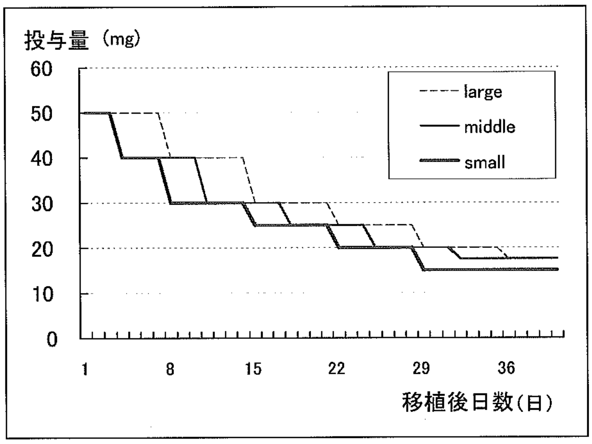


図 1 ステロイド投与プロトコール

統計学的検討の結果を表 1 に示す。移植時年齢に関しては、年齢が高くなるとオッズ比（odds ratio、以下 OR）が Adjusted OR = 1.045（p = 0.0184）とごく軽度ではあるが有意に上昇した。性別については有意差は得られなかった。免疫抑制剤については、タクロリムスに対するシクロスポリンの ION 発生に関する OR は Adjusted OR = 1.582 であったが、有意ではなかった（p = 0.2450）。移植腎の種類では Adjusted OR = 1.298（p = 0.7143）、急性拒絶反応に対するパルス投与の影響はパルス投与のない症例に対して Adjusted OR = 0.721（p = 0.5523）、そして HLA マッチング数についても Adjusted OR = 0.855（p = 0.7963）と、これらの項目については有意差は得られなかった。経口ステロイド投与量のプロトコールに関しては、ION の発生率を比較すると、現在用いられている small に対して middle では有意な OR の上昇を認めなかったが、large で Adjusted OR = 3.197（p = 0.0479）と OR が有意に上昇した。

4. 考察

われわれは、平成 12 年度研究報告書[1]で、2 施設のステロイド投与量や併用免疫抑制剤を調査して、腎移植後 ION の発生率について検討を行った。そして、腎移植後 8 週でステロイド投与量と ION 発生の間に有意な関係があることを確認した。平成 16 年度研究報告書において田中ら[2]は、経口ステロイド投与歴のある症例は、投与歴のない症例に対して ION 発生率の OR が 13.5（p = 0.000）であり、ION 発生に対してステロイド投与の影響が非常に強いことを示した。また、坂井ら[3]は腎移植症例に関して、タクロリムス使用群とシクロスポリン使用群の間で比較を行い、ステロイド総投与量およびパルス投与量のいずれにも有意差がないにもかかわらず、両群間に ION 発生率の明らかな差を認めたことから、免疫抑制剤の選択によって ION 発生を抑制できる可能性を報告した。急性拒絶反応に対するパルス投与と ION 発生率の関与に関する報告では、廣田ら[4]は平成 10 年度研究報告書で症例・対照研究を行い、パルス投与量について OR の有意差を認めなかったとした。

今回の研究結果では、経口ステロイド投与プロトコール間で、OR に有意差を認めた。すなわち術後 28 日までの経口ステロイド総投与量と ION 発生の間に有意な関係があることが確認できた。免疫抑制剤の違いや急性拒絶反応に対するパルス投与の有無についてはわれわれの先の報告[1]と同様、OR に有意差を認めなかった。ION 発生において、免疫抑制剤や急性拒絶反応に対するパルス投与の影響は否定できないが、ステロイド投与量がより強い影響力を持つと考える。

経口ステロイド投与プロトコールの large と small の間で ION 発生率に有意差を認めたが、これまでの報告と異なって注目すべきことは、large と small の違いは術後 28 日までの投与量であることと、その投与量はそれぞれ 1015mg と 815mg で差は 28 日間で 200mg のみとごくわずかであることである。28 日以後のステロイド投与量はほぼ同一でありプロトコール間でほとんど差はない。すなわち、術後 28 日までという早期のステロイド投与量が ION 発生率に有意に影響することが確認できた。これは、ION の予防時期を考える上で大切な事実であり、ION を予防できる時期はステロイド投与開始直後のごく限られた時間でしかないことを示している。また、28 日間の合計で 200mg（28 日間の総投与量の約 20～25％、1 日平均投与量で考えると約 7mg）というわずかなステロイド投与量の違いが ION 発生率に有意に影響することも判明した。このことは投与量の微妙なコントロールで ION 発生を抑制できる可能性を意味し、遺伝子診断やステロイド代謝酵素活性の測定などによってステロイド投与量を調節して個別化を行うこと（tailor maid medicine）の重要性を示すものであると考える。

5. 結論

腎移植症例を対象として ION 発生の危険因子について統計学的に検討した。ION 発生と免疫抑制剤、急性拒絶反応に対するパルス投与との関連は認めな

かった。手術時年齢が高くなるとORが軽度に上昇した。術後28日までのわずかなステロイド投与量の差がION発生率に有意に影響していることが確認できた。術後早期の、そして少量のステロイド投与量の調節でION発生を予防できる可能性があると考える。

6. 研究発表

1. 論文発表
   なし
2. 学会発表
   なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

8. 参考文献

1) 久保俊一, 柴谷匡彦, 藤岡幹浩, 中村文紀, 上島圭一郎, 濱口裕之, 小嶋晃義, 淺野武志, 坂井孝司, 菅野伸彦, 西井 孝, 大園健二. 2施設間における腎移植後大腿骨頭壊死症の比較. 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12年度研究報告書:84-86, 2000
2) 田中 隆, 廣田良夫. 特発性大腿骨頭壊死症の発生要因—多施設共同研究・対照研究—. 平成12年度分担研究報告書:1-5, 2005
3) 坂井孝司, 菅野伸彦, 山崎 聡, 西井 孝, 原口圭司, 大園健二, 越智隆弘, 小角幸人, 高原史郎, 奥山明彦. 腎移植患者における特発性大腿骨頭壊死症 FK506投与群とCYA投与群の比較. 骨・関節系疾患調査研究班特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会平成10年度研究報告書:212-213, 1999
4) 廣田良夫ら. ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生要因:腎移植患者における症例・対照研究. 骨・関節系疾患調査研究班特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会平成10年度研究報告書:169-174, 1999

表1:統計解析結果

	Cases (N=35)	ONF Controls (N=176)	P value	Odds Ratio Crude OR (95%CI)	P value	※Adjusted OR (95%CI)	P value
Age							
Median	41.37	35	0.0183***	1.034 (1.005-1.063)	0.02	1.045 (1.007-1.083)	0.0184
(Range)	(24-63)	(4-69)					
Mean	41	35.5					
Gender							
Male	22 (62.86%)	127 (72.16%)	0.2699*	0.653 (0.305-1.3972)	0.2718	0.613 (0.274-1.376)	0.2357
Female	13 (37.14%)	49 (27.84%)		1		1	
Immunosuppressant							
Cyclosporine	24 (68.57%)	102 (57.95%)	0.2422*	1.582 (0.730-3.431)	0.245	1.575 (0.617-4.024)	0.3422
Tacrolimus	11 (31.43%)	74 (42.05%)		1		1	
Kidney							
Living	28 (80.00%)	158 (89.77%)	0.1466**	1			
Cadaveric	7 (20.00%)	18 (10.23%)		2.194 (0.839-5.738)	0.109	1.298 (0.321-5.258)	0.7143
Acute Rejection							
Absent	30 (85.71%)	142 (80.68%)	0.4836*	1		1	
Present	5 (14.29%)	34 (19.32%)		0.696 (0.252-1.927)	0.4858	0.721 (0.246-2.119)	0.5523
HLA							
6 or 3 match	21 (60.00%)	125 (71.02%)	0.1971*	1		1	
Absent	14 (40.00%)	51 (28.98%)		1.634 (0.771-3.461)	0.1998	0.855 (0.260-2.809)	0.7963
Steroid Dose							
Small	5 (14.9%)	49 (27.84%)		1		1	
Middle	12 (34.29%)	70 (39.77%)		1.68 (0.556-5.074)	0.3576	2.400 (0.739-7.794)	0.1451
Large	18 (51.43%)	57 (32.39%)	0.0235***	3.095 (1.070-8.949)	0.0371	3.197 (1.011-10.108)	0.0479
		Trend: P=0.0256				Trend: P=0.0502	

*:Chi-square test
**:Fisher's exact test
***:Wilcoxon's rank sum test
****:Mantel extension method
※This model includes ALL

腎移植患者の骨壊死発生の危険因子

高尾正樹、菅野伸彦、西井　孝、三木秀宣、小山　毅、花之内健仁、中村宣雄、吉川秀樹
（大阪大学大学院医学研究科　整形外科）

1986年から2003年にかけて当院で腎移植をおこなった332例のうち、233例(70.2%)に両股関節、両膝関節のMRIスクリーニングをおこない、11例(4.7%)に骨壊死発生を認めた。今回腎移植後の骨壊死発生の危険因子を移植後早期の投与薬剤、腎機能に着目して調査をおこなった。

1.　研究目的

腎移植患者の骨壊死の発生頻度はMRIを用いたprospective　screeningで4.0-13.7%と報告され[1-4]、その発生時期は移植後早期の2-12wと報告されている[5]。その一方、腎移植患者の骨壊死発生の危険因子を移植後早期に着目して解析した報告は少ない。本研究の目的は腎移植後の骨壊死発生の危険因子を移植後早期の投与薬剤、腎機能に着目して調査することである。移植後の平均入院期間が6-8週のため、今回調査期間を詳細な経過が把握しやすい6週とした。

2.　研究方法

1986年から2003年にかけて当院で腎移植を行った332例のうち、両股関節、両膝関節のMRIスクリーニングをおこなった233例(70.2%)を対象とした。入院中の移植チャートをもとに、性、移植時年齢、体重、移植腎の種類(死体腎、生体腎)、免疫抑制剤の種類、ステロイド総投与量(移植後6週)(プレドニゾロン換算)、メチルプレドニゾロン大量静注量、回数、プレドニン1日平均投与量を調査した。また、移植後早期の腎機能として、delayed graft function(DGF;移植腎の機能獲得が遷延し移植後1週間以内に透析を要する場合)の有無を調査した[6,7]。移植後後期の腎機能として移植後6週のCr/BUN濃度を調査し、急性拒絶反応の有無も腎生検結果をもとに調査した。骨壊死発生に関連する因子を検出するためロジスティック回帰モデルによるオッズ比の算出をおこなった。$P<0.05$を統計学的に有意とした。

3.　研究結果

MRI screeningの結果、大腿骨頭壊死症を8例、大腿骨顆部壊死症を5例に認め、合計11例に骨壊死の発生を認めた。骨壊死の発生頻度は4.7%であった。単変量解析の結果(表1)、年齢、性別、体重、免疫抑制剤では有意なオッズ比の変化は認めず、死体腎で有意なオッズ比の上昇を認め、オッズ比は5.05倍(95%CI;1.39-19.5)であった。ステロイド投与量は、ステロイド総投与量(プレドニゾロン換算)、メチルプレドニゾロン大量静注量、回数、プレドニン1日平均投与量いずれにおいても有意はオッズ比の変化を認めなかった。移植腎機能との関連であるが、移植後1週以内に透析を要するdelayed　graft　function(DGF)で有意なオッズ比の上昇を認め、オッズ比は8.19倍(95%CI;2.27-29.4)であった。移植後6週のクレアチニン濃度、BUN濃度も有意差を認めオッズ比はそれぞれ1.60倍(95%CI;1.12-2.30)、1.45倍(95%CI;1.14-1.85)であった。急性拒絶反応では有意なオッズ比の変化を認めなかった。

DGF症例と骨壊死発生との関連を見るために、単変量解析で有意なリスク因子であった死体腎と境界域の有意差を示したステロイド総投与量にて多変量解析したところDGFで有意なオッズ比の上昇を認めオッズ比は6.41倍(95%CI;1.21-33.3)であった(表2)。DGFは全233症例の19.4%にあたる46例に認め、DGF症例の骨壊死発生頻度は15.2%、非DGF症例では1.3%であった。

表1. 単変量解析結果

変量（単位）	Crude OR (95%CI)	P Value
年齢（歳）	1.05 (0.99-1.12)	0.11
男性	1.65 (0.43-6.38)	0.47
体重 (kg)	1.01 (0.95-1.09)	0.68
死体腎	5.05 (1.39-19.5)	0.01
免疫抑制剤;Tacrolimus	0.62 (0.12-2.92)	0.54
総ステロイド投与量(g)	1.35 (0.96-1.91)	0.08
MP 大量静注量(g)	1.52 (0.96-2.39)	0.07
MP 大量静注回数（回）	1.16 (0.97-1.39)	0.09
PSL 一日平均量(5mg)	1.02 (0.58-1.80)	0.94
DGF	8.19 (2.27-29.4)	0.001
血清 Cr (mg/dl) (6w)	1.60 (1.12-2.30)	0.009
血清 BUN (10mg/dl) (6w)	1.45 (1.14-1.85)	0.002
急性拒絶反応	1.80 (0.53-6.11)	0.34

MP、メチルプレドニゾロン
PSL、プレドニゾロン

表2. 多変量解析結果

変量（単位）	Adjusted OR (95%CI)	P Value
死体腎	1.85 (0.38-9.00)	0.44
総ステロイド投与量(g)	1.37 (0.92-2.03)	0.11
DGF	6.41 (1.21-33.3)	0.02

4. 考察

単変量解析、多変量解析の結果、移植腎の機能獲得が遷延し移植後1週以内に透析を要するDGF症例で骨壊死発生のリスクが高かった。DGFは移植腎のreperfusion injuryや急性拒絶反応が主な原因とされているが、遺伝的な凝固線溶系障害も関連するとも報告され、急性拒絶反応を続発しやすいことも報告されている[6,7]。エンドセリンが分泌され血管収縮を起こしやすくなるとも報告されている[6]。DGFを示す症例はその背景に骨壊死発生と関連する因子有しているものが多く、その結果骨壊死発生のハイリスク群となっている可能性が考えられた。

ステロイド投与量と骨壊死発生に関しては、単変量解析では総投与量、大量静注量、回数では境界域の有意差を示したが、死腎移植やDGFで補正した多変量解析では有意ではなかった。症例数が11と少ないので、今後症例数の増加とともにさらに検討が必要であると考えられた。

5. 結論

腎移植233例のMRI screeningにて、11例に骨壊死(4.7%)を認め、移植早期に腎機能が不良であるDGF症例で骨壊死発生が有意に多かった。

6. 研究発表

1. 論文発表
   なし
2. 学会発表

1) 高尾 正樹、菅野 伸彦、西井 孝、三木 秀宣、小山 毅、花之内 健仁、吉川 秀樹: 腎移植患者の骨壊死発生の危険因子。第32回日本股関節学会、新潟、2005.11.7.

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

8. 参考文献

1) Kopecky KK, Braunstein EM, Brandt KD, Filo RS, Leapman SB, Capello WN, Klatte EC. Apparent avascular necrosis of the hip: appearance and spontaneous resolution of MR findings in renal allograft recipients. Radiology. 1991;179:523-7.
2) Mulliken BD, Renfrew DL, Brand RA, Whitten CG. Prevalence of previously undetected osteonecrosis of the femoral head in renal transplant recipients. Radiology. 1994;192:831-4.
3) Le Parc JM, Andre T, Helenon O, Benoit J, Paolaggi JB, Kreis H. Osteonecrosis of the hip in renal transplant recipients. Changes in functional status and magnetic resonance imaging findings over three years in three hundred five patients. Rev Rhum Engl Ed. 1996;63:413-20.
4) Lopez-Ben R, Mikuls TR, Moore DS, Julian BA,

Bernreuter WK, Elkins M, Saag KG. Incidence of hip osteonecrosis among renal transplantation recipients: a prospective study. Clin Radiol. 2004;59:431-8.

5) Kubo T, Yamazoe S, Sugano N, Fujioka M, Naruse S, Yoshimura N, Oka T, Hirasawa Y. Initial MRI findings of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in renal allograft recipients. Magn Reson Imaging. 1997;15:1017-23.
6) Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation Lancet. 2004;364:1814-27.
7) Pieringer H, Biesenbach G. Risk factors for delayed kidney function and impact of delayed function on patient and graft survival in adult graft recipients. Clin Transplant. 2005;19:391-8.

SHRSP 大腿骨頭壊死に対するPentosan 投与(2)

熊谷謙治、村田雅和、宮田倫明、穂積 晃、尾崎 誠、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)
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 を投与した 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。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 負荷 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 負荷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ている。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要因として以前の研究から推定されている。また 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探索、検討が大腿骨頭壊死研究班会議 病態解析IIの課題である。前回より Pentosan に着目し、その有効性を検討している。今回の目的は実験数の増加や薬量の増加で、SHRSPのSteroid Hormone負荷大腿骨頭壊死における Pentosan 投与実験 Protocol の開発を進めることである。

2. 研究方法

【材料と方法】

ラットは長崎大学先導生命科学研究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 47 匹を使用した。

Pentosan とSteroid hormone の投与で Steroid Hormone 投与群(以下 S 群と略す)、Pentosan 投与群(以下 P 群と略す)、Pentosan および Steroid Hormone 投与群(以下 PS 群と略す)、control 群(以下 C 群と略す)の4群を作成した。Steroid Hormone は 15 週齢で methylpredonisolone acetate 8mg(およそ 30mg/kg)を背部に筋注した。Pentosan として Arthropharm 社の CaXPS 8mg(約 30mg/Kg)を毎週背部に筋注した。

17 週齢目に犠牲死とし、心臓採血にて血液を採取し、また両大腿骨頭を採取した(図1)。

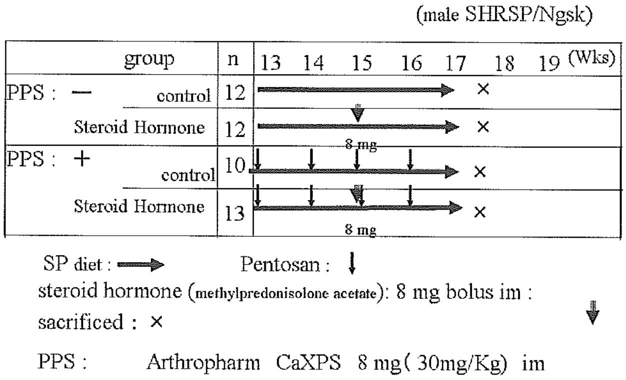


図1 材料と方法

飼育はアニマルセンターで通常ラットケージを使用し、定期的に観察し、各週に血圧,体重を検量した。屠殺解剖後、生化学凝固能などを検査し、薄切永久標本を作製して、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。

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、脂肪細胞辺縁と骨髄細胞と骨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.　研究結果

Pentosan 投与で体重の減少はなく、順調に生育した。またSteroid Hormone の負荷で体重は有意に減少した（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がSteroid Hormone非投与に比較し有意に増加し、著明な高脂血症を呈していた。Pentosanを投与することにより、総コレステロール値、HDL値、トリグリセライド値がSteroid Hormone非投与に比べ、有意に減少していたが、更にSteroid hormoneを加えると、有意にHDLは減少し、LDLは増加した。いずれも電解質は正常であった（図2）。

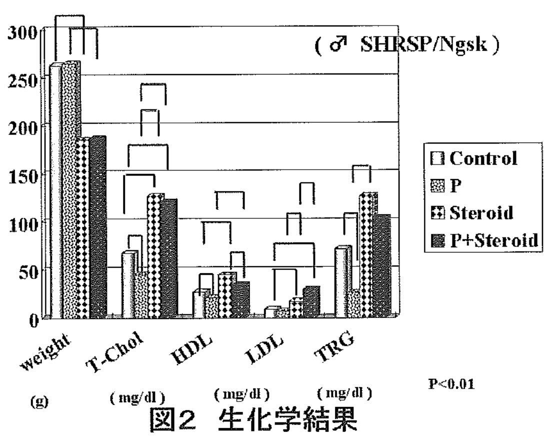


図2　生化学結果

血液凝固能(aPTT, PT)では、各群間に有意な差は認めなかった。

大腿骨頭の壊死の頻度はSteroid hormoneを非投与で比較すると、C群は50％、P群では20％であり、有意に減少していた。Steroid hormone投与群においてはS群では75％に対し、PS群では65.4％であり、減少傾向はみられるが有意差は認めなかった(表1)。

表1　大腿骨頭壊死の頻度

	PPS：－		PPS：＋	
Control	12 /24	50.0%	4 /20	20.0 %
Steroid Hormone	18/24	75.0 %	17 /26	65.4 %

＊＊：P<0.01
＊：P<0.05

また壊死像の光顕観察（H&E染色）では修復反応の少ない典型的なものが大部分であった。大腿骨頭血管はPentosan投与による影響は見出せなかった。
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。C群においては、抗4-HNEモノクローナル抗体では、Epiphysis・Metaphysisともに、脂肪細胞壁の染色性が軽度みられ、骨髄球では一部に、染色性を認め、骨細胞の染色は認めなかった。抗8-OHdGモノクローナル抗体では、染色性はほとんど認めなかった。S群においては、抗4-HNEモノクローナル抗体ではEpiphysis・Metaphysisともに、脂肪細胞壁および骨髄球の染色性が共に強く、また骨細胞にも一部、染色性を認めた。抗8-OHdGモノクローナル抗体では、Metaphysisと骨髄球に染色性を認めた。P群においては、抗4-HNEモノクローナル抗体ではEpiphysis・Metaphysisともに、脂肪細胞壁の染色性を軽度認めた。骨髄球は一部、染色性を認めるも、C群に比べ、やや減弱していた。抗8-OHdGモノクローナル抗体では、C群と同様に、染色性はほとんど認めなかった。PS群においては、抗4-HNEモノクローナル抗体ではEpiphysis・Metaphysisともに、脂肪細胞壁の染色性を軽度認めた。骨髄球の一部に染色性を認め、またEpiphysisの骨細胞の一部にも染色性を認めた。抗8-OHdGモノクローナル抗体では、Epiphysis・Metaphysisともに、一部染色性を認め、S群よりは減弱していた。

免疫染色の結果をまとめると、抗 4-HNE モノクローナル抗体では S 群が著明に Epiphysis、Metaphysis ともに、

強い染色性を認め、以下PS群、C群、P群と減弱していった(図3)。

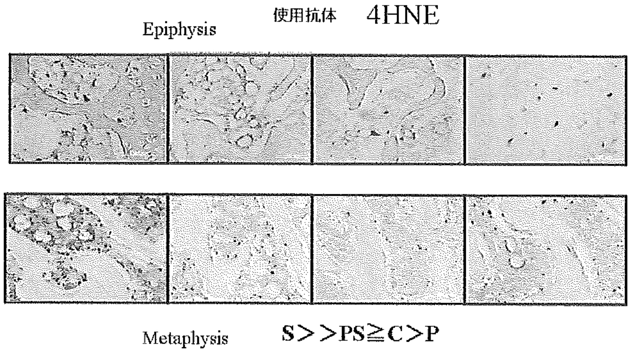


図3　免疫染色の検討

抗8-OHdGモノクローナル抗体では、S群、PS群の順で染色性が減弱していた。C群、P群においては、染色性はほとんど認めなかった(図4)。

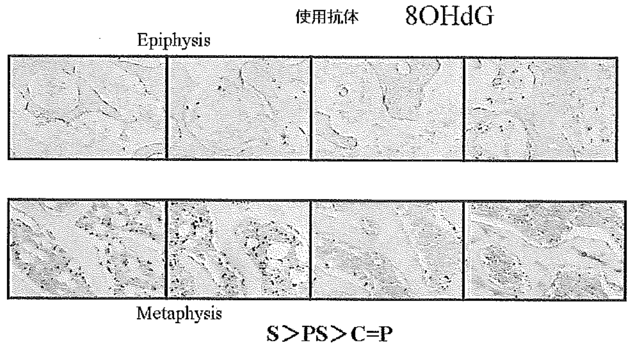


図4　免疫染色の検討

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やすい。実験的には動物に、Steroid Hormoneの薬物負荷し、大腿骨頭の無腐性壊死を生じさせている。Steroid Hormoneの血管作用で内皮の障害や酸化stressが注目され、Steroid Hormoneの負荷で高脂血症や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。今までのSHRSPラットを使用した研究ではSHRSPの大腿骨頭がWKYのものより酸化stressに曝され、Steroid Hormoneの負荷で酸化stressが増大すること。Steroid Hormoneの負荷で高脂血症を呈すること。壊死の発生頻度との関係では、脂質系で特にトリグリセライドの上昇の相関が高いことが推定されている。Steroid Hormoneの投与による大腿骨頭壊死の大腿骨頭末梢循環の改善薬剤の候補は多岐にわたり、warfarin, heparinなどの抗凝固薬やStatin系の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。

前年度報告書のよう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であるPentosanを大腿骨頭壊死症に対して予防薬、改善薬としての有効性を検討している。

PentosanはPeter GhoshがSeminars in Arthritis and Rheumatism, 1999で述べているように毛細血管内皮からt-PAやSODの放出を刺激することによってfibrinや脂質による閉塞物を動化させ血流の改善し、また血小板の活性化とPAI-1の放出の閾値を増加させる循環動態の改善作用が特に期待される。今回、Pentosan群でcontrol群と比べて壊死発生頻度の改善した理由を考察すると、上記のPentosanの作用機序として、循環動態の改善に加えて、血液生化学的改善がみられたことから高脂血症の改善の作用が大きな役割をなしたと思われる。PentosanはHeparin類似薬と分類され、Heparinの血管内皮に存在するリパーゼを遊離させて血中の特にトリグリセライドを低下させる作用がみられたものと思われる。

Steroid hormone負荷でPentosanの壊死抑制効果が有意にみられなかった理由は、ラット1匹当たりmethylpredonisolone acetate 8mg投与しており、これは、人間に換算すると1500mgを1回投与したことになり、大容量になる。そのため、ペントサンの作用を上回るSteroid hormone負荷で抑制効果がみられなかったと考えられる。また今回の酸化stressに関する免疫組織学的な結果も合致している。

このことは前回の実験がmethylpredonisolone acetate 3mgの投与量で大腿骨頭の壊死の頻度はPentosanで抑制されたことやまた酸化stressも抑制されたが、今回その抑制作用が弱い理由になると思われる。

今回実験数的にはある程度満足のいくものであるが、Steroid Hormone投与量が1尾あたり8mgと多すぎて、評価できるものとは言い難い。

しかし、Steroid Hormone非負荷では、Pentosanによる抑制効果がみられており、投与開始時期に関しては満足行くものと考える。今後用量を変えて週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

1. steroid hormone 負荷による SHRSP の大腿骨頭壊死の改善目的で Pentosan を使用した。
2. steroid hormone 非負荷の群では Control 群に比べて、Pentosan 投与群では発生頻度は減少していた。
3. Pentosan 投与群では高脂血症改善作用がみられ、特にトリグリセライドが減少していた。
4. 免疫組織学的に Pentosan 投与で酸化 stress は減少の傾向を示していた。)

6. 研究発表

1. 論文発表
   なし
2. 学会発表
   第41回高血圧関連疾患モデル学会(平成17年9月1日　札幌市)

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

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:ピタバスタチンの効果

赤池雅史、粟飯原賢一、八木秀介、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系での一酸化窒素(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ピタバスタチ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血圧上昇、反応性充血による大腿動脈の血管拡張反応の減弱、および大動脈における内皮型 NO 合成酵素(eNOS)発現の減少がみられたが、これらはピタバスタチンの投与によりいずれも改善した。ピタバスタチンは eNOS の発現増加により NO 産生を亢進させることで NO bioavailablity 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することが示唆された。ピタバスタチンは大腿骨頭壊死症の予防・治療薬として有効である可能性がある。

1. 研究目的

グルココルチコイド過剰による大腿骨頭壊死症の発症機序としては大腿骨頭における循環障害が最も重要であると考えられている。我々はこれまでに培養血管内皮細胞を用いた検討ならびに大腿骨頭壊死症患者の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による一酸化窒素(NO)の bioavailability の低下とそれによる血管内皮機能障害が微小循環の破綻をもたらす結果、大腿骨頭壊死を惹起する可能性を報告し、グルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害が本症の予防ならびに治療標的となりうる可能性を提唱してきた [1]。

HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン)は強力なコレステロール低下作用だけでなく内皮型 NO 合成酵素(eNOS)発現増強や内皮依存性血管弛緩反応の改善など血管系への多面的直接作用が注目されている。中でもピタバスタチンは腸管からの吸収後に肝チトクローム P450 による代謝をほとんど受けないため、*in vitro* で確認された血管系への多面的作用が *in vivo* においても発揮されることが期待できる。そこで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、12 週齢)をコントロール群、ピタバスタチン投与群、デキサメサゾン(DEX)投与群、DEX およびピタバスタチン投与群の 4 群(各群 n=6)に分け検討した。ピタバスタチンは 0.3mg/kg/day を経口投与し、DEX はピタバスタチンの投与開始後 8 日目から 0.3mg/kg/day を経口投与した。DEX 投与開始後 14 日目に血圧、脈拍、血管内皮機能、大動脈における eNOS 蛋白発現について解析を行った。

血圧、脈拍は tail cuff method により測定した。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増加率により評価した。大動脈の eNOS 蛋白の発現量は胸腹部大動脈を摘出しウエスタンブロット法により評価した。

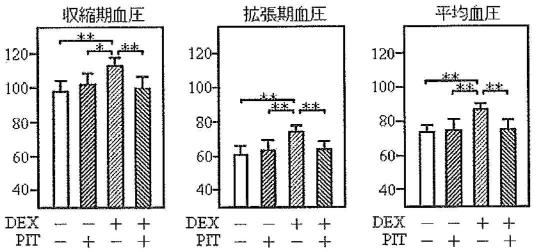
(倫理面への配慮)

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

1) 血圧、脈拍、血糖および脂質の変化

収縮期、拡張期および平均血圧は、いずれもDEX投与群においてコントロール群と比較して有意に高値であったが、ピタバスタチン投与群、DEXおよびピタバスタチン投与群ではコントロール群と差がなかった(図1)。脈拍はいずれの群においても差がなかった。

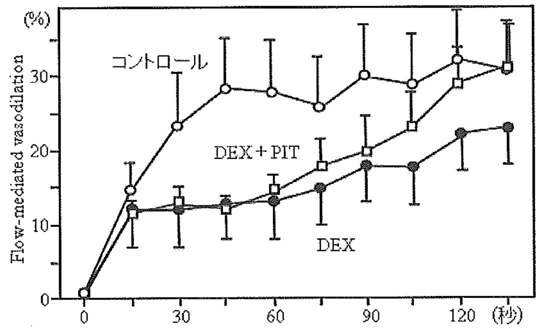


DEX;デキサメサゾン, PIT;ピタバスタチン n=6, mean±SD, * p<0.05, ** p<0.01

図1. 血圧に及ぼすピタバスタチンの影響

2) 血管内皮機能に及ぼすピタバスタチンの効果

DEX投与群では反応性充血時の大腿動脈拡張反応が低下していたが、DEXおよびピタバスタチン投与群ではDEX投与による大腿動脈拡張反応の低下が改善していた(図2)。

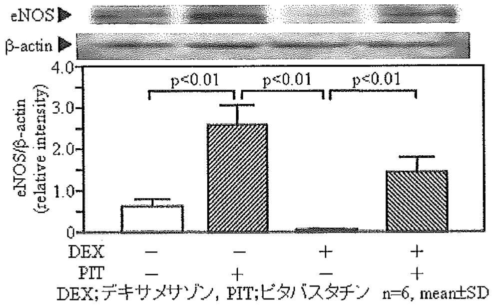


DEX;デキサメサゾン, PIT;ピタバスタチン n=6, mean±SEM

図2. 内皮依存性血管弛緩反応に及ぼすピタバスチチンの効果

3) 大動脈におけるeNOS発現に及ぼすピタバスタチンの効果

ピタバスタチン投与群ではコントロール群と比較してeNOS蛋白発現の増加が認められた。DEX投与群ではeNOS蛋白発現が著明に抑制されていたが、DEXおよびピタバスタチン投与群ではこの抑制が改善していた(図3)。



DEX;デキサメサゾン, PIT;ピタバスタチン n=6, mean±SD

図3. 内皮型一酸化窒素合成酵素の発現に及ぼすピタバスタチンの効果

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消去が亢進する結果、血管内皮機能が低下することを報告してきた[1)]。また、グルココルチコイド過剰は血管内皮細胞でのeNOS発現を抑制することが報告されている[2,3)]。このようなNO bioavailabilityの低下による血管内皮機能低下は循環障害を惹起し、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。我々はすみやかな臨床応用を想定し、心血管イベントの抑制などの血管保護作用を有する薬剤について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影響を検討してきた。そこで今年度は強力なコレステロール低下作用だけでなく、血管への多面的保護作用を有するスタチンに着目した。

スタチンはHMGCoA還元酵素を阻害することによりコレステロール合成を抑制するが、コレステロール合成経路の各種中間産物の合成を同時に抑制することにより、コレステロール低下作用と独立した多面的作用を発揮する。血管内皮細胞におけるeNOSに及ぼす作用としては、メバロン酸の合成低下によるPI3-Akt系の活性化とそれによるeNOSのリン酸化ならびに活性化、ゲラニルゲラニルピロリン酸の合成低下によるRhoAの抑制とそれによるeNOS発現増加などが報告されている。また、スタチンは *in vivo* において動脈硬化性疾患患者の血管内皮機能を改善することも報告されている。今回の検討ではDEXを投与したグルココルチコイド過剰マウスにおいて、ピタバスタチンの同時投与がグルココルチコイド過剰による血圧上昇を有意に抑制し、反応性充血時の大腿動脈拡張反応低下を改善した。グルココルチコイド過剰によ

る高血圧の発症機序としてはNO bioavailabilitry の低下による血管内皮機能低下に基づく末梢血管抵抗の増大が重要であることが報告されている。また、反応性充血時の flow-mediated vasodilatation は内皮依存性の血管拡張反応であり、血管内皮機能のよい指標である。今回の結果からピタバスタチ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。

ピタバスタチ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 eNOS の発現増加や活性化によるNO産生の増加などの可能性がある[4-5]。今回の検討では DEX 投与は大動脈における eNOS 蛋白量の発現を著しく減少させたが、ピタバスタチンの投与はそれをほぼ完全に回復させたことから、ピタバスタチンは eNOS 発現を増加させることにより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。ただし、酸化ストレス抑制やeNOSのリン酸化を介した活性化なども関与している可能性があり、さらに検討が必要である。

今後は、ピタバスタチンの持つこのような作用がスタチンに共通したものか否かを明らかにするため、*in vitro* においてピタバスタチ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アトロ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ピタバスタチンの経口投与により改善することが示唆された。ピタバスタチンは大腿骨頭壊死症の治療ならびに予防において有効である可能性がある。

6. 研究発表

1. 論文発表

1) Ikeda Y, Aihara K, Sato T, Akaike M, Yoshizumi M, Suzaki Y, Izawa Y, Fujimura M, Hashizume S, Kato M, Yagi S, Tamaki T, Kawano H, Matsumoto T, Azuma H, Kato S. Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. J Biol Chem 280: 29661-6, 2005.

2) Kato M, Azuma H, Akaike M, Iuchi T, Aihara K, Ikeda Y, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Matsumoto T. Aspirin inhibits thrombin action on endothelial cells via up-regulation of aminopeptidase N/CD13 expression. Athrerosclerosis 183:49-55,2005.

3) Yoshida T, Azuma H, Aihara K, Fujimura M, Akaike M, Mitsui T, Matsumoto T. Vascular 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.

4) Ito Y, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. c-Fos degradation by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in osteoclast progenitors. Bone 37:842-9, 2005

5) Matsumoto T, Miki T, Hagino H, Sugimoto T, Okamoto S, Hirota T, Tanigawa Y, Hayashi Y, Fukunaga M, Shiraki M, Nakamura T. A new active Vitamin D, ED-71, increases bone mass in osteoporotic patients under Vitamin D supplementation: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. J Clin Endocrinol Metab 90: 5031-6, 2005.

6) Nawata H, Soen S, Takayanagi R, Tanaka H, Takaoka K, Fukunaga M, Matsumoto T, Tanaka H, Fujiwara S, Miki T, Sagawa A, Nishizawa Y, Seino Y. Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis (2004 edition). J Bone Miner Metab 23: 105-9, 2005.

7) Shibata H, Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Sano T, Kitazoe K, Hashimoto T, Ozaki S, Wakatsuki S, Kido S, Inoue D, Matsumoto T. Malignant B-lymphoid cells with bone lesions express receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and vascular endothelial growth factor to enhance osteoclastogenesis. Clin Cancer Res 11: 6109-15, 2005.

8) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kangawa K. Adrenomedullin

enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. Circulation 111: 356-62, 2005.

9) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kanagawa K, Kitamura S. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. Cardiovasc Res 66: 543-51, 2005.

2. 学会発表

1) 赤池雅史, 加藤みどり, 石川カズ江, 八木秀介, 池田康将, 橋詰俊二, 藤村光則, 粟飯原賢一, 東 博之, 松本俊夫. Pitavastatin inhibits TNF-α-induced NF-κB transcriptional activation through BMK1/ERK5 activation in vascular endothelial cells. 第 69 回 日本循環器学会学術集会, 横浜, 2005.3.20.
2) 粟飯原賢一, 東 博之, 赤池雅史, 藤村光則, 八木秀介, 橋詰俊二, 池田康将, 松本俊夫. Arterial cuff injury causes enhanced neointimal formation and increased adventitial area in heterozygous heparin cofactor II deficient mice. 第 69 回日本循環器学会学術集会, 横浜, 2005.3.19.
3) 赤池雅史. ステロイド誘発骨壊死の病因病態仮説. 第 23 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2005.7.22.
4) 八木秀介, 粟飯原賢一, 赤池雅史, 藤村光則, 池田康将, 橋詰俊二, 東 博之, 松本俊夫. Pitavastatin は angiotensin II によるマウス冠動脈リモデリングを抑制する. 第 37 回日本動脈硬化学会総会, 東京, 2005.7.15.
5) 赤池雅史, 八木秀介, 粟飯原賢一, 池田康将, 岩瀬 俊, 橋詰俊二, 藤村光則, 東 博之, 松本俊夫. HMG-CoA reductase inhibitor pitavastatin elicits its anti-inflammatory effect through activation of BMK1/ERK5 in vascular endothelial cells. AHA Scientific Sessions 2005, Dallas USA, 2005.11.13.
6) 粟飯原賢一, 東 博之, 赤池雅史, 池田康将, 藤村光則, 橋詰俊二, 岩瀬 俊, 八木秀介, 松本俊夫. Heparin cofactor II plays a crucial role in fetal development and cuff-injured vascular remodeling in mice. AHA Scientific Sessions 2005, Dallas USA, 2005.11.16.

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

8. 参考文献

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 92:81-7, 2003
2) Wallerath T, Witte K, Schafer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B, Forstermann U. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A. 96:13357-62, 1999
3) Wallerath T, Godecke A, Molojavyi A, Li H, Schrader J, Forstermann U. Dexamethasone lacks effect on blood pressure in mice with a disrupted endothelial NO synthase gene. Nitric Oxide 10:36-41, 2004
4) Schafer SC, Wallerath T, Closs EI, Schmidt C, Schwarz PM, Forstermann U, Lehr HA. Dexamethasone suppresses eNOS and CAT-1 and induces oxidative stress in mouse resistance arterioles. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288:H436-44,2005
5) Zhang Y, Croft KD, Mori TA, Schyvens CG, McKenzie KU, Whitworth JA. The antioxidant tempol prevents and partially reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. Am J Hypertens 17:260-5, 2004

大量ステロイド薬による血管内皮細胞障害に対するCNPの制御機構

田中良哉、岡田洋右、谷川隆久、廣瀬暁子 （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）の発症には血管障害の関与があることが示唆されている。高濃度の糖質コルチコイド（GC）は内皮細胞の増殖活性抑制、G_2/M 期細胞減少、アポトーシスを誘導し血管障害を惹起することを解明した。さらにそのアポトーシス誘導の機序として Bax 発現誘導、Bcl-2 発現低下による caspace-9、3/7 の誘導が関与することを明らかにした。一方、C 型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）は、高濃度 GC により誘導されたアポトーシスを制御し、その機序として PI3K を介した Bax/Bcl-2 の imbalance 是正が関与することが示唆された。以上より、IONF 発症には、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 形成に関与するが、CNP はその内皮障害を制御し、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（ION）は、大腿骨頭の循環障害による骨梁及び骨髄の阻血性の無菌性壊死で、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。症例対照研究や疫学研究により、ステロイド薬が ION の発症要因の約 6 割を示すことが明らかになり、我々も、ステロイドパルス療法の後に ION が生じ易いことを報告してきた。

一方、ION の発症機序は不詳であるが、組織学的所見から、静脈系の循環障害に伴う組織の阻血状態と、阻血により齎される血管の再生或いは新生の遅延と障害が関与し、その結果、血管障害、組織壊死が生じると考えられている。我々も、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障害に於ける関与を報告してきた。

さらに、高濃度の糖質コルチコイドによる血管障害の可能性が、我々を含めた複数の施設から報告されるが、ステロイド薬が骨頭の阻血状態を引き起こす機序は十分に解明されておらず、さらには、骨頭壊死の予防・治療は全く確立されていない。平成 17 年度は、高濃度ステロイド薬による血管内皮細胞でのアポトーシス誘導機構を解明するとともに、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(C-type natriuretic peptide)が、高濃度ステロイド薬により惹起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

血管内皮細胞として、臍帯静脈由来内皮細胞（HUVEC）を用いた。糖質コルチコイド（ステロイド薬）としては、メチルプレドニゾロン（m-PSL）を使用した。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 propiodine 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り検出した。caspase-3/7、9 活性については、ルミノメーターで検出した。p21、Bax、bcl-2 等の細胞質内蛋白質は細胞をホルマリン及びサポニンで処理後に抗体で染色しフローサイトメトリーで検出した。

（倫理面への配慮）

特に該当せず。

3. 研究結果

血管内皮細胞(HUVEC)に、ステロイドパルス療法で到達する血中濃度に該当するメチルプレドニゾロン（m-PSL）100 μ g/ml を添加し、以下の結果を得た。

1) 高濃度 m-PSL は、HUVEC 細胞内での p21 の発現を著明に増強させた（フローサイトメータ）。
2) 高濃度 m-PSL による細胞周期の G0/G1 arrest を PI 染色で認めた。
3) 高濃度 m-PSL は、早期アポトーシス細胞を著明に

誘導した(PI/annexin V 染色)。

4) 高濃度 m-PSL は、Bax の細胞内発現を著明に増強させた。
5) 高濃度 m-PSL により caspase-3/7、9 活性が増強することをルミノメーターで認めた
6) CNP は高濃度 m-PSL により惹起された p21 発現を低下させ、G0/G1 arrest を抑制した。
7) CNP は bcl-2 発現を増強させた。
8) CNP は高濃度 m-PSL により誘導された caspase-3/7、9 の活性を低下させ、アポトーシスを抑制した。

以上より、臨床で汎用されるステロイドパルス療法に代表されるような高濃度 m-PSL は、血管内皮細胞の増殖活性抑制、G0/G1 arrest、アポトーシスを誘導し、その機序として Bax 発現誘導による caspace-9、3/7 の誘導が関与することが明らかとなった。一方、CNP は高濃度 m-PSL により惹起された内皮細胞の細胞周期停止やアポトーシスを抑制した。

以上の結果より、CNP は高濃度 m-PSL により齎される血管内皮細胞障害を予防できる可能性が示唆された。

4. 考察

ION 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 ION 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、高濃度ステロイド薬による血管障害の関与を臨床的に示してきた。しかし、ステロイド薬投与患者における ION 発症機序については現在まで不明であった。

今回の結果より、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、Bax 発現増強による caspace-9、3/7 誘導によりアポトーシスが惹起される機序が明らかとなった。

一方、ION 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。現在まで様々な増殖因子、抗凝固薬等が試行されているが、明確に IONF 発症を予防することができた治療法はないのが現状である。

今回検討したナトリウム利尿ペプチドファミリーの一つである CNP は、脳、血管内皮細胞から分泌され、血管平滑筋細胞の増殖抑制、血管弛緩作用を持ち合わせているため、抗動脈硬化作用を期待されているペプチドである。また、近年、ウサギを用いた大動脈バルーン障害モデルにおいて、CNP 遺伝子導入による虚血誘導血管内皮細胞の再生促進、大動脈結紮後血管再生モデルにおける CNP による血管再生促進等が報告され、CNP による血管内皮再生作用も注目されている。今回、高濃度 m-PSL によって誘導された血管内皮細胞のアポトーシスを、CNP を前投与し Bax/Bcl-2 の不均衡を是正することにより制御できる機序が解明された。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 産生亢進等の作用も報告されており、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、ION に於ける血管障害を制御できる可能性も考えられた。

5. 結論

高濃度ステロイド薬は内皮細胞のアポトーシス誘導による血管障害を介して ION 形成に関与し、CNP は高濃度ステロイド薬による血管内皮障害を制御することが可能であることが示唆され、ION への治療、予防という治療応用への可能性が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of expression of P-glycoprotein on peripheral lymphocytes to steroid-resistance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2005) 52, 1676-1683
2) Sobue T, Naganawa T, Xiao L, Okada Y, Tanaka Y, Ito M, Okimoto N, Nakamura T, Coffin JD, Hurley MM. Over-expression of fibroblast growth factor-2 causes defective bone mineralization and osteopenia in transgenic mice. *J Cell Biochem* (2005) 95: 83-94
3) Saito K, Nawata M, Iwata S, Tokunaga M, Tanaka Y. Extremely high titre of antihuman chimeric antibody following re-treatment with rituximab in a patient with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (2005) 44, 1462-1464
4) Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts

and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* (2005) 4, 325-328

5) Soen S, Tanaka Y. Glucocorticoid-induced Osteoporosis: Skeletal Manifestation of Glucocorticoid and 2004 Japan Society for Bone and Mineral Research-Proposed Guideline for Its Management. *Mod Rheumatol* (2005) 15, 163-168
6) Tanaka Y, Okada Y. Acro-osteolysis and symphalangism mutations. *J Bone Miner Res* (2005) 20: 160
7) Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology* (2005) 44: 176-182
8) 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* (2005) 7, 476-484
9) 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* (2005) 20: 1002-1010
10) Kishikawa H, Mine S, Kawahara C, Tabata T, Hirose a, Okada Y, Tanaka Y. Glycated albumin and cross-linking of CD44 induce scavenger receptor 3 expression and uptake of oxidized LDL in human monocytes. *Biochem Biophy Res Commun* (2006) 339: 846-851

2. 学会発表

1) 田中良哉. 生物学的製剤と膠原病の臨床： 治療のブレークスルーを目指して. 第102回日本内科学会総会（教育講演）大阪, 平成17年4月7-9日
2) 田中良哉. 関節リウマチ治療の新展開. 平成17年度日本内科学会生涯教育講演会（教育講演）東京, 平成17年5月22日
3) 田中良哉. 続発性骨粗鬆症、骨破壊は制御できるか－TNF阻害療法によるリウマチ治療のパラダイムシフトー. 第23回日本骨代謝学会学術集会(ランチョン教育講演)大阪, 平成17年7月21日－23日
4) 田中良哉、岡田洋右、名和田雅夫、中山田真吾、齋藤和義. RAの骨代謝異常とTNFα. 第23回日本骨代謝学会学術集会(シンポジウム)大阪, 平成17年7月21日－23日
5) 田中良哉、辻村静代、齋藤和義. 膠原病治療に於ける薬剤抵抗性の臨床と基礎. 第33回日本臨床免疫学会総会（シンポジウム）京都, 平成17年10月28-29日

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

8. 参考文献

なし

SHRSP 大腿骨頭壊死

ー高齢ラットを対象にしてー

熊谷謙治、村田雅和、尾崎　誠、宮田倫明、穂積　晃、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）

特発性大腿骨頭壊死症(ION)は大腿骨頭が阻血性壊死に陥り、股関節機能が失われる難治性疾患である。病態についてはいまだ明らかではないが、凝固・線溶系、脂質代謝の異常の関与が報告されている。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ている。SHRSP は生殖が 12 週齢から 20 週齢まで可能で、飼料をSP食で維持した場合平均寿命は8月齢で、1年齢でほぼ死亡といわれている。今回 40 週齢を犠牲死とし、高齢の大腿骨頭壊死について研究した。牡 SHRSP ラットを 19 匹使用し、Steroid hormone の投与の有無で 2 群に分類した。体重は、Steroid hormone 投与で、有意に減少していた。血液生化学上は、Steroid hormone 投与群は T-CHO,HDL,LDL,TRG が control 群に比較し有意に増加し、著明な高脂血症を呈した。control 群では約 40%の Old Necrosis がみられ、また高齢にもかかわらず、Early Necrosis が 20%にみられた。Steroid hormone を投与すると、17 週齢と同じように骨髄の中の脂肪細胞が増加し、また 20%の Fresh Necrosis がみられた。注目すべき点は、Old Necrosis の所見を呈するものの中に 20%の脂肪増加、変性、Early Necrosis を呈するものがみられたことである。

1.　研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(Idiopathic osteonecrosis of the femoral head: ION)は、臨床で使用される Steroid Hormone や飲酒との関係が深いことや青壮年期に多いことは疫学的に判明しているが、その発生原因に関してはまだまだ解明されていなく、実験動物を要した病態解析は重要である。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骨頭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。ラットの壊死の判定は犠牲死による標本採取によって可能で、青壮期以降の壊死の動態、高齢期の壊死発生については調べられていない。今回の研究の目的は、SHRSP の寿命とされる 40 週齢時の骨頭の状態を把握し、また Steroid Hormone の反応をみることである。

2.　研究方法

対象

ラットは長崎大学先導生命科学研究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 34 週齢、牡 SHRSP/Ngsk を 19 匹を使用した。

Steroid hormone 投与の有無で Steroid Hormone 投与群と control 群の 2 群を作成した。飼育はアニマルセンターで通常ラットケージを使用し、定期的観察し、各週に血圧,体重を検量した。Steroid Hormone は 38 週齢で methylpredonisolone acetate 4mg（およそ 10mg/kg）を背部に筋注した。 40 週齢目に犠牲死とし、心臓採血にて血液を採取し生化学検査、凝固能など検査し、また両大腿骨頭を採取し、薄切永久標本で、壊死の頻度、壊死の程度を観察評価した（図1）。

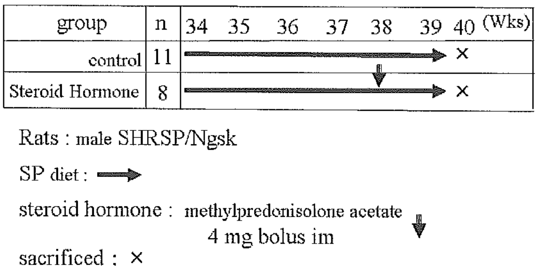


図1 対象&方法

大腿骨頭壊死判定については標本作製の過程で熱発生が生じないため、1993 年の Jacques ARLET 等の Type1 から Type4 に準拠して骨髄脂肪細胞の変性のみみられる Fat++ 、骨髄細胞の壊死のみがみられる Early Necrosis 、骨髄腔と骨梁の壊死がみられる Fresh Necrosis、添加骨が出現している Old Necrosis と定義した(表 1, 表 2)。

統計解析

表1 Jacques ARLET による病理組織学的所見 (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 is often present 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2 病理組織学的診断基準

necrosis	Fatty degeneration	myelocyte	osteocyte	Appositional bone formation	Criteria by J. ARLET
Fat++	+	-	-	-	Type 1
Early	+/-	+	-	-	Type 2
Fresh	+/-	+	+	-	Type3
Old	+/-	-	+	+	Type4

統計的有意差の検討には、Student T test を用いた。
(倫理面への配慮)

本研究を開始するにあたり, 長崎大学実験動物委員会の承認を得た。

3. 研究結果

1) 対象の一般特性

体重は、Steroid hormone 投与群で有意に減少していた。血液生化学上は、Steroid hormone 投与群は T-CHO,HDL,LDL,TRG がコントロール群に比較し有意に増加し、著明な高脂血症を呈していた(図 2)。

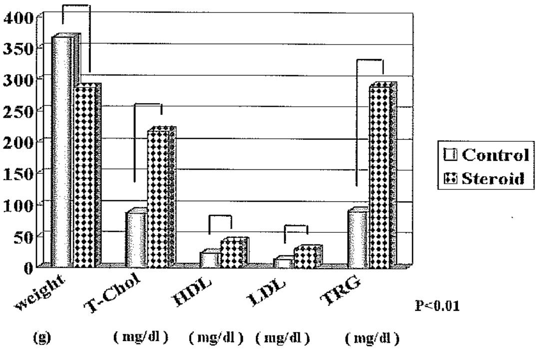


図2 体重および生化学的結果

凝固能(aPTT, PT)は、2 群間に有意な差は認めなかった。

2) 大腿骨頭壊死の発生頻度

本検討での大腿骨頭壊死の発生頻度は、control 群では約 40%の Old Necrosis がみられ、また高齢にもかかわらず、Early Necrosis が 20%にみられた。Steroid hormone を投与すると、17 週齢と同じように骨髄の中の脂肪細胞が増加し、また 20%の Fresh Necrosis がみられた。注目すべき点は、Old Necrosis の所見を呈するものの中に 20%の脂肪増加、変性 Early Necrosis を呈するものがみられたことである。これらの所見は実験数が少ないためか、統計学的には有意差は認めなかった(表 3)。

表3 病理組織学的結果

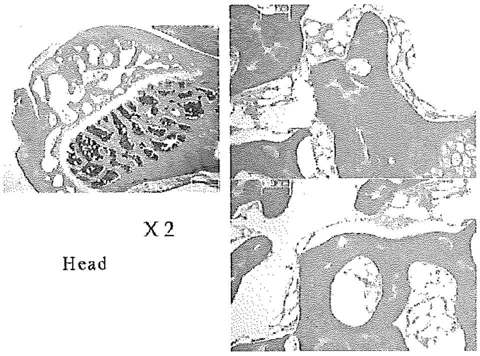
	n	Normal	f ~ f+	f++	Old Nec.	Old plus	Fresh Nec.	Early Nec.
Control Group	22	9	1	0	8	f=1	0	4
S.H. Group	16	4	2	1	5	f+=1 f++=2 Early=1	3	1

組織像を供覧する。

成長軟骨帯は全ての大腿骨頭標本で認められた。

control 群でみられた Early Necrosis である。

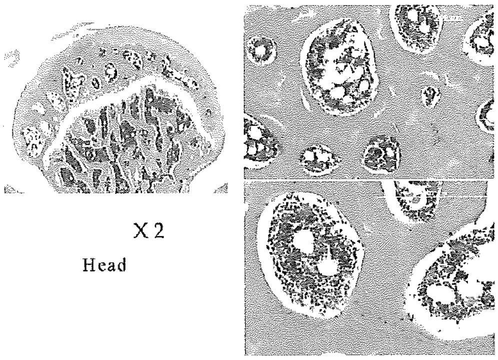
所見的には従来の17週辺りのものと違いなく、骨髄腔と骨梁の壊死がみられる(図3)。



X 2
Head
X 10
Epiphysis

図3 control群でみられたEarly Necrosis

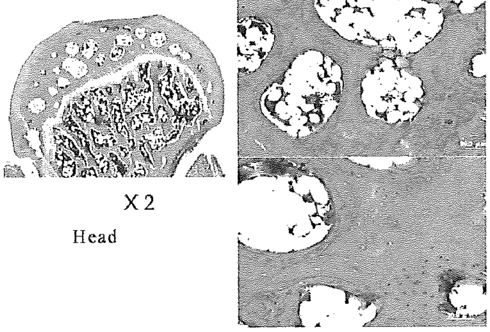
control 群での Old Necrosis である。骨細胞が空虚となった骨梁領域を囲むように骨細胞を伴う骨梁(添加骨)がみられる。骨髄細胞には異常所見はみられない(図4)。



X 10
X 2
Head
X 20
Epiphysis

図4 control群でみられたOld Necrosis

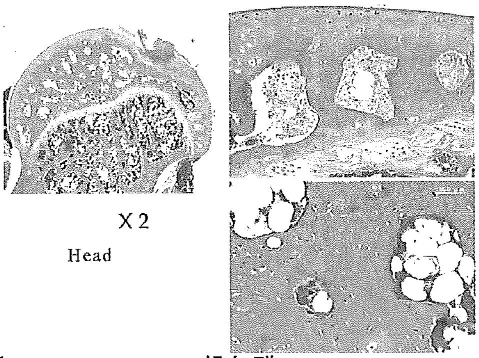
Steroid hormone 投与群の Old Necrosis である。骨髄細胞には脂肪細胞の膨張化や変性がみられる(図5)。



X 10
X 2
Head
X 20
Epiphysis

図5 Steroid hormone投与群のOld Necrosis

Steroid hormone 投与群では、Old Necrosis の所見に加えて外側に Early Necrosis の所見がみられた(図6)。



X 10
X 2
Head
X 20
Epiphysis

図6 Steroid hormone投与群
Old Necrosis ＋Early Necrosis

4. 考察

これまでに、15 から約 20 週齢の SHRSP/Ngsk ラットを観察し、その壊死の組織所見は Early Necrosis から Fresh Necrosis であった。高齢のラットを検討することで大腿骨頭壊死の進展状況、発生状況を推察が可能となる。SHRSPラットを生産販売管理しているSHR等疾患モデル共同研究会によると、一般的にSHRSPの生殖能力は12から約20週齢まで可能で、標準食であるSP飼料食で維持した場合、高血圧や脳出血とその合併症のため平均寿命は8ヶ月で、1年でほぼ死亡とされている。そこで今回ほぼ限界の 40 週齢に犠牲死を設定し研究した。

本検討での大腿骨頭壊死の発生頻度は、約 40%の Old Necrosis と20%の Early Necrosis であった。このことから、少数ではあるが約 20 週齢以後にも壊死生じうることが考えられる。また骨髄細胞の壊死のみがみられる Early Necrosis、骨髄腔と骨梁の壊死がみられる Fresh Necrosis、添加骨が出現している Old Necrosis への組織学的進展が遅いことも考えられる。Steroid hormone を投与すると、17 週齢と同じように骨髄の中の脂肪細胞が増加し、また 20%の Fresh Necrosis がみられた。注目すべき点は、Old Necrosis の所見を呈するものの中に 20%の脂肪細胞の増加、変性 Early Necrosis を呈するものがみられたことである。これらの所見は実験数が少なく、統計学的には有意差は認めなかったが、Steroid hormone が脂肪細胞を変化・変性させうることや骨頭壊死を生じさせうること、さらに Old Necrosis の所見を呈するものの中に Steroid hormone を投与すると Early Necrosis を呈するものがみられたことで、SHRSP ラットそのものに生じる大腿骨頭壊死と Steroid hormone を投与による壊死は機序が異なる可能性が示唆される。

今回の実験結果から病態図を想定すると、従来から云っているように、正常骨頭に脂肪の増多 変性などの変化を経て、Early Necrosis、 Fresh Necrosis が生じ、長期経過を経て Old Necrosis になると考えられる。此処で Steroid hormone 負荷されると脂肪の増多、変性などの変化を経て、Early Necrosis、 Fresh Necrosis が誘導され、更には自然発症した Old Necrosis に脂肪の増多変性、Early Necrosis、 Fresh Necrosis が生じ得ることが想定される(図7)。

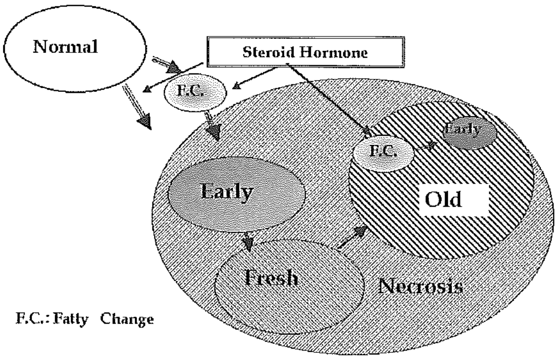


図7 SHRSP/Ngskの大腿骨頭壊死病態想定図

40 週齢の SHRSP ラットのほぼ限界まで観察しても、上腕骨頭には壊死が生じていなく、大腿骨頭においても全症例 Growth Plate は存在していた点は臨床、疫学的に ION と異なるが、狭義の特発性の原因の存在、Steroid hormone による助長、脂肪細胞の動態など ION と SHRSP ラットの大腿骨頭壊死との共通点は多い。大半の大腿骨頭壊死が 20 週齢未満のラットに発症しており、今後の研究の主体は条件設定が容易な現行の 15 から 17 週齢であるが、原因究明に高齢ラットも Steroid hormone 負荷で Fresh Necrosis が誘導されたもの、Old Necrosis に Early Necrosis を生じたものなどの酸化 stress、サイトカイン等の組織学的検索が注目されうる。

5. 結論

1. 40 週齢の SHRSP ラットの大腿骨頭壊死を観察した。
2. 上腕骨頭壊死は観察されず、全例の大腿骨頭で Growth Plate は存在していた。
3. 40 週齢では Old Necrosis が多く観みられるが、Early Necrosis もみられた。
4. Steroid Hormone の負荷で Fresh Necrosis が増加し、また Old Necrosis 中に脂肪細胞の増生や変性がみられた。

6. 研究発表

1. 論文発表
   なし
2. 学会発表
   なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし