

大腿骨頸部内側骨折における虚血後修復反応の組織学的検討

坂井孝司、中村宣雄、岩名大樹、北田誠、西井 孝、高尾正樹、吉川秀樹、菅野伸彦
(大阪大学大学院医学系研究科 整形外科)

大腿骨頭における虚血後修復反応を調査するため、昨年度に引き続いて、受傷後 2 週以内に摘出した大腿骨頸部骨折の大腿骨頭 58 関節を調査した。TRAP 陽性細胞は 8 関節(14%)で retinaculum、円靭帯周囲、骨折部近傍に見られた。HIF-1 α は 17 関節(29%)に発現し、proangiogenic factor である VEGF は 42 関節(72%)、FGF-2 は 41 関節(71%)に発現し、いずれも骨折部近傍に存在した。HIF-1 α や FGF-2 の発現は受傷後 3 日以内の例で多く見られた。

1. 研究目的

障害された骨における修復過程では osteogenesis と angiogenesis が密接に関わっている。我々は特発性大腿骨頭壊死症における修復反応として、TRAP 陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 陽性細胞が、境界域に多く発現し、X線学的病期と関連があることを報告した¹⁾。但し特発性大腿骨頭壊死症の修復反応をヒト組織で検討する際、人工股関節置換術時に大腿骨頭を採取するため、stage 進行例が多く壊死発生後長期経過しており、早期の修復反応を捉えられない。また動物モデルでは、ヒトの骨壊死との異動が常に問題となる。そこで昨年度から引き続いて、受傷後 2 週以内の大腿骨頸部内側骨折症例を対象として虚血後の修復反応を組織学的に検討した。

2. 研究方法

対象は 57 例 58 関節(男性 9 例、女性 48 例)で、平均 80 歳(58-97 歳)、受傷後手術までの期間は平均 6.5 日(1-14 日)で、受傷後 2 週以内の例に限定して調査した。Garden stage3 が 10 関節、stage4 が 48 関節で、4 例で bisphosphonate を使用していた。

手術時に摘出した大腿骨頭組織について、昨年度同様以下のように調査した。すなわち、ホルマリン固定し冠状断にてスラブを作成し、EDTA による脱灰後、HE 染色、TRAP 染色を施行した。さらに抗 HIF-1 α 抗体(monoclonal rabbit IgG)、抗 VEGF 抗体(monoclonal rabbit IgG)、抗 FGF-2 抗体(polyclonal rabbit IgG)による免疫染色を施行し、TRAP 陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、

FGF-2 各々の発現が円靭帯近傍、retinaculum 近傍、骨折部近傍の各領域における分布状況と分布密度を調査した。なお転移性白蓋骨腫瘍で広範切除を施行した切除骨頭をコントロールとした。分布密度に関しては、陽性細胞数を 40 倍と 100 倍の視野で計測し、grade0、grade1、grade2、grade3 の 4 段階で評価した。さらに組織学的所見と Garden stage、受傷から手術までの期間との関連を調査した。

3. 研究結果

TRAP 陽性細胞は 8 関節(14%)で陽性であった。円靭帯・retinaculum 近傍、骨折部近傍(grade1: 7 関節、grade2: 1 関節)で見られた。コントロールでも円靭帯近傍(grade1)および retinaculum 近傍(grade1)に陽性細胞を認めた。

HIF-1 α は 17 関節(29%)で骨折部近傍の血管内皮細胞で陽性であった。grade1 が 11 関節、grade2 が 4 関節、grade3 が 2 関節で、コントロールは陰性であった。VEGF は 42 関節(72%)で骨折部近傍の浮腫様組織で陽性であった。全例 grade1 で、コントロールは陰性であった。FGF-2 は 41 関節(71%)で骨折部近傍の骨髄細胞で広く陽性であった(grade1: 24 関節、grade2: 10 関節、grade3: 7 関節)。また円靭帯近傍、retinaculum 近傍でも発現が見られた。

Garden stage3 例/4 例と組織所見の比較(表 1)では、TRAP 陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 発現については stage3 例と 4 例で差を認めなかった。

受傷後手術までの日数が 3 日以内の例と 3 日を超え

る例との組織所見の比較(表 2)では、HIF-1 α で受傷後 3 日以内で陽性例が多い傾向があり、TRAP 陽性細胞、VEGFとFGF-2発現については差を認めなかった。

表1 Garden stage 3例とstage4例の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	stage 3	7	2	1	0	N.S.
	stage 4	43	5	0	0	
HIF-1 α	stage 3	5	3	1	1	N.S.
	stage 4	36	8	3	1	
VEGF	stage 3	4	6	0	0	N.S.
	stage 4	12	36	0	0	
FGF-2	stage 3	3	4	3	0	N.S.
	stage 4	14	20	7	7	

(Chi-square test)

表2 受傷後日数 \leq 3日例と $>$ 3日例の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	\leq 3日	10	2	1	0	N.S.
	$>$ 3日	40	5	0	0	
HIF-1 α	\leq 3日	5	3	3	2	0.001
	$>$ 3日	36	8	1	0	
VEGF	\leq 3日	4	9	0	0	N.S.
	$>$ 3日	12	33	0	0	
FGF-2	\leq 3日	0	7	3	3	0.05
	$>$ 3日	17	17	7	4	

(Chi-square test)

4. 考察

TRAP 陽性細胞は、大腿骨頸部骨折例では controlと同様に円靭帯、retinaculum 近傍に存在し、また骨折部近傍にも存在していた。これらの所見は昨年度と同様であった。

HIF-1 α は組織の阻血状態の結果生じる細胞内低酸素状態において誘導される特異的転写因子である²⁾。大腿骨頭壊死症の抗 HIF-1 α 抗体による免疫染色では、修復層においてFlk-1陽性の内皮細胞由来の細胞で陽性となる²⁾。昨年度同様、骨折部近傍の血管内皮細胞に発現し、受傷後3日以内で多く見られ、受傷後からの期間との関連から、受傷後早期に多く発現している可能性が示唆された。

VEGFはproangiogenic growth factorで、骨細胞を刺激し骨の修復を促進する³⁾。またFGF-2は虚血下でVEGFと同等に血管新生を誘導する³⁾。VEGFは骨折部近傍の浮腫様組織に、FGF-2は骨髄細胞に広く発現し、特発性大腿骨頭壊死症でのreparative interfaceと同様の所見であった¹⁾。Garden stageや受傷後からの期間とは関連が見られなかったが、systemicには長管骨の骨

折後2週でVEGF・FGF2の血中濃度が増加するとの報告もあり^{4),5)}、局所所見との差異がみられ、この傾向は今年度も同様であった。

5. 結論

大腿骨頸部内側骨折の大腿骨頭では、TRAP陽性細胞は円靭帯、retinaculumや骨折部近傍に存在した。HIF-1 α 、VEGF、FGF-2はいずれも骨折部近傍に発現し、HIF-1 α は血管内皮に、VEGFは浮腫領域に、FGF-2は骨髄細胞に広く見られたHIF-1 α やFGF-2の発現は受傷後3日以内の例で多く見られた。

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

- Li W, Sakai T, Nishii T, Nakamura N, Takao M, Yoshikawa H, Sugano N. Distribution of TRAP Positive Cells and Expression of HIF-1 α , VEGF, and FGF-2 in the Reparative Reaction in Patients with Osteonecrosis of the Femoral Head. J Orthop Res 27:694-700,2009
- Okada Y, Tanikawa T, Iida T, Tanaka Y. Vascular injury by glucocorticoid; involvement of apoptosis of endothelial cells. Clin Calcium 17:872-877, 2007.
- Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. Drug Discovery Today 8:980-989, 2003.
- Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vecsei V, Aharinejad S. VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing. J Orthop Res

27:1293-1297, 2009.

- 5) Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. Arch Orthop Trauma Surg 129: 989-997, 2009.

大腿骨頭軟骨下骨折、急速破壊型股関節症の組織学的検討

特発性大腿骨頭壊死症との比較

坂井孝司、阿部裕仁、高尾正樹、吉川秀樹（大阪大学大学院医学研究科 整形外科）
西井孝、菅野伸彦（大阪大学大学院医学研究科 運動器医工学治療学）
安藤渉、大園健二（関西労災病院 整形外科）
三木秀宣（国立大阪医療センター 整形外科）
李勝博（市立豊中病院 整形外科）
原口圭司（大阪府立急性期総合医療センター 整形外科）

大腿骨頭軟骨下骨折では組織学的に、軟骨下骨梁骨折周囲の仮骨に沿って TRAP 陽性細胞を認めた。一方急速破壊型股関節症では軟骨下領域に TRAP 陽性細胞の集簇を認め、また RANKL は骨梁にそった lining cell や線維組織内の細胞に多く発現し、骨破壊に関与している可能性が示唆された。

1. 研究目的

Postel らは 6-12 か月で股関節の破壊が進行し、激しい股関節痛をきたす疾患群を急速破壊型股関節症 (RDC) として報告した¹⁾。RDC は大腿骨頭壊死症の鑑別診断の一つで、種々の mechanical factor やサイトカインとの関わりが報告されている²⁾⁻⁶⁾。何らかの initial episode に引き続き osteoclast が活性化し骨破壊に関わっている。一方、骨脆弱性素因を有さない例も含めた骨頭下軟骨下骨折 (SFFH) は、軽微な外傷あるいは誘因なく発症し、MRI で骨頭荷重部に局所的異常信号領域や骨頭内浮腫像を認めると報告され、骨頭壊死症の鑑別疾患の一つとなっている⁷⁾⁻¹⁰⁾。

本研究の目的は、SFFH、RDC について、大骨頭組織を対象に、主に HE 染色以外の組織学的な特徴を明らかにすることである。

2. 研究方法

対象は、SFFH5 関節、RDC44 関節で、これまでに報告してきた ION51 関節¹¹⁾と比較した。大腿骨頭組織を作成し、HE、TRAP 染色を行い TRAP 陽性細胞の分布や集簇の有無について調査した。40 倍の視野で 50 個以上の TRAP 陽性細胞を認めた場合集簇とした。また抗 RANKL、MMP-9、CD-68 抗体による免疫染色を行った。

3. 研究結果

肉眼的所見では、SFFH で軟骨下骨梁の骨折、RDC では関節面の著明な破壊と線維性肉芽組織、ION では修復領域で区画された黄色調の壊死領域が認められた。HE 染色所見について、SFFH では軟骨下骨梁の骨折とその周囲に仮骨形成を認めたが、ION と異なり壊死領域が存在しなかった。また周囲に bone marrow edema を認め、軟骨は残存していた。RDC では関節面の広範な骨梁破壊と線維性肉芽組織、ION では壊死、修復、正常領域に区画されていた。

TRAP 染色では、SFFH のマクロ像では染色は認められなかった。RDC ではマクロでも骨破壊部にそって赤い染色が確認でき、ION では stage3B 以後の症例で修復領域にそって染色が確認できた。SFFH で TRAP 陽性細胞は、軟骨下骨梁骨折周囲に存在する仮骨周囲にそって存在した (図 1)。陽性細胞は多核細胞が多く osteoclast と思われた。RDC では、TRAP 陽性細胞は、軟骨下領域の線維性組織・骨梁周囲に集簇し、陽性細胞について、多核細胞は osteoclast と思われたが、単核細胞も多く存在した (図 2)。TRAP 陽性細胞は SFFH5 例中 4 例に存在したが、集簇は認めなかった。RDC では 34 例 (77%) で TRAP 陽性細胞の集簇を認め、特徴的であった。RDC で TRAP 陰性であった 3 例は、骨破壊が著明で骨組織がほぼ消失し、線維組織が主体のいわば

壁土のような組織であった。なお ION では全例に TRAP 陽性細胞を認めたが、集簇は認めなかった。

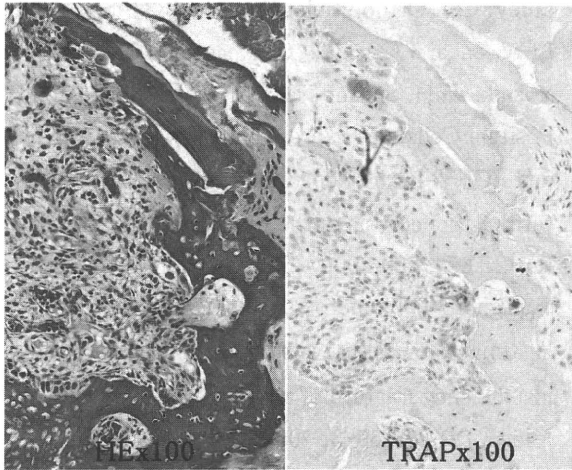


図 1 SFFH 例に対する HE, TRAP 染色

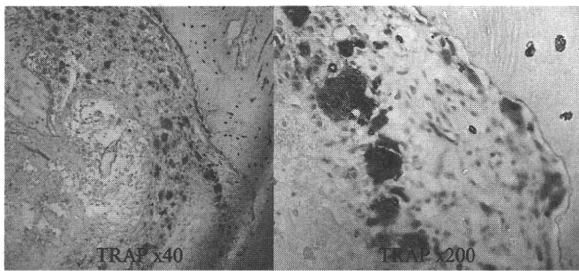


図 2 RDC 例に対する TRAP 染色

免疫染色について、SFFH 例では、5 例中 RANKL 陽性は 1 例のみで、MMP-9, CD68 の発現を全例で破骨細胞と思われる多核細胞に認めた。RDC では TRAP 陽性多核細胞に CD68, MMP-9 が陽性であった。TRAP 陽性細胞の周囲で RANKL は骨梁にそった osteoblast や線維組織内の細胞で発現し、osteoclast と思われる多核細胞には染まっていなかった(図 3)。RDC では 34 例(77%)で RANKL の発現を認め、MMP-9, CD68 の発現を 41 例(93%)に認めた。なお ION では RANKL の発現を Stage3B1 例に、MMP-9, CD68 の発現を 10 例(20%)に認めたのみであった。

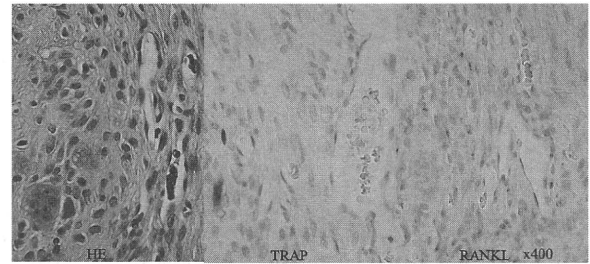


図 3 RDC 例に対する HE, TRAP, RANKL 免疫染色

4. 考察

HE 所見では、SFFH では軟骨下骨梁の骨折とその周囲に仮骨形成を認めたが、壊死領域が存在せず山本らの報告¹²⁾と同様の所見であった。軟骨は残存していた。RDC では関節面の広範な骨梁破壊と線維性肉芽組織、ION では壊死、修復、正常領域に区画され、鑑別可能であった。

TRAP 陽性細胞の集簇については以前に発表した OA, RA, 大腿骨頸部骨折との比較¹³⁾でも RDC で特徴的であった。TRAP 陽性細胞は、RA 滑膜において関節軟骨の破壊を誘導する可能性が報告されており¹⁴⁾、RDC でも軟骨下領域に集簇を認め、骨破壊に関与している可能性があった。

RANKL は RA の骨破壊に関与しており、破骨細胞の前駆細胞表面の RANK と結合し破骨細胞分化を促進するといわれている。RDC 例でも骨梁周囲や線維性組織内に多く発現し、骨破壊に関与している可能性が示唆された。

5. 結論

SFFH では軟骨下骨梁骨折周囲の仮骨に沿って TRAP 陽性細胞を認めた。RDC では軟骨下領域に TRAP 陽性細胞の集簇を認め、また RANKL は骨梁にそった lining cell や線維組織内の細胞に多く発現し、骨破壊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
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) Postel M and Kerboul M. Total prosthetic replacement in rapidly destructive arthrosis of the hip joint. Clin Orthop Relat Res 72:138-144, 1970.
- 2) Komiya S, Inoue A, Sasaguri Y, Minamitani K, Morimatsu M. Rapidly destructive arthropathy of the hip. Studies on bone resorptive factors in joint fluid with a theory of pathogenesis. Clin Orthop Relat Res 284:273-82, 1992.
- 3) Tamai M, Sagawa K, Kawabata R, Inoue A, Itoh K. Production of IL-6 by T cells from the femoral head of patients with rapidly destructive coxopathy (RDC). Clin Exp Immunol 103:506-13, 1996.
- 4) Sugano N, Ohzono K, Nishii T, Sakai T, Haraguchi K, Yoshikawa H, Kubo T. Early MRI findings of rapidly destructive coxopathy. Magnetic Resonance Imaging 19:47-50, 2001.
- 5) Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. Arthritis Rheumatism 46:2625-31, 2002.
- 6) Yamamoto T, Takabatake K, Iwamoto Y. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head resulting in rapid destruction of the hip joint: a sequential radiographic study. AJR 178:435-7, 2002.
- 7) Song WS, Yoo JJ, Koo KH, Yoon KS, Kim YM, Kim HJ. Subchondral fatigue fracture of the femoral head in military recruits. J Bone Joint Surg Am 86-A: 1917-24, 2004.
- 8) Kim JW, Yoo JJ, Min BW, Hong SH, Kim HJ. Subchondral fracture of the femoral head in healthy adults. Clin Orthop Relat Res 464:196-204, 2007.
- 9) Yamamoto T, Nakashima Y, Shuto T, Jingushi S, Iwamoto Y. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head in young adults. Skeletal Radiol 36:S38-42, 2007.
- 10) Ishihara K, Miyanishi K, Ihara H, Jingushi S, Torisu T. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head may be associated with hip dysplasia: a pilot study. Clin Orthop Relat Res 468:1331-5, 2010.
- 11) Li W, Sakai T, Nishii T, Nakamura N, Takao M, Yoshikawa H, Sugano N. Distribution of TRAP Positive Cells and Expression of HIF-1 α , VEGF, and FGF-2 in the Reparative Reaction in Patients with Osteonecrosis of the Femoral Head. J Orthop Res 27:694-700, 2009
- 12) Yamamoto T, Iwamoto Y, Schneider R, Bullough PG. Histopathological prevalence of subchondral insufficiency fracture of the femoral head. Ann Rheum Dis 67:150-3, 2008.
- 13) 坂井孝司 菅野伸彦 中村宣雄 安藤渉 西井孝 高尾正樹 山村在慶 岩名大樹 花之内健仁 吉川秀樹 急速破壊型股関節症におけるTRAP陽性細胞の発現様式 Hip Joint 34:755-7, 2008.
- 14) Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, Hashimoto J, Suzuki R, Yoshikawa H, Ochi T. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. Ann Rheum Dis 62:196-203, 2003.

特発性大腿骨頭壊死症に対する血管柄付腸骨移植術後の組織学的検討

阿部裕仁 坂井孝司 西井孝 高尾正樹 中村宣雄 吉川秀樹 菅野伸彦
(大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学)

特発性大腿骨頭壊死症に対する血管柄付腸骨移植術(VIBG)後の修復反応を調査するため、組織学的に TRAP、HIF1- α 、VEGF、FGF-2 の分布を摘出骨頭 2 例について、と core biopsy(CB)術後 4 例をコントロールとして調査した。VIBG 移植骨周囲、CB 移植骨および骨孔周囲に TRAP 陽性細胞を部分的に認めた。HIF1- α は VIBG、CB とも全例で認められなかったが、VIBG で VEGF、FGF2 の発現を部分的に認めた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症に対する血管柄付骨移植の目的は、①壊死組織への remodeling の誘導、②壊死部に対する力学的補強による圧潰予防である¹⁾。血管柄付骨移植は血管柄付腓骨移植(vascularized fibular bone graft; VFBG)と、血管柄付腸骨移植(vascularized iliac bone graft; VIBG)に大別される。このうち VIBG は、深腸骨回旋動脈を温存したまま腸骨を採取し、頸部前面中央に頸部基部より骨頭直下までに移植する術式である。臨床成績では術後 5-8 年の経過観察で success rate が 24%から 97%と報告されている²⁻⁵⁾。

一方で術後移植骨周囲の組織学的評価の報告は少ない。VIBG 後の摘出骨頭に関して、組織学的に移植骨は生着し周囲の骨新生が生じていたとする報告はある^{6,7)}が、移植骨への修復反応に対する詳細な検討は行われていない。

本研究の目的は、特発性大腿骨頭壊死症に対する VIBG 後の修復反応について、組織学的に明らかにすることである。

2. 研究方法

特発性大腿骨頭壊死症に対する VIBG および CB 術後に圧潰を生じ、人工股関節全置換術(THA)を施行した際に摘出した大腿骨頭を組織学的に検討した。症例は VIBG が 2 例、CB が 4 例であった。CB のうち 3 例で人工骨移植術(HA)を併用していた。CB 単独例を除く全例がステロイド性的大腿骨頭壊死症であった。

初回手術から THA までの期間について、VIBG の 3 例は各々 6、8、10 年、CB+HA の 3 例は各々 0.2、2、16

年、CB 単独の 1 例で 15 年であった。初回術前の病型分類はすべて type C1 で、病期分類は stage 2 が 2 例、stage 3A が 4 例であった。THA 施行時の病期分類はすべて stage 4 であった(表 1)。

摘出骨頭を冠状面でスライスし、ホルマリン固定、EDTA で脱灰後に切片を作成した。修復反応の評価方法として移植骨周囲を壊死域、境界域、正常域に分け、それぞれの領域について観察した(図 1)。CB 単独例に関しては、骨孔周囲を観察した。多核の TRAP 陽性細胞を破骨細胞とし、Angiogenesis に関しては HIF1- α 、VEGF、FGF-2 の発現を評価した。

	age	gender	Diagnosis	type	初回手術時 stage	THA時 stage	初回手術-THA間 隔(年)
VIBG1	22	F	Steroid ON(SLE)	C1	3A	4	8
VIBG2	42	F	Steroid ON(原田病)	C1	2	4	10
CB+HA1	60	F	Steroid ON(Cushing症候群)	C1	3A	4	0.2
CB+HA2	38	M	Steroid ON(潰瘍性大腸炎)	C1	3A	4	2
CB+HA3	56	F	Steroid ON(特発性血小板減少症)	C1	2	4	16
CB	52	F	Idiopathic ON	C1	3A	4	15

表 1:患者背景

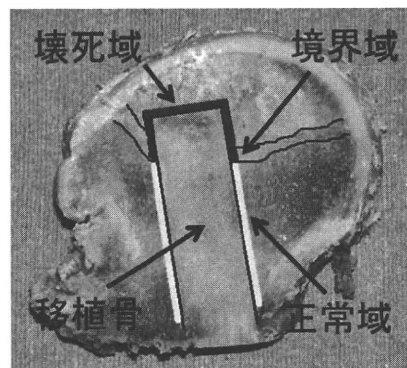


図 1:移植骨と壊死域、境界域、正常域

3. 研究結果

VIBG 2 例のうち 1 例で、壊死域、境界域、正常域すべての領域で TRAP 陽性細胞を認め、1 例で壊死域のみで発現していたが、各々の発現部位は限局していた。CB 例でも、各領域で部分的に発現していた(表 2)。HIF1- α は VIBG 例、CB 例ともに発現が見られなかった。VEGF、FGF-2 に関しては、VIBG 例で壊死域や境界域で部分的に発現を認めた(表 3)。CB 例では、VEGF の発現は認めなかったが、1 例で FGF-2 の発現を正常域でわずかに認めた。

TRAP	発現部位		
	壊死域	境界域	正常域
VIBG1	+	+	+
VIBG2	+	-	-
CB+HA1	+	+	-
CB+HA2	+	-	-
CB+HA3	+	+	-
CB	-	+	+

表 2: TRAP 陽性細胞の分布

	HIF1- α			VEGF			FGF-2		
	壊死域	境界域	正常域	壊死域	境界域	正常域	壊死域	境界域	正常域
VIBG1	-	-	-	-	+	-	-	+	-
VIBG2	-	-	-	+	-	-	+	-	-
CB+HA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB+HA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB+HA3	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CB	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 3: Angiogenesis factor の分布

症例供覧

42 歳女性、特発性大腿骨頭壊死症、VIBG 術後 10 年

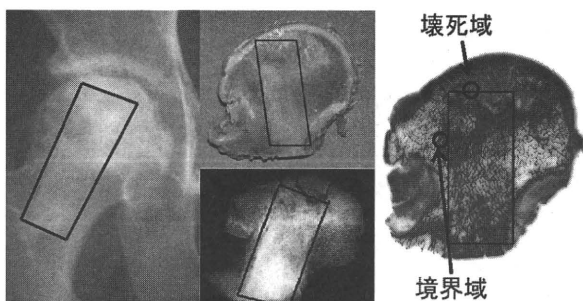


図 2: 肉眼的、X 線所見。移植骨部で骨梁の肥厚を認め、組織学的にも骨癒合していると考えられた。

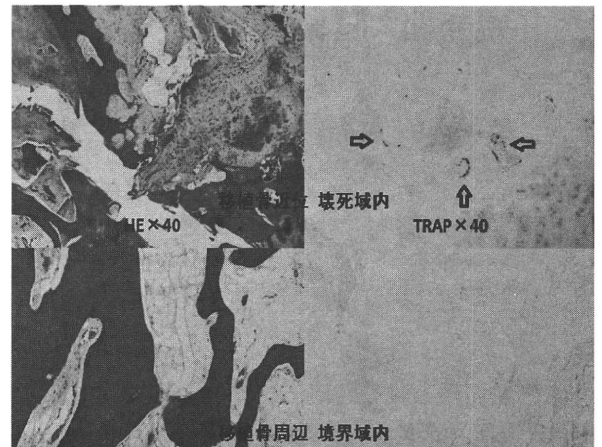


図 3: HE 染色、TRAP 染色。壊死域では TRAP 陽性細胞が存在し、骨新生を認めた。境界域では TRAP 陽性細胞は認められなかった。

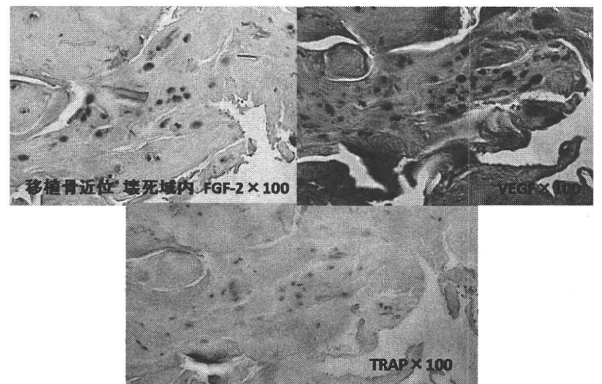


図 4: angiogenesis factor. 移植骨近位部壊死域で、FGF-2、VEGF の発現を認めた。同部位では TRAP 陽性細胞は認めなかった。

4. 考察

VIBG 例、CB 例の両者において移植骨部、骨孔部とも修復組織の侵入、その周囲の新生骨梁形成、TRAP 陽性細胞を認めた。TRAP 陽性細胞は移植骨周囲の壊死域、境界域、正常域で存在していたが、限局していた。CB 単独例では壊死域内に TRAP 陽性細胞を認めなかった。

VFBG を含めた過去の報告では、移植骨は生着し、remodeling が生じていたと報告している⁶⁻⁸⁾。今回の検討でも組織学的に移植骨は生着し、remodeling を示していた。HIF1- α は VIBG 例、CB 例ともに骨頭摘出時には stage4 で、発現を認めなかった⁹⁾。VIBG 例では移植骨近位部の壊死域、境界域に部分的に VEGF、FGF-2 の発現を認めた。なお TRAP 陽性細胞と VEGF、

FGF-2 発現部位との関連は認めなかった。

血管柄付骨移植の術後圧壊の原因として remodeling の程度、移植骨の位置・大きさなどが failure の原因として考えられている^{10,11)}。今回の症例では remodeling、angiogenesis は生じているものの、その反応は部分的で、移植骨のサイズは壊死部に対して小さく前方に限局していた。すなわち、壊死組織への remodeling は部分的で、圧潰に対する力学的補強も十分ではないと考えられた。

本研究の limitation として THA conversion 時に骨頭を切除し、組織学的検討が可能な failure 例のみを対象としていることである。当科関連施設では、9 例 10 関節に VIBG 施行しているが、その中で THA への conversion となった 2 例 2 関節を今回の対象とした。

5. 結論

特発性大腿骨頭壊死症に対する VIBG 例、CB 例ではともに、骨移植部、骨孔部周囲に新生骨梁形成、TRAP 陽性細胞の存在を認めた。HIF-1 α は両者とも発現を認めなかった。VIBG 例で VEGF、FGF-2 の発現を部分的に認めたが、CB では発現を認めなかった。

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) Scully SP, AARON RK. Survival Analysis of Hips Treated with core decompression or vascularized fibular grafting because of avascular necrosis. J Bone Joint Surg Am. 1998; 80: 1270-5.
- 2) Chen CC, Lin CL, Chen WC, Shih HN, Ueng SW, Lee MS. Vascularized iliac bone-grafting for osteonecrosis with segmental collapse of the femoral

- head. J Bone Joint Surg Am. 2009; 91: 2390-4.

- 3) Babhulkar S. Osteonecrosis of femoral head: Treatment by core decompression and vascular pedicle grafting. Indian J Orthop. 2009; 43: 27-35.
- 4) Nagoya S, Nagao M, Takada J, Kuwabara H, Wada T, Kukita Y, Yamashita T. Predictive factors for vascularized iliac bone graft for nontraumatic osteonecrosis of the femoral head. J Orthop Sci. 2004; 9: 566-70.
- 5) Eisenschenk A, Lautenbach M, Schwetlick G, Weber U. Treatment of femoral head necrosis with vascularized iliac crest transplants. Clin Orthop Relat Res. 2001; 386: 100-5.
- 6) 小助川維摩, 名越智, 加谷光規, 佐々木幹人, 館田健児, 山下敏彦. 特発性大腿骨頭壊死症に対する血管柄付き腸骨移植術の組織学的検討. Hip Joint 2009; 35: 361-4.
- 7) 菊池明, 中村吉秀, 三井博正, 藤哲. 大腿骨頭壊死症に対して施行した血管柄付き腸骨移植術後の骨頭病理所見. Hip Joint 2009; 35: 365-9.
- 8) Valle GDA, Bates J, Di Carlo E, Salvati EA. Failure of free vascularized fibular graft for osteonecrosis of the femoral head: a histopathologic study of 6 cases. J Arthroplasty. 2005; 20: 331-6.
- 9) Li W, Sakai T, Nishii T, Nakamura N, Takao M, Yoshikawa H, Sugano N. Distribution of TRAP-positive cells and expression of HIF-1 α , VEGF, and FGF-2 in the reparative reaction in patients with osteonecrosis of the femoral head. J Orthop Res. 2009; 27: 694-700.
- 10) Malizos KN, Quarles LD, Dailiana ZH, Rizk WS, Seaber AV, Urbaniak JR. Analysis of failures after vascularized fibular grafting in femoral head necrosis. Orthop Clin North Am. 2004; 35: 305-14.
- 11) Carter JR, Furey CG, Shaffer JW. Histopathologic analysis of failed vascularized fibular grafts in femoral head osteonecrosis. Microsurgery. 1998; 18: 110-8.

特発性大腿骨頭壊死症における圧潰の起点と部位

本村悟朗、山本卓明、山口亮介、池村聡、中島康晴、馬渡太郎、岩本幸英
(九州大学大学院医学研究院 整形外科)

圧潰は骨頭のどの部位を起点として発生するのか、及び、圧潰部位は壊死領域の大きさと関連があるか、を検討した。Stage 3A または 3B の特発性大腿骨頭壊死症の初回手術時に切除された、連続した 30 骨頭(25 患者)を対象とした。骨頭中央の切片において、壊死領域の内側端が大腿骨頭窩を超える群と超えない群とに分け、圧潰部位の違いの有無を検討した。30 骨頭すべてにおいて、圧潰は壊死領域の外側端を起点として発生していた。壊死領域の内側端が大腿骨頭窩を超えない場合、19 骨頭中 18 骨頭(94.7%)において軟骨下領域に圧潰を認めた。これに対し、壊死領域の内側端が大腿骨頭窩を超える場合、軟骨下領域に圧潰を認めたのは 11 骨頭中 4 骨頭(36.4%)であった。

1. 背景・研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ION)における骨頭圧潰の臨床的特徴として、壊死域が臼蓋荷重部外側 1/3 を超えると圧潰のリスクが高まることがあげられる。すなわち、分界部外側端の位置が圧潰発生に大きく影響することを示唆しているが、圧潰骨頭では分界部外側端での骨折を必ず生じているか検討した報告は渉猟し得た限りない。また、骨頭圧潰部位に関しては、骨頭軟骨下に沿うタイプ(crescent sign)や壊死域深部を通るものなどがあるが¹⁾、その要因に関して検討した報告はない。

本研究の目的は、圧潰骨頭において、1)分界部外側端での骨折が必ず生じているか、2)骨頭圧潰部位と壊死域の大きさとの関連があるか、を検討することである。

2. 研究方法

対象は、Stage 3A または 3B の ION の初回手術時に摘出された、連続した 30 骨頭(25 患者)である。男性 17 例、女性 8 例、手術時平均年齢 47 歳、ステロイド性 13 骨頭、アルコール性 15 骨頭、明らかな誘因なし 2 骨頭であった。

まず摘出骨頭をホルマリン固定した後、冠状面に沿った 3mm 厚の連続スライスを作成し、それぞれのスライスにおける肉眼像、軟線 X 線写真、HE 染色標本を検討した。

壊死域の大きさと骨頭圧潰部位との関連については、壊死域の大きさによって 2 群に分け、軟骨下骨領域での圧潰の割合について、統計学的に検討した(Fisher exact probability test)。

3. 研究結果

全骨頭において、分界部外側端での骨折を必ず含んでおり、肥厚した骨梁と壊死骨梁との間で骨折を生じていた。肉眼像および軟線 X 線像では圧潰が明瞭でなかった骨頭が 2 骨頭あったが、病理学的には骨折を認めた(図 1)。

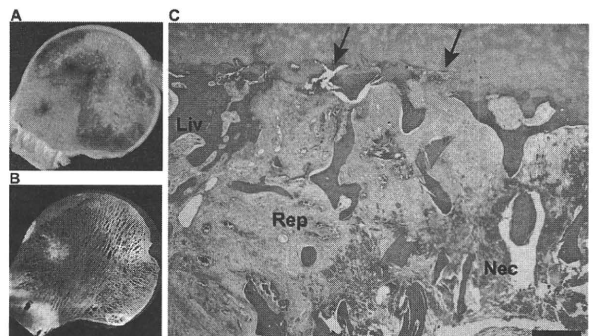


図1.肉眼像(A)および軟線 X 線像(B)では圧潰が明瞭でなかったが、HE 染色標本(C)にて分界部外側端での骨折(矢印)を認めた。

壊死領域の内側端が大腿骨頭窩を超えない場合(図 2A)、19 骨頭中 18 骨頭(94.7%)において軟骨下領域に圧潰を認めた。これに対し、壊死領域の内側

端が大腿骨頭窩を超える場合(図 2B)、軟骨下領域に圧潰を認めたのは 11 骨頭中 4 骨頭(36.4%)であった。2 群における軟骨下領域での圧潰の割合には統計学的有意差を認めた($p=0.0011$)。

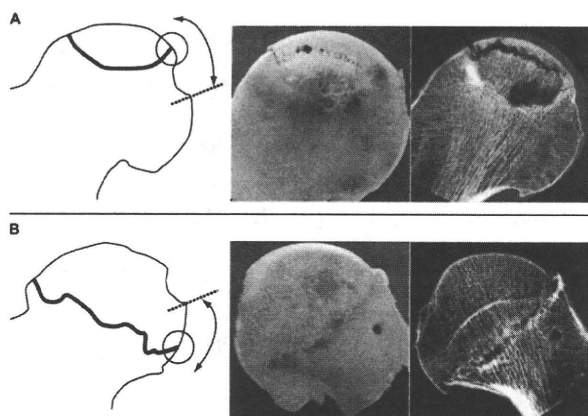


図 2. 壊死域の大きさと圧潰部位との関連

4. 考察

圧潰の起点について、Bulloughらは修復層での肥厚骨梁と隣接する壊死骨梁間でのストレス集中が壊死骨頭圧潰の一因であると推察している²⁾。本研究においては、圧潰骨頭では分界部外側端での骨折を必ず含んでおり、分界部外側端では肥厚骨梁と壊死骨梁間で骨折が生じていた。従って、荷重ストレスが大きな分界部外側端が圧潰の起点であることが示唆された。

本研究では、壊死域が比較的小さい場合には、軟骨下骨領域での圧潰が有意に多く認められた。Yangらは、3D FEM studyにおいて、分界部直上の壊死域深部にかかるストレスは、necrotic angleが大きくなるほど高くなると報告している¹⁾。以上より、壊死域の大きさは、圧潰の部位に影響を与える因子の1つであることが示唆された。

5. 結論

1. 圧潰骨頭では、分界部外側端での骨折を必ず生じていた。
2. 分界部外側端では、肥厚骨梁と壊死骨梁間で骨折が生じていた。
3. 壊死域が大腿骨頭窩を超えない場合には、軟骨下骨領域での圧潰が有意に多かった。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Motomura G, Yamamoto T, Suenaga K,

Nakashima Y, Mawatari T, Ikemura S, Iwamoto Y. Long-term outcome of transtrochanteric anterior rotational osteotomy for osteonecrosis of the femoral head in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2010;19(7):860-5.

- 2) Motomura G, Yamamoto T, Yamaguchi R, Ikemura S, Nakashima Y, Mawatari T, Iwamoto Y. Morphological analysis of collapsed regions in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* In press.

2. 学会発表

- 1) 本村悟朗、山本卓明、山口亮介、池村聡、中島康晴、馬渡太郎、岩本幸英:特発性大腿骨頭壊死症における圧潰の起点と部位、第 37 回日本股関節学会、福岡、2010.10.1-2.
- 2) 本村悟朗、山本卓明、末永賢也、中島康晴、馬渡太郎、岩本幸英:大腿骨頭前方回転骨切り術の長期結果～SLE 症例における検討～、第 83 回日本整形外科学会学術総会、東京、2010.5.27-30
- 3) 本村悟朗、山本卓明、末永賢也、中島康晴、馬渡太郎、岩本幸英:SLE 症例における大腿骨頭壊死症の治療～大腿骨頭前方回転骨切り術の長期結果～、第 54 回日本リウマチ学会総会・学術総会、神戸、2010.4.22-25

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) Yang JW, Koo KH, Lee MC, Yang P, Noh MD, Kim SY, Kim KI, Ha YC, Joun MS. Mechanics of femoral head osteonecrosis using three-dimensional finite element method. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2002;122:88-92.
- 2) Bullough PG, DiCarlo EF. Subchondral avascular necrosis: a common cause of arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1990;49:412-20.

未成熟家兎におけるステロイド性骨壊死の検討

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)

臨床的に小児ではステロイド性骨壊死が発生しにくいことが報告されているが、基礎実験で検討した報告はない。本研究の目的は、成熟、未成熟家兎におけるステロイド性骨壊死を比較検討することである。日本白色家兎成熟雄 20 羽、未成熟雄 20 羽に対してメチルプレドニゾロン 20mg/kg を一回右殿筋内に筋注し、2 週後に評価した。骨壊死発生率は成熟家兎が 75%(15/20 羽)であったのに対し、未成熟家兎は 5%(1/20 羽)であった。

1. 研究目的

小児におけるステロイド性骨壊死に関しては、10 歳以下の腎移植患者ではステロイド性骨壊死が発生しなかったという報告¹⁾や、小児 SLE 患者ではステロイド性骨壊死の発生率が低かったという報告²⁾があり、小児ではステロイド性骨壊死が発生しにくい可能性が示唆されている。しかし、基礎実験においてその可能性を検討した報告はない。

本研究の目的は、未成熟、成熟家兎におけるステロイド性骨壊死を比較検討することである。

2. 研究方法

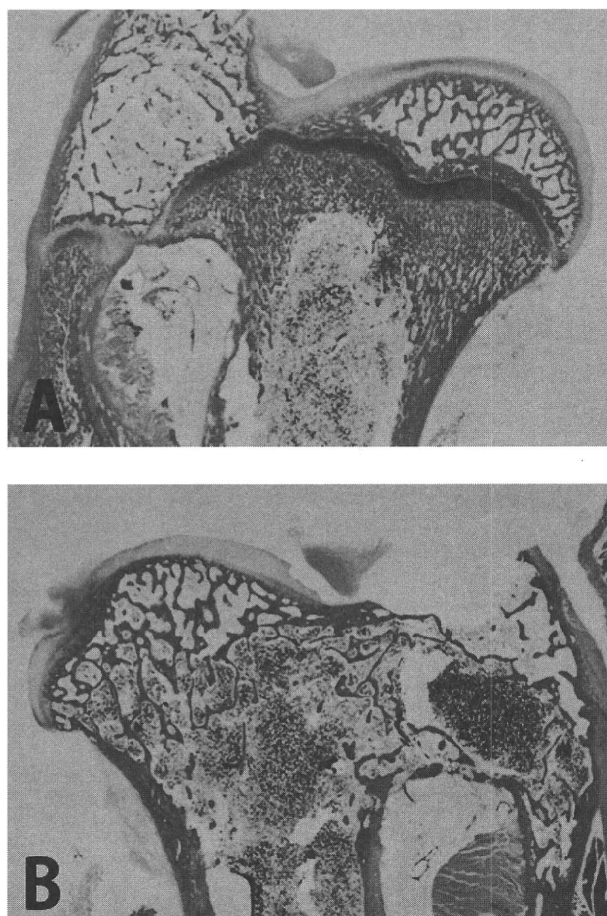
未成熟家兎は骨端軟骨が残存している家兎と定義し、15 週齢の家兎を用いた(図 1A)。成熟家兎は骨端軟骨が消失している家兎と定義し、30 週齢の家兎を用いた(図 1B)。15 週齢の未成熟雄家兎 20 羽、30 週齢の成熟雄家兎 20 羽を対象とし、メチルプレドニゾロン 20 mg/kg を一回右殿筋内に筋注し、2 週で犠牲死とした。また、ステロイド投与前から犠牲死まで各週採血を行った。

評価項目として、両群の壊死発生率、脂質、血小板など一般血液検査を比較した。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³⁾。

さらに、骨壊死発生率に関する要因として、CYP3A 活性と硝酸イオンを評価した。CYP3A 活性として、CYP3A が代謝酵素であるミダゾラムを 0.5mg/kg 静注し、60 分後のミダゾラムとミダゾラム代謝物の血中濃度比を算出したもの指標として用い、ステロイド投与前と投与 48 時間後で評価した。また、体内では不安定な NO を

評価する指標として一酸化窒素の酸化分解物である硝酸イオンを測定した。

図 1 大腿骨近位 (A) 未成熟家兎 (B) 成熟家兎



3. 研究結果

骨壊死発生率は、成熟家兔群が 75% (15/20 羽)であったのに対し、未成熟家兔群は 5% (1/20 羽)であり、両群間に有意な差が認められた(図 2)。

両群の骨壊死像を比較すると、核濃縮を伴う骨髄造血細胞壊死が認められるのは両群で同様であったが、成熟家兔では壊死周辺部に好酸性を示す漿液成分が認められ、壊死境界が比較的明瞭であるのに対して、未成熟家兔では壊死周囲に既に修復反応と考えられる細胞浸潤が認められ、境界が不明瞭となっていた(図 3A,B)。

血清脂質は、中性脂肪、総コレステロールとも、ステロイド投与前、投与 1 週後で未成熟家兔群が有意に高値であり、LDL/HDL 比は両群で有意な差は認められなかった(図 4)。

血小板値は各週とも未成熟家兔群が有意に高値であった(図 5)。

CYP3A 活性は、ステロイド投与前、投与 48 時間後ともに、未成熟家兔群が有意に高値であった(図 6)。

硝酸イオンは、ステロイド投与前は両群で有意な差は認められなかったが、成熟家兔群ではステロイド投与後有意に低下したのに対し、未成熟家兔群では有意な変化が認められず、投与後 1 週では未成熟家兔群が有意に高値であった(図 7)。

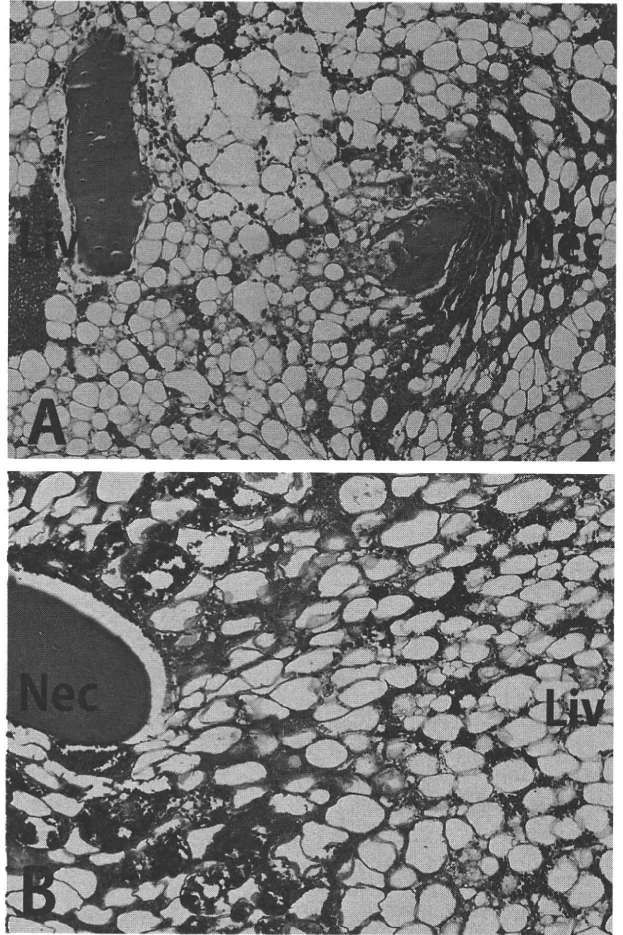
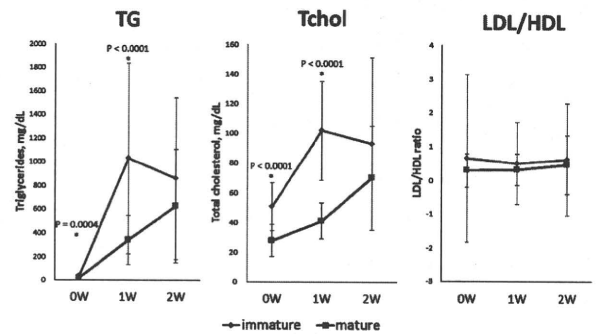


図 4 脂質

中性脂肪 (TG)、総コレステロール (Tchol)、low/high density lipoprotein cholesterol 比 (LDL/HDL ratio)



Mann-Whitney U test

図 2 骨壊死発生率

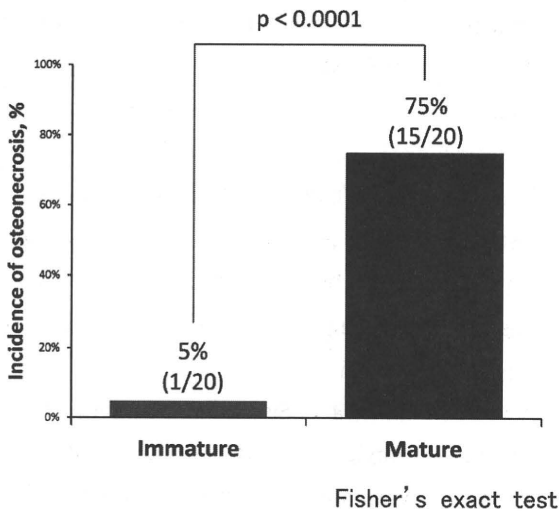


図 3 骨壊死病理組織像(HE 染色 × 100)

(A) 未成熟家兔骨壊死組織像

(B) 成熟家兔骨壊死組織像

図 5 血小板数

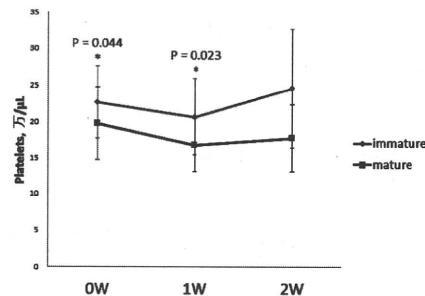
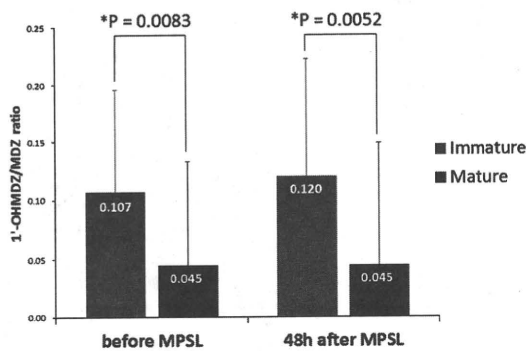
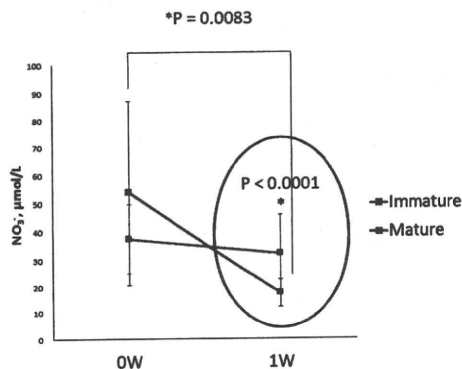


図 6 CYP3A 活性



Midazolam 0.5mg/kg 静注 60 分後の血中 1'-OH Midazolam/Midazolam 濃度比

図 7 硝酸イオン



4. 考察

本研究により、未成熟家兎にはステロイド性骨壊死が発生しにくいという結果が得られた。

家兎における骨壊死発生に関する要因として、中性脂肪値や LDL/HDL 比といった血清脂質が関与していたとの報告がある^{4,5)}。本研究では中性脂肪、コレステロール、血小板とも、骨壊死発生が少ない未成熟家兎群で高値であり、LDL/HDL 比に有意な差は認められず、本研究の結果には血清脂質の関与は認められなかった。

CYP3A 活性は、未成熟家兎で有意に高いという結果であった。ステロイド性骨壊死症患者の CYP3A 活性は、健常人及びアルコール性骨壊死患者に比し、有意に低かったとする報告や、小児では CYP3A 代謝薬剤の代謝率が高く、体重あたりで成人の 2 倍量を使用する必要があるという報告がある^{6,7)}。小児では CYP3A によるステロイド代謝活性が高いため、ステロイド性骨壊死が起きにくい可能性が示唆された。

また、硝酸イオンは未成熟家兎で有意に低下しないという結果であった。ステロイド性大腿骨頭壊死におい

て NO や endothelin-1 などの血管収縮因子を介した虚血発生の可能性が報告されており⁸⁾、未成熟家兎では NO 産生が低下しにくくステロイド性骨壊死が起きにくい可能性が示唆された。

5. 結論

未成熟、成熟家兎におけるステロイド性骨壊死を比較し、未成熟家兎では有意に骨壊死発生率が低かった。また、未成熟家兎は有意に CYP3A 活性が高く、ステロイド投与後も NO 産生が低下しなかった。

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) Stern PJ, Watts HG. Osteonecrosis after renal transplantation in children. *J Bone Joint Surg Am.* 1979 Sep;61(6A):851-6.
- 2) Nakamura J, Saisu T, Yamashita K, Suzuki C, Kamegaya M, Takahashi K. Age at time of corticosteroid administration is a risk factor for osteonecrosis in pediatric patients with systemic lupus erythematosus: a prospective magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):609-15.
- 3) 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 Nov;40(11):2055-64.
- 4) 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*. 2001 Feb;40(2):196-201

- 5) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Kondo K, Hirota Y, Iwamoto Y. Risk factors for developing osteonecrosis after prophylaxis in steroid-treated rabbits. *J Rheumatol*. 2008 Dec;35(12):2391-4. Epub 2008 Nov 1.
- 6) Kaneshiro Y, Oda Y, Iwakiri K, Masada T, Iwaki H, Hirota Y, Kondo K, Takaoka K. Low hepatic cytochrome P450 3A activity is a risk for corticosteroid-induced osteonecrosis. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Oct;80(4):396-402.
- 7) Anderson GD, Lynn AM. Optimizing pediatric dosing: a developmental pharmacologic approach. *Pharmacotherapy*. 2009 Jun;29(6):680-90.
- 8) Kerachian MA, Séguin C, Harvey EJ. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Apr;114(3-5):121-8. Epub 2009 Feb 21.

ステロイド性家兎骨壊死モデルにおける CYP3A 活性の性差に関する検討

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

成熟日本白色雄家兎 20 羽(雄群)、雌家兎 20 羽(雌群)を対象として、メチルプレドニゾロン(MPSL)20mg/kg 投与前、投与後 48 時間の CYP3A 活性を測定した。骨壊死発生率は雄群 75%(15/20 羽)、雌群 30%(6/20 羽)であり、雄群の骨壊死発生率が有意に高かった($P < 0.05$)。CYP3A 活性に関しては、MPSL 投与前、投与後 48 時間共に雌群が雄群に比し有意に高かった($P < 0.05$)。また、雄群の CYP3A 活性は、MPSL 投与前、投与後 48 時間で不変であったのに対して、雌群では有意に上昇していた。本研究結果から、CYP3A 活性の性差が骨壊死発生率の性差に関連している可能性が示唆された。

1. 研究目的

ステロイド性家兎骨壊死モデルでは、骨壊死発生率に性差(雄>雌)を認めることが報告されている¹⁾。また、ステロイドの代謝酵素である CYP3A 活性の個体差が、骨壊死発生に関連していることが報告されている²⁾。本研究の目的は、ステロイド性家兎骨壊死モデルにおける CYP3A 活性の性差を検討することである。

2. 研究方法

成熟日本白色雄家兎 20 羽(雄群)、雌家兎 20 羽(雌群)を対象とした。MPSL20mg/kg を 1 回右殿筋内に筋注、2 週で犠牲死とし両大腿骨、上腕骨の 8 領域における骨壊死発生を病理組織学的に検討した³⁾。CYP3A 活性に関しては、MPSL 投与前、投与後 48 時間に midazolam 0.5mg/kg を静注、1 時間後に採血し、簡便な CYP3A 活性の指標である 1'-OH midazolam / midazolam ratio を算出した^{4,5)}。また、血中エストラジオール(E2)値の測定を毎週行った。

(倫理面への配慮)

本実験は、九州大学大学院医学研究院付属動物実験施設倫理委員会の承認を得て行われた。

3. 研究結果

骨壊死発生率は雄群 75%(15/20 羽)、雌群 30%(6/20 羽)であり、雄群の骨壊死発生率が有意に高かった(図 1)。CYP3A 活性は、MPSL 投与前、投

与後 48 時間共に雌群が雄群に比し有意に高かった(図 2)。また、雄群の CYP3A 活性は、MPSL 投与前、投与後 48 時間で不変であったのに対して、雌群では有意に上昇していた(図 2)。E2 値は、MPSL 投与前(0W)から 2W にかけて有意に雌群で高かった(図 3)。

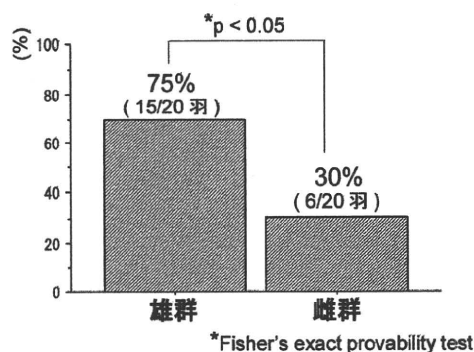


図 1 骨壊死発生率

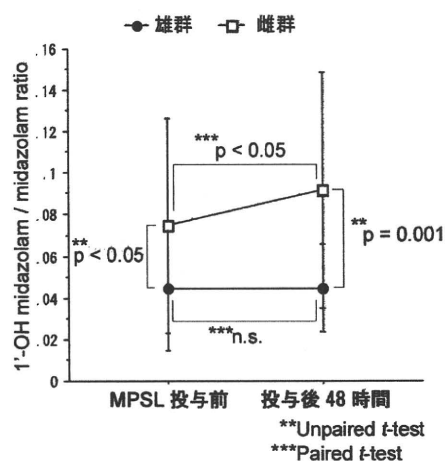


図 2 CYP3A 活性

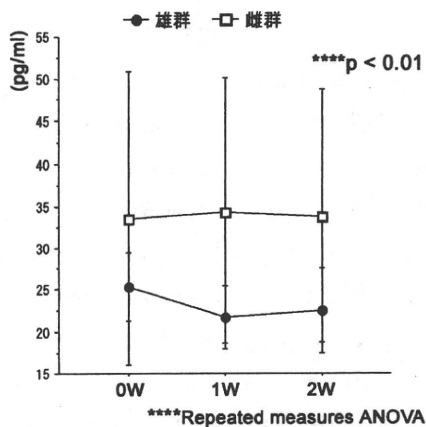


図3 エストラジオール(E2)

4. 考察

ステロイド性家兎骨壊死モデルにおいて、CYP3A 活性誘導薬投与群の骨壊死発生率は、コントロール群及び阻害薬投与群に比し、有意に低かったと報告されている^{6,7)}。本研究では、雌群のCYP3A 活性が雄群に比し有意に高く、CYP3A 活性の性差が骨壊死発生率の性差に関連していると考えられた。

ステロイドがCYP3A 活性に及ぼす影響として、健康人に対してデキサメタゾンを経口投与した結果、投与前に比しCYP3A 活性が平均25%上昇したと報告されている⁸⁾。本研究では、雄群のCYP3A 活性は不変であったのに対して、雌群はMPSL投与後48時間で有意に上昇していた。骨壊死に至るイベントはステロイド投与後早期に起こっていることが示唆されており⁹⁾、MPSL投与後早期のCYP3A 活性も骨壊死発生率の性差に関与していると考えられた。

雌群のE2値は雄群に比し有意に高かった。また、雄群のE2はMPSL投与後1週で減少しているのに対して、雌群では維持されていた。エストロゲンとCYP3A 活性の関連に関して、卵巣摘出したラットにE2を投与すると有意にCYP3A 活性が上昇したという報告があり¹⁰⁾、CYP3A 活性の性差にE2が関与していることが示唆された。

5. 結論

- ① 雌群のCYP3A 活性は、雄群に比し有意に高かった。
- ② 雌群のみ、MPSL投与後48時間のCYP3A 活性が上昇していた。
- ③ CYP3A 活性の性差に、性ホルモンが関与していることが示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikemura S, Yamamoto T, Nishida K, Motomura G, Iwamoto Y. Gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1128-1132.
- 2) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Nakashima Y, Mawatari T, Iwamoto Y. MRI evaluation of collapsed femoral heads in patients 60 years of age or older: the differentiation of subchondral insufficiency fracture from osteonecrosis of the femoral head. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;195:W63-68.

- 3) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Nakashima Y, Mawatari T, Motomura G, Iwamoto Y. A histopathological evaluation of a concave-shaped low-intensity band on T1-weighted MR images in a subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Skeletal Radiol*. 2010;39:185-188.

- 4) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Motomura G, Mawatari T, Nakashima Y, Iwamoto Y. The radiological outcome analyses of transtrochanteric curved varus osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 2010;92:781-786.

2. 学会発表

- 1) Ikemura S, Yamamoto T, Zhao G, Nakashima Y, Mawatari T, Motomura G, Iwamoto Y. Prediction of the outcome of transtrochanteric curved varus osteotomy for osteonecrosis. The AAOS 2010 Annual Meeting. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.

- 2) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Nakashima Y, Mawatari T, Iwamoto Y. Collapsed femoral heads in patients 60 years of age or older: histopathologic correlation with MRI. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.

- 3) Ikemura S, Yamamoto T, Nishida K, Motomura G, Iwamoto Y. Gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.

Orleans, Louisiana, USA.

- 4) Ikemura S, Yamamoto T, Iwasaki K, Motomura G, Yamaguchi R, Zhao G, Iwamoto Y. Bone marrow fat cell changes in alcohol-treated rabbits. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- 5) 池村聡、山本卓明、岩崎賢優、本村悟朗、山口亮介、趙嘎日達、岩本幸英:アルコール投与家兎における骨髓脂肪細胞径の検討、第 83 回日本整形外科学会学術総会.東京、5.27-30. 2010.
- 6) 池村聡、山本卓明、岩崎賢優、本村悟朗、山口亮介、趙嘎日達、岩本幸英:アルコール投与家兎における脂質代謝異常、第 37 回日本股関節学会.福岡、10.1-2. 2010.
- 7) 池村聡、山本卓明、本村悟朗、中島康晴、馬渡太郎、岩本幸英:大腿骨頭の圧潰を呈した 60 歳以上症例における病理組織学的所見と MRI 所見の対比、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会.京都、10.14-15. 2010.
- 8) 池村聡、山本卓明、岩崎賢優、本村悟朗、山口亮介、趙嘎日達、岩本幸英:アルコール投与家兎における脂質代謝異常、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会.京都、10.14-15. 2010.

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) Ikemura S, et al. Gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1128-1132.
- 2) Kaneshiro Y, et al. Low hepatic cytochrome P450 3A activity is a risk for corticosteroid-induced osteonecrosis. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80:396-402.
- 3) Yamamoto T, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues:

corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum*. 1997;40:2055-2064.

- 4) Zhu B, et al. The distribution and gender difference of CYP3A activity in Chinese subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;55:264-269.
- 5) 高岡 邦夫、他:特発性大腿骨頭壊死症の発生と肝 CYP3A 活性の相関に関する研究. 平成 17 年度総括・分担研究報告書、85-90, 2006.
- 6) Masada T, et al. Increased hepatic cytochrome P4503A activity decreases the risk of developing steroid-induced osteonecrosis in a rabbit model. *J Ortop Res*. 2008;26:91-95.
- 7) Tokuhara Y, et al. Low levels of steroid-metabolizing hepatic enzyme (cytochrome P450 3A) activity may elevate responsiveness to steroids and may increase risk of steroid-induced osteonecrosis even with low glucocorticoid dose. *J Orthop Sci*. 2009;14:794-800.
- 8) McCune JS, et al. In vivo and in vitro induction of human cytochrome P4503A4 by dexamethasone. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;68:356-366.
- 9) 市堰 徹、他: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. 平成 21 年度総括・分担研究報告書、91-93, 2010.
- 10) Chou CP, et al. Modulation of serum concentrations and hepatic metabolism of 17beta-estradiol and testosterone by amitraz in rats. *Arch Toxicol*. 2008;82:729-737.

ステロイド性家兎骨壊死モデルにおける血管攣縮予防薬ファスジルを用いた

骨壊死発生抑制効果の検討 — 予備的実験報告 —

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

45羽の成熟日本白色雄家兎を2群に分類した。Fasudil(ファスジル)投与群(25羽)には、メチルプレドニゾロン(MPSL)20mg/kg 筋注直前より、Fasudil(15mg/kg)+生理食塩水 50mlを7日間、1日2回30分かけて点滴静注を行った。Control群(20羽)にはMPSL20mg/kg1回筋注のみ行った。2週で犠牲死とし、病理組織学的検討を行った結果、Fasudil投与群の骨壊死発生率は32%(8/25羽)であり、Control群(75%:15/20羽)に比し有意に抑制されていた($P<0.01$)。

1. 研究目的

ステロイド性骨壊死発生のメカニズムの1つとして、血栓や塞栓などの閉塞性病変が示唆されているが、人および動物モデルにおける検討において、実際に動脈の閉塞が確認できた例は極めて少ない^{1,2)}。また、大量ステロイド投与が血管に及ぼす影響として、NOの産生低下を介した血管内皮障害や、endothelin-1(ET-1)などの血管平滑筋収縮物質の惹起によるspasmが起り得ることが報告されている^{3,4)}。

脂質代謝異常、凝固能亢進、血管運動性障害などがステロイド性骨壊死の病因として報告されており^{5,6)}、我々はspasmに着目して、血管運動性と骨壊死発生との関連について検討した。

2. 研究方法

実験1) 血管攣縮予防薬 Fasudil(ファスジル)を用いた骨壊死発生率の検討(図1)

45羽の成熟日本白色雄家兎を2群に分類した。Fasudil投与群(25羽)には、メチルプレドニゾロン(MPSL)20mg/kg 筋注直前より、Fasudil(エリル®旭化成ファーマ)(15mg/kg)+生理食塩水 50mlを7日間、1日2回30分かけて点滴静注を行った。2週で犠牲死とし、病理組織学的検討を行った¹⁾。また、Fasudilおよび Hydroxyfasudil(Fasudilの第一代謝物で薬理効果を有する)の血中濃度を投与開始後30分、1.5時間、7時間の3ポイントで計測した。Control群(20

羽)にはMPSL20mg/kg1回筋注のみ行った。

実験2) 早期病変における免疫組織学的検討(図1)

成熟日本白色雄家兎10羽をMPSL+Fasudil群(5羽)、MPSL単独群(5羽)に分類した。MPSL筋注後24時間で犠牲死とし、大腿骨・上腕骨近位部の骨髓を摘出し、ET-1と親和性が高く主に血管平滑筋に存在する、ET_A受容体の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

本実験は、九州大学大学院医学研究院附属動物実験施設倫理委員会の承認を得て行われた。

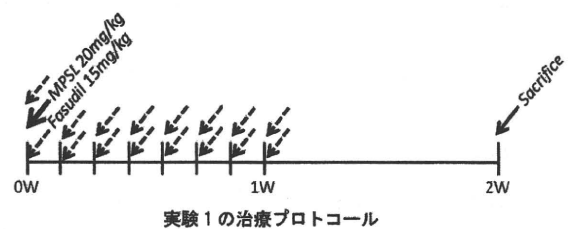


図1 実験1、2の治療プロトコール

3. 研究結果

実験1)

Fasudil 投与群の骨壊死発生率は 32%(8/25 羽)であり、Control 群(75%:15/20 羽)に比し有意に抑制されていた(図 2)。

血中濃度 (Fasudil + Hydroxyfasudil) は、点滴開始後 30 分が、平均 3312 ± 982ng/ml、1.5 時間値: 812 ± 237ng/ml、7 時間値: 40 ± 23ng/ml であった。

実験 2)

まず、 α アクチンで血管平滑筋を同定した(図 3A)。血管平滑筋における ET_A 受容体の発現は、MPSL + Fasudil 群は MPSL 単独群に比し ET_A 受容体の発現が抑制されていた(図 3B、C)。

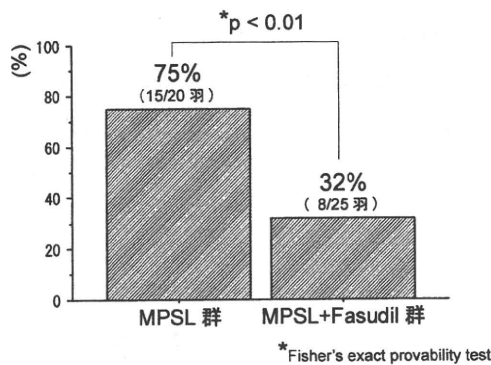


図 2 骨壊死発生率

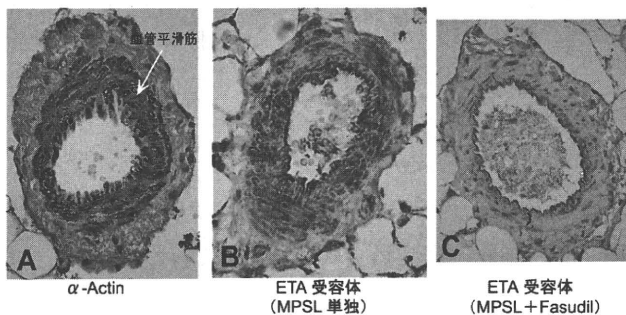


図 3 免疫組織化学的染色

4. 考察

本研究における Fasudil 投与群の骨壊死発生率は 32%であった。これは、過去の単剤投与による骨壊死予防実験の結果と同程度であった^{5,7,8)}。血中濃度に関しては、点滴開始後 30 分、1.5 時間値共にヒトの研究報告の 5~10 倍、7 時間値も、Rho-kinase を阻害する必要血中濃度よりも高かった⁹⁾。更に本研究では薬剤を 1 日 2 回投与していたことより、薬剤投与期間中、高い血中濃度が維持出来ていたと考えられる。従って、脂質代謝異常、凝固能亢進、血管運動性障害といった多面的作用により骨壊死に至ることが推察されている中で、本研究では、Fasudil により血管運動性障害をある程度予防できたことより、骨壊死発

生率を半分程度(75%→32%)に抑制できたと考えられた。

骨壊死の病因に関しては、NO 産生低下や活性酸素の上昇といった血管運動性障害の経路に vasospasm が関与していることが示唆された。

5. 結論

- ① MPSL + Fasudil 群の骨壊死発生率は 32%であり、MPSL 単独投与群に比し、有意に骨壊死発生率が抑制されていた。
- ② 免疫組織化学的検討により、血管平滑筋における ET_A 受容体の発現は、Fasudil 投与により抑制されていた。
- ③ 血管攣縮が骨壊死発生のメカニズムに関与している事が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikemura S, Yamamoto T, Nishida K, Motomura G, Iwamoto Y. Gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1128-1132.
- 2) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Nakashima Y, Mawatari T, Iwamoto Y. MRI evaluation of collapsed femoral heads in patients 60 years of age or older: the differentiation of subchondral insufficiency fracture from osteonecrosis of the femoral head. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;195:W63-68.
- 3) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Nakashima Y, Mawatari T, Motomura G, Iwamoto Y. A histopathological evaluation of a concave-shaped low-intensity band on T1-weighted MR images in a subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Skeletal Radiol*. 2010;39:185-188.
- 4) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Motomura G, Mawatari T, Nakashima Y, Iwamoto Y. The radiological outcome analyses of transtrochanteric curved varus osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 2010;92:781-786.

2. 学会発表

- 1) Ikemura S, Yamamoto T, Zhao G, Nakashima Y, Mawatari T, Motomura G, Iwamoto Y. Prediction