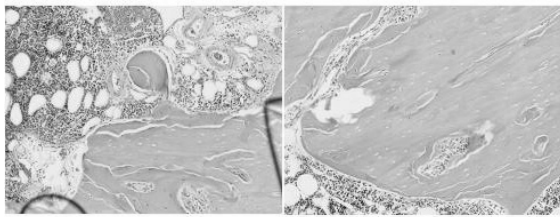


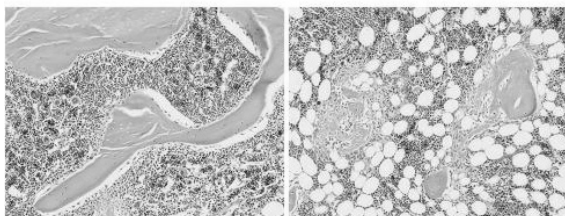
図3 1000mg/kg/day x 1day, post 14 days sacrifice (HE x100)



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

マウス骨細胞アポトーシスにおける p53 の関与

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の研究において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、その結果として細胞死に至る可能性を報告した。また p53 が骨細胞アポトーシスに関与している可能性を報告した。今年には p53 の役割についてさらに詳細に検討した。

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。

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。またこのとき結紮遠位部で p53, TRAILR2/DR5, Bax などのアポトーシス関連遺伝子が上昇することを明らかにした。本年の研究班では p53 の役割についてさらに検討した。

2. 研究方法

MLO-A5 細胞を用いた検討

マウス前骨細胞株細胞 MLO-A5 細胞は Lynda Bonewald 博士 (University of Missouri, School of Dentistry) から提供された。遺伝子の導入はアデノウイルスベクターによっておこなった。P53 を発現するアデノウイルスベクターは齋藤らの方法を用いて構築した。

3. 研究結果

アデノウイルスベクターを用いて MLO-A5 細胞に p53 遺伝子を強発現することが可能であった。このとき MLO-A5 細胞において Caspase-7 の活性化が見られ、形態的にもアポトーシスが生じていた。また TRAILR2, Bax 発現の誘導も観察された。

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、尾部結紮再還流による骨壊死動物モデルを作成し、昨年の本研究班で結紮遠位部において p53 の発現が上昇することを報告した。今回は前骨細胞株細胞 MLO-A5 を用いて、p53 の過剰発現がアポトーシスを誘導することを明らかにした。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

マウス結紮再還流による骨壊死モデルにおける p53 発現誘導は骨細胞アポトーシスに関与している可能性が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 2007, 9:382-396.
- 2) Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone.* 2007, 40:68-74.
- 3) Suematsu A, Tajiri Y, Nakashima T, Taka J, Ochi S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S, Takayanagi H. Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2007, 17:17-23.
- 4) Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, Niida S, Nakajima T, Tanaka S, Ito M, Karsenty G, Ikeda K. -glutamyltransferase as a pathogenic factor of bone and joint disease. *Endocrinology* 2007, 48:2708-2715.
- 5) Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, Shinoda Y, Kawasaki Y, Ogata N, Hoshi K, Akiyama T, Chen WS, Hay N, Tobe K, Kadowaki T, Azuma Y, Tanaka S, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. 2007. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. *PLoS ONE* 2007, 2:e1058.
- 6) Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Itabe H, Nakayama KI, Nakayama K, Tanaka S. Negative feedback loop in the Bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2007, 22:1631-1639.
- 7) Miyazaki T, Yamamoto S, Tanaka S. Molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis. *Future Rheumatology* 2007, 2:61-72.
- 8) Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the

RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol* 2007, 27:466-478.

- 9) Hikita A, Tanaka S. Ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *Adv Exp Med Biol.* 2007;602:15-21.

2. 学会発表

- 1) A New York Academy of Sciences Meeting "Skeletal development and remodeling in health, disease & aging" (2007.5.18-21) New York: Session I, BONE CELL FORMATION AND FATE "Regulation of the life and death of the osteoclast"
- 2) 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research ANZBMS-JSBMR, Joint Symposium 1-4(2007.7.20) "Role of Bcl-2 Family on Skeletal Integrity"
- 3) 第80回日本整形外科学会学術集会 (2007.5.24) 教育研修講演「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
- 4) 第80回日本整形外科学会学術集会 (2007.5.24) パネルディスカッション7:生物学的製剤の功罪と外科療法「生物学的製剤時代の関節破壊と骨破壊制御」
- 5) 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19年度 第1回会議 研究成果報告会(2007.7.7)京都 「マウス骨壊死モデルの解析」
- 6) 日本内分泌学会サマーセミナー (2007.7.17) "Molecular biology of the skeletal development" Overview
- 7) 第33回リウマチ中央教育研修会(2007.7.28)「関節リウマチの骨・軟骨破壊」
- 8) 第28回 日本炎症・再生医学会(2007.8.3)ワークショップ15「新規分子を標的とした炎症制御」
- 9) 第22回 日本整形外科学会基礎学術集会 (2007.10.25)浜松 シンポジウム2 骨免疫学「関節リウマチにおける骨破壊の機序」
- 10) 平成19年度 リウマチ・アレルギー相談員養成研修会(2007.11.7)新宿 「リウマチの外科治療・リハビリ」
- 11) 第35回日本リウマチ・関節外科学会(2007.11.9) シンポジウム1 人工膝関節の機種選択と限界

- 「コンピューターナビゲーションシステムの関節リウマチ患者 TKA における有用性とその問題点」
- 12) 第 8 回日本整形外科学会認定リウマチ医研修会 (2007.11.25) 東京 「関節リウマチ骨破壊の制御」
- 13) 第 1 回骨・軟骨フロンティア (2007.12.1) 東京 一般演題3 「骨軟骨における細胞死の制御」

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

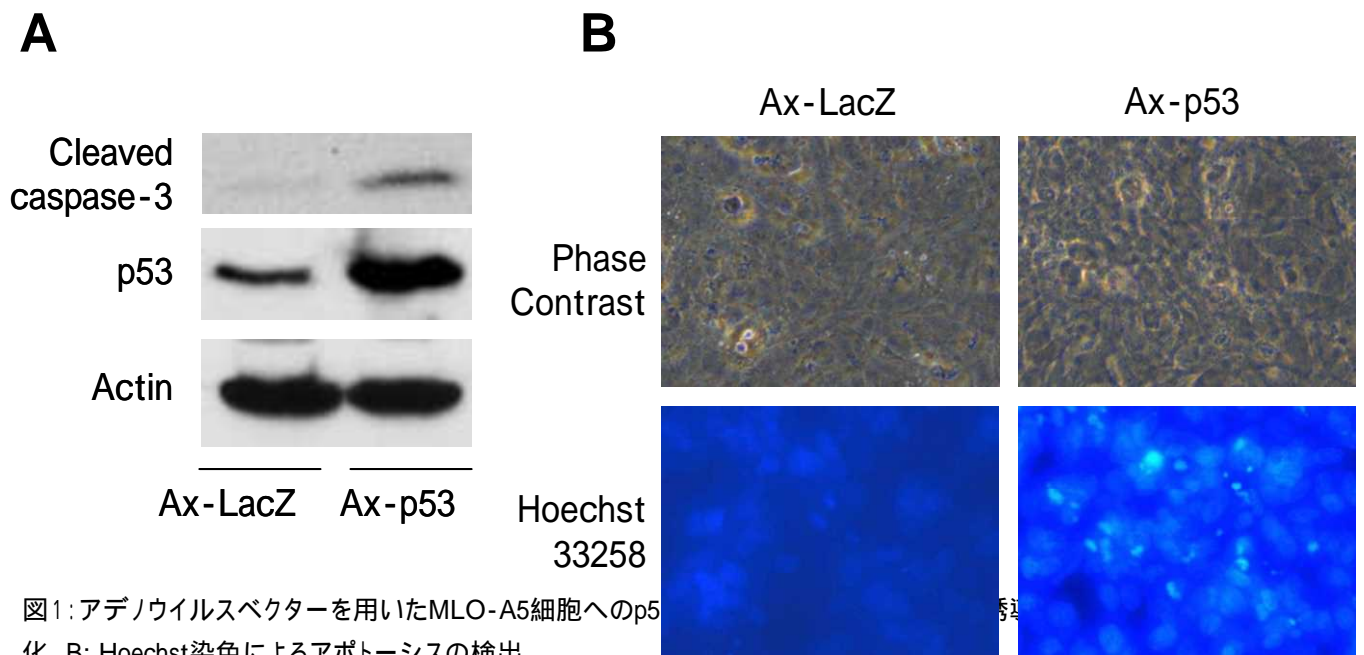


図1: アデノウイルスベクターを用いたMLO-A5細胞へのp53誘導による細胞死の検出。 A: Western blotによるCleaved caspase-3, p53, Actinの検出。 B: Phase ContrastおよびHoechst染色による細胞死の検出。

マウス骨壊死モデルの作成とその解析

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 (idiopathic osteonecrosis of the femoral head, ION) 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。われわれは本研究班においてマウス尾部結紮による新しい骨壊死モデルの作出に成功した。本モデルは ION の病理組織像を再現するという意味で優れたモデルである。本モデルを用いて骨細胞アポトーシスにおいて p53 遺伝子の発現が重要な役割を果たすことを明らかにした。本モデルを用いてシンバスタチンが骨細胞アポトーシスおよび骨壊死を抑制することを明らかにした。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。

われわれは本研究班においてマウス尾部結紮・再還流モデルにおいて結紮遠位部で p53, TRAILR2/DR5, Bax などのアポトーシス関連遺伝子が上昇することを明らかにした。今回は研究班では p53 の役割についてさらに検討した。またシンバスタチンが骨細胞アポトーシス、empty lacunae の形成、p53 遺伝子発現に及ぼす作用を検討した。

2. 研究方法

p53 の骨細胞に対する役割

マウス前骨細胞株細胞 MLO-A5 細胞は Lynda Bonewald 博士 (University of Missouri, School of Dentistry) から提供された。遺伝子の導入はアデノウイルスベクターによっておこなった。P53 を発現するアデノウイルスベクターは斎藤らの方法を用いて構築した。

マウス尾部結紮モデルにおけるシンバスタチンの作用

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群を作成して骨細胞のアポトーシス、empty lacunae 形成、p53 発現に対する作用を検討した。

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

アデノウイルスベクターを用いて MLO-A5 細胞に p53 遺伝子を強発現することが可能であった。このとき MLO-A5 細胞において Caspase-7 の活性化が見られ、形態的にもアポトーシスが生じていた(図1)。また TRAILR2, Bax 発現の誘導も観察された。

シンバスタチンを用いた研究において、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(図2)。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2)。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。

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、尾部結紮再還流による骨壊死動物モデルを作成し、これまでの本研究班で報告してきた。今回は前骨細胞株細胞MLO-A5を用いて、p53の過剰発現がアポトーシスを誘導することを明らかにした。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。

また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p53の上昇が骨細胞アポトーシスに重要な役割を果たしている可能性がある。また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) 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. 2007, 9:382-396.
- 2) Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk

pathways negatively regulate matrix mineralization. Bone. 2007, 40:68-74.

- 3) Suematsu A, Tajiri Y, Nakashima T, Taka J, Ochi S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S, Takayanagi H. Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol 2007, 17:17-23.
- 4) Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, Niida S, Nakajima T, Tanaka S, Ito M, Karsenty G, Ikeda K. γ -glutamyltransferase as a pathogenic factor of bone and joint disease. Endocrinology 2007, 48:2708-2715.
- 5) Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, Shinoda Y, Kawasaki Y, Ogata N, Hoshi K, Akiyama T, Chen WS, Hay N, Tobe K, Kadowaki T, Azuma Y, Tanaka S, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. 2007. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. PLoS ONE 2007, 2:e1058.
- 6) Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Itabe H, Nakayama KI, Nakayama K, Tanaka S. Negative feedback loop in the Bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. J Bone Miner Res 2007, 22:1631-1639.
- 7) Miyazaki T, Yamamoto S, Tanaka S. Molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis. Future Rheumatology 2007, 2:61-72.
- 8) Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. Am J Nephrol 2007, 27:466-478.
- 9) Hikita A, Tanaka S. Ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. Adv Exp Med Biol. 2007;602:15-21.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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) A New York Academy of Sciences Meeting “Skeletal development and remodeling in health, disease & aging” (2007.5.18-21) New York: Session I, BONE CELL FORMATION AND FATE “Regulation of the life and death of the osteoclast”
 - 2) 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research ANZBMS-JSBMR, Joint Symposium 1-4(2007.7.20) “Role of Bcl-2 Family on Skeletal Integrity”
 - 3) 第 80 回日本整形外科学会学術集会 (2007.5.24) 教育研修講演「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
 - 4) 第 80 回日本整形外科学会学術集会 (2007.5.24) パネルディスカッション7:生物学的製剤の功罪と外科療法「生物学的製剤時代の関節破壊と骨破壊制御」
 - 5) 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 19 年度 第 1 回会議 研究成果報告会(2007.7.7)京都 「マウス骨壊死モデルの解析」
 - 6) 日本内分泌学会サマーセミナー (2007.7.17) ”Molecular biology of the skeletal development” Overview
 - 7) 第 33 回リウマチ中央教育研修会(2007.7.28) 「関節リウマチの骨・軟骨破壊」
 - 8) 第 28 回 日本炎症・再生医学会(2007.8.3) ワークショップ15 「新規分子を標的とした炎症制御」
 - 9) 第 22 回 日本整形外科学会基礎学術集会 (2007.10.25) 浜松 シンポジウム2 骨免疫学 「関節リウマチにおける骨破壊の機序」
 - 10) 平成 19 年度 リウマチ・アレルギー相談員養成研修会(2007.11.7) 新宿 「リウマチの外科治療・リハビリ」
 - 11) 第 35 回日本リウマチ・関節外科学会 (2007.11.9) シンポジウム1 人工膝関節の機種選択と限界「コンピューターナビゲーションシステムの関節リウマチ患者 TKA における有用性とその問題点」
 - 12) 第 8 回日本整形外科学会認定リウマチ医研修会(2007.11.25) 東京 「関節リウマチ骨破壊の制御」
 - 13) 第 1 回骨・軟骨フロンティア(2007.12.1) 東京 一般演題3 「骨軟骨における細胞死の制御」
 - 14) 2nd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems
 - 15) (2008.7.11) Rhodes, Greece, Session V Basic Concepts into osteoimmunology: Osteoclasts “Regulation of Skeletal Homeostasis by Bcl-2 family”
 - 16) 5th Meeting of Bone Biology Forum (2008.8.22) Fuji, Session 5 “Regulation of osteoclast apoptosis”

- 17) 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」
- 18) 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」
- 19) 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 ラン
チョンセミナー13(2008.4.22) 「骨吸収を標的に
した関節リウマチ治療戦略」
- 20) 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」
- 21) 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」
- 22) 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」

3. 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

4. 参考文献

なし

Hoechst
33258

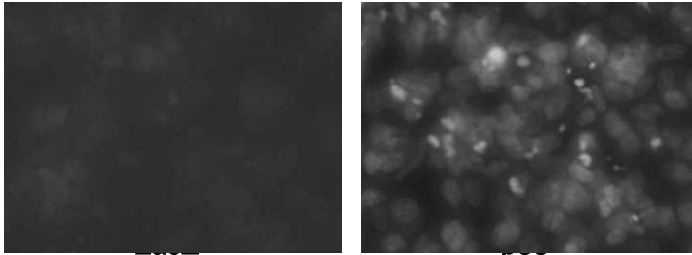
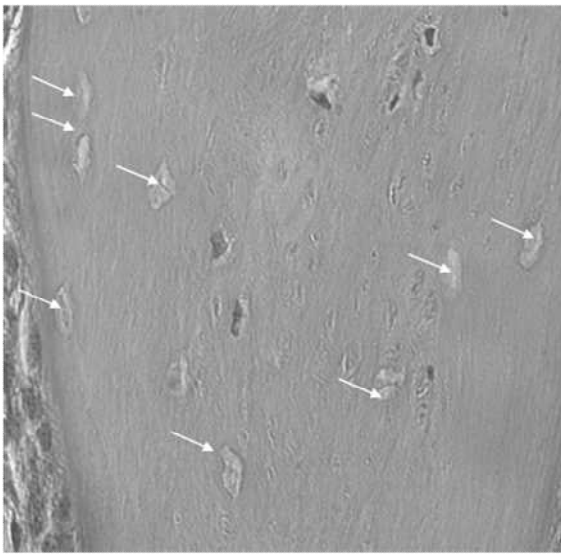
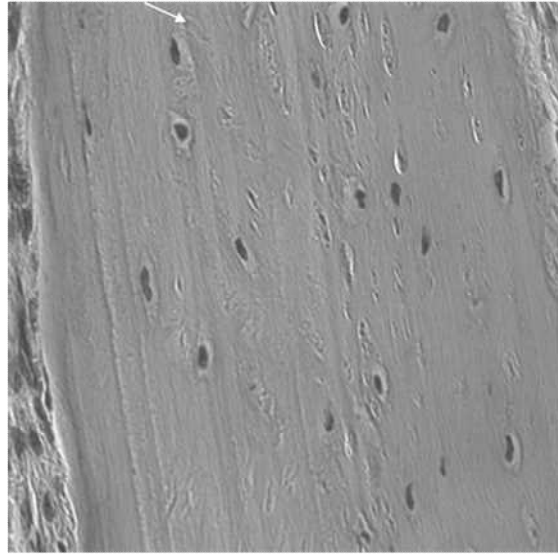


図1: アデノウイルスベクターを用いたMLO-A5細胞へのp53過剰発現によるアポトーシス誘導。Hoechst染色によるアポトーシスの検出。



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: 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

ラットの大腿骨頭壊死モデル作製

名越 智、岡崎俊一郎、加谷光規、館田健児、佐々木幹人、山下俊彦(札幌医大整形外科)

大腿骨頭壊死症に対する動物モデルは家兎を用いたものが主体で、人に発生する骨壊死と発生部位に違いが見られる。動物の扱いやすさからみると、小動物での大腿骨頭壊死のモデルが有用と考えられる。我々は、Wistar 系雄ラットに LPS、ステロイドを投与することにより人の大腿骨頭壊死症に類似した大腿骨頭壊死が大腿骨近位骨端部に生じることがわかり、人の骨壊死発生部位に極めて類似しており、今後の疾患の機序解明モデルとして有用であると考えられた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症の発生要因に大量投与されたステロイドが挙げられている。その発生機序はまだ明らかではなく、人に発生する骨壊死と発生部位、病理組織が類似する動物モデルの開発が必要である。従来の動物モデルは、家兎での報告¹⁻⁴⁾が多く、骨壊死は生じるものの、壊死の部位が必ずしも骨端部ではなく、人での大腿骨頭壊死の発生様式とは異なることが多い。また、動物の扱いやすさを考えると、より小動物におけるモデルの作製が必要と考えられる。当科では、ステロイド投与を受ける疾患に SLE などの炎症性疾患が多いことに着目し、大腿骨頭壊死ラットモデルの作成を試みた。

2. 研究方法

Wistar 系雄ラット 10 週齢を用い、LPS 1.0mg/kg を 24 時間間隔で 2 回尾静脈より静注した。さらに methylprednisolone 20mg/kg を 24 時間間隔で 3 回筋注した。最終 methylprednisolone 注射後 1,2,3,4 週間で屠殺し、血液、臓器および両大腿骨を採取した。生化学的検査として血中トリグリセリド、総コレステロール濃度を測定し、血中サイトカイン濃度を測定した。大腿骨、肝臓および腎臓については組織染色を行った。

3. 研究結果

薬剤投与開始後より 14 日目までは体重減少を認めた(図 1)。14 日目以降に体重は増加に転じた。血中トリグリセリド値は有意に減少し、総コレステロールは有意に上昇した(図 2, 3)。ステロイド注射 1 週後に骨壊死が大腿骨頭骨端に認められた(図 4)。壊死部では、骨梁骨細胞の核の濃縮、偏在および、empty lacuna を認め

た(図 5)。同部位では骨髄細胞の壊死、変性も認めた。ステロイド注射 4 週間後には壊死部での肉芽組織の侵入が認められた(図 6)。骨壊死の主発生部位は大腿骨近位骨端部であった(表 1)。肝組織では一部脂肪変性を認めたが、肝細胞壊死や細胞浸潤像など明らかな肝障害は認められなかった。腎組織では腎盂腎炎を認め、周囲に炎症細胞浸潤が著明であった。

体重

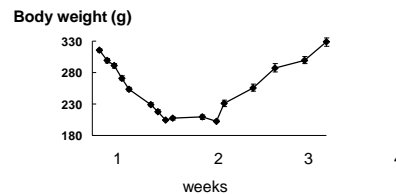


図1

TG

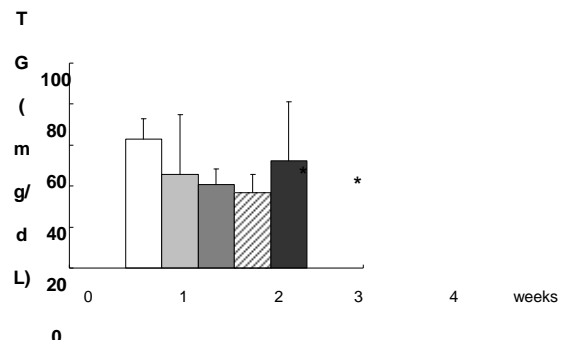


図2

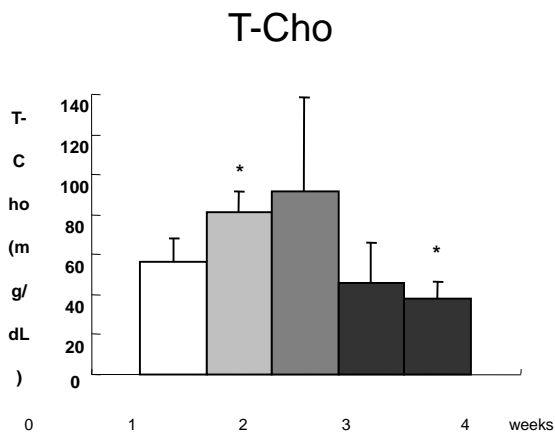


図3

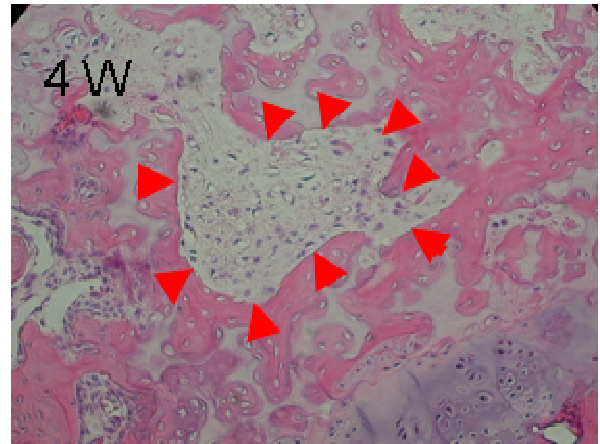


図6

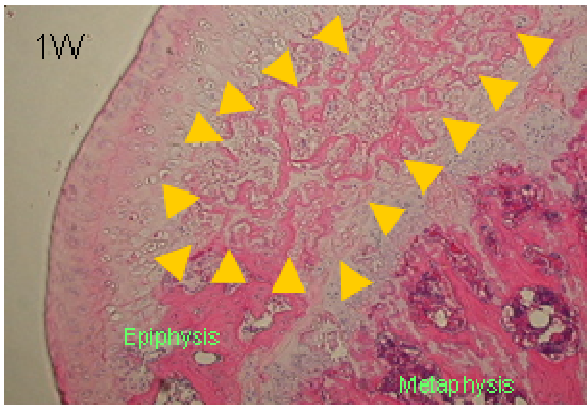


図4

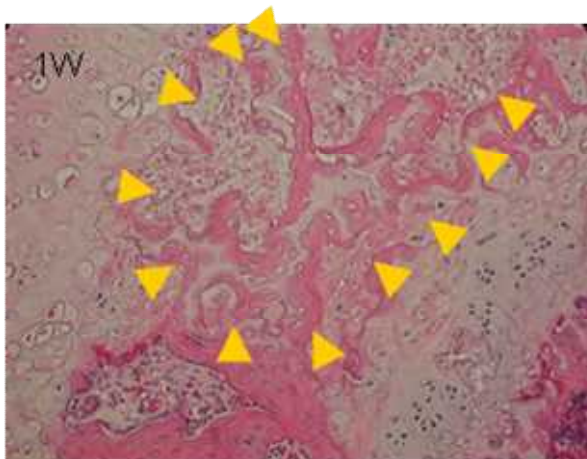


図5

表1

	Proximal epiphysis	Metaphysis
Cont	0/3	0
1w	1/3	0
2w	1/3	1/3
3w	2/3	0
4w	2/6	0

4. 考察

Yamamoto らは、家兎に LPS、ステロイドを投与することにより、大腿骨の骨壊死の動物モデルを作製した¹⁾。一方、小動物であるラットでの大腿骨頭壊死モデルに関しては、易卒中高血圧発症ラット(SHRSP)⁵⁾にステロイドを投与することにより骨壊死が生じることが報告されている。今回われわれは、実験しやすくするために、小動物であるラットに LPS、ステロイドを投与することにより、大腿骨頭壊死の小動物モデルを作製することができた。処置後 1 週から骨壊死が生じ、4 週で肉芽組織が侵入していたことから、壊死に対する修復機序が働くことがわかった。骨壊死の発生頻度は、約 33 - 66%であった。注入された LPS、メチルプレドニゾロンは肝臓で取り込まれ代謝されるが、組織学的に肝障害は認められなかった。このラットモデルでの骨壊死の発生部位は大腿骨

近位骨端部であり、人の骨壊死発生部位に極めて類似しており、今後の疾患の機序解明モデルとして有用であると考えられた。

5. 結論

LPS、ステロイドをラットに投与することによりヒトの大腿骨頭壊死症に類似した大腿骨頭壊死が大腿骨近位骨端部に生じることがわかった。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
3. 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) Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, Sueishi K. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. Clin Orthop Relat Res 1995(316):235-43.
- 2) Kabata T, Kubo 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.
- 3) Miyanishi K, Yamamoto T, Iriya 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). 40(2): 196-201, 2001.
- 4) Tsuji T, Sugano N, Sasaki 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) Hirano T, Iwasaki K, Oda J, Kumashiro T. Osteonecrosis of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. Relation to ossific nuclei during growth. Acta Orthop Scand 1992;63(1):37-40., 2004

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。

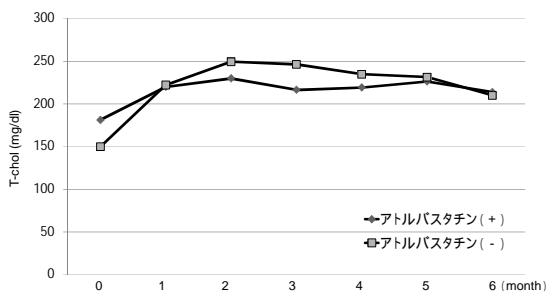


図1 . アトルバスタチンの有無とステロイド投与後T-chol

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)。

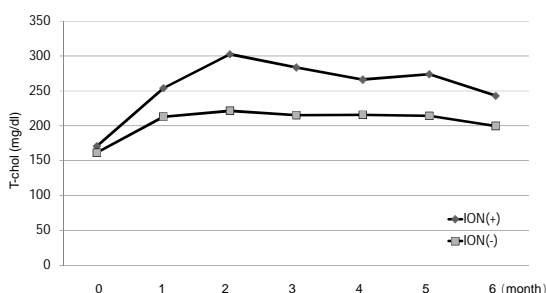


図2 . IONの発生とステロイド投与後T-chol

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