

病変部およびその周囲の染色性について観察した。また血管透過性の評価として抗アルブミン抗体を用いて各3群において検討した。

C. 結果

(1) 抗AGEsモノクローナル抗体を用いた検討

A群（コントロール群）では陽性所見は認められなかった。一方、ステロイドを投与したB群、C群とも陽性所見が観察された。B群（5日群）においては大腿骨近位内側部（壊死好発部位）に陽性所見を認め、強拡大では同部位の陽性細胞の集簇が観察された。またC群（14日群）では、壊死部を含む周辺に多数の陽性細胞の集簇が認められ、B群と比較し染色範囲は広範囲であった。また大腿骨近位外側および骨幹部でも陽性細胞は散在性に認められたが、壊死部周辺に比べると明らかに少なかった。AGEsは時間の経過とともに範囲が広く、かつ集簇も多くなる傾向があると思われた。

(2) 抗アルブミン抗体を用いた検討

A群ではアルブミンの漏出と思われる所見は認められなかった。B群では、AGEsと同様に大腿骨近位内側部（壊死好発部位）の間質に漏出所見を認めた。C群でも壊死部および壊死周囲の間質を中心により強く漏出所見が認められた。また、B群およびC群ともに大腿骨近位外側および骨幹部でも若干の漏出所見を認めた。

D. 考察

大腿骨頭壊死症の発生機序はこれまで、脂肪塞栓説⁶⁻⁸⁾やコンパートメント説⁹⁻¹¹⁾、血管炎などの血管自体の障害によるとされる説¹²⁾、骨髄内出血、微小血管の破綻説¹³⁾、凝固、線容系の異常説¹⁴⁾、血栓説¹⁵⁾¹⁶⁾などの諸説が報告されてきたが、未だ詳細は明確にはされていない。以前に我々は、ステロイドと低分子ヘパリンの併用投与により壊死面積は増大することを班会議にて報告した¹⁷⁾。最近の我々の知見では、ステロイド性骨壊死モデルにおいて血栓、脂質代謝異常のみならず、血管壁の傷害に基く血行の破綻が重要な壊死発生原因の一つと考えている。

今回検討したAGEs修飾蛋白などの糖酸化ならびに脂質酸化最終蛋白修飾物はいくつかの生理活性を有し血管や組織の障害進展に関わると考えられる。例えば、単球遊走刺激、マクロファージからの炎症性サイトカインの放出、NO活性の阻害、血管平滑筋増

殖刺激、血小板凝集能亢進などが報告されている¹⁾³⁾。また、AGEsは濃度依存的にVEGF産生亢進作用があることも報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。

本モデルでの大腿骨におけるAGEs発現の特徴として、5日群では、壊死好発部位である近位内側部に多く発現を認める傾向があり、14日群では、壊死周囲を含め全体的に発現を認めた。また柳下らの報告からVEGFの発現も同様の部位に認める傾向があり⁴⁾、AGEsのVEGF発現亢進作用¹⁸⁾¹⁹⁾も考慮すると、本モデルでの壊死発生と何らかの関連性が示唆される。アルブミン染色でも、B群ではやはり大腿骨近位内側に漏出を多く傾向があり、C群では壊死範囲を含む広範囲の漏出所見を認めた。C群での反応は壊死が起こる過程での反応か、壊死発生の結果なのかは明確ではないが、少なくともステロイド投与後5日ですでに血流うっ滞や血管外漏出が生じていることが考えられ、血管透過性は亢進していることが示唆された。また、今回の検討においてAGEsとアルブミンは、ほぼ同様の部位に認められたことから両者の関連性も示唆された。もしAGEsの発現がステロイド投与による生体内酸化ストレスによって生じたものであるならば、酸化ストレスを軽減させる薬剤投与などにより壊死発生予防に役立つ可能性があり、興味深く思われる。

また今回対象数は少ないため統計学的検討はしていないが、生体内酸化ストレスの指標として、グルタチオンペルオキシダーゼ活性およびグルタチオンを調査した。グルタチオンペルオキシダーゼ活性は5日で平均1626.7から平均3133へ上昇し、グルタチオンは同様に5日で平均37.5から平均25.8へ低下を認め、生体内が酸化ストレス下にあることが示唆された。(図1)

ステロイドの投与により糖、脂質代謝異常などにより生体内酸化ストレスが発生し、蛋白修飾反応が惹起されAGEなどの最終蛋白修飾物の蓄積が誘導される。その蓄積物が直接ないし、レセプターを介して組織構築の変化や血管内皮および血管壁の傷害、血管透過性の亢進をもたらすことが、大腿骨頭壊死症発生の一要因である可能性が考えられた。しかしながら糖尿病においてもAGEsの発現および生体内酸化ストレスが発生するにもかかわらず、糖尿病では骨壊死が生じにくいことなどから考えると、他の要因との関連性があるものと思われ検討が必要と考えている。今後、壊死発生と酸化ストレスの関係や酸化ストレス抑制剤による壊死発生率の変化、および

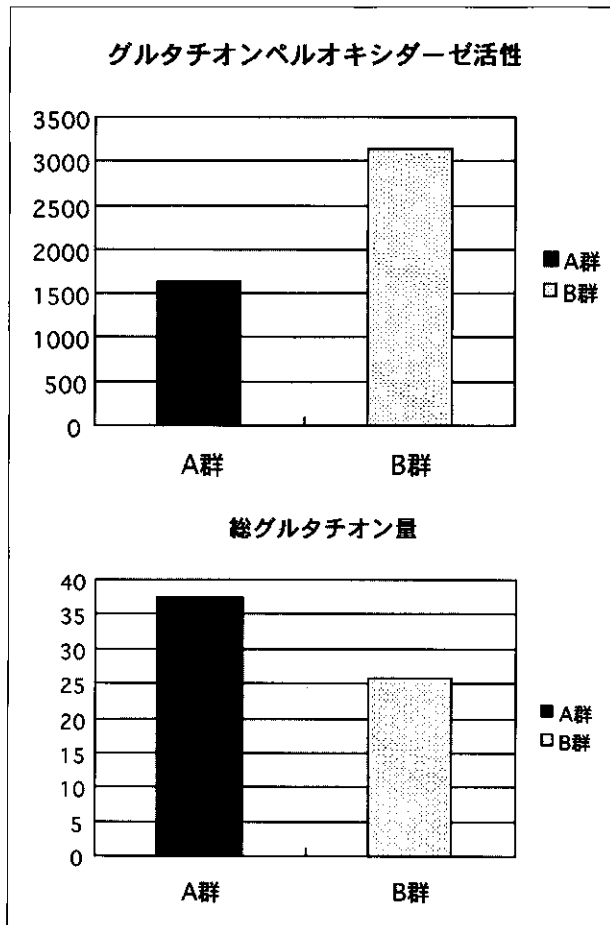


図1. 酸化ストレスの指標

ステロイド投与5日でGSHPX活性は上昇し、グルタチオンは低下しており、生体内が酸化ストレス下にあることが示唆される。

ステロイド投与モデルの血管状態について、対象を増やして検討する方針である。

E. まとめ

(1) ステロイド投与家兎の大腿骨を抗AGE抗体および抗アルブミン抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

(2) 対照群と比較してB群で壊死好発部位の近位内側に、C群ではより広い範囲での陽性反応が認められた。

(3) アルブミン染色にて、5日群、14日群とも対照群とは明かな変化を認めたことから、ステロイド投与5日ですでに血液うっ滞あるいは血管の破綻による血液漏出を示唆する所見を認めた。

(4) 大腿骨頭壊死症とAGEsおよび血管透過性亢進が関係している可能性が示唆された。

F. 参考文献

- Miyata, T., Takeda, S., Kawai, R. et al. Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in β 2-microglobulin-containing amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. 93; 2353
- Baynes, J. W.; Perspectives in diabetes: role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991. 40; 405
- Miyata, T., Maeda, K., Kurokawa, K. et al. Oxidation conspires with glycation to generate noxious advanced glycation end products in renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant*. 1997. 12; 255
- 松本忠美、柳下信一、堀井健志、加畑多文、西野暢、二見智子、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～。厚生労働省特定疾患骨関節系調査研究班 平成12年度研究報告書2001: 58-60.
- 松本忠美、柳下信一、堀井健志、加畑多文、西野暢、二見智子、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～。
厚生労働省特定疾患骨関節系調査研究班 平成12年度研究報告書2001: 61-63.
- Fisher D E: The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid-induced avascular necrosis: clinical and experimental results. *Clin Orthop* 1978. 130; 68-80
- Fiser D E and Bickel W H: Corticosteroid-induced avascular necrosis. *J Bone Joint Surg* 1971. 53-A; 859-873
- Jones J P: Fat embolism and osteonecrosis. *Orthop Clin North AM* 1985. 16; 595-633
- Wang G J, Sweet D E Reger S I et al: Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J Bone Joint Surg* 1977. 59-A; 729-735
- Ficat R P: Idiopathic bone necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg* 1985. 67-B; 3-9
- Zizic T M, Marcoux C, Hungerford D S et al: The early diagnosis of ischemic necrosis of bone.

- Arthritis Rheum 1986. 29 ; 1177-1186
- 12) Wang TY , Wang TY , Avolonitis EG , Relkin R .
Systemic necrotizing vasculitis causing bone necrosis . Am J Med 1988. 84 ; 1085-1086
 - 13) Saito S , Inoue A , Ono K . Intramedullary haemorrhage as a possible cause of avascular necrosis of the femoral head . J Bone Joint Surg Br 1987. 69 ; 346-351
 - 14) Zalavras C , Dailiana Z , Elisaf M , Bairaktari E , Vlachogiannopoulos P , Katsaraki A , Malizos KN .
Potential aetiological factors concerning the development of osteonecrosis of the femoral head . Eur J Clin Invest 2000. 30 ; 215-221
 - 15) Atumi T , Kuroki Y . Role of impairment of blood supply of the femoral head in the pathogenesis of idiopathic osteonecrosis > Clin Orthop 1992. 277 ; 22-30
 - 16) Jones J P : Intravascular coagulation and osteonecrosis . Clin Orthop 1992. 277 ; 41-53
 - 17) 松本忠美、二見智子、西野暢、堀井健志、加畑多文、柳下信一。ステロイド投与家兎モデルにおける末梢循環改善薬および抗凝固剤の効果に関する研究。厚生労働省特定疾患骨関節系調査研究班平成13年度研究報告書2002：72-77
 - 18) Murata T , Nagai R , Ishibasi T et al . The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas . Diabetologia 1997. 40 ; 764-769
 - 19) Lu M , Kuroki M , Amano S et al . Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression . J Clin Invest 1998. 101 ; 1219-1224

特発性大腿骨頭壊死症発生における脂肪細胞の役割に関する研究 第3報；ステロイド投与によるヒト骨髄内脂肪細胞径の変化

重松 正森、北島 将、佛淵 孝夫
(佐賀医科大学整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症発生の仮説の1つとしてコンパートメント症候群がある。今回、我々はステロイド投与におけるヒト骨髄内脂肪細胞の形態の変化について研究した。ION発生後では、ION群とcontrol群での骨髄内脂肪細胞径の差は認めなかったが、培養条件下では、ステロイド投与により骨髄内脂肪細胞径は1.2倍弱に増大することを確認した。これらの結果により、ステロイド投与による骨髄内脂肪組織の肥大および増殖能の亢進が髓腔内圧を高め、ION発生の一因となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症（以下ION）発生の仮説の1つとしてコンパートメント症候群（図1）があり、これに関する多数の報告がある。皮下脂肪培養に取り組んでいる杉原らのグループによると、皮下脂肪細胞の肥大率は種によりかなりの差がみられ、ヒトでは最大1.3倍であると報告している。

これまでの班会議において、我々はION発生における骨髄内脂肪細胞の役割を解明すべく、培養実験を開始し経過を報告してきた。今回はステロイド投与におけるヒト骨髄内脂肪細胞の形態の変化について報告する。

<仮説:コンパートメント症候群>

- ・ 脂肪細胞径の増大
- +
- ・ 脂肪細胞の増殖

が内圧を高めるのでは？

図1

B. 研究方法

<対象>

当院でTHAを施行したOA23例ION7例より得た、骨髄内脂肪組織を使用した。（図2）

<対象>

	男	女	計
OA	0	23	23
ION	4	3	7

図2

<実験方法>

THAのリーミングの際に得られる骨髄内脂肪組織をorgan cultureし、走査型電子顕微鏡にて観察、最大直径を計測した。ステロイドにはデキサメタゾン10-7Mを用い、5日間培養後、観察した。（図3）

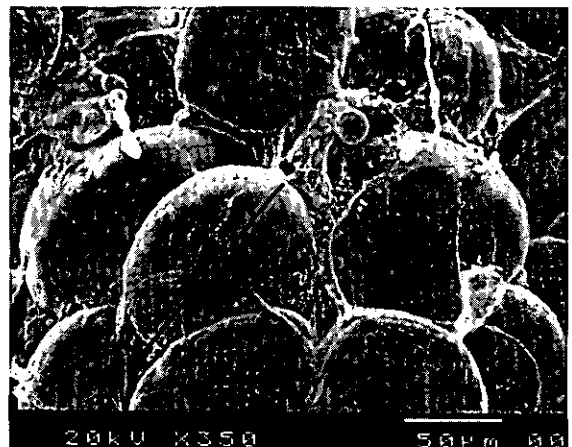


図3

C. 結果

1. ION群とOA (control)群の骨髄内脂肪細胞直径の比較

図に示すように、ION群とcontrol群での骨髄内脂肪細胞径の差は認めなかった(図4)。また、コントロール群の各年齢層の、平均最大直径と比較しても骨髄内脂肪細胞径の差は認めなかった(図5)。

2. ステロイド投与による骨髄内脂肪細胞径の変化

症例を示す。52歳女性の骨髄内脂肪組織に5日間ステロイドを投与したところ、直径で1.14倍、体積で1.48倍に肥大した(図6)。また、54歳女性の骨髄内

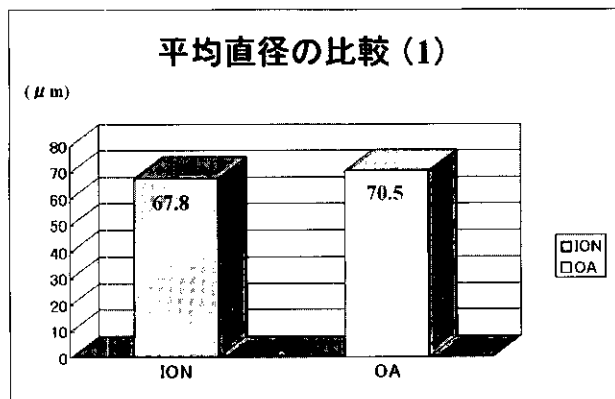


図 4

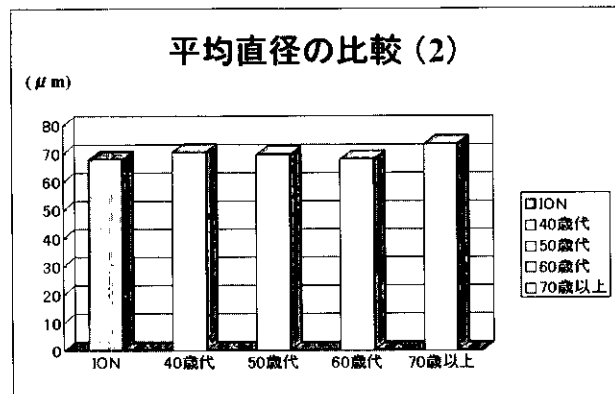


図 5

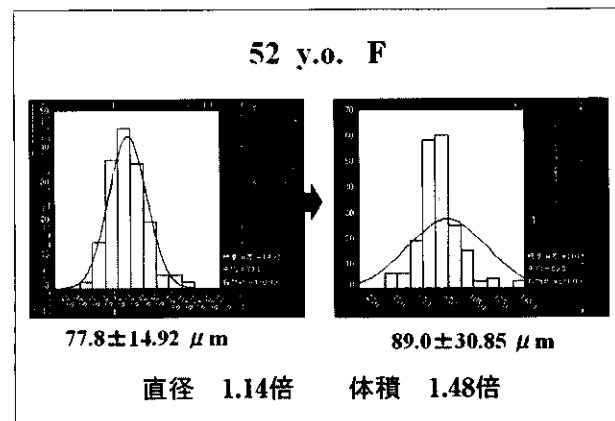


図 6

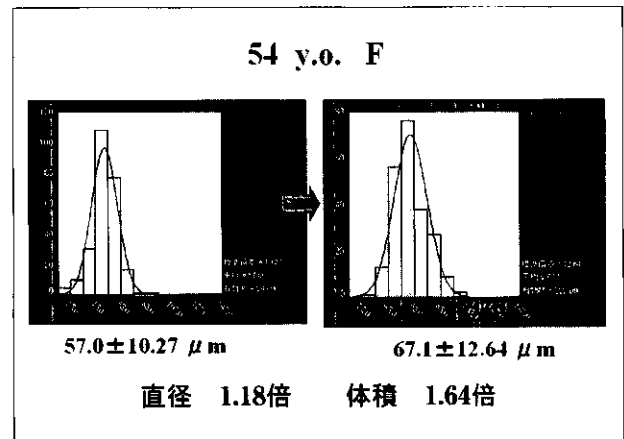


図 7

脂肪組織に5日間ステロイドを投与したところ、直径で1.18倍、体積で1.64倍に肥大した(図7)。

以上より、以下の結果を得た。

1. ION発生後では、ION群とcontrol群での骨髄内脂肪細胞径の差は認めなかった
2. 培養条件下では、ステロイド投与により骨髄内脂肪細胞径は1.2倍弱に増大した。

D. 考察

IONのヒト骨髄内脂肪細胞径については多数の報告があるが(その多くが、ION症例の骨髄内脂肪細胞径は肥大しており、これがコンパートメント説を裏付けるとするもの)、我々の結果では、ION発生後に骨髄内脂肪細胞径の差はなかった。

また、コンパートメント説に関する動物実験報告も多数なされており、ステロイド投与により骨髄内脂肪細胞径が増大することが報告されている。しかし、脂肪細胞径の肥大率は種により大きく異なることが皮下脂肪の実験で確認されている。今回、培養条件下ではあるが、ステロイド投与によるヒト骨髄内脂肪細胞の肥大率は約1.2倍であることを確認した。

前回、我々はステロイド投与により骨髄内脂肪細胞

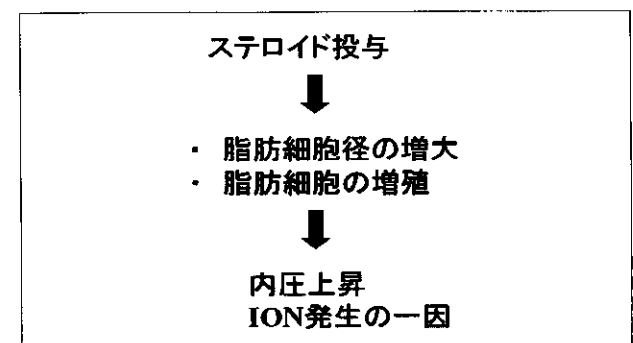


図 8

の接着・増殖能が亢進することを報告したが、この結果と考え合わせると、ステロイド投与による骨髓内脂肪組織の肥大および増殖能の亢進が髄腔内圧を高め、ION発生の一因となる可能性が示唆された(図8)。

ただし、コンパートメント説のみでは、「なぜ特定の部位に発生するのか」など、説明できない点もあり、歩行時の力学的解析などを含め更なる研究が必要であると考えられた。

E. 結論

1. ION発生後では、ION群とOA群では骨髓内脂肪細胞径の差は認めなかった。
2. 培養条件下では、ステロイド投与により骨髓内脂肪細胞径は約1.2倍に増大した。
3. ステロイド投与による骨髓内脂肪組織の肥大および増殖能の亢進が髄腔内圧を高め、ION発生の一因となる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 北島将、重松正森、肥後知子、佛淵孝夫、ヒト骨髓内脂肪細胞培養の試み—ステロイド濃度変化に対する接着増殖率—、整形外科と災害外科 . 51suppl2: 82
- 2) Masamori Shigematsu, Hideo Watanabe, Hajime Sugihara. Proliferation and Differentiation of Unilocular Fat Cells in the bone marrow; Cell Structure and Function, Vol 24, No2, pp89~100, 1999

2. 学会発表

- 1) 重松正森、OA症例におけるヒト骨髓内脂肪細胞培養の試み、第29回日本股関節学会、平成14年9月13日
- 2) 重松正森、OA症例におけるヒト骨髓内脂肪細胞培養の試み、第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11・12日
- 3) 肥後知子、重松正森、小峯光徳、佛淵孝夫、ヒト骨髓内脂肪細胞培養の試み、第104回西日本整形・災害外科学会、平成14年6月14日

糖質コルチコイドによる血管内皮細胞障害機構

田中 良哉、岡田 洋右、福島あゆみ、峯信 一郎
(産業医科大学医学部第一内科)
南 康博 (神戸大学大学院医学研究科生体防御学)

特発性大腿骨頭壊死症IONFの形成過程への血管障害の関与が示唆される。今回、糖質コルチコイドGCの血管内皮細胞機能に於ける作用を検討した。GCは、内皮細胞の増殖活性を濃度依存的に阻害し、細胞内p21亢進、G₂/M期細胞減少、アポトーシスを誘導した。また、GCによる内皮細胞の増殖抑制とアポトーシスは、低酸素誘導転写因子HIF-1 α 遺伝子導入や終末糖化産物AGE添加で増強した。以上、GCは内皮細胞アポトーシス誘導による血管障害を介してIONF形成に関与し、組織虚血状態や炎症性刺激、耐糖能異常などにより惹起される事が示唆された。

A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症IONFの病態形成には、糖質コルチコイド(ステロイド薬)の関与が示唆される。当科でプレドニゾン内服による血中濃度の推移を測定した膠原病33症例の内、SLEでステロイドパルス療法を施行した症例の21%にIONF発病を認め、非SLEでパルス療法未施行群にはIONFを認めなかった。斯様な結果からも、IONFの発症に於けるステロイド薬、特にパルス療法の重要性が示唆されるものである。一方、IONFの発症に於いては、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。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hypoxia-inducible factor (HIF)-1は、血管内皮細胞にアポトーシスを誘導する事を報告してきた。今回、血管内皮細胞の細胞機能特性に於ける、ステロイド薬の関与、並びに、HIF-1 α 、更に炎症性刺激などによる作用修飾を検討した。

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。糖質コルチコイド(ステロイド薬)として、プレドニゾン(PSL)、メチルプレドニゾン(m-PSL)、デキサメタゾン(DEX)を使用した。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

1. 各種ステロイド薬を血管内皮細胞に添加し、TetraColor One[®]法により細胞増殖活性を検討した。ステロイド薬大量内服療法、即ち、PSL 60mg、m-PSL 48 mg、DEX 6mgで到達可能な血中濃度に該当する各々1 μ g/ml、1 μ g/ml、10⁻¹⁰ Mでは、24時間以内の内皮細胞増殖に対して何ら影響を与えなかった。しかし、ステロイドパルス療法で到達する血中濃度PSL 100 μ g/ml、m-PSL 100 μ g/ml、DEX 10⁻⁸ Mの投与により、細胞増殖は顕著に抑制された。

2. ステロイド薬が影響を与える内皮細胞増殖に関する分子をスクリーニングしたところ、PSL添加12時間以内にp21の細胞内発現が著明に増強する事をフローサイトメーターで認めた。また、ステロイド薬による内皮細胞の細胞周期をpropidium iodide (PI)染色により検討したところ、PSL添加によりG₂/M増殖期細胞の約20%減少とA期(PI^{very low})アポトーシス細胞の80%増加を認めた。さらに、PI/annexin V染色により検出する早期アポトーシス細胞は、PSL処理により約12%から約28%へ急増した。以上より、ステロイド薬は、血管内皮細胞のp21の発現増強などを介して細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導す

るものと考えられた。

3. 細胞内酸素濃度低下によって誘導される転写因子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た。HIF-1 α はp21の転写を誘導するとされるが、p21の上流域に存在する低酸素反応領域HREエピトープを有するオリゴヌクレオチドを作成し、EMSAを行ったところ、低酸素刺激、並びに、HIF-1 α の遺伝子導入により得られた内皮細胞核抽出物に強いバンドを認めた。内皮細胞にHIF-1 α を導入すると、p21の細胞内発現の増強、さらに、サイクリン依存性キナーゼCDK-4および、CDK-6のキナーゼ活性の低下を誘導した。以上、HIF-1 α は、血管内皮細胞のp21の発現増強などを介して細胞周期を抑制し、アポトーシスを誘導するものと考えられた。

4. ステロイド薬PSLを添加することによる内皮細胞の増殖抑制は、HIF-1 α を遺伝子導入することによって更に増強され、PSLを100 μ g/ml添加した際に最大値に達した。

5. 内皮細胞のA期 (PI^{very low}) アポトーシス細胞は、PSLの添加、または、HIF-1 α 遺伝子導入により増強したが、両者を共存させると明らかな相乗効果が得られた。

6. RAGE (receptor for glycation endproducts) は、糖化終末反応生成物AGEや炎症反応の際の多彩な遺伝子転写に関与するHMG (high mobility group) -1に対する受容体である。PSLによる内皮細胞の増殖抑制は、AGEによってRAGEを刺激する事により更に増強された。さらに、アネキシンV陽性細胞は、無刺激、PSL 20 μ g/ml刺激、PSLとAGEによる共刺激により、各々12、18、35%と増加し、AGEはPSLによる内皮細胞アポトーシス誘導を増強する可能性が示された。なお、IL-1添加によってもAGEと類似のPSLによるアポトーシス増強効果が認められた。

7. VEGFは、内皮細胞に細胞増殖を誘導するが、PSL添加によって抑制された内皮細胞の増殖はVEGFを添加しても回復しなかった。

D. 考察

血管内皮細胞の増殖活性におけるステロイド薬の作用を検討してきた。その結果、ステロイド薬大量内服療法 (例えばPSL 60mg) で到達可能な血中濃度 (1 μ g/ml) では内皮細胞増殖に影響はないが、ステロイドパルス療法で到達する血中濃度PSL (m-PSL 100 μ g/ml) では、細胞増殖は顕著に抑制された。そ

の機序として、ステロイド薬は、血管内皮細胞のp21の発現増強などを介して細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導するものと考えられた。一方、IONFの発症に於いては、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。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HIF-1 α は、血管内皮細胞にp21の発現増強などを介して細胞周期を抑制し、アポトーシスを誘導した。さらに、ステロイド薬による内皮細胞の増殖抑制とアポトーシスは、HIF-1 α 遺伝子導入や終末糖化産物AGE添加によるRAGEを刺激することにより増強した。また、ステロイド薬による血管障害は、VEGFの添加によっても回復困難である可能性が示唆された。以上より、ステロイド薬は血管内皮細胞アポトーシス誘導による血管障害を介してIONF形成に関与するが、組織虚血状態や炎症性刺激、耐糖能異常などにより惹起されるものと考えられる。

E. 結論

ステロイド薬は、パルス療法に使用される濃度で血管内皮細胞の増殖活性を濃度依存的に阻害し、細胞内p21亢進、G₂/M期細胞減少、アポトーシスを誘導した。また、ステロイド薬による内皮細胞の増殖抑制とアポトーシスは、低酸素誘導転写因子HIF-1 α や終末糖化産物AGE添加で増強した。以上、ステロイド薬は内皮細胞アポトーシス誘導による血管障害を介してIONF形成に関与し、組織虚血状態や炎症性刺激、耐糖能異常などにより惹起される事が示唆された。

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 Cells* (2002) 7, 143-149.
- 2) Tanaka Y, Nakayamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami Y: H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J Biol Chem* (2002) 277, 21446-21452.
- 3) Tanaka Y, Okada Y, Nakamura T: Inter- and intra-cellular signaling in secondary osteoporosis. *J Bone Min-*

er Metabolism (in press)

4) 田中良哉. 骨壊死とICAM-1およびHIF-1遺伝子. 整形・災害外科 (2002) 45, 168-169.

5) 田中良哉. 炎症性疾患・血液疾患による骨粗鬆症. Medical Practice (2002) 19, 1673-1676

2. 学会発表

1) 飯田武, 岡田洋右, 福島あゆみ, 南康博, 田中良哉. ステロイドによるHIF-1誘導性血管内皮細胞アポトーシスの増強効果. 第20回日本骨代謝学会(岡山)平成14年7月

2) 飯田武, 峯信一郎, 太幡敬洋, 福島あゆみ, 三澤晴雄, 岡田洋右, 田中良哉. 血管内皮細胞のアポトーシスにおけるHypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の関与. 第45回日本糖尿病学会(東京)平成14年5月

3) 飯田武, 齋藤和義, 岡田洋右, 峯信一郎, 中山田真吾, 中野和久, 田中良哉. Hypoxia-inducible factor(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. 第46回日本リウマチ学会総会(神戸)平成14年4月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当せず

2. 実用新案登録

該当せず

3. その他

該当せず

グルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害：活性酸素の関与

粟飯原賢一、井内 貴彦、赤池 雅史

三ッ井貴夫、東 博之、松本 俊夫

(徳島大学大学院医学研究科生体情報内科学・内科学第一)

ステロイド投与をはじめとするグルココルチコイド過剰は、高血圧、動脈硬化など、心血管系の合併症を引き起こすことが知られているが、大腿骨細動脈においても、血管内皮機能障害を引き起こし、大腿骨頭壊死発症に深く関与していることが予想される。我々はこれまでグルココルチコイド過剰状態が、内皮依存性血管弛緩反応を低下させ、血管組織においてNO availabilityが減弱していることを示してきた。このNO availabilityの減弱は、ヒト臍帯静脈内皮細胞に対するdexamethasone添加実験の結果から、グルココルチコイド過剰による血管内皮活性酸素種の産生増加が要因の一つであると示唆された。

A. はじめに

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

B. 対象と方法

自己免疫疾患などによりグルココルチコイド (30mg/day以上)を服用中の患者19例、クッシング症候群患者2例、健常対照12例を対象とし、strain gauge plethysmographyを用いて前腕における内皮依存性および内皮非依存性血管弛緩反応を解析し血管内皮機

能を評価した。このうち、内皮依存性血管弛緩反応は、5分間の完全阻血を解除した直後の前腕血流量の増加反応 (反応性充血) により評価し、内皮非依存性血管弛緩反応は、NO供与薬であるニトログリセリンを300 μ g舌下投与した際の前腕血流量の増加反応により評価した。前腕血流量の増加反応は安静時の前腕血流量を100%とした時の増加率 (%increase) により表記した。また、同一症例において、グルココルチコイド投与前後 (プレドニゾロン30mg/day以上を2-4週間投与後) で比較するとともに、抗酸化薬であるビタミンCの2g単回経口投与による影響について解析を行った。

次に培養細胞を用いた検討では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) (大日本製薬、大阪) の培養系にdexamethasone (DEX) 10^{-7} Mを24時間添加し、細胞内oxidant測定用蛍光プローブである5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) (Molecular Probes, USA)を用いて、蛍光強度を蛍光プレートリーダーにより測定することにより細胞内H₂O₂の産生を評価した。また、抗酸化作用を有するVitamin C 10 μ g/mlおよびVitamin E 10 μ g/mlや、superoxide dismutase (SOD) をDEXとともに培養系に添加し、活性酸素産生への影響を検討した。さらに、スピントラップ剤として5,5'-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)を用いた電子スピン共鳴法に

より、hydroxyl radical (OH \cdot)の検出も行った。一方、各種の活性酸素産生系の阻害薬を培養系に添加し細胞内H $_2$ O $_2$ 産生への影響を調べることにより、DEXによる活性酸素の産生源についても検討した。活性酸素産生系の阻害については、ミトコンドリア電子伝達系はcarbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) 0.5 μ M, xanthine oxidase系はoxypurinol 100 μ M, NADPHオキシダーゼ系はquinacrine 30 μ M, prostaglandine生成系はindomethacine 100 μ M, NO合成系はN-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 1mMをそれぞれ培養系へ添加することにより行った。

更にDEX投与による活性酸素産生の局在部位について共焦点レーザー法で検討した。HUVECにDEXの添加群・非添加群の2群を用い、活性酸素に対する蛍光色素であるDCFH-DAとミトコンドリアの蛍光標識であるミトトラッカーを使用し、両者の発色画像を重ね合わせて比較検討した。

次に、HUVECにおいてDEX非添加コントロール群、DEX添加群・DEX+SOD添加群、DEX+L-NAME添加群、更には陽性コントロール群の抽出蛋白に対し、抗ニトロ化チロシン抗体を用いたイムノブロット解析を行い、活性酸素によるNO消去代謝産物(ニトロ化チロシン含有蛋白質)の定量化を行った。

最後にPSL内服患者と健常対照者の小動脈組織切片を用い、ニトロ化チロシン抗体を用いて免疫染色を行い、血管内皮での活性酸素によるNO消去代謝産物(ニトロ化チロシン含有蛋白質)の可視的定量化を行った。

C. 結果

内皮依存性血管弛緩反応はグルココルチコイド過剰症において健常対照に比較し有意に低下していたが(グルココルチコイド過剰症 $36 \pm 34\%$ vs 健常対照 $173 \pm 65\%$, mean \pm SD, $p < 0.01$)、内皮非依存性血管弛緩反応には両群に差はなかった(グルココルチコイド過剰症 $25 \pm 26\%$ vs 健常対照 $23 \pm 21\%$, N.S.)

(図1a)。また、同一症例の検討では内皮依存性血管弛緩反応はグルココルチコイド投与後に全例で低下していたが(投与前 $116 \pm 40\%$ vs 投与後 $27 \pm 26\%$, $p < 0.01$)、内皮非依存性血管弛緩反応はグルココルチコイド投与前後で差はなかった(投与前 $28 \pm 23\%$ vs 投与後 $23 \pm 23\%$, N.S.) (図1a)。血管内皮機能の評価時にはグルココルチコイド投与前後でbody mass index、血圧、総コレステロール、空腹時血糖に

は有意な差はなかった。また、グルココルチコイド投与により低下した内皮依存性血管弛緩反応は、Vitamin Cの単回投与により有意に改善した(投与前 $27 \pm 26\%$ vs 投与後 $116 \pm 40\%$, $p < 0.01$) (図1b)。

電子スピン共鳴法による検討ではDEXの添加によりOH \cdot のシグナルが検出された(図2a)。更に培養細胞系を用いた検討では、DEX用量依存性に活性酸素(H $_2$ O $_2$)が増加していることが判った。一方この増加した活性酸素はH $_2$ O $_2$ の消去剤であるカタラーゼ(100U/ml)を投与することによりDEX投与前レベルまで消去した。また、グルココルチコイドレセプター拮抗薬であるRU486 (10^{-5} M)を添加するとはほぼ完全に活性酸素の産生は抑制された(図2b)。以上より、HUVECsにたいしデキサメサゾン添加により用量依存性に活性酸素の産生が生じること、またこの活性酸素種はグルココルチコイドレセプターを介していることが示された。

また、活性酸素産生系の阻害薬を用いた検討では、DEX添加による細胞内H $_2$ O $_2$ 産生亢進はquinacrine、oxypurinol、およびCCCPの添加により有意に抑制され、

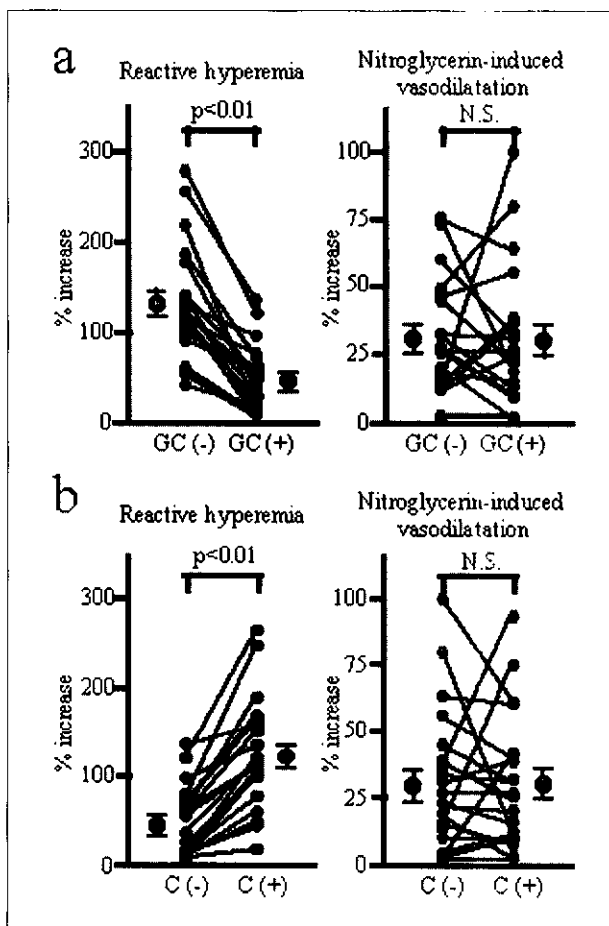


図1

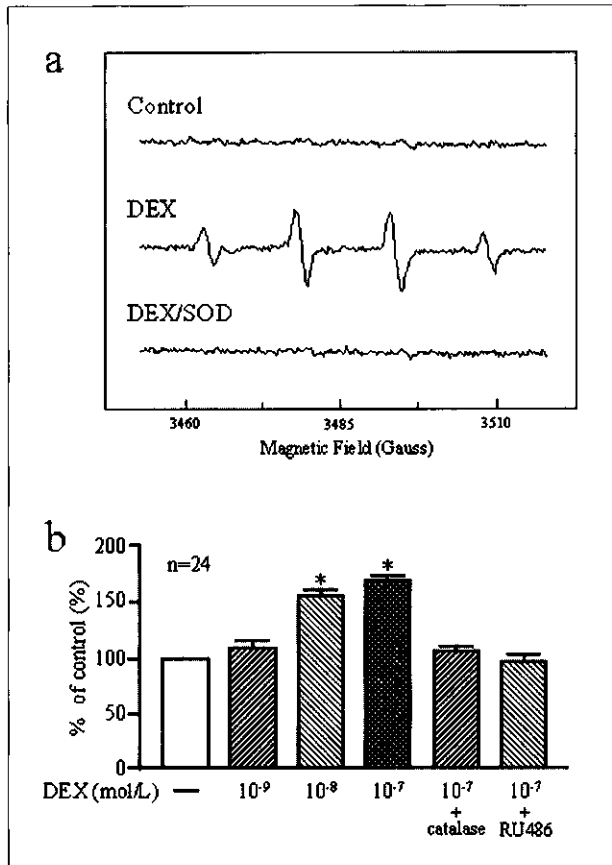


図 2

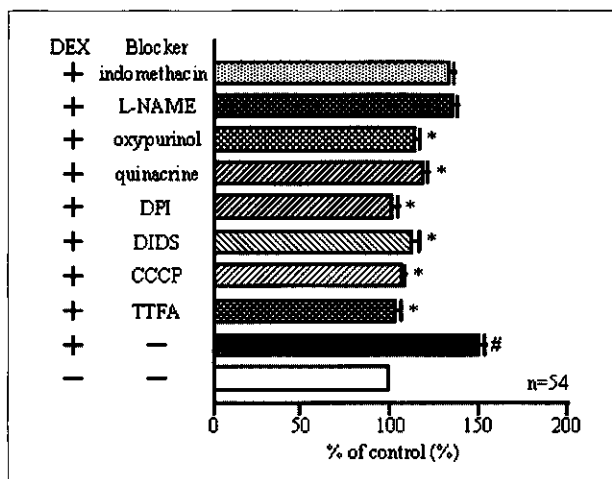


図 3

これらのうちCCCPによる抑制が最も顕著であった(図3)。一方、L-NAMEおよびindomethacinの添加はDEX添加による細胞内H₂O₂産生亢進を抑制しなかった(図3)。

共焦点レーザー法による検討では、DEX添加の活性酸素産生の多い部分(DCFH-DAによる緑色発色)がミトコンドリア局在(ミトトロッカーによる赤色発色)と重なり合った黄色の発色領域を確認し、ミトコンドリアによる活性酸素産生が示された(図4)。

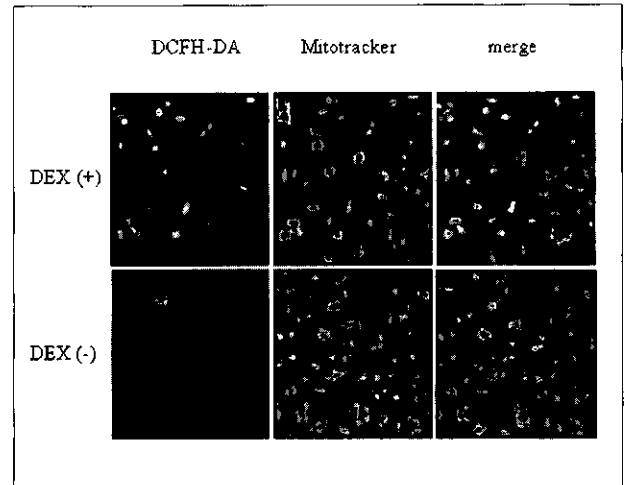


図 4

HUVECを用いて、DEX添加による活性酸素種、NOとperoxynitriteの増減について蛍光分析にて経時的に測定した結果は、活性酸素種の増加とともにNOが消費され、これらの生成物であるperoxynitriteが増加していることが明らかとなった(図5a)。

ニトロ化チロシンの抗体を用いたイムノブロット解析では、HUVECの抽出蛋白においてコントロールに対し、DEX添加群のバンドが強く染色されており、

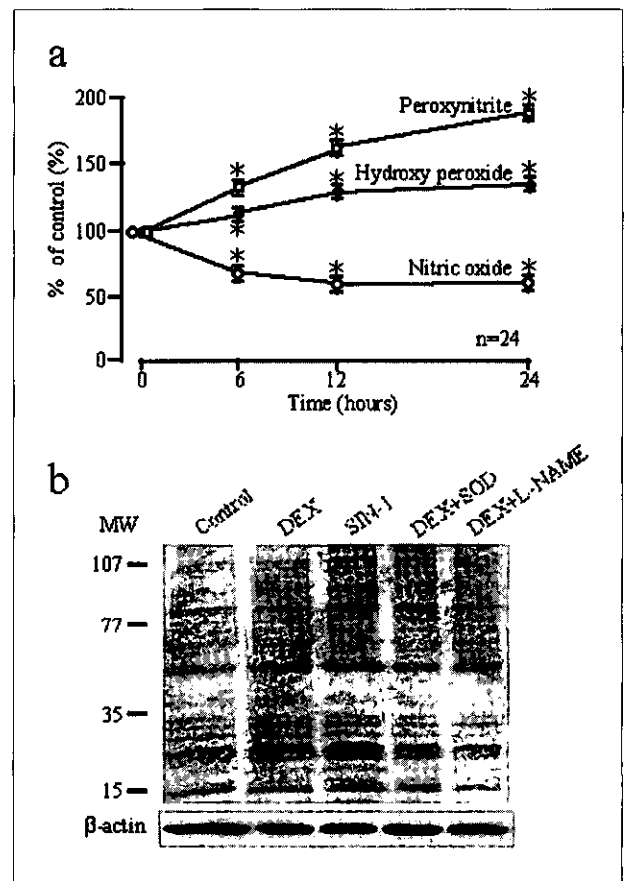


図 5

陽性コントロールであるSIN-1とはほぼ同程度に染色された。一方、SOD, L-NAMEを添加群は活性酸素、並びにNOの産生が抑制されるためにニトロ化チロシン蛋白は減少し、バンドはやや淡染であった(図5b)。

ヒトの小動脈組織切片の解析では、血管内皮特異的にPSL内服患者群でニトロ化チロシン含有蛋白の染色が見られ、グルココルチコイド過剰では活性酸素過剰による、NOの消去亢進が示された(図6)。

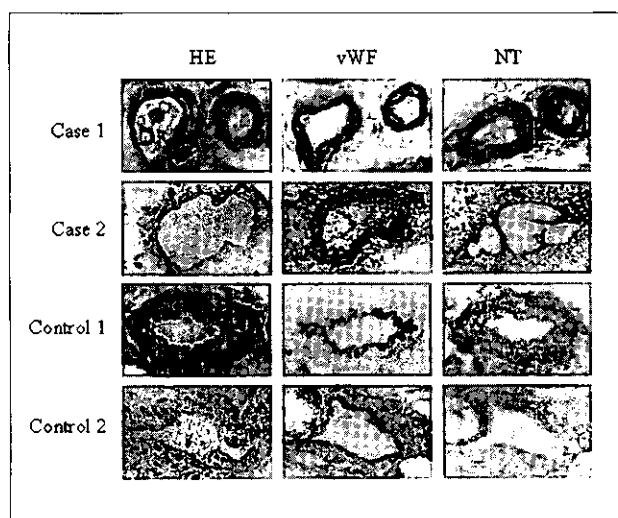


図6

D. 考察・結論

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

けるNO availabilityの低下は活性酸素の産生亢進によるNOの消去によることが示唆された。

培養細胞を用いた検討では、グルココルチコイドが血管内皮細胞における活性酸素の産生を亢進することが確認された。血管内皮細胞での活性酸素産生に及ぼすグルココルチコイドの影響についてはこれまでほとんど検討されていない。Spontaneously hypertensive ratではグルココルチコイドの過剰分泌により血管内皮細胞におけるxanthine oxidaseが活性化し、これにより活性酸素産生が亢進することが報告されている⁴⁾。高脂血症やアンジオテンシンII刺激などによる血管内皮細胞での活性酸素産生はxanthine oxidase系やNADPH oxidase系が重要であるとする報告もみられる¹⁾。今回の活性酸素産生系の阻害薬を用いた検討においても、xanthine oxidase系およびNADPH oxidase系はグルココルチコイドによる血管内皮細胞での活性酸素産生に関与していることが示唆されたが、活性酸素の産生がCCCPによって最も強く抑制されたことにより、グルココルチコイドによる活性酸素の産生はミトコンドリア電子伝達系が主要な産生源である可能性が示唆され、共焦点レーザー法を用いた解析でも活性酸素の産生源の一つが、ミトコンドリアであることが判明した。グルココルチコイドによるミトコンドリアでの活性酸素産生亢進のメカニズムは現時点では不明であるが、ミトコンドリアDNAにはグルココルチコイド応答配列(GRE)が存在しており⁵⁾、グルココルチコイドがその核内受容体を介してミトコンドリアDNAの転写活性に影響を及ぼし、電子伝達系の酵素活性や活性酸素の産生に関与している可能性などが考えられる。

HUVECを用いた蛍光解析・イムノプロット解析の結果やヒト小動脈切片の解析結果からは、グルココルチコイドにより過剰産生された活性酸素は、血管内皮細胞から産生されるNOを消去することにより血管内皮機能を障害すると考えられた。このような現象が大腿骨頭を灌流する血管で生じた場合には、大腿骨頭壊死の発症要因となることが推測される。以上のことから、グルココルチコイド過剰で生じる血管内皮の活性酸素産生を抑制し、NO availabilityを維持出来るような予防策を講じることが、大腿骨頭壊死症発症の抑制につながると期待される。今後、更なるin vitro, in vivo解析を行い、グルココルチコイド過剰下での効果的な活性酸素産生抑制が大腿骨頭壊死発症に及ぼす影響の検討が必要である。

E. 参考文献

- 1) Weber RMF. et al.: Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998;97:108-112.
- 2) Arlet J: Nontraumatic avascular necrosis of the femoral head: Past, present, and future. *Clin Orthop* 1992;277:12-21.
- 3) Iwatsubo H. et al.: Converting enzyme inhibitor improves forearm reactive hyperemia in essential hypertension. *Hypertension* 1997; 29:286-290.
- 4) Suzuki H. et al.: In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 1995;25:1083-10889.
- 5) Tsiriyotis C. et al.: The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: Mitochondrial nucleotide sequences, showing similarity to hormone response elements, confer dexamethasone inducibility to chimaeric gene transfected in L_{ATK}- cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;235:349-354.

F. 研究発表

論文発表

1. Iuchi, T. Akaike, M. Mitsui, T. Ohshima, Y. Shintani, Y. Azuma, H. Matsumoto, T.
Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92(1):81-7, 2003.
2. Akaike, M. Azuma, H. Kagawa, A. Matsumoto, K. Hayashi, I. Tamura, K. Nishiuchi, T. Iuchi, T. Takamori, N. Aihara, K. Yoshida, T. Kanagawa, Y. Matsumoto, T.
Effect of aspirin treatment on serum concentrations of lipoprotein(a) in patients with atherosclerotic diseases. *Clin Chem* 48(9):1454-9, 2002.
3. Kitagawa, H. Yanagisawa, J. Fuse, H. Ogawa, S. Yogiashi, Y. Okuno, A. Nagasawa, H. Nakajima, T. Matsumoto, T. Kato, S.
Ligand-selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation

function 1 by a CBP-containing histone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol*

22(11):3689-706, 2002

4. Mitsui, T. Azuma, H. Nagasawa, M. Iuchi, T. Akaike, M. Odomi, M. Matsumoto, T.
Chronic corticosteroid administration causes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Neurol* 249(8):1004-9, 2002
5. Mitsui, T. Umaki, Y. Nagasawa, M. Akaike, M. Aki, K. Azuma, H. Ozaki, S. Odomi, M. Matsumoto, T.
Mitochondrial damage in patients with long-term corticosteroid therapy: development of oculoskeletal symptoms similar to mitochondrial disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 104(3): 260-6, 2002
6. Okazaki, R. Inoue, D. Shibata, M. Saika, M. Kido, S. Ooka, H. Tomiyama, H. Sakamoto, Y. Matsumoto, T.
Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* 143(6): 2349-56, 2002
7. Takeuchi, Y. Watanabe, S. Ishii, G. Takeda, S. Nakayama, K. Fukumoto, S. Kaneta, Y. Inoue, D. Matsumoto, T. Harigaya, K. Fujita, T.
Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice. *J Biol Chem* 277(50): 49011-8, 2002
8. Umaki, Y. Mitsui, T. Endo, I. Akaike, M. Matsumoto, T.
Apoptosis-related changes in skeletal muscles of patients with mitochondrial diseases. *Acta Neuropathol* 103(2): 163-70, 2002

G. 知的所有権の取得状況

なし

プロブコール及びワーファリンを併用したステロイド性骨壊死予防実験

本村 悟朗、山本 卓明、宮西 圭大
神宮司誠也、岩本 幸英 (九州大学整形外科)

我々は、ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルを用いた実験において、抗高脂血症剤であるプロブコールを予防的に投与することにより、骨壊死発生率が70%から38%へと有意に低下したことを報告した。今回、プロブコールと抗凝固薬であるワーファリンを併用投与した結果、骨壊死発生率は5%へと有意に低下した。

A. 研究目的

ステロイド性骨壊死の原因はいまだ不明であるが、脂質代謝異常・脂肪塞栓・骨内圧上昇・凝固異常など様々な要因の重要性が報告されている。今回我々は、ステロイド単独投与による実験的骨壊死モデルを用い、ステロイド性骨壊死の病因の一つと考えられている脂質代謝異常と凝固異常の両者を制御して、骨壊死予防効果を検討したので報告する。

B. 研究方法

ステロイド単独投与家兎骨壊死モデル¹⁾を用い、以下の3群を作成した。WP群は、MPSL 20mg/kgを一回筋注するに加えて、抗高脂血症剤であるプロブコール及び抗凝固剤であるワーファリンを予防的に投与した群 (21羽)、P群はMPSL 20mg/kgを一回筋注するに加えて、プロブコールのみを予防的に投与した群 (29羽)、CTR群はMPSL 20mg/kgを一回筋注した群 (20羽)とした。プロブコールはMPSL投与前2週よりMPSL投与後2週まで300mg/kg/dayを、ワーファリンはMPSL投与前1週よりMPSL投与後2週まで1.5mg/kg/dayを経口投与とした。各群をMPSL投与後2週でと殺し、両大腿骨・上腕骨における骨壊死発生率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、脂質系因子・凝固系因子の経時的変化を検索した。

C. 研究結果

予防薬投与のないCTR群の骨壊死発生率が70% (14/20羽)であったのに対し、WP群における骨壊死発生率は5% (1/21羽)と著明に骨壊死発生を抑制していた。

単剤予防薬投与群であるP群の骨壊死発生率は38% (11/29羽)とCTR群に比すれば有意に低下していたが、WP群よりも高かった (図1)。

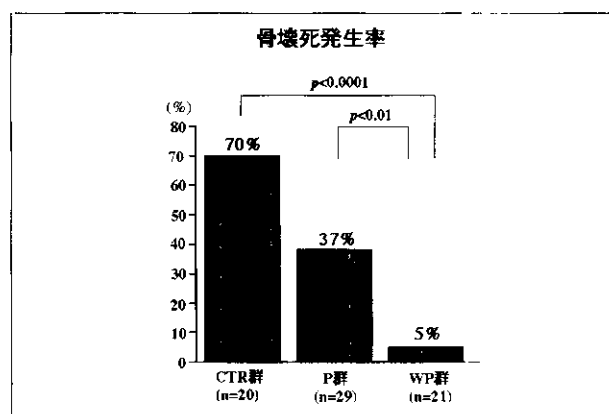


図1

凝固系因子であるPT-INR値は、WP群においてMPSL投与直前にはすでに高値であり、ワーファリンの効果を認めた (図2)。MPSL投与後1週にかけ

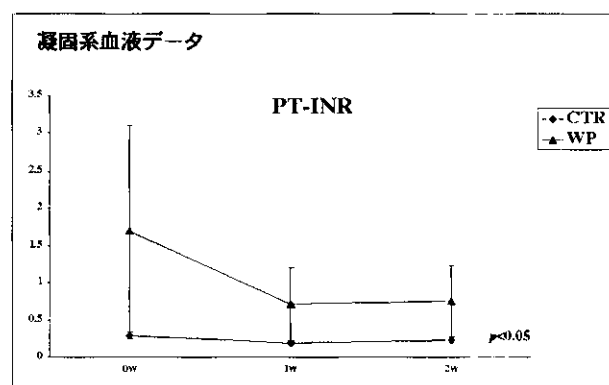


図2

てPT-INR値の低下を認めたがCTR群に比べると有意に高い値を持続していた。

脂質系因子であるLDL-cholesterolは、CTR群においてMPSL投与後1週から2週にかけて著明に上昇するのに対し、WP群・P群では1週目からの上昇が有意に抑制されており、プロブコールの効果を認めた(図3)。

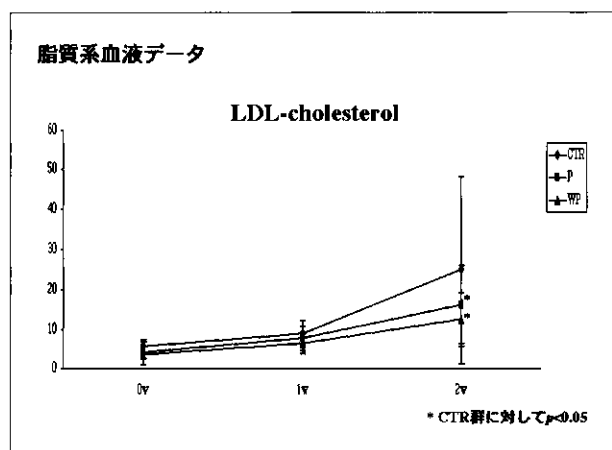


図3

WP群において、骨壊死発生を認めた1羽では採血データ上、脂質系因子・凝固系因子ともにそれぞれプロブコール・ワーファリンの効果を認めており、骨壊死発生誘因は不明であった。

D. 考察

薬による骨壊死発生予防の試みは今までもなされてきたが²⁾³⁾、それらは単一薬剤によるものであり、脂質系及び凝固系の両者を併用した予防研究はなされていない。我々はプロブコール単剤によるステロイド性骨壊死発生予防研究において、壊死群においても非壊死群同様プロブコールによる脂質代謝改善効果を認めた。この結果から、骨壊死発生原因には個体差があり、凝固異常の様な脂質代謝異常以外の要因が骨壊死発生により大きな影響をあたえていればプロブコール単剤で予防することはできないと考えられた。また、我々はステロイド大量投与に伴う凝固異常を制御する目的で、ワーファリン単剤による骨壊死発生予防効果を検討した。その結果、家兎9羽中3羽に骨壊死を認め、骨壊死発生率は33%であった。この結果はプロブコール単剤による骨壊死発生予防効果とほぼ同等であり、このことは単剤使用での骨壊死発生予防効果の限界を示していると考えられた。

本実験において、プロブコール及びワーファリンを併用投与することにより大幅に骨壊死発生率が低

下したことから、ステロイド性骨壊死モデルの骨壊死発生原因として脂質代謝異常及び凝固異常がmajor factorであることが裏付けられた。今後は、これらの相互関係を検討していきたい。

E. 結論

ステロイド単独投与骨壊死モデルにおいて、プロブコール及びワーファリンを併用投与することにより、骨壊死発生率は5%へと著明に低下した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Shirasawa K, Noguchi Y, Iwamoto Y.

Subchondral insufficiency fracture of the femoral head and acetabulum : a case report. J Bone Joint Surg Am. 2002 Jul;84-A(7):1205-9.

2. 学会発表

第29回日本股関節学会学術集会(2002.9.12-13 札幌)

ステロイド性骨壊死予防実験の検討

本村悟朗、山本卓明、宮西圭太、首藤敏秀

中島康晴、神宮司誠也、岩本幸英

第17回日本整形外科基礎学術集会(2002.10.10-12 青森)

早期ステロイド性大腿骨頭壊死症における骨髄脂肪細胞径の増大

本村悟朗、山本卓明、宮西圭太、山下彰久、

神宮司誠也、居石克夫、岩本幸英

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 参考文献

1) Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum. 1997 Nov;40(11):2055-64.

2) Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. Clin Orthop. 2001 May;(386):173-8.

- 3) The Otto Aufranc Award. Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis.
Clin Orthop. 1997 Nov;(344):8-19.

全身性エリテマトーデス（SLE）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、金井 美紀、金 英俊
木田 一成、橋本 博史（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、ステロイド剤の副作用である高脂血症の関与が考えられ、これをコントロール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と考えられる。そこで、ステロイド剤投与を行うSLE患者に高脂血症の治療として、スタチン系薬剤の投与および血漿交換療法の併用を行い、大腿骨頭壊死症の発症が抑制されるかを検討する。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）患者において、大腿骨頭壊死症（AN）の発症は機能的予後を左右する大きな問題となっている。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自体によりANが発症しやすいとも考えられているが¹⁾²⁾³⁾、ステロイド剤の副作用として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性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、preclampsia（子癇）⁴⁾、白血球減少⁸⁾等が報告されており、血液粘度高値、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ことが考えられている。

我々はその中で高脂血症について注目し、SLEの治療としてステロイド剤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の発症の危険性を抑える可能性があるのではないかと考え、検討を継続して行った。

B. 研究方法

〈対象〉

倫理委員会にて承認を得て、インフォームドコンセントの得られたSLE患者のうち、初発でステロイ

ド治療の既往がない患者、あるいはステロイド剤の維持量にて経過中に増悪を認め、ステロイド剤を増量する患者とする。これらの患者は股関節痛などの自覚症状がなく、単純X線、MRIにてANを認めないことを確認する。

〈方法〉

ステロイド剤の投与基準

1. 初回ステロイド治療開始患者

プレドニゾロン換算で30mg/日以上、あるいは0.5mg/Kg/日以上ステロイド剤の投与を開始する患者。

2. ステロイド剤増量患者

維持量よりプレドニゾロン換算で40mg/日以上、あるいは1.0mg/Kg/日以上ステロイド剤を増量する患者。

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、パルス療法が初回の患者。あるいは維持量よりパルス療法を開始する患者。パルス療法はメチルプレドニゾロン500mg、1,000mg/日のどちらでも良いこととする。

〈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

ステロイド剤を開始あるいは増量とともにスタチン系薬剤としてアトルバスタチンを使用する。投与量は10mg/日より投与開始し、効果をみて20mg/日まで増量する。

2. スタチン系薬剤に加え、血漿吸着療法を施行する群

ステロイド剤を開始あるいは増量とともにスタチン系薬剤としてアトルバスタチンを10mg/日より投与開始し、その後血漿交換療法として血漿吸着療法を施行する。

3. 抗高脂血症剤の投与および血漿吸着療法を行わない群
上記3群を患者にインフォームドコンセントを得た上で割り付ける。

〈血漿交換療法の方法〉

血漿交換療法として選択的にLDLコレステロール、抗DNA抗体および抗カルジオリピン抗体を吸着するデキストラン硫酸をリガンドとしたカラムを使用し血漿吸着療法（LDL吸着療法）を行う。

一回の血漿処理量は2Lとし、2週に一回の割合で行う。

〈検査項目〉

- 脂質系：総コレステロール（T-Cho）、HDL-C、LDL-C、VLDL-C、中性脂肪、Apo-A I、Apo-B、Apo-E、Apo-CII、Lp(a)、RLP-C（remnant like lipoprotein cholesterol）、LPL（lipoprotein lipase）
- 凝固系：ループスアンチコアグラント（LAC）、抗リン脂質抗体（ α CL）、抗 β 2GPI複合体抗体、IgG、フィブリノーゲン（Fibg）

脂質系および凝固系のうちIgG、Fibg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、 α CL、抗 β 2GPI複合体抗体は3カ月毎に測定する。

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。

C. 研究結果

まずは、昨年度に報告した3症例の経過を報告する（表1）。

	症例1	症例2	症例3
年齢	23歳	18歳	26歳
性別	女性	女性	女性
病態	汎血球減少	ループス腎炎 (WHO IV)	ループス腎炎
ステロイド 最大投与量 (PSL換算)	50mg/日	60mg/日	50mg/日
ステロイド パルス療法	(-)	メチルプレドニ ゾロン 500mg×3日	(-)
LDL吸着療法	(-)	(+)	(+)
前	(-)	(-)	(-)
3ヶ月後	(-)	(-)	(-)
6ヶ月後	(-)	(-)	(-)
1年後	(-)	(-)	(-)

表1. 大腿骨頭壊死症発生の有無（MRI所見）

〈症例1〉

23歳女性。プレドニゾロン10mg/日で経過中に汎血球減少（WBC 1500、Hb8.5g/dl、PLT6.5万）を認め、SLEに伴う自己免疫性血球貪食症候群が疑われ、プレドニゾロン50mg/日に増量した。増量前の総コレステロール値は226mg/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264mg/dlと上昇を認めたが、SLEの活動性とともに汎血球減少の改善も認められ、プレドニゾロンの漸減が可能となり、1年後プレドニゾロン18mg/日投与中で、総コレステロール値は210mg/dlと正常を維持している。1年後までの大腿骨頭壊死症を思わせる臨床症状は認めず、単純X線およびMRIでの変化を認めていない。

〈症例2〉

18歳女性。プレドニゾロン10mg/日で経過中に蛋白尿3~5g/日、下腿浮腫を認め、ループス腎炎、ネフローゼ症候群の診断で腎生検を施行した。びまん性糸球体腎炎（WHO分類IVa）の結果で、ステロイドパルス療法（メチルプレドニゾロン500mg/日×3日間）施行し、後療法としてプレドニゾロン60mg/日に増量した。増量前の総コレステロール値は258mg/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296mg/dlと上昇を認め、2週に一回のLDL吸着療法を開始した。蛋白尿は1g/日以下に減少し、浮腫の消失を認め、プレドニゾロンの漸減が可能となり、1年後プレドニゾロン22.5mg/日投与中で、2週に一回のLDL吸着療法は継続し、総コレステロール値は182mg/dlと正常を維持している。1年後までの大腿骨頭壊死症を思わせる臨床症状は認めず、単純X線およびMRIでの変化を認めていない。
 〈症例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、プレドニゾロンの減量が可能となり、1年後プレドニゾロン20mg/日投与中で、2週に一回のLDL吸着療法は継続し、総コレステロール値は215mg/dlと正常を維持している。1年後までの大腿骨頭壊死症を思わせる臨床症状は認めず、単純X線およびMRIでの変化を認めていない。

次に追加2症例につき報告する。

〈症例4〉 (図1)

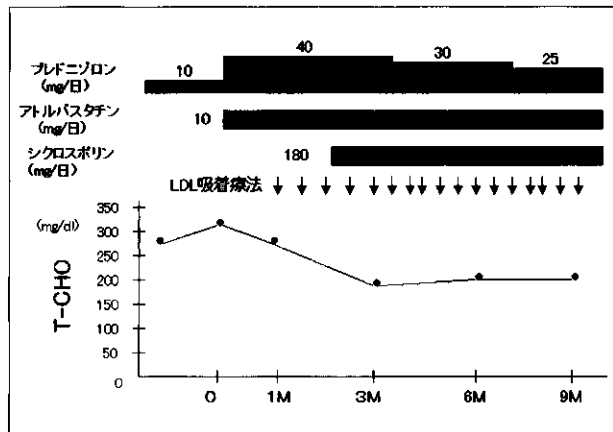


図1. 経過表 症例4 33才 女性 ループス腎炎(WHO IV)

33歳女性。平成11年7月SLE、ループス腎炎(腎性検にてびまん性糸球体腎炎の所見)と診断され、ステロイドパルス療法(メチルプレドニゾロン500mg×3日間)を施行し、プレドニゾロン40mg/日およびミゾリビン150mg/日を投与された。

平成13年1月SLEの再増悪を認め、ステロイドパルス療法を施行するも効果なく、シクロフォスファミドパルス療法(250mg/日)を施行し軽快した。平成

13年10月ループス腎炎、ネフローゼ症候群にてシクロフォスファミドパルス療法を施行したが効果なく、プレドニゾロン40mg/日に増量とした。増量前の総コレステロール値は314mg/dlと著明高値を示し、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281mg/dlと高値が持続し、2週に一回のLDL吸着療法を開始した。またシクロスポリン180mg/日を併用し、蛋白尿の減少を認め、プレドニゾロンの減量が可能となり、9ヶ月後プレドニゾロン25mg/日投与中で、2週に一回のLDL吸着療法は継続し、総コレステロール値は214mg/dlと正常を維持している。6ヶ月後までの大腿骨頭壊死症を思わせる臨床症状は認めず、単純X線およびMRIでの変化を認めていない。

〈症例5〉 (図2)

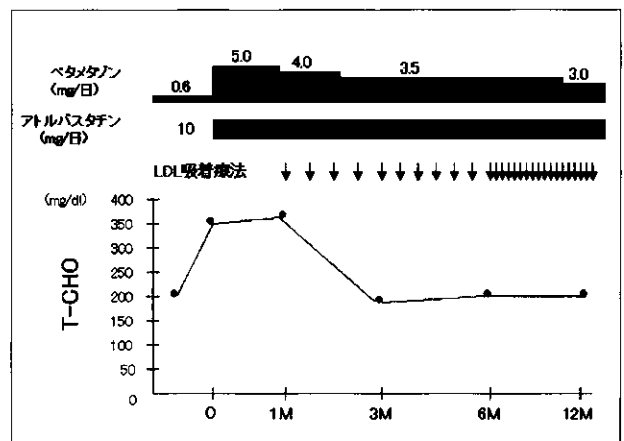


図2. 経過表 症例5 40才 女性 ループス腎炎(WHO V)

40歳女性。平成10年6月関節炎、光線過敏症、白血球(リンパ球)減少、血小板減少、抗核抗体陽性、抗DNA抗体陽性にてSLEと診断し、プレドニゾロン30mg/日より開始された。溶血性貧血に対しステロイドパルス療法を施行し、プレドニゾロン50mg/日に増量し、さらに血球貪食症候群の存在が考えられたため、ベタメタゾン6mg/日とし軽快した。

平成13年4月までにベタメタゾン0.6mg/日に減量していたが、蛋白尿の出現を認め、SLEの増悪が考えられた。

ループス腎炎、ネフローゼ症候群にて、入院の上腎生検を施行し、膜性腎症(一部糸球体硬化症あり)の所見を認め、ベタメタゾン5mg/日に増量とした。増量前の総コレステロール値は354mg/dlと著明高値を示し、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379mg/dlとさらに上