

グルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害に対する治療法の検討

赤池 雅史、栗飯原賢一、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)

我々はグルココルチコイド過剰による血管内皮細胞での酸化ストレス亢進ならびに一酸化窒素 (NO) のbioavailabilityの低下が血管内皮機能を障害し、大腿骨頭壊死の発症を惹起する可能性を報告してきた。本研究ではこのような血管におけるグルココルチコイド過剰作用に及ぼす薬剤の効果を検討した。グルココルチコイド投与患者ではビタミンEの投与により前腕での血管内皮機能が改善した。また、デキサメサゾン投与マウスではNOの代謝産物である亜硝酸/硝酸イオンの尿中排泄量が減少し、この減少はアスピリン投与により有意に改善した。抗酸化薬ならびにアスピリンはNO bioavailabilityの改善によりグルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害を改善することが示唆された。

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最も重要であると考えられている。我々は培養ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた検討により、グルココルチコイド過剰が血管内皮細胞において活性酸素の産生を亢進させることを見いだすとともに、グルココルチコイド過剰症患者では血管内皮での活性酸素産生亢進とそれによる一酸化窒素 (NO) の消去が亢進し、血管内皮機能が著しく低下していることを明らかにしてきた。さらに免疫組織学的検討により、ステロイド性大腿骨頭壊死症例の大腿骨細動脈では酸化ストレスが亢進していることをみいだしている。このような酸化ストレス亢進に伴うNO bioavailabilityの低下ならびに血管内皮機能障害は微小循環の破綻を引き起こし、大腿骨頭壊死の主要な発症要因である可能性があり、本症における治療ターゲットのひとつと考えられる。一般に酸化ストレスを軽減し血管内皮機能を改善する薬剤としては、ビタミンEなどの抗酸化薬の他に、アスピリン、スタチン、アンジオテンシン変換酵素阻害薬・アンジオテンシン受容体拮抗薬などが知られており、特に後者3種類の薬剤では大規模臨床試験により動脈硬化性疾患における心血管イベントの抑制効果を有することが確立している。本研究ではこれらの薬剤の中でビタミンEおよびアスピリンがグルココルチコイド過剰によるNO bioavailabilityの低下

に及ぼす効果について検討した。

B. 研究方法

1) グルココルチコイド投与患者の血管内皮機能に及ぼすビタミンEの効果

対象は自己免疫疾患のためグルココルチコイド治療を施行された3例である。症例1は20歳・男性で多発性硬化症のためプレドニゾロン50mg/day投与ならびにメチルプレドニゾロンによるパルス療法を1クール施行された。症例2は62歳・女性で慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーのためプレドニゾロン30mg/dayの投与をうけた。症例3は44歳・男性でサルコイドーシスのためプレドニゾロン30mg/dayの投与をうけた。いずれの症例もグルココルチコイド治療開始2週間後よりビタミンE 600mg/dayの投与を開始し、グルココルチコイド投与前、投与後2週、4週、6週、8週後にプレチスモグラフを用いて反応性充血による前腕血流増加反応を測定し、血管内皮機能指標とした。血流増加量は安静時の血流量を100%としそれに対する増加率で表した。

2) グルココルチコイド過剰マウスにおけるNO bioavailabilityの変化ならびにアスピリン投与による効果

C57/BL6J (オス、7週齢) の背側皮下にDexamethasone pellet (5mg, 90 days release) (Innovative Research of America, USA) を埋め込み、グルココルチコイド過剰マウスを作成した。アスピリンの投与

方法はCyrusらの報告 (Circulation 106:1282-1287, 2002) に基づき、Dexamethasone pelletの植え込み7日前から最終濃度30mg/Lで飲水中に添加した。マウスの飲水量は平均3~4ml/dayであるため、この方法の場合、体重30gのマウスではアスピリン投与量は3~4mg/kg/dayに相当する。マウスはコントロール群、デキサメサゾン投与群、デキサメサゾンおよびアスピリン投与群の3群 (各群 n=6) に分け、Dexamethasone pelletの植え込み後28日目に代謝ケージを用いて24時間尿を採取し、NO産生量の指標としてHPLC法により亜硝酸/硝酸イオン (NOx) を測定した。また、血圧、脈拍をtail cuff methodにより測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言ならびに徳島大学倫理委員会規定に基づき施行した。

C. 研究結果

1) グルココルチコイド投与患者の血管内皮機能に及ぼすビタミンEの効果 (図1)

グルココルチコイド投与により血管内皮機能は全例で低下した (症例1: 前178%、後38%、症例2: 前142%、後1.4%、症例3: 前112%、後0%)。この低下はビタミンEの投与により全例で改善したが (症例1: 184%、症例2: 89%、症例3: 52%)、症例2におけるビタミンEの効果は一過性であり、グルココルチコイド治療開始後8週間 (ビタミンE投与6週間) で、再び0.8%にまで低下した。

2) グルココルチコイド過剰マウスにおけるNO bioavailabilityの変化ならびにアスピリン投与による効果 (図2)

尿中NOx排泄量は、コントロール群 6.38 ± 1.81 nmol/hour/g, デキサメサゾン投与群 (DEX) 4.49 ± 0.45 nmol/hour/gであり、デキサメサゾン群が有意に低値であった ($p < 0.05$)。デキサメサゾンならびにアスピリンの両者を投与した群 (DEX+ASP) では 5.64 ± 0.86 nmol/hour/gであり、デキサメサゾンの単独投与群と比べ有意に高値であった ($p < 0.05$)。平均血圧および脈拍には3群間で有意な差はなかった (平均血圧: コントロール群 73 ± 5 mmHg, デキサメサゾン群 67 ± 7 mmHg, デキサメサゾン+アスピリン群 76 ± 5 mmHg, 脈拍 コントロール群 619 ± 44 mmHg, デキサメサゾン群 636 ± 53 mmHg, デキサメサゾン+アスピリン群 720 ± 39 mmHg)。体重は3群間で有意な差

はなかった (コントロール群 27 ± 1 g, デキサメサゾン群 26 ± 0.2 g, デキサメサゾン+アスピリン群 25 ± 0.3 mmHg)。

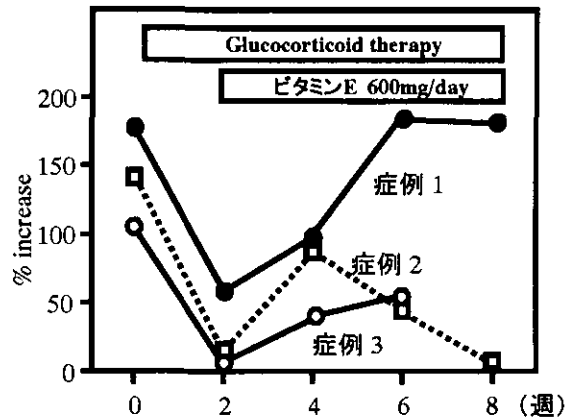


図1. 反応性充血による前腕血流増加反応の変化

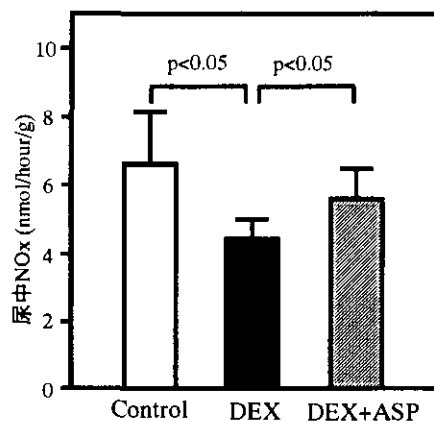


図2. デキサメサゾンおよびアスピリン投与による尿中NOx排泄量への効果

D. 考察

我々はこれまでにグルココルチコイド過剰患者の血管内皮では活性酸素産生によるNO消去が亢進し、血管内皮機能が低下していることを報告してきた。このような酸化ストレスの亢進とNO bioavailabilityの低下は大腿骨頭壊死症の重要な発症要因である可能性があり、本症における治療ならびに予防の重要なターゲットのひとつであると考えられる。昨年度はグルココルチコイド過剰による前腕血管内皮機能の低下が強力な抗酸化作用を有するビタミンCの大量単回投与により有意に改善することを報告したが、ビタミンCの作用時間はきわめて短いため、今回は抗酸化効果が持続するビタミンEの作用を検討した。現時点での症例数は少ないが、いずれの例でも血管内皮機能の改善が認められ、酸化ストレスを軽減す

ることでグルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害が改善することが示された。このことは酸化ストレスに対する治療の重要性を示唆するものではあるが、ビタミンEによる効果が長期間持続しない例が認められたなどその効果についてはさらに検討する必要がある。さらに、一般に循環器疾患領域における大規模臨床試験ではビタミンEなどによる抗酸化療法の心血管イベント抑制効果は未だ確立していない。これに対して、心血管イベントの抑制効果が確立している薬剤は、アスピリン、アンジオテンシン転換酵素阻害薬・アンジオテンシン受容体拮抗薬、スタチンなどであり、これらの薬剤に共通する作用は、血管内皮細胞に対する抗酸化作用を含めた多面的作用により血管内皮機能を改善するものである。そこで本年度の研究ではこれらのなかでも心血管イベントの抑制において最もエビデンスの確立しているアスピリンに着目し、グルココルチコイド過剰によるNO bioavailability低下に及ぼす効果を検討した。

アスピリンはシクロオキシゲナーゼ活性を阻害しトロンボキサンA₂の産生を抑制することで血小板凝集を阻害するが、他の血小板凝集阻害薬では十分な心血管イベント抑制効果がみられないことから、血小板凝集抑制作用だけでなく、血管内皮細胞に対する保護作用が重要視されている。すなわち、アスピリンは血管内皮細胞においてフェリチン合成やNOS活性を上昇することにより活性酸素による血管内皮細胞傷害を軽減することや、動脈硬化疾患患者において血管内皮機能を改善することなどが報告されている。今回の検討ではグルココルチコイド過剰マウスにおいて、アスピリンの同時投与が尿中NO_x排泄量を有意に増加させた。NO_xはNOの代謝産物であり、NOSによるNO合成と活性酸素によるNO消去の結果、実際に生体で作用するNO量すなわちNO bioavailabilityのよい指標と考えられている。すなわちアスピリンは酸化ストレス減弱もしくはNO合成増加などの作用により、グルココルチコイド過剰により低下したNO bioavailabilityを改善する作用を有していると考えられる。今後は8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)あるいは8-isoprostane (8-epiPGF_{2α})などの酸化ストレスマーカーの尿中排泄量の検討を行うとともに、大動脈組織においてルシゲニン法、DHE染色による活性酸素産生の評価や3-nitrotyrosine測定を用いた活性酸素によるNO消去の定量化などを行い、アスピリンによるNO bioavailability改善作用の機序に

ついて明らかにしていく予定である。さらに、アスピリンと同様に血管内皮細胞において酸化ストレス軽減作用、NO合成増加作用を含めた多面的作用を有し、心血管イベントの抑制効果が認められるアンジオテンシン受容体拮抗薬やスタチンについても同様の検討を行い、グルココルチコイドによるNO bioavailability低下の改善作用が最も顕著である薬剤を明らかにする予定である。このような血管内皮機能に及ぼす薬剤の影響を解析するアプローチは、大腿骨頭壊死症の治療ならびに予防法の開発において新たな切り口を提供するものであると考えられる。

E. 結論

グルココルチコイド過剰によるNO bioavailabilityの低下ならびに血管内皮機能障害は抗酸化薬やアスピリンの投与により改善することが示唆された。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 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* 92:81-87,2003
- 2) Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, Kato S, Matsumoto T. Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology* 2003, in press.
- 3) Fujimura M, Akaike M, Kato M, Takamori N, Abe M, Nishiuchi T, Azuma H, Matsumoto T. Aggressive antiplatelet therapy before coronary stent implantation in acute coronary syndrome with essential thrombocythemia--a case report-- *Angiology* 54:485-90,2003
- 4) Kido S, Inoue D, Hiura K, Javier W, Ito Y, Matsumoto T. Expression of RANK is dependent upon differentiation into the macrophage/osteoclast lineage: Induction by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and TPA in a human myelomonocytic cell line, HL60. *Bone*

32:621-9,2003

- 5) Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S, Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, Yanagisawa J, Kato S. The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. Cell 113: 905-17,2003
- 6) Takamori N, Azuma H, Kato M, Hashizume S, Akaike M, Tamura K, Matsumoto T. High plasma heparin cofactor II activity is associated with reduced incidence of in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention. Circulation, 109:481-6,2004
- 7) Tohjima E, Inoue D, Yamamoto N, Kido S, Ito Y, Kato S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Matsumoto T. Decreased AP-1 activity and interleukin-11 expression by bone marrow stromal cells may be associated with impaired bone formation in aged mice. J Bone Miner Res 18:1461-70,2003

2. 学会発表

- 1) 赤池雅史、東 博之、松本俊夫. シンポジウム「特発性大腿骨頭壊死症の分子メカニズムから治療へ」：血管内皮機能に及ぼすグルココルチコイドの作用. 第18回日本整形外科基礎学術集会、平成15年
- 2) 粟飯原賢一、東 博之、赤池雅史、藤村光則、吉田智則、橋詰俊二、加藤みどり、山口普史、池田康将、松本俊夫. ビタミンD-ビタミンD受容体システムは生体における血液凝固調節因子である。第26回日本血栓止血学会学術集会。平成15年
- 3) Ken-ichi Aihara, Nobuyuki Takamori, Yasuhiko Kanagawa, Masashi Akaike, Mitsunori Fujimura, Tomonori Yoshida, Shunji Hashizume, Midori Kato, Hiroshi Yamaguchi, Shunji Kato, Tomoko Arase, Akira Kondo, Toshio Matsumoto, Hiroyuki Azuma. Heparin Cofactor II is inversely related to the severity of carotid atherosclerosis. American Heart Association Scientific Sessions 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ステロイド誘発の特発性大腿骨頭壊死症 (ION) の発生素因についての研究 —家兎でのCYP3A6酵素活性とステロイド誘発骨壊死発生との相関—

政田 俊明、金城 養典、大橋 弘嗣、高岡 邦夫
(大阪市立大学整形外科)

家兎の肝臓でのステロイド (glucocorticoid) 代謝の主要酵素であるCYP3A6の活性 (ヒトのCYP3A4に相当) と骨壊死発生との相関を明らかにするために、CYP3A6の抑制 (itraconazole) または誘導効果を有する薬剤 (rifampicin) を家兎に投与した後、ステロイド剤を大量投与し、骨壊死の発生頻度・壊死範囲について検索した。その結果、ステロイド代謝酵素活性群では骨壊死の頻度・程度ともに低下した。一方、ステロイド代謝酵素阻害群では骨壊死の頻度・程度ともに増強した。これらの結果より、ステロイド代謝酵素活性と骨壊死の発現に関連性があることが示唆された。この実験事実からヒトでのステロイドに関連した特発性大腿骨頭壊死症 (以下ION) の発生の危険因子としてステロイド代謝能低下の可能性があることが窺われた。

A. 研究目的

IONに関する従来の疫学的研究から、ステロイド剤使用によってIONが誘発されることは知られている。またION発生はステロイド剤の総投与量ではなく、一日投与量と相関することも知られている。さらに同一量のステロイド剤を投与しても個々の患者によってION発生の有無が診られることも知られている。このような事実はステロイド剤に対する感受性に個体差があることが推定される。

個人のステロイド剤に対する感受性の差をもたらす可能性のある原因として、ステロイド代謝能の個人差に着目した。

ステロイド剤の代謝に中心的役割を果たしている酵素は肝臓のCYP3A4 (家兎ではCYP3A6) である。体内に取り込まれたグルココルチコイドは血流により標的細胞に運ばれ本来の作用を発揮するが、一部は肝臓でCYP3A4により不活性化される。ヒトCYP3A4酵素活性には個人差が大きいことが知られている (1~20倍)¹⁾。この酵素の活性が強ければステロイド剤は速やかに代謝され薬効は遷延しないが、その酵素活性が弱ければ高い血中濃度が持続し、ステロイド剤の効果が過剰となって副作用がもたらされることが想像される (図1)。IONがステロイド剤の骨循環への過剰効果の結果であると仮定すれば、

CYP3A4活性の低下がION発生の素因である可能性がある。この研究ではこの仮説に基づいて家兎モデルを用いてCYP3A6の酵素活性を薬剤によって人為的に変動させ、ステロイド剤による骨壊死発生への効果を検索した。もしCYP3A6活性と壊死発生との関連性が明らかにできれば、ステロイド剤投与にあたって、同酵素活性の測定によって個々の患者に投与すべきステロイド剤の至適量を調整することで、期待される薬効を損なうことなくIONを予防できる可能性がある。すなわち、本研究は究極的にはステロイド剤使用の適正化によってIONを予防することである。

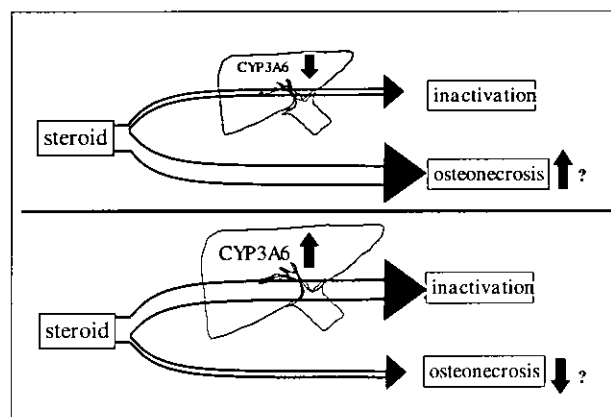


図1. CYP3A6とステロイド性骨壊死の仮説

B. 研究方法

日本白色家兎 メス（体重3.5～4.5kg）を用いてステロイド剤を投与して骨壊死動物モデルとした²⁾。このモデル動物を1. Control群（ステロイド剤単独投与群）、2. CYP3A6阻害群（Itraconazole投与+ステロイド投与群）、3. CYP3A6誘導群（Rifampicin投与+ステロイド投与群）の3群に分けた。

Control群（n=16）にはステロイド剤としてDepo-Medrol 20mg/kgを右殿筋内に1回筋注投与した。CYP3A6阻害群（n=6）にはItraconazole 100mg/kgを3週間経口投与し、その後Depo-Medrol 20mg/kgを右殿筋内に1回筋注投与した。CYP3A6誘導群（n=7）にはRifampicin 100mg/kgを3回腹腔内投与し、3週間後にDepo-Medrol 20mg/kgを右殿筋内に1回筋注投与した。各群とも3週間経過観察した後、犠牲死させ両大腿骨のH-E標本を作製した（図2）。その病理組織学的観察を行い、骨壊死の有無と壊死巣の大きさに関して検索した。

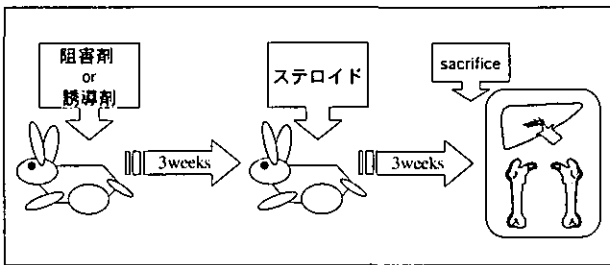


図2. モデル作製

組織評価法は山本らの骨壊死の定義に従い、骨壊死は骨髄の造血細胞壊死および脂肪細胞壊死を伴うもの。骨梁の骨細胞がempty lacunaeまたはpycnotic nuclei of osteocyteを呈するものとした。

壊死の範囲は、定量的評価をするために家兎の壊死好発部位である大腿骨近位1/3のmetaphysis同一レベル横断組織標本を作成し、横断総面積あたりの壊死面積（%）を評価した。骨壊死の頻度は、壊死の定義を満たすものを骨壊死と判定し頻度を検討した。

またCYP3A6 誘導または阻害薬投与前と投与後3週間目の肝臓3gを液化窒素にて凍結保存しミクロソームを調製して、それぞれの肝臓組織でCYP3A6活性を測定し³⁾、各群の投薬前後のCYP3A6の値を比較し、CYP3A6が誘導または阻害されていることを確認した。

C. 研究結果

骨壊死の範囲：

家兎の壊死好発部位である大腿骨近位1/3の同一レ

ベル組織横断面標本を作製し病理組織学的に評価した（図3）。各群の%骨壊死面積ではControl群は13.6±4.7%、CYP3A6阻害群は48.0±26.4%、CYP3A6誘導群は2.3±4.0%であった。Control群とCYP3A6阻害群、CYP3A6阻害群とCYP3A6誘導群との間で有意差（P<0.05）を認めた（図4）。

骨壊死発生率：

Control群は75%（12/16）、CYP3A6阻害群は100%（6/6）、CYP3A6誘導群は28.6%（2/7）であった。CYP3A6阻害群とCYP3A6誘導群との間で有意差（P<0.05）を認めた（表1）。

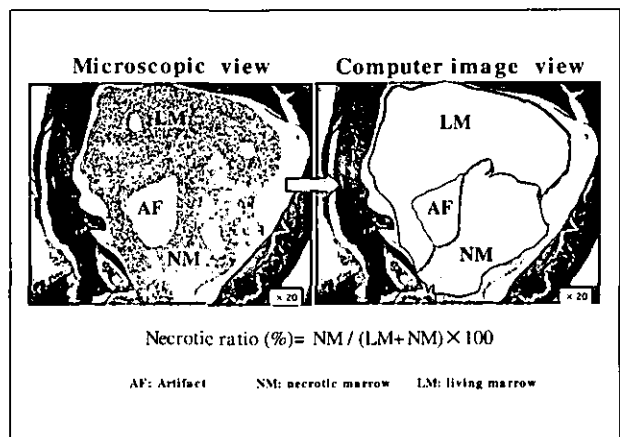


図3. 壊死横断面積計測

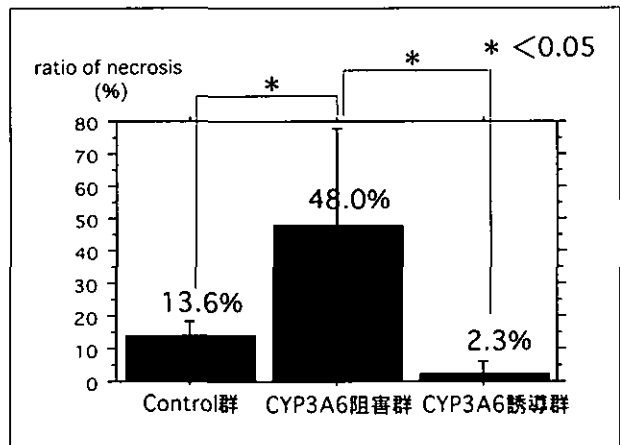


図4. CYP3A6の阻害、誘導と%壊死面積

	ION発症		計	壊死頻度
	(+)	(-)		
Control群	12	4	16	75%
CYP3A6阻害群	6	0	6	100%
CYP3A6誘導群	2	5	7	28.6%*

表1. CYP3A6の阻害、誘導と%壊死発生頻度（%） *P<0.05

CYP3A6酵素活性：

CYP3A6阻害または誘導薬投与前後のCYP3A6酵素活性の比は、CYP3A6阻害群では0.83倍、CYP3A6誘導群では1.2倍であった（図5）。

これらの事実は、ステロイド剤投与時のCYP3A6活性が骨壊死発生と相関していることを示唆している。

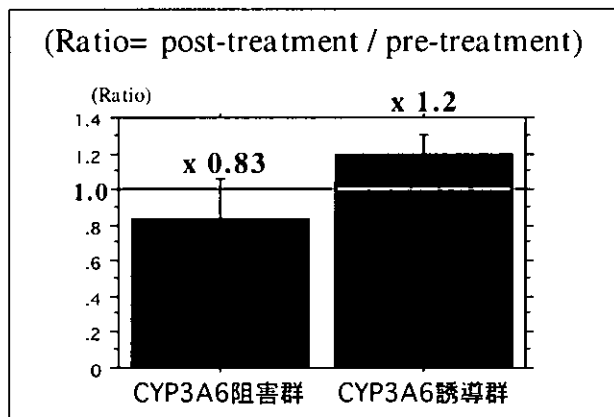


図5. ItraconazoleおよびRifampicinによるCYP3A6酵素活性の変化

D. 考察

ステロイド剤とIONとの関連に関する研究は古くから国内外問わず臨床研究、基礎研究ともに進められており、その因果関係が指摘されている。しかし、IONの発生機序については明らかにされていない。IONが骨の微小循環に影響して阻血性壊死を起こすと一般に考えられている。しかし、ステロイド剤がどのような機序で骨循環を障害するのかについては定説がなく、ステロイド剤による高脂血症に由来する脂肪塞栓や血液凝固能亢進、骨髄内脂肪増生による骨髄圧上昇による微小循環障害、血管内皮細胞障害や内皮依存性血管運動障害などが提唱されてきた。いずれにしても、そのようなステロイド剤の効果が過剰となれば骨壊死のリスクが高くなることが推察できる。長期にステロイド剤を投与したときのION発生は総投与量よりも一日投与量に関連があることから過剰なステロイド剤の効果がION発生に関与していることが窺われる。しかし多量の一日投与量であってもそれらの患者すべてにIONが発生するわけではないことも明らかである。すなわち、ION発生の素因はステロイド剤に対する反応性にかなりの個体差があることも窺われる。従来からステロイド剤に対する反応性の個体差は、薬物代謝酵素、薬物受容体、薬物輸送蛋白などの活性の個人差が関与し

ていると考えられてきた。今回我々は家兎におけるステロイド代謝酵素であるCYP3A6の活性変動とステロイドに誘発される骨壊死罹患傾向との関連性に着目した。

ヒトでのステロイド剤を含む薬物代謝の中心的酵素は、肝臓のミクロソーム分画中（主に小胞体膜）に存在するCYP3A4酵素であり、多くの薬物を水酸化している⁴⁾。これらの酵素活性には個人差があり、代謝能が異なることが示されている。この代謝能の差によって薬物効果の個人差が生ずるとされる。

本実験では、CYP3A6活性の変化を同酵素の阻害剤と誘導剤によって人為的に起こし、ステロイド剤に誘発される骨壊死発生への効果を観察した。CYP3A4酵素を阻害する代表的薬剤は、抗真菌剤のItraconazoleと抗生剤のErythromycinである。これらの作用機序は、Itraconazoleのアゾール基がCYP3A4の第6配位座に配位することによって酵素活性が阻害される。また、Erythromycinの代謝産物（ニトロアルカン）がCYP3A4の第6配位座の部分で不可逆的に複合体を形成することによってCYP3A4の活性を消失させる。これらによって、CYP3A4が新しく生成するまでの数日間、代謝阻害が持続することになる。

CYP3A4酵素を誘導する代表的薬剤は、抗結核剤のRifampicinである。その作用機序は、Rifampicinは消化管におけるCYP3A4の含量を増加させることによってステロイド剤のbioavailabilityを低下させるとともに、核内のオーファンレセプターであるプレグナンX-レセプター（PXR）が活性化されCYP3A4遺伝子の転写が亢進するためである⁵⁾。

このCYP3A4酵素阻害、または誘導によって、あらかじめCYP3A6酵素活性を変動させた家兎にステロイド剤を大量投与した。本実験の予備実験ではメチルプレドニゾン（Depo-medrol）20mg/kg 1回殿筋内筋注で80%の頻度で安定して骨壊死を誘発できることを確認した。

家兎におけるItraconazoleまたはRifampicin投与とCYP3A6活性の定量的関係についての報告は少なかつたため、肝ミクロソームを調整してItraconazoleまたはRifampicin投与前後のCYP3A6酵素活性を定量化し、CYP3A6酵素活性が阻害または誘導されていることを確認した。

CYP3A6誘導剤をステロイド剤投与前に投与することにより、骨壊死発現頻度は28.6%に減少し、壊死面積も有意に縮小した。従って、ステロイド性骨

壊死の発現頻度はCYP3A6活性に依存すると考えられた(図6)。従来の動物実験で抗高脂血症剤の投薬により家兎ステロイド性骨壊死の発生頻度が低下するとの報告があるが⁶⁾、この抗高脂血症剤がCYP3A6の誘導に作用している可能性もあるために同様の家兎ステロイド骨壊死モデルを使用して現在検討をしている。

CYP3A4活性低下がステロイドによるION発生の主要な危険因子であることが明らかになれば個々の患者でのCYP3A4活性を測定することによって、ステロイド剤投与が必要な患者へのステロイド剤の投与量を調整することで、ステロイド剤に期待する治療効果を損なうことなくIONの発生を防止することが可能かもしれない。今後はION患者でのCYP3A4活性の測定による検索が必要であろう。しかしCYP3A4活性の測定は必ずしも容易ではない。しかし、ステロイド剤の血中からの消退曲線、尿中への代謝産物の排泄量測定などの間接的な測定やCYP3A4遺伝子発現と平行するとされる白血球でのCYP3A4発現の測定などが可能性の高い方法であろう。

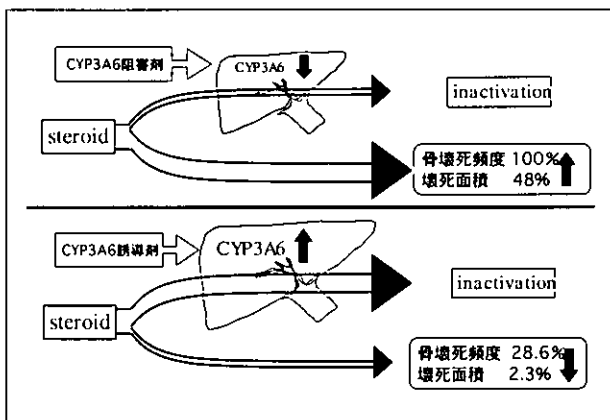


図6. CYP3A6の阻害、誘導と骨壊死発生との関係

E. 結論

CYP3A6は、Itraconazole、Rifampicinで阻害および誘導されることを確認した。CYP3A6阻害モデルの骨壊死面積は、他群より有意に増加した。CYP3A6誘導モデルの骨壊死面積は2.3%とわずかであり、骨壊死頻度は28.6%に低下した。ヒトではCYP3A4活性の測定とその測定値を基にしたステロイド投与量の調節により、IONの発生を予防できる可能性が示唆された。

ステロイド剤の主な代謝酵素であるCYP3A4 に関

して大腿骨頭壊死症との関連を見た研究はこれまで報告がなく、これらの研究によりステロイドの治療効果を考慮しながら大腿骨頭壊死症という副作用の発現を低減させる個別のステロイド剤投与量設定による治療法、いわゆるtailor-made medicineに準じた治療によってION予防の可能性を追求したい。

F. 学会発表

Association of CYP3A6 Level with Incidence and Extent of Steroid Induced Osteonecrosis in Rabbit: Masada T, Ohashi H, Kaneshiro Y, Takaoka K, 2003 Association Research Circulation Osseous.

G. 参考文献

- 1) Michel Eichelbaum, Oliver Burk: CYP3A genetics in drug metabolism. NATURE MEDICINE. 7(3): 285-87, 2001.
- 2) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K: Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissue: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum. 40 (11): 2055-64. 1997 Nov.
- 3) Maurice E. Veronese, Michael E. McManus, Pisamai Laupattarakasem, John O. Miners and Donald J. Birkett : Tolbutamide hydroxylation by human, rabbit and rat liver microsomes and by purified forms of cytochrome P-450. Drug Metabolism and disposition. 18(3) : 356-61. 1990.
- 4) 杉山正康, 神谷大雄: 薬の相互作用としくみ: 73-136, 1997.
- 5) 澤田康文: チトクロームP450 3A4による代謝変化. 薬局 Vol.52, No.12 : 2675-86, 2001.
- 6) Cui Q, Wang G J, Su C C, et al : Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. Clin Orthop 344 : 8-19, 1997.

特発性大腿骨頭壊死症の発生要因 大腿骨頭壊死症の発生とCYP3A4 activityの相関に関する研究

高岡 邦夫、金城 養典、大橋 弘嗣、政田 俊明
(大阪市立大学大学院整形外科)
小田 裕 (大阪市立大学大学院麻酔・集中治療医学)

グルココルチコイド剤は肝臓で主に薬物代謝酵素であるCYP3A4により代謝され、残りが標的細胞に至る。このCYP3A4活性は個人差が大きいことも知られている。この酵素活性低下はステロイド剤の過度の効果をもたらす可能性があり、ステロイド投与に関連する特発性大腿骨頭壊死症の発症の素因となっている可能性がある。この仮説の基に大腿骨頭壊死症発症患者のCYP3A4活性及び発現量をmidazolam clearance, real-time RT-PCR法を用いて測定を試みた。その結果、ステロイド性大腿骨頭壊死症患者群のmidazolam clearanceは 6.6 ± 1.3 mg/kg/minで、健常人対照群の 12.2 ± 2.8 mg/kg/minに比べ統計学的に ($P=0.0023$) 有意に低下していた。したがってステロイド剤投与に際してCYP3A4活性が測定できれば、ステロイド剤の投与量の調整によって予防できる可能性があると考えた。その測定を非侵襲的に行うためにヒト末梢血リンパ球よりreal-time RT-PCR法にてCYP3A4 mRNAの発現量の定量系を確立し、簡便なCYP3A4活性の測定として使用出来るか検討中である。

A. 研究目的

大腿骨頭壊死症 (IONF) は青壮年期に好発し、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。本疾患の病因は必ずしも明らかではないが、ステロイド投与歴との関連が示唆されている。しかし、ステロイド治療を受けた症例すべてに本症が発症するわけではない。この事実は特発性大腿骨頭壊死発症の素因の存在を強く示唆している。そこで我々はステロイド代謝の個体差がIONFの発生と関連があるのではと考えた。

鎮静剤であるmidazolamは体内でglucocorticoidと同様に、肝臓のCYP3A4のみによって1'-OH midazolamに代謝され、CYP3A4活性の指標となる¹⁾。そこでこのmidazolamを用いてIONF患者のCYP3A4活性をIONFのない患者と比較した。

また、CYP3A4発現低下のある個体をスクリーニングために低侵襲な方法で個体のCYP3A4活性を測定することも試みている。近年、肝臓中に発現するCYP3A4 mRNAと末梢血リンパ球中に発現するCYP3A4 mRNAの誘導性に相関性があるとの報告²⁾ や末梢血リンパ球中のCYP3A4 mRNAの定量系についての報

告があり³⁾、これらを参考にして末梢血リンパ球中CYP3A4 mRNA発現量の測定系の確立によってCYP3A4発現低下のある個体でのステロイド剤投与量の減量により本症の発生を防止する可能性についても研究している。

B. 研究方法

1) 大腿骨頭壊死症の発生と個体間のCYP3A4活性差との相関についての研究

〈対象〉

対象は、手術を受けたIONF患者11例 (ステロイド性6例、アルコール性 5例)、対照患者としてOA患者4例、骨折患者2例である (表1)。

表1

Group	age	sex
Steroid 性 ION	36.3 ± 6.7 歳	M : 4 例
		F : 2 例
Alcohol 性 ION	39.8 ± 14.2 歳	M : 5 例
Control	43.3 ± 19.7 歳	M : 2 例
		F : 4 例

〈方法〉

手術麻酔導入を、midazolam 0.25mg/kgによって行い、その後経時的に動脈ラインより採血を行った(5,10,15,20,30,45,60,90,120,180,240,360分。1回2.5cc)。採血後、2時間以内に遠心分離(15000rpm×2分)し、上清液を-80℃にて保存。後日、その上清液から血中midazolam濃度、および1'-OH midazolam濃度をHPLC法によって定量した。得られた測定値より血中濃度変化曲線を作成し血中濃度曲線下面積(AUC)、clearance(CL)を算出した。

* CL=Dose/AUC

2) 末梢血リンパ球中のCYP3A4mRNAの発現量の微量定量系の確立

健康人サンプルのヒト末梢血リンパ球中のtotal RNAを抽出し、逆転写反応によってcDNAを作成した。このcDNAを用いてreal-time PCR法によりCYP3A4 mRNA発現量の定量を試みた。

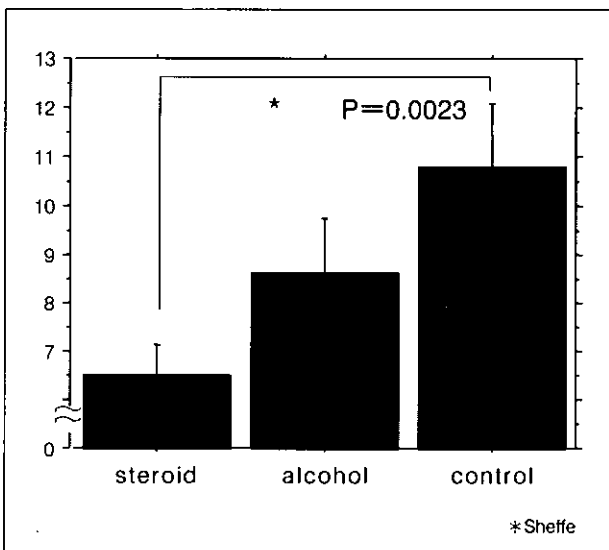
(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては大阪市立大学医学部倫理委員会の承認を受け、指針に沿って行った。

C. 研究結果

1) 大腿骨頭壊死症発生とCYP3A4活性の相関

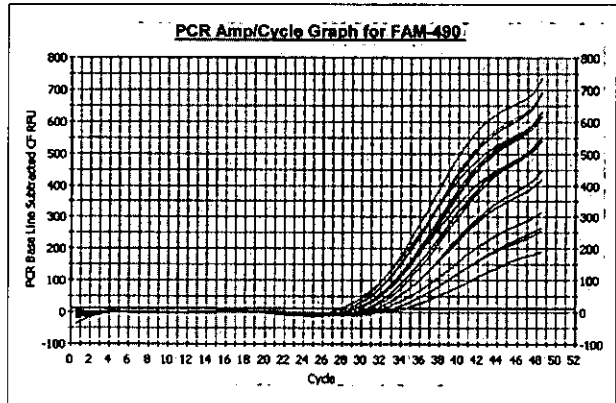
ステロイド性IONF患者群のmidazolam clearanceは 6.5 ± 1.3 mg/kg/min、アルコール性IONF患者群は 8.8 ± 2.3 mg/kg/min、対照患者は 12.1 ± 2.8 mg/kg/minであり、ステロイド性IONF患者では対照患者に比べ、統計学的有意差(P=0.0023/Sheffe)をもってmidazolam clearanceが低下していた(グラフ1)。



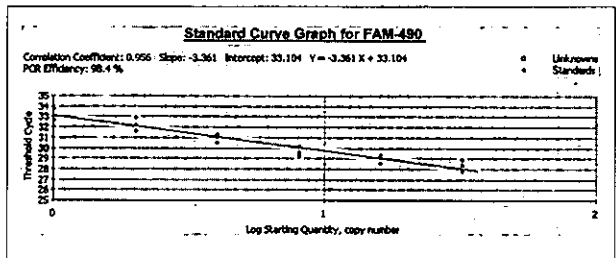
グラフ1

2) 末梢血リンパ球中のCYP3A4mRNA発現量の微量測定

末梢血リンパ球中のCYP3A4mRNA発現量を、real-time PCR法によって定量を試みた。その結果、相関係数0.956、PCR効率98.4%と良好な定量系を確立した(グラフ2,3)。今後はこの発現量とmidazolam clearance値との相関、さらに特発性大腿骨頭壊死発生との相関について検索を進める予定である。



グラフ2



グラフ3

D. 考察

midazolam clearanceを用いた研究結果より、ステロイド性IONF患者ではCYP3A4活性が一般人よりも低値であったことから、この患者群ではステロイド剤が過剰に作用をしたことが窺われる。今後はステロイド剤投与前のCYP3A4活性と特発性大腿骨頭壊死症発生との相関をprospectiveに検討すべきと考えている。

この研究は今後も続行する予定であるが、現時点ではステロイド性骨頭壊死症例数が5例と少ない為、今後さらに症例数を増やし検証する余地はある。しかし、少ない症例数にもかかわらずCYP3A4活性が有意に低い結果が得られ、これらの結果から、CYP3A4活性が低い患者(poor metabolizer)では、体内に必要以上にステロイドが蓄積する傾向にあり、

結果として過剰なステロイドの薬理効果をもたらし、ステロイド性IONF発症のriskが高い可能性がある。

CYP3A4活性の低下がステロイド性IONFの発症の1つの原因であるとするれば、できるだけ簡便かつ低侵襲な方法で個々の患者でのCYP3A4活性を把握することによって、投与ステロイド量を調整することでIONF発症が予防できるかもしれない。

患者のCYP3A4活性をステロイド剤投与時に把握する方法としては、midazaoram clearance法は実際的ではない。直接肝組織よりassayする方法、erythromycin breath testなども、検査に伴う侵襲の大きさや、薬物投与に伴う問題がある。低侵襲的にCYP3A4活性を把握する新しい非侵襲的方法が必要であろう。その一つとして、末梢血リンパ球中のCYP3A4 mRNA発現量の測定系を確立した。今後、この測定系が実際にCYP3A4活性の把握の代替法として使用できるか検討していく予定である。

D. まとめ

1. midazaoram clearance法によって、ステロイド性大腿骨頭壊死症患者群の肝臓CYP3A4活性レベルは非壊死症群に比して有意に低値であることを認めた。CYP3A4活性低下によるステロイド剤の過剰効果がIONF発生と関連があることが示唆された。

2. 肝臓でのCYP3A4活性を推定する低侵襲な方法で測定する方法として、末梢血リンパ球からのCYP3A4mRNA発現量の定量系を確立した。この方法によって過剰なステロイド剤の薬理作用を防ぎ、IONFの防止が可能か否かが今後の課題である。

E. 文献

- 1) Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe; I: in vivo-in vivo correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:549-56
- 2) Nakamoto T, Hase I, Imaoka S, Hiroi T, Oda Y, Asada A and Funae Y. Quantitative RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes: Induction of CYP3A4 in lymphocytes and in liver by rifampicin. *Pharmacogenetics* 2000;10:571-575
- 3) Isabella Nowakowski-Gashaw, Przemyslaw M. Mrozikiewicz, Ivar Roots, and Jurgen Brockmoller. Rapid Quantification of CYP3A4 Expression in Human

ステロイド性骨壊死モデルにおけるチアゾリジン誘導体の及ぼす影響

本村悟朗、山本卓明、宮西圭太
神宮司誠也、岩本幸英（九州大学整形外科）

チアゾリジン誘導体（以下TZD誘導体）がステロイド大量投与家兎の骨髓脂肪細胞径に及ぼす影響を検討した。本実験においては、TZD誘導体はステロイド大量による骨髓脂肪細胞径の増大を抑制しなかった。

A. 研究目的

チアゾリジン誘導体（以下TZD誘導体）は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を促進する薬剤であり、肥大した脂肪細胞をアポトーシスによって減少させることが報告されている¹⁾。Okunoらは、肥満ratの後腹膜脂肪組織において、TZD投与により肥大した脂肪細胞が著明に減少し、脂肪細胞数は増加するが全体として脂肪細胞のサイズが小型化することを報告している¹⁾。

一方ステロイド性骨壊死においては、その病因の一つに骨髓脂肪細胞径の増大の関与が提唱されている^{2,3)}。

そこで本研究では、TZD誘導体をステロイド大量投与家兎⁴⁾に短期間投与することにより、1. 骨髓脂肪細胞径、2. 骨壊死発生、に影響を及ぼすか検討した。

B. 研究方法

TZD誘導体として、現在日本で唯一臨床使用されているピオグリタゾンを選択した。今回対象としたのは、28週齢以上の雄家兎38羽である。ステロイド投与に加えピオグリタゾンを投与した群18羽、ピオグリタゾンは投与せずステロイド投与のみの群15羽、ステロイド投与なし群5羽である。

ステロイド投与群には、メチルプレドニゾン 20mg/kgを一回筋中した。ピオグリタゾンは、メチルプレドニゾン投与前1週より投与後2週までの3週間、3mg/kgを、毎日経口投与した。

調査項目は、骨髓脂肪細胞径、骨壊死発生の有無で、骨髓脂肪細胞径は、1羽あたり100の骨髓脂肪細胞径を測定し、その平均値とした。骨壊死の有無は、病理組織学的定義に基づき判定した。

C. 研究結果

骨髓脂肪細胞径は、ステロイド投与なし群では、36.4mmであったのに対し、ステロイド投与ありの2群では、ピオグリタゾン非投与群が63.7mm、ピオグリタゾン投与群が59.3mmと著明に増大していた。ピオグリタゾン投与のありなしでは、統計学的有意差は認めなかった（Fig. 1）。

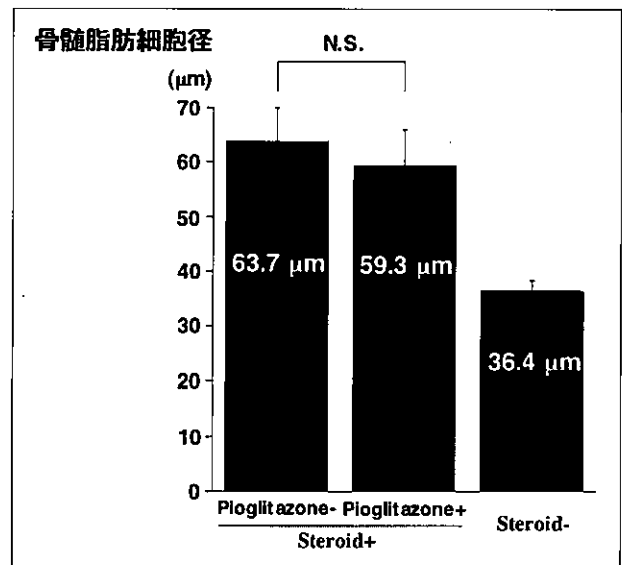


Fig. 1

骨壊死発生は、ピオグリタゾン非投与群で15羽中11羽に、ピオグリタゾン投与群で18羽中14羽に認め、発生率に有意差を認めなかった（Fig. 2）。

ピオグリタゾン投与群における骨壊死は、ピオグリタゾン非投与群のものと同様の所見も、病理組織学的所見も同様であった。

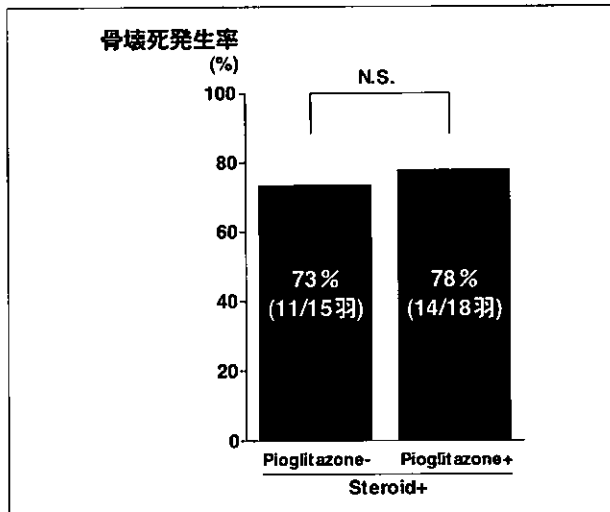


Fig. 2

D. 考察

TZD誘導体は骨髄においては、未分化細胞から脂肪細胞へと分化誘導することが報告されているが⁵⁾、骨髄脂肪細胞のサイズに関する報告は渉猟した限りなかった。

ピオグリタゾンとステロイドに関する報告では、骨髄において、ピオグリタゾンは未分化細胞を脂肪細胞へと分化誘導するが、glucocorticoidの存在下では、さらに強く脂肪細胞へと分化誘導することが報告されている⁵⁾。またMoritaらは、ピオグリタゾンはデキサメタゾンの薬物動態には影響しないと報告している⁶⁾。これらの報告と本実験を考慮すると、ピオグリタゾンは骨髄においては、ステロイドの作用と協調することはあっても、拮抗することはないと考えられた。

E. 結論

ピオグリタゾンは、ステロイド大量による骨髄脂肪細胞径の増大を抑制しなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第18回日本整形外科基礎学術集会 (2003.10.16-17 北九州)

プロブコールおよびワーファリン併用投与によるステロイド性骨壊死予防実験

本村悟朗、山本卓明、宮西圭太

神宮司誠也、岩本幸英

第30回日本股関節学会 (2003.10.30-31 東京)

急速破壊型股関節症における対側股関節の検討

本村悟朗、山本卓明、神宮司誠也

首藤敏秀、中島康晴、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) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.* 1998;101:1354-61.
- 2) 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.* 2002;30:185-90.
- 3) Wang GJ, Sweet DE, Reger SI, Thompson RC. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1977;59:729-35.
- 4) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1997;40:2055-64.
- 5) Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Klierer SA, Lehmann JM, Morris DC. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol.* 1996;50:1087-94.
- 6) Morita H, Oki Y, Ito T, Ohishi H, Suzuki S, Nakamura H. Administration of troglitazone, but not pioglitazone, reduces insulin resistance caused by short-term dexamethasone (DXM) treatment by accelerating the metabolism of DXM. *Diabetes Care.* 2001;24:788-9.

ステロイド性骨壊死モデルにおける骨壊死発生risk factorの解析

本村 悟朗、山本 卓明、宮西 圭太、
 神宮司誠也、岩本 幸英（九州大学整形外科）
 近藤 亨子、廣田 良夫
 （大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学）

日本白色雄家兎64羽のうち、骨壊死発生群（21羽）と非発生群（43羽）を比較した。Logistic regression modelを用いて多変量解析を行った結果、ステロイド投与直前のトリグリセリド（中性脂肪）で有意差を示す量反応関係を認めた。

A. 研究目的

ステロイド大量投与家兎における骨壊死発生risk factorを統計学的に解析する。

B. 研究方法

〈Study design〉

日本白色雄家兎64羽のうち、骨壊死発生群（21羽）と非発生群（43羽）を比較した。内訳は、メチルプレドニゾン20mg/dlを右臀筋に一回のみ筋注するステロイド性骨壊死モデルIに、抗凝固剤であるワーファリン1.5mg/kg/dayと抗高脂血症剤であるプロブコール300mg/kg/dayを予防的に投与した群21羽（骨壊死発生:1羽、非発生:20羽）、ステロイド性骨壊死モデルIIにプロブコールのみを予防的に投与した群19羽（骨壊死発生:6羽、非発生:13羽）、ステロイド性骨壊死モデルIIIにワーファリンのみを予防的に投与した群9羽（骨壊死発生:3羽、非発生:6羽）、ステロイド性骨壊死モデルIVに予防薬投与のない群15羽（骨壊死発生:11羽、非発生:4羽）である。

〈解析項目〉

総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、トリグリセリド（中性脂肪）、遊離脂肪酸、カイロミクロン、血小板、プロトロンビン時間（PT-INR）について解析した。これらはすべて、ステロイド投与直前の採血データを使用した。

〈解析方法〉

1. 検査項目は骨壊死非発生群（43羽）の三分位をカットオフ値として3レベルに分割した。

2. Logistic regression modelにより、odds ratio (OR)と95%信頼区間（95% CI）を計算した。

C. 研究結果

〈単変量解析〉

単変量解析においては、ステロイド投与直前のトリグリセリド高値（OR=7, 26.0+ vs. < 19.0 mg/dl）、及びPT-INR低値（OR=4.33, < 0.238 vs. 0.833+）が骨壊死のリスク上昇と、カイロミクロン高値（OR=0.07, 31.0+ vs. <16.0）がリスク低下と関連を示した。量反応関係も有意であった（Table 1）。

Table 1. Logistic解析結果（1）

Serological Factor	Category	ON onset (%)	crude OR (95% CI)	trend P
Total Cholesterol (mg/dl)	<18 18.0 - 19.9 20.0+	8/20 (40) 3/18 (19) 10/28 (36)	1 0.35 (0.07-1.82) 0.83 (0.28-2.72)	0.85
HDL Cholesterol (mg/dl)	<14 14.0 - 16.9 17.0+	10/25 (40) 3/15 (20) 7/23 (30)	1 0.38 (0.09-1.68) 0.68 (0.20-2.17)	0.464
LDL Cholesterol (mg/dl)	<3 3.0 - 3.9 4.0+	4/17 (24) 9/18 (50) 8/28 (28)	1 3.25 (0.76-13.89) 1.24 (0.31-4.85)	0.984
Triglyceride (mg/dl)	<19 19.0 - 25.9 26.0+	2/17 (12) 4/17 (24) 14/29 (48)	1 2.31 (0.38-14.72) 7 (1.35-38.28)	0.012
Free Fatty Acid (mEq/l)	<0.2 0.20 - 0.29 0.30+	7/14 (50) 9/32 (28) 5/18 (28)	1 0.39 (0.11-1.44) 0.39 (0.09-1.67)	0.215
Chyromicron (mg/dl)	<18 18.0 - 30.9 31.0+	14/28 (50) 6/20 (30) 1/16 (6)	1 0.43 (0.13-1.44) 0.07 (0.01-0.58)	0.005
Platelet (x 10 ⁴ /μl)	<27.1 27.10 - 32.9 33.0+	11/24 (46) 3/18 (17) 6/20 (30)	1 0.24 (0.05-1.04) 0.51 (0.15-1.77)	0.234
PT-INR	0.833+ 0.238 - 0.832 <0.238	3/18 (17) 5/18 (28) 13/28 (46)	1 1.92 (0.38-9.85) 4.33 (1.02-18.38)	0.037

〈多変量解析〉

単変量解析で骨壊死のリスクと有意な関連を示した項目と遊離脂肪酸を同時に考慮した多変量解析では、トリグリセリド（OR=7.61）とカイロミクロン（O-

R=0.06)で有意なORと量反応関係を認めた(Table 2)。

さらにプロブコールとワーファリンを加えた多変量解析では、プロブコール (OR=0.1) で有意なORの低下、トリグリセリドとカイロミクロンで有意差または境界域の有意差を示す量反応関係を認めた。

Table 2. Logistic解析結果 (2)

	adj OR (95% CI)	trend P	adj OR (95% CI)	trend P
Triglyceride (mg/dl)				
< 16	1		1	
16.0 - 19.9	2.67 (0.31-22.63)	0.026	2.08 (0.15-28.60)	0.040
20.0+	7.61 (1.12-51.44)		6.68 (0.85-88.78)	
Chyromicron (mg/dl)				
< 16	1		1	
16.0 - 30.9	0.42 (0.08-2.14)	0.034	0.29 (0.04-2.16)	0.060
31.0+	0.06 (0.00-0.82)		0.03 (0.00-1.15)	
Free Fatty Acid (mEq/l)				
< 0.2	1		1	
0.20 - 0.29	0.28 (0.05-1.53)	0.551	0.49 (0.08-3.19)	0.553
0.30+	0.53 (0.09-3.26)		1.82 (0.22-15.35)	
PT-INR				
0.833+	1		1	
0.238 - 0.832	1.93 (0.27-14.04)	0.824	0.94 (0.08-14.38)	0.564
< 0.238	0.93 (0.12-7.02)		0.34 (0.01-12.97)	
Probucof				
			0.1 (0.02-0.54)	
Warfarin				
			0.45 (0.02-13.03)	

D. 考察

これまでのところ、ステロイド投与に伴う脂質代謝異常がステロイド性骨壊死発生の一因ではないかと考えられている¹⁻⁵⁾。今回得られた結果は、このような脂質代謝異常を来しやすい素因を示唆している可能性があると思われた。

E. 結論

ステロイド大量投与家兎において、多変量解析の結果、ステロイド投与直前のトリグリセリド (中性脂肪) で有意差を示す量反応関係を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第18回日本整形外科基礎学術集会 (2003.10.16-17 北九州)

プロブコールおよびワーファリン併用投与によるステロイド性骨壊死予防実験

本村悟朗、山本卓明、宮西圭太、神宮司誠也
岩本幸英

第30回日本股関節学会 (2003.10.30-31 東京)

急速破壊型股関節症における対側股関節の検討

本村悟朗、山本卓明、神宮司誠也、首藤敏秀

¹⁾中島康晴、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) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1997;40:2055-64.
- 2) Wang GJ, Sweet DE, Reger SI, Thompson RC. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1977;59:729-35.
- 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.* 2002;30:185-90.
- 4) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Noguchi Y, Sugioka Y, Iwamoto Y. Increased level of apolipoprotein B/apolipoprotein A1 ratio as a potential risk for osteonecrosis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:514-6.
- 5) Pritchett JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop* 2001;386:173-8.

大腿骨頭壊死モデル作製の試み 培養骨細胞におけるsteroid投与の影響に関する検討

辻 宗啓、松野 丈夫、伊藤 浩、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)

これまで我々は骨頭壊死の際に骨を構成する細胞がどのような経過で死に至るかについて着目し検討してきた。病理組織学的検討ではosteocyteは阻血後96~108時間でviableな細胞の数が減少し始め、2週間後には完全な壊死となっていた。培養骨細胞であるMLO-Y4を用い 10^{-2} Mのdexamethasoneを投与した培養液で24時間培養したのちに増殖能を検討したところ、投与により用量依存性に細胞増殖能が低下した。また、抗ssDNA抗体による染色にてapoptosis陽性細胞が確認された。これまでのMLO-Y4を用いた研究では、steroidの投与によりapoptosisが誘導されることが報告されており、今回の増殖能の低下もsteroidによるものと推察される。

A. 研究目的

これまで我々は種々のcollagen vascular diseasesを発症するenv-pXラットを用いることで、より高率に骨および骨頭壊死を発生させることができると考え、このラットを用いた大腿骨頭壊死モデルの作製を試みてきた。しかし、これまでのところ再現性のある骨頭壊死を確認するには至っていない。今後は免疫系のdysfunctionやsteroidの影響だけでなく、そのほかの要因も検討する必要があると考えられた。

この実験系において骨の病理組織所見ではどの時点で壊死が起こり始めているかを判断する基準が明らかでなく、その評価に苦慮することがあった。そこで、時間経過と共に骨細胞の病理組織所見がどのように変化するかを確認した。また、壊死の発生過程においてosteoblastやosteocyteのapoptosisがその発生に関与しているとの報告もあり、阻血状態やステロイドの投与によってosteocyteのapoptosisが誘導されるかどうかを培養骨細胞であるMLO-Y4を用いて検討した。

B. 研究方法

1. 形態学的検討 (in vivo)

8週齢のWKAH rat 雄の大腿骨を摘出し、その近位約1/3の部分の別のWKAH ratの背部皮下に埋め込む。

12時間ごとに埋め込んだ大腿骨を摘出、ホルマリン固定後EDTAにて脱灰して標本作製、epiphysis内の骨小腔に対するviableなosteocyteの数の経時的变化を観察する。

2. 培養骨細胞による機能評価 (in vitro)

MLO-Y4 (murine long bone osteocyte Y4) はオステオカルシンのpromoter領域をSV40 early T regionの上流につないでオステオカルシンを過剰発現させたtransgenic mouseの長管骨からとられた培養細胞で、ALP活性が低くオステオカルシンの発現は強いがtype I collagenのmRNAの発現は弱いという、典型的なosteocyteの特徴を有している。このMLO-Y4のdexamethasone (以下DEX) 存在下における増殖能を確認した。さらにMLO-Y4をculture slide上で約70%附着を示す状態まで培養し、DEXを投与してさらに24時間培養後に抗ssDNA抗体による染色を行い、apoptosisの有無を検討した。

C. 研究結果

1. 形態学的検討 (in vivo)

osteocyteは阻血後96~108時間でviableな細胞の数が減少し始め、2週間後には完全な壊死となっていた(図1)。

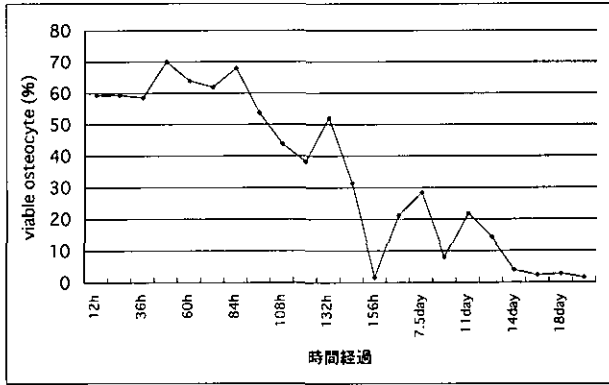


図1. 骨頭のcortexにおけるviable osteocyteの割合の経時的変化

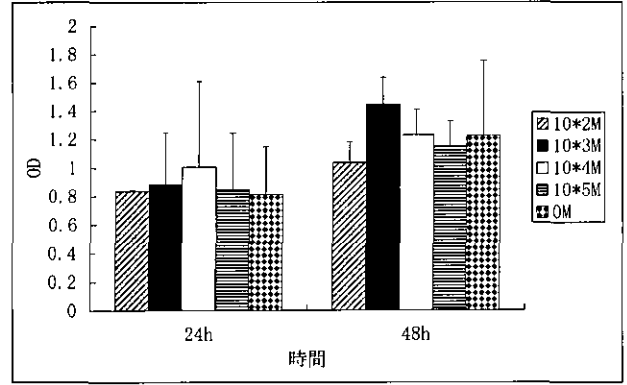


図2. steroid投与によるMLO-Y4における増殖能



図3. DEX(-)にて培養したMLO-Y4の抗ssVNA抗体による染色

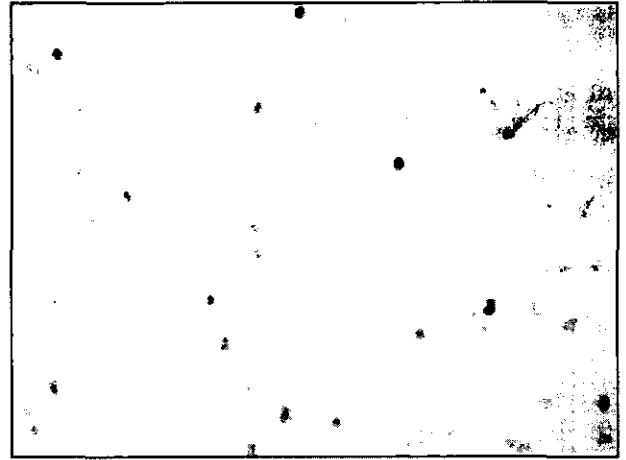


図4. DEX 10⁻²M添加にて培養してMLO-Y4の抗ssVNA抗体による染色

2. 培養骨細胞による機能評価 (in vitro)

増殖能の検討では、DEXの濃度が 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} Mと希釈されるに従って増殖率が増加していることがわかった(図2)。抗ssDNA抗体を用いた免疫組織化学では、controlに比べて抗ssDNA抗体陽性細胞が増加していた(図3, 4)。

D. 考察

阻血状態に置かれたosteocyteがどのような経過で変性、壊死していくかについて、これまでいくつかの報告がある。Cattoらは骨折症例で検討を行い、osteocyte nucleiの消失は受傷後4.5日から始まるとし¹⁾、Bauerらは大腿骨頭壊死患者のcore biopsyの検討でosteocyteの消失までに48時間から4週間かかるとした²⁾。Animal modelを用いた検討では5日目以降でosteocyteの核の変性や消失が確認出来るとしている³⁾。また、Satoらは阻血後12時間よりosteocyteのapoptosisが始まり96時間以降empty lacunaeとなったと報告している⁴⁾。今回の我々の検討でもviableなosteocyteの数は96から108時間頃より減少し始めており、諸家の報告と同様の結果と

なった。よって、osteocyteは阻血状態に置かれるとおよそ96から108時間後より徐々に変性、壊死に陥ると推察される。

特発性大腿骨頭壊死は様々な条件が重なって発症する疾患であるが、その要因の一つとしてosteocyteのapoptosisも挙げることができる。これまでに、大腿骨頭壊死の治療の際に摘出された骨頭の検索でosteocyteのapoptosisが報告されており⁵⁾、その過程でどのような遺伝子発現が見られるかに関しても他の研究で報告され始めている⁴⁾。さらに、DEXの投与によってosteocyteがapoptosisに傾くことはこれまでも報告がある⁶⁾。今回の検討では、DEXを投与することでMLO-Y4は増殖能が低下することがわかった。さらに免疫組織化学による検討では、DEXの投与により抗ssDNA抗体陽性細胞が見られ、osteocyteのapoptosisが誘導されることが確認された。よって、steroidがosteocyteのapoptosisに何らかの影響を与えている可能性が示唆された。今後はapoptosisに陥る際にosteocyteはどのようなシグナルを介して誘導されているか、さらなる検討が必要と考える。

E. 結論

1. osteocyteは阻血後96～108時間でviableな細胞が減少し始め、2週間後には完全な壊死となっていた。
2. DEXの投与によりosteocyteの増殖能は低下しapoptosis陽性細胞が出現する。

F. 参考文献

- 1) Mary Catto : A Histological Study of Avascular Necrosis of the Femoral Head after Transcervical Fracture. *J.Bone and Joint Surg.*, 47-B(4): 749-776, 1965.
- 2) Thomas W. Bauer et al : Osteonecrosis of the Femoral Head:Histologic Diagnosis and Findings After Core Biopsy. *Osteonecrosis-Etiology, Diagnosis, and Treatment*, Chapter10:73-80, AAOS, 1997.
- 3) D Norman, D Reis et al, : Vascular deprivation-induced necrosis of the femoral head of the rat. An experimental model of avascular osteonecrosis in the skeletally immature individual or Legg-Perthes disease. *Int.J.Exp.Path.*, 79: 173-181, 1998
- 4) M. Sato et al : Apoptosis and expression of stress protein (ORP150, HO1) during development of ischaemic osteonecrosis in the rat. . *J.Bone and Joint Surg.*, 83-B(5): 751-759, 2001.
- 5) Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(8):2907-12, 2000.
- 6) Ahuja SS, Zhao S, Bellido T, Plotkin LI, Jimenez F, Bonewald LF. CD40 ligand blocks apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha, glucocorticoids, and etoposide in osteoblasts and the osteocyte-like cell line murine long bone osteocyte-Y4. *Endocrinology*, 144(5):1761-9, 2003.

大腿骨頭壊死症発生における骨髄内脂肪細胞の関与に関する研究

佛淵 孝夫（佐賀大学整形外科）

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いる。我々は特発性大腿骨頭壊死における骨髄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）症例を対象とした骨髄内脂肪細胞の培養実験を開始したので経過を報告してきた。平成14年11月から平成15年7月にかけて当院で人工股関節全置換術を施行したOA31例の骨髄内脂肪を組織培養した。このうち12例では皮下脂肪を採取し、皮下と骨髄内の違いについても検討した。骨髄内脂肪細胞は、皮下脂肪細胞とステロイドに対する反応が異なり、また、低濃度ステロイド下と高濃度ステロイド下では異なる挙動を示していた。また、高濃度ステロイドが投与された際、ヒト骨髄内ではphaseの切り替わりが起こっているのではないかと推測された。今後はこのphaseの切り替わりに注目して研究を継続していく予定である。

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いる。これまで、我々は特発性大腿骨頭壊死における骨髄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経過を報告してきた。今回の研究目的は、組織培養を行い、皮下と骨髄内脂肪細胞のステロイド反応性の違い及びステロイド濃度による反応性の違いを明らかにすることである。

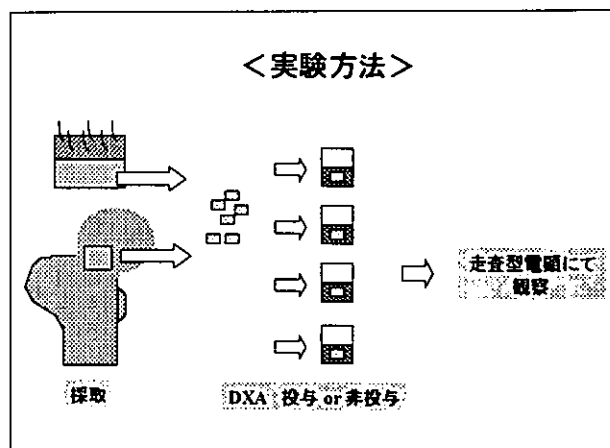
B. 研究方法

〈対象〉

対象は平成14年11月から平成15年7月までに人工股関節全置換術（以下THAと略す）を施行したOA31症例である。全例50歳台で、そのうち、12例では皮下脂肪組織も採取し、比較検討した。

〈実験方法〉

実験方法としては、THA手術時に骨髄組織および皮下脂肪組織を採取し、これを均等な大きさとし、培養液中で培養後、走査型電子顕微鏡にて観察した。



1. まず、THAで大腿骨をリーミングした際に得られる骨髄内組織、または皮下脂肪組織を採取する。
2. これを均等な大きさとする。
3. 培養液中で培養後、走査型電子顕微鏡にて観察する。

（倫理面への配慮）

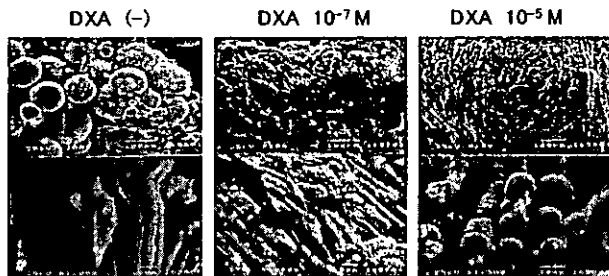
研究の趣旨を説明した文書を作成した。骨髄内組織は普段は廃棄されるものである点、プライバシーは守られる点、拒否しても不利益は生じない点などを文書化した。術前説明の際、承諾を得た。

C. 研究結果

1. 皮下と骨髄内脂肪細胞のステロイド反応性

下図は、殿部より得た皮下脂肪細胞で、上が弱拡大、下が強拡大である。

ステロイドに対する皮下脂肪の反応



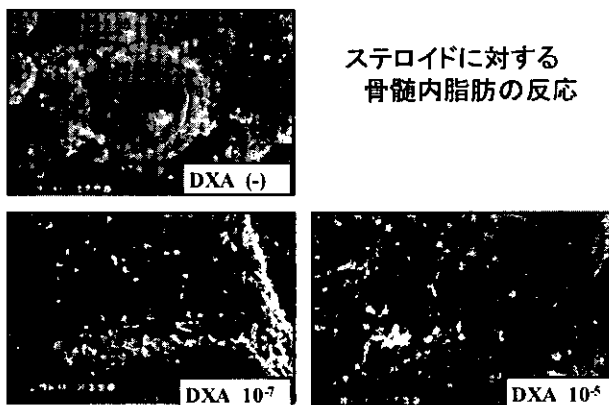
一番左がデキサメタゾンなしで、丸い細胞が脂肪細胞である。

デキサメタゾン $10^{-7}M$ になると脂肪細胞の表面に未熟脂肪細胞が出現する。

$10^{-5}M$ になると、さらに増殖しているのがわかる。

ステロイド投与下ではこのようにして中心性肥満が生じてくると考えられる。

下図は、骨髄内脂肪細胞である。



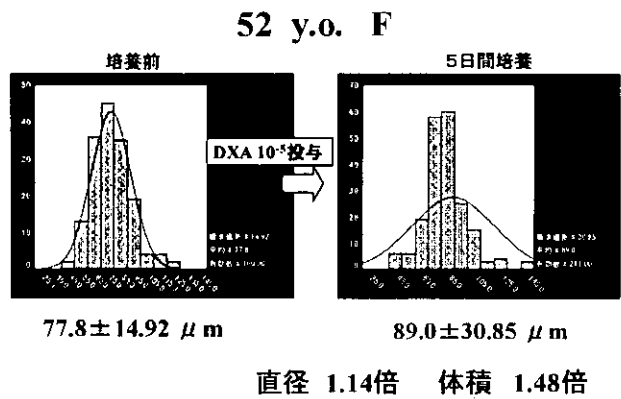
ステロイドに対する骨髄内脂肪の反応

皮下と同様に、デキサメタゾン $10^{-7}M$ になると未熟脂肪細胞が出現する。しかし、さらに高濃度の 10^{-5} では未熟脂肪細胞が出現するものの、その数はあまり多くはない。必ずこのようになるわけではないが、骨髄内では低濃度ステロイド下の方が増殖の傾向は強かった。

2. ステロイド投与による脂肪細胞の増大について計測法は、次の写真のように脂肪細胞の最大径を計測した。



下図は、52歳女性。デキサメタゾン $10^{-5}M$ 投与、5日間培養により、径は1.14倍、体積は1.48倍に増大している。



下図は54歳女性。径は1.18倍、体積は1.64倍に増大している。

