

シス細胞の80%増加を認めた。

B. 高濃度 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。

C. 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  $\mu$ 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周期を抑制し、アポトーシスを誘導する事が示唆された。

D. 高濃度 GC に暴露した内皮細胞に CNP を添加したところ、p21 の発現抑制、 $G_0/M$  増殖期の細胞数の回復、早期アポトーシスの抑制が齎された。以上から、CNP は高濃度 GC により齎される血管内皮細胞障害を制御できる可能性が示唆された。

#### 4. 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、我々は、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を報告しており、高濃度 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、血管内皮細胞の p21 の発現増強などを介して細胞周期を停止し、アポトーシスを誘導するものと考えられた。

一方、IONF の発症過程では、静脈系循環障害に伴う組織阻血状態と血管再生や新生の障害により壊死が生じるとされており、阻血組織の病態や再生において血管系は重要な役割を担う。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 HIF-1  $\alpha$  が、血管内皮細胞に p21 の発現増強などを介して細胞周期を抑制し、アポトーシスを誘導することを報告した。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 による血管内皮障害を制御できる可能性が示された。これまでに、CNP

遺伝子導入により血管再生の促進、ICAM-1、VCAM-1 発現抑制、マクロファージ浸潤減少、NO 産生亢進等が報告され、血管調節のみならず血管構築をも制御し、抗炎症作用を発揮し、血管障害における予防・治療に応用できる可能性が示唆されている。現在、CNP は臨床試験段階にあり、将来的には、ステロイドパルス療法時に CNP の予防投与等を行うことにより、IONF に於ける血管障害を制御できる可能性も考えられる。

#### 5. 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) で血管内皮細胞の細胞内 p21 亢進、 $G_0/M$  期細胞減少、アポトーシスを誘導した。一方、CNP は、高濃度 GC による内皮細胞の p21 発現を抑制し、 $G_0/M$  増殖期の細胞数を回復し、早期アポトーシスを抑制した。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、ステロイド薬による血管障害は、CNP によって回復可能であることを示し、IONF の治療、予防という観点から重要な示唆を与えるものとする。

#### 6. 健康危険情報

なし。

#### 7. 研究発表

##### A. 論文発表

- 1) 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* (2004) 31, 163-6
- 2) Okada Y, Tsukada J, Nakano K, Tonai S, Mine S, Tanaka Y. Macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  induces hypercalcemia in adult T-cell leukemia. *J Bone Miner Res* (2004) 19, 1105-1111
- 3) Okada Y, Tanaka Y. Immune signals in the context of secondary osteoporosis. *Histol Histopathol* (2004) 19: 863-866
- 4) Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Fibroblast growth factor-2 induces receptor

- activator of nuclear factor kappa B ligand expression and osteoclast maturation by binding to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* (2004) 50, 2450-2458
- 5) 岡田洋右, 田中良哉. 膠原病患者におけるステロイド性骨粗鬆症の一次予防の検討. *Osteoporosis Japan* (2004) 12: 321-323
  - 6) Sakuma-Zenke M, Sakai A, Nakayamada S, Kunugita N, Uchida S, Tanaka S, Mori T, Tanaka Y, T Nakamura. Reduced expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in bone marrow cells in mice after unloading. *J Bone Miner Res* (in press)
  - 7) Nakayamada S, Kurose K, Saito K, Mogami A, Tanaka Y. Small GTP-binding protein rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* (in press)
- B. 学会発表
- 1) 田中良哉. 生物学的製剤. 第 48 回日本リウマチ学会総会学術集会 (シンポジウム) 岡山, 平成 16 年 4 月
  - 2) 田中良哉. 続発性骨粗鬆症の病態と治療. 第 3 回東京骨軟骨フォーラム (特別講演) 東京, 平成 16 年 6 月
  - 3) Tanaka Y. New insights in secondary osteoporosis. *Osteoporosis Forum 2004 in FUKUOKA* (特別講演) 福岡, 平成 16 年 6 月
  - 4) 田中良哉. 骨粗鬆症の病態と治療. 第 46 回日本老年医学会学術集会 (ランチョンセミナー) 幕張, 平成 16 年 6 月
  - 5) 中山田真吾, 岡田洋右, 名和田雅夫, 中野和久, 齋藤和義, 田中良哉. 糖質コルチコイド大量療法による続発性骨粗鬆症に対する各種世代別ビスフォスホネートの一次予防効果. 第 22 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 平成 16 年 8 月
  - 6) 田中良哉. 関節リウマチ治療のこれからの流れ. 第 32 回日本臨床免疫学会総会 (教育講演) 東京, 平成 16 年 10 月
  - 7) 田中良哉. 関節リウマチの内科的治療の進歩—抗サイトカイン療法によりブレイクスルーできるか—. 第 30 回日本内科学会九州支部主催生涯教育講演会 (特別講演) 宮崎, 平成 16 年 10 月
  - 8) 田中良哉. SLE の治療の進歩: 新規生物学的製剤の可能性. 第 54 回日本アレルギー学会総会 (シンポジウム) 横浜, 平成 16 年 11 月
  - 9) 岡田洋右, 田中良哉. ステロイド性骨粗鬆症における一次予防. 第 6 回日本骨粗鬆症学会 (シンポジウム) 埼玉, 平成 16 年 11 月
  - 10) 田中良哉. 抗サイトカイン療法は関節リウマチ治療をブレイクスルーできるか. 第 15 回日本リウマチ学会関東支部学術集会 (ランチョン教育講演) 東京, 平成 16 年 12 月
  - 11) 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
8. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)
- A. 特許取得
    - 田中良哉. Fas 抗原発現増強剤, 特開 2003-1712822.
  - B. 実用新案登録
    - なし
  - C. その他
    - なし

# ION における脂肪細胞の役割に関する研究

## 第5報；骨髄内脂肪細胞のアポトーシスについて

重松正森 佛淵孝夫 (佐賀大学整形外科)

現在、特発性大腿骨頭壊死とアポトーシスの関係が注目され始めている。高濃度ステロイド投与下ではアポトーシスが誘発されやすいとされており、ネクローシスなのかアポトーシスであるのか意見の分かれるところである。これまで我々は骨髄内脂肪細胞を培養し、投与されるステロイドの濃度により反応が異なることを報告してきたが、上述のような背景から脂肪細胞のアポトーシス誘導についての研究に着手した。一般に脂肪細胞のアポトーシスの確認は困難とされており、その理由は脂肪細胞が他の細胞と比較して体積が大きく、核が偏在しているため切片に現れることが非常に少ないためである。今回の目的は脂肪細胞のアポトーシス検出方法を確認することである。

### 1. 研究方法

2001年、Ogawa らはリンパ球を用いてアポトーシスを細胞表面から判断する方法を発表した。これによるとアポトーシスの特徴として2点が挙げられる。1点は細胞表面の陥凹であり、もう1点は細胞表面の膜形成である。この検出法が脂肪細胞にも当てはまるのかを検討した。

#### A. クジラ脂肪細胞

一般に脂肪細胞ではアポトーシスは非常に生じにくい。鯨の脂肪細胞はアポトーシスが比較的多いことが知られているため、日本鯨研究所に依頼し、8頭の内臓脂肪および皮下脂肪細胞を入手した。観察方法は後述するヒト脂肪細胞の観察に準じた。

#### B. ヒト脂肪細胞

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、走査型電子顕微鏡で観察した。

- 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にする。
- 3) 培養液中で培養後、走査型電子顕微鏡で観察する。

### 2. 結果

#### A. クジラ脂肪細胞

電子顕微鏡で観察すると、陥凹を示す脂肪細胞と膜形成を示す脂肪細胞を認めた。その率は1%未満であった。この部位を切片にすると、apoptotic body を認め、また Tunnel 染色や short stranded DNA も陽性であった。これらの事よりこの所見を示す細胞はアポトーシスを起こしていることが再確認できた。

#### B. ヒト脂肪細胞

鯨脂肪細胞と同様の所見を認めた。しかし、現時点ではこれらの所見を示すものは DXA 10-5 M の高濃度ステロイド投与下だけであった。

### 3. 考察

ヒト脂肪細胞でもアポトーシスを検出することが可能であった。しかし、検出したのは高濃度ステロイド条件下のみであり、特発性大腿骨頭壊死発生の一因となっているかもしれない。今後、培養条件を変えることによりアポトーシス発生に差が生じるかなどの研究を行なう予定である。

### 4. 結語

- A. 脂肪細胞のアポトーシス検出法を確立した。
- B. 高濃度ステロイド投与下で、アポトーシス出現を認めた。
- C. ステロイド非投与下ではアポトーシスは未だ検出

していない。

D. ステロイドにより脂肪細胞にアポトーシスが生じ、何らかの脂質代謝を変化させる可能性が示唆された。

## 5. 参考文献

- 1) Ogawa K: High-resorption scanning electron microscopic evaluation of cellmembrane porosity by ultrasound. Med Electron Microsc. 2001 Dec;34(4):249-53.
- 2) Chang CJ, Shih WL, Yu FL, Liao MH, Liu HJ: Apoptosis induced by bovine ephemeral fever virus. J Virol Methods. 2004 Dec 15;122(2):165-70.

## 6. 研究発表

- 1) 肥後たかみ、THA における自己輸血の経験、第 99 回西日本整形災害外科学会、2000 年
- 2) 石井孝子、セメントレス人工股関節全置換術の早期荷重に関する検討、関節外科学会、2000 年
- 3) 石井孝子、THA におけるクリニカルパス、第 37 回日本リハビリテーション医学会、2000 年
- 4) 釘本康孝、THA 術後における自助具の評価、第 100 回西日本整形災害外科学会、2000 年
- 5) 肥後たかみ、大腿骨側の形態からみたセメントレス THA の短期成績、第 13 回日本人工関節学会、2001 年
- 6) 古賀俊光、THA における自己輸血について、関節外科学会、2001 年
- 7) 肥後たかみ、人工股関節全置換術における自己輸血、整形外科と災害外科 50:536-539、2001 年
- 8) 古賀俊光、各種大腿骨骨切り術後にする THA、日本リウマチ・関節外科学会、2001
- 9) 重松正森、佛淵孝夫、OA 症例におけるヒト骨髄内脂肪細胞培養の試み、日本股関節学会 29 回抄録集 224, 2002
- 10) 重松正森、佛淵孝夫、OA 症例におけるヒト骨髄内脂肪細胞培養の試み、日本整形外科学会基礎学術集会 76 (8) , S1122
- 11) 肥後知子、重松正森、佛淵孝夫、ヒト骨髄内脂肪細胞培養の試み、西日本整形災害外科学会 51 suppl 1, 2, 2002
- 12) 北島 将、重松正森、佛淵孝夫、ヒト骨髄内脂肪

細胞培養の試み～ステロイド濃度変化に対する接着増殖率、西日本整形災害外科学会 51, 82, 2002

- 13) 北島 将、重松正森、佛淵孝夫、ステロイドによる大腿骨頭壊死症の発生機序、日本整形外科学会基礎学術集会 77, S1090, 2003
- 14) 北島 将、重松正森、佛淵孝夫、ヒト骨髄内脂肪細胞と皮下脂肪細胞の電顕的比較、日本臨床電子顕微鏡学会 S115, 2003

# SHRSP 大腿骨頭壊死に対する Pentosan 投与(1)

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、村田 雅和、宮田 倫明、穂積 晃、尾崎 誠  
(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)

Steroid Hormone の投与によって生じる大腿骨頭壊死の原因と考えられている大腿骨頭末梢循環障害、酸化 stress の改善目的で Pentosan を投与し SHRSP/Nagasaki に Steroid Hormone の負荷の有無で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 Pentosan 使用で脂質代謝への影響がみられ、HDL 値、トリグリセライド値の上昇は抑制されていた。組織学的に Pentosan 使用 steroid hormone 投与の群では骨頭壊死の発生頻度は有意に減少していた。Pentosan 使用で steroid hormone 投与 SHRSP 大腿骨頭の酸化 stress の発現が若干減弱していた。SHRSP/Nagasaki の Steroid Hormone 投与の方法改善に相まって今後 Pentosan の投与開時期や用量、投与間隔を微細に研究する必要がある。

## 1. 研究目的

われわれは SHRSP を用いて大腿骨頭壊死の病態解析をおこなっている。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 週齢に好発し、また Steroid Hormone の負荷で壊死の頻度が増加することも判った。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、脂質系ではトリグリセライドの上昇がこの壊死の発生原因として以前の研究から推定される。一方大腿骨頭壊死研究会議の病態解析グループで Steroid Hormone の投与による大腿骨頭壊死の原因とされる大腿骨頭末梢循環の改善薬剤の検討が課題とされた。われわれは AAOS の Osteonecrosis にその可能性が記載されている Pentosan に着目した。今回の目的は、SHRSP に Steroid Hormone を負荷し、Pentosan 投与で大腿骨頭壊死の変化をみることである。

## 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 13 週齢牡 SHRSP/Ngsk を使用した。

SHRSP/Ngsk に Steroid Hormone の負荷群 (Steroid Hormone 投与群) と未負荷群 (control 群) の 2 群を作成し、各々 9 匹、7 匹を使用した。Steroid Hormone は 15 週齢で methylprednisolone acetate 8mg を背部に筋注した。Pentosan として Arthroparm 社の CaXPS 4mg (約 16mg/Kg) を毎週背部に筋注した。

(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、生化学及び凝固能検査を行い、薄切永久標本作製し、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 type I 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酸化ストレス測定用抗体抗 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

緑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。

### 3. 結果

Pentosan 投与で体重の減少はなく、順調に生育した。また Steroid Hormone を投与で体重は減少した(図2)。

血液生化学検査では Steroid Hormone 投与で総コレステロール値、HDL 値、LDL 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。2週齢遅く、Steroid Hormone 投与量が 3mg 少ない以前の Pentosan 非投与実験群と参考のため比較すると Steroid Hormone 非投与で HDL 値、トリグリセライド値は減少していた(図3)。血液凝固能では TPA や PAI1 に著変はみられなかったが aPTT や PT は Pentosan 投与で延長していた。大腿骨頭の壊死の頻度は control 群と Steroid Hormone 投与群は有意な差はなかった。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。大腿骨頭血管の光顕観察(H&E 染色)では Pentosan 投与による影響は見出せなかった。

以前の Pentosan 非投与実験群と参考のため比較すると Steroid Hormone 投与群では有意に減少していることが判る(図4)。

大腿骨頭に於ける酸化 stress を Steroid Hormone 投与で Pentosan 投与の有無と壊死の有無で比較した。抗 4HNE モノクローナル抗体では Pentosan 非投与で染色性が亢進し、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。Pentosan 投与では壊死の有無にかかわらず染色性は metaphysis を含め低下していた。抗 8-OHdG モノクローナル抗体では Pentosan 投与で若干染色性が低下しているようであった(図5)。

### 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はブタ、犬、ニワトリ、

ウサギ、ラットなどを使用した 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、骨髓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。われわれの今までの SHRSP ラットを使用した実験から SHRSP の大腿骨頭が WKY のものより酸化 stress に曝され、Steroid Hormone の負荷で増大することや Steroid Hormone の負荷で高脂血症を呈すが脂質系ではトリグリセライドの上昇がこの壊死の発生原因として推定される。一方大腿骨頭壊死研究班会議の病態解析グループでステロイドホルモンの投与による大腿骨頭壊死の原因とされる大腿骨頭末梢循環の改善薬剤の検討が課題とされている。大腿骨頭末梢循環の改善薬剤は幅広く、Steroid Hormone 誘発の微小循環改善として期待される薬剤にはまず warfarin, heparin などの抗凝固薬や pravastatin, atorvastatin などの Statin 系の薬剤に代表される脂質代謝改善薬やビタミン C や E などの酸化 stress の改善薬が考えられる。特定の原因が究明されていない現状で改善薬を求めると Steroid Hormone 誘発の大腿骨頭壊死症で判明している諸事象を改善する薬剤が望まれる。

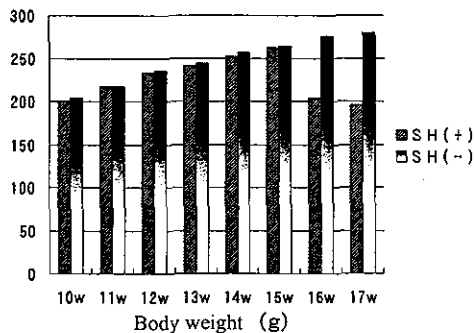
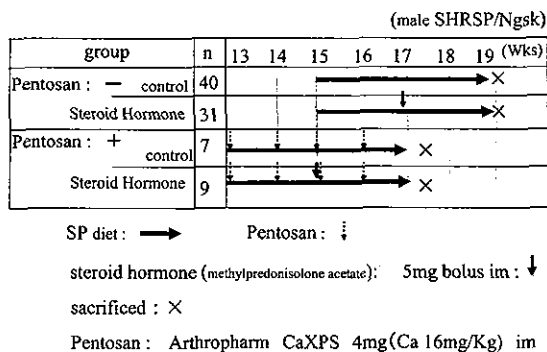
上述のように以前からの SHRSP ラット実験で大腿骨頭は酸化 stress や Steroid Hormone の負荷でのトリグリセライドの上昇がこの壊死の発生原因として推定されることから末梢循環改善を加えて薬剤を選択した。

1997 年 J.R. Urbaniak 等の編集の AAOS Osteonecrosis : Etiology, Diagnosis, and Treatment-US の 102-103 頁に Pentosan polysulfate (PPS) の大腿骨頭壊死症に対する有効性を示唆し、文章中に脂肪融解作用と抗凝固作用と線維素溶解作用と抗炎症作用を有した薬剤が大腿骨頭壊死症の治療に望まれ、PPS は、凝集を減らして、血小板 aggregability を減少させて、線維素溶解を刺激して、TG と CHOL レベルを低下させる能力を有していることから適材としている記載がある。Pentosan の主たる薬剤 Pentosan polysulfate sodium (PPS) (ペントサン多硫酸ナトリウム) はドイツで開発され、ブナの木から抽出、加工した多糖体で、分子量は約 4000 から 6000 ダルトンである(図5)。1949年に Heparin 類似薬として発売開始され、1996年 間質性膀胱炎の治療薬

(Elmiron)として米国、カナダで発売開始され、1990年代後半から動物主としてイヌの変形性関節症治療薬 (CARTROPHEN VET) オーストラリアを中心としてわが国を除く世界中で販売されている。また近年ではプリオン病まで応用され注目されている。上記の薬理学的作用機序については不明な点が多い。

Pentosan の数多い臨床文献のうち、イヌの変形性関節症治療薬として長年基礎及び獣医学的研究している Peter Ghosh は Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1999でPentosanをDMOADs(Disease Modifying Osteoarthritic Drugs)に分類し、その作用機序を以下のように挙げている。1. 軟骨 integrity の保持 2. 滑膜の炎症や補体活性の減少、白血球と滑膜細胞による pro-inflammatory mediatorsを減少 3. 滑膜細胞の Cytoprotection や高分子ヒアルロンサン合成能の改善 4. fibrin や脂質による閉塞物を動化させるため毛細血管内皮から t-PA や SOD やリパーゼ放出を刺激することによって滑膜や軟骨下骨に於ける血流の改善 5. 血小板の活性化と PAI-1 の放出の閾値を増加させること。今回この 2,4,5 の作用が期待されるのでPentosan の応用を試みた。

今回の結果は研究初期で、実験条件設定があまく、



実験数が少ないことや以前の Pentosan 非投与実験群との比較には Pentosan 非投与実験群が2週齢遅く、Steroid Hormone 投与量が1尾あたり 3mg 少なく、満足して評価できるものとは言い難い。

しかし、より厳しい Steroid Hormone 投与量でも大腿骨頭の壊死の頻度や酸化 stress が Pentosan で抑制されたことや Pentosan 投与でトリグリセライドの上昇が抑制されたことは AAOS Osteonecrosis の記載に合致しているようである。今後 Pentosan 投与に関して開始時期を早くするか、用量を変えて週1回の筋肉内注射を週数回の分け行うか、筋肉内注射を皮下注射に変更するなど改善の余地がある。

### 5. 結論

- A) Steroid hormone投与によるSHRSPの大腿骨頭壊死の改善目的で Pentosan を使用した。
- B) Pentosan 使用 steroid hormone 投与の群では骨頭壊死の発生頻度は有意に減少していた。
- C) Pentosan 使用で APTT と PT は延長していた。
- D) Pentosan 使用で脂質代謝への影響がみられた。
- E) Pentosan 使用で steroid hormone 投与 SHRSP 大腿骨頭の酸化 stress の発現が減弱していた。

図1：実験群の内訳：

SHRSP/Ngsk に Steroid Hormone の負荷群 (Steroid Hormone 投与群) と未負荷群 (control 群) の2群を作成し、各々9匹、7匹を使用した。Steroid Hormoneは15週齢でメチルプレドニゾン8mgを背部に筋注した。Pentosan として Arthrofarm社のCaXPS 4mg (約 16mg/Kg) を毎週背部に筋注した。

図2：Pentosan 投与での体重の推移：

Pentosan 投与で体重の減少はなく、順調に生育した。また Steroid Hormone を投与で体重は減少した。

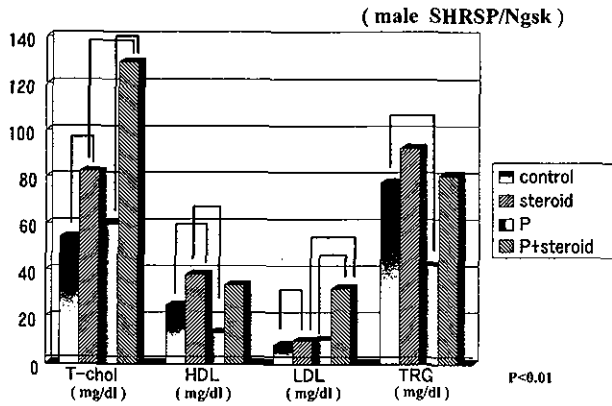


図3 : 血液生化学検査

血液生化学検査では Steroid Hormone 投与で総コレステロール値、HDL 値、LDL 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。以前の Pentosan 非投与実験群と参考のため比較すると Steroid Hormone 非投与で HDL 値、トリグリセライド値は減少していた。

群間の処置による骨頭壊死率の比較

処置	壊死数		壊死数	
	Pentosan : -	%	Pentosan : +	%
control群	42 / 80	52.5	10 / 14	71.4
Steroid Hormone群	59 / 62	95.1	10 / 18	55.6

\*: P<0.01

表1 : 大腿骨頭壊死頻度 (Steroid Hormone 投与で Pentosan 投与の有無)

大腿骨頭の壊死の頻度は control 群と Steroid Hormone 投与群は有意な差はなかった。以前の Pentosan 非投与実験群と参考のため比較すると Steroid Hormone 投与群では有意に減少していることが判る。

Pentosan	Steroid Hormone	necrosis	4HNE	8OHdG
-	+	-	■	■
-	+	+	■	■
+	+	-	■	■
+	+	+	■	■

Femoral Head 酸化stressの染色性

図4 : 大腿骨頭 stress の染色性

大腿骨頭に於ける酸化 stress を Steroid Hormone 投与で Pentosan 投与の有無と壊死の有無で比較した。抗 4-HNE モノクローナル抗体では Pentosan 非投与で染色性が亢進し、特に脂肪細胞辺縁に強く、metaphysis の染色性も亢進していた。Pentosan 投与では壊死の有無にかかわらず染色性は metaphysis を含め低下していた。抗 8-OHdG モノクローナル抗体では Pentosan 投与で若干染色性が低下しているようであった。

Structural formula of pentosan polysulfate sodium (PPS)

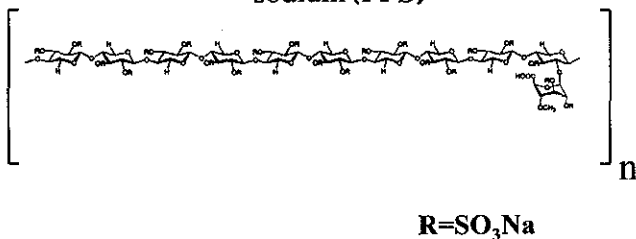


図5 : Pentosan の分子構造

ブナの木から抽出した多糖体で分子量は約 4000 から 6000 ダルトンである。



# ステロイド投与家兎において骨髓静脈系に

## 出現する細胞は骨壊死に関与するか？

福井 清数、兼氏 歩、市塚 徹、杉森 端三、松本 忠美 (金沢医科大学整形外科)  
篠原 治道、木南利栄子 (金沢医科大学解剖学II)

今回我々は走査型電子顕微鏡を用いてステロイド投与家兎の骨髓静脈内での形態学的変化を観察したところ、直径 50  $\mu\text{m}$  以上の大きな細胞成分を骨髓静脈内において捉えることができた。またこれらの細胞はステロイド投与後 5 日の時点で観察された。

### 1. 研究目的

ステロイド性骨壊死の発生機序として脂肪塞栓説<sup>1)</sup>、骨脂肪細胞変性説<sup>2)</sup>、脂質代謝異常説、凝固異常説<sup>3)</sup>、骨内圧上昇説<sup>4)</sup>、血管炎<sup>5)</sup>などの血管自体の障害など様々な説が報告されているが未だ解決していない。以前より我々は骨壊死の発生機序には静脈性の要因が関与すると考えてきた。堀井らは骨髓内類洞の血管鑄型を作製し走査型電子顕微鏡を用いて観察した結果、ステロイド投与家兎では類洞が有意に拡張していることを示してきた<sup>6)</sup>。今回我々は、同じく走査型電子顕微鏡を用いてステロイド投与家兎の骨髓静脈内での形態学的変化を観察したところ、直径 50  $\mu\text{m}$  以上の大きな細胞成分を骨髓静脈内において観察し得たので報告する。

### 2. 研究方法

対象：体重約 3.5kg の雌性日本白色家兎に対し体重 1kg あたり酢酸メチルプレドニゾロン 4mg を 1 回のみ臀筋内に筋注し、筋注の翌日を第 1 日とし、5 日目に犠牲死とした 5 羽を S5 群、14 日目に犠牲死とした 7 羽を S14 群とした。対照として生理的食塩水のみを臀筋内に筋注し、14 日目に犠牲死とした家兎 6 羽をコントロール群とした。

試料の作製：静脈麻酔下に家兎を仰臥位とし、開腹の上、腹部大動脈を露出した。20G のサーフロー針を腹部大動脈の末梢方向に向けて刺入し、約 4°C の生理食塩水約 500ml で灌流した。その後 2% グルタルアル

ルデヒド-1% リン酸緩衝液約 200ml にて固定を行った。直ちに大腿骨を摘出し、近位内側 1/3 部の骨髓を摘出した。これを 1% グルタルアルデヒド-1% リン酸緩衝液に 24 時間浸漬し、その後 1% オスミウム酸-リン酸緩衝液にて 3 時間後固定を行った。70%-100% の希釈列系のアルコールで脱水した後、50% DMSO-カゴジル酸溶液 (PH7.4) にて細胞保護処理を行い、-196°C の液体窒素に浮かべて急速凍結し切断した。次に酢酸イソアミルで置換し、臨界点乾燥、イオンコーティングを経て SEM にて骨髓内動静脈を観察した。また scion image を用いて観察した試料の総面積をそれぞれ検出し、検討数の評価に加えた。

### 3. 研究結果

対照群の骨髓内動静脈を示す (図 1)。骨髓内の動静脈は必ずしも平行に走行しておらず、しばしば交差していた。また交差する部位では動脈の外膜を静脈の内皮が覆うという骨髓特有の構造が存在していた。

次に S14 群の静脈内腔を示す (図 2)。直径約 50  $\mu\text{m}$  以上の大きな細胞成分が静脈内でみられた。これらの細胞の多くは球形もしくは楕円球形を呈し、その表面には粒状微絨毛が散在し、しばしば赤血球やリンパ球と思われる血球成分が附着していた。

S-5 群の静脈内においても S14 群でみられた細胞成分と形態学的に類似した大きな細胞を確認することができた。中には静脈内腔を完全に閉塞するようなものもみられた (図 3)。

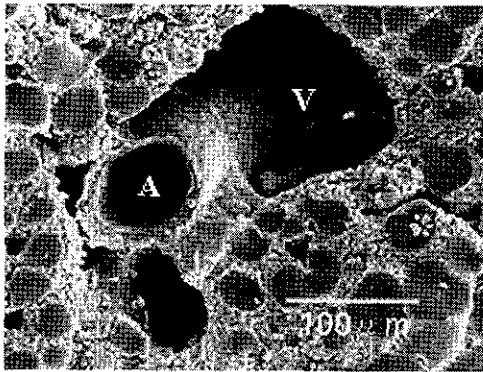


図1:コントロール群における骨髓内動静脈  
静脈内皮が動脈外膜を覆う骨髓特殊の構造がみられる

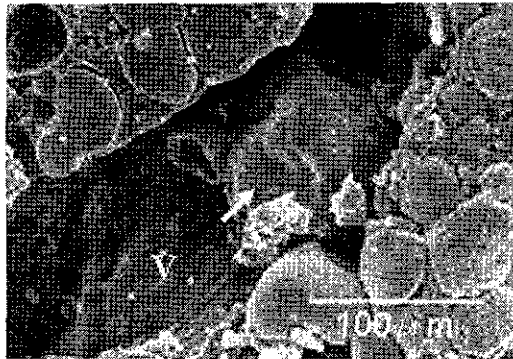


図2:S14群の骨髓内静脈(V)  
直径50 μm以上の細胞成分を認める(矢印)

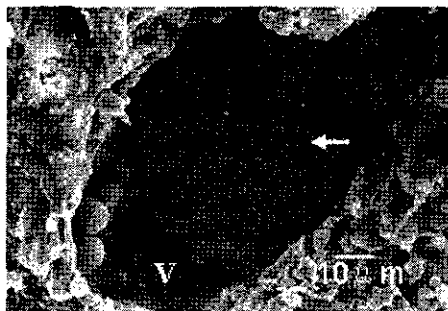


図3:S5群の骨髓内静脈(V)  
直径50 μm程の細胞成分が静脈腔を完全に閉塞している(矢印)

またこの細胞の構成成分を確認するため、SEM で観察した試料をトリミングし、エポンに浸漬後エポン包埋しウルトラミクロトームにて1 μm に薄切後、ト

ルイジンブルーにて染色し光顕にて観察する、いわゆる戻しの作業を行った。その結果細胞成分のほとんどが脂肪で構成されていたことから、これらの細胞は脂肪細胞もしくはそれに類した構造物(脂肪滴)であることがわかった。今回の検討ではこれら脂肪体における核の存在は確認できなかった。

これらの細胞は骨髓静脈内において S14 群では 7 羽中 5 羽(観察総面積 826mm) に、S5 群では 5 羽中 4 羽(観察総面積 624mm) にみられたが対照群(観察総面積 719 mm) には認めなかった。観察総面積に有意差はなかったが、観察された脂肪体の出現家兔数に統計学的有意差を認めた(図4)。

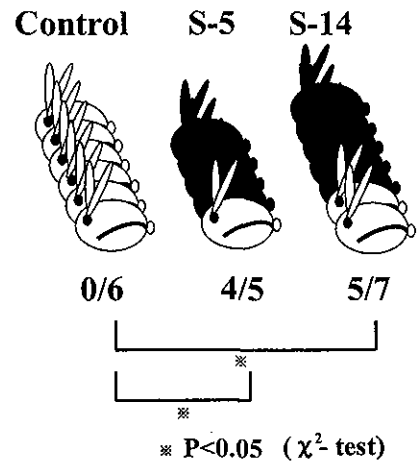


図4:骨髓静脈内における直径50 μm以上の脂肪体の出現頻度

#### 4. 考察

骨髓幹細胞は脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化能を有し、ステロイドは分化誘導を促進すると報告されている<sup>78,9)</sup>。また脂肪前駆細胞の自動能は Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) によって制御され、その脂肪細胞における PAI-1 分泌をグルココルチコイドが促進するという報告がある<sup>10,11)</sup>。つまりステロイドは骨髓間質において脂肪細胞への分化および脂肪細胞(脂肪前駆細胞)の自動能に関与している。つまり今回ステロイド投与家兔にみられた骨髓静脈内脂肪体は脂肪細胞の分化、自動能により出現した可能性がある。もし骨髓静脈内に遊出した脂肪細胞が骨髓静脈内において蓄積あるいは静脈を閉塞すれば、血流の鬱滞を生じ、その結果骨壊死を引き起こす可能性があるかもしれない。またこれらの細胞がステロイド投与後早期に骨髓静脈内において確認できたことから本実験結果は

骨壊死に直接もしくは間接的に関係する現象といえるのではないかと考えている。

## 5. 結論

直径 50 $\mu$ m を超える脂肪細胞と思われる細胞成分が骨髓静脈内において観察された。これらの細胞はステロイド投与後 5 日と早期からみられることよりこれら脂肪細胞の出現が骨壊死発生の Key event となる可能性が示唆された。

## 6. 研究発表

### A. 論文発表

なし

### B. 学会発表

なし

## 7. 知的所有権の取得状況

### A. 特許取得

なし

### B. 実用新案登録

なし

### C. その他

なし

## 8. 参考文献

- 1) Jones JP Jr.: Fat embolism and osteonecrosis: Orthop Clin North Am.1985:595-633.
- 2) Kawai K: Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. A histochemical and electron microscopic study.: J Bone Joint Surg Am.1985:755-63.
- 3) Jones JP Jr.: Fat embolism, intravascular coagulation, and osteonecrosis. Clin Orthop. :294-308: 1993.
- 4) Hungerford DS.: Role of core decompression as treatment method for ischemic femur head necrosis: Orthopade. :219-23: 1990.
- 5) Matsui M, Saito S, Ohzono K et al:Experimental steroid-induced osteonecrosis in adult rabbits with Hypersensitivity vasculitis.: Clin Orthop. :61-72.: 1992.
- 6) Horii T, Matsumoto T et al: Effects of steroids on femoral diaphyseal intramedullary circulation in rabbits: Arch Orthop Trauma Surg. 2002:506-9.
- 7) Prockop DJ: Marrow Stromal Cells as Stem cells for Nonhematopoietic Tissues: Science. 1997:71-4.
- 8) Hauner H et al: Promoting Effect of Glucocorticoids on the differentiation of Human Adipocyte Precursor cells Cultured in a Chemically defined Medium: J Clin Invest. 1989:1663-70.
- 9) Cui Q et al: Steroid-Induced Adipogenesis in a Pluripotential Cell Line from Bone Marrow: J Bone Joint Surg Am.:1054-63.
- 10) Crandall DL et al: Autocrine Regulation of Human Preadipocyte Migration by Plasminogen Activator Inhibitor-1: J Clin Endocrinol Metab.2000:2609-14.
- 11) Udden J et al: Glucocorticoid- Regulated Adipose Tissue Secretion of PAI-1, but not IL-6,TNF $\alpha$  or Leptin in vivo: Horm Metab Res. 2002:698-702

# ステロイド投与量が骨壊死発生に及ぼす影響

## —動物モデルでの検討—

本村悟朗、山本卓明、宮西圭太、西田顕二郎、神宮司誠也、岩本幸英  
(九州大学整形外科)

ステロイド性骨壊死動物モデルでは、パルス療法に相当する大量ステロイド（メチルプレドニゾロン：MPSL 20mg/kg）投与で、再現性良く約 7 割に骨壊死が発生するが、その一方で約 3 割には骨壊死は発生していない。今回、ステロイド投与量を増やし 40mg/kg とすることによる骨壊死発生を検討した。その結果、96% (23/24 羽) に骨壊死発生を認めた。

### 1. 研究目的

ステロイド投与量は骨壊死発生における危険因子の一つである<sup>1)</sup>。ステロイド性骨壊死動物モデルにおいては、パルス療法に相当する大量ステロイド（メチルプレドニゾロン 20mg/kg）投与で、再現性良く約 7 割に骨壊死が発生するが、その一方で約 3 割には骨壊死は発生していない<sup>2,4)</sup>。

本研究では、動物モデルを用いて、ステロイド投与量を増量することによる骨壊死発生率の変化を検討した。

### 2. 研究方法

成熟日本白色雄家兎 44 羽を用いた。24 羽に対してはメチルプレドニゾロン（MPSL）40mg/kg を、20 羽に対しては MPSL 20mg/kg を、それぞれ一回のみ右臀筋内に注射した。両群とも MPSL 筋注後 4 週時に犠牲死とした。

骨壊死判定は、両大腿骨及び両上腕骨の近位 1/3 及び遠位部の（計 8 部位）の HE 染色標本を用いて病理組織学的に検索した<sup>5)</sup>。

骨壊死数は、骨壊死発生家兎 1 羽あたりの骨壊死発生数（最大 8）とした。

骨壊死の面積は、近位大腿骨部 HE 標本における骨壊死面積（mm<sup>2</sup>）を NIH image software を用いて計測した。

### 3. 研究結果

#### 骨壊死発生率

MPSL 20mg/kg 投与群では、20 羽中 14 に骨壊死発生を認め、発生率は 70%であった。一方、MPSL 40mg/kg 投与群では、24 羽中 23 羽に骨壊死発生を認め、発生率は 96%であった。両群間の骨壊死発生率は統計学的有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）。

#### 骨壊死の病理組織像（Figure 1）

両群とも、骨髓造血細胞壊死を伴い骨梁内骨細胞が empty lacnae を示す、典型的な骨壊死像を呈していた。

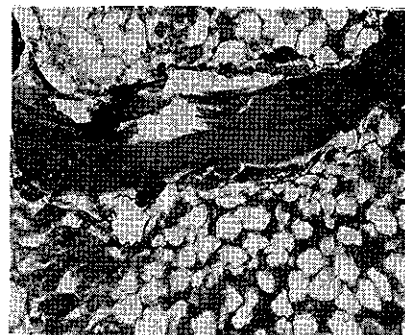


Figure 1. 周囲の骨髓造血細胞壊死を伴い骨梁内骨細胞が empty lacnae を呈している。

#### 骨壊死数及び骨壊死面積

MPSL 40mg/kg 投与群では、骨壊死数が  $2.4 \pm 1.2$  であり、MPSL 20mg/kg 投与群 ( $1.3 \pm 0.5$ ) に比し有

意に多発していた ( $p < 0.005$ )。骨壊死面積は両群間に有意差を認めなかった。

#### 4. 考察

これまで我々は、MPSL 5mg/kg 投与で、約4割に骨壊死が発生することを報告した<sup>6)</sup>。これより、ステロイド感受性の高い家兎においては比較的少量のステロイド投与で骨壊死が発生すると考えられる。一方、MPSL 40mg/kg 投与により96%に骨壊死が発生したことから、ステロイド感受性の低い家兎においても、投与量を増量することにより骨壊死が発生する可能性があると考えられた。

ステロイド感受性と骨壊死の関連について、浅野らはステロイド輸送蛋白の遺伝子多型と骨壊死発生の関連を<sup>6)</sup>、政田らはステロイド代謝酵素活性と骨壊死発生の関連をそれぞれ報告している。今後は、これらステロイド感受性に影響を及ぼすと考えられる因子とステロイド投与量との関連を検討していきたい。

#### 5. 結論

家兎において、メチルプレドニゾロン 40mg/kg 投与による骨壊死発生率は96%であった。

#### 6. 参考文献

- 1) Felson DT, Anderson JJ. Across-study evaluation of association between steroid dose and bolus steroids and avascular necrosis of bone. *Lancet*. 1987;18;1:902-6.
- 2) 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.
- 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) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Jingushi S, Iwamoto Y. Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 2004;50:3387-91.

5) Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, Inoue S, Okamoto M, Sugioka N, Nishino H, Tanaka T, Hirota Y, Kubo T. ABCB1 C3435T and G2677T/A polymorphism decreased the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after kidney transplantation. *Pharmacogenetics*. 2003;13:675-82.

6) 政田俊明、金城養典、大橋弘嗣、高岡邦夫. 家兎 CYP3A6 酵素活性から見たステロイド誘発特発性大腿骨頭壊死症(ION)の発生素因についての検討. 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症調査研究分科会 平成14~15年度総合研究報告書 2004:32-35.

#### 7. 研究発表

##### A. 論文発表

1) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Jingushi S, Iwamoto Y. Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum*. 2004;50:3387-91.

2) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Sueishi K, Iwamoto Y. Bone marrow fat-cell enlargement in early steroid-induced osteonecrosis - A histomorphometric study of autopsy cases-. *Pathol Res Pract*. In press.

##### B. 学会発表

1) 本村悟朗、山本卓明、宮西圭太、神宮司誠也、岩本幸英;ステロイド性骨壊死の予防へ向けた基礎的研究,第19回日本整形外科基礎学術集会(2004.10.21-22 東京)

2) 本村悟朗、山本卓明、宮西圭太、西田顕二郎、神宮司誠也、岩本幸英;ステロイド投与量が骨壊死発生に及ぼす影響 -動物モデルでの検討-,第31回日本股関節学会(2004.10.15-16 長崎)

#### 8. 知的所有権の取得状況

##### A. 特許取得

なし

##### B. 実用新案登録

なし

##### C. その他

なし

# 異なる種類のステロイド剤が骨壊死発生に及ぼす影響

宮西圭太、山本卓明、入佐隆彦、本村悟朗、神宮司誠也、岩本幸英（九州大学整形外科）

居石克夫

（九州大学大学院医学研究院病理病態学）

ステロイド性大腿骨頭壊死（以下、骨壊死）は、基礎疾患の治療に用いたステロイド剤の副作用として生じる疾患である。現在、基礎疾患の病態に応じて、さまざまな種類のステロイド剤が使用されている。今回我々は、ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルを用いて、3種類のステロイドの骨壊死発生への影響を検討した。

## 1. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死（以下、骨壊死）は、基礎疾患の治療に用いたステロイド剤の副作用として生じる疾患である。現在、基礎疾患の病態に応じて、さまざまな種類のステロイド剤が使用されているが、それらの骨壊死への影響を検討した文献は少ない。今回我々は、ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルを用いて、3種類のステロイドの骨壊死発生への影響を検討したので報告する。

## 2. 研究方法

ステロイド単独投与家兎骨壊死モデル<sup>1</sup>を用いた。実験は九州大学動物実験倫理委員会の承認を受け、そのガイドラインに沿って行った。39羽の日本白色家兎に対し、25mg/kg プレドニゾロン（PSL：コハク酸プレドニゾロンナトリウム：13羽）、20mg/kg メチルプレドニゾロン（MP SL：酢酸メチルプレドニゾロン：13羽）、20mg/kg トリアムシノロン（TR：酢酸トリアムシノロン：13羽）をそれぞれ1回筋肉内注射した。4週間後に大腿骨と上腕骨を採取し、組織学的に骨壊死の有無を検討した。ステロイド投与前後で血液データの解析を行った。

## 3. 研究結果

骨壊死病変では組織学的に骨髓や骨梁の壊死所見を認めた。MP SL投与家兎では、他の2剤に比べて繊維肉芽組織などの修復反応が少ない傾向があった。MP SL投与群での大腿骨近位における骨壊死発生は、

他の2剤より有意に高率であった（表1：p<0.01）。上腕骨近位では、MP SL投与家兎の骨壊死発生は、TRに比べて有意に高かった（表2：p<0.05）。血中コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸はステロイド投与後1～2週を中心にMP SL投与家兎で、他の2剤より有意に高値を示した（p<0.05）。

## 4. 考察

異なるステロイド剤の骨壊死発生に及ぼす影響は、基礎疾患や投与方法、投与量の違いにより臨床での評価が困難であることが多い。本研究では、3剤のステロイドのグルココルチコイド活性<sup>2</sup>、ステロイドの半減期（12～36時間）<sup>2</sup>、そして投与方法をそろえることで、正確なステロイド剤の骨壊死発生への影響検討を試みた。

表1. 家兎大腿骨における骨壊死発生<sup>1</sup>

ステロイド <sup>1</sup>	大腿骨数	骨壊死あり <sup>1</sup>	
		近位	遠位 <sup>1</sup>
PSL <sup>1</sup>	26	3 (12%)	3 (12%) <sup>1</sup>
MP SL <sup>1</sup>	26	17 (65%) <sup>*</sup>	8 (31%) <sup>1</sup>
TR <sup>1</sup>	26	4 (15%)	2 (8%)

PSL=prednisolone sodium succinate; MP SL=methylprednisolone acetate; TR=triamcinolone acetonide<sup>1</sup>

<sup>\*</sup>p<0.01 vs. PSL and TR<sup>1</sup>

表2 家兎上肢骨における骨壊死発生<sup>a)</sup>

ステロイド <sup>b)</sup>	上肢骨数	骨壊死あり <sup>c)</sup>	
		近位	遠位 <sup>d)</sup>
FSL <sup>e)</sup>	26	1 (4%)	0 (0%)
MPSL <sup>e)</sup>	26	6 (23%)*	0 (0%)
TR <sup>e)</sup>	26	0 (0%)	0 (0%)

FSL=prednisolone sodium succinate, MPSL=methylprednisolone acetate, TR=triamcinolone acetonide  
<sup>a)</sup> p<0.05 vs TR <sup>e)</sup>

MPSLは、高用量 (1mg/kg 以上) もしくはステロイドパルス療法で用いられる薬剤であり<sup>3)</sup>、骨壊死発生への関与が報告されている<sup>4, 5)</sup>。一方、TRは整形外科領域では関節内注射などの局所治療で用いられることが多いが、単独全身投与での骨壊死発生例は、我々が凌駕しえた範囲では確認できなかった。今回の実験結果は、これらのMPSLとTRの臨床での発生頻度にほぼ矛盾しなかった。一方、PSLは臨床では低～中用量で用いられ、骨壊死発生例を多く認めるのに対して、本実験では骨壊死発生率は低かった。この原因として、動物種による相違や、基礎疾患、投与方法などのバイアスの関与が考えられる。臨床においてステロイド剤の種類により骨壊死発生率が違うことが証明されれば、リスクの高い患者に対して適切なステロイド剤を選択することが新たな予防法の一つとなりうるかもしれない。

今回、MPSLは他の2剤と比べて高率に骨壊死を発生し、脂質代謝に対する影響も大きかった。MPSLは構造的にステロイド核の6α位にメチル基がついているのが特異的である。このコンポーネントは、特定の細胞でcytolysisを誘発することが知られており<sup>6)</sup>、今回の結果の構造的な原因の1つとして考慮する必要がある。そのほかアルブミンやcorticosteroid-binding globulinなどのステロイド結合蛋白やステロイドの体内吸収率の違いも原因として考えられ、これらの検討が今後の課題と思われる。

## 5. 結論

家兎において、メチルプレドニゾロン 40mg/kg 投与による骨壊死発生率は96%であった。

## 6. 知的所有権の取得状況

### A. 特許取得

なし

### B. 実用新案登録

なし

### C. その他

なし

## 7. 参考文献

- 1) Yamamoto T, Irida 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) USPDI. Corticosteroids - Glucocorticoid effects (systemic). In: Drug information for the health care professional. Greenwood Village: Micromedex Thomson Healthcare, 2002:1002-27.
- 3) Badsha H, Edwards CJ. Intravenous pulses of methylprednisolone for systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2003; 32:370-7.
- 4) Oinuma K, Harada Y, Nawata Y *et al.* Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:1145-8.
- 5) Nagasawa K, Ishii Y, Mayumi T *et al.* Avascular necrosis of bone in systemic lupus erythematosus: possible role of haemostatic abnormalities. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:672-6.
- 6) Waddell AW, Currie AR. A comparison of the effects of prednisolone and methylprednisolone on human lymphoblastoid cells. *Biochem J* 1977; 168:323-4.

# 家兎骨髓内微小循環系におけるステロイド剤の影響

## —新しい方法による生体骨髓内微小循環系の観察—

小林千益、堀内博志、酒井典子 (信州大学医学部整形外科)

我々はこれまで、骨髓内微小循環系に注目して、ステロイドを誘因とする特発性大腿骨頭壊死症(ION)の病態・病因の解明に取り組んできた。しかしステロイド剤を投与した際に、骨髓内微小循環系における機能的変化が骨内に生じ骨壊死にいたるのことは未だ解明されていない。IONの病態解明のためには、より生体に近い状態での観察が重要と考えられる。今回、蛍光物質を骨髓内微小循環系のトレーサーとして用いることによって家兎大腿骨内の微小循環系を *in vivo* で観察することが出来た。今後このモデルを用いてステロイド剤投与の際に生じる、骨髓内微小循環系の変化について解析を進める計画である。

### 1. 研究目的

我々はこれまで、骨髓内微小循環系に注目して、ステロイドを誘因とする特発性大腿骨頭壊死症(ION)の病態・病因の解明に取り組んできた。しかしステロイド剤を投与した際に、骨髓内微小循環系における機能的変化が骨内に生じ骨壊死にいたるのことは未だ解明されていない。IONの病態解明のためには、より生体に近い状態での観察が重要と考えられる。今回、我々は *in vivo* で家兎骨髓内微小循環系を観察可能なシステムを確立したので報告する。

### 2. 方法

動物は日本白色家兎(体重2kg、オス)を用いた。麻酔下に大腿外側を約4cm皮膚切開した後、伸筋および屈筋群間の筋間中隔で展開し大腿骨外側皮質に到達する。この展開では出血を最小限に抑えて大腿骨に到達可能である。その後、大転子から約15mmを中心として5から8mm程度幅約1mm外側皮質を削る(図1)。これらの操作はすべて実体顕微鏡下で行い、決して皮質を破って骨髓が露出しないようにする。これにより骨髓腔が薄ら観察出来る。次に実体蛍光顕微鏡下に視野を確保したのち、蛍光物質(FITCデキストラン;分子量77000、10mg/kg)を静脈内投与し骨髓内微小循環系を冷却カラーCCDカメラと実体生

体蛍光顕微鏡システムによって、動画および静止画像として観察可能となる。

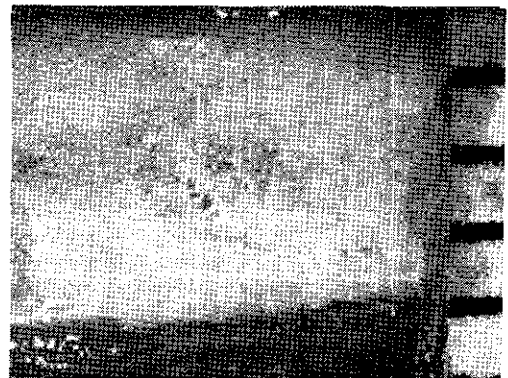


図1:

家兎大腿骨外側皮質を削ると、骨髓内が薄ら観察できる。目盛りは1mm。

### 3. 結果

今回の実験ではステロイド非投与家兎を用いた。蛍光物質を耳静脈から全身、投与後約20秒から大腿骨髄内において蛍光物質の分布が観察された。今回使用したFITCデキストランではまず毛細血管網に出現し、



それに引き続いて周囲の骨髄への蛍光物質の漏出も観察出来た。

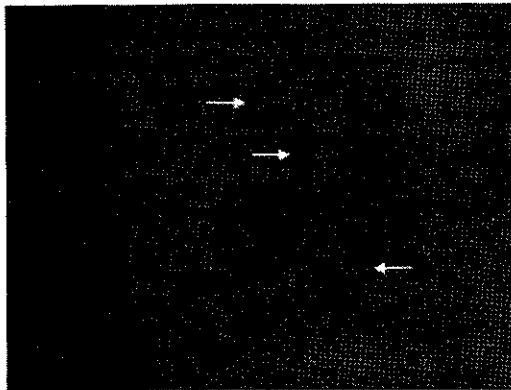


図2：  
蛍光物質を全身投与すると、蛍光顕微鏡下に骨髄内毛細血管網が観察出来る(矢印)。

#### 4. 考察

我々はこれまで、骨髄内微小循環系に注目して、ステロイドを誘因とする特発性大腿骨頭壊死症(ION)の病態・病因の解明に取り組んできた。しかしステロイド剤を投与した際に、骨髄内微小循環系における機能的変化が骨内に生じ骨壊死にいたるのかは未だ解明されていない。

我々は当初血管内皮細胞がステロイド剤により apoptosis に陥るのではないかと仮説を立案した。しかしながら、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)を用いた研究ではステロイド剤により HUVEC が apoptosis に陥るという現象は確認出来なかった<sup>9)</sup>。その後、当班会議からも血管内皮細胞に注目した研究成果が報告されている<sup>23)</sup>。

我々は平成 11 年よりステロイド投与家兎骨壊死モデルを用いた、大腿骨骨髄内抵抗血管の生理・薬理的検討を行ってきた。ステロイド投与後 7 日目での観察を、既に報告してきている。ステロイド剤投与家兎から採取した大腿骨骨髄内抵抗血管において、COX-アラキドン酸の反応が亢進していることが明らかになった。この反応はステロイド非投与家兎には見られなかった。また、ステロイド投与家兎から採取した大腿動脈においては、COX-アラキドン酸系の亢進は認めな

かったことから、この反応はすべての血管で生じているものではないことが判明し、骨髄内固有の反応である可能性も示唆されている。さらにこの COX-アラキドン酸系の亢進はインドメタシンおよび選択的 COX-2 阻害剤である NS398 で抑制された。また、これらの薬物をステロイド剤と同時にあらかじめ家兎に投与することで、骨壊死発生を有意に抑制出来ることも見出している<sup>9)</sup>。

我々の標本は生体反応性を保っていたとはいえ、摘出標本での研究(ex vivo)であった。我々は ION の病態解明のためには、より生体に近い形での骨髄内循環の観察が重要と考えている。今回、蛍光物質を用いることにより in vivo で家兎骨髄内微小循環系を観察可能なシステムを確立出来た。

今後は、ステロイド投与により骨髄内循環がどのような変化を受けているのか、観察していく計画である。ステロイド投与からの時間、蛍光物質の分子量を変えていくいくつかの因子について観察可能と考えている。現在班会議で、ステロイド投与後に骨髄内微小循環系におこる変化として、いくつかの可能性が挙げられている。この実験系を用いることで、循環系の生体における観察可能であり成果が期待できると考えている。

#### 5. 参考文献

- 1) 比佐健二ほか：血管内皮細胞における TNF- $\alpha$  とステロイドの影響。厚生省骨関節系疾患調査研究班、平成 9 年度研究報告書。138-141,1998.
- 2) Iida, T. et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells* 7: 143-149,2002
- 3) Iuchi, T. et al. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92:81-87,2003.
- 4) 堀内博志ほか。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：骨壊死予防の可能性の検討。特発性大腿骨頭壊死症調査研究分化会、平成 15 年度研究報告書。27-29,2004.

# 新たなマウス骨壊死モデル作成の試み

田中 栄 (東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科)

特発性大腿骨頭壊死症は壮年期成人に好発し、その罹患によって股関節が破壊され、起立歩行障害により QOL が著しく侵される疾患である。その病態の分子メカニズムはいまだに明らかではないが、研究が困難な理由の一つは適当な動物モデル、とくにマウスなど遺伝子改変が容易であるような動物のモデルが存在しないことである。われわれは現在マウス尾部結紮による新しい骨壊死モデルを作成中である。その途中経過について報告する。

## 1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死 (Idiopathic Osteonecrosis of the femoral head, ION) は壮年期成人に好発し、その罹患によって股関節が破壊され、起立歩行障害により QOL が著しく侵される疾患である。その真の原因は明らかではないが、主たるリスクファクターとしては、ステロイド剤の投与、アルコール愛飲などがあげられており、このような背景因子の元に、何らかの原因で大腿骨頭部の阻血が生じ、骨細胞の壊死が生じるものと考えられている。しかしながら阻血から骨細胞壊死に至る分子メカニズムは不明なままであり、そのことが疾患の有効な予防法、治療法の開発を困難なものにしている。

このような病態を解析するためには適当な動物モデルの開発がきわめて有用である。これまでにウサギを用いたステロイド骨壊死モデルが広く使われており、これによって多くの重要な知見が得られてきた。しかしながら骨壊死のメカニズムをさらに詳細に検討するためには、分子生物学的改変が容易であり、すべてのゲノムが明らかにされているマウスのモデルを作成することは、多くのメリットを有すると考えられる。われわれの本研究室における目的は、マウス骨壊死モデルを作成し、骨細胞壊死に至る過程を分子生物学的に検討することである。

## 2. 研究対象

### A. マウス尾部結紮モデル

8週齢の ddy マウスを使用し、尾部を巻きワイヤ

一で結紮し、2, 4, 8時間後に結紮を解除する。血流再開後、7日後に結紮部の近位、遠位部の尾椎を採取、ホルマリン固定を行い、EDTA 脱灰後、組織学的検討に供した。骨細胞アポトーシスは TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 染色によって検討した。コントロールとしては結紮直後に sacrifice したものと、および結紮の近位部の骨組織を用いた。

### B. マウス尾部切断モデル

やはり8週齢のマウスの尾部を切断し、これを乾燥させないように湿潤な環境に保ち、2, 4, 8, 24時間後にホルマリン固定し、EDTA 脱灰後に組織学的に検討した。コントロールとしては切断直後に固定した組織を用いた。

## 3. 研究結果

結紮モデルにおいて、2時間、4時間阻血の尾椎ではほとんど組織学的な異常は認められなかったが、8時間阻血尾椎では阻血遠位において empty lacunae の出現が認められた。また TUNEL 染色において陽性に染色される骨細胞の出現が認められた。一方結紮部の近位ではほとんど TUNEL 陽性細胞は認めず、empty lacunae も認めなかった (図1)。

一方尾部切断モデルにおいては24時間後も明らかな empty lacunae の出現は認めなかったが、TUNEL 陽性細胞は多数観察された。

阻血部近位

阻血部遠位

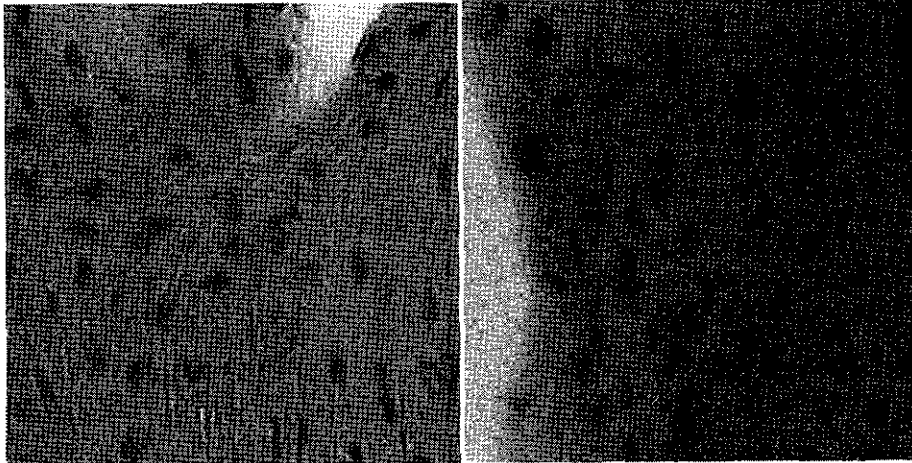


図1:

8時間の尾部阻血、再環流後7日後の阻血部近位、遠位における骨細胞アポトーシスを TUNEL 染色で検討した。阻血部遠位において TUNEL 陽性細胞が多数観察される。

#### 4. 考察

細胞死には大きく分けて「ネクロシス」と「アポトーシス」という二つの形態が存在することが知られている。「ネクロシス」という言葉は外的な要因で細胞が死に至る過程を指しており、細胞質や細胞小器官（特にミトコンドリア）の崩壊が主であり、細胞核にはあまり変化が起こらないのが特徴である。一方の「アポトーシス」は細胞にプログラムされた死のことであり、細胞核の変化（DNAの断裂）が主であり、細胞質や細胞小器官（ミトコンドリアなど）にはあまり変化がない。ION の定義はあくまで臨床的なものであり、厳密な定義で細胞の「ネクロシス」が起こっていることを意味する訳ではない。実際に Manolagas らのグループは、ION における骨壊死に骨は骨細胞のアポトーシスが関与している可能性を示している。

今回われわれは、「背景となるファクターがいかなるものであれ、ION の本体は大腿骨頭部の阻血であり、阻血によって誘導される骨・骨髄細胞へのダメージである」との仮説に基づき、確実に阻血時間、阻血の程度がコントロールできる骨壊死動物モデルの作成を試みた。また動物種としてマウスを選択することによって様々な遺伝子改変動物の利用、ゲノム情報の利用が可能になることが期待された。尾部結紮モデル、尾部切断モデルともに阻血の誘導は確実であり、阻血、あるいは再環流の時間も厳密にコントロールが可能であ

る。今後これらのモデルを利用することによって、①どの程度の阻血によって骨細胞、骨髄細胞、血管内皮細胞などに不可逆的なダメージが加わるのか、②いかなる細胞内情報伝達機構が阻血によるこれらの細胞の細胞死誘導に関与しているのか、などが明らかになることが期待される。

#### 5. 健康危険情報

特になし

#### 6. 業績

##### A. 論文発表

- 1) Seto H, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Hiraoka H, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, Tanaka S. Distinct Role of Smad Pathways and p38 Pathways in Cartilage-specific Gene Expression in Synovial Fibroblasts. *J Clin Invest* 2004, 113, 718-726.
- 2) Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem*, 2004, 279, 17660-6.
- 3) Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada K, Juji T, Tanaka S, Oda H, Shukunami C,

- Nishizaki Y, Hiraki Y, Yamamoto K.  
Chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor, suppresses T cell response; an implication of a therapeutic potential for the treatment of arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 828-839.
- 4) Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, Kawaguchi H. Osteoclast Differentiation by RANKL Requires NF-kappaB-Mediated Downregulation of Cyclin-Dependent Kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res.* 2004, 19:1128-1136.
  - 5) Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 2004, 114:475-484.
- 「骨粗鬆症治療薬の最新の話題」
- 8) 日本医師会生涯教育制度適合学術集会 (2004.10.7) 大分 「骨粗鬆症治療の新世紀」
  - 9) 第19回日本整形外科基礎学術集会 (2004.10.22) 東京 教育研修講演 「関節破壊の分子メカニズムとその治療戦略」
  - 10) ハイペン発売10周年記念講演会 (2004.10.28) 神戸 特別講演 「関節リウマチの新しい治療戦略」
  - 11) Bone and Joint Research Club～骨と関節の代謝調節を考える基礎の会～ (2004.11.13-14) かずさ 特別セッション 「細胞内シグナル伝達をターゲットにした疾患治療法の開発～新しい時代の創薬をめざして～」 「細胞内シグナル伝達をターゲットにした骨関節疾患治療戦略」
  - 12) 千葉市医師会講演会 (2004.11.17) 千葉 「骨粗鬆症の臨床アップデート～整形外科の立場から～」

## B. 学会発表

- 1) 茨城県保険医協会・県南地区医師会学術講演会 (2004.5.25) 土浦 「運動器疾患の治療戦略」
- 2) 第21回日本TDM学会・学術大会ランチョンセミナー (2004.6.6) 大阪 「骨破壊をターゲットにした新しい骨代謝疾患治療法の開発」
- 3) 第30回 日本整形外科スポーツ医学会学術集会 (2004.7.3) 東京 シンポジウムIII 関節軟骨修復術の基礎と臨床 “Molecular mechanism of joint destruction and possible therapeutic approach toward cartilage repair”
- 4) 大阪整形外科症例検討会 特別講演 (2004.7.10) 大阪 「骨破壊をターゲットにした関節リウマチ治療戦略」
- 5) エビスタ販売記念講演 (2004.7.24) 盛岡 「骨粗鬆症治療の新世紀～Is the paradigm shifting?～」
- 6) 第22回日本骨代謝学会 (2004.8.7) 大阪 シンポジウムII 関節リウマチと変形性関節症における骨破壊分子メカニズムと治療 「関節炎における骨破壊メカニズムとその制御」
- 7) 第1回 横浜骨粗鬆症研究会 (2004.9.9) 横浜

## 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定含む)

- A. 特許取得  
なし
- B. 実用新案登録  
なし
- C. その他  
なし