

edematous area で陽性であった。FGF-2 は 45 関節中 43 関節 (95%) で reparative interface zone 及び正常域で広く陽性であった。

X 線学的病期と組織所見の比較 (表 1) では、TRAP 陽性細胞の分布と HIF-1 α 発現は stage III/IV 例で有意に多かった。VEGF と FGF-2 については stage I/II と stage III/IV 例で差を認めなかった。病型と組織所見の比較 (表 2) では、C1 例と C2 例で差を認めなかった。

またステロイド関連と組織所見の比較 (表 3) では、ステロイド関連例と非ステロイド関連例で差を認めなかったが、手術時にステロイドを使用していた例と非使用例 (表 4) では、FGF-2 発現に有意差を認め、ステロイド使用例で明らかに発現が少なかった。

図1 TRAP陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2の分布

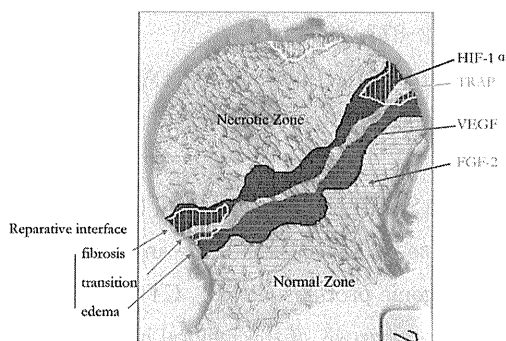


表1 X線学的病期と組織評価の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	stage I/II	0	3	1	0	0.035
	stage III/IV	0	9	20	18	
HIF-1 α	stage I/II	0	1	3	0	0.025
	stage III/IV	2	21	14	4	
VEGF	stage I/II	1	0	2	1	N.S.
	stage III/IV	2	19	12	8	
FGF-2	stage I/II	1	0	2	1	N.S.
	stage III/IV	1	13	23	4	

(Chi-square test)

表2 病型と組織評価の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	C1	0	8	16	13	N.S.
	C2	0	4	5	5	
HIF-1 α	C1	1	17	11	2	N.S.
	C2	3	5	4	2	
VEGF	C1	1	16	8	6	N.S.
	C2	2	3	6	3	
FGF-2	C1	1	10	18	2	N.S.
	C2	1	3	7	3	

(Chi-square test)

表3 ステロイド関連例と組織評価の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	steroid+	0	7	13	16	N.S.
	-	0	5	8	2	
HIF-1 α	steroid+	3	15	9	4	N.S.
	-	1	7	6	0	
VEGF	steroid+	3	12	10	6	N.S.
	-	0	7	4	3	
FGF-2	steroid+	2	8	18	3	N.S.
	-	0	5	7	2	

(Chi-square test)

表4 手術時ステロイド使用例と組織評価の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	steroid+	0	3	7	2	N.S.
	-	0	9	14	16	
HIF-1 α	steroid+	2	3	3	2	N.S.
	-	2	19	12	2	
VEGF	steroid+	0	4	3	3	N.S.
	-	3	15	11	6	
FGF-2	steroid+	3	7	0	0	0.005
	-	1	6	23	5	

(Chi-square test)

4. 考察

実験的外傷性骨壊死モデルにおける TRAP 陽性細胞の分布については報告されているが¹⁾、特異性大腿骨頭壊死症の骨頭組織に対する臨床例での TRAP 染色の報告はこれまでにない。本研究において、Stage3A のような圧潰が軽度のみ生じている例では境界域の軟骨下領域 (retinaculum 付着部周囲) や円靭帯付着部周囲のみに TRAP 陽性細胞が存在することから、TRAP 陽性細胞が血流によって recruit され、Stage3B、Stage4 と病期が進むにつれて骨頭中央の境界域へも存在が広がっていくと考えられた。

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⁾。内皮細胞でのアポトーシスを引き起こし、高濃度のグルココルチコイドとともに血管損傷を引き起こして骨壊死発生に関連すると考えられている。本研究では境界域の壊死域側に存在する細胞に発現が見られた。血管周囲にもみられ、内皮細胞由来の細胞と考えられた。

VEGF は proangiogenic growth factor で、骨細胞を刺激し骨の修復を促進する³⁾。低酸素下では HIF-1 α 、HIF-2 α が核へ移行して作用し、VEGF-A の転

写を誘導する³⁾。Radkeらは、特発性大腿骨頭壊死症の core biopsy の組織に対する抗 VEGF 抗体による免疫染色を施行し、浮腫領域に陽性であったと報告し⁴⁾、本研究の結果と一致している。

FGF-2 は、虚血条件下で VEGF と同等に血管新生を誘導し、成熟度の高い血管新生が誘導される。Nakamaeらは、血管束移植と FGF-2 投与によって壊死骨での angiogenesis が促進されると報告している⁵⁾。本研究では FGF-2 は境界域で、血管壁や骨髄細胞に広く発現が見られ、手術時にステロイドを使用していた例で明らかに発現が少なかった。これはステロイドによる修復反応の阻害を示す事例と考えられるが、今後の更なる検証が必要であると考えられた。

VEGF、FGF-2 の発現と X 線学的病期との関連は明確ではなかった。本研究では骨壊死が発生してから、ほとんどの例で圧潰をきたして手術の適応となるまで長期間が経過した症例を対象としており、決して早期からの修復反応をみているわけではない。早期からの修復反応における HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 の発現を検討するため、現在大腿骨頸部骨折例を対象として調査を進めている。

5. 結論

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って新生骨梁周囲にみられた。HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 のいずれも境界域を中心に存在することが確認され、HIF-1 α は壊死域に近接する修復域近位に、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。

6. 研究発表

1. 論文発表

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. 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) Kim HKW, Randall TS, Bian H, Jenkins J, Garces A, Bauss F. Ibandronate for prevention of femoral head deformity after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in immature pigs. J Bone Joint Surg Am 87-A: 550-557, 2005.
- 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) Radke S, Battmann A, Jatzke S, Eulert J, Jakob F, Schutze N. Expression of the angiogenic proteins CYR61, CTGF, and VEGF in osteonecrosis of the femoral head. J Orthop Res 24:945-952, 2006.
- 5) Nakamae A, Sunagawa T, Ishida O, Suzuki O, Yasunaga Y, Hachisuka H, Ochi M. Acceleration of surgical angiogenesis in necrotic bone with a single injection of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). J Orthop Res 22:509-513, 2004.

股関節疾患における大腿骨頭の組織学的検討

—特発性大腿骨頭壊死症との比較—

坂井孝司、西井孝、高尾正樹、阿部裕仁、安藤渉、田村理、中村宣雄、大園健二、菅野伸彦、(大阪大学大学院医学研究科 整形外科)

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

1. 研究目的

骨脆弱性素因を有さない例も含めた骨頭下軟骨下骨折(SFFH)は、軽微な外傷あるいは誘因なく発症し、MRI で骨頭荷重部に局所的異常信号領域や骨頭内浮腫像を認めると報告され、骨頭壊死症の鑑別疾患の一つとなっている^{1)~4)}。

一方 Postel らは 6-12 か月で股関節の破壊が進行し、激しい股関節痛をきたす疾患群を急速破壊型股関節症(RDC)として報告した⁵⁾。RDC は大腿骨頭壊死症の鑑別診断の一つで、種々の mechanical factor やサイトカインとの関わりが報告されている^{6)~10)}。何らかの initial episode に引き続き osteoclast が活性化し骨破壊に関わっている。

本研究の目的は、SFFH、RDC のみならず関節リウマチ(RA)も含めた股関節疾患について、大骨頭組織を対象に、主に HE 染色以外の組織学的な特徴を明らかにすることである。

2. 研究方法

対象は、SFFH10 関節、RDC45 関節、RA12 関節と前回よりも症例数が増加し、これまでに報告してきた ION51 関節¹¹⁾と比較した。大腿骨頭組織を作成し、HE、TRAP 染色を行い TRAP 陽性細胞の分布や集簇の有無について調査した。40 倍の視野で 50 個以上の TRAP 陽性細胞を認めた場合集簇とした。また抗 RANKL、MMP-9、CD-68 抗体による免疫染色を行った。

3. 研究結果

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

TRAP 染色では、SFFH で TRAP 陽性細胞は、軟骨下骨梁骨折周囲に存在する仮骨周囲にそって存在した。陽性細胞は多核細胞が多く osteoclast と思われた。RDC では、TRAP 陽性細胞は、軟骨下領域の線維性組織・骨梁周囲に集簇し、陽性細胞について、多核細胞は osteoclast と思われたが、単核細胞も多く存在した。TRAP 陽性細胞は SFFH10 例中 8 例に存在したが、集簇は認めなかった。RA では 12 例中 11 例(92%)に TRAP 陽性細胞が存在し、そのうち 3 例に集簇を認めた。RDC では 35 例(78%)で TRAP 陽性細胞の集簇を認め、特徴的であった。なお ION では全例に TRAP 陽性細胞を認めたが、集簇は認めなかった。

免疫染色について、SFFH 例では、10 例中 RANKL 陽性は 2 例(20%)で、MMP-9、CD68 の発現を破骨細胞と思われる多核細胞に各々 7 例、10 例で認

めた。RA では 3 例(25%)で RANKL の発現を認め、MMP-9、CD68 の発現を各々 11 例(92%)、12 例(100%)に認めた。RDC では 35 例(78%)で RANKL の発現を認め、MMP-9、CD68 の発現を 41 例(93%)に認めた。なお ION では RANKL の発現を Stage3B1 例に、MMP-9、CD68 の発現を 10 例(20%)に認めたのみであった。

4. 考察

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

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

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

5. 結論

SFFH では軟骨下骨梁骨折周囲の仮骨に沿って、RA では軟骨下骨梁に沿って TRAP 陽性細胞を認めた。RDC では軟骨下領域に TRAP 陽性細胞の集簇を認め、また RANKL は骨梁にそった lining cell や線維組織内の細胞に多く発現し、骨破壊に関与している可能性が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

坂井孝司 西井孝 高尾正樹 阿部裕仁 安藤 渉 田村理 中村宣雄 大園健二 吉川秀樹 菅野伸彦 大腿骨頸部軟骨下骨折と急速破壊型股関節症の組織学的検討 第 38 回日本股関節学会

(平成 23 年 10 月 7 日・8 日鹿児島)

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

該当なし。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

- 1) Song WS, Yoo JJ, Koo KH, Yoon KS, Kim YM, Kim HJ. Subchondral fatigue fracture of the femoral head in military recruits. *J Bone Joint Surg Am* 86-A: 1917-24, 2004.
- 2) Kim JW, Yoo JJ, Min BW, Hong SH, Kim HJ. Subchondral fracture of the femoral head in healthy adults. *Clin Orthop Relat Res* 464:196-204, 2007.
- 3) Yamamoto T, Nakashima Y, Shuto T, Jingushi S, Iwamoto Y. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head in young adults. *Skeletal Radiol* 36:S38-42, 2007.
- 4) Ishihara K, Miyanishi K, Ihara H, Jingushi S, Torisu T. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head may be associated with hip dysplasia: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 468:1331-5, 2010.
- 5) Postel M and Kerboull M. Total prosthetic replacement in rapidly destructive arthrosis of the hip joint. *Clin Orthop Relat Res* 72:138-144, 1970.
- 6) Komiya S, Inoue A, Sasaguri Y, Minamitani K, Morimatsu M. Rapidly destructive arthropathy of the hip. Studies on bone resorptive factors in joint fluid with a theory of pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 284:273-82, 1992.
- 7) Tamai M, Sagawa K, Kawabata R, Inoue A, Itoh K. Production of IL-6 by T cells from the femoral head of patients with rapidly destructive coxopathy (RDC). *Clin Exp Immunol* 103:506-13, 1996.

- 8) Sugano N, Ohzono K, Nishii T, Sakai T, Haraguchi K, Yoshikawa H, Kubo T. Early MRI findings of rapidly destructive coxopathy. *Magnetic Resonance Imaging* 19:47-50, 2001.
- 9) Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheumatism* 46:2625-31, 2002.
- 10) Yamamoto T, Takabatake K, Iwamoto Y. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head resulting in rapid destruction of the hip joint: a sequential radiographic study. *AJR* 178:435-7, 2002.
- 11) Li W, Sakai T, Nishii T, Nakamura N, Takao M, Yoshikawa H, Sugano N. Distribution of TRAP Positive Cells and Expression of HIF-1 α , VEGF, and FGF-2 in the Reparative Reaction in Patients with Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Orthop Res* 27:694-700, 2009
- 12) Yamamoto T, Iwamoto Y, Schneider R, Bullough PG. Histopathological prevalence of subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Ann Rheum Dis* 67:150-3, 2008.
- 13) 坂井孝司 菅野伸彦 中村宣雄 安藤渉 西井孝 高尾正樹 山村在慶 岩名大樹 花之内健仁 吉川秀樹 急速破壊型股関節症におけるTRAP陽性細胞の発現様式 *Hip Joint* 34:755-7, 2008.
- 14) Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, Hashimoto J, Suzuki R, Yoshikawa H, Ochi T. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 62:196-203, 2003.

酸化誘発剤の単回投与によるラット骨壊死モデル

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

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

1. 研究目的

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

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

2. 研究方法

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

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

3. 研究結果

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

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

4. 考察

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

5. 結論

ラットに酸化誘発剤を単回投与することで、ラットの

腿骨頭に薬剤投与後7日で約40%の骨壊死を認めた。骨内のイベントは酸化誘発剤投与から3日目頃までに発生していると考えた。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

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) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M et al: Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci* 2004;9:509-15.
- 2) 北村憲司: 常用量のグルタチオンによるステロイド性骨壊死の抑制効果の検討. *金沢医科大学雑誌* 2005;30:245-52
- 3) Ichiseki T, Ueda Y, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione depletion induced osteonecrosis in rats. *Rheumatology.* 45:287-290,2006
- 4) 三秋恒平. 日本白色家兎に対する酸化ストレス誘発剤を用いた骨壊死誘発実験. *金沢医科大学雑誌* 31:1-6,2006
- 5) Yamamoto T, Iriya T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 1997;40:2055-64
- 6) Sato M, Sugano N, Ohzono K, Nomura S, Kitamura Y, Tsukamoto Y, Ogawa S. Apoptosis and expression of stress protein (ORP150, HO1) during development of ischemic osteonecrosis in the rat. *J Bone and*

Joint Surg. 83-B(5):751-759,2001

- 7) Mary Catto. A Histological Study of Avascular Necrosis of the Femoral fracture. *J. Bone and Joint Surg.* 47-B(4):749-776,1965

- 8) 辻宗啓、松野丈夫、伊藤浩、寺西正、池田仁、吉木啓. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班平成15年度研究報告書: 45-47,2003

酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける虚血性変化

金子聖司、市堰徹、兼氏歩、中川慎太郎、三上友明、福井清数、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、酸化誘発剤(BSO)投与後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 α の発現を観察した。骨内では免疫組織学検討では BSO 投与後 6 時間で HIF-1 α 陽性を認め、Western blot 法では BSO 投与後 3 時間で HIF-1 α の発現の増強を認めた。また、腹部大動脈では Western blot 法にて BSO 投与後 1 時間で HIF-1 α の発現を認めた。本モデルでは薬剤投与後、非常に早期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¹⁾。

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。我々は、同ラット骨頭壊死モデルにおいて組織の低酸素状態の指標である HIF-1 α を用いて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。また、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った。

2. 研究方法

BSO 単回投与ラット大腿骨頭壊死モデル²⁾(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

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

BSO 投与、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

項目1)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 α の発現について検討した。実験1の6時間群で HIF-1 α の陽性所見を認めたので、BSO 投与後 1 時間、3 時間の群を加えて検討を行った。項目2)ラットの腹部大動脈から蛋白質を抽出し、Western blot 法にて HIF-1 α の発現について検討した。BSO 投与後 1 時間、3 時間、6 時間、12 時間、1 日、3 日、5 日、7 日に犠牲死とした群で検討を行った。

3. 研究結果

実験1の結果

HIF-1 α 陽性細胞は N 群でははっきりとした発現を認めないが、B6 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の結果

項目1)n群では HIF-1 α 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。

項目2)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

HIF-1 α 、hypoxia-inducible factor-1 α 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 α 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 α 蛋白質の濃度は上昇するとされている。³⁻⁴⁾本検討では、免疫組織学的検討において HIF-1 α 陽性細胞はn群と比較し、B6 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6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 α 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 α 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。また、腹部大動脈では BSO 投与後1時間以降の群で HIF-1 α 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 α 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。²⁾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を含めた一過性の病態も検索する必要があると考えた。

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。また、腹部大動脈においても全ての個体で早期に低酸素状態が生じた可能性がある。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

- 1) 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

2. 学会発表

- 1) 金子聖司、市堰徹、兼氏歩、杉森端三、福井清数、北村憲司、三上友明、中川慎太郎、松本忠美
酸化誘発ラット骨壊死モデルにおける骨内の HIF-1 α の発現
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

Paze271-274(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
Paze752-756(2000.09)

家兎骨壊死モデルにおけるステロイド投与後早期の血管内ストレス

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

ステロイドを投与した家兎における骨内での早期の変化を調査することを目的とし、ステロイド性骨壊死モデルにおいてマクロファージに注目して検討した。対照群家兎5羽、実験群としてステロイド 40 mg/kg 投与し 24 時間、72 時間、120 時間で犠牲死とした各5羽、14 日経過時に犠牲死とした家兎 15 羽について、抗 MAC 抗体にて免疫組織学的検討を行い、本モデルでの骨壊死好発部位である大腿骨近位部を検討した。ステロイド投与後 24 時間から血管内の単球系マクロファージは血管内皮上に接着しているものが観察できた。72 時間群および 120 時間群では血管外にでたマクロファージが主であった。14 日後では骨壊死の発生した部位周辺に多くのマクロファージが観察できた。

ステロイド投与後 24 時間のマクロファージの動きから 24 時間以内で血管内に強いストレスが加わっていることが確認できた。14 日目の反応は壊死周囲の修復反応と考えられた。本モデルにおける機序の検討はステロイド投与後 24 時間を中心に行うことが重要であることが示唆された。

1. 研究目的

近年、ステロイド性骨壊死動物モデルを使用したステロイド投与後早期の変化に注目した検討が報告されている。骨内の虚血に注目した実験としては、VEGF がステロイド投与後3-5日の骨髓造血細胞に発現していることから、虚血などの低酸素状態がステロイド投与後かなり早期に発生していることが示唆されている¹⁾。また我々は、虚血や血管障害を誘発する因子である酸化ストレスに注目した実験として、骨内細胞がステロイド投与後少なくとも5日以内に DNA 酸化障害に陥っていることも報告した²⁾。これらの報告から、ステロイド投与後早期の段階ですでに骨壊死発生の Event が生じていることが考えられる。

血管で低酸素性のストレスが生じた際に鋭敏に反応する細胞としてマクロファージがあげられ、虚血との強い関連が示されている^{3),4)}。

本実験では、ステロイド投与後早期のマクロファージの動きに注目し、骨内血管での低酸素状態に陥る時期について検討した。

2. 研究方法

実験動物には、体重約 3.5 kg の成熟雌性日本白色家兎を使用した。本研究のプロトコールは金沢医科大学

動物実験指針に基づいて行った。まず、MP40 mg/kg を右側殿筋内に単回投与し、24 時間、3 日、5 日、14 日で犠牲死とした各群を A 群(5 羽)、B 群(5 羽)、C 群(5 羽)、D 群(15 羽)とした。

検討項目

1、病理組織学的検討

家兎にて骨壊死の好発部位とされている大腿骨近位内側部周辺領域を中心とした H-E 染色標本にて骨壊死発生の有無について検討した。骨壊死の定義は、Yamamoto らの定義⁵⁾に基づき判定した。

2、免疫組織学的検討

抗 MAC387 抗体を使用し、各群におけるマクロファージの動態を免疫組織学的に検討した。

3. 研究結果

1、病理組織学的検討

D 群でのみ骨壊死の発生を認めた。H-E 染色標本にて 15 羽中、14 羽に骨細胞の empty lacunae、また周囲の造血細胞、脂肪細胞の壊死を認め、骨壊死発生率は 93%であった。

2、免疫組織学的検討

N 群ではほとんど陽性所見は認めず、マクロファージの動きが確認出来なかった。A 群では本モデルにおけ

る骨壊死好発部位とされている大腿骨近位内側骨幹部付近の血管内で単球系マクロファージが血管内皮に接着している所見が得られた。また、同部位周辺におけるB群およびC群では血管内から組織に出たマクロファージが確認できた。D群では骨壊死の周囲を取り囲むように多数のマクロファージが出現していた。

4. 考察

ステロイド性骨壊死の発生機序とされている虚血などの血流障害の時期を知ることは、骨壊死発生の機序の解明および予防法を確立する上で非常に重要となる。これまで、ステロイド性骨壊死における血管に注目した報告としては、Nishimuraらは家兎にステロイドを週1回8週間投与したモデルで、静脈系において内膜における泡沫様細胞の増加や中膜の空胞化を認めたとしている⁸⁾。しかしながらこの報告は、骨壊死発生後の事象を捉えている可能性が考えられる。

骨壊死発生の機序解明には、ステロイド投与後早期の、少なくとも骨壊死が生じるより前の骨内血管内での状態を捉えることが重要である。

今回の検討では、A群ですでに血管内のマクロファージの動きを認めたことから考えると、ステロイド投与後少なくとも24時間以内に血管内に非常に強いストレスがかかっていることが示唆された。また、D群での反応は骨壊死周囲のみに認められており、修復反応により起こっていることが考えられた。

本実験結果より、本モデルにおける骨内の血管内での低酸素性のEventは少なくともステロイド投与後24時間以内であることが確認できた。すなわち、ステロイド投与後24時間以内が、これまで動物モデルにおいて骨壊死発生率の抑制が報告されている薬剤(脂質代謝改善薬や抗酸化剤)のターゲットとなる時期であることが考えられた。

5. 結論

本実験結果より、本モデルにおける骨内の血管内での低酸素性のEventは少なくともステロイド投与後24時間以内であることが確認できた。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、福井清数、三上友

明、中川慎太郎、北村憲司、松本忠美:ステロイド性骨壊死における酸化ストレスの関与と抗酸化剤による骨壊死抑制、第37回日本関節病学会、横浜、2009.11.19

2) T.Ichiseki, A.Kaneuji, T.Sugimori, K.Fukui, K.Kitamura, T.Mikami, S.Nakagawa, T.Matsumoto: Prophylactic effect of antioxidant vitamins against osteonecrosis after steroid administration in a rabbit model. Association Research Circulation Osseous 15th International Symposium on Bone Circulation (ARCO 2009) Yokohama. 2009.11.17

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. *J Rheumatol.* 2008;35:2383-90

2) Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda Y, 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 Apr;44(4):456-60

3) De Palma M, Naldini L. Role of hematopoietic cells and endothelial progenitors in tumour angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Aug;1766(1):159-66

4) Ito T, Tsukada T, Ueda M, Wanibuchi H, Shiomi M. Immunohistochemical and quantitative analysis of cellular and extracellular components of aortic atherosclerosis in WHHL rabbits. *J Atheroscler Thromb.* 1994;1(1):45-52

5) Yamamoto T, Irita T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 1997;40:2055-64

- 6) Nishimura T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K.
Histopathologic study of veins in steroid treated
rabbits. Clin Orthop Relat Res. 1997;334:37-42.

ステロイド性骨壊死予防の可能性-抗酸化ビタミンを使用した検討-

三上友明、市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、福井清教、北村憲司、中川慎太郎、松本忠美
(金沢医科大学 整形外科)
上田善道、勝田省吾
(金沢医科大学 病理学Ⅱ)

当科ではこれまで骨壊死発生には酸化ストレスが関与していることに注目し、グルタチオンで骨壊死が抑制されることを報告してきた。今回、抗酸化力の強いとされるビタミン E を家兎に投与し、骨壊死発生予防の可能性に関して検討した。使用した動物モデルは骨壊死の再現性を高くする為に、MPSL40 mg/kg を 1 回殿筋内に筋注した家兎とし、ステロイド筋注のみを S 群、ステロイドに加えてビタミン E を連日静注した E 群を作成して、病理組織学的、血液生化学的検査を行った。E 群では骨壊死抑制の可能性が示唆された。

1. 研究目的

これまでに当科では、近年種々の疾患で関与が報告されている生体内酸化ストレスに注目し、家兎に対してステロイド投与後早期に DNA 酸化障害が発生していること、またステロイド投与家兎骨壊死モデルを用いて抗酸化剤であるグルタチオン投与により骨壊死発生が有意に抑制されたことを報告し、骨壊死と酸化ストレスとの関係についての検討を行ってきた¹⁻²⁾。

ステロイド投与家兎骨壊死モデルに対して、グルタチオンを大量投与した結果、骨壊死発生率は 0%と十分な抑制効果が確認できた。しかし、同モデルに対して臨床的な常用量であるグルタチオンを投与した際には、骨壊死発生率は 30%と有意な抑制効果は認められたが、その効果は完全ではなかった。従って、更なる予防効果が期待できる、臨床的に安全で一般的に使用されている薬剤が必要と考えられる。

最近ではグルタチオンを含めた抗酸化物質の内、特に効果が強いといわれている抗酸化ビタミンが注目されている³⁾。臨床においても、心疾患など酸化ストレス関連疾患に対して発症予防目的によく利用されており、十分な予防効果が報告されている。抗酸化ビタミンの中ではビタミン E が特に抗酸化作用を有しており、また一般的に臨床で使用され、安全性も高いといわれている。従って、抗酸化作用を有するビタミン E を投与することによりステロイドによる生体内酸化ストレスを抑制することができれば、骨壊死発生を予防できる可能性が考えられる。

従って、本研究の目的はステロイド投与家兎骨壊死モデルを使用し、ビタミン E による骨壊死発生抑制効果に

関して検討することである。

2. 研究方法

実験1:酢酸メチルプレドニゾロン(以下 MPSL) 40 mg投与群の作成

体重約 3.5 kgの成熟雌性日本白色家兎に対し MPSL40 mgを 1 回のみ殿筋内に筋注した 15 羽を S 群とした。

実験2:MPSL+ビタミン E 投与群の作成

実験1と同様に MPSL40 mg投与した家兎に対してビタミン E を 50 mg/kg 連日静注した 10 羽を E 群とした。

両群 2 週間後に犠牲死とし、各群において下記の(1)、(2)を検討した。

(1) 病理組織学的検討

2 週間後に犠牲死とした家兎の両側大腿骨を摘出し、各群において H-E 染色標本作製し、光学顕微鏡にて大腿骨近位内側部における骨壊死の有無について検討した⁴⁾。

(2) 血液生化学的検討

酸化ストレスの指標としてグルタチオン(GSH)値を測定した⁵⁾。当科の研究にて、ステロイド投与後早期に生体内酸化が生じていることが示唆されている為⁶⁾、ステロイド投与後早期に集中し、MPSL 投与前、1、3、5、7、14 日目に採血を行った。

3. 研究結果

実験1:

(1) S群では15羽中、14羽に骨壊死を認め、骨壊死発

生率は93%であった。

- (2) S群ではMPSL投与後、1日目から急激にGSH値の低下を認め、7日目まで統計学的に有意なGSH値の低下を認めた($P < 0.05$)

実験2:

- (1)E群では、骨壊死は10羽とも認めなかったが、骨髄壊死を1羽に認め、今回骨壊死発生率は10%とカウントした。有意に骨壊死発生率は抑制されていた($P < 0.05$)。
- (2)E群ではS群と比較して、MPSL投与1日目、3日目でGSH値の低下が有意に抑えられていた($P < 0.05$)。

4. 考察

通常、生体内では酸化還元バランスは平衡に保たれている。しかし、過剰のステロイドが投与されると、酸化還元バランスが崩れ、生体内に過剰の酸化ストレスが加わることになる。つまり、生体内で過酸化の連鎖反応が起こり、最終産物である過酸化物質が体内に蓄積することになる。生体内に過酸化物質が蓄積すると、更に酸化還元バランスが崩壊し、酸化ストレスが増加するという負のサイクルを生じることになる。

今回検討したビタミンEは、過酸化反応の連鎖を停止させ、過酸化物質の蓄積を抑制する効果を有する。本実験より直接的な抗酸化作用を有しているビタミンEを投与することによって有意な骨壊死抑制効果が確認できた。

5. 結論

本実験よりステロイド性骨壊死モデルに対してビタミンEを投与することで、骨壊死発生抑制効果が確認できた。ビタミンEは臨床的にも十分応用可能であり、ステロイド性大腿骨頭壊死症の予防法として期待できることが示された。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mikami T, Ichiseki T, Kaneuji A, Ueda Y, Sugimori T, Fukui K, Matsumoto T. Prevention of steroid-induced osteonecrosis by intravenous administration of vitamin E in a rabbit model. J Orthop Sci. 2010 Sep;15(5):674-7

2. 学会発表

- 1) 三上友明、市堰 徹、兼氏 歩、北村憲司、福井清数、中川慎太郎、杉森端三、松本忠美:ステロイド

投与家兎における抗酸化ビタミンを用いた骨壊死予防についての検討、第36回日本股関節学会、京都、2009.10.31

- 2) 市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、福井清数、三上友明、中川慎太郎、北村憲司、松本忠美:ステロイド性骨壊死における酸化ストレスの関与と抗酸化剤による骨壊死抑制、第37回日本関節病学会、横浜、2009.11.19

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M et al: Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. J Orthop Sci 2004;9:509-15.
- 2) 北村憲司:常用量のグルタチオンによるステロイド性骨壊死の抑制効果の検討. 金沢医大誌 2005;30:245-52
- 3) 足立 寿、今泉 勉: 抗酸化物質. The lipid 2003, Vol.14:40-45.
- 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;40:2055-64
- 5) 近藤宇史、井原義人: レドックス基礎医学 グルタチオンシステム. 淀井淳司、松尾禎之(編)、医学のあゆみ別冊レドックス-ストレス予防の医学、東京、医歯薬出版、2005;14-8
- 6) Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda Y, 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 Apr;44(4):456-60

未成熟家兎におけるステロイド性骨壊死の検討

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

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

1. 研究目的

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

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

2. 研究方法

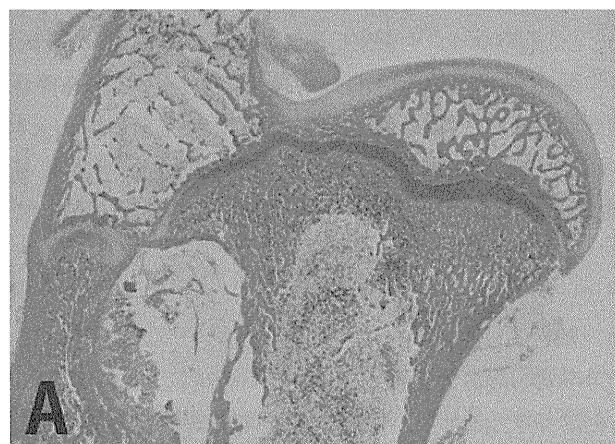
未成熟家兎は骨端軟骨が残存している家兎と定義し、15 週齢の家兎を用いた(図 1A)。成熟家兎は骨端軟骨が消失している家兎と定義し、30 週齢の家兎を用いた(図 1B)。15 週齢の未成熟雄家兎 20 羽、30 週齢の成熟雄家兎 20 羽を対象とし、メチルプレドニゾロン 20 mg/kg を一回右殿筋内に筋注し、2 週で犠牲死とした。また、ステロイド投与前から犠牲死まで各週採血を行った。

評価項目として、両群の壊死発生率、脂質、血小板など一般血液検査を比較した。骨壊死は、両大腿骨及び上腕骨の近位 1/3 及び遠位部(計 8 部位)の HE 染色標本を用いて病理組織学的に判定した³⁾。

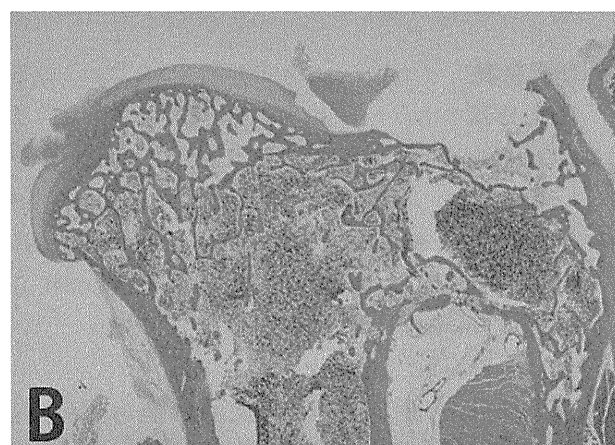
さらに、骨壊死発生率に関する要因として、CYP3A 活性と硝酸イオンを評価した。CYP3A 活性として、CYP3A が代謝酵素であるミダゾラムを 0.5mg/kg 静注し、60 分後のミダゾラムとミダゾラム代謝物の血中濃度比を算出したもの指標として用い、ステロイド投与前と投与 48 時間後で評価した。また、体内では不安定な NO を

評価する指標として一酸化窒素の酸化分解物である硝酸イオンを測定した。

図 1 大腿骨近位



(A) 未成熟家兎 骨端軟骨が残存している。



(B) 成熟家兎 骨端軟骨は消失している。

3. 研究結果

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

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

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

血小板値は各週とも未成熟家兔群が有意に高値であった(図 5)。

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

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

図 2 骨壊死発生率

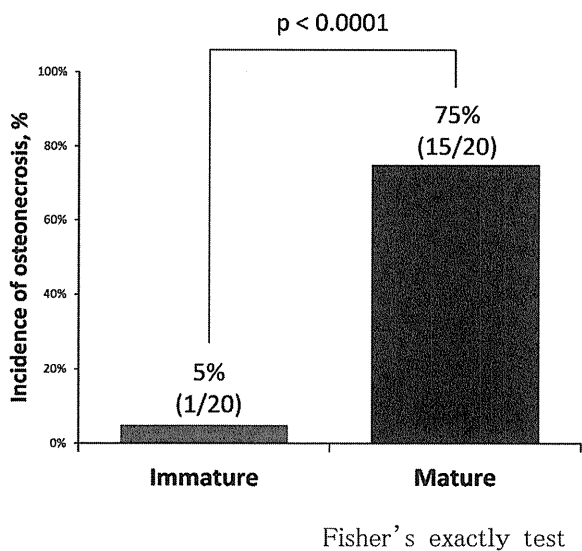
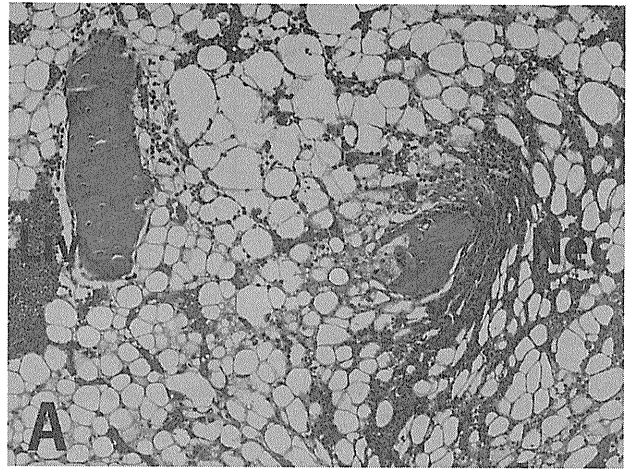
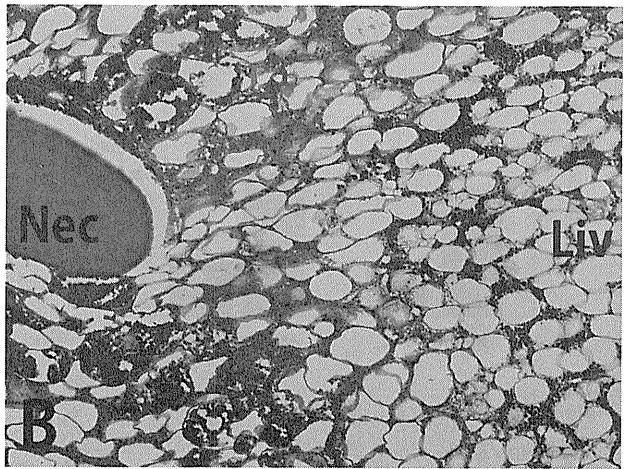


図 3 骨壊死病理組織像(HE 染色 ×100)



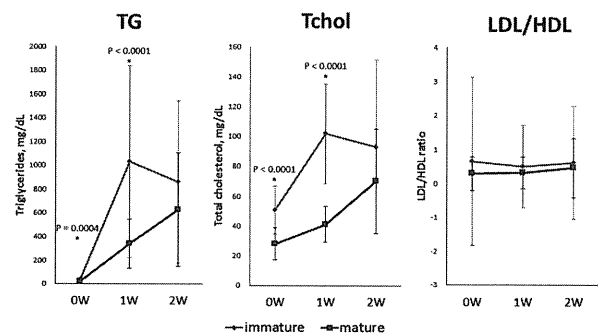
(A) 未成熟家兔骨壊死組織像



(B) 成熟家兔骨壊死組織像

図 4 脂質

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



Mann-Whitney U test

図5 血小板数

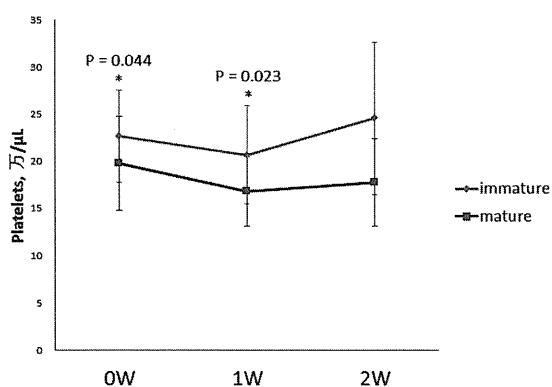
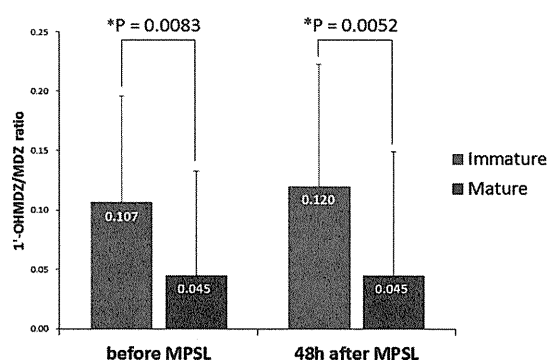
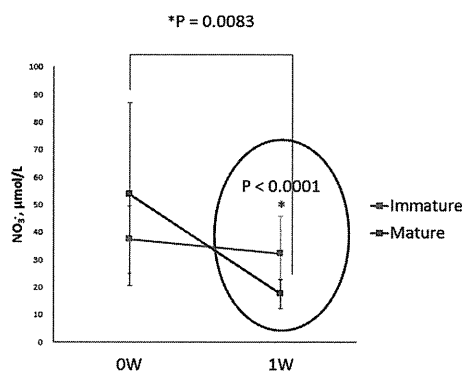


図6 CYP3A 活性



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

図7 硝酸イオン



4. 考察

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

家兔における骨壊死発生に関する要因として、中性脂肪値や LDL/HDL 比といった血清脂質が関与していたとの報告がある^{4,5)}。本研究では中性脂肪、コレステロール、血小板とも、骨壊死発生が少ない未成熟家兔群

で高値であり、LDL/HDL 比に有意な差は認められず、本研究の結果には血清脂質の関与は認められなかった。

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

また、硝酸イオンは未成熟家兔で有意に低下しないという結果であった。ステロイド性大腿骨頭壊死において NO や endothelin-1 などの血管収縮因子を介した虚血発生の可能性が報告されており⁸⁾、未成熟家兔では NO 産生が低下しにくくステロイド性骨壊死が起きにくい可能性が示唆された。

5. 結論

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

6. 研究発表

1. 論文発表
 - 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兔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髓浮腫像の発生部位. 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: 成熟度の異なる家兔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: 家兔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: 未成熟及び成熟家兔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における骨髓浮腫像の検討. 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) Stern PJ, Watts HG. Osteonecrosis after renal transplantation in children. J Bone Joint Surg Am. 1979 Sep;61(6A):851-6.
- 2) Nakamura J, Saisu T, Yamashita K, Suzuki C, Kamegaya M, Takahashi K. Age at time of corticosteroid administration is a risk factor for osteonecrosis in pediatric patients with systemic lupus erythematosus: a prospective magnetic resonance imaging study. Arthritis Rheum. 2010 Feb;62(2):609-15.
- 3) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum. 1997 Nov;40(11):2055-64.
- 4) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jinguishi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density

lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology*. 2001 Feb;40(2):196-201

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