

C) 病態解析

グルココルチコイド投与家兎骨髄内抵抗血管における COX2依存性拡張反応の検討

水野 理介、大橋 俊夫（信州大学医学部第一生理）
堀内 博志、斎藤 直人、小林 千益、高岡 邦夫
（信州大学医学部整形外科）

我々は、ステロイド投与家兎骨壊死モデルから採取した骨髄内抵抗血管が、アラキドン酸によって拡張反応を誘起してくることを報告してきた。今回は、アラキドン酸による拡張反応に対する選択的COX 2 阻害薬であるNS-398の影響について検討した。その結果、NS-398はアラキドン酸による骨髄内抵抗血管拡張反応を有意に抑制することが判明した。

はじめに

生体各組織の局所血流量は、各組織に分布する抵抗血管である細動脈の収縮や拡張によって直接的に調節されていることが知られている。しかしながら骨内微小循環を規定する骨髄内を走行する細動脈ならびに抵抗血管の機能的構築は、全く明らかにされていない。平成11年の本学会議において、我々は、骨髄内から摘出したヒト、家兎ならびにラット抵抗血管の生理・薬理的機能構築を解明できる実験系を確立し、興味ある新知見を得てきた¹⁾。その後我々は、グルココルチコイド投与家兎における摘出骨髄内抵抗血管の解析を行い、グルココルチコイド投与は、家兎骨髄内抵抗血管にアラキドン酸による拡張反応を誘起し、この拡張反応はインドメタシン（非選択的COX阻害薬）によって抑制されることを報告した。今回は、グルココルチコイド投与家兎骨髄内抵抗血管におけるアラキドン酸による拡張反応に対するCOXの亜系解析、特にCOX 2 の依存性について薬理的に検討した。

対象と方法

実験には日本白色家兎（雄、体重～3.0kg）を用い、家兎をメチルプレドニゾロン投与群（MPSL）と非投与群（Cont）に設定した。MPSL群は、メチルプレドニゾロン20mg/kg/dayを3日間連続投与し作製し、投与7日目に動物を屠殺し骨髄内の抵抗血

管を摘出し実験に用いた。摘出骨髄内抵抗血管作製方法とその解析方法は、平成11年学会報告書に準じた¹⁾。ノルエピネフリン（ 10^{-6} M）によって前収縮を負荷した標本に対して、アラキドン酸（ 10^{-8} ～ 10^{-5} M）を外腔側から投与し標本の反応性を検討した。また、アラキドン酸による標本の反応性に対する選択的COX 2 阻害薬であるNS-398（ 3×10^{-6} M）^{2),3)}の影響について検討した。また、拡張性のプロスタグランジンのアナログであるイソカルバサイクリンの反応についても合わせて検討した。

結果

アラキドン酸は、ノルエピネフリンにて前収縮を負荷したMPSL群の骨髄内抵抗血管に対して用量依存的な拡張反応を誘起した。このアラキドン酸による拡張反応はNS-398（ 3×10^{-6} M）によってほぼ完全に抑制された。一方、Cont群の標本に対してアラキドン酸は、拡張反応を誘起しなかった。イソカルバサイクリンは、両群の標本に対して用量依存的な拡張反応を誘起し、その反応量は両群間において有意な差は見られなかった。

考察

今回の実験によって次の事が判明した。1) MPSL投与によって家兎摘出骨髄内抵抗血管は、アラキドン酸に対して用量依存的に拡張反応を誘起し

たが、非投与群では拡張反応を示さなかった。このMPSL投与群におけるアラキドン酸の拡張反応は、選択的COX 2 阻害薬であるNS-398によって完全に抑制された。2) イソカルバサイクリンは、コントロール群ならびにMPSL群の摘出骨髄内抵抗血管に対して同程度の拡張反応を誘起した。従って、MPSL投与によって、家兎摘出骨髄内抵抗血管は、COX 2 を誘導しその活性化を介して内因性の拡張性プロスタグランジンを産生することが示唆された。本実験系で得られた結果から、我々はMPSL投与による家兎の骨髄内抵抗血管におけるCOX 2 -拡張性プロスタグランジン産生系による骨髄内微小循環環境変化と浮腫形成を中心とした病態生理学的意義において次のような作業仮説を建てた。すなわち、ステロイド投与によって骨髄内抵抗血管においてCOX 2 が誘導される。ステロイド投与はさらにアラキドン酸の供給源である血中脂質の増加を起こす。従って、アラキドン酸-COX 2 -拡張性プロスタグランジンはカスケードの亢進によって骨髄内抵抗血管の拡張がおこり骨髄内に充血性の血流増加が誘起される。骨髄内の毛細血管床は、外部を骨組織という低コンプライアンス構造物でおおわれている、従って、僅かな血管透過性の亢進は容易に骨組織の浮腫を生ずる。さらにこの組織間隙の圧上昇は、経壁圧の影響を直接受ける骨髄内に分布する細静脈やリンパ管の狭窄・圧平を引き起こし浮腫を亢進し増悪させる。骨髄内の浮腫は、組織間隙における物質交換の拡散距離を延長し、骨細胞への栄養・酸素供給障害、老廃物除去障害を引き起こし、骨髄内の微小循環環境の恒常性維持の破綻を起こすことが想定される。

参考文献

- 1) 水野理介ほか. : 摘出骨細動脈標本の薬物反応評価実験装置の試作と応用.厚生省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死調査研究分科会 平成11年度研究報告書. 1999 ; 11-15
- 2) Chulada PC et al. : Differential inhibition of murine prostaglandin synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs using exogenous and endogenous sources of arachidonic acid. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997, 280 ; 606-613
- 3) Pang L et al. : Bradykinin stimulates IL- 8

production in cultures human airway smooth muscle cells : role of cyclooxygenase products. J. Immunol. 1998, 161 ; 2590-2515

HIF-1 α 誘発性血管内皮細胞アポトーシスにおける ステロイドの影響に関する研究

田中 良哉、飯田 武、福島あゆみ、峯 信一郎

(産業医科大学医学部第一内科)

藤本 浩子、南 康博 (神戸大学大学院医学研究科生体防御学)

血管内皮細胞にhypoxia-inducible factor (HIF) -1 α を遺伝子導入すると、細胞増殖抑制、p21発現誘導を介するアポトーシスを誘導した。さらに、HIF-1 α を遺伝子導入した内皮細胞にステロイドを添加すると、濃度依存性に細胞増殖抑制、DNA合成の低下、静止期細胞率の増加、早期アポトーシスの誘導を顕著に増強させた。以上、ステロイドは、組織虚血状態で誘導される血管内皮細胞の増殖抑制やアポトーシスをさらに増強することにより、骨頭壊死形成を惹起することが示された。

A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) の病態形成には組織の阻血状態が重要視されており、阻血組織の病態や再生において血管系は重要な役割を担う。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、血管内皮細胞にアポトーシスを誘導する事を報告した。一方、IONの病態形成において、ステロイド薬の関与が示唆される。今回、HIF-1 α とステロイド薬が血管内皮細胞の細胞機能特性に及ぼす役割を検討した。

B. 研究方法

臍帯静脈由来内皮細胞と皮膚微小血管由来内皮細胞株HMEC-1を血管内皮細胞として用いた。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。

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、大部分の細胞は浮遊し破砕傾向を示した。HIF-1 α を遺伝子導入した内皮細胞にステロイド薬 (プレドニゾロン) を添加すると、HIF-1 α によって誘導された細胞増殖抑制、並

びに、DNA合成能低下を濃度依存性に更に増強し、100 μ g/mlで最大値に達した。また、HIF-1 α 導入によるG_{0/1}期静止内皮細胞の増加は、ステロイド薬の添加により更に増強した。さらに、HIF-1 α 導入によるannexinV^{high}PI^{low}の早期アポトーシス細胞の増加は、ステロイド薬の添加により更に増強した。一方、IL-1は代表的な炎症性サイトカインであるが、HIF-1 α によって誘導された内皮細胞増殖抑制は、IL-1 β の添加により濃度依存性に更に増強された。

D. 考 察

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を報告してきた。今回、HIF-1 α を遺伝子導入した血管内皮細胞にステロイド薬を添加し、ステロイド薬がHIF-1 α により齎される濃度依存性に内皮細胞増殖抑制、静止期細胞率増加、アポトーシスをさらに増強させることが示された。以上、ステロイド薬、および、代表的炎症性サイトカインIL-1 β は、組織虚血状態で誘導される血管内皮細胞の増殖抑制やアポトーシスをさらに増強することにより、骨頭壊死形成を惹起することが示された。

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、細胞周期停止を誘導し、血管の再生や新生の障害を引き起こす。組織虚血状態で誘導される内皮細胞の増殖抑制やアポトーシスには、ステロイド薬およびIL-1などに代表される炎症病態メディエーターが介在する可能性が示唆され、IONの病態形成には、組織虚血、炎症、ステロイドの複合要因によって齎されるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y: Hypoxia-inducible factor-1 α induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes to Cells* (in press)

2. 学会発表

- 1) 飯田 武、齋藤和義、粟津雄一郎、中山田真吾、中野和久、田中良：血管内皮細胞におけるHypoxia-inducible factor-1 α によるアポトーシスの誘導. 第45回日本リウマチ学会（東京）平成13年5月
- 2) 飯田 武、峯信一郎、齋藤和義、岡田洋右、藤本浩子、南康博、田中良哉：血管内皮細胞におけるHIF-1 α 遺伝子導入によるアポトーシスの誘導. 第22回日本炎症・再生医学会（東京）平成13年7月
- 3) 飯田 武、岡田洋右、齋藤和義、内田宗志、中村利孝、南 康博、田中良哉：特発性大腿骨頭壊死症におけるHypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の関与と血管内皮細胞におけるHIF-1 α 遺伝子導入によるアポトーシスの誘導. 第19回日本骨代謝学会(名古屋)平成13年8月
- 4) 飯田 武、峯信一郎、齋藤和義、太幡敬洋、藤本浩子、南 康博、田中良哉：Hypoxia-inducible factor-1 α 遺伝子導入による血管内皮細胞のアポトーシスの誘導. 第31回日本免疫学会（大阪）平成13年12月

グルココルチコイド過剰症における 大腿骨細動脈での活性酸素の産生亢進

赤池 雅史、東 博之、松本 俊夫 (徳島大学医学部第一内科)
堀内 博志、高岡 邦夫 (信州大学医学部整形外科)
大橋 俊夫、水野 理介 (信州大学医学部第一生理)

大腿骨細動脈を用いて免疫組織化学による検討を行い、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症例の大腿骨細動脈ではDNA過酸化指標である8-hydroxy-deoxyguanosineと脂質過酸化指標である4-hydroxy-nonenalが増加していることを明らかにした。グルココルチコイド過剰は大腿骨細動脈での活性酸素の産生を亢進させ、血管内皮機能を障害する結果、大腿骨頭壊死の原因となる循環障害を惹起する可能性がある。

A. 研究目的

グルココルチコイド過剰による大腿骨頭壊死の発症には大腿骨頭での循環障害が重要な役割を果たしていると考えられている。我々はグルココルチコイド過剰症において活性酸素産生の亢進により内皮依存性血管弛緩反応が著明に低下していることを報告した。さらに、培養細胞を用いた検討により、グルココルチコイド過剰は血管内皮細胞において活性酸素の産生を亢進させる結果、一酸化窒素 (NO) の消去を亢進し、NO availabilityの低下を引き起こすことを明らかにしている。このような活性酸素の産生亢進による血管内皮機能の低下は微小循環の破綻を引き起こし、大腿骨頭壊死の重要な発症要因である可能性がある。本研究ではヒトの大腿骨細動脈における活性酸素の産生について免疫組織化学を用いて検討した。

B. 研究方法

対象は大腿骨頭置換術を施行した4例(男性1例、女性3例、年齢33歳～62歳)である(表1)。このうちの1例はウエジナー肉芽腫症のためにプレドニゾロン25～50mg/dayを5年間服用中であり、ステロイド性大腿骨頭壊死をきたした例である。もう1例はアルコール性大腿骨頭壊死症例であり、他の2例は股関節症の症例であった。これらの症例の大腿骨頭置換術に際し切除された大腿骨頭部の海綿骨な

らびに大腿骨骨髄から、実体顕微鏡下に血管径150～300 μ mの細動脈を摘出し、ホルマリン固定後、パラフィン包埋標本を作成した。この検体を用いて、DNA過酸化指標である8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)と脂質過酸化指標である4-hydroxy-nonenal (4HNE)について免疫組織化学による検討を行った。

C. 研究結果

HE染色では全例において内膜肥厚などの血管リモデリング所見は認められなかった。免疫組織化学では股関節症の2例において中膜平滑筋において8-OHdGのごくわずかな染色がみられた。これらの例では4HNEも同様に中膜平滑筋においてわずかな染色が認められた。アルコール性大腿骨頭壊死症例では、8-OHdGおよび4HNEいずれも全く染色性は認められなかった。これらに対し、ステロイド性大腿骨頭壊死症例では中膜血管平滑筋に4HNEが強く染色され、その部位では8-OHdGも陽性であった。

D. 考察

今回の検討ではステロイド性大腿骨頭壊死症例の大腿骨細動脈において4HNEと8OHdGが陽性であり、アルコール性大腿骨頭壊死症例や股関節症例と比し、これらが顕著に増加していた。4HNEはアラ

表 1.

表1. 対象症例の臨床像

	症例1	症例2	症例3	症例4
年齢・性	51歳・女	49歳・女	33歳・女	62歳・男
臨床診断	股関節症	股関節症	大腿骨頭壊死 (アルコール性)	大腿骨頭壊死 (ステロイド性)
ステロイド投与	—	—	—	25~50mg/day
喫煙習慣	—	—	20本/日・15年	5本/日・30年
BMI	17.3	23.4	22.7	23.4
高血圧	—	—	—	—
糖尿病	—	—	—	—
総コレステロール (mg/dl)	208	182	181	230

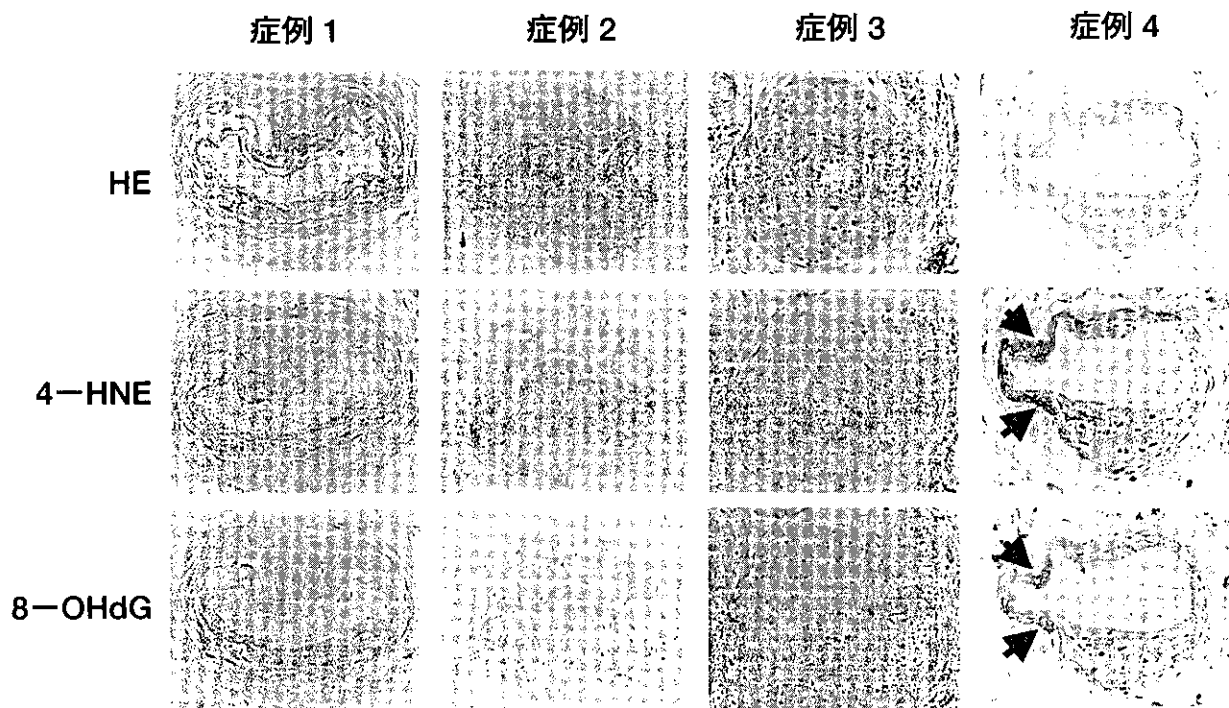


図 1. 大腿骨細動脈での 4-HNE および 8-OHdG の免疫組織化学

キドン酸などのn-6系高度不飽和脂肪酸の活性酸素による酸化によって生成される。また、8-OHdGはDNA中の2'デオキシグアノシンの8位が活性酸素により酸化されることにより生じる。すなわち、これらの増加は大腿骨を灌流する血管で活性酸素の産生が亢進していることを示すものである。また、ア

ルコール性大腿骨頭壊死症例の例では、4-HNEおよび8-OHdGの染色が全く認められなかったことから、大腿骨血管系におけるこのような活性酸素の産生亢進は、ステロイド過剰によるものの可能性がある。

我々はこれまでにグルココルチコイド過剰症では

活性酸素の産生亢進により血管内皮機能が低下していること、培養血管内皮細胞ではグルココルチコイド過剰により活性酸素の産生が亢進し、その結果、血管内皮細胞から産生・放出されるNOの消去が亢進していることなどを明らかにしてきた。今回の結果はグルココルチコイド過剰による活性酸素の産生亢進が大腿骨灌流血管においても生じていることを示唆するものである。血管平滑筋の弛緩作用ならびに増殖抑制作用、および抗血栓作用などの血管内皮機能は主として血管内皮細胞からのNOの産生・放出により維持されている。大腿骨灌流血管における活性酸素産生の亢進はNO availabilityの低下をもたらし、血管内皮機能を障害する結果、大腿骨頭壊死の原因となる循環障害を惹起する可能性がある。

今後、大腿骨頭壊死症の発症における血管内皮機能障害の重要性をさらに明確にするためには、グルココルチコイド過剰症における血管内皮機能と大腿骨頭壊死症の発症率および重症度との関係を明らかにすることが必要である。また、グルココルチコイド過剰に伴う大腿骨頭壊死症例の大腿骨細動脈を用いて、3-nitrotyrosineの免疫組織化学による検討を行い、大腿骨頭血管組織における活性酸素の産生亢進とそれによるNO availabilityの低下を明らかにする予定である。

E. 結論

グルココルチコイド過剰では大腿骨細動脈での活性酸素の産生亢進により血管内皮機能障害を生じ、大腿骨頭壊死症の原因となる循環障害を惹起する可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T, 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST- 2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 142: 2205-2212, 2001.
- 2) Kanagawa Y, Shigekiyo T, Aihara K, Akaike M, Azuma H, Matsumoto T. Molecular mechanism of type I congenital heparin cofactor (HC) II deficiency caused by a missense mutation at reactive P 2 site: HC II Tokushima. *Thromb Haemost* 85: 101-7, 2001.

- 3) Abe M, Shintani Y, Eto Y, Harada K, Fujinaka Y, Kosaka M, Matsumoto T. Interleukin- 1 beta enhances and interferon-gamma suppresses activin A actions by reciprocally regulating activin A and follistatin secretion from bone marrow stromal fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 126: 64- 8, 2001.

2. 学会発表

- 1) Takahiko Iuchi, Masashi Akaike, Mitsunori Fujimura, Masaomi Morioka, Takashi Iwase, Midori Kato, Shunji Hashizume, Kazue Ishikawa, Tomonori Yoshida, Nobuyuki Takamori, Yasuhiko Kanagawa, Takao Mitsui, Hiroyuki Azuma, Toshio Matsumoto
Activation of glucocorticoid receptor induces superoxide production from mitochondria and elicits endothelial dysfunction
American Heart Association Scientific Session 2001,平成13年
- 2) 赤池雅史, 松本俊夫
シンポジウム「ステロイドと骨」:ステロイドによる活性酸素産生の亢進とNO代謝
第19回日本骨代謝学会,平成13年

LPS家兎骨壊死モデルに及ぼすNOの影響に関する研究

居石 克夫（九州大学大学院医学研究院病理病態学）

我々は特発性大腿骨頭壊死症（aseptic necrosis of the femoral head：以下ANF）における病態を、①血管内皮障害および凝固系の活性化に基づく微小血栓形成、②内皮依存性血管弛緩反応障害に起因する骨髄内微小循環障害と仮定し、血管系の恒常性維持において大きな役割を担うNitric Oxide（以下NO）に注目し、我々が確立したLipopolysaccharide（以下LPS）誘発家兎骨壊死モデルを用いてNO合成阻害剤であるNG-nitro-L-arginine-Methyl Ester（以下L-NAME）およびNO供与体であるsodium nitropruside（以下SNP）などのNO修飾剤や、NO産生における基質であるL-arginineを併用投与しLPS誘発骨壊死発生に及ぼす影響を調査してきた。現在までの結果において、NOはその善悪両面の生理作用により壊死の促進と抑制の両方向に影響を及ぼす可能性があり、LPS誘発家兎骨壊死発生に与える影響の解析にはより複雑な解釈を要するものの、SNP投与などのNOドナーを用いたNO供給治療は、骨壊死発生に対して有効な予防法となり得ることが示唆されたので報告する。

A. 研究目的

LPS誘発家兎骨壊死モデルを用いて、骨壊死発生に及ぼすNO合成阻害剤、NO供与体、NO合成基質投与の影響について検討し、ANF発生とNOの関係を明らかにする。

B. 研究方法

[実験群および実験系]

成熟日本雄白色家兎（体重3.0～4.0kg）40羽を用い、図1に示す通りLPS単独群、LPS+L-NAME併用投与群、LPS+SNP併用投与群、LPS+L-arginine併用投与群の4群を設定した。LPS単独群はNormal Waterを与え自由飲水させた。L-NAME（7mg/kg/day）

およびSNP（7 mg/kg/day）は6週間、L-arginine（0.8g/kg/day）は3週間適正な管理の元に飲水投与した。また、全ての群で飲水開始後2週目にLPS（10ug/kg）を静注投与した。

[検討項目]

耳動脈にエラスト針を挿入し、中心静脈圧モニタリング装置を用いて血圧を測定した。また、NO産生の指標として、NOの代謝産物である血漿中NO_xを測定した（Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, BDL）。

[病理組織学的検索]

飲水投与開始後6週（LPS投与後4週）で屠殺し、両大腿骨および両上腕骨を摘出。ホルマリン固定、脱灰後、H&E染色を行い、光学顕微鏡にて詳細に観察した。骨壊死の判定は、従来通り骨髄の造血細胞壊死及び脂肪細胞壊死を伴い、骨梁がempty lacunaeまたはpycnotic nuclei of osteocyteを呈するものとした¹⁾。

[倫理面への配慮]

この動物実験は、九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査を受け、「九州大学医学部における動物実験に関する指針」、「動物の保護及び保管に関する法律」（法律第105号）及び「実験動物の飼養及び保管

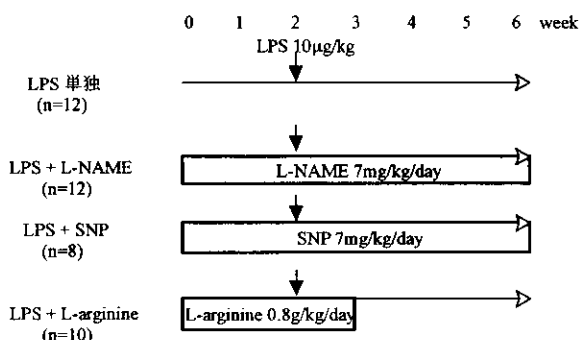


図1.本実験における実験群および治療プロトコール

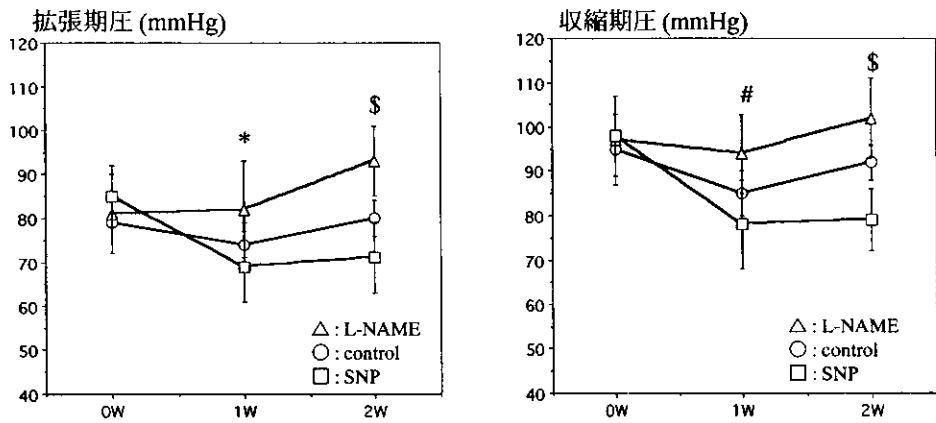


図 2. 各NO修飾剤の血圧に与える影響。飲水開始後2週間において、拡張期圧、収縮期圧ともにL-NAME投与群で有意に高く、SNP投与群で有意に低い ($p < 0.01$)。

* $p < 0.01$: L-NAME vs. SNP
 # $p < 0.01$: L-NAME vs. SNP, $p < 0.05$: control vs. L-NAME
 \$ $p < 0.01$: each group

に関する基準」(総理府告示第6号)の規制に基づいて行われたものである。

C. 研究結果

1. 血圧の変動

図2に示す通り、飲水開始後2週では拡張期圧、収縮期圧ともにL-NAME投与群で有意に高く、SNP投与群で有意に低かった ($p < 0.01$)。このことからL-NAMEおよびSNPの薬理的活性は発揮されているものと考えられた。

2. 血漿NOx値の変動

血漿NOxはL-arginine投与により経時的に増加した。また、SNP投与後2週ではNormal Waterに比し有意に低下した ($p < 0.01$)。L-NAME投与群はNormal Waterとほぼ同様の推移であった (図3)。

3. 病理学的所見

図4にLPS+L-arginine群における骨壊死の肉眼所見を示す。骨頭から骨幹部にかけて全体に黄白色調の壊死巣を認めた。

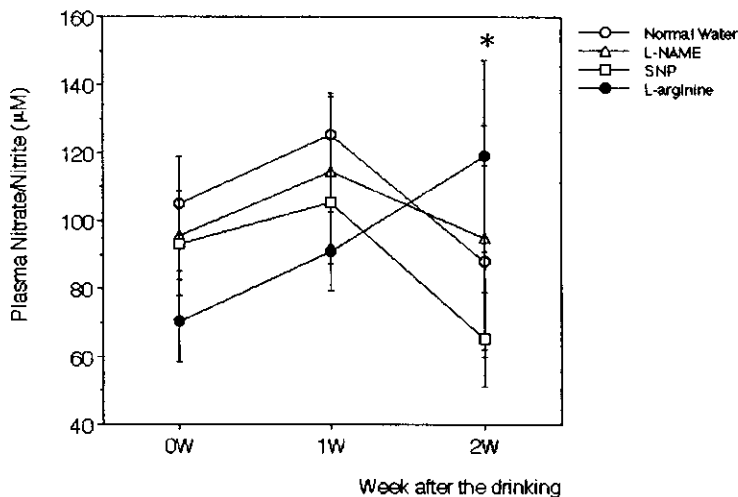
図5はLPS+L-arginine群における骨壊死の組織像

である。壊死骨梁と、その周囲の旺盛な添加骨形成および線維性肉芽組織による修復反応を認めた。また、皮質にも壊死が発生しており、これに対する添加骨や類骨の増生で皮質は著明に肥厚していた。また、骨髓組織も広く壊死に陥っていた。

4. 骨壊死発生率

大腿骨における壊死発生率を表1に示す。近位部、遠位部ともにLPS+SNP群で最も低く、LPS+L-NAME群およびLPS+L-arginine群ではLPS単独群と同程度か若干高い傾向を示した。

上腕骨においても大腿骨とほぼ同様の傾向が認められた (表2)。



* $p < 0.01$: SNP vs. NW and L-NAME

図 3.

各NO修飾剤の代謝産物NOxの値に与える影響。血漿NOxはL-arginine投与により経時的に増加した。SNP投与後2週間においてNormal Waterに比し有意な低下 ($p < 0.01$) を認めた。L-NAME投与群はNormal Waterとほぼ同様の推移であった。

表 1. Plevallence and Location of Femoral Bone Necrosis

Group	No. of examined bone	No. of ON lesions (%)	
		Proximal (hip)	Distal (knee)
LPS	24	14 (58.3%)	13 (54.2%)
LPS + L-NAME	24	19 (79.2%)	18 (75.0%)
LPS + SNP	16	4 (25.0%)	4 (25.0%)
LPS + L-arginine	20	14 (70.0%)	11 (55.0%)

* p<0.01
p<0.05

表 2. Plevallence and Location of Humeral Bone Necrosis

Group	No. of examined bone	No. of ON lesions (%)	
		Proximal (hip)	Distal (knee)
LPS	24	18 (75.0%)	17 (70.8%)
LPS + L-NAME	24	22 (91.7%)	22 (91.7%)
LPS + SNP	16	7 (43.8%)	6 (37.5%)
LPS + L-arginine	20	16 (80.0%)	17 (85.0%)

* p<0.01
p<0.05

結果のまとめ

1. LPS+L-NAME群およびLPS+L-arginine併用投与群は、LPS単独投与群と比較すると骨壊死発生が高い傾向が認められた。
2. LPS+SNP併用投与群の壊死発生率は、大腿骨近位・遠位、上腕骨近位において他の3群に比し有意に低かった (p<0.05)。
3. 病理組織学的に、各群の骨壊死組織に異なる点は認められなかった。
4. 骨幹部の骨皮質にも壊死が発生しており、これに対する添加骨や頰骨の増生で皮質は著明に肥厚していた。
5. 大腿骨頭及び上腕骨頭の中には、ヒトの大腿骨頭壊死と同様に軟骨下骨梁に広がる骨壊死も認められた。

6. 血漿NO_xは、飲水投与開始後1週では各群間に差を認めなかったが、SNP投与後2週では有意な低下が認められた。

7. 血圧は飲水投与後2週においてL-NAME群で有意に高く、SNP群で有意に低かった。

他臓器 (心、肺、肝、腎、脾、副腎) に有意な病理組織学的所見を認めなかった。

D. 考 察

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のではないかと推察のもとに、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、血小板凝集など

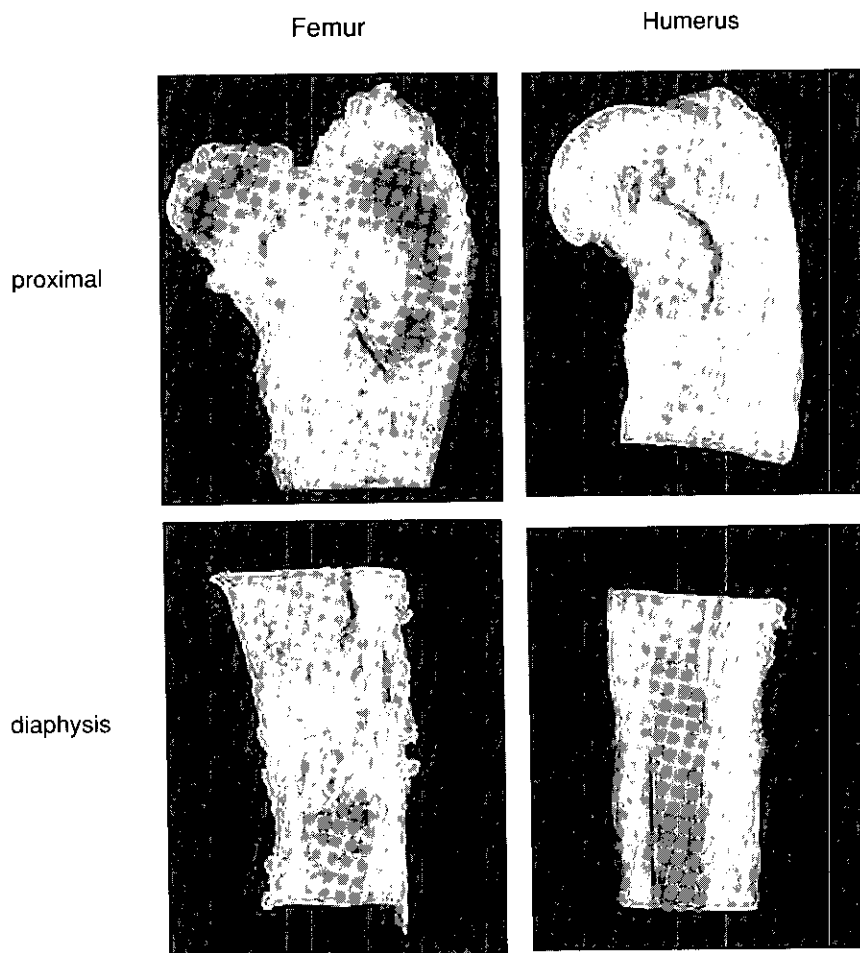
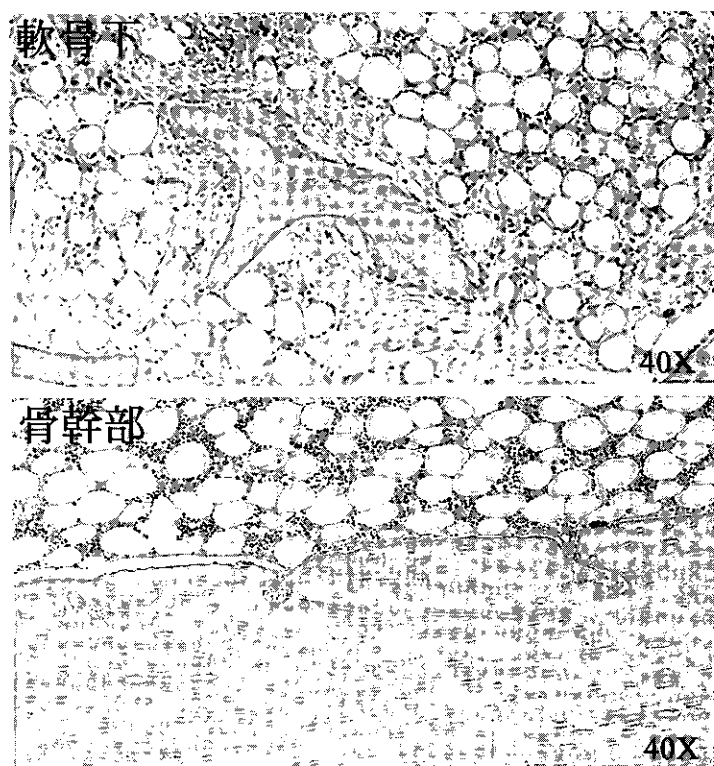


図4.
LPS+L-arginine群における骨壊死の肉眼所見。骨頭から骨幹部にかけて全体に黄白色調の壊死巣を認める。また、骨幹部にも同様の壊死を認め、骨皮質は著明に肥厚していた。



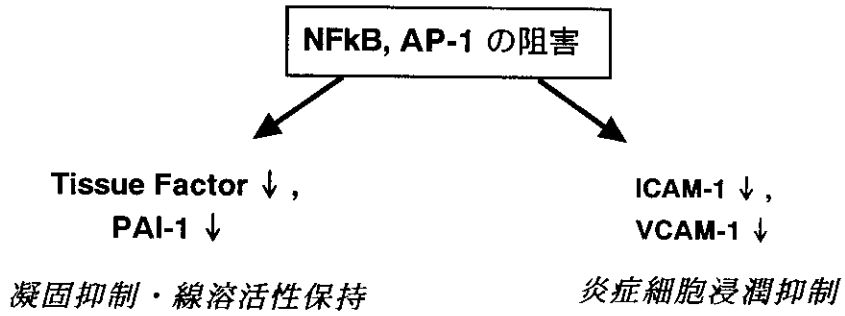
NOの血液壁に及ぼす抑制作用

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

図6. NOの血液壁に及ぼす種々の抑制作用

←図5.
LPS+L-arginine群における骨壊死の組織像。ヒトにおける壊死局在と同様に、軟骨下領域にも壊死骨梁と、その周囲の旺盛な添加骨形成および線維性肉芽組織による修復反応を認めた。

(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 7. NOが凝固系に与える影響と血管内皮障害について

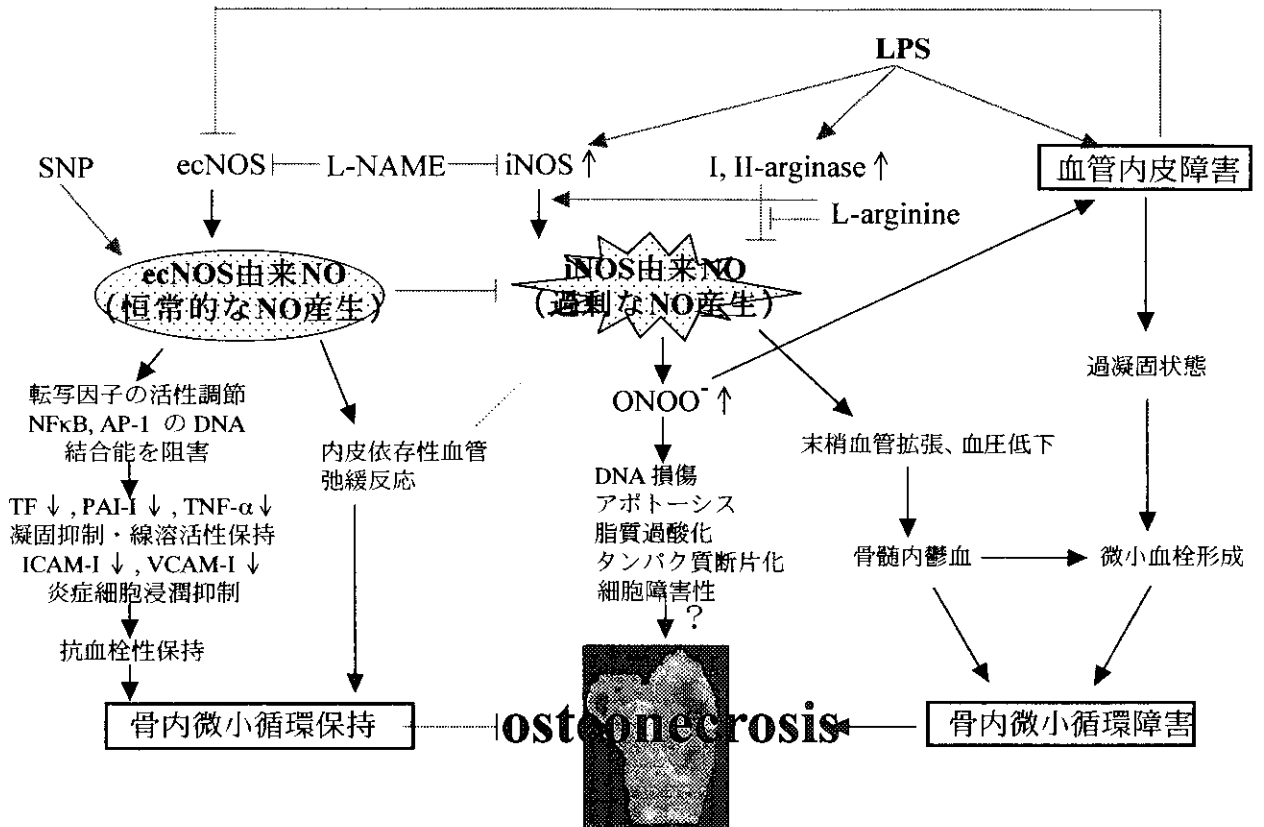


図 8. LPS 誘発家兔骨壊死モデルに与えるNOの影響についてのシエーマ

の抑制作用を有する (図 6)。また、NOは生体特に血管系の恒常性維持に重要であるが、その一方で、LPSなどにより誘導された過剰なNOはperoxynitriteの過剰産生を介して生体に様々な悪影響を及ぼすことが明らかにされている。NOが凝固系に与える影響を図 7 に示す。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が抑制される⁵⁾ ことにより凝固抑制・線溶活性保持に作用する。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投与は抑制した。また同様に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⁾。NOが有するこれらの善悪両面の作用は、ecNOS由来恒常的NO産生状態と、iNOS由来過剰NO産生状態に分けて考えると比較的解析が容易となる。そこで、LPS誘発骨壊死とNOの関係について推察を加える (図 8)。LPS投与によりiNOS由来NOの悪玉的作用と血管内皮障害による骨内微小循環障害が惹起され骨壊死発生が誘発されたものと考えられた。LPS+L-arginine群では基質過剰によりiNOS由来NO産生を助長したため壊死発生が促進されたものと考えられた。また、LPS+L-NAME群では、今回のL-NAME投与濃度では過剰なiNOSを抑制できなかったことに加えて、ecNOSをも抑制したことにより壊死発生が助長されたものと考えられた。一方、LPS+SNP群では、SNP投与つまりecNOS由来NOの供給により、NOの血管弛緩反応に加え、前述した抗血栓性保持作用、また、血管壁においては透過性、白血球凝集と遊走、平滑筋トーンと増殖、酸化ストレス、アポトーシス、血小板凝集などに対する抑制作用を発揮し、その結果壊死発生が抑制されたものと考えられた。つまり、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産生量の差が重要と思われた。

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等について骨髓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。

E. 結 論

1. LPS誘発家兎骨壊死発生において、NOはその善悪両面の生理作用により壊死の促進と抑制の両方向に影響を及ぼしていた。又、結果の解析にはより複雑な解釈を要した。
2. LPS誘発家兎骨壊死モデルにおいては、LPS投与により大量に誘導されたiNOSを介した過剰なNO産生が骨壊死発生に促進的に関与していることが示唆された。
3. SNP投与などのNOドナーを用いたNO供給は、骨壊死発生に対して有効な予防法となり得ることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Yamamoto T, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2055-2064.
- 2) Andrew DT, et al. Alteration of NF-kappa B p50 DNA binding kinetics by S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Comm.* 1997; 3: 703-706.
- 3) Janes RM, et al. Inhibition of NF-kappa B DNA binding by nitric oxide. *Nuc Acids Res.* 1996; 12: 2236-2242.
- 4) Dragana N, et al. 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, et al. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I kappa B a. *J Biochem.* 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 JS, 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.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita A, Yonemitsu Y, Okano S, Nakagawa K, Nakashima Y, Irisa T, Iwamoto Y, Nagai Y, Hasegawa M, Sueishi K: Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J Immunol* 2002 168: 450-457
2. Irisa T, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Iwamoto Y, Sugioka Y, Sueishi K: Osteonecrosis induced by a single administration of low-dose lipopolysaccharide in rabbits. *Bone* 2001 28: 641-649
3. Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K, Ueno H, Nakashima Y, Nakagawa K, Fukumura M, Kato A, Hasan MK, Nagai Y, Sugimachi K, Hasegawa M, Sueishi K: Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J* 2001 15: 1294-1296

2. 学会発表

山下彰久：血管新生因子FGF-2はアジュバント関節炎の増悪因子である, 第78回九大病理研究会 2001.12.8.

山下彰久、米満吉和、中島 豊、長谷川護、居石克夫：血管新生因子FGF-2はアジュバント関節炎における関節腫脹、滑膜増生、骨破壊の増悪因子である, 第42回日本脈管学会総会 2001.11.21

山下彰久、米満吉和、中島豊、長谷川護、居石克夫：血管新生因子FGF-2はアジュバント関節炎における関節腫脹、滑膜増生、骨破壊の増悪因子である, 第9回日本血管細胞生物学会 2001.11.6

山下彰久、居石克夫、山本卓明、入佐隆彦、宮西圭太、野口康男、岩本幸英：LPS誘発家兎骨壊死に及ぼすNOの影響（第三報）

厚生労働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13年度第1回会議, 2001.6.9

—SHR大腿骨頭壊死モデルの至適条件、 NOS inhibitor及びステロイドホルモン負荷の試み—

進藤 裕幸（長崎大学医学部整形外科）
熊谷 謙治、和田 政浩、鈴木 暢彦
村田 雅和（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）

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、初期や早期壊死像はSHRSP/Izm、SHRSP/Nagasakiで見られた。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。

大腿骨頭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）、またステロイドホルモンの関与が注目され、SHRSPにNOS inhibitor含有高コレステロール飼料投与やステロイドホルモンの負荷を行い、大腿骨頭壊死の動態を観察した。

その結果、血管内皮細胞特にNOSや高脂血症の壊死への関与が示唆され、またステロイドホルモン負荷が大腿骨頭壊死に影響を及ぼす傾向が見られた。

【研究目的】

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Hiranoらは大腿骨頭無腐性壊死が生じることを報告している¹⁾。

本教室に於いてこのSHRに大腿骨頭に無腐性壊死、骨化障害が起きることに着目し、荷重ストレス、血管の走行などの観点から1988年より調査、研究を行ってきた。その研究によると牡に多く、ラットの壮年期である15週齢から20週齢にかけ好発し、その頻度は牡ラットで約40から50%で、壊死は繰り返さず1度のみでまた修復機転が働くという人間の大腿骨頭壊死の特徴に類似している。

目的1：大腿骨頭壊死のモデルとしてSHRを使用する際、実験結果が安定していることや薬物負荷などでより高頻度の壊死発生が望まれる。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、純系化された亜系も多種存在する（図1）。またSHRとSHRSP（亜系間）でも発生頻度が異なるようである。故に実験の目的は至適条件（発生時期、発生頻度、典型的な初期壊死像検

出）の検索が必要である。

目的2：臨床的及び疫学的に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。故に実験の目的は壊死の阻血原因として血管内皮系特にNO合成酵素（以下NOSと略）を検索すること、具体的にはNOS inhibitorをSHRに投与し大腿骨頭を観察することである。またステロイドホルモン負荷を行いステロイドホルモンの関与の有無を調べる。また上記より安定した高頻度の壊死発生を生じさせることである。

目的1：SHR大腿骨頭壊死モデルの至適条件
実験①

【材料&方法】

ラットはSHRの標準的な系とされているSHRイズモラット（SHR/Izm）、Charles River Japan社から購入したSHRラット（SHR/NCrj）SHR/SPイズモラット（SHRSP/Izm）SHRSPラットで長崎大学医学部附属動物実験施設で系代飼育されている。（SHRSP/Nagasaki）を使用し、生後10から17週齢の

表 1. 対象および結果. 大腿骨頭壊死

ラットはSHR/Izm, SHR/NCrj, SHRSP/Izm, SHRSP / Nagasakiを使用し、生後10から17週齢の種々の週齢で屠殺し、標本採取観察をした。

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また週齢間でも発生率が異なる。また注目すべき点は初期と早期壊死の所見が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。

strain	週齢	骨頭数	(%)	
			初期と早期の壊死数	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

表 2 大腿骨頭無腐性壊死の組織学的診断基準

ラットの大腿骨頭無腐性壊死には修復機転が働くため以下の0から4のphaseが想定され、冠状断の最大割面で評価した。phase 0. 骨髄の一部にのみ壊死がみられるもの。phase 1. 修復反応がみられなく、骨髄、骨梁が完全壊死に陥ったもの。phase 2. 骨頭外側部から血管に富む肉芽の侵入したもの。phase 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。phase 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。

	骨髄壊死	骨梁壊死	肉芽：修復反応
Early stage	(+)	(-)	(-)
P1.	(+)	(+)	(-)
P2.	(+)	(+)	(+) 特に骨頭外側部
P3.	(+)	(+) 類骨形成	(+) 旺盛な壊死修復
P4.	(+) 正常造血組織の 骨髓腔の置換	(+) 壊死骨梁の remodeling	(+)

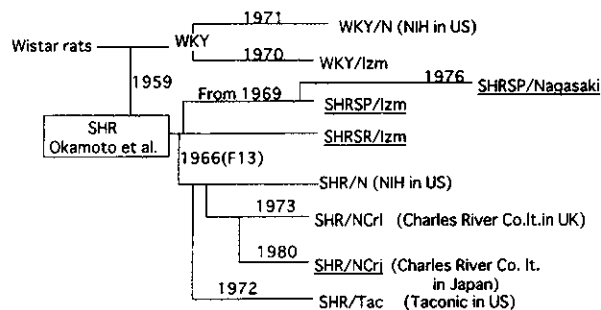


図 1. SHR起源と亜系間の関係

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。

種々の週齢で屠殺し、標本採取観察を計画した(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飼料(F2, SP)を用いた。尚、飼育時定期的観察し各週に血圧、体重を検量した。ラットの大腿骨頭無腐性壊死には修復機転が働くため以下の0から4のphaseが想定される。

- 0 骨髄の一部にのみ壊死がみられるもの。
- 1 修復反応がみられなく、骨髄、骨梁が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。

上記の0から4の所見から大腿骨頭無腐性壊死の組織学的診断基準を作成し、組織学的標本は冠状断の最大割面で評価した(表2)。

(倫理面への配慮)

長崎大学実験動物委員会の認可を得た。

【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SHRSPに頻度が高く、またSHRSP/IzmとSHRSP/Nagasakiでも頻度の差がありまた週齢間でも発生率が異なった。また注目すべき点は骨髓脂肪と骨髄の不完全壊死がみられ修復機転が働いてなくまた骨細胞の壊死がない所見の初期壊死と早期壊死が多くみられたことである(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の系が異なると異なる実験結果が出てきており、そのため標準化を目指してSHR/Izmがclose-upされているが、SHRの亜系間の大腿骨頭壊死の頻度および程度差が存在する可能性が考えられる。Naito等はSHRSP/Nagasakiを55匹とSHR/NCrj 40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SHRSP (SHRSP/Nagasaki)で通常のSHR (SHR/NCrj)

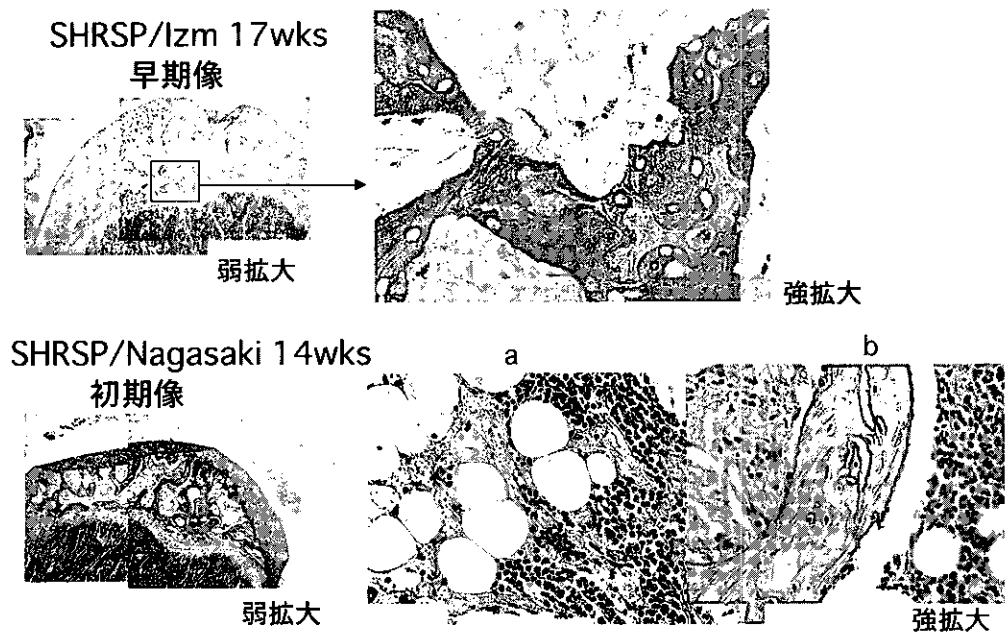


図2. 実験①の大腿骨頭組織像（初期及び早期骨頭壊死像）
 上段：早期大腿骨頭壊死
 SHRSP/Izm 17週齢 大腿骨頭epiphysisに骨髄や脂肪細胞及び骨細胞に広範にわたって壊死がみられるが、修復機転がはたらいでない。
 下段：初期大腿骨頭壊死
 SHRSP/Nagasaki 14週齢 epiphysisに骨髄脂肪壊死と骨髄の不完全壊死がみられ (a) 修復機転がはたらいでなくまた骨細胞の壊死がない (b) 所見がみられる。

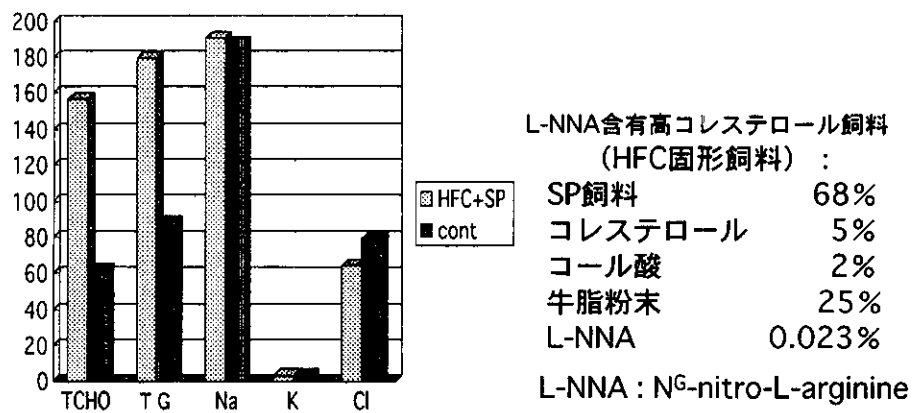


図3. 実験②の血液生化学検査結果及びHFC固形飼料の成分組成
 総コレステロール値やトリグリセライド値が対照群の倍値に上昇し高脂血症を呈したが、電解質は正常であった。

よりも壊死発生頻度が高いことを報告しているが、今回使用したSHR/IzmとSHR/NCjと大腿骨頭壊死の出現時期や頻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かった。

骨髄脂肪壊死と骨髄に不完全な壊死がみられ、また其処には修復機転が働いてなくまた骨細胞の壊死がない初期壊死と思われる所見および早期壊死所見を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。

(SHRSP/Izm ♂)		週齢(Wks)		壊死率 %
		15	17	
HFC食 + SP食群 壊死骨頭数	9	→ x		75
対象総骨頭数	12			
対照 壊死骨頭数	0	→ x		0
対象総骨頭数	6			

x : sacrificed

図 4. 実験②の計画内容及び結果

15週齢のSHRSP/Izm 6匹を使用し、HFC固形飼料とSP飼料を等量混合したものを約2週間与え、対照として3匹にSP飼料のみを2週間与えた。

大腿骨頭の壊死の頻度は対照群が0%に比して75%であった。

処置 (SHRSP/Nagasaki ♂)		週齢(Wks)		壊死率 %
HFC食+SP食	S.H.	匹数	13 14 15 16 17 18 19	
-	-	2	→ x	25
+	-	2	→ x	25
		3	→ x	17
+	+	10	→ x	50
		3	→ x	100
-	+	4	→ x	13
		3	→ x	50

HFC+SP等量飼料: → SP飼料: → x : sacrificed
S.H. : Steroid hormone (MPSL): 10mg bolus im : ↓

図 5. 実験③の計画内容及び結果

SHRSP/Nagasakiの13から15週齢にかけての壮ラットを使用しHFC固形飼料とSP飼料の等量混合物の投与の有無とステロイドホルモン負荷の有無で4群の実験を設定した。

ステロイドホルモン負荷はメチルプレドニゾロン10mgを1shotで背部に筋肉内注射を行った。尚、HFC固形飼料とSP飼料を等量混合物投与の重点的観察のために10匹の15週齢ラットに4週間投与も行った。

大腿骨頭の壊死の頻度は対照群が25%に比してHFC+SP等量飼料投与群、ステロイド負荷群は各々50%であった。

現状ではラットの大腿骨骨頭無腐性壊死は、retrospective的に修復機転を見越した組織学的所見から診断している。初期、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垂系、週齢を薬物負荷を使用することが望ましいと思われる。また発生時期が特定することは原因探求の手助けにもなり得よう。

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。しかし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週で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

処置 (SHRSP/Nagasaki ♂)			週齢(Wks)						壊死率 %
HFC食+SP食	S.H.	匹数	13	14	15	16	17	18	
-	-	2	→ x						25
-	+	3	→ x						50
+	-	10	→ x						50

	対照群	HFC+SP群	ステロイド群	対照群	HFC+SP群	ステロイド群	
体重	272	210	236	TCHO	58.5	92.7	84.3
TP	5.95	5.1	5.2	HDL	27.5	43.3	26.5
				LDL	10.5	12	21.7
				TG	52	101	73.3

HFC+SP等量飼料: → SP飼料: → x : sacrificed
S.H. : Steroid hormone (MPSL): 10mg bolus im : ↓

図 6. 実験③の血液生化学検査結果

体重: 対照群、HFC+SP等量飼料投与群、ステロイド負荷群の順で体重が増加していた。

血液生化学検査: 総コレステロール値やトリグリセライド値が対照群に比較してHFC+SP等量飼料投与群、ステロイド負荷群ではほぼ倍値に上昇し高脂血症を呈したが、電解質は正常であった。

処置 (SHRSP/Nagasaki ♂)			週齢(Wks)						壊死率 %
HFC食+SP食	S.H.	匹数	13	14	15	16	17	18	
+	-	10	→ x						50

体重	236 ± 29	TP	5.2 ± 0.53
		TCHO	84.3 ± 14.8
		HDL	26.5 ± 0.71
		LDL	21.7 ± 8.1
		TG	73.3 ± 25.6

HFC食+SP食: → x : sacrificed

図 7. HFC+SP等量飼料投与群内の血液生化学検査値にばらつき

HFC+SP等量飼料投与群間では総コレステロール値やトリグリセライド値の値にばらつきも見られた。一原因として等量の混合飼料であり、餌が均一でなく、ラットに餌摂取の学習効果に起因すると考えられる

のは10週以降にみられる。

今回の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ようである。growth plateが見られることや壊死がepiphysisに限局することはperthes病に類似するようであるがラットのgrowth plateが生涯見られることや壊死が一度しか発生しないことや壮年期に好発する事は成人の大腿骨頭壊死のモデルとして考えられる。故に大腿骨頭壊死のモデルとしてSHRSP/Nagasakiの14週齢、SHRSP/Izmの17週齢牡

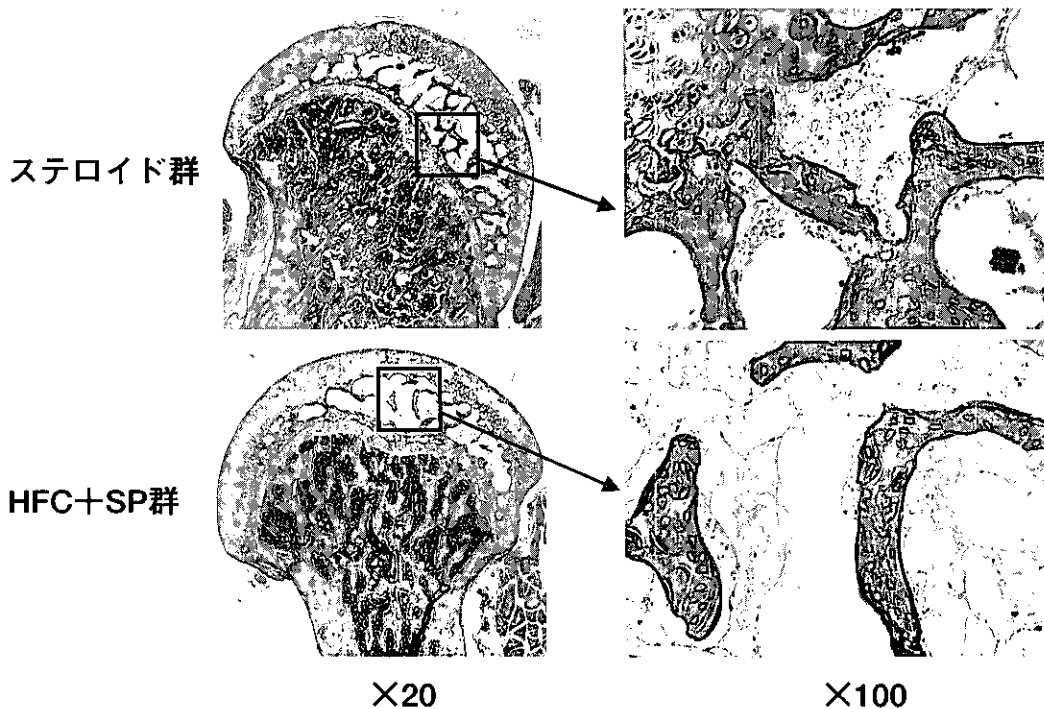


図 8. 実験③の大腿骨頭組織像

大腿骨頭の壊死はHFC+SP等量飼料投与群、ステロイド負荷群は各々50%で、またその壊死像は修復反応の少ない典型的なものが大部分であった。

ラットを使用すべきである。

【まとめ】

- ・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。

目的 2：NOS inhibitor 及びステロイドホルモン負荷の試み
実験②

【材料&方法】

実験①の結果をふまえてラットはSHR等疾患モデル共同研究会（SHRラット共同研）から購入した6匹のSHR/SPイズモラット（SHRSP/Izm）を使用し、15週齢からL-NNA（N^G-nitro-L-arginine）含有高コレステロール食（以下HFC固形飼料と略）とSP飼料を等量混合したものを約2週間与え、対照として3匹の同じ週齢のSHR/SPにSP飼料のみを2週間与えた。

実験①のように飼育、屠殺解剖後、生化学検査、組織学的観察評価をした（図4）。

（倫理面への配慮）

長崎大学実験動物委員会の認可を得た。

【結果】

体重と血圧について：HFC固形飼料とSP飼料を等量混合したものを与えても増加傾向がみられ、血液生化学検査では総コレステロール値やトリグリセライド値が対照群の倍値に上昇し高脂血症を呈したが、電解質は正常であった（図3）。

大腿骨頭の壊死の頻度は対照群が0%に比して75%であった（図4）。

大腿骨頭血管の光顕観察（H&E染色）ではNOS inhibitor投与による影響は見出せなかったが大腿骨頭骨端の骨髓腔の脂肪細胞に着目すると若干膨化していた。

実験③

【材料&方法】

実験②でSHRSP/Izmの大腿骨頭壊死とNOS inhibitor、高コレステロール飼料の因果関係がある