

ビタミン E の骨壊死抑制効果の検討

栗林正明、藤岡幹浩、高橋謙治、新井祐志、石田雅史、後藤 毅、久保俊一

(京都府立医大大学院医学研究科 運動器機能再生外科学)

ビタミンE(α-トコフェロール)がステロイド性骨壊死の発生頻度を減らすことができるかを動物モデルを用いて調査した。日本白色家兔を、通常の飼料を食べさせるコントロール群、通常の飼料にα-トコフェロールを600mg/kgで添加した強化飼料を食べさせるビタミンE群の2群に分けた。骨壊死を起こすことを目的に、すべての家兔に高容量の酢酸メチルプレドニゾロン(MPSL)(20mg/kg)を右殿筋に筋注した。MPSLを注射してから4週間後に両大腿骨に骨壊死があるかを病理組織学的に検討した。ビタミンE群は21羽中5羽(23.8%)、コントロール群は20羽中14羽(70%)に骨壊死が発生した。α-トコフェロールは骨壊死の発生頻度を減らした(P=0.0036)。α-トコフェロールは臨床でよく用いられる薬剤であり、ヒトのステロイド性骨壊死に対する予防法として有望である。

1. 研究目的

骨壊死はステロイド投与後に骨内に虚血が生じることが原因の1つであるというコンセンサスが得られている¹⁾。骨壊死に関連するステロイドの効果として従来から諸説が提唱されてきた。最近、Ichisekiらが家兔にステロイドを投与するとすぐに骨内に酸化傷害が起こり、その後に骨壊死が発生すると報告した²⁾。そこで、抗酸化物質がステロイド投与後に発生する酸化傷害を軽減させ骨壊死を予防するのではないかとわれわれは考えた。ビタミンEは生体内に存在する脂溶性物質であり、強い抗酸化作用を持っている³⁾。ビタミンEの中でも最も生物活性が高いα-トコフェロールが骨壊死を予防しやすいのではないかと考えた。

本研究ではα-トコフェロールがステロイド性骨壊死の発生頻度を減らすことができるかを動物モデルを用いて調査した。またα-トコフェロールが、骨壊死が発生した個体内において骨壊死発生部位数を減らすことができるか検討した。

2. 研究方法

50羽の雄性日本白色家兔(28-32週齢、3.3-3.9kg)を次の2群に割り付けた。(1)コントロール群(25羽):通常の飼料で飼育した。(2)ビタミンE群(25羽):α-トコフェロールを600mg/kgで通常の飼

料に添加したビタミンE強化飼料で飼育した。

この研究ではYamamotoらの報告に準じたステロイド性骨壊死家兔モデルを用いた⁴⁾。2群に割り付けて飼育を開始してから2週間後にステロイドはパルス療法に相当する酢酸メチルプレドニゾロン(MPSL)を20mg/kgを1回右殿筋内に筋注した。MPSL投与から4週後に2群をペントバルビタールの大量投与によって安楽死させた。両大腿骨を摘出し、近位1/3と遠位1/3に分割した。それぞれの正中冠状断のヘマトキシリンエオジン染色組織標本を作製し、病理組織学的検討を行った。

全ての病理組織学的評価は盲検化して二人の検者が行った。骨壊死の病理組織学的定義は骨髄造血細胞壊死または脂肪細胞壊死を伴い骨梁内骨細胞が空胞化または核濃縮を示すものとした⁴⁾。骨髄造血細胞壊死または脂肪細胞壊死を伴わない骨梁内骨細胞の空胞化は骨壊死と診断しなかった。大腿骨の組織標本中に一つでも骨壊死領域を認めた家兔は骨壊死発生家兔とした。

まず、α-トコフェロールの骨壊死予防効果を判定するためにコントロール群とビタミンE群の骨壊死が発生した家兔数を比較した。次に骨壊死が多発することをα-トコフェロールが抑制するかどうかを検討するために骨壊死が発生した家兔1羽あたりの骨壊死部位数を両大腿骨近位1/3と遠位1/3(合計4部

位)で評価した。

- トコフェロールの摂取量を評価するために飼料の摂取量を計測した。与えた飼料の重量から残った飼料の重量を引いた重量を家兔が食べた飼料の量と定義し、1週間ごとにその量を記録した。この量から - トコフェロールの摂取量 (mg/kg/day) を算出した。

統計学的検討は骨壊死が発生した家兔の数を chi-square for independence test または Fisher's exact probability test で評価した。骨壊死がある個体内の骨壊死の部位数については Mann-Whitney's U test で評価した。p<0.05 を統計学的有意とした。

3. 研究結果

50羽中9羽の家兔が死亡した。ビタミンE群では4羽、コントロール群では5羽がMPSL投与後に死亡した。この9羽の家兔を除外して検討した。ビタミンE群では21羽中5羽(23.8%)に骨壊死が発生した。コントロール群は20羽中14羽(70.0%)に骨壊死が発生した。ビタミンE強化飼料によって骨壊死の発生頻度を減らした(P= 0.0036)。両群の骨壊死が生じた家兔の1羽当たりの骨壊死数に差はなかった(ビタミンE群; 1.80 ± 0.45 , コントロール群 1.57 ± 0.65)。

ビタミンE群の - トコフェロールの摂取量は 20.82 ± 2.47 mg/kg/day であった。

4. 考察

- トコフェロールが骨壊死の発生率、多発性に与える影響について検証した。その結果、 - トコフェロールが家兔における骨壊死の発生率を低下させることを確認した。ステロイド投与後の骨壊死に対して - トコフェロールがもつ予防効果に関しての報告はこれまでになく、本研究が初めてである。家兔の骨壊死は、骨壊死が骨髄細胞壊死を周囲に伴う骨細胞の空胞化を伴い、その修復過程では肉芽組織と添加骨形成を示す。その組織学的な特徴は家兔とヒトの骨壊死では類似しており、ヒトのステロイド投与後の骨壊死の病態を反映するモデルとして多くの研究に用いられている。 - トコフェロールがヒトのステロイド投与後の骨壊死に対しても予防効果をもつ可能性がある。

今回の研究では - トコフェロールは骨壊死の個体あたりの発生部位数に影響を与えなかった。骨壊死の多発性には関与しない可能性がある。

- トコフェロールの生化学的、生物学的な研究は数多く、その抗酸化作用、膜安定化作用、微小循環賦活作用などに関して報告されている^{3,5)}。われわれの研究では - トコフェロールが骨壊死を抑制する機序について明らかにしていないが、これらの作用が関与したのではないかと推察している。

Kappusらは - トコフェロールは非常に安全な薬剤であり、ヒトに用いるときの医薬品としての安全投与量の上限は1600mg/dayと報告している⁶⁾。今回の研究で家兔に食べさせた - トコフェロールの量をヒト(60kg)に換算すると約1250mg/dayであり、安全な投与量と考えられる。

われわれの研究では - トコフェロールを安全な投与量で経口摂取させ、ステロイド性骨壊死を抑制した。 - トコフェロールは安全性が高く、すでに臨床でよく使われる薬物であるため、追加実験が必要なもののヒトを対象とした骨壊死の予防効果を確認する臨床試験に応用しやすいと考える。

5. 結論

本研究は - トコフェロールが家兔の骨壊死発生率を低下させることをはじめて示した。 - トコフェロールは臨床でよく用いられる薬剤であり、ヒトのステロイド性骨壊死に対する予防法として有望であると考えられる。

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) W. Drescher, K.P. Weigert, M.H. Bunger, J. Ingerslev, C. Bunger, and E.S. Hansen, Femoral head blood flow reduction and hypercoagulability under 24 h megadose steroid treatment in pigs. J

Orthop Res 22 (2004) 501-8.

- 2) T. Ichiseki, A. Kaneuji, S. Katsuda, Y. Ueda, T. Sugimori, and T. Matsumoto, DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology (Oxford)* 44 (2005) 456-60.
- 3) G.W. Burton, A. Joyce, and K.U. Ingold, Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 221 (1983) 281-90.
- 4) T. Yamamoto, T. Iriya, Y. Sugioka, and K. Sueishi, Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 40 (1997) 2055-64.
- 5) A. Tasinato, D. Boscoboinik, G.M. Bartoli, P. Maroni, and A. Azzi, d-alpha-tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 12190-4.
- 6) H. Kappus, and A.T. Diplock, Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Radic Biol Med* 13 (1992) 55-74.

ステロイド投与家兎における抗酸化ビタミンを用いた骨壊死予防の検討

三上友明、市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、福井清数、北村憲司、中川慎太郎、三秋恒平、松本忠美
(金沢医科大学 整形外科)

当科ではこれまで骨壊死発生には酸化ストレスが関与していることに注目し、グルタチオンで骨壊死が抑制されることを報告してきた。今回、抗酸化力の強いとされるビタミン類を家兎に投与し、骨壊死発生予防の可能性に関して検討した。使用した動物モデルは骨壊死の再現性を高くする為に、MPSL40mg/kgを1回殿筋内に筋注した家兎とし、ステロイド筋注のみをS群、ステロイドに加えてビタミン類を連日静注した群を作製して、病理組織学的、血液生化学的検査を行った。ビタミンE投与群で骨壊死抑制の可能性が示唆された。

1. 研究目的

これまでに当科では、近年種々の疾患で関与が報告されている生体内酸化ストレスに注目し、家兎に対してステロイド投与後早期にDNA酸化障害が発生していること、またステロイド投与家兎骨壊死モデルを用いて抗酸化剤であるグルタチオン投与により骨壊死発生が有意に抑制されたことを報告し、骨壊死と酸化ストレスとの関係についての検討を行ってきた(1, 2)。

ステロイド投与家兎骨壊死モデルに対して、グルタチオンを大量投与した結果、骨壊死発生率は0%と十分な抑制効果が確認できた。しかし、同モデルに対して臨床的な常用量であるグルタチオンを投与した際には、骨壊死発生率は30%と有意な抑制効果は認められたが、その効果は完全ではなかった。従って、更なる予防効果が期待できる、臨床的に安全で、一般的に使用されている薬剤が必要と考えられる。

最近ではグルタチオンを含めた抗酸化物質の内、特に効果が強いといわれている抗酸化ビタミンが注目されている(3)。臨床においても、心疾患など酸化ストレス関連疾患に対して発症予防目的によく利用されており、十分な予防効果が報告されている。抗酸化ビタミンの中ではビタミンE、C、Kが特に抗酸化作用を有しており、また一般的に臨床で使用され、安全性も高いといわれている。従って、抗酸化作用を有するビタミン(E、C、K)を投与することによりステロイドによる生体内酸

化ストレスを抑制することができれば、骨壊死発生を予防できる可能性が考えられる。

従って、本研究の目的は、ステロイド投与家兎骨壊死モデルを使用し、抗酸化ビタミン(E、C、K)による骨壊死発生抑制効果に関して検討することである。

2. 研究方法

実験1：酢酸メチルプレドニゾロン(以下MPSL)40mg投与群の作成

体重約3.5kgの成熟雌性日本白色家兎に対し、MPSL40mgを1回のみ殿筋内に筋注した15羽をS群とした。

実験2：MPSL+抗酸化ビタミン投与群の作成

実験1と同様にMPSL40mg投与した家兎に対して、ビタミンEを50mg/kg連日静注した10羽をE群、ビタミンCを30mg/kg連日静注した10羽をC群、ビタミンKを0.5mg/kg連日静注した5羽をK群とした。

全群、2週間後に犠牲死とした。使用したビタミンは、すべて半減期が短いため連日静注とし、量も臨床的に報告されている最大投与量を用いた。各群において下記の(1)、(2)を検討した。

(1) 病理組織学的検討

2週間後に犠牲死とした家兎の両側大腿骨を摘出し、各群においてH-E染色標本作製し、光学顕微鏡にて大腿骨近位内側部における骨壊死の有無について検討した(4)。

(2) 血液生化学的検討

酸化ストレスの指標としてグルタチオン (GSH) 値を測定した (5)。当科の研究にて、ステロイド投与後早期に生体内酸化が生じていることが示唆されている為 (6)、ステロイド投与後早期に集中し、MPSL 投与前、1、3、5、7、14 日目に採血を行った。

3. 研究結果

実験 1:

- (1) S 群では 15 羽中、14 羽に骨壊死を認め、骨壊死発生率は 93%であった。
- (2) S 群では、MPSL 投与後、1 日目から急激に GSH 値の低下を認め、7 日目まで統計学的に有意な GSH 値の低下を認めた。(P<0.05)

実験 2:

- (1) E 群では、10 羽とも骨壊死は認めず骨壊死発生率は 0%と、有意に骨壊死発生は抑制されていた。(P<0.05) また、C 群では 10 羽中 6 羽に骨壊死を認め骨壊死発生率は 60%、K 群では 5 羽中 5 羽に骨壊死を認め 100%であった。
- (2) E 群では S 群と比較して、MPSL 投与 1 日目、3 日目で GSH 値の低下が有意に抑えられていたが (P<0.05)、C 群、K 群では S 群と比較して、有意な変化を認めなかった。

4. 考察

通常、生体内では酸化還元のパランスは平衡に保たれている。しかし、過剰のステロイドが投与されると、酸化還元のパランスが崩れ、生体内に過剰の酸化ストレスが加わることになる。つまり、生体内で過酸化の連鎖反応が起こり、最終産物である過酸化物質が体内に蓄積することになる。生体内に過酸化物質が蓄積すると、更に酸化還元のパランスが崩壊し、酸化ストレスが増加するという負のサイクルを生じることになる。

今回検討したビタミン E は、過酸化反応の連鎖を停止させ、過酸化物質の蓄積を抑制する。従って、直接的な抗酸化作用を有しており、ビタミン E 投与群では骨壊死発生率が 0%と有意な抑制効果が確認できた。

ビタミン C は、ビタミン E の抗酸化作用を補助するという間接的な作用が主である為

(7、8) 本研究にて骨壊死発生率は 60%と抑制傾向は認められたが、十分な結果は得られなかった。

ビタミン K は、抗酸化作用を有するという報告は近年散見されているが (9) 未だ明らかな機序は判明していない。今回の研究では、抑制効果は認めなかった。

5. 結論

本実験よりステロイド性骨壊死モデルに対してビタミン E を投与することで、骨壊死発生抑制効果が確認できた。また、ビタミン C では、骨壊死抑制傾向は認められたが、有意な低下は得られず、ビタミン K に関しては骨壊死抑制効果を認めなかった。ビタミン E は臨床的にも十分応用可能であり、ステロイド性大腿骨頭壊死症の予防法として期待できることが示された。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

三上友明、市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、福井清数、北村憲司、中川慎太郎、三秋恒平、松本忠美：ステロイド投与家兎における抗酸化ビタミンを用いた骨壊死予防の検討、第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2008.10.24

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) 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) 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. 金沢医大誌 2005; 30: 245-52.

- 3) 足達 寿, 今泉 勉: 抗酸化物質. The lipid 2003, Vol. 14: 40-45.
- 4) Yamamoto T, Iriya T, Sugioka Y et al: Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum 1997; 40: 2055-64.
- 5) 近藤宇史, 井原義人: レドックス基礎医学 グルタチオンシステム. 淀井淳司, 松尾禎之 (編), 医学のあゆみ別冊レドックス - ストレス防御の医学, 東京, 医歯薬出版, 2005; 14-8.
- 6) 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.
- 7) 阿部康二: フリーラジカルと脳卒中治療. 医学のあゆみ 2005, 212: 533-538.
- 8) Packer JE, Slater TF, Willson RL: Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C 1979, 278: 737-738.
- 9) 白川 仁: 酸化ストレスによる神経細胞のアポトーシスを阻害するビタミン K の作用 ビタミン 2004; 78: 147-49.

酸化ストレスラット骨壊死モデルの組織学的検討

坂井孝司、西井 孝、中村宣雄、高尾正樹、花之内健仁、中原一郎、塩見俊行、
津田晃佑、吉川秀樹、菅野伸彦

(大阪大学大学院医学研究科 整形外科)

Buthionine sulphoximine (BSO) を 1 回皮下投与した酸化ストレスラット骨壊死モデルについて組織学的検討を行った。1000mg/kg/day 投与後 1 週(6 匹)、2 週(6 匹)、3 週(6 匹)では各々骨壊死発生が25%、2000mg/kg/day 投与後 2 週(6 匹)では骨壊死発生が42%に見られた。骨幹部のみに認める例が多く、骨髄壊死を伴った例は少なかった。

1. 研究目的

Ichiseki ら¹⁾によって報告されている酸化ストレスラット骨壊死モデルについて、BSO の投与量及び投与方法を変更して追試し、骨壊死発生について組織学的に検討した。

2. 研究方法

Wister rat 雄 24-28 週齢 27 匹を対象とした。D,L-Buthionine-(S,R)-Sulfoximine (BSO)を蒸留水に溶解して 1 回皮下投与しモデルを作成した。蒸留水を皮下投与し 1 週後に犠牲死としたもの(n=3)をコントロールとした(図1)。BSO 1000mg/kg を 1 回皮下投与し、1 週後に犠牲死としたもの(n=6)、2 週後に犠牲死としたもの(n=6)、3 週後に犠牲死としたもの(n=6)、BSO 2000mg/kg を 1 回皮下投与し、2 週後に犠牲死としたもの(n=6)の 4 群について検討した。

両大腿骨と両脛骨を摘出しホルマリン固定後、EDTA にて脱灰し、HE 染色標本を作成した。また酸化ストレスの指標として、麻酔下に採取した動脈血に対して The Diacron-Reactive Oxygen Metabolites test (d-ROM)を施行した。

3. 研究結果

BSO 1000mg/kg を 1 回皮下投与し、1 週後に犠牲死としたものでは、3 本の大腿骨で骨幹部に骨梁壊死を認め(3/12, 25%)、そのうち 1 本では骨端部にも骨梁壊死を認めた。

BSO 1000mg/kg を 1 回皮下投与し、2 週後に犠牲

死としたものでは、2 本の大腿骨で骨幹部に骨髄壊死を認め(2/12, 17%)(図 2)、3 本の大腿骨で骨幹部に骨梁壊死を認めた(3/12, 25%)(図 3)。また 1 本の脛骨で骨幹部に骨髄壊死を認めた(1/12, 9%)。

図1 control (HE x100)

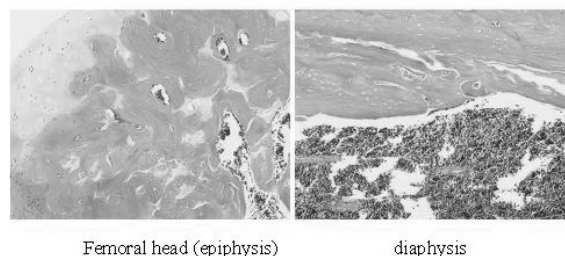
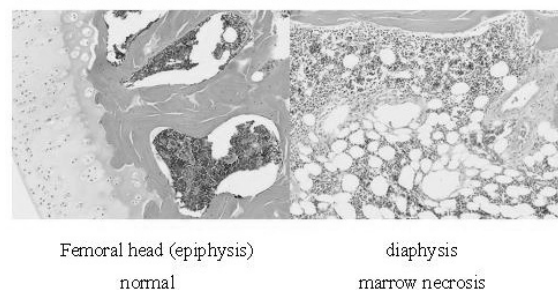
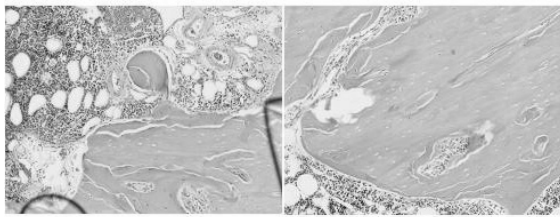


図2 1000mg/kg/day x 1 day, post 14 days sacrifice (HE x100)



BSO 1000mg/kg を 1 回皮下投与し、3 週後に犠牲死としたものでは、3 本の大腿骨で骨端部に骨梁壊死を認めた(3/12, 25%)。

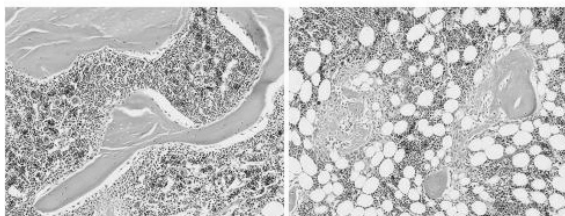
図3 1000mg/kg/day x 1day, post 14 days sacrifice (HE x100)



diaphysis
trabecular necrosis

BSO 2000mg/kg を 1 回皮下投与し、2 週後に犠牲死としたものでは、5 本の大腿骨で骨幹部に骨梁壊死を認めた(5/12,42%) (図4)。いずれの群でも骨端部には少なく、骨幹端部には認めなかった。

図4 1000mg/kg/day x 1day, post 14 days sacrifice (HE x100)



trabecular necrosis
diaphysis
new bone formation

d-ROM 値について、骨壊死発生の有無で比較すると、壊死あり(8 匹) 365.1 ± 67 IU.CARR, 壊死なし(13 匹) 393.4 ± 69 IU.CARR で差を認めなかった。BSO 投与からの期間では、1 週(6 匹) 368.3 ± 62 IU.CARR, 2 週(12 匹) 391.1 ± 73 IU.CARR, 3 週(6 匹) 380.2 ± 62 IU.CARR で差を認めなかった。BSO 投与量では、0g(3 匹) 406.5 ± 32 IU.CARR, 1g/kg(18 匹) 391.9 ± 99 IU.CARR, 2g/kg(6 匹) 409.5 ± 51 IU.CARR で差を認めなかった。

4. 考察

今回 BSO を 1 回 1000mg/kg/day 皮下投与後 1 週、2 週、3 週では各々骨壊死発生が 25%、2000mg/kg/day 投与後 2 週では骨壊死発生が 42% に見られた。連続 14 日間 500mg/kg/day 皮下投与した Ichiseki らの報告と比較して発生率は低く、また骨幹部のみにみられる例が多く、骨端部には少なく、骨幹端部には見られなかった。この理由として、BSO 投与法・投与量の違いによると考えられた。また Rat における BSO の血中動態についても検討する必要があると考えられた。

今回酸化ストレス度の指標として、d-ROM 値を使用

した。d-ROM 値は血液における過剰な活性酸素、フリーラジカルによるダメージの副産物(ヒドロペルオキシド)を間接的に分析測定し数値化したものである。正常は 200-300IU.CARR で、341-400 は中等度のストレス、401-500 は高度のストレス、501 以上はかなり高度のストレスを表すとされている。今回はすべての個体で 300-500IU.CARR の範囲内であった。但し BSO を投与しなかったコントロール群でもこの範疇にあり、BSO 投与群と差を認めなかったことから、麻酔下に採血しているにもかかわらず一連の処置による影響も示唆され、現時点では酸化ストレスラット骨壊死モデルの酸化ストレス測定には適当とはいえない。

5. 結論

BSO を 1 回 1000mg/kg/day 皮下投与後 1 週、2 週、3 週では各々骨壊死発生が 25%、2000mg/kg/day 投与後 2 週では骨壊死発生が 42% に見られた。骨端部には少なく、骨幹端部には認めず、骨幹部のみに見られる例が多く、骨髄壊死はも少なかった。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

8. 参考文献

- 1) Ichiseki T, Ueda Y, Katsuda S, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology* 2006;45: 287-290.

骨壊死動物モデル組織検討会のまとめ

骨壊死動物モデルの定義、特徴の文献的検討

高尾正樹、西井孝、坂井孝司、花之内健仁、中原一郎、塩見俊行、津田晃佑、
中村宣雄、吉川秀樹、菅野伸彦（大阪大学大学院医学研究科 整形外科）

以前家兎骨壊死モデルの組織評価の再現性の検討を大阪市立大学、金沢大学、九州大学、大阪大学の4施設で行い、施設間での骨、骨髄壊死の定義や組織評価基準の相違について報告した。特発性大腿骨頭壊死症の予防法確立および前臨床的検証のためには、壊死の起点が明らかな再現性の高い動物モデルによる実験が不可欠である。施設間で骨、骨髄壊死の定義や組織評価基準を一致させることは実験結果の再現性、信頼性の向上の点で重要と考えるが、それぞれの動物モデルにおいて人との相違や、骨、骨髄壊死の様態の特徴を踏まえて結果を解釈することも重要と考えられる。今回動物種によるステロイド反応性の相違を含め、各骨壊死動物モデルの定義、特徴の文献的検討を行い骨壊死動物モデル組織検討会のまとめとして報告する。

1. 研究目的、方法

以前家兎骨壊死動物モデルの組織診断の再現性の検討を大阪市立大学、金沢大学、九州大学、大阪大学の4施設で行い、施設間での骨、骨髄壊死の定義や組織評価基準の相違について報告した¹⁾。標本は35標本中31標本(89%)がステロイド単独投与による骨、骨髄壊死モデルであった。4施設で診断が完全に一致したのは全体の約1/3で、施設間の組織診断に不一致があった。主な原因は、施設間での動物モデルでの骨、骨髄壊死の定義や組織評価基準が異なるということであった。具体的には

1. 骨壊死と骨髄壊死を区別するかどうか施設により異なる。
2. partial empty lacunae を骨壊死に含めるかどうかの方針が異なる。
3. 組織変化が軽度の時の骨髄壊死の判定基準が異なる。
4. アーチファクトの評価が異なる。

であった。

病態解明のため様々な非外傷性骨壊死動物モデルが報告されているが、これらの動物モデルがどのような特徴を有し、骨壊死がどのように定義されているか代表的動物モデルを対象に文献的検討を行った。

2. 研究結果

ステロイドの単独投与で骨、骨髄壊死を認めた動物種としてはマウス²⁾、チキン³⁾、ラビット⁴⁻⁶⁾の3つの動物種の報告がある。ブタではステロイド投与後の骨頭の血流低下が報告されているが、骨、骨髄壊死の発生は報告されていない⁷⁾（表1）。

マウスではデキサメサゾン⁸⁾を12日間経口投与し、大腿骨遠位 epiphysis に40%の確率で骨壊死が発生した報告されている²⁾。壊死領域の大きさは記述されていない。骨壊死の定義は骨髄壊死を伴う骨梁壊死とし、骨壊死と骨髄壊死を区別している。

チキンではメチルプレドニゾロン(MPSL)を3mg/kg毎週6-12週投与し、骨頭に骨髄壊死を40%、骨壊死を16%認めたと報告している³⁾。壊死領域の大きさは報告されていないが、文献のfigureでは骨頭に比し比較的小さな壊死が提示されている。骨壊死の定義は骨髄壊死を伴う骨梁壊死とし、骨壊死と骨髄壊死を区別している。

ラビットの20mg/kgのMPSL単回投与モデルでは、骨壊死の定義は骨髄壊死を伴う骨梁壊死としているが、骨髄壊死単独でも骨壊死に含めている⁴⁾。骨、骨髄壊死が70%と高率に発生するが、壊死領域の大きさは比較的小さく、近位1/3大腿骨の平均0.7%に相当すると報告されている。

ラビットの4mg/kgのMPSL単回投与のモデルも同様の傾向で、60%に骨、骨髄壊死が発生するが、壊死領域の大きさは小さく平均5mm²と報告されている^{5,6)}。骨壊死の定義は骨髄壊死を伴う骨梁壊死としている。

われわれは20mg/kgMPSL単回投与ラビットモデルの血流評価のため、Dynamic MRIをステロイド投与後3日、1w、3w、6w、9wで撮像したが、虚血パターンの信号変化をとらえることができたのは9w群の18大腿骨中1大腿骨のみであった^{8,9)}。9w群で壊死を認めたのは6大腿骨で、組織はすべて骨髄壊死であった。壊死領域の大きさは平均4.4mm²と小さかった。造影MRIでは、20mg/kgMPSL投与後9wで骨髄壊死を呈した6大腿骨中4大腿骨で検出できたが、血清病モデルのMRI像と比べると変化は小さかった。本モデルの壊死領域の大きさが小さいことを反映した結果であった^{10,11)}。

ステロイド非投与の骨、骨髄壊死動物モデルでは、ラットでは酸化ストレスモデル¹²⁾やラビットでは血清病モデル¹³⁾、LPSモデル¹⁴⁾、SLE-likeモデル¹⁵⁾の報告がある(表2)。

Buthionine sulfoximine 500mg/kg/日14日間連続投与による酸化ストレスラットモデルではepiphysisに高率に骨壊死を認めると報告されている。骨壊死の定義としては骨髄壊死または骨梁壊死とし、骨髄壊死と骨壊死を区別していない¹²⁾。壊死領域の大きさは報告されていない。

10mg/kgの馬血清2回投与による血清病ラビットモデルでは、大腿骨全ての部位に骨壊死や骨髄壊死の発生を認め、骨壊死の定義としては骨髄壊死を伴う骨梁壊死とし、骨壊死と骨髄壊死を区別している¹³⁾。

100µg抗DNA抗体のimmunizationによるSLE-likeラビットモデルでは骨髄壊死のみの報告がされている。骨壊死は骨髄壊死を伴う骨梁壊死とし、骨壊死と骨髄壊死を区別している¹⁵⁾。壊死領域の大きさは報告されていない。

10µg/kgのLPS単回投与ラビットモデルでは、大腿骨全ての部位に骨壊死や骨髄壊死の発生を認め、骨壊死の定義としては骨髄壊死を伴う骨梁壊死とし、骨壊死と骨髄壊死を区別している¹⁴⁾。壊死領域の大きさは大腿骨近位1/3の平均86.7%と大きい。これにステロイド投与を加えたラビットモデルで予防的治療の効果をDynamic MRIと造影マイクロCTも用いて評

価している報告があるが、壊死領域が大きいため高い検出感度を報告している¹⁶⁾。

3. 考察、結論

骨壊死動物モデルでの骨壊死の定義は、すべてヒトでの定義と同じく骨髄壊死を伴う骨梁壊死としたものであり、骨壊死の組織学的定義のgold standardであることが確認されたが、骨壊死と骨髄壊死を区別するかどうかは動物モデルにより異なっていた。

一言に骨壊死動物モデルといっても、壊死範囲の大きさは大腿骨近位1/3のほとんどを占めるものから、1%に満たないものまでさまざまであった。ステロイド単独投与による骨、骨髄壊死の範囲は動物種によらず小さい傾向があった。壊死の部位もepiphysis, metaphysis, diaphysisの区分でさまざまであった。

特発性大腿骨頭壊死症の予防法確立および前臨床的検証のためには、壊死の起点が明らかな再現性の高い動物モデルによる実験が必要不可欠である。動物モデルでの骨、骨髄壊死像とヒトの骨壊死との相違を念頭において、結果を解釈し検証することはいうまでもないことであるが、動物モデル間においても組織学的特徴や診断基準に相違があることも十分理解することが重要であると考えられた。

4. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

5. 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

6. 参考文献

- 1) 高尾正樹、菅野伸彦、中村宣雄、坂井孝司、岩切健太郎、山本卓明、西田顕二郎、加畑多文。骨壊死動物モデル組織診断検討会の報告。特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の標準化を目的とした総合研究 平成17年度総括・分担研

- 2) Yang L, Boyd K, Kaste SC, Kamdem Kamdem L, Rahija RJ, Relling MV. A mouse model for glucocorticoid-induced osteonecrosis: Effect of a steroid holiday. *J Orthop Res.* 2008
- 3) 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.
- 4) 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.
- 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) 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.
- 7) Drescher W, Schneider T, Becker C, Hobolth J, Ruther W, Hansen ES, Bunger C. Selective reduction of bone blood flow by short-term treatment with high-dose methylprednisolone. An experimental study in pigs. *J Bone Joint Surg Br.* 2001;83:274-7.
- 8) Takao M, Sugano N, Nishii T, Sakai T, Nakamura N, Yoshikawa H. Different magnetic resonance imaging features in two types of nontraumatic rabbit osteonecrosis models. *Magn Reson Imaging.* 2008 in press
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Ichiseki T, Ueda Y, Katsuda S, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:287-90.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Korompilias AV, Gilkeson GS, Seaber AV, Urbaniak JR. Hemorrhage and thrombus formation in early experimental osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;386:11-8.
- 16) Qin L, Zhang G, Sheng H, Yeung KW, Yeung HY, Chan CW, Cheung WH, Griffith J, Chiu KH, Leung KS. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone. *Bone.* 2006;39:863-71.

表1. ステロイド投与骨・骨髄壊死動物モデル一覧

Species	Treatment	ON definition	Distinction between ON and MN	Prevalence	Site	Size
Mouse	Dexamethasone p.o. 12 days	TN and MN	Yes	ON 40%	Distal epiphysis	-
Rabbit	MPSL 20mg/kg i.m. single dose	TN and MN	No	ON 70%	Metaphysis Diaphysis	0.7% of 1/3 proximal femur
Rabbit	MPSL 4mg/kg i.m. single dose	TN and MN	Yes	ON 60%	Metaphysis Diaphysis	5 mm ²
Chicken	MPSL 3mg/kg/w i.m. 6-12w	TN and MN	Yes	MN 40% ON 16%	Proximal epiphysis	-

ON osteonecrosis, TN trabecular necrosis, MN marrow necrosis, MPSL methylprednisolone, BSO buthionine sulphoximine, LPS lipopolysaccharide

表2. ステロイド非投与骨・骨髄壊死動物モデル一覧

Species	Treatment	ON definition	Distinction between ON and MN	Prevalence	Site	Size
Rat	BSO 500mg/kg/day i.s. 14 days	TN and/or MN	Yes	ON 71%	Proximal epiphysis Distal epiphysis	-
Rabbit	Horse serum 10ml/kg, two dose	TN and MN	Yes	MN 28% ON 44%	Epiphysis Metaphysis Diaphysis	-
Rabbit	Anti-DNA antibody 100 µg immunization	TN and MN	Yes	MN 35%	Metaphysis Diaphysis	-
Rabbit	LPS 10 µg/kg single dose	TN and MN	Yes	ON 77%	Epiphysis Metaphysis Diaphysis	86.7% of 1/3 proximal femur

ON osteonecrosis, TN trabecular necrosis, MN marrow necrosis, MPSL methylprednisolone, BSO buthionine sulphoximine, LPS lipopolysaccharide

マウス骨壊死モデルを用いたシンバスタチンの骨壊死に対する作用の解析

田中 栄 (東京大学医学部附属病院 整形外科)
大熊千晶、懸田健史 (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。われわれはこれまでにマウス尾部結紮による新しい骨壊死モデルを作成した。今年はこのモデルを用いてスタチン製剤であるシンバスタチンの作用を検討した。シンバスタチンはマウス骨壊死モデルにおける骨細胞アポトーシスおよび骨壊死を抑制した。またシンバスタチン投与によって p53 の発現誘導の低下が認められた。

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。われわれは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における骨細胞アポトーシス、骨壊死に対するシンバスタチンの作用を検討した。

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し、組織学的に検討した。シンバスタチンは 0.02w/w% (約 50mg/kg/day) の混餌として投与を行った。以下の4群を作成して検討した。

Group1: シンバスタチン投与なし

Group2: 尾部結紮7日前から尾部結紮まで投与

Group3: 尾部結紮後 sacrifice まで投与

Group4: 尾部結紮前7日から sacrifice まで投与

3. 研究結果

Group1 および 2 では結紮部の遠位において著明な骨細胞アポトーシス、empty lacunae の形成が認められた。一方 Group 3, 4 では再還流後 7 日目における骨細胞アポトーシスは抑制されており、14 日目における empty lacunae の形成も低下していた(図1)。免疫組織学的検討によって骨細胞における p53 の発現が Group3, 4 では低下していた(図2)。

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、このモデルを用いてシンバスタチンが骨細胞アポトーシスに対して抑制的に作用することを明らかにした。今後シンバスタチンの骨細胞に対する作用の分子メカニズムを明らかにすることが必要と考えられる。

5. 結論

マウス尾部結紮による骨壊死モデルにおいてシンバスタチンは骨細胞アポトーシス、骨壊死に対して抑制的に作用する。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Yamaki M, Miura T, Tanaka S, Udagawa N, Takahashi N. MKK6-p38 MAPK signaling pathway enhances survival but not bone-resorbing activity of osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, 365:252-257.
- 2) Ajima R, Akiyama T, Usui M, Yoneda M, Yoshida Y, Nakamura T, Minowa O, Noda M, Tanaka S, Noda T, Yamamoto T. Osteoporotic bone formation in mice lacking tob2; involvement of Tob2 in RANK ligand expression and osteoclasts differentiation. *FEBS Lett.* 2008, 582:1313-1318.
- 3) Okuma-Yoshioka C, Seto H, Kadono Y, Hikita A, Oshima Y, Kurosawa H, Nakamura K, Tanaka S. Tumor necrosis factor-alpha inhibits chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts through p38 mitogen activating protein kinase pathways. *Mod Rheumatol.* 2008;18(4):366-378.
- 4) Oshima Y, Akiyama T, Hikita A, Iwasawa M, Nagase Y, Nakamura M, Wakeyama H, Kawamura N, Ikeda T, Chung UI, Hennighausen L, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S. Pivotal role of Bcl-2 family proteins in the regulation of chondrocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 2008, 283(39): 26499-26508.
- 5) Eun-Ju Chang, Jeongim Ha, Frank Oerlemans, You Jin Lee, Soo Woong Lee, Jiyeon Ryu, Hyung Joon Kim, Youngkyun Lee, Hyun-Man Kim, Je-Yong Choi, Jin Young Kim, Chan Soo Shin, Youngmi Kim Pak, Sakae Tanaka, B éWieringa, Zang Hee Lee, Hong-Hee Kim. Brain-type creatine kinase has a crucial role in osteoclast-mediated bone resorption. *Nature medicine,* 14:966-972, 2008.

2. 学会発表

- 1) 2nd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems
- 2) (2008.7.11) Rhodes, Greek, Session V Basic Concepts into osteoimmunology: Osteoclasts "Regulation of Skeletal Homeostasis by Bcl-2 family"
- 3) 5th Meeting of Bone Biology Forum (2008.8.22) Fuji, Session 5 "Regulation of osteoclast apoptosis"
- 4) 第 62 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2008.4.17) シンポジウム 2 組織破壊の科学「破骨細胞アポトーシス制御の分子機構」
- 5) 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 参天ブース企画 RA における DMARDs 療法の可能性と限界 (2008.4.21) 「RA における骨破壊制御」
- 6) 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 ランチオンセミナー13 (2008.4.22) 「骨吸収を標的にした関節リウマチ治療戦略」
- 7) 第 81 回日本整形外科学会学術集会 (2008.5.25) クラークモーニングセミナー 5 「骨質改善という観点からみた骨粗鬆症治療戦略」
- 8) 第 29 回 日本炎症・再生医学会 コースレクチャー 東京 (2008.7.10) 「骨破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
- 9) 第 20 回中部リウマチ学会 特別講演 (2008.9.6) 浜松「関節リウマチにおける骨破壊メカニズム」

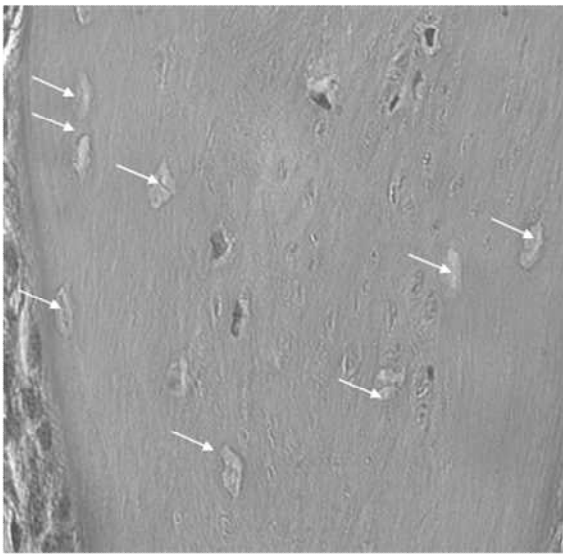
7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

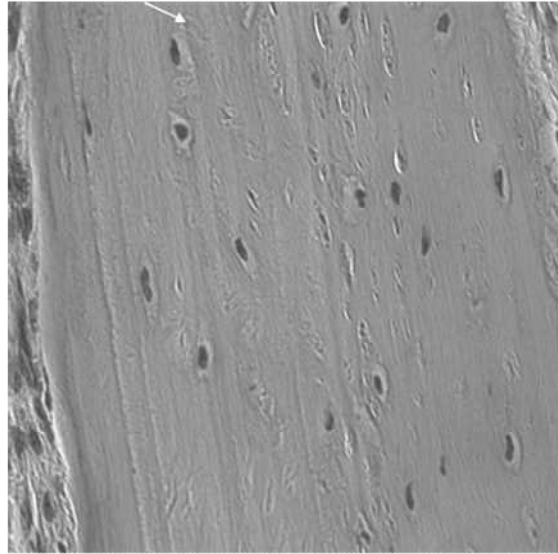
8. 参考文献

なし

図1: 結紮・再還流後14日目におけるempty lacunae形成(矢印)の全骨細胞に対する比率

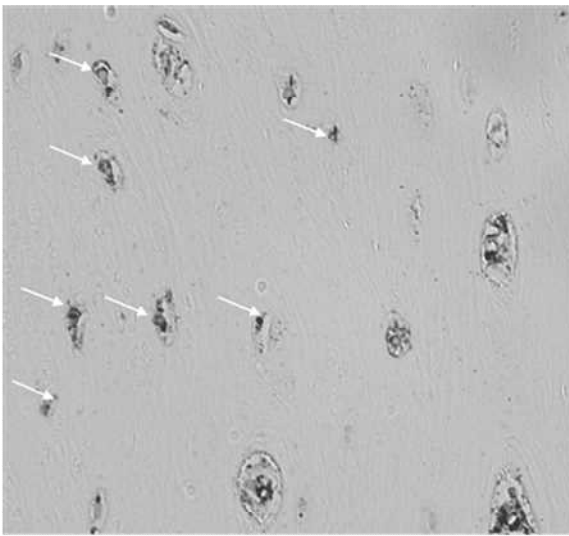


Group I : 非投与群 $51.2 \pm 5.0\%$

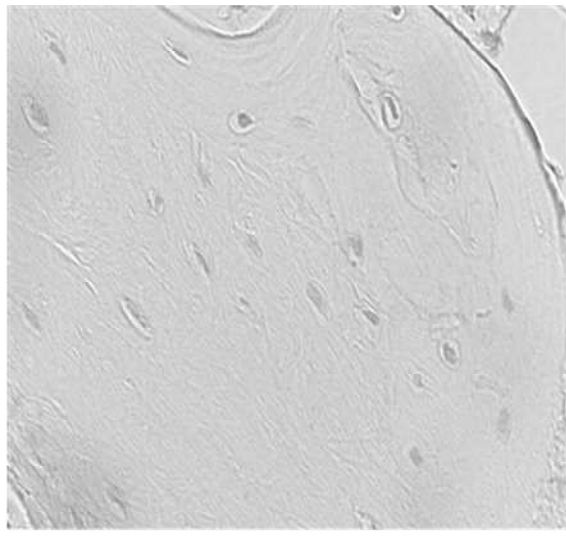


Group IV : 結紮前後投与群 $10.5 \pm 1.1\%$

図2: 再還流7日目におけるp53陽性骨細胞(矢印)の比率



Group I : 非投与群 $36.7 \pm 1.5\%$



Group IV : 結紮前後投与群 $14.0 \pm 2.9\%$

高脂血症治療薬を用いたステロイド性大腿骨頭壊死症予防法の研究

石田雅史、藤岡幹浩、栗林正明、久保俊一

(京都府立医大大学院医学研究科 運動器機能再生外科学)

津田裕士、梁 広石

(順天堂東京江東高齢者医療センター 総合診療科)

山路 健、関谷文男

(順天堂大学医学部膠原病内科)

田中良哉、岡田洋右

(産業医科大学 第一内科学)

三森経世、野島崇樹、川端大介

(京都大学大学院医学研究科 内科学講座 臨床免疫学)

竹内 勤、天野宏一

(埼玉医科大学総合医療センター リウマチ膠原病内科)

川人 豊

(京都府立医大大学院医学研究科 生体機能制御学)

黒田 毅

(新潟大学大学院医歯学総合研究科 内部環境医学講座(第二内科))

京都府立医科大学、順天堂大学、産業医科大学、京都大学、埼玉医科大学、新潟大学の共同研究として高脂血症治療薬によるステロイド性大腿骨頭壊死症予防の可能性を検討している。患者背景を統一するため、SLE 初発患者でステロイド治療を初めて受けるものを対象として blocked randomization で無作為抽出した症例にアトルバスタチンを投与し、大腿骨頭壊死症の発生予防効果を検討している。アトルバスタチンを投与した SLE 症例 21 例中 4 例、アトルバスタチンの投与しなかった SLE 症例 23 例中 5 例において大腿骨頭壊死症が発生し、現在のところアトルバスタチンによる有意な予防効果は確認できていない。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (Idiopathic osteonecrosis of the femoral head; ION) は青壮年に好発し、進行性に股関節の破壊をきたして患者の quality of life を著しく侵す関節疾患である。ION の病因は必ずしも明らかではないが、ステロイドの使用やアルコール多飲との関連が示唆されている。その罹患患者数は年々増加傾向にあり、特に近年では全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) など種々の疾患治療にステロイドを使用した患者での ION 発生が増加しており全 ION 症例の約半数がステロイド投与と関連があると推測されている¹⁾。しかしステロイドが ION の発生に関連する詳細な機序は不明であり、有効な予防措置がとれていないのが現状である。ION の存

在はステロイドを用いた治療を進める上でも大きな障害となっており、確実な予防法が求められている。本研究の目的は、これまでに動物モデルや後向き臨床研究で骨壊死の発生抑制効果の可能性が報告されている高脂血症治療薬について^{2,3)}、厳密な前向き臨床研究で ION 発生抑制効果を評価することである。

2. 研究方法

A. 対象

対象とした基礎疾患は本邦におけるステロイド性 ION の基礎疾患として最多を占める SLE とした。20 歳以上 65 歳未満の SLE 初発患者で過去にステロイド治療を受けていない症例のうち、プレドニゾロンに換算して 0.5mg/kg/day 以上のステロイド

投与を開始するものを対象とし、文書で研究への協力を同意を得た。妊娠を希望する女性患者、重篤な肝障害、腎機能障害、心疾患を有する患者、その他、担当医が不相当と判断した患者は対象から除外した。

B. blocked randomization

共同研究施設から報告された症例を京都府立医大で blocked randomization によって無作為に 2 群に分けた。1 群にはステロイド投与開始と同時にアトルバスタチン 10mg/day を投与し、もう 1 群はアトルバスタチン非投与とした。

C. 血液生化学検査

血液検査としてステロイド開始前に抗リン脂質抗体を測定した。また月に 1 回総コレステロール値 (total cholesterol; T-chol) を測定してアトルバスタチン投与の有無、ION 発生の有無との関連を検証した。

D. 画像検査

単純 X 線像と単純 MR 画像で ION 発生の有無を確認した。撮影はステロイド治療開始前と 6 ヶ月後に行い、可能な症例では 1 年後にも撮影した。基礎疾患が重篤な場合にはステロイド治療開始後 4 週までの画像検査を「治療前」として許容した。これは、ステロイド投与後の ION が発生してから MR 画像上の所見を生じるまでに 4 週間以上を要するためである。これまでの臨床的研究によって、ION はステロイド投与開始から 6 ヶ月以内に発生し、それ以後の発生はまれであることが示されている^{4,5)}。この期間が ION 発生の予防に重要な時期である。6 ヶ月以上経過を観察できた症例についてアトルバスタチンの ION 予防効果を検討した。

E. 倫理面への配慮

患者には本研究に関する十分な説明を行い、文書による同意を得た。重篤な副作用を認めた場合や、患者ないしその家族が薬剤投与の中止を求めた場合、アトルバスタチン非投与群の患者が重度の高脂血症を呈した場合、その他担当医師が試験の継続が困難と判断した場合には登録患者は研究への参加を撤回できるよう配慮した。なお、本研究は各共同研究施設の臨床研究審査委員会の承認を受けて施行した。

F. 統計解析

統計学的有意差の検討には Fisher's exact

probability test, Shapiro-Wilk test, F test, Student's t-test, Welch's t-test, Mann-Whitney's U test, paired t-test を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

3. 研究結果

A. 患者背景

登録されたアトルバスタチン投与群は 25 症例でそのうち 6 ヶ月以上経過観察できているのは 21 例 (男性 2 例、女性 19 例) である。平均年齢は 36 歳 (20-48 歳) であった。ステロイドの初期投与量はプレドニゾロン換算で平均 47mg/day、ステロイドパルス療法を受けた症例は 5 例であった。

アトルバスタチン非投与群として登録されたのは 28 例で、6 ヶ月以上経過を観察できているアトルバスタチン非投与群は 23 例 (男性 2 例女性 21 例) であった。平均年齢は 48 歳 (20-63 歳)、ステロイド初期投与量はプレドニゾロン換算で 1 日平均 46mg/day、ステロイドパルス療法を受けた症例は 6 例であった (表 1)。

表 1. 対象症例

	アトルバスタチン (+)	アトルバスタチン (-)
6ヵ月以上経過症例	21 (2:19)	23 (2:21)
平均年齢	36 ± 8.7	48 ± 15
ステロイド初期量	47 ± 12mg	46 ± 22mg
ステロイドパルス	5	6
アルコール愛飲歴	0	2
抗リン脂質抗体陽性	4	5

B. ION 発生率

ステロイド投与開始から 6 ヶ月以上を経過したアトルバスタチン非投与群では 23 例のうち 5 例で ION の発生を認めた。アトルバスタチン投与群 21 例での ION の発生は 4 例であった (表 2)。

ステロイド投与量、抗カルジオリピン抗体陽性症例数、パルス療法を施行した症例数に関して ION 発生の有無で有意差は認めなかった (表 3)。

表 2. ION 発生率

	アトルバスタチン (+) n=21	アトルバスタチン (-) n=23	p
ION 発生	4 (19%)	5 (22%)	*1

*Fisher's exact probability test

表3 . ION発生の有無での比較

	ION (+)	ION (-)
症例数(男:女)	9 (3:6)	35 (2:33)
平均年齢	37 ± 14	37 ± 12
ステロイド初期量	57 ± 31mg	44 ± 12mg
ステロイドパルス	1	6
アルコール愛飲歴	1	2
抗リン脂質抗体陽性	2	2

C. 血液生化学所見

1) ステロイド投与後の T-chol (図 1)

アトルバスタチン投与群および非投与群ともステロイド投与後の T-chol の平均値は有意に上昇し、両群間で有意差を認めなかった。

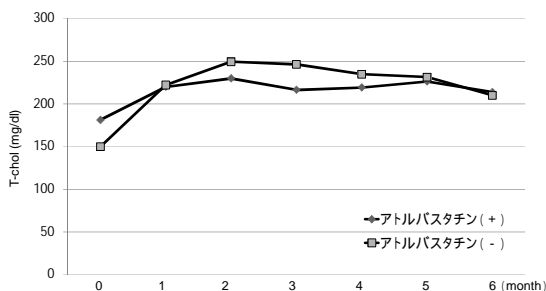


図1 . アトルバスタチンの有無とステロイド投与後T-chol

2) ION 発生の有無と血液生化学所見

ION 発生例では T-chol の平均値が ION 非発生例に比べて有意に高かった(図 2)。

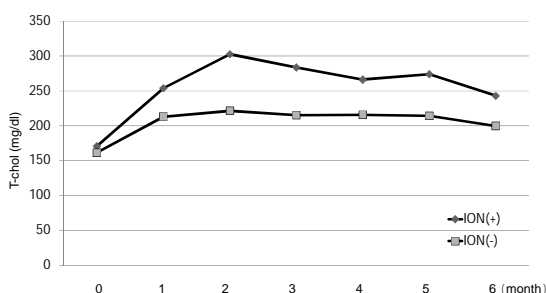


図2 . IONの発生とステロイド投与後T-chol

4. 考察

A. 本研究における ION 発生率

アトルバスタチンを投与した群での ION 発生率は 19%、アトルバスタチン非投与群では 22%であった。わが国の SLE 症例における ION の発生率は約 30%とされている⁶⁾。本研究での ION 発生率は

両群を合わせて 20%であり、以前の報告より低かった。これは、ION の危険因子とされるステロイドパルス療法の頻度が 44 例中 7 例(16%)と少ないことが関連している可能性がある。本研究では、症例数が少ない段階ではアトルバスタチン投与群の方が ION 発生率が少ない傾向を認めていた。症例数が増えると有意な差になると期待していたが、実際には症例数が増えるに従ってその傾向が低くなってきた印象である。そして、現段階でステロイド投与後の ION に対するアトルバスタチンの有意な予防効果を認めていない。

Pritchett らはスタチンを内服していた患者におけるステロイド投与後の ION 発生率が 1%程度であったとして、スタチンが ION を予防する可能性について報告した³⁾。しかしこれは prospective な研究であり、コントロール群が設定されていないためスタチンの効果を厳密には評価できていない。また、SLE 症例を ION のハイリスクとして対象から除外している点は本研究と大きく異なる。スタチンの開始時期もステロイドに先行していた症例を選択しており、ステロイドと同時にスタチンの投与を開始した本研究とは異なる。これらの点で厳密にスタチンの ION 予防効果を評価した本研究の結果と差異が生じている可能性がある(表 4)。

表4 . Pritchettの報告との比較

	本研究	Pritchett らの報告 (Clin Orthop. 2001)
研究デザイン	RCT (case:21, control:23)	Prospective study n=284 (controlなし)
対象症例	初回ステロイド治療を受けるSLE症例	SLEなどIONのリスクが高い基礎疾患をもつものは除外
スタチン開始時期	ステロイドと同時	ステロイド投与前から内服
スタチンのION予防効果	ION発生率19% 予防効果は有意ではない。	ION発生率1% 予防効果をもつ可能性が高いと推察

B. 血液生化学所見

アトルバスタチンを投与することによって T-chol の上昇はある程度抑制された。また、ION 発生症例ではステロイド投与後の T-chol が有意に上昇していた。脂質代謝異常が ION の発生に何らかの関連をもつ可能性や ION 発生症例でステロイドの薬理作用が増強している可能性は否定できない。

5. 結論

(1) 初回ステロイド治療を受ける SLE 症例を対象

にして、アトルバスタチンの ION 予防効果を多施設共同の Randomized controlled trial で検証した。

- (2) ION 発生率はアトルバスタチン非投与群で 22%, アトルバスタチン投与群で 19%であり, 両群間に有意差を認めなかった。
- (3) ION 発生例では非発生例に比べて T-chol が有意に高値を示した。
- (4) アトルバスタチン投与例ではステロイド治療開始後の T-chol 上昇をある程度抑制できた。
- (5) 基礎疾患, スタチンの開始時期によってステロイド性 ION に対するスタチンの予防効果が異なる可能性があると考えた。

6. 研究発表

1. 著書
なし
2. 研究発表
なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) 福島若葉, 廣田良夫ほか: 特発性大腿骨頭壊死症の全国疫学調査-中間報告-. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の標準化を目的とした総合研究. 平成 17 年度総括・分担研究報告書, 1-6, 2006.
- 2) Cui Q. et al. Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. Clin Orthop 344: 8-19, 1997.
- 3) Pritchett, JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. Clin Orthop Rel Res 386: 173-178, 2001.
- 4) Kubo T. et al. Initial MRI findings of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head

in renal allograft recipients. Magn Reson Imaging 15:1017-23, 1997.

- 5) Nagasawa K, Tada Y, Koarada S, et al: Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: prospective study by MRI. Lupus 14: 385-390, 2005.
- 6) 長澤浩平: ステロイド治療と骨壊死. 日本医事新報 4099: 19-25, 2002