

ION における脂肪細胞の役割に関する研究

—第6報 骨髄内脂肪細胞の表面形態変化について—

北島 将、重松正森、馬渡正明、佛淵孝夫（佐賀大学医学部 整形外科）

特発性大腿骨頭壊死症発生機序の一因として、脂質代謝異常、脂肪細胞肥大等による圧上昇、脂肪塞栓など脂肪細胞との関与が提唱されている。これまで我々は骨髄培養により、ヒト骨髄内脂肪細胞とステロイドとの関連を調査、報告してきた。今回は走査型電子顕微鏡を用いた骨髄内成熟脂肪細胞の表面変化について報告する。注目すべき所見として、脂肪細胞表面に多数の微細な脂肪滴が認められた。ヒト骨髄内では高濃度のステロイドにより、未熟脂肪細胞及び単胞性脂肪細胞の増加、脂肪細胞径の増大などの他に、脂肪滴が細胞外に過剰に析出される可能性が示唆され、IONの発生に何らかの関与をしているのではないかと考えられる。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症の発生機序については様々な説が唱えられており、近年は脂質代謝や脂肪細胞の関与も注目されている。これまで我々は特発性大腿骨頭壊死における骨髄内脂肪の役割を解明するため、手始めに変形性股関節症(以下 OA と称す)症例を対象とした培養実験を開始し経過を報告してきた。今回の研究目的は組織培養を行ない、骨髄内成熟脂肪細胞の表面の形態変化を調査することである。

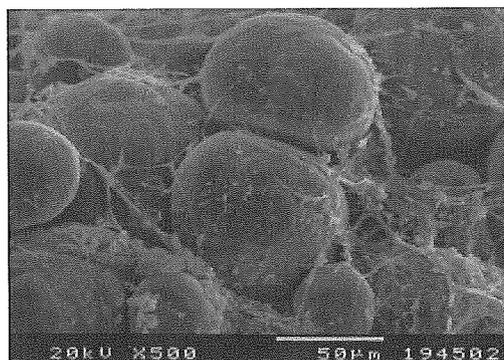


図1 培養前 細胞表面形態

2. 研究方法

対象は、当科にて人工股関節置換術(以下 THA)を行った OA 症例である。THA 時に骨髄組織を採取して均等な大きさとし、培養液中で1、3、5、7日間培養後、走査型電子顕微鏡にて観察した。デキサメタゾン(DEX)は $10^{-7}M$ 、 $10^{-5}M$ の濃度になるよう投与した。

(倫理面への配慮)

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

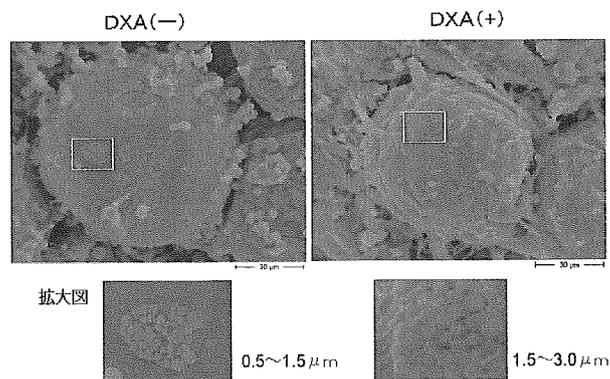


図2 培養7日目 細胞表面形態

3. 研究結果

培養前の骨髄内成熟脂肪細胞の表面は平滑であり

細胞間隙は線維成分で占められていた(図1)。

ステロイド投与群では早期から(投与群:約3日目、非投与群:約7日目)周囲に脂肪滴をもった fibroblast like

cell が増殖し、徐々に細胞間隙を占拠する像が認められた(図2)。これらは OIL RED O 染色で赤染することを確認した。脂肪滴の数はステロイド投与群により多く、脂肪滴の径はステロイド投与群(1.5~3.0 μ m)がステロイド非投与群(0.5~1.5 μ m)の約2倍であった。

4. 考察

今回、新たな発見として成熟脂肪細胞の細胞表面に出現する微細な脂肪滴がある。これはステロイド投与群、非投与群の間に明らかな相違を認めた。これら微細な脂肪滴は通常の病理組織検査では捉えることができないため注目されてこなかったものと考えられる。これら微細な脂肪滴が骨髓内に留まるなら低比重のため骨頭荷重部に集まり、何らかの作用を起こすことが予測される。また、血管内に流入すれば脂肪塞栓の一因となるかもしれない。また、この変化が骨髓のみならず皮下、内臓内の脂肪にも起こるとすれば、現在注目されている脂質代謝異常と深く関わる所見である。今後は高脂血症治療薬が成熟脂肪細胞の表面形態にどのような変化をもたらしているかも検証して行きたい。ヒト骨髓内においては高濃度のステロイドにより、未熟脂肪細胞の増加、単胞性脂肪細胞の増加、脂肪細胞径増大などの他に脂肪滴が細胞外に過剰に析出される可能性が示唆され、IONの発生に何らかの関与をしているのではないかと考えられた。

5. 結論

1. 成熟脂肪細胞の表面には微小の脂肪滴が多数確認された。
2. ステロイド投与によりにより骨髓内脂肪細胞表面に多数の微細な脂肪滴産生を認めた。
3. この現象が脂質代謝異常、脂肪塞栓など ION 発生に関与している可能性が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 北島 将、重松正森、小河賢司、杉原 甫、佛淵孝夫:ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序—骨髓内脂肪細胞のアポトーシスの観察—, 第 37 回日本臨床分子形態学会. 大阪 2005.10.
 - 2) 馬渡正明、佛淵孝夫:大腿骨頭壊死症に対する

骨きり術, 第 78 回日本整形外科学会総会. 横浜 2005.5.

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) Sbarbati A, Zancanaro C, Cigolini M, Cinti S. Brown adipose tissue: a scanning electron microscopic study of tissue and cultured adipocytes. *Acta Anat (Basel)* 1987;128-1:84-8.
- 2) Thorn H, Stenkula KG, Karlsson M, Ortegren U, Nystrom FH, Gustavsson J, Stralfors P. Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol Biol Cell* 2003;14-10:3967-76.

ステロイド投与による可溶性血管内皮プロテイン C 受容体(EPCR) と

可溶性トロンボモジュリンの変動に関する検討

小荒田秀一、長澤浩平（佐賀大学 医学部 膠原病リウマチ内科）

可溶性EPCRは活性化プロテインCを捕捉し、その抗凝固活性を抑制することで血栓形成傾向に関与すると考えられる。ステロイド治療を行った膠原病患者 242名で可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリンを ELISA 解析した。疾患活動期には可溶性 EPCR(31.6%)・可溶性トロンボモジュリン(27.1%)ともに上昇していた。ステロイド投与後に SLE(60%)で可溶性EPCRが上昇した(他疾患は 11%)が、可溶性トロンボモジュリンは変動がなかった。SLE では原疾患による血管内皮傷害に加え、ステロイド投与による可溶性 EPCR の増加が凝固系の機能亢進を起し、大腿骨頭壊死などの臓器虚血に繋がる可能性があることが示された。

1. 研究目的

プロテインC抗凝固経路の障害は血栓症の重要な要因であるが、ステロイド投与によるプロテインC経路の変化に関する報告は現在までのところほとんどみられない。血管内皮プロテインC受容体(膜型 EPCR)は血管内皮の傷害によりその一部が血清中に遊離する(可溶性 EPCR)と考えられている。膠原病におけるステロイド投与前後の血清中の可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリンをELISA法により横断的および経時的に測定した。膠原病にもとづく血管内皮傷害に加え、ステロイド投与による可溶性 EPCR の増加が血栓形成を助長し、大腿骨頭壊死につながる可能性について検討した。

血管内皮細胞上に存在する EPCR は、トロンボモジュリンとともに、プロテイン C を活性化プロテイン C に変換する。活性化プロテイン C は凝固因子である Va、VIII a 因子を分解・不活化し、抗凝固作用を示し、EPCR は血栓形成を抑制する重要な因子であると考えられる(図 1)。

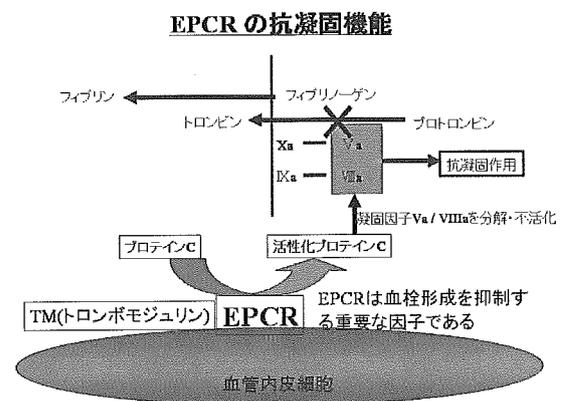


図1

膠原病による血管内皮傷害が起こると、血管内皮細胞上の膜型EPCRはメタプロテイナーゼにより切断され、可溶性EPCRが産生される。血中に遊離した EPCR は、活性化プロテインCやプロテインCを捕捉し、活性化プロテインCの抗凝固作用を抑制すると想定される。この結果、血栓形成が助長され、大腿骨頭壊死などの臓器虚血による諸病態が引き起こされる可能性がある(図 2)。

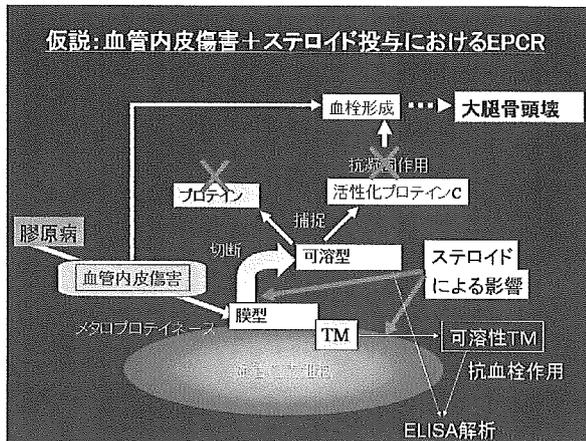


図 2

しかしながら、ステロイド治療によるEPCRを含むプロテイン C 経路に対する影響は解明されていない。

今回、可溶性 EPCR と、密接に関連する血管内皮細胞上の抗凝固因子であるトロンボモジュリンについて ELISA 解析を行った。

2. 研究方法

解析患者の背景は、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 100 例、血管炎 57 例、その他のリウマチ性疾患 85 例 (多発性筋炎 15 例、関節リウマチ 20 例、強皮症 12 例、成人スチル病 10 例、シェーグレン症候群 10 例、混合性結合組織病 5 例、皮膚筋炎 4 例、その他 9 例)、正常 22 名について解析を行った (表 1)。そのさいに、各疾患において、疾患活動期と寛解期に分け解析を行った。採血後直ちに患者血清を分離し、凍結保存後に一括して可溶性 EPCR および可溶性トロンボモジュリンを ELISA 法により解析した。

表 1 対象症例

疾患	患者数	FM
SLE	100	93:7
活動期	43	
寛解期	57	
血管炎	57	36:21
活動期	19	
寛解期	38	
その他のリウマチ性疾患	85	
活動期	36	
寛解期	49	
患者計	242	
正常	22	17:5
計	251	

3. 研究結果

リウマチ性疾患における可溶性EPCR値の横断的解析を行った。いずれのリウマチ性疾患においても、正常と比較して可溶性EPCRの有意な上昇がみられた (SLE 7.7 ± 19.8 ng/ml, 血管炎 3.8 ± 16.7 ng/ml, その他 5.4 ± 23.0 ng/ml) が ($p < 0.05$)、それぞれの疾患の間で統計学的に有意差はみられなかった。正常者では、可溶性 EPCR の上昇例を認めなかった (図3)。

各疾患における可溶性EPCR値の横断的解析

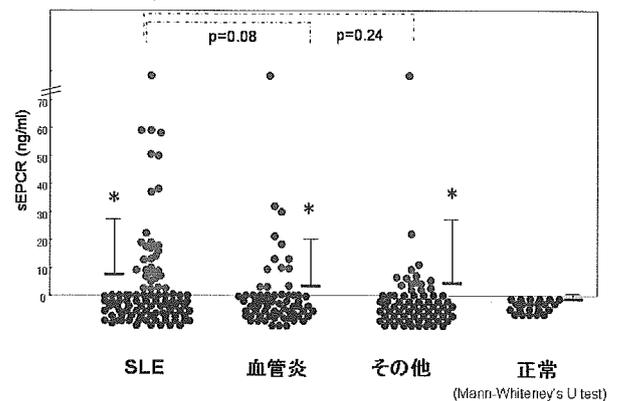


図3

つぎに各疾患における疾患活動性と可溶性EPCRの解析を行った。活動性のある SLE 患者では非活動性患者に比して、可溶性 EPCR が有意に上昇していた ($p=0.004$)。また、SLEの活動性患者では、血管炎、その他のリウマチ性疾患の活動性患者と比較して有意な上昇が見られた。これに対して血管炎・その他のリウマチ性疾患では、疾患の活動性と非活動性患者の間で有意な差を認めなかった (図4)。

疾患活動性と可溶性EPCR値

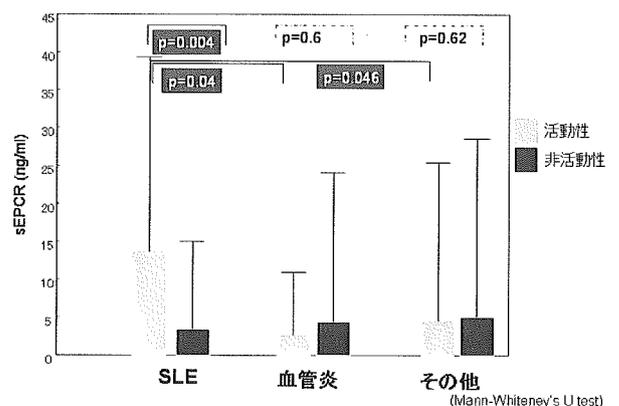


図4

各疾患における疾患活動性と可溶型 EPCR 陽性率 (可溶型 EPCR > 0 ng/ml を陽性とした) の検討を行った。SLE患者では、活動性がある患者で、53.5%という高い陽性率を示し、 χ^2 乗検定により疾患活動性と陽性率の間に有意な相関を認めた(p=0.000018)。しかし、血管炎、その他のリウマチ性疾患では疾患活動性と陽性率の間に有意な相関はなかった。疾患活動期には可溶型 EPCR は 31.6%で上昇していた。(表 2)。

疾患活動性とsEPCR陽性率の相関

sEPCR 上昇例/全体(%)	disease activity		p value (χ^2 検定)
	(+)	(-)	
SLE (n=100)	23/43 (53.5%)	7/57 (12.3%)	0.000018
血管炎 (n=57)	2/19 (10.5)	6/38 (15.8)	0.46
その他 (n=85)	6/36 (16.7)	10/49 (20.4)	0.60
全症例 (n=242)	31/98 (31.6)	23/151 (15.2)	0.005

表 2

次にもう一つの血管内皮細胞由来の可溶性抗凝固因子である可溶型トロンボモジュリンについてELISA法により検討した。疾患別のトロンボモジュリン値の解析では、正常に比較して、SLE(p=0.025)と血管炎(p=0.03)で上昇が認められた(図5)。

可溶型トロンボモジュリン(sTM)値

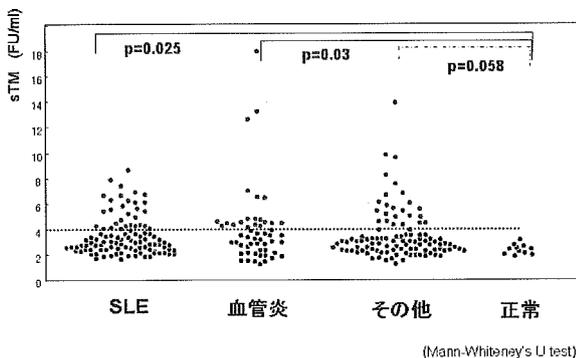


図5

各疾患における疾患活動性とトロンボモジュリン値の関連について検討を行った。いずれの疾患においても疾患活動性のある患者において、可溶型トロンボ

モジュリンの上昇がみられた。しかしながら、統計学的に有意差があったのはSLE患者においてのみであり、各疾患の間で可溶型トロンボモジュリン値に有意差はなかった。また、どの群においても、疾患活動性患者のトロンボモジュリンの平均値は正常値の範囲内にとどまっており、リウマチ性疾患における活動性を反映する可溶型トロンボモジュリン陽性化の検出感度は低いと考えられた(図6)。疾患活動期における可溶型トロンボモジュリンの陽性率は 27.1%であった。

疾患活動性と可溶型トロンボモジュリン(sTM)値

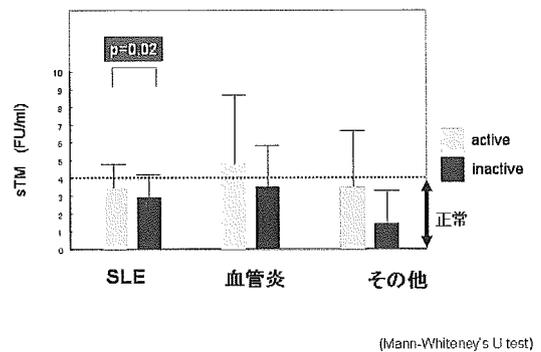


図6

可溶型EPCRと可溶型トロンボモジュリンの陽性率については、全症例でみると両者の陽性率で差はなかった。しかし、疾患別に見ると、可溶型EPCRはSLEでの陽性率が高かったが、可溶型トロンボモジュリンでは疾患での差はみられなかった。したがって、可溶型EPCRの上昇は、SLEに比較的特徴的であると考えられた。また、可溶型 EPCR と可溶型トロンボモジュリンの間には有意な相関を認めなかった(図7)。

可溶型EPCR/TM 疾患別陽性率

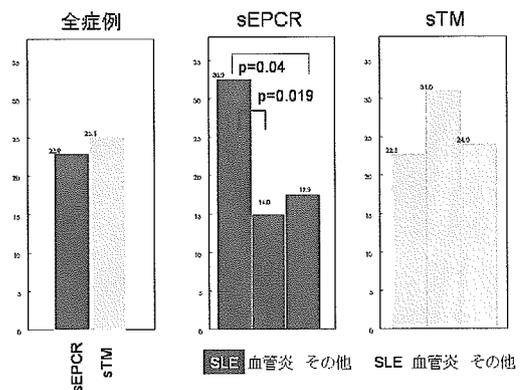


図7

可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリンは、血管内皮障害を反映して上昇すると考えられるが、両者の上昇する機序は異なっている可能性が示唆された。

次に、ステロイドの影響をみるために、一日プレドニゾロン換算30mg以上のステロイド治療がなされた場合の可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリンの変動を検討した。ステロイド投与による可溶性 EPCR の変動パターンは多様であったが、可溶性トロンボモジュリンは大きな変化が認められなかった。

治療前と治療後7日目の時点をもとにした可溶性 EPCR の変動については以下の4つのパターンに分類が可能であった。

- 1) 治療後に上昇
- 2) 持続して高値
- 3) 治療後に低下
- 4) 正常値を維持

しかし、可溶性トロンボモジュリンに関しては、図8に示すように、ステロイド投与による変動はなく、分類はしえなかった。

ステロイド治療(PSL30mg/日以上)によるsEPCR/TMの変動

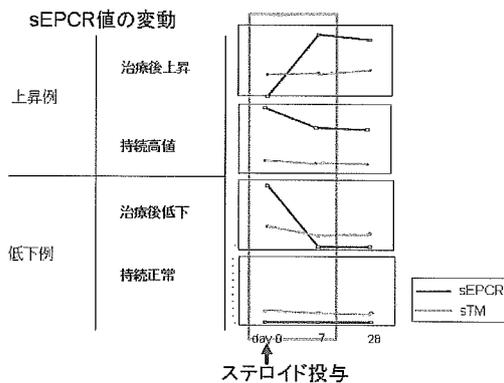


図8

ステロイド投与前および投与7日目での可溶性 EPCR の変動をもとに、それぞれの疾患で占める各分類の度数の解析を試みた。SLEでは、治療後上昇する症例が7例、治療後も持続して高値を示す症例が2例というように、ステロイド治療後も可溶性EPCRの上昇を示す例が9/15例(60%)と多く占め、その他のリウマチ性疾患では、3/18例(11%)のみが上昇を示した。血管炎では、4/10例(40%)に増加がみられた。このように、SLEでは、ステロイド投与により、可溶性EPCRの上昇する例が有意に多いことが示された($p<0.05$)(表3)。

ステロイド投与によるsEPCR変動パターンの疾患別解析

	SLE	血管炎	その他
上昇例	9 (60%)*	4 (40%)	3 (11%)
治療後上昇	7	2	1
持続高値	2	2	2
低下例	6 (40%)	6 (60%)	15 (89%)
治療後低下	1	3	3
持続正常	5	3	12
計	15	10	18

* $p<0.05$

SLEでは、ステロイド投与により、可溶性EPCRの上昇する例が有意に多い

表3

4. 考察・結論

リウマチ性疾患患者では可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリン値が上昇することが示されたが、両者に相関はなかった。ステロイド投与により、可溶性 EPCR は大きく変動したが、可溶性トロンボモジュリンの変動は乏しかった。疾患別の活動性のある患者では可溶性 EPCR はSLEで上昇が見られたが、可溶性トロンボモジュリンはとくに差は認めなかった。以上のことより、可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリンは血管内皮細胞より異なる機序により産生され、また病態生理上も異なる意義を有することが示唆された。

今回の研究では、EPCR の多型性を解析していないため、EPCR のフェノタイプ解析が及ぼす可溶性 EPCR の産生についての検討が今後必要となると考えられる。

とりわけ、SLEでは、疾患活動期に可溶性EPCRの増加が特徴的に示されており、さらにステロイドの大量投与により、可溶性 EPCR はさらに上昇する症例が有意に多く、このことはSLE において大腿骨頭壊死の発生の頻度が疾患特異的に高いことと関連している可能性も示唆される。SLE における大腿骨頭壊死の発生には、膠原病原疾患による血管内皮細胞傷害に加えて、ステロイド投与による可溶性 EPCR の上昇がプロテイン C 抗凝固経路を阻害し、そのことにより、血栓形成が起こりやすくなっていることが関連している可能性もある。今後、解析症例数を増やすとともに、活性型プロテイン C の補充療法やメタロプロテアーゼ・インヒビターなどによる可溶性 EPCR の産生抑制などによる大腿骨頭壊死の予防法に対する試みも考慮される。

5. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koarada S, Haruta Y, Mitamura M, Tada Y, Morito F, Ohta A, Nagasawa K. Ex Vivo CD4+ T Cell Cytokine Expression from Patients with Sjögren's Syndrome Following In Vitro Stimulation to Induce Proliferation. *Rheumatology(Oxford)*. (in press)
- 2) Koarada S, Ide M, Haruta Y, Tada Y, Ushiyama O, Morito F, Ohta A, Nagasawa K. Two cases of antinuclear antibody negative lupus showing increased proportion of RP105-lacking B cells. *J Rheumtol*. 32(3): 562-4, 2005
- 3) Nagasawa K, Tada Y, Koarada S, Horiuchi T, Tsukamoto H, Murai K, Ueda A, Yoshizawa S, Ohta A. Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: prospective study by MRI. *Lupus*. 14(4): 385-90, 2005

2. 学会発表

- 1) 血管炎症候群における可溶性内皮プロテインC受容体の検討. 小荒田秀一, 多田芳史, 春田善男, 三田村未央, 大田明英, 長澤浩平. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 Page135、横浜、2005.4.18.

6. 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

7. 参考文献

- 1) Tsuneyoshi N, Fukudome K, Horiguchi S, Ye X, Matsuzaki M, Toi M, Suzuki K, Kimoto M. Expression and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines. *Thromb Haemost* 85:356-61, 2001

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

ステロイド投与後早期における骨内の DNA 酸化障害の骨壊死発生への関与

市堰 徹、兼氏 歩、北村憲司、松本忠美 (金沢医科大学 整形外科)
上田善道、勝田省吾 (金沢医科大学 第2病理学)

- (目的) : ステロイド投与家兎における骨壊死発生に骨内の DNA 酸化傷害が関与しているか否かの検討。
(対象と方法) : 約 3.5Kg の日本白色家兎でステロイド非投与 5 羽を N 群、メチルプレドニゾロン 4mg/kg を一回のみ殿筋内投与した後、3 日、5 日、14 日で犠牲死とした各 10 羽をそれぞれ A、B、C 群とし、4 群間で 8-OHdG に特異性が高いとされている N45.1 モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。
(結果) : 8-OHdG Index は、N 群(171±2.1)、A 群(172±3.8)、B 群(612±4.1)、C 群(653±7.8)であり、N、A 群と比較し B、C 群で有意に増加していた(p<0.001)。
(結論) : ステロイド投与早期の骨内酸化傷害は、骨壊死発生に深く関与していると考えられた。

1. 研究目的

近年、血管障害などを含む多くの病態や疾患に深い関与が示されている生体内酸化ストレスが、ステロイド性骨壊死の発生に関与していることが報告されている¹⁾。組織の酸化障害はアポトーシスを誘導する因子のひとつとしても知られている。組織の DNA が酸化的損傷を受けると、グアニン塩基が酸化された 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)が生成され、主要な酸化的障害のマーカーとして注目されている。

本実験では、ステロイド投与後早期における骨内の DNA の酸化障害の有無について家兎モデルを用いて調査し、骨壊死と DNA 酸化障害との関与について検討することを目的とした。

2. 対象と方法

本研究のプロトコールは、金沢医科大学動物実験指針に基づいて行った。

対象は約 3.5Kg の日本白色家兎でステロイド非投与 5 羽を N 群、メチルプレドニゾロン 4mg/kg を一回のみ殿筋内投与した後、3 日、5 日、14 日で犠牲死とした各 10 羽をそれぞれ A、B、C 群とし、4 群間で比較検討した。

3. 検討項目

8-OHdG に特異性が高いとされている N45.1 モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。また、NIH Image を使用し、各群の positive area (8-OHdG %PA) を算出し、4 群間で比較検討した。

4. 結果

免疫組織化学的検討による陽性所見は、各群とも大腿骨近位骨幹部の造血細胞に認められた。しかしながら N 群、A 群では、B 群、C 群と比較すると明らかに少なく、陽性細胞は散在性に認めるのみであった。一方 B、C 群では本モデルにおける骨壊死好発部位である大腿骨近位骨幹部に酸化障害を受けた造血細胞の集簇が観察された。また、8-OHdG Index は、N 群(171±2.1)、A 群(172±3.8)、B 群(612±4.1)、C 群(653±7.8)であり、N、A 群と比較し B、C 群で有意に増加していた(p<0.001)。

5. 考察

ステロイド性骨壊死の発生時期を知ることは、機序の解明や予防法を確立するために非常に重要である。

本研究では、本モデルにおいて病理組織学的に骨壊死を認めていないステロイド投与後 5 日ですでに骨内造血細胞が強く酸化的障害を受けていた。すなわち、ステロイド投与後かなり早期に骨内における

Ischemic な Event が生じやすく骨壊死発生につながる環境が形成されていることが考えられた。また、B 群と骨壊死が 70% に認められた C 群における酸化障害の発生に有意差がなかったことから、酸化障害は骨壊死の結果として生じたものではなく、むしろ原因としてとらえやすいのではないかと考えた。

6. 結論

ステロイド投与早期の骨内酸化傷害は、骨壊死発生に深く関与していると考えられた。

7. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Ichiseki, A. Kaneuji, S. Katsuda, Y. Ueda, T. Sugimori, T. Matsumoto, DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis, *Rheumatology* 44(2005), 456-460.
- 2) T. Ichiseki, Y. Ueda, S. Katsuda, K. Kitamura, A. Kaneuji, T. Matsumoto, Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats, *Rheumatology*. in press.

8. 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

9. 参考文献

- 1) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M et al: Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci* 2004; 9: 509-15.

ステロイド投与家兔大腿骨髄の観察: 骨髄細動脈における微小脂肪塞栓の存在

福井清数、兼氏 歩、市堰 徹、杉森端三、北村憲司、松本忠美 (金沢医科大学整形外科)
木南利栄子、篠原治道 (金沢医科大学解剖学Ⅱ)

当科では免疫組織学的検討を中心に骨壊死発生の機序を検討してきた。本研究の目的は免疫組織学的手法ではなく走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて大腿骨髄内を広く観察することにより、形態学的観点からステロイド投与による大腿骨髄内の微小変化を検索した。その結果、微小脂肪塞栓を骨髄細動脈内において観察し得たので報告する。

1. 研究目的

前回の班会議で骨髄静脈内に直径 $50\mu\text{m}$ 程度の球形の構造物がみられることを報告した¹⁾。この球形の構造物は戻しの操作により脂肪滴であることがわかった。今回同様の脂肪滴を骨髄細動脈内においても観察することができたので報告する。

2. 研究方法

対象: 体重 1kg あたりに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た体重約 3.5kg の雌性日本白色家兎である。筋注の翌日を第 1 日とし、5 日目に 5 羽、8 日目に 5 羽、14 日目に 6 羽を犠牲死とした。また生食のみ臀筋内に筋注し、14 日目に犠牲死とした 6 羽をコントロールとした。

実験方法: 静脈麻酔下に開腹し、腹部大動脈を露出した。約 4°C の生理食塩水および1%グルタルアルデヒド-1%リン酸緩衝液で還流固定を行った。その後直ちに大腿骨を摘出し、近位内側 1/3 部の骨髄を摘出した。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、1%オスミウム酸-リン酸緩衝液で 3 時間後固定を行った。25 および 50%DSMO-カゴジル酸溶液 (PH7.4) で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。これを 70%-100%の希釈列系のアルコールで脱水した後、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 で骨髄内動静脈を観察した²⁾。また SEM で観察した総面積を scion image を用いて算出し評価方法のひとつとして加えた。

3. 研究結果

ステロイド投与後 5 日目で骨髄細動脈内に脂肪滴を認めた。5 日目ではこれらの脂肪滴が細動脈を閉塞する像は確認することができなかった。ステロイド投与後 8 日目になると直径 $10\mu\text{m}$ 程度の細動脈を完全に閉塞した脂肪滴がみられた (図1)。

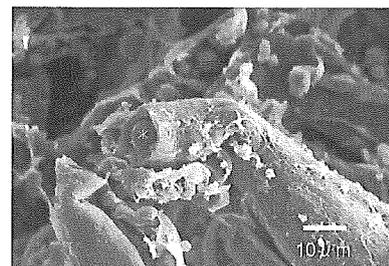


図1 ステロイド投与後8日目の細動脈内脂肪滴(*)

ステロイド投与後 14 日目では直径 $50\mu\text{m}$ 程度の脂肪滴が細動脈内において観察された (図2)。

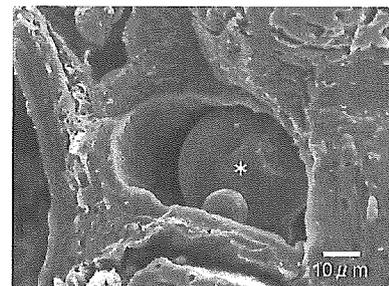


図2 ステロイド投与後14日目の細動脈内脂肪滴(*)

またステロイド投与後 14 日目になると、直径 $50\mu\text{m}$ 程度の細動脈をほぼ完全に閉塞する脂肪滴を捉えるこ

ともできた。観察総面積はコントロールでは1羽あたり118-135mm²、ステロイド投与後5日目では1羽あたり121-138mm²、ステロイド投与後8日目では1羽あたり125-142mm²、ステロイド投与後14日目では1羽あたり123-141mm²で、各群間でばらつきはなくほぼ一定していた。骨髓細動脈内において観察された脂肪塞栓はステロイド投与後8日目で5個所、14日目でも5個所観察された。しかしコントロールの骨髓細動脈内には脂肪滴および脂肪塞栓を認めなかった。

4. 考察

脂肪塞栓説は1966年にJonesとSakovichがはじめて実験的に報告した⁹⁾。それ以降脂肪塞栓説はステロイド性骨壊死発生要因のひとつとしてよく知られている。一方、有力な説でありながら脂肪塞栓の組織像を提示することは非常に困難とされてきた。実際脂肪塞栓の組織像はごくわずかしき提示されていない。しかもそれらの写真はすべて光顕によるものである⁴⁾⁵⁾。今回我々ははじめて脂肪塞栓の電顕像を提示することができた。本研究で比較的容易に脂肪塞栓像を提示することができ、従来の研究において脂肪塞栓の観察が困難であった理由としてSEMではエタノール脱水前にオスミウムにより脂肪固定をするので脂肪滴は残存するが、パラフィン切片では脂肪固定なしにエタノールで脱水処理(脱脂)するので脂肪滴は消失してしまうからではないかと考えている。また脱水前に脂肪固定しても脂肪滴と脂肪細胞を区別することが非常に困難であることも一因として挙げられるのではないかと考えている。

5. 結論

ステロイド投与家兎において微小脂肪塞栓が骨髓細動脈内にみられた。微小脂肪塞栓の発生を投与後8日に認めた。ステロイド投与後8日目では直径10 μ m程度の極めて小さな細動脈が、14日目には直径50 μ m程度の大きな細動脈が脂肪滴により閉塞していた。

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

8. 参考文献

- 1) 福井清数ら. 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? 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16年度報告書.33-35, 2005.
- 2) Fukui K, Kominami R, Kaneuji A, Matsumoto T, Shinohara H: A new method of perfusion fixation for the rabbit femur. *Okajima Folia Anat. Jpn.* 81:57-62, 2004.
- 3) Jones JP Jr: Fat embolism of bone. *J Bone Surg* 48A:149-164,1966.
- 4) Jones JP Jr: Fat embolism and osteonecrosis. *Orthop Clin North Am* 16:595-633,1985.
- 5) Fisher DE: The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid-induced avascular necrosis:clinical and experimental results. *Clin Orthoped Related Res* 130:68-80, 1978.
- 6) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K: Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues. *Arthritis Rheum* 40:2055-2064, 1997.

マウス骨壊死モデルの解析

田中 栄 (東京大学医学部附属病院 整形外科)
大熊千晶 (順天堂大学医学部 整形外科)

研究要旨:特発性大腿骨頭壊死の分子メカニズムを解明するためには適切は動物モデル、特に遺伝子操作が容易なマウスモデルの作成が有用である。われわれは昨年マウス尾部結紮による新しい骨壊死モデルの作成を報告した。本年はさらにその組織像を詳細に検討したので報告する。

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、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、何らかの原因で大腿骨頭部の阻血が生じ、骨細胞および骨髄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細胞壊死に至る分子メカニズムは不明なままである。

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。われわれは昨年本研究班においてマウス尾部結紮・再還流によって結紮遠位部に骨壊死が生じることを報告した。本年の研究班ではさらにその組織像を詳細に解析した。

2. 研究方法

マウス尾部結紮モデル

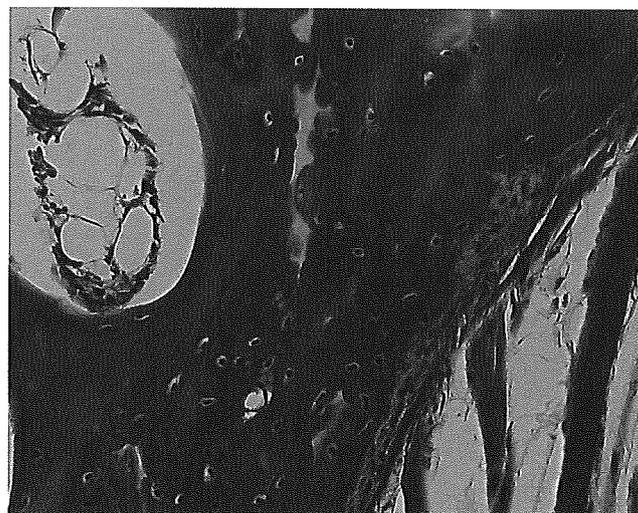
8週齢の ddy マウスを使用し、尾部を巻きワイヤーで結紮し、8時間後に結紮を解除する。血流再開後、4、7、14、28日後に結紮部の近位、遠位部の尾椎を採取、ホルマリン固定を行い、EDTA 脱灰後、組織学的検討に供した。骨細胞アポトーシスは TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 染色

によって検討した。HE 染色によって認められる empty lacunae の割合を定量化した。破骨細胞分化因子である receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) の発現を結紮近位部・遠位部において real time PCR によって定量化した。

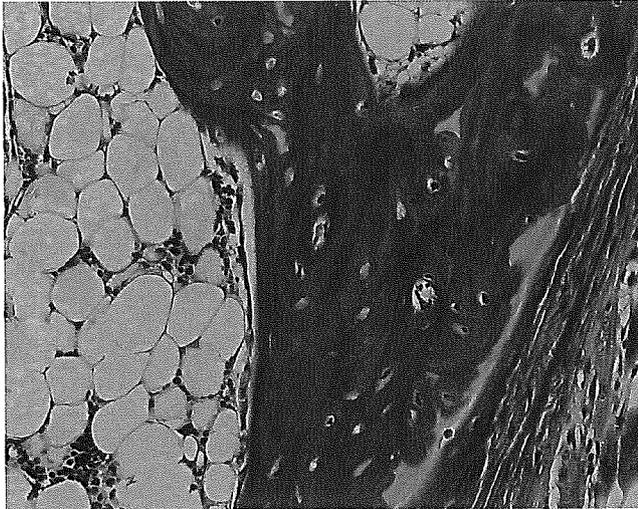
3. 研究結果

マウス尾部結紮 8 時間後に再還流を行ったところ、再還流後 7 日目からアポトーシス陽性の骨細胞の出現が認められた。また再還流後 14 日目には多数の empty lacunae が (図1)、28 日目には旺盛な骨新生が認められた (図2)。再還流後 7 日目に結紮遠位で RANKL の発現上昇が認められ、14 日目、28 日目には破骨細胞数の増加が認められた。

図1: 結紮・再還流後 14 日目の組織像。結紮遠位部で多数の empty lacunae が観察される

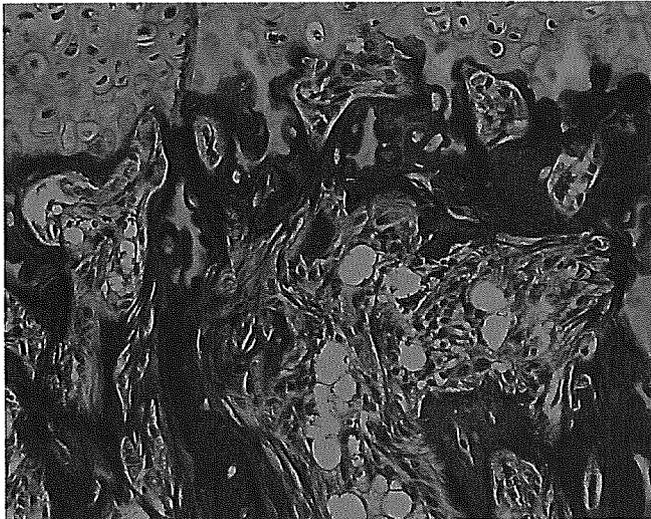


結紮近位部



結紮遠位部

図2: 結紮・再還流後 14 日目の組織像。結紮遠位部で旺盛な骨新生が観察される



4. 考察

血流の遮断とそれに引き続く再還流による組織障害は ischemia reperfusion injury として脳、肺、腎臓、腸管などさまざまな臓器で報告されている。われわれは、「ION の本体は大腿骨頭部の阻血とその後の再還流による骨・骨髄細胞へのダメージである」との仮説に基づき、尾部結紮再還流による骨壊死動物モデルを作成し、その組織像を詳細に検討した。このモデルにおいてはマウスの尾部の 8 時間結紮し、その後血流を再開するという方法によって、結紮尾部に確実に虚血・再還流を起こすことが可能である。再還流後 7 日目からアポトーシスに陥った骨細胞の数が増加し、14 日目には多数の empty lacunae が、そして 28 日

目には骨細胞壊死部において旺盛な新生骨の形成が認められる。このモデルを用いることによって骨細胞が壊死に陥る際に変動する遺伝子の検索が可能である。われわれは結紮遠位部において 7 日目に RANKL の発現が誘導されることを明らかにした。今後 DNA microarray などを用いることによって、骨壊死の過程で変動する遺伝子を網羅的に解析し、これを実際の臨床例と照らし合わせることによって ION の分子メカニズムに迫ることが可能であると考えられる。

5. 結論

マウス尾部結紮による骨壊死モデルは ION の natural course をある程度再現していると考えられる。今後このモデルを用いることによって ION の分子メカニズムに対する知見が得られるものと考えられる。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, Tanaka S, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor \cdot B ligand and involved in osteoclast adhesion and migration. *Blood*. 2005, 105: 2963-2969.
- 2) Yagishita N, Ohneda K, Amano T, Yamasaki S, Sugiura A, Tsuchimochi K, Shin H, Kawahara K, Ohneda O, Ohta T, Tanaka S, Yamamoto M, Maruyama I, Nishioka K, Fukamizu A, Nakajima T. Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis. *J Biol Chem* 2005, 280:7909-7916.
- 3) Gohda J, Akiyama T, Koga T, Takayanagi H, Tanaka S, Inoue JI. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *Embo J* 2005, 24:790-799.
- 4) Hsia, DA, Lim S-T, Bernard-Trifilo JA, Mitra, SK, Tanaka S, den Hertog, J, Streblow, DN, IlicZ D, Ginsberg, MH, Schlaepfer DD. Integrin $\alpha 4 \beta 1$ promotes FAK-independent cell motility via $\alpha 4$ cytoplasmic domain-specific activation of Src. *Mol Cell Biol* 2005, 25:9700-9712.
- 5) Fukuda A, Hikita A, Wakeyama H, Akiyama T, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of osteoclast apoptosis and motility by small

- GTPase binding protein Rac1. *J Bone Miner Res* 2005, 20:2245-2253.
- 6) Hikita A, Kadono Y, Chikuda H, Fukuda A, Wakeyama H, Yasuda H, Nakamura K, Oda H, Miyazaki T, Tanaka S. Identification of an alternatively spliced variant of CAPRI as a possible regulator of RANKL shedding. *J Biol Chem* 2005, 280: 41700-41706.
 - 7) Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 2005, 281: 2120-2127.
 - 8) Tanaka S. Intracellular signal transduction pathways: good therapeutic targets for joint destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatology* 2005, 15:19-27.
 - 9) Akiyama T, Miyazaki T, Bouillet P, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S. In vitro and in vivo assays for osteoclast apoptosis. *Biol. Proced. Online* 2005, 7: 48-59.
 - 10) Tanaka S, Takahashi N, Nakamura K, Suda, T. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting RANKL-RANK signaling system. *Immunological Review* 2005, 108:30-49.
 - 11) 田中 栄「骨代謝—Bone Cell Biology—」*SERM* 1:44-51, 2005.
 - 12) 太田博明、田中 栄、加藤茂明、野崎雅裕「座談会 SERMとは」*SERM*1:107-121, 2005.
 - 13) 疋田温彦、田中 栄「関節リウマチの成因と病態生理 概論的事項 破骨細胞と軟骨・骨破壊機構」*日本臨床*Vol 63, Supple 1:84-86, 2005.
 - 14) 泉 亮良、田中 栄 「RAの主な整形外科手術と手術を勧めるタイミング—適応と有効性—」*Medical Practice* 22:487-492, 2005.
 - 15) 田中 栄 「口が語る性差～口腔所見の性差から全身を診る～ 第7回 骨粗鬆症の病態と新しい治療法」*性差と医療* 2:767-773, 2005
 - 16) 田中 栄「RANKLと骨破壊」*炎症と免疫* 13:435-440, 2005.
 - 17) 田中 栄「RANKLワクチンによる新骨代謝疾患治療」*Clinical Calcium* 15:1160-1164, 2005
 - 18) 山田浩司、田中 栄「人工膝関節術後感染症の治療戦略」*リウマチ科* 33:595-602, 2005
 - 19) 中村正樹、田中 栄「骨侵食の機序」*日本臨床* 63:1571-1573, 2005.
 - 20) 十字琢夫、田中 栄「RANKLワクチン」*日本臨床* 63:1666-1670, 2005.
 - 21) 田中 栄「骨代謝—Bone Cell Biology—」*SERM* 2:42-47, 2005.
 - 22) 田中 栄「Osteoimmunology 特集にあたって」*The Bone* 19:641-642, 2005.
 - 23) 田中 栄「破骨細胞アポトーシスの分子機構」*臨床免疫* 44:612-614, 2005.
- ## 2. 学会発表
- 1) A New York Academy of Sciences Meeting “Skeletal development and remodeling in health, disease & aging” (2005.5.18-21) New York: Session I, BONE CELL FORMATION AND FATE “Regulation of the life and death of the osteoclast”
 - 2) 2nd Asian Osteoporosis Forum (2005.9.3-4) Tokyo. Session 3: Bone & Other Disease States “Rheumatoid Arthritis and Bone”.
 - 3) 2nd Meeting of bone biology forum (2005.11.18-19) Fujii, Session VI “Regulation of the life and death of the osteoclast”
 - 4) 第2回大阪SERM学術セミナー(2005.5.26)大阪「骨粗鬆症治療の新世紀」
 - 5) 第37回日本結合組織学会学術集会(2005.5.27)富山 特別講演2「関節リウマチによる骨関節破壊の分子メカニズム」
 - 6) 相楽・綴喜医師会学術講演会(2005.6.4)京都「新しい骨粗鬆症治療戦略」
 - 7) 第43回 聖マリアンナ医科大学難治研センター大学院セミナー「骨破壊をターゲットにした骨代謝疾患治療戦略」(2005.6.2)川崎
 - 8) 竜ヶ崎市・牛久市医師会講演会(2005.6.7)龍ヶ崎「骨粗鬆症治療の新世紀」
 - 9) 神奈川県央地区学術講演会(2005.6.10)相模原「骨粗鬆症治療の新世紀」
 - 10) SERM学術講演会(2005.6.24)前橋「骨粗鬆症治療の新世紀」
 - 11) 第5回臨床骨代謝フォーラム(2005.7.9)東京「関節リウマチにおける骨破壊の分子メカニズム」

- 12) 第23回 日本骨代謝学会学術集会
(2005.7.21-23)大阪 イブニングセミナー2「新しい骨粗鬆症治療薬とその作用機序」
- 13) Bone & Joint Research Club～第2回 骨と関節の代謝調節を考える基礎の会～(2005.10.8-9) かつさ 特別セッション:【 関節疾患克服に向けての分子生物学的アプローチ 】「骨破壊の分子メカニズムと新しい治療戦略」
- 14) 第33回 臨床免疫学会総会 ランチョン教育講演 (2005.10.29) 京都「骨破壊をターゲットにした関節リウマチの治療戦略」
- 15) 第11回 埼玉県骨粗鬆症研究会(2005.11.5)さいたま市 研修特別講演「骨粗鬆症の新しい治療」
- 16) 第33回 日本リウマチ・関節外科学会
(2005.11.11)品川 ワークショップ2 関節リウマチ治療における骨・関節破壊抑制の最新知見「関節リウマチにおける骨破壊の分子メカニズム」
- 17) 第10回 骨代謝セミナー(2005.12.22)東京「関節リウマチにおける骨破壊のメカニズムと治療戦略」

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

ピタバスタチンによるステロイド性骨壊死予防効果

西田顕二郎、山本卓明、本村悟郎、神宮司誠也、岩本幸英（九州大学整形外科）

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるピタバスタチンは、第3世代のスタチン系製剤で、強力な総コレステロール低下作用およびHDL-コレステロール上昇作用を有しており、近年、主に動脈硬化性疾患治療の分野で注目されている。今回、ステロイド性骨壊死モデルを用いて、ピタバスタチンの骨壊死予防効果を検討した結果、コントロール群では骨壊死発生率が70%であったのに対し、ピタバスタチン投与群では43%であった。

1. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序については、凝固異常(1)、脂質代謝異常(2)、酸化障害(3)などの関与が報告されている。抗高脂血症剤投与によるステロイド性骨壊死予防効果について、ステロイド投与患者にスタチンを投与することで骨壊死発生が減少したという報告(4)や、ステロイド骨壊死モデルにプロブコールを投与することで骨壊死発生率が減少したという報告(5)がされている。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるピタバスタチンは、第3世代のスタチン系製剤で、強力な脂質低下作用を有しており、近年、主に動脈硬化性疾患治療の分野で注目されている(6)。前回の、preliminary な実験では、ステロイド骨壊死モデルにピタバスタチン投与を行ったところ、骨壊死発生率が、ステロイド単独投与群で70%(14/20)であったのに対し、ピタバスタチン投与群では、43%(9/21)であった。今回、実験数を増やし、ステロイド性骨壊死モデルにおけるピタバスタチンの骨壊死予防効果を検討した。

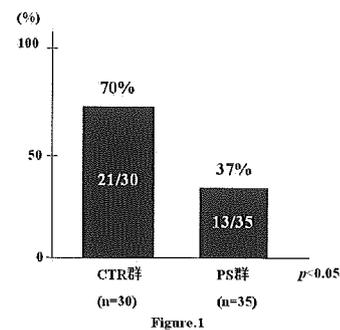
2. 研究方法

28週齢以上の日本白色家兔65羽に、メチルプレドニゾロン(以下MPSL)20mg/kgを一回右臀筋内に注射した。これらを、ステロイド筋注前2週より筋注後2週までピタバスタチン0.7mg/kgを毎日静脈注射した群(PS群、n=35羽)と、ステロイドのみ投与した群(CTR群、n=30羽)の2群に分けた。各群をMPSL投与後2週で犠牲死とし、両大腿骨・上腕骨の近位1/3

及び遠位部における骨壊死発生を病理学的に検討した(7)。週に一回、AM8~9時に採血を行い、各脂質系の検査を行った。

3. 研究結果

骨壊死発生率は、CTR群で30羽中21羽で、70%であったのに対し、PS群では35羽中13羽で、37%であり、CTR群に比して有意に低下していた(Fig.1)。



血液データについては、T-Chol、LDL-Cにおいて、PS群で有意な低下を認めた。その他の中性脂肪、HDLコレステロール、リポ蛋白分画については、両群間で有意差は認められなかった(Fig.2)。

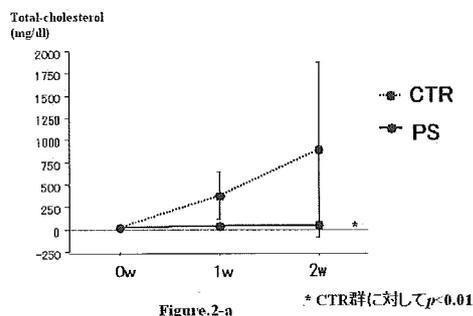


Figure.2-a

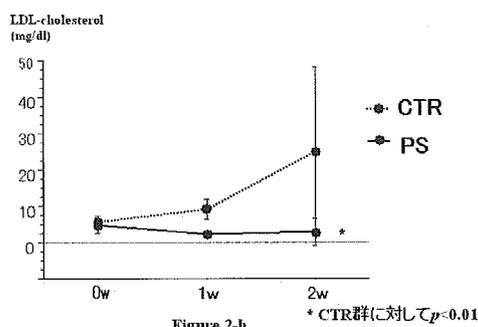


Figure.2-b

4. 考察

抗高脂血症剤である、プロブコール投与における同様の実験の結果、骨壊死発生率は37%であり、ピタバスタチン投与群とほぼ同等の結果であった。LDL-Cについては、前回同様、プロブコール群、ピタバスタチン群ともにコントロール群より有意な低下を認めていた。さらにピタバスタチン群では、プロブコール群と比してさらに有意な低下を認めた。しかしながら、骨壊死発生率に、両群間の差を認めていないことを考えると、単純に脂質を低下させることが、必ずしも骨壊死発生減少には相関しないのではないかと考えられる。今後、骨壊死との相関が考えられるその他の因子について検討を行っていく予定である。

5. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

西田 顕二郎、山本 卓明、本村 悟郎、神宮司 誠也、岩本 幸英:ピタバスタチンによるステロイド性骨壊死予防効果、第20回 日本整形外科学会基礎学術集会、三重、2005.4.10-10.21、第32回 日本股関節学会、新潟、2005.11.7

6. 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

7. 参考文献

- 1) Jones JP Jr. Intravascular coagulation and osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 277:41-53,1992
- 2) Irisa T, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Iwamoto Y, Sugioka Y, Sueishi K. Osteonecrosis induced by a single administration of low-dose lipopolysaccharide in rabbits. Bone. 28(6):641-9,2001
- 3) Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda Y, Sugimori T, Matsumoto T. DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. Rheumatology(Oxford) 44(4):456-60,2005
- 4) Pritchett JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. Clin Orthop Relat Res 386:173-8,2001
- 5) 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 50(10):3387-91,2004
- 6) Hayashi T, Rani P JA, Fukatsu A, Matsui-Hirai H, Osawa M, Miyazaki A, Tsunekawa T, Kano-Hayashi H, Iguchi A, Sumi D, Ignarro LJ. A new HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin remarkably retards the progression of high cholesterol induced atherosclerosis in rabbits. Atherosclerosis. 176(2):255-63,2004
- 7) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum. 40(11):2055-64,1997

骨壊死動物モデル組織診断検討会の報告

高尾正樹、菅野伸彦、中村宣雄、坂井孝司（大阪大学 整形外科グループ）
岩切健太郎（大阪市立大学 整形外科グループ）
山本卓明、西田顕二郎（九州大学 整形外科グループ）
加畑多文（金沢大学 整形外科グループ）

骨壊死動物モデルの組織診断が複数の研究施設でどの程度一致しているか、またその組織診断基準の統一性がどの程度あるかを検証するため、2005年10月22日大阪市立大学整形外科医局にて大阪大学、大阪市立大学、九州大学、金沢大学の4施設の代表者が集まりそれぞれ7-11標本合計35標本を持参しそれぞれ組織診断を行った。その結果を報告する。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症の予防法確立および前臨床的検証のためには、壊死の起点が明らかな再現性の高い動物モデルによる実験が不可欠である。しかしながら、ステロイド単独投与による骨壊死動物モデルにおいては、その反応が動物種によっても異なり¹⁻³⁾、また、ウサギ骨壊死モデルにおいても、投与剤の種類や投与方法や観察時期によっても骨壊死発生頻度が異なる³⁻¹³⁾。骨壊死動物モデルの診断は、組織学診断であり信頼性が高いが、早期骨壊死の病理診断は必ずしも容易ではない^{5, 14-20)}。そこで、骨壊死動物モデルの組織診断が複数の研究施設でどの程度一致しているか、またその組織診断基準の統一性がどの程度あるかを検討するため、骨壊死動物実験モデルを手がけてきた4つの研究施設による組織診断検討会を行った。

2. 研究方法

4施設からウサギ近位大腿骨のHE標本を合計35枚用意した。

九州大学からは7枚のプレパラートが用意され、標本は10%中性ホルマリン固定後、蟻酸脱灰し(3日間)、

4 μ mの厚みの薄切標本をHE染色したもので、ステロイド骨壊死モデル(20 mg/kg メチルプレドニゾロン(MP))が1枚、ステロイド骨壊死モデル(20 mg/kg MP)およびMP投与2週間前からピタバスタチン0.7mg/kg/day4週間静注)6枚で、前者は骨壊死と診断され、後者のうち2枚が骨壊死と診断されたものであった。

大阪大学からは11枚で、標本は10%中性ホルマリン固定後、EDTA脱灰し、4 μ mの厚みの薄切標本をHE染色したもので、ウサギ血清病骨壊死モデルが1枚、ステロイド骨壊死モデル(20 mg/kg MP)が9枚、コントロール用無処置ウサギ標本1枚であった。ウサギ血清病骨壊死モデルの標本の診断は骨壊死で、ステロイド骨壊死モデル(20 mg/kg MP)ではステロイド投与後3日が1枚で正常と診断され、ステロイド投与後3週が8枚で、そのうち3枚を骨髄壊死、残り5枚は正常と診断した。

大阪市立大学からは8枚で、標本は10%中性ホルマリン固定後、蟻酸脱灰し、4 μ mの厚みの薄切標本をHE染色したもので、ステロイド骨壊死モデル(20 mg/kg MP一回筋注後3週)7枚とコントロール用無処置ウサギ標本1枚であった。ステロイド骨壊死モデル

のうち4枚が骨壊死と診断されたもので、他の3枚は骨壊死なしと判断したものであった。

金沢大学からは9枚で、標本は10%中性ホルマリン固定後、EDTA 脱灰し、5 μ mの厚みの薄切標本をHE染色したもので、ステロイド骨壊死モデル(4mg/kg MPを週1回投与)が8枚とコントロール用生食注射ウサギ標本1枚であった。ステロイド骨壊死モデルは、ステロイド1回投与後1週標本が3枚、2回投与後1週標本が1枚、4回投与後1週が3枚、16回投与後1週が1枚であった。ステロイド1回投与標本のうち2枚が早期骨壊死、1枚が骨髄壊死と診断され、2回投与標本は骨壊死と診断されていた。4回投与標本のうち2枚が骨壊死、1枚が骨髄壊死と診断され、16回投与標本は骨壊死と診断されていた。

各標本を盲目的に4施設ごとで観察し、骨髄所見、骨梁所見、総合診断の3項目を評価表に記入し、4施設間の診断の一致度を検討した。診断所見が不一致したものについては、全員で討議し、その内容を記録した。

3. 研究結果

各施設の診断結果を表1に示す。完全に診断が一致したものは全35標本中8標本(22.9%)で、内訳は骨壊死と診断した3標本と正常と診断した5標本であった。3施設で診断が一致したのは9標本(25.7%)で、内訳は3施設で骨壊死と診断した6標本、骨髄浮腫と診断した1標本、正常と診断した2標本であった。2施設で診断が一致したものが最も多く16標本(45.7%)で、全く一致しなかったものは2標本(5.7%)であった。骨壊死と診断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設があった標本が16標本(45.7%)あった。骨髄壊死と診断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設があった標本が2標本(5.7%)あった。またすべての施設が壊死ありと判定したものの骨壊死と骨髄壊死の判定にわかれた標本が7標本(20%)あった。

このうち、骨壊死と骨髄壊死の診断に分かれた7標本中2標本(標本名;阪大(1)、九大(6))、骨壊死と診

断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設がある16標本のうち8標本(標本名;九大(4)、阪大(3)、阪大(4)、市大(6)、市大(7)、金沢(2)、金沢(3)、金沢(5))(このうち標本金沢(3)では施設間で全く診断が一致しなかった)、骨髄壊死と診断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設があった標本2標本のうち1標本(標本名;九大(1))について討議を行った。

骨壊死と骨髄壊死の診断が分かれた標本

標本名;阪大(1)

九州大、大阪市大で骨壊死と診断されていたが、九州大、大阪市大の診断定義として骨壊死と骨髄壊死とを区別していないことによる相違であった。

標本名;九大(6)(図1)

九州大、大阪市大は骨壊死(骨髄壊死)の診断であったが、金沢大では骨壊死の診断であった。図1に占めす小骨梁のempty lacunaを陽性と診断した結果であった。

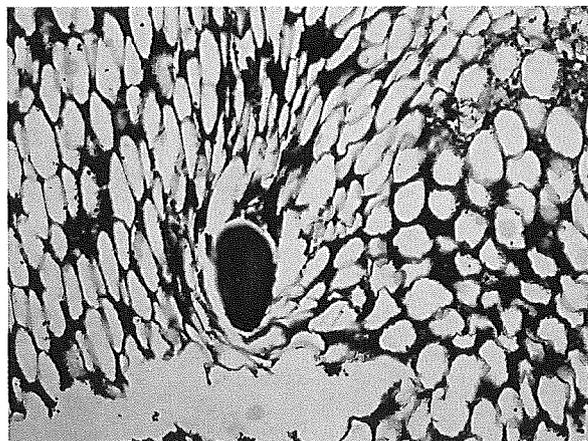


図1. 標本名;九大(6) HE \times 100

骨壊死と診断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設がある8標本

表 1. 診断結果

標本名	Model	診断結果				所見の 一致数
		九州大学	大阪大学	大阪市大	金沢大学	
九大 1	Pitavastatin	Bleeding	Normal	Normal	MN	2
九大 2	Pitavastatin	Edema	Edema	ON	Edema	3
九大 3	Pitavastatin	Edema	Artifact	ON	MN	1
九大 4	Pitavastatin	ON	Edema	ON	MN	2
九大 5	Pitavastatin	Edema	Others	ON	Edema	2
九大 6	Pitavastatin	ON	MN	ON	ON	3
九大 7	20mg 2wks	ON	ON	ON	ON	4
阪大 1	20mg 3wks	ON	MN	ON	MN	2
阪大 2	20mg 3wks	Fat necrosis	Normal	Normal	Degeneration	2
阪大 3	20mg 3wks	Normal	Normal	ON	ON	2
阪大 4	20mg 3wks	ON	Edema	ON	Edema	2
阪大 5	20mg 3wks	Edema	Normal	ON	Edema	2
阪大 6	20mg 3wks	ON	MN	ON	MN	2
阪大 7	20mg 3wks	ON	MN	ON	Edema	2
阪大 8	20mg 3wks	Normal	Edema	ON	Edema	2
阪大 9	20mg 3days	Normal	Normal	Normal	Normal	4
阪大 10	SS model 3w	ON	ON	ON	ON	4
阪大 10	Control	Edema	Normal	Normal	Normal	3
市大 1	20mg 3wks	Normal	Normal	ON	Normal	3
市大 2	20mg 3wks	ON	MN	ON	ON	3
市大 3	20mg 3wks	Normal	Normal	Normal	Normal	4
市大 4	20mg 3wks	ON	MN	ON	ON	3
市大 5	20mg 3wks	Normal	Normal	Normal	Normal	4
市大 6	20mg 3wks	ON	Normal	Normal	ON	2
市大 7	20mg 3wks	ON	Normal	ON	ON	3
市大 8	Control	Normal	Normal	Normal	Normal	4
金沢 1	4mg 16times	ON	MN	ON	ON	3
金沢 2	4mg 1time	ON	Normal	Normal	ON	2
金沢 3	4mg 2times	Normal	Artifact	ON	ON	2
金沢 4	Control	Normal	Normal	Normal	Normal	4
金沢 5	4mg 1time	ON	Artifact	Normal	ON	2
金沢 6	4mg 4times	ON	MN	ON	ON	3
金沢 7	4mg 1time	Bleeding	Normal	Normal	MN	2
金沢 8	4mg 4times	Edema	Normal	ON	Congestion	1
金沢 9	4mg 4times	ON	ON	ON	ON	4

(ON : 骨壊死、MN : 骨髄壊死)