

図2. 早期大腿骨頭壊死 SHRSP/Nagasaki 14週齢

組織学的にepiphysisに早期壊死と思われる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また骨細胞の壊死がみられない。

修復機転がはたらいてなく、また骨細胞の壊死がない早期壊死と思われる所見をSHRSP/Nagasakiの14週齢屠殺6骨頭中3骨頭にSHRSP/Izmの17週齢屠殺14骨頭中6骨頭にみられた。

通常ラットの大腿骨骨頭無腐性壊死は人間のようにMRIなどのように経時的に検出追跡できずまた修復機転が働くので、retrospective的に組織学的所見から壊死を診断している。早期の壊死像が多数検出されたことにより更に高頻度壊死発生モデルを作製するためこの亜系でこの時期を薬物負荷などを使用することが望まれる。

更に人間の年齢とラットの週齢をパラレルには論じられないが、生殖年齢は人間が約20歳から40歳に対してラットは10週から16週。血圧の上昇は人間が約40歳からに対してラットは6週から特に顕著なものは10週以降にみられ、SHRSP/Nagasakiの14週齢、SHRSP/Izmの17週齢は人間に換算すると凡そ30歳から50歳に相当すると考えられ人間の大腿骨頭壊死の発生年齢に類似している。

今回の実験はまだ症例数も少なく、追加実験が必要

であるがその際には上記の系間の比較、免疫組織学的な検索も行う予定である。

【まとめ】

・大腿骨頭壊死のモデルとしてSHRを使用する際、至適条件（発生時期、発生頻度、典型的壊死像検出）の検索が必要である。

・SHRとSHRSPではSHRSPに壊死発生頻度が高く、典型的な早期壊死はSHRSP/Izm、SHRSP/Nagasakiで見られ、SHRSP/Izmの方が壊死発現の週齢が高かった。

SHRSP/Nagasakiの14週齢、SHRSP/Izmの17週齢が大腿骨頭壊死のモデルとして至適と考えられた。

【文献】

- 1) Naito S et al.: Femoral head necrosis and osteopenia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). Bone, 14(5):745-53, 1993.
- 2) Hirano, T., Iwasaki, K. and Yamane Y.: Osteonecrosis

of the femoral head of growing spontaneously
hypertensive rats. Acta
Orthop.,59:530-535 1988.

【学会発表】

第36回 高血圧自然発生ラット(SHR)学会
京都市 平成12年7月15日
SHR における大腿骨頭壊死の至適条件

厚生省特定疾患対策研究事業 骨・関節系研究班
特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会
平成12年度 第1回分科会会議

SHR大腿骨頭壊死に於けるNOS inhibitorの影響（第1報）

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）には心血管系、自律神経系、腎機能、免疫系などの異常とともに大腿骨頭の無腐性壊死が生じることが知られている。

【目的】

壊死の阻血的原因として血管内皮系特にNO合成酵素（以下NOSと略）を検索すべく、NOS阻害剤（inhibitor）をSHRに投与し、大腿骨頭を観察してNOの血管病変関与の有無を調べ、より安定した高頻度の壊死発生を生じさせること。

【材料&方法】

ラットはCharles River Japan社から購入したSHRラット（SHR/Ncrj）とSHR共同研から購入したSHR/SPイズモラット（SHRSP/Izm）を使用し、8から15週齢の種々のgroupを設定しL-NNA含有高コレステロール飼料（HFC固形飼料・表1）を約2週間与え、一部のgroup（A、B）では食塩水添加した。屠殺後、生化学検査、標本採取を計画した（図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、定期的観察し各週に血圧、体重を計測した。

【結果】

体重と血圧について HFC固形飼料を与えると増

表1. L-NNA含有高コレステロール飼料（HFC固形飼料）の組成

L-NNA含有高コレステロール食（HFC固形飼料）

SP飼料	68%
コレステロール	5%
コール酸	2%
牛脂粉末	25%
L-NNA	0.023%

（L-NNA：N^G-nitro-L-arginine：NO synthesis inhibitor）

加傾向はみられなく、特に食塩水付加群では2週間で瀕死の状態まで陥り多臓器障害を生じていた（図2）。血液生化学検査では総コレステロール値、トリグリセライド値が著明に上昇し高脂血症を呈し、電解質異常も呈していた（表2）。

大腿骨頭の壊死の頻度は各群概ね50%でややEgroupで高かった（表3）。

HFC固形飼料と食塩水を与えたSHR/Ncrjでは非投与コントロールに比較して比較的若い10週齢で週齢で壊死の頻度が高かった（表4）。

大腿骨頭血管の顕微鏡観察（H&E染色）ではNOS inhibitor投与による影響は見出せなかった。

【考察】

人間の大腿骨頭の無腐性壊死の原因として血液凝固系の異常、血管内皮異常、ステロイドホルモン、高脂血症などの異常が考えられている。そのうちの血管内皮細胞に着目すると血管内皮細胞内のNOSで産生されるNOは血管平滑筋に作用し、主に血管拡張作用を有すといわれている。1988年からの当教室の研究では大腿骨頭壊死が雄ラットに好発していることから壊死の原因にEstrogenの関与が考えられる。また一般にNOSとEstrogenの相互相乗作用があることやSHR-Spで昇圧にともないeNOSが減少する報告がある¹⁾ことからNOの大腿骨頭の無腐性壊死への関与が考えられる。家兔にステロイドホルモンを投与し作成した大腿骨頭壊死モデルで高脂血症が壊死に対する関与の報告が数々あり、酸性コレステロールの存在下でNOS inhibitor投与すると高脂血症、動脈硬化を呈すことも知られている。

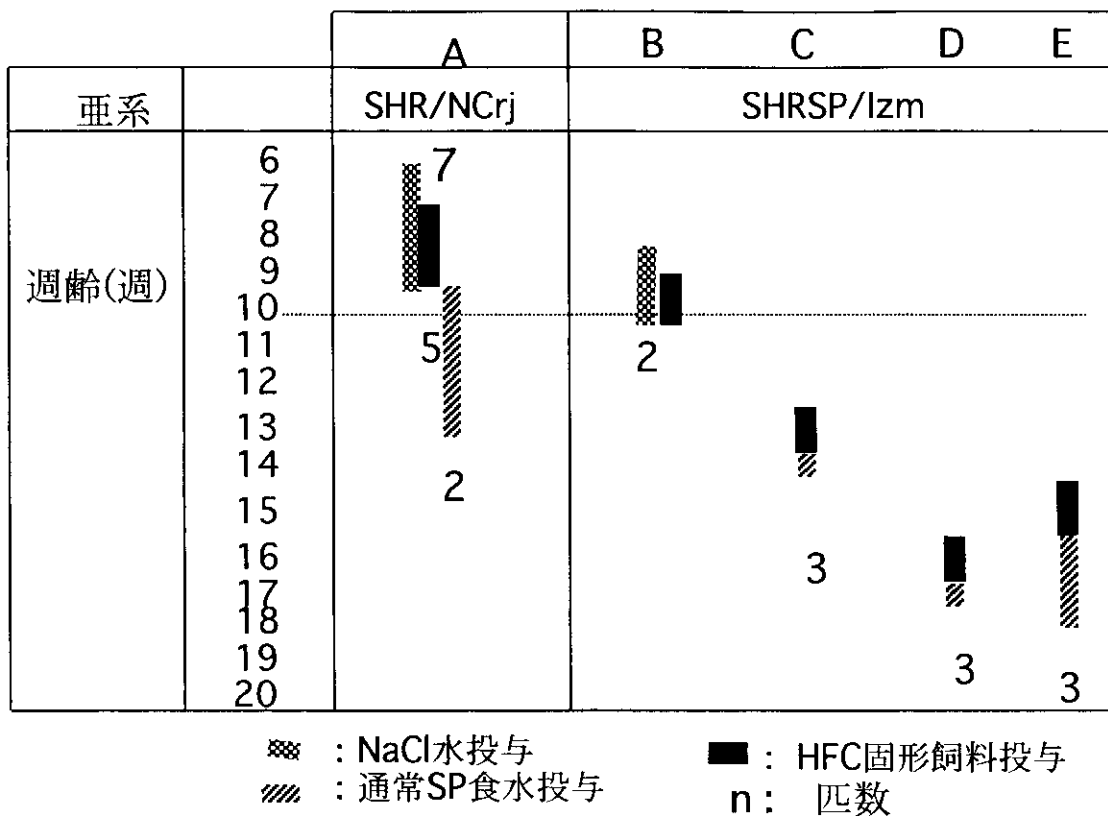


図1. 対象 (使用したSHRラットの亜系、週齢、匹数の一覧表)

SHRラット(SHR/NCrj)とSHR/SPイズモラット(SHRSP/Izm)を使用し、8から15週齢の種々のgroupを設定しL-NNA含有高コレステロール飼料(HFC固形飼料・表1)を約2週間与え、一部のgroup(A, B)では食塩水添加した。

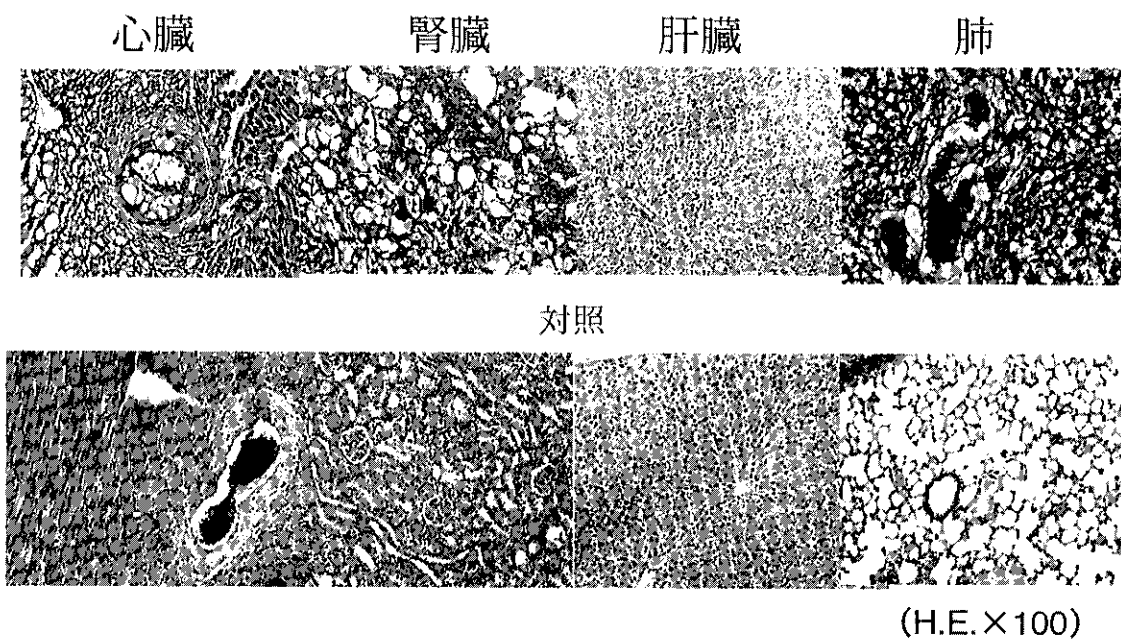


図2. 臓器障害 SHR/NCrj 10wks A group

HFC固形飼料を与え、食塩水付加したA groupでは瀕死の状態であった。対照に比較して冠動脈の動脈硬化、心筋や肝臓や腎臓細胞の脂肪変性、無気肺の著明な変化がみられた。

表 2. 結果. Labo-data

血液生化学検査では総コレステロール値、トリグリセライド値が著明に上昇した高脂血症を呈し、電解質異常も呈していた。

結果. Labo-data

亜種	group	n	週齢			T-CHO	TG	Na	K	Cl
			開始	終了	屠殺					
SHR/NCrj	A	3	6	10	10	230.3	62.3	187.6	4.2	86.7
SHRSP/lzm	B	1	8	10	10	126		148	3.9	107
	C	2	12	14	15	700	124	151	7.5	86.5
	E	3	14	16	19	123.3	117	141.3	5.4	95

正常値	週齢	T-CHO	TG
SHRSP/lzm	8	70.4 ± 2.7	40.2 ± 3.9
	10	66.8 ± 4.1	47.6 ± 1.8
SHR/lzm	8	75.4 ± 5.5	36.8 ± 4.9
	10	64.8 ± 3.9	34.4 ± 4.7

表 4. SHR/NCrjでの比較

L-NNA 含有高コレステロール飼料と食塩水を与えたSHR/NCrjでは非投与コントロールに比較して比較的若い10週齢で週齢で壊死の頻度が高かった。

大腿骨頭無腐性壊死頻度の比較
(♂ SHR/NCrj)

	週齢				
	9	10	12	15	20
NOS inhibitor 投与群					
壊死骨頭数		5		2	
対象総骨頭数		10		4	
対照					
壊死骨頭数	1		1	9	8
対象総骨頭数	12		12	12	44

故にNOS inhibitor投与でNO産生を阻害し、高脂血症を作成し、大腿骨頭観察を行えば大腿骨頭壊死発生に於けるNOの関与の解明が可能とおもわれた。

ラットの高脂血症の作成は難しいが、Ikeda.K.らがSHRSPに動脈硬化、心筋梗塞を生じさせた方法に準じて行なった²⁾。

SHRラットのどの亜系、どの週齢に投与するかはIkeda.K.がSHRSPに行った8週齢、筆者等がおこなった骨頭壊死の至適条件の研究(SHR-SP/lzmの17週齢)に従って計画した。今回の結果ではNOS inhibitor投与による大腿骨頭壊死の顕著な増加はなかった。しかし非投与コントロールに比較してSHR/NCrjで若い10週齢で壊死の頻度が高かったことは(表4)NOSのかなり若い時期に血管内皮への関与が示唆された。

今回臓器障害が強く瀕死の状態を呈しNOS inhibitor

表 3. 結果. 各groupの壊死率

大腿骨頭の壊死の頻度は各群概ね50%でややE groupで高かった。

結果. 各groupの壊死率

亜種	group	n	週齢			壊死数	総骨頭数	壊死率
			開始	終了	屠殺			
SHR/NCrj	A	5	6	10	10	5	10	0.5
		2	6	10	14	2	4	0.5
SHRSP/lzm	B	3	8	10	10	3	6	0.5
		3	12	14	15	3	6	0.5
	D	3	15	16	17	3	6	0.5
		3	14	16	19	4	6	0.67

の毒性が目立った。

NO合成酵素には細菌成分のリポポリサッカライドやサイトカインによって誘導される誘導型NO合成酵素(iNOS)、血管内皮細胞に局在し継続的にNOを産生する血管内皮型NO合成酵素(eNOS)、主に中枢・末梢神経系に局在し神経伝達物質の一つとされるNOを産生する神経型NO合成酵素(nNOS)の3種が知られている。

NOS inhibitorは最近種々の薬剤が開発製品化されているがL-NAME、L-NMMA、L-NNAが最も広範に用いられている。これら3種の阻害剤はcNOS(eNOS、nNOS)、iNOSともに阻害作用を示すとされているが、3品の作用強度は用いる組織や細胞によって異なる。今回大腿骨の血管内皮に注目したがNOS inhibitorでいろいろな臓器、部位に作用し臓器障害を呈したものと思われる。今後NOS inhibitorの選択、投与量の更なる検討し、CまたはEgroupの様式で実験個数を積み重ねる予定である。

また大腿骨頭血管の顕微鏡観察(H&E染色)ではNOS inhibitor投与による影響は見出せなかったので今後組織化学検索も行う必要がある。

【まとめ】

- ・SHRにNOS inhibitor含有高コレステロール食を投与し大腿骨頭壊死の動態を観察した。
- ・SHR/NCrjでは壊死自然発生頻度の低い10週齢でその頻度は上昇傾向がみられた。
- ・SHR大腿骨頭壊死モデルにおいて血管内皮細胞、NOひいては動脈硬化の壊死への関与が若干示唆された。

【文献】

- 1) Hirata, Y. et al.: Nitric oxide release from kidneys

of hypertensive rats treated with imidapril.

Hypertension 29:1296-1302 (1997)

- 2) Ikeda .K.: Nitric oxide deficiency induces myocardial infarction in hypercholesterolaemic stroke-prone spontaneously hypertensive. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (1997) 24. 0344-348

【学会発表】

日本リウマチ関節外科学会誌 Vol.19. Suppl. 2000
144

SHRにおける大腿骨頭壊死のNOS阻害薬の影響

第28回日本リウマチ・関節外科学会 2000年10月21
日

岡山市

厚生省特定疾患対策研究事業 骨・関節系研究班
特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会
平成12年度 第2回分科会会議

全身性エリテマトーデス患者におけるステロイド大量投与後の高脂血症が大腿骨頭壊死症発症に及ぼす影響に関する研究

津田 裕士 (順天堂大学医学部膠原病内科)

全身性エリテマトーデス (SLE) に合併する大腿骨頭壊死症の病因として、ステロイドの副作用である高脂血症の関与が考えられ、これを抑制することが、大腿骨頭壊死症の発症を低下させることが可能ではと考えられる。そこで、ステロイド投与を施行する SLE 患者に高脂血症の治療として、スタチン系薬剤の投与、及び血漿交換療法の併用をおこない大腿骨頭壊死症の発症が抑制されるかを検討する。血漿交換療法としては免疫吸着法と二重膜濾過法をおこない、どちらの方法が発症を抑制する事が可能かをも検討する。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (以下 SLE) 患者において、大腿骨頭壊死症 (以下 AN) の発症は機能的予後を左右する大きな問題の一つである。その発症の原因と考えられる因子がこれまでいろいろと報告されており、SLE そのものの病態の一つとして発症することも考えられているが⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾、ステロイドの副作用として AN が発症するとの認識が一般的である⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾。その中でもステロイド高脂血症が関与しているとの報告も認められている。

SLE 患者における AN の発症の危険因子として、若年での発症⁽⁷⁾、レイノー現象⁽⁵⁾⁽⁸⁾、ステロイド療法後の Cushingoid habitus、血管炎⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾、静脈血栓症、喫煙、preeclampsia (子癇)⁽⁴⁾、白血球減少⁽⁸⁾等が報告されており、血液粘稠度高値、ステロイド高脂血症、糖尿病、抗リン脂質抗体陽性、凝固異常も SLE の AN 発症の危険因子となりうる事が考えられている。前回我々も報告したが、高脂血症は AN 発症群と、AN 非発症群とにおいて有意な差は認めなかったが、発症群において総コレステロールが高い症例が多い傾向を認めた。IgG のみ有意な差を認めており、高脂血症、LAC 陽性患者は有意ではなかったが AN 発症群に多い傾向であった。また、男性患者に AN 発症の危険性が大きいことが明らかだった。

このことから、SLE の治療としてステロイドを大量に使用する症例において、高脂血症をコントロー

ルすることが AN 発症の危険性を抑制する可能性があるのではないかと考えられる。

そこで、今回我々は、ステロイドによる高脂血症をコントロールすることで AN 発症を抑制できるかを検討するために、ステロイドを中等量以上投与する患者にたいし、ステロイド投与開始とともに抗高脂血症治療薬を投与する群と、その治療に血漿交換療法を併用する群を設定し、AN 発症を抑制することが可能であるかを検証するための prospective study を開始する。

B. 研究方法

対象

対象患者は、アメリカリウマチ協会の SLE の診断基準を満たす患者のうちで、初発でステロイド治療の既往のない患者。あるいは、ステロイド維持量にて経過観察していたもので、SLE の増悪を認め、ステロイド増量する患者のなかで、以下の治療を開始する者とする。これらの患者は股関節痛の自覚症状がなく、X線、MRI にて AN のないことを確認する。

1. 初回ステロイド治療開始患者

プレドニン換算で30mg/day以上、あるいは0.5mg/Kg/day以上のステロイド投与を開始する患者。

2. ステロイド増量患者

維持量よりプレドニン換算40mg/day以上に増量する患者。あるいは1.0mg/Kg/day以上にステロイドを増量する患者。

3. ステロイドパルス療法患者

ステロイド治療の既往がなくパルス療法初回の患者。あるいは維持量よりパルス療法を開始する患者。パルス療法はソルメドロール500mg/day, 1000mg/dayのどちらでも良い。

以上の患者を選択し、以下に述べる治療法を行い、経過を追いANが発症しないかを観察していく。

ステロイド増量群、ステロイド維持量よりパルス療法を施行する症例においては、これまで大量の(プレドニン換算でおよそ1mg/Kg/day以上)投与を受けていない症例を原則とする。

高脂血症の治療法

1. 抗高脂血症剤としてスタチン系のみを使用する群

スタチン系薬剤としてはセリバスタチンを使用する。投与量は当初0.15mgより投与開始し、効果をみて0.3mg/dayまで増量可能とする。

2. スタチン系薬剤に加え血漿交換療法として免疫吸着法を施行する群

スタチン系薬剤としてセリバスタチンを投与し、同時に血漿交換療法として免疫吸着法を施行する。

3. スタチン系薬剤に加え血漿交換療法として二重膜濾過法を施行する群

スタチン系薬剤としてセリバスタチンを投与し、同時に血漿交換療法として二重膜濾過法を施行する。

以上の3群の治療法に患者を無作為に振り分け、ステロイド治療開始時、および増量、パルス療法開始時より治療を開始する。

SLEの活動性、T-Choの脂質の値等によって、血漿交換療法の頻度を検討するが、原則的には週1回の頻度で開始する。以降はSLEの活動性により2~4週に1回の頻度で行う。

血漿交換療法

血漿交換療法の方法は、免疫吸着療法と二重膜濾過法とを選択し行い、患者は無作為に振り分ける。免疫吸着療法はポアサイズ(孔径)0.3 μ mの中空糸膜にて血液を血球成分と血漿成分とを分離し、分離された血漿を超低比重リポ蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、低比重リポ蛋白(low density lipoprotein, LDL)に存在するアポリポ蛋白Bを認識し、高い静電的親和性により吸着する特性を持ったデキストラン硫酸をリガンドとしたセルロースビーズの詰まったカラムを通すことにより、VLDL、LDLを除去する(図1)。このような方法でVLDL、LDLを除去することによりコレステロール、中性

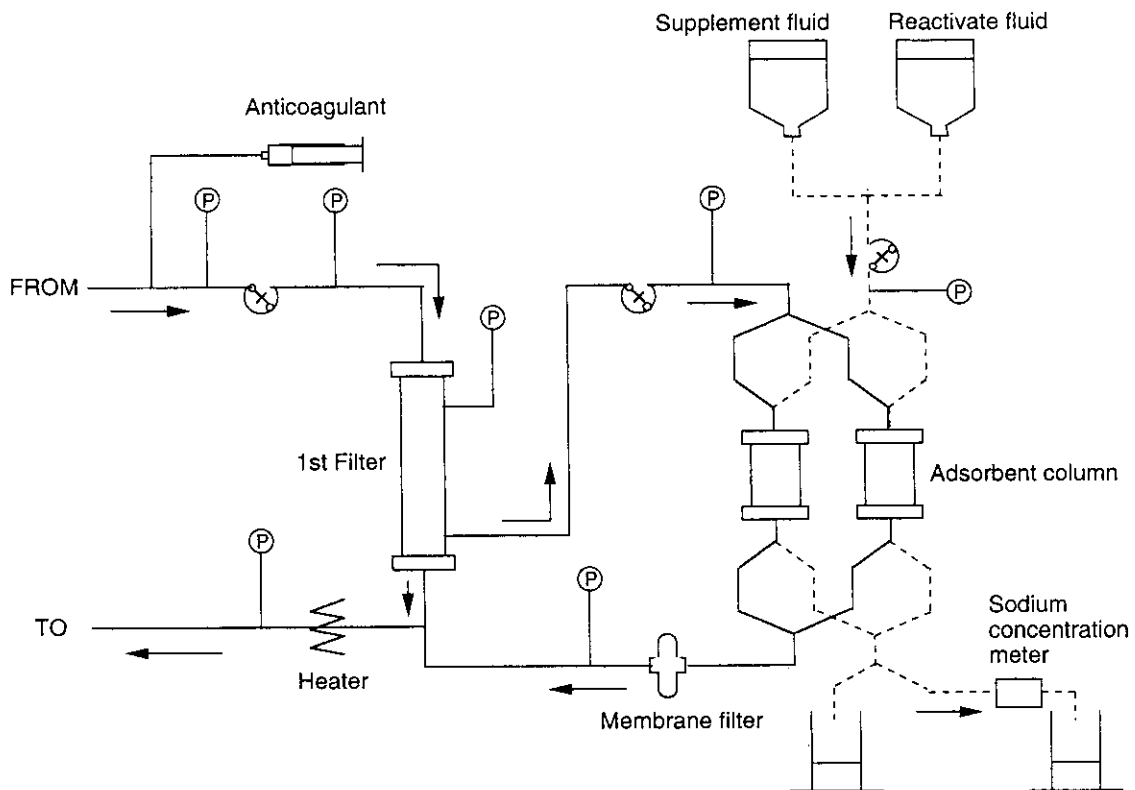


図1. 免疫吸着療法

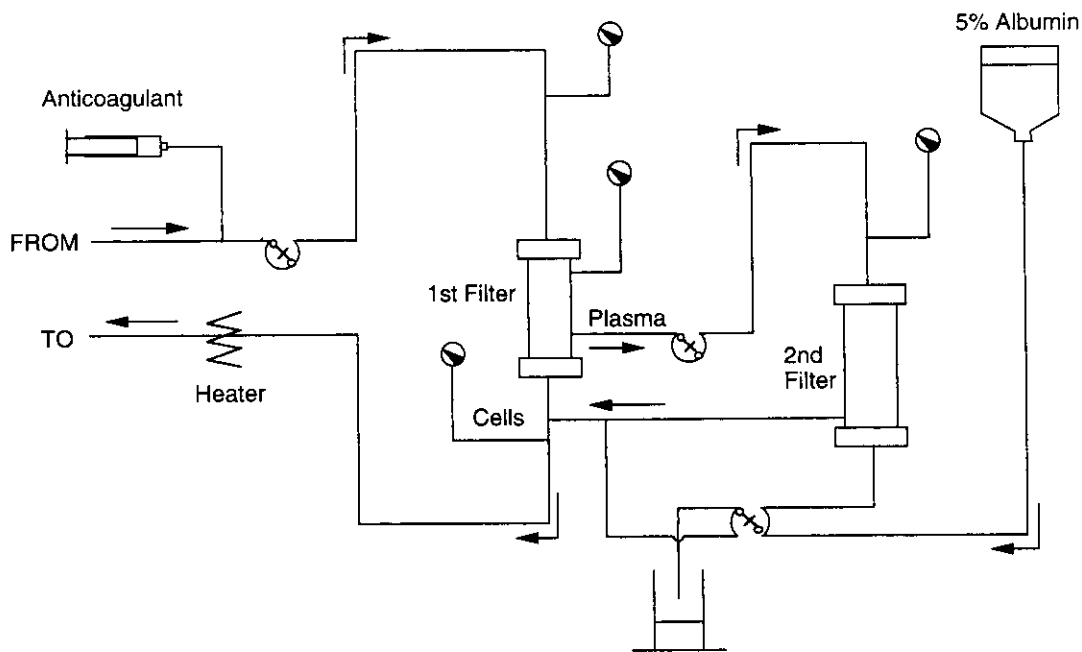


図2. 二重膜濾過法

脂肪を低下させるが、抗動脈硬化作用を持つ高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) は殆ど吸着しない。また、このカラムは LDL を吸着する他に、抗リン脂質抗体や抗 DNA 抗体を吸着する性質もっており SLE の治療としても用いられている。

二重膜濾過法は、中空糸膜にて血液を血漿成分に分離した後、ポアサイズ (孔径) $0.03 \mu\text{m}$ と更に細かな中空糸膜にて濾過除去することにより、より粒子サイズの大きいリポ蛋白を除去することでコレステロール、中性脂肪を低下させる (図2)。この療法においては、自己抗体を含む免疫グロブリンや免疫複合体を除去することにより SLE の治療法として行われている。また、血液粘度を上昇させ、血流を妨げると考えられる高分子物質も一緒に除去することが可能であり、血症粘稠度の低下も認められる。この時免疫グロブリン、アルブミンなどの蛋白質も除去廃棄されてしまうために、アルブミン製剤の補充を必要とする。免疫吸着療法においてはこのような補充は必要としない。

検査項目

1. 脂質系：T-Cho、HDL-C、LDL-C、VLDL-C、TG、ApoA-I、ApoB、ApoE、ApoCII、Lp (a)、RLP-C (remnant like lipoprotein cholesterol)、LPL (lipoprotein lipase)

2. 凝固系：ループスアンチコアグラント (LAC)、抗リン脂質抗体 (αCL)、抗 $\beta 2\text{GP I}$ 複合体抗体、IgG、Fib等

脂質系、及び凝固系のうち IgG、Fib は治療開始時、開始後1ヶ月毎に3ヶ月まで測定し、以降は3ヶ月毎測定する。LAC、 αCL 、抗 $\beta 2\text{GP I}$ 複合体抗体は3ヶ月毎に測定する。

3. 大腿骨頭MRI

治療開始前、治療開始3ヶ月後、6ヶ月後、1年後、以後1年毎に検査を行い、経過中に股関節痛を訴えれば、その時点で検査を施行する。

4. SLE の活動性は血液採血時毎に評価する。

研究対象者へのこの研究における医学倫理的配慮について

研究等の対象となる個人及びその家族等の関係者に対する人権の擁護策として、対象患者に対して、本研究の目的、方法、予測される結果と副作用等について、事前に十分な説明を行い、患者本人及びその家族の理解と自由意志による同意を得た後に治療を施行することとする。また、一旦同意した後にその同意を撤回した場合は、直ちに本研究を中止する。同意しない場合や同意を撤回した場合にも、その後の診療においていかなる不利益も受けることがないように十分配慮する。研究成果の発表にあたっては、

患者個人の氏名は一切公表せず、個人の人権が確実に守られるよう注意を払う等配慮する。

以上のようなプロトコールにて SLE 患者に対するステロイド治療後の高脂血症を抑制することが、大腿骨頭壊死症の発症を抑制するかを検討していく。

文 献

1. Velayos EE, Lordholt JD, Smyth CJ, Priest R. Arthroplasty associated with steroid therapy. *Ann Intern med* 1966;64:759-71.
2. Leventhal GH, Dorfman HD. Aseptic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. *semin Arthritis Theum* 1974;4:73-93.
3. Mok CC, Lau CS, Cheng PW, Ip WY. Bilateral Kienbock's disease in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1997;26:485-7.
4. Mont MA, Glueck CJ, Pacheco IH et al. Risk factors for osteonecrosis in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997;24:654-62
5. Zizix TM, Marcoux C, Hungerford DS, Dansereau J-Y, Stevens MB. Corticosteroid therapy associated with ischemic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1985;79:596-604
6. C. C. MOK. Risk factors for avascular bone necrosis in systemic lupus erythematosus. *British J Rheumatol*. 1998;37:895-900
7. Smith FE, Sweet DE, Brunner CM, Davis JS IV. Avascular necrosis in systemic lupus erythematosus. An apparent predilection for young adults. *Ann Rheum Dis* 1976;35:227-32
8. Klipper AR, Stevens MB, Zizic TM, Hungerford DS. Ischemic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Galtimore)* 1976;55:251-7

慢性関節リウマチにおける股関節破壊メカニズムに関する研究

田中 栄 (東京大学医学部付属病院整形外科)

慢性関節リウマチ (RA) 患者の中には急速に股関節破壊を来す症例が存在する。われわれはこのようなタイプのRA股関節破壊に注目し、その臨床像の検討および組織学的な検討を行った。その結果これらの症例においては組織学的にアポトーシスをおこしている骨細胞の割合が高いことを見出した。アポトーシスをおこしている骨細胞の周囲には tumor necrosis factor- α 染色にて陽性像を示す細胞が存在した。また骨細胞株細胞である MLO-Y4 細胞において TNF- α によってアポトーシスが誘導された。TNF- α によっておこる骨細胞アポトーシスが RA 股関節破壊に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は慢性の関節炎を特徴とする全身性の炎症疾患である。病変が進行すると、軟骨、骨の著しい破壊を引き起こし、関節の機能低下を導く。その股関節病変もまた多彩な病態を示すが、中には急速に大腿骨頭の破壊に至る症例が存在する。このような症例では MRI 上も病理組織上も骨頭の壊死を示唆するような所見が認められる。本研究は RA 股関節破壊のメカニズムを細胞レベルで検討し、特発性大腿骨頭壊死とのアナロジーを模索することによってその発生メカニズムのヒントを得ることを目的としている。

B. 研究方法

当科において平成 3 年から平成 11 年までに人工股関節全置換術 (THA) を行った RA 症例 30 例を対象とした。術前に X 線学的に股関節破壊様式を骨破壊 (BD) 型、炎症性破壊 (ID) 型、変形性関節症 (OA) 型の 3 型に分類した。全例術前にインフォームドコンセントを得、THA 術中に摘出した骨頭を病理学的に検討した。骨細胞アポトーシスは transferase-mediated dUTP-nick end labeling (TUNEL) 染色および電子顕微鏡による形態変化の観察によって判定した。培養骨細胞としては Lynda Bonewald らによって樹立されたマウス骨細胞の株細胞である MLO-Y4 細胞を用いた。細胞の生存は MTT assay および Hoechst 染色による核染色によって検討した。

(倫理面への配慮)

手術検体の採取に際してはあらかじめ患者の了承を文書にて取り、プライバシーの保護には十分に配慮した。

C. 研究結果

当科において上述期間に THA を行った RA 症例は 30 例でその内訳は BD 型 15 例、ID 型 14 例、OA 型 1 例であった。症例の少ない変形性関節症型を除いた 2 つのタイプの間にはステロイド 1 日使用量 (骨破壊型 7.5 mg, 炎症性破壊型 5 mg) 以外に臨床的に有意な差は認められなかった。病理組織検討を行った症例の一部 (12 例) について骨細胞のアポトーシスを TUNEL 染色にて検討した結果、Firestein のグレードで BD 型 3.0, ID 型 2.2 であった (図 1)。骨細胞のアポトーシスは電子顕微鏡による観察にても確認された。破壊骨頭における TNF- α の発現を免疫染色にて検討したところ、diffuse な陽性染色像が認められた (図 2)。マウス骨細胞 cell line MLO-Y4 細胞を用いた検討によって TNF- α は用量依存的に骨細胞の survival を抑制することが明らかになった。TNF- α で刺激した細胞では核の濃染像などが認められ、アポトーシスをおこしていることが示唆された (図 3)。

D. 考察

RA は全身性の炎症性疾患であり、さまざまな関節に著明な骨破壊を来す。股関節の罹患頻度も高く、

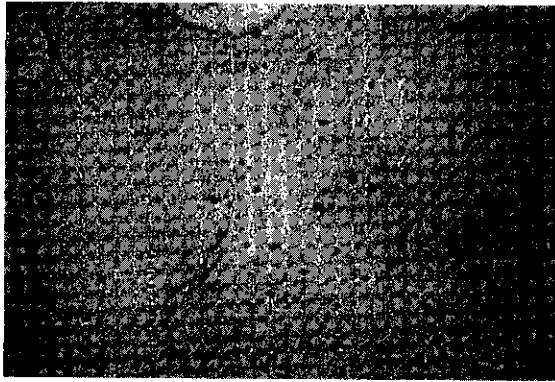


図 1. RA 破壊大腿骨頭のTUNEL染色。
多数の陽性細胞が認められる。



図 2. 抗TNF-α抗体による免疫染色。
骨周辺の結合組織に陽性染色像が見られる。



図 3. TNF-α 処理したMLO-Y4 細胞。
核の濃染像が見られる。

越智らの報告によるとムチランス型では約80%、多関節型でも40%近くの患者において股関節に破壊が認められるとしている。今回の研究から、このような大腿骨頭においては骨細胞のアポトーシスが生じていることが明らかになった。昨年 Manolagasらのグループはステロイド性大腿骨頭壊死の大腿骨にお

いて骨細胞アポトーシスが生じていることを報告した。また加畑らもウサギステロイド骨壊死モデルにおいて骨髄細胞のアポトーシスが生じていることを報告している。われわれの研究、およびこれらの報告から骨細胞、あるいは骨髄細胞のアポトーシスが慢性関節リウマチ、そして特発性大腿骨頭壊死における骨頭破壊に重要な役割を果たしていると考えられる。われわれはこのようなRAおよび特発性大腿骨頭壊死における骨細胞アポトーシスに共通の分子メカニズムが存在するのではないかと仮説の元に研究を行っている。

最近慢性関節リウマチの病態においてTNF-αが重要な役割を果たしていることが明らかになっており、臨床的にもTNF-αの抗体、あるいは可溶性レセプターがRA骨破壊予防に有効であると報告されている。破壊をおこした骨頭にも免疫染色によってdiffuseなTNF-αの陽性染色像が認められたこと、培養骨細胞を用いた検討からTNF-αが骨細胞の細胞死を促進することなどから、RA大腿骨頭における骨細胞アポトーシスはTNF-αを介している可能性が示唆された。来年度以降は特発性大腿骨頭壊死における骨細胞アポトーシスにおけるTNF-αの関与についてモデル動物、臨床検体を用いて検討を進めたい。

E. 結論

RA股関節破壊において大腿骨頭の骨細胞アポトーシスが認められ、このような現象がTNF-αを介している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Miyazaki, H. Takayanagi, M. Isshiki, T. Takahashi, M. Okada, Y. Fukui, H. Oda, K. Nakamura, H. Hirai, T. Kurokawa, and S. Tanaka. In vitro and in vivo suppression of osteoclast function by adenovirus vector-induced csk gene. *J. Bone Miner. Res.* 15:41-51, 2000
- 2) H. Takayanagi, H. Iizuka, T. Juji, T. Nakagawa, A. Yamamoto, T. Miyazaki, Y. Koshihara, H. Oda, K. Nakamura, and S. Tanaka. Receptor activator of nuclear factor κB ligand/ Osteoclast differentiation factor is involved in osteoclastogenesis from synovocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:259-269, 2000

- 3) T. Miyazaki, H. Katagiri, Y. Kanegae, H. Takayanagi, Y. Sawada, A. Yamamoto, M.P. Pando, T. Asano, I.M. Verma, H. Oda, K. Nakamura, and S. Tanaka Reciprocal Role of ERK and NF- κ B pathways in survival and activation of osteoclasts. *J. Cell Biol.* 148: 333-342, 2000
- 4) T. Miura, S. Tanaka, A. Seichi, M. Arai, T. Goto, H. Katagiri, T. Asano, H. Oda, and K. Nakamura. Partial functional recovery of paraplegic rat by adenovirus-mediated gene delivery of constitutively active MEK1. *Exp. Neurol.* 166:115-126, 2000
- 5) T. Nakagawa, S. Tanaka, H. Suzuki, H. Takayanagi, T. Miyazaki, K. Nakamura, and T. Tsuruo. Over-expression of the csk gene suppresses tumor metastasis in vivo. *Int. J. Cancer* 88:384-391, 2000
- 6) Y. Yoshida, S. Tanaka, H. Umemori, O. Minowa, M. Usui, N. Ikematsu, E. Hosoda, T. Imamura, J. Kuno, T. Yamashita, K. Miyazono, M. Noda, T. Noda, and T. Yamamoto. Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* 103:1085-1097, 2000
- 7) N. Kobayashi, Y. Kadono, A. Naito, K. Matsumoto, T. Yamamoto, S. Tanaka, and J.-I. Inoue. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J*, in press

2.学会発表

- 1) Eighth Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease (2000.4.1-4) ダボス Reciprocal role of ERK and NF- κ B pathways on survival and activation of osteoclasts.
- 2) 埼玉骨代謝研究若手の会 (2000.5.11) 川越 破骨細胞の機能発現の分子メカニズム
- 3) 第44回日本リウマチ学会総会 (2000.5.13-15) 横浜 バイポーラ型人工肩関節の展望
- 4) 動物への遺伝子導入とその応用の開発研究会 第24回定例会 (2000.6.7) 東京 破骨細胞機能発現の分子メカニズム
- 5) Advances in Tissue & Genetic Engineering for the Treatment of Arthritic Diseases (2000.9.11-12) ボストン Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus vector-mediated gene transfer
- 6) 第15回日本整形外科学会基礎学術集会 (2000.9.28-29) 京都 シンポジウム「臨床応用のための運動器細胞の分化と機能の制御」破骨細胞・

高齢者の大腿骨頭軟骨剥脱に関する研究

樋口富士男・日高大次郎（久留米大学医療センター・整形外科）

特発性大腿骨頭壊死症の特異的な肉眼所見に骨頭関節軟骨の趨壁形成や剥脱がある。人工股関節置換術時に骨頭軟骨剥脱を伴った高齢者の股関節疾患症例を臨床的および病理学的に検討したところ、特発性大腿骨頭壊死症が6股、変形性股関節症が2股、急速破壊型股関節症が1股であった。骨頭軟骨の剥脱部位は、そのほとんどが軟骨下骨であり、骨粗鬆症の関与が示唆された。

A. 研究目的

高齢者の特発性大腿骨頭壊死症の特徴を明らかにすることを目的として、特発性大腿骨頭壊死症に特異的な肉眼所見である骨頭関節軟骨の趨壁形成や剥脱を伴った高齢者の股関節疾患症例を臨床的および病理学的に検討した。

B. 研究方法

1999年1月から2000年6月までの間に、人工股関節置換術の術中骨頭関節軟骨が軟骨下骨から剥脱していた8例9股関節を対象とした。全例女性で、手術時年齢は60歳から87歳平均73歳で、2例が両側罹患1例が両側手術例であった。特発性大腿骨頭壊死症の誘因であるアルコールの愛飲やステロイドの内服歴を有する症例は、慢性関節リウマチの診断のもとにステロイドを少量（隔日にプレドニン5mg）服用していた一例のみであった。これらの症例の画像診断、骨塩量測定と摘出骨頭の病理組織学的検査を行った。

（倫理面への配慮）

患者へは口頭で、研究内容の説明と実施の承諾を得た。

C. 研究結果

特発性大腿骨頭壊死症調査研究班の診断基準と、これらの症例の諸検査所見を比較すると、骨頭圧潰は全9股に見られ、帯状硬化像の形成は8股に見られたが、必要条件としての関節裂隙の状態は温存が5股、狭小化が3股、消失が1股であった。骨シンチグラムの cold in hot は検査できた5股全例に見ら

れ、MRIの band pattern は検査できた6股中5股にみられたが、二次性変形性股関節症の経過中急速に骨頭圧潰を示した例では、圧潰前の検査時点でこれらの所見は認めなかった。多発性骨壊死は、検査できた7股関節中2例が両股関節罹患だったが、他の部位の骨壊死は一例も認めなかった。摘出骨頭の病理学的検討を行った7例7骨頭のうち5骨頭に骨壊死を認めたが、急速破壊型股関節症の一例（症例6）は急速破壊型股関節症の病理所見であり¹⁾、画像診断で3つの項目を満たす1例（症例1）で骨壊死を認めなかった。また画像診断で1つの項目しか満たさなかった1例（症例2）では病理検査で骨壊死を認め特発性大腿骨頭壊死症の確定診断を得た。高齢者の骨頭軟骨剥脱9股の病理組織学的を加味した最終診断は、特発性大腿骨頭壊死症が6股、変形性股関節症が2股、急速破壊型股関節症が1股であった（表1、2）。骨頭軟骨の剥脱部位の病理組織学的所見は、確認できた5骨頭のうち4骨頭では軟骨下骨で剥脱して修復組織が骨の表面を覆っていたが（図1）、症例7は関節軟骨がTide markで剥がれその間に線維組織が侵入していた（図2）。

D. 考察

高齢者の特発性大腿骨頭壊死症は、一側性で、女性に好発しステロイドやアルコールなどの誘因のない狭義の特発性が多く、X線学的には早期に関節裂隙が狭小化することが多いなど、若年・壮年期の特発性大腿骨頭壊死症とは趣が異なる^{2) 3)}。一方、高齢者に好発する急速破壊型股関節症は、早期から白蓋も侵されることで大腿骨頭壊死症と区別される

表 1. 患者の臨床的背景

症例	年齢	性	誘因	多発性骨壊死	画像診断陽性数
1	73	F	なし	なし	3
2	87	F	なし	未検	1
3	66	F	なし	あり	4
4	81	F	なし	未検	1
5	79	F	なし	あり	4
6	60	F	なし	なし	1
7	67	F	なし	あり	4
8	71	F	ステロイド	なし	4
9	72	F	なし	なし	2

表 2. 患者の骨塩量・病理組織所見

症例	骨塩量(若年成人)	骨塩量(年齢平均)	病理	剥脱部位	確定診断
1	79%	105%	関節症	軟骨下骨	OA
2	52%	84%	骨壊死	軟骨下骨	ION
3	77%	98%	未検		ION
4	46%	73%	未検		OA
5	61%	94%	骨壊死	不明	ION
6	91%	109%	RDC	軟骨下骨	RDC
7	77%	98%	骨壊死	Tide mark	ION
8	75%	99%	骨壊死	不明	ION
9	53%	73%	骨壊死	軟骨下骨	ION

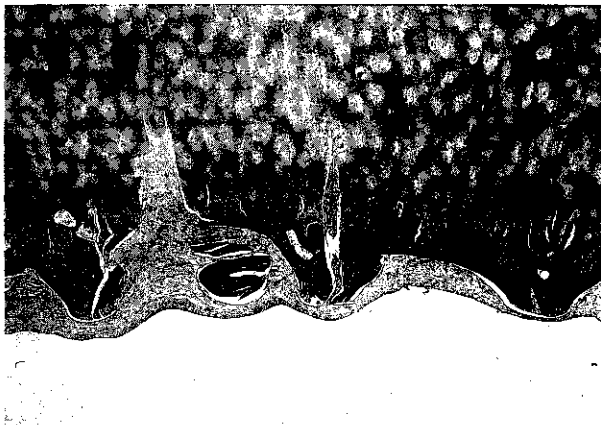


図 1. 骨頭軟骨の剥脱部位の病理組織学的所見。軟骨下骨で剥脱して修復組織が骨の表面を覆っている（症例 2）。



図 2. 症例 7 では関節軟骨が Tide mark で剥がれその間に線維組織が侵入していた。

が、一側性が多いこと、女性に好発しステロイドやアルコールなどの誘因がないこと、病理所見に骨壊死が見られる例が多いことなど、その病像は末期の特発性大腿骨頭壊死症と類似している¹⁾。また、最近では高齢者での骨頭の圧迫骨折を契機として股関節破壊に至る病態も考えられている^{4) 5) 6)}。

関節軟骨剥脱例を特発性大腿骨頭壊死症の診断基

準にあてはめると 9 股中 6 股が画像診断の 4 項目のみで診断できたが、そのうち 1 股は病理学的検査で骨壊死を認めなかった。逆に、画像診断で特発性大腿骨頭壊死症の診断基準を満たさなかったが病理学的検査で骨壊死を認め、特発性大腿骨頭壊死症と診断できたのが 1 股であった。骨粗鬆の程度を知る目的で骨塩量測定を行ったところ、特発性骨頭壊死症

のうち骨頭軟骨下で関節軟骨が剥脱していた4例はいずれもYAM値が70%以下の骨粗鬆症を合併していた。しかし、急速破壊型股関節症や変形性股関節症例では年齢平均より高値を示す例もあり、今後は骨形成マーカーや骨吸収マーカーなど骨代謝の分析が必要と思われた。

E. 結論

荷重部関節軟骨が剥脱した例では関節裂隙が狭小化すると考えられるが、その原疾患は高齢者では特発性大腿骨頭壊死症のほかに急速破壊型股関節症や一次性変形性股関節症も含まれていた。

参考文献

- 1) 戸次鎮史、井上明生、樋口富士男、藤川謙二、藤田 彰：急速破壊型股関節症にみられる骨頭壊死と特発性大腿骨頭壊死症の病理組織学的検討. *Hip Joint*, 12: 16-20, 1986.
- 2) 井上明生、樋口富士男、志波直人、大川孝浩、木下 斎、平沼成一、服巻直也、宮本義明、吉田和博：老人の特発性大腿骨頭壊死. 厚生省特発性大腿骨頭壊死症調査研究班 昭和63年度報告書: 257-260, 1989.
- 3) Shibayama K: Idiopathic osteonecrosis of the femoral head in the elderly. *Kurume Med J* 47:37-43, 2000.
- 4) Bangil M, Soubrier M, Dubost J. et al.: Subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Rev. Rheumat*, 63: 859-861, 1996.
- 5) Visuri T: Stress osteopathy of the femoral head. 10 military recruits followed for 5-11 years. *Acta Orthop Scandinavica* 68: 138-141, 1997.
- 6) Yamamoto T, Schneider R, Bullough PG: Subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Am. J. Surg. Pathol* 24: 464-468, 2000.

F. 研究発表

1. 論文発表 未実施

2. 学会発表

H高大次郎、樋口富士男、後藤昌史、山中健輔：老人の骨頭軟骨剥脱例

第100回西日本整形・災害外科学会、平成12年11月18日19日（長崎）

大腿骨骨髄損傷後再生過程に関する研究

鶴上 浩 (産業医科大学整形外科)
内田 宗志 (産業医科大学整形外科)
綿貫 誠 (産業医科大学整形外科)

ラット大腿骨骨髄損傷モデルにおける骨再生過程において、損傷後3日目の前骨芽細胞はアクチビン β A遺伝子を発現する。骨芽細胞へ分化するにしたがって、アクチビン β A遺伝子発現は消失した。

A. 研究目的

骨頭壊死の病態はまだ解明されていない。骨頭壊死では骨端部の広範な骨髄壊死をきたしている。しかし、骨端部に広範な骨髄壊死を起こす有用な動物モデルはない。本研究では、骨髄再生過程に関与する遺伝子の発現を調べるため、ドリルによる骨穿孔モデルを作製した。

B. 研究方法

エーテルおよびネンブタールによる深麻酔下にウイスター系雌性ラット両側大腿骨骨幹にドリル穿孔を施し、術後1、3、5、7、11、14、および21日に灌流固定ののち、損傷部骨組織を摘出し、浸潤固定と脱灰処理を施してパラフィン包埋した。約5 μ m厚脱パラフィン連続切片を用いて、①H・E染色、②酵素組織化学として、alkaline phosphatase (ALP)染色、③免疫細胞化学として、間接酵素抗体法による免疫染色、④in situ hybridizationとしてアクチビン β AmRNAとオステオカルシンmRNA発現についてそれぞれ検索した。

C. 研究結果

組織学・酵素組織化学：損傷部は術後3日には肉芽組織で置換され、周囲の肥厚した骨膜内層にはALP陽性反応を呈する前骨芽細胞が多数存在した。5日以降、肥厚骨膜と損傷部髄腔における骨形成と髄腔内新生海綿骨間に血管新生が進行した。さらに7日から11日にかけて新生海綿骨間に洞様毛細血管が発達するとともに髄腔内仮骨 (medullary callus)

と骨膜新生骨との連絡が生じ、14日から21日にかけて骨髄再生が進行した。免疫細胞化学：術後3日からPCNA、ならびにアクチビンA免疫陽性反応を呈した。5日以降、骨芽細胞にも両陽性反応は認められ、11日以降漸減した。フォリスタチン免疫陽性反応は5日以降、主として骨芽細胞に出現し漸増した。アクチビン受容体については、I B型とII型とも、3日から5日にかけて骨芽細胞および前骨芽細胞に免疫陽性反応が認められた。

分子組織学：アクチビン β Am RNA シグナルは3日以降前骨芽細胞に発現したが、5日以降、殆ど検出不能となった。一方、オステオカルシンm RNA シグナルは3日に骨膜内層の一部の細胞に出現し、5日には、アクチビン β Am RNA の発現に反比例的に増加していた。

D. 考察

骨再生過程に出現する前骨芽細胞は3日以降、一過性にアクチビン β Aを産生するが、オステオカルシンm RNA 発現に伴ってその産生能を失っていく。前骨芽細胞のPCNA陽性反応、さらにアクチビン受容体の局在は、活発に増殖する前骨芽細胞によって産生されたアクチビンAが、受容体仲介によるautocrine、およびparacrine様式によって骨芽細胞への分化を誘導することを示唆する。

E. 結論

骨損傷モデル再生過程において、前骨芽細胞は

過性にアクチビンを産生し、autocrineとparacrine様式によって骨芽細胞への分化を誘導する。

F. 研究発表

Transient Expression of Activin β A mRNA on Osteoprogenitor Cells in Rat Bone Regeneration After Drill-Hole Injury
(Bone Vol. 27, No.1 July 2000: 81-90)

ラットを用いた大腿骨頭壊死モデル作製の試みに関する研究

辻 宗啓 (旭川医科大学整形外科)
松野 丈夫 (旭川医科大学整形外科)
後藤 英司 (旭川医科大学整形外科)
寺西 正 (旭川医科大学整形外科)
吉木 敬 (北海道大学大学院医学研究科病態分子病理)
池田 仁 (北海道大学大学院医学研究科病態分子病理)

自己免疫疾患を発症するtransgenic rat に対するステロイド単独投与での大腿骨頭壊死モデル作製の可能性を検討する。次の3群を作製した。A群：10週齢のtransgenic rat 2頭にprednisolon acetate 4mg/100gを、22～27週齢のtransgenic rat 4頭に2mg/100gをそれぞれ1回投与。B群：67週齢のtransgenic rat 1頭にprednisolon acetate 10mg/100gを2週間隔で2回投与。C群：8週齢のtransgenic rat 4頭にsteroidパルス療法に準じて7日間連日投与。それぞれ6週間後に犠牲死させ骨頭壊死発生の有無を組織病理学的に検討した。いずれの群においても骨頭壊死の発生は見られなかった。

A. 研究目的

これまでに報告されてきた骨壊死の動物モデルとしては、代表的なものとして家兎に馬血清を注射して作製した血清病型骨壊死モデル¹⁾、Schwartzman反応を利用して血管内の過凝固状態を作成しこれにステロイドを投与することで骨壊死を誘導するモデル²⁾、ステロイド単独投与による実験的に骨壊死を作成したモデル³⁾などがある。いずれも家兎を用い主にdiaphysisに壊死が見られている。しかし、epiphysisに壊死が見られていないことや、SLE患者に見られるような自己抗体を持つモデルはなく、実際の病態に近いモデルをつくるには解決すべき問題が残っていると思われる。我々は、いくつかの自己抗体を持つratにステロイドを単独投与することによる大腿骨頭壊死モデル作製の可能性について検討した。

B. 研究方法

env -pX transgenic ratを11頭使用し以下の各群に分けた。A群は22～27週齢のtransgenic rat 4頭にprednisolon acetate 2mg/100gを、10週齢のtransgenic rat 2頭に4mg/100gをそれぞれ1回のみ投与した。B群は67週齢のtransgenic rat 1頭にprednisolon acetate 10mg/100gを2週間隔で2回投与した。C群は8週

齢のtransgenic rat 4頭にsteroidパルス療法に準じて7日間連日投与した(図1)。ratはsteroid投与後6週で犠牲死させ大腿骨、上腕骨を摘出、ホルマリン固定後EDTAにて脱灰し、骨壊死の有無について病理学的に検討した。

図1. 投与方法

① 1回投与		4mg/100g
② 2回投与		10mg/100g
③ パルス療法に準じた投与	1 day	10mg/100g
	2 day	10mg/100g
	3 day	10mg/100g
	4 day	5mg/100g
	5 day	5mg/100g
	6 day	2.5mg/100g
	7 day	1.25mg/100g

(倫理面への配慮) 今回の実験は北海道大学大学院医学研究科付属動物実験施設の指針に従って行った。

C. 研究結果

今回、上記投与方法にてsteroidを投与したtransgenic ratには骨頭壊死および骨壊死の所見は認められな

かった。また、steroid投与による皮膚炎や関節炎などの自己免疫疾患の改善も見られなかった。

D. 考察

我々は大腿骨頭壊死モデルを作製するにあたって、何らかの自己抗体を持つ動物にsteroidを投与することが重要であると考えている。临床上ではSLEなどの自己免疫疾患患者に多く大腿骨頭壊死が見られていることや、自己免疫疾患を持たない大腿骨頭壊死患者の約40%に何らかの自己抗体が見られたという報告もあることから⁴⁾、ratにおいても何らかの自己抗体が関与している可能性は強い。前回の報告で我々は、リウマトイド因子、抗カルジオリピン抗体、抗核抗体といった自己抗体を持ち、関節炎や血管炎、血栓症、唾液腺炎、皮膚炎などのさまざまな疾患を発症するenv -pX transgenic ratを紹介した。今回はそのratを用い、頭数の増加や投与方の変更を行ってsteroidを投与したが、骨頭壊死は確認できなかった。

その原因として、rat自体のsteroid反応性の問題や、steroidの種類などが考えられるが、今後更に検討が必要と考えている。また、前回の報告では、LEW ratでnecrosisが起こっていたことを考えると、このstrainで骨頭壊死モデルが作製できる可能性もあり、引き続きsteroid投与を行うことを検討している。

- 1) 高岡邦夫：実験的骨壊死, 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班平成1年度研究報告書：65-67, 1990.
- 2) 居石克夫、山本卓明 他：全身性家兎Shwartzman反応における骨病変, 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班平成4年度研究報告書：25-29, 1993.
- 3) Yamamoto, T et al.: Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissue ; corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 40 : 2055-2064, 1997.
- 4) 李 勝博 他：特発性大腿骨頭壊死における自己抗体, 厚生省特定疾患調査研究報告書, 35031, 1997.