

標本名;九大(4) (図 2,3)

九州大、大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)、金沢大が骨髄壊死、大阪大が骨髄浮腫の診断であった。1箇所の骨髄領域のヘマトキシリン染色性の低下と間質成分の増加、造血細胞の核の破碎変化の解釈で診断が分かれていた。

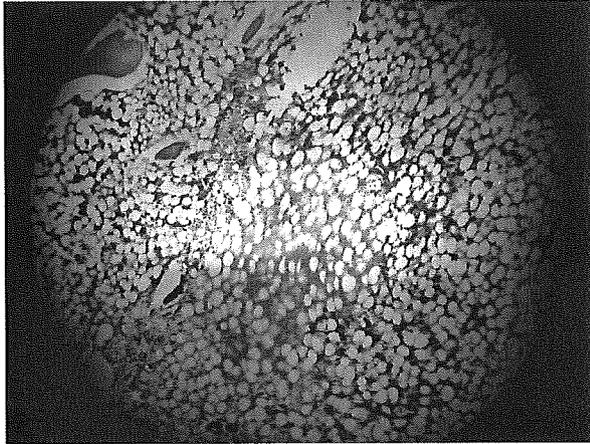


図 2. 標本名;九大(4) HE ×40

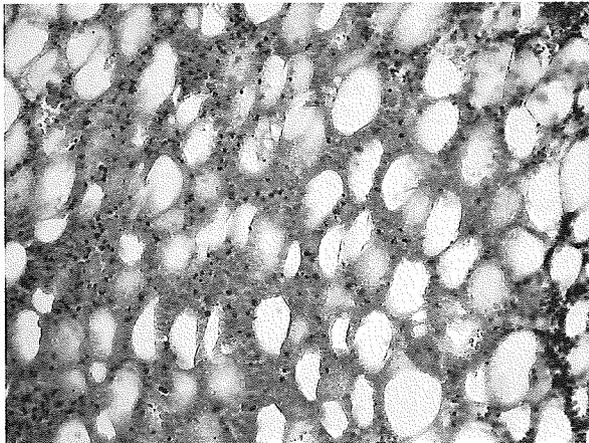


図 3. 標本名;九大(4) HE ×100

標本名;阪大(3) (図 4)

金沢大が骨壊死、大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)、九州大、大阪大が正常との診断であった。周囲のヘマトキシリン染色性の低下と造血細胞の破碎変化、その中の小骨梁の empty lacuna を陽性とするかどうかで診断が分かれていた。

標本名;阪大(4) (図 5)

九州大と大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)の診断で、金沢大と大阪大が骨髄浮腫の診断であった。図5に

示す間質成分を necrotic debris とするか浮腫性変化ととるかで診断が分かれていた。

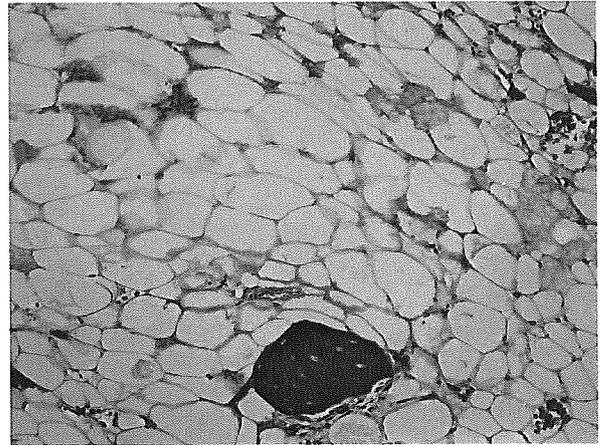


図 4. 標本名;阪大(3) HE ×100

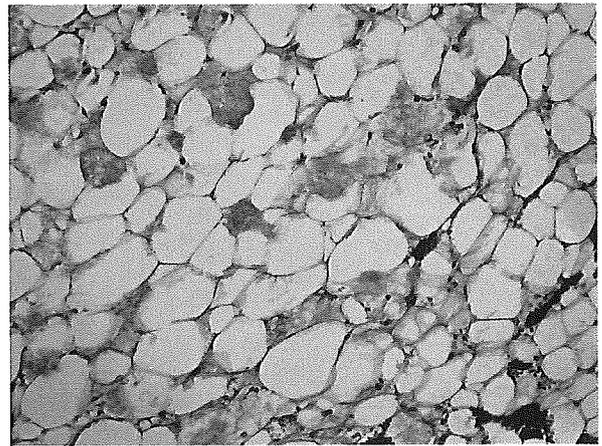


図 5. 標本名;阪大(4) HE ×100

標本名;市大(6)(図 6)

金沢大が骨壊死、九州大、大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)の診断、大阪大が正常の診断であった。骨髄組織のヘマトキシリン染色性の低下、造血細胞の破碎変化を陽性とするかどうかという点と、骨壊死に関しては骨髄病変に接する皮質骨の部分的 empty lacuna を骨壊死とするかどうかで診断が分かれていた。

標本名;市大(7)(図 7)

九州大、金沢大が骨壊死、大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)、大阪大が正常の診断であった。骨髄壊死に関しては骨髄組織のヘマトキシリン染色性の低

下、造血細胞の破碎変化を陽性とするかどうかで診断が分かれた。骨壊死に関しては図7に示す小骨梁の empty lacuna を陽性とするかどうかで診断が分かれていた。

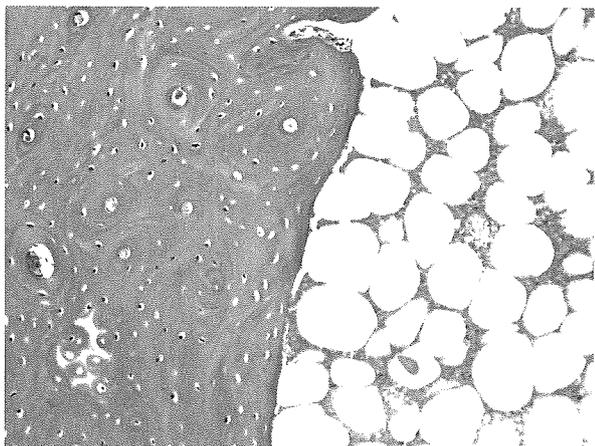


図6. 標本名;市大(6) HE ×100

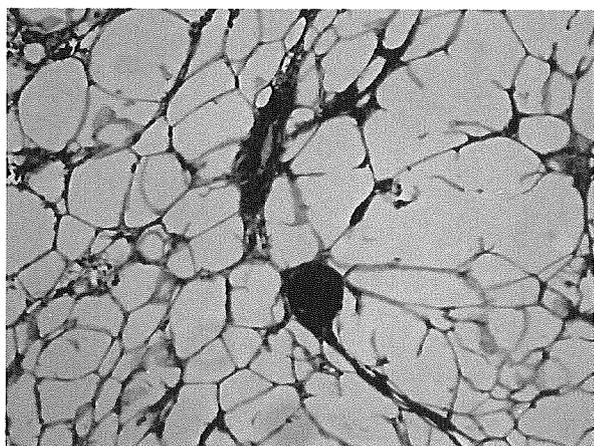


図7. 標本名;市大(7) HE ×100

標本名;金沢(2)(図8,9)

九州大と金沢大が骨壊死、大阪大、大阪市大が正常の診断であった。頸部内側に皮質骨に沿うヘマトキシリン染色低下領域を認めた標本であった。ステロイド4mg1回投与後1wの標本の早期例で、ヘマトキシリン染色低下領域には正常形態を有する細胞や、核の変化を認める細胞も混在しており、図8のヘマトキシリン染色低下領域を陽性とするかどうかで診断が分かれていた。骨壊死の診断についてはこの領域から離れた部分の小骨梁の empty lacuna を陽性とするかどうかで診断が分かれていた。

標本名;金沢(3) (図10)

九州大が正常、大阪大がアーチファクト、大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)、金沢大が骨壊死の診断であった。図2に示す小骨梁の empty lacuna を陽性と診断するかどうか、周囲の骨髄間質成分の増加とヘマトキシリン染色性の変化を壊死とするかどうかで診断が分かれた。金沢大の解釈では周囲の骨髄の変化は修復がすすみ修復性組織に置換された状態で empty lacuna のみ残った状態という解釈であった。明らかな骨髄壊死を伴わない小骨梁の empty lacuna の解釈で診断が分かれた標本であった。九州大学では、骨壊死の修復された像と考え、正常と診断していた。

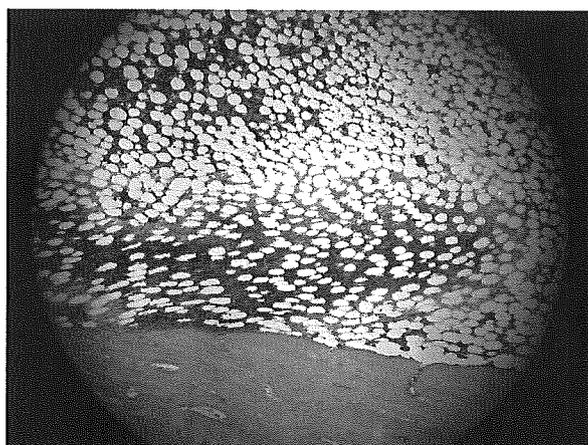


図8. 標本名;金沢(2) HE ×40

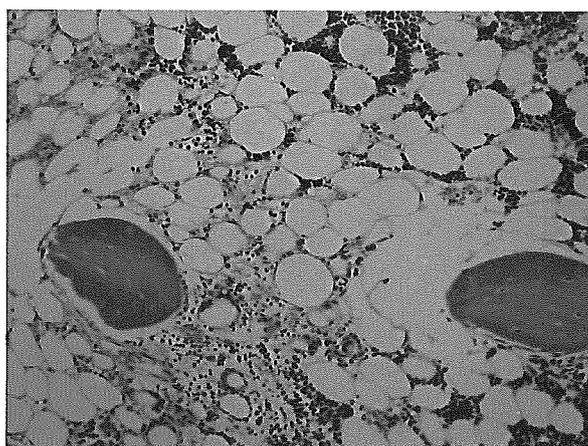


図9. 標本名;金沢(2) HE ×100

標本名;金沢(5)(図11,12)

これもステロイド4mg投与後1wの早期の標本であり診断が分かれた。九州大、金沢大が骨壊死、大阪

大がアーチファクト、大阪市大が正常の診断であった。図 11 のヘマトキシリン染色低下領域を陽性とするかどうかで診断が分かれていた。骨壊死の診断についてはこの領域に接する骨梁の partial empty lacuna を陽性とするかどうかで診断が分かれていた。

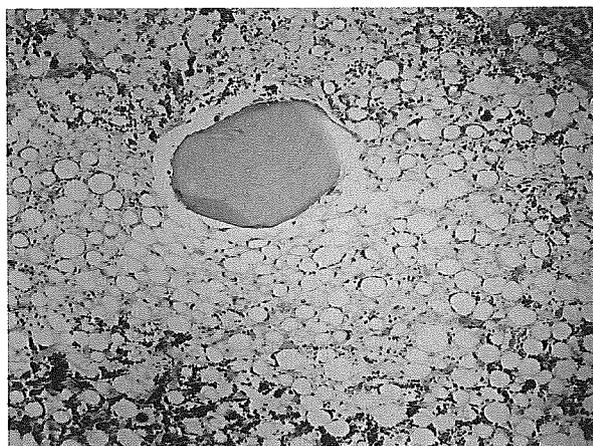


図 10. 標本名;金沢(3) HE ×40

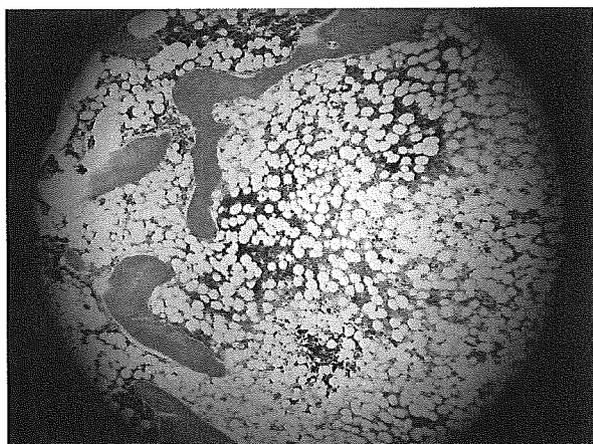


図 11. 標本名;金沢(5) HE ×40

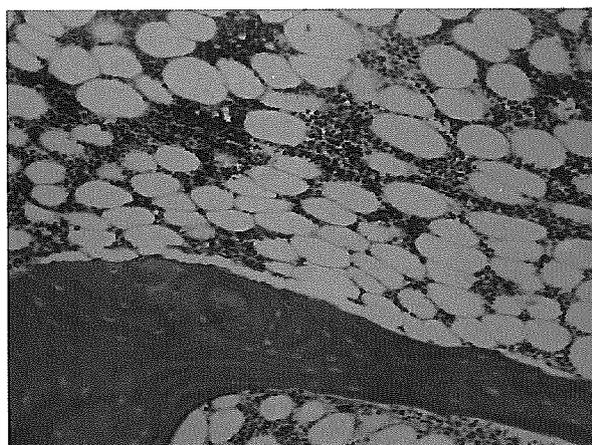


図 12. 標本名;金沢大(5) HE ×100

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

標本名;九大(1)(図 13)

金沢大が骨髄壊死、九州大が骨髄内出血、大阪大と大阪市大が正常の診断であった。標本の状態が比較的悪く骨髄組織の骨梁の亀裂や折返しがあり判定の難しいケースであったが、切片作成上の破碎を伴う骨髄組織の一部のヘマトキシリン染色性の低下を骨髄壊死と解釈した診断で、九州大では骨髄内出血の診断であった。

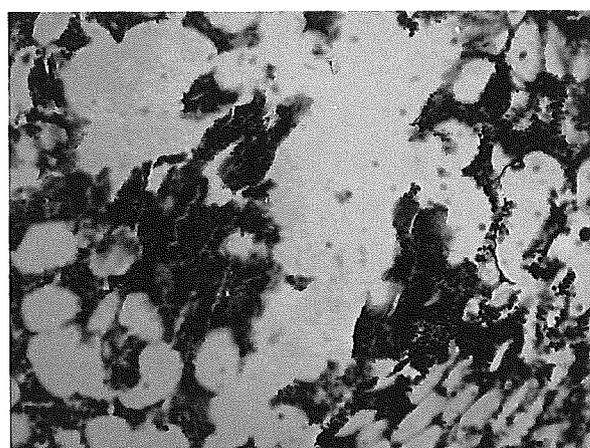


図 13. 標本名;九大(1) HE ×100

#### 4. 考察

今回持参標本以外は盲目的に組織診断を行った。馬血清モデルの1標本とコントロールの3標本の除いてはステロイド単独投与による骨、骨髄壊死モデルで類似する組織変化を呈するものが多かったが、その初期組織診断は施設間で不一致があった。初期診断が分かれた原因としては、1. 骨壊死と骨髄壊死の定義に相違があったこと、2. 組織変化が軽度である時(早期例など)の骨髄壊死判定基準が異なること、3. 標本作成上のアーチファクトの評価が異なることが主なものであった。

骨壊死の定義として九州大、大阪市大では骨髄壊死も骨壊死に含める方針であった<sup>3)</sup>。また金沢大では骨髄壊死と診断できる領域の中の小骨梁に empty lacunae が認められれば積極的に骨壊死と診断し、骨梁の partial empty lacuna の内、骨髄壊死と診断で

きる領域に接する部分に見られるものは骨壊死と診断する方針であった。一方、大阪大は骨梁の empty lacunae の判定に関しては、骨梁が小さく周囲に切片の亀裂がある場合は標本作成上のアーチファクトの可能性も考慮し骨壊死の診断は慎重であった。

骨髄壊死の定義は、ヘマトキシリン染色性の低下あるいは好酸性の上昇、脂肪細胞の虚脱、造血細胞の核の破碎変化を認め、修復性の組織反応を認める領域という点では一致していたが<sup>3,4,5,13</sup>、それぞれの変化が軽度である場合どこで線引きをするかという判定基準で診断が分かれていた。ステロイド投与後1週の早期例の場合、ヘマトキシリン染色性の低下はみられるが脂肪細胞の虚脱、造血細胞の核の破碎変化は乏しいか軽度であるものがあり、また修復性反応も乏しくこれを骨髄壊死と診断するかどうかで初期診断が分かれていた。金沢大では同様の染色低下領域に TUNEL 染色を行い陽性であった実験結果と病理医の意見から<sup>5</sup>、早期例の染色低下領域を積極的に骨髄壊死に診断していた。大阪大では標本作成上のアーチファクトの可能性も考慮し、ヘマトキシリン染色性低下の所見以外の脂肪細胞の虚脱、造血細胞の核の破碎変化、修復性の組織反応が乏しいものの評価は慎重であった。今回、持参の標本以外は標本の情報は全くのブラインドであり、標本の種類や作成時期等はわからないまま判定していた。そのためかステロイド投与後 3 週の組織変化が軽度である標本で、骨髄浮腫と診断するか骨髄壊死と診断するかも初期診断が分かれていたケースもあった。どの時期のどのような変化で診断をするのかという発生時期を考慮した骨髄壊死の判定基準も必要であると考えられた。

アーチファクトの評価であるが、切片の破碎が認められる場合の所見の不一致が認められた。今回の標本は馬血清モデルの 1 標本とコントロールの 3 標本の除いてはステロイド単独投与による骨壊死モデルで、壊死領域は比較的小領域のものが多く、切片の状態により判定が困難になる場合があった。切片作成の状態も評価する必要があると考えられた。

## 5. 結論

本研究で骨壊死と骨髄壊死の判定基準に施設間で不一致があることが明らかとなった。その原因としては、1. 骨壊死と骨髄壊死を区別するかどうか施設により方針が異なること、2. partial empty lacunae を骨壊死に含めるかどうか方針が異なること、3. 組織変化が軽度の時の骨髄壊死の判定基準が異なること、4. アーチファクトの評価が異なることが考えられた。

## 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

## 8. 参考文献

- 1) Cui Q, Wang GJ, Su CC, Balian G. The Otto Aufranc Award. Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 1997;344:8-19.
- 2) Drescher W, Schneider T, Becker C, Hobolth J, Ruther W, Hansen ES, Bunger C. Selective reduction of bone blood flow by short-term treatment with high-dose methylprednisolone. An experimental study in pigs. J Bone Joint Surg Br. 2001;83:274-7.
- 3) 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.
- 4) Kabata T, Kubo T, Matsumoto T, Hirata T,

- Fujioka M, Takahashi KA, Yagishita S, Kobayashi M, Tomita K. Onset of steroid-induced osteonecrosis in rabbits and its relationship to hyperlipaemia and increased free fatty acids. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:1233-7.
- 5) Kabata T, Kubo T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K, Katsuda S, Horii T, Uto N, Kitajima I. Apoptotic cell death in steroid induced osteonecrosis: an experimental study in rabbits. *J Rheumatol*. 2000;27:2166-71.
  - 6) Korompilias AV, Gilkeson GS, Seaber AV, Urbaniak JR. Hemorrhage and thrombus formation in early experimental osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;386:11-8.
  - 7) Matsui M, Saito S, Ohzono K, Sugano N, Saito M, Takaoka K, Ono K. Experimental steroid-induced osteonecrosis in adult rabbits with hypersensitivity vasculitis. *Clin Orthop Relat Res*. 1992;277:61-72.
  - 8) Matsui M, Ohzono K, Nakamura N, Sugano N, Masuhara K, Nakata K, Takaoka K, Ono K, Ochi T. The immune reaction to heterologous serum causes osteonecrosis in rabbits. *Virchows Arch*. 1995;427:205-11.
  - 9) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Motomura G, Jingushi S, Sueishi K, Iwamoto Y. Effects of different corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:332-6.
  - 10) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40:196-201.
  - 11) 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.
  - 12) Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, Sueishi K. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. *Clin Orthop Relat Res*. 1995;235-43.
  - 13) 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*. 2001;28:641-9.
  - 14) 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.
  - 15) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, Katsuda S. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci*. 2004;9:509-15.
  - 16) 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)*. 2005;44:456-60.
  - 17) Nakata K, Masuhara K, Nakamura N, Shibuya T, Sugano N, Matsui M, Ochi T, Ohzono K. Inducible osteonecrosis in a rabbit serum sickness model: deposition of immune complexes in bone marrow. *Bone*. 1996;18:609-15.
  - 18) Sakai T, Sugano N, Tsuji T, Miyazawa T, Nakamura N, Haraguchi K, Ochi T, Ohzono K. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging in a nontraumatic rabbit osteonecrosis model. *J Orthop Res*. 1999;17:784-92.
  - 19) Sakai T, Sugano N, Tsuji T, Nishii T, Yoshikawa H, Ohzono K. Serial magnetic resonance imaging in a

non-traumatic rabbit osteonecrosis model: an experimental longitudinal study. *Magn Reson Imaging*. 2000;18:897-905.

- 20) Tsuji T, Sugano N, Sakai T, Yoshikawa H.  
Evaluation of femoral perfusion in a non-traumatic rabbit osteonecrosis model with T2\*-weighted dynamic MRI. *J Orthop Res*. 2003;21:341-51.

# グルタチオン合成阻害による骨および骨髄への影響:

## 酸化ストレス誘発 Rat における骨壊死

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) : Rat を用いて酸化ストレスによる大腿骨の骨細胞への影響を調査し、骨壊死発生との関係を検討すること、および Wister 系 Rat において Chemical induce に新たな骨壊死モデルを作成すること。
- (対象と方法) : 24 週齢の雌性 Wister 系ラットに、酸化ストレス誘発剤 buthionine sulfoximine (BSO) 500mg/kg を 14 日間連日皮下投与した 7 匹を B 群、生理食塩水を Vehicle injection として使用した 8 匹を N 群とし、両群間で骨壊死発生率及び血液生化学的に比較検討した。
- (結果) : B 群の大腿骨で骨頭に 3 匹および顆部に 2 匹の骨壊死発生を認め、血液生化学的に酸化ストレスの発生が確認できた。
- (結論) : 骨壊死発生に酸化ストレスが深く関与していることが示され、Rat における Chemical induce な骨壊死モデルが作成できた。

### 1. 研究目的

近年我々は、家兎におけるステロイド性骨壊死モデルの骨壊死発生に生体内酸化ストレスが関与していることを報告した<sup>1,2)</sup>。本実験の目的は、実験動物として一般的に用いられており、遺伝子学的検索に優れている Rat を用いて酸化ストレスによる骨細胞への影響を調査し、骨壊死発生との関係を検討することである。

### 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。

24 週齢の雌性 Wister 系ラットに、酸化ストレス誘発剤 buthionine sulfoximine (BSO) 500mg/kg を 14 日間連日皮下投与した 7 匹を B 群、生理食塩水を Vehicle injection として使用した 8 匹を N 群とし検討に加えた。各群、処置開始後 14 日で犠牲死させ、両側の大腿骨を取り出した。

### 3. 検討項目

病理組織学的検討

H-E 染色標本を作製し、大腿骨における骨壊死発

生率の有無を検討し、各群における骨壊死発生率の差を検定した。骨壊死の定義は病理組織学的定義に基づき判定した<sup>3)</sup>。

また、血液生化学的検討に還元型グルタチオン (GSH)、総コレステロール量 (T-cho)、中性脂肪 (TG) について検討した。

### 4. 結果

還元型グルタチオンは、N 群と比較し B 群で有意に低下していた ( $p < 0.001$ )。一方、T-cho および TG については有意差を認めなかった。病理組織学的検討では、N 群では骨壊死像を呈した固体は認めず、B 群では 7 匹中 5 匹 (71.4%) に骨壊死を認め、部位の内訳は大腿骨頭に広範囲な骨壊死を 3 匹に、大腿骨顆部に 2 匹に認めた ( $p < 0.05$ )。

### 5. 考察

BSO は、酸化ストレス誘発剤、特に生体内におけるグルタチオン (GSH) の合成を阻害させて酸化ストレスを誘発する薬剤である<sup>4)</sup>。今回の検討では、BSO によって有意に GSH の低下が引き起こされ酸化ストレスは発生するが、T-cho および TG は変化がなかった。

すなわち、純粋に酸化ストレスのみで、ヒトにおける好発部位である骨頭もしくは大腿骨顆部に骨壊死を発生することが示された。また、本モデルは遺伝子学的検索にも優れている Rat での骨壊死モデルであるため、今後の研究に有用と考えている。

## 6. 結論

Ratにおいて酸化ストレスの誘発のみで骨壊死の発生が確認でき、酸化ストレスの骨壊死への強い関与が確認できた。

## 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.
- 2) Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, et al. DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 ; 44: 456-60.
- 3) Yamamoto T, Irida T, Sugioka Y et al: Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow

tissue. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2055-64.

- 4) Drew R, Miners JO. The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. *Biochem Pharmacol*. 1984; 33: 2989-94.

# 常用量のグルタチオンによるステロイド性骨壊死の抑制効果の検討

北村憲司、市堰 徹、兼氏 歩、福井清数、松本忠美（金沢医科大学 整形外科）  
勝田省吾（金沢医科大学 第Ⅱ病理学）

これまで当科では本会議にて、ステロイド性骨壊死モデルを用いてステロイド投与後早期に生体内酸化ストレスが発生していること、抗酸化剤である還元型グルタチオン(GSH)を大量に投与することで骨壊死の発生を抑制し、骨壊死発生と酸化ストレスとの関与について報告してきた。今回我々はステロイド性骨壊死モデルにおける常用量 GSH による骨壊死発生の抑制効果および酸化ストレスの関与について病理組織学的に検討し報告する。

## 1. 研究目的

当科ではこれまで生体内酸化ストレスと骨壊死発生の関与について検討を行い、酢酸メチルプレドニゾン(以下 MPSL)を 4mg/kg 投与した家兎モデルに対し、還元型グルタチオン(以下 GSH)を 5mg/kg/day 投与することで骨壊死発生率を 0%に抑制することを報告した<sup>1)</sup>。しかしながらステロイド投与量を増加することで骨壊死発生率が増加する可能性が指摘されており<sup>2)</sup>、ステロイドパルス量の相当する MPSL を 20mg/kg 投与した家兎での検討を行うことが必要である。そこで本研究の目的はステロイド 20mg/kg 投与家兎における GSH ヒト常用量による骨壊死抑制効果および酸化ストレスの関与を検討することである。

## 2. 対象と方法

体重約 3.5kg の雌性日本白色家兎に対して 20mg/kg の MPSL を 1 回のみ臀筋内に筋注し、14 日経過時点で犠牲死とした 10 羽を S 群とした。また MPSL 投与同日より GSH を 5mg/kg/day × 5 日間連続投与し、14 日経過時に犠牲死とした 10 羽を G 群とした。これらと比較検討を行うため未処置の家兎 10 羽を N 群とし対照とした。

## 3. 検討項目

### 1) 病理組織学的検討

H-E 染色標本を作製し、大腿骨近位内側 1/3 における骨壊死発生率の有無を検討し、各群における骨壊死発生率の差を検定した。骨壊死の定義は病理組織学的定義に基づき判定した<sup>3)</sup>。

### 2) 免疫組織化学的検討

抗 LOX-1 抗体<sup>4)</sup>の発現の亢進を組織過酸化の指標として用い、大腿骨近位 1/3 における酸化ストレスの発生について検討を行った。また各標本において無作為に 3 視野を選び、全細胞数に対する陽性細胞数の割合を算出し、陽性細胞率(以下 %PC)として群間で比較検討を行った。

## 4. 結果

### 1) 病理組織学的検討

S 群での骨壊死発生率は 90%であった。また常用量の GSH を併用した G 群では、骨壊死発生率は 30%であった。両群間に有意差を認め、常用量の GSH により骨壊死発生率が抑制されていることが確認できた。(P<0.05)

### 2) 免疫組織化学的検討

N 群では LOX-1 の染色性が散在的に認めるのみであったのに対し、S 群では骨髓造血細胞において明らかにその染色性が亢進していた。また G 群では N 群とほぼ同程度の染色性を示した。

%PC では、S 群は N 群及び G 群と比較して有意に %PC の増加を認めていた。(P<0.01) (表 1)

N 群と G 群間には有意差を認めなかった。

一方、G 群内で骨壊死を認めた個体と骨壊死を認めなかった個体を比較すると、骨壊死を認めた個体で LOX-1 の染色性及び %PC が増加する傾向を認めた。

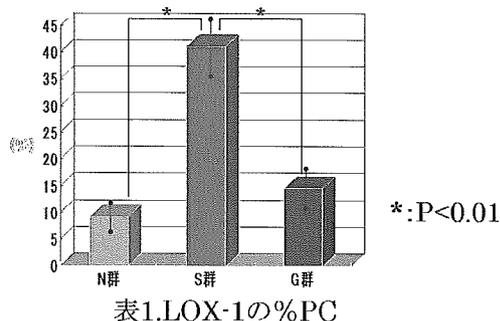


表1.LOX-1の%PC

## 5. 考察

ステロイド性骨壊死と酸化の関与についての報告はこれまでに認められており、これらは酸化を抑制することが骨壊死を予防することにつながる可能性を示唆している<sup>1,5,6)</sup>。近年我々はGSH合成阻害剤であるButhionine Sulfoximine(BSO)を投与したラットで、GSHを低下させ酸化ストレスを誘発することのみで骨壊死が発生したことを報告し、酸化ストレスと骨壊死発生の密接な関与を報告した<sup>7)</sup>。このことから生体内のGSHを維持することが骨壊死発生の予防に重要であることが考えられた。

今回の実験で常用量のGSHを投与することで骨壊死の発生を有意に抑制し、骨内酸化ストレスの発生も抑制していた。しかし一方でMPSL投与量を20mg/kgにすることで、G群で30%に骨壊死の発生を認めたことから、ステロイド投与量に応じたGSHの投与量を設定する必要があることが考えられた。

## 6. 結論

- 1.常用量GSHにより骨内酸化ストレスの発生及び骨壊死発生の有意な抑制が示された。
- 2.ステロイド投与量に応じたGSHの容量を設定する必要があると考えられた。

## 7. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) 北村憲司、市堰 徹、兼氏 歩、松本忠美:常用量のグルタチオンによるステロイド性骨壊死の抑制効果の検討、第32回 日本股関節学会、新潟、2005.11.7.

## 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) 北村憲司、兼氏歩、市堰徹ほか:ステロイド性骨壊死モデルにおけるグルタチオン常用量による骨壊死抑制効果の検討:厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の標準化を目的とした総合研究 平成16年度 総括・分担研究報告書 2005; 53-4.
- 2) 本村悟朗、山本卓明、宮西圭太ほか: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—:厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の標準化を目的とした総合研究 平成16年度 総括・分担研究報告書 2005; 36-7.
- 3) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y et al: Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissue. *Arthritis Rheum* 1997; Nov 40(11): 2055-64.
- 4) Sawamura T, Kume N, Aoyama T et al: An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 1997 06 Mar; 386: 73-7.
- 5) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M et al: Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci* 2004; 9(5): 509-15.
- 6) Ichiseki T, Kaneuji A, Matsumoto T et al: DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology* 2005; 44: 456-60.
- 7) Ichiseki T, Ueda Y, Katsuda S et al: Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Nov 22; [Epub ahead of print]

# 走査型電子顕微鏡を用いたステロイド投与家兎大腿骨髄の観察： 微小脂肪塞栓の存在について

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）

本研究では免疫組織学的手法ではなく走査型電子顕微鏡を用いて大腿骨髄内を広くに観察することにより、形態学的観点からステロイド投与と虚血との関係を検討してきた。その結果、ステロイド投与後早期から骨髄動脈内において大小様々な脂肪滴および脂肪塞栓がみられることを本会議でも報告してきた。今回、これらの知見を総括するとともに脂肪滴の由来についても得られた知見をもとに考察を加え報告する。

## 1. 研究目的

大腿骨頭壊死発生の直接原因は虚血であるという点では意見が一致している。しかしステロイド投与によりなぜ虚血性変化が生じるのかは不明である。当科では免疫組織学的検討を中心に骨壊死の発生要因を検討してきた。本研究で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に観察することにより、形態学的観点からステロイド投与と虚血との関係を検討することを目的とした。

## 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を対象とした。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: 実験1では骨髄動脈をSEMで観察した。腹部大動脈から約4℃の生理食塩水および1%グルタールアルデヒド-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-196 度の液体窒素で急速凍結し、切断した。この試料を一連の処理を経てSEMで観察した。実験 2 ではフィルターを通した大動脈血清をSEMで観察した(図1)<sup>9)</sup>。全血の1/6にあたる約 40ml を腹部大動脈から灌流前に採血し 3000 回転で 15 分間遠心分離した。上澄み液を採取し 1%グ

ルタールアルデヒド-1%リン酸緩衝液で固定後、pore size 8  $\mu$  m の millipore filter を用いて濾過した。この濾過した filter 自体を 1%オスmium酸-リン酸緩衝液で固定後、一連の操作を経て SEM で観察した<sup>9)</sup>。実験 3 では SEM 像 - 光学顕微鏡像 - 透過型電子顕微鏡像を対比して観察した。SEM 像で所見の得られた試料をトリミングし、エポキシ樹脂に包埋した。これを 0.5  $\mu$  m に薄切し、1% トルイジンブルー染色して光学顕微鏡にて観察した。またいくつかのエポキシ樹脂包埋試料は、ウルトラマイクロームで 60-80 nm に薄切して透過型電子顕微鏡で観察した。

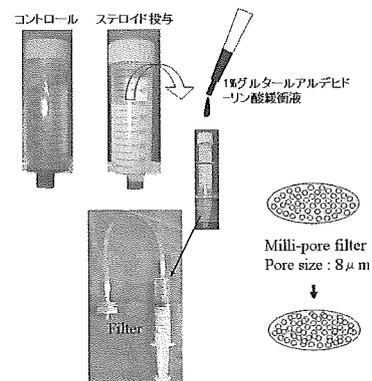


図1 フィルターを通した大動脈血清の観察

## 3. 研究結果

ステロイド投与家兎の骨髄細類洞内において直径 10~50  $\mu$  m 程度の球形の構造物を認めた。実験 3 で行った SEM 像と光学顕微鏡像の対比から、この球形

の構造物は脂肪滴であることがわかった(図2)。

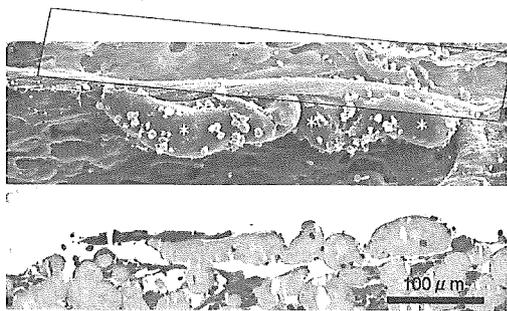


図2 SEM像と光顕像の対比  
(\*:脂肪滴)

ステロイド投与後 5 日目の骨髄細動脈内において類洞で認めた脂肪滴と同様の脂肪滴を認めた。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 μm 程の細動脈を完全に閉塞した脂肪滴がみられた。ステロイド投与後 14 日目の骨髄細動脈内には様々な大きさの脂肪滴がみられた(図3)。

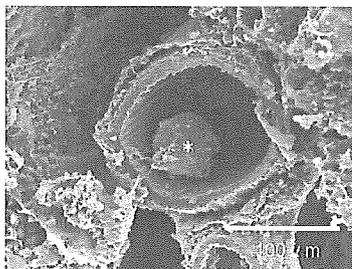


図3 ステロイド投与後14日目の細動脈内脂肪滴(\*)

同時にこれらの脂肪滴が雪だるま状に癒合する所見を観察することができた。ステロイド投与後 14 日目では骨髄脂肪細胞の分断化により発生した脂肪滴が類洞内に遊出する所見がしばしば観察された。また投与後14日目では、3つの連なる脂肪滴により直径 50 μm 程度の細動脈が完全に閉塞している像を捉えることができた。次に実験2、3で行った大動脈血清のSEM像であるが、大動脈血清でみられた脂肪滴には核は存在せず、しばしばその周囲には好酸球などの細胞成分が付着していた。またコントロールでみられた脂肪滴が表面平滑で直径 10~20 μm 程度であったのに対し、ステロイド投与家兎でみられた脂肪滴は表面不整で直径10~50 μm 程度と様々な大きさを呈していた。観察総面積はコントロールでは1羽あたり 118-135mm<sup>2</sup>、ステロイド投与後5日目では1羽あたり 121-138mm<sup>2</sup>、ステロイド投与後8日目では1羽あたり

125-142mm<sup>2</sup>、ステロイド投与後 14 日目では1羽あたり 123-141mm<sup>2</sup> で、各群間でばらつきはなくほぼ一定していた。骨髄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日目では5 箇所、14日目でも5 箇所観察された。しかしコントロールの骨髄細動脈内には脂肪滴および脂肪塞栓を認めなかった(表1)。

	コントロール (n=6)	ステロイド 投与後5日 (n=5)	ステロイド 投与後8日 (n=5)	ステロイド 投与後14日 (n=6)
観察総面積 (mm <sup>2</sup> )	774	646	665	783
(Range)	(118-135)	(121-138)	(125-142)	(123-141)
観察された 脂肪滴の数	0	2	5	5
観察された 脂肪塞栓の数	0	0	5	5

表1 骨髄細動脈における脂肪塞栓数

#### 4. 考察

本研究により新しくわかった知見として以下の3つが挙げられる。第1に脂肪細胞分断化により生じた脂肪滴が静脈系に流入していたこと、第2に脂肪滴が血中において癒合、肥大化していたこと、第3に直径 10 μm 程度の極めて細い骨髄内細動脈が脂肪滴により完全に閉塞していたことである。しかし静脈系に出現した脂肪滴が動脈中に出現した脂肪滴であったかどうかは本研究では検討できていないため詳細は不明である。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<sup>3)</sup>。従来の脂肪塞栓説が多量のステロイドを用いて脂肪塞栓の発生を確認しているのに対し<sup>4)</sup>、本研究では従来の 1/3 から 1/4 の投与量で脂肪塞栓の発生を確認することができた。また従来の脂肪塞栓説がステロイド投与後 4週以降に脂肪塞栓を確認しているのに対し<sup>5)</sup>、本研究ではステロイド投与後8日目と非常に早期に観察することができた。これらの違いは SEM により微小細動脈における早期かつ微細な変化が観察可能となったために生じたと考えている。従来の脂肪塞栓説では、多くがステロイド投与により脂肪変性した肝細胞が破裂することで形成された ceroid と呼ばれる cyst が脂肪滴であると考えられている。そしてその脂肪滴の 20%が肺を通過し骨をはじめ脳、腎などの組織において脂肪塞栓を形成すると報告している<sup>6)</sup>。一方本研究では、骨髄脂肪細胞の分断化により発生した脂肪滴が動脈血中にみられた脂肪滴であったのではないかと推察している。つまり、静脈系に流入した非常

に小さな脂肪滴が、従来の報告にあるように肺を通過して動脈循環に流入し、末梢組織で癒合、肥大化し、直径  $10\mu\text{m}$  程度の極めて細かい細動脈を閉塞させた結果、組織の虚血を招く可能性があるのではないかと考えている(図4)。

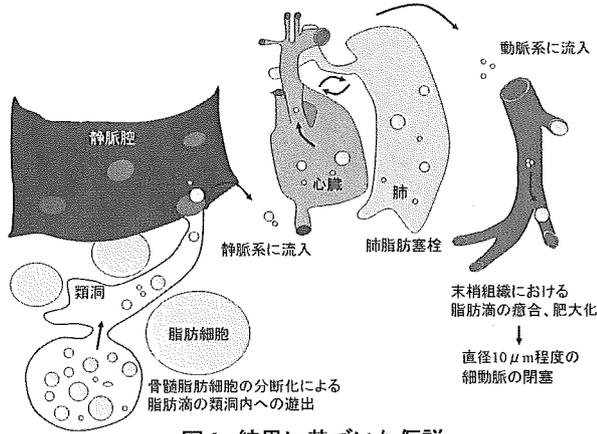


図4 結果に基づいた仮説

## 5. 結論

少量のステロイド投与により微小脂肪塞栓が骨髄細動脈内にみられた。その微小脂肪塞栓の発生は投与後5日目と極めて早期なものであった。ステロイド投与後8日目では直径  $10\mu\text{m}$  程度の細動脈が、14日目には直径  $50\mu\text{m}$  程度の大きな細動脈が脂肪滴により閉塞していた。このようにステロイド投与後早期にみられた極めて微小な脂肪塞栓が大腿骨頭壊死の直接原因である虚血をもたらす可能性があるのではないかと考えている。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fukui K et al. Glucocorticoid induces micro-fat embolism in the rabbit: A scanning electron microscopic study. Orthopaedic Research in press.

### 2. 学会発表

- 1) 福井清数、兼氏歩、市堰徹、杉森端三、北村憲司、松本忠美:ステロイド投与家兎大腿骨髄内細動脈における微小脂肪塞栓の存在、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) Fukui K, Kominami R, Kaneuji A, Matsumoto T, Shinohara H: A new method of perfusion fixation for the rabbit femur. Okajimas Folia Anat Jap, 9 81:57-62,2004.
- 2) Gurd AR: Fat embolism: An aid to diagnosis. J Bone Joint Surg 52B:732-737,1970.
- 3) Jones JP Jr: Fat embolism of bone. J Bone Surg 48A:149-164,1966.
- 4) Kawai K, Tamaki A, Hirohata K: Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. J Bone Joint Surg 67A: 755-763,1985.
- 5) Jones JP Jr: Etiology and pathogenesis of osteonecrosis. Seminar in Arthroplasty, 2:160-168,1991.
- 6) 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.

# 家兎骨髓内微小循環系におけるステロイド剤の影響

## —新しい方法による骨髓内循環系の観察—

堀内博志、小林千益、酒井典子、小平博之、薄井勇紀、加藤博之  
(信州大学医学部 整形外科)

我々はこれまで、血管内皮細胞機能および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。ステロイド剤投与により、どのように循環系が変化し骨壊死を生じるのか、未だ解明されるに至らない。我々は ION の病態解明のためには、生体に近い形での骨髓内循環系の観察が重要と考えて研究を行っている。今回、蛍光物質を用い家兎大腿骨髄内循環系を、in vivo で観察出来るモデルを確立した。コントロール群とステロイド投与群の家兎で、比較を行ったが2群間での差は見出せなかった。

### 1. 研究目的

これまで、血管内皮細胞および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。ステロイド剤を投与した際に、どのような変化が骨内あるいは骨髓内循環系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 ION の病態解明のためには、より生体に近い形での観察が重要と考えて研究を行っている。今回、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、コントロール群およびステロイド投与家兎群間での比較検討を行った。

### 2. 研究方法

動物は日本白色家兎(体重2kg、オス)を用いコントロール群およびステロイド投与群(MPSL 20mg/kg筋注1回、24時間後に実験、n=5)。麻酔下に大腿外側を約3cm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。この展開ではほとんど出血を生じることなく、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。実体顕微鏡下に操作を行い、決して皮質を破り骨髓が露出しないようにする。この状態で、骨髓腔を観察するモデルを作成した。次に蛍光顕微鏡下に視野を

確保したのち、蛍光物質(FITC MW:77000,10 mg)を静脈内投与し骨髓内微小循環系がCCDカメラを解して、動画および静止画像として観察した。

### 3. 研究結果

蛍光物質を耳静脈から全身投与したが、その直後から大腿骨髄内において蛍光物質の存在が観察された。今回使用した蛍光物質ではまず毛細血管網が確認され、それに引き続いて周囲の骨髓への蛍光物質の漏出も観察出来た。今回の検討では、蛍光物質投与開始から骨髓で同定出来るまでの時間は2群間で差はなかった。また、投与開始からの時間を特定して蛍光物質の拡散範囲を検討したが2群間で差を見出すに至らなかった。

### 4. 考察

我々はこれまで、血管内皮細胞および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。ステロイド剤を投与した際に、どのような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の仮説を立案した。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 に陥るといふ現象は確認出来なかつた<sup>1)</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>2,3)</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、大腿骨骨髓内抵抗血管の生理・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髓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つた。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つたことから、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、骨髓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 NS397 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>4)</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)であつた。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髓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 で家兎骨髓内微小循環系を観察可能なシステムを確立出来た。しかしながら、今回の実験系ではステロイド投与の際に生じると考えられる、骨髓内循環系の変化を捉えることが出来なかつた。その原因としては、実験標本の準備段階での個体差や detect がフエジーであることなどが考えられ、標本改良の必要があると考えた。

今後は、ステロイド投与により骨髓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を振ったり、蛍光物質の分子量を変えることで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髓内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、循環系の実際の状態が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 vascularendothelial 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.

# ステロイド性骨壊死モデルにおける性差の検討

西田颯二郎、山本卓明、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、日本白色家兎の雄にメチルプレドニゾロン(以下MPSL)20mg/kgを投与することで、約7割に骨壊死が発生すると報告されている。今回、preliminaryな実験として、日本白色家兎の雌6羽に対しステロイド投与を行った。その結果、33%(2/6羽)に骨壊死発生を認めた。

## 1. 研究目的

骨壊死動物モデルとして、今までに様々な種類のものが報告されている(1-7)。しかし、それらのモデルにおける、骨壊死発生に関する性差の比較検討は行われていない。今回、ステロイド単独投与骨壊死モデルにおいて、骨壊死発生に対する性差の影響について検討した。

## 2. 研究方法

28週齢以上の日本白色家兎の雄6羽に対し、MPSL 20mg/kgを一回右臀筋内に注射した。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(8)。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、33%(2/6)であった。病理組織像については、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おり、雄家兎における骨壊死所見と同様のものであった(figure 1)。また血液データについては、T-cholで、雄群に対して有意な低下を認めたが、その他の項目においては有意差を認めなかった。(Figure 2)

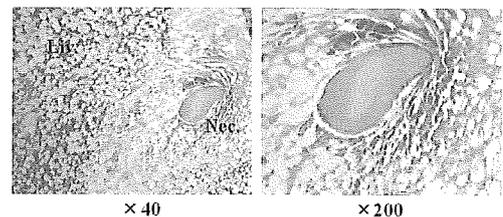


Figure 1

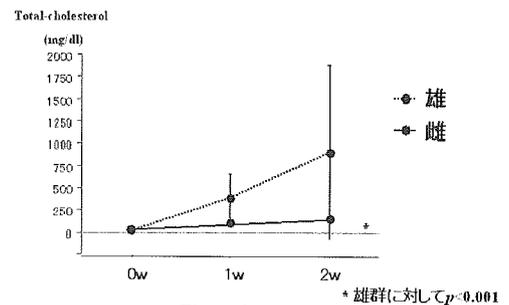


Figure 2

## 4. 考察

SLE患者におけるステロイド治療後の壊死発生について、nagasawaらは、男性で60%(3/5人)、女性で20%(21/106人)に発症したと報告しており、またOinumaらは、男性で75%(3/4人)、女性で43%(29/68人)に発生したと報告している(9-10)。雄家兎における、ステロイド単独投与モデルでの骨壊死発生率については、57%(8/14羽)、76%(29/38羽)と報告されている(2-3)。今回の雌家兎における骨壊

死発生率は33%(2/6)であり、雄と有意差を認めるものではなかった。今後、さらに実験数を増やし、骨壊死発生への性差の影響について検討を進めていく予定である。

## 5. 結論

日本白色雌家兎におけるメチルプレドニゾロン20mg/kg投与による骨壊死発生率は33%であった。

## 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) Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, Sueishi K. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. *Clin Orthop Relat Res.* 316:235-43, 1995
- 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.* 40(11):2055-64,1997
- 3) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford).* 40(2):196-201,2001
- 4) Tsuji T, Sugano N, Sakai T, Yoshikawa H. Evaluation of femoral perfusion in a non-traumatic rabbit osteonecrosis model with T2\*-weighted dynamic MRI. *J Orthop Res.* 21(2):341-51,2003
- 5) Kabata T, Kubo T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K, Katsuda S, Horii T, Uto N, Kitajima I. Apoptotic cell death in steroid induced osteonecrosis: an experimental study in rabbits. *J Rheumatol.* 27(9):2166-71,2000
- 6) 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
- 7) Nakata K, Masuhara K, Nakamura N, Shibuya T, Sugano N, Matsui M, Ochi T, Ohzono K. Inducible osteonecrosis in a rabbit serum sickness model: deposition of immune complexes in bone marrow. *Bone.* 18(6):609-15,1996
- 8) 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
- 9) Nagasawa K, Ishii Y, Mayumi T, Tada Y, Ueda A, Yamauchi Y, Kusaba T, Niho Y. Avascular necrosis of bone in systemic lupus erythematosus: possible role of haemostatic abnormalities. *Ann Rheum Dis.* 48(8):672-6,1989
- 10) Oinuma K, Harada Y, Nawata Y, Takabayashi K, Abe I, Kamikawa K, Moriya H. Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis.* 60(12):1145-8,2001

# 高脂血症治療薬を用いたステロイド性大腿骨頭壊死症予防法の研究

石田雅史、藤岡幹浩、平田哲朗、久保俊一

(京都府立医大大学院医学研究科 運動器機能再生外科学)

津田裕士 (順天堂東京江東高齢者医療センター 総合診療科)

山路 健、金井美紀、関谷文男 (順天堂大学医学部膠原病内科)

田中良哉、岡田洋右 (産業医科大学 第一内科学)

三森経世、川端大介

(京都大学大学院医学研究科 内科学講座 臨床免疫学)

竹内 勤、天野宏一

(埼玉医科大学総合医療センター リウマチ膠原病内科)

川人 豊 (京都府立医大大学院医学研究科 生体機能制御学)

黒田 毅

(新潟大学大学院医歯学総合研究科 内部環境医学講座(第二内科))

京都府立医科大学、順天堂大学、産業医科大学、京都大学、新潟大学、埼玉医科大学の共同研究として高脂血症治療薬による大腿骨頭壊死症予防の可能性を検討している。患者背景を統一するため、SLE 初発患者で過去にステロイド治療を受けていないものを対象として高脂血症治療薬を投与している。抗高脂血症薬を投与した SLE 症例 5 例において大腿骨頭壊死症は発生していない。

## 1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (Idiopathic osteonecrosis of the femoral head; ION) は青壮年層に多発し、進行性に股関節の破壊をきたして起立・歩行障害を引き起こし、患者の QOL が著しく侵される関節疾患である。本疾患の病因は必ずしも明らかではないが、ステロイド剤の使用やアルコール多飲との関連が示唆されている。その罹患患者数は年々増加傾向にあり、特に近年では全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)など種々の疾患治療にステロイド剤を使用した患者での ION 発生が増加しており、ION 症例の約半数がステロイド剤投与と関連があると推測されている<sup>1)</sup>。しかし、ステロイド剤が本疾患の発生に関連する詳細な機序は不明であり、有効な予防措置がとれないのが現状である。これまでの臨床的研究によって、ION は基礎疾患に対するステロイド剤投与開始から、3~6 ヶ月以内に発生し、それ以後の発生はまれであることが示されている。この期

間 ION 発生の予防に重要な時期である。本研究では、これまでに動物モデルでは骨壊死の発生抑制効果が確認されている高脂血症治療薬について<sup>2,3,4)</sup>、臨床研究において ION 発生抑制効果を厳密に評価することを目的とする。

## 2. これまでの研究結果、基礎的背景

- 1) 家兎を用いた動物実験モデルにおいて、ステロイド性骨壊死の発生率は、高脂血症治療薬 プロブコールの使用により、有意に低下 (79%-43%)した。(平成 13 年度報告書、九州大学)
- 2) 上記において抗凝固剤であるワーファリン併用により、壊死発生率はさらに有意に低下し、1割以下となった。(79%-43%-9%) (平成 14 年報告書、九州大学)
- 3) SLE 患者 11 名を対象としてステロイドとともにワーファリン+スタチン(シンバスタチンあるいはアトルバスタチン)を投与した結果、3 ヶ

月以上の経過で ION の発生を認めていない。  
(平成 14～15 年度報告書、佐賀医科大学)

- 4) SLE 患者 10 名 (初回発症 4 例、増悪 6 例) に対して、抗高脂血症薬アトルバスタチンを同時に投与開始し、血漿交換療法の併用をおこなった。高脂血症のコントロールが不良であった 1 例に ION が発生した。(平成 15 年度報告書、順天堂大学)
- 5) SLE 患者 14 人に対してステロイドと共にワーファリン+スタチンを投与した結果、3 ヶ月以上の経過で ION を認めたのは 1 例のみ (7%) であった。これは、予防措置をとらない場合の SLE 患者 29 人での ION 発生率 33% に比べ低かった。(平成 16 年度報告書、佐賀大学)
- 6) HMG-CoA 還元酵素阻害剤ピタバスタチンの使用により、家兎モデルでのステロイド性骨壊死発生率は有意に低下した。(平成 16 年度報告書、九州大学)
- 7) SLE の virgin case に対してアトルバスタチンを投与した 3 例で ION は発生していない。(平成 17 年度報告書、順天堂大学)

### 3. 研究方法

患者背景を統一するため、対象を SLE の初発患者で過去にステロイド治療を受けていないもののみを対象として、症例数を集めるために多施設共同研究の形をとって共同研究を行っている。高脂血症治療薬を投与するか否かは症例登録後に京都府立医大において blocked randomization を用いて無作為に割り振られる。

### 4. 研究結果

多施設共同研究を行う以前からの症例を含めると、SLE の初発患者に高脂血症治療薬を用いたものは 10 例である。そのうち 6 例はステロイド剤投与開始から 1 年以上経過しているが、いずれの症例でも ION の発生を認めていない。一方、高脂血症治療薬を用いずにステロイド剤投与開始から 1 年以上経過した症例では 3 例中 2 例に ION が発生している。

多施設共同研究を開始した平成 16 年以降に登録された高脂血症治療薬投与群は 5 例で、そのうち 2 例はステロイド剤投与開始後 1 年を経過して

いる。現在のところどの症例にも ION は発生していない。

### 5. 考察

高脂血症治療薬を併用した群においてはステロイド剤治療開始後 1 年経過した 2 例中 2 例とも ION の発生を認めていない。すでに 1 年が経過しているため、これらの症例で ION が今後発生する可能性はほとんどないと考えられる。

これまでに SLE 症例における ION の発生率は約 30% と報告されているが、高脂血症治療薬を用いていない SLE 症例における ION 発生率は更に高くなる可能性もある。

現在、本研究は多施設共同研究で行っている。初発の SLE 症例で過去にステロイド剤投与を受けていないものは非常に限られており、症例数を集めることが困難なためである。平成 17 年度は協力医療機関を増やして平成 16 年度より症例数を多く集めることができたが、まだ目標症例数に達していない。来年度は必要に応じて更に協力医療機関を増やし、症例数を増やす予定である。

### 6. 結論

ステロイド剤を初めて用いる SLE 初発患者に対して高脂血症治療薬を併用した症例で ION の発生を認めていない。

### 7. 研究発表

1. 著書  
なし
2. 研究発表  
なし

### 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) Nagasawa K. et al. A vascular necrosis of bone in systemic lupus erythematosus: possible role

of haemostatic abnormalities. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 672-676.

- 2) 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の標準化を目的とした総合研究. 平成16年度 総括・分担研究報告書. p45-52.
- 3) Cui Q. et al. Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. *Clin Orthop* 1997; 344: 8-19.
- 4) Pritchett, JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop Rel Res* 2001; 386: 173-178.
- 5) Kubo T. et al. Initial MRI findings of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in renal allograft recipients. *Magn Reson Imaging* 1997;15:1017-23