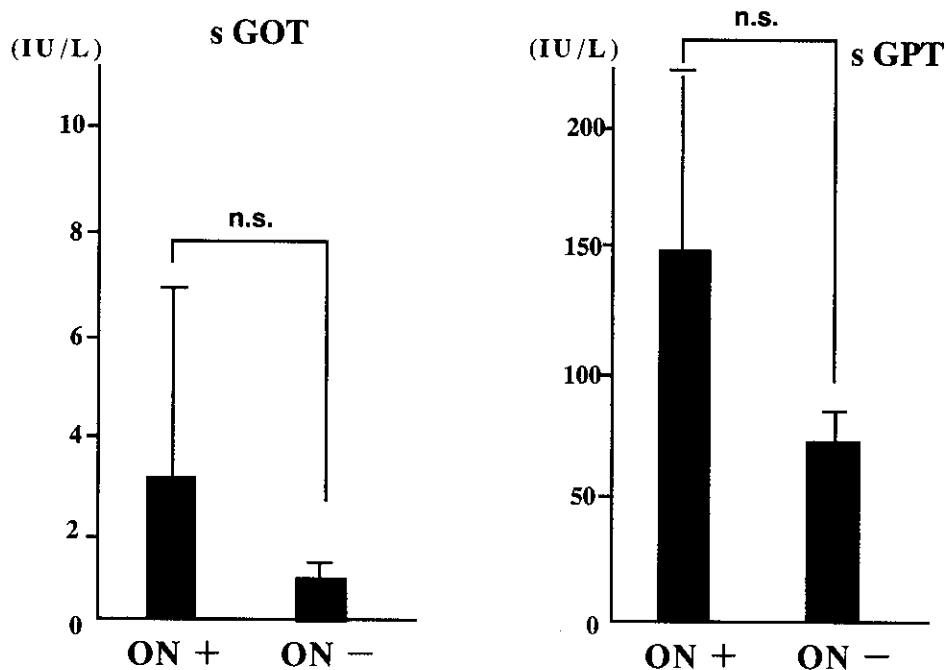


図9 LPS投与24時間後における壊死の有無での比較 (2)

LPS誘発骨壊死発生は、L-NAME投与で亢進、SNP投与で抑制される傾向にあった。3. LPS投与24時間後のLPS+L-NAME群の一部の肝臓においては、肝細胞が腫大し小壊死巣が散在していた。4. 3群間における血小板、トランスアミナーゼ、血清脂質に有意差を認めなかった。5. 骨壊死群では、非骨壊

死群に比し血清脂質 (TG, FFA) が有意に高値であった。

考 察

前回のLPS単独骨壊死モデルにおけるLPS投与5時間後の骨髄組織は、著明な浮腫、鬱血あるいは出血

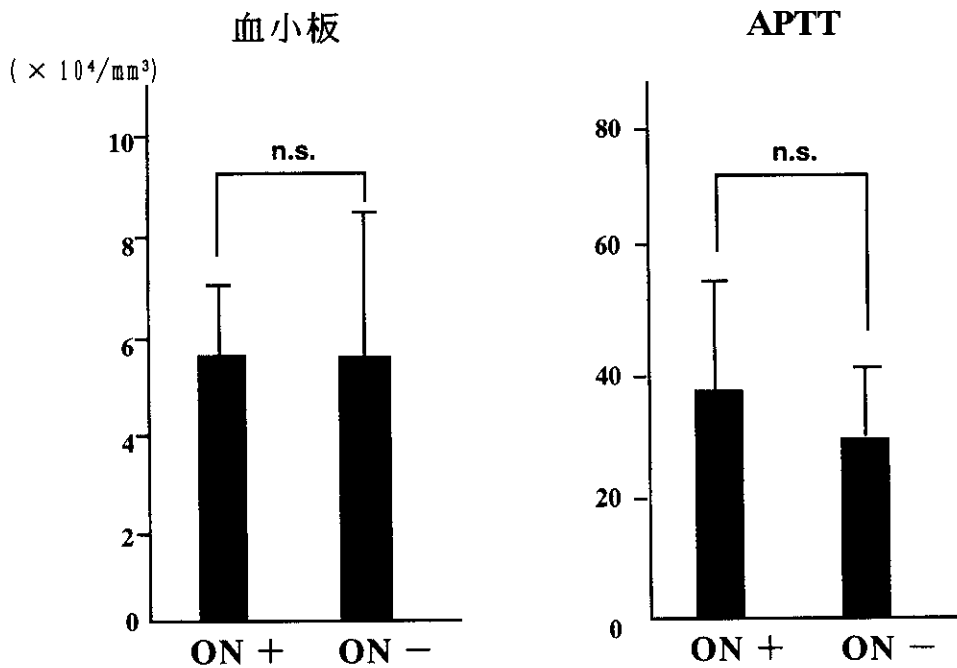


図10 LPS 投与24時間後における壊死の有無での比較 (3)

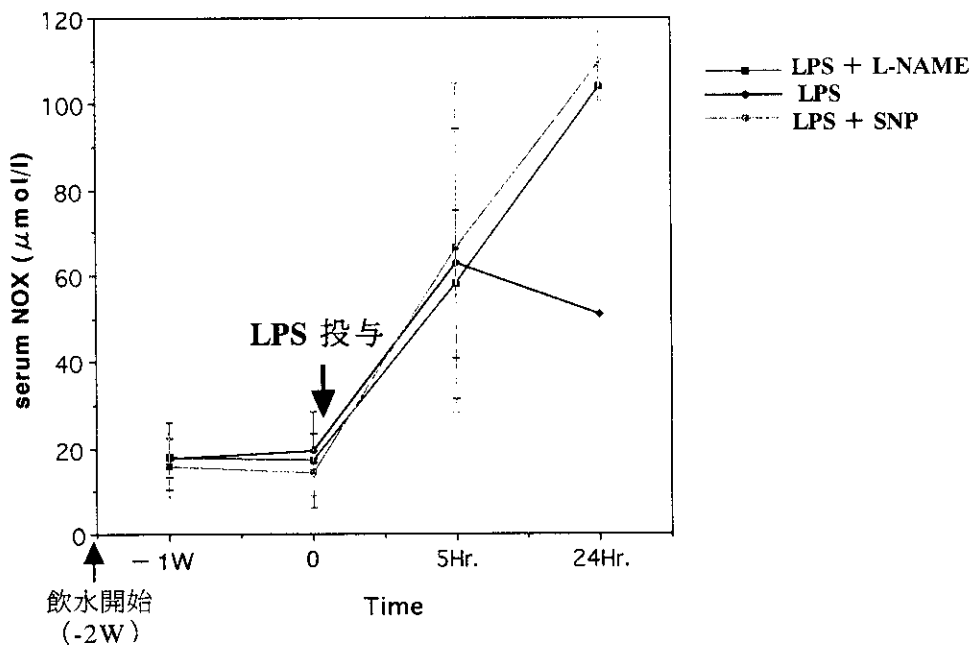
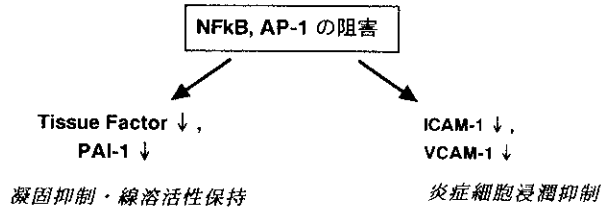


図11 血清NOx 値の推移

を起こしていたが、明らかな骨梁壊死および骨髄壊死は認めなかった。今回の実験では LPS 投与 5 時間後の大腿骨及び上腕骨において、骨髄浮腫、造血細胞の腫大、核の染色性低下、断片化あるいは濃縮、核破碎産物を散在性に認めた。この細胞崩壊過程と考えられる病変の発生は、L-NAME 投与で亢進、

SNP 投与で抑制され LPS 投与 4 週後における 3 群の骨壊死発生率と同様の傾向を示し、また、発生部位も類似していたことより、骨壊死発生における極めて早期の組織像であると考えられた。これより、壊死は LPS 投与 5 時間後より確認可能であることが示唆された。今回は明らかな骨梁壊死を認めなかったが、

(1) 凝固系に与える影響



(2) 血管内皮障害

過剰の酸化ストレス状態
peroxynitrite の形成 → ラジカル型 NO↑

図12 LPS 誘発骨壊死と NO の関係

その原因として範囲が非常に小さく、その大部分は骨梁に接しない場所に発生したという局在的要因と、LPS投与 5 時間後及び24時間後という早期の組織所見であったため、骨細胞の変化が未だ明瞭になっていないという時間的要因の二点が推察された。また、明らかな血栓形成を認めなかったものの、一部分にフィブリン様の硝子物を認め、また血液学的検査において骨壊死群ではAPTTが亢進傾向を示したため、壊死発生の背景には過剰な凝固系の亢進が存在したとも考えられた。

我々はLPS誘発骨壊死の発生に、凝固系の亢進及び血管内皮障害が関与しているとの仮説のもとに、重要なvasoactive mediatorとして知られるNOに注目してきた。NOは血管壁に対して透過性、白血球凝集及び遊走、平滑筋トーンス及び増殖、酸化ストレス、アポトーシス、血小板凝集を抑制する(表5)。そこでLPS誘発骨壊死とNOの関係について検討した(図12)。NOが凝固系に与える影響は、転写因子であるNFkBおよびAPIの活性を阻害²³⁾⁴⁾し、Tissue FactorやPAI-1の発現が抑制されることにより凝固抑制・線溶活性保持に作用することが示唆されている⁵⁾。我々のLPS投与DICモデルラットを用いた実験では、Tissue Factor, PAI-1の発現をL-NAME投与は亢進、SNP投与は抑制していた。また同様にNOはNFkBおよびAPIの活性阻害を介し、接着分子であるICAM-1, VCAM-1が抑制され、その結果炎症細胞浸潤が抑制され抗血栓性に作用することが報告されている⁶⁾。次に血管内皮障害について、前述の通りNOは血管壁での酸化ストレス抑制に作用するが、一方で過剰な酸化ストレスの状況下においては、活性酸素と反応し、peroxynitriteを形成する⁷⁾。高濃度のperoxynitriteは細胞タンパクをニトロ化し、また水酸化ラジカル

表5 NOの血管壁に及ぼす抑制作用

1. 透過性
2. 白血球凝集・遊走
3. 平滑筋トーンス・増殖
4. 酸化ストレス
5. アポトーシス
6. 血小板凝集

を形成することにより血管内皮障害を引き起こすと考えられている⁸⁾。以上より、LPS誘発骨壊死の発生には凝固系の亢進及び血管内皮障害が関与しており、L-NAME投与によってNO産生が抑制され壊死発生を促進、またNOドナーであるSNP投与により壊死発生が抑制されたものと考えられた。しかし、LPS投与によって過剰発現が予想されるInducible NOS (iNOS)によるNO増加が起こるにも関わらず、L-NAME投与は壊死発生を促進し、SNP投与は壊死発生を抑制したのであるだろうか。その要因として、LPS投与前のendothelial constitutive NOS (ecNOS)の発現及び活性の違い、あるいはecNOS由来のNO産生量の差ならびにNOドナーの直接的影響が重要であると推察された。

今後は、NOの促進及び抑制により変化すると考えられるTissue Factor, PAI-1, ICAM-1, VCAM-1等について骨髄局所での発現及び活性を検索し凝固系の影響を検討すると同時に、転写因子NFkB及びAPIを分子レベルで検索することによるメカニズムの解明が必要であると考えられる。

結語

1. LPS 誘発骨壊死は、LPS 投与24時間以内にも発生することが確認された。
2. NO の抑制及びNO ドナーは LPS 誘発骨壊死の発生に重要である。
3. 今後、骨髄内血管壁における NO 機能の解明が骨壊死発生機序の検討に意義あることと考えられた。

参考文献

- 1) 居石克夫ほか：LPS誘発家兎骨壊死に及ぼすNOの影響。厚生省特定疾患 骨・関節系疾患調査

研究班 平成10年度研究報告書 1999 : 195—198.

- 2) Andrew D.T. et al. Alteration of NF-kappa B p50 DNA binding kinetics by S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Comm.* 1997; 3:703-706.
- 3) James R.M. et al. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nuc Acids Res.* 1996; 12: 2236-2242.
- 4) Dragana N., Arne H., and Giannis S. Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochem Biophys Res Comm.* 1998; 1: 109-112.
- 5) Bouchie et al. Natriuretic Factor and Nitric Oxide Suppress Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 1771—1779.
- 6) Martin S., Hai-Bing Peng, and James K.L. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I kappa B α . *J Biol Chem.* 1997; 49: 30969-30974.
- 7) Hogg N. et al. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J.* 1992;281:419—424.
- 8) Beckman J.S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:1620—1624.

グルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害：活性酸素の関与

赤池 雅史、井内 貴彦（徳島大学医学部、第一内科）
三ツ井貴夫、東 博之（徳島大学医学部、第一内科）
松本 俊夫（徳島大学医学部、第一内科）

グルココルチコイド過剰症では前腕の内皮依存性血管弛緩反応が有意に低下し、抗酸化剤である Vitamin C 投与はこれを改善した。ヒト臍帯静脈内皮細胞培養系での検討では、dexamethasone 添加により活性酸素産生が増加し、この増加は各種の活性酸素産生系阻害薬のうち CCCP により最も抑制された。グルココルチコイド過剰はミトコンドリア電子伝達系での活性酸素産生の亢進を介して管内皮機能を障害する結果、大腿骨頭壊死を引き起こす可能性がある。

はじめに

血管内皮細胞は一酸化窒素 (NO) をはじめとする各種の vasoactive mediator を産生・放出することにより、血管平滑筋の弛緩作用および増殖抑制作用、抗血栓作用などの血管内皮機能を発揮し、末梢循環を維持している¹⁾。一方、同様に血管内皮細胞から産生される活性酸素種の superoxide (O_2^-) は NO を消去し、血管内皮機能を障害するとされている¹⁾。グルココルチコイド過剰による大腿骨頭壊死の発症においては、大腿骨頭の血行終末部における微小循環系の破綻が最も注目されており²⁾、このような循環障害の成立には血管内皮機能障害が重要な役割を果たしている可能性がある。しかしながら、グルココルチコイド過剰が血管内皮機能におよぼす影響についてはこれまで十分に検討されていない。本研究の目的はグルココルチコイド過剰が血管内皮細胞での活性酸素の産生を亢進し、血管内皮機能障害をきたすことを明らかにすることである。

対象と方法

自己免疫疾患などによりグルココルチコイド (30mg/day 以上) を服用中の患者 19 例、クッシング症候群患者 2 例、健常対照 12 例を対象とし、strain gauge plethysmography を用いて前腕における内皮依存性および内皮非依存性血管弛緩反応を解析し血管内皮機能を評価した。このうち、内皮依存性血管弛緩反応は、5 分間の完全阻血を解除した直後の前腕

血流量の増加反応 (反応性充血) により評価し、内皮非依存性血管弛緩反応は、NO 供与薬であるニトログリセリンを 300 μ g 舌下投与した際の前腕血流量の増加反応により評価した。前腕血流量の増加反応は安静時の前腕血流量を 100% とした時の増加率 (% increase) により表記した。また、同一症例において、グルココルチコイド投与前後 (プレドニゾロン 30mg/day 以上を 2-4 週間投与前後) で比較するとともに、抗酸化薬であるビタミン C の 2g 単回経口投与による影響について解析を行った。

次に培養細胞を用いた検討では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) (Cell systems, USA) の培養系に dexamethasone (DEX) 10^{-7} M を 24 時間添加し、細胞内 oxidant 測定用蛍光プローブである 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) (Molecular Probes, USA) を用いて、蛍光強度を蛍光プレートリーダーにより測定することにより細胞内 H_2O_2 の産生を評価した。また、抗酸化作用を有する Vitamin C 10 μ g/ml および Vitamin E 10 μ g/ml や、superoxide dismutase (SOD) 100U/ml を DEX とともに培養系に添加し、活性酸素産生への影響を検討した。さらに、スピントラップ剤として 5,5'-dime-thyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) を用いた電子スピン共鳴法により、hydroxyl radical (OH^\cdot) の検出も行った。一方、各種の活性酸素産生系の阻害薬を培養系に添加し細胞内 H_2O_2 産生への影響を調べることにより、DEX による活性酸素の産生源につ

いても検討した。活性酸素産生系の阻害については、ミトコンドリア電子伝達系は carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hyazone (CCCP) 0.5 μ M、xanthine oxidase 系はoxypurinol 100 μ M、NADPHオキシダーゼ系はquinacrine 30 μ M、prostaglandine生成系はindomethacine 100 μ M、NO合成系はN-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 1mMをそれぞれ培養系へ添加することにより行った。

結果

内皮依存性血管弛緩反応はグルココルチコイド過剰症において健常対照に比較し有意に低下していたが(グルココルチコイド過剰症 $36 \pm 34\%$ vs 健常対照 $173 \pm 65\%$, mean \pm SD, $p < 0.01$)、内皮非依存性血管弛緩反応には両群に差はなかった(グルココルチコイド過剰症 $25 \pm 26\%$ vs 健常対照 $23 \pm 21\%$, N.S.) (図1)。また、同一症例の検討では内皮依存性血管弛緩反応はグルココルチコイド投与後に全例で低下していたが(投与前 $116 \pm 40\%$ vs 投与後 $27 \pm 26\%$, $p < 0.01$)、内皮非依存性血管弛緩反応はグルココルチコイド投与前後で差はなかった(投与前 $28 \pm 23\%$ vs 投与後 $23 \pm 23\%$, N.S.) (図2)。血管内皮機能の評価時にはグルココルチコイド投与前後でbody mass index、血圧、総コレステロール、空腹時血糖には有意な差はなかった。また、グルココルチコイド投与により低下した内皮依存性血管弛緩反応は、Vitamin Cの単回投与により有意に改善した(投与前 $27 \pm 26\%$ vs 投与後 $116 \pm 40\%$, $p < 0.01$) (図3)。

培養細胞系を用いた検討では、DEXの添加により、HUVEC細胞内の H_2O_2 産生が有意に増加した。また、この増加はVitamin CおよびVitamin Eの添加により有意に減少し、SODの添加によりほぼ完全に抑制された(図4)。また、電子スピン共鳴法による検討ではDEXの添加により OH^\cdot のシグナルが検出された(図5)。さらに、活性酸素産生系の阻害薬を用いた検討では、DEX添加による細胞内 H_2O_2 産生亢進はquinacrine、oxypurinol、およびCCCPの添加により有意に抑制され、これらのうちCCCPによる抑制が最も顕著であった(図6)。一方、L-NAMEおよびindomethacinの添加はDEX添加による細胞内 H_2O_2 産生亢進を抑制しなかった(図6)。

考察・結論

今回の検討ではグルココルチコイド過剰症におい

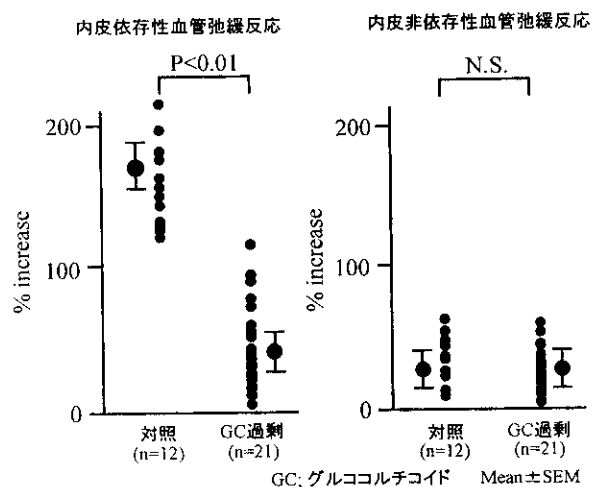


図1 グルココルチコイド過剰症患者における血管内皮機能

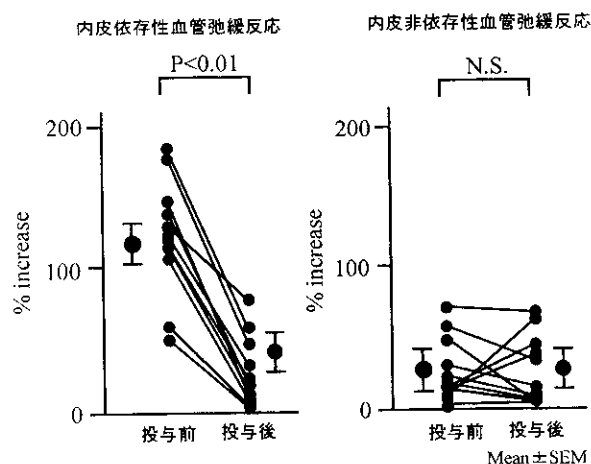


図2 グルココルチコイドの投与による血管内皮機能の変化

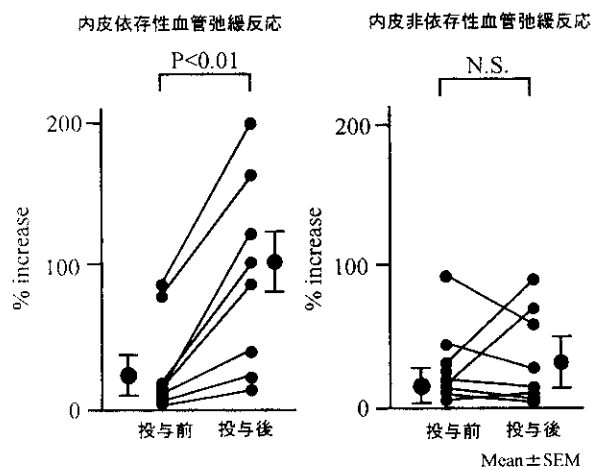
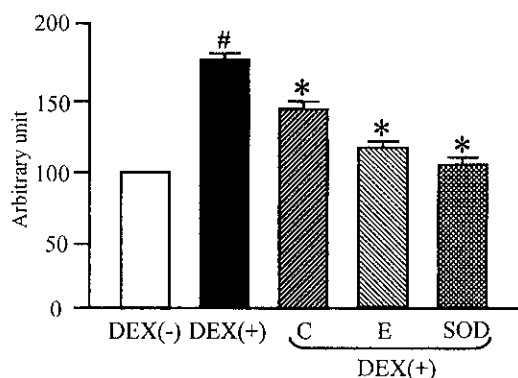
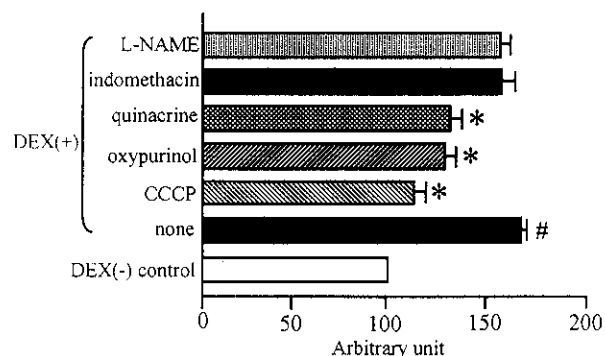


図3 Vitamin Cの投与による血管内皮機能の変化



Mean ± SEM # p < 0.01 vs DEX (-) * p < 0.01 vs DEX (+)
 DEX; dexamethasone, C; Vitamin C, E; Vitamin E
 SOD; superoxide dismutase

図4 Dexamethasone による活性酸素産生への影響



Mean ± SEM # p < 0.01 vs DEX (-) * p < 0.01 vs DEX (+) none
 DEX; dexamethasone, CCCP; carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone

図6 dexamethasone による活性酸素産生に及ぼす各種阻害薬の影響

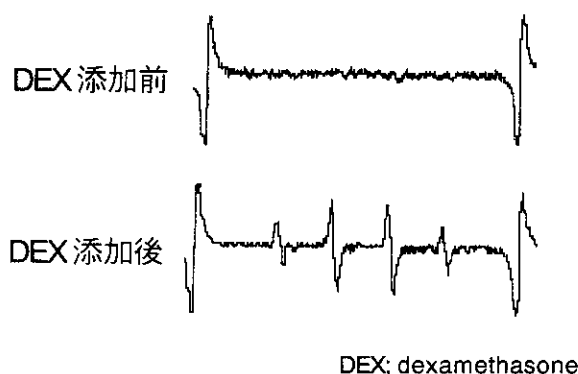


図5 Hydroxyl radical の産生 に及ぼすdexamethasone の影響

て反応性充血による内皮依存性血管弛緩反応の低下が認められた。反応性充血は主として血管内皮細胞からのNOの放出による血管弛緩反応であるため³⁾、グルココルチコイド過剰症では血管組織においてNO availabilityの低下、すなわち血管内皮機能の低下が存在すると考えられる。内皮依存性血管弛緩反応は自己免疫疾患などの基礎疾患や高血圧症、高脂血症、糖尿病などの存在によっても低下する可能性がある。しかしながら、グルココルチコイド投与前後の検討において、内皮依存性血管弛緩反応がグルココルチコイド投与後に有意に低下していること、また、この低下がグルココルチコイド投与による血圧、総コレステロール、血糖などの上昇がみられる以前に出現していることなどから、血管内皮機能の低下はグルココルチコイドの直接作用であると考えられる。さらに、Vitamin Cの投与により、グルココルチコイドによる内皮依存性血管弛緩反応の低下

が有意に改善したことより、グルココルチコイド過剰症におけるNO availabilityの低下は活性酸素の産生亢進によるNOの消去によることが示唆された。

培養細胞を用いた検討では、グルココルチコイドが血管内皮細胞における活性酸素の産生を亢進することが確認された。血管内皮細胞での活性酸素産生に及ぼすグルココルチコイドの影響についてはこれまでほとんど検討されていない。Spontaneously hypertensive ratではグルココルチコイドの過剰分泌により血管内皮細胞におけるxanthine oxidase活性が亢進し、これにより活性酸素産生が増加することが報告されている⁴⁾。高脂血症やアンジオテンシンII刺激などによる血管内皮細胞での活性酸素産生はxanthine oxidase系やNADPH oxidase系が重要であるとする報告もみられる¹⁾。今回の活性酸素産生系の阻害薬を用いた検討においても、xanthine oxidase系およびNADPH oxidase系はグルココルチコイドによる血管内皮細胞での活性酸素産生に関与していることが示唆されたが、活性酸素の産生がCCCPによって最も強く抑制されたことにより、グルココルチコイドによる活性酸素の産生はミトコンドリア電子伝達系が主要な産生源である可能性が高い。グルココルチコイドによるミトコンドリアでの活性酸素産生亢進のメカニズムは現時点では不明であるが、ミトコンドリアDNAにはグルココルチコイド応答配列(GRE)が存在しており⁵⁾、グルココルチコイドがその核内受容体を介してミトコンドリアDNAの転写活性に影響を及ぼし、電子伝達系の酵素活性や活性酸素の産生に関与している可能性などが考えられる。

グルココルチコイドにより過剰産生された活性酸素は、同様に血管内皮細胞から産生されるNOを消去することにより血管内皮機能を障害すると考えられる。このような現象が大腿骨頭を灌流する血管で生じた場合には、大腿骨頭壊死の発症要因となることが推測される。今後は、大腿骨頭灌流血管における活性酸素の産生亢進やそれによるNO消費を明らかにすることが必要である。このために、大腿骨頭壊死症例の大腿骨頭から採取した血管などを用いて、DNA過酸化の指標である 8-hydroxy-deoxy-guanosineや脂質過酸化の指標である 4-hydroxy-nonenalの免疫組織化学により活性酸素の産生亢進を明らかにするとともに、superoxideがNOと反応した際に産生されるperoxynitriteの組織指標である 3-nitro tyrosineの免疫組織化学により、活性酸素によるNOの消去亢進を明らかにする予定である。

参考文献

- 1) Weber RMF. et al.: Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998; 97:108-112.
- 2) Arlet J: Nontraumatic avascular necrosis of the femoral head: Past, present, and future. *Clin Orthop* 1992; 277:12-21.
- 3) Iwatsubo H. et al.: Converting enzyme inhibitor improves forearm reactive hyperemia in essential hypertension. *Hypertension* 1997; 29:286-290.
- 4) Suzuki H. et al.: In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 1995; 25:1083-1089.
- 5) Tsiriyotis C. et al.: The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: Mitochondrial nucleotide sequences, showing similarity to hormone response elements, confer dexamethasone inducibility to chimaeric gene transfected in LTK- cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 235:349-354.

特発性大腿骨頭壊死症の病態形成における hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) の役割

田中 良哉、飯田 武 (産業医科大学医学部、第一内科)
峯 信一郎、江藤 澄哉 (産業医科大学医学部、第一内科)
山田 真和 (産業医科大学保健学部)

特発性大腿骨頭壊死症の主因として、組織の阻血状態がもたらす細胞内酸素濃度の低下が挙げられる。今回、低酸素特定の転写因子hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) α を血管内皮細胞に遺伝子導入したところ、p21とp53の発現を増強し、bcl-2の発現を抑制する事を見いだした。即ちHIF-1 α は、内皮細胞の細胞周期の停止、引いては細胞死を誘導し、血管の再生或いは新生の遅延または障害をもたらす可能性が示唆された。

はじめに

全身性エリテマトーデス (SLE) を始めとする膠原病疾患の臨床などに於いて、特発性大腿骨頭壊死症 (IONF) はしばしば遭遇する合併症であるが、その発症機構は未だ不祥である。これまで、静脈血栓や静脈狭窄、ステロイド薬による血液凝固亢進、脂質代謝異常による動脈硬化や脂肪塞栓、血管障害、骨髓脂肪細胞の容積拡大による骨頭内圧の上昇、血管周囲の炎症或いは血管炎、血栓の易形成性などが発症機序に関与するとされるが決定的な裏付けな殆どない。ただ、共通して認められる組織学的所見としては、静脈系の循環障害に伴う組織の阻血状態であり、その結果血管の再生或いは新生が遅延または障害されて、壊死が生じる可能性が示される。即ち、組織の阻血状態が、IONFの病態形成に重要な鍵を握るものと考えられる。

最近、組織の阻血状態がもたらす細胞内酸素濃度の低下の結果誘導される転写因子として、hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) が同定された。HIF-1 は、塩基性helix-loop-helixファミリーに属する転写因子で、HIF-1 α とHIF-1 β の二量体を形成する。HIF-1 β (ARNT) は、生体内で幅広く分布し、正常でも低酸素状態でも発現するが、HIF-1 α は、低酸素状態で誘導される。HIF-1 α/β の標的遺伝子としては、VEGF、エリスロポエチン、iNOS、GLUT-1、3等が

報告され、何れも血管新生や血管拡張等を介する酸素運搬の亢進と解糖等を介する酸素消費の抑制の結果、阻血状態を改善せしめるべく生体反応に強く関与するようである。

今回、IONFの病態機構に於いて認められる組織の阻血状態がもたらす細胞内酸素濃度の低下がHIF-1 α の発現を誘導し、血管の再生或いは新生の遅延または障害をもたらす可能性に関して検討した。

方 法

血管内皮細胞として、臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) と皮膚微小血管由来血管内皮細胞株 HMEC-1 を用いた。human HIF-1 α の血管内皮細胞への遺伝子導入は、lipofectamin^{plus}を用いて行った。血管内皮細胞の細胞表面分子の発現は抗体と二次抗体で染色し、細胞内分子の発現はホルマリンとサポニンで処理後抗体と二次抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。また、これらの分子の1細胞あたりの発現分子数は、QIFKITを用いて算出した。

結 果

血管内皮細胞を低酸素状態で培養すると、培養3時間後にHIF-1 α とHIF-1 β の細胞内における発現増強を認めた。これらの分子の発現増強は、VEGFの添加やデキサメタゾンの添加の影響を受けなかつ

た。

HIF-1 α を血管内皮細胞に遺伝し導入し、細胞表面抗原の解析を行ったところ、VCAM-1 (CD106)、E-selectin (CD62E)、Fas (CD95)の発現は誘導されなかったが、ICAM-1 (CD54)の発現増強効果を認めた。また、PECAM-1 (CD31)の発現は、導入前後で殆ど変化がなかった。

一方、血管内皮細胞の細胞内分子に関しては、HIF-1 α の遺伝子導入によって、bcl-2の発現が抑制され、逆に、p53およびp21の発現の増強が認められた(表1)。なお、デキサメタゾンの添加によって、HIF-1 α の遺伝子導入によって誘導されるp53およびp21の発現を更に亢進させるとの予備的成績を得ている。

表1

HIF-1 α regulates cell cycle-associated molecules in endothelial cells

	HMEC-1		HUVEC	
	(-)	HIF-1 α	(-)	HIF-1 α
cell surface molecules (molecules/one cell by FACScan and QIFKIT analysis)				
Fas (CD95)	0	0	0	0
ICAM-1 (CD54)	4000	3000	3000	8000
VCAM-1 (CD106)	0	0	0	0
E-selectin (CD62E)	0	0	0	0
PECAM-1 (CD31)	3000	3000	12000	17000
intracellular molecules (molecules/one cell by FACScan and QIFKIT analysis)				
bcl-2	0	0	11000	3000
p53	0	1000	1000	2000
p21	2000	4000	11000	18000

考察と結論

p21は、癌抑制遺伝子産物であるp53によって誘導される遺伝子で、細胞周期G1チェックポイントに作用するサイクリン/サイクリン依存性キナーゼ複合体のキナーゼ活性を阻害することによって、G1期において細胞周期の進行を負に制御する分子である。また、p21の遺伝子上流域にはHIF-1結合部位であるhypoxia-response elementが存在する。今回の検討で、血管内皮細胞に於いてHIF-1 α を遺伝子導入することによって、p21の発現のみならず、p53の発現も増強したことから、HIF-1 α は、内皮細胞の細

胞周期をG1期で停止し、細胞の増殖停止をもたらす可能性が示唆される。また、アポトーシスの制御機能を有するbcl-2の発現が、HIF-1 α の遺伝子導入によって抑制された点から、HIF-1 α は、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する可能性も考えられる。さらに、我々は、滑膜細胞や骨芽細胞を用いてICAM-1の発現増強とアポトーシスの誘導との関連性を報告しており、内皮細胞においてもHIF-1 α の遺伝子導入によるICAM-1の発現増強とアポトーシスとの関連性が示唆される。これまで、HIF-1 α のアポトーシスへの関与については、殆ど報告がなく、今後、更に詳細に解析することによってこれらの点を解明する必要がある。同時に、糖質コルチコイドが、HIF-1 α によってもたらされるp53/p21の発現増強や細胞周期の停止に如何なる影響を及ぼすかも不詳であり、今後の検討を要する。一方、IONF組織内の血管内皮細胞上に於いて、実際にHIF-1 α 、さらには、p21が発現誘導されているか否かを免疫組織学的に明らかにする必要がある。

以上、多くの問題点が残存しているが、IONFの病態形成に関与すると考えられる阻血状態に陥った血管内皮細胞に於いて、HIF-1 α の発現や機能を解析することによって、血管の再生或いは新生の遅延または障害する機構を解明する手がかりを把握することができればと期待される。

参考文献

- 1) O'Rourke JF, et al.: Hypoxia response elements. *Oncology Res.* 9: 327-332, 1997.
- 2) Bunn HF, et al.: Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev.* 76: 839-885, 1996.
- 3) Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Op Genetics Develop* 8: 588-594, 1998.
- 4) Smith DWE: Is avascular necrosis of the femoral head the result of inhibition of angiogenesis? *Med Hypothesis* 49: 497-500, 1997.
- 5) Urbaniak JR, et al.: Revascularization of the femoral head in osteonecrosis. *J Am Acad Orthop Surg* 6: 44-54, 1998.
- 6) Mont MA, et al.: Osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Rel Res* 355S: S314-S335, 1998.

非外傷性ウサギ骨壊死モデルにおける経時的MRI

坂井 孝司、大園 健二
菅野 伸彦、西井 孝
中村 宣雄、原口 圭司 (大阪大学医学部整形外科)

ウサギ血清病モデルを利用した非外傷性骨壊死モデル18羽を対象に、経時的に同一個体に繰り返しGd-DTPA造影MRIを施行し組織所見とMR所見とを比較検討した。非造影MRIに比べて造影MRIの方が壊死所見に対する感度、特異度ともに優れていた。また、2回目馬血清投与後72時間の赤血球の漏出、1週から3週後の壊死所見、6週から12週の修復過程に至る組織学的変化を、Gd-DTPA造影パターンの変化として検出しえた。

ウサギ血清病モデルを利用した非外傷性骨壊死モデル¹⁾では、Gd-DTPA造影脂肪抑制 T1 強調画像 (Gd-FST1WI) を用いて横断的に病理組織像と対比することにより、最終処置後1週及び3週で壊死が focal homogeneous enhancement pattern として検出される²⁾。このモデルでは馬血清を3週間の間隔で2回静脈内投与し、2回目投与後1週から3週で骨髄壊死と骨梁壊死が大腿骨近位骨幹端部を中心に発生する。処置後早期では類洞への赤血球漏出と細動脈血栓、さらにC3とIgGの免疫複合体沈着が確認されている³⁾。一方、臨床例に対する造影MRIの報告では、壊死域が全く造影されない^{4) 5)}、あるいは focal homogeneous pattern や周囲のみが造影される⁶⁾、というように症例間で違いが見られる。これらの報告ではstageの進行した例もあり、必ずしも早期の壊死を反映しているとはいえ、造影パターンの違いは、壊死発生からMRI撮像までの時間経過及びcollapseの有無を含めたstagingによって影響されると考えられる。そこで今回、壊死発生からの時間経過を考慮し、血清病ウサギ骨壊死モデルにおける壊死発生から修復に至る経過を明らかにするため、同一個体において繰り返し経時的にMRIを撮像し、縦断的研究を行った。

対象及び方法

オスの日本白色家兎17羽34大腿骨 (体重3.4-4.0kg)

を対象とした。あらかじめ非動化した馬血清を3週間の間隔で1回あたり10ml/kg、2回静脈内投与した。初回馬血清投与前、2回目投与後72時間、1週、3週、6週、9週、及び12週まで同一個体において繰り返し経時的にMRIを施行した。なお、初回馬血清投与前のMR画像を正常コントロールとした。2回目投与後72時間でのMRI撮像後に7羽(72時間屠殺群)、6週での撮像後に6羽(6週屠殺群)、12週での撮像後に4羽(12週屠殺群)を屠殺し、両側の大腿骨を摘出、ホルマリン固定、EDTA脱灰後、coronal断面をHE染色して組織診断を行った。MRIは4.7T (Omega CSI-II, GE-BRUKER あるいは1.0T (Magnetom Harmony, Siemens AG) の superconducting magnet system を用い、spin echo法で前額断面のみを撮像した。まずT2強調 (T2WI)、T1強調 (T1WI)、脂肪抑制T1強調 (FST1WI) を撮像し、Gd-DTPA (マグネビストR) 0.1mmol/kg を静注後、造影T1強調 (Gd-T1WI)、造影脂肪抑制T1強調 (Gd-FST1WI)、合計5種類を撮像した。

結果

histological study

72時間屠殺群(7羽14大腿骨)では壊死所見は見られなかったが、類洞への赤血球漏出を71% (10/14大腿骨) に認めた。6週屠殺群(6羽12大腿骨)では、壊死を83% (10/12大腿骨) に認めた。12週屠殺群(4