

家兎骨壊死モデルにおけるステロイド投与後早期の血管内ストレス

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

ステロイドを投与した家兎における骨内での早期の変化を調査することを目的とし、ステロイド性骨壊死モデルにおいてマクロファージに注目して検討した。対照群家兎5羽、実験群としてステロイド40mg/kg投与し24時間、72時間、120時間で犠牲死とした各5羽、14日経過時に犠牲死とした家兎15羽について、抗MAC抗体にて免疫組織化学的検討を行い、本モデルでの骨壊死好発部位である大腿骨近位部を検討した。ステロイド投与後24時間から血管内の単球系マクロファージは血管内皮上に接着しているものが観察できた。72時間群および120時間群では血管外に出たマクロファージが主であった。14日後では骨壊死の発生した部位周辺に多くのマクロファージが観察できた。ステロイド投与後24時間のマクロファージの動きから24時間以内で血管内に強いストレスが加わっていることが確認できた。14日目の反応は壊死周囲の修復反応と考えられた。本モデルにおける機序の検討はステロイド投与後24時間を中心に行うことが重要であることが示唆された。

1. 研究目的

近年、ステロイド性骨壊死動物モデルを使用したステロイド投与後早期の変化に注目した検討が報告されている。骨内の虚血に注目した実験としては、VEGFがステロイド投与後3-5日の骨髓造血細胞に発現していることから、虚血などの低酸素状態がステロイド投与後かなり早期に発生していることが示唆されている¹⁾。また我々は、虚血や血管障害を誘発する因子である酸化ストレスに注目した実験として、骨内細胞がステロイド投与後少なくとも5日以内にDNA酸化障害に陥っていることも報告した²⁾。これらの報告から、ステロイド投与後早期の段階ですでに骨壊死発生のEventが生じていることが考えられる。

血管で低酸素性のストレスが生じた際に悦敏に反応する細胞としてマクロファージがあげられ、虚血との強い関連が示されている^{3,4)}。

本実験では、ステロイド投与後早期のマクロファージの動きに注目し、骨内血管での低酸素状態に陥る時期について検討した。

2. 研究方法

実験動物には、体重約3.5kgの成熟雌性日本白色家兎を使用した。本研究のプロトコールは金沢医科大学動物実験指針に基づいて行った。まず、MP40mg/kgを

右側殿筋内に単回投与し、24時間、3日、5日、14日で犠牲死とした各群をA群(5羽)、B群(5羽)、C群(5羽)、D群(15羽)とした。

検討項目

1、病理組織学的検討

家兎にて骨壊死の好発部位とされている大腿骨近位内側部周辺領域を中心としたH-E染色標本にて骨壊死発生の有無について検討した。骨壊死の定義は、Yamamotoらの定義⁵⁾に基づき判定した。

2、免疫組織化学的検討

抗MAC387抗体を使用し、各群におけるマクロファージの動態を免疫組織化学的に検討した。

3. 研究結果

1、病理組織学的検討

D群でのみ骨壊死の発生を認めた。H-E染色標本にて15羽中、14羽に骨細胞のempty lacunae、また周囲の造血細胞、脂肪細胞の壊死を認め、骨壊死発生率は93%であった。

2、免疫組織化学的検討

N群ではほとんど陽性所見は認めず、マクロファージの動きが確認できなかった。A群では本モデルにおける骨壊死好発部位とされている大腿骨近位内側骨幹部付近の血管内で単球系マクロファージが血管内皮に接着

している所見が得られた。また、同部位周辺におけるB群およびC群では血管内から組織に出たマクロファージが確認できた。D群では骨壊死の周囲を取り囲むように多数のマクロファージが出現していた。

4. 考察

ステロイド性骨壊死の発生機序とされている虚血などの血流障害の時期を知ることは、骨壊死発生の機序の解明および予防法を確立する上で非常に重要となる。これまで、ステロイド性骨壊死における血管に注目した報告としては、Nishimuraらは家兎にステロイドを週1回8週間投与したモデルで、静脈系において内膜における泡沫様細胞の増加や中膜の空胞化を認めたとしている⁶⁾。しかしながらこの報告は、骨壊死発生後の事象を捉えている可能性が考えられる。

骨壊死発生の機序解明には、ステロイド投与後早期の、少なくとも骨壊死が生じるより前の骨内血管内での状態を捉えることが重要である。

今回の検討では、A群ですでに血管内でのマクロファージの動きをみとめたことから考えると、ステロイド投与後少なくとも24時間以内に血管内に非常に強いストレスがかかっていることが示唆された。また、D群での反応は骨壊死周囲のみに認めており、修復反応により起こっていることが考えられた。

本実験結果より、本モデルにおける骨内の血管内での低酸素性のEventは少なくともステロイド投与後24時間以内であることが確認できた。すなわち、ステロイド投与後24時間以内が、これまで動物モデルにおいて骨壊死発生率の抑制が報告されている薬剤(脂質代謝改善薬や抗酸化剤)のターゲットとなる時期であることが考えられた。

5. 結論

本実験結果より、本モデルにおける骨内の血管内での低酸素性のEventは少なくともステロイド投与後24時間以内であることが確認できた。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、福井清数、三上友明、中川慎太郎、北村憲司、松本忠美：
ステロイド性骨壊死における酸化ストレスの関与と抗

酸化剤による骨壊死抑制、

第37回日本関節病学会、横浜、2009.11.19

- 2) T.Ichiseki, A.Kaneuji, T.Sugimori, K.Fukui, K.Kitamura, T.Mikami, S.Nakagawa, T.Matsumoto:
Prophylactic effect of antioxidant vitamins against osteonecrosis after steroid administration in a rabbit model. Association Research Circulation Osseous 15th International Symposium on Bone Circulation(ARCO 2009) Yokohama.2009.11.17

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) Kabata T, Matsumoto T, Yagishita S, Wakayama T, Iseki S, Tomita K. Vascular endothelial growth factor in rabbits during development of corticosteroid-induced osteonecrosis: a controlled experiment. J Rheumatol. 2008;35:2383-90.
- 2) Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda Y, Sugimori T, Matsumoto T. DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. Rheumatology (Oxford). 2005 Apr;44(4):456-60.
- 3) De Palma M, Naldini L. Role of haematopoietic cells and endothelial progenitors in tumour angiogenesis. Biochim Biophys Acta. 2006 Aug;1766(1):159-66.
- 4) Ito T, Tsukada T, Ueda M, Wanibuchi H, Shiomi M. Immunohistochemical and quantitative analysis of cellular and extracellular components of aortic atherosclerosis in WHHL rabbits. J Atheroscler Thromb. 1994;1(1):45-52.
- 5) 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.
- 6) Nishimura T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K. Histopathologic study of veins in steroid treated rabbits.

ステロイド性骨壊死予防の可能性-抗酸化ビタミンを使用した検討-

三上友明、市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、福井清敏、北村憲司、中川慎太郎、松本忠美
(金沢医科大学 整形外科)
上田善道、勝田省吾
(金沢医科大学 病理学Ⅱ)

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 E 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 E を連日静注した E 群を作製して、病理組織学的、血液生化学的検査を行った。E 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 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 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、ビタミン E 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+ビタミン E 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 群とした。

両群、2 週間後に犠牲死とし、

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、骨壊死は 10 羽とも認めなかったが、骨髄壊死を 1 羽に認め、今回骨壊死発生率は 10%とカウントした。有意に骨壊死発生は抑制されていた ($P < 0.05$)。
- (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 ($P < 0.05$)。

4. 考察

通常、生体内では酸化還元の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、酸化還元のバランスが崩れ、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、更に酸化還元のバランスが崩壊し、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効果を有する。本実験より直接的な抗酸化作用を有しているビタミン E を投与することによって有意な骨壊死抑制効果が確認できた。

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。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

- 1) 三上友明、市堰 徹、兼氏 歩、北村憲司、福井清数、中川慎太郎、杉森端三、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についての検討、第 36 回日本股関節学会、京都、2009.10.31
- 2) 市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、福井清数、三上友明、中川慎太郎、北村憲司、松本忠美:ステロイド性骨壊死における酸化ストレスの関与と抗酸化剤による骨壊死抑制、第 37 回日本関節病学会、横浜、2009.11.19
- 3) T.Ichiseki, A.Kaneuji, T.Sugimori, K.Fukui, K.Kitamura, T.Mikami, S.Nakagawa, T.Matsumoto: Prophylactic effect of antioxidant vitamins against osteonecrosis after steroid administration in a rabbit model. Association Research Circulation Osseous 15th International Symposium on Bone Circulation (ARCO 2009) Yokohama. 2009.11.17

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, Irisa 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.

ビタミン E のステロイド性骨壊死に対する予防効果の検討

栗林正明、藤岡幹浩、高橋謙治、上島圭一郎、後藤 毅、石田雅史、久保俊一

(京都府立医科大学大学院医学研究科 整形外科)

家兎においてステロイド剤を投与すると即時に骨内で酸化ストレスが起こり、その後に骨壊死が発生すると報告された。それ以降、ステロイド剤が骨壊死を誘発する機序として酸化ストレス説が有力視されている。ステロイド性骨壊死の予防薬候補としてビタミン E の同族体の中でも最も抗酸化作用が強い α -トコフェロール (alpha-tocopherol: Toc と略) に着目した。本研究は Toc のステロイド性骨壊死に対する予防効果を確認し、その機序を明らかにすることを目的とした。対象はステロイド性骨壊死家兎モデルで、通常の飼料を与える対照群と Toc 強化飼料を与える実験群とした。対象群は 20 羽中 14 羽、実験群は 21 羽中 5 羽に骨壊死が発生した。骨壊死の発生は実験群で有意に抑制された。Toc 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薬として有望である。

1. 研究目的

全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患などの治療および腎移植術後の免疫抑制のために高容量のステロイド剤を投与された患者に大腿骨頭壊死症が発生することが多い。広範囲の骨壊死を生じた大腿骨頭は圧潰するため、多くの症例で手術療法を必要とする。ステロイド性大腿骨頭壊死症は比較的若年者に発生する傾向があるため、長期間の使用を余儀なくされる人工関節には耐久性の問題が懸念される。そのためステロイド性骨壊死を予防することが重要であるが、有効な予防法は臨床応用されていない。

ステロイド剤が骨内に虚血を生じさせて骨壊死を誘発する機序として高脂血症説、脂肪塞栓説、血液凝固能亢進説、血管内皮傷害説および骨組織アポトーシス説などの諸説が従来から提唱されている。最近、家兎においてステロイド剤を投与すると即時に骨内で酸化ストレスが起こり、その後に骨壊死が発生すると報告された¹⁾。それ以降、ステロイド剤が骨壊死を誘発する機序として酸化ストレス説が有力視されている。したがって、ステロイド剤に誘発された酸化ストレスを抗酸化物質で軽減すれば、骨壊死の発生を抑制する可能性がある。

そこで、強力な抗酸化物質であるビタミン E がステロイド剤を投与した後に発生する骨内の酸化ストレスを軽減し、骨壊死を予防するという仮説を立てた。ま

た、ビタミン E には同族体として 4 種のトコフェロールと 4 種のトコトリエノールの合計 8 種類が自然界に存在することが知られている。その抗酸化作用は α -トコフェロール (alpha-tocopherol: Toc と略) を 100 とすると、 β -トコフェロールは 30~50、 γ -トコフェロールは 10、 δ -トコフェロールは 2 以下で、トコトリエノールはトコフェロールに比べ低い。このことから、ビタミン E の同族体の中で最も強い抗酸化作用を持つ Toc は骨壊死を予防する能力が他の同族体より高いことが期待できる。

本研究では動物モデルを用いて Toc がステロイド性骨壊死発生個体数と個体内での骨壊死発生部位数を減らす効果を持つかを調査し、ステロイド剤によって生じる脂質代謝異常、脂質過酸化および凝固・線溶系異常を引き起こす血管傷害に対する Toc の影響を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

28 から 32 週齢の雄性日本白色家兎 (3.3-3.9kg) を用いた。Toc を 0.71mg/kg の割合で含有する通常の飼料である ORC4 を与える対照群と、ORC4 に Toc を 600mg/kg の割合で添加した Toc 強化飼料を与える実験群に割り付けた (各群 n=25)。割り付けを行ってから 2 週間後に、20mg/kg の酢酸メチルプレドニゾロン (methylprednisolone acetate: MPSL と略) を家兎の

右殿筋内に注射してステロイド性骨壊死家兎モデルを作製した²⁾。

MPSLを投与した4週間後に家兎を犠牲死させ、両大腿骨を摘出し近位1/3と遠位1/3に分割した。大腿骨をフォルマリンで固定した後 ethylene diamine tetraacetic acid で脱灰し、大腿骨の正中冠状断の hematoxylin-eosin 染色を施行した。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²⁾。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兎は骨壊死発生家兎とした。病理組織学的に骨壊死の有無を判定し、骨壊死発生個体数と個体内での骨壊死発生部位数を2群間で比較した。また、脂質代謝異常の指標として脂肪細胞径と脂肪細胞面積比を計測し、2群間および骨壊死発生群と非発生群の間で比較した。

脂質過酸化を評価するため、大腿骨に anti malondialdehyde monoclonal antibody (MDA) による免疫染色を施行した。酸化ストレスによる血管傷害の指標として MDA 陽性血管数を計測し、2群間および骨壊死発生群と非発生群の間で比較した。

実験開始時(WK-2)、MPSL投与直前(WK0)、投与後2週(WK2)および4週(WK4)の時点で耳静脈から血液を採取し、遠心分離によって血漿を得た。脂質代謝異常の指標として総コレステロール(total cholesterol: T-cho)とトリグリセリド(triglycerides: TG)、脂質過酸化の指標としてチオバルビツール酸反応陽性物質(thiobarbituric acid-reactive substances: TBARS)、および Toc の血漿中濃度を測定した。Toc濃度は脂質量に影響されるため、Toc/T-cho比を算出した。これらを4時点での群間および群内の4時点間で比較した。

家兎の体重および摂取した飼料の重量から Toc の摂取量を算出し、安全性の指標とした。

3. 研究結果

50羽中9羽の家兎はMPSLを投与した後に死亡したため、これらを評価の対象から除外した。対照群では20羽中14羽(70.0%)の家兎に骨壊死が発生した。一方、実験群では21羽中5羽(23.8%)の家兎に骨壊死が発生し、Toc強化飼料はステロイド性骨壊死の発生を有意に抑制した(P=0.0036、Fisher's exact

probability test)。しかしながら、骨壊死発生部位数は2群間で差がなかった(表1)。脂肪細胞径および脂肪細胞面積比は2群間および骨壊死発生群と非発生群の間の比較で差がなかった(表1、2)。MDA陽性血管数は実験群で有意に少なく、骨壊死発生群で有意に多かった(表1、2)。T-cho(図1A)は対照群内においてWK-2よりもWK4で、実験群内においてWK-2よりもWK2で高値であった(図1A)。T-choの群間比較ではすべての時点において差はなかった。TG(図1B)は対照群内および実験群内において、WK-2よりもWK2およびWK4でともに高値であった。TGの群間比較ではすべての時点において差はなかった。WK2に採取した試料の多くが乳び血漿であったため、比色法で定量するTBARSは乳びによる背景の影響を受け測定できなかった。この理由でTBARSの検討からWK2を除外した。TBARS(図1C)は対照群内においてWK-2よりもWK4で有意に高値であり、実験群内においてはすべての時点間に差はなかった。TBARSの群間比較ではWK4で対照群よりも実験群の方が低値であった。Toc/T-cho比(図1D)は対照群内のすべての時点間に差はなく、実験群内においてWK-2よりもWK0、WK2およびWK4で高値であった。Toc/T-cho比の群間比較ではWK-2において差はなく、WK0、WK2およびWK4で対照群よりも実験群の方が高値であった。

Tocの摂取量は対照群において0.02mg/kg/day、実験群において20.3mg/kg/dayであった。

表1. 対照群と実験群

	対照群	実験群	p値 [#]
家兎数	20	21	
骨壊死発生部位数	1.57±0.65	1.80±0.45	0.5
脂肪細胞径(μm)	54±7.0	56±3.7	0.3
平均脂肪細胞面積比(%)	57±6.6	57±6.8	0.9
MDA陽性血管数	3.9±2.3	1.4±0.96	<0.001
餌摂取量(g)	4987±542	4981±541	0.98
Toc摂取量(mg/kg/day)	0.02±0.01	20.3±5.9	<0.001

Student's t test

表 2. 骨壊死発生群と非発生群

	発生群	非発生群	p 値 [#]
家兔数	19	22	
脂肪細胞径 (μm)	54 \pm 4.3	55 \pm 6.7	0.5
平均脂肪細胞面積比 (%)	57 \pm 6.5	56 \pm 7.0	0.7
MDA 陽性血管数	3.9 \pm 2.1	1.5 \pm 1.4	0.001

Student's t test

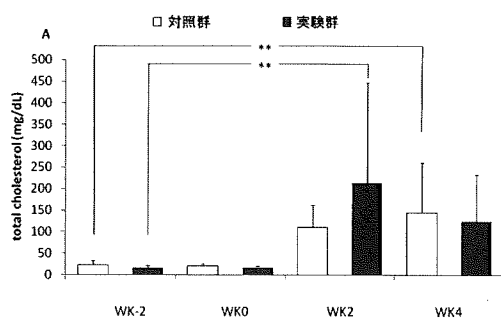


図 1 A

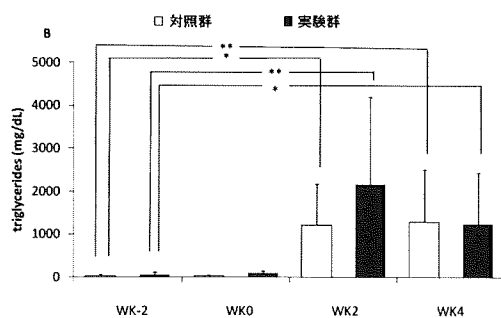


図 1 B

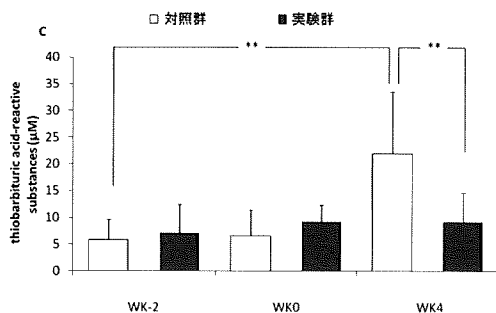


図 1 C

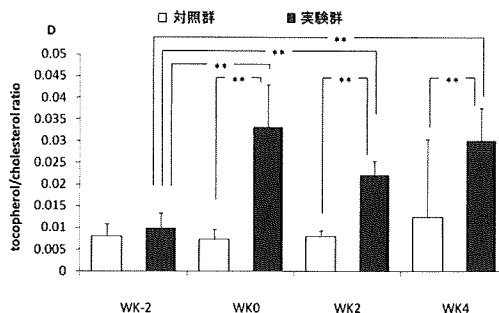


図 1 D

生化学データ. A total cholesterol, B triglycerides, C thiobarbituric acid-reactive substances, D tocopherol/cholesterol ratio. * p < 0.05, ** p < 0.01 Tukey-Kramer method.

4. 考察

本研究では、動物実験において Toc がステロイド性骨壊死を予防することを明らかにした。しかしながら、Toc を与えても骨壊死を発生した家兔が存在し、骨壊死を発生した家兔において骨壊死の発生部位数を減らすことはできなかった。これはステロイド性骨壊死の発生には多因子が関与し、その発生には閾値が存在している可能性を示していると考えた。

脂質代謝異常の指標は対照群と実験群に差がなかった。したがって、Toc がステロイド性骨壊死を予防した機序が、これまでに報告された脂質代謝異常を抑制すること以外にも存在している可能性があると考えた。脂質過酸化の指標および酸化ストレスによる血管傷害の指標は対照群で有意に高値であった。これは Toc が血液および血管に対する酸化ストレスを抑制したことを示している。

血管内皮細胞は酸化ストレスを受けやすい。酸化ストレスを受けると、血管内皮由来の血管弛緩因子である一酸化窒素 (nitric monoxide: NO と略) の産生が減少する。NO は血小板内の cyclic guanosine monophosphate 濃度の上昇を介して抗血小板作用を示す。つまり、酸化ストレスは NO の減少を介して抗血小板作用を抑制する。また、酸化ストレスによる血管内皮傷害はトロンボモジュリンの産生を低下させる。局所で凝固系が活性化するとトロンビンが産生されるが、血管内皮細胞上のトロンボモジュリンに結合することによって、すぐに不活化される。また、トロンビン/トロンボモジュリン複合体はプロテイン C 依存性の抗凝固反応を活性化する³⁾。つまり、酸化ストレスによる

血管内皮傷害はトロンボモジュリンの産生を低下させることを介して抗凝固系を破綻させる。したがって、Toc が酸化ストレスに誘発される血管傷害を抑制することによって抗血小板作用と抗凝固作用を維持した可能性がある。この機序が、Toc がステロイド性骨壊死を予防した機序の 1 つであると考えた。

ヒトに対して Toc は安全な薬剤であり、その無毒性量の上限は 1600mg/day と報告されている⁴⁾。本研究で家兎が摂取した Toc の量は体重 60kg のヒトに換算すると約 1200mg/day であり、安全な投与量であった。

5. 結論

動物実験で安全な投与量の Toc を経口摂取させることによって、ステロイド性骨壊死の発生を抑制した。脂質過酸化および酸化ストレスによる血管傷害を抑制することがステロイド性骨壊死を予防する機序の 1 つであることを明らかにした。本研究の結果から、Toc はステロイド性骨壊死の予防薬となる可能性があると考えた。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Ishida M, Goto T, Kubo T. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Acta Orthop*, in press.

2. 学会発表

- 1) 栗林正明、藤岡幹浩、高橋謙治、上島圭一郎、後藤 毅、石田雅史、久保俊一: ビタミン E の骨壊死抑制効果の検討、第 36 回日本股関節学会 学術集会。京都、2009.10.30
- 2) 栗林正明、藤岡幹浩、石田雅史、後藤 毅、久保俊一: ビタミン E のステロイド性骨壊死予防効果の検討、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会。横浜、2009.11.5
- 3) Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi K, Ueshima K, Arai Y, Ishida M, Goto T, Kubo T. Vitamin E prevents Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. New Orleans, LA, USA, 2010. 3. 6-9

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, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda Y, Sugimori T, Matsumoto T. DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 456-60.
- 2) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2055-64.
- 3) Tasinato A, Boscoboinik D, Bartoli GM, Maroni P, Azzi A. 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* 1995; 92: 12190-4.
- 4) Kappus H, Diplock AT. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 55-74.

家兎誘発モデルにおける、ビタミン E のステロイド性骨壊死予防効果

岩崎賢優、山本卓明、本村悟朗、池村聡、山口亮介、趙嘎日達、岩本幸英
(九州大学大学院医学研究院 整形外科)

雄の日本白色家兎に高容量酢酸メチルプレドニゾロン(MPSL)20mg/kgの1回筋注で、約70%に骨壊死が発生することは過去の研究で明らかになっている。我々はこの家兎モデルに100mg/kgのビタミンE(α -トコフェロール)をMPSL投与の1週前からMPSL投与2週後の犠牲死まで、経胃的に連日投与を行い、骨壊死予防効果を検討した。 α -トコフェロール投与後に、血中グルタチオン(GSH)値は有意に上昇し、MPSL投与後もGSH値は維持された。骨壊死の発生率は10羽中6羽(60%)であった。

1. 研究目的

家兎ステロイド性骨壊死誘発モデルに対し、ビタミンE(α -トコフェロール)を投与して、骨壊死発生を予防できるかを検討する。

2. 研究方法

対象は雄の成熟日本白色家兎10羽。体重3.4~3.7kg(平均3.5kg)。

酢酸メチルプレドニゾロン(以下MPSL)投与の1週前から犠牲死までビタミンE(α -トコフェロール100mg/kg/day)を連日経胃的に注入する(図1)。MPSL20mg/kgを1回のみ殿筋に筋注し、MPSL投与後2週で犠牲死とする¹⁾。酸化ストレスの指標として血中グルタチオンをMPSL投与1週前、0週、1週後、2週後に測定する。

骨壊死の病理組織学検討は、両大腿骨・上腕骨の近位1/3及び遠位部のHE染色標本を用い、山本らの方法で判定する¹⁾。

3. 研究結果

骨壊死発生率の結果は、全標本に1つでも骨壊死を認めた家兎が10羽中6羽(60%)であった。

血中グルタチオン測定については、ビタミンE投与前の平均22.6 μ g/mlと比較して、ビタミンE投与開始1週後は平均36.6 μ g/mlと有意に上昇した。MPSL投与後もグルタチオン値は高値を維持した(図2)。

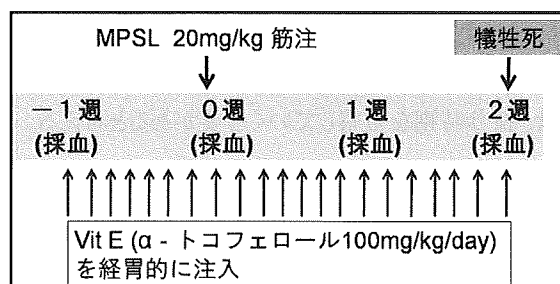


図1: 実験プロトコール

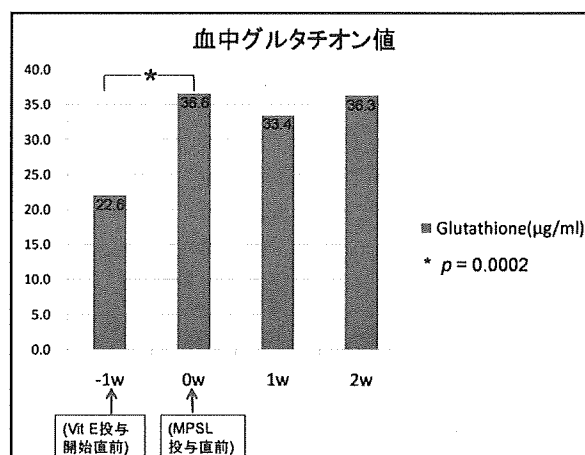


図2: 血中グルタチオン値の推移

4. 考察

ビタミンEによる骨壊死予防効果については、近年いくつかの報告がある。いずれも山本らの報告に準じたステロイド性骨壊死家兎モデルを用いている¹⁾。同モデル

における骨壊死発生率は、当科での研究において約70%であることが判明している²⁾。三上らは成熟白色家兎にMPSL 40mg/kgを殿筋に一回筋注の後、ビタミンE 50mg/kgの連日静注を2週間行い、骨壊死発生率を0%に抑制した(コントロール群93%)と報告している³⁾。また栗林らは成熟白色家兎でMPLS 20mg/kgを筋注する2週間前からビタミンEを添加した飼料を与え(添加量600mg/kg、平均摂取量は約20mg/kg/day)、骨壊死発生率を23.8%に抑制した(コントロール群70.0%)と報告している⁴⁾。

今回の予備的試験においては、MPSL 20mg/kg筋注の1週前から合計3週間、ビタミンE100mg/kg/dayという高容量の経胃的投与を行った。その結果、体内の抗酸化作用の指標である、血中グルタチオン値はビタミンE投与前と比較して有意に上昇し、MPSL投与後も高値を維持した。しかし骨壊死発生率は60%と、十分な骨壊死抑制効果は得られなかった。ビタミンEの骨壊死抑制作用については更に研究を進め、適切な投与方法、投与量、投与時期を考察していく必要があると考える。

5. 結論

ステロイド投与家兎骨壊死モデルにおいて、ビタミンEによる骨壊死抑制効果を検討した。骨壊死発生率は60%であり、十分な抑制効果は得られなかった。今後さらに研究を進め、適切な投与方法、投与量、投与時期を考察していく必要がある。

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) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects

of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 1709-10.

- 2) Motomura G, Yamamoto T, Irisa T, Miyanishi K, Nishida K, Iwamoto Y. Dose effects of corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits. *J Rheumatol.* 2008; 35: 2395-9
- 3) 三上友明、市塚徹、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. 厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)平成20年度総括・分担報告書: 52-54, 2009
- 4) 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. ビタミンEの骨壊死予防効果の検討. 厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)平成20年度総括・分担報告書: 49-51: 2009

SHRSP 大腿骨頭壊死に対する Pentosan 投与

宮田倫明、熊谷謙治、尾崎 誠、穂積 晃、
後藤久貴、坂本和隆、野崎義宏、進藤裕幸

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 整形外科学)

丹羽正美 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 神経感覚薬理学)

Back ground:ステロイド性大腿骨頭壊死症は、steroid hormone による酸化ストレスの増大、脂質代謝障害、末梢循環障害が主な原因とされる。本研究では、Stroke Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP) の大腿骨頭壊死モデルを用いて、steroid hormone とヘパリン類似物質(脂質代謝改善物質)である Pentosan Polysulfate Sodium (Pentosan) の効果を評価、検討することを目的とする。

Materials and methods: 13 週齢牡 SHRSP/Ism 123 匹を対象とし、Pentosan と steroid hormone の投与の有無によって 4 群に分けた;Control 群(以下 C 群)、Pentosan 投与群(以下 P 群)、steroid hormone 投与群(以下 S 群)、Pentosan+steroid hormone 投与群(以下 PS 群)。Steroid hormone は 15 週齢で methylprednisolone acetate 4mg (15mg/kg)を投与し、Pentosan は 13 週齢より 3mg/day/kg を4週間腹腔内持続投与した。17 週齢目に犠牲死とし、心臓血と両大腿骨を採取した。血液検査では凝固系と脂質を計測した。大腿骨頭の病理組織から骨壊死を診断し、抗 4HNE 抗体および抗 8OHdG 抗体を用いて酸化ストレスを検出した。各群における大腿骨頭壊死の発症率を統計学的に、また酸化ストレスを比較、検討した。

Results: PS 群のトリグリセライド値は、S 群よりも有意に低く、Pentosan によって脂質代謝が改善していた。組織学的大腿骨頭壊死の発症率は、C 群の 30.4%(17/56 骨頭)に対し、P 群では 14.8%(10/71 骨頭)と有意に低かった。また、S 群では 91.3%(42/46 骨頭)と効率に大腿骨頭壊死を発症していたのに対し、PS 群は 40.8%(29/71 骨頭)であり、Pentosan の投与群で著しく抑制されていた。酸化ストレスの免疫組織学的検討では、S 群に比べ PS 群では染色性が明らかに減弱していた。

Conclusions: Pentosan は、脂質代謝系の改善と酸化ストレスの軽減により、SHRSP における大腿骨頭壊死の発症率を低減させると考えられる。

1. 研究目的

近年、臓器移植の普及や膠原病の治療などに伴いステロイド性大腿骨頭壊死症の割合が増加して社会的問題となっている¹⁾。

ステロイド性大腿骨頭壊死の発生メカニズムとしてはステロイドによる酸化ストレスの増大、脂質代謝障害、凝固・線溶系傷害が関与していると考えられている^{2,3,4)}。

Steroid Hormone の投与による大腿骨頭壊死の原因とされる大腿骨頭末梢循環の改善薬剤の探索・検討が課題とされている。大腿骨頭壊死の実験モデルには諸動物が用いられている。我々の使用している stroke prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP)の大腿

骨壊死の所見は臨床症例に酷似している⁵⁾。

大腿骨頭壊死症の予防・治療法は現在、確立しておらず特効薬の開発が求められている。

Pentosan はドイツで開発されヘパリン類似物質として約 60 年間世界中で使用されている薬物である。抗酸化作用や脂質代謝改善作用も注目されている。

今回、SHRSP に Pentosan を持続投与し、自然発生およびステロイド誘発性大腿骨頭壊死の発生変化を調べた。

2. 研究方法

【材料&方法】

Animals

SHR 共同研にて購入した 13 週齢牡 SHRSP/Izm 123 匹を使用した。すべてのラットは長崎大学先端生命科学研究所支援センター動物実験室(アニマルセンター)で温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 2\%$ で飼育した。Pentosan と Steroid Hormone の投与で control 群(C 群)、Pentosan 投与群(P 群)、Steroid hormone 投与群(S 群)、Pentosan + Steroid Hormone 投与群(PS 群)の 4 群を作成し、各々 28 匹、36 匹、23 匹、36 匹を使用した。Steroid Hormone は、15 週齢で methylprednisolone acetate 4mg (about 15mg/Kg) を背部に皮下注した。Pentosan として Bene 社の NaPPS を Alzet 社の osmotic pump を使用し 3mg/day/kg 投与した。投与方法は osmotic pump をラットの背部皮下に埋没し腹腔内に shunt tube を挿入することで腹腔内持続投与とした。

ラットはアニマルセンターで通常ラットケージを使用し SP 飼料で飼育した。17 週齢目に犠牲死とし、血液を心臓より採取後、両大腿骨頭を摘出した(図 1)。

(倫理面への配慮)

長崎大学実験動物委員会の認可を得た。

血液学的検査

血液サンプルは心臓より採取した。Pentosan の抗凝固作用を調べるため、APTT, PT を計測した。また、高脂血症の改善の効果を調べるために生化学テストは Total cholesterol, HDL, LDL, TG を計測した。

組織学的検査

組織学的検査では、摘出した両側の大腿骨近位部を 10%ホルマリンで 24 時間固定し、岡山大学オリジナルの脱灰方法で脱灰後、パラフィン包埋した。引き続いて、円靭帯を通る切片を H-E 染色し、組織学的変化を観察した。

大腿骨頭壊死については標本作製の過程で熱発生が生じないため、Jacques ARLET, 1993 の組織学的診断基準に準じて type1 から診断した。

酸化 stress 解析

酸化 stress の検出には一次抗体として日本油脂株式会社 (NIHON-YUSHI Corporation, Tokyo, Japan) の酸化ストレス測定用抗体抗 8-OHdG モノクローナル抗体と抗 4-HNE モノクローナル抗体 (anti-4HNE

monoclonal antibody and anti-8OHdG monoclonal antibody) を使用し、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて染色検鏡を行った。抗 4HNE モノクローナル抗体は 4-HNE が生体脂質のうち $\omega 6$ 系高度不飽和脂肪酸が酸化ストレスを受けて生成する酸化二次生成物であり特に脂肪細胞の周囲に検出される。所見は観察箇所が無染色なもの、脂肪細胞辺縁のみ染色されるもの、骨髄細胞まで染まるものの 3 段階で評価した。抗 OHdG モノクローナル抗体は活性酸素による酸化ストレスが亢進すると DNA 中に 8 OHdG が生成されることに着目したもので核内に検出される。所見は観察箇所が無染色なもの、骨髄球の一部に染色されるもの、骨髄細胞球全体が染まるものの 3 段階で評価した。また両者で染色強度についても加味した。

統計学的解析

統計学的解析は平均±平均値の標準誤差で表した。各群間の違いは、 χ^2 乗検定と t 検定を用いて統計解析を行った。

3. 研究結果

体重

Pentosan 投与で体重の減少はなく、順調に生育した (C 群 $309.8 \pm 23.5\text{g}$ 、P 群 $300.9 \pm 23.5\text{g}$)。また、Steroid Hormone の負荷で体重は有意に減少した (S 群 $242.1 \pm 24.7\text{g}$ 、PS 群 $255.4 \pm 30.6\text{g}$) ($P < 0.001$) (図 2)。

Laboratory data

総コレステロール値は S 群 ($102.5 \pm 26.2\text{mg/dl}$) と PS 群 ($100.2 \pm 32.3\text{mg/dl}$) は、C 群 ($61.1 \pm 10.2\text{mg/dl}$) と P 群 ($58.9 \pm 9.1\text{mg/dl}$) に比べ、有意に増加していた ($P < 0.01$)。HDL 値は S 群 ($32.4 \pm 8.9\text{mg/dl}$) と PS 群 ($28.8 \pm 8.4\text{mg/dl}$) は C 群 ($18.9 \pm 3.9\text{mg/dl}$) と P 群 ($19.4 \pm 2.8\text{mg/dl}$) に比べ有意に増加していた ($P < 0.01$)。LDL 値は S 群 ($13.0 \pm 8.9\text{mg/dl}$) と PS 群 ($12.9 \pm 5.5\text{mg/dl}$) は C 群 ($8.5 \pm 2.9\text{mg/dl}$) と P 群 ($8.1 \pm 1.9\text{mg/dl}$) に比べ有意に増加していた ($P < 0.01$)。トリグリセライド値は S 群 ($106.6 \pm 48.6\text{mg/dl}$) と PS 群 ($68.9 \pm 46.5\text{mg/dl}$) は C 群 ($40.6 \pm 20.6\text{mg/dl}$) と P 群 ($37.7 \pm 18.6\text{mg/dl}$) に比べ有意に増加していた ($P < 0.01$)。加えて、PS 群のトリグリセライド値は S 群と比べ有意に低下していた ($P < 0.01$)。要約すると血液生化学

検査では Steroid Hormone 投与で総コレステロール値、HDL 値、LDL 値、トリグリセライド値が Steroid Hormone 非投与に比較し有意に増加し(P<0.01)、著明な高脂血症を呈していた。Steroid Hormone に加えて Pentosan を投与することにより、トリグリセライド値のみが有意に減少していた(P<0.01) (図 2)。

血液凝固能(aPTT, PT)では、各群間に有意な差は認めなかった(図 3)。いずれも電解質は正常であった。

組織学的所見

大腿骨頭の壊死の頻度は Steroid hormone 投与と比較すると S 群では 91.3%(42/ 46 大腿骨頭)に対し、PS 群では 40.8%(29 / 71 大腿骨頭)であり、有意に著明に減少していた(P<0.0001)。

また Steroid hormone 非投与と比較すると、C 群は 30.4%(17/56 大腿骨頭)、P 群では 14.8%(10/71 大腿骨頭)であり、有意に減少していた(P<0.05) (図 4)。

酸化 stress の解析結果

大腿骨頭における酸化 stress を4群間で比較した。

C 群においては、抗 4-HNE モノクローナル抗体では脂肪細胞壁の染色性は殆ど皆無で、骨髓球、骨細胞の染色は認めなかった。抗 8-OHdG モノクローナル抗体では骨髓球に一部の染色性をみとめた。P 群においては、抗 4-HNE モノクローナル抗体では染色性はほとんどみられなかった。抗 8-OHdG モノクローナル抗体では C 群よりも更に染色性は低下していた。S 群においては、抗 4-HNE モノクローナル抗体では脂肪細胞壁および骨髓球の染色性が共に強く、また骨細胞にも一部染色性を認めた。抗 8-OHdG モノクローナル抗体では骨髓球全体に強い染色性を認めた。PS 群においては、抗 4-HNE モノクローナル抗体での脂肪細胞壁の染色性、また抗 8-OHdG モノクローナル抗体での骨髓球の染色性は S 群と比べ明らかに減弱していた。

免疫染色の結果をまとめると、抗 8-OHdG モノクローナル抗体では S 群が著明に強い染色性を認めたが、Pentosan を投与した PS 群では染色性が著明に減弱していた。以下 C 群、P 群と減弱していった(図 5)。抗 4-HNE モノクローナル抗体でも同様の傾向が見られた。(図 5)。

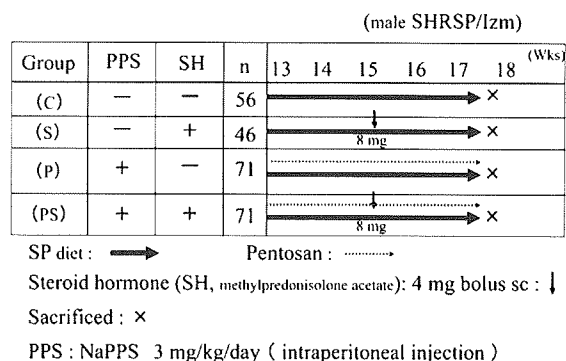


図 1 : 材料と方法

Control 群(C 群)、Steroid hormone 投与群(S 群)、Pentosan 投与群(P 群)、Pentosan+Steroid hormone 投与群(PS 群)の 4 群を設定し、各々の骨頭数は 56,46,71,71 骨頭であった。Steroid hormone は 15 週齢で methylprednisolone acetate 4mg を皮下注した。Pentosan は 13 週齢より 3mg/day/kg を 4 週間腹腔内投与した。17 週齢目に犠牲死とした。

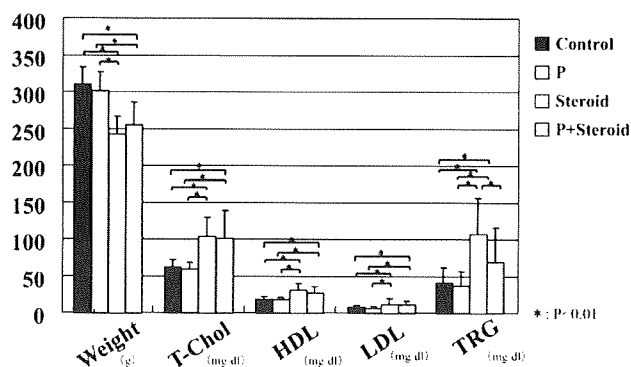


図 2 : 体重と生化学的検査値

体重は Pentosan 投与で減少はなく、順調に生育した。Steroid Hormone の負荷で体重は有意に減少した。血液生化学検査では Steroid Hormone 投与で総コレステロール値、HDL 値、LDL 値、トリグリセライド値が Steroid Hormone 非投与に比較し有意に増加し(P<0.01)、著明な高脂血症を呈していた。Steroid Hormone に加えて Pentosan を投与することにより、トリグリセライド値のみが有意に減少していた(P<0.01)。

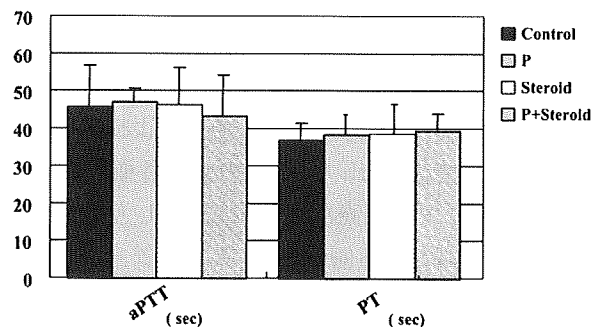


図 3 : 血液凝固試験

血液凝固能(aPTT, PT)では、各群間に有意な差は認めなかった。

	PPS -	PPS +
Steroid -	30.4 (%) (17/56)	14.8 (%) (10/71)
Steroid +	91.3 (%) (42/46)	40.8 (%) (29/71)

* P=0.0001
** P=0.0261
*** P=0.0001
**** P=0.0004

図 4 : 組織学的大腿骨頭壊死の発生率

C 群の 30.4% (17/56 骨頭) に対し、P 群では 14.8% (10/71 骨頭) と有意に低かった。また、S 群では 91.3% (42/46 骨頭) と効率に大腿骨頭壊死を発症していたのに対し、PS 群は 40.8% (29/71 骨頭) であり、Pentosan の投与群で著しく抑制されていた。

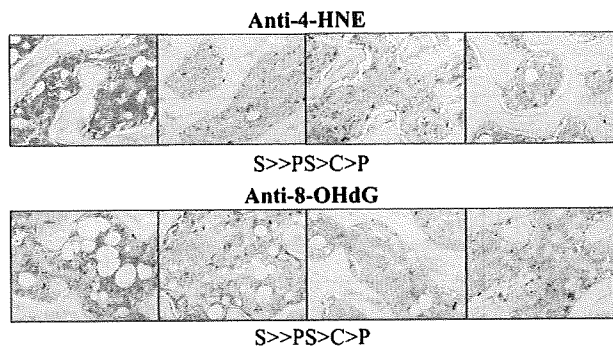


図 5 : 酸化 stress の検出

抗 8-OHdG モノクローナル抗体では S 群が著明に強い染色性を認めたが、Pentosan を投与した PS 群では染色性が著明に減弱していた。以下 C 群、P 群と減弱していった。抗 4-HNE モノクローナル抗体でも同様の傾向が見られた。

4. 考察

大腿骨頭壊死症は日本では年間 3000 人が発症し、その数は年々増加傾向にある¹⁾。特に Steroid Hormone 治療を施された患者に著明に大腿骨頭壊死が増加しており、患者の側面では ADL の極端な低下、医療経済面では医療費の高騰などの社会問題が深刻となっている。この大腿骨頭壊死の対処法としては、脊髄損傷の症例で壊死の治癒が報告されており、免荷による壊死部の治癒機転を促す方法として、前後の大腿骨頭回転骨切りや内反骨切り^{6,7)}が開発されている。しかし大腿骨頭壊死の治療連携などの不備のため、人工関節形成術などの end point 治療が大半を占めているのが現状である。

大腿骨頭壊死の治療・予防薬があれば、患者の側面および医療経済面での著しい恩恵の寄与が期待される。薬物の探求にはまず病態、病因の究明が先行する。現在考えられ、実証されつつある病因は、血液凝固能の

亢進による血栓形成、血管内皮傷害、脂肪細胞および脂質代謝異常、apoptosis、酸化ストレスなどが列挙される⁸⁾。

SHR は 1959 年に、岡本、青木らによって分離継代された高血圧自然発症ラットである。高血圧発症のみならず、末梢血管障害も呈する。大腿骨頭にはヒト大腿骨頭壊死と酷似した組織像を呈する大腿骨頭壊死みられる^{9,10,11)}。SHRSP でその頻度や程度が増加する¹²⁾。またステロイドを使用すると壊死の頻度が増加する⁵⁾。大腿骨頭壊死の病態・病因究明の in vivo の研究動物として、Pig や Dog や Rabbit や Chicken の使用報告が多い。実験法は外科的血管遮断やこれらの動物は高脂血症を呈しやすいので、負荷処置として、Steroid Hormone 投与が行われている。これらの動物の壊死の発生部位は骨幹部が主体で、ヒトの臨床所見とは異なっている。Rat を用いた研究は、散見されるが、その大半は外科的血管遮断である¹³⁾。SHRSP は自然発症の大腿骨頭壊死であり、Steroid Hormone 投与で増加することなどヒトの臨床所見に似ている。また他の動物実験とは異なり、SHRSP は純系であり、動物実験環境も単純化が可能である。

大腿骨頭壊死症の予防薬として効果が見込まれるものとして、松本、赤池ら¹⁴⁾はピタバスタチが NO bioavailability 低下によって生じる酸化ストレスを改善し、Steroid Hormone 過剰による血管内皮傷害を防止する可能性を報告している。Ichiseki らはラビットを用いた還元型グルタチオンは酸化 stress を抑制し、骨壊死の予防の可能性を示唆している¹⁵⁾。本村らは家兎を用いた実験でワーファリンとプロブコールの併用で骨壊死発生率を 5% へと低下させると述べている¹⁶⁾。岩切らは CYP3A6 活性を誘導させるシンバスタチンの方が CYP3A6 活性を誘導しないプラバスタチンよりも壊死の発生率を減少させたと述べている¹⁷⁾。Iuchi らは抗酸化剤である Vitamin C は NO 活性低下による血管内皮依存性弛緩反応の抑制を回復できると報告している¹⁸⁾。長澤らはワーファリンとスタチンを併用し、ワーファリン単独投与よりも壊死の発生率が低かったと述べている¹⁹⁾。

これらの報告は、文献引用などされ、信頼性が高い。

以上から、抗凝固作用と脂質代謝改善作用が大腿骨頭壊死の予防の本質と考えられる。この 2 作用を併せ持つ薬剤が大腿骨頭壊死の予防薬として望ましいと我々は考えた。

American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) は pentosan の大腿骨頭壊死症に対しての有効性を示

唆している²⁰⁾。その根拠はPPSが、脂肪融解作用と抗凝固作用と線維素溶解作用と抗炎症作用を有した薬剤であり、凝固を減らして、血小板凝集を減少させて、線維素溶解を刺激して、TGとCHOLレベルを低下させる能力を有しているためと記載がある。

Pentosan は 1947 年にドイツ・ミュンヘンでヨーロッパの木から抽出し半合成された分子量 4000 から 6000 Dalton の五炭糖多糖体硫酸ナトリウム塩である。ヘパリン類似物質である。抗凝固や抗血栓作用や抗高脂血症作用や抗酸化作用を有し、約 60 年前から主としてヨーロッパでヘパリンの代用薬として使用されている。また 1996 年間質性膀胱炎の治療薬として FDA の認可を得て米国、カナダで発売された。1990 年代後半にはイヌの変形性関節症の治療薬として使用され、現在世界中に普及している。

Pentosan の研究の第一人者である Peter Ghosh は Pentosan が多因子性に作用し、特に毛細血管内皮から t-PA や SOD の放出を刺激することによって fibrin や脂質による閉塞物を動化させ血流を改善し、また PAI-1 の放出の閾値を増加させる循環動態の改善作用を強調している²¹⁾。

SHRSP における自然発生の骨頭壊死と多因子(性)の投与によって発生した骨頭壊死では原因は異なっていると考えられるが、両者ともに骨頭壊死の発生率が低下したことは pentosan の持つ多面的作用、すなわち抗酸化作用、抗凝固作用、脂質代謝改善作用、抗炎症作用によるものがまず想定される。今回、Steroid Hormone 非投与の 2 群で pentosan 群は control 群と比べて壊死の発生率が低下した理由を考察すると上記の pentosan の作用機序のうち、循環動態の改善は aPTT や PT 値に変化なく、また解剖時臓器に出血傾向も認められなく、有意に作用したものととは考えにくい。生化学検査でコレステロール値に変化がみられないのに、トリグリセライド値が低下しており、Pentosan は heparin 類似薬の共通作用である、血管内皮に存在するリパーゼを遊離させて血中の特にトリグリセライドを低下させる作用がみられたものと思われる。このトリグリセライドの低下が改善も理由の 1 つと考える。

我々が最も注目している酸化 stress の関与に関して、検出には抗 4HNE モノクローナル抗体と抗 8-OHdG モノクローナル抗体を使用した。今回の実験で SHRSP に Steroid Hormone 非投与の 2 群を比較すると、Pentosan の投与で酸化ストレスが抗減少していたので、自然発症の大腿骨頭壊死の原因に酸化ストレスの関与が示唆

される。

Steroid Hormone 投与 2 群間について考えてみると、ステロイドを負荷すると抗 4HNE モノクローナル抗体と抗 8-OHdG モノクローナル抗体の両者ともに染色性が強く亢進し、酸化 stress が著明に増大していた。Pentosan を投与するとステロイドによって増大した酸化ストレスが抗 4HNE モノクローナル抗体と抗 8-OHdG モノクローナル抗体の両者で著明に改善していた。このことから、ステロイド負荷による大腿骨頭壊死の原因に酸化 stress が強く関与していることが考えられる。Pentosan は前述の bene 社製のナトリウム塩と Arthroparm (Sydney, Australia)社製の calcium pentosan polysulfate (CaPPS) がある。前段階の投与量と投与法の探索研究では、パルス療法モデルとして、両者を週一回の背部皮下注した。この実験方法では想定される結果や安定した結果を得ることが出来なかった。持続少量投与法を考えた場合、頻回の注射に比べて osmotic pump の使用がラットの負担も少なく、簡便である。筋肉内に抗凝固剤の持続投与は大きな血腫を誘発するので、投与法は osmotic pump をラットの背部皮下に埋設し腹腔内に shunt tube で腹腔内持続投与した。また CaPPS は水溶液が針状結晶を沈殿し易く、この osmotic pump に貯留するのは不相当と判断された。Pentosan として Bene 社の好意で NaPPS を供給していただき、Alzet 社の osmotic pump を使用し 3mg/day/kg で投与した。

Pentosan の血中濃度モニタリングが可能であれば、pentosan の作用機序など明確になるかもしれないが、pentosan の抗体の作成が非常に難しく、Pentosan は血中濃度を測ることが不可能で、トリグリセライド値の低下で、pentosan が体内に delivery されたことを確認するしかなかった。

heparin 類似薬としての作用は今回の使用量では、解剖時臓器の出血傾向はなく、また aPTT PT 値に異常なく、軽微であったと解釈できる。その使用量で、SHRSP Steroid Hormone 性大腿骨頭壊死症の発生率を有意に減少させており、予防薬として効果が十分見込める。

pentosan の臨床応用の可能性に関しては、今回の結果から、パルスの投与でなく、持続性に少量を投与することで予防薬として効果が十分望まれる。そこでまずは、大腿骨頭壊死が頻回に発生するステロイドパルス療法時に投与開始する方法が考えられる。内服薬のエルミンも間質性膀胱炎で使用されているので、これを応用する方法もあり得る。

大腿骨頭壊死の予防、治療法は、全世界中で探求され

ているが、未だその決定的なものは見つかっていない。今回の実験で pentosan は SHRSF モデルにおいて大腿骨頭壊死の発生率を有意に減少させていた。pentosan は Steroid Hormone 性大腿骨頭壊死症の予防薬探求に光明をさした。

5. 結論

Pentosan は、脂質代謝系の改善と酸化 stress の軽減により、SHRSF における大腿骨頭壊死の発生率を低させると考えられる。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hozumi A, Osaki M, Goto H, Sakamoto K, Inokuchi S, Shindo H. Bone marrow adipocytes support dexamethasone-induced osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;382:780-4.
- 2) Okano K, Enomoto H, Osaki M, Shindo H. Joint congruency as an indication for rotational acetabular osteotomy. *Clin Orthop Relat Res.* 2009; 467:894-900.

2. 学会発表

- 1) 野村賢太郎、尾崎誠、穂積晃、福島達也、進藤裕幸:特発性大腿骨頭壊死症に対する人工骨頭置換術と人工股関節置換術の治療成績の検討、第 118 回西日本整形災害・外科学会。長崎市、平成 21 年 11 月 14・5 日
- 2) 後藤久貴、尾崎誠、坂本和隆、穂積晃、熊谷謙治、進藤裕幸:破骨細胞分化のサポート細胞としての骨髄脂肪細胞 共培養系における細胞接触の影響、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会。横浜市、平成 21 年 11 月 5 日・6 日
- 3) 野崎義宏、熊谷謙治、宮田倫明、尾崎誠、丹羽正美、進藤裕幸:プラバスタチンによる易卒中高血圧自然発症ラットを使用したステロイドホルモン誘発大腿骨頭壊死の抑制効果、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会。横浜市、平成 21 年 11 月 5 日・6 日
- 4) 宮田倫明、熊谷謙治、野崎義宏、尾崎誠、穂積晃、古市格、村田雅和、丹羽正美、進藤裕幸:SHRSF 大腿骨頭壊死に対するペントサン投与、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会。横浜市、平成 21 年 11 月 5 日・6 日

- 5) 岡野邦彦、榎本寛、尾崎誠、高橋克郎、進藤裕幸:先天性股関節脱臼を伴わない臼蓋形成不全例の頻度、第 82 回日本整形外科学会学術集会。福岡市、平成 21 年 5 月 14-17 日
- 6) 熊谷謙治、宮田倫明、丹羽正美:脳卒中自然発症高血圧ラット大腿骨頭壊死薬理研究モデルを使用した Pentosan の有効性の検討、第 30 回日本臨床薬理学会年会。横浜市、平成 21 年 12 月 3-5 日
- 7) 熊谷謙治、村田雅和、丹羽正美:脳卒中自然発症高血圧ラットを用いた大腿骨頭壊死薬理研究モデル、第 30 回日本臨床薬理学会年会。横浜市、平成 21 年 12 月 3-5 日

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) Hirota Y. Etiology of idiopathic osteonecrosis of the femoral head: nationwide epidemiologic studies in Japan. *Osteonecrosis: Etiology, Diagnosis, and Treatment.* 1997, 51-58.
- 2) Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda Y, Sugimori T, Matsumoto T. DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology (Oxford).* 2005, 44:456-460.
- 3) Fisher DE.. The role of fat embolism in the etiology of cortico-steroid-induced avascular necrosis : clinical and experimental results. *Clin Orthop* 1978, 130:68-80.
- 4) Zhang G, Qin L, Sheng H, Wang XL, Wang YX, Yeung DK, Griffith JF, Yao XS, Xie XH, Li ZR, Lee KM, Leung KS. A novel semisynthesized small molecule icaritin reduces incidence of steroid-associated osteonecrosis with inhibition of both thrombosis and lipid-deposition in a dose-dependent manner. *Bone.* 2009, 44:345-356.
- 5) Murata M, Kumagai K, Miyata N, Osaki M, Shindo H. Osteonecrosis in stroke-prone spontaneously

- hypertensive rats: Effect of glucocorticoid. *J Orthop Sci.* 2007, 12:289-295.
- 6) Atsumi T, Muraki M, Yoshihara S, Kajihara T. Posterior rotational osteotomy for the treatment of femoral head osteonecrosis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1999, 119:388-393.
 - 7) Sugioka Y. Transtrochanteric anterior rotational osteotomy of the femoral head in the treatment of osteonecrosis affecting the hip: a new osteotomy operation. *Clin Orthop Relat Res.* 1978, 130:191-201.
 - 8) Michael A. Mont, Lynne C. Jones and David S. Hungerford Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Ten Years Later *J Bone Joint Surg Am.* 2006, 88:1117-1132.
 - 9) Wada M, Kumagai K, Murata M, S-Yamashita Y, Shindo H. Warfarin reduces the incidence of osteonecrosis of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. *J Orthop Sci.* 2004, 9:585-590.
 - 10) Iwasaki K, Hirano T, Sagara K, Nishimura Y. Idiopathic necrosis of the femoral epiphyseal nucleus in rats. *Clin Orthop* 1992, 277:31-40.
 - 11) Hirano T, Iwasaki K, Sagara K, Nishimura Y, Kumashiro T. Necrosis of the femoral head in growing rats. Occlusion of lateral epiphyseal vessels. *Acta Orthop Scand.* 1989, 60:407-410.
 - 12) Suzuki M, Kumagai K, Osaki M, Murata M, Tomita M, Miyata N, Hozumi A, Niwa M. Osteonecrosis of femoral head in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats, especially old rats. *Clin Exp Hypertens.* 2008, 30:689-697.
 - 13) Boss JH, Misselevich I, Peskin B, Zinman C, Levin D, Norman D, Reis DN. Postosteonecrotic osteoarthritis-like disorder of the femoral head of rats. *J Comp Pathol.* 2003, 129:235-239.
 - 14) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Yoshida S, Ise T, Iwase T, Ishikawa K, Azuma H, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exerts eNOS-independent protective actions against angiotensin II induced cardiovascular remodeling and renal insufficiency. *Circ Res.* 2008, 102:68-76.
 - 15) Ichiseki T, Ueda Y, Katsuda S, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology (Oxford).* 2006, 45:287-290.
 - 16) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Jingushi S, Iwamoto Y. Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 2004, 50:3387-3391.
 - 17) Iwakiri K, Oda Y, Kaneshiro Y, Iwaki H, Masada T, Kobayashi A, Asada A, Takaoka K. Effect of simvastatin on steroid-induced osteonecrosis evidenced by the serum lipid level and hepatic cytochrome P4503A in a rabbit model. *J Orthop Sci.* 2008, 13:463-468.
 - 18) Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, Ohshima Y, Shintani Y, Azuma H, Matsumoto T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2003, 92:81-87.
 - 19) Nagasawa K, Tada Y, Koarada S, Tsukamoto H, Horiuchi T, Yoshizawa S, Murai K, Ueda A, Haruta Y, Ohta A. Prevention of steroid-induced osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus by anti-coagulant. *Lupus.* 2006, 15:354-357.
 - 20) Cheras PA. Role of hyperlipidemia, hypercoagulability, and hypofibrinolysis in osteonecrosis and osteoarthritis. In: Urbaniak JR, Jones JP Jr, editors. *Osteonecrosis: etiology, diagnosis, and treatment.* Rosemont, IL: American Academy of Orthopedic Surgeons. 1997, 97-104.
 - 21) Ghosh P. The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulfate for its treatment. *Semin Arthritis Rheum.* 1999, 28:211-267.

抗血小板薬によるステロイド性骨壊死予防効果

— 予備的実験報告 —

山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙嘎日達、岩本幸英
(九州大学 整形外科)

抗血栓薬には、動脈性血栓予防を目的とした抗血小板薬と、静脈性血栓予防を目的とした抗凝固薬がある。虚血性心疾患やアテローム血栓性脳梗塞など、血管壁の障害を起因とした動脈性血栓による梗塞性疾患の予防には、抗血小板薬が使用されている。今回、約 70% の骨壊死発生が期待されるステロイド性家兎骨壊死モデルに対して、抗血小板薬クロピドグレルを継続的に投与し、骨壊死発生の予防効果を予備的に検討した。骨壊死発生率は 40% であった。

1. 研究目的

抗血栓薬には、動脈性血栓予防を目的とした抗血小板薬と、静脈性血栓予防を目的とした抗凝固薬がある。アスピリンやチクロピジンなどの抗血小板薬は、主に虚血性心疾患やアテローム性血栓性脳梗塞、閉塞性動脈硬化症など、動脈硬化性病変を基盤にして血管壁の破綻が起き、形成される血小板血栓に起因する疾患に対して、予防的投与が行われている。対して、ワルファリンカリウム、ヘパリンナトリウムなどの抗凝固薬は、深部静脈血栓症や心房細動など、血流停滞によって形成される凝固血栓に起因する疾患に対して、予防的投与が行われている。

約 70% の骨壊死発生率が認められるステロイド性骨壊死動物モデルにおいて、抗凝固薬投与により骨壊死発生率から 33% に抑制されたと報告されている^{1,2,3)}。

本実験の目的は、ステロイド性骨壊死家兎モデルに抗血小板薬を投与し、骨壊死発生抑制効果を検討することである。

抗血小板薬として、クロピドグレル(商品名プラビックス)を使用した。

2. 研究方法

28 週齢以上の成熟日本白色家兎 10 羽に対して、経胃チューブ用いて、20ml の生理食塩水に溶解したクロピドグレル 5mg/kg を連日経胃投与した。投与開始 1 週後にメチルプレドニゾロン 20mg/kg を一回右殿筋内に

注射した。抗血小板薬投与は継続し、投与開始 3 週後に犠牲死とした。

骨壊死は、両大腿骨及び上腕骨の近位 1/3 及び遠位部(計 8 部位)の HE 染色標本を用いて病理組織学的に判定した。

抗血小板薬投与開始直前と投与開始後 1 週毎に採血した。採血管には凝血予防を目的として、1/10 量のクエン酸を添加したものを使用した。採取した全血に血小板凝集惹起物質として、4 濃度(0.25、1.0、4.0、16.0 μ M)の ADP を添加し、血小板を凝集させた。3 分間の反応の後、血小板凝集能測定機(WBA カルナ、IMI、埼玉)にて、血小板凝集が得られる惹起物質の最低濃度 Platelet aggregation threshold index (PATI)を測定した。

3. 研究結果

抗血小板薬投与開始直前と比較し、投与開始 1 週後に PATI は有意に上昇し、3 週後まで高値を維持していた(図 1)。

骨壊死発生率は 40%(10 羽中 4 羽)であった(図 2,3)。