

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。

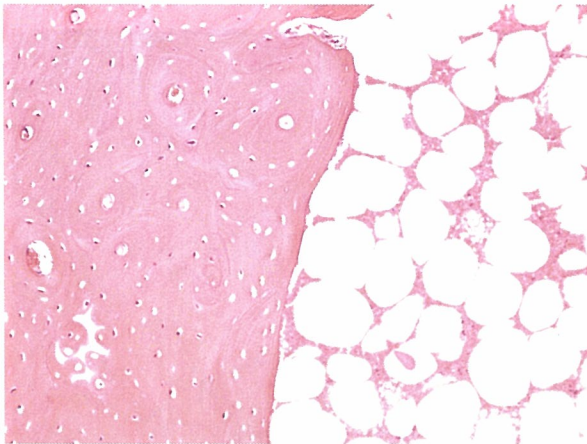


図6. 標本名;市大(6) HE ×100

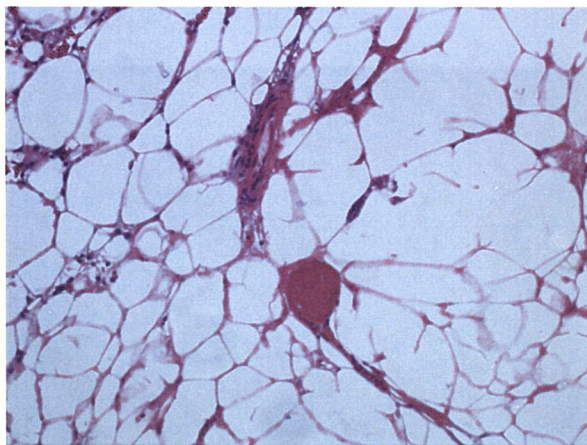


図7. 標本名;市大(7) HE ×100

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つ

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。

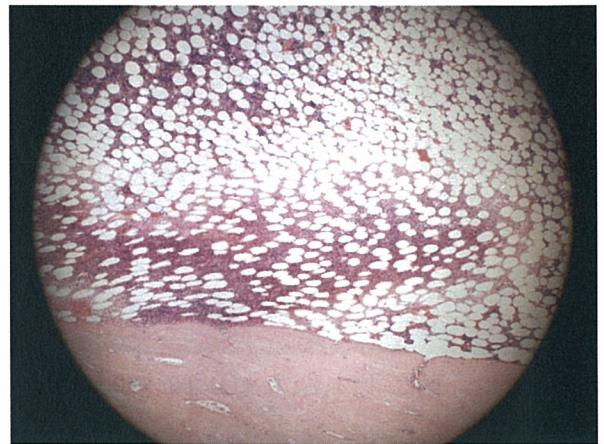


図8. 標本名;金沢(2) HE ×40

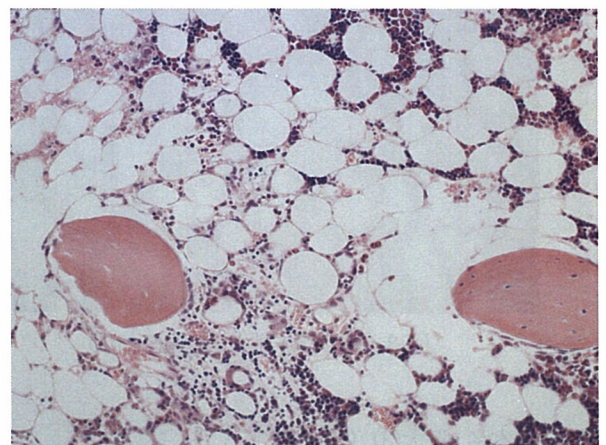


図9. 標本名;金沢(2) HE ×100

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。

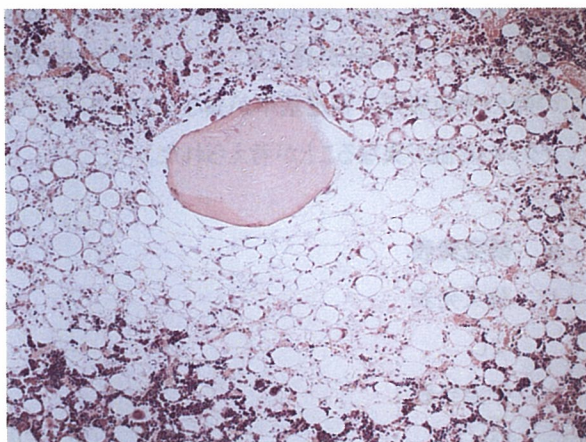


図 10. 標本名;金沢(3) HE ×40

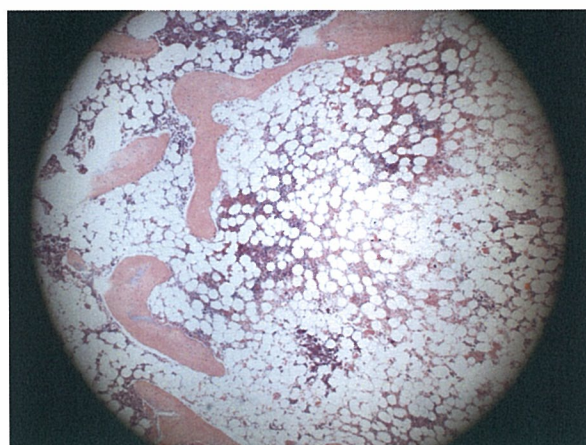


図 11. 標本名;金沢(5) HE ×40

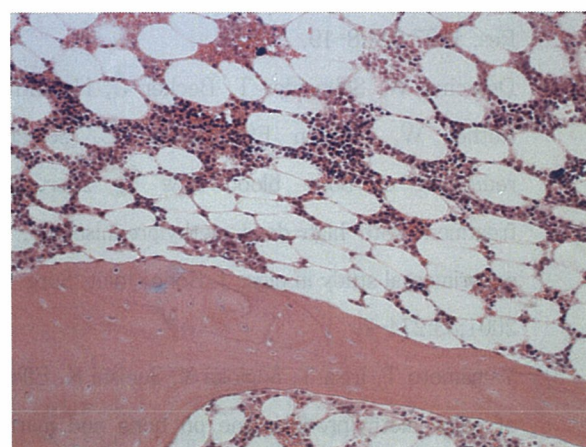


図 12. 標本名;金沢大(5) HE ×100

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。

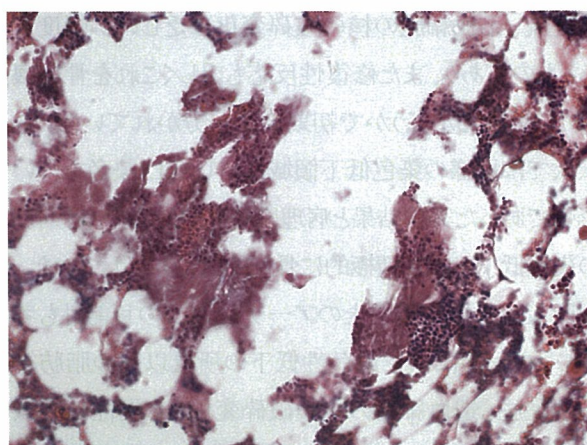


図 13. 標本名;九大(1) HE ×100

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³⁾。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^{3,4,5,13)}、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⁵⁾、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, Bungler 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, Irita 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.

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、小平博之、天正恵治、斎藤直人、酒井典子（信州大学医学部 整形外科）
大橋俊夫、水野理介、伊古美文隆（信州大学 器官制御生理学）

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、如何に循環系の変化が発生し骨壊死に至るのか、これまで様々な観点から研究が行われてきたが解明されるにいたっていない。我々はIONの病態解明のために、より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。まず、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。耳静脈から全身投与した蛍光物質は、家兎大腿骨髄腔内でその存在が確認できた。しかし、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。次いで、骨髓内循環を定量的に評価する指標として、骨髓内圧に注目した。骨髓内は周囲を皮質骨に取り囲まれた生体内でも特殊な環境にある。同じ環境下にあるのは脳のみである。我々は骨髓内圧が骨髓内循環を定量的に評価する因子になりうるのではないかと考えた。家兎を用いた in vivo の実験で、体血圧の上昇と静脈圧の上昇はそれぞれ大腿骨髄圧の上昇をもたらすことが判明した。また、静脈圧の上昇の方が動脈圧上昇に比して反応時間および反応量ともに影響が大きいことが判明した。

1. 研究目的

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循環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。しかし、骨髓は周囲を硬い皮質骨に取り囲まれている特殊な環境にあるため、他臓器のように外部からその血流を観察できる方法が確立されていない。そこで我々は、骨髓内血流を real time で定量的に観察することを目的として2つの実験系を立ち上げた。ひとつは、蛍光物質を用いて in vivo で家兎骨髓内微小循環系を観察する系である。この実験系を用いて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試みた(研究1)。さらに、骨髓内圧を指標として骨髓内循環を定量的に評価することを試みた。骨髓は周囲を皮質骨に取り囲まれた生体内でも特殊な環境である。

同様な環境にあるのは脳のみである。脳においては脳内圧が脳内血流に影響を与えるという Monro-Kelly の法則が存在する。骨髓内においても血流のひとつの指標として骨髓内圧を用いて評価できないかと考えた。体血圧を変化させることで骨髓内圧がどのように変化するかを、家兎を用いて測定した。さらに、班研究として注目してきている NO や酸化ストレス下での圧力変化、つまり血管反応性の変化を定量的に評価することを本実験系の目的とした(研究2)。

2. 研究方法

研究1

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)。麻酔下に大腿外側を約4cm皮膚切開した後、伸筋および屈筋群間の筋間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しないで、大腿骨に到達可能である。その後、大転

子から約 15mm を中心として 5 から 8mm 程度幅約 1mm 外側皮質を削る(図1)。実体顕微鏡下に操作を行い、決して皮質を破って骨髄が露出しないようにする。これにより骨髄腔が薄ら観察出来る。次に蛍光顕微鏡下に視野を確保したのち、蛍光物質を静脈内投与し骨髄内微小循環系が CCD カメラを解して、動画および静止画像として観察可能となる。

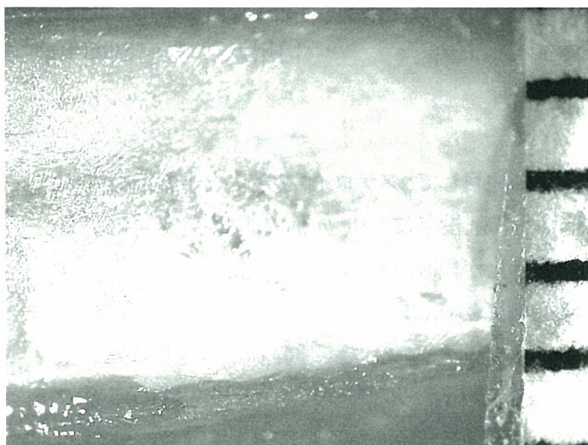


図1:家兎大腿骨外側皮質を削ると、骨髄内が薄ら観察できる。目盛りは 1mm。

研究2

動物は日本白色家兎(体重3kg、オス)を使用。麻酔は全身麻酔。右頸動脈、左大腿静脈、右大腿骨での圧を3チャンネルで同時計測できるポリグラフシステムを用い動脈圧、静脈圧、骨髄圧の計測を同時に行った。

NE3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を耳静脈から投与し動脈圧を上昇させ、また腹部圧迫によって下大静脈を閉塞させることで下肢静脈圧を上昇させ、このときの家兎大腿骨骨髄圧の変化を調べた。

骨髄圧の計測方法は、右大腿を外側切開し、筋間を分け、大腿骨外側骨皮質を露出。1.5mm エアードリルで開窓を行い、ここに 4Fr アンギオカテーテルを髓腔内(大腿骨骨幹部中央部)に挿入し、周囲をボーンワックスでシールドしたのち、切開した筋膜を縫合。アンギオカテーテルをポリグラフシステムに接続し、骨髄圧を測定した。

3. 研究結果

研究1

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 FITC(分子量 77000)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髄への蛍光物質

の漏出も観察出来た(図2)。今回の検討では、蛍光物質投与開始から骨髄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。

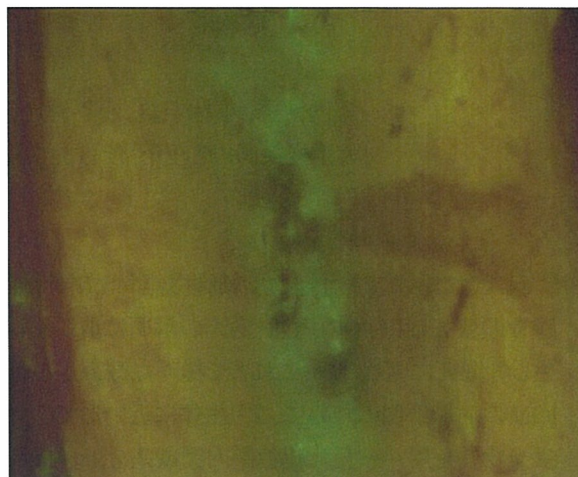


図2:蛍光物質を全身投与すると、蛍光顕微鏡下に骨髄内毛細血管網が観察可能である。

研究2

NE3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与を行うと、NE 投与と同時に動脈圧(収縮期圧)は上昇した。また静脈圧もこれに同期するように軽度の上昇を観察した。また、骨髄圧は NE 投与直後に軽度上昇、その後 2 分ほどでピークまで上昇を認め、その後ゆっくりと戻っていった。すべての家兎で同様のパターンを観察した(図3)

下大静脈圧迫では下肢静脈圧は急峻な上昇を認め、これに伴い骨髄圧も上昇を認めた。動脈圧は軽度の上昇を認めるのみであった。下大静脈の圧迫においても全ての家兎で同様のパターンを示した。(図4)

今回の結果では動脈、静脈圧を上昇させた際の骨髄内圧の反応が明らかに異なっていた。圧の上昇の程度で見ると、静脈圧の上昇の影響が強いと考えられた。

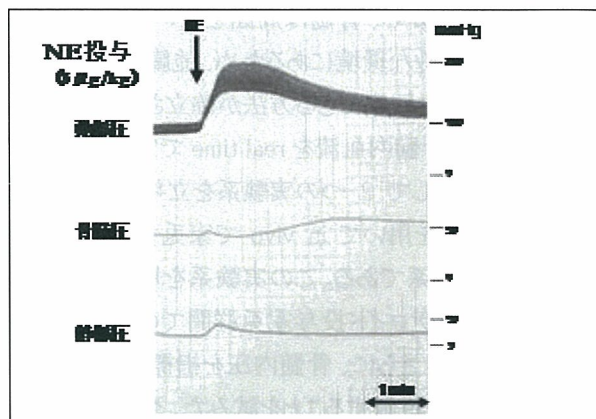


図3:NE 投与時の動脈圧、静脈圧、骨髄圧の変化

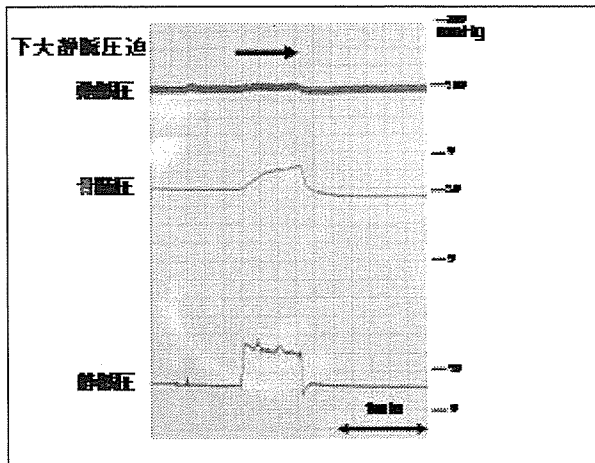


図4: 下大静脈圧迫時の動脈圧、静脈圧、骨髄圧の変化

4. 考察

我々はこれまで、血管内皮細胞および骨髄内微小循環系に注目して、ステロイドを誘因とする特発性大腿骨頭壊死症(ION)の病態・病因の解明に取り組んできた。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 に陥るという現象は確認出来なかった¹⁾。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^{2,3)}。

我々は平成 11 年よりステロイド投与家兎骨壊死モデルを用いた、大腿骨骨髄内抵抗血管の生理・薬理的検討を行ってきた。ステロイド投与後 7 日目での観察を、既に報告してきている。ステロイド剤投与家兎から採取した大腿骨髄内抵抗血管において、COX-アラキドン酸の反応が亢進していることが明らかになった。この反応はステロイド非投与家兎には見られなかった。また、ステロイド投与家兎から採取した大腿動脈においては、COX-アラキドン酸系の亢進は認めなかったことから、この反応はすべての血管で生じているものではないことが判明し、骨髄内固有の反応である可能性も示唆されている。さらにこの COX-アラキドン酸系の亢進はインドメタシンおよび選択的 COX-2 阻害剤である 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⁴⁾。

我々の標本は生体反応性を保っていたとはいえ、摘

出標本での研究(ex vivo)であった。我々は ION の病態解明のためには、より生体に近い形での骨髄内循環の観察が重要と考えられる。今回、蛍光物質を用いることにより in vivo で家兎骨髄内微小循環系を観察可能なシステムを確立出来た。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、骨髄内循環系の変化を捉えることが出来なかった。その原因としては、実験標本の準備段階での個体差や観察操作の微細な誤差の存在などが考えられ、定量的評価には標本改良の必要があると考えた。

ステロイド投与により骨髄内循環がどのような変化を受けているのか、より生体に近い状態で観察可能なモデルの確立を目指している。現在行っている骨髄圧を指標とした観察系は定量評価可能なモデルであり、今後このモデルを用いてステロイド剤投与での骨髄内循環の変化を捉えていく方針である。また、酸化ストレスなど班研究で明らかになりつつある現象に即したデータの蓄積を試みる予定である。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となり、これまでとは異なる観点からの骨壊死の病態解明を行っていく予定である。また、新たな知見が得られる可能性があると考えている。

5. 文献

- 1) 比佐健二ほか: 血管内皮細胞における TNF- α 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 α 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.

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

家兎大腿骨における血行動態依存性骨髄内圧調節の検討

—動脈圧及び静脈圧の影響—

小平博之、堀内博志、小林千益、天正恵治
齋藤直人

(信州大学医学部運動機能学講座)
(信州大学医学部保健学科)

我々はこれまで、血管内皮細胞の反応性および骨髄内微小血管の血管運動性に注目して研究を行ってきた。現在我々は、骨にシールドされた環境が骨髄と脳に特徴的であることに注目し、骨髄内血流の研究を進めてきた。しかし骨髄内血流を再現性よく定量的に評価することにはいまだ成功しておらず、今回血流を評価する指標として骨髄圧に注目し、体血圧を上昇させることと、骨髄外で静脈の出口をふさぎ、静脈圧を上昇させることによって、骨髄内環境がどのように変化するか検討する実験を行った。その結果、動脈、静脈圧を上昇させた際の骨髄内圧の反応が明らかに異なっており、圧の上昇の程度で見ると、静脈圧の上昇の影響が強いと考えられた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症に関してはいまだに病態が不明であり、解明すべき点がいくつか存在している。そのひとつに同じ大量ステロイド投与を行った場合でもIONになる人とならない人がいることから、骨壊死発生の素因が示唆される。これに関しては本学会議を中心として遺伝子解析が行われ、解明が進んでいる。また、ステロイド全身投与においてなぜ骨だけが壊死に至るのかという疑問もいまだ存在している。我々はこれまで、血管内皮細胞の反応性および骨髄内微小血管の血管運動性に注目して研究を行ってきた。現在我々が注目しているのは、骨髄の解剖学的特徴である。硬い皮質骨に囲まれた環境は、骨髄および脳に特徴的な特殊な環境と考えられる。

脳の局所循環においては Monro-Kellie の法則により脳内の総容積は一定に保たれている。例えば血管が拡張すれば血液容積が増すため、これに対抗して脳脊髄圧が上昇し血管を外側から圧迫し血管を収縮させている。つまりは頭蓋内の血管容積の増減、すなわち頭蓋内循環の変化と脳内圧は密接な関係があることが分かっている。我々は脳の局所循環と同様に、骨髄内循環も骨髄内圧と密接な関係があると考えた。

我々は図1に示す仮説を元に骨髄内血流の研究

を進めてきた。しかし骨髄内血流を再現性よく定量的に評価することにはいまだ成功しておらず、今回血流を評価する指標として骨髄圧に注目した。つまり、体血圧を上昇させることと、骨髄外で静脈の出口をふさぎ、静脈圧を上昇させることによって、骨髄内環境がどのように変化するか検討する実験を開始した。

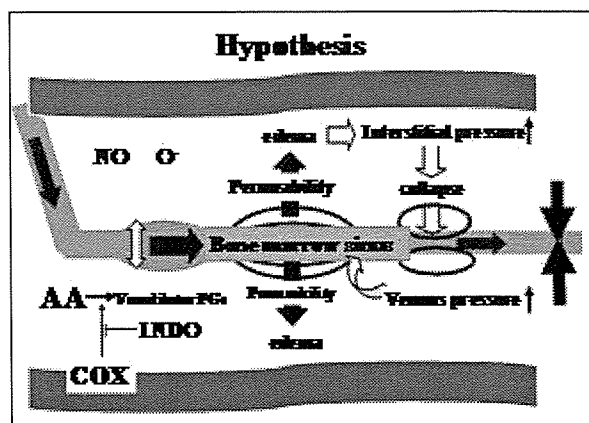


図1:

2. 研究方法

日本白色家兎、オス、3.0kgを使用。麻酔は全身麻酔。右頸動脈、左大腿静脈、右大腿骨での圧を3チャンネルで同時計測できるポリグラフシステムを用い計測を行った。NE3 μ g/kg を耳静脈から投与し動脈圧を上昇させ、また腹部圧迫によって下大静脈を閉

塞させることで下肢静脈圧を上昇させ、このときの家兔大腿骨髄圧の変化を調べた。

骨髄圧の計測方法だが、右大腿を外側切開し、筋間を分け、大腿骨外側骨皮質を露出。1.5mm エアードリルで開窓を行い、ここに 4Fr アンギオカテーテルを髄腔内に挿入し、周囲をボーンワックスでシールドしたのち、切開した筋膜を縫合。アンギオカテーテルをポリグラフシステムに接続し、骨髄圧を測定した。その他の圧センサーでも骨髄圧の測定を試みたが、この方法による再現性が優れていたため、現在この方法で研究を行っている。

カテーテル挿入による骨髄圧測定位置は大腿骨骨幹部中央部とした。この方法により再現性よく家兔大腿骨髄圧が測定できることを確認した。(図 2)

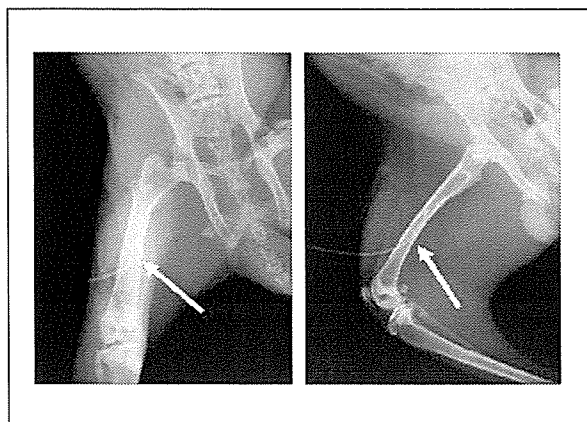


図 2: アンギオカテーテル挿入後の家兔大腿骨 X 線

3. 研究結果

代表的な圧波形を示す。NE $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与を行うと、NE 投与と同時に動脈圧(収縮期圧)は 110 から 230mmHg まで上昇した。また静脈圧もこれに同期するように 5~10mmHg に軽度の上昇を観察した。また、骨髄圧は NE 投与直後に軽度上昇、その後 2 分ほどで 75mmHg までピークの上昇を認め、その後ゆっくりと戻っていった。すべての家兔で同様のパターンを観察した。(図 3)

下大静脈圧迫では下肢静脈圧は 5~18mmHg に急峻な上昇を認め、これに伴い骨髄圧も 50~85mmHg 上昇を認めた。動脈圧は軽度の上昇を認めるのみであった。下大静脈の圧迫においても全ての家兔で同様のパターンを示した。(図 4)

今回の結果では動脈、静脈圧を上昇させた際の骨髄内圧の反応が明らかに異なっていた。圧の上昇の程度で見ると、静脈圧の上昇の影響が強いと考えられた。

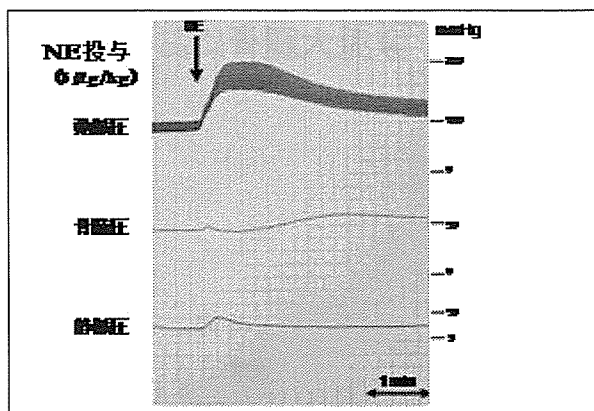


図 3: NE 投与時の動脈圧、静脈圧、骨髄圧の変化

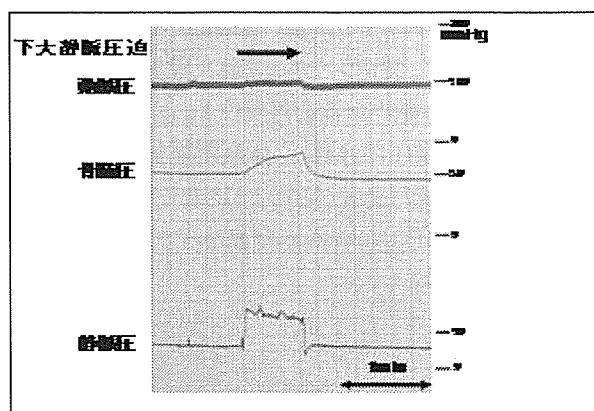


図 4: 下大静脈圧迫時の動脈圧、静脈圧、骨髄圧の変化

4. 考察

今後の課題としては、血流量測定:動脈圧および静脈圧の上昇に際し骨髄内循環がどのように変化しているかを、血流計などを用いて計測する計画である。また、ステロイド投与家兔と非投与家兔での比較検討を行うことで、ステロイド剤の影響を調査する計画である。さらに、家兔での虚血再灌流モデルを作成し、骨髄内圧の変化および血管反応性の検討を行う予定である。

5. 研究発表

なし

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

走査型電子顕微鏡を用いたステロイド投与家兔大腿骨髄の観察：

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静脈内において大小様々な脂肪滴および脂肪塞栓を捉えることができた。今回、これらの知見を総括し報告する。

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。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 の雌性日本白色家兔を対象とした。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では骨髄動静脈を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)⁹⁾。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%グルタルアルデヒド-1%リン酸緩衝液で固定後、pore

size 8 μ m の millipore filter を用いて濾過した。この濾過した filter 自体を 1%オスミウム酸-リン酸緩衝液で固定後、一連の操作を経て SEM で観察した⁹⁾。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、エポン樹脂に包埋した。これを 0.5 μ m に薄切し、1% トルイジ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ン樹脂包埋試料は、ウルトラミクロームで 60-80 nm に薄切して透過型電子顕微鏡で観察した。

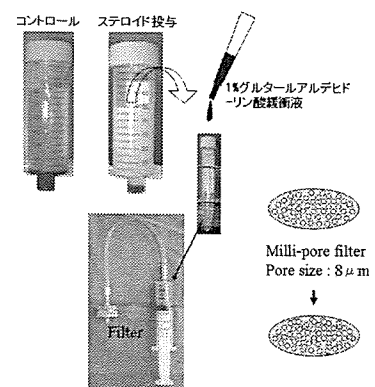


図1 フィルターを通した大動脈血清の観察

3. 研究結果

ステロイド投与家兔の骨髄細類洞内において直径 10~50 μ 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)。

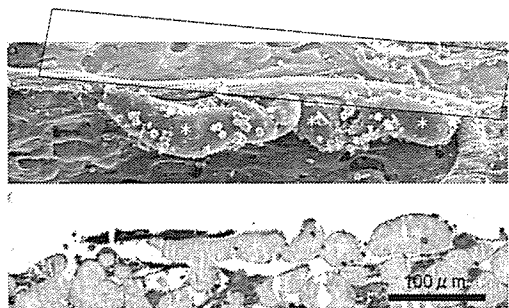


図2 SEM像と光顕像の対比
(* : 脂肪滴)

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つた。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)。

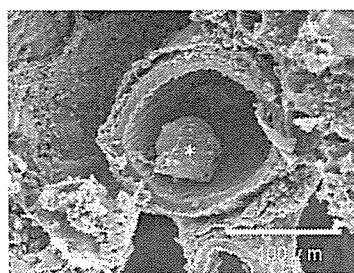


図3 ステロイド投与後14日目の細動脈内脂肪滴(*)

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 118-135mm²、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 日目でも 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つた(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 ²)	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つ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³⁾。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⁴⁾、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⁵⁾、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つたために生じたと考えている。

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。ステロイド投与後8日目では直径 10 μm 程度の細動脈が、14 日目には直径 50 μm 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

- 1) Fukui K et al. Glucocorticoid induces micro-fat embolism in the rabbit: A scanning electron microscopic study. Orthopaedic Research 24(4) : 675-683,2006.
- 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:ステロイド投与家兔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.

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。組織の酸化傷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での DNA の酸化傷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

病理組織学および、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

に骨内造血細胞が強く酸化障害を受けていた。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

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^(1,2)。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

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⁽³⁾。

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個体は認めず、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⁽⁴⁾。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。

sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. Biochem Pharmacol. 1984; 33: 2989-94.

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.45(2006).

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, Irisa 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

日本白色家兎に対する酸化ストレス誘発剤を用いた骨壊死誘発

三秋恒平、兼氏 歩、市堰 徹、杉森端三、北村憲司、福井清数、松本忠美
(金沢医科大学 整形外科)

当科ではラットに酸化ストレス剤を投与することによって骨壊死が発生することを報告した。今回我々は同様に酸化ストレス誘発剤を投与することによって日本白色家兎に骨壊死が発生するかどうかを検討した。10羽で検討を行い、現在結果が出ているのは8羽であるが、3羽に骨壊死を認め、発生部位はステロイド性骨壊死の好発部位であった。また10羽全羽に高脂血症は呈していなかった。酸化ストレスが骨壊死発生に大きな関与を及ぼしていると考えた。

1. 研究目的

家兎大腿骨の血管内皮増殖因子(VEGF)やVEGF-mRNAの発現より虚血発作は、ステロイド投与後3日前後で生じることが報告されており¹⁾、また生体内酸化ストレスも、ステロイド投与後3~5日で大腿骨内で発生することが報告されている²⁾。我々はステロイド投与家兎に抗酸化剤である還元型グルタチオン(以下GSH)を投与することによって骨壊死発生が有意に抑制できることを報告した²⁻³⁾。また逆に、ラットに酸化ストレス誘発剤を投与することによって大腿骨頭に壊死を作製することに成功した⁴⁾。以上のことから酸化ストレスが骨壊死発生の原因である可能性が高いと考えてきた。

そこで、これまでステロイド性骨壊死モデルで使用してきた家兎においても酸化ストレス誘発剤を投与することで骨壊死が発生するか、またステロイド性骨壊死と同部位に発生するかを検討した。

2. 研究方法

体重約3.5kgの雌性日本白色家兎に酸化ストレス誘発剤であるButhionine-Sulfoximine(以下、BSO)500mg/kgを14日間連日静脈投与した10羽をBSO群、コントロールとして生食を14日間連日静脈投与した10羽をCTR群とした。投与開始前、投与開始5日目、14日目に採血を行い、14日目に犠牲死させ両側の大腿骨を摘出した。

病理組織学的検討としてH-E染色標本にて大腿骨近位骨幹部における骨壊死発生の有無について

検討した。骨壊死の定義は、病理組織学的定義に基づき判定した⁵⁾。血液生化学的検査は、抗酸化の指標として還元型グルタチオン(以下GSH)を、脂質系の指標として総コレステロール(以下T-cho)、トリグリセライド(以下TG)を測定した。

本研究のプロトコールは、金沢医科大学動物実験の指針に基づいて行った。

3. 研究結果

CTR群では、10羽全例で骨壊死を認めなかった。BSO群は、10羽中現在結果が出ているのは8羽であるが、8羽中3羽にステロイド性骨壊死の好発部位である大腿骨近位骨幹部に骨壊死を認めた(図1)。

採血結果に関して、GSHはBSO群において5日目の値は注射前の値と比較して著明に低下しており、14日目の値は若干回復していた。これはラットで行った壊死誘発実験⁴⁾とほぼ同様な結果であり、また両群間で統計学的に有意差を認めた($p < 0.05$)(図2)。T-choとTGに関しては、ともに値の上昇を認めず、また両群間で統計学的に有意差はなく(図3、図4)脂質代謝異常は生じていないと考えられた。

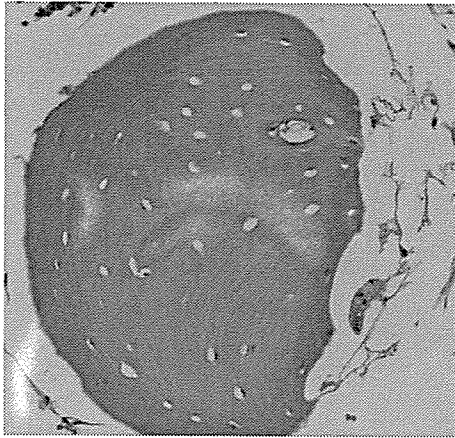


図 1:BSO 群

Empty lacunae を認める

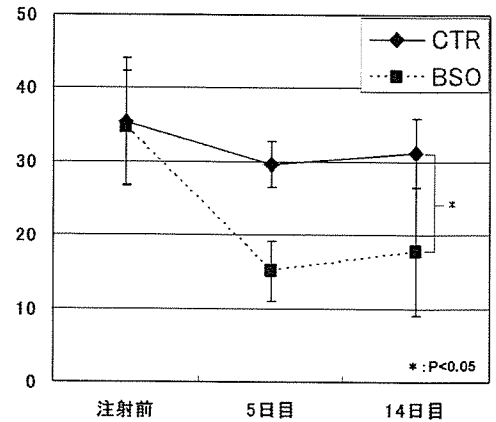


図 2:GSH

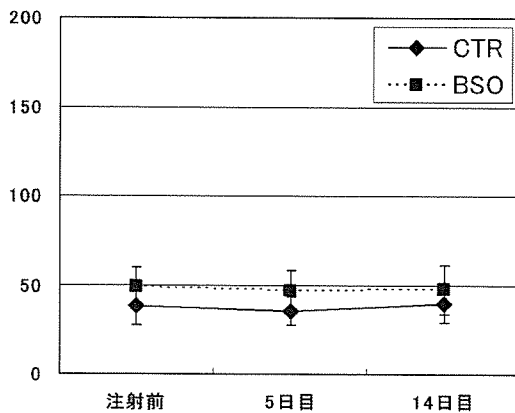


図 3:T-cho

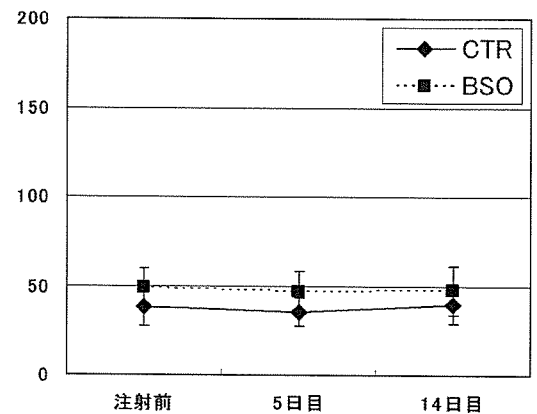


図 4: TG

4. 考察

ステロイド投与家兎で大腿骨の虚血発作は投与後 3~5 日と早期に生じている¹⁾。これまでの研究で、脂肪塞栓は 8~14 日後に⁶⁾、静脈還流障害は 4 週後に生じた報告があるが⁷⁾、ステロイド投与後 3~5 日で虚血発作が生じていることを考慮すると、これらの説は壊死の原因ではなく壊死の結果生じた現象であったと考えられる。また当科では、抗凝固剤の投与で骨壊死を抑制できなかったことを報告しており⁸⁾、壊死の原因としてこれらの説は考えにくい。

これまでの当科の研究においてステロイド投与家兎は、ステロイド投与後 3~5 日に酸化ストレスが発生していたこと、抗酸化剤投与で壊死を有意に抑制したことより酸化ストレスが壊死発生に関与すると考えた。

また、ステロイド以外に壊死を誘発する実験を行い、酸化ストレス誘発剤の投与によりラットのみでなく今回家兎でも 3 羽、ステロイド性骨壊死と同部位に骨壊死

を誘発した。また、いずれの動物も GSH は有意な低下を示したものの、T-cho、TG は高値を示さなかったことより、酸化ストレスが脂質代謝系を介さず直接壊死発生の原因である可能性が非常に高いと考えた。

5. 結論

酸化ストレス誘発剤投与の家兎 8 羽中 3 羽に骨壊死を認め、骨壊死発生部位はステロイド性骨壊死と同部位であった。生体内酸化ストレスが骨壊死発生の重要な原因であると考えた。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

三秋恒平、兼氏 歩、市堰 徹、北村憲司、杉森端三、福井清数、松本忠美：日本白色家兎に対する酸化ストレス誘発剤を用いた骨壊死誘発、