

# ステロイド性家兎骨壊死モデルにおけるエンドセリン誘発血管攣縮の関与

## — 予備的実験報告 —

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

ステロイド投与が血管に及ぼす影響として、NO 産生低下を介した血管内皮障害や、endothelin-1 などの血管平滑筋収縮の効果増強が報告されており、ステロイド性骨壊死発生に血管攣縮が関与している可能性が示唆されている。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 endothelin-1 誘発血管攣縮の関与を検討することである。28 週齢以上の日本白色家兎 30 羽に対して、メチルプレドニゾロン 20mg/kg 筋注直前からエンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタン 15mg/kg を 1 日 2 回経口投与し、1 週間継続した。2 週後の病理学的評価にて骨壊死が認められたのは 5/20 (25%) であり、約 7 割の発生率が期待されるステロイド性家兎骨壊死モデルにおいて、骨壊死発生抑制効果が示唆された。

### 1. 研究目的

NO 貼付薬や血管攣縮予防薬ファスジルによるステロイド性骨壊死抑制効果が報告されており<sup>1, 2)</sup>、ステロイド性骨壊死に血管攣縮が関与している可能性が示唆されている。血管運動の調節因子として、血管収縮因子であるエンドセリンやトロンボキサン A<sub>2</sub> や血管拡張因子である NO やプロスタサイクリン等があるが、本研究は強い血管収縮因子であるエンドセリンに注目した。

本研究の目的はステロイド性骨壊死モデルにおける endothelin-1 誘発血管攣縮の関与について家兎モデルにて予備的に検討することである。

### 2. 研究方法

薬剤として、エンドセリン受容体阻害薬であるボセンタンを用いた。本薬剤は Endothelin-1 の ET-A 受容体および ET-B 受容体結合を阻害し、肺動脈性肺高血圧症の肺血行動態改善に有効であることが報告されている<sup>3, 4)</sup>。

28 週齢以上の成熟雄日本白色家兎 30 羽を ERA 群 (20 羽) と CTR 群 (10 羽) にランダムに分けた。ERA 群に対しては生食 5ml に溶解したボセンタン 15mg/kg を、CTR 群には生食 5ml のみをゴム製経胃チューブ用いて一日 2 回経胃投与した。初回薬剤投与後に、メチルプレドニゾロン 20mg/kg を一回右殿筋内に注射した。薬剤

はメチルプレドニゾロン筋注 1 週後まで継続投与し、2 週後に全羽犠牲死とした。

評価項目として骨壊死発生率を評価した。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診断し、いずれかの部位に骨壊死が認められたものを骨壊死発生ありと判定した<sup>5)</sup>。また、脂質、血糖値などの血液学的データを比較検討した。

### 3. 研究結果

CTR 群の骨壊死発生率が 70% (7/10 羽) であったのに対して、ERA 群の骨壊死発生率は 25% (5/20) と、有意に低かった。

総コレステロール、中性脂肪は、メチルプレドニゾロン筋注後両群とも 1 週さらに 2 週と有意に上昇していた。また、血糖値はメチルプレドニゾロン筋注後に有意に上昇し、高値を維持していた。

図1 総コレステロール

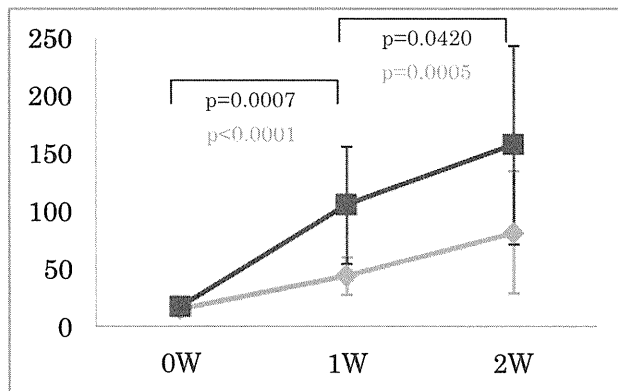


図2 中性脂肪

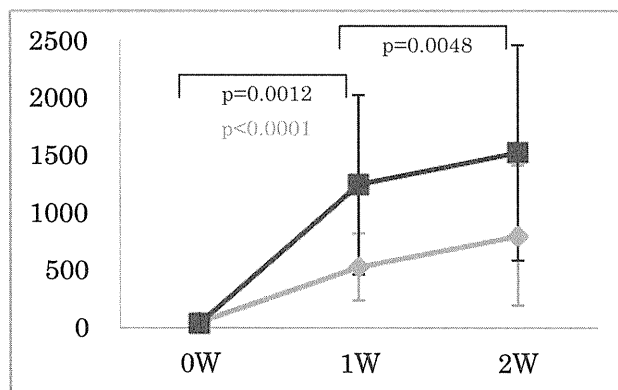
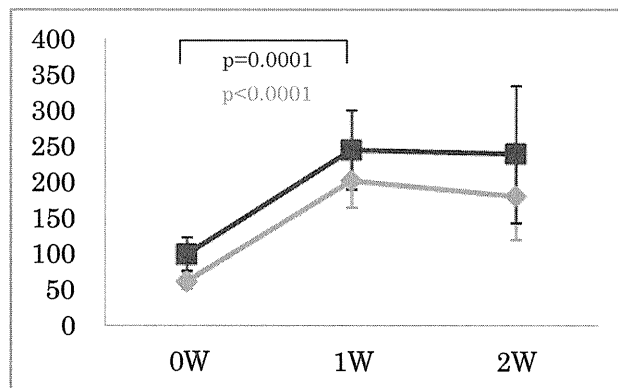


図3 血糖値



#### 4. 考察

ステロイドの血管への作用として、骨内血管系に血管内皮障害が起こると報告されている<sup>6)</sup>。その要因として、高コレステロール血症や高中性脂肪血症、急速高血糖、酸化ストレス等が報告されている<sup>7-10)</sup>。本研究では、ステロイド投与後に高コレステロール血症や高中性脂肪血症、高血糖が認められており、急性の血管内皮障害に関与した可能性が示唆される。

また、血管内皮障害によって NO 産生低下や、内皮依存性血管拡張の減弱が認められることが報告されており<sup>9,11)</sup>、血管内皮障害と血管運動の関連が示唆されて

いる。動物実験においても、ステロイドによってエンドセリン誘発血管攣縮が増強したと報告されており<sup>12)</sup>、本研究では、エンドセリン受容体阻害薬によってステロイド性骨壊死発生率が低下していた。ステロイド性骨壊死発生に血管内皮障害を介したエンドセリン誘発血管攣縮が関与している可能性が示唆された。

#### 5. 結論

ステロイド性骨壊死家兎モデルにおいて、エンドセリン受容体阻害薬を投与することで骨壊死発生が抑制された。

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwamoto Y. MRI-detected Double Low-Intensity Bands in Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Orthop Sci.* 2011 Jul;16(4):471-5
- 2) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Drug on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Jul 8 in press
- 3) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S,
- 4) Iwamoto Y. Incidence of Non-Traumatic Osteonecrosis of the Femoral Head in the Japanese Population. *Arthritis Rheum.* 2011 Oct;63(10):3169-73.

##### 2. 学会発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwasaki K, Zhao G, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Agent on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *ORS Annual meeting 2011.* January 13-16, 2011, Long Beach, CA, USA
- 2) 山口亮介、山本 卓明、本村 悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英：ステロイド性骨壊死家兎モデルにおける抗血小板薬の骨壊死発生予防効果。第 84 回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜。
- 3) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英：一過性大腿骨頭萎縮症の骨頭内発生部位。第 84

回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜.

- 4) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症における骨髄浮腫像の発生部位. 第 121 回西日本整形・災害外科学会学術集会 2011.6.11,12 福岡
- 5) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 成熟度の異なる家兎におけるステロイド性骨壊死発生率の差. 第 38 回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島
- 6) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 家兎における抗血小板薬のステロイド性骨壊死発生抑制効果. 第 38 回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島
- 7) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 未成熟及び成熟家兎におけるステロイド性骨壊死の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 8) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、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の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 9) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症の MRI における骨髄浮腫像の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬

## 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) Drescher W, Beckmann R, Kasch R, Pufe M, Knobe M, Kweider N, Hassenpflug J, Tingart M, Pufe T, Kadyrov M. Nitrate patch prevents steroid-related bone necrosis. *J Orthop Res.* 2011 Oct;29(10):1517-20..
- 2) 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. 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—. 平成 22 年度総括・分担研究報告書, 109-11, 2010

- 3) Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet.* 2001 Oct 6;358(9288):1119-23.
- 4) Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2002 Mar 21;346(12):896-903.
- 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 Nov; 40(11):2055-64.
- 6) 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.
- 7) Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM, Stuehlinger M, Lin KY, Cooke JP, Morrow JD, Ridker PM, Rifai N, Miller E, Witztum JL, Mietus-Snyder M. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation.* 2003 Sep 2;108(9):1059-63. Epub 2003 Aug 11.
- 8) Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation.* 2002 Sep 3;106(10):1211-8.

- 9) Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998 May 5;97(17):1695-701.
- 10) 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.
- 11) 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 Jan 10;92(1):81-7.
- 12) Drescher W, Li H, Lundgaard A, Bünger C, Hansen ES. Endothelin-1-induced femoral head epiphyseal artery constriction is enhanced by long-term corticosteroid treatment. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Nov;88 Suppl 3:173-9.

# ミネラルコルチコイド受容体阻害薬によるステロイド性骨壊死抑制効果

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)

グルココルチコイドは、血管内皮細胞においてはグルココルチコイド受容体のみならず、ミネラルコルチコイド受容体(MR)に結合して作用を発揮すると報告されている。そこでステロイド性骨壊死モデルに対して、MR阻害薬による骨壊死抑制効果を検討した。28週齢以上の日本白色家兎20羽にMR阻害薬であるエプレレノン投与した上で、メチルプレドニゾロンを筋注した。7/18羽(38.9%)に骨壊死発生が認められ、MR阻害薬による骨壊死発生抑制効果の可能性が示唆された。

## 1. 研究目的

グルココルチコイドは、全身に普遍的に存在するグルココルチコイド受容体に結合して作用を発揮するが、一方で一部の組織では、ミネラルコルチコイド受容体(MR)にも結合して作用を発揮することが知られている<sup>1)</sup>。近年、グルココルチコイドのMRを介した血管内皮障害がステロイド性骨壊死に関与している可能性が報告されており、MR阻害薬によるステロイド性骨壊死発生抑制効果の可能性が提案されている<sup>2,3)</sup>。

エプレレノンはMRに特異的に結合し、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系のアルドステロンのMR結合を阻害することで効果を発揮するMR阻害薬で、治療抵抗性高血圧や慢性心不全において改善効果が報告されている<sup>4)</sup>。

本研究の目的は、ステロイド性骨壊死家兎モデルにおいて、MR阻害薬エプレレノンによるステロイド性骨壊死発生抑制効果を検討することである。

## 2. 研究方法

28週齢以上の成熟雄日本白色家兎20羽に対して、生食に溶解したエプレレノン10mg/kgを、ゴム製経胃チューブを用いて一日2回連日経胃投与した。薬剤投与を2日間行った後、メチルプレドニゾロン20mg/kgを一回右殿筋内に注射した。エプレレノンはメチルプレドニゾロン筋注1週間まで継続投与し、2週後に全頭犠牲死とした。

評価項目として骨壊死発生率を評価した。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診断し、いずれかの部位に骨壊死が認められたものを骨壊死発生ありと判定した<sup>5)</sup>。

また、MR阻害薬によるネガティブフィードバックの結果として変動が予想されるレニン活性、アルドステロン濃度について、投与前、ステロイド投与1週毎に調査した。

## 3. 研究結果

20羽中2羽が胃管挿入時の気管損傷で死亡した。骨壊死発生率は、38.9%(7/18羽)であった。

レニン活性、アルドステロン濃度ともに、エプレレノン投与後有意に上昇し、メチルプレドニゾロン筋注後に有意に低下していた(図1、2)

図1 レニン活性

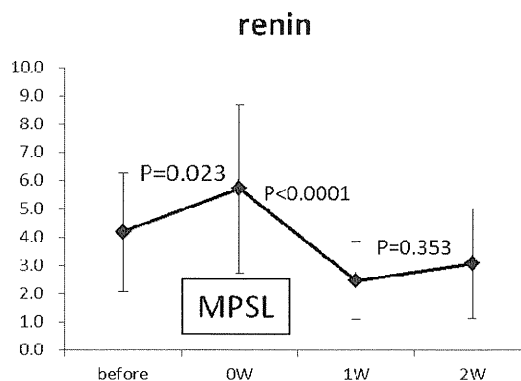
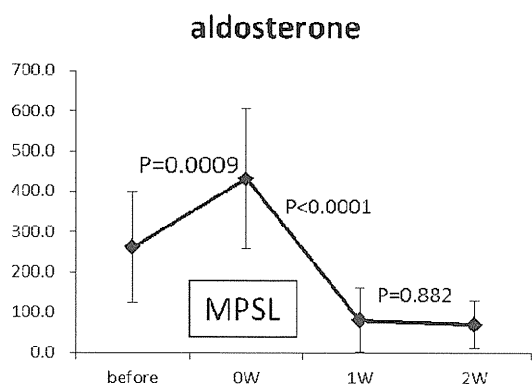


図2 アルドステロン濃度



#### 4. 考察

本研究では、約 70%の骨壊死発生率が期待されるステロイド性骨壊死家兎モデルに対して、エプレレノンを投与することで、骨壊死発生率は約 40%であった。MR 阻害薬エプレレノンによるステロイド性骨壊死発生抑制効果の可能性が示唆された。

グルココルチコイドは、血管内皮細胞において MR を介して Superoxide 産生増加や eNOS 発現の低下を引き起こし、血管内皮細胞に関与している可能性が報告されており、今後は血管内皮機能についてさらに検討していく予定である。

#### 5. 結論

MR 阻害薬エプレレノンによるステロイド性骨壊死発生抑制効果の可能性が示唆された。

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwamoto Y. MRI-detected Double Low-Intensity Bands in Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Orthop Sci.* 2011 Jul;16(4):471-5
- 2) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Drug on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Jul 8 in press
- 3) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Incidence of Non-Traumatic Osteonecrosis of the Femoral Head in the Japanese Population. *Arthritis Rheum.* 2011 Oct;63(10):3169-73.

##### 2. 学会発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwasaki K, Zhao G, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Agent on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. ORS Annual meeting 2011. January 13-16, 2011, Long Beach, CA, USA
- 2) 山口亮介、山本 卓明、本村 悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: ステロイド性骨壊死家兎モデルにおける抗血小板薬の骨壊死発生予防効果. 第 84 回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜.
- 3) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症の骨頭内発生部位. 第 84 回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜.
- 4) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症における骨髄浮腫像の発生部位. 第 121 回西日本整形・災害外科学会学術集会 2011.6.11,12 福岡
- 5) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 成熟度の異なる家兎におけるステロイド性骨壊死発生率の差. 第 38 回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島
- 6) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 家兎における抗血小板薬のステロイド性骨壊死発生抑制効果. 第 38 回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島
- 7) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 未成熟及び成熟家兎におけるステロイド性骨壊死の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 8) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、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の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 9) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症の MRI における骨髄浮腫像の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬

## 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) Walker BR. Glucocorticoids and cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol.* 2007; 157:545-59.
- 2) 赤池雅史、栗飯原賢一、松本俊夫. アルドステロン受容体拮抗薬はグルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害を抑制する. 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, 63-66, 2010
- 3) 赤池雅史、栗飯原賢一、松本俊夫. エプレレノン はグルココルチコイドによる血管内皮細胞での酸化ストレス増大と一酸化窒素産生低下を抑制する. 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 22 年度総括・分担研究報告書, 77-80, 2011
- 4) 加藤茂明、横田健一、今井祐記. 新規 MR 転写共役因子複合体によるエピゲノム修飾. 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 22 年度総括・分担研究報告書, 74-5, 2011
- 5) Yamamoto T, Irida T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1997 Nov; 40(11):2055-64.

# 抗血小板薬によるステロイド性骨壊死予防効果—第3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)

阻血性壊死病変である心筋梗塞や脳梗塞では、血管内皮障害に起因する血小板凝集が重要な発症要因であることが知られており、血小板凝集を抑制する抗血小板薬に発症抑制効果が認められている。そこでステロイド性骨壊死に対して、抗血小板薬による骨壊死予防効果を検討した。28週齢以上の日本白色家兎65羽を抗血小板薬投与群(AP群)35羽、対照群(NS群)30羽に分けステロイドを投与した。骨壊死発生率はAP群16/33羽(48.5%)、NS群22/30羽(73.3%)であり、AP群は骨壊死発生が有意に抑制されていた( $P<0.05$ )。血管内血小板凝集がステロイド性骨壊死発症要因の一つである可能性が示唆された。

## 1. 研究目的

阻血性壊死病変である心筋梗塞や脳梗塞では、血管内皮障害に起因する血小板凝集が重要な発症要因であることが知られており、血小板凝集を抑制する抗血小板薬に発症抑制効果が認められている。しかし、同じく阻血性病変であると考えられているステロイド性骨壊死に対する抗血小板薬の発症抑制効果は未だ検討されていない。

抗血小板薬クロピドグレルは、ADP誘発血小板凝集を選択的に不可逆的に阻害することで効果を発揮する薬剤で、アスピリンやパナルジンなど他の抗血小板薬と比較してより高い効果と安全性が確認されており、心血管疾患に対する第一選択薬の一つとされている<sup>1)</sup>。

我々は過去に、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症抑制効果の可能性に関する予備的実験を報告し<sup>2)</sup>、さらに予防的投与はステロイド投与1週間からの投与で十分に効果を発揮することを報告した<sup>3)</sup>。

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症抑制効果を検討することである。

## 2. 研究方法

28週齢以上の成熟雄日本白色家兎65羽をランダムにクロピドグレル投与群35羽(AP群)、生食投与群30羽(NS群)の2群に分けた。AP群に対しては20mlの生食に溶解したクロピドグレル5mg/kg、NS群に対しては20mlの生食単独を、ゴム製経胃チューブ用いて連日経

胃投与した。薬剤投与開始1週後に、メチルプレドニゾン20mg/kgを一回右殿筋内に注射し、開始3週後に全頭犠牲死とした。薬剤は犠牲死まで継続した。

評価項目として、骨壊死発生率、1週毎の血小板凝集能、血液学的データを比較検討した。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診断し、いずれかの部位に骨壊死が認められたものを骨壊死発生ありと判定した<sup>4)</sup>。

血小板凝集能は、血小板凝集能測定機(WBAカルナ、IMI、埼玉)を用いて、薬剤投与前から犠牲死まで1週毎に採取した血液で、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。血液学的データとして、脂質、血小板数を比較検討した。

## 3. 研究結果

AP群のうち、1羽がステロイド投与翌日に原因不明に死亡し、1羽が胃管挿入時の気管損傷で死亡した。

骨壊死発生率は、NS群が73.3%(22/30羽)であったのに対し、AP群が48.5%(16/33羽)であり、両群間に有意な差が認められた( $p=0.042$ ) (図1)。

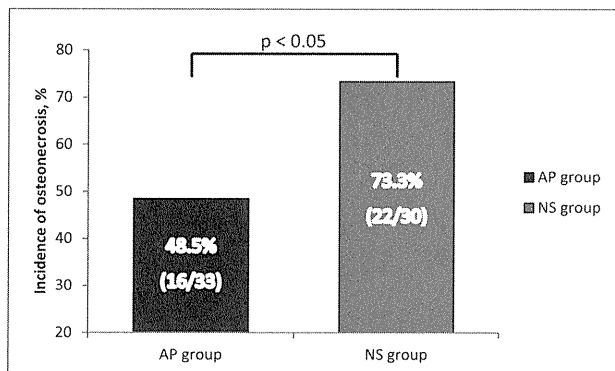
血小板凝集能はNS群では有意な変化が認められなかったのに対して、AS群ではクロピドグレル投与後、有意に血小板凝集能が抑制され、ステロイド投与時以降両群間に有意な差が認められた (図2)。

中性脂肪、総コレステロールは、いずれも両群におい



てステロイド投与後有意に上昇したが、両群間に有意な差は認められなかった (図 3、4)。血小板数は、NS 群ではステロイド投与後有意に低下したのに対して、AP 群では比較的高値を保ち、両群間に有意な差が認められた (図 5)。

図 1 骨壊死発生率



AP group: クロピドグレル投与群

NS group: 生食投与群

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。PATI が高値であるほど血小板凝集能が抑制されている。

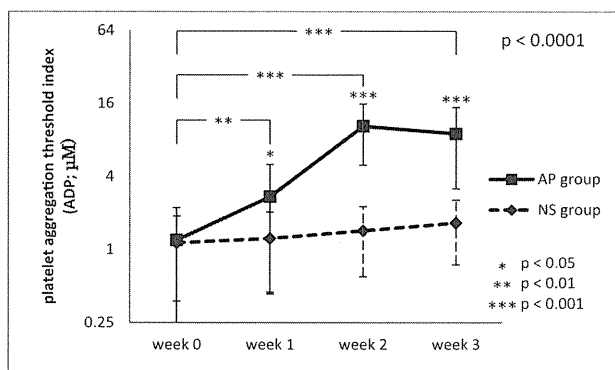


図 3 Triglycerides

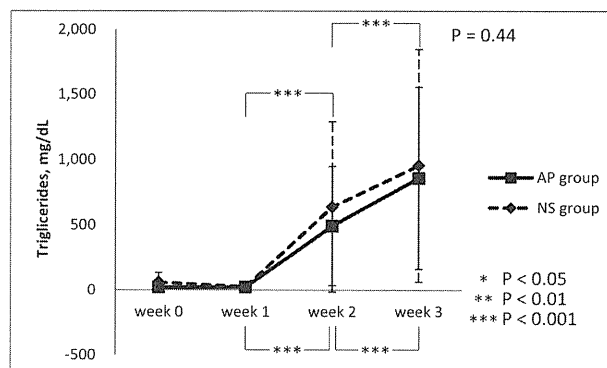


図 4 Total cholesterol

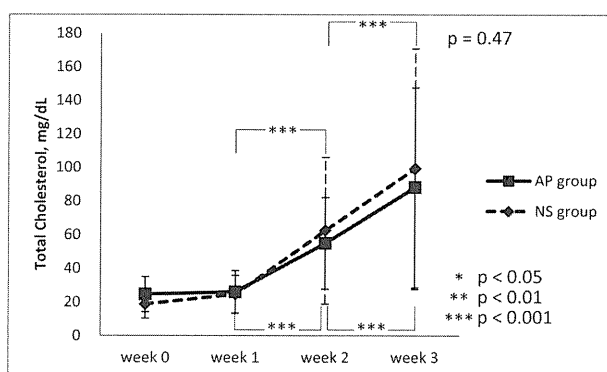
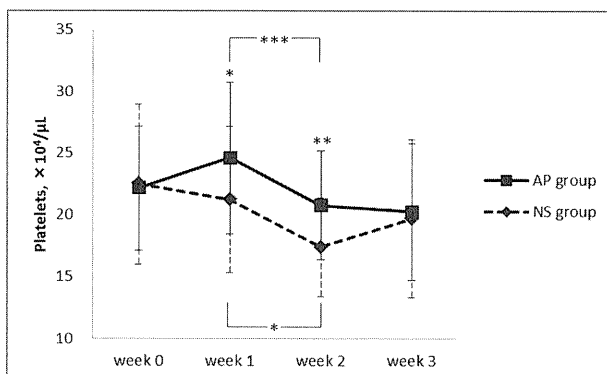


図 5 血小板数



#### 4. 考察

抗血栓薬としては、抗血小板薬と抗凝固薬が代表的であり、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に予防的に投与されている。一方、アスピリンやチクロピジンなどの抗血小板薬は、心筋梗塞やアテローム性血栓性脳梗塞などの血管内皮障害を起因とする動脈性虚血性疾患に対して予防的に投与されている。

本研究の結果、抗血小板薬により血小板凝集を阻害し、ステロイド性骨壊死発生抑制効果が認められた。ス

ステロイドと血管内皮に関する報告として、骨内血管系の血管内皮と血管床におけるステロイドによる機能障害がステロイド性骨壊死発生に関与しているという報告や<sup>5)</sup>、ステロイドのミネラルコルチコイド作用により血管内皮障害が引き起こされると報告されている<sup>6)</sup>。ステロイド性骨壊死においても、他の阻血性疾患と同様に血管内皮障害を起因とした血小板凝集が発生に関与している可能性が示唆される。

これまでに基礎実験においてステロイド性骨壊死に予防的効果が認められた薬剤として、ワーファリンやピタバスタチン、ビタミン E などが報告されているが<sup>7-9)</sup>、臨床的に予防効果が示された報告は少ない。抗血小板薬クロピドグレルも臨床的予防薬剤候補の一つになりうると考えられる。

## 5. 結論

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が認められた。血管内血小板凝集が骨壊死発生要因の一つである可能性がある。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwamoto Y. MRI-detected Double Low-Intensity Bands in Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Orthop Sci.* 2011 Jul;16(4):471-5
- 2) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Drug on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Jul 8 in press
- 3) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Incidence of Non-Traumatic Osteonecrosis of the Femoral Head in the Japanese Population. *Arthritis Rheuma.* 2011 Oct;63(10):3169-73.

### 2. 学会発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwasaki K, Zhao G, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Agent on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *ORS Annual meeting 2011. January 13-16, 2011, Long Beach, CA, USA*
- 2) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎

賢優、趙ガリダ、岩本幸英: ステロイド性骨壊死家兎モデルにおける抗血小板薬の骨壊死発生予防効果. 第 84 回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜.

- 3) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症の骨頭内発生部位. 第 84 回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜.
- 4) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症における骨髄浮腫像の発生部位. 第 121 回西日本整形・災害外科学会学術集会 2011.6.11,12 福岡
- 5) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 成熟度の異なる家兎におけるステロイド性骨壊死発生率の差. 第 38 回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島
- 6) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 家兎における抗血小板薬のステロイド性骨壊死発生抑制効果. 第 38 回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島
- 7) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 未成熟及び成熟家兎におけるステロイド性骨壊死の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 8) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、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の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 9) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症の MRI における骨髄浮腫像の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬

## 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) Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 1997; 54:745-51.
- 2) 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
- 3) 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 - 第2報 -. 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22年度総括・分担研究報告書, 112-3, 2011
- 4) Yamamoto T, Iriya 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.
- 5) Kerachian MA, Seguin C, Harvey EJ. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 114:121-8.
- 6) 赤池雅史、栗飯原賢一、松本俊夫. エプレレノン はグルココルチコイドによる血管内皮細胞での酸化ストレス増大と一酸化窒素産生低下を抑制する. 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22年度総括・分担研究報告書, 77-80, 2011
- 7) 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.
- 8) 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.
- 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 Feb;81(1):154-60.

# 高コレステロール食を投与した家兎におけるステロイド骨壊死

## についての検討

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

本研究の目的は、ステロイド性骨壊死家兎モデルにおける高コレステロール血症の影響を検討することである。市販の高コレステロール食を2週間与えた28週齢以上の雄日本白色家兎20羽(CHOL群)と、通常食を与えた20羽(CTR群)に対して、メチルプレドニゾロン20mg/kgを単回筋注し、2週後に犠牲死とした。CTR群ではステロイド投与後に高コレステロール血症、中性脂肪高値が認められ、骨壊死発生率は60%(12/20)であった。一方、CHOL群はステロイド投与前から著明な高コレステロール血症を呈したが、骨壊死発生率は15%(3/20)と有意に低かった。

### 1. 研究目的

ステロイド性骨壊死発生に脂質代謝異常が関連している可能性が報告されている<sup>1-4)</sup>。しかし、コレステロールや中性脂肪などの脂質がステロイド性骨壊死発生に関与する詳細なメカニズムはまだ明らかとされていない。本研究の目的はステロイド性骨壊死家兎モデルにおける高コレステロール血症の影響について検討する事である。

### 2. 研究方法

#### 実験1)

28週齢以上の成熟日本白色家兎20羽に市販の高コレステロール食を投与しCHOL群とし、他の20羽に通常食を投与しCTR群とした。投与開始から2週後両群ともメチルプレドニゾロン20mg/kgを一回右殿筋内に注射し、投与開始4週後に犠牲死とした。

#### 実験2)

高コレステロール食の主なコレステロール成分であるラノリンを3%の割合で通常食と混ぜて家兎20羽に投与しLA群とした。投与開始から2週後両群ともメチルプレドニゾロン20mg/kgを一回右殿筋内に注射し、投与開始4週後に犠牲死とした。

三群共に犠牲死まで1週毎に採血し、血中脂質を測定した。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。

(倫理面への配慮)

本研究は、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

#### 実験1)

血中トータルコレステロールは、CHOL群では高コレステロール食投与した後に急速に上昇しており、CTR群と比べ、-1Wから2Wまで高値であった(1、 $P<0.0001$ )。中性脂肪はステロイド投与後両群とも有意に上昇していたが、CTR群の方がCHOL群より有意に高値であった(図2、 $P<0.0001$ )。血中LDL/HDL比はCHOL群の方がCTR群より有意に高値であった(図3、 $P<0.0001$ )。

CHOL群の骨壊死発生率は15%(3/20羽)であり、CTR群(60%: 12/20羽)に比し有意に低かった(図4、 $P=0.003$ )。この結果から、高コレステロール食中の成分の関与を疑い、主なコレステロール成分であるラノリンに注目した。

実験 2)

LA 群の血中脂質について測定した結果、トータルコレステロールとLDL/HDL比はCTR群と比べ有意に高値であり、中性脂肪はCTR群の方が高く、実験1)のCHOL群と同じ傾向であった(図5)。骨壊死発生率は20分の2羽、10%で、CTR群と比べ有意に低かった(図6)。

図4:骨壊死発生率(CHOL群/CTR群)

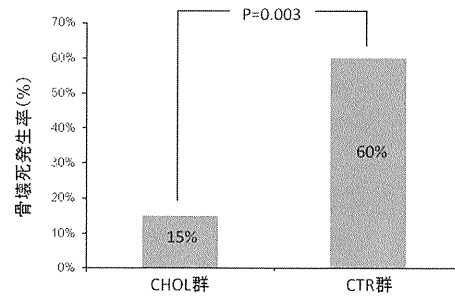


図1:血中トータルコレステロール(CHOL群/CTR群)

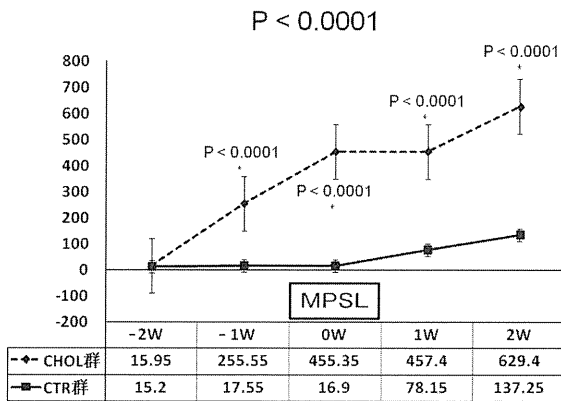


図5:血中脂質(LA群/CTR群)

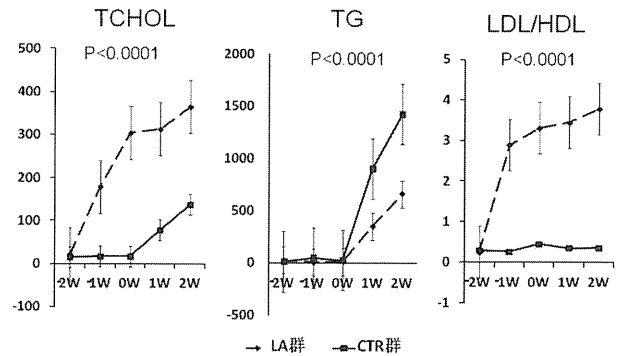


図2:血中トータル中性脂肪(CHOL群/CTR群)

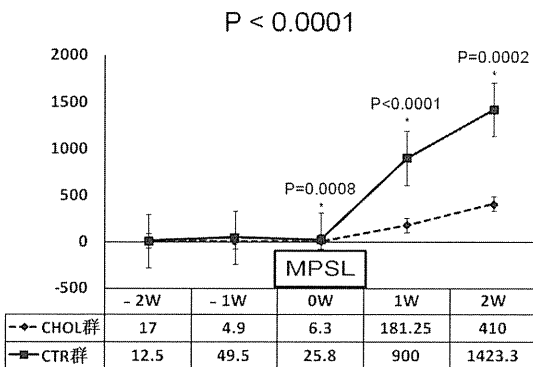


図6:骨壊死発生率(LA群/CTR群)

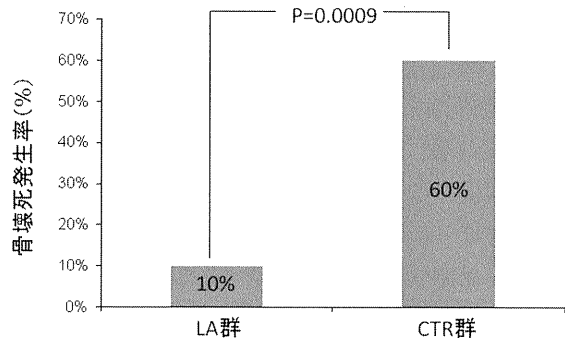
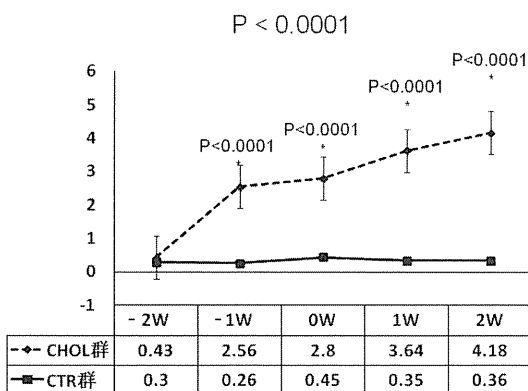


図3:血中LDL/HDL比(CHOL群/CTR群)



4. 考察

ステロイド性骨壊死に脂質代謝異常が関連している可能性が報告されている<sup>1-4)</sup>。しかし、本研究では、トータルコレステロール、LDL/HDL比が高値であるCHOL群の骨壊死発生率はCTR群(60%)と比べ有意に低かった。

ラノリンは高コレステロール食の主なコレステロール成分であるが、羊毛脂とも呼ばれ、羊毛から造られる脂肪様物質である。本研究では、LA群の脂質測定結果もCHOL群と同じ傾向であり、壊死発生率もCTR群と比べ有意に低かった。その要因としては、ラノリンの中に

多量に存在し、コレステロールなどのステロイド化合物の前駆体であるラノステロールがステロイドと競合した可能性などが考えられるが、今後さらなる検討が必要と考えられる。

## 5. 結論

高コレステロール食を投与した家兎におけるステロイド性骨壊死について検討した。高コレステロール投与家兎は有意にコレステロールが上昇したが、骨壊死発生は抑制されていた。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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-B: 781-86.

### 2. 学会発表

- 1) 趙嘎日達、山本卓明、池村 聡、本村悟朗、岩崎賢優、山口亮介、岩本幸英：大腿骨頭前方回旋骨切り術後の関節症性変化の進行に及ぼす因子に関する検討、第121回西日本整形・災害外科学会学術集会. 福岡、6. 11-12. 2011.
- 2) 趙嘎日達、山本卓明、池村 聡、本村悟朗、岩崎賢優、山口亮介、岩本幸英：大腿骨頭前方回旋骨切り術の関節症性変化の進行に及ぼす因子の検討、第38回日本股関節学会学術集会. 鹿児島、10. 7-8. 2011.

## 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) Miyanishi K, et al. 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;40: 196-201.
- 3) 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: 3387-91.
- 4) Wang GJ, et al. Cortisone induced bone changes and its response to lipid clearing agents. *Clin Orthop* 1978;130: 81-5.

# 酸化誘発ラット骨壊死モデルにおける骨頭内の虚血性変化

金子聖司、市堰徹、兼氏歩、中川慎太郎、三上友明、福井清教、北村憲司、松本忠美  
(金沢医科大学 整形外科)

当科の報告した酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおいて、骨内の低酸素状態の発生の有無とその時期について検討を行った。組織の低酸素状態の指標として HIF-1 $\alpha$  の発現を観察した。免疫組織学検討では BSO 投与後 6 時間で HIF-1 $\alpha$  陽性を認め、Western blot 法では BSO 投与後 3 時間で HIF-1 $\alpha$  の発現の増強を認めた。本モデルでは薬剤投与後早期に骨内に低酸素状態が生じていた。

## 1. 研究目的

大腿骨頭壊死症は、最終的には骨内の虚血によって発症すると考えられている。虚血が生じる時期に関しては、ステロイド投与家兎骨壊死モデルでは、薬剤投与後、比較的早期に虚血が生じるとの報告がある<sup>1)</sup>。

当科での酸化ストレス誘発剤単回投与ラット大腿骨頭壊死モデルの検討では、早いもので BSO 投与から 5 日目に骨壊死が確認されており、7 日目以降は骨壊死の発生率に明らかな変化を認めなかった。つまり、BSO 投与から少なくとも 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。しかし、直接虚血を示唆する現象を捉えてはおらず、実際に骨内に虚血が生じているかどうかは不明であった。HIF-1 $\alpha$  は低酸素時に濃度が上昇するタンパク質で、組織内の低酸素状態を示す指標として多分野で検討されている因子である。今回我々は、ラット骨壊死モデルにおいて HIF-1 $\alpha$  を指標に骨内の低酸素状態の発生の確認とその時期の検討を行った。

## 2. 研究方法

BSO 単回投与ラット大腿骨頭壊死モデル<sup>2)</sup>(24 週齢の Wister 系ラットに BSO500 mg/kg を 1 回のみ腹腔内投与)を用いた。

### 実験 1: 免疫組織化学的検討

組織の低酸素状態の指標として、各群における HIF-1 $\alpha$  の発現を観察した。

BSO 投与、12 時間、1 日目、3 日目、5 日目、7 日目、に犠牲死として両大腿骨を取り出した。各群 n=5 とした。

また、腹腔内に生理食塩水を一回のみ投与し犠牲死とした 5 例を N 群とし検討に加えた。

### 実験 2: Western blot 法による検討

ラットの両側の骨頭から蛋白質を抽出し、Western blot 法にて HIF-1 $\alpha$  の発現について検討した。実験 1 では 12 時間で HIF-1 $\alpha$  の陽性所見を認めたので、BSO 投与後 1 時間、3 時間、6 時間の群を加えて検討を行った。

## 3. 研究結果

### 実験 1

HIF-1 $\alpha$  陽性細胞は N 群でははっきりとした発現を認めないが、B12 時間群で陽性所見を認めた。陽性細胞は日数が経過するにつれて染色が弱まっていた。

### 実験 2

n 群では HIF-1 $\alpha$  の発現はごくわずかであった。3 時間以降では、発現は増強しており、別の個体でも同様の傾向を認めた。

## 4. 考察

HIF-1 $\alpha$ 、hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  は転写因子の一つであり、低酸素の指標として、様々な分野で研究されている。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、HIF-1 $\alpha$  蛋白の濃度は上昇するとされている。<sup>3-4)</sup> 本検討では、免疫組織学的検討において HIF-1 $\alpha$  陽性細胞は n 群と比較し、B12 時間群ですでに陽性細胞(+)と考えた。つ

まり、BSO 投与後すでに 12 時間で骨内が低酸素状態に陥っていると考えられた。ウェスタンブロット法による検討では、いずれもn群では HIF-1 $\alpha$  の発現はごくわずかであった。BSO 投与後 3 時間以降では発現の増強を認めたことから、BSO 投与後 3 時間ですでに骨内に低酸素状態が生じていると考えた。また、6 時間以降の群では HIF-1 $\alpha$  の発現に差がみられた。本モデルでの骨壊死の発生率は 7 日で約 40% であり、壊死の発生する個体としない個体とがある。今回の検討でも、個体によって薬剤投与により生じる低酸素状態に差がある可能性が考えられた。これが骨壊死を生じる個体と生じない個体との差であるかは不明であるが、興味深い部分である。

## 5. 結論

BSO 投与直後から 3 時間以内に、全ての個体で一旦骨内に虚血性変化が起きている可能性がある。今後はこの時期に焦点を絞り、より個体数を増やした検討を行う必要があると考えた。

## 6. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) S Kaneko, T Ichiseki, A Kaneuji, T Sugimori, K Fukui, K Kitamura, T Mikami, S Nakagawa, T Matsumoto. Oxidative stress induced hypoxia in a rat osteonecrosis model. 第 38 回日本股関節学会 鹿児島 10.7-8.2011
  - 2) 金子聖司、市堰徹、兼氏歩、杉森端三、福井清数、北村憲司、松本忠美: 酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける早期の骨内虚血状態、第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋、10.20-21.2011

## 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. Rheumatol. 2008 Dec;35(12):2383-90
- 2) Ichiseki T, Kaneuji A, Ueda Y, Nakagawa S, Mikami T, Fukui K, Matsumoto T. Osteonecrosis development in a novel rat model characterized by a single application of oxidative stress. Arthritis Rheum. 2011 Jul;63(7):2138-41
- 3) 木下学 用語解説 HIF-1(Hypoxia inducible factor-1) 外科と代謝・栄養(0389-5564)44 巻 5 号 271-274(2010.10)
- 4) 十川和博 血管新生研究の新しい展開 血管再生分子機構 低酸素応答における HIF-1 の役割. 医学のあゆみ (0039-2359)194 巻 10 号 752-756(2000.09)



# 酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける HIF-1 $\alpha$ 発現の検討

金子聖司、市堰徹、兼氏歩、福井清教、北村憲司、松本忠美  
(金沢医科大学 整形外科)

酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける、大腿骨頭と腹部大動脈での Western blot 法による HIF-1 $\alpha$  の発現を検討した。大腿骨頭と腹部大動脈はともに BSO 投与後非常に早期に HIF-1 $\alpha$  の発現を認めた。従って虚血性変化は酸化誘発後、非常に早期に生じる可能性が示唆された。

## 1. 研究目的

酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおいて、低酸素状態の指標とされる HIF-1 $\alpha$ <sup>1)</sup>を用いた検討では、薬剤投与後 3 時間で骨内に低酸素状態が生じていた。薬剤投与から短時間で虚血、すなわち血流障害が生じていることから、血管の攣縮などの急激な変化が生じていると考えられ、血管を調べる必要があると考えた。しかしながらラットの大腿骨頭の血管を取り出すことは非常に困難であるため、腹部大動脈を取り出し血管においても低酸素性事象の発生の有無と時期の検討を行うこととした。

## 2. 研究方法

BSO 単回投与ラット大腿骨頭壊死モデル<sup>2)</sup>(24 週齢の Wister 系ラットに BSO500 mg/kg を 1 回のみ腹腔内投与)を用いた。

BSO 投与、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間、1 日目、3 日目、5 日目、7 日目、に犠牲死として両大腿骨および腹部大動脈を取り出した。各群 n=3 としそれぞれウェスタンブロット法で検討した。

## 3. 研究結果

### 大腿骨頭

n 群では HIF-1 $\alpha$  の発現はごくわずかであった。

3 時間以降の群では発現は前回と同様に別の個体でも増強していた。

### 腹部大動脈

n 群では発現を認めなかったが、すべての個体で 1 時間以降の群で発現の増強を認めた。また、7 日目の

群で発現が低下していた。

## 4. 考察

骨頭では BSO 投与後、3 時間以降で発現の増強を認めたことから、BSO 投与後 3 時間ですでに骨内に低酸素状態が生じていると考えられた。また、腹部大動脈では、BSO 投与後 1 時間以降の群で HIF-1 $\alpha$  の発現の増強を認め、薬剤投与後 1 時間で低酸素状態が生じていると考えられた。加えて 7 日目の群では HIF-1 $\alpha$  の発現が低下したことから、低酸素状態は一過性の事象であった可能性があり、今後は 7 日以降も確認する必要があると考える。

本検討の重要なポイントとしては、低酸素性事象の発生は、薬剤投与後非常に早期に生じていること、一過性の事象である可能性があること、血管での変化も早期に生じる可能性があること、以上の 3 つが挙げられる。本モデルは酸化ストレス誘発剤を直接腹腔内に投与しており、投与後早期に生体内に酸化ストレスが誘発されている。<sup>2)</sup>また、大腿骨頭部の血管と大動脈が同じであるという断定は出来ないが、血管においても酸化ストレス誘発後に何らかの障害を生じた可能性が考えられた。

これらの点から、慢性的な血流や骨内の変化ではなく、酸化誘発から起こる急激なおかつ一過性の血流障害が発生しており、今後は薬剤投与後早期の血管攣縮などの一過性の病態も検索する必要があると考えた。

## 5. 結論

ラット大腿骨頭壊死モデルにおいて、大腿骨頭並び

に腹部大動脈では BSO 投与後、非常に早期に HIF-1  
 $\alpha$  が発現していた。

## 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) 十川和博 血管新生研究の新しい展開 血管再生分子機構 低酸素応答における HIF-1 の役割. 医学のあゆみ (0039-2359)194 巻 10 号 752-756(2000.09)
- 2) Ichiseki T, Kaneuji A, Ueda Y, Nakagawa S, Mikami T, Fukui K, Matsumoto T. Osteonecrosis development in a novel rat model characterized by a single application of oxidative stress. Arthritis Rheum.2011 jul;63(7):2138-41

# SHRSP のステロイド性大腿骨頭壊死症に対する各種薬剤による予防の研究

野崎義宏、熊谷謙治、宮田倫明、進藤裕幸、穂積晃、後藤久貴、尾崎誠  
(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻 展開医療科学講座 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 医療科学専攻 病態解析・制御学講座 神経感覚薬理学)

ステロイド性大腿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想定・提唱されている。ペントサンはヘパリン類似物質として抗凝固作用があり、スタチン類は脂質低下作用を持つ薬剤である。近年、両薬剤ともに抗酸化作用や抗凝固作用などの多面的作用が報告されている。脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)で観察される大腿骨頭壊死は、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、ステロイド投与で有意に発生頻度が増加することを明らかにして来た。今回、SHRSP にペントサンと水溶性スタチンのプラバスタチンをそれぞれ投与し、ステロイド性大腿骨頭壊死の抑制の有無を調べ、大腿骨頭壊死発生の予防の可能性を調査した。その結果、両薬剤ともに大腿骨頭壊死の発生率を有意に低下させた。酸化ストレスの抑制効果に関して、両薬剤で細胞周囲の抑制が同程度に認め、細胞核での抑制はペントサンが強い印象であった。さらにプラバスタチン群では、全身の脂質代謝の改善効果は認めなかったが脂肪細胞の骨頭骨髓占拠率の低下を認め、局所の脂質代謝改善効果が示唆された。両薬剤ともに酸化ストレスの抑制が大腿骨頭壊死の発生率低下に関与していることが考えられた。

## 1. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死の病因として、ステロイドによ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。ペントサンは抗凝固作用、スタチンは脂質低下作用を持つ薬剤として使用されているが、両薬剤とも酸化ストレスの抑制作用があり、大腿骨頭壊死の治療薬として注目されている。本研究の目的は SHRSP にペントサンとスタチンの各薬剤を投与し、ステロイド性大腿骨頭壊死の抑制・予防の可能性を調べることである。

## 2. 研究方法

(材料と方法)

13 週齢牡 SHRSP/Izm ラット (SHR 等疾患モデル共同研究会から購入) を使用した。ペントサン (pentosan polysulfate sodium, Bene pharma Chem GmbH & Co. KG, Geretsried, Germany)、プラバスタチン (Mevalotin, Daiichi Sankyo co. Ltd, Tokyo, Japan)、およびステロイドの投与の有無で 28 匹のコントロール群、15 匹のステロイ

ド群、36 匹のペントサン群、23 匹のプラバスタチン群、36 匹のペントサン+ステロイド群、15 匹のプラバスタチン+ステロイド群の計 6 群を作成した。

コントロール群は 13 週齢から犠牲死とする 17 週齢まで全群と共通の SP 飼料で飼育した。

ステロイド群では、15 週齢時に 4mg (約 15mg/Kg) のメチルプレドニゾロン (Predonisolone, Shionogi and Co.Ltd, Osaka, Japan) を背部に皮下注した。

ペントサン群では、13 週齢時にオスモティックポンプ (osmotic mini pumps, Alza Corp, Palo Alto, Ca, USA) をラットの背部皮下に埋設し、腹腔内にシヤントチューブを挿入することで腹腔内より 3mg/day/kg のペントサン投与を行った。

プラバスタチン群では、プラバスタチンが水溶性であることを利用して飲料水に混入し、15 mg/day/kg のプラバスタチンを 13 週齢より投与した。

ペントサン+ステロイド群では、13 週齢時からオスモティックポンプを使用して 3mg/day/kg のペントサン投与を開始し、15 週齢時に 4mg のメチルプレドニゾロンを背部

に皮下注した。

プラバスタチン+ステロイド群では、13 週齢時から 15 mg/day/kg のプラバスタチンを飲料水に混入して投与を開始した。15 週齢時に 4mg のメチルプレドニゾロンを背部に皮下注した。

犠牲死は 17 週齢時にエーテル吸入、50mg/kg のペントバルビタール溶液の腹腔内投与を行い無痛処置後に行った。犠牲死直後に心臓採血、両大腿骨頭摘出を行った(表 1)。

(血液学的検査)

各群の血液学的評価として血算、脂質系、凝固能を犠牲死の際に調査した。

(組織学的検査)

両側の大腿骨近位部は24時間ホルマリン固定後、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 等の分類に従い、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)。診断は 3 人の検者(野崎、熊谷、宮田)が各標本を別個に観察した。

(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。

コントロール群、ステロイド群、プラバスタチン、およびプラバスタチン+ステロイド群に於いては客観的評価目的で 3-point scale method を考案した。3-point scale method 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 人の検者が観察した点数で評価した。

(脂肪細胞占拠率)

客観的評価を行うために、NIH image を用いて骨頭骨髓内の脂肪細胞占拠率を、骨髓細胞と脂肪細胞の面積比で計測した。コントロール群、ステロイド群、プラバスタチン群、プラバスタチン+ステロイド群で施行した。観察点は無作為に各群から 5 つの骨頭を選択し、各骨

頭から 4 点を選び西田の計測方法に準じて測定した<sup>14)</sup>。

表1: 材料と方法

	ステロイド	n	13	14	15	16	17 (週齢)
コントロール	—	56	—————→				X
ステロイド	+	46	—————→				X
ペントサン	—	71	- - - - -→				X
プラバスタチン	—	71	—————→				X
ペントサン+ステロイド	+	29	- - - - -→				X
プラバスタチン+ステロイド	+	30	—————→				X

- SP食;
- ➔ ペントサン(3mg/kg/day) 腹腔内に持続投与
- ➔ プラバスタチン(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)

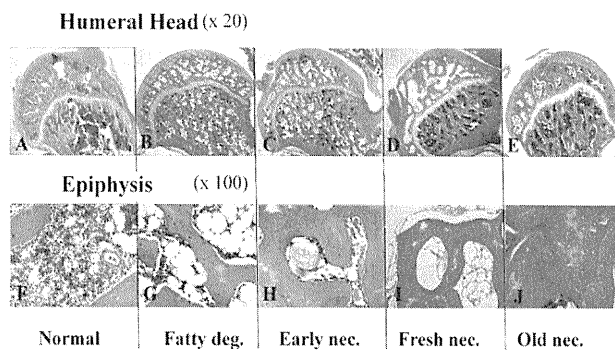


図 1. 各病期の病理組織像。正常骨 (A,F)、fatty degeneration (B,G)、early necrosis(C,H)、fresh necrosis(D,I)、old necrosis(E, J)の組織像を示す。図 A-E は全骨頭像 (x20) で、図 F-J は各病期での鑑別点 (x100) である。fatty degeneration では骨髓内の脂肪変性が認められ (G)、early necrosis 期では骨髓内の単核球壊死と脂肪細胞内の浸出液と辺縁の途絶 (H)が fresh necrosis 期では骨細胞の壊死 (I) が、そして old necrosis 期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

(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。他の生化学データや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