

ピタバスタチン投与により、ATDSC の新生が有意に減少した (図 4, 6)。④デキサメサゾン[®]の脂肪細胞分化誘導により出現した前脂肪細胞が、ピタバスタチンの投与により減少し、ATDSC 中に占める前脂肪細胞の割合が濃度依存性に低下する傾向を示した (図 5, 7)。

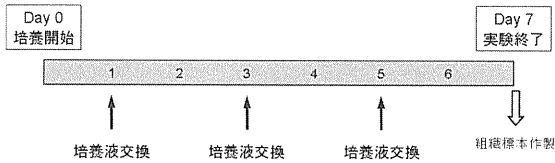


図 1 実験プロトコール

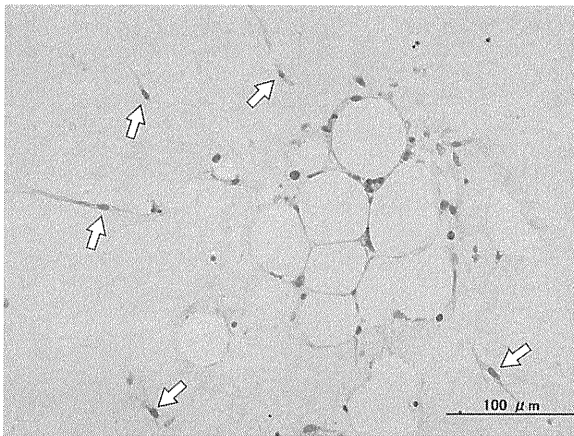


図 2 OA 症例 1 Dex (-) の HE 染色標本
脂肪組織片の周囲に脂肪滴を有しない紡錘形細胞 (ATDSC: 矢印) が新生している

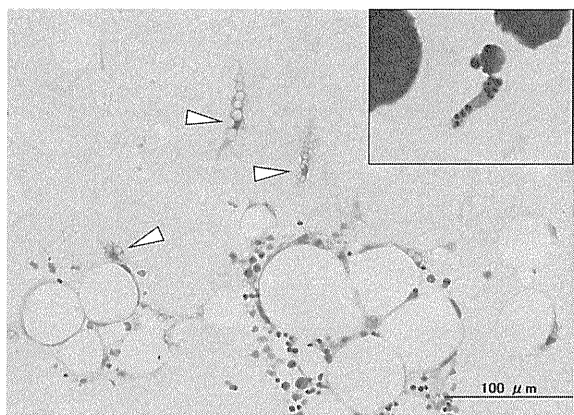


図 3 OA 症例 1 Dex 10 μM 投与の H-E 染色標本 (挿入図は Oil red O 染色)
脂肪組織片の周囲に脂肪滴を有する前脂肪細胞 (矢頭) が新生している

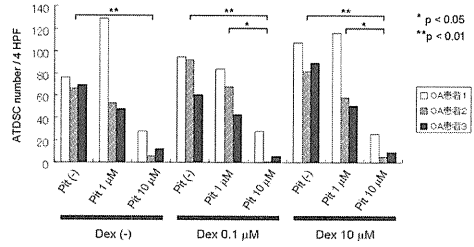


図 4 OA 症例における ATDSC の数

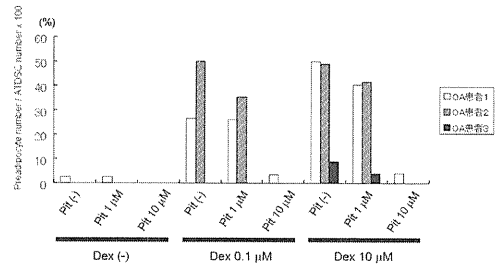


図 5 OA 症例における前脂肪細胞の割合

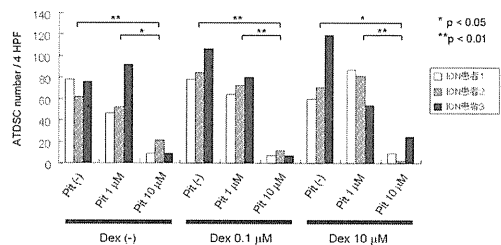


図 6 ION 症例における ATDSC の数

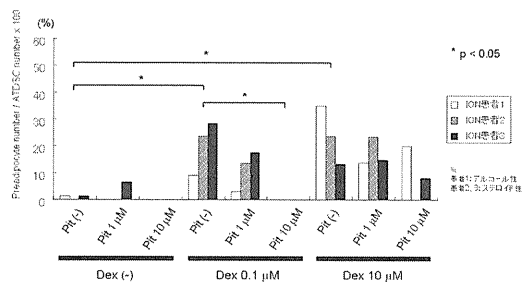


図 7 ION 症例における前脂肪細胞の割合

4. 考察

ヒト骨髄脂肪組織片を 3 次元培養すると、脂肪組織片周囲に紡錘形の ATDSC が出現し、これにステロイドを投与すると、ATDSC 中の前脂肪細胞の比率が増加した。

さらにピタバスタチンの投与により、ATDSC の数の減少および前脂肪細胞の比率の低下がみられた。この結果は、ピタバスタチンが、ステロイドによる骨髄内間葉系幹細胞からの脂肪細胞分化亢進を抑制することを示している。ただし、培養液中の 10 μ M は、血中濃度から換算すると極めて高濃度であり、ATDSC 自体の数も著減していることから骨髄脂肪組織の再生能の低下が危惧される。低濃度 (1 μ M) では効果が少なかったことから、通常投与量でのスタチンの脂肪細胞分化抑制を介した ION 予防効果は少ないと考えられる。今後、症例数を重ねるとともに、アディポサイトカインや酸化ストレスマーカーの発現など脂肪細胞の機能に着目した研究が必要と考える。

5. 結論

ステロイド投与により誘導される脂肪組織片由来間葉系細胞の脂肪細胞分化が、高濃度ピタバスタチンの投与によって抑制された。ピタバスタチンをはじめとするスタチン系の薬剤が、骨髄内間葉系細胞の脂肪細胞分化抑制を介して、特発性大腿骨頭壊死症の予防・治療に有効である可能性があるが、至適濃度の検討、脂肪細胞の機能を含めた更なる研究が必要である。

6. 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) Kitajima M, Shigematsu M, Ogawa K, Sugihara H, Hotokebuchi T. Effects of glucocorticoid on adipocytes size in human bone marrow. *Med Mol Morphol* 40: 150-156, 2007
- 2) Inoue T, Node K. Statin therapy for vascular failure. *Cardiovas Drug Ther* 21: 281-295, 2007

特発性大腿骨頭壊死症における microRNA の発現

山崎啓一郎 (広島大学大学院整形外科)
安永裕司 (広島大学大学院人工関節・生体材料学)

低酸素状態は組織に対する主要なストレスのうちの一つであり、心疾患、不整脈、糖尿病、壊死といった病態において重要事項である。大腿骨頭壊死症 (ION) においてもその病態に低酸素状態が深く関係することが予想される。また non-coding RNA の一つである microRNA がさまざまな疾患の病態に関わっている事がわかってきており、本研究では血管新生に関係すると言われている microRNA-210(miR-210)に着目し、ION 患者10例(ON 群)を対象に変形性股関節症患者10例(OA 群)と比較検討を行った。Mature および primary miR-210 では ON 群の方が OA 群より優位に発現していた。Matrix metalloproteinase(MMP)-2、-7、Vascular endothelial growth factor(VEGF)では ON 群の方が OA 群より優位に発現していたが、hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α では両群間に有意差は認められなかった。ION において miR-210 の発現が認められ、miR-210 の発現細胞は von Willebrand Factor (vWF)や VEGF によって染色され、血管内皮細胞といった血管系細胞であることが示唆された。また低酸素状態下の血管内皮細胞に miR-210 を over-expression させその影響を調べた。miR-210 は用量依存性に作用し低酸素状態下での細胞生存に関与している可能性がある。

1. 研究目的

低酸素状態は組織に対する主要なストレスのうちの一つであり、心疾患、不整脈、糖尿病、壊死といった病態において重要事項である。大腿骨頭壊死症 (ION) においてもその病態に低酸素状態が深く関係することが予想される。RNA は遺伝情報を DNA からタンパク質に伝令する機能がその主体であると唱えるセントラルドグマが常識であり、遺伝子の半分以上を占める non-coding RNA はジャンク、ガラクタとされてきた¹⁻³⁾。しかしながらこの non-coding RNA の一つである microRNA がさまざまな疾患の病態に関わっている事がわかってきた⁴⁻⁶⁾。本研究の目的は血管新生に関係すると言われている microRNA-210(miR-210)に着目し、ION におけるその発現を検討することである。

2. 研究方法

subject	age	sex	Aetiology of ON	medical illness
ON1	56	male	steroid induced	OVI, PE, HL, toxicodermatitis
ON2	32	male	steroid induced	Liver dysfunction
ON3	54	female	steroid induced	SLE
ON4	55	female	steroid induced	renal transplantation
ON5	45	male	alcohol associated	none
ON6	46	male	alcohol associated	none
ON7	42	female	idiopathic	SLE, RA
ON8	52	male	alcohol associated	stasis ulcer, varix of lower leg
ON9	69	female	idiopathic	brain infarction
ON10	45	male	alcohol associated	none
OA1	71	male		CRBBB, anemia
OA2	63	female		none
OA3	74	male		OVI
OA4	73	female		HT, HL, RD
OA5	73	female		HT, HL
OA6	63	female		DM, HL
OA7	83	female		HT
OA8	71	Female		cerebral infarction
OA9	76	female		HT
OA10	66	female		none

CRBBB=Complete right bundle branch block, HT=hypertension HL=hyperlipemia
RD=renal dysfunction OVI=obstructive ventilatory impairment DM=diabetes mellitus
PE=pulmonary emphysema SLE=systemic lupus erythematosus RA=rheumatoid arthritis

表 1: 臨床的背景

ON に対して施行された手術の際、切除された骨頭より壊死骨を含む骨組織を en bloc に採取し、これより RNA を精製し、real-time PCR を用いて mature および primary miR-210、低酸素状態の際に発現がみられる Matrix metalloproteinase(MMP)-2、-7、VEGF (vascular endothelial growth factor)、hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の発現を確認し、変形性股関節症 (OA) に対して施行された手術の際、切除された骨頭より RNA を精製し、同様にして mature

および primary miR-210、MMP-2、-7、VEGF、HIF-1 α の発現を確認し両群間で比較検討した。ON 連続切片で、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)、*in situ* hybridization (ISH)、osteocalcin、von Willebrand factor(vWF)および VEGF の免疫染色(IHC)を行い、組織学的評価を行った。

(統計解析)

統計学的有意差の検討には Mann Whitney U test を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究を開始するにあたり、広島大学における臨床研究倫理審査委員会の承認を得た。

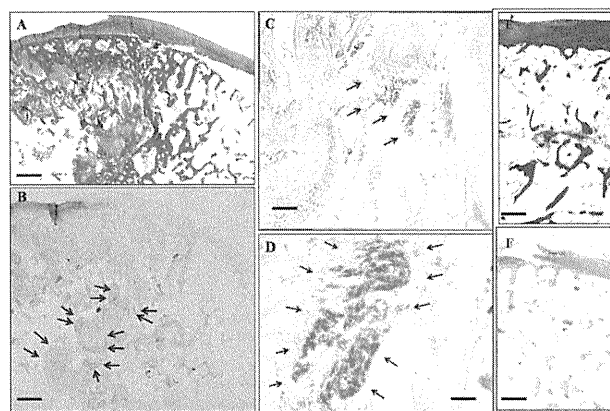


図2 組織学的評価 (HE 染色、ISH)

壊死組織周囲に mature miR-210 発現細胞を有意に発現していた(図 2A:HE 染色、図 2B-D:ISH)。OA 組織では mature miR-210 の発現は認められなかった(図 2E:HE 染色、図 2F:ISH)。黒矢印は mature miR-210 発現細胞。

3. 研究結果

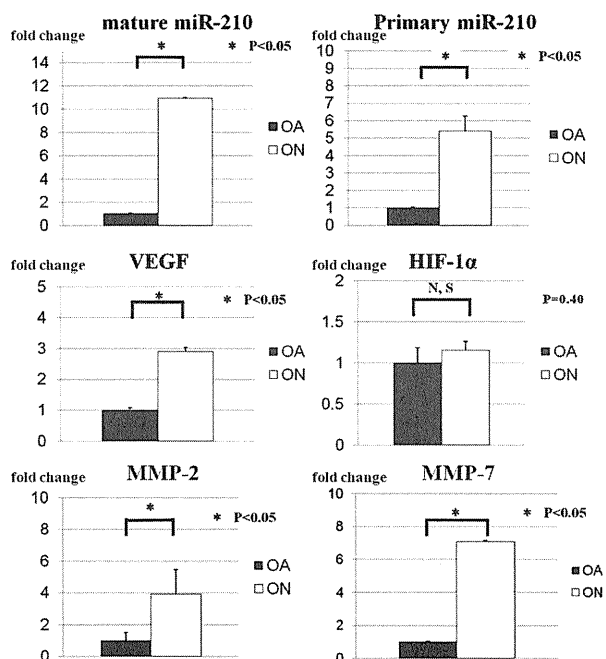


図1 Real-time PCR による定量評価

Mature および primary miR-210 では ON 群の方が OA 群より優位に発現していた。VEGF、MMP2 および MMP7 では ON 群の方が OA 群より優位に発現していた。HIF-1 α では両群間に有意差は認められなかった。

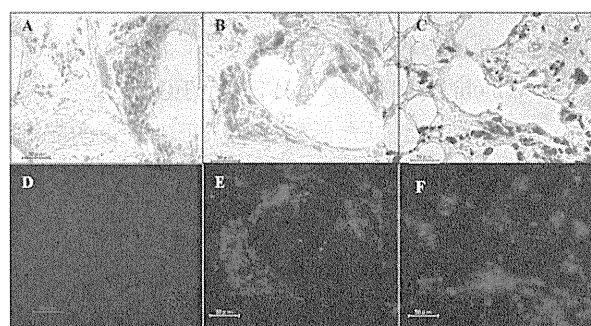


図3 組織学的評価 (免疫染色、ISH)

免疫染色にてこれらの細胞は osteocalcin の発現はなく、VEGF および vWF を発現しており、骨芽細胞や骨細胞ではなく血管内皮細胞などの血管形成に関与する細胞であることが示された(図 3A-C: ISH、図 3D: osteocalcin、E: VEGF、F: vWF)。

Group	route of transfection	transfected dose
Group A	control siRNA(-)	(-)
Group B	control siRNA(+)	40 nM/well
Group C	over-expression of miR-210	5 nM/well
Group D	over-expression of miR-210	20 nM/well
Group E	over-expression of miR-210	40 nM/well

表2 miR-210 の over-expression モデル

そこでわれわれは低酸素下での血管内皮細胞における miR-210 の機能評価を行うべく、表2の如く血管内皮細胞 (HUVEC; Human umbilical vein endothelial cells) に miR-210 を over-expression し低酸素状態 (0.5% O₂) にしたところ、24 時間では酸素正常状態と低酸素状態では明らかな差は認められなかったが、48 時間モデルでは 20nM および 40nM over-expression させた群、72 時間モデルでは 40nM over-expression させた群のみ低酸素状態で生存することができなかった (図4)。

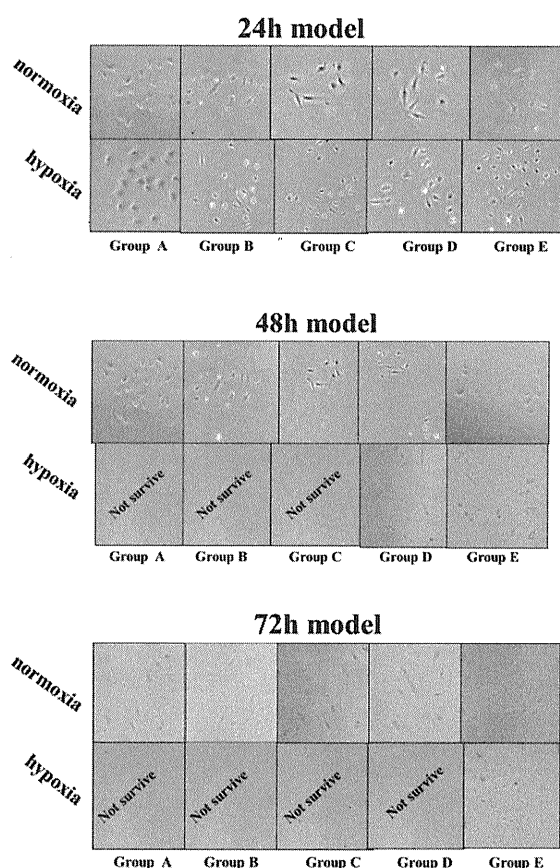


図4 HUVEC への miR-210 over-expression

4. 考察

低酸素状態は組織に対する主要なストレスのうちの一つであり、心疾患、不整脈、糖尿病、壊死といった病態において重要事項である。またマクロファージはそのような低酸素状態または虚血状態におかれた組織で増加し、いくつかの転写因子を過剰発現させてそれに応答している。

Kulshreshtha らは低酸素状態で miR-210 が誘導されることを報告している⁷⁾。Fasanaro らは、miR-210 が心血管形成と血管リモデリングにおける極めて重要な役割を担っているとされている Ephrin-A3 (EFNA3) を直接標的とし、この発現を抑制することを報告した⁸⁾。また彼らは miR-210 による

EFNA3 の発現抑制は虚血への血管応答に関与するという考えを示している。したがって ION においても、この miRNA-210 の発現がみられ、骨壊死に関わっている可能性があり、今回我々は ON 患者における miRNA-210 の発現を解析し検討した。

ON 群では OA 群に比較し、有意に miRNA-210 が発現しており、miR-210 発現細胞は VEGF および vWF を発現しており、骨芽細胞や骨細胞ではなく血管内皮細胞などの血管形成に関与する細胞であることが示唆され、miR-210 は ION の病態に関与していると考えられる。

また低酸素状態下の HUVEC に miR-210 を over-expression させると、用量依存性に作用し低酸素状態下の細胞生存に関与している可能性が示唆され、miR-210 が治療ターゲットになりうると思われる。

5. 結論

ION 患者 10 例および OA 患者 10 例を対象に、miRNA-210 の発現の検討を行った結果、ON 群では OA 群に比較し、有意に miRNA-210 が発現しており、miR-210 は ION の病態に関与していることが示唆された。また miR-210 は血管内皮細胞をターゲットにした治療に有用であると思われる。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004;431:350-5.
- 2) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004;116:281-97.
- 3) Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnson WK, Lim LP, et al. The widespread impact of mammalian

MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 2005;310:1817-21.

- 4) Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9; 435(7043):834-8.
- 5) Marcucci G, et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Engl J Med*. 2008 May 1; 358(18):1919-28.
- 6) Pfeffer S, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004 Apr 30; 304(5671):734-6.
- 7) Kulshreshtha R, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007 Mar;27(5):1859-67.
- 8) Fasanaro P, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*. 2008 Jun 6;283(23):15878-83.

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)が家兎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

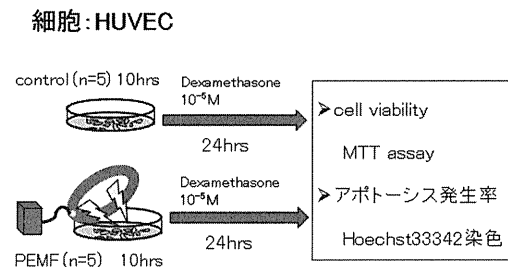
われわれはこれまでに電磁場刺激(pulsed electromagnetic fields therapy: PEMF)が家兎のステロイド性骨壊死の発生リスクを有意に抑制することを確認した¹⁾。しかし、PEMFによる骨壊死予防機序は現在のところ明らかになっていない。ステロイドが骨壊死を発生させる機序の一つとして、ステロイド投与による血管内皮傷害とそれに伴う阻血が関連していると報告されている²⁾。そこで今回はPEMFによる細胞保護作用と血管新生作用について検討した。

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^{-8} 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

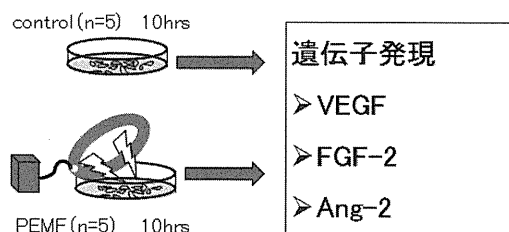


B. 血管新生作用

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

細胞: HUVEC



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。

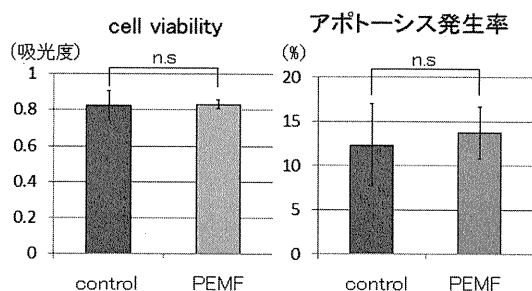
3. 解析結果

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 ± 0.08 、PEMF 群では 0.83 ± 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)。

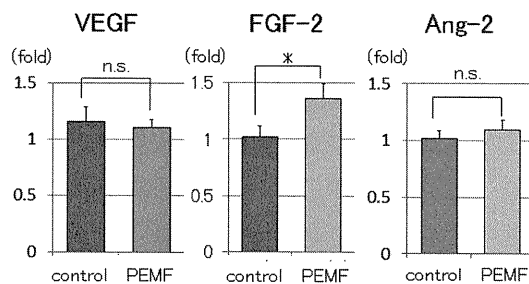
図 A 細胞保護作用



B. 血管新生作用 (図 B)

VEGF の遺伝子発現は control 群で 1.15 ± 0.12 、PEMF 群で 1.10 ± 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 ± 0.10 、PEMF 群で 1.36 ± 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 ± 0.06 あったのに対し、PEMF 群で 1.09 ± 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1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られる。

動物モデルでは、酸化ストレス²⁾、脂質代謝異常³⁾や凝固・線溶系異常⁴⁾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^{5,6)}、高脂血症治療薬⁷⁾や抗凝固薬⁸⁾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¹⁾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. 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) Ishida M, Fujioka M, Takahashi K, 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.

特発性大腿骨頭壊死症における股関節液中サイトカイン濃度の検討

阿部裕仁 坂井孝司 高尾正樹 西井孝 菅野伸彦 (大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学)
中村宣雄 (協和会病院 人工関節センター)
安藤渉 大園健二 (関西労災病院 整形外科)
三木秀宣 (国立大阪医療センター 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症(ION)16例16関節の関節液中サイトカイン濃度を測定し、変形性股関節症(OA)21例22関節、急速破壊型股関節症(RDC)27例28関節と比較した。ION stage 3Bはstage 4に比して有意にIL-6濃度が高値であった。OAとION stage4に差はなかったが、ION stage 3BはOAに比して有意にIL-1 β 、IL-6、IL-8が高値であった。RDCはOAに比して有意にIL-1 β 、IL-8、TNF- α が高値であった。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ION)の関節液中マーカーに関しては、ケラタン硫酸やMMP-3が変形性股関節症(OA)と比して高値であることや、COMPやTIMP-1がearly stageでLate stageに比して高値であることなどが報告されている¹⁻³⁾。我々はIONにおいて破骨細胞を含むTRAP陽性細胞のreparative interface zoneでの分布について報告してきた⁴⁾。破骨細胞を活性化する因子として、IL-1 β 、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインが報告されている^{5,6)}。関節液中サイトカイン濃度に関しては、膝関節についてIL-1 β 、IL-8、TNF- α が関節リウマチでOAに比して有意に高値であることが報告されている⁷⁻⁹⁾。しかし、股関節液中サイトカイン濃度についての報告は少なく、IONの股関節液中サイトカインに関する報告はない^{10,11)}。本検討の目的は人工股関節全置換術(THA)施行時に採取したIONの股関節液中サイトカイン濃度を測定し、その特徴を明らかにすることである。

2. 研究方法

2004~2011年にTHAを施行したION16関節を対象とし、変形性股関節症(OA)22関節、急速破壊型股関節症(RDC)28関節を比較対象とした。IONはStage3B:6関節、Stage4:10関節であった。OA、RDCでは全例で関節裂隙の消失を認めた。患者背景を表1に示す。

関節液は、採取直後に遠心分離により血球成分を

除去したのちに-80℃で冷凍保存した。測定にはHomogenous Time Resolved Fluorescence (HTRF)を用いた。HTRFは、ELIZAに比して工程が簡便で正確性が高いと報告されている¹²⁾。測定した項目は、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α である。IONでのStage間および疾患間でのサイトカイン濃度の差を調査した。統計にMann-Whitney U testを用い、 $p<0.05$ を有意とした。

3. 研究結果

ION股関節液においてstage3BではIL-6がstage4に対し有意に高値であった(Stage 3B: 1117 \pm 1394pg/ml, stage 4: 707 \pm 708pg/ml, $p=0.03$) (表2)。IONとOAの比較では、ION stage 4とOA間では有意差を認めなかったが、ION stage 3BはOAに対し、IL-1 β 、IL-6、IL-8が有意に高値であった(表3、図1)。

RDCとOAの比較では、RDCがOAに対し、IL-1 β 、IL-8、TNF- α が有意に高値であった(表4)。

	関節	性別(男/女)	年齢(歳)
ION	16	6/10	52.4 \pm 16.4
OA	22	2/20	69.8 \pm 10.4
RDC	28	3/25	75.2 \pm 6.9

表1: 患者背景比較

ION病期	Stage 3B 6関節	Stage 4 10関節	Mann-Whitney U test (p値)
IL-1 β (pg/ml)	1117 \pm 1394	871 \pm 1276	0.35
IL-6 (pg/ml)	2478 \pm 2076	707 \pm 708	0.03
IL-8 (pg/ml)	3906 \pm 4338	2204 \pm 2552	0.64
TNF- α (pg/ml)	1278 \pm 2157	927 \pm 1051	0.99

表 2: ION 病期間での股関節液中サイトカイン濃度比較

	ION Stage 3B 6関節	OA 22関節	Mann-Whitney U test (p値)
IL-1 β (pg/ml)	1117 \pm 1394	516 \pm 1166	0.03
IL-6 (pg/ml)	2478 \pm 2076	829 \pm 600	0.04
IL-8 (pg/ml)	3906 \pm 4338	1205 \pm 1290	0.04
TNF- α (pg/ml)	1278 \pm 2157	568 \pm 1083	N.S.

表 3: ION stage 3B と OA の股関節液中サイトカイン濃度比較

	RDC 28関節	OA 22関節	Mann-Whitney U test (p値)
IL-1 β (pg/ml)	793 \pm 1195	516 \pm 1166	0.02
IL-6 (pg/ml)	1207 \pm 1175	829 \pm 600	N.S.
IL-8 (pg/ml)	3291 \pm 2589	1205 \pm 1290	0.0002
TNF- α (pg/ml)	982 \pm 1478	568 \pm 1083	0.009

表 4: RDC と OA の股関節液中サイトカイン濃度比較

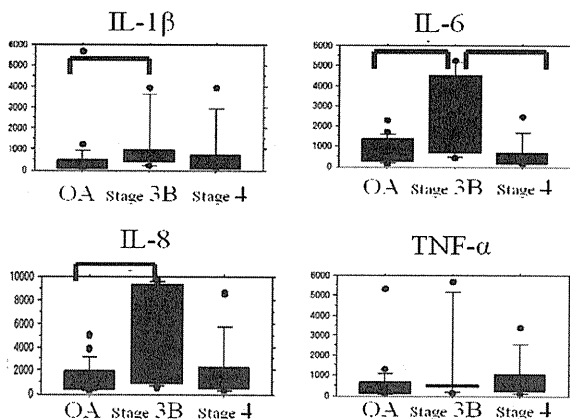


図 1: 箱ひげ図。OA と ION stage3B および Stage4 との比較

4. 考察

ION の関節液中軟骨代謝マーカーの報告は散見される¹⁻³⁾。ケラタン硫酸や COMP、TIMP-1 は early stage の方が late stage に比して高濃度であり、病期がマーカーの濃度に影響することが報告されている。しかし、ION 関節液中炎症性サイトカイン濃度に関する報告はない。本検討では ION stage 3B において、IL-6 濃度が

stage 4 に比して有意に高値であることが示された。ION stage 4 は OA と同等のサイトカイン濃度を示し、OA 変化が出現後は、通常の OA と同じ挙動を示すことが明らかになった。

RDC は OA に比して関節液中 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 濃度が高値であった。RDC の関節液中マーカーとしては、血中 MMP-3、MMP-9、type I collagen C-peptide や尿中 type II collagen C-telopeptide が報告されている¹³⁻¹⁵⁾。しかし関節液中マーカーの報告はない。ION で病期がサイトカイン濃度に影響することを考慮すると、関節破壊進行前の RDC では、さらに高値を示している可能性があり、RDC と OA との鑑別に有用である可能性がある。

ION における reparative interface zone および RDC における軟骨下領域に TRAP 陽性細胞が存在することを我々は報告した¹⁶⁾。しかし、破骨細胞の活性化因子に関しては明らかではない。RA 同様にサイトカインが関与している可能性は考えられるが、本研究では ION、Stage3B、Stage4 の症例と RDC では関節破壊進行後の症例のみであり、現段階では明らかではない。今後も stage 1、stage 2、stage 3A の症例よりの関節液を収集し、検討を続けていく予定である。

5. 結論

ION において関節液中 IL-6 濃度は Stage3B で Stage4 よりも高値であった。股関節圧壊の程度と関節液中 IL-6 濃度との関連性が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 阿部裕仁、坂井孝司、安藤渉、西井孝、高尾正樹、中村宜雄、吉川秀樹、菅野伸彦: 急速破壊型股関節における関節液中サイトカイン濃度の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会: 2011.10.21

2) Abe H, Sakai T, Ando W, Nishii T, Takao M, Sugano N: Comparison of cytokine levels in the joint fluid between rapidly destructive coxopathy, hip osteoarthritis, hip osteonecrosis, and rheumatoid arthritis. 75th annual scientific meeting of America

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) Kato S, Yamada H, Terada N, Masuda K, Lenz ME, Morita M, Yoshihara Y, Henmi O. Joint biomarkers in idiopathic femoral head osteonecrosis: comparison with hip osteoarthritis. *JRheumatol.* 2005; 32: 1518-23.
- 2) Jingushi S, Lohmander LS, Shinmei M, Hoerrner LA, Lark MW, Sugioka Y, Iwamoto Y. Markers of joint tissue turnover in joint fluids from hips with osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Res.* 2000; 18: 728-33.
- 3) Iwase T, Hasegawa Y, Ishiguro N, Ito T, Iwasada S, Kitamura S, Iwata H. Synovial fluid cartilage metabolism marker concentrations in osteonecrosis of the femoral head compared with osteoarthrosis of the hip. *J Rheumatol.* 1998; 25: 527-31.
- 4) Li W, Sakai T, Nishii T, Nakamura N, Takao M, Yoshikawa H, Sugano N. Distribution of TRAP-positive cells and expression of HIF-1alpha, VEGF, and FGF-2 in the reparative reaction in patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Res.* 2009; 27: 694-700.
- 5) Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol.* 1985; 135: 2562-8.
- 6) Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275: 768-75.
- 7) Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, Strieter RM. Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol.* 1991; 147: 2187-95.
- 8) Hussein MR, Fathi NA, El-Din AM, Hassan HI, Abdullah F, Al-Hakeem E, Backer EA. Alterations of the CD4(+), CD8 (+) T cell subsets, interleukins-1beta, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations. *Pathol Oncol Res.* 2008; 14: 321-8.
- 9) Xiu ZB, Chen WT, Sun KM. Study on correlation between the pathological changes under arthroscopy and the cytokine levels in the knee osteoarthritis of the Blood Stasis type. *Zhongguo Gu Shang.* 2010; 23: 890-3.
- 10) Xie J, Naito M, Maeyama A. Intracapsular pressure and interleukin-1beta cytokine in hips with acetabular dysplasia. *Acta Orthop.* 2010; 81: 189-92.
- 11) Komiya S, Inoue A, Sasaguri Y, Minamitani K, Morimatsu M. Rapidly destructive arthropathy of the hip. Studies on bone resorptive factors in joint fluid with a theory of pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992; 284: 273-82.
- 12) Enomoto K, Aono Y, Mitsugi T, Takahashi K, Suzuki R, Préaudat M, Mathis G, Kominami G, Takemoto H. High throughput screening for human interferon-gamma production inhibitor using homogenous time-resolved fluorescence. *J Biomol Screen.* 2000; 5: 263-8.
- 13) Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 2625-31.
- 14) Berger CE, Kröner A, Stiegler H, Leitha T, Engel A. Elevated levels of serum type I collagen C-telopeptide in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Int Orthop.* 2005; 29: 1-5.
- 15) Garnerio P, Conrozier T, Christgau S, Mathieu P, Delmas PD, Vignon E. Urinary type II collagen

C-telopeptide levels are increased in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 2003; 62: 939-43.

- 16) 坂井孝司、阿部裕仁、安藤渉、高尾正樹、西井孝、原口圭司、三木秀宣、李勝博、大園健二、吉川秀樹、菅野伸彦. 大腿骨頭軟骨下骨折、急速破壊型股関節症の組織学的検討 特発性大腿骨頭壊死症との比較. 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・分担報告書;94-6.

股関節疾患における関節液中骨軟骨代謝マーカー

山口亮介、山本卓明、本村悟朗、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、池村聡、岩崎賢優、趙嘎日達、岩本幸英
(九州大学 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症 (ION)、臼蓋形成不全に続発した変形性股関節症 (OA)、急速破壊型股関節症 (RDC) は関節症進行時の臨床像や経過が異なり、各疾患で骨代謝、軟骨代謝が異なっている可能性が考えられる。そこで、当施設にて手術中に採取した ION 群 70 例、OA 群 20 例、RDC 群 21 例の関節液中における骨代謝マーカー (BAP、TRACP-5b)、軟骨代謝マーカー (MMP-3、ケラタン硫酸) を比較検討した。ION 群は他疾患と比較して、BAP、MMP-3、ケラタン硫酸が有意に高値であった。RDC 群は他疾患と比較して TRACP-5b が有意に高値であったが、OA 群はいずれもが低値であった。一方 ION 群内の stage ごとの比較では、BAP が stage 3A、3B に比較して stage 4 では有意に低下していた。各疾患における人工関節症例のみの比較では、BAP に群間差は認められなかったが、他項目は全体の結果と同様の結果であった。関節液中骨代謝、軟骨代謝マーカーの違いが、各疾患の関節症進行の病態を表す一つの指標であると考えられた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) では、骨頭壊死骨の圧潰を起因として数か月～数年で関節症が進行する一方、臼蓋形成不全に続発した変形性股関節症 (OA) では、関節軟骨の摩耗、変性により数年～数十年かけて関節症が進行し、急速破壊型股関節症 (RDC) では関節破壊像を呈し、数週～数か月で急速に関節症が進行する。各股関節疾患では関節症進行の病態における骨代謝、軟骨代謝が異なっている可能性が考えられる。

本研究の目的は、各股関節疾患の関節液を用いて骨代謝、軟骨代謝マーカーを比較検討することである。

2. 研究方法

2008 年 10 月から 2010 年 6 月の間に、当施設で手術を施行し、関節液を採取できた ION 群 70 例 (平均年齢 47 歳、男性 43 例女性 27 例)、OA 群 20 例 (平均年齢 56 歳、男性 2 例女性 18 例)、RDC 群 21 例 (平均年齢 70 歳、男性 2 例女性 19 例) を対象とした。手術内容は、ION 群が骨切り術 30 例 (前方回転骨切り 29 例、後方回転骨切り 1 例)、人工物置換 40 例 (人工骨頭置換 29 例、人工関節置換 11 例) であり、OA 群が骨切り術 7 例 (全例寛骨臼移動術)、人工物置換 13 例 (全例人工関節置換)、RDC 群は全例人工関節置換が行われた。

関節液は、手術時に関節包内に注射器を刺入して採

取し、12000rpm で 5 分間遠心分離を行い、血球成分を除いて -80°C で凍結保存した。保存した関節液を生理食塩水で 3 倍、10 倍、100 倍、1000 倍に希釈し、各検査試薬に適した希釈液を用いて測定した。

調査項目は、骨代謝マーカーとして、骨形成マーカーである骨型アルカリフォスファターゼ (BAP)、破骨細胞活性マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRACP-5b) を測定した。また軟骨代謝マーカーとして、軟骨破壊マーカーである軟骨基質破壊酵素 MMP-3、軟骨分解産物であるケラタン硫酸を測定した。

各項目を One-way ANOVA で検定し、各群間は Tukey-Kramer HSD test による多重比較を行った。

3. 研究結果

BAP は、OA 群、RDC 群より ION 群が有意に高値であった (図 1)。TRACP-5b は、ION 群、OA 群より RDC 群が有意に高値であった (図 2)。MMP-3、ケラタン硫酸は、OA 群、RDC 群より ION 群が有意に高値であった (図 3, 4)。

一方 ION 群内の stage ごとの比較では、BAP が stage 3A、3B に比較して stage 4 では有意に低下していたが、他項目は有意な差が認められなかった。各疾患における人工関節症例のみの比較では、BAP に群間差は認められず、他項目は全体結果と同様であった (図 5-8)。

図1 BAP

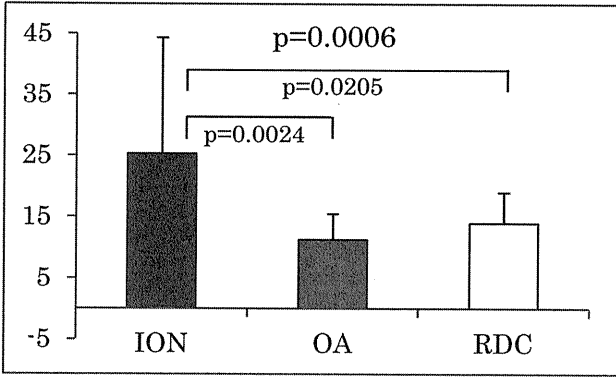


図5 人工関節症例におけるBAP

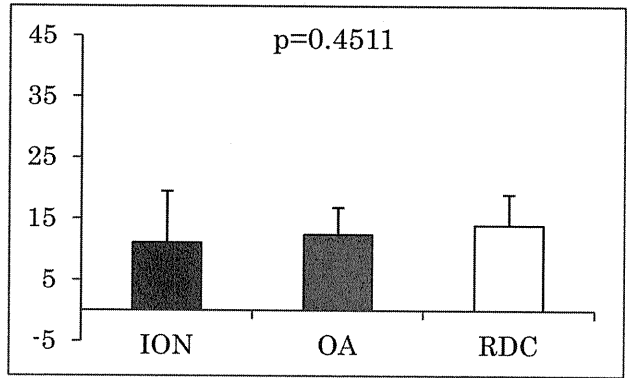


図2 TRACP-5b

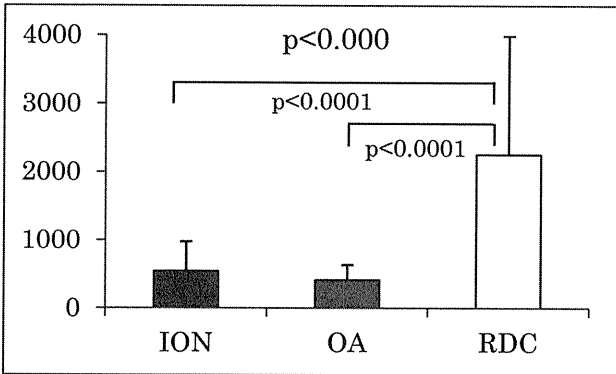


図6 人工関節症例におけるTRACP-5b

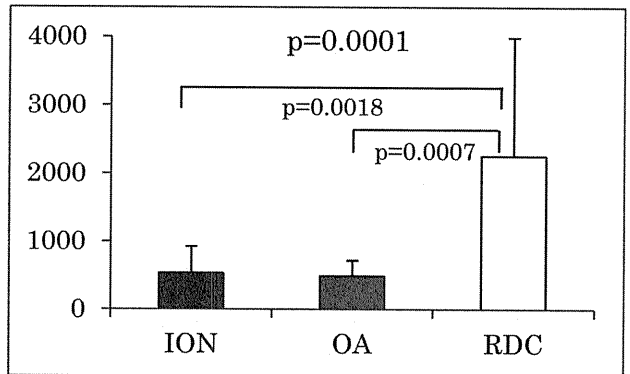


図3 MMP-3

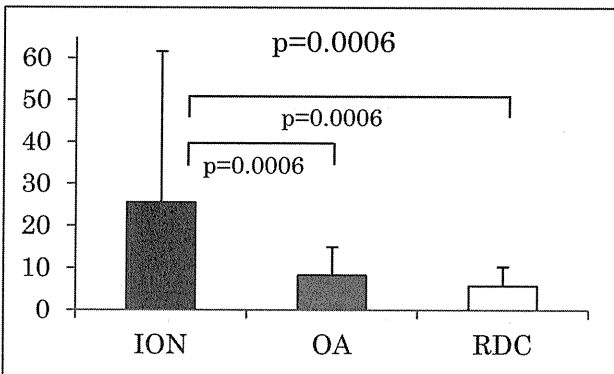


図7 人工関節症例におけるMMP-3

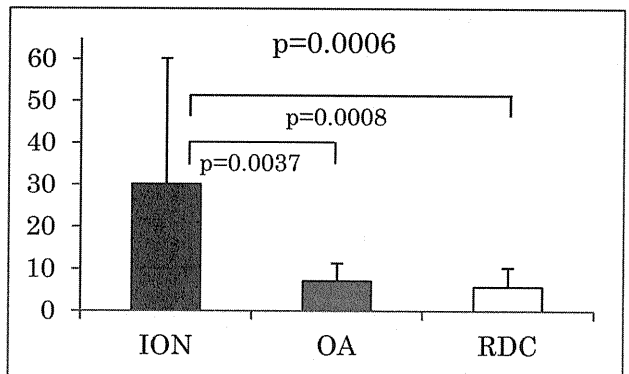


図4 ケラタン硫酸

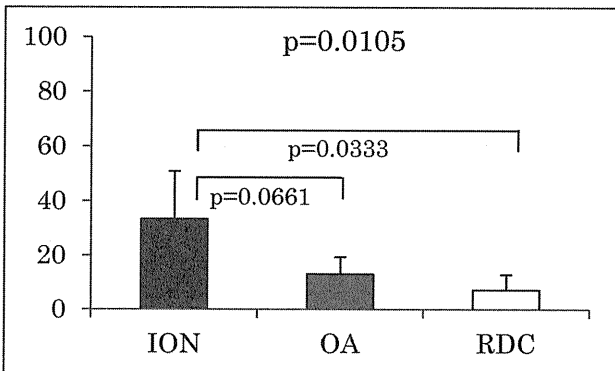
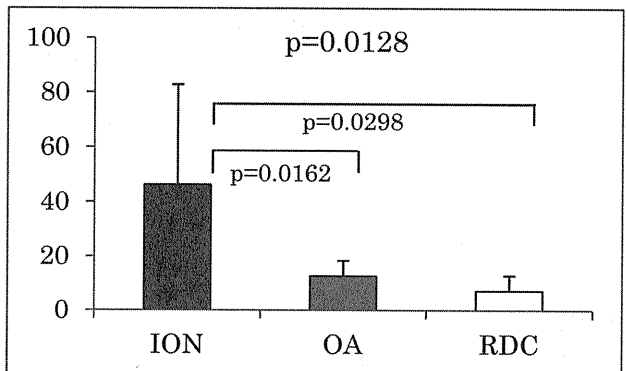


図8 人工関節症例におけるケラタン硫酸



4. 考察

本研究において、ION 群では骨形成方向の骨代謝が認められたが、比較的強い軟骨代謝も同時に認められた。一方 OA 群は、骨代謝、軟骨代謝とも相対的に低値であった。ION は骨頭壊死骨の圧潰を起因として関節症が進行し、OA は軟骨の摩耗変性により関節症が進行する。大腿骨頭壊死症と変形性股関節症の関節液中軟骨代謝マーカーに関しては、C 末端 type II procollagen、MMP-3 が大腿骨頭壊死症で高値であったという報告¹⁾や、ケラタン硫酸が大腿骨頭壊死症で高値であったという報告²⁾がある。本研究でも同様の結果であり、進行した症例でも同じ傾向であった。関節症進行という観点からは、ION と OA の軟骨代謝の違いも臨床経過の違いに関与している可能性が示唆される。

RDC 患者では OA 患者と比較して、血清中、関節滑膜中 MMP-3,-9 が高値であったと報告されている³⁾。本研究では、RDC 群、OA 群ともに軟骨代謝は低値であり両群で明らかな差は認められなかったが、RDC 群は破骨細胞活性が非常に高値であった。RDC は骨頭や臼蓋の急速な破壊像を呈して関節症が進行する疾患であるが、その進行には軟骨代謝だけでなく、破骨細胞活性が関与している可能性が示唆される。

大腿骨頭壊死症の関節液中軟骨代謝マーカーに関する報告で、MMP-3 や TIMP-1 は後期 stage よりも初期 stage の方が高値であり、早期 stage における骨切り術が重要であることが報告されている⁴⁾。本研究における ION 群内の stage ごとの比較では、軟骨代謝マーカーに有意な群間差は認められなかったが、骨形成マーカー BAP は stage 3B までは保たれ、stage 4 では低下するという結果であった。骨切り術を考慮する際や骨頭のリモデリングを期待する症例では、早期に手術を行う重要性を示唆する結果であると考えられた。

本研究では、ION 群や OA 群には複数 stage の症例が含まれており、全体の群間差に影響している可能性が考えられる。そこで人工関節症例のみに限定して各群を比較検討した結果、BAP は群間差が認められなかったが、他項目は全体の群間差と同様の傾向であった。これらの結果から、人工関節が必要な股関節終末像は各疾患で異なり、関節液中骨代謝、軟骨代謝が関節症進行の病態に関与している可能性が示唆された。

5. 結論

ION、OA、RDC において関節液中骨代謝、軟骨代謝マーカーは各疾患で異なり、関節症進行の病態を表す

一つの指標であると考えられた。

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 Rheuma. 2011 Oct;63(10):3169-73.

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Nakashima Y, Mawatari T, Ikemura S, Iwasaki K, Zhao G: A Fact-Finding Study on Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head Based on Clinical Research Forms of the Specified Disease Treatment Research Program. The 15th International Symposium on Bone Circulation. ARCO 2009 November 17-19, 2009, Yokohama, Japan
- 2) 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
- 3) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、本村悟朗、池村聡、藤井政徳、岩本幸英: 強彎ノミを用いた寛骨臼移動術の X 線学的検討. 第 36 回日本股関節学会学術集会 2009.10.30,31 京都
- 4) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩本幸英: 福岡県における特発性大腿骨頭壊死症の発生率. 第 37 回日本股関節学会学術集会 2010.10.1,2 福岡
- 5) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩本幸英: MRI で double low-intensity bands を呈した大

腿骨頭壊死症例. 第 37 回日本股関節学会学術集会 2010.10.1,2 福岡

- 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: 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.
- 7) 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.
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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) Iwase T, Hasegawa Y, Ishiguro N, Ito T, Iwasada S, Kitamura S, Iwata H. Synovial fluid cartilage metabolism marker concentrations in osteonecrosis of the femoral head compared with osteoarthritis of the hip. *J Rheumatol.* 1998 Mar;25(3):527-31.
- 2) Kato S, Yamada H, Terada N, Masuda K, Lenz ME, Morita M, Yoshihara Y, Henmi O. Joint biomarkers in idiopathic femoral head osteonecrosis: comparison with hip osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2005 Aug;32(8):1518-23.
- 3) Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 2002 Oct;46(10):2625-31.
- 4) Jinguishi S, Lohmander LS, Shinmei M, Hoerrner LA, Lark MW, Sugioka Y, Iwamoto Y. Markers of joint tissue turnover in joint fluids from hips with osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Res.* 2000 Sep;18(5):728-33.

大腿骨頸部内側骨折における虚血後修復反応の組織学的検討

坂井孝司、中村宣雄、岩名大樹、北田誠、西井 孝、高尾正樹、吉川秀樹、菅野伸彦

(大阪大学大学院医学系研究科 整形外科)

大腿骨頭における虚血後修復反応を調査するため、受傷後 2 週以内に摘出した大腿骨頸部骨折の大腿骨頭 101 関節を調査した。TRAP 陽性細胞は 19 関節 (19%) で retinaculum、円靭帯周囲、骨折部近傍に見られた。HIF-1 α は 41 関節 (41%) に発現し、proangiogenic factor である VEGF は 42 関節 (42%)、FGF-2 は 82 関節 (82%) に発現し、いずれも骨折部近傍に存在した。HIF-1 α や FGF-2 の発現は受傷後 3 日以内の例で多く見られた。

1. 研究目的

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

2. 研究方法

対象は 100 例 101 関節 (男性 17 例、女性 83 例) で、平均 80 歳 (58-97 歳)、受傷後手術までの期間は平均 6.3 日 (1-14 日) で、受傷後 2 週以内の例に限定して調査した。Garden stage3 が 16 関節、stage4 が 85 関節で、5 例で bisphosphonate を使用していた。

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

HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 各々の発現が円靭帯近傍、retinaculum 近傍、骨折部近傍の各領域における分布状況と分布密度を調査した。なお転移性臼蓋骨腫瘍で広範切除を施行した切除骨頭をコントロールとした。分布密度に関しては、陽性細胞数を 40 倍と 100 倍の視野で計測し、grade0、grade1、grade2、grade3 の 4 段階で評価した。さらに組織学的所見と Garden stage、受傷から手術までの期間との関連を調査した。

3. 研究結果

TRAP 陽性細胞は 19 関節 (19%) で陽性であった。円靭帯・retinaculum 近傍、骨折部近傍で見られた。コントロールでも円靭帯近傍 (grade1) および retinaculum 近傍 (grade1) に陽性細胞を認めた。

HIF-1 α は 41 関節 (41%) で骨折部近傍の血管内皮細胞で陽性であった。grade1 が 25 関節、grade2 が 11 関節、grade3 が 5 関節で、コントロールは陰性であった。VEGF は 42 関節 (42%) で骨折部近傍の浮腫様組織で陽性であった。全例 grade1 で、コントロールは陰性であった。FGF-2 は 82 関節 (82%) で骨折部近傍の骨髄細胞で広く陽性であった (grade1: 45 関節、grade2: 21 関節、grade3: 16 関節)。また円靭帯近傍、retinaculum 近傍でも発現が見られた。

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

受傷後手術までの日数が3日以内の例と3日を超える例との組織所見の比較では、HIF-1 α とFGF-2で受傷後3日以内で陽性例が多い傾向があり、TRAP陽性細胞とVEGF発現については差を認めなかった。

4. 考察

TRAP陽性細胞は、大腿骨頸部骨折例ではcontrolと同様に円靭帯、retinaculum近傍に存在し、また骨折部近傍にも存在していた。

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

VEGFはproangiogenic growth factorで、骨細胞を刺激し骨の修復を促進する³⁾。またFGF-2は虚血下でVEGFと同等に血管新生を誘導する³⁾。VEGFは骨折部近傍の浮腫様組織に、FGF-2は骨髄細胞に広く発現し、特発性大腿骨頭壊死症でのreparative interfaceと同様の所見であった¹⁾。Garden stageや受傷後からの期間とは関連が見られなかったが、systemicには長管骨の骨折後2週でVEGF・FGF2の血中濃度が増加するとの報告もあり^{4),5)}、局所所見との差異がみられた。

5. 結論

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

6. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

坂井孝司 岩名大樹 西井孝 高尾正樹 北田誠 中村宣雄 吉川秀樹 菅野伸彦 大腿骨頸

部内側骨折における修復反応の組織学的検討
第24回日本整形外科学会基礎学術集会(平成21年11月 横浜)

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) Li W, Sakai T, Nishii T, Nakamura N, Takao M, Yoshikawa H, Sugano N. Distribution of TRAP Positive Cells and Expression of HIF-1 α , VEGF, and FGF-2 in the Reparative Reaction in Patients with Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Orthop Res* 27:694-700,2009
- 2) Okada Y, Tanikawa T, Iida T, Tanaka Y. Vascular injury by glucocorticoid; involvement of apoptosis of endothelial cells. *Clin Calcium* 17:872-877, 2007.
- 3) Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 8:980-989, 2003.
- 4) Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vecsei V, Aharinejad S. VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing. *J Orthop Res* 27:1293-1297, 2009.
- 5) Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 129: 989-997, 2009.

特発性大腿骨頭壊死症における修復反応に対する組織学的検討

坂井孝司、西井 孝、中村宣雄、高尾正樹、吉川秀樹、菅野伸彦

(大阪大学大学院医学系研究科 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症例 51 関節を対象に、修復過程を明らかにするため、TRAP 陽性細胞の発現様式と、HIF-1 α と proangiogenic growth factor である VEGF、FGF-2 の発現様式を免疫染色にて調査し、これまでにえられた所見と、X 線学的病期、病型、ステロイド使用の関係について検討した。TRAP 陽性細胞は、病早期では円靭帯や retinaculum 付着部周囲に見られ、病期の進行に伴い修復域全体にわたり新生骨梁周囲に見られるようになり、発現密度と病期には相関がみられた。HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 のいずれも境界域に存在し、HIF-1 α は主に血管内皮細胞や骨細胞で発現が見られ、VEGF は浮腫領域に、FGF-2 は修復域から正常域にかけて広く見られた。HIF-1 α の発現と病期には相関がみられ、FGF-2 の発現は手術時ステロイド使用例で有意に減少していた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ONFH)の修復過程を明らかにするため、大腿骨頭組織における TRAP 陽性細胞の発現様式と HIF-1 α と proangiogenic growth factor である VEGF、FGF-2 の発現様式を調査し、これまでにえられた組織学的所見と X 線学的病期、病型、ステロイド使用の関係について検討した。

2. 研究方法

対象は当科にて特発性大腿骨頭壊死症と診断した 42 例 51 関節、男性 18 例、女性 24 例、診断時平均 48 歳(22-80 歳)であった。関連因子はステロイド 35 関節、アルコール 15 関節、狭義の特発性 1 関節であった。X 線学的病期は Stage1 が 1 関節、Stage2 が 3 関節、Stage3A が 9 関節、Stage3B が 21 関節、Stage4 が 17 関節であった。病型は typeC1 が 14 関節、typeC2 が 37 関節であった。手術時に摘出した大腿骨頭組織について、ホルマリン固定し冠状断にてスラブを作成し、6 関節は非脱灰、45 関節は EDTA による脱灰後、HE 染色、TRAP 染色を施行した。脱灰した 45 関節に対し抗 HIF-1 α 抗体(monoclonal rabbit IgG)、抗 VEGF 抗体(monoclonal rabbit IgG)、抗 FGF-2 抗体(polyclonal rabbit IgG)による免疫染色を

施行し、TRAP 陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 各々の発現が壊死域、境界域、正常域の各領域における分布状況と分布の密度、また組織所見が X 線学的病期、病型、ステロイド使用との関連があるかを調査した。境界域は fibrous area、transitional area、edematous area の 3 つに分類して評価した。また分布密度に関しては、陽性細胞数を 40 倍の視野で計測し、grade0、grade1、grade2、grade3 の 4 段階で評価した。

3. 研究結果

TRAP 陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 発現の分布を図 1 に示す。TRAP 陽性細胞は全例で境界域に見られた。さらに retinaculum 付着部や円靭帯近傍にも見られた。病期が進行するにつれて境界域で見られる範囲が広がっていた。TRAP 陽性多核細胞は壊死骨梁周囲、新生骨梁周囲のいずれにも存在した。Stage が進行するにつれて壊死骨梁が少なくなり、新生骨梁周囲で見られる細胞が多くなっていた。

HIF-1 α は 45 関節中 41 関節(91%)で境界域の近位側の fibrosis area と transitional area の血管内皮細胞に発現が見られた VEGF は 45 関節中 42 関節(93%)で reparative interface zone の遠位側にあたる