

図5: NE 投与時の動脈圧、静脈圧、骨髄圧の変化

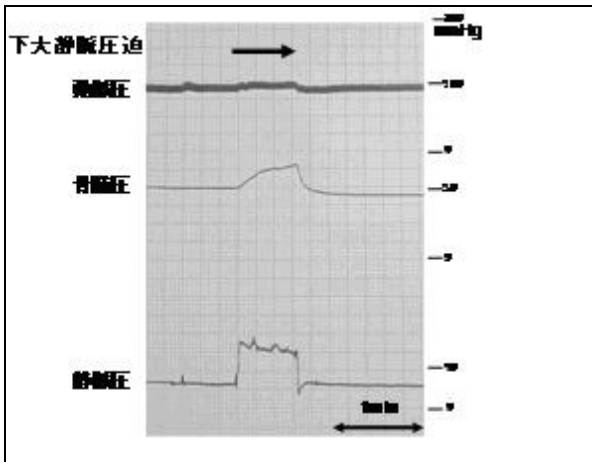


図6: 下大静脈圧迫時の動脈圧、静脈圧、骨髄圧の変化

実験2: 収縮期血圧が安定して 110mmHg 以上得られた兔を対象とした。代表的な圧波形を示す(図7)。ステロイド投与後 48 時間のものであるが、収縮期圧は 120 前後で安定、また静脈圧は 6~7mmHg でこれほどの兔でもほぼ同様の所見であった。また骨髄圧は計測開始(アンギオカテーテル挿入)から徐々に上昇し 10~15 分後に安定した。この例では骨髄圧は 85~95mmHg であった。

コントロール群 4 羽、ステロイド投与群は 24 時間が 3 羽、48 時間が 3 羽、72 時間が 3 羽、今回の研究対象とすることが出来た。結果をグラフに示す(図8)。コントロール群では骨髄内圧平均 59.25(50~65) mmHg、24 時間群では 53.3(40~65) mmHg、48 時間群では 84(75~90) mmHg、72 時間群では 55(50~60) mmHg と 48 時間群で骨髄内圧が高い傾向にあった。なお今回は対象が少なく、統計学的検討は行えなかった。

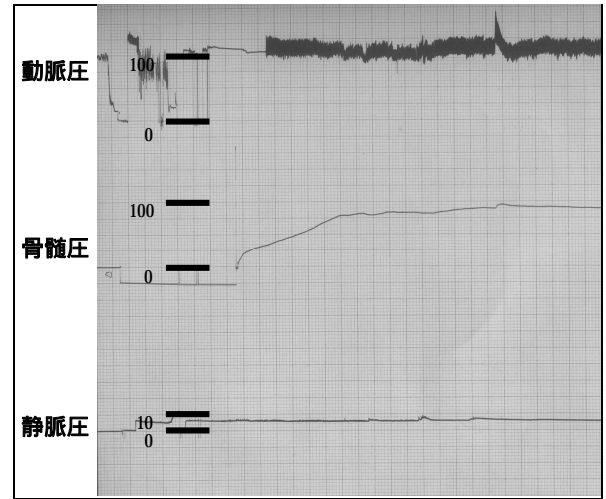


図7: 圧波形

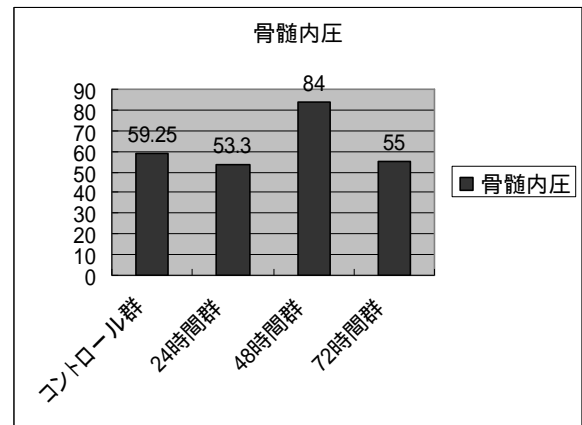


図8: 結果

実験3: 壊死発生率は開窓群で 8 羽中 2 羽(25%)、コントロール群で 8 羽中 6 羽(75%)であり、有意な差を認めた。つまり開窓によって骨髄内環境を変化させることで骨壊死発生率の低下を認めた。このことから骨髄が皮質骨によってシールドされている環境がステロイド性骨壊死発生率の誘因の一つになっている可能性が示唆された。

4. 考察

ステロイド性大腿骨壊死の原因として、大腿骨髄内の虚血発作との関連が示唆されている。柳下らは家兔では VEGF の発現がステロイド投与後 3 日で見出していると報告している⁷⁾。実際に骨髄内虚血が起こるにはそれ以前に何らかのイベントが必要であり、今回我々の研究では、家兔骨髄内圧がステロイド投与後 48 時間で上昇しており、これに矛盾しない結果であったと考える。また、骨髄内圧上昇の原因として、

酸化ストレスによる血管内皮障害などによる、血管透過性の亢進、これに伴う骨髄内のうっ血などが考えられる。特に骨髄内のうっ血に関しては、我々は動脈圧の上昇に比べ静脈圧の上昇で急峻な骨髄内圧の上昇を認めたことを確認している。

更に我々の疑問点である、なぜステロイド全身投与で壊死が骨にのみできるのか？といった問題がある。この理由として骨の解剖学的特徴、すなわち微小循環が類洞構造内で行われていることや、骨髄が皮質骨にシールドされており、閉鎖環境となっていることがあげられる。この皮質骨で閉鎖された環境を変化させることで骨髄内循環を変化させ、骨壊死発生に影響を与えるか検討した。その結果開窓によって壊死発生率が低下したことから、骨髄内循環の変化が生じていたことが推察された。ただし開窓によって臨床的に骨壊死予防効果があるといったことまでは現在考えておらず、また core decompression のように開窓によって治療を行うといったことも考えていない。

今回我々はステロイド性骨壊死発生の病態解析を行い、結果からは壊死発生の一因として骨の解剖学的特徴があげられること、また骨髄内の変化はステロイド投与後 48 時間と早期に生じていると考えた。

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

7. 参考文献

- 1) Sugano N et.al: Multicenter study of diagnostic criteria for nontraumatic osteonecrosis of the femoral head. J Bone Joint Surgery 81-B ;590-595, 1999
- 2) 柳下信一ほか: 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

電磁場刺激によるステロイド投与後骨壊死発生予防効果

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)

ステロイド投与後に好発するステロイド性骨壊死(骨壊死)には根本的な治療法や確実な予防法が確立されていない。骨壊死の原因はステロイド投与後に生じる骨内の虚血である。骨折治療に臨床利用されて安全性が確認されている電磁場刺激が、血管新生作用と血管拡張作用によって骨内の虚血を抑制し、骨壊死の発生率と重症度を低下させると仮説を立てた。ステロイドを単独投与した家兔を 40 羽、ステロイド投与の前後に電磁場刺激を与えた家兔を 40 羽として両群における骨壊死組織像を比較検討した。電磁場刺激を与えた家兔ではステロイド投与後の骨壊死発生率が有意に低下していた。一方で骨壊死の大きさなどその他の組織所見には電磁場刺激の有無による有意差を認めなかった。電磁場刺激は骨壊死の重症度を低下させる作用はない可能性があるが、骨壊死の発生率を低下させることを示した。電磁場刺激は、低侵襲なステロイド性骨壊死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の投与後に骨内が虚血に陥って発生すると考えられている。一方、骨折治療に広く臨床利用されてその安全性が確認されている電磁場刺激が、血管新生促進作用と血管拡張作用をもつことが確認されている^{1, 2)}。ステロイド投与に並行して電磁場刺激を与えることによって、骨内の虚血を抑制して骨壊死を予防する可能性があると考えた。本研究の目的は電磁場刺激がステロイド投与後骨壊死の発生率と重症度に対して影響を与えるかどうかを動物実験で検証することである。また、ステロイド投与後に生じる骨内虚血の原因のひとつと考えられている骨髄脂肪細胞径に対して電磁場刺激が与える影響も検討した^{3, 4)}。

2. 研究方法

90 羽の雌性日本白色家兔(28-32 週齢、3.2-4.3kg)を以下の 4 群に分けた。(1)ステロイド単独投与群(40 羽):1 週間飼育した後にメチルプレドニゾロン(methylprednisolone: MPSL)を筋注射し、4 週間飼育した。(2)ステロイド・電磁場刺激群(40 羽):電磁場刺激を 1 日 10 時間家兔の両殿部に与えた後、MPSL を殿筋内に 1 回筋注射した。MPSL 投与後も 1 日 10 時間の電磁場刺激を 4 週間与えた(図1)。(3)電磁場

刺激単独群(5 羽):家兔の両殿部に 1 日 10 時間の電磁場刺激を 5 週間与えた。(4)無処置群(5 羽):MPSL や電磁場刺激を与えずに 5 週間飼育した。

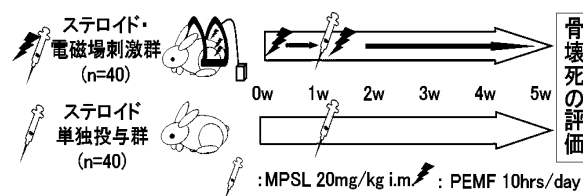


図1 ステロイド・電磁場刺激群とステロイド単独投与群

ステロイドはパルス療法に相当する 20mg/kg の MPSL を 1 回殿筋内に筋注射した⁵⁾。また、電磁場刺激は骨折の治療用に臨床利用されている EBI Bone Healing System[®] (Biomet Osteobiologics, Parsippany, NJ)を用いて発生させた。これはコイルに囲まれた領域に最大 25G の電磁場を 15Hz で発生させる装置である。家兔の両大腿に電磁場刺激が与えられるようにコイルを設置して、骨折治療における投与条件に準じて 1 日 10 時間電磁場刺激を与えた。電磁場刺激を投与し始めてから血管新生が認められるまで 1 週間を要するため、ステロイド投与 1 週間前から電磁場刺激の投与を開始した¹⁾。

骨壊死の有無を判定する組織学的検討は、MPSL

投与から4週後に行った。各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、大腿骨の近位 1/3 と遠位 1/3 を採取した。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た。

全ての組織学的な評価は盲検化して二人の検者が行った。今までの報告に従って、骨髓造血細胞と脂肪細胞の壊死を伴う骨梁内骨細胞の核の濃縮あるいは空胞化を呈する領域と、骨梁が存在しない部位でも骨髓造血細胞と脂肪細胞の広範な壊死を認める領域を骨壊死と判定した。骨細胞の空胞化と脂肪細胞の壊死のみを認め、骨髓造血細胞の壊死を認めない領域は骨壊死と判定しなかった。大腿骨の組織標本中に一つでも骨壊死領域を認めた家兎は骨壊死発生家兎とした⁵⁾。

まず、電磁場刺激の骨壊死予防効果を判定するためにステロイド単独投与群とステロイド・電磁場刺激群の骨壊死発生率を比較した。

次に骨壊死発生家兎を対象にして、骨壊死の重症度に影響を与える因子について検討した。ステロイド性骨壊死が多発することを電磁場刺激が抑制するかどうかを検討するために各群の骨壊死発生家兎 1羽あたりの骨壊死数を大腿骨近位 1/3 と遠位 1/3 で評価した。

電磁場刺激が骨壊死の大きさに対して影響を与えるかどうかを調べるために、骨壊死の面積占有率を測定した。骨壊死の占有率は大腿骨近位 1/3 での骨壊死領域の面積を測定し、大腿骨近位 1/3 の面積に対する割合を算出して求めた。面積は顕微鏡からコンピューターに取り込んだ画像を NIH image software (US National Institutes of Health, Maryland)を用いて算出した。修復部は壊死組織には含めなかった⁵⁾。

電磁場刺激の骨壊死予防効果に部位による差異があるかどうかを検討するために、大腿骨近位 1/3 および遠位 1/3 のそれぞれで骨壊死を発生した家兎数を比較した。

電磁場刺激が骨壊死の修復に影響するかどうかを確認するために、大腿骨組織標本で骨壊死修復反応としての添加骨形成の有無を比較した。

骨髓脂肪細胞に電磁場刺激が与える影響を評価するためにステロイド単独投与群とステロイド・電磁場刺激群における骨髓脂肪細胞径を算出して比較した。骨髓脂肪細胞径は、右大腿骨近位 1/3 の非壊死領域からランダムに選択した 4 部位(1 部位 = $25 \times 10^{-8} \text{m}^2$)の 25 個ずつの骨髓脂肪細胞の長径を

NIH image software 測定した平均値とした⁶⁾。

統計学的検討は骨壊死発生率と部位ごとの骨壊死発生家兎数の比較を²⁾検定、家兎 1 羽あたりの骨壊死発生数の比較を Mann-Whitney U test、骨壊死の占有率の比較を unpaired t test、脂肪細胞径の比較を One-way analysis of variance と Scheffe's post hoc test で判定した。p<0.05 を統計学的有意とした。

3. 研究結果

ステロイド単独投与群 40 羽中 26 羽(65%)に骨壊死を認めた。一方、ステロイド・電磁場刺激群で骨壊死を認めたのは 40 羽中 15 羽(37.5%)であった。両群の骨壊死発生率に有意差を認めた(p=0.01)。また、電磁場刺激単独群、無処置群では骨壊死の発生を認めなかった。

続いて骨壊死を生じていた家兎における多発性についての検討を行った。骨壊死発生家兎 1 羽あたりの骨壊死発生数はステロイド単独群で 1.1 ± 0.3 個、ステロイド・電磁場刺激群で 1.2 ± 0.2 個であり、有意差を認めなかった。

大腿骨の近位 1/3 と遠位 1/3 での骨壊死発生家兎数についての検討では、大腿骨近位で骨壊死を発生した家兎はステロイド単独投与群の 26 羽中 15 羽(58%)、ステロイド・電磁場刺激群の 15 羽中 10 羽(67%)であり、大腿骨遠位に骨壊死が発生していた家兎はステロイド単独投与群では 26 羽中 14 羽、ステロイド・電磁場刺激群では 15 羽中 8 羽であった。部位ごとの骨壊死発生家兎数で両群間に有意差を認めず、電磁場刺激の部位による骨壊死予防効果の差異は確認できなかった。

骨壊死の大きさに関する検討を行った。骨壊死の大腿骨近位 1/3 における面積占有率は、ステロイド単独投与群では $2.8 \pm 1.9\%$ 、ステロイド・電磁場刺激群では $2.7 \pm 1.8\%$ であり、両群間に有意差を認めなかった。

修復過程について、ステロイド単独投与群およびステロイド・電磁場刺激群ともに添加骨形成を認めなかった。

骨髓脂肪細胞径はステロイド単独投与群で $61.0 \pm 4.5 \mu\text{m}$ 、ステロイド・電磁場刺激群で $56.9 \pm 5.4 \mu\text{m}$ 、電磁場刺激単独群で $46.1 \pm 3.4 \mu\text{m}$ 、無処置群で $47.6 \pm 3.0 \mu\text{m}$ であった。ステロイド単独投与群は無処置群に比べて有意に骨髓脂肪細胞径が増大していた(p<0.01)。また、電磁場刺激の有無で

は脂肪細胞径に有意差を認めなかった(p=0.43)。

4. 考察

われわれは電磁場刺激が骨壊死の発生率、多発性、大きさ、発生部位、修復過程、また、骨壊死の発生機序の一つと考えられている骨髄脂肪細胞径に与える影響について検証した。

その結果、電磁場刺激が家兎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電磁場刺激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。

家兎の骨壊死は、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兎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。電磁場刺激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。

また、今回の研究においては、電磁場刺激は骨壊死の個体あたりの発生数、大きさおよび発生部位に影響を与えず、修復を促進する所見も認めなかった。電磁場刺激を骨壊死の治療に用いた臨床研究においても、その効果は評価が一定しておらず^{8, 9)}、電磁場刺激が骨壊死の修復反応や、重症度には関連しない可能性がある。

骨壊死の発生に関与すると考えられている骨髄脂肪細胞径に対しては電磁場刺激の明らかな影響を認めなかった。今回の研究では電磁場刺激が骨壊死発生率を低下させる機序については明らかにできなかったが、電磁場刺激の持つ血管新生促進作用や血管拡張作用がステロイド投与後の骨内虚血を抑制して骨壊死率を低下させたと推察した。

5. 結論

本研究は電磁場刺激が家兎の骨壊死発生率を低下させることをはじめて示した。すでに臨床利用されている電磁場刺激を用いた研究結果であり、電磁場刺激はヒトのステロイド性骨壊死に対する予防法としても有望であると考えらる。

6. 研究発表

1. 論文発表

Ishida M, Fujioka M, Takahashi K, Arai Y, Kubo T. Electromagnetic Fields: A Novel Prophylaxis for Steroid-induced Osteonecrosis, Clin Orthop Relat Res, 466(5):1068-73,2008

2. 学会発表

石田雅史、藤岡幹浩、栗林正明、高橋謙治、新井祐志、久保俊一：電磁場刺激によるステロイド性骨壊死予防効果、第22回日本整形外科学会基礎学術集会、浜松、2007.10.25-26.

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) Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, Galiano RD, Bhatt KA, Baharestani S, Gan J, Simon B, Hopper RA, Levine JP, Gurtner GC. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2. FASEB J. 2004;18:1231-1233.
- 2) Smith TL, Wong-Gibbons D, Maultsby J. Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields. J Orthop Res. 2004;22:80-84. Wang GJ, Lennox DW, Reger SI, Stamp WG, Hubbard SL. Cortisone-induced intrafemoral head pressure change and its response to a drilling decompression method. Clin Orthop Relat Res. 1981;159:274-8.
- 3) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Rheumatology (Oxford). 2001;40:196-201.
- 4) 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;30:185-190.

- 5) Yamamoto T, Irida T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum*. 1997;40:2055-2064.
- 6) Shaw SL, Salmon ED, Quatrano RS. Digital photography for the light microscope: results with a gated, video-rate CCD camera and NIH-image software. *Biotechniques*. 1995;19:946-955.
- 7) Steinberg ME, Brighton CT, Bands RE, Hartman KM. Capacitive coupling as an adjunctive treatment for avascular necrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;261:11-18.
- 8) Massari L, Fini M, Cadossi R, Setti S, Traina GC. Biophysical stimulation with pulsed electromagnetic fields in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:56-60.

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一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髓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⁾。骨髓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.

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実験

- 第2報 -

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)

前回我々は、日本白色家兎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。10羽で検討を行ったが前回は8羽までしか結果が出ていなかった。最終的には10羽中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。また抗8-OHdG抗体による免疫組織学的検討を行ったところ、酸化ストレス剤投与群で有意にその発現が亢進していた。血液学的検討では10羽全羽に高脂血症は呈しておらず、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⁾。免疫組織学的検討として、骨内での酸化ストレスの発生を確認するため、免疫組織学的に抗8-hydroxy-2'-deoxy-guanosineモノクローナル抗体(以下、抗8-OHdG抗体)を用いて各群の大腿骨の染色性について検討した。相対的に定量化するために大腿骨近位骨幹部における骨壊死周囲の組織を無作為に3視野選び、全細胞数に対する陽性細胞数の割合を算出し、陽性細胞率(%PC)として各群において比較検討を行った。

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

病理組織学的検討において、CTR群は、10羽全例で骨壊死を認めなかった。BSO群では、10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)。

免疫組織学的検討において、BSO群はCTR群と比較して骨髄造血細胞における抗8-OHdG抗体の

発現が明らかに亢進していた。%PC は CTR 群 $7.6 \pm 2.8\%$ 、BSO 群 $16.6 \pm 2.5\%$ であり、統計学的に有意差を認めた ($p < 0.05$)。 (図 2a,b,c)

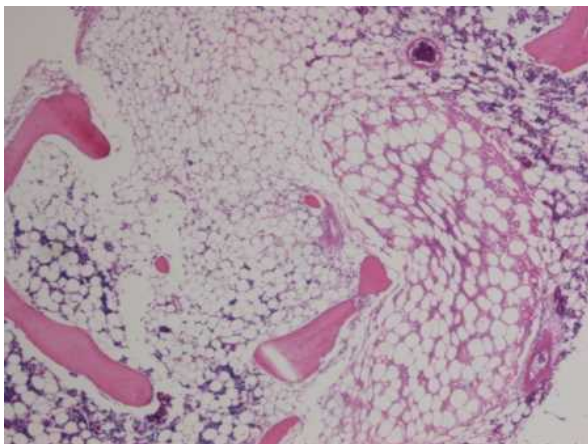


図 1: BSO 群(H-E 染色)

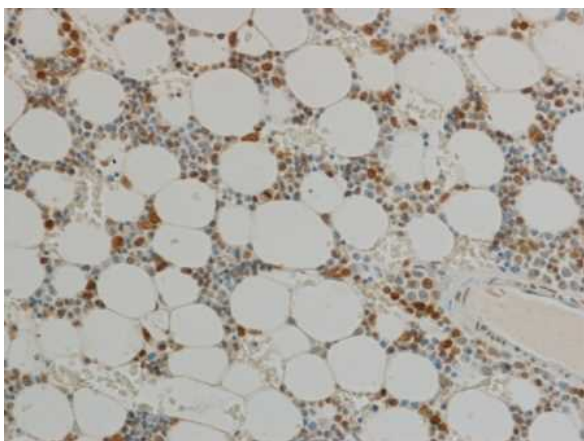


図 2a: BSO 群(免疫染色)

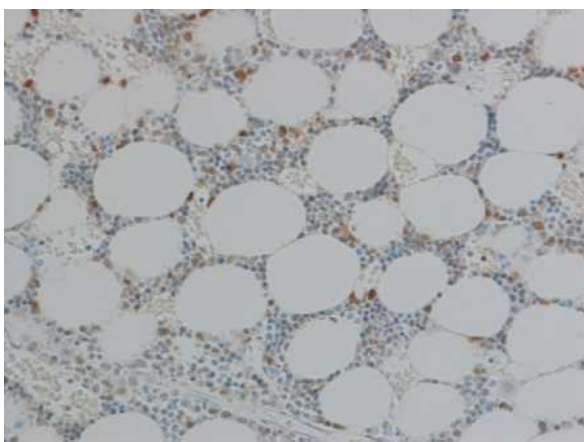


図 2b: CTR 群(免疫染色)

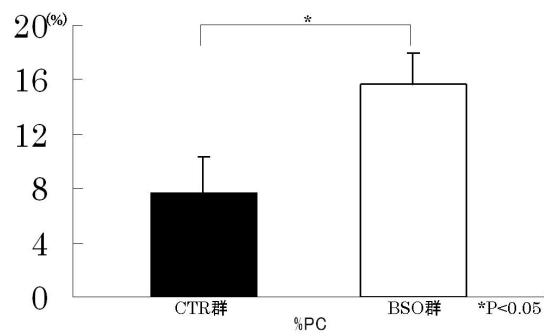


図 2c:陽性細胞率(%PC)

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 3)。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 4、図 5) 脂質代謝異常は生じていないと考えられた。

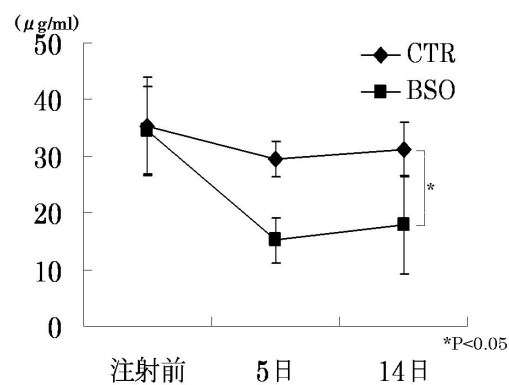


図 3: GSH

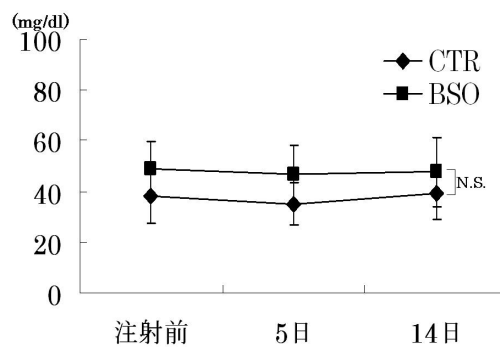


図 4: T-cho

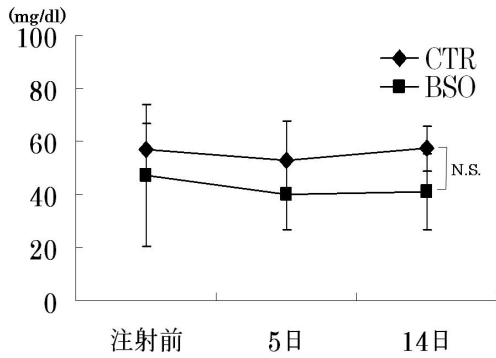


図 5: TG

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10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
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) 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

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染色標本を作製し、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バ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、酸化還元バランスが崩れ、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、更に酸化還元バランスが崩壊し、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：ステロイド投与家兔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.

酸化誘発剤の単回投与によるラットにおける病理組織学的検討

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

我々は、これまで酸化ストレスが骨壊死発生に関与していることを報告してきた。今回、酸化誘発剤を使用したラットモデルの改良を試み、buthionine sulphoximine (BSO)を単回投与することでラットに骨壊死ができるか検討した。

1. 研究目的

ステロイド性骨壊死の発生機序については諸説報告されているが、当科ではこれまで酸化ストレスに注目して研究を行ってきた。当科ではステロイド投与家兎を用いた研究で大腿骨内ではステロイド投与後3日から5日の間に酸化ストレスが発生していること、ステロイド投与後に抗酸化剤として還元型グルタチオン(以下 GSH)を投与することにより骨壊死が抑制できることを報告した¹⁻²⁾。

これらの結果からステロイド投与後に酸化ストレスが発生し骨壊死につながるものと考え、家兎およびラットに対する酸化誘発剤 (Buthionine Sulfoximine : 以下 BSO) を14日間連続皮下投与することで骨壊死の発生を確認した³⁻⁴⁾。

しかしこれらのモデルではBSOを14日間連続投与しているため、実際に骨壊死が一度のみの酸化ストレス曝露で発生するものなのか、また虚血などのイベントはいつ起こっているのかが不明瞭であった。また今後投与量の増加などを考慮した場合、皮下投与では限界がある。そこで今回我々はラットの腹腔内に酸化誘発剤を単回投与することにより骨壊死の発生および発生時期について検討した。

2. 研究方法

24週齢のWister系ラットにBSO500mg/kgを1回のみ腹腔内投与した29匹をB群、7日間連続で腹腔内投与した6匹を7B群とした。BSO投与当日を0日とし、B群のうち投与後1日目、3日

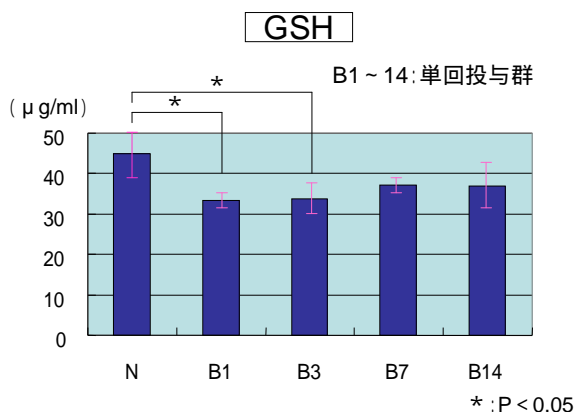
目、7日目、14日目に腹部大動脈から採血を行った後に犠牲死としたものをそれぞれB1(5匹)、B3(5匹)、B7(10匹)、B14(9匹)群として両大腿骨を取り出した。7B群は初回投与を0日とし、7日目にB群と同様に犠牲死として大腿骨を取り出した。腹腔内に生理食塩水を一回のみ投与し7日目、14日目に犠牲死とした各5例をN群とし検討に加えた。

病理組織学的検討としてH-E染色標本作製し、大腿骨頭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学的定義に基づき検討した⁵⁾。また、酸化の指標として還元型グルタチオン(以下、GSH)を測定した。

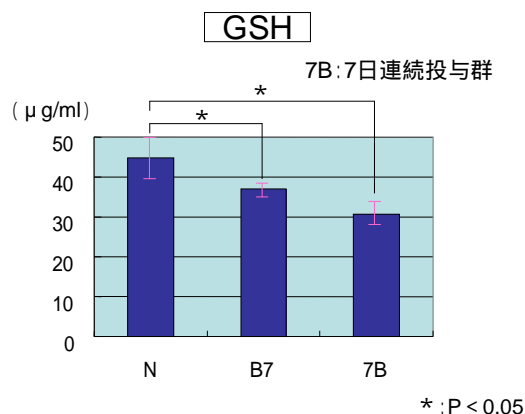
3. 研究結果

GSHは、B1・B3・B7・14群ではN群に比べ低下していた($p<0.05$)(図1)。またB7群に比べ7B群ではGSHの低値を認めていた(図2)。

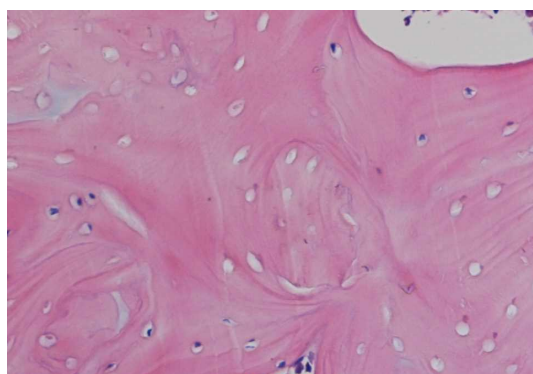
病理組織学的検討において、N群では骨壊死を認めなかった。同様にB1群、およびB3群でも骨壊死は認めなかった。B7群において10匹中4匹の大腿骨頭にempty lacunaeを認め骨壊死と判断した。B14群で9匹中3匹、7B群では6匹中2匹で同様にempty lacunaeを認め、いずれも30~40%に骨壊死が発生していた(図3)。



(図 1)



(図 2)



(図 3)

各群の骨壊死発生率

	1日	3日	7日	14日
B群	0 / 5	0 / 5	4 / 10 (40%)	3 / 9 (33%)
7B群			2 / 6 (33%)	
14日皮下群 ³⁾				3 / 7 (42%)

(表 1)

4. 考察

これまでに行ったラットにBSOを14日間連続皮下投与した実験では7匹中3匹(42%)に大腿骨頭部の骨壊死を認めており³⁾、今回行ったBSO単回投与B7群とほぼ同様な発生率だった。また各群の壊死発生率についてはいずれも30~40%であり、BSOの投与回数を増やすことによる骨壊死発生の増加は認めなかった。B7群、B14群間でも発生率の有意差はなかった(表1)。

このことより、骨壊死に至る虚血等のイベントは、単回の酸化ストレス曝露のみで7日目までに発生し得ることがわかった。ラットでは、Osteocyteのアポトーシスは虚血から12時間ではじまり、96時間でempty lacunaeが出現したとの報告があり、諸家の報告でもおおむね4日~5日で核の消失が見られるとの報告が見られる⁶⁻⁸⁾。すなわち、今回のモデルで最初に骨壊死が確認さ

れた7日目より逆算すると、BSO投与から3日目ころまでに骨壊死にいたるイベントが起こっていると推察できる。すなわち、薬剤投与から3日目ごろまでを重点的に検索することが壊死の発生過程の原因解明につながると考えた。

5. 結論

ラットに酸化誘発剤を単回投与することで、ラットの大腿骨頭に骨壊死の発生を認めた。単回投与と連日投与で壊死発生率は変わらなかった。薬剤投与後7日で約40%の骨壊死を認めたことから、骨内のイベントは酸化誘発剤投与から3日目頃までに発生していることが推察された。

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) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, Katsuda S. Oxidative stress and Vascular Permeability in steroid-induced osteonecrosis model. J Orthop Sci 9: 509-515, 2004
- 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. 金沢医科大学雑誌 30: 245-52, 2005
- 3) Ichiseki T, Ueda Y, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione Depletion induced osteonecrosis in rats. Rheumatology. 45: 287-290, 2006
- 4) 三秋恒平. 日本白色家兔に対する酸化ストレス誘発剤を用いた骨壊死誘発実験. 金沢医科大学雑誌 31: 1-6, 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) Sato M, Sugano N, Ohzono K, Nomura S, Kitamura Y, Tsukamoto Y, Ogawa S. Apoptosis and expression of stress protein(ORP150, HO1) during development of ischaemic osteonecrosis in the rat. J.Bone and Joint Surg. 83-B(5): 751-759, 2001
- 7) Mary Catto. A Histological Study of Avascular Necrosis of the Femoral fracture. J.Bone and Joint Surg. 47-B(4): 749-776, 1965
- 8) 辻宗啓, 松野丈夫, 伊藤浩, 寺西正, 池田 仁, 吉木敬. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死

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)

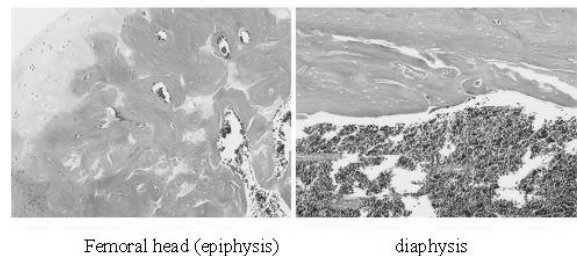
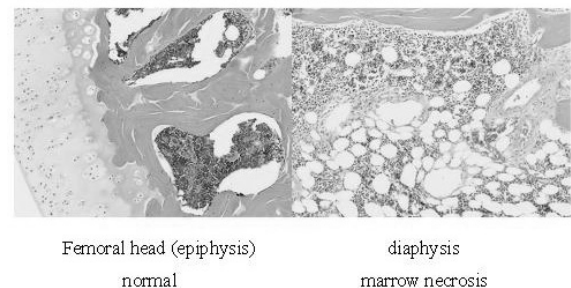


図2 1000mg/kg/day x 1 day, post 14 days sacrifice (HE x100)



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%)。