

かった。手術時年齢が高くなると OR が軽度上昇した。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。

表 1 : 統計解析結果

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

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

- 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, 浅野武志, 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

- 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

- 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

- 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

肝移植後の特発性大腿骨頭壊死症

堀内博志、小林千益、斎藤直人、天正恵治、小平博之、加藤博之（信州大学医学部 整形外科）
橋倉泰彦、中澤勇一、池上俊彦、宮川眞一（信州大学医学部外科 移植外科）

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

1. 研究目的

臓器移植法が成立したのに伴い、わが国でも平成11年には脳死移植が再開され移植医療に対して関心が高まっている。腎移植や骨髄移植に加え、心臓移植や肝移植例も国内手術症例が増加してきている。特発性大腿骨頭壊死症(ION)の観点から考えると、腎移植、骨髄移植後に問題となっているIONが、心臓移植、肝移植症例でもある一定頻度発生し、移植後の臨床的問題となるのか明らかにしていく必要がある。肝臓移植手術に際しては、免疫抑制剤としてのFK506やステロイド剤が大多数の症例で使用されており、移植手術時には多くの症例に対しステロイドパルス療法が行われる。さらに術後、拒絶反応が見られた場合にはステロイドパルス療法を追加する必要がある。本研究の目的は、ステロイド大量投与が行われる肝移植症例を対象として、日本人における骨壊死発生頻度を明らかにすることである。移植手術として歴史の長い腎移植や骨髄移植では、既に骨壊死に関してのまとまった報告も多い。それぞれの報告で若干ばらつきがあるものの、それぞれの臓器移植における骨壊死発生頻度も明らかになってきている。しかし、比較的歴史の浅い肝移植に関しては本邦での骨壊死に関する調査・研究は信州大学症例以外には行われていない。我々はこれまでも、肝移植症例におけるION発生・発症の調査を行い、経過報告を行ってきたが¹⁾、今回は2004年末までの状況を報告する。

2. 研究方法

2005年2月までに信州大学医学部第一外科学教室で施行された肝移植症例は、222例（小児例103、成人例119例）である。全例信州大学第一外科学にて経過観察あるいは追跡調査されている。経過中股関節に疼痛等愁訴が生じた場合は、信州大学医学部整形外科に紹介して頂き、整形外科医が直接検診を行い、X線およびMRIにて診断を行うことになっている。また、すでに報告しているとおり2002年12月までは、信州大学第一外科主治医および信州大学整形外科担当医が、ステロイド使用による骨壊死発生のリスクを説明し、患者がその必要性を理解しMRI撮影を承諾した場合、スクリーニング目的で股関節MRIを施行した¹⁾。

3. 研究結果

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

4. 考察

わが国では肝移植は未だ施行されている施設が

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

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

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

腎移植や骨髄移植例での報告に比べ肝移植後の骨壊死発生の報告は少ない。報告されている頻度は2~8%程度^{4),5)}だが、MRIによる検討はなされていないため、肝移植後のION発生頻度は未だ不明である。なかにはその発生頻度の低さから肝移植においては骨壊死に関してはスクリーニングする必要はない⁴⁾と結論付けた報告もある。我々のこれまでの調査でも、IONは肝臓移植後の臨床的問題点とはなっておらず、骨髄移植や腎移植とは異なる結果であった。今後は、肝移植症例での調査を継続するとともに、移植間でのION発生頻度の差がなぜ生じるのかを検討することが移植後IONの病態解明に重要ではないかと考えている。

5. 結論

現時点では、肝移植後の特発性大腿骨頭壊死症は臨床的な問題とはなっていない。

6. 研究発表

1. Horiuchi,H et al: Osteonecrosis of the femoral head in Japanese adults after liver transplantation: a preliminary report.J Orthop Sci. 2004;9:119-21.

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

骨髄移植後大腿骨頭壊死に対する人工股関節置換術

山口 仁、長谷川幸治、増井徹男、加納稔也、関 泰輔、坪井真幸、松田達男

(名古屋大学大学院医学系研究科 整形外科)

骨髄移植(BMT)後発症の特発性大腿骨頭壊死(ION)に対し、人工股関節置換術が行われた症例の臨床及びX線評価した。対象は人工股関節置換術(THA)/人工骨頭置換術(BHA)が行われた9例/12股で、初回手術時平均年齢32.6歳(20~51歳)、女性4例/5股・男性5例/7股、平均経過観察期間は9.4年であった。原因疾患の内訳は、急性骨髄性白血病3例・急性リンパ性白血病1例・慢性骨髄性白血病1例・非ホジキン悪性リンパ腫2例・再生不良性貧血1例・骨髄異型性症候群1例であった。セメントレス臼蓋コンポーネントはOsteonics 6股、セメント臼蓋コンポーネントはCharnley 3股、バイポーラーコンポーネントは京セラ製2股・Osteonics 1股、セメントレス大腿コンポーネントはOmniflex 5股・Omnifit 2股、セメント大腿コンポーネントはCharnley 3股・京セラ製2股であった。JOAスコアは術前平均56.5点から術後平均86.5点に改善した。X線の破綻は臼蓋カップに1例/1股(1/9, 11.1%)、大腿ステムに2例/2股(2/12, 16.7%)を認めた。再置換症例はなかった。また感染などの合併症の発生もなかった。

1. 研究目的

本研究の目的は、骨髄移植(BMT)後発症の特発性大腿骨頭壊死(ION)に対し、人工股関節置換術が行われた症例の臨床及びX線評価を行うことである。

2. 研究対象

骨髄移植後に特発性大腿骨頭壊死(ION)が発生し、1995年より2005年の間に人工股関節置換術(THA)/人工骨頭置換術(BHA)が行われた9例/12股である。初回手術時平均年齢 32.6 ± 9.9 歳(20~51歳)、女性4例/5股・男性5例/7股、平均経過観察期間は9.4年(11ヶ月~16年11ヶ月)であった。また平均ステロイド総投与量 Σ は10874mg/PSL換算(1430~18100)であった。原因疾患の内訳は、急性骨髄性白血病(AML)3例・急性リンパ性白血病(ALL)1例・慢性骨髄性白血病(CML)1例・非ホジキン悪性リンパ腫(NHML)2例・再生不良性貧血(AA)1例・骨髄異型性症候群(MDS)1例であった。

術式に関して、THAは2例/3股が側方進入で5例/6股が後方進入、BHAは2例/3股が全例後方進入であった。使用機種に関しては、セメントレス臼蓋コン

ポーネントはOsteonics 6股、セメント臼蓋コンポーネントはCharnley 3股、バイポーラーコンポーネントは京セラ製2股・Osteonics 1股、セメントレス大腿コンポーネントはOmniflex 5股・Omnifit 2股、セメント大腿コンポーネントはCharnley 3股・京セラ製2股であった。

3. 評価項目

単純X線股関節正面像で測定した。臼蓋側は臼蓋カップ migration, 臼蓋カップ radio lucent line, 臼蓋周囲 osteolysis, 臼蓋カップ polyethylene wear, 人工骨頭 migration を、大腿骨側はステム subsidence, ステム周囲 radio lucent line, ステム周囲 osteolysis, ステムの内外反偏位変化を評価した。X線の破綻は特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会において小林らが報告している基準に沿った。すなわちセメントカップは4mm以上または 4° 以上の migration, 全周性 demarcation と、セメントレスカップは migration, 全周性または進行性 radio lucent line と、ステムは5mm以上の進行性 subsidence, セメント周囲 radio lucent line, セメントからの debonding, セメント・ステムの破損, ステム周囲の expansile osteolysis と定義した。

4. 結果

JOA スコアは術前平均 56.5 点から術後平均 86.5 点に改善した。X 線の破綻は臼蓋カップに 1 例/1 股 (1/9, 11.1%)、大腿ステムに 2 例/2 股 (2/12, 16.7%) を認めた。再置換症例は 0 例であった。感染などの合併症の発生は 0 例であった。

5. 考察

骨髄移植後発症の大腿骨頭壊死発生頻度は retrospective study では 19%(19/100) (Torii Y, et al. Clin Orthop 382, 2001)、prospective study では 13.3%(4/30) (鳥居, 長谷川ら 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 2000) と報告されている。いずれの報告でも 10%以上と発生頻度は高い。治療方法として骨頭が圧解した場合は人工関節が選択される。臓器移植後の人工関節置換術の報告は少ない。人工関節の成績を調査することは重要である。ION 全体に対する THA/BHA 手術後の臨床成績は特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会における多施設調査による報告では、ION に対する THA/BHA 成績は術後 16 年で 臼蓋/9.7% 大腿/8.6% が再置換術となり (12 施設・初回 THA/BHA 549 関節)、ION の THA の耐用性は大腿コンポーネントに差は無かったが、ソケットは OA より劣った (9 施設・初回 THA 612 関節/平均経過観察期間 10 年) と報告されている。これらの報告からは臼蓋側骨強度が ION は OA に比べ低値であることを示唆された。

また一般に、BMT 後発症 ION は治療に用いるステロイド使用量が多い。例えば個々の症例によりばらつきはあるものの、BMT においては約 3000 ~ 50000mg/PSL 換算のステロイド量を投与するのに対し、SLE では約 500mg ~ 3000mg/PSL 換算のステロイド投与量である。過去の報告では Ebeling らは、同種 BMT 後 骨密度は 10gPSL 使用で 9% 低下し、また同種 BMT は 自家 BMT と比べて有意に骨密度が低下と述べている。(Ebeling PR et al. 1999 JBMR) 更に BMT 後 ION 患者は若年発生が多く活動量が大きい。特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会での ION 発症後 THA 患者平均年齢が平均 48.7 歳であるのに対し、本研究平均年齢は 32.6 歳であった。これらの事から BMT 後 ION は THA/BHA 成績は早期に loosening を来す可能性が考えられた。しかしながら、本研究の結果からは BMT 後 ION に対する THA

の成績は ION 全体と変わらなかった。その原因の一つとして、BMT ではステロイド療法は完全寛解すれば投薬中止となる事があるかもしれない。ステロイド投与も長期に及ばなければ骨密度低下への影響も少ない。今回、長期使用例は 2 例/12 例であった。しかし GVHD が発生し、ステロイド・免疫抑制剤投与が長引けば、BMD 低下だけでなく感染のリスクも高くなる。過去に白血病・血液疾患患者に対する BMT 後 ION 症例における THA 成績の報告は非常に少ないが、2 年以上の短・中期報告では良好であったと報告されている。(Bizot P et al. 1996 JBJS Br) しかし、実質臓器移植後に骨粗鬆症は広く認められる (Maalouf NM et al. J Clin Endocrinol Metab 2005) という報告や、前述の同種 BMT 後 10gPSL 使用で BMD 9% 低下 (Ebeling PR et al. JBMR 1999) という報告もあり、長期的 THA 成績には BMD 低下の影響も考えられ、今後も follow が必要と考える。

本研究には問題点として Retrospective study であること、現在の基準でいえば骨切りの適応に対し THA を行っている症例があること、多施設・多術者による成績のばらつきがあることなどが挙げられる。

6. 結論

BMT 後 ION に対する THA の成績は ION 全体と変わらなかった。

7. 研究発表

1. 講演

1) 長谷川幸治

MIS による人工股関節置換術、脱臼性股関節症に対する人工関節置換術

中山大学附属第一医院 2005.10.18 [中国広州市]

2) 長谷川幸治

特発性大腿骨頭壊死症の診断と治療. 東濃整形外科医会 (多治見市) 2005.10.22

3) 長谷川幸治

変形性股関節症に対する偏心性寛骨臼回転骨切り術. 南信整形外科医会 (伊那市) 2005.11.12

4) 長谷川幸治

変形性股関節症に対する骨切り術のすすめ. 名東区整形外科医会 (名古屋市) 2006.4.19

- 5) 長谷川幸治
偏心性寛骨臼回転骨切り術の長期成績と問題点. 第 140 回宮城股関節研究会(仙台市) 2006.7.21
- 6) 長谷川幸治
特発性大腿骨頭壊死症に対する QOL について. 平成 18 年度難病教育講演会(愛知県特定疾患研究協議会)(名古屋市)2006.10.30
- 7) 長谷川幸治
股関節疾患に対する骨切り術のすすめ. 浜松整形外科(浜松市)2006.11.10
2. 学会発表
 - 1) Hasegawa Y, Kawasaki M, Matsuda T, Kitamura S: Eccentric rotational acetabular osteotomy for adult hip dysplasia. 2005.Sep 4 - 9, 第23回国際整形外科災害外科学会(SICOT) Istanbul(Turky)
 - 2) 長谷川幸治:Hip spine syndrome. 2005 年 10 月 15 日~10 月 19 日, 第 3 回中日脊柱外科検討会(中国佛山市)

8. 知的所有権の取得状況

1. 特許
 - 1.生体インプラント材及びその作成方法(独立行政法人産業技術総合研究所と共同)2003年6月、2006年6月
 - 2.大腿骨彎曲内反骨切りガイド
メイラ株式会社と共同申請 2005 年申請中
 - 3.抜くのが容易なチタン性螺子と手術器具一式
メイラ株式会社と共同申請 2005 年申請中

SHRSP を利用した大腿骨頭壊死研究

熊谷謙治、尾崎 誠、村田雅和、宮田倫明、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)

丹羽正美 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座 神経感覚薬理学)

SHRSP 大腿骨頭壊死は特発性大腿骨頭壊死症に非常に類似した側面を有するので、我々はこの 3 年間原因の探求として、大腿骨頭の酸化 stress の発現状況、脂肪細胞の adipokine の検討、高齢ラットでの大腿骨頭壊死の病態、治療薬の開発としてペントサン投与し、研究したので報告する。

①SHRSP/Nagasaki と WKY/Izm に Steroid Hormone を投与し、大腿骨頭壊死の動態、骨頭に生ずる酸化 stress を観察した。SHRSP/Nagasaki の Steroid Hormone 投与群では、組織学的には壊死発生頻度は control 群に比べ、Steroid Hormone 投与群で多かった。抗 8-OHdG (8-hydroxy-deoxyguanosine) と抗 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) を用いた酸化 stress の解析では WKY に比較して、SHRSP で酸化 stress はより多く観察された。また WKY において steroid hormone 投与で 酸化 stress は増加していた。微小循環障害で注目されている AGE/RAGE の血管内皮への関与は軽微であった。

②易卒中高血圧自然発症ラット(SHRSP と略す)に Steroid Hormone の投与によって大腿骨頭壊死の生じ、その際脂肪細胞が腫大、増生し、一部には脂肪変性や壊死を伴うことも判ってきた。近年脂肪細胞の血管作用、代謝領域の関与が注目されており、大腿骨頭壊死と脂肪細胞増生の関係を調べるために、adipokines のうち、Adiponectin (Acrp30) と、抗 PPAR γ の抗体を使用し、通常の免疫染色を行った。

その結果、内蔵白脂肪細胞や皮下脂肪の研究論文と同様に大腿骨髄内脂肪細胞に染色性が確認でき、WKY の大腿骨頭では、Steroid Hormone 投与群の方が Adiponectin, PPAR γ の染色性が高く、また SHRSP と WKY の大腿骨頭では、SHRSP の方が Adiponectin, PPAR γ の染色性が高かった。

SHRSP の Steroid Hormone 無投与群では、骨頭壊死の方が Adiponectin, PPAR γ の染色性が高かった。

③SHRSP 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、高齢の大腿骨頭を観察した。Steroid hormone の投与の有無で 2 群に分類した。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。

④大腿骨頭壊死の原因と考えられている大腿骨頭末梢循環障害、酸化 stress の改善目的で Pentosan を投与し SHRSP/Nagasaki に Steroid Hormone の負荷の有無で大腿骨頭壊死の動態、骨頭に生ずる酸化 stress を観察した。SHRSP/Nagasaki の Steroid Hormone 投与群では Pentosan 使用で脂質代謝への影響がみられ、HDL 値、TGR 値の上昇は抑制されていた。Pentosan 使用で steroid hormone 投与 SHRSP 大腿骨頭の酸化 stress の発現が若干減弱していた。SHRSP/Nagasaki の Steroid Hormone 投与の方法改善に相まって今後 Pentosan の投与開時期や用量、投与間隔を微細に研究する必要がある。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症は近年疫学、臨床的研究が急速に進歩したため、Steroid Hormone 治療で一時期に大量投与(12.5 mg以上)で増加し、高脂血症との因果関係、更には細動脈や細静脈の内皮細胞の関与も明らかになってきている。近年腎臓など諸臓器の生体移植や膠原病などの Steroid Hormone 治療の増加に相まって大腿骨頭壊死症の増加が危惧され、社会問題と成りうるため注目されている。

我々は易卒中高血圧自然発症ラット(SHRSP と略す)で 15～19 週齢でより高頻度に早急期の壊死が発生することを発見した。特発性大腿骨頭壊死症では、実験モデルによる病態解析が必須と考えられる。特発性大腿骨頭壊死症の原因は未だにはっきりと解明されてなく、種々の原因因子の関与、相互連関が考えられる。そのため、根本的な治療は見いだされていない。SHRSP 大腿骨頭壊死は特発性大腿骨頭壊死症に非常に類似した側面を有するので、我々はこの 3 年間原因の探求として、大腿骨頭の酸化 stress の発現状況、脂肪細胞の adipokine の検討、高齢ラットでの大腿骨頭壊死の病態、治療薬の開発としてペントサン投与を行い、研究したので報告する。

-Steroid Hormone 負荷と酸化 stress-

2. 研究方法

【材料&方法】

ラットは長崎大学先端生命科学研究所支援センター動物実験施設(アニマルセンター)で系代飼育されている15週齢牡SHRSP/Ngskと牡WKY/Izmを使用した。SHRSP/NgskとWKY/IzmでそれぞれSteroid Hormoneの負荷群(Steroid Hormone 投与群)と未負荷群(control群)の4群を作成し、各々31匹、40匹、10匹、20匹を使用した。Steroid Hormoneは17週齢でmethylprednisolone acetate 5mgを背部に筋注した。飼育はアニマルセンターで通常ラットケージを使用し、定期的観察し各週に血圧、体重を検量した。屠殺解剖後、薄切永久標本を作製し、壊死の頻度、壊死の程度を観察評価した。大腿骨頭壊死については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抗8-OHdGと、抗4-HNEモノクローナル抗体を使用し免疫染色を行った。また微小循環障害で注目されているAGE(RAGEの血管内皮への関与をみるため、抗AGEモノクローナル抗体と抗RAGE H-300ポリクローナル抗体を使用した。大腿骨頭の免疫染色の評価はepiphysisとmetaphysisに分けて更にepiphysisでは

脂肪細胞辺縁と骨髄細胞に着目して染色性のないものを-、染色性のあるものを+ 特に染色性が強く、x20の各視野で陽性で強染顆粒あるものを++として表記、解析した(図1-1)。

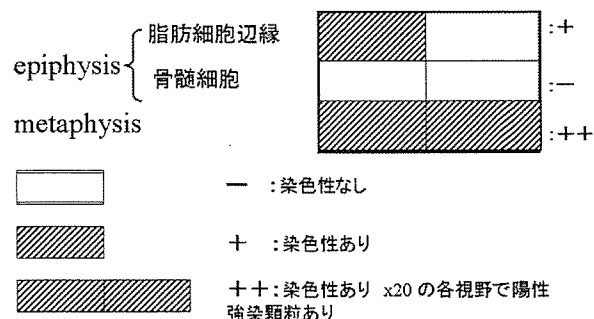


図1-1:大腿骨頭染色性表記法

3. 結果

Steroid Hormone を投与すると体重は減少した。血液生化学検査では Steroid Hormone 投与群では T-CHO 値の上昇は軽度であったが HDL 値、TRG 値は上昇していた。いずれも電解質は正常であった。

大腿骨頭の壊死の頻度は control 群に比べ、Steroid Hormone 投与群は有意に高かった。

またその壊死像は修復反応の少ない典型的なものが大部分であった。

また WKY/Izm に Steroid Hormone 投与では T-CHO 値、HDL 値、LDL の上昇は SHRSP/Ngsk よりも高度であった。酸化 stress は抗 4-HNE モノクローナル抗体では SHRSP に於いて Steroid Hormone 投与にかかわらず、染色性が亢進しており、特に脂肪細胞辺縁に強く、壊死部分は判定不可能であったが metaphysis の染色性も亢進していた。WKY では control 群では染色性はなく、Steroid Hormone 投与で染色性が出現したが、SHRSP の control 群より軽度であった。抗 8-OHdG モノクローナル抗体では SHRSP に於いて control 群に比べ Steroid Hormone 投与群で染色性が亢進しており、特に骨髄細胞に強く、metaphysis の染色性も亢進していた。WKY では Steroid Hormone 投与群に比較し、control 群の epiphysis に染色性が強かった。しかし metaphysis の染色性は Steroid Hormone 投与で SHRSP と同等に亢進していた。微小循環障害で注目されている AGE (Advanced Glycation Endproducts)に関して、lateral epiphyseal vessels の染色性が高く、RAGE は、SHRSP に於いてみられ、Steroid Hormone 投与で増加し、SHRSP の血管病変に RAGE の関与が示唆された(図 1-2、図2)。

Strain	steroid	necrosis	AGE	RAGE	4HNE	8OHdG
SHRSP /Nsgk	-	-	■	■	■	■
	-	+	■	■	■	■
	+	-	■	■	■	■
	+	+	■	■	■	■
WKY /Izm	-	-	■	■	■	■
	+	-	■	■	■	■

図1-2: 大腿骨頭の染色性の結果



染色性の比較 :

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

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

図2: 血管流入部とepiphysis内の血管の酸化stress(染色性)の比較

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。昨今Steroid Hormoneの血管作用で内皮の障害や酸化stressが注目されている。ラットを使用した実験では血行遮断の報告はみられるがSteroid Hormoneの負荷の報告はない。また普通のラットはSteroid Hormone負荷で大腿骨頭壊死は生じにくいということも判った。これは他の種の動物に比較してSteroid Hormoneの代謝やレセプターなどが若干異なることに起因するかもしれない。しかし今回のSHRSPのSteroid Hormone負荷群がSHRSPやWKYの対照群に比較しTRG値の上昇と骨頭壊死の発生頻度が上回っていた。このことはSHRSPでは他のラットの亜系にはない大腿骨頭の血管病変ないしは代謝系の異常が推定される。Steroid Hormone負荷が壊死頻度に影響を及ぼす傾向がみられたことは人体の大腿骨頭壊死と類似し興味深い。

酸化stressの検出には抗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た。抗8-OHdGモノクローナル抗体は活性酸素による酸化stressが亢進すると、DNA中の2'-デオキシグアノシンの8位が酸化されて8-OHdGが生成されることに着目したもので、抗4-HNEモノクローナル抗体は4-HNE(4-hydroxy-2-nonenal)が、生体脂質のうちアラキドン酸のようなω6系高度不飽和脂肪酸が酸化stressをうけて生成する酸化二次生成物(アルデヒド)であ

り、蛋白質と比較的安定な反応物を形成したところに高い特異性を有している。二者を併用することにより生体側と代謝産物側からのapproachで酸化stressの検出の確実性が増す。抗4-HNEモノクローナル抗体の結果から脂肪細胞に於ける酸化stressはSHRSPではSteroid Hormone投与にかかわらず、亢進し、WKYではcontrol群では染色性はなく、Steroid Hormone投与で染色性が出現したことから一般的にラットでもSteroid Hormone投与で特に脂肪細胞に酸化stressは亢進することが判る。しかし、SHRSPでは更に亢進していた。抗8-OHdGモノクローナル抗体の結果ではSHRSPでcontrol群に比べSteroid Hormone投与群で染色性が亢進しており、特に骨髓細胞に強くmetaphysisの染色性も亢進していた。このことはSteroid Hormoneの酸化stressはSHRSPでは骨髓細胞に強く発現することが推測される。糖尿病の網膜症や腎臓障害の微小循環障害の研究に伴って解明され、現在注目されているAGE(糖化最終産物)のSHRSPに於いてSteroid Hormone投与の有無、壊死の有無で差がないものの、AGEの受容体であるRAGEについてみるとWKYでは染色性(発現)は見られなく、SHRSPに於いてみられ、Steroid Hormone投与で増加していた。何らかしSHRSPの血管病変にRAGEの関与が示唆される。

epiphysis内の血管とlateral epiphysial vesselsの染色性を比較で、抗AGE抗体ではlateral epiphysial vesselsの染色性が高く、壊死発生に何らかの意義を有する可能性が考えられる。

5. 結論

- SHRSPおよびWKYの大腿骨頭および周辺に発生する酸化stressを免疫組織科学的に観察した。
- WKYに比較して、SHRSPで酸化stressはより多く観察された。またWKYにおいてsteroid hormone投与により酸化stressは増加していた。
- 微小循環障害で注目されているAGEはlateral epiphysial vesselsの染色性が高く、RAGEは、SHRSPに於いてみられ、Steroid Hormone投与で増加し、SHRSPの血管病変にRAGEの関与が示唆された。

- SHRSP 大腿骨頭壊死(高齢ラットを対象にして) -

2. 研究方法

対象

ラットは長崎大学先端生命科学研究所支援センター動物実験施設(アニマルセンター)で系代飼育されている34週齢、

牡 SHRSP/Ngsk 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 methylprednisolone 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。

大腿骨頭壊死判定は 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)。

統計解析

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。

表 1 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

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。

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、統計学的には有意差は認めなかった(表 2)。

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 週齢のものと同じく、骨髄腔と骨梁の壊死がみられる(図 3)。

表 2 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

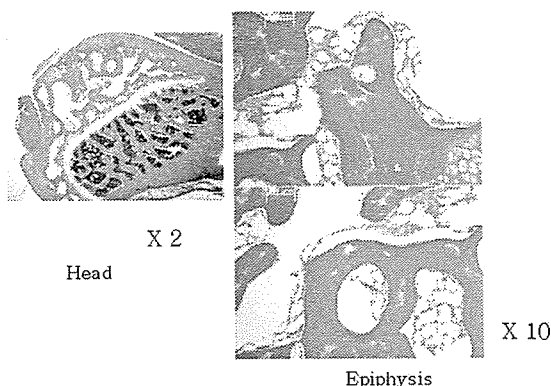


図 3 control群でみられたEarly Necrosis

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)。

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)。

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)。

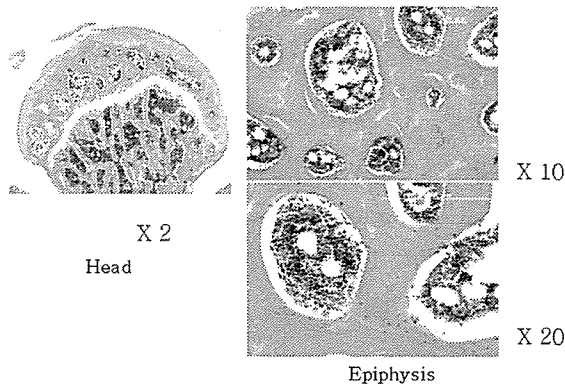


図4 control群でみられたOld Necrosis

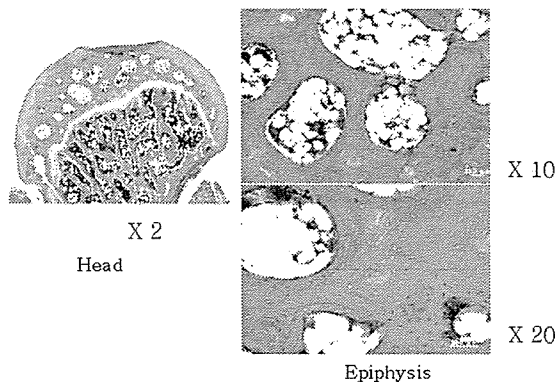


図5 Steroid hormone投与群のOld Necrosis

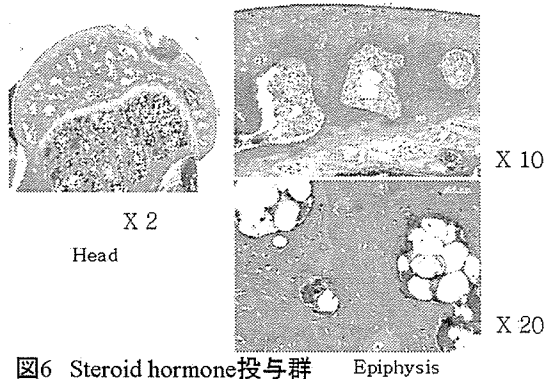


図6 Steroid hormone投与群
Old Necrosis + Early Necrosis

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、骨髄空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。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・変性させることや骨頭壊死を生じさせること、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、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。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)。

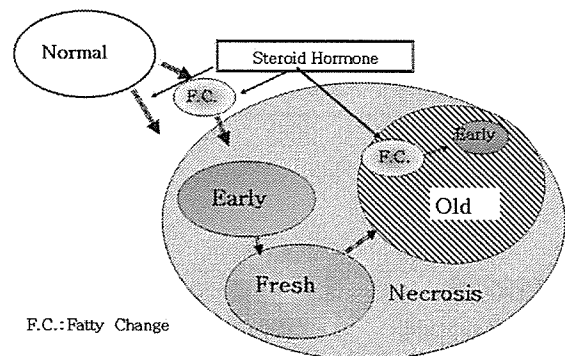


図7 SHRSP/Ngskの大腿骨頭壊死病態想定図

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い、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。

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 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。

- SHRSP 大腿骨頭壊死に対する Pentosan 投与 -

2. 研究方法

【材料&方法】

ラットは長崎大学先端生命科学研究支援センター動物実験施設(アニマルセンター)で系代飼育されている13週齢牡SHRSP/Ngskを使用した。

SHRSP/NgskにSteroid Hormoneの負荷群(Steroid Hormone投与群)と未負荷群(control群)の2群を作成し、各々9匹、7匹を使用した。Steroid Hormoneは15週齢でmethylpredonisolone acetate 8mgを背部に筋注した。PentosanとしてArthroparm社のCaXPS 4mg(約16mg/Kg)を毎週背部に筋注した。飼育はアニマルセンターで通常ラットケージを使用し、定期的観察し各週に血圧、体重を検量した。屠殺解剖時採血し、また薄切永久標本を作製し、壊死の頻度、壊死の程度を観察評価した。大腿骨頭壊死については標本作製の過程で熱発生が生じないためJacques ARLET, 1993の組織学的診断基準に準じてtype2から診断した。酸化stressの検出には一次抗体として抗8-OHdGモノクローナル抗体と抗4-HNEモノクローナル抗体を使用し通常の免疫染色プロトコールに従って染色検鏡を行った。大腿骨頭の免疫染色の評価はepiphysisとmetaphysisに分けて更にepiphysisでは脂肪細胞辺縁と骨髓細胞に着目して染色性のないものを-、染色性のあるものを+ 特に染色性が強く、x20の各視野で陽性で強染顆粒あるものを++として表記した。

3. 結果

Pentosan 投与で体重の減少はなく、順調に生育した。また Steroid Hormone を投与で体重は減少した(図8)。

血液生化学検査では Steroid Hormone 投与で T-CHO, HDL, LDL TRG 値は上昇していた。いずれも電解質は正常であった。Steroid Hormone 投与、Pentosan 非投与実験群 Pentosan 投与で HDL 値、TRG 値は減少していた(図8)。

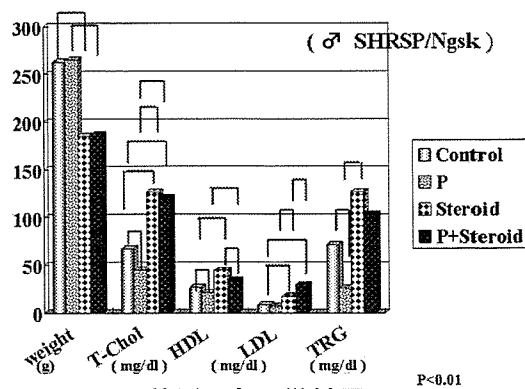


図8 体重、生化学結果

血液凝固能では TPA や PAI1 に著変はみられなかったが aPTT や PT は Pentosan 投与で延長していた。大腿骨頭の壊死の頻度は統計学的には non-parametric でデータなの為か有意な差はえられなかった。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。抗 4-HNE モノクローナル抗体では Pentosan 非投与で染色性が亢進し、特に脂肪細胞辺縁に強く、壊死部分は判定不可能であったが metaphysis の染色性も亢進していた。Pentosan 投与では壊死の有無にかかわらず染色性は metaphysis を含め低下していた。抗 8-OHdG モノクローナル抗体では Pentosan 投与で若干染色性が低下しているようであった(図9)。

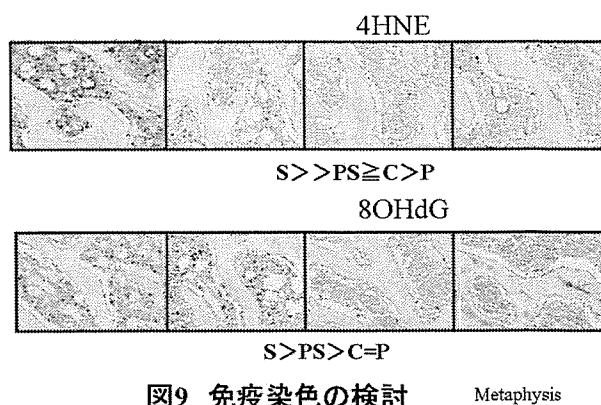


図9 免疫染色の検討

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られる。また Steroid Hormone 投与で高脂血症、骨髓内脂肪細胞の増生が生じ、これも壊死と深く関係していると考えられている。昨今 Steroid Hormone の血管作用で内皮の障害や酸化 stress が注目され、SHRSPラットを使用した実験ではSHRSPの大腿骨頭がWKYのものより酸化 stress に曝され、Steroid

Hormoneの負荷で増大することやSteroid Hormoneの負荷で高脂血症を呈することが分かっている。一方大腿骨頭壊死研究会の病態解析Ⅱでステロイドホルモンの投与による大腿骨頭壊死の原因とされる大腿骨頭末梢循環の改善薬剤の検討が課題とされた。大腿骨頭末梢循環の改善薬剤は幅広く、Steroid Hormone誘発の微小循環改善として期待される薬剤には warfarin, heparin などの抗凝固薬や pravastatin, atorvastatin などの Statin 系の薬剤に代表される脂質代謝改善薬やビタミン C や E などの酸化 stress の改善薬が考えられる。特定の原因が究明されていない現状で改善薬を求めると Steroid Hormone 誘発の大腿骨頭壊死症で判明している諸事象を改善する薬剤が望まれる。

上述のように以前からの SHRSP ラット実験で大腿骨頭は酸化 stress や Steroid Hormone の負荷でのトリグリセライドの上昇がこの壊死の発生原因として推定されることから末梢循環改善に加えて前述の事象を改善する薬剤を検索した。

J.R. Urbaniak と J.P. Jones の編集の AAOS Osteonecrosis : Etiology, Diagnosis, and Treatment (1997 年) の 102-103 頁に脂肪融解作用と抗凝固作用と線維素溶解作用と抗炎症作用を有した薬剤が大腿骨頭壊死症の治療に望まれ、Pentosan polysulfate (PPS) は、凝集を減らして、血小板 aggregability を減少させて、線維素溶解を刺激して、TG と CHOL レベルを低下させる能力を有していることから、大腿骨頭壊死症に対して適材としている。Pentosan の主たる薬剤 Pentosan polysulfate sodium (PPS) (ペントサン多硫酸ナトリウム) はドイツで開発され、ブナの木から抽出した多糖体で分子量は約 4000 から 6000 ダルトンである。1949 年に Heparin 類似薬として発売開始されている。Pentosan をイヌの変形性関節症治療薬として長年研究している Peter Ghosh は Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1999 でその作用機序を 1. 軟骨 integrity の保持 2. 滑膜の炎症や補体活性の減少、白血球と滑膜細胞による pro-inflammatory mediators を減少 3. 滑膜細胞の Cytoprotection や高分子ヒアルロンサン合成能の改善 4. fibrin や脂質による閉塞物を動化させるため毛細血管内皮から t-PA や SOD やリパーゼ放出を刺激することによって滑膜や軟骨下骨に於ける血流の改善 5. 血小板の活性化と PAI-1 の放出の閾値を増加させることを挙げている。今回この 2,4,5 の作用が期待されるので Pentosan の応用を試みた。

今回、実験条件設定があまく、実験数が少ないことから満足して評価できるものとは言い難い。

しかし、酸化 stress も抑制されたことや Pentosan 投与でトリグリセライドの上昇が抑制されたことは AAOS Osteonecrosis

の記載に合致しているようである。

5. 結論

1. steroid hormone 投与による SHRSP の大腿骨頭壊死の改善目的で Pentosan を使用した。
2. Pentosan 使用 steroid hormone 投与の群では骨頭壊死の発生頻度は減少していた。
3. Pentosan 使用で APTT と PT は延長していた。
4. Pentosan 使用で脂質代謝への影響がみられた。
5. Pentosan 使用で steroid hormone 投与 SHRSP 大腿骨頭の酸化 stress の発現が減弱していた。

-脂肪細胞の adipokine の検討-

2. 研究方法

【材料&方法】

ラットはわれわれが以前研究で使用したラットの大腿骨近位部のパラフィンブロックを使用し、データベースから SHRSP/Ngsk と WKY/Izm でそれぞれ Steroid Hormone の負荷群 (Steroid Hormone 投与群) と未負荷群 (control 群) の 4 群、更に SHRSP/Ngsk は大腿骨頭壊死の有無で群を分けた。各々 5 ブロックから薄切標本を作製した。

adipokines の検出には一次抗体として Santa Cruz Biotechnology 株式会社の抗 Adiponectin (Acrp30) モノクローナル抗体 (sc-17044-R) と、抗 PPAR γ モノクローナル抗体 (sc-7273) 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 (metaphysis) の免疫染色の評価は、脂肪細胞辺縁と骨髄細胞に着目して染色性のないものを -、染色性のあるものを + 特に染色性が強く、x20 の各視野で陽性で強染顆粒あるものを ++ として解析した。

3. 結果

内蔵白脂肪細胞や皮下脂肪の研究論文と同様に大腿骨髄内脂肪細胞に染色性がみられ、adipokine の産生を確認できた。

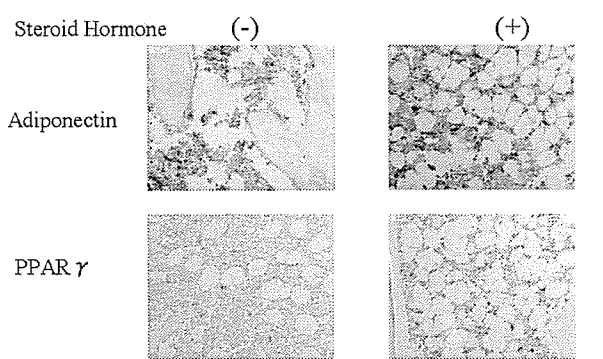
WKY の大腿骨頭では、Steroid Hormone 投与群の方が Adiponectin, PPAR γ の染色性が高かった (図 10)。

SHRSP と WKY の大腿骨頭では、SHRSP の方が Adiponectin, PPAR γ の染色性が高かった。

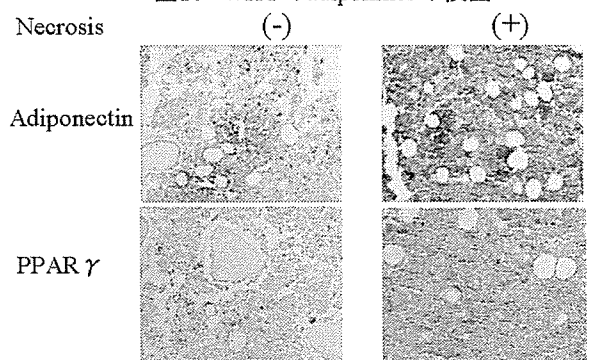
SHRSP の Steroid Hormone 無投与群では、骨頭壊死の方が Adiponectin, PPAR γ の染色性が高かった (図 11)。

SHRSP の Steroid Hormone 投与群では、Adiponectin では大差はないが、骨頭壊死の方が PPAR γ の染色性が高かつ

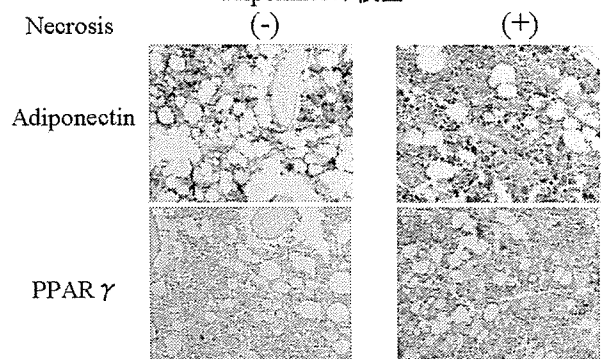
た(図12)。



WKY
図10 WKYのadipokinesの検出 ×20



SHRSPSteroid Hormone無投与群の
adipokinesの検出 ×20



SHRSPSteroid Hormone投与群の
adipokinesの検出 ×20

4. 考察

我々は易卒中高血圧自然発症ラット(SHRSPと略す)で15~19週齢でより従来の高血圧自然発症ラット(SHRと略す)よりも高頻度で早急期の壊死が発生することを発見し、steroid hormoneや高脂血症の関与の研究を行ってみると、脂肪細胞が腫大、増生し、一部には脂肪変性や壊死を伴っていることも判ってきた。

近年 metabolic syndrome の概念の定着など脂肪細胞の全身的、局所的な役割が注目される。metabolic syndrome の分野では主にインシュリンの作用を中心とした代謝疾患や高血圧関連で循環器疾患に関係する内科領域の分子生物学的研究が日進月歩で進み、種々の adipokine が発見されてい

る。

今回は SHRSP と WKY の大腿骨頭骨髄内の Adiponectin , PPAR γ の染色性をみたが、内蔵白脂肪細胞や皮下脂肪の研究論文と同様に大腿骨髄内脂肪細胞に染色性がみられ、adipokine の産生を確認できた。

WKY の大腿骨頭では、Steroid Hormone 投与群の方が Adiponectin , PPAR γ の染色性が高かったことは Steroid Hormone で壊死を生じないratでも脂肪細胞の応答が観られることがわかる。SHRSPとWKYの大腿骨頭では、SHRSPの方が Adiponectin , PPAR γ の染色性が高く、脂肪細胞の感受性に差がありそうである。

SHRSP の Steroid Hormone 無投与群では、骨頭壊死の方が Adiponectin , PPAR γ の染色性が高く、骨頭壊死に Adiponectin , PPAR γ が関与している可能性が考えられるが、Steroid Hormone 投与群での結果が、判然としていなく Steroid Hormone の抗炎症作用等の相互作用も否定できない。

今回はSHRSPとWKYの大腿骨頭骨髄内のAdiponectin , PPAR γ の染色性を観てみたのみである。Steroid Hormone投与に反応して脂肪細胞の増生が著しく、増生した脂肪細胞からは大量のLeptin、PAI-1、TNF α が放出されることは既知の事実である。Leptin、Adiponectinの骨細胞に対する作用もいわれているが、此处ではPAI-1の循環動態への影響 TNF α のapoptosis誘導による脂肪細胞や骨髄細胞の壊死に着眼すると、脂肪細胞の動態と大腿骨頭壊死の関係が結びつきやすい(図13)。

Mechanism of ION

-Adipocyte dysfunction?-

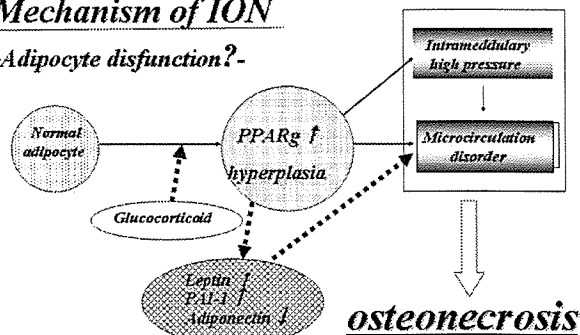


図13 脂肪細胞の動態と大腿骨頭壊死の想定図
- adipokines に関して -

今後、Steroid Hormone誘発性大腿骨頭壊死症(ION)の病態生理について検索していく上で、血管病変と脂肪細胞の変化を相互的に観れる各種adipokinesの動態の評価が望まれる。

5. 結論

1. SHRSP/NgskとWKY/Iの大腿骨頭で、Steroid Hormone投与の有無、骨頭壊死の有無に分け 骨髄脂肪細胞を adipokine の免疫組織化学法により観察した。
2. 骨髄脂肪細胞からも皮下、腹腔脂肪細胞と同様に adipokine の産生を確認した。
3. WKY の大腿骨頭では、Steroid Hormone 投与群の方が Adiponectin , PPAR γ の染色性が高かった。
4. SHRSP と WKY の大腿骨頭では、SHRSP の方が Adiponectin , PPAR γ の染色性が高かった。
5. SHRSP の Steroid Hormone 無投与群では、骨頭壊死の方が Adiponectin , PPAR γ の染色性が高かった。

6. 研究発表

学会発表

- 1) 第40回SHR学会(平成16年9月17-18日大阪府)
熊谷謙治、丹羽正美
-SHRSP 大腿骨頭壊死における酸化 stress の検討-
- 2) 第19回日本整形外科学会基礎学術集会
(平成16年10月21-22日 東京都)
熊谷謙治、村田雅和、宮田倫明、鈴木暢彦、丹羽正美、
進藤裕幸
SHRSP を利用した大腿骨頭壊死研究
- 3) 第21回日本整形外科学会基礎学術集会
(平成18年10月19-20日 長崎市)
宮田倫明、熊谷謙治、村田雅和、尾崎誠、丹羽正美、
進藤裕幸
SHRSP 大腿骨頭壊死に対する Pentosan 投与
- 4) 第11回SHR国際シンポジウム
心臓血管の危険因子-疾病予防のための遺伝学
(平成16年5月16,17日米国 オレゴン州 ポートランド
市)
熊谷謙治、鈴木暢彦、和田政浩、村田雅和、宮田倫明、
尾崎誠、丹羽正美、進藤裕幸
- 5) The 12th International Symposium on SHR
-Genetics of Experimental and Human Hypertension in
Relation with Environmental Factors-
The Pentosan for the Avascular Necrosis of Femoral Head
in SHRSP
K. Kumagai, M. Osaki, M. Murata, N. Miyata, M. Niwa,
H. Shindo
- 6) 第12回SHR国際シンポジウム
環境因子に関連した実験および臨床高血圧の遺伝学

(平成18年10月20,21日 日本国 京都市)

熊谷謙治、尾崎誠、村田雅和、宮田倫明、丹羽正美、
進藤裕幸

—ペントザンの大腿骨頭壊死に対する効果—

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

—HMG-CoA 還元酵素阻害薬の効果—

赤池雅史、栗飯原賢一、池田康将、八木秀介、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、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるピタバスタチンが血管内皮機能に及ぼす効果について検討した。グルココルチコイド過剰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。さらに培養ヒト臍帯静脈内皮細胞における検討では、ピタバスタチンは高濃度グルココルチコイド存在下において eNOS プロモーター活性を上昇させ、eNOS 蛋白発現を増加させたが、インプレノイド中間体であるゲラニルゲラニルピロリン酸の添加により eNOS 蛋白発現増加作用は消失した。ピタバスタチンは血管内皮細胞に対するコレステロール非存的な多面的作用を介して eNOS 発現を増加させることにより、NO bioavailability 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障害を改善することが示唆され、本剤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酸化ストレス充進に伴う一酸化窒素(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誘発性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、高い血中濃度を維持し *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動物モデルならびに培養血管内皮細胞を用いて検討した。

2. 研究方法

(1)グルココルチコイド過剰マウスを用いた検討

C57BL/6J(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、尿中硝酸/亜硝酸(NOx)排泄量、大動脈における eNOS 蛋白発現、dihydroethidium(DHE)染色および尿中 8-OHdG 排泄量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。尿中 NO_x 排泄量は Griess 法により測定し、尿中 8-OHdG 排泄量は ELISA により測定した。

(2) 培養血管内皮細胞を用いた検討

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の培養系にピタバスタチン 10^{-5} M を添加し、その 12 時間後にデキサメサゾン (DEX) 10^{-5} M を添加し、さらに DEX 添加 16 時間後にウエスタンブロットによる eNOS 蛋白発現および luciferase reporter gene assay による eNOS プロモーター活性を解析した。eNOS 蛋白発現の解析については発現量の解析とともに eNOS の Ser1177 のリン酸化を認識する抗体を用いて eNOS 活性化についても評価し、これらはアトルバスタチン 10^{-5} M 添加による効果についても同様に検討した。また、ピタバスタチンとともにメバロン酸 $100\mu\text{M}$ 、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) $10\mu\text{M}$ 、あるいはファルネシルピロリン酸 (FPP) $10\mu\text{M}$ を同時に添加し eNOS 発現に及ぼす影響について解析した。eNOS プロモーター活性の評価は eNOS プロモーター遺伝子の -1193~+109、-1001~+109、-742~+109、-265~+109 を組み込んだ luciferase reporter vector を Lipofectamine plus (Invitrogen) を用いて HUVEC に transfection し、luciferase assay system により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言、徳島大学遺伝子組み換え実験安全管理委員会規定、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) グルココルチコイド過剰マウスにおける血圧、脈拍、血糖および脂質の変化とピタバスタチンの効果

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。

表 1. 体重および代謝データ

	control	PIT	DEX	DEX+PIT
体重 (g)	30.2±2.3	30.0±1.2	26.9±2.0*	27.7±2.0
総コレステロール (mg/dl)	62.3±4.3	63.0±1.6	88.2±10.0**	78.5±8.4**
中性脂肪 (mg/dl)	87.3±27.3	45.2±17.2*	80.3±15.9	42.8±13.5**
HDLコレステロール (mg/dl)	36.0±3.9	38.6±3.1	57.7±6.9**	52.4±6.5**
空腹時血糖 (mg/dl)	93.5±8.0	87.7±13.6	97.7±9.2	85.2±12.4

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

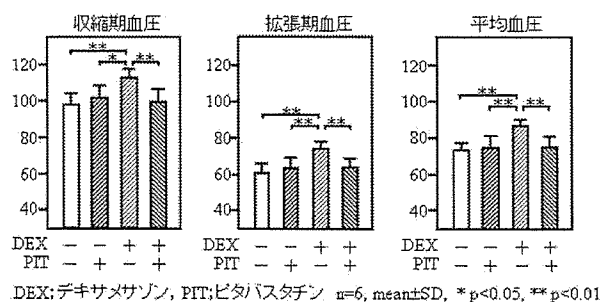


図 1. 血圧に及ぼすピタバスタチンの効果

2) グルココルチコイド過剰マウスにおける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)。

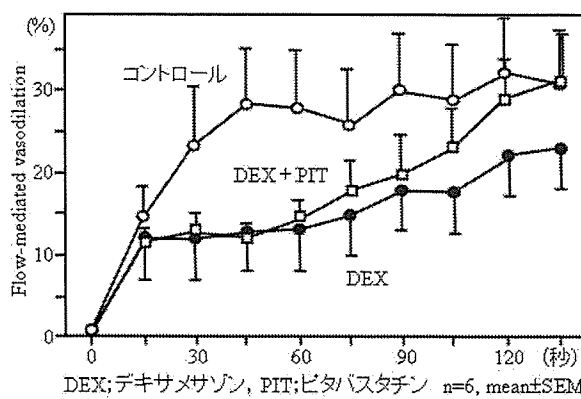


図 2. 内皮依存性血管弛緩反応に及ぼすピタバスタチンの効果

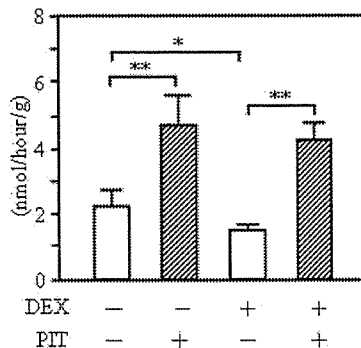
3) グルココルチコイド過剰マウスにおける尿中 NO_x 排泄量および大動脈における eNOS 発現に及ぼすピタバスタチンの効果

尿中 NO_x 排泄量はピタバスタチン投与群ではコントロール群と比較しての増加が認められた。DEX 投与

群では有意に減少していたが、DEX およびピタバスタチン投与群ではこの減少が改善していた(図 3A)。

eNOS 蛋白発現はピタバスタチン投与群ではコントロール群と比較して増加が認められた。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 3B)。

A: 亜硝酸/硝酸イオンの尿中排泄量



B: 大動脈における内皮型一酸化窒素合成酵素の発現

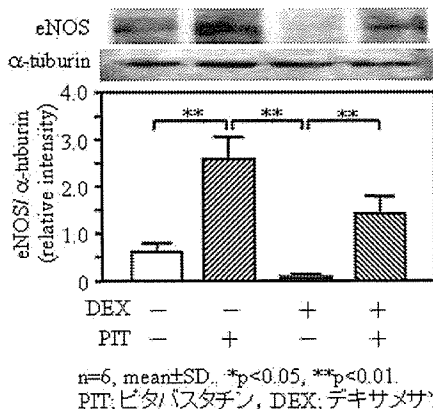


図3. グルコルチコイド過剰マウスにおける一酸化窒素産生に及ぼすピタバスタチンの効果

4) グルコルチコイド過剰マウスにおける酸化ストレス指標に及ぼすピタバスタチンの効果

DHE 染色による superoxide 産生の検討では、DEX 投与群の大動脈で産生増加が認められたが、DEX およびピタバスタチン投与群ではコントロール群と同程度に減少していた(図 4A)。また、尿中 8-OHdG 排泄量についても DEX 投与群で有意に増加していたが、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 4B)。

5) HUVEC における eNOS 発現に及ぼすピタバスタチンおよびアトルバスタチンの効果

HUVEC における eNOS 蛋白の発現量はピタバスタチンあるいはアトルバスタチンの添加により有意に増加した。DEX 添加は eNOS 蛋白の発現量を有意に抑

制したが、この抑制作用はピタバスタチンあるいはアトルバスタチンの添加により消失した。eNOS 活性の指標である Ser1177 のリン酸化はこれらの eNOS 蛋白発現量と連動していた(図 5)。

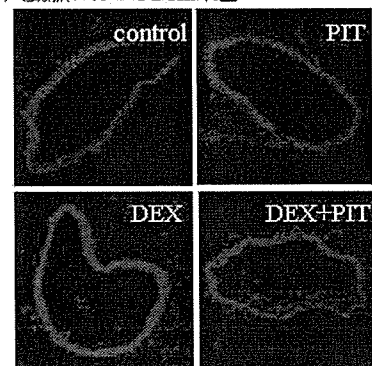
6) ピタバスタチンによる eNOS 発現増加作用に及ぼすイソプレノイド中間体の影響

DEX 存在下の HUVEC におけるピタバスタチンの eNOS 蛋白発現増加作用はメバロン酸および GGPP の添加によりほとんど消失した。一方、FPP の添加は影響を与えなかった(図 6)。

7) eNOS プロモーター活性に及ぼすピタバスタチンの効果

ピタバスタチンは 4 種類の eNOS プロモーターのいずれにおいてもその活性を増加させ、その効果は DEX 添加群においても同等に認められた。なお、DEX 添加は eNOS プロモーター活性に有意な影響を及ぼさなかった(図 7)。

A: 大動脈における DHE 染色



B: 尿中 8OHdG 排泄量

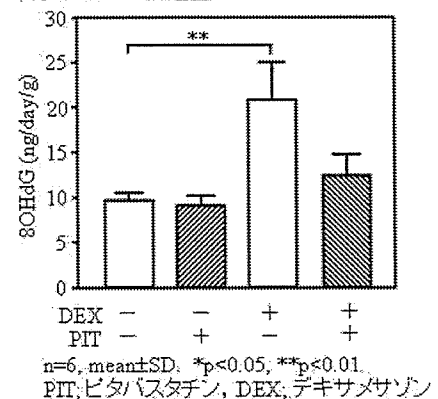
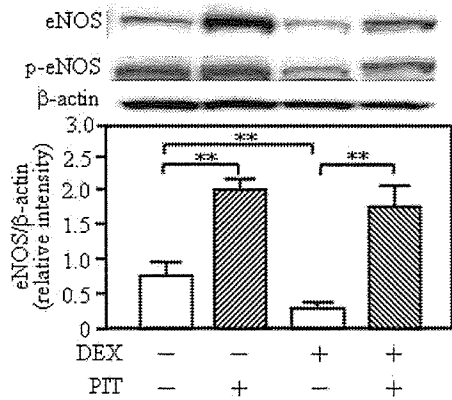
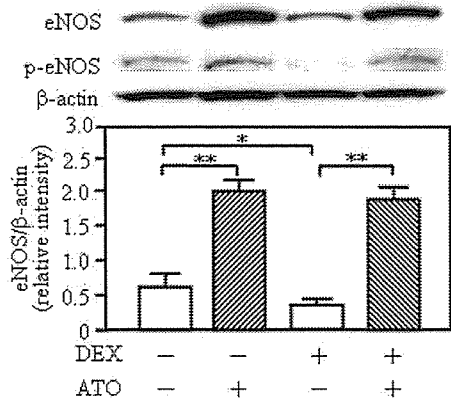


図4. グルコルチコイド過剰マウスにおける酸化ストレスに及ぼすピタバスタチンの効果

A: ビタバスタチンの効果

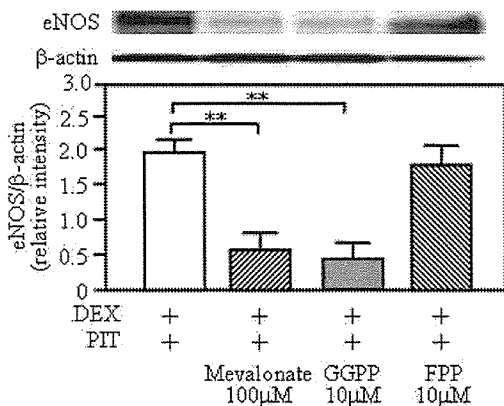


B: アトルバスタチンの効果



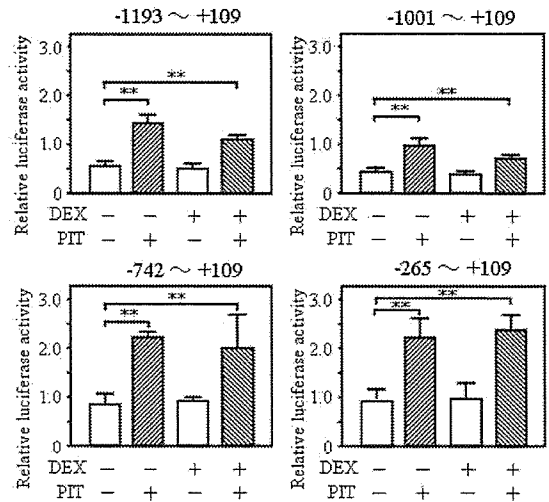
n=6, mean±SD. *p<0.05, **p<0.01.
PIT; ビタバスタチン, ATO; アトルバスタチン,
DEX; デキサメサゾン

図5. 培養ヒト臍帯静脈内皮細胞における一酸化窒素合成酵素の発現に及ぼすスタチンの効果



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

図6. ビタバスタチンによる一酸化窒素合成酵素の発現増加作用に及ぼすイソプレノイド中間体の影響



n=3, mean±SD. *p<0.05, **p<0.01 vs control.
PIT; ビタバスタチン, DEX; デキサメサゾン

図7. 一酸化窒素合成酵素プロモーター活性に及ぼすビタバスタチンの影響

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。我々はこれまでに NO bioavailability の低下によるグルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害が大腿骨頭壊死症の予防ならびに治療標的となりうる可能性を提唱し、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検討した。

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、特にイソプレノイド中間体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⁴⁾。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、グラニルグ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⁴⁾。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 bioavailability 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、血管内皮機能ならびに血管拡張性を改善したと考えられる。

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⁵⁻⁶⁾。グルココルチコイド過剰マウスを用いた今回の検討では DEX 投与は大動脈における eNOS 蛋白質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。また同時に、グルココルチコイド過剰による酸化ストレスの亢進をピタバスタチンが抑制して結果も得られており、酸化ストレス抑制による NO 消去の抑制作用も血管内皮機能改善に寄与している可能性がある。

HUVEC の培養系を用いた今回の検討では、ピタバスタチンは DEX による eNOS 蛋白発現の抑制を改善し、これは活性型 eNOS の発現増加を伴っていた。また、アトルバスタチンにも同様の作用が認められた。このような結果は、グルココルチコイド過剰マウスでみられたグルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害に対するピタバスタチンの改善効果は、血管内皮細胞への直接的作用によるものであり、さらにこの作用はスタチンの class effect であることが示唆される。さらに、今回の検討ではコレステロール合成経路のイソプレノイド中間体である GGPP によって、ピタバスタチンの eNOS 発現増加作用が相殺されており、このことはグルココルチコイドによる eNOS 発現抑制に及ぼすピタバスタチンの効果が、イソプレニル化阻害による Rho 阻害を介したものである可能性を示している。こ

の点については今後 Rho 阻害薬の効果についても検討が必要である。また、ピタバスタチンは eNOS プロモーター活性を有意に増加させたことから、eNOS 発現増加作用の機序のひとつとして eNOS 遺伝子の転写亢進が考えられる。しかしながら、今回の検討では DEX は HUVEC における eNOS プロモーター活性に影響を及ぼさなかったこと、DEX は eNOS mRNA の半減期を短縮させ、一方、DEX はその半減期を延長させることが報告されていることより、ピタバスタチンはグルココルチコイドによる eNOS mRNA の不安定化を改善することにより、eNOS 発現増加作用を発揮している可能性もあり、さらに検討が必要である。

今後は、グルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害に及ぼす HMG-CoA 還元酵素阻害薬の作用について NO 合成増加作用ならびに酸化ストレス軽減作用の面からさらに検討を行い、その分子メカニズムについても解明を進めることで、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に及ぼすピタバスタチンの改善効果は血管内皮細胞に及ぼす多面的直接作用による eNOS 発現増加を介するものであることが示唆された。ピタバスタチンはグルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害を改善する作用を有しており、グルココルチコイド過剰による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) Aihara K, Azuma H, Takamori N, Kanagawa Y, Akaike M, Fujimura M, Yoshida T, Hashizume S, Kato M, Yamaguchi H, Kato S, Ikeda Y, Arase T, Kondo A, Matsumoto T.: Heparin cofactor II is a novel protective factor against carotid atherosclerosis in elderly individuals. *Circulation* 109:2761-2765, 2004.
- 2) Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, Hayashi H, Yamada Y, Endoh F, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Kato M, Yoshimura K, Yamamoto Y, Kato S, Matsumoto T.: Disruption of nuclear