

11.0J for Windows^R statistical software (SPSS Inc, Chicago, IL,USA)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研究支援センター動物実験室で行った。(登録番号：0906170768)

3. 研究結果

(体重と生化学所見)

コントロール群と比較してペントサン投与で体重の著明な減少はなく、順調に生育した。各群間での血圧の変動は認めなかった。ペントサン投与における血液凝固能(aPTT, PT)は、各群間に有意な差を認めなかった(図2)。また各群間の電解質は正常であった。ステロイド投与により有意な体重減少を認めたが、血液生化学検査では、ステロイド投与で総コレステロール値、HDL値、LDL値、トリグリセリド値がステロイド非投与に比べて有意に増加し($P<0.01$)、著明な高脂血症状態を呈していた。しかし、ステロイド投与に加えてペントサンを投与することにより、トリグリセリド値の上昇が有意($P<0.01$)に抑制されていた。プラバスタチンやステロイド投与によるラットの死亡は認めず、各群間で血圧の明らかな差異は認められなかった。プラバスタチン群では、コントロール群と比較して軽度の体重減少を認めたが、ステロイド群ほど体重減少は顕著ではなかった。

血液生化学データはステロイド群が高脂血症を呈し、T-chol, HDL, LDLとTG値が非ステロイド群と比べ有意($p<0.05$)に上昇していた。プラバスタチン+ステロイド群では、プラバスタチン投与で高脂血症を改善しなかった(表2)。

(骨頭壊死発生率)

ステロイド投与で著明に増加した骨頭壊死(91%)がペントサン群では41%と有意に減少した。今回は有意差を認める事ができなかったが、コントロール群の発生率(30%)と比較してもペントサン投与群の発生率(15%)は抑制されており、自然発症性の骨頭壊死の抑制にも有効である可能性が考えられた(表3-1)。

プラバスタチンを予防的に飲用させたプラバスタチン群ではステロイド投与により上昇した骨頭壊死発生率が91%から41%に有意($P<0.001$)に低下した。コントロール群と比較してもプラバスタチン群では発生率が30%から17%

に有意($P<0.001$)に減少しておりプラバスタチンがステロイド性骨頭壊死だけでなく自然発症性骨頭壊死に対しても有効である可能性が考えられた(表3-2)。

(脂肪細胞占拠率)

骨頭骨髓内の脂肪細胞占拠率はコントロール群(3%)、プラバスタチン群(6%)、プラバスタチン投与+ステロイド群(11%)、ステロイド群(33%)の順で占拠率が高くなっていた。コントロール群に比べステロイド群では脂肪細胞は著しく増加していた。プラバスタチン+ステロイド群をステロイド群と比較するとステロイド群の33%に対してプラバスタチン+ステロイド群が11%と3分の1に減少していた。(図3)。

(酸化ストレス)

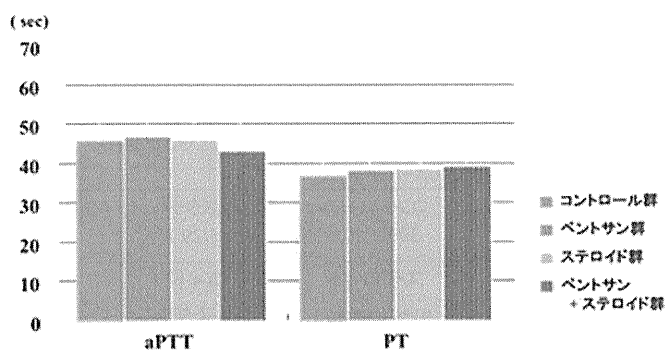
免疫組織染色で、ステロイド投与により抗8-OHdG、抗4-HNEともに骨髓脂肪細胞、骨髓細胞周囲が強く染色されていた(図4-1)。

ペントサン、プラバスタチン投与群では、ステロイド負荷により著増していた脂肪細胞壁、骨髓球の染色性が低下していた(図4-2)。

(3-point scale method)

ステロイド群(19%)と比べコントロール群(10%)では酸化ストレスは有意に($p<0.001$)低下しており、ステロイド群と比べプラバスタチン+ステロイド群(13%)では酸化ストレスは有意($p<0.001$)に低下し、プラバスタチンがステロイドにより増加した酸化ストレスを抑制していた(図5)。

図2 血液凝固能



ペントサン投与により各群間の凝固能(aPTT, PT)に有意差を認めなかった。

表 2: 体重と生化学所見

	Body Weight	T·chol	HDL	LDL	TG
単位	g	mg/ dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
コントロール	309.8 (23.5)	60.4 (10.0)	19.2 (3.8)	7.87 (2.9)	49.5 (21.6)
ステロイド	247.4 (26.5)	102.5 (26.2)	32.4 (8.6)	13.0 (8.9)	106.6 (48.6)
ペントサン	300.9 (23.5)	58.9 (9.1)	19.4 (2.8)	8.1 (1.9)	37.7 (18.6)
プラバスタチン	281.1 (26.2)	60.6 (14.0)	18.1 (3.9)	6.5 (1.6)	35.9 (15.6)
ペントサン +ステロイド	255.4 (30.6)	100.2 (32.3)	28.8 (8.4)	12.9 (5.5)	68.9 (46.5)
プラバスタチン +ステロイド	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を認めた。

ペントサン投与により高脂血症状態の改善を認めたが、プラバスタチン投与では高脂血症の改善効果は認めなかった。

表 3-1: 骨頭壊死発生率(ペントサン)

ステロイド	ペントサン		P値
	-	+	
-	コントロール 30% (17/56)	ペントサン 15% (10/71)	0.0261
+	ステロイド 91% (42/46)	ステロイド+ ペントサン 41% (29/71)	< 0.001
P値	< 0.0001	0.004	

(骨頭壊死数 / 大腿骨頭数)

コントロール群では 30%に骨頭壊死が発生し、ペントサン投与により 15%と発生率が低下した。ステロイド群の骨頭壊死発生率 91%に対し、ペントサン+ステロイド投与群では 41%と有意に減少した(P<0.001)。

表3-2: 骨頭壊死発生頻度(プラバスタチン)

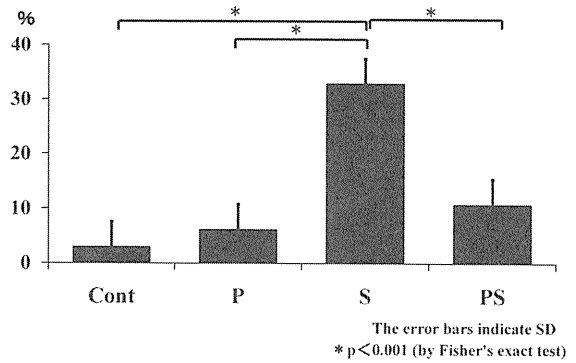
ステロイド	プラバスタチン		P値
	-	+	
-	コントロール 30% (17/56)	プラバスタチン 17% (5/29)	<0.001
+	ステロイド 91% (42/46)	ステロイド+ プラバスタチン 43%(13/30)	0.047
P値	< 0.001	0.004	

(骨頭壊死数 / 大腿骨頭数)

コントロール群では30%に骨頭壊死が発生して、プラバスタ

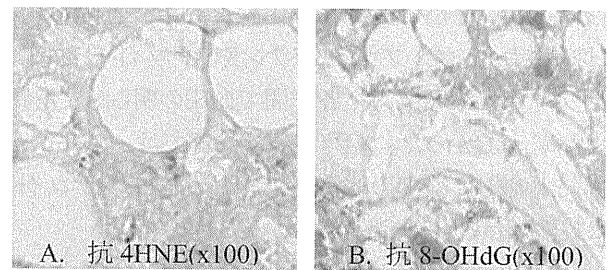
チン投与により17%と発生率が低下した。ステロイド群の骨頭壊死発生率91%に対し、プラバスタチン+ステロイド投与群では43%と減少した。

図 3 脂肪細胞占拠率



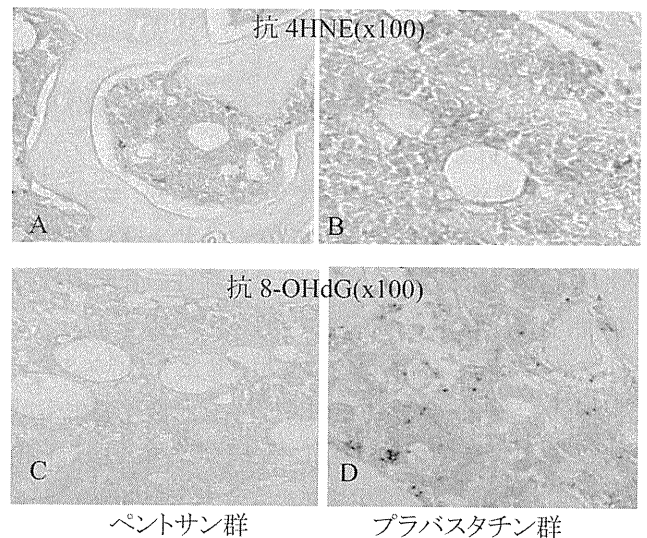
コントロール(Cont)群、ステロイド(S)群、プラバスタチン群(P)、およびプラバスタチン+ステロイド群(PS)の4群間で比較した。ステロイド投与により増加した脂肪細胞占拠率がプラバスタチン投与で有意(p < 0.001)に低下した。

図 4-1 免疫染色による酸化ストレスの評価



ステロイド投与により抗 8-OHdG、抗 4-HNE ともに強く染色されており酸化ストレスの顕著な増加を示した。

図 4-2 免疫染色による酸化ストレスの評価



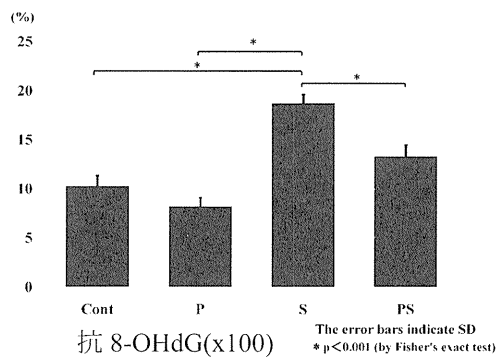
ペントサン群

プラバスタチン群

ペントサン群(A, C)、プラバスタチン群(B,D)

抗 4HNE 染色でペントサン群(A)、プラバスタチン群(B)ともに脂肪細胞、骨髄細胞周囲の染色性の低下傾向を認めた。抗 8-OHdG 染色ではペントサン群(C)の染色性の低下が強い印象であった。

図5 3-point scale method の結果



コントロール(Cont)群、ステロイド(S)群、プラバスタチン群(P)、およびプラバスタチン+ステロイド群(PS)の4群間で比較した。ステロイド投与により19%に上昇した酸化ストレスがプラバスタチン投与で13%に低下した。

4. 考察

大腿骨頭壊死の決定的な病因はいまだ明らかでない。多因子が関連すると推測され、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¹³⁾。これらの因子の改善が想定されるワーファリン、低分子ヘパリン、スタチンやビタミンEなどが動物やヒトに試験的に用いられている⁶⁾⁹⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁶⁾。今回の研究で使用したペントサンは分子量4000から6000ダルトンの五炭糖多糖体硫酸ナトリウム塩でヘパリン類似物質である。Peter Ghoshはペントサンが多面的に作用すると述べており、特にペントサンの循環動態の改善作用を強調している⁵⁾。スタチン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³⁾。Pritchettはスタチンを投与中のステロイド群284症例に関して、ステロイド性大腿骨頭壊死の発症率が減少していたと報告している¹⁶⁾。しかしこの研究は後ろ向き研究であり高脂血症と大腿骨頭壊死患者の因果関係は明瞭ではない。Jasińska等はスタチンの多面的作用がeNOSの発現上昇やnitric oxideの産生を増加させると報告している⁹⁾。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の発生率を70%から37%までに抑制したと報告しており、ピタバスタチン投与でLDL低下効果だけでなく、血栓形成減少、骨髄内血管

の脂肪塞栓減少が関係していると述べている¹⁵⁾。

以上より、ペントサンとプラバスタチンの多面的作用がステロイド性大腿骨頭壊死の予防・治療剤として有効であると考え、本研究に両薬剤を採用した。SHRSPにおける自然発生の骨頭壊死とステロイド投与により発生した骨頭壊死の発生機序は異なっていると考えられるが、ペントサンとプラバスタチン投与により骨頭壊死の発生率がともに低下したことは両薬剤の持つ多面的作用によるものが想定された。

今回、ペントサン群とペントサン+ステロイド群の2群に於いてステロイド群と比べて壊死の発生率が低下した。ペントサンの循環動態改善作用はaPTT、PT値に有意な変化が認められず、また投与開始から犠牲死にかけて出血傾向も認められていないことから骨頭壊死抑制の主要な機序とは考え難く、別の作用機序が関与している可能性が考えられた。

プラバスタチン群に於いても全身的な脂質低下作用が認められなかった。藤岡らはラットの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り、血中脂質レベルが上昇すると述べており、今回の生化学検査の結果を説明できる⁴⁾。ペントサンの循環動態改善作用もプラバスタチンの全身的な脂質低下作用も骨頭壊死抑制の中心的な作用機序としては考え難く、両薬剤に共通する別の作用機序が関係している可能性が示唆された。

ステロイド投与で骨頭内の酸化ストレスが増加し骨頭壊死の発生率が上昇すること、抗酸化剤の投与により骨頭壊死の発生率が低下する事を諸家が報告している。市堰らは家兎とラットを使用し、骨頭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⁸⁾。栗林らは家兎に抗酸化作用を有するビタミンEを投与し骨頭壊死を抑制したことを報告している¹⁰⁾。血管病変と酸化ストレスとの関連に関して、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¹⁴⁾¹⁸⁾。ペントサンもプラバスタチンも抗酸化作用を持ち、免疫組織学検査で骨頭内の酸化ストレスを有意に抑制したことが確認された。両薬剤の抗酸化作用が骨頭壊死抑制の中心的役割を果たしている可能性が示唆された。

今回の研究でステロイド投与により骨髄脂肪細胞の骨髄内占拠率が上昇する事を確認した。我々はステロイド投与で骨髄内の脂肪細胞が機能変化をおこし

PAI-1 分泌を増加させる事が、骨髄内の微少循環の障害を引き起こす事で骨頭壊死の原因となりえることを報告している⁷⁾。プラバスタチン群、プラバスタチン+ステロイド群では、全身的な高脂質状態の改善は認められなかったが骨頭骨髄内の脂肪細胞占拠率が明らかに抑制されておりプラバスタチンが骨髄内の脂質代謝を継続的に改善していた可能性が示唆された。Li らは骨髄内の脂肪細胞に関して、ロバスタチンは PPAR γ 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¹¹⁾。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すると報告しており²⁾、プラバスタチンの骨髄脂肪に対する抑制作用も骨頭壊死発生率の低下に関係している事が考えられた。

ペントサンとプラバスタチンによる酸化ストレスの抑制に関して両薬剤の異なる点は、プラバスタチン投与において、抗 4HNE 抗体ではペントサンと同様に脂肪細胞壁、骨髄球の染色性が著明に減弱していたが抗 8OHdG 抗体では抗 4HNE 抗体ほどは顕著ではなかった事である。このことから、ステロイド負荷による大腿骨頭壊死の原因に酸化ストレスが強く関与していることが考えられる一方、ペントサンとプラバスタチンではステロイドによる酸化ストレス抑制の機序が異なる可能性が考えられた。スタチン類に関して、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抑制しステロイド性骨頭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¹⁷⁾。今回の研究で、両薬剤は骨頭壊死発生率を同程度に低下させており細胞外での酸化ストレスの抑制が骨頭壊死抑制の主要な機序であるかもしれない。

骨頭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にあるかは今後の研究課題であるが、今回の研究で SHRSP のステロイド性大腿骨頭壊死に関して、ペントサンとプラバスタチン投与で壊死発生率を低下させ、酸化ストレスが抑制された事実が確認された。骨頭壊死発生に酸化ストレスが関与している事が考えられ、酸化ストレスの抑制に関するさらなる研究が期待される。

5. 結論

1. SHRSP ステロイド性大腿骨頭壊死モデルを用いてペントサンとプラバスタチンの骨頭壊死発生予防の

効果を検討した。

2. 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。
3. 酸化ストレスの抑制が骨頭壊死の発生率低下に関与する可能性が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshihiro Nozaki, Kenji Kumagai, Noriaki Miyata, Masami Niwa, Pravastatin reduces steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in SHRSP rats, *Acta Orthopaedica*, 2011. (in Press)
- 2) Noriaki Miyata, Kenji Kumagai, Makoto Osaki, Masakazu Murata, Masato Tomita, Akira Hozumi, Yoshihiro Nozaki, Masami Niwa, Pentosan Reduces Osteonecrosis of Femoral Head in SHRSP, *Clinical and Experimental Hypertension*, 2010; 32(8): 511-516.
- 3) 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. 大腿骨頭壊死と脂肪細胞. 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

- 1) Kenji Kumagai, Yoshihiro Nozaki, Masami Niwa, Pravastatin Reduces the Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in SHRSP Rats, The 14th International Symposium on SHR - Ecogenomic Models of Human Diseases, Sep.24th-25th, Montreal, Canada.
- 2) 宮田倫明, 熊谷謙治, 野崎義宏, 穂積晃, 尾崎誠, 進藤裕幸: SHRSP を用いたステロイド性大腿骨頭壊死の予防薬の検討~ペントサンとプラバスタチンの効果~, 第二回班会議, 2009.12.12

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) Ghosh P. The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulfate for its treatment. Semin Arthritis Rheum 1999; 28: 211-267.
- 6) 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.
- 7) Hozumi A, Osaki M, Sakamoto K, Goto H, Fukushima T, Baba H, Shindo H. Dexamethasone-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in human primary bone marrow adipocyte. Biomedical Research 2010; 31(5):281-286
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Li X, Cui Q, Kao C, Wang GJ, Balian G. Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPAR γ 2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. Bone 2003; 33: 652-9.
- 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) 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.
- 14) 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
- 15) 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.
- 16) Pritchett JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. Clin Orthop Relat Res 2001; 386: 173-8.
- 17) 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.
- 18) 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

特発性大腿骨頭壊死の発生に対する活性酸素種の関与

舘田 健児、名越 智、山下 敏彦 (札幌医科大学 整形外科学講座)

岡崎 俊一郎、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、その病態に活性酸素種(ROS)の関与が示唆される報告があるが、詳細な発生機序は未だ不明である。本研究の目的は、動物モデルを用いて大腿骨頭壊死における ROS の関与を明らかにすることとした。Wistar 系雄ラット(10 週齢)を用いて 24 時間間隔で lipopolysaccharide を 2 回、methylprednisolone(MPSL)を 3 回投与する群(LM 群)と、さらに抗酸化剤である N-acetyl cysteine(NAC)を MPSL と同時に投与する群(LMN 群)を作成した。処置後 24 時間、1 週及び 2 週で血液、大腿骨、肝臓を採取した。大腿骨については組織学的評価を行い、過酸化脂質の指標である malondialdehyde(MDA)と炎症系の転写制御因子である NF- κ B の活性を測定した。大腿骨頭壊死の発生率は LM 群で 24%、LMN 群で 59%であり、NAC を投与した群で大腿骨頭壊死発生率が高かった。肝臓中の MDA については、処置後 2 週で LMN 群の方が有意に低値を示した。NF- κ B 活性は処置後 24 時間で LMN 群の方が有意に低値であった。LPS 投与は NF- κ B を活性化させ、MPSL は NF- κ B の活性を抑制することが知られている。また、ROS は NF- κ B を活性化させることが報告されている。今回 NAC を MPSL と同時投与したことで NF- κ B 活性がより抑制されたことが、大腿骨頭壊死の発生率上昇に関与したことが示唆される。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ION)は、ステロイド療法やアルコール摂取が危険因子として知られているが、その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、ラットで大腿骨頭壊死が発生すること、そしてその病態に自然免疫異常が関与している可能性を報告した¹⁾。自然免疫系では、活性酸素種(ROS)が発生し、その ROS は転写制御因子である NF- κ B の活性化などを介して、細胞保護的な作用や炎症性サイトカインの産生などに関わることが、近年報告されている⁶⁻⁷⁾。一方、Ichiseki らは、ラットに酸化ストレス誘発剤を投与する事によって、大腿骨頭壊死が生じることを報告している²⁾。酸化ストレスは ROS が組織を酸化し、組織酸化の連鎖反応が生じることで、組織障害をもたらすもので、様々な疾患への関与が報告されており³⁻⁵⁾、大腿骨頭壊死症の病態に酸化ストレスが関与する可能性も示唆される。

以上により、LPS と MPSL 投与で発生するラット大腿骨頭壊死に対して抗酸化剤を処置すると、壊死は発生しないと考えた。そこでこの研究では、抗酸化剤を処置

して大腿骨頭壊死の発生に及ぼす影響を検討した。

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 LM 群とした。さらに生体内でグルタチオンに合成され ROS を消去する N-acetyl cysteine (NAC) 100 mg/kg を MPSL と同時に 3 回腹腔内投与する群を LMN 群とした。両群とも MPSL 最終投与より 24 時間、1 週及び 2 週で犠牲死とし、両大腿骨、肝臓、血液を採取した。

大腿骨近位部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。酸化ストレスの指標として、過酸化脂質の最終代謝産物である malondialdehyde(MDA)を血漿と肝臓で TABARS 法により測定した。また、炎症系の転写制御因子である NF- κ B の活性を肝臓で gel shift assay 法により測定し、さらに炎症性サイトカインである血漿 IL-1 β 濃度を multiplex analysis system (Luminex, Austin)にて測定した。

統計学的検討には Student's t-test を用い、p 値が

0.05 以下の場合は有意差ありとした。

3. 研究結果

大腿骨頭壊死の発生をLM群では24%、LMN群では59%に認め、NACを投与したLMN群で大腿骨頭壊死の発生率が高値を示した(表1)。図1にLMN群の組織像を示す。Epiphysisで広範にempty lacunaeを認め、骨髓細胞が消失している。

血漿MDA濃度は、有意差は認めないものの1週でLMN群の方が低値であった。肝臓では2週でLMN群の方が有意に低値を示した(図2)。NF-κBの活性は、24時間と1週でLMN群の方が低値を示し、24時間では、LM群に対して統計学的に有意差を認めた(図3A)。血漿IL-1β濃度は、24時間と1週でLMN群の方が低値を示し、1週ではLM群に対して統計学的に有意差を認めた(図3B)。

表1: 大腿骨頭壊死発生率

群	処置後時間			Total
	24 h	1w	2w	
LM群	2/4	2/10	0/3	4/17 = 24%
LMN群	3/4	3/7	4/7	10/17 = 59%

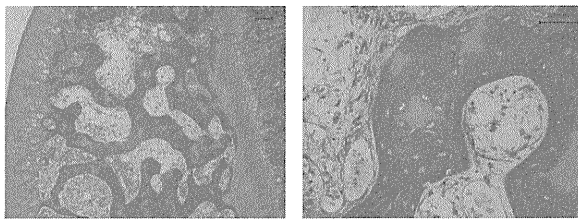


図1: 大腿骨頭の組織像 (H&E染色) LMN群

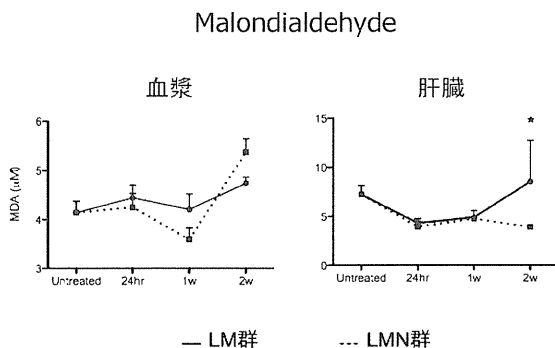


図2: 血漿及び肝臓MDA濃度

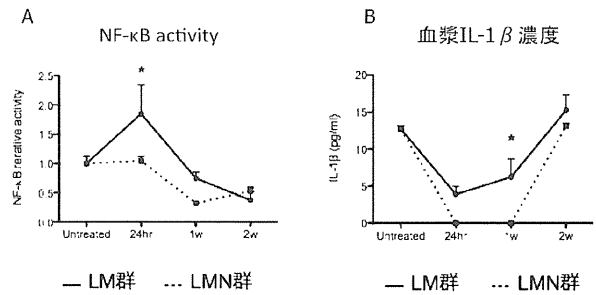


図3: (A) 肝臓NF-κB活性 (B)血漿IL-1β濃度

4. 考察

本研究では、NACを投与したLMN群で大腿骨頭壊死の発生率が上昇した。さらに、NAC投与後24時間ではNF-κB活性が低下し、NAC投与後1週及び2週ではMDA値が減少した。MPSLはグルココルチコイド受容体と結合して複合体を形成し、核内でNF-κBの転写活性を抑制することで、抗炎症作用を発揮する⁸⁾。また、ROSはNF-κBの活性化に関与するが、抗酸化剤であるNACはNF-κBの活性を抑制すると報告されている⁹⁻¹⁰⁾。今回の結果から、MPSLとNACを同時投与することによって、薬剤投与後早期よりNF-κB活性がより強力に抑制されたことが大腿骨頭壊死の発生率上昇に関与した可能性が示唆された。

KuribayashiらとMikamiらは、野兎骨壊死モデルに対して抗酸化剤であるビタミンEを継続的に投与したところ、骨壊死発生率が減少したため、抗酸化剤がステロイド性大腿骨頭壊死症の発生予防に使用できる可能性があることを報告している¹¹⁻¹²⁾。しかし、本研究ではNACの投与により大腿骨頭壊死の発生率が上昇し、逆の結果となった。実験系の相違点としては、動物モデルが異なること、抗酸化剤としてNACを使用したこと、そして、NACの投与期間をMPSLと同時の3日間のみとしたことが挙げられる。ビタミンEは主に細胞膜上での脂質酸化連鎖反応を止めることで、抗酸化作用を発揮すると言われている¹³⁾。一方NACは細胞内のグルタチオン濃度を上昇させ、細胞内で発生したROSを消去すると報告されている¹⁴⁾。こういった抗酸化作用の作用機序の相違が大腿骨頭壊死の発生に影響した可能性が示唆された。

5. 結論

ステロイド性ラット大腿骨頭壊死モデルにNACを投与することにより、大腿骨頭壊死の発生率が24%から59%に上昇した。NACの投与により24時間でNF-κBの活性が減少し、1週及び2週でMDAが減少した。大腿骨頭壊死の発生率はNF-κBの活性がより抑制され

たことで上昇した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
 - 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：
ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生に対する活性酸素種の関与、第 38 回日本股関節学会。鹿児島、2011.10.7-8

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) 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.
- 2) Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest* 2003; 111: 769-78.
- 3) D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 813-24.
- 4) Ichiseki T, Kaneuji Y, Matsumoto T et al. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology* 2006; 45: 287-90.
- 5) Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53: S26-36.
- 6) Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 134-47.
- 7) Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Barja G et al. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol B* 1998; 168: 149-58.
- 8) De Bosscher K. The Interplay between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor- κ B or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Repression. *Endocrine Reviews* 2003; 24: 488-522.
- 9) Asehnoune K, Strassheim D, Abraham E et al. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF- κ B. *J Immunol* 2004; 172: 2522-9.
- 10) Oka S, Kamata H, Hirata H et al. N-acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B kinases. *FEBS Lett* 2000; 472: 196-202.
- 11) Kuribayashi M, Fujioka M, Kubo T et al. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Acta Orthop* 2010; 81: 154-60.
- 12) Mikami T, Ichiseki T, Matsumoto T et al. Prevention of steroid-induced osteonecrosis by intravenous administration of vitamin E in a rabbit model. *J Orthop Sci* 2010; 15: 674-7.
- 13) Packer L, Weber SU, Rimbach G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr* 2001; 131: 369S-73S.
- 14) De Flora S, Izzotti A, Balansky RM et al. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 2001; 22: 999-1013.

大腿骨頭壊死症の発生における荷重の影響

岡崎俊一郎、松本博志
名越智、舘田健児、山下敏彦

(札幌医科大学 法医学)
(札幌医科大学 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症はなんらかの原因による阻血によって発生すると考えられている。歩行時の股関節への負荷は体重の3倍と報告されているが、大腿骨頭壊死症の発生と荷重の関係は明らかとなっていない。今回、ラットにおいて尻尾懸垂手技を用いて検討した結果、大腿骨頭壊死症の発生に荷重の影響がないことが明らかとなった。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症の発生機序はいまだ明らかとなっていないが、直接的もしくは間接的な阻血により発生すると考えられている。股関節は荷重関節であり、歩行時にかかる負荷は体重の3倍とも報告され¹、特発性大腿骨頭壊死症の発生へのなんらかの関与が示唆される。しかしながら、特発性大腿骨頭壊死症の発生に対する荷重の影響に関する報告は乏しい。そこで、本研究の目的は大腿骨頭壊死症発生における荷重の影響を明らかにすることである。

2. 研究方法

Wistar系雄性ラットを荷重群と非荷重群に分け、非荷重群はWronskiらの報告²を一部改変し尻尾懸垂を行い、後肢を完全免荷とした。両群ともに既報に従い24時間間隔でLPS 1.0mg/kgを2回静注したのち、メチルプレトニソロン 20mg/kgを3回筋注し、大腿骨頭壊死症を発生させた³。非荷重群は初回LPS注射時より尻尾懸垂を行った。最終メチルプレトニソロン投与後3週後に屠殺し、上腕骨および大腿骨を採取した。固定・脱灰後に組織染色を行い、上腕骨頭壊死および大腿骨頭壊死の発生頻度の比較を行った。

3. 研究結果

荷重群では7/11匹に大腿骨頭壊死の発生を認め、非荷重群においても6/11匹の大腿骨頭壊死の発生を認めた(図1)。両群間に統計学的な有意差を認めなかった($p=0.66$, Chi-square test)。一方、上腕骨頭においては、両群ともに上腕骨頭壊死の発生

を認めなかった。大腿骨頭の組織像は、荷重群および非荷重群ともに大腿骨頭の広範にわたり骨梁骨細胞の核の空胞化および、その周囲の骨髄壊死を認め、骨壊死像を呈していた(図2)。一方、上腕骨頭では、両群ともに骨壊死像を認めず、正常像を呈していた(図3)。

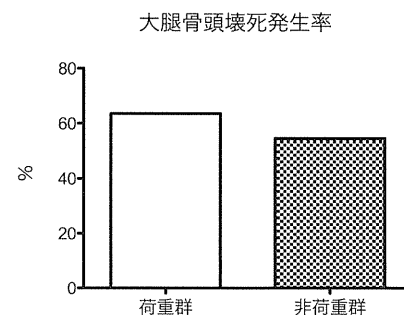


図1 大腿骨頭壊死の発生率
両群間に統計学的有意差を認めない。

4. 考察

本研究の結果から、ラットモデルでは特発性大腿骨頭壊死症の発生に荷重の影響がないことが明らかとなった。また、ペルテス病モデルと考えられるSHRラットでは、起立による股関節への負荷の増強によって大腿骨頭壊死症の発生率が上昇した報告されている⁴。このことから、ペルテス病と特発性大腿骨頭壊死症の発生機序は異なることが示唆された。

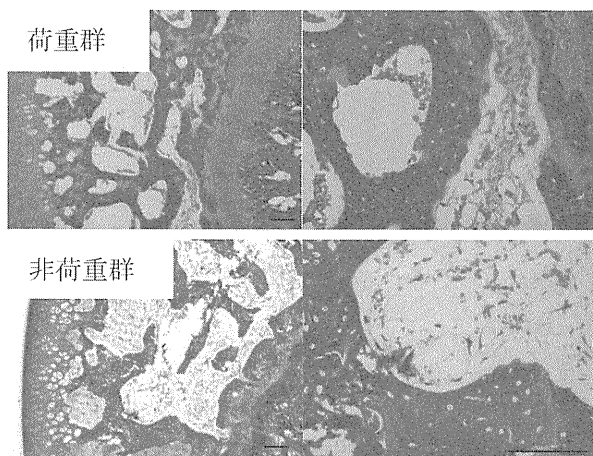


図2 大腿骨頭組織像 荷重群および非荷重群
H&E染色 スケールバー100 μ m
両群共に大腿骨頭の広範にわたり empty lacunae および骨髄壊死を認める。

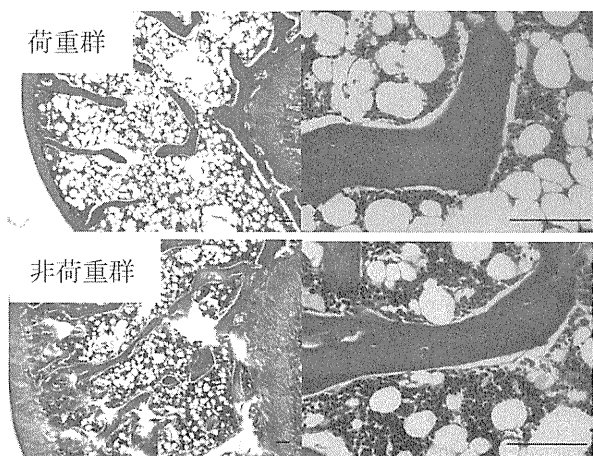


図3 上腕骨頭組織像 荷重群および非荷重群
H&E染色 スケールバー100 μ m
両群共に骨壊死像は認めず、正常像を示す。

5. 結論

ラットでは大腿骨頭壊死症の発生に荷重の影響がないことが明らかとなり、今後の発生機序解明にラットモデルは有用と考えられた。

6. 研究発表

1. 論文発表
投稿中
2. 学会発表
 - 1) 岡崎俊一郎、名越 智、舘田健児、片田竜一、水尾圭祐、渡邊 智、山下敏彦、松本博志:ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生における荷重の影響、第38回日本股関節学会.鹿児島、2011.10.7

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) Bergmann G, Rohlmann A, Graichen F. In vivo measurement of hip joint stress. 1. Physical therapy. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*. Nov-Dec 1989;127(6):672-679.
- 2) Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. *Bone*. May 1998;22(5 Suppl):83S-88S.
- 3) Okazaki S, Nishitani Y, Nagoya S, Kaya M, Yamashita T, Matsumoto H. Femoral head osteonecrosis can be caused by disruption of the systemic immune response via the toll-like receptor 4 signalling pathway. *Rheumatology*. 2009;48(3):227-232.
- 4) Mihara K, Hirano T. Standing is a causative factor in osteonecrosis of the femoral head in growing rats. *J Pediatr Orthop*. Sep-Oct 1998;18(5):665-669.

大腿骨頭壊死症の発生における自然免疫機構の関与

岡崎俊一郎、松本博志
名越智、舘田健児、山下敏彦

(札幌医科大学 法医学)
(札幌医科大学 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症の発生機序に自然免疫機構が関与していることを指摘してきた。今回、自然免疫機構の関与を明らかにするため、TLR4 のリガンドの他、TLR7 または TLR9 のリガンド並びにメチルプレドニゾロンをラットに単回投与したところ、いずれのリガンド投与においても、大腿骨頭壊死の発生を認めた。メチルプレドニゾロンの単回投与では、大腿骨頭壊死の発生を認めなかったことから、特発性大腿骨頭壊死症の発生機序には TLR を介した自然免疫機構が重要な役割を果たしていると考えられた。

1. 研究目的

我々は toll-like receptor (TLR) 4 のリガンドである LPS を 2 回投与後にメチルプレドニゾロンを 3 回投与するラット大腿骨頭壊死症モデルを報告し、大腿骨頭壊死症の発生機序に自然免疫機構、TLR4 signaling が関与することを指摘してきた¹⁾。今回、自然免疫機構の関与を明らかにするため、TLR4、TLR7 または TLR9 のリガンドならびにメチルプレドニゾロンの単回投与を行い大腿骨頭壊死症の発生の有無を確認した。

2. 研究方法

Wistar 系雄性ラット (n=24) を 4 群に分け、薬剤の投与を行った。各群の詳細を以下に示す。

SM 群: 生理食塩水 1.0 ml/kg 皮下注射、24 時間後にメチルプレドニゾロン 20 mg/kg 筋肉内注射。

4M 群: TLR4 のリガンドである LPS 1.0 mg/kg 静脈注射、24 時間後にメチルプレドニゾロン 20 mg/kg 筋肉内注射。

7M 群: TLR7 のリガンドである抗ウイルス薬のイミキモド 30 mg/kg 皮下注射、24 時間後にメチルプレドニゾロン 20 mg/kg 筋肉内注射。

9M 群: TLR9 のリガンドであるペプチド DNA である CpG-C 0.5 mg/kg 皮下注射、24 時間後にメチルプレドニゾロン 20 mg/kg 筋肉内注射。

各群ともにメチルプレドニゾロン投与後 2 週後に屠殺し、大腿骨を採取した。固定・脱灰後に組織染色を行い、大腿骨頭壊死の発生頻度の比較を行った。

3. 研究結果

ステロイド単回投与群である SM 群では大腿骨頭壊死症の発生を認めなかった。一方、4M 群および 7M 群ではそれぞれ 50% に大腿骨頭壊死の発生を認め、SM 群に比較し統計学的な有意差を認めた ($p < 0.05$, Chi-square test)。また、9M 群では有意差は認めないものの 33% に大腿骨頭壊死の発生を認めた。組織学的には、4M 群、7M 群および 9M 群のいずれも大腿骨頭の広範に骨梁骨細胞の核の空胞化ならびに周囲の骨髄壊死像を認め、骨壊死像を呈していた。一方、SM 群では骨壊死像を認めず、正常像を示した (図 1、2)。

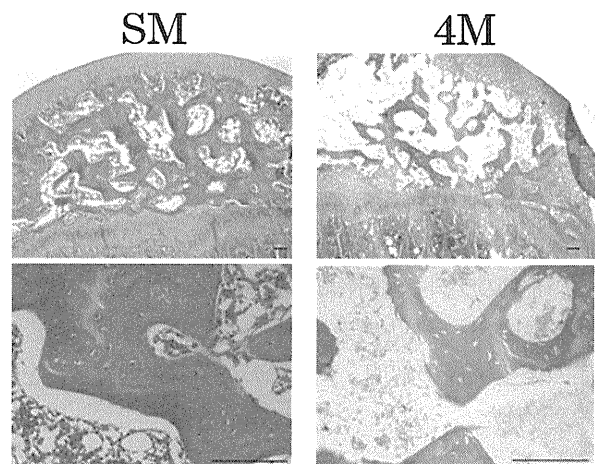


図 1 大腿骨頭組織像 SM 群および 4M 群

H&E 染色 スケールバー 100 μ m

SM 群では骨梁骨細胞、骨髄共に正常像を示す。4M 群では大腿骨頭の広範に empty lacunae および骨髄

壊死を認める。

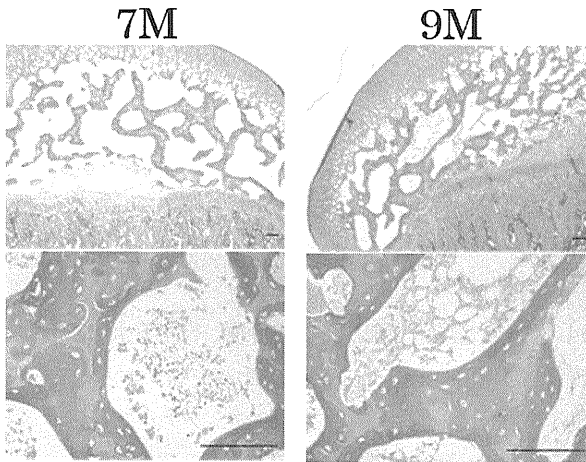


図2 大腿骨頭組織像 7M 群および9M 群
H&E染色 スケールバー100 μ m
両群共に4M 群と同様に大腿骨頭の広範に empty lacunae および骨髓壊死像を示す。

4. 考察

特発性大腿骨頭壊死症の基礎疾患として、SLE などの自己免疫疾患、喘息、SARS などが報告されている。一方、SLE や自己免疫疾患の病態に TLR7 や TLR9 などが関与することが報告され²⁾、喘息では TLR4 の関与が報告されている³⁾。さらに、SARS ウィルスは ssRNA ウィルスであることから、その病態に ssRNA をリガンドの一つとする TLR7 が関与していると考えられる⁴⁾。従って、自然免疫異常を伴う疾患に対し、ステロイドを投与することにより特発性大腿骨頭壊死症が発生していると考えられる。

本研究では、生理食塩水およびステロイドを投与した SM 群では大腿骨頭壊死の発生を認めなかったが、いずれかの TLR のリガンドならびにステロイドを投与した群では大腿骨頭壊死の発生を認めた。この結果から、大腿骨頭壊死症の発生には TLR を介した自然免疫機構が関与していると考えられた。

本研究のラット大腿骨頭壊死症モデルはヒトの病態を再現したモデルと考えられ、特発性大腿骨頭壊死症の発生機序の解明、予防法の確立に重要であると考えられた。

5. 結論

ラットを用いた動物実験では、ステロイド単独投与では大腿骨頭壊死の発生は認めず、TLR のリガンドおよびステロイド投与によってその発生を認めた。以上

の結果から、特発性大腿骨頭壊死症の発生機序には TLR を介した自然免疫機構が重要な役割を果たしていると考えられた。

6. 研究発表

1. 論文発表
投稿中
2. 学会発表
岡崎俊一郎、名越 智、館田健児、片田竜一、水尾圭祐、渡邊 智、山下敏彦、松本博志：ステロイド性大腿骨頭壊死症発生における自然免疫シグナリングの役割、第 39 回日本臨床免疫学会・東京、2011.9.15

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) Okazaki S, Nishitani Y, Nagoya S, Kaya M, Yamashita T, Matsumoto H. Femoral head osteonecrosis can be caused by disruption of the systemic immune response via the toll-like receptor 4 signalling pathway. *Rheumatology*. 2009;48(3):227-232.
- 2) Christensen SR, Shlomchik MJ. Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2007;19(1):11-23.
- 3) Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med*. 2009;15(4):410-416.
- 4) Cervantes-Barragan L, Züst R, Weber F, Spiegel M, Lang KS, Akira S, Thiel V, Ludwig B. Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood*. 2007;109(3):1131-1137

大腿骨頭壊死症の発生におけるステロイドの役割

岡崎俊一郎、松本博志
名越智、舘田健児、山下敏彦

(札幌医科大学 法医学)
(札幌医科大学 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症の発生機序に対するステロイドの作用は明らかとなっていない。今回、より詳細な発生機序を明らかにするため、大腿骨頭壊死症の発生におけるステロイドの役割を検討した。その結果、TLRのリガンド投与による転写制御因子NF- κ B、IRF7の活性化の後、ステロイド投与によってNF- κ B活性を抑制された結果、大腿骨頭壊死症が発生したと考えられた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症の発生機序に toll-like receptor(TLR)を介した自然免疫機構が関与することを報告した。しかしながら、大腿骨頭壊死症の発生におけるステロイドの役割は明らかとなっていない。今回、より詳細な発生機序を明らかにするため、大腿骨頭壊死症の発生におけるステロイドの役割を検討した。

2. 研究方法

Wistar系雄性ラット(n=96)を4群に分け、薬剤の投与を行った。各群の詳細を以下に示す。

4S群:TLR4のリガンドであるLPS 1.0 mg/kg 静脈注射、24時間後に生理食塩水 1.0ml/kg 筋肉内注射。

4M群:LPS 1.0 mg/kg 静脈注射、24時間後にメチルプレドニゾロン 20 mg/kg 筋肉内注射。

7S群:TLR7のリガンドである抗ウイルス薬のイミキモド 30 mg/kg 皮下注射、24時間後に生理食塩水 1.0ml/kg 筋肉内注射。

7M群:イミキモド 30 mg/kg 皮下注射、24時間後にメチルプレドニゾロン 20 mg/kg 筋肉内注射。

各群ともに最終注射後1、3または7日後に屠殺し、血液、大腿骨および肝臓を採取した。検討項目は、大腿骨組織像、血液生化学検査 (AST、ALT、triglyceride (TG)、total cholesterol (TC)、high-density lipoprotein cholesterol (HDL))、EMSA法にて肝臓中転写制御因子 (NF- κ B、IRF7) 活性、ELISA法にて血中炎症性サイトカイン (IL-1 α 、IL-1 β 、TNF α 、IFN α) 濃度の測定を行った。

3. 研究結果

大腿骨頭壊死の発生頻度を表1に示す。

表1 大腿骨頭壊死症の発生頻度

	4S	4M	7S	7M
1 day	1/6	2/10	0/6	0/10
3 day	1/6	3/10	1/6	3/10
7 day	1/6	5/10	1/6	4/10

4M群ではステロイド投与翌日から、7M群ではステロイド投与後3日から大腿骨頭壊死を認めた。以上のことから、ラットでは大腿骨頭壊死症はステロイド投与後3日以内に発生すると考えられた。また、TLRのリガンド単独投与群である4S群、7S群においても、大腿骨頭壊死の発生を11~17%に認めた。組織学的には、いずれの群においても大腿骨頭の広範に骨梁骨細胞の核の空胞化ならびに周囲の骨髄壊死像を認め、骨壊死像を呈していた。

血液生化学検査では、肝機能の指標であるASTおよびALT値はステロイド投与による明らかな差を認めなかった(図1)。一方で、脂質の指標であるTGおよびTC値はステロイド投与により、高値を示す傾向を示した。また、HDL値はステロイド投与1日目より有意に高値を示した(図1)。

転写制御因子NF- κ B活性は、4S群、7S群ではTLRリガンド投与によって活性化が認められたが、ステロイド投与後1日で4M群、7M群ともに4S群、7S群と比較し有意に活性が低下していた。一方で、IRF7活性はいずれの群においてもTLRリガンド投与によって活性化が認められたが、4M群、7M群と

もに 4S 群、7S 群と比較し、ステロイド投与による活性の変化を認めなかった(図2)。

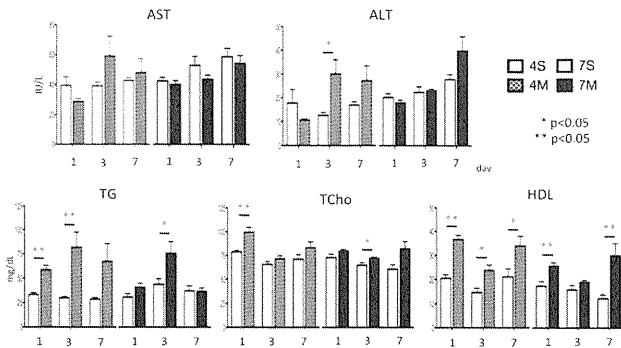


図1 血液生化学検査値 AST、ALT、TG、TC、HDL

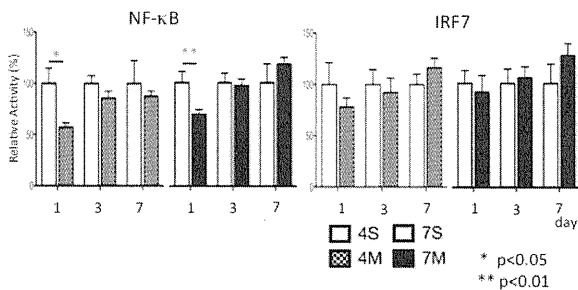
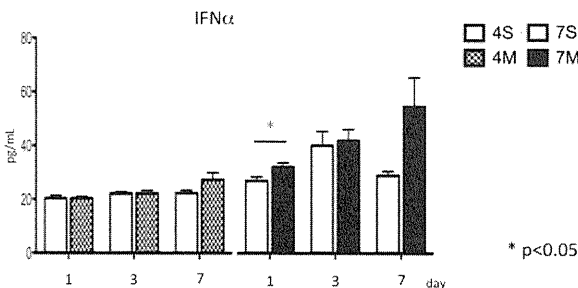


図2 転写制御因子活性 EMSA 法

・・・が制御する IFN α 濃度は 4M 群では 4S 群と比較し、ステロイド投与による差を認めなかったが、7M 群では 7S 群と比較し、ステロイド投与によって産生が増加する傾向を認めた(図3)。また、未処置ラット血中 IFN α 濃度(n=8, 14.1 \pm 2.1 pg/mL)との比較では、生理食塩水投与後 7 日の 4S 群および 7S 群が有意に高値を示したことから(22.3 \pm 1.1 pg/mL、28.9 \pm 1.6 pg/mL)、TLR のリガンドである LPS やイミキモド投与によって、IFN α 産生が亢進したと考えられた。その一方で、転写制御因子 NF- κ B が制御するサイトカイン(IL-1 α 、IL-1 β 、TNF α)濃度は検出限界以下であった。



4. 考察

本研究では、ラットの大腿骨頭壊死症がステロイド投与後 3 日以内に発生していたことから、ステロイド投与後早い時期での変化が大腿骨頭壊死症の発生に重要であることが示唆された。本研究の結果からは、TLR4 のリガンドである LPS もしくは TLR7 のリガンドであるイミキモド投与による転写制御因子 NF- κ B、IRF7 の活性化の後、ステロイド投与によって NF- κ B 活性を抑制した結果、大腿骨頭壊死症が発生したと考えられた。

また、TLR のリガンド単独投与群である 4S 群、7S 群においても大腿骨頭壊死の発生を認めた。喫煙は特発性大腿骨頭壊死症の危険因子としても報告され 1)、煙の構成成分にはエンドトキシン(LPS)が含まれている 2)。さらに、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の病態に TLR の関与が報告されている 3)。また、近年、HIV 感染者での大腿骨頭壊死症の発生報告がなされている 4)。HIV ウイルスは ssRNA ウイルスであり、ssRNA は TLR7 のリガンドの一つと報告され、HIV 感染以外の大腿骨頭壊死の危険因子のない症例での大腿骨頭壊死発生の報告がなされている 5)。以上のことから、狭義の特発性大腿骨頭壊死症の原因の一つに TLR を介した自然免疫機構が関与し、グラム陰性菌感染、喫煙、ウイルス感染などが背景疾患として挙げられることが示唆された。

5. 結論

ラットを用いた動物実験では、大腿骨頭壊死症は TLR のリガンド投与による NF- κ B および IRF7 の活性化の後、ステロイド投与によって NF- κ B 活性が抑制された結果として発生していた。さらに、TLR のリガンド投与のみでも少数の大腿骨頭壊死症が発生していたことから、狭義の特発性大腿骨頭壊死症の発生機序に自然免疫機構が中心的な役割を果たしていることが強く示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

岡崎俊一郎、名越 智、舘田健児、片田竜一、水尾圭祐、渡邊 智、山下敏彦、松本博志: ステロイド性大腿骨頭壊死症発生における自

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) Matsuo K, Hirohata T, Sugioka Y, Ikeda M, Fukuda A. Influence of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status on idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res. 1988;234:115-23.
- 2) Nishioka M, Ogawa E, Kinose D, Haruna A, Ohara T, Ito I, Hoshino Y, Ito Y, Matsumoto H, Niimi A, Mio T, Chin K, Hirai T, Muro S, Mishima M. Lipopolysaccharide induced connective tissue growth factor gene expression in human bronchial epithelial cells. Respirology. 2010 May;15(4):669-76.
- 3) Pace E, Giarratano A, Ferraro M, Bruno A, Siena L, Mangione S, Johnson M, Gjomarkaj M. TLR4 upregulation underpins airway neutrophilia in smokers with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure. Hum Immunol. 2011 Jan;72(1):54-62.
- 4) Lamas JL, Ocampo A, Martínez-Vázquez C, Miralles C, Longueira R, Arias M, Sopeña B, Rivera A, Portela D. Asymptomatic osteonecrosis of the hip in HIV-infected patients. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010 Mar;28(3):150-5.
- 5) Ries MD, Barcohana B, Davidson A, Jergesen HE, Paiement GD. Association between human immunodeficiency virus and osteonecrosis of the femoral head. J Arthroplasty. 2002;17:135-9.

高磁場 MRI 装置を用いたステロイド骨壊死モデルの経時的画像所見の検討

林 成樹、藤岡幹浩、上島圭一郎、生駒和也、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)

家兎ステロイド性骨壊死モデルにおいて、これまでステロイド投与後早期に骨内環境の変化をとらえることは困難であった。今回、ステロイド投与後早期の病態を解明するために、高磁場 MR 装置を用いて家兎ステロイド性骨壊死モデルを *in vivo* で観察する研究を開始した。ステロイド投与後 25 日目の大腿骨骨幹部に単純 MRI で信号変化を認めた。組織学的に同部位に骨髄壊死を確認した。また、造影 MRI と T2* dynamic MRI の撮像も開始した。*in vivo* で骨壊死にかかわる早期の変化を確認することは、病態解明だけでなく骨壊死の予防法確立に役立つと考える。

1. 研究目的

これまでわれわれは臨床において腎移植後 6 週から 12 週で T1 強調画像で band 像が確認できると報告したが、band 像以前の骨内変化は画像変化では確認できていない¹⁾。

実験的研究において、Ichiseki らは家兎にステロイドを投与すると早期に骨内に酸化障害が起こると報告しており²⁾、Miyanishi らは、ステロイド投与後 14 日目に骨髄内の血流変化が生じると述べている³⁾。しかし、Takao らは家兎ステロイド骨壊死モデルの MRI で骨髄内の変化や血流変化を検出できたのはステロイド投与 9 週後であったと報告しており、骨壊死にいたる骨髄内変化を MRI で早期にとらえることはできていない⁴⁾。これはステロイド投与後に家兎の大腿骨近位部に生じる血流変化が小さいことが一因と考えられている。また、これまでステロイド性大腿骨頭壊死症を実験動物モデルで *in vivo* で経時的に観察した研究は少ない。今回われわれの施設に導入された高磁場 MR 装置では高解像度で経時的に撮像できるため、比較的小さい家兎の股関節でも骨壊死に関わる微小な骨・骨髄内変化を経時的にとらえることができる可能性があると考えた。

本研究の目的は、ステロイド性骨壊死における早期の病態を解明することであり、特にステロイド投与後に起こる早期の骨髄内の変化を MRI でとらえることである。

2. 研究方法

28 週齢以上の雄性日本白色家兎 8 羽にメチルプレドニゾロン(methylprednisolone: MPSL) 20mg/kg を一回右殿筋内注射し、骨壊死モデルを作成した。

MR 装置は Agilent 社製動物用横置き型 MRI system、7.04T、ボア径 310mm を使用した(図 1)。家兎をイソフルラン吸入麻酔下に腹臥位とし、股関節・膝関節を軽度屈曲位で MR 装置に固定した。

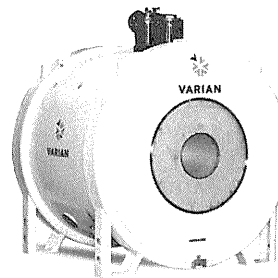


図 1

①非造影での評価

まず PD 強調画像(proton density weighted image: PDWI)(TR/TE=2000/15ms)、T1 強調画像(T1 weighted image: T1WI)(TR/TE=350/15ms)、脂肪抑制 T1 強調画像(fat suppression T1WI: FST1WI)(TR/TE=350/15ms)と T2 強調画像(TR/TE=2500/60ms)を撮像した。

②動脈相の血流評価

次に、動脈相の血流を評価するために 0.4mmol/kg の MRI 用造影剤(Gadolinium

Diethylenetriaminepenta-acetic Acid: Gd-DTPA)を外側耳静脈から急速投与し、4秒に1回撮像可能なT2*強調画像(TR/TE=30/5ms)を同一スライスで30回連続で撮像した。大腿骨近位部の好発部位に region of interest(以下 ROI)を設定した(図2)。その中の信号強度を計測し、time-signal intensity curve を作成した。



図2 T2*強調画像: 破線に囲まれた領域を ROI として設定した。

③定常状態の造影効果の評価

最後に T1 強調画像(以下 Gd-T1WI)、脂肪抑制 T1 強調画像(以下 Gd-FST1WI)を撮像した。NMR system(Agilent 社製 VNMRJ[®])を用いて Gd-T1WI の信号強度から T1WI の信号強度を subtraction して得られた信号強度を画像化し、造影効果の有無を判定した。同様の操作を Gd-FST1WI と FST1WI にも行った。

3. 研究結果

①非造影での評価

MPSL 投与後 25 日目に撮像した単純 MRI で大腿骨骨幹部にわずかではあるが、PDWI および T1WI で低信号領域を示す部位を認めた(図3)。

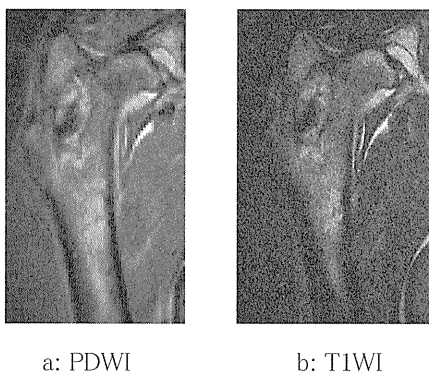


図3

同部位の組織標本では弱拡大像で骨髓細胞の減少している領域を認め、その部位の強拡大像で骨髓内脂

肪細胞の核消失と好酸性デブリスの蓄積を認め、組織学的に骨髓壊死と判定した(図4)。

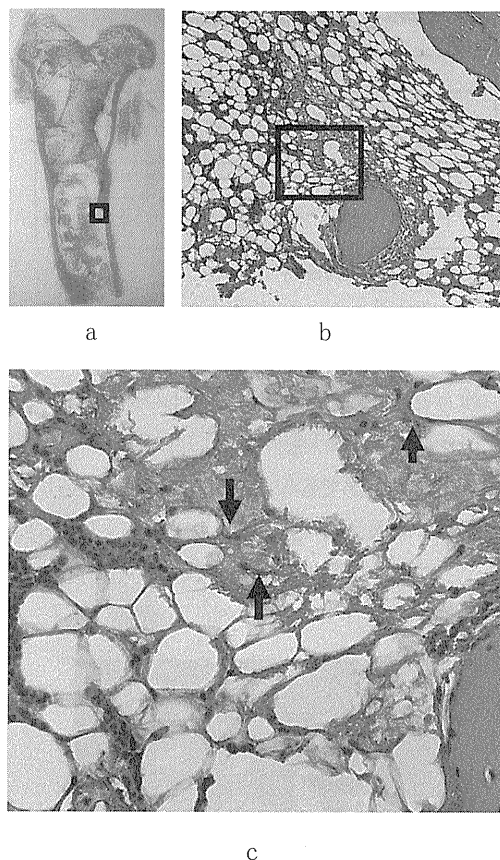


図4a: 組織標本マクロ像。四角で囲まれた領域が PDWI と T1WI の信号変化があった領域と比較的一致している部位である。
b: 弱拡大像。骨髓細胞数の減少した領域がある。
c: 強拡大像。骨髓内脂肪細胞の核消失と骨髓細胞の壊死を認めた(↑)。

②動脈相の血流評価

MPSL 投与前の T2* dynamic MRI から作成した time-signal intensity curve では造影剤投与後 30 秒間で徐々に信号強度が増強し、その後はやや不安定な状態で定常状態になっていた。MPSL 投与後 3 日目の家兎で作成した time-signal intensity curve では造影剤投与後 30 秒間は大きな振幅で造影効果の変動があったが、その後は変化が小さくなった(図5)。

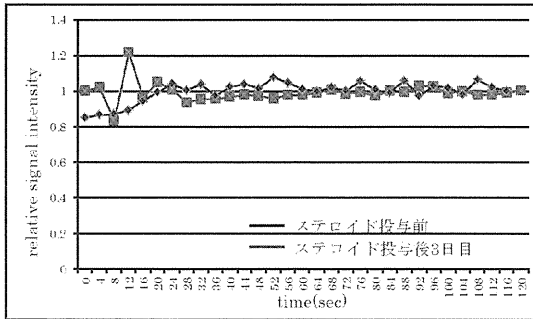


図 5 time-signal intensity curve

③定常状態の造影効果の評価

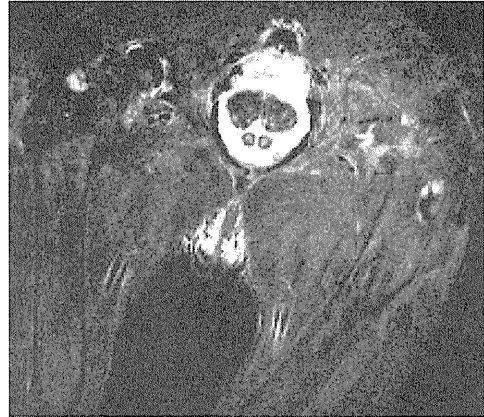
MPSL 投与後 3 日目および 11 日目の造影 MRI では T1WI と FST1WI とともに大腿骨近位部に明らかな造影効果を示す部位は確認できなかった。18 日目の造影 MRI で左大腿骨の骨壊死好発部位に T1WI および FST1WI でわずかではあるが環状に造影されているように見える領域があった(図 6)。



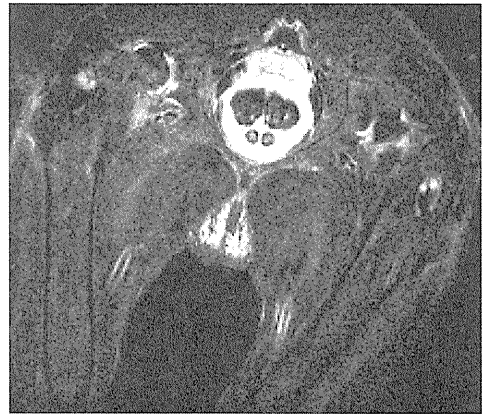
a



b



c



d

- 図 6a: MPSL 投与後 3 日目の Gd-T1WI から T1WI を subtraction した画像。骨壊死好発部位に造影効果を認めなかった。
- b: MPSL 投与後 3 日目の Gd-FST1WI から FST1WI を subtraction した画像。明らかな造影効果を呈している領域はなかった。
- c: MPSL 投与後 18 日目の Gd-FST1WI から FST1WI を subtraction した画像。左大腿骨の骨壊死好発部位に微弱ではあるが造影効果を認めた
- d: MPSL 投与後 18 日目の Gd-FST1WI から FST1WI を subtraction した画像。T1WI で合成した画像よりもさらに軽度ではあるが同部位に造影効果を認めた。

4. 考察

PDWI と T1WI における低信号領域に相当する部位で組織学的に骨髓内脂肪細胞壊死を含む骨髓壊死を確認した。単純 MRI で骨壊死をとらえた可能性があると考え。今後も継続して MRI と組織学的所見との対比

を継続していく必要があると考える。

T2* dynamic MRI は骨壊死において早期の微小血流障害、動脈相の血行動態を評価することに優れていると報告されている⁵⁾。T2* dynamic MRI は T2*強調画像を用いて行うが、撮像時間が短いという長所と同時に signal to noise 比が低く画像が粗いという短所を併せ持つ。今回の結果では、造影剤投与後 30 秒間では信号強度の変化を認めたが、その後は信号強度の変化はそれほど大きくなかった。造影剤投与後 30 秒間をより詳細に評価する方法の確立が必要であると考えた。また、MPSL 投与後早期に起こる酸化障害の影響を骨髄内でとらえることを目標として、ステロイド投与後早期(6 時間後、12 時間後)に dynamic MRI を行い検討していく予定である。

MPSL 投与後 18 日目の家兎で T1WI の subtraction した画像においてわずかではあるが確認できた造影効果は壊死領域部の血流低下と壊死領域周囲にできた血管新生による新しい血流による変化ではないかと考えた。今後は組織学的所見と対比させるとともに、個体数を増やしてこの造影効果の意義を検討していく必要があると考えた。

5. 結論

1. 高磁場 MR 装置を用いてステロイド投与後家兎を経時的に観察する研究を開始した。
2. ステロイド投与後 25 日目の個体で大腿骨内に信号変化を認め、同部位に組織学的に骨髄壊死を確認した。
3. 今後は組織学的所見の検証を行うとともに dynamic MRI で早期の骨内の変化を検討する予定である。

6. 研究発表

1. 著書
なし
2. 研究発表
なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Kubo T, Yamazoe S, Sugano N, Fujioka M, Naruse S, Yoshimura N, Oka T, Hirasawa Y. Initial MRI findings of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in renal allograft recipients. *Magn Reson Imaging*.1997;15:1017-23.
- 2) Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda S, Sugimori T, Matsumoto T. DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology(Oxford)*.2005;44:456-60.
- 3) Miyanishi K, Yamamoto T, Iriha 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.
- 4) Takao M, Sugano N, Nishii T, Sakai T, Nakamura N, Yoshikawa H. Different magnetic resonance imaging features in two types of nontraumatic rabbit osteonecrosis models. *Magn Reson Imaging*.2009;27:233-9.
- 5) Tsuji T, Sugano N, Sakai T, Yoshikawa H. Evaluation of femoral perfusion in a non-traumatic rabbit osteonecrosis model with T2*-weighted dynamic MRI. *J Orthop Res*.2003;21:341-51

高齢発症(70 才以上)特発性大腿骨頭壊死症の病理組織学的所見について

安藤 渉、花之内健仁、不動一誠、山本健吾、大園健二 (関西労災病院 整形外科)
坂井 孝司、高尾 正樹 (大阪大学大学院医学系研究科 整形外科)
西井 孝、菅野 伸彦 (大阪大学大学院医学系研究科 運動器医工学治療学)

特発性大腿骨頭壊死症と診断され人工関節置換術を施行された 70 才以上の症例 6 例 6 関節(男性 2 例女性 4 例, 70-79 才)の摘出骨頭病理組織について検討した。全例ステロイド性であった。病理組織所見として、全例において壊死層(empty lacunae)、修復反応層(肉芽組織、添加骨形成)、健全層という典型的な三層構造を認めた。修復反応層においては、添加骨形成が旺盛である傾向があった。

1. 研究目的

近年、高齢発症の特発性大腿骨頭壊死症(以下 ION)が増加しているといわれている。福島等は ION 確定診断時のピークが 60-70 代であったと報告している¹⁾。この原因として、鑑別すべき疾患(変形性股関節症、大腿骨頭軟骨下骨折、一過性大腿骨頭萎縮症など)が除外されていない可能性がある。前回、我々は ION との鑑別を困難とさせる症例の特徴を検討とし、高齢者、女性、片側性、ステロイド歴なしといった割合が高かったと報告した²⁾。ION は、診断基準項目の内 Xp, MRI などの画像による診断基準に適合することにより診断されることが多いが、高齢発症では誤診される可能性が高いことを考慮すると、高齢者で画像による ION 診断基準を適切に満たしている場合に、本当に組織学的にも ION であるかを再確認する必要がある、さらに、高齢者に特徴的な病理所見の有無について検討する必要があると考えられた。そこで、本研究において、高齢発症 ION の病理組織学的所見について検討した。

2. 研究方法

1999 年 3 月～2009 年 11 月まで ION の診断のもと人工股関節全置換術(以下 THA)を行い骨頭標本が得られた症例のうち、摘出骨頭採取時が 70 才以上(70-79 才)であった 6 例 6 関節について、性別、年齢、発症誘因、病型、病期、疼痛期間の調査、及び、組織学的検討を行った。

3. 研究結果

性別は、男性 2 例女性 4 例、6 例中 5 例が両側性で発症誘因は全例ステロイド性、基礎疾患は類天疱瘡が 2 例、特発性間質性肺炎、特発性血小板減少性紫斑病、ぶどう膜炎、分類不能型膠原病がそれぞれ 1 例ずつであった。発症から手術までの期間は 22.5 ヶ月(6～77 ヶ月)であった。発症時、病型は C1; 1 例、C2; 5 例、病期は Stage 2; 1 例、stage 3b; 4 例、Stage 4; 1 例であった。

病理組織学的検討であるが、全例、壊死層、修復層、健全層の 3 層構造という ION 典型的所見を認めた。また、高齢発症 ION においても、修復層では同等以上の添加骨形成が観察された(図 1)。

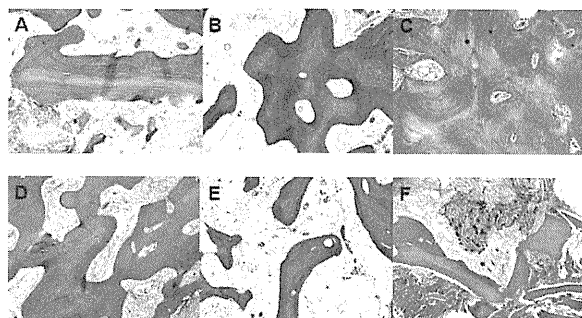


図1 修復層における組織像。(A), (C), (D)において、壊死骨周囲に壊死骨の 2 倍以上の厚みを有する添加骨形成を認める。

症例を供覧する。

<症例 1>

79 才女性。2002 年にステロイド内服開始し、2006 年