

図1 経過表 症例1 23才 女性 汎血球減少

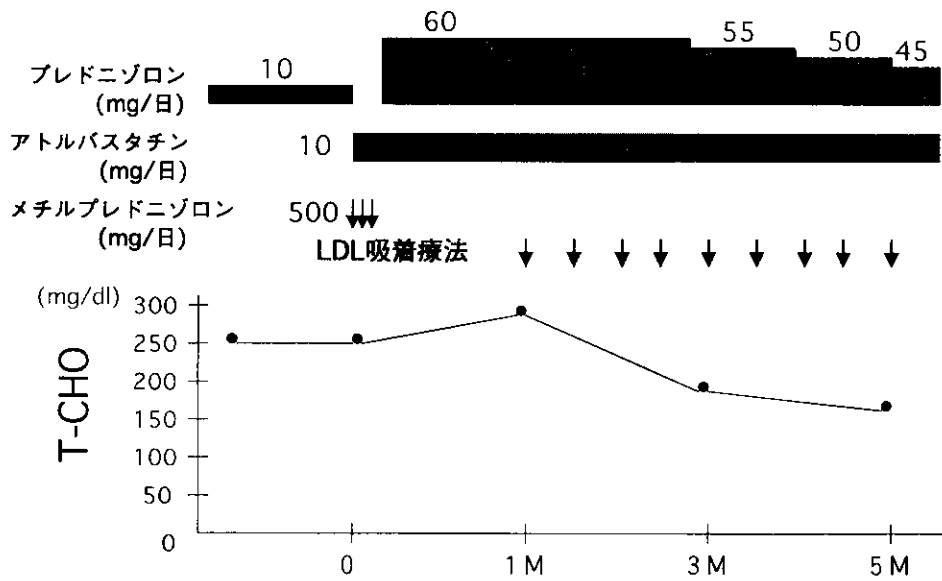


図2 経過表 症例2 18才 女性 ループス腎炎 (WHO IV)

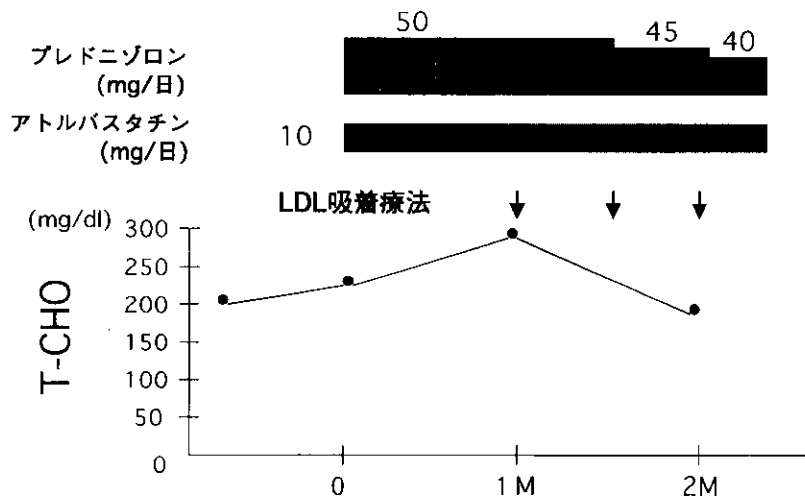


図3 経過表 症例3 26才 女性 ループス腎炎

臨床症状は認めず、単純X線および大腿骨頭のMRIでも変化を認めていない。

#### 症例3 (図3)

26歳女性。蛋白尿1~3g/日認め、ループス腎炎の診断でプレドニゾロン50mg/日の投与を開始した。開始前の総コレステロール値は228mg/dlで、同時にアトルバスタチン10mg/日を開始した。1ヶ月後の総コレステロール値は282mg/dlと上昇を認め、2週に一回のLDL吸着療法を開始した。蛋白尿の減少を認め、プレドニゾロンを減量可能となり、2ヶ月後の総コレステロール値は195mg/dlに低下した。2週に一回のLDL吸着療法は継続中である。1ヶ月後の臨床症状は認めず、単純X線および大腿骨頭のMRIでも変化を認めていない。

#### D. 考察

SLE患者に大量のステロイド剤を初回投与を行う場合や増量する場合に、高脂血症がみられることが多く、大腿骨頭壊死症の発生の危険因子を増幅することになり得る。

また大腿骨頭壊死症の発生はステロイド剤投与開始より3~6ヶ月といわれており<sup>9)</sup>、その期間に高脂血症を予防するための治療も必要と考えられる。

今回、ステロイド剤を初回投与あるいは増量する症例に対し、抗高脂血症薬 アトルバスタチンを同時に投与開始とし、またインフォームドコンセントにより血漿吸着療法(LDL吸着療法)の併用を行った。

3症例の結果より、アトルバスタチンの投与にも関わらず総コレステロール値の上昇が認められ、ステロイド剤によるSLEの活動性の低下により、ステロイド剤の減量とともに、総コレステロール値の低下が認められた。

現在までに大腿骨頭壊死症の発症は認めておらず、治療および経過観察中である。

今後、長期の経過観察および対象患者の追加が必要と考えられる。

#### E. 結論

SLE患者における大腿骨頭壊死症の発症の危険因子であるステロイド剤投与、高脂血症に関して、今後のデータ集積をしていく必要である。

#### F. 参考文献

- 1) Velayos EE, Lordholt JD, Smyth CJ, Priest R: Arthroplasty associated with steroid therapy. *Ann Intern Med* 64: 759-771, 1966
- 2) Leventhal GH, Dorfman HD: Aseptic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 4: 73-93, 1974
- 3) Mok CC, Lau CS, Cheng PW, Ip WY: Bilateral Kienbock's disease in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 26: 485-487, 1997
- 4) Mont MA, Glueck CJ, Pacheco IH, et al: Risk factors for osteonecrosis in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 24: 654-662, 1997
- 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* 79: 596-604, 1985
- 6) Mok CC: Risk factors for avascular bone necrosis in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 37: 895-900, 1998
- 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* 35: 227-232, 1976
- 8) Klipper AR, Stevens MB, Zizic TM, Hungerford DS: Ischemic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Galtimore)* 55: 251-257, 1976
- 9) Nagasawa K, Tsukamoto H, Tada Y, et al: Imaging study on the mode of development and changes in avascular necrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus: Long-term observation. *Br J Rheumatol* 33: 343-347, 1994

# 早期ステロイド性大腿骨頭壊死症における骨髓脂肪細胞の増大

本村 悟朗、山本 卓明、野口 康男、宮西 圭太、  
 岩本 幸英 (九州大学整形外科)  
 山下 彰久、居石 克夫 (順九州大学第一病理)

ステロイド性大腿骨頭壊死症の病因の一つに脂質代謝異常が提唱されており、動物実験では骨髓脂肪細胞径の増大が報告されている。今回我々はステロイド性壊死骨頭をStage1群とStage2以降の進行期群に分けて、骨髓脂肪細胞のサイズを比較検討した。その結果、早期のStage1が有意に骨髓脂肪細胞径が大きく、また、進行期群とコントロール群間の比較では有意差はなかった。これより、ヒトにおいて骨壊死発生早期には骨髓脂肪細胞径は増大していることが分かった。

## A. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死症の原因はいまだ不明であるが<sup>1,2)</sup>、これまでの動物実験の結果から、ステロイドによる脂質代謝異常の関与が示唆されている<sup>3,5)</sup>。一方、ヒトにおいて大腿骨頭壊死症の骨髓脂肪細胞が増大しているという報告は渉猟しえた限りでは1つだけされているが、OAとの比較であり、壊死群にはステロイド性とアルコール性とが混在し、stageは明記されていない<sup>4)</sup>。従って、現在のところ、どの時期に増大しているのか、股関節疾患のない骨頭の骨髓脂肪細胞と比べたらどうか、ステロイド性ではどうなのか、ということがはっきりしていない。そこで、今回我々は、ヒトステロイド性無症候性大腿骨頭壊死症例 (stage1) の骨頭を検索する機会を得たので、ヒトステロイド性壊死骨頭において、骨髓脂肪細胞径を病期別に比較検討することを目的とした。

## B. 研究方法

【対象】ステロイド性無症候性大腿骨頭壊死症 (以下Early ON Group) 4例4骨頭は、1989年から1992年の間に九州大学第一病理学教室にて剖検された症例である。ステロイド性症候性大腿骨頭壊死症 (以下Advanced ON Group) 7例7骨頭は、同時期に当科にて人工関節手術を施行された症例の中で、ステロイド投与歴を含め病歴が詳細に把握可能な症例から年齢をmatchさせて抽出した。また、ステロイド投与非壊死例 (股関節疾患無し、以下Ste+ON-

Group) 8例8骨頭、ステロイド非投与非壊死例 (Normal Group) 11例11骨頭は、同時期に九州大学第一病理学教室にて剖検された症例の中で、病歴が詳細に把握可能な症例から年齢をmatchさせて抽出した。それぞれの平均年齢、性別、基礎疾患を表に示す (表1)。

表1

Group	年齢	性別	基礎疾患
Early-ON (n=4)	41(33-47)*	1M 3F	SLE 2, 肝疾患 1, その他 1
Advanced-ON (n=7)	37(25-54) <sup>†</sup>	4M 3F	SLE 4, PN 1, その他 2
Ste+ON- (n=8)	50.6(38-62)*	5M 3F	血液疾患 6, PN 1, その他 1
Normal (n=11)	48.4(32-62)*	8M 3F	悪性腫瘍 6, 心疾患 3, その他 2

\*死亡時  
<sup>†</sup>手術時

【方法】骨髓脂肪細胞の計測はWangらの方法に従い<sup>5)</sup>、1骨頭においてランダムに4視野選択し (1視野=41×10.8 mm<sup>2</sup>)、NIH image ソフトを用いて1視野あたり25の脂肪細胞の長径を計測し、その平均を脂肪細胞のサイズとした。壊死に陥った脂肪細胞は除外した。

(統計学的解析) 壊死群間 2 群の比較にはt検定を用いたが、ステロイド一日最大投与量の比較のみ Mann-Whitney 検定を用いた。各群間の骨髓脂肪細胞

胞のサイズの比較には分散分析及び多重比較検定 (Fisher post hoc検定) を用いた。危険率5%以下を有意差ありとした。

### C. 研究結果

Early-ONGroupの骨髓脂肪細胞径は $82.3 \pm 8.6 \times 10^{-6}m$ であり、Advanced-ONGroupと比べると有意に大きかった (表2)。次に、この2群間において、ステロイド投与量の分布に違いがないか検討する目的で、ステロイド総投与量、ステロイド一日最大投与量、ステロイド投与期間を比較した。結果は表2に示すように、ステロイド総投与量、ステロイド一日最大投与量、ステロイド投与期間のどれも統計学的に明らかな有意差は見られなかった。従って、ステロイド性大腿骨頭壊死骨頭においては、早期と進行期を比べると早期の方が有意に骨髓脂肪細胞径が大きいことが分かった。そこで、早期の骨髓脂肪細胞径が大きいのか、進行期の骨髓脂肪細胞径が小さいのかをみるため、コントロール群と比較検討した。結果は表3に示すように、Advanced-ON Group群の骨髓脂肪細胞径はコントロールの2群の骨髓脂肪細胞径と比べ、明らかな有意差は見られなかった。

表2. Early-ON GroupとAdvance-ON Groupの比較

Group	Fat-cell Diameter ( $\times 10^{-6}m$ )	Age	Steroid		
			Total(mg)	Max/day(mg)	Duration(M)
Early-ON (n=4)	$82.3 \pm 8.6$	$41.0 \pm 6.1$	$10430.3 \pm 7773.9$	$350.5 \pm 450.9$	$30.3 \pm 51.9$
Advanced-ON (n=7)	$70.0 \pm 7.1$	$37.0 \pm 11.9$	$14614.3 \pm 6504.4$	$58.6 \pm 14.6$	$57.4 \pm 52.7$

\*  $p < 0.05$   
N.S not significantly

### D. 考察

我々の骨壊死の動物モデルを用いた実験系の採血データから、血漿中のfree fatty acid、triglycerides、cholesterolのレベルがステロイド投与後2週でピークに達し、8週から徐々に回復し始めることが分かっている<sup>6)</sup>。このデータは、脂肪代謝異常は徐々に改善してくることを示しており、早期には増大していた脂肪細胞が正常化してくることと関連しているのかも知れない。

### E. 参考文献

1. Arlet, J.: Nontraumatic avascular necrosis of the femoral head. Past, present, and future. Clin Orthop, (277) : 12-21. 1992.
2. Glimcher, M. J., and Kenzora, J. E.: The biology of osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implications: II. The pathological changes in the femoral head as an organ and in the hip joint. Clin Orthop, (139) : 283-312. 1979.
3. Miyanishi, K., Yamamoto, T., Irisa, T., Yamashita, A., Jingushi, S., Noguchi, Y., Iwamoto, Y.: Bone Marrow Fat-cell Enlargement and a Rise in Intraosseous Pressure in Steroid-treated Rabbits With Osteonecrosis. Bone, 30 ( 1 ) : 185-190, 2002.
4. Solomon, L.: Idiopathic necrosis of the femoral head: pathogenesis and treatment. Can J Surg, 24(6): 573-8. 1981.
5. Wang, G. J.; Sweet, D. E.; Reger, S. I.; and Thompson, R. C.: Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. J Bone Joint Surg Am, 59 ( 6 ) : 729-35. 1977.
6. Yamamoto, T.; Irisa, T.; Sugioka, Y.; and Sueishi, K.: Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum, 40 ( 11 ) : 2055-64. 1997.

表3. コントロール群との比較

	Normal (n=11)	Ste+ON- (n=8)	Advanced-ON (n=7)	Early-ON (n=4)
Fat-cell Diameter $\times 10^{-6}m$	$73.3 \pm 7.6$	$70.5 \pm 6.5$	$70.0 \pm 7.1$	$82.3 \pm 8.6$

\*  $p < 0.05$   
N.S not significantly

# ステロイド性大腿骨頭壊死症予防の試み

山本 卓明、野口 康男、宮西 圭太、本村 悟朗  
岩本 幸英 (九州大学整形外科)  
山下 彰久、居石 克夫 (九州大学第一病理)

ステロイド性大腿骨頭壊死症の病因の一つに、脂質代謝異常が提唱されている。本研究では、脂質代謝改善剤であるProbucoIを用い、動物モデルを用いて本症の予防法について検討した。本剤使用により、骨壊死発生率は79%から43%へと有意に低下した。また、高脂血症の程度および骨髓内脂肪細胞の内径増加も抑制されていた。ステロイド投与後に認められる高脂血症を抑制することは、ステロイド性大腿骨頭壊死の発生予防の一助となる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

特発性ステロイド性大腿骨頭壊死症（以下ION）と脂質代謝異常に伴う高脂血症との関連は従来より指摘されている<sup>1-5)</sup>。今回我々は、家兎を用いたステロイド単独投与による実験的骨壊死モデルを用い、高脂血症を抑制することにより、骨壊死発生率が変化するか否かについて検討し、その壊死発生メカニズムについても考察を加えた。

## B. 研究方法

ステロイド単独投与家兎骨壊死モデル<sup>1)</sup>を用い、以下の2群を作成した。A群はMSPL20mg/kgを一回のみ右臀筋内に筋注した群（28匹）、B群はMPSL20mg/kgを一回筋注に加えて、高脂血症治療剤であるProbucoIを4週間経口投与（300-350mg/kg/day）した群（30匹）とした。各群をステロイド投与後4週でト殺し、大腿骨・上腕骨における骨壊死発生率および骨髓内の脂肪細胞の径を病理組織学的に検討した。さらに血液生化学的検査も併せて行い、コレステロール、中性脂肪、血小板の経時的变化を検索した。

## C. 研究結果

A, B群における、骨壊死発生率は、それぞれ79%、43%で、ProbucoIを併用投与したB群が有意に低い骨壊死発生率を示した（ $P<0.01$ ）（図1）。さらにB群における骨髓内の脂肪細胞の径は平均で約53.4±

6.6と、A群の43.3±5.7と比べ有意に縮小していた（ $P<0.0001$ ）（図1）。

血液生化学データは、ProbucoI投与群では中性脂肪とコレステロールが有意に低下していたが、血小板は有意差を認めなかった（図2）。

## D. 考察

ProbucoIの主な薬理作用は、抗酸化作用、末梢組織からの脂質の引き抜き、動脈硬化抑制などがある。これまでの報告によれば、大腿骨頭壊死症では脂質が末梢組織である大腿骨頭へ沈着しやすいことが報告されている<sup>3,5)</sup>。この観点から考えると、ProbucoIが骨髓内への脂質沈着を抑制したことにより、骨壊死発生率が低下した可能性が考えられる。これは、骨髓内の脂肪細胞径がprobucoI投与により縮小していたことから裏付けられる。

しかしながら、骨壊死発生率をゼロにすることは出来ておらず、また今回の検索では直接的な骨壊死の抑制機序は解明できていない。今後は、具体的な壊死発生抑制のメカニズム解明に加えて、他の要因の検討も合わせて行い、臨床応用へと進めていきたい。

## E. 結論

ステロイド単独投与骨壊死モデルにおいて、ステロイド投与後に認められる高脂血症を抑制することは、ステロイド性大腿骨頭壊死の発生予防の一助と

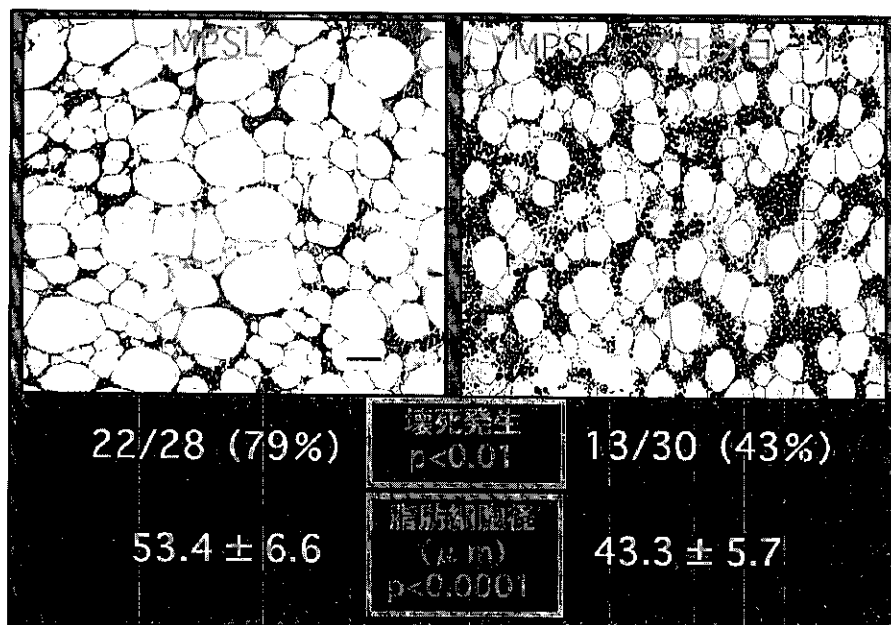


図 1

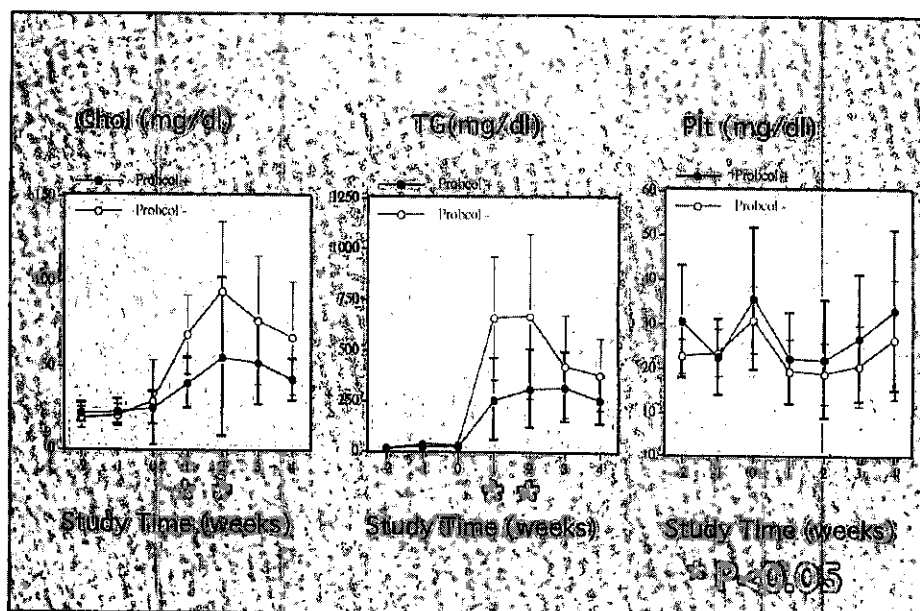


図 2

なる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamamoto T, Bullough PG. The role of subchondral insufficiency fracture in rapid destruction of the hip joint. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2423-2427.

2. Yamamoto T, Schneider R, Bullough PG. Insufficiency subchondral fracture of the femoral head. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 464-468.

### 2. 学会発表

1. Yamamoto T, Bullough PG, Iwamoto Y. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head. A differential diagnosis in Osteonecrosis. The ARCO Meeting. October 4-6, 2000,

Baltimore, USA.

2. Yamamoto T, Sugioka Y, Bullough PG, Iwamoto Y. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head. International Hip Society. October 11-14, 2000, Los Angeles, USA.

#### F. 参考文献

- 1) Yamamoto T, Irisa T, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues. *Arthritis Rheum* 1997;40:2055-64.
- 2) Jones JP Jr. Fat embolism, intravascular coagulation and osteonecrosis. *Clin Orthop* 1993;292:294-308.
- 3) Boskey AL, Raggio CL, et al. Changes in the bone tissue lipids in persons with steroid- and alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop* 172: 289-295, 1983.
- 4) Miyanishi K, Yamamoto T, et al. Increased level of apolipoprotein B/apolipoprotein A1 ratio as a potential risk for osteonecrosis. *Ann Rheum Dis* 58:514-516, 1999.
- 5) Miyanishi K, Yamamoto T, et al. A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology* 40: 196-201, 2001.

# 骨髓内脂肪培養に関する研究

佛淵 孝夫 (佐賀医科大学整形外科教授)

特発性大腿骨頭壊死の発生機序については、様々な説が唱えられており、近年は脂質代謝や脂肪細胞の関与も注目されてる。今回、我々は特発性大腿骨頭壊死における骨髓内脂肪細胞の役割を解明するため、手始めに変形性股関節症（以下OAと略す）症例を対象とした培養実験を開始したので報告する。平成13年7月から10月にかけて当院でTHAを施行したOA 45例の骨髓内脂肪細胞を培養した。全検体の50%前後を生着させることができた。若年群に対し高齢群の方が生着率は高い傾向にあった。今後の方針としては、さらに症例を増やし、特発性大腿骨頭壊死の発生機序を究明していきたいと考えている。

## A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死の発生機序については、様々な説が唱えられており、近年は脂質代謝や脂肪細胞の関与も注目されてる。今回、我々は特発性大腿骨頭壊死における骨髓内脂肪細胞の役割を解明するため、手始めに変形性股関節症（以下OAと略す）症例を対象とした培養実験を開始したので報告する。

- 1) まず、THAで大腿骨をリーミングした際に得られる骨髓内組織を採取する。
- 2) これを遠心し、脂肪組織の層の細胞を、培養液が充満したフラスコにいれる。
- 3) 天井面に細胞が接着した後、反転して観察する。

(倫理面への配慮)

研究の趣旨を説明した文書を作成し、承諾を得た。

## B. 研究方法

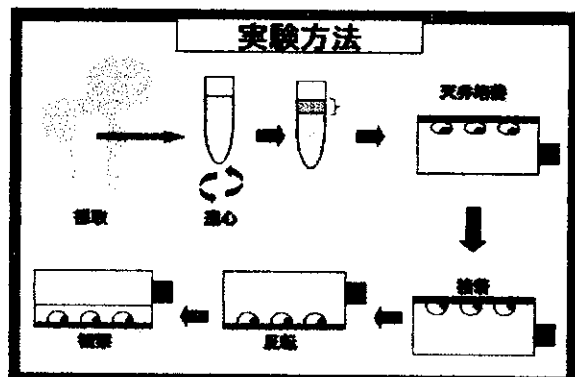
### 1 対象

対象は平成13年7月から10月までに人工股関節全置換術（以下THAと略す）を施行したOA45症例。男性8例、女性37例で、平均年齢は男性62.6才、女性62.8才であった。

### 2 実験方法

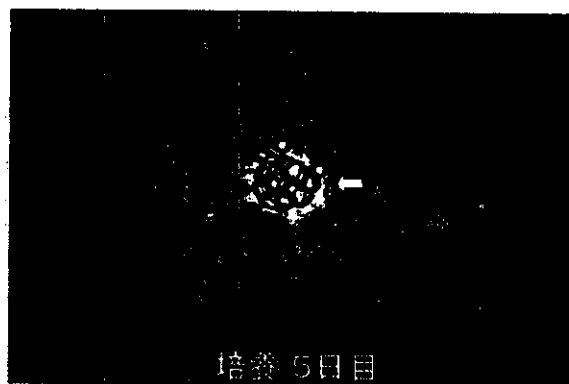
共同演者の杉原らが脂肪培養のために考案した天井培養法を用いた。

実験方法のシェーマを以下に示す。



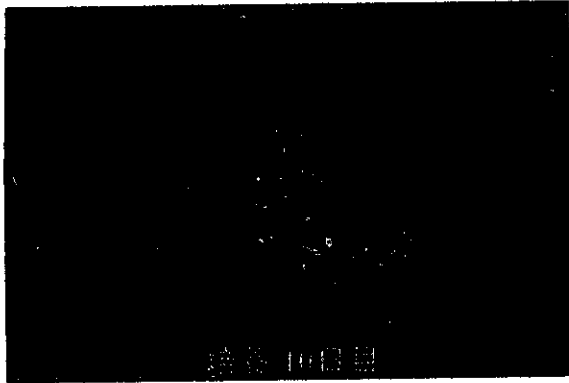
## C. 研究結果

### 1 組織学的形態学的変化

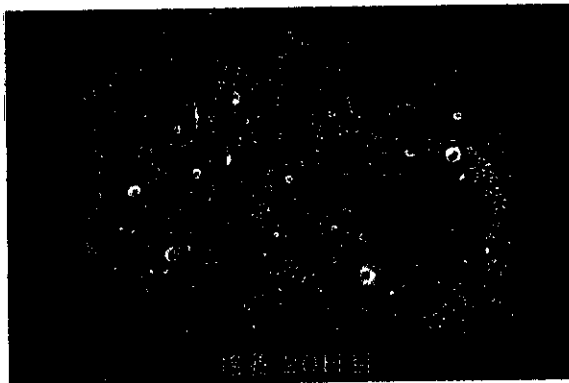


- 1) まず、接着した脂肪組織片（矢印）周囲にfibroblast-like cellが出現する。



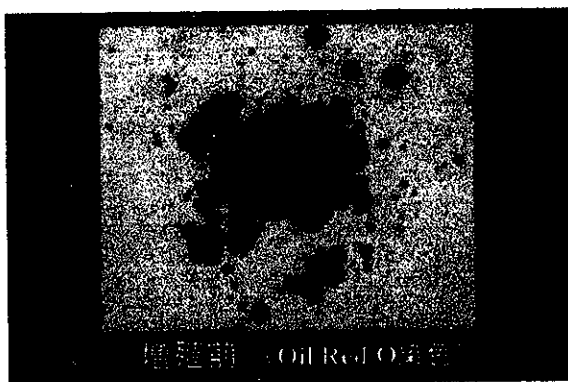


2) 経過を追う毎に、fibroblast-like cell は増加して  
いく。

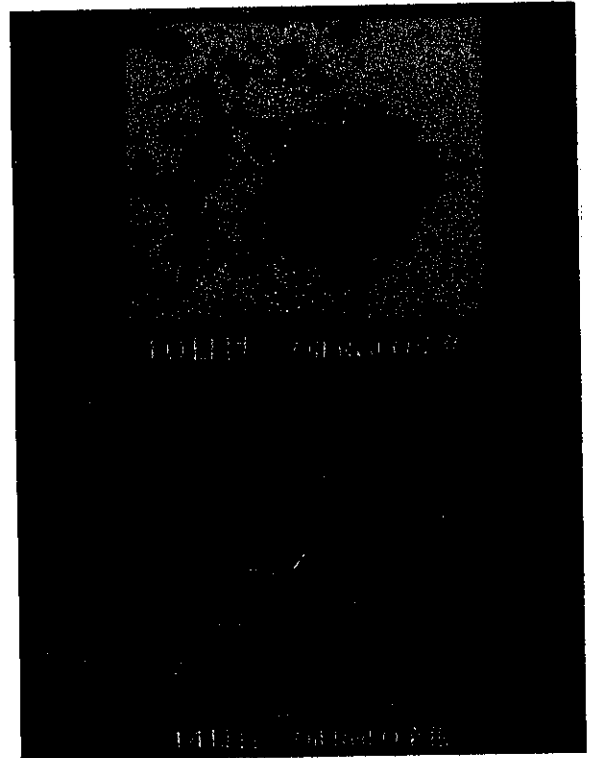


3) コンフルエントの状態になると、分化傾向を示  
すようになる。具体的には、細胞質内に脂肪滴  
を持ち始め多胞性脂肪細胞が出現してくる。

この形態学的変化をさらに詳細に観察するために  
Oil red O染色を用いた。(この染色では、脂肪は赤  
染する。)



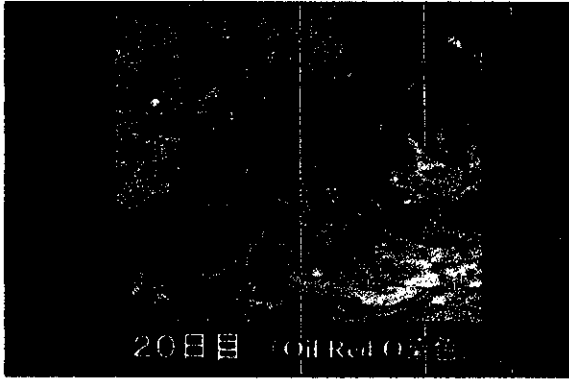
1) 最初にまいた脂肪細胞の塊である。



2) 前述のように、周囲にfibroblast-like cell が出現  
する。経過を追う毎に、fibroblast-like cellは増  
加していく。徐々に胞質内に脂肪滴を持ち始め  
多胞性脂肪細胞が出現する。



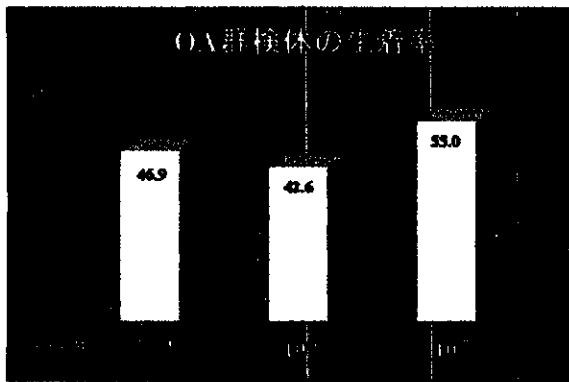
3) さらに拡大すると、細胞質内に微細な脂肪滴が  
多数出現しているのがわかる。この現象より、  
これらの細胞がいわゆるfibroblastではないこと  
がわかる。



- 4) 上述の脂肪滴が増大するとこのような像が認められる。これらブドウ房状の多胞性脂肪細胞はやがて単胞性脂肪細胞へと変化していく。

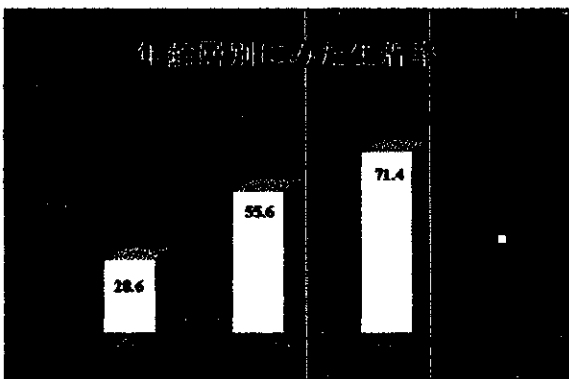
## 2 生着率

- 1) 生着率を下に示す。ステロイド反応性を調べる目的で、培養液中にデキサメタゾン投与している。現時点では50%前後の生着率を得ている。

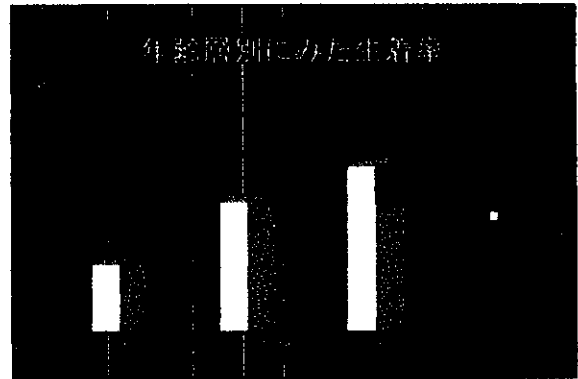


- 2) 次に年齢層別の生着率を示す。

年齢層別にみると、高齢群の方が若年群に比べ、生着率が高い傾向を認めた。



- 3) これを培養液のステロイド濃度別に示す。



高齢群では生着率とステロイド濃度には明らかな差はないが、若年層ではステロイドを加えると生着率が上昇する傾向を認めた。

## D. 考察

今回の研究では興味深い現象を2点認めた。1つは若年群よりも高齢群の方が生着しやすい、という点。もう1つはステロイド投与下では生着率は高齢群とほぼ同等になる、という点である。また、症例数が少ないため断言はできないが、もし、「若年群では骨髄内脂肪の接着、増殖能力が低いのにステロイド投与によりこれらが上昇する」という仮説が成立すれば、パルスなどステロイド療法との関連を見出す糸口になるかもしれない。

更に高濃度のステロイド投与の系で確認する必要があると考えている。

## E. 結論

- 平成13年7月から10月にかけて当院でTHAを施行したOA45例の骨髄内脂肪細胞を培養した。
- 全検体の50%前後を生着させることができた。
- 若年群に対し高齢群の方が生着率が高い傾向にあった。
- 今後の方針としては、特発性大腿骨頭壊死の症例を増やし、以下についてOAと比較・検討する予定である。
  - \* ステロイド反応性
  - \* サイトカイン産生能
  - \* サイトカインレセプター
  - \* 骨髄内組織の増殖・分化の形態学的変化

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 石井孝子、セメントレス人工股関節全置換術の早期荷重に関する検討、2000, 10, 20. 日関外誌19suppl. 2000:101
- 2) 石井孝子、THAにおけるクリニカルパス、第37回日本リハビリテーション医学会、2000, 6, 23. プログラム・抄録集：46
- 3) 釘本康孝、THA術後における自助具の評価、第100回西日本整形災害外科学会、2000年 整形外科と災害外科 50：1149－1152、2001年
- 4) 肥後たかみ、大腿骨側の形態からみたセメントレスTHAの短期成績、第13回日本人工関節学会、2001, 3, 23. 抄録集：124
- 5) 古賀俊光、THAにおける自己輸血について、関節外科学会、2001, 10, 21. 日関外誌19suppl: 97
- 6) 古賀俊光、各種大腿骨骨切り術後に対するTHA、日本リウマチ・関節外科学会、日本リウマチ・関節外科20suppl:97

### 2. 学会発表

- 1) 肥後たかみ、THAにおける自己輸血の経験、第99回西日本整形災害外科学会、2000年
- 2) 石井孝子、セメントレス人工股関節全置換術の早期荷重に関する検討、関節外科学会、2000年
- 3) 石井孝子、THAにおけるクリニカルパス、第37回日本リハビリテーション医学会、2000年
- 4) 釘本康孝、THA術後における自助具の評価、第100回西日本整形災害外科学会、2000年
- 5) 肥後たかみ、大腿骨側の形態からみたセメントレスTHAの短期成績、第13回日本人工関節学会、2001年
- 6) 古賀俊光、THAにおける自己輸血について、関節外科学会、2001年
- 7) 肥後たかみ、人工股関節全置換術における自己輸血、整形外科と災害外科 50：536－539、2001年
- 8) 古賀俊光、各種大腿骨骨切り術後に対するTHA、日本リウマチ・関節外科学会、2001年

## ORP150とHO1による骨組織の虚血性変化の評価

菅野 伸彦、西井 孝、三木 秀宜、中村 宣雄、  
原口 圭司、坂井 孝司、岸田 友紀、吉川 秀樹、  
(大阪大学医学部整形外科)  
佐藤 宗彦 (井上病院整形外科)  
大園 健二 (国立大阪病院整形外科)

Rat modelで神経細胞や骨組織の虚血性変化の良好な指標となりうるORP (oxygen-regulated protein) 150とHO1 (haemoxygenase 1) を用いて、一過性大腿骨頭萎縮症例 (TOF) での骨頭内虚血性変化の有無を、頸部骨折症例 (FNF) と比較し評価した。FNF例の骨折後3日以内の摘出骨頭では、骨細胞・骨髄細胞にORP150およびHO1の発現を認めたが、TOF例のbiopsy標本ではORP150およびHO1の発現は認められなかった。TOFは骨髄内浮腫がその主病態であり、骨頭壊死症の前駆状態や骨頭内での虚血性変化の続発病態ではないと推察された。

### A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症は、ステロイドやアルコールなどの疫学的背景因子の如何にかかわらず、大腿骨頭の虚血により発生するとされている。骨髄の血流障害の過程に骨髄内圧上昇が関与しているとの報告もあり、また臨床的にMRIで観察される骨髄浮腫が骨壊死発生の前駆状態であるとの仮説もある<sup>1)</sup>。そこで、骨細胞や骨芽細胞などの虚血に対する反応をmRNAの発現で観察することで、臨床的にMRIで観察される骨髄浮腫が壊死発生にいたる循環障害であるか否かを検証する。

### B. 研究方法

虚血などで発現するストレス蛋白であるORP (oxygen-regulated protein) 150とHO1 (haemoxygenase 1)に着眼して、ラット骨組織の虚血後の細胞死にいたる過程を、in situハイブリダイゼーション法とTUNEL法で観察されたように<sup>2)</sup>、ヒトの骨組織でも観察できるかを検証するために、大腿骨頸部骨折後の大腿骨頭の組織学的観察を行った。骨折後2日の骨頭1個、骨折後3日の骨頭1個、骨折後7日の骨頭2個、骨折後14日の骨頭1個をパラホルムアルデヒドとマイクロウェーブ固定し、脱灰し、薄切標本作製した。大腿骨頸部骨折後に生じる骨壊死は

サイズの如何にかかわらず、骨頭頂上部の外側が常に含まれるため<sup>3)</sup>、同部位のHE標本に加えて、ORP150とHO1のin situハイブリダイゼーション法によるmRNAの発現を検討した。また、一過性大腿骨頭萎縮症例 (TOF) 2例のCore生検標本も同様に、組織学的に検討した。

### C. 研究結果

大腿骨頸部骨折後7日以降に摘出した大腿骨頭では、ORP150とHO1のmRNAを発現している細胞はなかった。骨折後3日以内の大腿骨頭では、骨頭頂上部の外側部の骨細胞にORP150とHO1のmRNAの発現を認めた。ここで、ヒトの骨組織でも虚血に対してORP150とHO1のmRNAの発現を認めることが明らかとなった。一方、TOF2例のCore生検標本では、骨細胞の壊死は認めなかったが、骨髄浮腫が認められた。骨細胞、骨芽細胞、骨髄細胞にはORP150とHO1のmRNAの発現を認めなかった。

### D. 考察

骨内血管の透過性亢進と滲出液による骨髄浮腫は、骨循環障害を引き起こし虚血性骨壊死を発生する可能性が示唆されているが、本研究において、TOFに伴う骨髄浮腫は、細胞レベルで低酸素ストレ

ス蛋白のmRNA発現がなく、骨壊死を発生する病態ではないと考えられた。

#### F. 参考文献

- 1) Hofmann S, Engel A, Neuhold A, et al: Bone-marrow oedema syndrome and transient osteoporosis of the hip. An MRI-controlled study of treatment by core decompression. *J Bone Joint Surg* 75B:210-6, 1993.
- 2) Sato M, Sugano N, Ohzono K, et al: Apoptosis and expression of stress protein (GRP78, HO1) during development of ischemic osteonecrosis in a rat experimental model. *J Bone Joint Surg* 83B:751-759, 2001.
- 3) Sugano N, Masuhara K, Nakamura N, et al: MRI of early osteonecrosis of the femoral head after transcervical fracture. *J Bone Joint Surg* 78B:253-7, 1996.

# 大腿骨骨髄損傷後再生過程に関する研究

大西 英生 (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3週間の再生過程において、HIF-1alphaおよびARNT (HIF-1beta)は3日から5日にかけて、共に血管細胞に発現し、前骨芽細胞および骨芽細胞には発現しなかった。EPAS-1 (HIF-2alpha)は11日以降、単独で骨芽細胞に発現した。

## A. 研究目的

大腿骨頭壊死の分子メカニズムは、解明されておらず、適切な動物モデルはない。そこで骨髄再生の分子メカニズムを解明することが、本疾患の病態解明につながると考えた。これまで、低酸素状態の培養骨芽細胞では、HIF familyを介してVEGFが発現することがわかっている。今回、骨髄損傷再生過程にHIF familyが関与するか否かを明らかにするためにHIF-1 $\alpha$ 、ARNTおよびEPAS1の発現を検索した。

## B. 研究方法

Wistar系雌性ラットの両大腿骨骨幹部に2.5mm径の骨孔を作成した。術直後、1、3、5、7、11、14および21日に損傷部骨組織を摘出した。骨組織は、浸潤固定と脱灰処理を施してパラフィン包埋した。①HE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Flk-1、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  (EPAS-1)、HIF-1 $\beta$  (ARNT)の免疫染色④in situ hybridizationとしてオステオカルシンmRNA発現、⑤電子顕微鏡を用いた血管内皮細胞分化過程の観察。

## C. 研究結果

HE染色:1日後、損傷部はフィブリンクロットで覆われた。3日後、損傷部周辺の骨内膜および骨髄から多数の間葉細胞が進入し、5日後には間葉細胞が骨芽細胞へ分化し、髄腔内仮骨ネットワークを形成した。11日以降、髄腔内仮骨は消失し、造血細胞に置換されていった。

ALP染色、免疫染色、in situ hybridization:3日後ALP陽性であるが、オステオカルシンのmRNA発現を呈さない前骨芽細胞が出現した。この他、血管細胞分化の指標である、Flk-1免疫陽性細胞も出現した。5日後には3日後のALP陽性細胞はオステオカルシンmRNAを発現する骨芽細胞へ分化した。HIF-1 $\alpha$ とARNTの免疫陽性細胞は、1~5日後の損傷部周辺の新生血管内皮にみられたが11日以降はこれらの免疫反応は消失した。骨芽細胞にはこれらの免疫反応は全過程でみられなかった。一方、HIF-2 $\alpha$  (EPAS-1)の発現は、5日後まで認められなかったが、11日以降の骨芽細胞に発現した。

電子顕微鏡像:3日後の電子顕微鏡像では、ALP陽性細胞と既存骨髄の境界部にスリット管腔を形成した新生血管像を呈した。さらに5日以降では、周囲の骨芽細胞が形成する海綿骨ネットワークの間隙に存在する洞様毛細血管への発達が確認できた。

## D. 考察

HIF-1alphaおよびARNT (HIF-1beta)は3日から5日にかけて、共に血管細胞に発現し、前骨芽細胞および骨芽細胞には発現しなかった。

EPAS-1 (HIF-2alpha)は11日以降、単独で骨芽細胞に発現した。

## E. 結論

HIF familyは、骨髄損傷後5日までの血管新生部位に、HIF-1alphaとHIF-1betaが、11日以降の骨新生には、HIF-2alphaが関与する。

## F. 研究発表

### 学会発表

Localized Expression of Hypoxia Inducible Factor Family and Differential Expression of VEGF splice isoforms in Neovascularization and Bone Formation during Regenerating Bone and Bone Marrow after Drill-Hole Injury 2001 ASBMR Phoenix USA

# 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、松野 丈夫、後藤 英司、寺西 正  
(旭川医科大学、整形外科)

池田 仁、吉木 敬  
(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steroid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ため次の3群を作製した。A群：10週齢のenv-pX rat 2頭にprednisolon acetate 6mg/100g B群：67週齢のenv-pX rat 1頭にprednisolon acetate 10mg/100gを2週間隔で2回投与。C群：14週齢のenv-pX rat 8頭にsteroidパルス療法に準じてprednisolone acetate、methylprednisolone acetateをそれぞれ4頭づつ7日間連日投与。それぞれ6週間後に骨頭壊死発生の有無を組織病理学的に検討した。いずれの群も骨頭壊死の発生は見られなかった。また、8週齢の雄normal LEW rat 3頭にLPSを10 $\mu$ g/kgづつ1回静脈内に投与したところ、1頭で骨頭壊死を示唆する所見が認められた。DIC状態の惹起がratにおいても骨頭壊死の発症に影響する可能性が示唆された。

## 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<sup>1)</sup>、Schwartzman反応を利用して血管内の過凝固状態を作成しこれにsteroidを投与することで骨壊死を誘導するモデル<sup>2)</sup>、steroid単独投与による実験的に骨壊死を作成したモデル<sup>3)</sup>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、ratにsteroid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てきたのでその経過について報告する。さらに、これまでに報告されている骨壊死モデルがratでも再現できるかについて検討を加えた。

## B. 研究方法

使用するratの背景

今回実験に用いた、HTLV-I LTR-env-pX transgenic rat (以下env-pX rat) について簡単に説明する。ヒトT細胞白血病ウイルス(以下HTLV-I)は、成人T

細胞白血病(ATL)の他にも慢性脊髄麻痺を主症状とするHAM/TSPや慢性関節リウマチ類似の関節炎、シェーグレン症候群類似の唾液腺炎などHTLV-I関連疾患と総称されるさまざまな自己免疫疾患を発症する。我々の教室では、HTLV-I遺伝子のenvおよびpX領域をLTRプロモーターとともにWKAH ratに導入して、env-pX ratを作製した。このenv-pX ratは、生後5~6週頃から関節炎や血管炎、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。また疾患発症後のenv-pX ratの血中では、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が検出されており、env-pX ratにおける疾患の発症には自己免疫的機序が関与していると考えられている。env-pX ratに認められる疾患の病理組織像として、関節炎の局所では滑膜の増生や関節腔の狭小化、骨破壊像を伴うパンヌスの形成、CD4陽性T細胞の浸潤が認められる。またフィブリノイド壊死を伴う血管炎などの発症を認めている。このような自己免疫疾患発症ratを用いて大腿骨頭壊死をつくることで、大腿骨頭壊死症により近い病態が再現できる可能性があると思われる。

対象と方法

(1) env-pX ratを用いて次の3群に分けた。A群は



表 1. steroid pulse療法に準じたスケジュール

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

prednisolone acetate 6mg/100g を 2 頭に 1 回筋肉内単独投与した。B群はprednisolone acetate 10mg/100g を 1 頭に24時間間隔で 2 回筋肉内単独投与した。C 群はprednisolone acetate、methylprednisolone acetateをそれぞれ 4 頭に表 1 のごとくsteroid pulse療法に準じた投与方法に従って筋肉内に投与した。Rat はいずれも投与後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。

(2) normal LEW ratの雄雌各12頭に対してprednisolone acetateを 2mg/100g、10mg/100gの 2 doseで 1 回筋肉内単独投与した。Ratは投与後 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。

(3) 居石ら<sup>2)</sup>の報告を参考に、8 週齢の雄 normal LEW rat 3 頭にLipopolysaccharide (LPS : E.coli 011: B4, SIGMA社) を10 $\mu$ g/kgづつ 1 回静脈内に投与した。投与後 2 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。

#### (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

(1) A群では10週齢の雄 2 頭に、B群では64週齢の雄 1 頭に、C群では14週齢の雄 4 頭にprednisolone acetate を、16週齢の雄 4 頭にmethylprednisolone acetate を、それぞれ steroid pulse 療法に準じて投与した。いずれの群でも病理組織学的に骨頭壊死は確認できなかった。

(2) normal LEW rat への投与では、24頭すべてで組織学的に骨頭壊死を確認できなかった。

(3) 3 頭のうち 1 頭で骨頭壊死を疑わせる所見を



図 1. epiphysis の壊死像

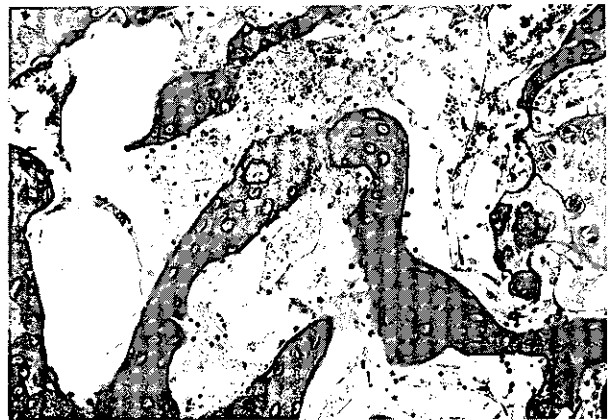


図 2. empty lacunaeと壊死物

認めた(図 1, 2)。組織学的にはLPS投与の 2 週間後に犠牲死させて確認したため壊死として特徴的な所見ではないが、epiphysis部分で骨梁にempty lacunaeを認め、骨髄細胞の減少と一部壊死組織も見られる。

### D. 考 察

大腿骨頭壊死モデルを作製する上で我々は、epiphysisに壊死が見られることが重要であると考えている。これまでのモデルではdiaphysisには再現性のある壊死が見られているがepiphysisには見られたという報告はない。さらに、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<sup>4)</sup>、自己抗体をもつ動物でモデルを作製するというのも重要である。これらの条件を満たしうる動物として、env-pX ratによるモデル作製を検討した。

前回、いくつかのstrainのratにsteroidを投与したと

ころLEW rat 2 頭で骨頭壊死が確認できたことを報告した。しかし、その後頭数を増やして行った検索では、新たな骨頭壊死は確認できず、数頭のenv-pX ratへのsteroidを投与でも明らかな骨頭壊死は確認できなかった。そこで我々は居石ら<sup>2)</sup>の報告に注目し、LPSによりDIC状態を惹起することで骨頭壊死発生率が上がるのではないかと考え、今回 ratでの検討を加えた。normal rat 3 頭にLPSを投与したところ、1 頭で骨頭壊死を疑わせる所見が確認できた。しかし、投与後から犠牲死させるまでの期間が短かったため、病理組織学的に骨頭壊死とは判断しづらい結果となった。今後はさらに頭数を増やすとともに、6 週間待機した上で検索したいと考えている。今回の結果から、LPSによるDIC状態の誘発でnormal だけでなくenv-pX ratでも骨頭壊死が発生するものと期待している。

## E. 結 論

env-pX ratへのsteroid投与では、現在までに明らかな骨頭壊死は確認されていないが、normal LEW ratへのLPS投与で3 頭中1 頭に骨頭壊死を示唆する所見を認めた。今後はenv-pX ratへのLPS投与を検討している。

## F. 研究発表

### 論文発表

- 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 methyleprednisolone 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.

# ステロイド誘発性大腿骨頭壊死における骨細胞アポトーシスと腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - $\alpha$ の役割に関する研究

田中 栄 (旭東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科)

ステロイド誘発性大腿骨頭壊死の骨頭においては骨細胞アポトーシスが認められることが知られているがその原因については不明なままである。今回われわれは大腿骨頭壊死の壊死組織においてTNF- $\alpha$ を高発現する細胞が存在することを明らかにした。骨細胞株細胞であるMLO-Y4細胞はTNF- $\alpha$ 、あるいはdexamethasone (DEX) によってアポトーシスを生じる。正常マウスにDEXを持続投与すると骨組織におけるTNF- $\alpha$ の発現が上昇し、骨細胞アポトーシスが認められるが、TNF- $\alpha$ をノックアウトしたマウスではこのような骨細胞アポトーシスは認められない。以上の結果からステロイド投与によって発現上昇したTNF- $\alpha$ が大腿骨頭壊死における骨細胞アポトーシスの原因である可能性が示唆された。

## A. 研究目的

大腿骨頭壊死は壮年期成人に好発し、その罹患によって股関節が破壊され、起立歩行障害によりQOLが著しく侵される疾患である。同様の股関節破壊が生じる疾患として慢性関節リウマチが挙げられる。昨年われわれは慢性関節リウマチにおいて急速に股関節破壊が生じた症例を検討し、このような症例においてはステロイドの1日使用量が有意に高いことを明らかにした。また股関節破壊部位において骨細胞のアポトーシスが生じていること、そしてこのような骨細胞アポトーシスにTNF- $\alpha$ が関与している可能性を報告した。本年の研究では特発性大腿骨頭壊死患者の壊死組織においてTNF- $\alpha$ を高発現する細胞が存在し、その周囲に骨細胞アポトーシスが認められることを示した。またマウスへのデキサメサゾン投与によって骨細胞アポトーシスが誘発されることを示し、このアポトーシスがTNF- $\alpha$ ノックアウトマウスでは抑制されていることを明らかにした。

## B. 研究方法

当科において2001年度に人工股関節全置換術を行った2症例について文書によるインフォームドコンセントを得た後大腿骨頭を採取し、これを病理学的に検討した。骨細胞アポトーシスtransferase-mediated dUTP-nick end labeling (TUNEL) 染色に

よって判定した。TNF- $\alpha$ の発現は特異的な抗体を用いた免疫組織染色によって検討した。培養骨細胞としてはLynda Bonewaldらによって樹立された骨細胞の株細胞であるMLO-Y4細胞を使用した。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。マウス骨細胞アポトーシスモデルはWeinsteinらの報告にしたがって作成した。すなわち10週齢のマウス背部皮下に7.5 mgのデキサメサゾンベレットを挿入し、4週後に屠殺し、大腿骨頭組織を検討した。TNF- $\alpha$ ノックアウトマウスは東京大学医科学研究所の岩倉洋一郎博士より供与された。

(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2000年度におこった特発性大腿骨頭壊死症2例(ステロイド誘発性1例、アルコール性1例)の大腿骨頭組織においてTUNEL染色で陽性に染色される骨細胞が観察された。またその周囲には抗TNF- $\alpha$ 抗体で染色される細胞の著明な浸潤が認められた(図1)。

骨細胞株細胞であるMLO-Y4細胞をTNF- $\alpha$ で刺激

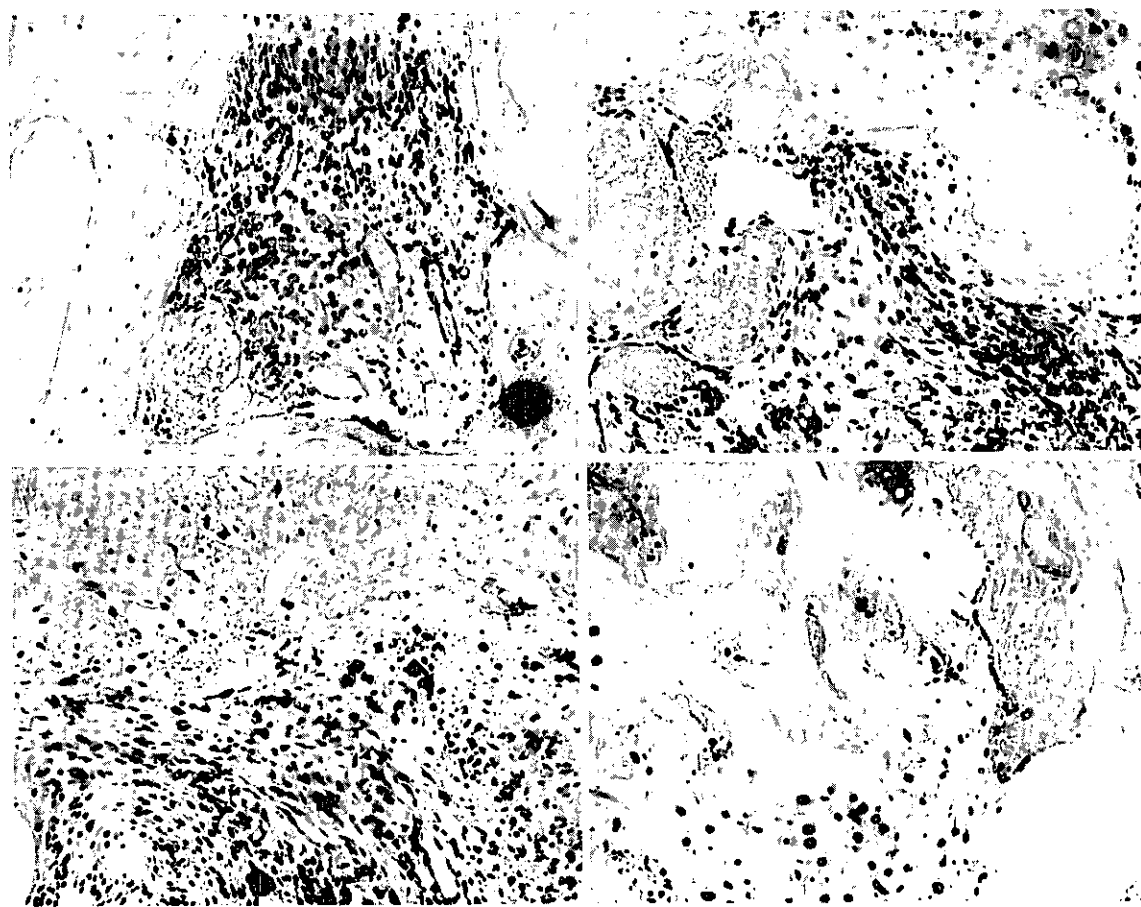


図 1 : 大腿骨頭壊死症例大腿骨における抗TNF- $\alpha$ 抗体染色

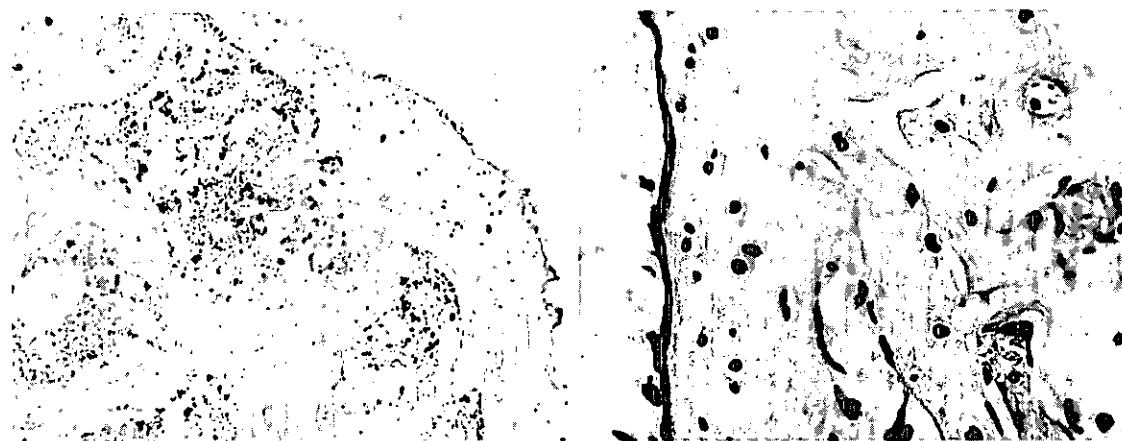


図 2 : 正常マウスへのデキサメサゾンペレット投与による骨細胞アポトーシス (TUNEL 染色)

したところ用量依存性に細部数の減少が認められた。このとき細胞の核の濃染像が認められ、アポトーシスの誘導が示唆された。同様の現象キサメサゾンによっても誘導された。

10 週齢の正常マウスに7.5 mgのデキサメサゾンペレットを皮下移植したところ4週目には骨細胞の

アポトーシスが観察された(図2)。またこのときアポトーシスに陥った骨細胞の周囲には抗TNF- $\alpha$ 抗体で染色される細胞の浸潤が認められた。現在TNF- $\alpha$ ノックアウトマウスにおいて検討しているが、プレリミナリーな検討ではアポトーシスに陥る骨細胞数の減少が認められた。