

活性酸素の産生亢進によりNO availabilityを低下させる結果、血管内皮機能を障害し、大腿骨頭壊死を引き起こす可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato, K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T, Ogata E Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Mineral Res* 2000;15:770-779

Inoue D, Matsumoto T Parathyroid hormone-related peptide and bone: pathological and physiological aspects. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2000;54:32-41

Ohnishi T, Takeda E, Yogita S, Miyake H, Kinoshita T, Terashima Y, Matsumoto T, Tashiro S Effects of alendronate on bone metastases and hypercalcemia after surgery for hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2000;30:410-413

Shigekiyo T, Kanazuka M, Aihara K, Azuma H, Ohshima Y, Horie H, Nakahira, H, Takeichi T, Matsumoto T No increased risk of thrombosis in heterozygous, congenital dysplasminogenemia. *Int J Hematol* 2000;72:247-252

Shigekiyo T, Yoshida H, Kanagawa Y, Satoh K, Wakabayashi S, Matsumoto T, Koide T Histidine-rich glycoprotein (HRG) Tokushima 2: Novel HRG deficiency, molecular and cellular characterization. *Thromb Haemost* 2000; 84: 675-679

Nakamura Y, Matsumoto T, Tamakoshi A, Kawamura T, Seino Y, Kasuga M, Yanagawa H, Ohno Y Prevalence of idiopathic hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism in Japan. *J Epidemiol* 2000;10:29-33

Chikatsu N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Suzawa M, Obara T, Matsumoto T, Fujita T Cloning and characterization of two promoters for the human calcium-sensing receptor (CaSR) and changes of CaSR expression in parathyroid adenomas. *J Biol Chem* 2000;275:7553-7

Matsumoto T, Kubodera N, ED-71 Study Group Ialpha, 25-Dihydroxy-2beta- (3-hydroxypropoxy) vitamin D3 (ED-71): A promising candidate for the treatment of osteoporosis. *Vitamin D Endocrine System: Structural, Biological, Genetic and Clinical Aspects*, Eds. Norman AW, Bouillon R, Thomasset M, pp. 985-992, 2000

2. 学会発表

第73回日本内分泌学会学術総会。グルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害：ミトコンドリアからの活性酸素産生亢進の関与。井内貴彦、赤池雅史、藤村光則、高森信行、橋詰俊二、吉田智則、金川泰彦、三ツ井貴夫、新谷保実、東 博之、松本俊夫

ステロイド投与家兎の骨病変における病理組織学的検討(第4報)

～骨壊死とアポトーシスの関連について～

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

ステロイド投与家兎の大腿骨の骨壊死部におけるアポトーシスについてTUNEL法を用いて検討した。TUNEL陽性細胞は、ステロイド投与後早期の骨壊死部にはびまん性に分布し、経過とともに辺縁部に限局し、修復が進む時期には消失した。結果として、壊死部にしめるTUNEL陽性細胞の割合が経過とともに減少していく傾向であった。このような骨壊死部の経時的变化は、虚血の程度を反映したものと仮説した。

A. 研究目的

ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の発生機序について、これまで血流障害が原因とされてきた¹⁾が、未だ詳細は明らかにされていない。

一方、近年になり脳梗塞や急性心筋梗塞などの、局所の虚血や低酸素状態、虚血後再灌流障害に、アポトーシスが関与するといった報告が相次いでいる^{2) 3)}。松本は、ステロイド投与家兎の骨壊死部周辺にも同様にアポトーシスが存在することを示し、ステロイド性骨壊死の発生初期段階にアポトーシスが関与している可能性を報告した⁴⁾。

そこで本研究では、ステロイド投与後、比較的早期の病理組織像を評価に加えて、アポトーシスの経時的な変化について検討し、ステロイド性骨壊死とアポトーシスの関連性について考察した。

B. 研究方法

対象は体重約3.5kgの成熟した日本白色家兎を用いた。メチルプレドニゾロン4mg/kgを1回のみ殿筋内に筋注し、1日、3日、5日、1週、2週、4週後に屠殺した家兎をそれぞれ、1日群、3日群、5日群(以上8羽ずつ)、1週群、2週群、4週群(以上10羽ずつ)とし、コントロール群5羽を加えた7

群間で検討を行った。

屠殺後、両側大腿骨を摘出し、ホルマリン固定、パラフィン包埋標本を作成した。骨壊死部はHE染色標本で評価した。骨壊死の定義はYamamotoらが報告し⁵⁾、本会議にて従来から用いられているものに従った。アポトーシスはTUNEL法⁶⁾を用いて評価した。TUNEL法により濃染し、かつ形態の保たれている核を有する細胞をTUNEL陽性細胞とみなした。また、骨壊死部におけるTUNEL陽性細胞の集簇が見られた場合に「TUNEL陽性」と新たに定義し、採取した両側の大腿骨のうちどちらか一方でも陽性であった場合に、その個体を陽性と判定した。以上に基づいて、骨壊死発生率、骨壊死部におけるTUNEL陽性率、TUNEL陽性細胞の分布の経時的な変化について検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究のプロトコルは金沢大学医学部動物実験倫理委員会の規約に基づいて行われたものである。

C. 研究結果

骨壊死発生率について、コントロール群、1日群、3日群には骨壊死は認めなかった。5日群は8羽中2羽に、1週群は10羽中4羽に、2週群、4週群はいず

表1 骨壊死発生率

Group	骨壊死発生率
Control 群	0/5 羽 (0%)
1日群	0/8 羽 (0%)
3日群	0/8 羽 (0%)
5日群	2/8 羽 (25.0%)
1週群	4/10 羽 (40.0%)
2週群	6/10 羽 (60.0%)
4週群	6/10 羽 (60.0%)

れも10羽中6羽に骨壊死を認めた(表1)。骨壊死部におけるTUNEL陽性率は、5日群、1週群での骨壊死部はすべてTUNEL陽性であった。一方2週群では骨壊死部でのTUNEL陰性例が増え、4週群ではすべてが陰性であった(表2)。また骨壊死部におけるTUNEL陽性細胞の分布について、初期にはびまん性に分布していたが、経過とともに辺縁に局限し、修復が進んだ時期には認めなかった。この結果、壊死部にしめるTUNEL陽性細胞の割合が経過とともに減少していく傾向となった。

D. 考 察

われわれは以前、ステロイド投与家兎の骨壊死部辺縁にTUNEL陽性細胞の集簇を認めたこと報告し、骨壊死発生の初期段階にアポトーシスが関与している可能性を示唆した。今回の検討では、新たに5日群においてTUNEL陽性細胞が骨壊死部全体にびまん性に認められた組織像を得た。5日群、1・2週群、4週群の病理組織所見は、それぞれステロイド投与後の経過に特徴的で、その結果、ステロイド投与後早期の骨壊死部ほど、TUNEL陽性細胞の割合が高い傾向を認めた。

1995年Linnikらは、rat 脳虚血モデルにおいてその梗塞巣辺縁部にTUNEL陽性細胞の集簇を認めたと報告した⁷⁾。また彼らはこのような組織像を呈する成因として、虚血の程度を反映した結果であると推察した。今回の1・2週群の組織像はこのrat 脳虚血モデルの梗塞巣に類似しており、したがって、家兎のステロイド性骨壊死も脳梗塞などの急性阻血性壊死が病態であると考えられた。またTUNEL陽性細胞を認める辺縁部は虚血の程度が低く、そのため辺縁部の細胞はアポトーシスを呈し、虚血の程度の高い中心部ほど壊死に陥りやすいのではないかと考え

表2 TUNEL 陽性率

Group	TUNEL陽性数 / 骨壊死発生数
5日群	2/2 羽 (100.0%)
1週群	4/4 羽 (100.0%)
2週群	2/6 羽 (33.3%)
4週群	0/6 羽 (0%)

られた。

以上より、家兎のステロイド性骨壊死の経時的変化については、初期の骨壊死部は虚血の程度がまだ低く、骨壊死部にTUNEL陽性細胞をびまん性に認めるが、経過とともに中心部の虚血が高度になるため辺縁部にのみTUNEL陽性細胞を認め、最終的には病変部全体が高度な虚血におちいり、TUNEL陽性細胞は消失するのではないかと考えた。ステロイド性骨壊死の発生初期の段階でアポトーシスが関与しているということは、治療を考える上でもきわめて興味深いものである。すなわちアポトーシスを抑制すれば骨壊死範囲を縮小できるという新たな治療法の可能性があると考えられる。今後はステロイド投与後早期の家兎モデルにおける他のアポトーシス関連因子についても検討を行い、この仮説をさらに検証していく予定である。

E. 結 論

TUNEL法を用いたステロイド投与家兎大腿骨の病理組織像において、骨壊死部におけるTUNEL陽性細胞は、初期にはびまん性に分布し、経過とともに辺縁部に局限し、修復が進む時期には消失した。結果として、壊死部にしめるTUNEL陽性細胞の割合が経過とともに減少していく傾向であった。このような骨壊死部の経時的変化は、虚血の程度を反映したものと仮説した。

参考文献

- 1) Mont MA, Hungerford DS. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Am. 1995 Mar;77(3): 459-74.
- 2) Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y. Apoptosis and

- necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Mar; 16(2):186-94.
- 3) Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest.* 1996 Jan; 74(1):86-107.
 - 4) 松本忠美、加畑多文ら：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2報）～骨壊死とapoptosisとの関連について～、1999；平成10年度研究報告書：193-194
 - 5) Yamamoto T, Irida T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1997 Nov ; 40(11):2055-64.
 - 6) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992 Nov ; 119(3):493-501.
 - 7) Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR, Schroeder KK. Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995 Aug; 32(1):116-24.

ステロイド投与家兎の大腿骨における血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現について (第1報)

～骨壊死とVEGFの関連について～

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

ステロイド投与家兎の大腿骨の近位1/3における血管内皮増殖因子 (VEGF) について、免疫組織化学法で検討した。VEGF陽性率は5日群以降に高く、VEGF陽性部位は骨壊死好発部位である大腿骨近位内側に多い傾向であった。またVEGF発現細胞は、細胞種を問わず骨髄血球系の細胞にも発現しており、局所に集簇して認められたが、骨壊死部には認めなかった。ステロイド投与家兎の骨病変にVEGFが関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor、以下VEGF) は、血管内皮細胞に特異的に作用し、その増殖を促すタンパクである。組織の低酸素状態に反応して誘導されるという特徴から、動物モデルの虚血性病変において、発現が亢進するといった報告が散見されている^{1) 2)}。また最近では心筋梗塞や下肢動脈閉塞症などの虚血性疾患に対してVEGFを局所に作用し、側副血行を発達させ、虚血を解除するという血管新生療法も臨床応用されている^{3) 4) 5) 6)}。

ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の発生機序も、最近では脳梗塞や心筋梗塞のように急性虚血発作であるという解釈が広まりつつある。したがってステロイド性骨壊死においてもVEGFの発現の亢進が観察されたり、VEGFが骨壊死の発生を抑制または病変部を縮小させる可能性が考えられる。

そこで本研究では、ステロイド投与家兎の大腿骨の骨病変部におけるVEGFの発現の有無と経時的な変化について観察し、VEGFとステロイド性骨壊死との関連性について検討した。

B. 研究方法

対象は体重約3.5kgの成熟した日本白色家兎を用いた。メチルプレドニゾロン4mg/kgを1回のみ殿筋内に筋注し、1日、3日、5日、1週、2週、4週後に屠殺した家兎をそれぞれ、1日群、3日群 (以上6羽)、5日群 (8羽)、1週群、2週群、4週群 (以上10羽) とし、コントロール群5羽を加えた7群間で検討を行った。

屠殺後、両側大腿骨を摘出し、ホルマリン固定、パラフィン包埋標本を作成した。大腿骨近位部のVEGFの発現を免疫組織化学法を用いて観察した。また細胞質が濃染される細胞をVEGF発現細胞とみなし、10個以上のVEGF発現細胞の集簇を認めた場合に「VEGF陽性」と新たに定義した。なお採取した両側の大腿骨のうちどちらか一方でも陽性であった場合に、その個体を陽性と判定した。以上に基づいて、VEGF陽性率と陽性部位、VEGF発現細胞の組織学的特徴について検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究のプロトコールは金沢大学医学部動物実験倫理委員会の規約に基づいて行われたものである。

表1 VEGF 陽性率

Group	VEGF 陽性率
Control群	1/5 羽 (20.0%)
1日群	1/6 羽 (16.7%)
3日群	2/6 羽 (33.3%)
5日群	5/8 羽 (62.5%)
1週群	5/10 羽 (50.0%)
2週群	6/10 羽 (60.0%)
4週群	5/10 羽 (50.0%)

C. 研究結果

VEGF陽性率は、コントロール、1日、3日群の16～33%に比較して、5日群以降が50～60%とやや高い結果となった(表1)。これは、「ステロイド投与家兎の骨病変における病理組織学的検討(第4報)～骨壊死とアポトーシスの関連について～平成12年度研究報告書」で提示した骨壊死発生率とほぼ同様の傾向であった。

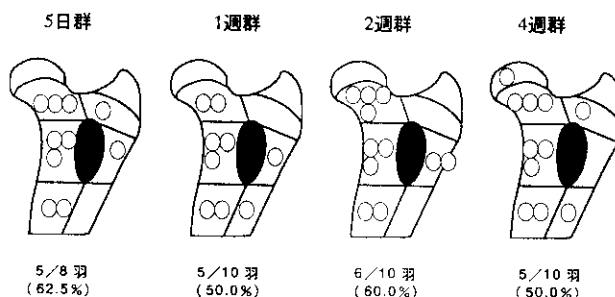
VEGFの陽性部位は、家兎大腿骨の近位1/3をスライドのように8分割し評価した。コントロール、1日、3日群においては陽性数も少なく明らかな傾向は認めなかったが、5日群以降では、骨壊死の好発部位である内側骨幹端部から転子下部にかけて多い傾向を認めた(図1)。また各群間での陽性部位に差はないように思われた。

病理組織像においては、発現細胞はマクロファージ、血管内皮細胞といった間質系細胞のみならず、骨髄血球系の細胞にも発現していた。また発現細胞は局所に集簇してみられる場合が多く、多いものでは3～4個の集簇が点在してみられた。明らかな骨壊死または骨髄壊死が存在する部位には、全例発現細胞は認めず、すべて骨壊死周辺部に認めた。また骨細胞の陽性例はほとんど認めなかった。

D. 考察

過去に、家兎の骨髄におけるVEGF発現に関する報告はなく、本研究が最初のstudyだと思われる。ステロイド投与家兎の大腿骨におけるVEGF発現の特徴は、陽性率において骨壊死発生率と同様に、5日群以降がやや高いこと、発現部位は骨壊死好発部位である近位内側が多い傾向にあることから、ステロイド性骨壊死と何らかの関連性があるものと推察

図1 VEGF 陽性部位



された。またその発現細胞は間質系細胞のみならず、細胞種を問わず骨髄血球系の細胞にも発現し、局所に集簇してみられる場合が多く、骨壊死部に認めないことから、ある局所の虚血、低酸素状態に対する周辺組織の反応ではないかと推察された。

今回は対象がまだ少なく、統計学的検討を含めた各群ごとの比較や骨壊死の有無での比較などは行っていないため、あくまでpreliminaryなデータである。しかしVEGFによる血管新生療法の可能性を考えると、ステロイド性骨壊死とVEGFの関連性については興味深いものがある。今後はさらに対象を増やし、またVEGFやVEGF-mRNAの定量、発現細胞の同定なども行いたいと考えている。

E. 結論

免疫組織化学法で、ステロイド投与家兎大腿骨におけるVEGFの発現を検討したところ、5日群以降に陽性率が高く、骨壊死好発部位である大腿骨近位内側に陽性部位が多い傾向であった。また骨髄血球系の細胞にも発現しており、局所に集簇して認められたが、骨壊死部には認めなかった。ステロイド投与家兎の骨病変にVEGFが関与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Xu F, Severinghaus JW. Expression and response to hypoxia of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat and rabbit tissues. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 454: 311-7.
- 2) Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K, Itoyama Y. Expression of angiogenic factors in rabbit spinal cord after transient ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1999 Feb; 25(1):63-71.

- 3) Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 Aug; 18(8): 887-95.
- 4) Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, Horowitz JR, Symes JF, Isner JM. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation.* 1996 Dec 15;94(12):3281-90.
- 5) Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation.* 1999 Aug 3;100(5):468-74.
- 6) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation.* 1998 Dec 22-29;98(25):2800-4.
- 7) 西江昭弘, 小野真弓, 桑野信彦. 低酸素ストレスとVEGF. *THE LUNG-perspectives.* 1998 ; 6(1):63-7.

ステロイド投与家兎の大腿骨における血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現について (第2報)

～Northern blot法によるVEGF-mRNAの解析について～

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

ステロイド投与家兎の近位大腿骨における、血管内皮増殖因子 (VEGF) mRNAの経時的变化について検討した。VEGF-mRNAは、control 群に比べ経過とともに上昇し、5 日群でpeakを認めた。その後1週群から4週群まではほぼプラトーで、control 群より高値を維持していた。したがって、ステロイド投与後早いものでは4～5日目にischemic eventが発生したのではないかと推察された。また発現のpeakが、ある特定の時期であったということは、これまでの、ischemic eventは1回であるという事実をさらに裏付けるものであると考えられた。

A. 研究目的

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor、以下VEGF) は、血管内皮細胞に特異的に作用し、その増殖を促すタンパクである。組織の低酸素状態に反応して誘導されるという特徴から、動物モデルの虚血性病変において発現が亢進するといった報告が散見されている^{1) 2)}。そこで私たちはステロイド投与家兎の大腿骨におけるVEGFの発現について免疫組織学的に検討し、報告した³⁾。その結果、ステロイド投与後、5日以降にVEGFの陽性率が高く、骨壊死好発部位である大腿骨近位内側に陽性部位が多い傾向であり、ステロイド投与家兎の骨病変にVEGFが関与している可能性が示唆された。

今回はさらにVEGFのmRNAの発現を検討し、本モデルにおける骨病変の病態について考察した。

B. 研究方法

対象は体重約3.5kgの成熟した日本白色家兎を用いた。メチルプレドニゾロン4mg/kgを1回のみ殿筋内に筋注し、3日、5日、1週、2週、4週後に屠殺した家兎をそれぞれ、3日群、5日群、1週群、2

週群、4週群 (以上3羽) とし、コントロール群3羽を加えた6群間で検討を行った。

方法は、家兎を屠殺後、すぐに大腿骨を摘出、近位1/3を半割した。大腿骨の一方から骨髓を採取し、液体窒素にて凍結、-80℃で保存した。各群3羽ずつからRNAを抽出した後、ノーザンブロット法でmRNAの解析を行った。なおこの解析には、ラットのVEGF-cDNAをプローブとして用いた。また半割した残りの大腿骨は、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片にした後、HE染色標本を作成し、骨壊死の有無を検討した。以上に基づいて、ステロイド投与後のVEGF-mRNA発現の変化、骨壊死発生率、VEGF-mRNAの発現と骨壊死の有無の関連性をそれぞれ検討した。

(倫理面への配慮)

本研究のプロトコルは金沢大学医学部動物実験倫理委員会の規約に基づいて行われたものである。

C. 研究結果

今回用いたラットのVEGF-cDNAのプローブで、

家兎のVEGF-mRNAを検出可能かを調べる予備実験を行った。ラット、マウス、家兎を用い、それぞれ比較的VEGFが多く発現していることが知られている腎臓から、RNAを抽出し、同様にノーザンブロット法を行った。その結果いずれの腎臓からも、3.9kbの単一バンドを認めた。過去の報告¹⁾からこれらのバンドはいずれもVEGF-mRNAと考えられた。よってラットのVEGF-cDNAのプロープで家兎のVEGF-mRNAを検出できることが判明した。

次に家兎の大腿骨近位 1/3 におけるVEGF-mRNAの発現を6群間で検討した。その結果、3.9kbのVEGF-mRNAを示す単一バンドを認めた。またcontrol群の平均を100%とした比で表すと、control群に比べステロイド投与群では経過とともに上昇しており、5日群でpeakを認めた。その発現量はおよそ3.6倍であった。その後減少したものの1週群から4週群まではほぼプラトーで、その発現量はcontrol群に比べおよそ2倍であった(図1)。

次に骨壊死発生率について、コントロール群、3日群、5日群には骨壊死は認めなかった。1週群には3羽中1羽に、2週群、4週群はいずれも3羽中2羽に骨壊死を認めた。

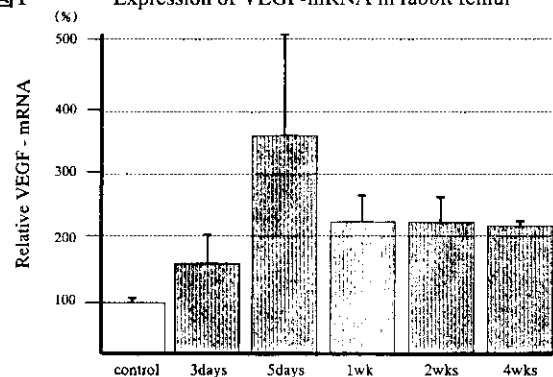
VEGF-mRNAの発現量と骨壊死の有無の関連性について検討した。骨壊死を5羽に認めたが、そのVEGF-mRNAの発現量は169%から210%であった。また骨壊死を認めなかった例でも132%から466%とかなりばらつきがあった。1週、2週、4週群のそれぞれ同一群間においても、VEGF-mRNAの発現量と骨壊死の有無には明らかな傾向を認めなかった。

D. 考察

組織に虚血・低酸素状態が発生すると、周囲はVEGFを発現する。またVEGFを誘導する因子の中では低酸素がもっとも強力であることが知られている^{4) 5) 6)}。したがってある組織中のVEGFの検出は、逆にその周囲の虚血状態を反映すると考えられる。タンパクであるVEGFはそのmRNAから翻訳されることから、さらにmRNAの検出は、組織の虚血、低酸素状態をより鋭敏に反映することが予想される。

1999年、Plateらはラットの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、病理組織学的にVEGF-mRNAの発現を検討した⁷⁾。その結果、VEGF-mRNAの発現は閉塞後3時間から見られ、12時間から24時間後にpeakとなり、1週間後まで持続していた。

図1 Expression of VEGF-mRNA in rabbit femur



今回の結果では、ステロイド投与後5日目にmRNAのpeakを認めた。以上からラットと家兎の違いを考慮しても、ステロイド投与後早いものでは4~5日目にischemic eventが発生したのではないかと推察された。また発現のpeakが、ある特定の一時期であったということは、山本⁸⁾、入佐ら⁹⁾や加畑¹⁰⁾が以前報告した、ischemic eventは1回であるという事実をさらに裏付けるものと考えられた。今後、対象数をさらに増やして検討を行う予定である。

一方ステロイド投与後1週以降もmRNAが発現し続けるという現象について、本モデルにおける意義は、現時点では不明である。また今回VEGF-mRNAの発現量と骨壊死の有無には明らかな関連性を認めなかった。VEGFの作用として、骨壊死発生後の早期修復や骨壊死の予防といった可能性を検討するために、今後はステロイド投与後2~4週群で、さらに対象を増やして検討を行う予定である。

E. 結論

ステロイド投与家兎の大腿骨における、VEGF-mRNAの発現について検討したところ、ステロイド投与後5日目にpeakを認めた。本モデルにおけるischemic eventは、早いものではステロイド投与後4~5日目に発生している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Xu F, Severinghaus JW. Expression and response to hypoxia of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat and rabbit tissues. *Adv Exp Med Biol.* 1998;454:311-7.
- 2) Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K, Itoyama Y. Expression of angiogenic factors in rabbit spinal cord after transient ischaemia. *Neuropathol*

Appl Neurobiol. 1999 Feb;25(1):63-71.

- 3) 松本忠美ほか：ステロイド投与家兎の大腿骨における血管内皮増殖因子（VEGF）の発現について（第1報）～骨壊死とVEGFの関連について～. 厚生省特定疾患 骨・関節系調査研究班 平成12年度研究報告書2000（投稿中）.
- 4) Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashima T, Yamashita J, Yamamoto H. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem.* 1995 Nov 24;270(47):28316-24.
- 5) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992 Oct 29;359(6398):843-5.
- 6) 西江昭弘, 小野眞弓, 桑野信彦. 低酸素ストレスとVEGF. *THE LUNG-perspectives.* 1998 ; 6(1) :63-7.
- 7) Plate KH, Beck H, Danner S, Allegrini PR, Wiessner C. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Jun;58(6):654-66.
- 8) Yamamoto T, DiCarlo EF, Bullough PG. The prevalence and clinicopathological appearance of extension of osteonecrosis in the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 1999 Mar;81(2):328-32.
- 9) 入佐隆彦, 山本卓明, 宮西圭太, 岩本幸英, 居石克夫. ステロイド投与家兎における早期骨病変の病理組織学的検討. 厚生省特定疾患 骨・関節系調査研究班 平成10年度研究報告書 1999 : 182-4.
- 10) 加畑多文, 西野 暢, 堀井健志, 柳下信一, 二見智子, 松本忠美. 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～. 厚生省特定疾患 骨・関節系調査研究班 平成11年度研究報告書2000 : 19-23.

ステロイド投与家兎モデルにおける 末梢血流循環改善剤の効果に関する研究

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

ステロイド投与家兎に末梢血流循環改善剤（LipoPGE₁；以下PGE₁）を投与し、血液生化学的所見および病理組織学的所見についての検討を行った。血液生化学的所見では、PGE₁投与による凝固系の抑制はみられなかったが、脂質系においてステロイド投与による脂質系の上昇をやや抑制する傾向がみられた。病理組織学的所見では、骨髄壊死および骨壊死の発生率に影響を与えなかった。これらの結果より、本モデルにおいては、骨壊死に対するPGE₁の抑制効果はないと考えた。

A. 研究目的

ステロイド投与が大腿骨頭壊死症発生の重要な因子であることは明らかにされているが、その発生機序の詳細については明らかにされていない。これまで、骨頭壊死に影響を与えるステロイドの作用として血管系、脂質代謝系、凝固系への関与が考えられてきている。近年、ステロイド性骨壊死は凝固能亢進による血栓形成に基づく虚血が病因であるという説が注目されてきているが、虚血に至る機序については不明である。しかしながら、その薬理効果から多くの疾患に対し幅広く使用されていること、およびステロイド投与が特発性大腿骨頭壊死症患者の背景因子の半数を占めるという現状は深刻であり、早急な病態解明および予防法の確立が必要である。以前、我々のグループが行った実験において、末梢血流改善剤であるプロスタグランジンE₁（PGE₁）をステロイドと共に投与することでステロイド投与による血小板凝集能亢進および大腿骨頭血流量低下がともに抑制されることが判明し、大腿骨頭壊死症におけるPGE₁の予防的投与の有効性が示唆された^{1),2)}。そこで今回我々は骨壊死の病態解明を目的に、末梢血流循環改善剤であるPGE₁をステロイド骨壊死モデルに投与し、骨壊死の発生にどのような影響を及

ぼすかについて血液生化学的および病理組織学的検討を行った。

B. 研究方法

体重約3.5kgの雌の成熟日本白色家兎に対し体重1kgあたりメチルプレドニゾロン4mgを右殿筋内に1回筋注した群をステロイド単独群（以下St単独群）（n=10）、ステロイドとともにPGE₁5μgを耳静脈より投与開始し、以後1週間連日投与した群をI群（n=6）、I群と同様にステロイド、PGE₁5μgを投与し、投与終了後1週間未投与で経過観察した群をII群（n=10）、ステロイドとともにPGE₁5μgを投与開始し、以後2週間連日投与した群をIII群（n=10）とした（図1）。これらに対しステロイド投与前、投与後3日、1週、2週において耳動脈より採血を行い、凝固系、脂質系の変動についてSt単独群とPGE₁の投与期間が最も長いIII群との間で比較検討した。また、I群はSt投与後1週目に、St単独群、II群、III群はSt投与後2週目に犠牲死とし、両大腿骨のH-E標本を作製してその病理組織学的所見について検討した。

骨壊死の判定は、骨髄の造血細胞および脂肪細胞の壊死に加え、骨細胞のempty lacunaeや核の濃縮を

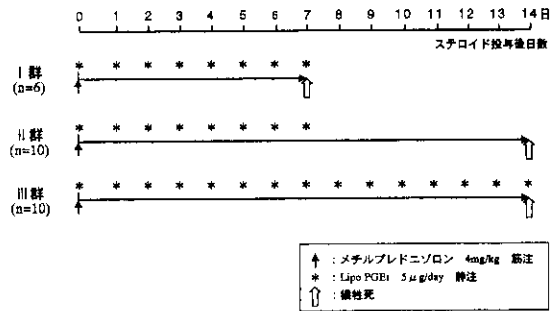


図 1. 各群における薬剤の投与方法

呈するものとし、骨髄のみに変化を認めるものを骨髄壊死として判定に加えた。

(倫理面への配慮)

本実験のプロトコルは、金沢医科大学医学部動物実験倫理委員会の規約に基づいて行われたものである。

C. 研究結果

血液生化学的所見；

凝固系では、PT (INR) において St 単独群で投与前と比較してステロイド投与後 1 週にかけて延長傾向が見られ、Ⅲ群との間でステロイド投与後 3 日、1 週で有意差 ($P < 0.05$) を認めた。APTT においては、St 単独群で投与前と比較してステロイド投与後 3 日から 1 週にかけて延長傾向を、Ⅲ群では、投与前と比較してステロイド投与後 3 日から 1 週にかけて短縮傾向を認めたが、両群間に有意差を認めなかった。また、AT-Ⅲにおいて、両群共に投与前と比較してステロイド投与後 2 週にかけてやや増加傾向がみられ、ステロイド投与後 3 日、2 週で両群間に有意差 ($P < 0.05$) を認めた。フィブリンノーゲンでは、両群ともに投与前と比較してステロイド投与後 3 日にかけ減少傾向を認めたが、両群間に有意差はなかった (図 2)。

脂質系では、総コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸は St 単独群において投与前と比較してステロイド投与後 3 日から 1 週にかけて著明な上昇を認めたのに対し、Ⅲ群ではその上昇が軽度であったが両群間に有意差はなかった。一方、HDL コレステロールは両群ともにステロイド投与後 3 日において著明な低下を認めたが有意差は認めなかった (図 3)。

病理組織学的所見；

I 群の 6 羽中 2 羽、II 群の 10 羽中 1 羽において大腿骨近位内側 1/3 付近に骨髄壊死を認めた。壊死部骨髄では、骨髄造血細胞の核は崩壊しており核破砕産物を認めた。脂肪細胞は核の消失を認めたが細胞構築は保たれていた。これらの骨梁には異常を認めなかった (図 5, 6)。St 単独群の 10 羽中 7 羽、II 群の 10 羽中 6 羽、Ⅲ群の 10 羽中 6 羽に骨壊死を認めた。上記の骨髄壊死所見に加え、骨梁において骨細胞の empty lacunae および核の濃縮を認めた (図 4, 7)。

壊死発生率；

骨髄単独壊死は St 単独群で 0/10 羽 (0%)、I 群で 2/6 羽 (33%)、II 群で 1/10 羽 (10%)、Ⅲ群で 0/10 羽 (0%) に認めた。骨壊死は St 単独群で 7/10 羽 (70%)、I 群で 0/6 羽 (0%)、II 群で 6/10 羽 (60%)、Ⅲ群で 6/10 羽 (60%) に認めた。骨髄壊死の発生率においては St 単独群と I、II、Ⅲ群間で有意差を認めなかったが骨壊死発生率において、St 単独群と I 群間で有意差 ($P < 0.05$) を認めた (図 8)。

D. 考察

ステロイド投与による骨壊死の発生には、脂質系の異常のみならず凝固系の異常が大きく関与していることは以前より報告されている。これらの異常を改善することがステロイド骨壊死予防および治療の鍵になると考えられ、現在までに様々な実験が行われてきた。また、我々は PGE₁ 投与により大腿骨頭血流低下および血小板凝集能の亢進が抑制されることを明らかとし、ステロイド性骨壊死予防の可能性について本班会議において報告した^{1), 2)}。

ステロイドの作用には、血管内皮細胞の障害、凝固能の亢進、血清脂質の上昇などがある。一方、PGE₁ には強力な血小板凝集能抑制作用および血管拡張作用による末梢血流改善作用がある。ステロイドの凝固系に与える作用機序としては、アラキドン酸の遊離を触媒するホスホリパーゼ A₂ を阻害することにより、結果として内皮細胞における PGI₂ 産生を抑制し、抗血栓性を低下させることが報告されている³⁾。一方、PGE₁ は血小板膜のレセプターと結合し、膜に存在する adenylylate cyclase を刺激して、血小板 c-AMP 量を増加させ、細胞質からの Ca⁺⁺ 能動輸送を促進し、細胞内の Ca⁺⁺ 濃度を低下させることによ

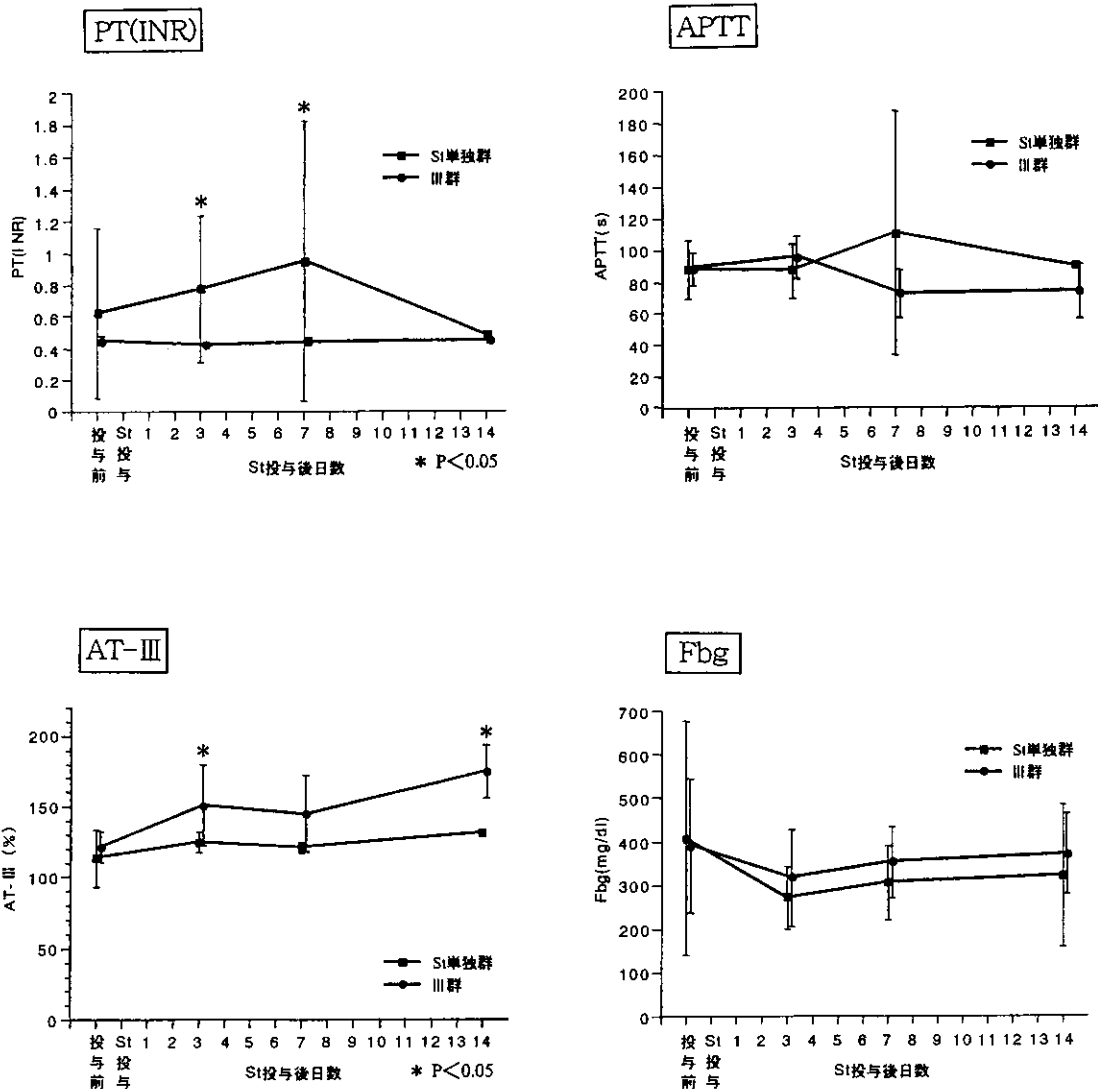


図2. 凝固系における経時的変化

って血小板凝集を抑制する⁴⁾。

今回の血液生化学的所見では、凝固系においてステロイド投与による凝固能亢進およびPGE₁投与による凝固能抑制を示唆する所見が得られなかった。脂質系においては、PGE₁投与はステロイド投与による脂質系の上昇をやや抑制する傾向を認めた。

病理組織学的検討において、骨髄単独壊死の発生率はSt単独群での0% (0/10羽) に対し、I群で33% (2/6羽)、II群で10% (1/10羽)、III群で0% (0/10羽) であり、統計学的有意差はなかった。一方、骨壊死発生率はSt単独投与群での70% (7/10羽) に対し、I群で0% (0/6羽)、II群で60% (6/10羽)、III群で60% (6/10羽) であり、St単独群とI群との間で有意差 (P<0.05) を認めた。I群で骨壊死を認めなかった理由としては、近年入佐ら⁵⁾が報告した

ように、壊死面積が非常に狭く周囲に骨梁が存在しなかったために骨髄壊死と判定された可能性がある。しかしながら、薬剤の投与条件が同一であり犠牲死の時期のみ異なるII群では骨壊死発生率が60% (6/10羽) となっており、その理由としてPGE₁が壊死の発生を遅延させた可能性も考えられるが、本実験においては壊死発生率の安定したステロイド投与後2週での評価が妥当であると考ええる。また、骨壊死が抑制されなかった理由として、凝固能及び脂質系の抑制が不十分であったことがまず考えられるが、それとは別に他の因子が壊死発生に関与した可能性が考えられる。これらの結果より、ステロイド性骨壊死の抑制においてPGE₁は有効な薬剤とは考えられなかった。

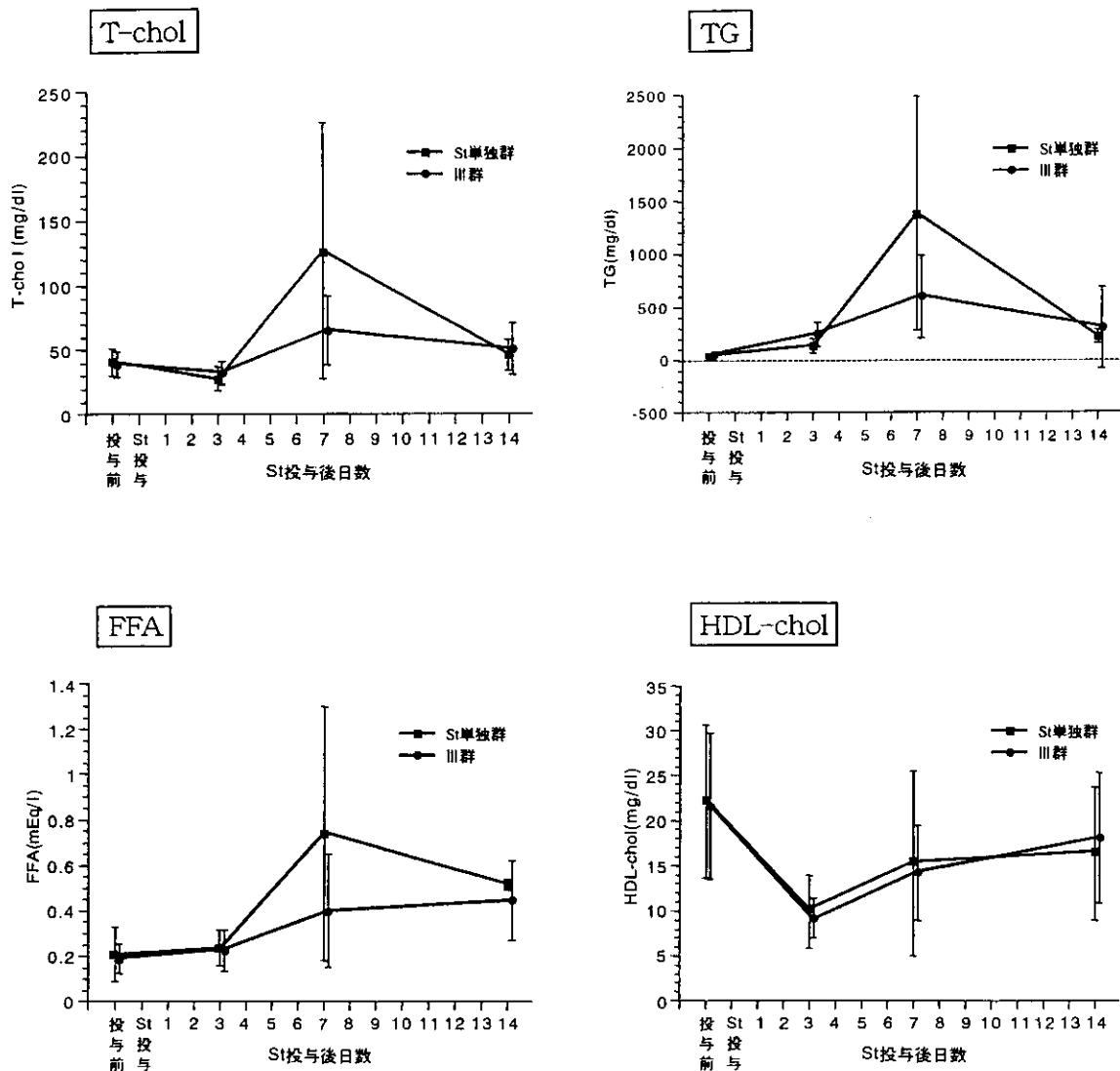


図3. 脂質系における経時的変化

E. 結論

ステロイド投与家兔にPGE₁を投与し血液生化学的所見および病理組織学的所見についての検討を行った。血液生化学的所見では、PGE₁投与による凝固系の抑制はみられなかったが、脂質系においてステロイド投与による脂質系の上昇をやや抑制する傾向がみられた。病理組織像では、I群、II群において骨髓壊死を認めたが、St群との比較において有意差を認めなかった。骨壊死発生率においては、ステロイド単独投与群と比較しI群との比較のみで有意差を認めた。したがって、PGE₁投与により脂質系の上昇はやや抑制されたが凝固系の抑制はされず、壊死発生を抑制することは出来ないと考えられた。

参考文献

- 1) 松本忠美, 柳瀬茂樹, 西野 暢, 中村琢哉, 西村立也: ステロイド投与家兔の大腿骨頭に対する末梢血流改善剤の効果. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班. 平成4年4度研究報告書: 49-53, 1993.
- 2) 松本忠美, 柳瀬茂樹, 西村立也, 西野 暢, 中村琢哉, 藤井秀人: ステロイド投与家兔の大腿骨頭に対する末梢血流改善剤の効果 (第2報) 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班 平成5年度研究報告書: 95-97, 1994.
- 3) 川合眞一: ステロイドの作用機序. アレルギー科 7: 75-82, 1999.
- 4) 大滝 裕, 浜野哲夫, 内田 武, 新留正和, 藤野善之, 渡辺正弘: LipoPGE₁の抗血小板作用.

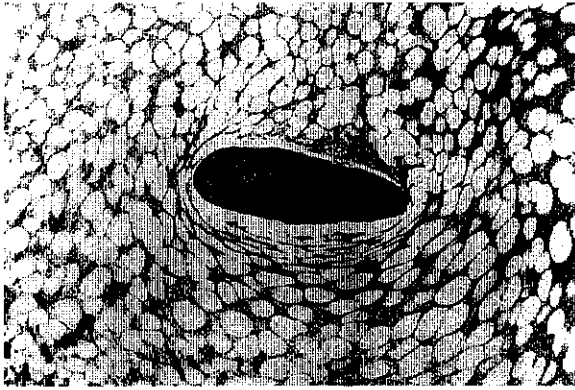


図 4. St 単独群の組織像

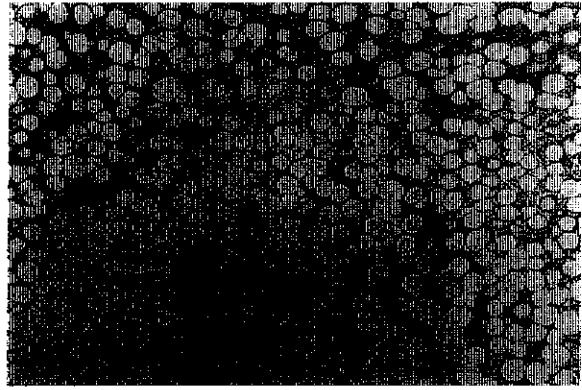


図 5. I 群の骨髄壊死例の組織像

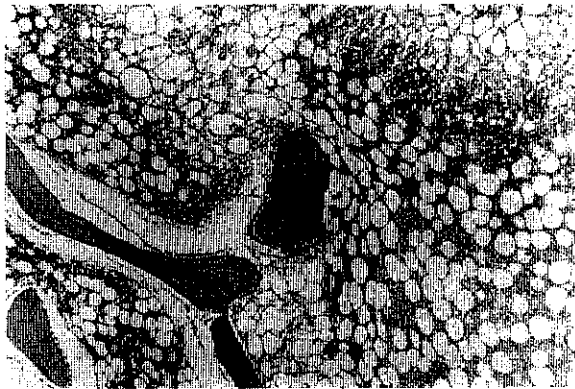


図 6. II 群の骨髄壊死例の組織像

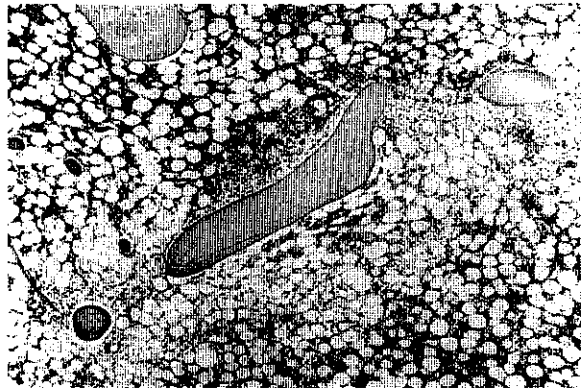


図 7. III 群の組織像

壊死発生率

	St単独群	I 群	II 群	III 群
骨髄壊死	0/10羽 (0%)	2/6羽 (33%)	2/10羽 (10%)	0/10羽 (0%)
骨壊死	7/10羽 (70%)	0/6羽 * (0%)	6/10羽 (60%)	6/10羽 (60%)

* P<0.05

図 8. 骨髄壊死および骨壊死の発生率

基礎と臨床 20: 110-114,1986.

- 5) 入差隆彦, 山本卓明, 宮西圭太, 岩本幸英, 居石克夫: ステロイド誘発家兎骨壊死に対するステロイド投与量の影響. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班 平成10年度研究報告書: 185-187,1999.

ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルにおける 骨髄内脂肪細胞の形態学的変化

宮西 圭太、野口 康男、山本 卓明、末永 英慈
岩本 幸英 (九州大学大学院医学研究院整形外科)
入佐 隆彦、山下 彰久、居石 克夫
(九州大学大学院病理病態学)

末梢への有意な脂質輸送による骨組織での脂質沈着を検討するため、ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルにおける骨髄内脂肪細胞の形態学的変化を検討した。その結果、壊死発生家兎では非発生家兎より有意に脂肪細胞のサイズが増大しており病態への関与が示唆された。

A. 研究目的

大腿骨頭壊死症と骨髄内脂肪細胞の形態学的変化の関連を動物モデルを用いて検証する。

B. 研究方法

日本白色家兎48羽に対し、ステロイド (Methylprednisolone acetate; 20 mg/kg) を筋肉内注射した。コントロールの6羽には、生理食塩水を筋肉内注射した。4週間後に屠殺し、大腿骨の上腕骨の組織標本を作成し組織学的に骨壊死の有無を判定した。NIH imageを用いて、骨髄内脂肪細胞の最大径を測定した。本実験は、九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査に基づいて行われた。

C. 研究結果

壊死あり群 (N=37) では、壊死なし群 (N=11) より有意に脂肪細胞径が増大していた。壊死なし群でも、コントロールより有意に脂肪細胞径が増大していた。

D. 考察

これまでにステロイドによる効果として骨髄内脂肪細胞増大が報告されている。本研究では壊死あり群となし群の間で細胞径に有意差を認めており、脂肪細胞の形態学的変化が本疾患の病因として重要と考えられた。

E. 結論

骨髄内脂肪細胞の形態学的変化は骨壊死の病因として重要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Miyanishi K, Noguchi Y, Yamamoto T, Irisa T, Suenaga E, Jingushi S, Sugioka Y, Iwamoto Y. Prediction of the outcome of transtrochanteric rotational osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg [Br]* 2000; 82: 512-516.

2. 学会発表

Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y: Histomorphometric Changes of Bone Marrow Fat Cells in Corticosteroid-Treated Rabbits with Osteonecrosis. The ARCO Meeting. October 4-6, 2000, Baltimore, USA

ステロイド単独投与家兎モデルにおけるFK506の併用効果

宮西 圭太、野口 康男、山本 卓明、末永 英慈
岩本 幸英 (九州大学大学院医学研究院整形外科)
人佐 隆彦、山下 彰久、居石 克夫
(九州大学大学院病理病態学)

ステロイド単独投与家兎モデルにおけるFK506の併用効果を検討した。FK506併用群では、非併用群と比較して大腿骨近位部における組織学的な骨壊死発生頻度が有意に増加していた。FK506併用は、本モデルにおいては骨壊死発生に促進的に働いている可能性が示唆された。

A. 研究目的

FK506の導入により骨壊死発生率の減少が報告されている。本研究の目的は、ステロイド単独投与家兎モデルにおけるFK506の併用効果を検討することである。

B. 研究方法

GroupAは20羽の日本白色家兎からなり、FK506 (0.1mg/kg) を15日間筋注し、2回目の注射後、ステロイド (20mg/kg) を1回筋注した。GroupBは40羽からなり、生食を15日間筋肉内注射し、2回目の注射後、同量のステロイドを1回筋肉内注射した。ステロイド注射4週間後に大腿骨近位部での骨壊死の有無を組織学的に判定した。本実験は、九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査に基づいて行われた。

C. 研究結果

骨壊死発生頻度はGroupAで38/80 (48%)、GroupBで27/40 (68%) と両者に有意差を認めた ($p<0.05$)。採血データでは、low density lipoprotein (LDL) がステロイド投与後2週目にGroupAで有意に高値であった ($p<0.05$)。

D. 考察

FK506は、骨壊死病因として提唱された血栓形成や高脂血症を惹起することが報告されておりこれらの因子が大腿骨近位での骨壊死発生数増加に関与

した可能性が推察される。

E. 結論

ステロイド単独投与家兎モデルにおいては、FK506併用は大腿骨近位部での骨壊死発生に促進的に働いている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Miyanishi K, Noguchi Y, Yamamoto T, Irisa T, Suenaga E, Jingushi S, Sugioka Y, Iwamoto Y. Prediction of the outcome of transtrochanteric rotational osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg [Br] 2000; 82: 512-516.

2. 学会発表

Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y: Histomorphometric Changes of Bone Marrow Fat Cells in Corticosteroid-Treated Rabbits with Osteonecrosis. The ARCO Meeting. October 4-6, 2000, Baltimore, USA

HIF-1 α による血管内皮細胞の細胞死誘導に関する研究

田中 良哉 (産業医科大学医学部第一内科)

飯田 武 (産業医科大学医学部第一内科)

藤本 浩子 (神戸大学医学部生体防御学)

南 康博 (神戸大学医学部生体防御学)

血管内皮細胞に組織阻血状態で誘導される転写因子hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α を遺伝子導入すると、p21の発現、G₀/I₁期静止細胞の増加、早期アポトーシス細胞と細胞DNA断片化が誘導された。しかし、m-PSLやPGE₂添加は、HIF-1 α 誘導細胞機能に影響しなかった。以上、血管内皮細胞では、HIF-1 α はp21転写誘導を介して細胞周期停止や細胞死を誘導する事が示された。

A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) の発症過程では、静脈系循環障害に伴う組織阻血状態と血管再生・新生の障害により壊死が生じる可能性が示される。hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) は、組織阻血状態による細胞内酸素濃度低下によって誘導される転写因子で、HIF-1 α とHIF-1 β の二量体を形成する。HIF-1 β は正常でも発現するが、HIF-1 α は、低酸素状態で誘導される。今回、IONの病態で問題となる血管再生や新生の障害におけるHIF-1 α の役割を検討した。

B. 研究方法

血管内皮細胞として、臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) と皮膚微小血管由来内皮細胞株HMEC-1を用いた。ヒト HIF-1 α の内皮細胞への遺伝子導入は、リポフェクション法を用いた。

(倫理面への配慮)

特に該当せず。

C. 研究結果

HIF-1 α 遺伝子を血管内皮細胞に導入したところ、細胞の増殖活性は抑制され、特に付着細胞数の減少が著しく、大部分の細胞は浮遊し破碎傾向を示した。また、HIF-1 α 導入によって、G₀/I₁期静止細胞の増加、annexinV^{high}PI^{low}の早期アポトーシス細胞の増加、

細胞のDNA断片化が誘導された。さらに、HIF-1 α の発現によりp21の発現が増強した。しかし、m-PSLやPGE₂添加は、HIF-1 α により誘導された細胞機能に影響を与えなかった。

D. 考察

p21は、細胞周期G₁チェックポイントにおいて細胞周期の進行を負に制御する。今回、血管内皮細胞に於いてHIF-1 α の遺伝子導入により、p21の発現増強を介して細胞周期をG₁期で停止し、増殖停止、アポトーシスを誘導することが示された。一方、IONの発症に関与するとされる大量に関しては、少なくともこの系では影響を及ぼさなかった。ION組織内の血管内皮細胞上に於けるHIF-1 α やp21の発現を免疫組織学的に明らかにする必要があるが、IONの病態形成に関与する阻血状態に陥った血管内皮細胞に於いて、HIF-1 α が血管の再生や新生の遅延・障害に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

血管内皮細胞では、組織阻血状態で誘導される転写因子HIF-1 α は、p21の転写誘導を介して細胞周期の停止や細胞死を誘導し、血管の再生や新生の障害を介して特発性大腿骨頭壊死症を齎す可能性が示唆された。

SHR大腿骨頭壊死モデルの至適条件

熊谷 謙治、和田 政浩、鈴木 暢彦、
進藤 裕幸 (長崎大学医学部整形外科)
丹羽 正美 (長崎大学医学部第一薬理)

高血圧自然発症ラット (以下SHRと略) は心血管系、自律神経系、腎機能、免疫系などの異常とともに大腿骨骨頭の無腐性壊死が生じることが知られている²⁾。

SHRは青木と岡本等により高血圧を呈したウイスター京都ラットを継代近親交配し、純系化されたものでその後分離純系化された亜系も多種存在する (図1)。

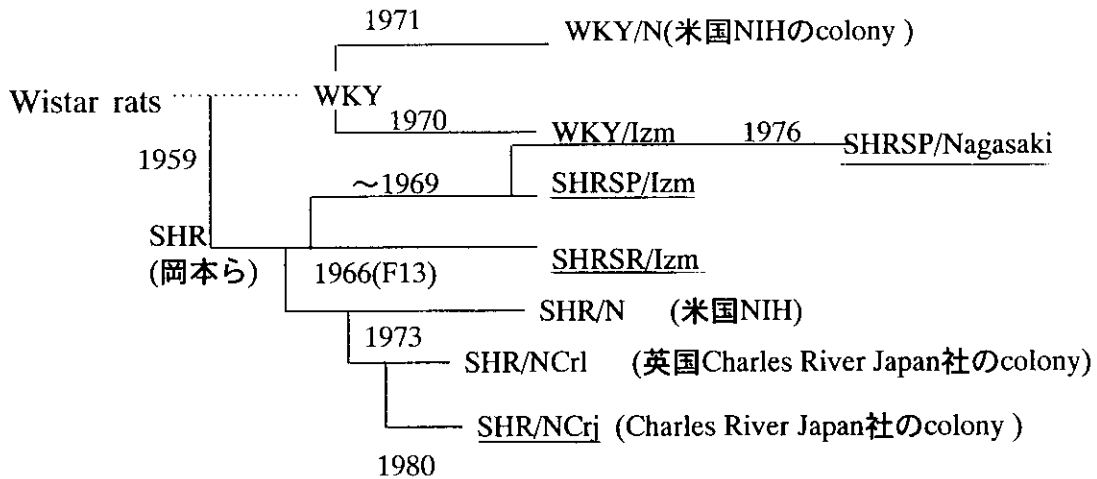


図1. SHR起源と亜系間の関係

SHRは青木と岡本等により高血圧を呈したウイスター京都ラットを継代近親交配し、純系化された。NIHに分配された後世界中に広まり、亜系も多種存在する。今回下線のSHR/Izm, SHR/NCrj, SHRSP/Izm, SHRSP/Nagasakiを実験に使用した。

【目的】

大腿骨頭壊死のモデルとしてSHRを使用する際、実験結果の安定性や薬物負荷などでより高頻度の壊死発生が望まれる。また SHRとSHRSP (亜系間) でも発生頻度が異なるようである。故に大腿骨頭壊死の至適条件 (発生時期、発生頻度、典型的な初期壊死像検出) の検索すること。

【材料&方法】

Charles River Japan社から購入したSHRラット (SHR/NCrj)、SHR共同研からSHRの標準的な系とされているSHRイズモラット (SHR/Izm)、(SHRSP/Izm)、

長崎大学医学部附属動物実験施設で継代飼育されているSHRSPラット (SHRSP/Nagasaki) を使用し、生後10から17週齢の種々の週齢で屠殺し、標本採取した (表1)。

飼育は長崎大学医学部附属動物実験施設で通常ラットケージを使用し、飼料としては船越農場の固形使用 (F2, SP) を用いた。

冠状断の最大断面の組織学的標本で評価し、外側のepiphysisや組織細胞構築等が不明瞭である標本は除外した。

組織学的診断基準はラットの大腿骨骨頭無腐性壊死の以下の1から4のphaseいずれかに合致するも

表 1. 対象および結果. 大腿骨頭壊死

SHR/Izm, SHR/NCrj, SHRSP/Izm, SHRSP/Nagasaki のラットを使用し、生後10から17週齢の種々の週齢で屠殺し、標本採取観察を行った。
 大腿骨頭壊死は各亜系間で発生率が異なりSHRよりもSHR/SPに頻度が高く、またSHRSP/IzmとSHRSP/Nagasakiでも頻度の差があり週齢間でも発生率が異なる。
 注目すべき点は早期壊死と思われる像がSHRSP/Nagasakiの14週齢の6骨頭中3骨頭にSHRSP/Izmの17週齢の14骨頭中6骨頭にみられたことである。

対象 および 結果 (大腿骨頭壊死)

亜系	週齢	骨頭数	典型的な 早期壊死数	組織学的壊死 (%)
SHR/Izm	10	6	0	17
	15	12	0	42
	17	12	0	58
SHR/NCrj	10	6	0	17
	15	6	0	67
SHRSP/Nagasaki	14	6	3	67
	15	4	0	25
SHRSP/Izm	17	14	6	64

のとし評価した。

1. 修復反応がみられなく、完全壊死に陥ったもの。
2. 骨頭外側部から血管に富む肉芽の侵入したものの。
3. 類骨形成を伴う肉芽による旺盛な壊死修復がみられるもの。
4. 壊死骨梁のremodelingと正常造血組織による骨髓腔の置換されたもの。

【結果】

体重と血圧は週齢に従って増加していた。
 大腿骨頭壊死は各亜系間で発生率が異なりSHRよりもSHR/SPに頻度が高く、またSHRSP/IzmとSHRSP/Nagasakiでも頻度の差があり、週齢間でも発生率が異なる。
 注目すべき点は早期壊死と思われる組織像が観察された。即ち、骨髓脂肪壊死と骨髓の不完全壊死がみられ修復機転がはたらいてなく、骨細胞の壊死がみられなかったことである (表1、図2)。

【考察】

近年世界中にSHRが広まり、諸臓器の同一の実験でSHRの系が異なると違った実験結果が出てきた。そのため標準化を目指してSHR/Izmがclose-upされている。大腿骨頭壊死の頻度および程度差に関してもSHRの亜系間の差異の可能性が考えられる。Naito等はSHRSP/Nagasakiを55匹とSHR/NCrj40匹使用し、10から16週齢で大腿骨頭壊死の発生頻度はSHRSP/Nagasakiは70%に対しSHR/NCrjが53.3% 24から36週齢では前者が45%に対し後者が20%とSHR-SP (SHRSP/Nagasaki) で通常のSHR (SHR/NCrj) よりも壊死発生頻度が高いことを報告している¹⁾。今回使用したSHR/IzmとSHR/NCrjと大腿骨頭壊死の出現時期、頻度といった出現態度は幾分異なるようである。またSHRとSHRSPではSHRSPに壊死発生頻度が高く、SHRSP/Izmの方が壊死発現の週齢が高く、典型的な早期壊死はSHRSP/Izm、SHRSP/Nagasakiで見られた。

SHRの亜系間で末梢の微少循環動態の差が存在する可能性があることが考えられる。

今回、骨髓脂肪壊死と骨髓の不完全壊死がみられ修