

4. まとめ

ステロイド投与・非投与に拘らず、全 ION を対象とした症例・対照研究でも、ステロイドおよびアルコールが有意なリスクファクターであることが確認された。本研究では、それら以外に喫煙習慣も強い危険因子であることが示唆された。ただし、現段階では単変量解析のみであり、今後、生活習慣（食習慣）や職業歴を含めた多変量解析での検討が必要である。

参加協力施設

旭川医科大学整形外科
信州大学整形外科
金沢医科大学整形外科
名古屋大学整形外科
京都府立医科大学整形外科
大阪大学整形外科
国立病院機構大阪医療センター
九州大学整形外科

究分科会 平成 11～13 年度研究報告書, 1-4, 2002

- 5) Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, et al: Reliability of flushing questionnaire and the ethanol patch test in screening for inactive aldehyde dehydrogenase-2 and alcohol-related cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1997; 6: 1105- 1107.
- 6) 疫学研究に関する倫理指針, 文部科学省、厚生労働省, 2002 年 6 月

5. 参考文献

- 1) Felson DT, Anderson JJ: A cross-study evaluation of association between steroid dose and bolus steroids and avascular necrosis of bone. *Lancet*, 1987; 1: 902-906.
- 2) Hirota Y, Hirohata T, Fukudsa K, et al: Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Am J Epidemiology*, 1993; 137: 530-538.
- 3) 田中隆、山本博司、廣田良夫、竹下節子：特発性大腿骨頭壊死症定点モニタリング -5 年間の集計結果一, 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症調査研究分科会 平成 13 年度研究報告書, 1-3, 2002
- 4) 田中隆、山本博司、廣田良夫、竹下節子：特発性大腿骨頭壊死症定点モニタリング -5 年間のまとめ一, 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症調査研

定点モニタリングによる特発性大腿骨頭壊死症の記述疫学研究

— 新患症例に関する 8 年間の集計・確定診断年別の経年変化 —

福島 若葉、田中 隆、廣田 良夫 (大阪市立大学大学院医学研究科・公衆衛生学)
竹下 節子 (東海大学福岡短期大学・情報処理学科)

(共同研究者)

高岡邦夫、小林章郎 (大阪市立大学大学院医学研究科 整形外科学)
進藤裕幸、熊谷謙治

(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)

松野丈夫 (旭川医科大学 整形外科)

松本忠美、兼氏 歩 (金沢医科大学 運動機能病態学)

渥美 敬 (昭和大学藤が丘病院 整形外科)

佛淵孝夫、重松正森 (佐賀大学医学部 整形外科)

遠藤直人、徳永邦彦 (新潟大学大学院医歯学総合研究科 機能再建医学講座 整形外科学分野)

大園健二 (独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター)

長谷川幸治 (名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻運動・形態外科学 整形外科学)

神宮司誠也、山本卓明 (九州大学大学院医学研究院 臨床医学部門 整形外科学分野)

小林千益、堀内博志 (信州大学医学部 運動機能学講座)

安永裕司

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻 病態制御医科学講座 整形外科学)

菅野伸彦、西井 孝 (大阪大学大学院医学系研究科 臓器制御医学専攻 器官制御外科学講座)

田中 栄 (東京大学医学部附属病院 整形外科)

藤岡幹浩、高橋謙治 (京都府立医科大学大学院医学研究科 運動器機能再生外科学)

小宮節郎 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 運動機能修復学講座 整形外科学)

樋口富士男 (久留米大学医学部附属医療センター 整形外科)

帖佐悦男 (宮崎大学医学部 整形外科)

眞島任史

(北海道大学大学院医学研究科 高次診断治療学専攻 機能再生医学講座 整形外科学分野)

名越 智 (札幌医科大学 整形外科学講座)

加畑多文 (金沢大学医学部医学系研究科 機能再建学)

稲葉 裕 (横浜市立大学医学部 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) の定点モニタリング新患データベースを基に、ION の基本特性について 8 年間の集計を行なうとともに、確定診断年別の経年変化を検討した。本システム開始以降に報告された新患症例数は 1,126 人、男女比は約 6:4 であった。背景因子は、「ステロイド全身投与歴あり」が 49%、「アルコール愛飲歴あり」が 33% であった。「両者あり」を含めると、ステロイド関連 ION は 54% であった。ION 確定診断時年齢は、20~50 代まで幅広く分布し、30~40 代にピークを認め

た。本システム開始以降の短期的経年変化については、いずれの変量についても明らかな傾向を認めなかった。しかし、過去の全国調査結果との比較による長期的経年変化の検討では、ステロイド性 ION の増加を認めた。ION の記述疫学特性に関する経年変化をみる場合は、長期的視野での検討が必要と考えられ、本システムを継続する重要性が改めて強調された。また、背景因子としてステロイド全身投与歴を有する者が増加しているという事実を踏まえ、ステロイド性 ION に関する詳細な検討が必要であると考えられた。

1. 研究目的

本研究班独自で、あるいは「疫学班」と共同で行なわれた、過去 4 回にわたる特発性大腿骨頭壊死症 (ION) の全国調査¹²³⁾の結果をうけ、1997 年より特定施設における定点モニタリングが開始された。現在、北海道から九州まで 18 施設が参加し、調査を継続中である。2004 年 12 月 15 日現在の新患症例は 1,241 人、手術症例は 917 人に達した。

本システムを用いた ION の記述疫学特性に関する従来の検討では、施設からの報告年別に集計を行っていた。しかし、各施設がある程度症例を蓄積した時点で報告した場合、報告年は確定診断年および手術年と必ずしも一致しない。従って、経年変化をより正確に把握するためには、確定診断年および手術年に基づく検討が必要である。

今回、ION の基本特性について 8 年間の集計を行なうとともに、従来からの課題であった、本システム開始以降の確定診断年および手術年に基づく経年変化の検討を目標とした。なお、本年度は新患症例に限って検討した。

2. 対象と方法

定点モニタリングとは、ION の患者が集積する医療施設を定点として、新患および手術症例を所定の様式により逐一 (あるいは随時) 報告するシステムである⁴⁾。1997 年 6 月に開始し、1997 年 1 月以降の症例について報告を得ている。

各施設で ION 新患症例および手術症例が発生した場合、所定の様式の調査票により報告する。調査票は、新患・手術用ともに各々 1 枚である。新患用調査票の主要項目は診断時画像所見、背景因子、手術用調査票の主要項目は、術直前の病型・病期分類、施行した術式、過去の手術施行である。症例発生時に逐一報告する場合もあるが、現在では、ある程度症例を蓄積した時点で随時報告する場合はほとんどである。

2004 年 12 月 15 日現在、データベースに ION 新患症例 1,241 人を蓄積している。このうち、1997 年以降に確定診断され、確定診断日から記入日までの期間が 3 年以内の者 1,126 人を、「本システム開始以降の新患症例」として扱い、今回の解析対象とした。

このような基準を用いた理由は、報告された新患の中には、報告日の 10 年以上も前に確定診断を受けた症例を認めたからである。これは、本システムの参加施設がいずれも整形外科領域における各地域の高次医療施設であり、各施設の関連病院で確定診断後、さらに高次の加療が必要となった後に紹介されたためと考えられる。

表 1. 記入日に基づく施設別報告数
(2004年1月1日～12月17日)

施設名	新患	手術
昭和大学藤が丘病院	45	0
名古屋大	26	0
京都府立医科大	17	15
大阪大	8	17
九州大	29	43
旭川医科大	5	6
大阪医療センター	10	18
信州大	8	8
佐賀大	11	11
金沢医科大	13	5
長崎大	15	9
横浜市立大	7	6
鹿児島大	4	12
宮崎大	7	6
広島大	8	7
新潟大	2	6
札幌医科大	9	5
大阪市大	18	13
計	242	187

3. 結果と考察

2004 年 12 月 15 日現在の集計結果を示す。

A. 施設別報告数 (表 1)

2004 年 1 月 1 日から 12 月 15 日の報告数は、新患症例 242 人、手術症例 187 人であった。

B. 8 年間の集計結果

男女比を図 1 に示す。対象者全員でみると、男女比は約 6:4 であった。背景因子別にみると、ステロイド全身投与歴を有する者では男女比が約 1:1 であるのに対し、アルコール愛飲歴を有する者では約 9:1 と顕著な性差を認めた。

背景因子の分布を図 2 に示す。対象者全員でみると、「ステロイド全身投与歴あり」が 49% と最多であり、「アルコール愛飲歴あり」33%、「両方なし」12%、「両方あり」5%と続いた。「両方あり」の者を含めると、ステロイド関連 ION は 54% であった。男女別にみると、男性では約半数がアルコール性であるのに対し、女性では約 70% がステロイド性であった。

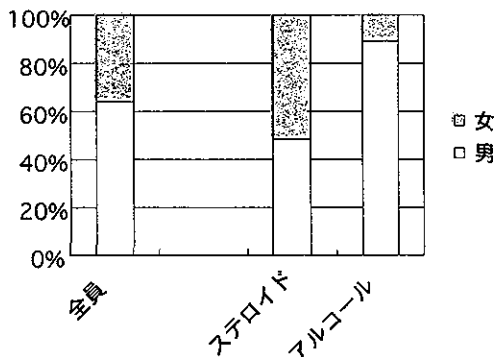


図 1. 8 年間の集計 - 男女比

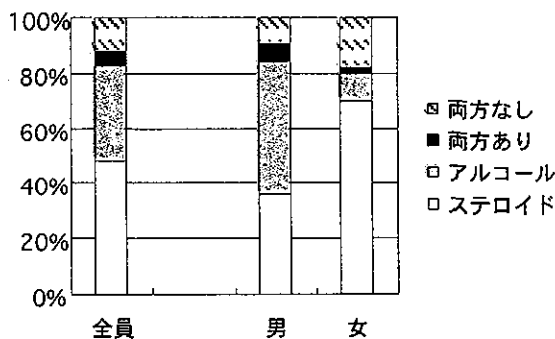


図 2. 8 年間の集計 - 背景因子

ION 確定診断時年齢分布を図 3 に示す。対象者全員でみると、確定時年齢は 20~50 代まで幅広く分布し、30~40 代にピークを認めた。男女別にみると、男性では 30~40 代の集積が顕著であるのに対し、女性で

は 20 代および 40~50 代に 2 峰性のピークが示唆された。また、20 代未満の若年発症例は女性に多い傾向であった。

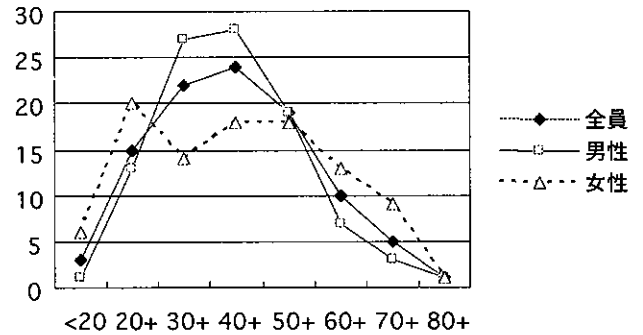


図 3. 8 年間の集計 - 確定診断時年齢分布

ステロイド全身投与の対象疾患は SLE が 23% と最多であった (表 2)。なお、ステロイド全身投与対象疾患の確定診断から ION 確定診断までは平均 4.9 年 (範囲: 0~39 年、標準偏差: ±5.5 年) であった。

表 2. 8 年間の集計

- ステロイド全身投与の対象疾患	
疾患名	n (%)
SLE	138 (23)
RA	10 (2)
多発性筋炎・皮膚筋炎	30 (5)
MCTD	14 (2)
シェーグレン	5 (1)
その他の膠原病	13 (2)
ネフローゼ症候群	39 (6)
腎炎	24 (4)
腎移植	18 (3)
血小板減少性紫斑病	29 (5)
再生不良性貧血	7 (1)
肝炎	7 (1)
喘息	33 (5)
皮膚疾患	19 (3)
眼疾患	21 (3)
その他	201 (33)
計	608 (100)

C. 確定診断年別の経年変化

新患数の経年変化を図 4 に示す。定点モニタリングが開始された 1997 年は若干報告数が少ないが、その後は安定して毎年 130~160 人の報告を得た。

男女比の経年変化を図 5 に示す。男性の割合が上昇傾向にあるとも読み取れるが、明瞭ではない。背景因

子、確定診断時年齢については、いずれも明らかな経年変化を認めなかった (図6、7)。

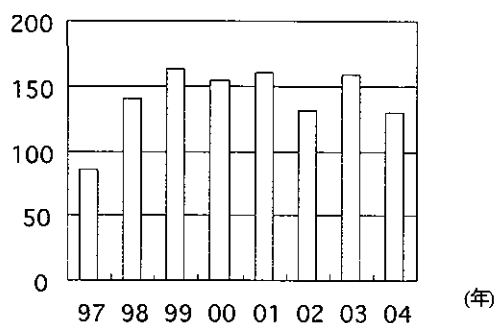


図4 経年変化 - 新患数

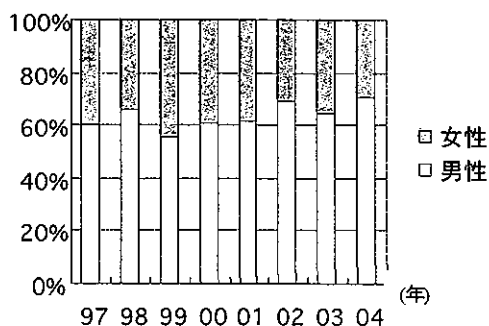


図5 経年変化 - 男女比

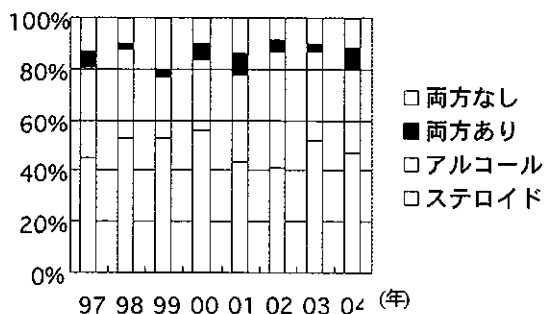


図6 経年変化 - 背景因子

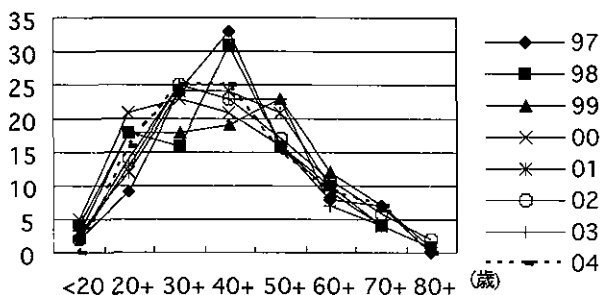


図7 経年変化 - 確定診断時年齢

D. 過去の全国調査との比較

定点モニタリング開始以降の短期的な経年変化は明らかではなかったが、長期的な経年変化を検討するため、過去の全国調査の結果と比較を行なった。

背景因子に関する比較を図8に示す。過去4回の全国調査と比較すると、ステロイド全身投与歴を有する者の割合が増加傾向にある。なお、第2、3回の全国調査については、背景因子が「両方あり」という調査項目を含まないため、厳密には、第1、4回の全国調査および本システムの調査結果との比較はできない。従って、第2、3回の全国調査結果を除くと、ステロイド性IONの増加がより強調された経年変化を読み取ることができる。

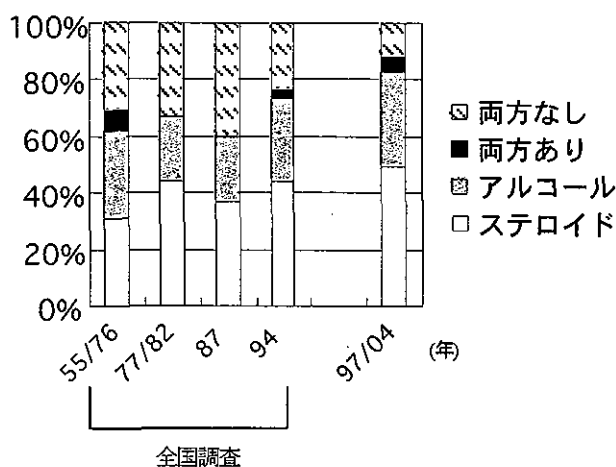


図8 経年変化 (過去の全国調査との比較) - 背景因子

4. 結論

以上の結果をまとめると、次のようになる。

1. 本システム開始以降の新患症例数は1,126人であった。
2. 男女比は約6:4であった。ステロイド全身投与歴を有する者では男女比が約1:1であるのに対し、アルコール愛飲歴を有する者では約9:1と顕著な性差を認めた。
3. 背景因子は、「ステロイド全身投与歴あり」が49%、「アルコール愛飲歴あり」が33%であった。「両方あり」を含めると、ステロイド関連IONは54%であった。
4. ION 確定診断時年齢分布をみると、男性では30~40代に集積しているのに対し、女性では2峰性のピークが示唆された。

5. 本システム開始以降の短期的経年変化については、いずれの変量についても明らかな傾向を認めなかった。
6. 過去の全国調査結果との比較による長期的経年変化の検討では、ステロイド性 ION の増加を認めた。

上記 5、6 より、経年変化をみる場合は長期的視野での検討が必要と考えられ、本システムを継続する重要性を改めて強調するものである。なお、次年度からは、本分科会所属の整形外科施設のほとんどが本システムに参加する予定であり、ION の記述疫学に関して、より精度の高い全体像の把握が可能になると思われる。

今後は、引き続き集計を行なうとともに、過去の全国調査と比較可能な変量につき、経年変化の検討を進めていく。また、背景因子としてステロイド全身投与歴を有する者が増加しているという事実を踏まえ、ステロイド性 ION についてより詳細に検討する予定である。

5. 参考文献

- 1) Hirota Y, Hotokebuchi T and Sugioka Y: Etiology of idiopathic osteonecrosis of the femoral head: nationwide epidemiologic studies in Japan. Ed by Urbanic JA and Jones Jr JP, Osteonecrosis: Etiology, Diagnosis and Treatment. pp51-58, American Academy of Orthopedic Surgeons, Illinois, 1997.
- 2) ニノ宮節夫：日本における特発性大腿骨頭壊死症の実態. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班 昭和62年度研究報告書
- 3) 青木利恵、大野良之、玉腰暁子、ほか：特発性大腿骨頭壊死症の全国疫学調査成績. 厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班 平成7年度研究業績集
- 4) 廣田良夫、竹下節子：定点モニタリングに特発性大腿骨頭壊死症の記述疫学研究. 厚生省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班 平成10年度研究報告書

肝移植後の特発性大腿骨頭壊死症

小林千益、堀内博志	(信州大学医学部整形外科)
橋倉泰彦	(信州大学医学部第一外科)
斎藤直人	(信州大学医学部保健学科)
脇谷滋之、天正恵治、加藤博之	(信州大学医学部整形外科)
中澤勇一、池上俊彦、宮川眞一	(信州大学医学部第一外科)

肝移植手術における特発性大腿骨頭壊死症の発生頻度を明らかにするため、信州大学第一外科で施行された肝移植症例での臨床的調査を行っている。2005年1月までに222例(小児例103、成人例119例)の肝移植が施行されている。臨床的に股関節障害が生じたのは、移植後1年で発生した大腿骨頭骨折の1例のみである。現時点では移植後骨壊死症が発症した症例は1例も認めていない。骨壊死症は現時点では肝移植後の臨床的問題点とはなっていない。腎移植や骨髄移植との骨壊死発生頻度の差がなぜ生じているのかは不明である。この観点に注目した臨床的調査・研究が移植後骨壊死発生の病態解明に有用と考えている。

1. 研究目的

臓器移植法が成立したのに伴い、わが国でも平成11年には脳死移植が再開され移植医療に対して関心が高まっている。腎移植や骨髄移植に加え、心臓移植や肝移植例も国内手術症例が増加してきている。特発性大腿骨頭壊死症(ION)の観点から考えると、腎移植、骨髄移植後に問題となっているIONが、心臓移植、肝移植症例でもある一定頻度発生し、移植後の臨床的問題となるのか明らかにしていく必要がある。肝臓移植手術に際しては、免疫抑制剤としてのFK506やステロイド剤が大多数の症例で使用されており、移植手術時には多くの症例に対しステロイドパルス療法が行われる。さらに術後、拒絶反応が見られた場合にはステロイドパルス療法を追加する必要がある。本研究の目的は、ステロイド大量投与が行われる肝移植症例を対象として、日本人における骨壊死発生頻度を明らかにすることである。移植手術として歴史の長い腎移植や骨髄移植では、既に骨壊死に関してのまとまった報告も多い。それぞれの報告で若干ばらつきがあるものの、それぞれの臓器移植における骨壊死発生頻度も明らかになってきている。しかし、比較的歴史の浅い肝移植

に関しては本邦での骨壊死に関する調査・研究は信州大学症例以外には行われていない。我々はこれまでも、肝移植症例におけるION発生・発症の調査を行い、経過報告を行ってきたが¹⁾、今回は2004年末までの状況を報告する。

2. 研究方法

2005年2月までに信州大学医学部第一外科学教室で施行された肝移植症例は、222例(小児例103、成人例119例)である。全例信州大学第一外科学にて経過観察あるいは追跡調査されている。経過中股関節に疼痛等愁訴が生じた場合は、信州大学医学部整形外科に紹介して頂き、整形外科医が直接検診を行い、X線およびMRIにて診断を行うことになっている。また、すでに報告しているとおり2002年12月までは、信州大学第一外科主治医および信州大学整形外科担当医が、ステロイド使用による骨壊死発生のリスクを説明し、患者がその必要性を理解しMRI撮影を承諾した場合、スクリーニング目的で股関節MRIを施行した²⁾。

3. 研究結果

肝移植症例 222 例で ION を発症した症例は、1 例もなかった。スクリーニング MRI で ION の発生を確認した 1 例も股関節痛は生じておらず、ION 発症にはいたっていない。移植後股関節痛を生じたのはこれまで報告した 2 例のみであり¹⁾、現時点において、肝移植後の ION は臨床的に全く問題とはなっていない。

4. 考察

わが国では肝移植は未だ施行されている施設に限られているが、信州大学医学部付属病院はそのうちの 1 施設である。信州大学第一外科においては、1990 年 6 月に第 1 例の生体部分肝移植が行われ、現在までに 222 例の肝移植が行われている。

腎移植や骨髄移植と同様に、肝移植においてもさまざまな免疫抑制剤が使用される。代謝阻害剤としてのアザチオプリン、サイトカイン合成阻害剤のサイクロスポリンや FK506 などに加え、抗炎症作用をもつステロイド剤もその中心的存在となっている。信州大学第一外科の肝移植術後免疫抑制療法²⁾は、初期にはサイクロスポリンとアザチオプリンを使用しており、ステロイド剤は術前（当日朝）および術中にメチルプレドニゾロン（MPSL）20mg/kg の high dose 投与を行い、漸減していくプロトコルであった。現在はサイクロスポリンが FK506 に変更されたが、ステロイド使用のプロトコルは変更されていない。つまり、信州大学第一外科で肝移植を行った全例にステロイドパルス療法が行われていることになる。さらに急性拒絶反応と診断された場合には、MPSL を 10~20mg/kg の high dose で投与する方法をとっている。

以上を踏まえ、我々は手術に際してステロイド大量投与を必要とする肝移植症例について、ION が臨床的問題となるか調査してきた。肝移植での骨壊死発生頻度が明らかになれば、既に検討されている腎移植や骨髄移植³⁾などと比較し移植間での発生頻度に差があった場合には、壊死発生機序解明の手がかりの一端にもなりうると考えた。

腎移植や骨髄移植例での報告に比べ肝移植後の骨壊死発生報告は少ない。報告されている頻度は 2~8% 程度^{4,5)}だが、MRI による検討はなされていないため、肝移植後の ION 発生頻度は未だ不明である。なか

はその発生頻度の低さから肝移植においては骨壊死に関してはスクリーニングする必要はない⁴⁾と結論付けた報告もある。我々のこれまでの調査でも、ION は肝臓移植後の臨床的問題点とはなっておらず、骨髄移植や腎移植とは異なる結果であった。今後は、肝移植症例での調査を継続するとともに、移植間での ION 発生頻度の差がなぜ生じるのかを検討することが移植後 ION の病態解明に重要ではないかと考えている。

5. 参考文献

- 1) Horiuchi, H et al: Osteonecrosis of the femoral head in Japanese adults after liver transplantation: a preliminary report. J Orthop Sci. 2004;9:119-21.
- 2) 橋倉泰彦ほか：生体部分肝移植；術式と術後免疫抑制療法を中心に Pharma Medica 1997；15：77 - 83.
- 3) Torii Y, et al: Osteonecrosis of the femoral head after allogeneic bone marrow transplantation. Clin Orthop. 2001, 382:124-32.
- 4) Papagelopoulos P et al.: Total joint arthroplasty in orthotopic liver transplant recipients. J. Arthroplasty, 1996；11：889-892.
- 5) Lieberman JR, et al: Symptomatic osteonecrosis of the hip after orthotopic liver transplantation. J Arthroplasty. 2000, 15: 767-71.

SHRSP を利用した大腿骨頭壊死研究

-Steroid Hormone 負荷と酸化 stress-

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 (長崎大学医学部・歯学部附属病院整形外科学)
鈴木 暢彦、尾崎 誠、村田 雅和、宮田 倫明
(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)
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 と WKY/Izm にを投与し、大腿骨頭壊死の動態、骨頭に生ずる酸化 stress を観察した。SHRSP/Nagasaki の 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。組織学的には壊死発生頻度は control 群に比べ、Steroid Hormone 投与群で多かった。WKY/Izm では control 群、Steroid Hormone 投与群とも壊死発生頻度は低く、両群間に有意差はみられなかった。抗 8-OHdG (8-hydroxy-deoxyguanosine) と抗 4-HNE (4-hydroxyl-2-nonenal) を用いた酸化 stress の解析では WKY に比較して、SHRSP で酸化 stress はより多く観察された。また WKY において steroid hormone 投与により 酸化 stress は増加していた。骨頭外側の流入血管と epiphysis 内血管を酸化 stress に関して比較すると、明らかな関係は示唆出来なかった。微小循環障害で注目されている AGE/RAGE の血管内皮への関与は軽微であった。

1. 研究目的

われわれの目的は SHRSP を用いた大腿骨頭壊死の病態解析である。

高血圧自然発症ラット (以下 SHR と略) には心血管系、自律神経系、腎機能、免疫系などの異常とともに大腿骨頭部の無腐性壊死が生じることが知られており、これまでの研究で SHR に比べて易卒中高血圧自然発症ラット (以下 SHRSP と略) に壊死発生率が高いこと、15 週齢から 17 週齢に好発することが判った。また Steroid Hormone の負荷で壊死の頻度が増加することも判った。この壊死の発生原因のひとつとして SHRSP の大腿骨頭が WKY のものより酸化 stress に曝され、また Steroid Hormone の負荷で増大していることが推定される。今回、免疫組織学的手法で酸化 stress に着目してその程度を比較し、骨頭の骨壊死との関わりがあるかどうかみることにある。

2. 研究方法

【材料&方法】

ラットは長崎大学先端生命科学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 と牡 WKY/Izm を使用した。

SHRSP/Ngsk には標準飼料である SP 飼料を与え、また WKY/Izm では標準飼料である F2 飼料を与えた。SHRSP/Ngsk と WKY/Izm でそれぞれ Steroid Hormone の負荷群 (Steroid Hormone 投与群) と未負荷群 (control 群) の 4 群を作成し、各々 31 匹、40 匹、10 匹、20 匹を使用した。Steroid Hormone は 17 週齢で methylprednisolone acetate 5mg を背部に筋注した (図 1)。

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。大腿骨頭壊死については標本作製の過程で熱発生が生じないため

Jacques ARLET, 1993の組織学的診断基準に準じてtype1から診断した(表1)。

(male SHRSP/Ngsk & WKY/Izm)

group	n	15	16	17	18	19(Wks)	
SHRSP/Ngsk control	40	—————▶					×
Steroid Hormone administrated	31	—————▶					×
WKY/Izm control	20	—————▶					×
Steroid Hormone administrated	10	—————▶					×

SP diet : —————▶ F2 diet : —————▶
 steroid hormone (methylpredonisolone acetate): 5mg bolus ↓
 im :
 sacrificed : ×

図1：実験群の内訳：

SHRSP/Ngsk、WKY/Izmに標準飼料を与えた。SHRSP/NgskとWKY/IzmでそれぞれSteroid Hormoneの負荷群（Steroid Hormone投与群）と未負荷群（control群）の4群を作成し、各々31匹、40匹、10匹、20匹を使用した。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。

Patho-histological Findings by Jacques ARLET, 1993

Type 1. Spots of fibrosis, necrosis, stasis and hemorrhages surrounded by areas of apparently normal fatty marrow

Type 2. Extensive necrosis of the hemopoietic and fatty tissues of bone marrow, occupying most spaces. It often presents as a fine eosinophilic network with the H&E Staining.

Type 3. The above marrow lesions are accompanied by bone trabeculae deprived from their osteocytes. (Deprivation is abnormal when at least 50% of osteocytic lacnae are empty. Emptying of the lacnae is the first clear sign of osteocytic necrosis on light microscope.)

Type 4. Signs of repair similar to those observed in the transitional zone underneath the squetrum in advanced cases.

表1：Jacques ARLET, 1993の組織学的診断基準

大腿骨頭壊死については標本作製の過程で熱発生が生じないために準じてtype1から診断した。

酸化stressの検出には一次抗体として日本油脂株式会社の酸化stress測定用抗体抗8-OHdGモノクローナル抗体と抗4HNEモノクローナル抗体を使用し通常の免疫染色プロトコルに従って染色検鏡を行った。また微小循環障害で注目されているAGE/RAGEの血管内皮への関与をTrans Genic社の抗AGEモノクローナル抗体とSanta Cruze Biotechnology社の抗RAGE H-300ポリクローナル抗体を使用し、同様にSHRSPではSteroid Hormoneの負荷の有無と壊死の有無で4群各4標本をWKYではSteroid Hormoneの負

荷の有無で2群各4標本を免疫染色し染色検鏡を行った。

大腿骨頭の免疫染色の評価はepiphysisとmetaphysisに分けて更にepiphysisでは脂肪細胞辺縁と骨髓細胞に着目して染色性のないものを-、染色性のあるものを+ 特に染色性が強く、x20の各視野で陽性で強染顆粒あるものを++として表記、解析した(図3-1)。

(倫理面への配慮)

長崎大学実験動物委員会の認可を得た。

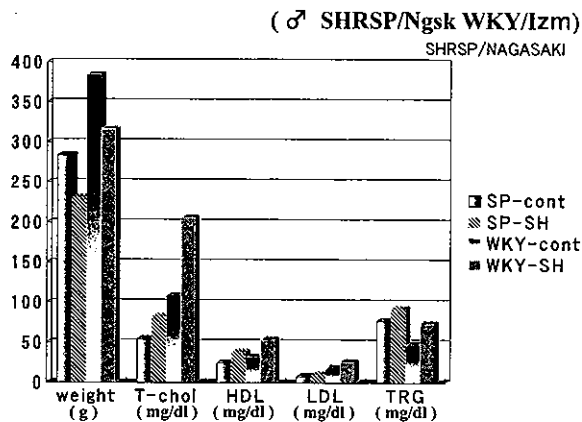


図2: 体重および生化学的結果

SHRSP/Ngsk とWKY/Izm それぞれSteroid Hormone を投与すると体重は減少した。

SHRSP/Ngsk では血液生化学検査では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。いずれも電解質は正常であった。またWKY/Izm にSteroid Hormone 投与では総コレステロール値、HDL値、LDLの上昇はSHRSP/Ngsk よりも高度であった。

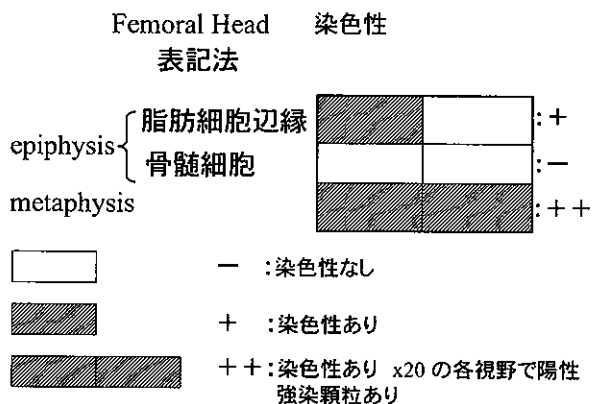


図3-1: 大腿骨頭染色性表記法

大腿骨頭の免疫染色の評価はepiphysis と metaphysis に分けて更にepiphysis では脂肪細胞辺縁と骨髄細胞に着目して染色性のないものを-、染色性のあるものを+ 特に染色性が強く、x20 の各視野で陽性で強染顆粒あるものを++として表記した。

3. 結果

Steroid Hormone を投与すると体重は減少した。

血液生化学検査では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。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、Steroid Hormone 投与群は有意に高かった(表2)。またその

壊死像は修復反応の少ない典型的なものが大部分であった。大腿骨頭血管の顕微鏡観察(H&E染色)では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。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と判断された。

またWKY/Izm にSteroid Hormone 投与では総コレステロール値、HDL値、LDLの上昇はSHRSP/Ngsk よりも高度であった(図2)。酸化stress は抗4HNEモノクローナル抗体ではSHRSPに於いてSteroid Hormone 投与にかかわらず、染色性が亢進しており、特に脂肪細胞辺縁に強く、壊死部分は判定不可能であったがmetaphysis の染色性も亢進していた。WKYではcontrol群では染色性はなく、Steroid Hormone 投与で染色性が出現したが、SHRSPのcontrol群より軽度であった。抗8-OHdGモノクローナル抗体ではSHRSPに於いてcontrol群に比べSteroid Hormone 投与群で染色性が亢進しており、特に骨髄細胞に強く、壊死部分は判定不可能であったがmetaphysis の染色性も亢進していた。WKYではSteroid Hormone 投与群と比較し、control群のepiphysis に染色性が強かった。しかしmetaphysis の染色性はSteroid Hormone 投与でSHRSPと同等に亢進していた。微小循環障害で注目されているAGE(Advanced Glycation Endoproteins)に関して染色性(発現)は見られるものの、SHRSPに於いてSteroid Hormone 投与の有無、壊死の有無で差がなく、WKYではcontrol群と比較しSteroid Hormone 投与群に染色性が強かった。AGEの受容体であるRAGEについてみてみるとWKYでは染色性(発現)は見られなく、SHRSPに於いてみられ、Steroid Hormone 投与で増加するが、壊死の有無で染色性の差は見いだせなかった(図3-2)。

epiphysis 内の血管とlateral epiphyseal vessels の染色性を比較した結果 抗4HNEモノクローナル抗体ではepiphysis 内の染色性が高く、抗8-OHdGモノクローナル抗体では明らかな関係はいえず、抗AGE抗体ではlateral epiphyseal vessels の染色性が高く、抗RAGEや抗8-OHdGモノクローナル抗体では明らかな関係はいえなかった(図4)。

大腿骨頭 染色性

Strain	steroid	necrosis	AGE	RAGE	4HNE	8OHdG
SHRSP /Ngsk	—	—				
	—	+				
	+	—				
	+	+				
WKY /Izm	—	—				
	+	—				

図 3-2 : 大腿骨頭染色性結果

酸化 stress は抗 4-HNE モノクローナル抗体では SHRSP に於いて Steroid Hormone 投与にかかわらず、染色性が亢進していた。WKY では control 群では染色性はなく、Steroid Hormone 投与で染色性が出現したが、SHRSP の control 群より軽度であった。抗 8-OHdG モノクローナル抗体では SHRSP に於いて control 群に比べ Steroid Hormone 投与群で染色性が亢進していた。微小循環障害で注目されている AGE に関して染色性（発現）は SHRSP に於いて Steroid Hormone 投与の有無、壊死の有無で差がなく、WKY では control 群に比較し Steroid Hormone 投与群に染色性が強かった。RAGE は WKY では染色性はなく、SHRSP でみられ、Steroid Hormone 投与で増加した。

4. 考察

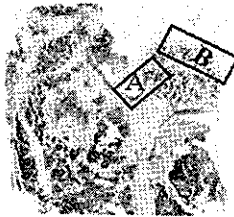
大腿骨頭の無腐性壊死のmechanismとして何らかの疎血性変化が考えられる。その疎血性変化の原因は血液凝固系の異常、血管およびその内皮の異常が考えられる。大腿骨頭壊死の実験モデルではブタ、犬、ニワトリ、ウサギ、ラットなどを使用し、実験方法としては、Steroid Hormoneの薬物負荷が主流のようである。Steroid Hormone投与で高脂血症、骨髄内脂肪細胞の増生が生じ、壊死と深く関係していると考えられている。昨今Steroid Hormoneの血管作用で内皮の障害や酸化stressが注目されている。ラットを使用した実験では血行遮断の報告はみられるがSteroid Hormoneの負荷の報告はない。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、し高脂血症を呈しにくいと考えられているようである。今

回の実験でWKYの方がより上昇しており必ずしも高脂血症を呈さないとは云いがたい。また普通のラットはSteroid Hormone負荷で大腿骨頭壊死は生じにくいということも判った。これは他の種の動物に比較してSteroid Hormoneの代謝やレセプターなどが若干異なることに起因するかもしれない。しかし今回のSHRSPのSteroid Hormone負荷群がSHRSPやWKYの対照群に比較してトリグリセライド値の上昇と骨頭壊死の発生頻度が上回っていた。このことはSHRSPは他のラットの系にはない大腿骨頭の血管病変ないしは代謝系の異常が推定される。今回の壊死の組織学的診断にJacques ARLET, 1993の組織学的診断基準を用いてtype1から壊死と診断した。壊死の組織学的診断には初期の壊死像の判定に諸処の考えがある。われわれは以前行った脂肪細胞の増生、変性、骨壊死とApoptosis

の解析の結果より、脂肪細胞の変性はApoptosisが増加しており、骨壊死の前段階もしくは初期と考えられる。また本実験には鋸使用しないので脂肪細胞の物理的変性の原因となる熱の発生はない。以上からJacques ARLETのType 1. であるSpots of fibrosis, necrosis,

stasis and hemorrhages surrounded by areas of apparently normal fatty marrowも壊死の確固たる傍証に為りうると判断し適用した。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。

血管流入部とepiphysis内の血管の酸化ストレス(染色性)の比較



染色性の比較：

- A : 血管流入部の方が染色性が高い
- B : 血管流入部の方が染色性が高い
- U: 判定不能
- N: 結果が一定でない

Strain	steroid	necrosis	AGE	RAGE	4HNE	8OHdG
SHRSP/Ngsk	-	-	A	U	B	U
	-	+	A	U	N	U
	+	-	AB	N	B	U
	+	+	A	U	B	A
WKY /Izm	-	-	A	N	A	N
	+	-	AB	N	B	N

図4：血管流入部と epiphysis 内の血管の酸化 stress (染色性) の比較

epiphysis 内の血管と lateral epiphyseal vessels の染色性を比較した結果 抗 4-HNE モノクローナル抗体では epiphysis 内の染色性が高く、抗 8-OHdG モノクローナル抗体では明らかな関係はいえず、抗 AGE 抗体では lateral epiphyseal vessels の染色性が高く、抗 RAGE抗 8-OHdG モノクローナル抗体では明らかな関係はいえなかった。

Strain間の処置による骨頭壊死率の比較

処置	SP/Ngsk		WKY/Izm	
	壊死数	%	壊死数	%
control群	42 /80	52.5	1 /40	2.5
Steroid Hormone群	59/62	95.1	0 /20	0

酸化 stress の検出には抗 8-OHdG モノクローナル抗体と抗 4HNE 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 stress 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 4HNE モノクローナル抗体は 4HNE(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 stress 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を形成したところに高い特異性を有している。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 の検出の確実性が増す。抗 4HNE モノクローナル抗体の結果から脂肪細胞に於ける酸化 stress は SHRSP では Steroid Hormone 投与にかかわらず、亢進し、WKY では control 群では染色性はなく、Steroid Hormone 投与で染色性が出現したことから一般的にラットでも Steroid Hormone 投与で特に脂肪細胞に酸化 stress は亢進することが判る。しかし、SHRSP では更に亢進していることがうかがえる。抗 8-OHdG モノクローナル抗体の結果では SHRSP で control 群に比べ Steroid Hormone 投与群で染色性が亢進しており、特に骨髓細胞に強く metaphysis の染色性も亢進していた。このことは Steroid Hormone の酸化 stress は SHRSP では骨髓細胞に強く発現することが推測される。壊死部分は判定不可能であったため壊死との因果関係は不明であり、壊死部の酸化 stress の既往判定法の開発が望まれる。

糖尿病の網膜症や腎臓障害の微小循環障害の研究に伴って解明され、現在注目されている AGE (糖化最終産物)の SHRSP に於いて Steroid Hormone 投与の有無、壊死の有無で差がないものの、AGE の受容体である RAGE についてみると WKY では染色性 (発現) は見られなく、SHRSP に於いてみられ、Steroid Hormone 投与で増加していた。何らかしらの SHRSP の血管病変に RAGE の関与が示唆される所見である。壊死の有無で染色性の差は見いだせなかったが今回使用した抗 RAGE 抗体はポリクローナルであり、モノクローナルな抗体の使用により詳細な差違が検出可能かも知れない。

epiphysis 内の血管と lateral epiphysial vessels の染色性を比較して抗 4HNE モノクローナル抗体では epiphysis が染色性が高いのは脂肪細胞の分布が

epiphysis 内に多いとされ、抗 AGE 抗体では lateral epiphysial vessels の染色性が高く、壊死発生に何らかの意義を有する可能性が考えられる。

今回、SHRSP 大腿骨頭壊死に関して酸化 stress が SHRSP で多く、また Steroid Hormone 投与で増加する傾向が窺われた。壊死との因果関係については不明な点が多く実験法の更なる改良が要求される。

5. 結論

- A. SHRSP および WKY の大腿骨頭および周辺に発生する酸化 stress を免疫組織科学的に観察した。
- B. WKY に比較して、SHRSP で酸化 stress はより多く観察された。また WKY において steroid hormone 投与により酸化 stress は増加していた。
- C. 骨頭外側の流入血管と epiphysis 内血管を酸化 stress に関して比較すると、明らかな関係は示唆出来なかった。
- D. 微小循環障害で注目されている AGE は lateral epiphysial vessels の染色性が高く、RAGE は、SHRSP に於いてみられ、Steroid Hormone 投与で増加し、SHRSP の血管病変に RAGE の関与が示唆された。

6. 研究発表

B. 学会発表

- 1) 熊谷謙治、丹羽正美；—SHRSP 大腿骨頭壊死における酸化 stress の検討、第 40 回 SHR 学会 (平成 16 年 9 月 17-18 日 大阪府)
- 2) 熊谷謙治、村田雅和、宮田倫明、鈴木暢彦、丹羽正美、進藤裕幸；SHRSP を利用した大腿骨頭壊死研究、第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (平成 16 年 10 月 21-22 日 東京都)
- 3) 熊谷謙治、鈴木暢彦、和田政浩、村田雅和、宮田倫明、尾崎誠、丹羽正美、進藤裕幸；心臓血管の危険因子—疾病予防のための遺伝学、第 11 回 SHR 国際シンポジウム (平成 16 年 5 月 16,17 日 米国 オレゴン州 ポートランド市)
- 4) 熊谷謙治、鈴木暢彦、和田政浩、村田雅和、宮田倫明、尾崎誠、丹羽正美、進藤裕幸；—易卒中高血圧自然発症ラット (SHRSP) の大腿骨頭壊死の研究—、第 11 回 SHR 国際シンポジウム (平成 16 年 5 月 16,17 日 米国 オレゴン州 ポートランド市)

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、粟飯原賢一、東 博之、松本俊夫

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体情報内科学)

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する結果、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開発を目的として、血管内皮機能に及ぼすアスピリンの効果について検討した。デキサメサゾン投与マウスでは反応性充血による大腿動脈の血管拡張反応が減弱しており、NO 代謝産物である亜硝酸/硝酸イオン(NOx)の尿中排泄量が減少していたが、これらはアスピリン投与によりいずれも改善した。さらに、アスピリン投与マウスでは大動脈における内皮型 NO 合成酵素(eNOS)の蛋白発現が増加していた。アスピリンは eNOS の発現増加により NO 産生を亢進させることで NO bioavailability を増加し、グルココルチコイド過剰による血管内皮機能低下を改善することが示唆された。

1. 研究目的

大腿骨頭における循環障害はグルココルチコイド過剰による大腿骨頭壊死の発症機序として最も重要であると考えられている。我々は培養血管内皮細胞を用いた検討ならびに大腿骨細動脈を用いた免疫組織学的検討などにより、グルココルチコイド過剰は血管内皮細胞での活性酸素産生亢進による一酸化窒素(NO)の消去を亢進させる結果、血管内皮機能を著しく低下させること、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などを明らかにしてきた。このような酸化ストレス亢進に伴う NO bioavailability の低下とそれによる血管内皮機能障害は微小循環の破綻をもたらし、大腿骨頭壊死の主要な発症要因である可能性があり、本症における治療標的として最も重要なもののひとつと考えられる。そこで本研究では血小板凝集抑制作用と共に血管内皮機能改善作用を有し、脳血管障害や心筋梗塞などの血管障害疾患の発症予防薬としてすでに広く臨床で用いられ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血管内皮機能障害に及ぼす本剤の効果について検討した。

2. 研究方法

C57/BL6J (オス、7 週齢) の背側皮下にデキサメサゾン (DEX) ペレット (5mg、90 days release) (Innovative Research of America、USA) を埋め込むことによりグルココルチコイド過剰マウスを作成し、植え込み後 28 日目に解析を行った。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、DEX ペレットの埋め込み 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、この方法により体重 30g のマウスではアスピリン投与量は 3~4mg/kg/day と推定される。マウスはコントロール群、アスピリン投与群、DEX 投与群、DEX およびアスピリン投与群の 4 群 (各群 n=6) に分け検討した。

血圧、脈拍は tail cuff method により測定し、また、グルココルチコイドによる糖脂質代謝への影響を評価するために空腹時血糖および総コレステロールを測定した。血管内皮機能は 2 分間の下肢完全阻血を解除直後に生じる反応性充血時の大腿動脈径の変化を CCD カメラを用いて 15 秒ごとに 2 分間にわたり撮影記録し、阻血解除後の大腿動脈径の経時的変化と時間との

積により評価した。大腿動脈径は阻血前の血管径を100%として表示した。また、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)排泄量を測定し、酸化ストレス指標として尿中8-hydroxy-deoxyguanosine(8-OHdG)ならびに8-isoprostane排泄量をELISA法により測定した。さらに胸腹部大動脈を摘出し、ウエスタンブロット法により大動脈のeNOS蛋白の発現量を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言、徳島大学医学部動物実験委員会規定ならびに徳島大学倫理委員会規定に基づき施行した。

3. 研究結果

A) 脈拍、血圧、空腹時血糖および総コレステロールの変化

コントロール群、DEX投与群、DEXおよびアスピリン投与群の各群間には脈拍、血圧、空腹時血糖、総コレステロールに有意差はなかった(表1)。

B) 血管内皮機能に及ぼすアスピリンの効果

DEX投与群では反応性充血時の大腿動脈拡張反応が有意に低下しており($p < 0.05$)、アスピリンの投与はこの低下を有意に改善した($p < 0.05$)(図1)。

C) NOx、8-OHdGならびに8-isoprostaneの尿中排泄量に及ぼすアスピリンの効果

尿中NOx排泄量は、コントロール群 6.38 ± 1.81 nmol/hour/g、アスピリン群 8.10 ± 2.9 nmol/hour/g、DEX投与群 4.49 ± 0.45 nmol/hour/g、DEXおよびアスピリン投与群 5.64 ± 0.86 nmol/hour/gであり、DEXの投与により有意に低下したが($p < 0.05$)、この低下はアスピリン投与により有意に改善した($p < 0.05$)(図2)。一方、8-OHdGならびに8-isoprostaneの尿中排泄量はアスピリン投与により変化しなかった(図3)。

D) eNOS発現に及ぼすアスピリンの効果

DEX投与群の胸腹部大動脈におけるeNOS発現はアスピリン投与により増加した(図4)。

4. 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除去が亢進し、血管内皮機能が低下していることを報告してきた。また、グルココルチコイド過剰は血管内皮細胞でのNOS発

現を抑制することが報告されている。このようなNO bioavailabilityの低下ならびに血管内皮機能の低下は循環障害を惹起すると考えられるため、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標的であると考えられる。そこで本年度の研究ではすみやかな臨床応用を想定し、すでに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、人と同様の少量経口投与がグルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害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阻害により血小板凝集を抑制するだけでなく、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。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、アスピリンの臨床効果は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によると考えられている。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反応性充血時の大腿動脈拡張反応を改善し、尿中NOx排泄量を有意に増加させた。反応性充血時の動脈拡張は一般に内皮依存性の血管拡張反応と考えられている。また、NOx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除去の結果、実際に生体で作用するNO量すなわちNO bioavailabilityのよい指標である。今回の結果からアスピリンはグルココルチコイド過剰により低下したNO bioavailabilityを改善し、血管内皮機能を改善する作用を有していると考えられる。

表1. 脈拍、血圧および代謝指標

	Control	DEX	DEX+Aspirin
体重(g)	27.0 ± 1.1	25.6 ± 0.2	24.8 ± 0.3
心拍数(/min)	619 ± 44	636 ± 53	720 ± 39
平均血圧(mmHg)	73 ± 5	67 ± 7	76 ± 5
空腹時血糖(mg/dL)	80 ± 16	76 ± 10	73 ± 11
総コレステロール(mg/dL)	75 ± 12	79 ± 9	78 ± 7

n=6, mean±SD. DEX; デキサメサゾン

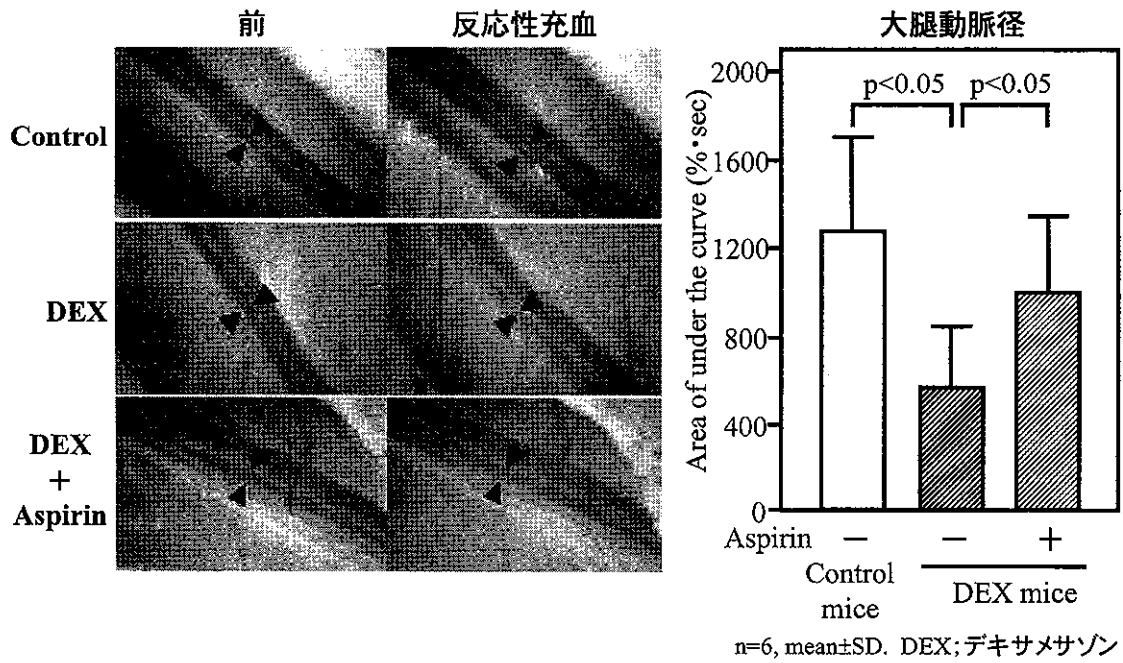


図1. 反応性充血における大腿動脈血管拡張反応に及ぼすデキサメサゾンおよびアスピリンの影響

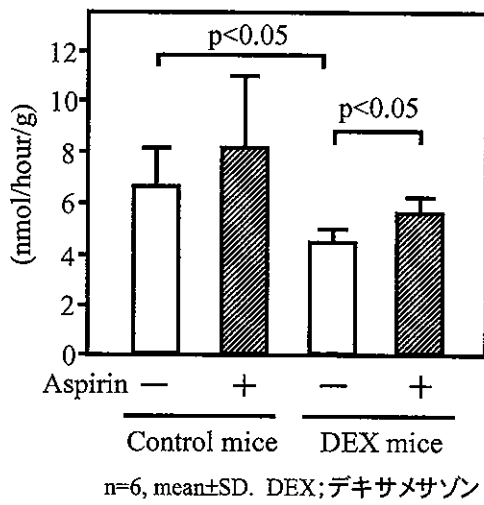


図2. 亜硝酸/硝酸イオンの尿中排泄量に及ぼすデキサメサゾンおよびアスピリンの影響

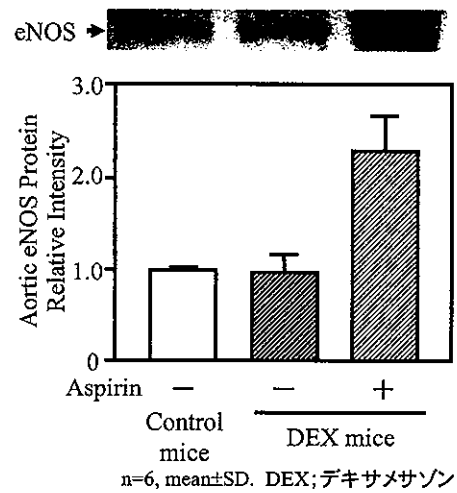
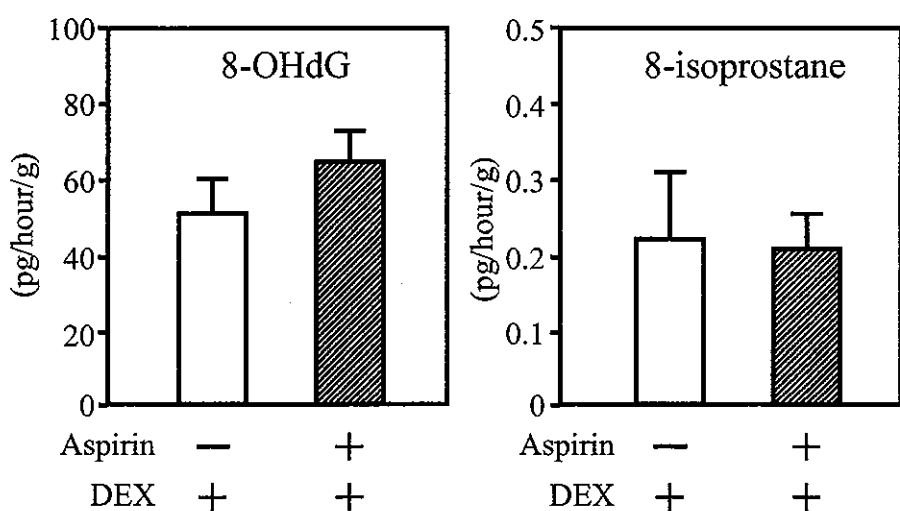


図3. 内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現に及ぼすアスピリンの影響



n=6, mean±SD. DEX; デキサメサゾン

図4. グルココルチコイド過剰マウスの酸化ストレス指標に及ぼすアスピリンの影響

アスピリンがグルココルチコイドによる NO bioavailability ならびに血管内皮機能の低下を改善した機序としては、酸化ストレスの抑制もしくは NO 合成の増加などが想定される。今回の検討ではアスピリンは DEX 投与マウスにおいて 8-OHdG ならびに 8-isoprostane などの酸化ストレスマーカーの尿中排泄量を減少させなかったこと、一方、大動脈における eNOS 蛋白質量の発現を増加させたことなどより、アスピリンは eNOS 発現量の増加により NO 産生量を増加させ、グルココルチコイド過剰による血管内皮機能低下を改善したと考えられる。

今後は、アスピリンと同様に酸化ストレス軽減作用、NO 合成増加作用を含めた血管内皮細胞への多面的作用を有するスタチンのひとつであるピタバスタチンについても同様の検討を行い、大腿骨頭壊死症の予防・治療薬としての臨床応用の可能性を検討する予定である。

5. 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アスピリンの少量経口投与により改善することが示唆された。このよう

なグルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害に及ぼす薬剤の影響の解析は、大腿骨頭壊死症の治療ならびに予防法の開発においてきわめて重要であると考えられる。

6. 健康危険情報

該当事項なし。

7. 研究発表

A. 論文発表

- 1) Aihara K, Azuma H, Takamori N, Kanagawa Y, Akaike M, Fujimura M, Yoshida T, Hashizume S, Kato M, Yamaguchi H, Kato S, Ikeda Y, Arase T, Kondo A, Matsumoto T.: Heparin cofactor II is a novel protective factor against carotid atherosclerosis in elderly individuals. *Circulation*;109:2761- 2765, 2004.
- 2) Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, Hayashi H, Yamada Y, Endoh F, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Kato M, Yoshimura K, Yamamoto Y, Kato S,

Matsumoto T.: Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. J Biol Chem 279:35798-35802,2004.

- 3) Takamori N, Azuma H, Kato M, Hashizume S, Aihara K, 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 109:481-486,2004.
- 4) Yoshida T, Azuma H, Aihara K, Fujimura M, Akaike M, Mitsui T, Matsumoto T.: Vasucular smooth muscle cell proliferation is dependent upon upregulation of mitochondrial transcription factor A (mtTFA) expression in injured rat carotid artery. Atherosclerosis 178:39-47, 2005.

B. 学会発表

- 1) 赤池雅史, 粟飯原賢一, 井内貴彦, 池田康将, 山口普史, 加藤みどり, 橋詰俊二, 吉田智則, 藤村光則, 石川カズ江, 東 博之, 松本俊夫. Aspirin ameliorates impaired production of endothelial nitric oxide in glucocorticoid excess. 第 68 回日本循環器学会学術集会. 平成 16 年
- 2) 加藤みどり, 池田康将, 橋詰俊二, 山口普史, 吉田智則, 藤村光則, 粟飯原賢一, 赤池雅史, 東 博之, 松本俊夫. Aspirin and Pitavastatin increase expression of aminopeptidase N/CD13 through the activation of Akt. 第 68 回日本循環器学会学術集会. 平成 16 年
- 3) 粟飯原賢一, 東 博之, 赤池雅史, 池田康将, 藤村光則, 橋詰俊二, 八木秀介, 加藤茂明, 松本俊夫. ヘパリンコファクターII 欠乏マウスにおける血管リモデリング異常の解析. 第 27 回日本血栓止血学会学術集会. 平成 16 年
- 4) 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, 周藤俊樹, 加藤茂明, 松本俊夫. ビタミン D-ビタミン D 受容体システムによる血液凝固調節作用の解析. 平成 16 年

8. 知的財産権の出願・登録状況

なし

糖質コルチコイドによる血管障害機構に関する研究

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、内皮細胞の細胞内 p21 亢進、G₀/M 期細胞減少、アポトーシスを誘導し血管障害をもたらす事を解明した。一方、内皮障害抑制作用を有するとされるナトリウム利尿ペプチドの一つ CNP は、高濃度 GC により誘導された内皮細胞のアポトーシスを抑制した。以上より、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、CNP は、高濃度 GC による内皮障害を制御し、IONF の治療・予防へ応用できる可能性が示唆された。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (IONF) は、全身性エリテマトーデス (SLE) 等の膠原病疾患にしばしば併発するが、発症機構は未だ不詳である。共通して認められる組織学的所見としては、静脈系の循環障害に伴う組織の阻血状態であり、その結果血管の再生或いは新生が遅延または障害されて、血管障害、さらには組織壊死が生じる可能性が示される。

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、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、細胞増殖を検討して、その機構の解明を試みた。

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、我々は組織阻血状態による細胞内酸素濃度低下によって誘導される転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF) -1 の血管内皮細胞の細胞機能特性に於ける関与、並びに、GC 薬存在下に於ける HIF-1 α の役割について報告してきた。そこで、今回、虚血状態における血管内皮障害を抑制することが報告されているナトリウム利尿ペプチドの一つである CNP が、高濃度 GC により誘導される血管内皮細胞障害に対する血管障害予防効果を有するかについても検討した。

2. 研究方法

A. 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。

B. 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 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。

3. 研究結果

A. 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、10⁻¹⁰M では、24 時間以内の内皮細胞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 (3x10⁶M)、m-PSL 100 μ g/ml、DEX 10⁸M を添加し、PI で染色し、細胞周期を観察した所、G₀/M 増殖期細胞の約 20%減少と A 期 (PI^{low}) アポトー