

C. 研究結果

対照家兎における細動脈の血管内腔はしっかりと内皮細胞で覆われており、血管長軸に沿って走る無数の皺壁marginal foldおよび飲小胞様小孔pinocytotic vesicle like pitを確認することができた(図2)。

対照家兎における類洞は内皮下の骨髓細胞がみえ

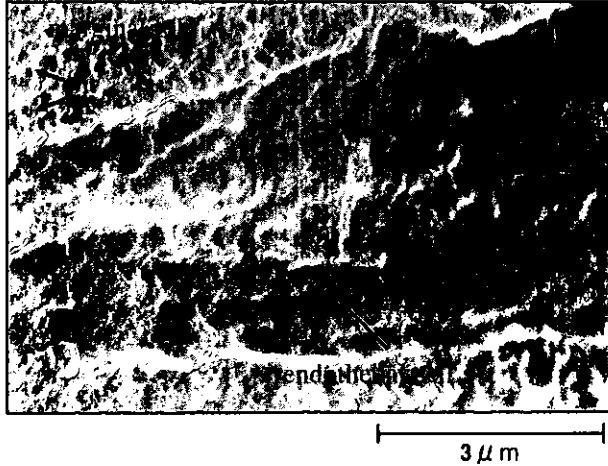


図2. 対照家兎における細動脈血管内皮

る程非薄な内皮細胞で覆われていた。血球等の遊出migrationに関与すると思われる比較的サイズの大きい小孔poreを多数確認することができた(図3)。

またS5群における類洞内皮細胞をコントロール群と比較検討したところ、明らかな形態学的変化を捉えることができなかった(図4)。

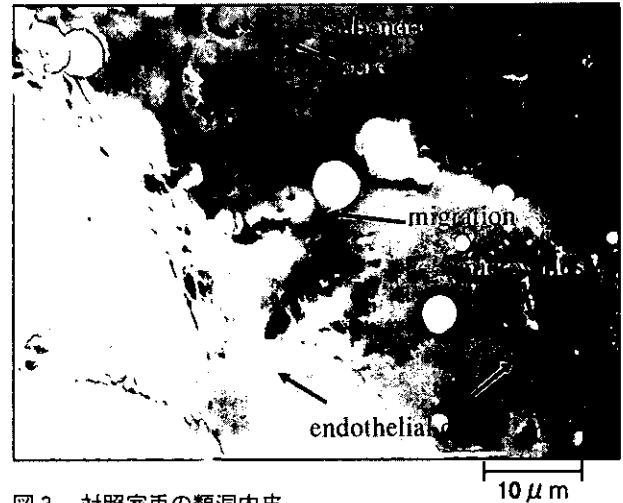
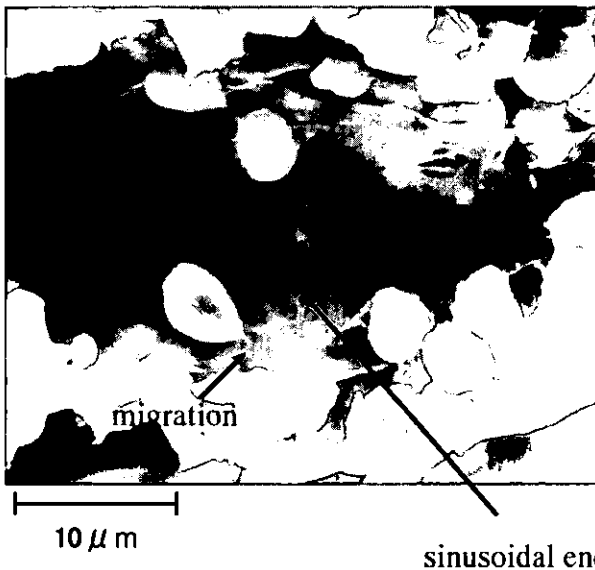


図3. 対照家兎の類洞内皮

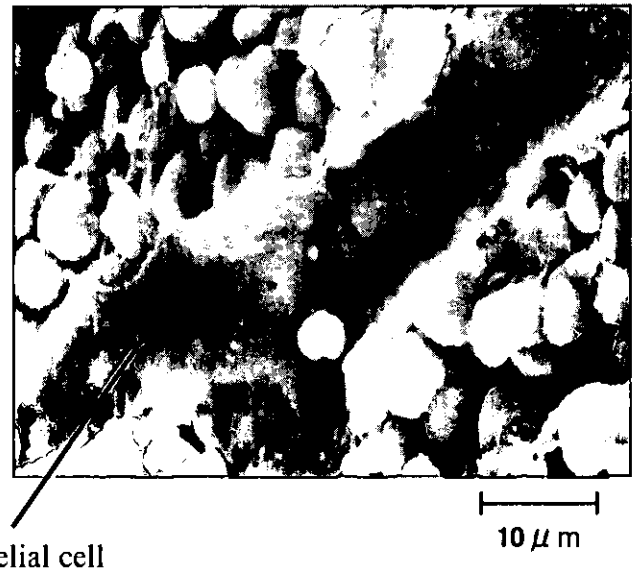


対照家兎

図4. コントロール群とS5群の類洞内皮の比較

D. 考察

正常家兎の細動脈、類洞における内皮細胞には形態学的多様性が存在していた。特に類洞は非常に非薄な内皮細胞でのみ構成されており、容易に周囲の骨髓実質および間質の影響を受けることが推察された。また類洞には基底膜の欠けた多数のporeが存在していたことから、Wilkesらの報告⁶⁾の如く骨髓内圧と



ステロイド投与後5日

類洞内圧はほぼ等しいことがわかった。

今回の検討でステロイド投与後5日における大腿骨内血管内皮細胞の明らかな形態学的変化は捉えることはできなかったが、今回の結果をもとに、今後検討を重ねることで何らかの形態学的変化を捉えることができるのではないかと考えている。

E. 結論

- 1) 大腿骨骨髓内血管内皮細胞の形態を走査型電子顕微鏡を用いて観察した結果、細動脈、類洞における内皮細胞には形態学的多様性が存在していた。
- 2) ステロイド投与後5日における大腿骨内血管内皮細胞の明らかな形態学的変化を捉えることはできなかった。
- 3) 対象家兎数を増やした上で、ステロイド投与による大腿骨骨髓内血管内皮細胞の形態学的変化について、今後さらに検討していく予定である。

F. 参考文献

- 1) 赤池雅史ら: 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. 厚生労働省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班特発性大腿骨頭壊死症分科会, 平成13年度研究報告書. 47-49, 2001
- 2) 田中良哉ら: 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. 厚生労働省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班特発性大腿骨頭壊死症分科会, 平成13年度研究報告書. 45-46, 2001.
- 3) Nishimura T, Matsumoto T : Histopathologic study of veins in steroid treated rabbits. Clin Orthop. 37-42. 1997.
- 4) Horii T, Matsumoto T et al : Effects of steroids on femoral diaphyseal intramedullary circulation in rabbits. Arch Orthop Trauma Surg. 506-509. 2002.
- 5) 島田達生. 走査型電子顕微鏡に試料作製法. よくわかる電子顕微鏡技術 医学・生物学顕微鏡技術研究会編, 初版, 99-119, 朝倉書店, 東京, 1992.
- 6) Wilkes CH et al. : Some physiological aspects of bone marrow pressure. J Bone Joint Surg Am. 57(1):49-57, 1975.

ステロイド治療と血清可溶性プロテインC受容体の関連

長澤 浩平、小荒田秀一 (佐賀大学内科)
 常吉 直子、福留 健司 (佐賀大学病態予防医学)

特発性大腿骨頭壊死 (IONF) は、リウマチ性疾患におけるステロイド治療による重大な合併症の一つである。発症過程に血管内皮細胞傷害の関与が示唆されている。血管内皮細胞上に存在するプロテインC受容体 (EPCR) は、血管内皮傷害により一部が血清中に遊離すると考えられる。血管炎、SLEの活動期で可溶性EPCRは上昇しており、血管内皮細胞傷害を反映している可能性がある。リウマチ性疾患におけるステロイド治療に伴う可溶性EPCRの変動を測定したところステロイド治療により血管内皮傷害が増強す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 (IONF) はステロイド治療にともなって起こる重要な合併症の一つであるが、発症過程に血管内皮の傷害が関与している可能性が指摘されている。全身性エリテマトーデス (SLE) において、IONFが発生することが多いが、疾患自体の特性とパルス療法を初めとしたステロイド大量投与による血管内皮細胞傷害が背景にあると考えられるがその詳細は解明されていない。

プロテインC経路は、アンチトロンビンⅢと並び、凝固系において重要な血栓制御メカニズムの一つである (図1)。血管内皮細胞上に発現するプロテインC受

容体 (EPCR) は、CD1/MHCクラス・スーパーファミリーの一員であるが、トロンボジュリンと共同し、プロテインCを活性型とし、凝固因子であるVaやVIIaを分解・不活化することで、抗凝固作用を発揮している。

血管内皮細胞上に存在するEPCRは、血管内皮の傷害により切断され、一部が可溶性EPCRとなって血清中に遊離すると考えられる (図2)。この可溶性EPCRの測定により、血管内皮の傷害を検出できると考えられる。また、可溶性EPCRは、血中の活性化プロテインCを捕捉し、抗凝固活性を低下させる可能性がある。そのため、最終的に、血栓形成が促進され、大腿骨頭壊死の発生に繋がる可能性がある。

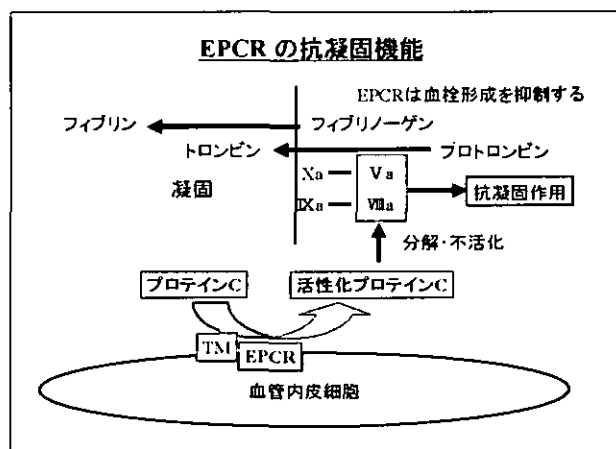


図1. EPCRと凝固系の関係

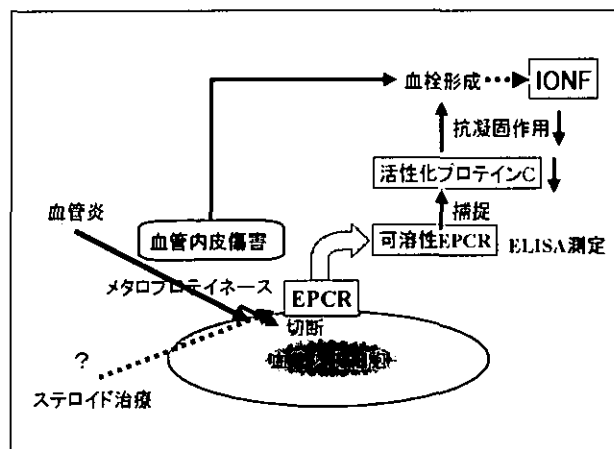


図2. 血管内皮傷害におけるsEPCRの発生とIONF

B. 方法

リウマチ性疾患を有する178例249検体のsEPCRを測定した(表1)。患者は、SLE82例・血管炎症候群26例を中心に解析をおこなった。SLEでは、活動期・寛解期・大腿骨頭壊死合併群に分類した。関節リウマチ・Behcet病、その他の疾患でも解析を行った。

一部の症例(34例)で、プロスペクティブにステロイド投与前、7日後、28日後のsEPCR濃度を測定した。SLE患者では、ステロイド開始から3ヶ月後にMRIで大腿骨頭壊死発生の評価を行った。

血清中のsEPCRは、 -80°C に保存した患者血清を、抗EPCR抗体を用いたELISA法にて解析した。正常上限である 6ng/ml 以上の場合を陽性と判定した。

表1. 患者背景

疾患	患者数	検体数
SLE	82	100
活動期	36	54
寛解期	46	46
SLE+IONF	25	25
血管炎症候群	26	42
ベーチェット病	16	22
関節リウマチ	13	17
その他	39	68
計	178	249

C. 結果

まず、各疾患におけるsEPCR陽性率を検討した。いずれのリウマチ性疾患においても、sEPCRの陽性症例がみられたが、そのうちで、sEPCRはSLE、血管炎において高い傾向がみられた(図3)。

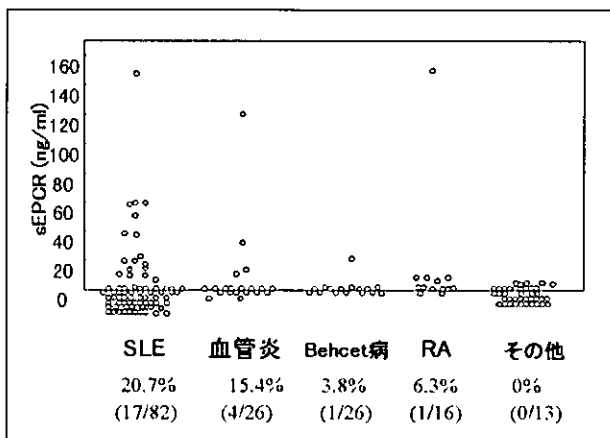


図3. リウマチ性疾患におけるsEPCR陽性率

次にsEPCRとSLEの疾患活動性の関連を検討した。疾患活動期には、52.7%が陽性と高頻度であったが、寛解期には、13%に低下した(図4)。SLEの疾患活動性とsEPCRが関連していると考えられた。

SLE患者において、ステロイド治療により大腿骨頭壊死を起こした症例に関し検討を行った。疾患の活動期、寛解期ともに、sEPCRの増加はほとんど認められず(図5)、治療前や寛解期のsEPCRの値と大腿骨頭壊死の関連性はないと考えられた。しかし、解析時期はステロイド開始前あるいはステロイド維持量と低用量であった。

大腿骨頭壊死の発生には、ステロイド投与が強く関連しており、ステロイド治療の影響を考慮すべきであると考えられた。そこで、ステロイド治療開始前から連続して採血を行いステロイド大量投与時のsEPCRの変動を次に検討した。

SLE症例は、ステロイド治療により、第7日には速やかにsEPCRが消失する例(症例1)もある(図6)が、ステロイド治療開始直後にsEPCRが上昇し、第28日までその上昇が遷延する症例(症例2)もみられた。

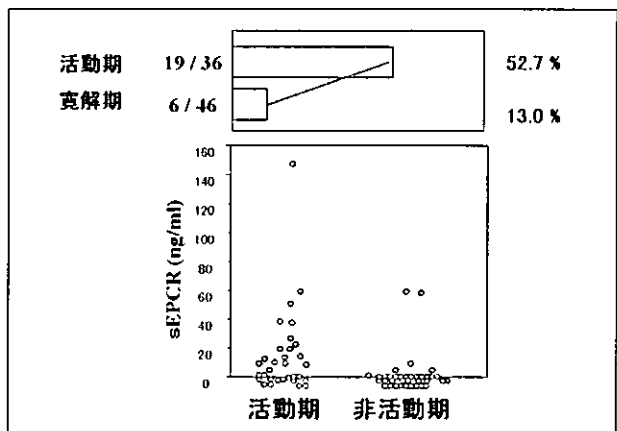


図4. SLEにおけるsEPCR陽性率

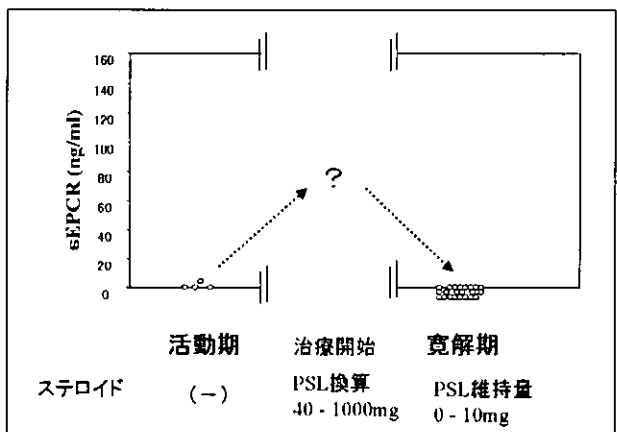


図5. SLE+IONF症例のsEPCR

また、大腿骨頭壊死例（症例3）では、パルス療法後も、sEPCRの上昇が遷延した。この症例では、血小板低下による出血傾向があったためIONF予防の抗凝固療法を行わなかった。血管炎症例でも、ステロイド治療後、sEPCRの上昇が持続する症例や新たに陽性となる症例がみられた（図7）。

ステロイド治療に伴うsEPCR陽性率の変化を各疾患で検討した（表2）。SLEでは、治療前にsEPCRが陽性である場合、治療後も持続陽性となる症例が多くみられた（80%）。また治療前に陰性であってもステロイド治療によって新たにsEPCRが陽性となる症例も多く存在した（66%）。よって、SLE全体では、ステロイド治療直後におけるsEPCR陽性率は75%と極めて高値となった。血管炎症候群でも、投与前陽性群は、2例とも持続陽性（100%）となった。また、投与前陰性例においては、あらたな陽性化が半数に認められた。血管炎症例全体として、治療直後に67%がsEPCRが陽性化していた。

一方、SLE、血管炎を除くその他のリウマチ性疾患では、投与前陽性群で治療直後も陽性である例は、40%にとどまった。また投与前陰性例であらたに陽性化する症例は、7%と極めて低頻度で、対照的であった。

このように、ステロイド治療を同様に行う場合であっても、治療前後のsEPCR値の変動は原疾患で大きく異なっていた。

表2. ステロイド治療によるsEPCR陽性率の変化

	治療前	治療後	N	IONF	治療後(+)率
SLE 8	(+) 5	(+) 4 (80%)	4 (80%)	1	62.5% (5/8)
	(-) 3	(+) 2 (66%)	2 (66%)	0	75.0% (6/8)
		(-) 1	1	0	
血管炎 6	(+) 2	(+) 2 (100%)	2 (100%)	nd	33.3% (2/6)
	(-) 4	(+) 2 (50%)	2 (50%)	nd	66.7% (4/6)
		(-) 2	2	nd	
その他 20	(+) 5	(+) 2 (40%)	2 (40%)	nd	25.0% (5/20)
	(-) 15	(+) 1 (7%)	1 (7%)	nd	15.0% (3/20)
		(-) 14	14	nd	

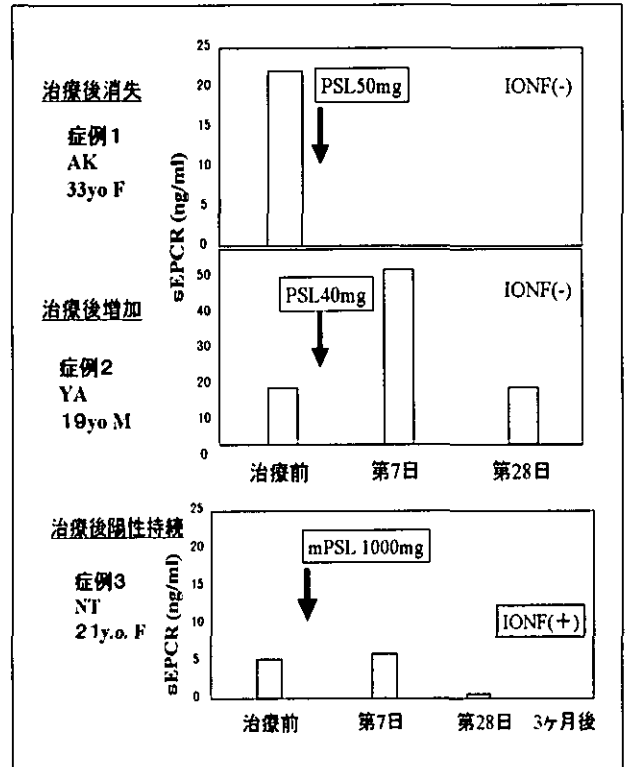


図6. SLE患者のステロイド治療によるsEPCRの推移

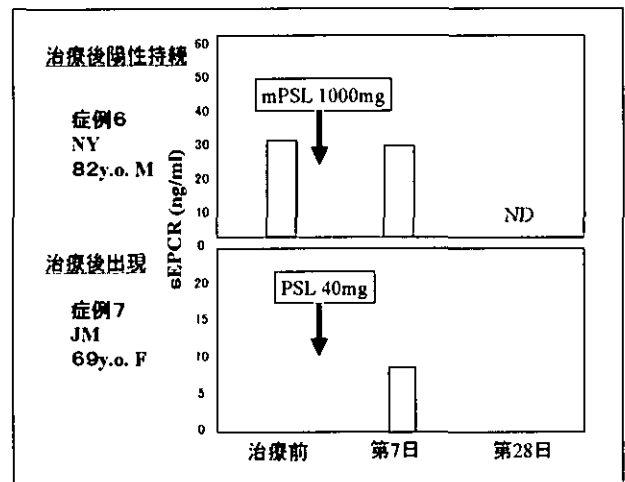


図7. 血管炎患者のステロイド治療によるsEPCRの推移

D. 考察

リウマチ性疾患のなかで、SLE、血管炎ではsEPCRが疾患活動期に陽性率・濃度ともに上昇しており、原疾患に関連して血管内皮細胞の傷害が存在していると考えられた。ステロイド治療によるsEPCR陽性率の変化に関しては（図8）、SLEでは治療前後ともに陽性率が高値であった。血管炎では治療後の陽性率の増加が目立った。一方で、その他のリウマチ性疾患では、ステロイド投与により、sEPCR陽性率の低下がみられた。この点から、SLE、

血管炎では、既存の血管内皮傷害がステロイド投与により増強されるが、その他のリウマチ性疾患では、ステロイド投与により血管内皮傷害が沈静化される可能性があると考えられた。sEPCRのステロイド治療による動態はSLE/血管炎とその他のリウマチ性疾患では異なっていると考えられた。よって、SLEにおけるIONFの発生には、原疾患に基づく内皮細胞傷害とステロイド療法による内皮傷害の増強の2段階の傷害が関係する可能性が示唆されたが、その証明には今後の症例の集積が必要である。

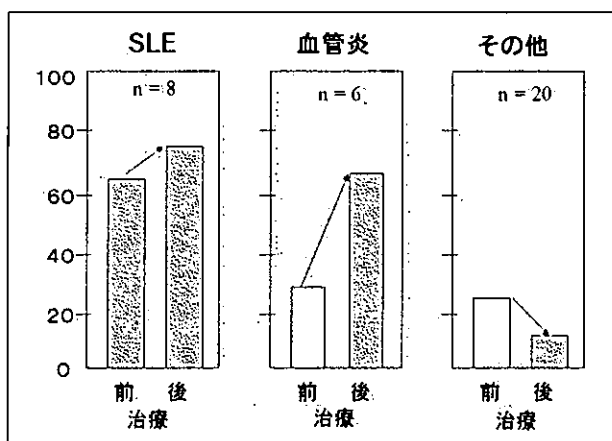


図8. ステロイド治療によるsEPCR陽性率の変化

E. 結論

活動性のある血管炎（15%）、SLE（53%）では、陽性化率・血清sEPCR値が上昇した。原疾患に関連した血管内皮細胞の傷害が推定された。

SLE/血管炎では、ステロイド療法後に、さらに血清sEPCRが増加する。ステロイドにより血管内皮傷害が増強される可能性がある。他の疾患ではステロイド療法による増加はなかった。

SLEにおけるIONFの発生には、(1)原疾患に基づく内皮細胞傷害と(2)ステロイド療法による内皮傷害の増強という2段階の傷害が関係する可能性がある。

IONFを起こした症例では、抗凝固療法が施行されておらず、ステロイドパルスも施行されていた。血管内皮傷害に加えて、パルス療法の有無、凝固異常などの種々の要因がさらにIONFの発生に関与している可能性がある。

F. 参考文献

1) Tsuneyoshi N, Fukudome K, Horiguchi S, Ye X, Matsuzaki M, Toi M, Suzuki K, Kimoto M. Expression

and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines. *Thromb Haemost* 85:356-61, 2001

2) Boomsma MM, Stearns-Kurosawa DJ, Stegeman CA, Raschi E, Meroni PL, Kurosawa S, Cohen Tervaert JW. Plasma levels of soluble endothelial cell protein C receptor in patients with Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol.* 128:187-94, 2001

糖質コルチコイドによる特発性大腿骨頭壊死症発症機構に関する研究

田中 良哉、岡田 洋右（産業医科大学医学部第一内科学講座）

特発性大腿骨頭壊死症（IONF）の形成への血管障害の関与が示唆される。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、高濃度のGCは、内皮細胞の細胞増殖活性抑制、細胞内p21亢進、G₂/M期細胞減少、アポトーシスを誘導する事を解明した。また、GCによる内皮細胞障害は、終末糖化産物AGE添加で増強した。IONF発症には、ステロイドパルス療法によるGC高容量急速暴露が起因するとの臨床結果と併せて、高濃度GCによる内皮細胞アポトーシス誘導による血管障害がIONF形成に関与する事、組織虚血状態や耐糖能異常などにより更に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（GC: ステロイド薬）の関与が報告されている。殊に、IONFの発症過程に於いて、高濃度のGC薬による血管障害の存在が示唆されており、本研究でも、高濃度のGC薬投与による血管内皮細胞の細胞周期、アポトーシス、細胞増殖への影響を検討し、その機構の解明を試みた。

一方、糖尿病の合併症として、血管障害が注目される。殊に、糖化終末反応生成物AGE（advanced glycation endproducts）は、糖尿病で特徴的な“持続する高血糖状態”より形成され、糖尿病の血管障害との関連性が示唆されている。また、AGEは、HMG（high mobility group）-1に対する受容体でもあるRAGE（receptor for AGE）と結合し、炎症反応の際の多彩な遺伝子転写に関与する。

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、AGEによる作用修飾を検討した。

B. 研究方法

（1）血管内皮細胞として、臍帯静脈由来内皮細胞を用いた。糖質コルチコイド（ステロイド薬）として、プレドニゾロン（PSL）、メチルプレドニゾロン（m-PSL）、デキサメタゾン（DEX）を使用した。

（2）細胞増殖は、TetraColor Oneを用いて吸光度計で測定した。細胞周期はpropidium iodide (PI) 染色後、フローサイトメトリーで検出した。細胞のアポ

トーシスは、PI染色及びannexin V/PI染色後のフローサイトメトリーによる検出した。p21、p53、bcl-2等の細胞質内蛋白質は細胞をホルマリン及びサポニンで処理後に抗体で染色しフローサイトメトリーで検出した。

（倫理面への配慮）

特に該当せず。

C. 研究結果

（1）ステロイド薬大量内服療法、即ち、PSL 60mg、m-PSL 48 mg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 (3 $\times 10^{-6}$ M)、m-PSL 100 μ g/mlの投与により、細胞増殖は顕著に抑制された。

（2）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。

（3）内皮細胞にPSLを添加し、PIで染色し、細胞周期を観察した所、PSL 100 μ g/ml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。

（4）内皮細胞をPI/annexin Vで二重染色し、早期アポトーシス細胞を検出した所、PSL 100 μ g/ml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事が示唆された。

(5) PSLによる内皮細胞の増殖抑制は、糖化終末反応生成AGEによって更に増強された。殊に、AGE存在下では、比較的低濃度のPSL (10 μ g/ml) でも増殖抑制効果を示した。

(6) 内皮細胞を無刺激、PSL 20 μ g/ml刺激、PSLとAGEによる共刺激を行うと、アネキシンV陽性細胞は、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。

D. 考察

IONFの発症過程に於いては、大腿骨頭における血行の途絶、あるいは虚血に起因する血管障害が関与すると考えられている。また、昨年の報告のように、SLE症例においてIONFを発症した症例が全て、ステロイドパルス療法の既往があった事は、高濃度のGC薬が、血管障害を伴うIONFの発症に深く関与する事を強く裏付ける。しかし、GC薬投与患者におけるIONF発症機序および臨床的背景については現在まで不明である。

以上のような臨床結果を踏まえて、血管障害におけるGC薬の関与について検討した。その結果、ステロイド薬大量内服療法で到達可能な濃度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濃度では、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、糖尿病の合併症として、血管障害が注目され、特に、AGEは、糖尿病で特徴的な“持続する高血糖状態”より形成され、HMG-1に対する受容体でもあるRAGEと結合して機能し、血管障害との関連性が示唆されている。また、HMG-1-RAGEを介するシグナルは、炎症反応の際の多彩な遺伝子転写に関与する。今回、GCによる血管内皮細胞増殖障害は、AGEの存在下では、内服療法で到達可能な濃度のPSL (10 μ g/ml) でも観察された。昨年度、PSLによる内皮細胞増殖障害が、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 の存在下で、増強される事を示したが、これらの結果を合わせると、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、組織虚血状態や耐糖能異常などによりさらに惹起されるものと考えられる。

E. 結論

ステロイド薬は、ステロイドパルス療法で到達可能な濃度 (3 $\times 10^{-6}$ M) 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、組織虚血状態や耐糖能異常などにより惹起される事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 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, 143-9
- 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, 21446-52
- 3) Tanaka Y, Okada Y, Nakamura T. Inter- and intra-cellular signaling in secondary osteoporosis. *J Bone Miner Metab* (2003) 21, 61-6
- 4) Tabata T, Mine S, Kawahara C, Okada O, Tanaka Y. Monocyte chemoattractant protein-1 induces scavenger receptor expression and monocyte differentiation into foam cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 305, 380-3
- 5) Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y. β 1 integrin-mediated signaling induces ICAM-1 and Fas and Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells. *Arthritis Rheum* (2003) 48, 1239-48
- 6) Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y. β 1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor κ B ligand on osteoblast and osteoclast maturation. *J Biol Chem* (2003) 278:

45368-74

- 7) Nakayamada S, Okada S, Saito K, Tanaka T. Etidronate prevents high-dose glucocorticoid-induced bone loss in premenopausal individuals with systemic autoimmune diseases. J Rheumatol (in press)
2. 学会発表
 - 1) 田中良哉. リウマチ・膠原病: 治療の新展開. 第26回日本医学会総会教育講演 (福岡) 平成15年4月
 - 2) 田中良哉. 続発性骨粗鬆症の病態と薬物治療. 第47回日本リウマチ学会ランチョンセミナー (東京) 平成15年4月
 - 3) Y Okada, S Nakayamada, K Saito, Y Tanaka Inflammatory signals in differential functions of osteoblasts. 第47回日本リウマチ学会 (東京) 平成15年4月
 - 4) 福島あゆみ, 岡田洋右, 峯信一郎, 太幡敬洋, 河原智恵, 三澤晴雄, 中井美穂, 廣瀬暁子, 田中良哉. 糖質コルチコイドによる血管内皮細胞障害機構と Hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α の関与. 第76回日本内分泌学会総会 (横浜) 平成15年5月
 - 5) 福島あゆみ, 岡田洋右, 峯信一郎, 太幡敬洋, 河原智恵, 三澤晴雄, 廣瀬暁子, 中井美穂, 田中良哉. 糖質コルチコイドによる血管内皮細胞障害機構における酸化ストレスの関与. 第46回日本糖尿病学会 (富山) 平成15年5月
 - 6) 田中良哉. ステロイド性骨粗鬆症の薬物療法. 第5回日本骨粗鬆症学会総会 (シンポジウム) (福岡) 平成15年10月
 - 7) 田中良哉. 免疫シグナルと続発性骨粗鬆症の病態機構. 第18回日本整形外科学会基礎学術集会 (教育研修講演) (北九州) 平成15年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ステロイド性骨壊死モデルにおける酸化ストレス、血管透過性亢進の関与 およびグルタチオンによる骨壊死抑制効果

市堰 徹、西野 暢、兼氏 歩
杉森 端三、松本 忠美（金沢医科大学整形外科）
勝田 省吾（金沢医科大学病理Ⅱ）
加畑 多文（金沢大学整形外科）

ステロイド性骨壊死モデルにおける生体内酸化ストレス発生、血管透過性亢進の関与および酸化ストレス抑制剤による骨壊死予防の可能性について検討した。検討方法は、血液生化学的に還元型グルタチオンおよび過酸化脂質を、免疫組織化学的にAGE発現の有無について調査し、骨内の血流障害の確認はアルブミンの間質への漏出所見にて調査した。本検討結果から、酸化ストレスはステロイド投与後3日から5日で発生していることが明らかとなった。また骨内での血流障害は、酸化ストレス発生時期であるステロイド投与後5日で認め、両者の関連が示唆された。骨壊死発生率はステロイド単独投与14日群で70%だったのに対し、抗酸化剤投与群では0%と有意な低下を認めた。本実験からステロイド性骨壊死モデルでの酸化ストレスの関与および酸化ストレスの抑制による骨壊死予防の可能性が示唆された。

A. はじめに

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序の詳細に関しては、未だ明確にされていない。これまでの報告によるとステロイド性骨壊死症の発生機序に関しては、最終的に骨内の虚血によって発生するという点では意見がほぼ一致している¹⁻⁴⁾。近年、様々な疾患の病態に生体内酸化ストレスの関与が明らかになっており、血管障害や組織障害への深い関与が認められている⁵⁻⁷⁾。

そこで、本実験では①骨壊死モデルであるステロイド投与家兎において酸化ストレスの発生および血管障害を確認するために血管透過性について検討すること②同モデルに対し酸化ストレス抑制剤を投与による壊死予防の可能性について検討し、発生率の変化からステロイド性骨壊死における酸化ストレスの関与を明らかにすることを目的とした。

B. 対象と方法

実験動物には体重約3.5kgの雌性日本白色家兎を用いた。また本研究のプロトコールは、金沢医科大学動物実験指針に基づいて行われたものである。

【実験1】ステロイド投与による生体内酸化ストレスの発生と骨壊死および骨髄壊死発生との関係についての検討

体重1kgあたり4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを一回右殿筋内に筋注し、ステロイド投与後14日で犠牲死とした10羽をS14群とした。また、ステロイドを投与せず同一条件で飼育した対照用家兎5羽をcontrol群とし、比較検討した。すべての家兎はネンブタール（大日本製薬、大阪）の急速静注によって犠牲死させ、速やかに両側大腿骨を摘出し、10%ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋標本を作製した。

【実験2】ステロイド骨壊死モデルにおける抗酸化剤の効果についての検討

体重1kgあたり4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを一回右殿筋内に筋注した当日より、GSH 500mg/kgをステロイド投与日から7日間連日耳静脈より投与し、14日経過時点で犠牲死とした10羽をG群とした。

実験1および実験2について以下の検討を行った。

①血液生化学的検討

各群についてステロイド投与前、投与後3日、5日、7日、14日に耳動脈より採血を行い、血中GSHおよびLPOの推移について検討した。

②免疫組織化学的検討

i; 酸化ストレスの骨内での発生を確認するために、免疫組織化学的に抗AGEモノクローナル抗体を用い、各群の大腿骨における染色性について観察した。

ii; 大腿骨内の血管傷害を調査するために血管透過性亢進について抗アルブミン抗体を用いて各群の染色性を観察した。

③病理組織学的変化

HE染色標本を作製して光学顕微鏡にて骨壊死および骨髄壊死発生の有無を検討した。壊死発生率は用いた家兎数に対する骨または骨髄壊死を認めた家兎数の割合で算出した。

C. 結果

【実験1】ステロイド投与による酸化ストレス発生についての検討

実験1-①

血液生化学的検討

GSHはステロイド投与後3日で有意に減少し、投与後7日から14日で改善傾向を認めた。LPOはステロイド投与後5日から7日で有意な上昇を認め、14日ではGSHと同様にコントロールとほぼ同程度まで改善していた(図1a, b)。

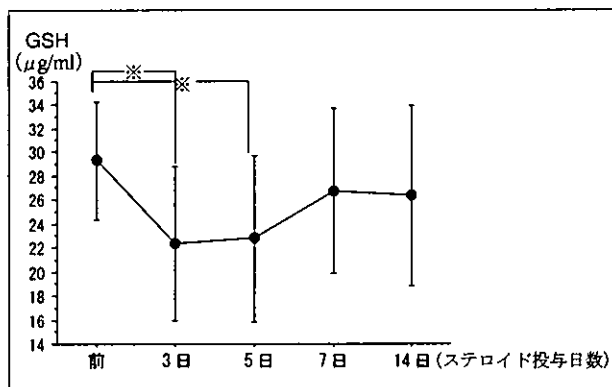


図1 (a)

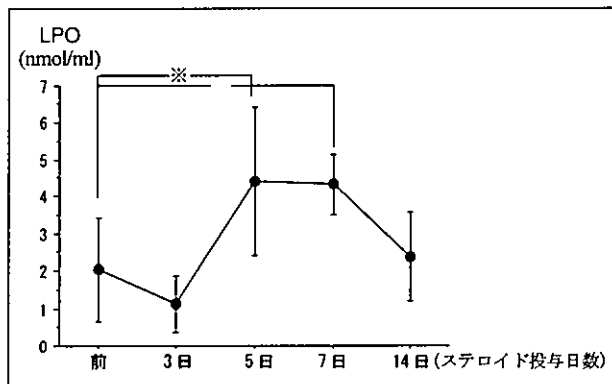


図1 (b)

実験1-②

免疫組織化学的検討

i 骨内の酸化ストレス発生についての検討

大腿骨内のAGEはコントロール群、S3群では陽性所見は認めなかった。一方、S5群においては大腿骨近位部に陽性所見を認め、強拡大では同部位の陽性細胞の集簇が観察された。またS14群では、壊死部を含む周辺部位に陽性細胞の集簇が認められた。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。

ii 血管透過性についての検討

コントロール群、S3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。S5群では、AGEと同様に大腿骨近位部の間質に漏出所見を認めた。S14群でも壊死部および壊死周囲の間質を中心に強い漏出所見を認めた。

実験1-③

病理組織学的検討

コントロール群では骨壊死および骨髄壊死は全例で認めなかった。S14群では10羽中7羽に骨壊死を認めた。実験1から本モデルにおいてステロイド投与後3日から5日で酸化ストレスが発生していることが明らかとなった。

【実験2】酸化ストレス抑制剤による骨壊死予防の可能性および酸化ストレスの関与についての検討

実験2-①

血液生化学的検討

GSHおよびLPOは有意な変化は認めず、酸化ストレスの発生が抑制されていた。実験1のステロイド単独群の推移と比較すると、GSHはステロイド投与後3日から7日で、LPOはステロイド投与後5日から7日で有意差を認めた(図2 a, b)。

実験2-②

免疫組織化学的検討

G群の免疫組織化学的検討では骨内のAGEの発現はほとんど認めなかった。

アルブミン染色でもAGEと同様に間質への漏出所見はほとんど認めなかったが、骨髄壊死の周囲にはステロイド単独群とほぼ同程度の漏出を認めた。

実験2-③

病理組織学的検討

H-E染色標本ではS14群で認められたような骨壊死の所見は、全例で認めなかった。また、骨髄壊死の

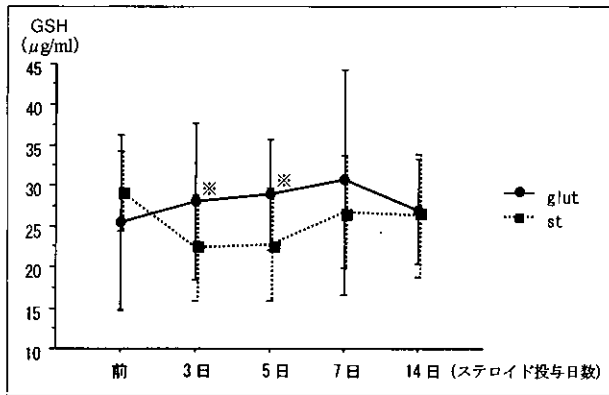


図 2 (a)

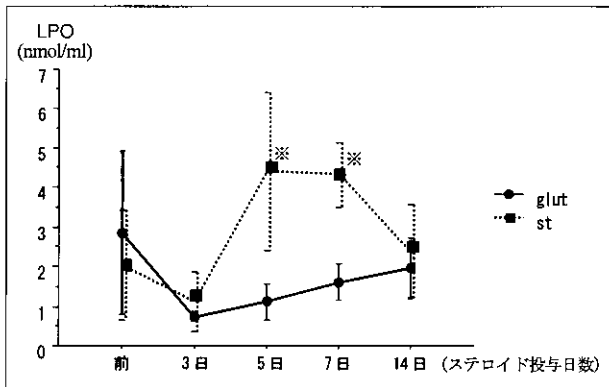


図 2 (b)

み10羽中2羽に認めた。S14群とG群の壊死発生率の比較では、G群で有意に減少していた。

D. 考察

近年様々な疾患において生体内酸化ストレスの発生が確認されており、血管内皮傷害や血管壁傷害などの血流障害および組織障害への積極的な関与を示唆する報告が多く認められるようになってきた。虚血などの血流障害が原因と考えられているIONにも生体内酸化ストレスが関与している可能性がある。

今回血液生化学的に検討したGSHやLPO、AGEは生体内酸化ストレスの発生をよく反映するとされており⁵⁻⁷⁾、生体膜の恒常性、細胞骨格の保持や異物の代謝などに関連するため、血管障害^{8,9)}や組織障害¹⁰⁾と深く関係している因子である。

本モデルにおいて、血中GSHおよびLPOはステロイド投与後3日から7日で有意な変化を認め、以後改善傾向を認めた。大腿骨内の酸化ストレス発生についての検討において、AGEはコントロール群、S3群では発現を認めず、S5およびS14群で強く発現を認めた。また、血管透過性はS5群で亢進所見を認めた。これらからステロイド投与による生体内酸化ストレ

スはステロイド投与後約3日から5日ですでに発生しており、何らかの血管障害も同時期に起こっていることが示され、ステロイド投与後かなり早期に血管障害や組織障害などが起こりやすい状態が形成されていることが確認できた。

一方、実験2では抗酸化剤の一つであるGSHをステロイド投与家兎に投与することで、酸化ストレスの指標として用いた血中のGSHおよびLPOは有意に改善され、大腿骨におけるAGEの発現も減少したことから、骨内においても酸化ストレスは抑制されたことが確認できた。

また、GSHの投与により酸化ストレスを抑制したと同時に骨壊死発生率は0%と抑制されていたことから、ステロイド投与による生体内酸化ストレスの発生がステロイド性大腿骨頭壊死発生に關与しており、酸化ストレスを抑制することによる骨壊死予防の可能性が示された。

E. 参考文献

- 1) 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
- 2) Wang TY, Wang TY, Avolonitis EG, et al. Systemic necrotizing vasculitis causing bone necrosis. Am J Med 1988. 84 ; 1085-1086
- 3) 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
- 4) Jones J P : Intravascular coagulation and osteonecrosis. Clin Orthop 1992. 277 ; 41-53
- 5) Chung SS, Ho EC, Lam KS, et al. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. J Am Soc Nephrol. 2003 ; 14 ; S233-236.
- 6) Uzel N, Sivas A, Uysal M, et al. Horm Metabol Res 1987 19(2) 89-90.
- 7) Hayashi M, Itoh M, Araki S, et al. Oxidative stress and disturbed glutamate transport in hereditary nucleotide repair disorders. J Neuropathol Exp Neurol 2001 60(4) 350-356.
- 8) Reed DJ, Fariss MW : Glutathione depletion and susceptibility. Pharmacol. Rev. 1984 36;25s-33s.
- 9) Burk RF, Patel K, Lane JM. Reduced glutathione protection against rat liver microsomal injury by carbon tetrachloride. Biochem J 1983 215 441-445 .
- 10) Willis ED, Wilkinson AE. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. Biochem J 1966 99 667-676 .

SHRSPを利用した大腿骨頭壊死研究 —NOS阻害薬とステロイドホルモン負荷—

進藤 裕幸 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
発生分化機能再建学講座構造病態整形外科学)
熊谷 謙治、鈴木 暢彦、尾崎 誠、村田 雅和
宮田 倫明 (長崎大学医学部・歯学部附属病院整形外科)
丹羽 正美 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
病態解析・制御学講座神経感覚薬理学)

SHRSP/NagasakiにNOS阻害剤含有高コレステロール飼料(HFC食)とSteroid Hormoneを投与し、大腿骨頭壊死の動態を観察した。control群に比べSteroid Hormone投与群とHFC食群ではepiphysis、metaphysis骨髄内の脂肪細胞の増加と膨化が著しく、骨髄内を脂肪細胞が広く占拠していた。その脂肪細胞は変性した部もあり壊死への移行を示唆していた。

骨壊死の有無と脂肪細胞の増生、変性に注目したStage検討ではcontrol群、HFC食群、Steroid Hormone投与群、HFC食+Steroid Hormone投与群で有意差がみられた。Apoptosisに着目してみるとepiphysisのみならず壊死周辺の大腿骨頭部にも発現していた。また脂肪細胞は変性した部に発現が増加しており壊死への移行が示唆された。酸化stressはSteroid Hormone投与+HFC食群で著しいことが窺われた。

A. 研究目的

ここ数年SHRSPにNOS阻害剤含有高コレステロール食を投与し高脂血症を作成、またSteroid Hormoneの負荷を行い、大腿骨頭の形態を観察してきた。今回の目的は骨頭に増生また一部変性した脂肪細胞が骨壊死と関わりがあるかどうかApoptosisや酸化stressに着目して観察することにある。

B. 研究方法

〈材料&方法〉

ラットは長崎大学先端生命科学研究所支援センター動物実験施設(アニマルセンター)で系代飼育されている15週齢牡SHRSP/Ngskを使用した。図1に示すように15週齢で処置を開始したSP飼料のみ投与群(control群)、HFC食のみ投与した群(HFC食群)、SP飼料を投与しSteroid Hormoneを負荷した群(Steroid Hormone投与群)更にHFC食を投与しSteroid Hormoneを負荷した群(HFC食+Steroid Hormone投与群)4群を設定し各々40匹、36匹、31匹、33匹使用

した。HFC食のレジメはL-NNA (N^G-nitro-L-arginine)を含むものを作成した。

(♂ SHRSP/Ngsk)

	匹数	骨頭数	週齢(Wks)	壊死		
			15	19	壊死数	%
control群	40	80	→	×	40	50.0
HFC食群	36	72	→	×	39	54.2
Steroid Hormone 投与群	31	62	↓	×	36	58.1
HFC食 + Steroid Hormone 投与群	33	66	↓	×	47	71.2

HFC食	
SP飼料	68%
コレステロール	5%
コール酸	2%
牛脂粉末	25%
L-NNA	0.006%

SP食: →
HFC食: →
Steroid hormone (MPSL): ↓
5mg bolus im
×: sacrificed

図1. 実験群の内訳:

control群、HFC食群、Steroid Hormone投与群、HFC食+Steroid Hormone投与群の4群を設定し各々40匹、36匹、31匹、33匹使用した。Steroid Hormoneは17週齢でメチルプレドニゾロン5mgを筋注した。control群、HFC食群、Steroid Hormone投与群Steroid Hormone+HFC飼料投与群の順で有意差はないが壊死率に増加傾向がみられた。下段にHFC食の内容も示した。

Steroid Hormoneは17週齢でメチルプレドニゾン 5mgを背部に筋注した。

飼育はアニマルセンターで通常ラットケージを使用し、定期的観察し各週に血圧、体重を検量した。屠殺解剖後、生化学検査、薄切永久標本を作製し、壊死の頻度、壊死の程度を観察評価した。組織学的に大腿骨頭壊死の発生頻度について、R. P. Ficatの組織学的診断基準に準じて診断し更にepiphysisの脂肪細胞の増生、変性の動態と骨頭壊死に関して大腿骨頭epiphysis内の脂肪細胞が増生に注目して、正常をStage1明らかな骨壊死をStage5とし脂肪細胞の占有面積が50%以下の増加をStage2、占有面積50%以上の増加をStage3、脂肪細胞は膨化し境界不鮮明で滲出物がみられ、変性所見と解釈できるものを、Stage4と定義したStage分類で分類しcontrol群、HFC食群、Steroid Hormone投与群、HFC食+Steroid Hormone投与群で各骨頭のStage分布を解析した(表1、図2)。

表1. 骨壊死の有無と脂肪細胞の増生、変性に関するStage分類 (epiphysis内)

大腿骨頭epiphysis内の脂肪細胞が増生に注目して正常をStage1明らかな骨壊死をStage5とし脂肪細胞の占有面積が50%以下の増加をStage2、占有面積50%以上の増加をStage3、脂肪細胞は膨化し境界不鮮明で滲出物がみられ、変性と解釈できるものを、Stage4と定義した。

骨壊死の有無と脂肪細胞の増生、変性に関する Stage 分類 (epiphysis 内)

Stage	1	2	3	4	5
壊死	-	-	-	-	+
脂肪細胞	正常	増生 (<50%)	増生 (≥50%)	変性	消失
骨髄細胞	正常	減少 (+)	減少 (++)	減少 (+~++)	消失

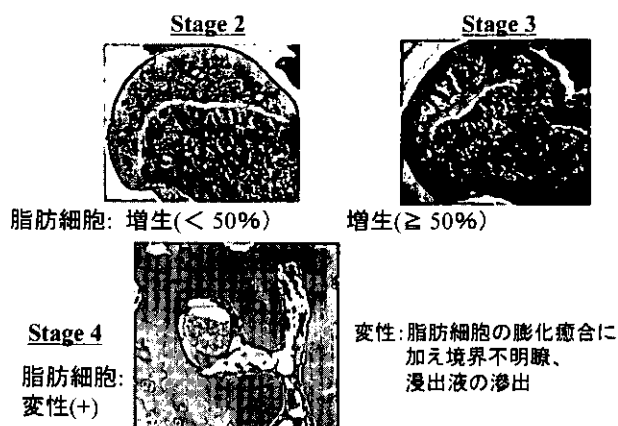


図2. Stage分類2, 3, 4の具体例

Apoptosisの実験はタカラバイオ株式会社のIn situ Apoptosis Detection Kit (Code No. MK500) を使用し、脱パラフィン標本をProtein Kで処理後、内因性ペルオキシダーゼをブロッキングし、TdT Enzyme反応調製液をスライド上のにせ湿潤箱中で38℃60分反応させた後、Anti-FITC HRP Conjugateを38℃30分反応させた。DABキットで発色させ、3%メチルグリーン染色後顕微鏡観察した。酸化stressの検出には一次抗体として日本油脂株式会社の抗8-OHdGモノクローナル抗体と抗4-HNEモノクローナル抗体を使用し通常の免疫染色プロトコールに従って染色を行った。またNOS阻害剤含有高コレステロール飼料とSteroid Hormone投与がSHRSP/Ngsk以外のstrainではどのように反応するかSHRSP/Izm, SHR/Izm, SHR/Crj, WKY/Izmに投与し、大腿骨頭壊死の動態を観察した。

(倫理面への配慮)

長崎大学実験動物委員会の認可を得た。

C. 結果

体重について：HFC食やSteroid Hormoneを投与すると体重は減少し、HFC食+Steroid Hormone投与群では著減していた。

血液生化学検査ではHFC食群では総コレステロール値やLDL値が対照群に比して著増し高脂血症を呈したが、HDL値、トリグリセライド値は正常であった。Steroid Hormone投与群では総コレステロール値の上昇は軽度であったがHDL値、トリグリセライド値は上昇していた。HFC食+Steroid Hormone投与群では総コレステロール値とLDL値とトリグリセライド値は更に上昇していた。いずれも電解質は正常であった。大腿骨頭の壊死の頻度はcontrol群に比べ、HFC食群、Steroid Hormone投与群、HFC食+Steroid Hormone投与群で有意ではないが高い傾向があった。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。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髄腔の脂肪細胞に着目するとcontrol群に比べSteroid Hormone投与群とHFC食群ではepiphysis, metaphysis骨髄内の脂肪細胞の増加、膨化が著しく、Steroid Hormone投与群ではepiphysisの骨髄内に脂肪細胞が広く占拠していた。HFC食+Steroid Hormone投与群では更に著しい傾向があった。Epiphysisの骨髄内の脂肪細胞に着目すると広く占拠するだけでなく、

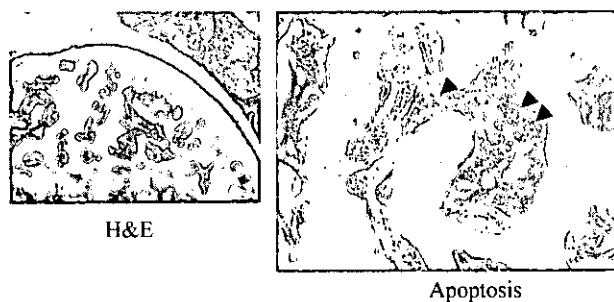
その脂肪細胞は変性した部もあり壊死への移行を示唆された。control群、HFC食群、Steroid Hormone投与群、HFC食+Steroid Hormone投与群で各骨頭のStage分布をKruskal-Wallisで検討すると $p=0.0067$ で有意差がみられた。

Apoptosisを観察してみると壊死の周辺に発現し、epiphysisのみならず大腿骨頸部にも発現がみられ、control群、Steroid Hormone投与群に比しHFC食投与群の発現に増加傾向がみられた。またEpiphysisでは

骨髄のほかにも外側関節軟骨にも発現していた(図3)。

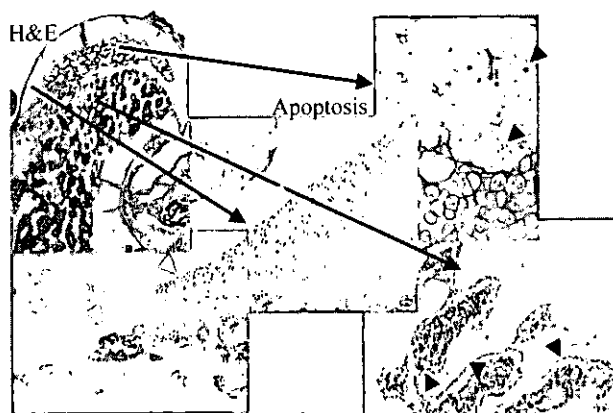
酸化stressは抗8-OHdGモノクローナル抗体と抗4-HNEモノクローナル抗体ともにcontrol群、HFC食群、Steroid Hormone投与群、Steroid Hormone投与+HFC食群の順で著しいことがうかがわれた(図4)。

またSHRSP/Izm, SHR/Izm, SHR/Crj, WKY/IzmにNOS阻害剤含有高コレステロール飼料とSteroid Hormone投与するとSHRSP/Ngsk以外では大腿骨頸部壊死の頻度は低くまた生化学反応も鈍い傾向にあった。



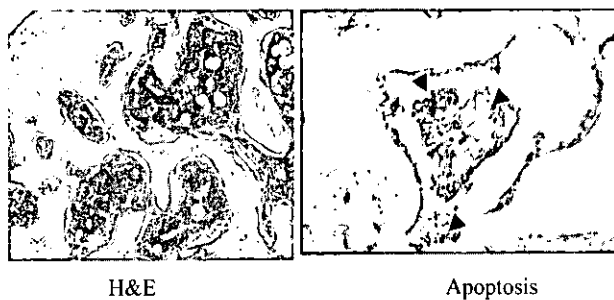
Control 群 : 壊死 (+)

図 3 (a)



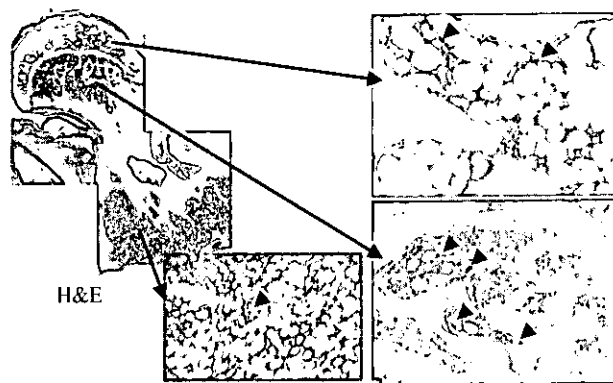
Control 群 : 壊死 (+)

図 3 (b)



control 群 : 壊死 (-) stage 4

図 3 (c)

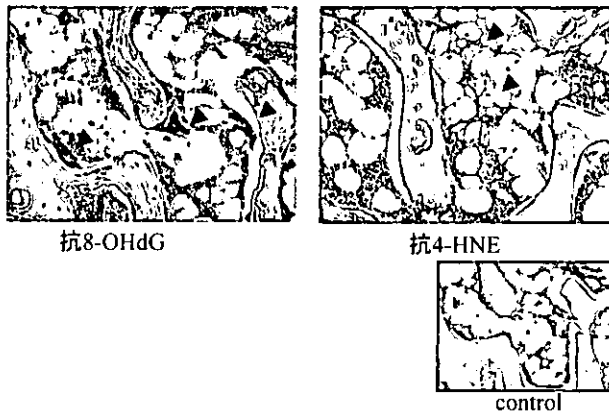


HFC 食群 : 壊死(+)

図 3 (d)

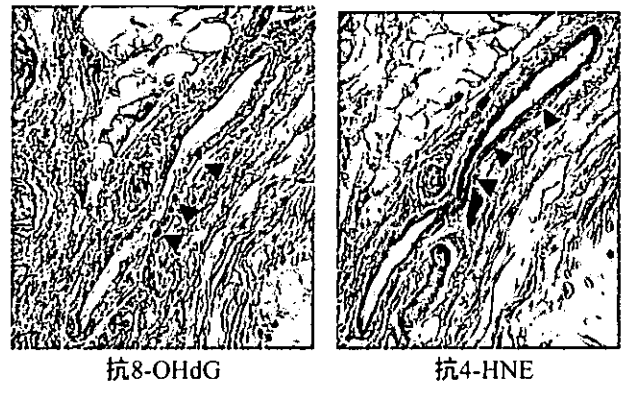
図 3. Apoptosisの所見 :

- a : control群の骨頭壊死 (+) : 壊死部に矢先のようにapoptosisが発現していた。
- b : control群の骨頭壊死 (+) : 壊死部にはなく、壊死周囲にepiphysisのみならず大腿骨頸部にもapoptosisが発現し、骨髄のほかにも外側関節軟骨にも発現していた。
- c : control群の骨頭壊死 (-) : H&E染色で脂肪変性と解釈した部位にはapoptosisが発現していた。
- d : HFC食投与群の骨頭壊死 (+) : 壊死部にはapoptosisがなく、壊死周囲にepiphysisのみならず大腿骨頸部にも発現し骨幹部に近づくほど減少していた。



HFC食 + Steroid Hormone 投与群：壊死 (-)

図 4 (a)



HFC食 + Steroid Hormone 投与群：壊死 (-)

図 4 (b)

図 4. 酸化stressの所見：

a：Steroid Hormone投与＋HFC食群（epiphysis内）

抗8-OHdGモノクローナル抗体と抗4-HNEモノクローナル抗体の陽性顆粒が矢先にみられる。

b：Steroid Hormone投与＋HFC食群

骨頭の外側の動脈に上記の2抗体の局在がみられ、酸化stressの壊死への関与が示唆される。

D. 考察

大腿骨頭の無腐性壊死のメカニズムとして血管内皮に注目してみると内皮が傷害されると血栓をつくり、また血栓が生じれば血管内皮が傷害されるという悪循環が想定される。またNOは血管内皮細胞内のNOSで産生され血管平滑筋に作用し、主に血管拡張作用を有している。故に血流障害の原因として血管内皮およびNOは無腐性壊死のメカニズムのうえで重要である。血圧上昇や血管の翦断力の変化とNOとの関係も報告されている。そこでNOS inhibitor投与でNO産生を阻害すれば大腿骨頭壊死発生に於ける血管内皮およびNOの関与が強調されるはずである。

一方酸性コレステロールの存在下でNO産生を阻害すれば高脂血症、動脈硬化を呈することも知られている。今回実験からNOS阻害薬と高コレステロール食をSHRSPに投与すると大腿骨頭壊死の頻度の増加傾向から上記の仮説のある程度の正当性が窺えた。

大腿骨頭壊死の実験モデルではブタ、犬、ニワトリ、ウサギ、ラットなどを使用し、実験方法としては、Steroid Hormoneの薬物負荷と外科的に血行遮断に大別される。ラットを使用した実験では血行遮断の報告はみられるがSteroid Hormoneの負荷の報告はない。ラットは純系で実験条件を均一化しやすく、病因の解析に適するが、高脂血症を呈しにくい。しかし今回Steroid Hormone負荷群が対照群に比較して総コレステロール値やトリグリセライド値が漸増であったが、骨頭壊死の発生頻度が総じてHFC食投与群と同様に

50%台であったことは好結果であろう。今回のSHRSP以外のstrainの結果からSHRSPは他のラットの系にはない大腿骨頭の血管系異常や代謝経路の違いなどが推定される。体重の減少即ち、異化の亢進は体重200gのラットにメチルプレドニゾン5mgを1shot投与でも過多と考えられ、更なる減量投与や投与時期複数少量投与などの検討が必要である。Steroid Hormone負荷が壊死頻度に影響を及ぼす傾向がみられたことは人体の大腿骨頭壊死と類似し興味深い。今回脂肪細胞の増生の解析ではHFC食群、Steroid Hormone投与群、HFC食＋Steroid Hormone投与群で骨頭に明らかに増加していた。HFC食群やSteroid Hormone負荷による骨頭脂肪細胞の動態は骨頭壊死の発生機序の原因もしくは助長因子となるかと思われた。Apoptosisをみると壊死の周辺に発現していて、epiphysisのみならず大腿骨頭部にも発現がみられ、control群、Steroid Hormone投与群に比しHFC食投与群の発現に増加傾向がみられた。またEpiphysisでは骨髄のほか外側関節軟骨にも発現していた。このことは、壊死は大腿骨頭全体に起こるべきところを何らかの因子によってEpiphysisに限局したことが想定され、また骨頭外側に壊死の関わりが大きいことが窺える。

酸化stressの検出には抗8-OHdGモノクローナル抗体と抗4-HNEモノクローナル抗体を使用した。抗8-OHdGモノクローナル抗体は活性酸素による酸化ストレスが亢進すると、DNA中の2'-デオキシグア

ノシンの8位が酸化されて8-OHdGが生成されることに着目したもので、抗4-HNEモノクローナル抗体は4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) が、生体脂質のうちアラキドン酸のような ω 6系高度不飽和脂肪酸が酸化ストレスをうけて生成する酸化二次生成物(アルデヒド)であり、蛋白質と比較的安定な反応物(マイケル付加体)を形成したところに高い特異性を有しており、二者を併用することにより生体側と代謝産物側からのapproachで酸化stressの検出が確実となる。酸化stressはcontrol群、HFC食群、Steroid Hormone投与群、Steroid Hormone投与+HFC食群の順に強くなることがかがわれ、生化学的な所見に合致している。骨頭の外側の動脈に上記の2抗体の局在がみられ、酸化stressの壊死への関与が示唆される。

以上のことからSHRSPの大腿骨頭のある種の特別な血流環境にHFC食やSteroid Hormone投与で高脂血症を呈すことで脂肪細胞が著しく膨張、増加し骨髓内(コンパートメント)圧が上昇し、虚血性変化が生じ始め、脂肪細胞の変性 膨化 壊死の状態ひいては骨頭壊死が生じるというR. P. Ficat等の仮説が強く指示された。

E. 結論

1. SHRSP/Nagasaki (SHR/Izm, SHR/Crj, WKY/Izm) にNOS阻害剤含有高コレステロール飼料とSteroid Hormoneを投与し、大腿骨頭壊死の動態を観察した。
2. 壊死発生頻度はcontrol群に比べ、HFC食群、Steroid Hormone投与群、Steroid Hormone+HFC食投与群で高い傾向がみられた。
3. 組織学的にはSteroid Hormone投与群とHFC食群では、骨髓内の脂肪細胞の増加が著しく、特にSteroid Hormone投与群ではepiphysisの骨髓内に脂肪細胞の変性を多数認めた。
4. 骨壊死の有無と脂肪細胞の増生、変性に注目したStage検討ではcontrol群、HFC食群、Steroid Hormone投与群で統計学的に脂肪細胞の動態に有意差がみられた。
5. Apoptosisに着目してみるとepiphysisのみならず壊死周辺の大腿骨頭部にも発現していた。脂肪細胞の変性した部に発現が増加しており、壊死への移行を示唆していた。
6. 酸化stressはSteroid Hormone投与+HFC食群で著しいことが観われた。

F. 研究発表

1. 学会発表
 - 1) 第18回日本整形外科学会基礎学術集会(平成15年10月17日(金)福岡県北九州市)村田雅和、熊谷謙治、鈴木暢彦、丹羽正美、進藤裕幸:易卒中高血圧自然発症ラットを用いた大腿骨頭壊死の研究—NOS阻害剤含有高コレステロール食とステロイドホルモン負荷の影響—
 - 2) 第39回SHR学会(平成14年6月28日(土)東京都)熊谷謙治、村田雅和、鈴木暢彦、丹羽正美、進藤裕幸:易卒中高血圧自然発症ラットを使用した大腿骨頭壊死に関する研究

ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症モデル家兎への サイクロオキシゲナーゼ阻害薬投与の影響：骨壊死予防の可能性の検討

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

我々は、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症モデル家兎から摘出した骨髄内抵抗血管が、アラキドン酸-サイクロオキシゲナーゼ（COX）カスケードを介して拡張反応を誘起してくることを報告してきた。さらに、メチルプレドニゾロン（MPSL）投与家兎にCOX阻害薬（インドメタシン、NS398）を前投与ならびに同時投与することによって、同家兎骨髄内抵抗血管のアラキドン酸誘発性拡張反応が有意に減弱出来ることが判明した。今回、メチルプレドニゾロン（MPSL）投与家兎にCOX阻害薬（インドメタシン、NS398）を前投与ならびに同時投与することによって、骨壊死予防効果があるかを検討した。その結果、MPSL投与時にCOX阻害剤（インドメタシン、NS398）を同時投与することで、有意に骨壊死発生率を抑制出来た。

A. 研究目的

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。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・薬理学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、MPSL投与家兎における摘出骨髄内抵抗血管の解析を行い、MPSL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）およびNS-398（選択的COX2阻害薬）によって抑制されることを明らかにした²⁾。さらにMPSL投与家兎にインドメタシンおよびNS-398の前投与と同時投与を行うことによって、MPSL投与家兎摘出骨髄内抵抗血管のアラキドン酸誘発性拡張反応が有意に抑制されることを報告してきた³⁾。それを踏まえて、今回MPSL単独投与骨壊死モデルにおいて、インドメタシンおよびNS-398の前投与と同時投与を行うことによって、骨壊死が予防可能かを検討した。

B. 研究方法

実験には日本白色家兎（雄、体重～3.0kg）を用い、MPSLを20 mg/kgで3日間連続筋注したMPSL単独投与群 [MPSL (+), n=10]、MPSLに加えインドメタシン10 mg/kgを投与した群 [MPSL+INDO, n=10] ならびにMPSLとNS-398 5mg/kgを投与した群 [MPSL+NS-398, n=5] を設定した（図）。MPSL投与開始後4週で家兎犠牲死して、両大腿骨のH-E標本を作製し、骨壊死を判定した。

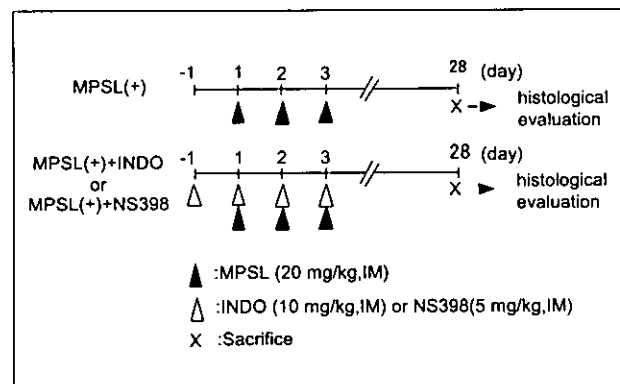


図. MPSL、INDOならびにNS-398の家兎への投与間隔・量。MPSL (▲、20mg/kg) は連続3日間筋肉内投与し、INDO (△、10mg/kg) およびNS-398 (△、5mg/kg) はMPSL投与1日前から連続4日間筋肉内投与した。1回目のMPSL投与から28日後に各群から大腿骨を摘出し組織学的評価を行った。

C. 研究結果

各群ともに骨頭以外の骨幹部及び骨幹端部に散在性に壊死巣が確認された。MPSL単独投与群での骨髓内脂肪細胞のサイズと比較して、MPSL+INDO群およびMPSL+NS-398群における骨髓内脂肪細胞のサイズは小さい傾向にあった。骨髓内毛細血管壁および毛細血管周囲の結合組織の状態は各群間に差はなかった。MPSL単独投与群の大腿骨での骨壊死発生率は15/20 (75%)であったのに対し、MPSL+INDO群で3/20 (15%) ($p<0.01$)、MPSL+NS-398群で3/10 (30%) ($p<0.05$)と有意に骨壊死発生率を抑制出来た(表)。

表

	MPSL	MPSL + INDO	MPSL + NS-398
Number of femurs/ Number of animals	20/10	20/10	10/5
Ratio of bone marrow necrosis	15/20	3/20 **	3/10*

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$

D. 考察

我々は、MPSL投与家兎から摘出した骨髓内抵抗血管において、アラキドン酸投与により拡張反応が誘起され、この拡張反応は同家兎から摘出した標本へのインドメタシンおよびNS-398処理によって完全に抑制されることを報告してきた。さらに、MPSL投与家兎へインドメタシンおよびNS-398を同時投与することによっても、MPSL投与時に発生する摘出骨髓内抵抗血管のアラキドン酸による拡張反応を有意に減弱し得ることを報告した。この結果は、MPSL投与時に家兎生体内において発生するアラキドン酸-COX-拡張性プロスタグランジン産生系亢進状態を、あらかじめインドメタシンあるいはNS398をMPSLと同時投与することである程度抑制出来ることを示している。そこで今回、MPSL投与時にあらかじめインドメタシンあるいはNS398を同時投与した場合、骨壊死発生を抑制出来るかを検討した。その結果、MPSL単独投与時に75%発生していた骨壊死をインドメタシンあるいはNS398を同時投与することで、有意に抑制することが可能であった。しかし、MPSL+INDO群、MPSL+NS398群いずれも完全に骨壊死を抑制するには到らなかった。このことは、今回実験に用いたインドメタシンおよびNS-398の投与方法によるものが考えられ、今後より効果的な

投与方法(量・間隔等)の探索が必要であると考えている。また、アラキドン酸-COXカスケード以外の関与についてもさらなる検討が必要と考えている。しかしながら、今回の結果からアラキドン酸-COX-拡張性プロスタグランジン産生系を抑制することで骨壊死を予防出来る可能性が示唆された。

我々はこれまで、独自に確立した抵抗血管灌流標本を用いて骨髓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・薬理的機能構築について検討してきた。その中で、ステロイド単独投与骨壊死モデルの大腿骨骨髓内抵抗血管において、アラキドン酸-COX-拡張性プロスタグランジン産生系亢進状態が発生することを見出した。この事実がどのようなメカニズムでステロイド誘発性骨壊死の発生に関与しているのかは定かではないが、我々は微量な浮腫形成を中心とした骨髓内微小循環環境変化がその病態ではないかとの作業仮説を建てている。しかし、詳細は不明でありさらなる研究が必要であると考えている。

E. 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、1999
- 2) 大橋俊夫ほか。ステロイド投与家兎大腿骨壊死症モデルにおける大腿骨骨髓内抵抗血管の機能解析：その総括。厚生労働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_13年度研究報告書 71-74、2002
- 3) 大橋俊夫ほか。ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症モデル家兎へのサイクロオキシゲナーゼ阻害薬投与の影響：骨髓内抵抗血管のアラキドン酸による拡張反応に対する作用。厚生労働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14年度研究報告書 2003

F. 研究発表

業績(大橋俊夫)

論文発表

- 1) Yashiro, Y., Ohhashi, T. Age-dependent changes in regulatory roles of nitric oxide and prostanoids on

mechanical activity of rabbit arterioles. *Jpn. J. Physiol.*
in press, 2003.

- 2) Momoi, H., Ikomi, F., Ohhashi, T. Estrogen-induced augmentation of endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilation in isolated rat cerebral small arteries. *Jpn. J. Physiol.* 53: 193-203, 2003.
- 3) Tsunemoto, H., Ikomi, F., Ohhashi, T. Flow-mediated release of nitric oxide from lymphatic endothelial cells of pressurized canine thoracic duct. *Jpn. J. Physiol.* 53: 157-163, 2003.
- 4) Hosaka, K., Mizuno, R., Ohhashi, T. Rho-Rho kinase pathway is involved in the regulation of myogenic tone and pump activity in isolated lymph vessels. *Am. J. Physiol.* 284: H2015-H2025, 2003.
- 5) Mizuno, R., Yokoyama, Y., Ono, N., Ikomi, F., Ohhashi, T. Establishment of rat lymphatic endothelial cell line. *Microcirculation* 10: 127-131, 2003
- 6) Kobayashi, M., Tomioka, N., Ushiyama, Y., Ohhashi, T. Arithmetic calculation, deep inspiration or hand grip exercise-mediated pre-operational active palmer sweating responses in humans. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 104: 58-65, 2003.
- 7) Yashiro, Y., Ohhashi, T. Effects of cilostazol, a selective cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor on isolated rabbit spinal arterioles. *Jpn. J. Physiol.* 52: 471-477, 2002.
- 8) Shibata, T., Ikomi, F., Ohhashi, T. Plasma-mediated potentiation in prostanoid-induced contractions in isolated canine jugular veins. *Jpn. J. Physiol.* 52: 441-448, 2002
- 9) Kazama, A., Ikomi, F., Yashiro, Y., Ohhashi, T. Development of pressurized retinal resistance-sized arteriolar preparation with special reference to acetylcholine-induced nitric oxide-mediated vasodilation. *Jpn. J. Physiol.* 52: 285-291, 2002.
- 10) Ikomi, F., Kousai, A., Ono, N., Ohhashi, T. Electrical stimulation-induced α_1 - and α_2 -adrenoceptors-mediated contractions of isolated canine lymph nodes. *Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical* 96: 85-92, 2002.

口頭発表

- 1) 堀内博志、水野理介、高岡邦夫、大橋俊夫：骨髄内抵抗血管の機能特性に対するステロイド剤の影響。第18回日本整形外科学会基礎学術集会。平成15年10月16、17日（北九州）