

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.
- 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) Yamamoto T, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1997;40:2055-2064.
- 2) Hirano K, et al. Histopathologic alterations of retinacular vessels and osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;342:192-204.
- 3) Iuchi T, et al. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2003;92:81-87.
- 4) Drescher W, et al. Endothelin-1-induced femoral head epiphyseal artery constriction is enhanced by long-term corticosteroid treatment. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:173-179.
- 5) Motomura G, et al. 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.
- 6) Kerachian MA, et al. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114:121-128.
- 7) Nishida K, et al. Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits: a preliminary histological study. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466:1054-1058.
- 8) Kuribayashi M, et al. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Acta Orthop.* 2010;81:154-160.
- 9) Suzuki Y, et al. Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil-ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post-marketing surveillance study. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2008;48:241-247.

# 抗血小板薬によるステロイド性骨壊死予防効果—第2報—

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)

抗血小板薬クロピドグレル継続投与による骨壊死発生抑制効果の可能性を過去に報告した。今回、ステロイド筋注一週前から抗血小板薬を投与した群(An1W群)、二週前から投与した群(An2W群)、一週前から生食を投与した群(Control群)を設定し、骨壊死発生率と薬剤効果を検討したので報告する。

## 1. 研究目的

我々は過去に予備的実験を行い、抗血小板薬クロピドグレルによるステロイド性骨壊死発生抑制効果の可能性を報告した<sup>1)</sup>。抗血栓薬には、大きく抗血小板薬と抗凝固薬があり、アスピリンやチクロピジンなどの抗血小板薬は、主に心筋梗塞やアテローム性血栓性脳梗塞などの動脈性虚血性疾患に対して予防的に使用される一方、ワーファリンやヘパリンなどの抗凝固薬は、深部静脈血栓症や心房細動などの血流停滞性疾患に対して予防的投与が行われている。

本研究の目的は、抗血小板薬クロピドグレルによるステロイド性骨壊死発生抑制効果を確認し、投与タイミングによる効果の違いを検討することである。

## 2. 研究方法

28週齢以上の成熟日本白色家兎45羽をランダムに3群に分けた。ステロイド投与1週前からクロピドグレルを投与した群25羽(An1W群)、ステロイド投与2週前からクロピドグレルを投与した群10羽(An2W群)、ステロイド投与1週前から生食を投与した群10羽(Control群)の3群とし、経胃チューブ用いて、20mlの生食に溶解したクロピドグレル5mg/kg、もしくは20mlの生食単独を連日経胃投与した。1週もしくは2週の薬剤前投与後、メチルプレドニゾロン20mg/kgを一回右殿筋内に注射し、2週後に犠牲死とした。薬剤は犠牲死まで継続した。

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<sup>2)</sup>。

クロピドグレルによる血小板凝集能抑制効果を確認するために、薬剤投与前から犠牲死まで1週毎に採血

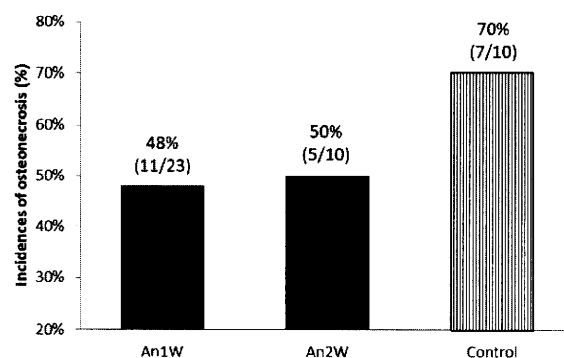
し、過去の報告と同様の方法<sup>1)</sup>で、血小板凝集能測定機(WBA カルナ、IMI、埼玉)を用いて、血小板凝集が得られる惹起物質ADPの最低濃度 Platelet aggregation threshold index (PATI)を測定した。

## 3. 研究結果

An1W群の2羽が途中で死亡した。骨壊死発生率は、Control群が70%(7/10羽)であったのに対し、An1W群が48%(11/23羽)、An2W群が50%(5/10)であった( $p=0.23, 0.36$ ) (図1)。

血小板凝集能抑制効果はControl群では有意な変化が認められなかったが、An1W群、An2W群はクロピドグレル投与後、Control群に比し有意に血小板凝集能が抑制されていた(図2)。しかし、An1W群とAn2W群間に有意な差は認められなかった。

図1 骨壊死発生率



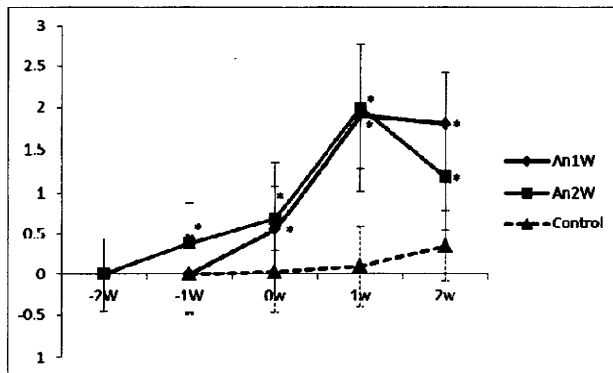
An1W: 1週前からクロピドグレルを投与した群

An2W: 2週前からクロピドグレルを投与した群

Control: 1週前から生食を投与した群

図 2 Platelet aggregation threshold index (PATI)

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  $\mu$ 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。各週で Control 群と An1W 群もしくは An2W 群の PATI を比較した。



\* $p < 0.05$  (Mann whitney U test)

#### 4. 考察

抗血小板薬投与により、ステロイド性骨壊死発生率は低下したが、Control 群と比べ有意な差ではなかった。これまで、いくつかの薬剤に家兎ステロイド性骨壊死発生抑制効果が報告されている<sup>3-5)</sup>が、単独での完全な抑制効果は認められておらず、ステロイド性骨壊死の発生機序が多因子である可能性が示唆されている。ステロイド性骨壊死発生に関与する要因として、凝固能亢進、脂質代謝異常、酸化ストレス、血管内皮障害などが報告されているが、本研究の結果から、血管内皮障害に基づく血小板凝集も要因として関与している可能性が考えられた。

クロピドグレルを1週間前から投与した群と2週間前から投与した群では、薬剤効果、骨壊死発生率に有意な差は認められなかった。薬剤効果は1週間投与で認められると考えられる。

#### 5. 結論

抗血小板薬によりステロイド性骨壊死発生は低下したが、有意な差を示すには至らなかった。抗血小板薬の効果は1週間投与、2週間投与で差はなかった。

#### 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) 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. 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 -. 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診断・治療・予防法の開発を目的とした全国学際的研究 平成21年度総括・分担研究報告書, 110-2, 2010
- 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 Nov; 40(11):2055-64.
- 3) 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 Oct;50(10):3387-91.
- 4) Nishida K, Yamamoto T, Motomura G, Jingushi S, Iwamoto Y. Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits: a preliminary histological study. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 May;466(5):1054-8.
- 5) Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Ishida M, Goto T, Kubo T. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Acta Orthop.* 2010 Feb;81(1):154-60.

# 脳卒中易発症高血圧自然発症ラットにおける pravastatin 投与による ステロイドホルモン性大腿骨頭壊死予防に関する研究

野崎義宏、熊谷謙治、宮田倫明、尾崎誠、穂積晃、進藤裕幸  
(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科発生分化機能再建学講座 構造病態整形外科学)

丹羽正美

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座 神経感覚薬理学)

大腿骨頭壊死症は年間約 3000 人が新たに罹患し、ステロイドホルモン(ステロイド)治療に関連の発症例が全体の 1/2 を占めている。大腿骨頭壊死症は患者の Quality of Life (QOL) を制限し、患者と家族に社会的負担をかけ、医療費を増加させる。大腿骨頭壊死症を予防または治療する薬剤が患者の QOL の改善や医療費抑制の観点から切望される。ステロイド性骨頭壊死の病因には、ステロイドが誘因となる酸化ストレスの増加、脂質代謝異常、凝固線溶系の異常が提起されている。スタチン(HMG-CoA reductase inhibitors)は脂質低下作用を持つ薬剤である。脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)で観察される骨頭壊死は組織学的だけでなく生理学的にもヒトの骨頭壊死と類似し、またステロイド投与で発生頻度が増加することが判っている。そこで SHRSP に水溶性スタチンであるプラバスタチンを投与し、ステロイド性骨頭壊死の抑制の有無を調べ、SHRSP ステロイド性大腿骨頭壊死モデルを用いプラバスタチンの骨頭壊死発生予防の可能性を研究した。その結果、プラバスタチンは大腿骨頭壊死の発生率を有意に低下させた。プラバスタチンは血清学的脂質代謝を改善しなかったが、酸化ストレスの軽減と脂肪細胞の骨髄占拠率の低下がみとめられ、プラバスタチン投与が局所の脂質代謝を改善が示唆され、ステロイド性骨頭壊死予防への可能性が考えられる。

## 1. 研究目的

ステロイド性骨頭壊死の病因には、ステロイドが誘因となる酸化ストレスの増加、脂質代謝異常、凝固線溶系の異常が提起されている。スタチンは脂質低下作用を持つ薬剤であるが、上記の異常を改善する可能性のあり、近年大腿骨頭壊死の治療薬として期待されている。SHRSP で観察される骨頭壊死は組織学的だけでなく生理学的にもヒトの骨頭壊死と類似し、またステロイド投与で発生頻度が増加することが判っている。そこで SHRSP にスタチンを投与し、ステロイド性骨頭壊死の抑制・予防の可能性を調べることが今回の目的である。

## 2. 研究方法

(材料と方法)

13 週齢牡 SHRSP/Izm ラットを SHR 等疾患モデル共同研究会から購入・使用した。プラバスタチンとステロイ

ドの投与でコントロール群(Cont 群)(28 匹)、プラバスタチン投与群(P 群)(23 匹)、ステロイド投与群(S 群)(15 匹)、プラバスタチン+ステロイド投与群(PS 群)(15 匹)の 4 群を作成した。実験手技に慣れるために、Cont 群(28 匹)と P 群(23 匹)は多めに割り当てた。ステロイドは、15 週齢でメチルプレドニゾン 4mg(約 15mg/Kg)を背部に皮下注した。プラバスタチンは第一三共社株式会社から入手した pravastatin sodium(メバロチン)を飲料水に混入し 15 mg/day/kg となるように 13 週齢から 4 週間投与した。

17 週齢の犠牲死はエーテル吸入、ペントバルビタール溶液(50mg/kg)腹腔内投与による麻酔導入後に行った。犠牲死直後、心臓採血、両大腿骨頭摘出を行った(表 1)。

表1: 材料と方法

Group	Pravastatin	Steroid	Number of rats	Weeks				
				13	14	15	16	17
Cont	-	-	28	----->x				
S	-	+	23	-----sc----->x				
P	+	-	15	----->x				
PS	+	+	15	-----sc----->x				

----> SP食;

==>pravastatin sodium(15mg/Kg/day、  
飲料水に混入)

X;犠牲死;

SC; メチルプレドニゾロン(4mg 皮下注)

13週齢牝SHRSP/Izmを通常ラットケージを使用して、SP飼料で飼育し、17週齢目に犠牲死とした。ステロイド投与はメチルプレドニゾロン(4mg)を皮下注した。pravastatin sodium (メバロチン) を飲料水に混入しラットが飲料水として平均15 mg/day/kg摂取するように13週齢から4週間投与した。

(血液学的検査)

プラバスタチンの高脂血症治療剤としての作用を調べるために total cholesterol( T-chol )値、high-density lipoprotein ( HDL )値、low-density lipoprotein ( LDL )値、triglycerides ( TG )値を調べた。

(組織学的検査)

両側の大腿骨近位部はホルマリン24時間固定後、脱灰しパラフィン包埋を行った。ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色標本で、骨頭壊死の診断を行った。診断基準は Arlet 等の分類に基づき、脂肪変性、骨髓球壊死、骨細胞壊死、添加骨の有無の評価項目で行った<sup>1)</sup>。(図1)

診断の精度を上げるため、3人の検者(野崎、熊谷、宮田)が各標本を別個に観察した。

Humeral Head (x 20)



Epiphysis (x 100)



Normal      Fatty deg.      Early nec.      Fresh nec.      Old nec.

図 1. 各病期の病理組織像。正常骨 (A,F)、fatty degeneration (B, G)、early necrosis(C, H)、fresh necrosis(D, I)、old necrosis(E, J)の組織像を示す。図 A-Eは全骨頭像 (x20) で、図 F-Jは各病期での鑑別点 (x100) である。fatty degeneration では骨髓内の脂肪変性が認められ (G)、early necrosis 期では骨髓内の単核球壊死 (H)が fresh necrosis 期では骨細胞の壊死 (I) が、そして old necrosis 期では添加骨 (J)が認められる。

(酸化ストレス)

酸化ストレスは抗 8-OHdG と、抗 4-HNE モノクローナル抗体( NOF Corporation, Tokyo, Japan )を用いて、Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)で免疫染色した。客観的評価のために 3-point scale methodを考案した。方法は各群5骨頭から無作為に観察点4か所を選び、各群合計で20か所を鏡検観察点として設定した。各観察点の血管、脂肪細胞、骨髓細胞と骨梁周囲の染色性を強陽性(2)、陽性(1)、陰性(0)と点数化し、盲検で3検者が観察した点数で評価したものである。

(脂肪細胞占拠率)

客観的評価のために骨頭骨髓内の脂肪細胞占拠率を計測するために、H-E組織画像を骨髄細胞と脂肪細胞をNIH imageを用いて測定した。観察点は無作為に各群から5骨頭を選び各骨頭から4点を選択し西田の計測方法で測定した<sup>20)</sup>。

(統計解析)

データは平均±標準偏差で表示した。骨頭壊死群間の差は Fisher's exact test で検定した。他の生化学データ、骨頭骨髓の脂肪細胞占拠率は Welch's t-test で各2群間同士を検定した。統計ソフトは SPSS<sup>R</sup> Version 11.0J for Windows<sup>R</sup> statistical software ( SPSS Inc, Chicago, IL )を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は長崎大学の動物実験委員会が定めた規約に則って長崎大学先導生命科学支援センター動物実験室(アニマルセンター)で行った。(登録番号: 0906170768)

### 3. 研究結果

(体重と生化学所見)

プラバスタチンやステロイド投与でラットの死亡は認めなかった。各群間で血圧の明らかな差異はみられなかった。プラバスタチン投与で体重は減少しなかったが、ステロイド投与による体重減少は認められた。血液生化学データは S 群が高脂血症を呈し、T-chol、HDL、LDL と TG 値が non-S 群と比較し有意 ( $p < 0.05$ ) に上昇していた。PS 群ではプラバスタチン投与で高脂血症を改善しなかった(表 2)。

表 2: 体重と生化学所見

Group	Body weight	T chol	HDL	LDL	TG
unit	g	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
Cont	309.8 (23.5)	60.4 (10.0)	19.2 (3.8)	7.87 (2.9)	49.5 (21.6)
P	281.1 (26.2)	60.6 (14.0)	18.1 (3.9)	6.5 (1.6)	35.9 (15.6)
S	247.4 (26.5)	102.5 (26.2)	32.4 (8.6)	13.0 (8.9)	106.6 (48.6)
PS	245.4 (31.5)	112.7 (28.6)	34.0 (6.0)	11.6 (3.1)	129.4 (57.0)

平均 (標準偏差)

ステロイド投与による体重減少と高脂血症所見が認められた。プラバスタチンは体重の変動には関与はなく、高脂血症の改善効果も血液検査上認められなかった。

(骨頭壊死発生率)

ステロイド投与で骨頭壊死頻度は増加したが、プラバスタチンを予防的に摂取させておくと骨頭壊死頻度は減少した。このことからステロイド性骨頭壊死の発生がプラバスタチンにより抑制されることが示唆される(表 3)。

表 3: 骨頭壊死発生頻度

Steroid	pravastatin		P value
	-	+	
-	Cont 30% (17/56)	P 17% (5/29)	< 0.001
+	S 91% (42/46)	PS 43% (13/30)	0.047
P value	< 0.001		

(骨頭壊死数 / 大腿骨頭数)

骨頭壊死発生率は C 群では 30.4% (17/56) で、S 群は 91.3% (42/46) であり、ステロイド投与で有意 ( $p < 0.001$ ) に増加していた。S 群と比較して PS 群では 43.3% (13/30) と有意に減少していたので、プラバスタチンによるステロイド性骨頭壊死の抑制が考えられた。

(骨頭骨髓脂肪細胞占拠率)

4群間で、P群、C群、PS群、S群の順で占拠率が高くなっていた。S群とC群を比較するとS群は著しく ( $p <$

0.001) 増加していた。PS群をS群と比較するとS群 (33%) に対してPS群 (11%) と有意 ( $p < 0.001$ ) に減少していた。P群 (6%) ではCont群 (3%) ほど低値ではないが、S群と比較して脂肪細胞占拠率が有意 ( $p < 0.001$ ) に減少していた(図 2)。

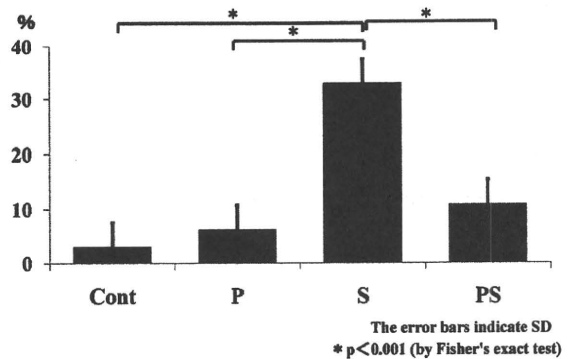


図 2 脂肪細胞占拠率。ステロイド投与により増加した脂肪細胞占拠率がプラバスタチン処置で有意 ( $p < 0.001$ ) に改善していた。

(骨頭骨髓内の酸化ストレス)

酸化ストレスについては 8-OHdG、4-HNE の免疫染色結果は同じ傾向であり、脂質酸化損傷マーカーである 4HNE の方がやや強い染色性を呈していた。プラバスタチン処置でステロイド負荷により著増していた脂肪細胞壁、骨髓球の染色性が著明に減弱している(図 3-1)。

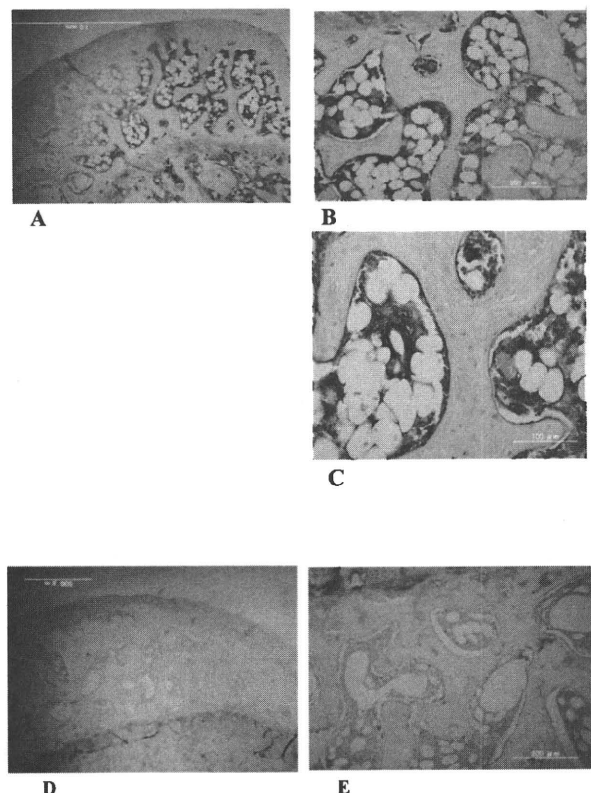


図 3-1 免疫染色による酸化ストレスの評価。S 群 (A:

x20, B: x100, C: x200), P 群 (D: x20, E: x100)。ステロイド投与により増加していた脂肪細胞周囲の染色性がプラバスタチン処置で減少傾向にある。

3-point method の結果では 4 群間で、P 群 (8.2%)、Cont 群 (10.25%)、PS 群 (13.3%)、S 群 (18.7%) の順で酸化ストレスが増加していた。S 群を Cont 群と比較すると酸化ストレスは有意 ( $p < 0.00$ ) 増加していた。また PS 群を S 群と比較すると酸化ストレスは有意 ( $p < 0.001$ ) に減少していた。これらの結果から、ステロイド投与で増加した酸化ストレスが、プラバスタチン処置で低下したことが示唆された。(図 3-2)

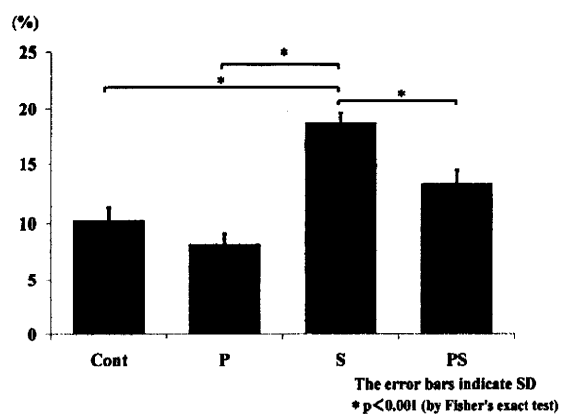


図 3-2 3-point scale method の結果。ステロイド投与による酸化ストレスの増加がプラバスタチン処置で抑制されることが客観的に証明された。

#### 4. 考察

骨頭壊死の決定的な病因はいまだ明らかでない。多因子の関連によると推測され循環障害、脂質代謝障害や酸化ストレスの増加などが病因として指摘されている<sup>12)</sup>。これらの因子の改善が想定される薬剤が動物やヒトに試されている。具体的にはワーファリン、低分子ヘパリン、スタチンやビタミン E などが報告されている<sup>5)9)12)14)18)</sup>。低分子ヘパリンの調査で、Glueck 等はその有効性と familial thrombophilia と endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C polymorphism との関連性を報告している<sup>5)</sup>。スタチン (HMG-CoA reductase inhibitors) は高脂血症の治療薬として世界中で広く使用されている<sup>3)</sup>。Pritchett は事前からスタチン投与されていた 284 症例で、ステロイドの大量投与による骨頭壊死発生率が減少していたと報告している<sup>18)</sup>。しかしこの研究は後ろ向き研究であり高脂血症と骨頭壊死患者の因果関係は明瞭ではない。Jasińska 等はスタチンの pleiotropic (multiphasic) effect が eNOS の upregulation や nitric

oxide の産生を増加させると報告している<sup>8)</sup>。今回の研究の価値は以上の論文などから類推されるが、研究の問題点として以下のものがあげられる。

a. ラットを使用した骨頭壊死抑制の研究が少ないこと。ステロイド性骨頭壊死の実験動物モデルとして家兎(もつとも多用されている)、犬、エミューを含めた鳥類や羊が使用されている<sup>11)</sup>。SHR ラットは岡本らが 1959 年に高血圧だけではなく末梢循環不全を起こす病態モデルラットとして開発した<sup>17)</sup>。我々は 20 年以上にわたり SHRSP を使用し、家兎と比較して骨頭に局限して壊死を起こすことがヒトと類似している事を発見し、また一定した壊死発生頻度を得ている<sup>13)</sup>。更に SHRSP は純系であり、実験デザインの単純化が期待できる。

b. ラットからヒトへの研究結果の外挿。臨床上病態解析を行うことは困難である。SHRSP の大腿骨頭壊死はヒトと組織像、病態像が比較的類似しており、直接の外挿には問題があると思われるが、SHRSP での機序、効果を臨床応用の参考にする価値はあると考えられる。

c. 今回の研究が 1 点観察であること。SHRSP は大変刺激に敏感であり頻回の血液採取は危険である。さらに純系ラットであるため血清学的検査が一定しており単一観察が可能であると判断した。

d. スタチンの中でプラバスタチンを使用したこと。高脂血症治療薬としてスタチンは世界中で使用・開発され、種類は多い。プラバスタチンの様な初期のものに比較して、強力な作用を有するものも開発されている。しかし大半が脂溶性であり、実験動物への投与方法は強制的に経口投与か、連日の皮下注射とならざるを得ず、実験動物への莫大なストレス負荷が予測される。ストレスに敏感で卒中を生じやすい SHRSP に過大な負荷をあたえることは研究計画上、禁忌である。故に親水性で、かつ無味無臭であり、飲料水に混入可能なプラバスタチンを使用した。今回、スタチンが骨頭壊死を抑制しうることが判った。西田らの研究でもピタバスタチンはステロイド性骨頭壊死を 70% から 37% の発生率までに抑制したと報告した。これはピタバスタチン投与で LDL 低下効果だけでなく、非脂質効果(血栓形成減少、骨髄内血管の脂肪塞栓減少)による骨頭壊死抑制が関係していると述べている<sup>16)</sup>。

今回、高脂血症改善が得られていない。藤岡らはラットに於いてコレステロールの生合成はプラバスタチン投与で投与 7 日目まで抑制されるがそれ以降は HMG-CoA

reductase 活性がプラバスタチンの効果を上回ると述べており、今回の結果を説明できる<sup>4)</sup>。今回の組織学的結果で、骨髄骨髄内の脂肪細胞占拠率が約 20%も抑制されておりプラバスタチン投与が局所の脂質代謝を改善した可能性が示唆された。栗林らもビタミン E 投与で同様の結果を述べている<sup>9)</sup>。Li らは骨髄内の脂肪細胞に関して、ロバスタチンは PPAR $\gamma$ 2 や 422aP2 に作用することにより、脂肪細胞の分化を抑制すると報告している<sup>10)</sup>。Cui らは *in vitro* 実験でロバスタチンが fat-specific gene 422 (aP2)の発現を抑制することでステロイドの脂肪細胞分化効果を阻害し、ステロイドの骨芽細胞発現阻害作用を減弱させると報告している<sup>2)</sup>。八木らはピタバスタチンが nitric oxide を活性化することで酸化ストレスを低下させステロイド性骨髄壊死の原因である血管内皮障害を阻害する可能性に関して報告している<sup>19)</sup>。4-HNE は脂肪細胞周辺に発現する $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids 酸化物の生成物で、8-OHdG は核内 DNA の酸化損傷時に生成される。抗 4-HNE 抗体と抗 8-OHdG 抗体を使用して免疫組織化学的に酸化ストレスを検出できる。ステロイド投与による大腿骨髄の酸化ストレスの増加は今回や他者の研究で免疫組織化学的に検証されている。酸化ストレスの低下と骨髄壊死発生率の低下は、近年、諸家が抗酸化剤投与での骨髄壊死抑制の研究で報告している。市塚らは家兎とラットを使用し、骨髄壊死は酸化ストレスの制御により抑制されると報告した<sup>7)</sup>。上述の栗林らは家兎に抗酸化作用を有するビタミン E 投与を報告している<sup>9)</sup>。血管病変と酸化ストレスに関しては、中村らと八尾らは酸化ストレスが SHR ラットの血管内皮障害と虚血性変化を誘導すると述べている<sup>15)20)</sup>。骨髄壊死に起因する酸化ストレスの主たる作用部位が脂肪細胞か血管かは今後の研究課題であるが、今回の研究で SHRSF のステロイド性大腿骨髄壊死に関して、プラバスタチン投与で壊死発生率を低下させ、酸化ストレスが軽減した事と合致している。

## 5. 結論

1. SHRSF ステロイド性大腿骨髄壊死モデルを用いプラバスタチンの骨髄壊死発生予防の可能性を研究した。
2. プラバスタチンは大腿骨髄壊死の発生率を有意に低下させた。
3. プラバスタチンは血清学的脂質代謝を改善しなかったが、酸化ストレスの軽減と脂肪細胞の骨髄占拠

率の低下がみとめられた。

## 6. 研究発表

1. 論文発表  
熊谷謙治, 尾崎誠, 穂積晃, 後藤久貴, 宮田倫明, 野崎義宏, 進藤裕幸. 大腿骨髄壊死と脂肪細胞. In : 七川欽次編. リウマチ病セミナーXXI. 大阪: 永井書店, 2010; 83-97.
2. 学会発表  
Kenji Kumagai, Yoshihiro Nozaki, Masami Niwa, Pravastatin Reduces the Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in SHRSF Rats, The 14th International Symposium on SHR - Ecogenomic Models of Human Diseases, Sep.24th-25<sup>th</sup>, Montreal, Canada,

## 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) Arlet J, Durroux R. Lagnostic histologique precoce de l'osteonecrose aseptique do la tete femorale par le forage biopsie. In: Arlet J, Ficat P, eds. La Ciculation Osseuse. Paris, France: Ed INSERM, 1973; 293-302.
- 2) Cui Q, Wang GJ, Su CC, Balian G. Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 1997; 344: 8-19.
- 3) Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J Lipid Res. 1992; 33: 1569-82.
- 4) Fujioka T, Tsujita Y, Shimotsu H. Induction of fatty acid synthesis by pravastatin sodium in rat liver and primary hepatocytes. Eur J Pharmacol.1997; 328: 235-39.
- 5) Glueck CJ, Freiberg RA, Sieve L, Wang P. Enoxaparin prevents progression of Stages I and II



- osteonecrosis of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 435: 164-70.
- 6) Hirota Y, Hotokebuchi T, Sugioka Y. Idiopathic osteonecrosis of the femoral head: nationwide epidemiologic studies in Japan. In: Urbaniak JR, Jones JP, eds. *Osteonecrosis: Etiology, Diagnosis, and Treatment*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons 1997: 51-58.
  - 7) Ichiseki T, Ueda Y, Katsuda S, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology* 2006; 45: 287-90.
  - 8) Jasińska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 483-99.
  - 9) Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Ishida M, Goto T, Kubo T. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Acta Orthop* 2010; 81: 154-60.
  - 10) Li X, Cui Q, Kao C, Wang GJ, Balian G. Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPAR $\gamma$ 2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. *Bone* 2003; 33: 652-9.
  - 11) Li Y, Han R, Geng C, Wang Y, Wei L. A new osteonecrosis animal model of the femoral head induced by microwave heating and repaired with tissue engineered bone. *Int Orthop* 2009; 33: 573-80.
  - 12) Mont AM, Jones CL, Hungerford SD. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88: 1117-32.
  - 13) 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: 289-95.
  - 14) 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: 354-57.
  - 15) Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong Y-F, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Pioglitazone Exerts Protective Effects Against Stroke in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats, Independently of Blood Pressure. *Stroke* 2007; 38: 3016-3022
  - 16) Nishida K, Yamamoto T, Motomura G, Jingushi S, Iwamoto Y. Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits: a preliminary histological study. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 66: 1054-8.
  - 17) Okamoto K. Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol* 1969; 7: 227-70.
  - 18) Pritchett JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop Relat Res* 2001; 386: 173-8.
  - 19) 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.
  - 20) Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Kobayashi N, Katakawa M, Yamamoto C, Tsunemi A, Suzuki R, Ueno T, Matsumoto K. Losartan Improves the Impaired Function of Endothelial Progenitor Cells in Hypertension via an Antioxidant Effect. *Hypertension Research* 2007; 30: 1119-28.

# 酸化誘発剤の単回投与によるラット骨壊死モデル

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

我々は、これまで酸化ストレスが骨壊死発生に関与していることを報告してきた。今回、酸化誘発剤を使用したラットモデルの改良を試み、buthionine sulfoximine (BSO)を単回腹腔内投与することでラットにおいて発生率は1週間で約40%の骨壊死モデルを作成した。

## 1. 研究目的

当科では、これまでステロイド投与後に酸化ストレスが発生することが骨壊死発生の重要な要因の一つと考え検討を行ってきた<sup>1-2)</sup>。近年、我々は家兎およびラットに対する酸化誘発剤 (Buthionine Sulfoximine : 以下 BSO) を14日間連続皮下投与することで骨壊死の発生を確認した<sup>3-4)</sup>。しかしながら、これらのモデルではBSOを14日間連続投与しているため、実際に骨壊死が一度のみの酸化ストレスで発生するものなのか、また虚血などの骨内における事象がいつ起こっているのかが不明瞭であった。

今回我々はラットの腹腔内に酸化誘発剤を単回投与することにより骨壊死の発生および発生時期について検討した。

## 2. 研究方法

24週齢のWistar系ラットにBSO500mg/kgを1回のみ腹腔内投与し、12時間、1日、3日、5日、7日、14日で犠牲死とし、それぞれB12h群(10匹)、B1d群(10匹)、B3d群(10匹)、B5d群(10匹)、B7d群(20匹)、B14d群(20匹)とした。犠牲死時に腹部大動脈から採血し、両大腿骨を取り出した。未処置のラット10匹をN群とし検討に加えた。

病理組織学的検討としてH-E染色標本を作製し、大腿骨頭における骨壊死発生の有無について検討した。骨壊死の定義は病理学的定義に基づき検討した<sup>5)</sup>。また、酸化の指標として肝還元型グルタチオン(以下、GSH)を測定した。

## 3. 研究結果

GSHは、B12h、B1d群ではN群に比べ低下していた( $p<0.05$ )。

病理組織学的検討において、N群では骨壊死を認めなかった。同様にB12h群、B1d群、B3d群、B5d群でも骨壊死は認めなかった。B7d群において20匹中7匹、B14d群で20匹中8匹の大腿骨頭にempty lacunaeを認め骨壊死と判断した。

## 4. 考察

これまでに行ったラットにBSOを14日間連続皮下投与した実験では7匹中3匹(42%)に大腿骨頭部の骨壊死を認めており<sup>3)</sup>、今回行ったBSO単回投与B7d、B14d群とほぼ同様な発生率だった。また、以前の本班会議でBSOの投与回数を増やすことによる骨壊死発生の増加は認めなかった事を報告しており、本検討でもB7群、B14群間でも発生率の有意差はなかった。これらの事を考えると、骨壊死に至る虚血等のイベントは、単回の酸化ストレス曝露のみで7日目までに発生し得ることがわかった。ラットでは、Osteocyteのアポトーシスは虚血から12時間ではじまり、96時間でempty lacunaeが出現したとの報告があり、諸家の報告でもおおむね4日~5日で核の消失が見られるとの報告が見られる<sup>6-8)</sup>。今回のモデルで最初に骨壊死が確認された7日目より逆算すると、BSO投与から3日目ころまでに骨壊死にいたるイベントが起こっていると推察できる。従って、薬剤投与から3日目ごろまでを重点的に検索

することが壊死の発生過程の原因解明につながる  
と考えた。

## 5. 結論

ラットに酸化誘発剤を単回投与することで、ラ  
ットの大腿骨頭に薬剤投与後7日で約40%の骨壊  
死を認めた。骨内のイベントは酸化誘発剤投与か  
ら3日目頃までに発生していると考えた。

## 6. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
1) なし

## 7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 8. 参考文献

- 1) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, Katsuda S. Oxidative stress and Vascular Permeability in steroid-induced osteonecrosis model. J Orthop Sci 9: 509-515, 2004
- 2) 北村憲司. 常用量のグルタチオンによるステロイド性骨壊死の抑制効果の検討. 金沢医科大学雑誌 30: 245-52, 2005
- 3) Ichiseki T, Ueda Y, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione Depletion induced osteonecrosis in rats. Rheumatology. 45: 287-290, 2006
- 4) 三秋恒平. 日本白色家兎に対する酸化ストレス誘発剤を用いた骨壊死誘発実験. 金沢医科大学雑誌 31: 1-6, 2006
- 5) Yamamoto T, Iriya T, Sugioka T, Sueishi K. Effect of pulse methylprednisolone on bone and Marrow tissue:Corticosteroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. Arthritis Rheum. 40: 2055-64, 1997
- 6) Sato M, Sugano N, Ohzono K, Nomura S,

Kitamura Y, Tsukamoto Y, Ogawa S. Apoptosis and expression of stress protein(ORP150, HO1) during development of ischaemic osteonecrosis in the rat. J.Bone and Joint Surg. 83-B(5): 751-759, 2001

- 7) Mary Catto. A Histological Study of Avascular Necrosis of the Femoral fracture. J.Bone and Joint Surg. 47-B(4): 749-776, 1965
- 8) 辻宗啓, 松野丈夫, 伊藤浩, 寺西正, 池田 仁, 吉木敬. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班平成 15 年度研究報告書: 45-47, 2003

# 酸化ストレス誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける早期の骨内変化

金子 聖司、市堰 徹、兼氏 歩、三上 友明、中川 慎太郎、福井 清数、松本 忠美  
(金沢医科大学 整形外科)

我々が作成した酸化誘発剤(BSO)単回投与ラット大腿骨頭壊死モデルでは、BSO投与後5日目から壊死を認めている。従ってBSO投与後、遅くとも5日以内に骨内に壊死の原因となりうる虚血性変化が生じている事が考えられる。そこで骨内の早期の変化を捉えるために、組織の低酸素状態の指標としてHIF-1 $\alpha$ 、酸化傷害の指標として8-OHdGの抗体を用いて検討を行ったところ、BSO投与後12時間で骨内に低酸素状態と酸化傷害の発生を示唆する所見が得られた。

## 1. 研究目的

我々は酸化ストレス誘発剤(BSO)を単回投与したラット骨壊死モデルで、薬剤投与後5日で10%、7日で約40%の骨壊死が発生する事を報告した<sup>1)</sup>。

BSO投与後5日目以降に骨壊死が確認されていることから、遅くともBSO投与から5日以内に骨壊死に至る虚血を含む事象が起こっていると考えられる。本検討の目的は、骨内の低酸素状態および酸化傷害の発生と時期を確認することである。

## 2. 研究方法

24週齢Wistar系ラットにBSO(500mg/kg)腹腔内単回投与したラット骨壊死モデルを使用した。BSO投与後、12時間、1日目、5日目、7日目に犠牲死とした。各群n=5とし、それぞれB12時間群、B1日群、B5日群、B7日群とした。また、未処置のラット5匹をN群とし検討に加えた。

組織の低酸素状態の指標としてHIF-1 $\alpha$ 、及び酸化ストレスの確認として8-OHdGの発現について免疫組織化学的検討を行った。

## 3. 研究結果

低酸素の指標であるHIF-1 $\alpha$ はN群では発現を認めなかったが、B12時間群で既に多数の陽性細胞を認めた。B1日群、B5日群、B7日群とも陽性細胞を認めたが、徐々に陽性細胞数は減少していく傾向があった。

8-OHdGはN群でも散見されたが、B12時間群で陽

性細胞数の増加が認められた。

B1日群以降、B5日群、B7日群でも同様の所見を認めた。

## 4. 考察

骨壊死発生の機序解明のためには、薬剤投与後早期の骨内の状態を捉える事が重要と考えられる。

HIF-1 $\alpha$ は組織の低酸素状態を反映する指標として、近年様々な分野で検討に用いられている。HIF-1 $\alpha$ は正常酸素濃度下では速やかに分解されるが、低酸素状態では分解されずに濃度が上昇する事がわかっている<sup>2)</sup>。本検討でB12時間群ではHIF-1 $\alpha$ は骨梁周囲の細胞、骨髄内の細胞に発現していた。このことから、BSO投与後12時間以内ですでに骨内に低酸素状態が生じていると考えられた。

8-OHdGは、DNAの酸化傷害によって生じる産物であり、これまでも酸化ストレスの指標として用いてきた。今回の検討では、B12時間群以降で陽性細胞数が上昇しており、BSO投与後12時間以内に、骨内でも酸化ストレスが生じていると考えられた。

従って機序解明のためには、薬剤投与後、より早期の状態に注目する必要があると考えられた。

## 5. 結論

BSO投与ラットモデルにおいて、薬剤投与12時間以内に骨内での低酸素状態および過酸化状態に陥っていることが示唆された。

## 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) 中川慎太郎：ラットに対する酸化ストレス誘発剤の単回投与による骨壊死モデル. 金沢医科大学雑誌 34: 107-113, 2009
- 2) Damert A, Ikeda E, Risau W. Biochem J 1997; 327: 419-423

# 特発性大腿骨頭壊死の発生における一酸化窒素の関与

舘田 健児、岡崎 俊一郎、名越 智、山下 敏彦 (札幌医科大学 整形外科学講座)  
渡邊 智、片田 竜一、水尾 圭祐、松本 博志 (札幌医科大学 法医学講座)

特発性大腿骨頭壊死症は、その病態に一酸化窒素(NO)や酸化ストレスが関与している可能性が報告されているが、詳細な発生機序は未だ不明である。2009年に、我々は lipopolysaccharide (LPS)と methylprednisolone (MPSL)を投与するステロイド性ラット大腿骨頭壊死モデルを報告した。本研究の目的はステロイド性ラット大腿骨頭壊死モデルを用いて、その病態における NO の関与について明らかにすることである。ステロイド性ラット大腿骨頭壊死モデルを control 群とし、さらに NO 合成酵素の阻害剤である N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)の追加投与を行った群を実験群とした。最終 MPSL 投与より1、2週で犠牲死とし、組織学的、血液学的評価を行った。その結果、大腿骨頭壊死症の発生を control 群の 20%、L-NAME 追加投与群の 67%に認めた。血漿中の脂質レベルは2週で control 群より有意に増加した。肝臓では L-NAME 追加投与群で脂肪滴の集積をみとめ、脂肪性肝炎に進展した。血漿 adiponectin レベルが2週で control 群より有意に低値を示した。以上の結果から、NO 合成酵素を阻害することでステロイド性大腿骨頭壊死症の発生率が上昇し、その病態に NO が関与していることが示唆された。さらに、脂質代謝異常と肝臓での脂肪細胞の集積、及び adiponectin がステロイド性大腿骨頭壊死症の発生に関与している可能性が示唆された。

## 1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ION)は、危険因子としてステロイド療法、長期の飲酒が知られている。その病態に一酸化窒素(NO)や酸化ストレスが関与している可能性が報告されているが<sup>1-4)</sup>、詳細な発生機序は未だ不明である。

我々は 2009 年に lipopolysaccharide (LPS)と methylprednisolone (MPSL)を投与することにより、大腿骨頭(epiphysis)に骨壊死が発生するステロイド性ラット大腿骨頭壊死モデルを報告した<sup>5)</sup>。本研究の目的はステロイド性ラット大腿骨頭壊死モデルを用いて、その病態における NO の関与について明らかにすることである。

## 2. 研究方法

Wistar 系雄性ラット10週齢に対し、24 時間間隔で LPS 2 mg/kg を 2 回静注した後、MPSL 20 mg/kg を 3 回筋注した群を control 群とした。さらに NO 合成酵素の阻害剤である N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を MPSL 最終投与の 24 時間後より 50 mg/kg で 3 回腹腔内投与した群を設定した

(L-NAME 追加投与群)。両群とも MPSL 最終投与より 1 週及び 2 週で犠牲死とし、両大腿骨、肝、血液を採取した。

大腿骨近位部と肝の組織切片を作成後、haematoxylin & eosin 染色を行い、組織学的に評価した。血液学的には、血漿中の total cholesterol、triglyceride、high density lipoprotein 濃度及び AST、ALT 濃度を測定した(SPOTCHEM D-Concept、Arkray)。また、血漿中の各サイトカイン濃度(IL-1- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-17、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、adiponectin)を multiplex analysis system にて測定した(Luminex, Austin)。

統計学的検討には Student's t-test を用い、p 値が 0.05 以下の場合を有意差ありとした。

## 3. 研究結果

大腿骨頭壊死の発生を control 群の 20%、L-NAME 追加投与群の 67%に認めた(表 1)。骨壊死の発生部位はいずれも epiphysis であった。図 1 に L-NAME 追加投与群の組織像を示す。

血漿 total cholesterol、triglyceride 及び high density

lipoprotein 濃度はいずれも1週では両群とも高値であったが、control 群では2週で減少したのに対し、L-NAME 追加投与群では2週でも高値が持続しており、2週で両群間に有意差を認めた(図2)。血漿AST及びALT 濃度は、L-NAME 追加投与群では、1週でばらつきが大きかったものの、両群間に有意差は認めなかった(図3)。

図4に肝の組織像を示す。Control 群では1週、2週ともほぼ正常像であったのに対し、L-NAME 追加投与群では1週で肝細胞の細胞質内に小脂肪滴の集積を認め、2週では大脂肪滴の集積と中心静脈周囲の炎症細胞浸潤を認め、脂肪性肝炎に進展した(図4)。

図5に血漿中の各サイトカイン濃度を示す。血漿 adiponectin 濃度は2週でcontrol 群よりも有意に低値を示した。また、統計学的に有意ではなかったが、IL-1 $\beta$  及びIL-17 濃度は1週で低い傾向(IL-1 $\beta$ : p = 0.088, IL-17: p = 0.087)を示し、MCP-1 濃度は1週で高くなる傾向(p = 0.055)を認めた。

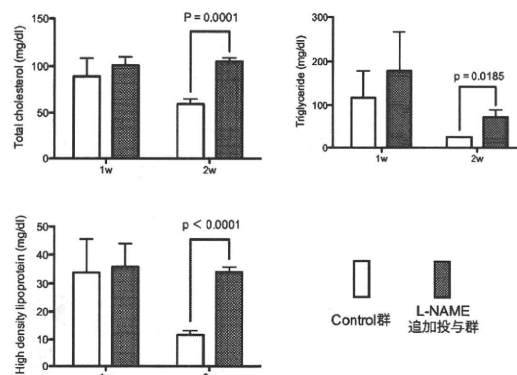


図2 血漿 total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein 濃度。いずれも2週においてcontrol より有意に高値であった。

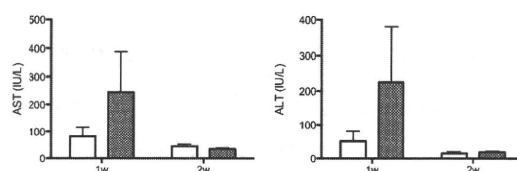


図3 血漿 AST, ALT 濃度。両群間に有意差を認めなかった。

	1週	2週	Total
Control 群	2/7	0/3	2/10 = 20%
L-NAME 追加投与群	3/6	3/3	6/9 = 67%

表1: 大腿骨頭壊死発生率

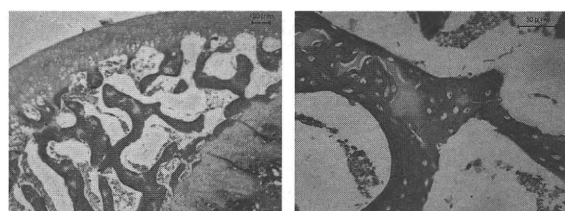


図1A 大腿骨頭の組織像(H&E 染色)。L-NAME 追加投与群、1週。Epiphysis で広範に empty lacunae を認め、骨髄細胞が消失している。

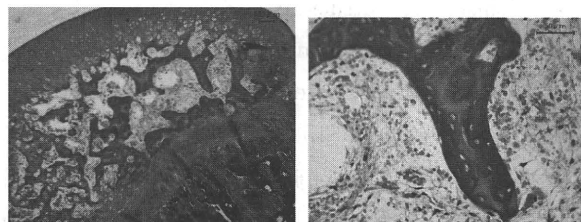
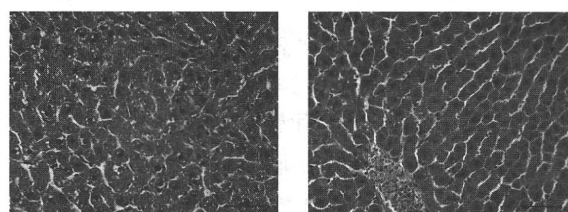


図1B 大腿骨頭の組織像(H&E 染色)。L-NAME 追加投与群、2週。1週と同様に広範に empty lacunae を認め、骨髄腔には幼若な細胞と線維組織を認めた。

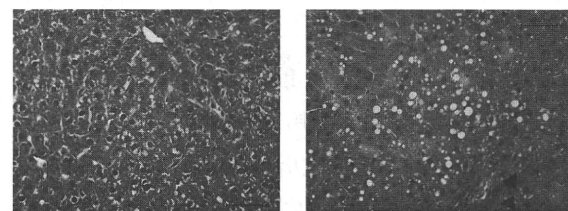
Control 群



1週

2週

L-NAME 追加投与群



1週

2週

図4 肝組織像(H&E 染色)。Control 群では1週、2週とも正常像を示した。L-NAME 追加投与群では1週で肝細胞の細胞質内に小脂肪滴の集積を認め、2週では大脂肪滴と中心静脈周囲の炎症細胞浸潤(◀)を認めた。

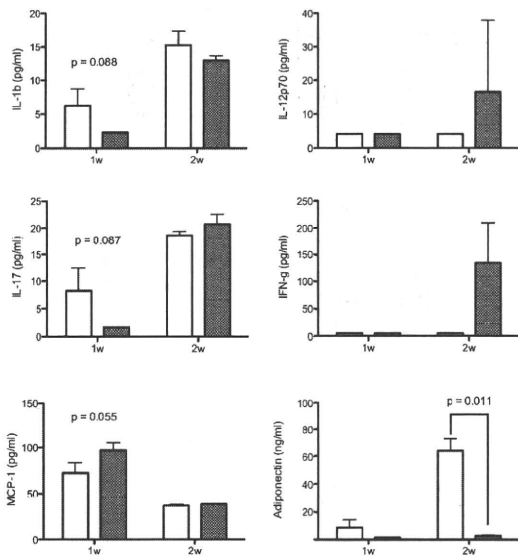


図5 血漿サイトカイン濃度。Adiponectin 濃度が2週でcontrol群よりも有意に低値を示した。IL1- $\alpha$ 、IL-2、IL-6、IL-10及びTNF- $\alpha$ は検出限界以下であった。

#### 4. 考察

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生におけるNOの関与について、赤池らはステロイド投与によってNO bioavailabilityが低下することで生じる血管内皮機能障害が関与している可能性について報告している<sup>3)</sup>。また、NOの産生が少ないとされるT-786C eNOS遺伝子多型が大腿骨頭壊死患者で多かったことから、NOの産生が少ないことが壊死発生のリスクであるという報告もある<sup>4)</sup>。本研究では、LPSとMPSLにL-NAMEを追加投与することにより、大腿骨頭壊死症の発生率が20%から67%に上昇し、過去の報告を支持する結果となった。

壊死発生率が高かったL-NAME追加投与群は、control群と比べて血漿中の脂質レベルの上昇が持続し、肝臓においても脂肪滴が集積して脂肪性肝炎に進展した。生理的範囲内のNOは脂質代謝を促進するため、NO合成酵素の抑制により高脂血症及び肥満を呈すると報告されている<sup>6)</sup>。また、肝障害は単独でIONの危険因子であると報告されている<sup>7)</sup>。このことから、脂質代謝異常、及び肝障害がステロイド性大腿骨頭壊死症の発生に関与している可能性が示唆された。

血漿adiponectinレベルはL-NAME追加投与群で低値を示した。Adiponectinは脂肪細胞から産生される生理活性物質であるが、ION患者でadiponectin値

が有意に低いと報告されている<sup>8)</sup>。Adiponectinは様々な血管系の病態に対し、防御的な役割を果たすが、脳虚血による脳損傷に対しては、NO合成酵素のリン酸化を介して防御的に関与すると報告されている<sup>9)</sup>。ステロイド性大腿骨頭壊死症の病態においてもadiponectinが関与している可能性が示唆される。

#### 5. 結論

NO合成酵素阻害剤であるL-NAMEを追加投与することにより、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生率が上昇し、その病態にNOが関与していることが示唆された。また、L-NAME追加投与により脂質代謝異常が遷延し、肝臓で脂肪細胞の集積をみとめ、血漿adiponectin値が低値となった。

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 舘田 健児、岡崎 俊一郎、渡邊 智、片田 竜一、水尾 圭祐、名越 智、山下 敏彦、松本 博志：特発性大腿骨頭壊死の発生における一酸化窒素の関与、第120回北海道整形災害外科学会。札幌、2011.1.22-23

#### 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, Katsuda S et al. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci* 2004; 9: 509-15.
- 2) Ichiseki T, Kaneuji Y, Matsumoto T et al. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology* 2006; 45: 287-90.
- 3) Akaike M, Matsumoto T. Glucocorticoid-induced reduction in NO bioavailability and



vascular endothelial dysfunction. *Clin Calcium* 2007; 17: 864-70.

- 4) Glueck CJ, Freiberg RA, Fontaine RN et al. Association between the T-786C eNOS polymorphism and idiopathic osteonecrosis of the head of the femur. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89: 2460-68.
- 5) Okazaki S, Nagoya S, Matsumoto H et al. Femoral head osteonecrosis can be caused by disruption of the systemic immune response via the toll-like receptor 4 signalling pathway. *Rheumatology* 2009; 48: 227-32.
- 6) Jobgen WS, Fried SK, Wu G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 571-88.
- 7) Sakaguchi M, Tanaka T, Fukushima W, Kubo T, Hirota Y. Impact of oral corticosteroid use for idiopathic osteonecrosis of the femoral head: a nationwide multicenter case-control study in Japan. *J Orthop Sci* 2010; 15: 185-91.
- 8) Shuai B, Shen L, Wei B et al. Low plasma adiponectin as a potential biomarker for osteonecrosis of the femoral head. *J Rheumatol* 2010; 37: 2151-5.
- 9) Nishimura M, Izumiya Y, Ouchi N et al. Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation* 2008; 117: 216-23.

# 電磁場刺激によるステロイド性骨壊死予防機序の検討

後藤 毅、藤岡幹浩、石田雅史、栗林正明、齊藤正純、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)

われわれはこれまでに、電磁場刺激(pulsed electromagnetic fields therapy: PEMF)が家兔のステロイド性骨壊死の発生リスクを有意に抑制することを確認した。しかし、PEMFによる骨壊死予防機序は現在のところ明らかになっていない。ステロイドが骨壊死を発生させる機序の一つとして、ステロイド投与による血管内皮傷害とそれに伴う阻血が関連していると報告されている。そこで今回はPEMFによる骨壊死予防機序を検討する目的で、PEMFによる細胞保護作用と血管新生作用についてヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞を用いて検討した。PEMFはステロイドによる血管内皮傷害を軽減させなかった。一方、血管内皮細胞においてPEMFは血管新生因子であるfibroblast growth factor-2の遺伝子発現を有意に亢進させた。PEMFは血管新生を促進することで、ステロイド性骨壊死を予防した可能性があると考えた。

## 1. 研究目的

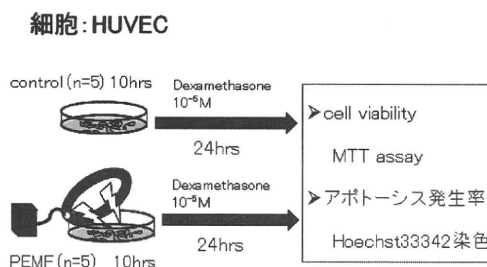
われわれはこれまでに電磁場刺激(pulsed electromagnetic fields therapy: PEMF)が家兔のステロイド性骨壊死の発生リスクを有意に抑制することを確認した<sup>1)</sup>。しかし、PEMFによる骨壊死予防機序は現在のところ明らかになっていない。ステロイドが骨壊死を発生させる機序の一つとして、ステロイド投与による血管内皮傷害とそれに伴う阻血が関連していると報告されている<sup>2)</sup>。そこで今回はPEMFによる細胞保護作用と血管新生作用について検討した。

## 2. 研究方法

### A. 細胞保護作用

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(human umbilical venous endothelial cells: HUVEC)を用いた。コントロール群と10時間の電磁場刺激を受けるPEMF群に分けて培養した(n=5)。その後 $10^{-6}$ Mのデキサメサゾン(dexamethasone: DEX)を含む培地で24時間培養し、cell viabilityおよびアポトーシス発生率について解析し、両群間で比較した。Cell viabilityはMTT assayで、アポトーシス発生率はhoechst33342染色で評価した(図1)。

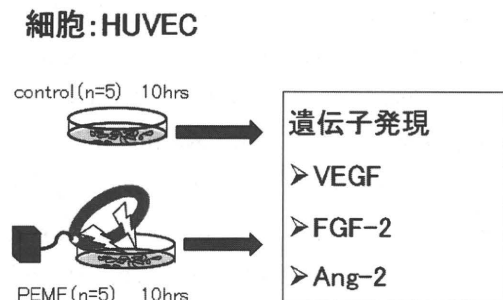
図1 細胞保護作用の評価



### B. 血管新生作用

HUVECを使用し、コントロール群と10時間の電磁場刺激を受けるPEMF群に分けて培養して(n=5)RNAを抽出したのちにreal time reverse transcription-polymerase chain reaction(real time RT-PCR)を行い、血管新生因子であるvascular endothelial growth factor(VEGF)、fibroblast growth factor-2(FGF-2)およびangiopoietin-2(Ang-2)の遺伝子発現を解析し、2群間で比較した(図2)。

図2 血管新生作用の評価



### C. 統計解析

統計学的検定には両側検定 t-test を用い、全てのデータは平均値±SD. で表記した。p<0.05 を統計学的有意とした。

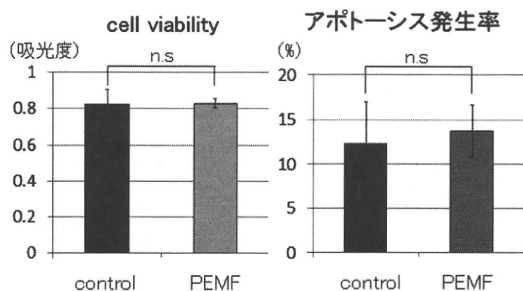
## 3. 解析結果

### A. 細胞保護作用 (図A)

Cell viability については、MTT assay での吸光度は control 群で  $0.82 \pm 0.08$ 、PEMF 群では  $0.83 \pm 0.02$  で両群間に統計学的有意差はなかった (P=0.84)。

アポトーシス発生率は control 群で  $12.3 \pm 4.6\%$ 、PEMF 群で  $13.7 \pm 2.9\%$  であり、有意な差は認めなかった (P=0.62)。

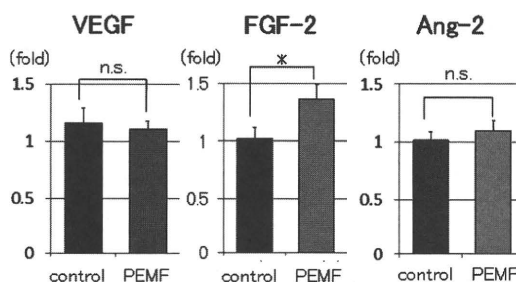
図A 細胞保護作用



### B. 血管新生作用 (図B)

VEGF の遺伝子発現は control 群で  $1.15 \pm 0.12$ 、PEMF 群で  $1.10 \pm 0.07$  であり、両者には統計学的有意差はなかった (P=0.47)。FGF-2 に関しては control 群で  $1.02 \pm 0.10$ 、PEMF 群で  $1.36 \pm 0.13$  であり、PEMF 群で有意に発現が亢進していた (P<0.01)。Ang-2 の遺伝子発現は control 群で  $1.02 \pm 0.06$  あったのに対し、PEMF 群で  $1.09 \pm 0.09$  であった。両者の間には統計学的に有意な差は認めなかった (P=0.28)。

図B 血管新生作用



## 4. 考察

HUVEC において、PEMF はステロイドによる cell viability および apoptosis 発生率には影響を与えず、ステロイドによる血管内皮傷害を軽減させなかった。一方、PEMF は血管新生因子の一つである FGF-2 の遺伝子発現を有意に亢進させた。家兎モデルでのステロイド性骨壊死の予防機序には、PEMF による血管新生促進作用が関連していると考ええる。

動物モデルでは、酸化ストレス<sup>2)</sup>、脂質代謝異常<sup>3)</sup>や凝固・線溶系異常<sup>4)</sup>が骨壊死の発生に関連していることが報告されており、抗酸化剤<sup>5,6)</sup>、高脂血症治療薬<sup>7)</sup>や抗凝固薬<sup>8)</sup>による骨壊死予防効果がすでに確認されている。PEMF による予防機序は血管新生を介していると推定されるため、これらの方法とは異なると考えられる。したがって、これらの方法と PEMF を併用することにより、相加的な効果が期待できる可能性がある。PEMF は 1970 年代から骨折治療に臨床応用されており、有害事象の報告はない。PEMF は安全性が確認されている点で優れており、ヒトに応用することが可能である。

一方、PEMF による予防効果を十分に得るためにはステロイド性骨壊死家兎モデルでの研究<sup>1)</sup>と同様に、ステロイド投与前から PEMF を開始することが望ましいと考える。

## 5. 結論

- (1) PEMF によるステロイド性骨壊死予防機序について検討した。
- (2) HUVEC において PEMF はステロイドによる cell viability および apoptosis 発生率には影響を与えなかった。一方、PEMF は血管新生因子の一つである FGF-2 の遺伝子発現を有意に亢進させた。
- (3) PEMF は血管新生を促すことで家兎でのステロイド性骨壊死の発生リスクを有意に低下させたと考え

た。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## 7. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許の取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 8. 参考文献

- 1) Ishida M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Kubo T. Electromagnetic fields: A Novel Prophylaxis for Steroid-induced Osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 2008;466:1068-1073.
- 2) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, Katsuda S. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. J Orthop Sci. 2004;9(5):509-15.
- 3) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid induced osteonecrosis in rabbits. Rheumatology (Oxford). 2001;40:196-201.
- 4) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. Bone. 2002 ;30:185-190.
- 5) Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Ishida M, Goto T, Kubo T. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits, Acta Orthop, 2010; 81:154-60.
- 6) 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.

- 7) Nishida K, Yamamoto T, Motomura G, Jingushi S, Iwamoto Y. Pitavastatin may Reduce Risk of Steroid-induced Osteonecrosis in Rabbits. Clin Orthop Relat Res. 2008;466:1054-1058.
- 8) 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(6) : 585-90.