

## 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) 柳下信一. ステロイド投与家兎骨壊死モデルにおける骨内の血管内皮増殖因子の発現について. 金沢大学十全医学会雑誌 115:10-20, 2006
- 2) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, Katsuda S. Oxidative stress and Vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. J Orthop Sci. 9:509-15, 2004
- 3) 北村憲司. 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. 金沢医科大学雑誌 30:245-52, 2005
- 4) Ichiseki T, Ueda Y, Katsuda S, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. Rheumatology(Oxford). 45:287-90, 2006
- 5) Yamamoto T, Iriya T, Sugioka T, Sueishi K. Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissue: Corticosteroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. Arthritis Rheum. 40:2055-64, 1997
- 6) Fukui K, Kominami R, Shinohara H, Matsumoto T. Glucocorticoid Induces Micro-Fat Embolism in the Rabbits: A Scanning Electron Microscopic Study. J Orthop Res. 24:675-83, 2006
- 7) 西村立也. ステロイド投与家兎における静脈病変 -ステロイド性大腿骨頭症の病因病態に注目して-. 金沢大学十全医学会雑誌 104:121-31, 1995
- 8) 二見智子. ステロイド性骨壊死モデルにおける末梢血流改善薬および抗凝固薬の効果についての検討. 金沢医科大学雑誌 26:186-97, 2001

# 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、杉森端三、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 病理学Ⅱ)

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

ステロイド性大腿骨頭壊死症は厚生労働省の難治性疾患に指定されている疾患であり、その発症機序は現在のところ諸説が報告されているが、未だ明確にされていない<sup>1)~4)</sup>。そのため機序の究明や予防法の確立が重要な課題とされている。

現在、酢酸メチルプレドニゾロン(以下MPSL)20mg/kgを殿筋内に投与した雄性日本白色家兔モデル<sup>9)</sup>と、MPSL4mg/kgを殿筋内に1回投与した雌性日本白色家兔モデル<sup>7)</sup>が再現性の良い骨壊死モデルとして確立されており、これらによる骨壊死の発症機序の究明が期待されている。

近年生体内酸化ストレスは種々の疾患への関与が報告されており<sup>5)~8)</sup>、当科でも、MPSL4mg 投与家兔モデルにおいてステロイド投与後 5 日目に骨内の酸化障害が発生したこと<sup>8)</sup>、グルタチオン(以下 GSH)により骨壊死発生率を有意に抑制したこと<sup>7)</sup>を報告した。この検討では酸化の関与を明らかにするために500mg/kgと大量のGSHを使用し骨壊死と酸化ストレスの関与を示した。

しかしながら臨床応用を考えた場合、GSHの投与量を通常量に相当する5mg/kgに変更し、同モデルにおける検討を加える必要がある。また、近年ステロイド投与量依存的に骨壊死発生率が上昇するとの報告があり、ステロイドパルス量に匹敵する投与量であるMPSLを20mg/kg投与した家兔に対する検討も必要と考えられる。

そこで本研究の目的は、GSHを常用量に相当した容量により先述した2種類の骨壊死モデルにおける

骨壊死抑制効果を検討することである。

## 2. 研究方法

実験1:MPSL4mg 投与群の作成

体重約 3.5kg の雌性日本白色家兔に対し、MPSL4mg/kgを1回のみ殿筋内に筋注した10羽をS4群とした。また同様の処置を施した家兔にステロイド投与同日からGSH 5mg/kgを5日間連続投与した10羽をG4群とした。

実験2:MPSL20mg 投与群の作成

実験1と同様の方法でMPSL20mg/kgを投与した10羽をS20群とし、GSH 5mg/kgを5日間連続投与した10羽をG20群とした。

またステロイドを投与せず同一条件で飼育した対照用家兔5羽をN群とし比較検討した。

各群ともにMPSL投与後14日目に犠牲死とし、各群において下記1)を検討した。

### 1)病理組織学的検討

各群においてHE染色標本作製し光学顕微鏡にて大腿骨近位1/3における骨壊死発生の有無を検討した。骨壊死発生率は各群において用いた家兔数に対する骨壊死を認めた家兔数の割合で算出した。

## 3. 研究結果

実験1:

- (1) S4群では10羽中7羽に骨壊死を認めた。  
G4群では骨壊死を認めた家兔は10羽中0羽で有意な抑制効果を認めた。(P<0.05)

実験2:

- (1) S20 群では 10 羽中 9 羽に骨壊死を認めた。  
一方 G20 群では骨壊死を認めた家兎は 10  
羽中 3 羽であり有意に抑制されていた。  
( $P < 0.05$ )

なお N 群では、5 羽すべてに骨壊死は認めなかつた。

#### 4. 考察

本研究で使用した GSH は生体内において酸化還元状態を制御し恒常性の維持作用を有しており、脂質過酸化を抑制し、組織や血管内皮を保護する因子である。

本研究で 5mg/kg の GSH を投与した G4、G20 群では骨壊死発生率が G4 群で 0%、G20 群で 30%と S4、S20 群と比較して有意な抑制を認めた。これは臨床応用を考慮した投与量でも抗酸化剤である GSH を単独投与により骨壊死の発生が抑制可能であることを示していると考えられる。

これらのことから、臨床における GSH 単剤による予防への応用が十分に期待できることが示された。

しかし一方で G20 群の 30%に骨壊死を認めたことから、ステロイドの投与量依存的に骨壊死発生の抑制が困難になることも予想されるため、今後はさらに GSH の投与量や投与期間を変更した検討を行うことが必要になると考えられる。

#### 5. 結論

常用量の還元型グルタチオンを投与することで骨壊死発生を有意に抑制できた。  
ステロイド投与量により骨壊死の抑制が困難となることが危惧されるため投与量及び投与期間を変更した検討も必要になると考えられる。

#### 6. 研究発表

- 論文発表
- 1) 北村憲司: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(金医大誌 30:245-52 2005)
- 学会発表
- 1) 北村憲司、市堰 徹、兼氏 歩、松本忠美、勝田省吾:ステロイド性骨壊死モデルにおける常用量のグルタチオンによる骨壊死抑制効果の検討、第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会、三重、2005.10.20

#### 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) Fisher D E: The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid-induced avascular necrosis: Clinical and experimental results. Clin Orthop 1978. 130; 68-80
- 2) Wang TY, Wang TY, Avolonitis EG, et al: Systemic necrotizing vasculitis causing bone necrosis. Am J Med 1988. 84:1085-1086
- 3) Saito S, Inoue A, Ono K: Intramedullary haemorrhage as a possible cause of avascular necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Br 1987. 69; 346-351
- 4) Jones J P: Intravascular coagulation and osteonecrosis. Clin Orthop 1992. 277; 41-53
- 5) Chung SS, Ho EC, Lam KS et al: Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. J Am Soc Nephrol. 2003; 14; S233-236
- 6) Hayashi M, Itoh M, Araki S, et al: Oxidative stress and disturbed glutamate transport in hereditary nucleotide repair disorders. J Neuropathol Exp Neurol 2001 60(4) 350-356
- 7) T. Ichiseki, T. Matumoto, M. Nishino et al: Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. J Orthop Sci 2004 9(5) 509-515
- 8) T. Ichiseki, K. Kaneuji, T. Matumoto et al: DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. Rheumatology 2005 44: 456-460
- 9) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K: Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissue. Arthritis Rheum. 1997 Nov 40(11) 2055-2064

# ステロイド性骨壊死モデルにおける性差の検討

西田顕二郎、山本卓明、池村 聡、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 MPSSL) 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、ステロイド性骨壊死モデルにおける性差の影響を検討するため、28 週齢以上の日本白色雄家兎 14 羽、雌家兎 15 羽に MPSSL 20mg/kg の投与を行った。その結果、骨壊死発生率は、雄群は 64%(9/14 羽)であったのに対し、雌群では 27%(4/15 羽) と有意な壊死発生率の低下を認めた ( $P < 0.05$ )。

## 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<sup>(1-7)</sup>。しかし、それらのモデルでの雌雄は様々であり、同一モデルにおける骨壊死発生率の性差に関する報告はされていない。今回、ステロイド単独投与骨壊死モデルにおける性差の検討を行った。

## 2. 研究方法

28 週齢以上の日本白色雄家兎 14 羽、雌家兎 15 羽に MPSSL 20mg/kg を一回右臀筋内に注射した。MPSSL 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。また、MPSSL 筋注投与開始時より週に一回、血液検査を行った。

## 3. 研究結果

骨壊死発生率は、雄群は 64%(9/14 羽)であったのに対し、雌群では 27%(4/15 羽) と有意な壊死発生率の低下を認めた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1)。血液生化学的には、T-chol および HDL-c が、雌群で有意 ( $p < 0.05$ ) な上昇を認めた。また LDL については、雌群で有意 ( $p < 0.05$ ) な低下を認めた (Fig. 2-a, b, c)。骨壊死の病理組織像においては、両群間で明らかな違いは認めなかった (Fig. 3-a, b)。

### 骨壊死発生率

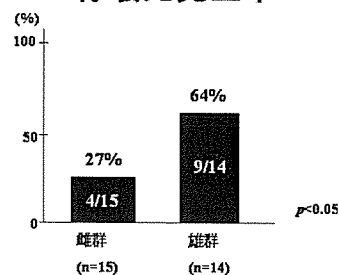


Figure 1

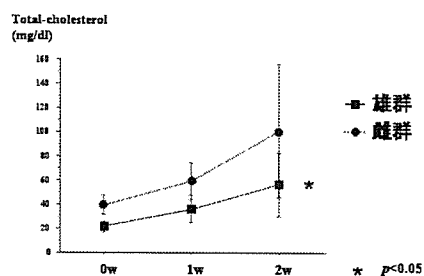


Figure 2-a

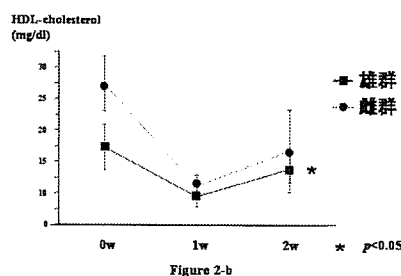
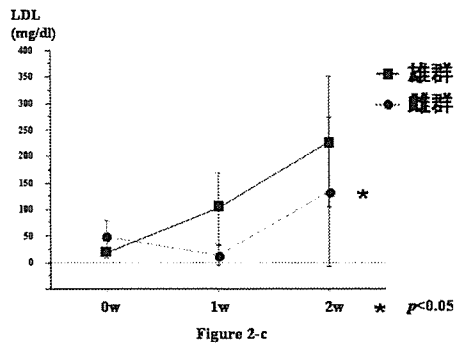
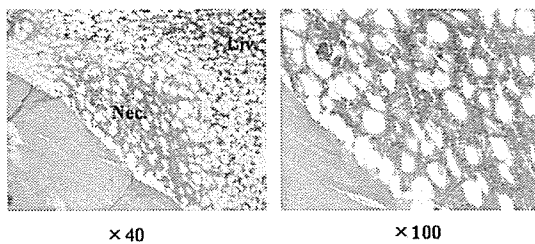


Figure 2-b

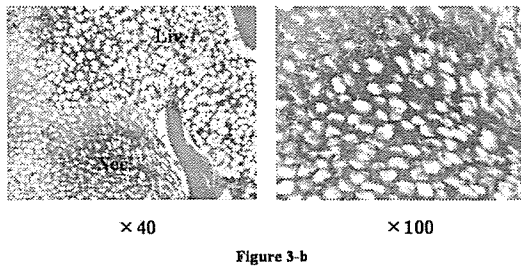
差関連因子についても、今後更なる検討が必要と考えられた。



### 雄群壊死発生家兔病理像



### 雌群壊死発生家兔病理像



## 4. 考察

SLE 患者におけるステロイド治療後の壊死発生に関する報告として、男性では 60%(3/5 人)、女性では 20%(21/106 人)に発生したという報告があり、ステロイド治療後の骨壊死の発生は、より男性に生じやすい可能性がある<sup>(8-9)</sup>。また動脈硬化家兔モデルの性差についての報告の中で、性ホルモンの動脈硬化病変への関与や、血管内皮細胞からの NO 産出に性差が認められることなどが報告されている<sup>(10-11)</sup>。今回我々の実験では、骨壊死発生に性差を認めたことより、性

## 5. 結論

ステロイド性家兔モデルにおける、骨壊死発生について性差を検討したところ骨壊死発生率は雄群で 64%であったのに対し、雌群では 27%と有意に低下していた。

## 6. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
1) ステロイド性骨壊死モデルにおける性差の検討  
西田 顕二郎、山本 卓明、本村 悟郎、神宮司 誠也、岩本 幸英：第 33 回 日本股関節学会、東京、2006.10.27

## 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, Jinguishi 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) 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
- 9) 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
- 10) Pernille H, Heidi L. A, Gry A, Steen S. Gender  
gap in aortic cholesterol accumulation in  
cholesterol-clamped Rabbits. *Circulation.*  
98(24):2731-7,1998
- 11) Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G.  
Basal release of nitric oxide from aortic rings is  
greater in female rabbits than in male rabbits:  
implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad  
Sci U S A.* 89(23):11259-63,1992

# 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—

本村悟朗、山本卓明、宮西圭太、西田顕二郎、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、パルス療法に相当する大量ステロイド(メチルプレドニゾロン: MP SL 20mg/kg)投与で、再現性良く約7割に骨壊死が発生するが、その一方で約3割には骨壊死は発生していない。今回、ステロイド投与量を増やし40mg/kgとすることによる骨壊死発生を検討した。その結果、96%(23/24羽)に骨壊死発生を認めた。

### 1. 研究目的

ステロイド投与量は骨壊死発生における危険因子の一つである<sup>(1)</sup>。ステロイド性骨壊死動物モデルにおいては、パルス療法に相当する大量ステロイド(メチルプレドニゾロン 20mg/kg)投与で、再現性良く約7割に骨壊死が発生するが、その一方で約3割には骨壊死は発生していない<sup>(2-4)</sup>。

本研究では、動物モデルを用いて、ステロイド投与量を増量することによる骨壊死発生率の変化を検討した。

### 2. 研究方法

成熟日本白色雄家兔44羽を用いた。24羽に対してはメチルプレドニゾロン(MP SL)40mg/kgを、20羽に対してはMP SL 20mg/kgを、それぞれ一回のみ右臀筋内に注射した。両群ともMP SL筋注後4週時に犠牲死とした。

骨壊死判定は、両大腿骨及び両上腕骨の近位1/3及び遠位部の(計8部位)のHE染色標本を用いて病理組織学的に検索した<sup>(2)</sup>。

骨壊死数は、骨壊死発生家兔1羽あたりの骨壊死発生数(最大8)とした。

骨壊死の面積は、近位大腿骨部HE標本における骨壊死面積(mm<sup>2</sup>)をNIH image softwareを用いて計測した。

### 3. 研究結果

#### 骨壊死発生率

MP SL 20mg/kg投与群では、20羽中14に骨壊死発生を認め、発生率は70%であった。一方、MP SL 40mg/kg投与群では、24羽中23羽に骨壊死発生を認

め、発生率は96%であった。両群間の骨壊死発生率は統計学的有意差を認めた( $p < 0.05$ )。

#### 骨壊死の病理組織像 (Figure 1)

両群とも、骨髄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いた。

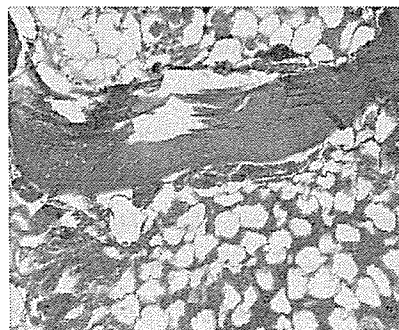


Figure 1. 周囲の骨髄造血細胞壊死を伴い骨梁内骨細胞がempty lacnaeを呈している。

#### 骨壊死数及び骨壊死面積

MP SL 40mg/kg投与群では、骨壊死数が $2.4 \pm 1.2$ であり、MP SL 20mg/kg投与群( $1.3 \pm 0.5$ )に比し有意に多発していた( $p < 0.005$ )。骨壊死面積は両群間に有意差を認めなかった。

### 4. 考察

これまで我々は、MP SL 5mg/kg投与で、約4割に骨壊死が発生することを報告した<sup>(3)</sup>。これより、ステロイド感受性の高い家兔においては比較的少量のステロイド投与で骨壊死が発生すると考えられる。一方、MP SL

40mg/kg 投与により96%に骨壊死が発生したことから、ステロイド感受性の低い家兎においても、投与量を増量することにより骨壊死が発生する可能性があると考えられた。

ステロイド感受性と骨壊死の関連について、浅野らはステロイド輸送蛋白の遺伝子多型と骨壊死発生の関連を<sup>6)</sup>、政田らはステロイド代謝酵素活性と骨壊死発生の関連をそれぞれ報告している。今後は、これらステロイド感受性に影響を及ぼすと考えられる因子とステロイド投与量との関連を検討していきたい。

## 5. 結論

家兎において、メチルプレドニゾロン 40mg/kg 投与による骨壊死発生率は 96%であった。

## 6. 参考文献

- 1) Felson DT, Anderson JJ. Across-study evaluation of association between steroid dose and bolus steroids and avascular necrosis of bone. *Lancet*. 1987;1:902-6.
- 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* 1997;40:2055-64.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, Inoue S, Okamoto M, Sugioka N, Nishino H, Tanaka T, Hirota Y, Kubo T. ABCB1 C3435T and G2677T/A polymorphism decreased the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after kidney transplantation. *Pharmacogenetics*. 2003;13:675-82.
- 6) 政田俊明、金城養典、大橋弘嗣、高岡邦夫. 家兎 CYP3A6 酵素活性から見たステロイド誘発特発性

大腿骨頭壊死症(ION)の発生素因についての検討. 厚生省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成 14-15 年度総合研究報告書 2004:32-35.

## 7. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) 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.
  - 2) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Sueishi K, Iwamoto Y. Bone marrow fat-cell enlargement in early steroid-induced osteonecrosis - A histomorphometric study of autopsy cases-. *Pathol Res Pract*. In press.
2. 学会発表
  - 1) 本村悟朗、山本卓明、宮西圭太、神宮司誠也、岩本幸英;ステロイド性骨壊死の予防へ向けた基礎的研究, 第 19 回日本整形外科基礎学術集会 (2004.10.21-22 東京)
  - 2) 本村悟朗、山本卓明、宮西圭太、西田顕二郎、神宮司誠也、岩本幸英;ステロイド投与量が骨壊死発生前に及ぼす影響 -動物モデルでの検討-, 第 31 回日本股関節学会 (2004.10.15-16 長崎)

## 8. 知的所有権の取得状況

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



# 異なる種類のステロイド剤が骨壊死発生に及ぼす影響

宮西圭太、山本卓明、入佐隆彦、本村悟朗、神宮司誠也、岩本幸英 (九州大学整形外科)  
居石克夫 (九州大学大学院医学研究院病理病態学)

ステロイド性大腿骨頭壊死(以下、骨壊死)は、基礎疾患の治療に用いたステロイド剤の副作用として生じる疾患である。現在、基礎疾患の病態に応じて、さまざまな種類のステロイド剤が使用されている。今回我々は、ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルを用いて、3種類のステロイドの骨壊死発生への影響を検討した。

## 1. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死(以下、骨壊死)は、基礎疾患の治療に用いたステロイド剤の副作用として生じる疾患である。現在、基礎疾患の病態に応じて、さまざまな種類のステロイド剤が使用されているが、それらの骨壊死への影響を検討した文献は少ない。今回我々は、ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルを用いて、3種類のステロイドの骨壊死発生への影響を検討したので報告する。

## 2. 研究方法

ステロイド単独投与家兎骨壊死モデル<sup>1)</sup>を用いた。実験は九州大学動物実験倫理委員会の承認を受け、そのガイドラインに沿って行った。39羽の日本白色家兎に対し、25mg/kg プレドニゾロン(PSL:コハク酸プレドニゾロンナトリウム:13羽)、20mg/kg メチルプレドニゾロン(MPSL:酢酸メチルプレドニゾロン:13羽)、20mg/kg トリアムシノロン(TR:酢酸トリアムシノロン:13羽)をそれぞれ1回筋肉内注射した。4週間後に大腿骨と上腕骨を採取し、組織学的に骨壊死の有無を検討した。ステロイド投与前後で血液データの解析を行った。

## 3. 研究結果

骨壊死病変では組織学的に骨髄や骨梁の壊死所見を認めた。MPSL投与家兎では、他の2剤に比べて繊維肉芽組織などの修復反応が少ない傾向があった。MPSL投与群での大腿骨近位における骨壊死発生は、他の2剤より有意に高率であった(表1:p<0.01)。上腕骨近位では、MPSL投与家兎の骨壊死発生は、TRに比べて有意に高かった(表2:p<0.05)。血中コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸はステロイド投与後1~2週を中心にMPS

L投与家兎で、他の2剤より有意に高値を示した(p<0.05)。

表1. 家兎大腿骨における骨壊死発生<sup>a)</sup>

ステロイド	大腿骨数	骨壊死あり <sup>b)</sup>	
		近位	遠位
PSL	26	3 (12%)	3 (12%)
MPSL	26	17 (65%)*	3 (31%)
TR	26	4 (15%)	2 (8%)

PSL=prednisolone sodium succinate; MPSL=methylprednisolone acetate; TR=triamcinolone acetonide  
\* p<0.01 vs. PSL and TR

表2. 家兎上腕骨における骨壊死発生

ステロイド	上腕骨数	骨壊死あり <sup>b)</sup>	
		近位	遠位
PSL	26	1 (4%)	0 (0%)
MPSL	26	6 (23%)*	0 (0%)
TR	26	0 (0%)	0 (0%)

PSL=prednisolone sodium succinate; MPSL=methylprednisolone acetate; TR=triamcinolone acetonide  
\* p<0.05 vs. TR

## 4. 考察

異なるステロイド剤の骨壊死発生に及ぼす影響は、基礎疾患や投与方法、投与量の違いにより臨床での評価が困難であることが多い。本研究では、3剤のステロイドのグルココルチコイド活性<sup>2)</sup>、ステロイドの半減期(12~36時間)<sup>2)</sup>、そして投与方法をそろえることで、正確なステロイド剤の骨壊死発生への影響検討を試みた。

MPSLは、高用量(1mg/kg以上)もしくはステロイドパルス療法で用いられる薬剤であり<sup>3)</sup>、骨壊死発生への関与が報告されている<sup>4, 5)</sup>。一方、TRは整形外科領域では関節内注射などの局所治療で用いられることが多いが、単独

全身投与での骨壊死発生例は、我々が凌駕しえた範囲では確認できなかった。今回の実験結果は、これらのMPSLとTRの臨床での発生頻度にはほぼ矛盾しなかった。一方、PSLは臨床では低～中用量で用いられ、骨壊死発生例を多く認めるのに対して、本実験では骨壊死発生率は低かった。この原因として、動物種による相違や、基礎疾患、投与方法などのバイアスの関与が考えられる。臨床においてステロイド剤の種類により骨壊死発生率が違うことが証明されれば、リスクの高い患者に対して適切なステロイド剤を選択することが新たな予防法の一つとなりうるかもしれない。

今回、MPSLは他の2剤と比べて高率に骨壊死を発生し、脂質代謝に対する影響も大きかった。MPSLは構造的にステロイド核の6 $\alpha$ 位にメチル基がついているのが特異的である。このコンポーネントは、特定の細胞でcytolysisを誘発することが知られており<sup>6)</sup>、今回の結果の構造的な原因の1つとして考慮する必要がある。そのほかアルブミンや corticosteroid-binding globulin などのステロイド結合蛋白やステロイドの体内吸収率の違いも原因として考えられ、これらの検討が今後の課題と思われる。

## 5. 結論

家兎において、メチルプレドニゾン 40mg/kg 投与による骨壊死発生率は96%であった。

## 6. 知的所有権の取得状況

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

## 7. 参考文献

- 1) Yamamoto T, Iriya 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.
- 2) USPDI. Corticosteroids - Glucocorticoid effects (systemic). In: Drug information for the health care professional. Greenwood Village: Micromedex Thomson Healthcare, 2002:1002-27.3) Badsha H, Edwards CJ. Intravenous pulses of methylprednisolone for systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis*

*Rheum* 2003; 32:370-7.

- 4) Oinuma K, Harada Y, Nawata Y *et al.* Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:1145-8.
- 5) Nagasawa K, Ishii Y, Mayumi T *et al.* Avascular necrosis of bone in systemic lupus erythematosus: possible role of haemostatic abnormalities. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:672-6.
- 6) Waddell AW, Currie AR. A comparison of the effects of prednisolone and methyl- prednisolone on human lymphoblastoid cells. *Biochem J* 1977; 168:323-4.

# ピタバスタチンによるステロイド性骨壊死予防効果

西田顕二郎、山本卓明、本村悟郎、神宮司誠也、岩本幸英（九州大学整形外科）

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるピタバスタチンは、第3世代のスタチン系製剤で、強力な総コレステロール低下作用および HDL-コレステロール上昇作用を有しており、近年、主に動脈硬化性疾患治療の分野で注目されている。今回、ステロイド性骨壊死モデルを用いて、ピタバスタチンの骨壊死予防効果を検討した結果コントロール群では骨壊死発生率が70%であったのに対し、ピタバスタチン投与群では37%であった。

## 1. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序については、凝固異常<sup>(1)</sup>、脂質代謝異常<sup>(2)</sup>、酸化ストレス<sup>(3)</sup>などの関与が報告されている。抗高脂血症剤投与によるステロイド性骨壊死予防効果について、ステロイド投与患者にスタチンを投与することで骨壊死発生が減少したという報告<sup>(4)</sup>や、ステロイド骨壊死モデルにプロブコールを投与することで骨壊死発生率が減少したという報告<sup>(5)</sup>がされている。HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるピタバスタチンは、第3世代のスタチン系製剤で、強力な脂質低下作用を有しており、近年、主に動脈硬化性疾患治療の分野で注目されている<sup>(6)</sup>。今回、ステロイド性骨壊死モデルにおけるピタバスタチンの骨壊死予防効果について検討した。

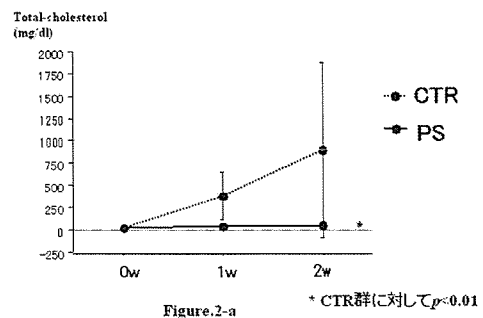
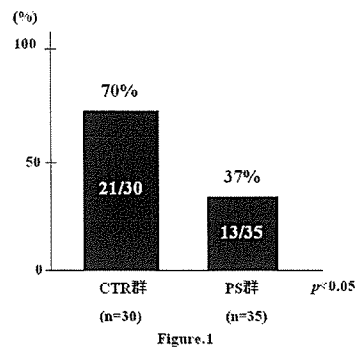
## 2. 研究方法

28週齢以上の日本白色家兔65羽に、メチルプレドニゾロン(以下 MPSSL) 20mg/kg を一回右臀筋内に注射した。これらを、ステロイド筋注前2週より筋注後2週までピタバスタチン0.7mg/kgを毎日静脈注射した群(PS群、n=35羽)と、ステロイドのみ投与した群(CTR群、n=30羽)の2群に分けた。各群をMPSSL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<sup>(7)</sup>。週に一回、AM8～9時に採血を行い、各脂質系の検査を行った。

## 3. 研究結果

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

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



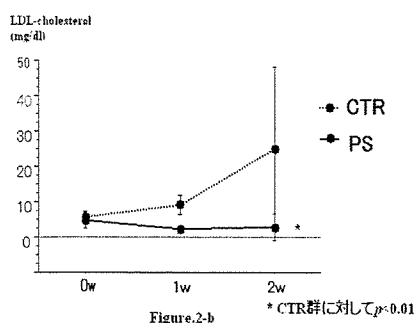


Figure.2-b

#### 4. 考察

抗高脂血症剤である、プロブコール投与における同様の実験の結果、骨壊死発生率は37%であり、ピタバスタチン投与群とほぼ同等の結果であった。LDL-Cについては、前回同様、プロブコール群、ピタバスタチン群ともにコントロール群より有意な低下を認めた。さらにピタバスタチン群では、プロブコール群と比してさらに有意な低下を認めた(Fig.3)。

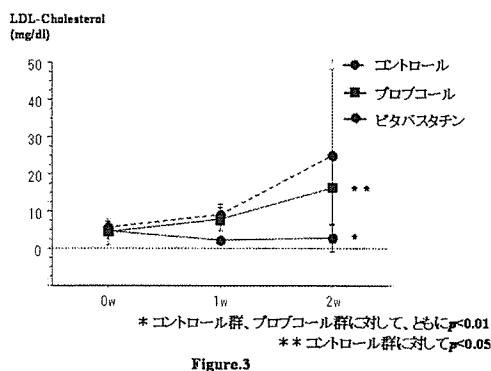


Figure.3

しかしながら、骨壊死発生率に、両群間の差を認めていないことを考えると、単純に脂質を低下させることが、必ずしも骨壊死発生減少には関連しないのではないかと考えられる。今後、骨壊死との相関が考えられるその他の因子について検討を行っていく予定である。

#### 5. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
- 1) ピタバスタチンによるステロイド性骨壊死予防効果  
西田 顕二郎、山本 卓明、本村 悟郎、神宮司 誠也、岩本 幸英：第20回 日本整形外科学会 基礎学術集会、三重、2005.4.10-12、第32回 日本股関節学会、新潟、2005.11.7

- 2) Effects of a lipid-lowering agent (pitavastatin) on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. Nishida, K., Yamamoto, T., Motomura, G., Jingushi, S., Iwamoto, Y. The 52nd Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Chicago, U.S.A. (2006)

#### 6. 知的所有権の取得状況

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

#### 7. 参考文献

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

Atherosclerosis. 176(2):255-63,2004

- 7) Yamamoto T, Iriya 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

# ステロイド誘発特発性大腿骨頭壊死症の発生素因についての検討

## —家兔での種々の高脂血症治療薬予防投与とステロイド誘発骨壊死発生との関係—

高岡邦夫、岩切健太郎、金城養典、政田俊明、徳原善雄、岩城啓好

(大阪市立大学大学院医学研究科 整形外科)

小田 裕

(大阪市立大学大学院医学研究科 麻酔・集中治療医学)

骨壊死発生と高脂血症、またステロイド代謝の主要酵素である CYP3A の活性との関与度を明らかにする為に、CYP3A を誘導しない非スタチン系高脂血症治療薬(プロブコール)、CYP3A を誘導しないスタチン系高脂血症治療薬(プラバスタチン)、またはCYP3A誘導作用を有するスタチン系高脂血症治療薬(シンバスタチン)を家兔に予防投与した後、ステロイド剤を大量投与し、その後さらに各薬剤を継続投与し、骨壊死の発生頻度について検索した。その結果、スタチン系高脂血症治療薬投与2群は Control 群とプロブコール群に比し骨壊死頻度は低下した。また、CYP3A 活性誘導作用の無いプラバスタチン群に比し、CYP3A 誘導作用を有するシンバスタチン群では骨壊死頻度が低下した。これらの結果より、骨壊死の発生とスタチンの特異的薬理作用に関連性があること、また骨壊死発生とステロイド代謝酵素活性に更なる関連性があることが示唆された。この事実より、ヒトでのステロイド誘発性特発性大腿骨頭壊死症(以下 ION)の発生予防因子としてスタチンの薬理効果及びステロイド代謝能亢進の可能性があることが示唆された。

### 1. 研究目的

IONに関する従来の研究結果から、ステロイド剤使用により ION が誘発されることは知られている。この ION 発生素因として、様々なメカニズムが推測されており、中でも、ステロイド剤による高脂血症と骨壊死との関連性が指摘されており、スタチン系薬剤(高脂血症治療薬)が骨壊死発生を予防するとの報告<sup>1)</sup>も見られている。また、我々はこれまで、ウサギ骨壊死モデルを用いてステロイド剤代謝酵素である肝 CYP3A 活性と骨壊死発生との負の相関について報告してきた。臨床においても、ION 患者の CYP3A 活性は健常人に比して低いことを明らかにした<sup>2)</sup>。しかし高脂血症、CYP3A 活性それぞれの骨壊死発生への関与度については不明であり、本研究ではこの点について検索し、予防措置を開発することを目的とする。

### 2. 研究方法

日本白色家兔メス(体重 3.5-4kg)を用いてステロイド剤を投与して骨壊死モデルとした<sup>3)</sup>。このモデル動物を 1. Control 群(ステロイド剤単独投与群 n=30)、2.非スタ

チン系で CYP3A に影響を及ぼさないとされている高脂血症治療薬(プロブコール n=15)投与群、3.スタチン系で CYP3A に影響を及ぼさないとされている高脂血症治療薬(プラバスタチン n=15)投与群、4. スタチン系で CYP3A 誘導作用を持つとされている高脂血症治療薬(シンバスタチン n=15)投与群の 4 群に分けた。

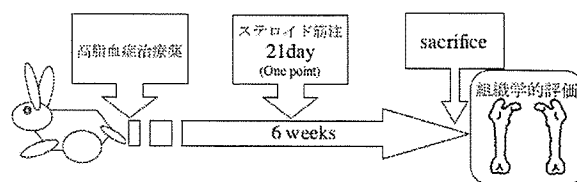


図1. モデル作製

Control 群にはステロイド剤として Methylprednisolone 20mg/kg を右殿筋内に一回筋注投与した。その他、高脂血症治療薬投与3群には、それぞれの薬剤を3週間毎日、経口及び静注投与し、3週目に Methylprednisolone 20mg/kg を右殿筋内に一回筋注投与し、さらにそれぞれの薬剤を3週間継続投与した。各群ともステロイド筋注投与後3週間経過観察した後、犠牲死させ両大腿骨のH-E標本作製し、その病理組織

学的観察を行い、骨壊死の発生頻度を評価した。組織評価法は山本らの骨壊死の定義に従い、骨壊死は骨髓の造血細胞壊死および脂肪細胞壊死を伴うもの、骨梁の骨細胞が empty lacunae または pycnotic nuclei of osteocyte を呈するものとした。

また、それぞれの群において、経時的に血液検査(薬剤投与開始後 0.7.14.21.24.28.31.35.42 日目)を行い脂質系因子 (Triglyceride, T-cholesterol, HDL, LDL, Free Fatty Acid) の測定を行い、高脂血症治療薬投与群 3 群での Control 群に対する脂質系因子の変動を比較した。

また、それぞれの高脂血症治療薬投与前と投与後 3 週目に Midazolam clearance test を行い、CYP3A 活性を測定し<sup>4)</sup>、各薬剤投与前後の CYP3A の値を比較し、CYP3A の誘導の有無を確認した。

### 3. 研究結果

脂質系因子の推移:

TG, T-cho, LDLにおいて、いずれもステロイド投与後 3 週目、すなわち 42 日目には control 群に比し、3 群共に有意差を持って低下していた。また、低下した 3 群間には有意差を認めなかった。

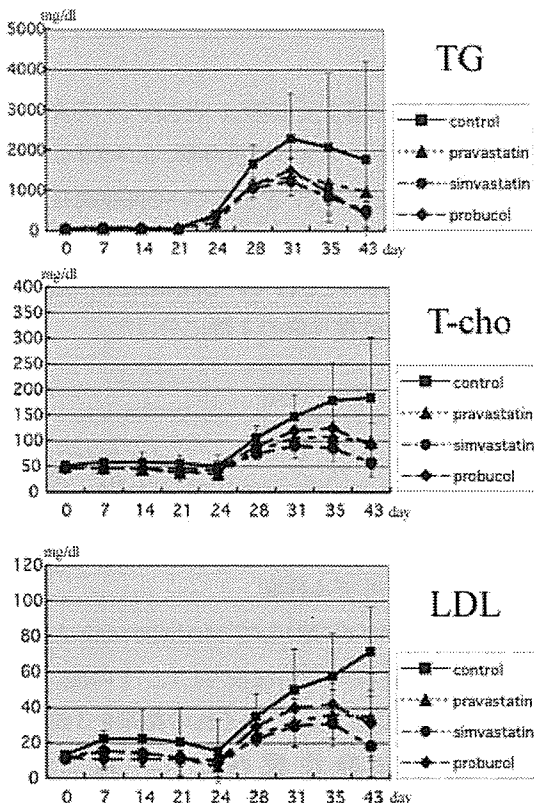


図 2. 脂質系因子の推移

MDZ clearance test による CYP3A 酵素活性測定:

各薬剤投与前後の CYP3A 酵素活性の比は、CYP3A

を誘導するシンバスタチン群でのみ 1.4 倍と有意に上昇していた。(p<0.005)

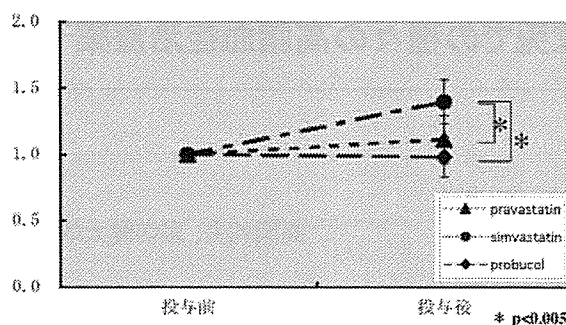


図 3. 高脂血症治療薬による CYP3A 酵素活性の変化

骨壊死発生率:

Control 群は 83%(25/30)、プロブコール群 67%(10/15)、プラバスタチン群 47%(7/15)、シンバスタチン群 13%(2/15)であった。Control 群とプラバスタチン群との間、シンバスタチン群との間で有意差(P<0.05)を認めた。また、CYP3A 活性を誘導するシンバスタチン群は、他の高脂血症治療薬投与群との間で、有意な骨壊死発生数の減少を認めた。

	ION		計	壊死率
	(+)	(-)		
Control 群	25	5	30	83%
Probucol 投与群	10	5	15	67%
Pravastatin 投与群	7	8	15	47%
Simvastatin 投与群	2	13	15	13%

表 1. 4 群での壊死発生頻度

### 4. 考察

ステロイド剤と ION との関連に関する研究は数多くあり、その因果関係が指摘されている。しかし未だ ION の発生機序については明らかではなく、一般的には骨の微小循環に阻血性壊死を起こすことが原因とされている。しかし、ステロイド剤による微小骨循環に与える障害の発生機序については一定の見解は無く、ステロイド剤による高脂血症が引き起こす脂肪塞栓や血液凝固能亢進、骨髓内脂肪増生による骨髓内圧上昇による微小循環障害、血管内皮細胞障害や内皮依存性血管運動障害などが提唱されてきた。このようなステロイド剤の効果が過剰となることで骨壊死のリスクは高くなることは推察され、逆にこのステロイド剤による高脂血症を予防することで骨壊死発生が減少するとの報告もある。しか

し、多量のステロイド投与をしたとしてもそれらの患者すべてにIONが発生するわけではないことも明らかとなっている。これは、ION発生素因にはステロイド剤に対する反応性にかかなりの個体差があることが窺われる。従来からステロイド剤に対する反応性の個体差は、薬物代謝酵素、薬物受容体、薬物輸送蛋白などの活性の個人差の関与が考えられてきた。今回我々は、家兎において、高脂血症治療薬を予防的に投与することにより、ステロイド代謝酵素であるCYP3A活性変動と脂質系因子の変動を調査し、骨壊死発生頻度へのそれぞれの関連性に着目した。

家兎において高脂血症治療薬投与により、脂質系因子であるTG, T-cho, LDL, Free Fatty Acidでは、ステロイド投与後3週目の値はcontrol群に比し有意に抑制されていること、またそれぞれの薬剤による抑制の程度に有意差が無いことを確認した。

また、家兎において高脂血症治療薬投与とCYP3A活性の定量的関係についての報告は少なかったため、実際にそれぞれの高脂血症治療薬投与前後のCYP3A酵素活性を定量化し、シンバスタチンのみで酵素活性が誘導されていることを確認した。

非スタチン系高脂血症治療薬をステロイド投与前に予防投与することにより骨壊死発生頻度はControl群に比し減少する傾向にあった。これはCYP3A活性に関わりなく高脂血症予防による効果の関与と考察される。また、Control群に比し、スタチン系高脂血症治療薬投与群で骨壊死発生頻度は有意に減少した。これについては、CYP3A活性に関わりなくスタチンの特異的薬理作用が示唆された。スタチンの特異的薬理作用には、抗炎症作用、抗血小板作用、血管内皮機能改善作用等のPleiotrophic effect(多面的効果)があるとされている。さらに、CYP3Aを誘導しない高脂血症治療薬のプラバスタチン投与群に比し、CYP3Aを誘導する高脂血症治療薬のシンバスタチン投与群で骨壊死発生は減少した。よって、CYP3A活性誘導が壊死発生抑制に関与することも示唆された。

## 5. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 岩切健太郎、金城養典、政田俊明、岩城啓好、高岡邦夫:家兎での高脂血症治療薬予防投与とステロイド誘発骨壊死発生との相関、第21回日本整形外科

学会基礎学術集会(2006.10.20)長崎

- 2) 岩切健太郎、金城養典、政田俊明、岩城啓好、小林章郎、小田裕、高岡邦夫:高脂血症治療薬はステロイド性骨頭壊死の発生を予防する、第33回日本股関節学会(2006.10.27)品川

## 6. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許の取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 7. 参考文献

- 1) Qui Q, Wang GJ, Su CC, Balian G: Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. Clin Orthop 344: 8-19, 1997
- 2) Kaneshiro Y, Oda Y, Iwakiri K, Takaoka K: Low Hepatic cytochrome P450 3A activity is a risk for corticosteroid-induced osteonecrosis. Clin Pharmacol Ther. 80: 396-402, 2006.
- 3) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K: Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissue : corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum. 40(11): 2055-64. 1997.
- 4) KE Thummel, DD Shen, TD Kunze, WF Trager, PS Hartwell, VA Raisys, CL Marsh, JP McVicar, DM Barr, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe I . In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. J Pharmacol Exp Ther. 271: 549-56. 1994.



# マウス骨壊死モデルの解析

田中 栄  
大熊千晶、懸田健史

(東京大学医学部附属病院 整形外科)  
(順天堂大学医学部 整形外科)

研究要旨:特発性大腿骨頭壊死の分子メカニズムを解明するためには適切な動物モデル、特に遺伝子操作が容易なマウスモデルの作成が有用である。われわれは昨年までの2年間でマウス尾部結紮による新しい骨壊死モデルを作成、組織像を検討し、骨壊死が阻血・再還流障害によるアポトーシス細胞死を起し、その結果としてネクローシス細胞死に至る可能性を報告した。今年はさらに、この阻血・再還流障害によって骨壊死を生じる際に変動する遺伝子について検討を行った。

## 1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死 (Idiopathic Osteonecrosis of the femoral head, ION) は壮年期成人に好発し、その罹患によって股関節が破壊され、QOL が著しく侵される疾患である。その真の原因は明らかではないが、何らかの原因で大腿骨頭部の阻血が生じ、骨細胞および骨髄細胞の壊死が生じるものと考えられている。しかしながら阻血から細胞壊死に至る分子メカニズムは不明なままである。

このような病態を解析するためには適当な動物モデルの開発がきわめて有用である。これまでにウサギを用いたステロイド骨壊死モデルが広く使われており、これによって多くの重要な知見が得られてきた。しかしながら骨壊死のメカニズムをさらに詳細に検討するためには、分子生物学的改変が容易であり、すべてのゲノムが明らかにされているマウスのモデルを作成することは、多くのメリットを有すると考えられる。われわれは昨年までの2年間で本研究班においてマウス尾部結紮・再還流によって結紮遠位部に骨壊死が生じること、さらにその組織像を解析し、時系列に沿って骨細胞がアポトーシス細胞死を生じ、その後にネクローシス細胞死が見られ、さらに新生骨の出現と破骨細胞数の増加がみられることを報告した。本年の研究班ではこの実験系で骨壊死が起こる際に変動のみられる遺伝子について検討した。

## 2. 研究方法

### マウス尾部結紮モデル

6週齢の C57B6 マウスを使用し、尾部を巻きワイヤー

で結紮し、8時間後に結紮を解除する。血流再開後、7日後に結紮部の近位、遠位部の尾椎を採取、骨組織のみを摘出し、冷凍凍結して破砕し、RNA を採取、検討に供した。遺伝子の解析はアポトーシス関連遺伝子プライマーを搭載した PCR array を用いて行った。変動のみられた遺伝子について、real time PCR によって定量化した

## 3. 研究結果

結紮・再還流にて結紮部の近位に比し遠位の骨組織で3倍以上の遺伝子発現上昇を認めたものは p53 と TRAIL-R2/DR5 であった(図1)。

## 4. 考察

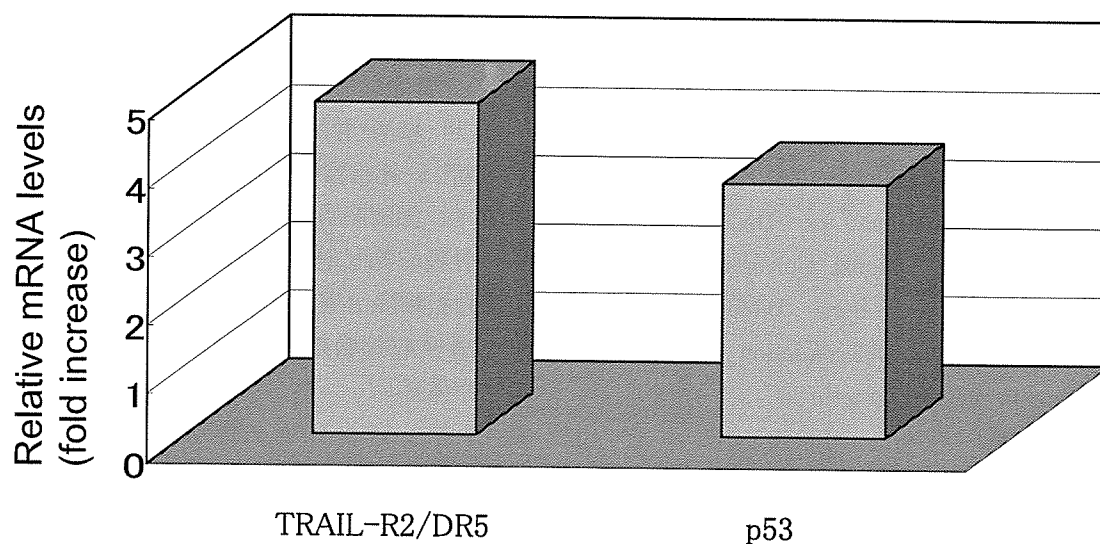
血流の遮断とそれに引き続く再還流による組織障害は ischemia reperfusion injury として脳、肺、腎臓、腸管などさまざまな臓器で報告されている。われわれは、「ION の本体は大腿骨頭部の阻血とその後の再還流による骨・骨髄細胞へのダメージである」との仮説に基づき、尾部結紮再還流による骨壊死動物モデルを作成し、その組織像を検討した。このモデルにおいてはマウスの尾部の8時間結紮し、その後血流を再開するという方法によって、結紮尾部に確実に虚血・再還流を起こすことが可能である。再還流後7日目からアポトーシスに陥った骨細胞の数が増加し、RANKL の発現が誘導された。この時点での遺伝子の変動を検討し、アポトーシス細胞死を強く誘導する p53-TRAIL R2/DR5 のシグナル伝達経路が活性化されている可能性が示された。今後組織

の p53 による免疫染色や p53 ノックアウトマウスでの骨壊死モデルの組織検討を用いることによって、p53 遺伝子の骨壊死への関与を解析し、またこれを実際の臨床例と照らし合わせることによって ION の分子メカニズムに迫ることが可能であると考えられる。

## 5. 結論

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

図1: 結紮・再還流後7日目で近位に比し遠位で発現上昇を認めた遺伝子



## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tanaka S, Takahashi N, Nakamura K, Suda, T. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting RANKL-RANK signaling system. Immunological Review 2005, 108:30-49.
- 2) Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Hikita A, Tanaka S, Yamane S, Suzuki R, Sandell JL, Ochi T. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha induces BMP-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation. J Biol. Chem 2006 Jul 11; [Epub ahead of print]
- 3) Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, Akira S, Paik TH, Jo EK. Protein kinase C zeta plays an essential role for Mycobacterium tuberculosis-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. Cell Microbiol. 2006 Aug 22; [Epub ahead of print]
- 4) Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. Negative Regulation of Osteoclastogenesis by Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand. J Biol. Chem 2006 Oct 3; [Epub ahead of print]
- 5) Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. Bone. 2006 Sep 13; [Epub ahead of print] 9. Tanaka S. Molecular mechanism of life and death of the osteoclast. Int J Oral Biol 2004, 29:121-126.
- 6) Ogata T, Yamamoto S, Nakamura K and Tanaka S. Signaling Axis in Proliferation and Differentiation of Schwann Cell. Mol Neurobiol. 2006, 33:51-62.
- 7) Miyazaki T, Tanaka S, Sanjay A, Baron R. The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. Mod Rheumatol 2006, 16:68-74.

- 8) Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, Kono S, Hoshikawa S, Nakamura M, Ohshima Y, Hikita A, Nakamura K. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. Ann N Y Acad Sci 2006, 1068:180-186.
2. 学会発表
- 1) 1st International conference on osteoimmunology: Interactions of the immune and skeletal systems (2006.5.28-6.2) Crete, Greek, Session I. Transcription factors and signals for the osteoimmune system: Part 1 "Regulation of ectodomain shedding of RANKL"
- 2) 2006 International Symposium of Dental Research Institute, Seoul National University (2006.9.29) Session I : Bone Biology "Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis"
- 3) 3rd IOF ASIA-PACIFIC REGIONAL CONFERENCE ON OSTEOPOROSIS AND 16th ANNUAL MEETING OF THE ANZ BONE & MINERAL SOCIETY (2006.10.22-26) Port Douglas, Australia, "Signals in life and death of the osteoclast"
- 4) 田中 栄、大熊千晶 厚生労働省難治性疾患研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会平成17年度 第2回会議 研究成果報告会(2005.12.3)京都 「マウス骨壊死モデルの解析 第3報」
- 5) 第10回 骨代謝セミナー(2005.12.22)東京 「関節リウマチにおける骨破壊のメカニズムと治療戦略」
- 6) 第6回 熊本骨折セミナー学術講演会(2006.1.7)熊本 特別講演④「新しい骨粗鬆症治療薬とその作用機序」
- 7) 第9回 東北リウマチ医の会(2006.1.22)盛岡 特別講演「関節リウマチにおける骨破壊のメカニズム」
- 8) 第1回 岡山運動器疾患研究会(2006.2.1)岡山 特別講演「関節リウマチにおける骨破壊メカニズム」
- 9) 第10回 臨床応用を目指した三次元臓器造形研究会(2006.2.4)東京 「関節外科領域における3次元造形応用」
- 10) Stryker CAOS forum 2006(2006.2.5)京都"TKA with navigation support"
- 11) Evista Web Conference (2006.2.16)東京 「骨粗鬆症治療剤をどのように選択すべきか？」
- 12) 静岡東部脊椎・骨代謝カンファレンス(2006.2.23)三島 特別講演「骨吸収抑制剤を中心とした新しい骨粗鬆症治療体系」
- 13) Medical Tribune 座談会(2006.3.4)札幌 「骨質からみた骨粗鬆症治療」
- 14) 第25回 城南・骨関節フォーラム(2006.3.11)東京 「新しい骨粗鬆症の治療戦略」
- 15) 第10回 湘南産婦人科研修会(2006.3.28)茅ヶ崎 「骨吸収抑制剤を用いた骨粗鬆症の治療」
- 16) 焼津骨粗鬆症治療カンファレンス(2006.3.29)焼津 「骨吸収抑制剤を中心とした新しい骨粗鬆症治療体系」
- 17) 第4回抗サイトカイン療法研究会(2006.4.15)岐阜 「関節リウマチにおける骨破壊メカニズムと治療戦略」
- 18) 第79回日本整形外科学会学術集会(2006.5.18-21)横浜 シンポジウム2 関節リウマチの診断と治療の新展開 「関節リウマチにおける関節破壊の分子メカニズム」
- 19) 佐賀県臨床整形外科医会(2006.6.8)佐賀 特別講演「骨吸収抑制剤を用いた骨粗鬆症の治療体系」
- 20) 日本医師会生涯教育講座(2006.6.15) 骨粗鬆症をめぐる最近の話題「新しい骨粗鬆症治療薬とその作用機序」
7. 知的所有権の取得状況
1. 特許の取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし
8. 参考文献  
なし

サブグループリーダー:藤岡幹浩(京都府立医大大学院医学研究科 運動器機能再生外科学)  
長澤浩平(佐賀大学医学部 膠原病リウマチ内科)  
山路 健(順天堂大学医学部 膠原病内科)

### 【研究目的】

当研究班では H15 年度までに動物モデルを用いて高脂血症治療剤、抗凝固剤および抗酸化剤が特発性大腿骨頭壊死症 (ION) 発生を予防することを示してきた。

H16 年度以降の研究目的は①これらの薬剤によって ION が臨床的に予防可能かどうかを検討すること、②新たな薬剤や処置の ION 発生予防効果を検証すること、③ION 予防効果の機序を解明すること、とした。

### 【研究方法と結果】

#### 1. (藤岡幹浩、京都府立医科大学大学院運動器機能再生外科学)

(山路 健、津田裕士、順天堂大学膠原病内科)

(田中良哉、岡田洋右、産業医科大学第一内科)

(三森経世、野島崇樹、川端大介、京都大学大学院臨床免疫学)

(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、京都府立医科大学大学院生体機能制御学)

(黒田 毅、新潟大学第二内科)

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(アトルバスタチン)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、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として、症例数を集めるために多施設共同研究として randomized controlled trial の形で行っている。アトルバスタチン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。

アトルバスタチン非投与群 10 例、投与群 13 例が

登録された。アトルバスタチン非投与群の 20%に ION の発生を認めたが、アトルバスタチン投与群には 1 例も ION が発生していない。また、ION 発生群では有意に血清コレステロールが高値であり、その他の検査データからもステロイドの薬理作用が増強している傾向を認めた。本研究の結果は①アトルバスタチンの ION 予防効果が期待できること、②高脂血症が ION の発生に何らかの関与をしている可能性があること、③ION 発生群ではステロイドの薬理作用が増強している傾向があることを示している。

#### 2. (山路 健、順天堂大学)

SLE 患者でステロイドを維持量から中等量以上(プレドニゾロン換算で 0.5mg/kg 以上)に増量した症例において、ION の発生がみられるかどうか、および高脂血症のコントロールと ION の関係について検討した。

1 年以上の経過を観察できた症例は 5 例であった。全例で血清コレステロールの上昇を認めたが、スタチンの投与によって上昇の程度は抑制された。ION の発生を 1 例に認めた。この症例はスタチンを内服しており高脂血症の程度は軽度であったが、アルコール愛飲歴があった。ステロイド以外の ION のリスクファクターについても考慮が必要であると考えられる。

#### 3. (長澤浩平、佐賀大学)

ステロイドを大量に使用する初発 SLE 患者にステロイド剤治療開始と同時にワーファリンとスタチンを併用投与し、ION 発生の有無を確認した。また、定期的な血液検査によって血清コレステロールや血液凝固能の変化を観察した。17 例において ION 発生の有無を確認した。

ワーファリンとスタチンを併用した大量ステロイド療法施行初発 SLE 患者において、ION の発生率は 18%であり、H15 年までの研究で判明した無治療群での ION 発生率 34%、ワーファリンのみの投与群での 26%に比べて低下していた。また、ワーファリンとスタチンを併用することによって、凝固能の亢進と血清コレス