

ステロイド性家兎骨壊死モデルにおける CYP3A 活性の性差に関する検討

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

成熟日本白色雄家兎 20 羽(雄群)、雌家兎 20 羽(雌群)を対象として、メチルプレドニゾロン(MPSL)20mg/kg 投与前、投与後 48 時間の CYP3A 活性を測定した。骨壊死発生率は雄群 75%(15/20 羽)、雌群 30%(6/20 羽)であり、雄群の骨壊死発生率が有意に高かった($P < 0.05$)。CYP3A 活性に関しては、MPSL 投与前、投与後 48 時間共に雌群が雄群に比し有意に高かった($P < 0.05$)。また、雄群の CYP3A 活性は、MPSL 投与前、投与後 48 時間で不変であったのに対して、雌群では有意に上昇していた。本研究結果から、CYP3A 活性の性差が骨壊死発生率の性差に関連している可能性が示唆された。

1. 研究目的

ステロイド性家兎骨壊死モデルでは、骨壊死発生率に性差(雄>雌)を認めることが報告されている¹⁾。また、ステロイドの代謝酵素である CYP3A 活性の個体差が、骨壊死発生に関連していることが報告されている²⁾。本研究の目的は、ステロイド性家兎骨壊死モデルにおける CYP3A 活性の性差を検討することである。

2. 研究方法

成熟日本白色雄家兎 20 羽(雄群)、雌家兎 20 羽(雌群)を対象とした。MPSL20mg/kg を 1 回右殿筋内に筋注、2 週で犠牲死とし兩大腿骨、上腕骨の 8 領域における骨壊死発生を病理組織学的に検討した³⁾。CYP3A 活性に関しては、MPSL 投与前、投与後 48 時間に midazolam 0.5mg/kg を静注、1 時間後に採血し、簡便な CYP3A 活性の指標である 1'-OH midazolam / midazolam ratio を算出した^{4,5)}。また、血中エストラジオール(E2)値の測定を毎週行った。

(倫理面への配慮)

本実験は、九州大学大学院医学研究院附属動物実験施設倫理委員会の承認を得て行われた。

3. 研究結果

骨壊死発生率は雄群 75%(15/20 羽)、雌群 30%(6/20 羽)であり、雄群の骨壊死発生率が有意に高かった(図 1)。CYP3A 活性は、MPSL 投与前、投

与後 48 時間共に雌群が雄群に比し有意に高かった(図 2)。また、雄群の CYP3A 活性は、MPSL 投与前、投与後 48 時間で不変であったのに対して、雌群では有意に上昇していた(図 2)。E2 値は、MPSL 投与前(0W)から 2W にかけて有意に雌群で高かった(図 3)。

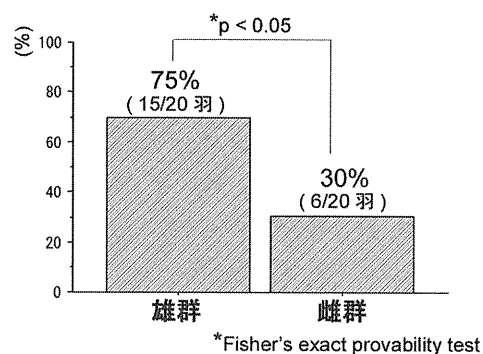


図 1 骨壊死発生率

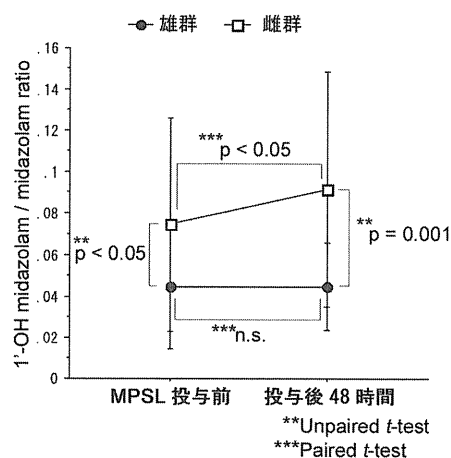


図 2 CYP3A 活性

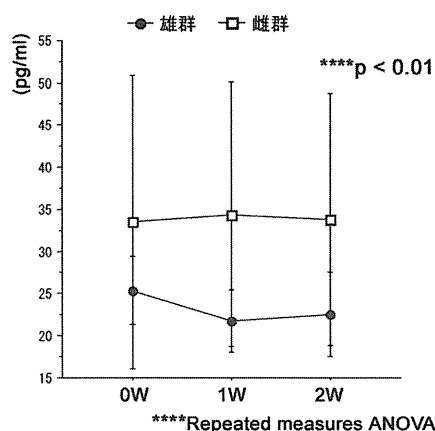


図3 エストラジオール(E2)

4. 考察

ステロイド性家兎骨壊死モデルにおいて、CYP3A 活性誘導薬投与群の骨壊死発生率は、コントロール群及び阻害薬投与群に比し、有意に低かったと報告されている^{6,7)}。本研究では、雌群のCYP3A 活性が雄群に比し有意に高く、CYP3A 活性の性差が骨壊死発生率の性差に関連していると考えられた。

ステロイドがCYP3A 活性に及ぼす影響として、健康人に対してデキサメタゾン[®]を5日間経口投与した結果、投与前に比しCYP3A 活性が平均25%上昇したと報告されている⁸⁾。本研究では、雄群のCYP3A 活性は不変であったのに対して、雌群はMPSL 投与後48時間で有意に上昇していた。骨壊死に至るイベントはステロイド投与後早期に起こっていることが示唆されており⁹⁾、MPSL 投与後早期のCYP3A 活性も骨壊死発生率の性差に関与していると考えられた。

雌群のE2 値は雄群に比し有意に高かった。また、雄群のE2 はMPSL 投与後1週で減少しているのに対して、雌群では維持されていた。エストロゲンとCYP3A 活性の関連に関して、卵巣摘出したラットにE2 を投与すると有意にCYP3A 活性が上昇したという報告があり¹⁰⁾、CYP3A 活性の性差にE2 が関与していることが示唆された。

5. 結論

- ① 雌群のCYP3A 活性は、雄群に比し有意に高かった。
- ② 雌群のみ、MPSL 投与後48時間のCYP3A 活性が上昇していた。
- ③ CYP3A 活性の性差に、性ホルモンが関与していることが示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikemura S, Yamamoto T, Nishida K, Motomura G, Iwamoto Y. Gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1128-1132.
- 2) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Nakashima Y, Mawatari T, Iwamoto Y. MRI evaluation of collapsed femoral heads in patients 60 years of age or older: the differentiation of subchondral insufficiency fracture from osteonecrosis of the femoral head. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;195:W63-68.

- 3) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Nakashima Y, Mawatari T, Motomura G, Iwamoto Y. A histopathological evaluation of a concave-shaped low-intensity band on T1-weighted MR images in a subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Skeletal Radiol*. 2010;39:185-188.

- 4) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Motomura G, Mawatari T, Nakashima Y, Iwamoto Y. The radiological outcome analyses of transtrochanteric curved varus osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 2010;92:781-786.

- 5) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Iwasaki K, Yamaguchi R, Zhao G, Iwamoto Y. Lipid metabolism abnormalities in alcohol-treated rabbits: a morphometric and haematologic study comparing high and low alcohol doses. *Int J Exp Pathol*. 2011;92:290-295.

2. 学会発表

- 1) Ikemura S, Yamamoto T, Zhao G, Nakashima Y, Mawatari T, Motomura G, Iwamoto Y. Prediction of the outcome of transtrochanteric curved varus osteotomy for osteonecrosis. The AAOS 2010 Annual Meeting. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- 2) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Nakashima Y, Mawatari T, Iwamoto Y. Collapsed femoral heads in patients 60 years of age or older: histopathologic correlation with MRI. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 9-13, 2010, New Orleans,

Louisiana, USA.

- 3) Ikemura S, Yamamoto T, Nishida K, Motomura G, Iwamoto Y. Gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- 4) Ikemura S, Yamamoto T, Iwasaki K, Motomura G, Yamaguchi R, Zhao G, Iwamoto Y. Bone marrow fat cell changes in alcohol-treated rabbits. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- 5) 池村聡、山本卓明、岩崎賢優、本村悟朗、山口亮介、趙嘎日達、岩本幸英:アルコール投与家兎における骨髓脂肪細胞径の検討、第 83 回日本整形外科学会学術総会.東京、5.27-30. 2010.
- 6) 池村聡、山本卓明、岩崎賢優、本村悟朗、山口亮介、趙嘎日達、岩本幸英:アルコール投与家兎における脂質代謝異常、第 37 回日本股関節学会.福岡、10.1-2. 2010.
- 7) 池村聡、山本卓明、本村悟朗、中島康晴、馬渡太郎、岩本幸英:大腿骨頭の圧潰を呈した 60 歳以上症例における病理組織学的所見と MRI 所見の対比、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会.京都、10.14-15. 2010.
- 8) 池村聡、山本卓明、岩崎賢優、本村悟朗、山口亮介、趙嘎日達、岩本幸英:アルコール投与家兎における脂質代謝異常、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会.京都、10.14-15. 2010.

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Ikemura S, et al. Gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1128-1132.

- 2) Kaneshiro Y, et al. Low hepatic cytochrome P450 3A activity is a risk for corticosteroid-induced osteonecrosis. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80:396-402.
- 3) Yamamoto T, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum*. 1997;40:2055-2064.
- 4) Zhu B, et al. The distribution and gender difference of CYP3A activity in Chinese subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;55:264-269.
- 5) 高岡 邦夫、他:特発性大腿骨頭壊死症の発生と肝 CYP3A 活性の相関に関する研究. 平成 17 年度総括・分担研究報告書、85-90, 2006.
- 6) Masada T, et al. Increased hepatic cytochrome P4503A activity decreases the risk of developing steroid-induced osteonecrosis in a rabbit model. *J Orthop Res*. 2008;26:91-95.
- 7) Tokuhara Y, et al. Low levels of steroid-metabolizing hepatic enzyme (cytochrome P450 3A) activity may elevate responsiveness to steroids and may increase risk of steroid-induced osteonecrosis even with low glucocorticoid dose. *J Orthop Sci*. 2009;14:794-800.
- 8) McCune JS, et al. In vivo and in vitro induction of human cytochrome P4503A4 by dexamethasone. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;68:356-366.
- 9) 市堰 徹、他: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. 平成 21 年度総括・分担研究報告書、91-93, 2010.
- 10) Chou CP, et al. Modulation of serum concentrations and hepatic metabolism of 17beta-estradiol and testosterone by amitraz in rats. *Arch Toxicol*. 2008;82:729-737.

高コレステロール食を投与した家兎におけるステロイド骨壊死

についての検討

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

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

1. 研究目的

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

2. 研究方法

実験 1):

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

実験 2):

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

三群共に犠牲死まで1週毎に採血し、血中脂質を測定した。骨壊死は、両大腿骨及び上腕骨の近位1/3及び遠位部(計8部位)のHE染色標本を用いて病理組織

学的に判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学大学院医学研究院附属動物実験施設倫理委員会の承認を得て行われた。

3. 研究結果

実験 1)

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

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

実験 2)

LA群の血中脂質について測定した結果、トータルコレステロールとLDL/HDL比はCTR群と比べ有意に高値であり、中性脂肪はCTR群の方が高く、実験1)の

CHOL 群と同じ傾向であった(図 5)。骨壊死発生率は 20 分の 2 羽、10%で、CTR 群と比べ有意に低かった(図 6)。

図 1: 血中トータルコレステロール(CHOL 群/CTR 群)

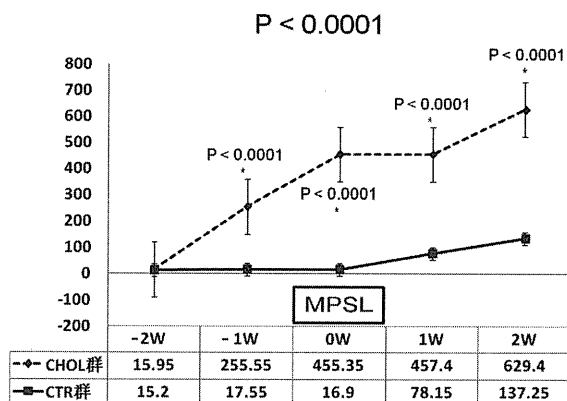


図 2: 血中トータル中性脂肪(CHOL 群/CTR 群)

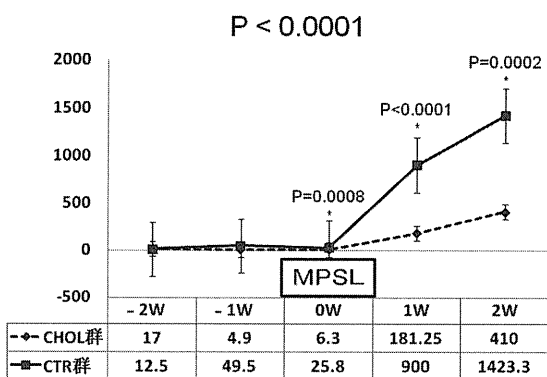


図 3: 血中 LDL/HDL 比(CHOL 群/CTR 群)

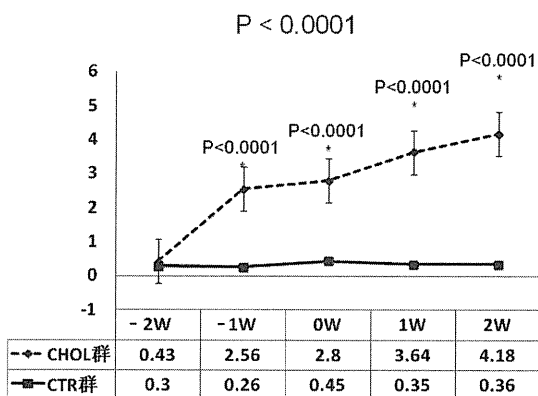


図 4: 骨壊死発生率(CHOL 群/CTR 群)

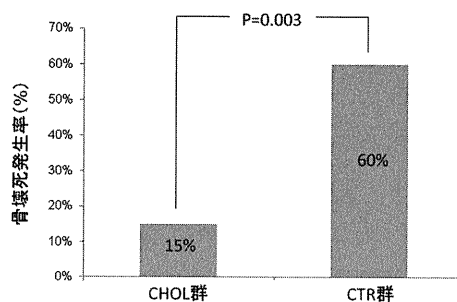


図 5: 血中脂質(LA 群/CTR 群)

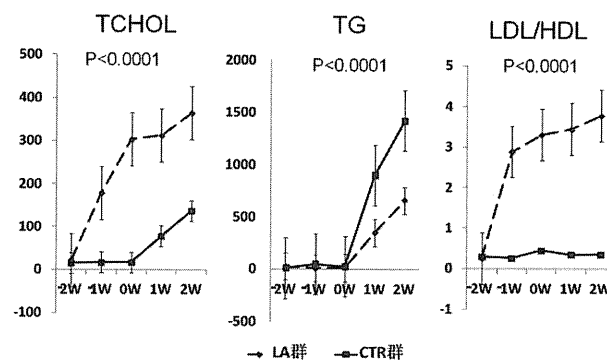
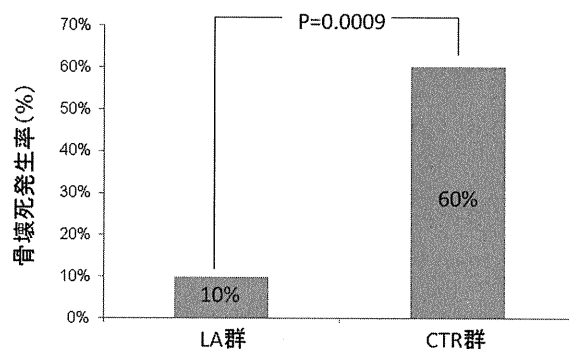


図 6: 骨壊死発生率(LA 群/CTR 群)



4. 考察

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

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

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

5. 結論

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

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Nakashima Y, Mawatari T, Motomura G, Iwamoto Y. A histopathological evaluation of a concave-shaped low-intensity band on T1-weighted MR images in a subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Skeletal Radiol.* 2010; 39: 185-188.
- 2) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Motomura G, Mawatari T, Nakashima Y, Iwamoto Y. The radiological outcome analyses of transtrochanteric curved varus osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. *J bone joint surg Br.* 2010; 92-B: 781-86.

2. 学会発表

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

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

- 1) Yamamoto T, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 2055-2064.
- 2) Miyanishi K, et al. A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology* 2001;40: 196-201.
- 3) Motomura G, et al. Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 2004;50: 3387-91.
- 4) Wang GJ, et al. Cortisone induced bone changes and its response to lipid clearing agents. *Clin Orthop* 1978;130: 81-5.

ミネラルコルチコイド受容体阻害薬によるステロイド性骨壊死抑制効果

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

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

1. 研究目的

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

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

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

2. 研究方法

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

評価項目として骨壊死発生率を評価した。骨壊死は、両大腿骨及び上腕骨の近位1/3及び遠位部(計8部位)

のHE染色標本を用いて病理組織学的に診断し、いずれかの部位に骨壊死が認められたものを骨壊死発生ありと判定した⁵⁾。

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

3. 研究結果

20羽中2羽が胃管挿入時の気管損傷で死亡した。

骨壊死発生率は、38.9%(7/18羽)であった。

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

図1 レニン活性

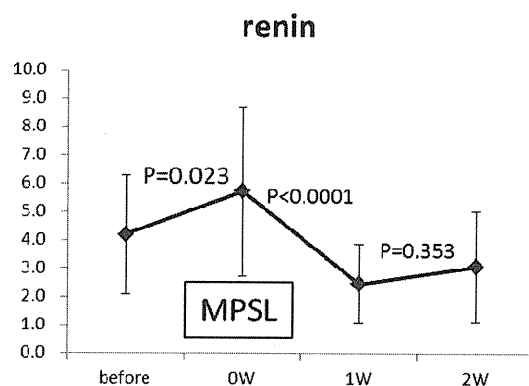
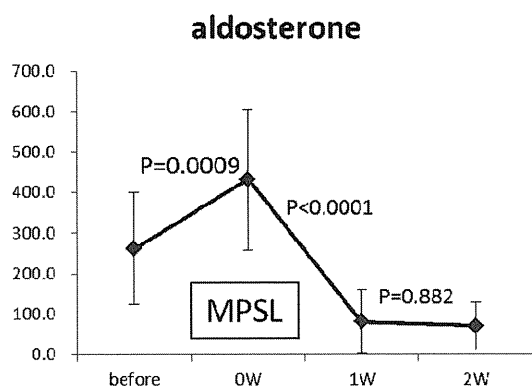


図2 アルドステロン濃度



4. 考察

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

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

5. 結論

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

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwamoto Y. MRI-detected Double Low-Intensity Bands in Osteonecrosis of the Femoral Head. J Orthop Sci. 2011 Jul;16(4):471-5
- 2) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Drug on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. Rheumatology (Oxford). 2011 Jul 8 in press
- 3) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Incidence of Non-Traumatic Osteonecrosis of the Femoral Head in the Japanese Population. Arthritis 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
- 法の開発を目的とした全国学際的研究 平成 22 年度総括・分担研究報告書, 77-80, 2011
- 4) 加藤茂明、横田健一、今井祐記。新規 MR 転写共役因子複合体によるエピゲノム修飾。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の診断・治療・予防法の開発を目的とした全国学際的研究 平成 22 年度総括・分担研究報告書, 74-5, 2011
- 5) Yamamoto T, 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.

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Walker BR. Glucocorticoids and cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol.* 2007; 157:545-59.
- 2) 赤池雅史、粟飯原賢一、松本俊夫。アルドステロン受容体拮抗薬はグルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害を抑制する。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の診断・治療・予防法の開発を目的とした全国学際的研究 平成 21 年度総括・分担研究報告書, 63-66, 2010
- 3) 赤池雅史、粟飯原賢一、松本俊夫。エプレレノン はグルココルチコイドによる血管内皮細胞での酸化ストレス増大と一酸化窒素産生低下を抑制する。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の診断・治療・予防

抗血小板薬によるステロイド性骨壊死予防効果

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

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

1. 研究目的

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

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

本研究の目的は、抗血小板薬クロピドグレルによるステロイド性骨壊死発症抑制効果を検討することである。

2. 研究方法

実験①薬剤投与開始タイミングの確認

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

2週後に犠牲死とした。薬剤は犠牲死まで継続した。

クロピドグレルによる血小板凝集能抑制効果を確認するために、薬剤投与前から犠牲死まで凝血予防を目的として、1/10量のクエン酸を添加した採血管を用いて1週毎に採血した。採取した全血に血小板凝集惹起物質として、4濃度(0.25、1.0、4.0、16.0 μ M)のADPを添加し、血小板を凝集させた。3分間の反応の後、血小板凝集能測定機(WBA カルナ、IMI、埼玉)にて、血小板凝集が得られる惹起物質の最低濃度 Platelet aggregation threshold index (PATI)を測定した。

実験②抗血小板薬による骨壊死発症抑制効果

28週齢以上の成熟雄日本白色家兎65羽をランダムにクロピドグレル投与群35羽(AP群)、生食投与群30羽(NS群)の2群に分けた。AP群に対しては20mlの生食に溶解したクロピドグレル5mg/kg、NS群に対しては20mlの生食単独を、ゴム製経胃チューブ用いて連日経胃投与した。薬剤投与開始1週後に、メチルプレドニゾロン20mg/kgを一回右殿筋内に注射し、開始3週後に全頭犠牲死とした。薬剤は犠牲死まで継続した。

評価項目として、骨壊死発生率、1週毎の血小板凝集能、血液学的データを比較検討した。骨壊死は、両大腿骨及び上腕骨の近位1/3及び遠位部(計8部位)のHE染色標本を用いて病理組織学的に診断し、いずれかの部位に骨壊死が認められたものを骨壊死発生ありと判定した²⁾。

3. 研究結果

実験①薬剤投与開始タイミングの確認

血小板凝集能抑制効果は、Control 群では有意な変化が認められなかったのに対して、An1W 群、An2W 群はクロピドグレル投与後、有意に血小板凝集能が抑制されていた(図1)。An1W 群とAn2W 群間に有意な差は認められなかった。1 週間前からの薬剤投与で効果が得られることを確認した。

実験②抗血小板薬による骨壊死発生抑制効果

AP 群のうち、2 羽が死亡した。骨壊死発生率は、NS 群が 73.3% (22/30 羽)であったのに対し、AP 群が 48.5% (16/33羽)であり、両群間に有意な差が認められた(p=0.042) (図 2)。肉眼、病理所見は両群同様であった(図 3, 4)。

血小板凝集能は、AP 群では有意に血小板凝集能が抑制され、ステロイド投与時以降両群間に有意な差が認められた (図 5)。

中性脂肪、総コレステロールは、いずれも両群においてステロイド投与後有意に上昇したが、両群間に有意な差は認められなかった (図 6, 7)。血小板数は、NS 群ではステロイド投与後有意に低下したのに対して、AP 群では比較的高値を保持していた (図 8)。

図 1 血小板凝集能抑制効果(実験①)

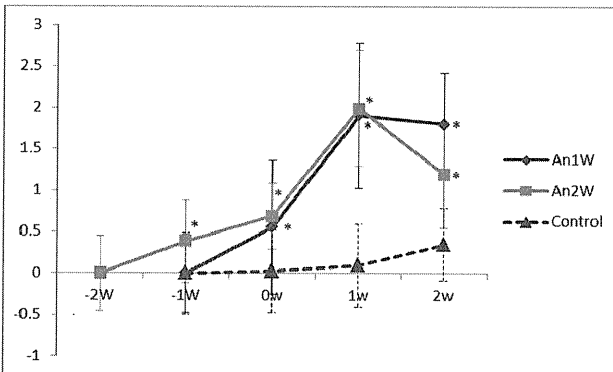
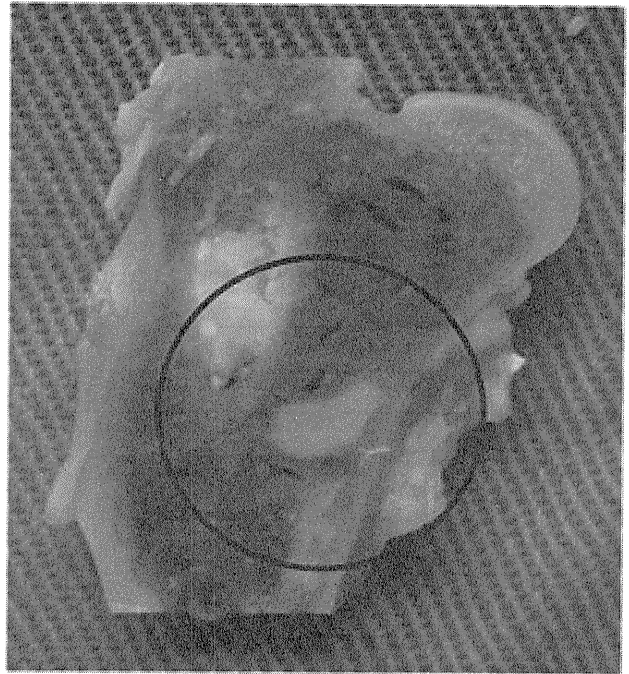


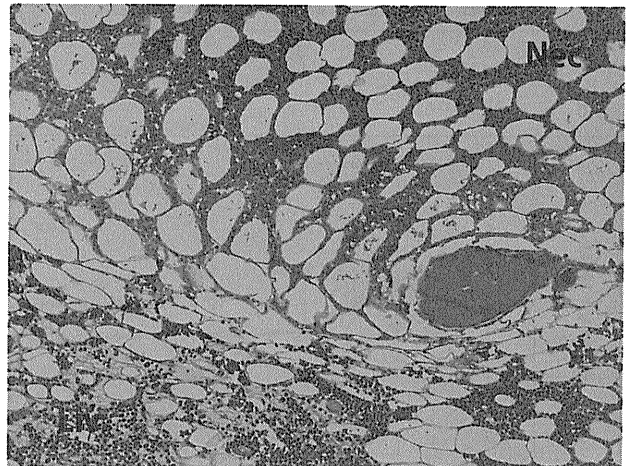
図 2 骨壊死発生率

図 3 骨壊死肉眼所見



右大腿骨近位部骨髓内に骨皮質に接した境界明瞭な白色病変を認める。

図 4 骨壊死病理組織所見(HE 染色、×100)



壊死域(Nec)と健常域(Liv)が境界明瞭に分かれる。

図 5 血小板凝集能抑制効果(実験②)

図 6 Triglycerides

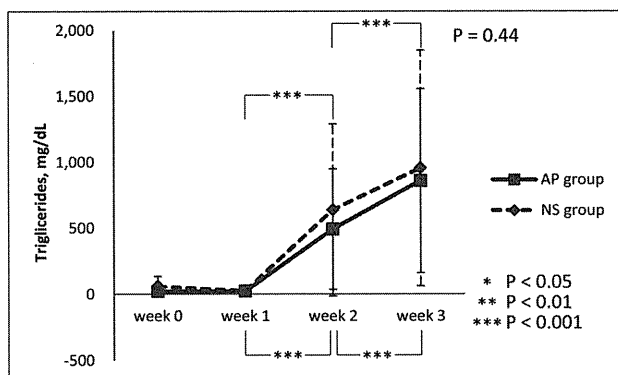


図 7 Total cholesterol

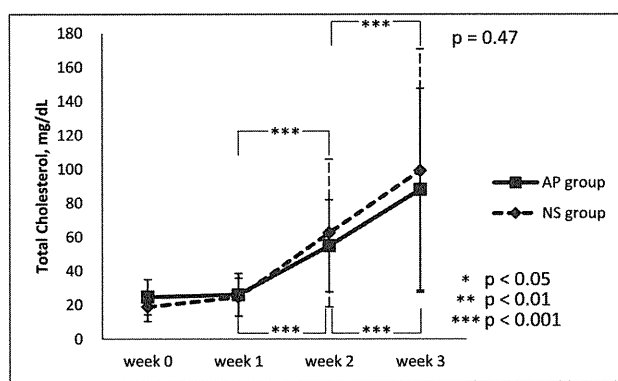
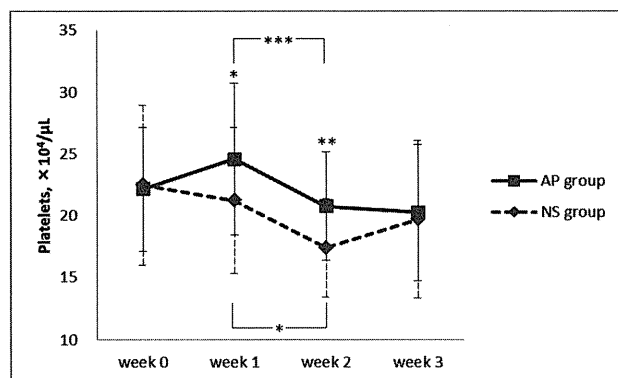


図 8 血小板数



4. 考察

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

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

teroidと血管内皮に関する報告として、骨内血管系の血管内皮と血管床におけるステロイドによる機能障害がステロイド性骨壊死発生に関与しているという報告や³⁾、ステロイドのミネラルコルチコイド作用により血管内皮障害が引き起こされると報告されている⁴⁾。ステロイド性骨壊死においても、他の阻血性疾患と同様に血管内皮障害を起因とした血小板凝集が発生に関与している可能性が示唆される。

これまでに基礎実験においてステロイド性骨壊死に予防的効果が認められた薬剤として、ワーファリンやピタバスタチン、ビタミン E などが報告されているが^{5~7)}、臨床的に予防効果が示された報告は少ない。抗血小板薬クロピドグレルも臨床的予防薬剤候補の一つになりうると思われる。

5. 結論

抗血小板薬クロピドグレルによるステロイド性骨壊死発生抑制効果が認められた。血管内血小板凝集が骨壊死発生要因の一つである可能性がある。

6. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, 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) Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 1997; 54:745-51.
- 2) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1997 Nov; 40(11):2055-64.
- 3) Kerachian MA, Seguin C, Harvey EJ. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 114:121-8.
- 4) 赤池雅史、栗飯原賢一、松本俊夫. エプレレノン はグルココルチコイドによる血管内皮細胞での酸化ストレス増大と一酸化窒素産生低下を抑制する. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の診断・治療・予防法の開発を目的とした全国学際的研究 平成22年度総括・分担研究報告書, 77-80, 2011
- 5) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Jingushi S, Iwamoto Y. Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of

steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 2004 Oct;50(10):3387-91.

- 6) Nishida K, Yamamoto T, Motomura G, Jingushi S, Iwamoto Y. Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits: a preliminary histological study. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 May;466(5):1054-8.
- 7) Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Ishida M, Goto T, Kubo T. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Acta Orthop.* 2010 Feb;81(1):154-60.

ステロイド性家兎骨壊死モデルにおける血管攣縮予防薬ファスジルを用いた骨壊死発生抑制効果の検討 — 予備的実験報告 —

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

45羽の成熟日本白色雄家兎を2群に分類した。Fasudil(ファスジル)投与群(25羽)には、メチルプレドニゾロン(MPSL)20mg/kg 筋注直前より、Fasudil(15mg/kg)+生理食塩水 50mlを7日間、1日2回30分かけて点滴静注を行った。Control群(20羽)にはMPSL20mg/kg1回筋注のみ行った。2週で犠牲死とし、病理組織学的検討を行った結果、Fasudil投与群の骨壊死発生率は32%(8/25羽)であり、Control群(75%:15/20羽)に比し有意に抑制されていた($P<0.01$)。

1. 研究目的

ステロイド性骨壊死発生のメカニズムの1つとして、血栓や塞栓などの閉塞性病変が示唆されているが、人および動物モデルにおける検討において、実際に動脈の閉塞が確認できた例は極めて少ない^{1,2)}。また、大量ステロイド投与が血管に及ぼす影響として、NOの産生低下を介した血管内皮障害や、endothelin-1(ET-1)などの血管平滑筋収縮物質の惹起によるspasmが起こり得ることが報告されている^{3,4)}。

脂質代謝異常、凝固能亢進、血管運動性障害などがステロイド性骨壊死の病因として報告されており⁵⁾、我々はspasmに着目して、血管運動性と骨壊死発生との関連について検討した。

2. 研究方法

実験1) 血管攣縮予防薬 Fasudil(ファスジル)を用いた骨壊死発生率の検討(図1)

45羽の成熟日本白色雄家兎を2群に分類した。Fasudil投与群(25羽)には、メチルプレドニゾロン(MPSL)20mg/kg 筋注直前より、Fasudil(エリル®旭化成ファーマ)(15mg/kg)+生理食塩水 50mlを7日間、1日2回30分かけて点滴静注を行った。2週で犠牲死とし、病理組織学的検討を行った¹⁾。また、Fasudilおよび Hydroxyfasudil(Fasudilの第一代謝物で薬理効果を有する)の血中濃度を投与開始後30分、1.5時間、7時間の3ポイントで計測した。Control群(20

羽)にはMPSL20mg/kg1回筋注のみ行った。

実験2) 早期病変における免疫組織学的検討(図1)

成熟日本白色雄家兎10羽をMPSL+Fasudil群(5羽)、MPSL単独群(5羽)に分類した。MPSL筋注後24時間で犠牲死とし、大腿骨・上腕骨近位部の骨髄を摘出し、ET-1と親和性が高く主に血管平滑筋に存在する、ET_A受容体の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

本実験は、九州大学大学院医学研究院附属動物実験施設倫理委員会の承認を得て行われた。

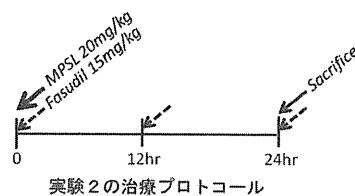


図1 実験1、2の治療プロトコール

3. 研究結果

実験1)

Fasudil 投与群の骨壊死発生率は 32%(8/25 羽)であり、Control 群(75%:15/20 羽)に比し有意に抑制されていた(図 2)。

血中濃度 (Fasudil + Hydroxyfasudil) は、点滴開始後 30 分が、平均 3312 ± 982 ng/ml、1.5 時間値: 812 ± 237 ng/ml、7 時間値: 40 ± 23 ng/ml であった。

実験 2)

まず、 α アクチンで血管平滑筋を同定した(図 3A)。血管平滑筋における ET_A 受容体の発現は、MPSL + Fasudil 群は MPSL 単独群に比し ET_A 受容体の発現が抑制されていた(図 3B、C)。

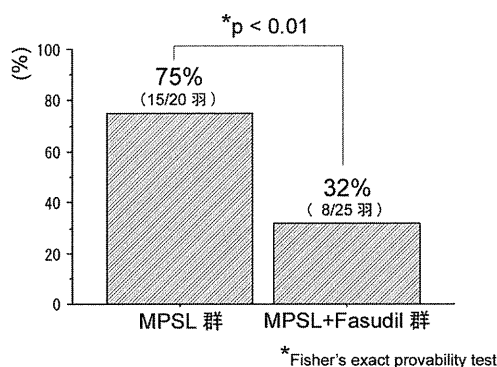


図 2 骨壊死発生率

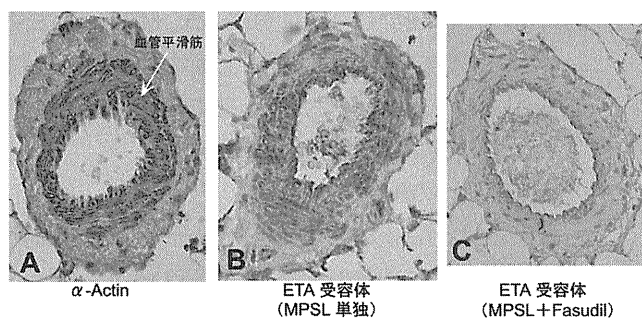


図 3 免疫組織化学的染色

4. 考察

本研究における Fasudil 投与群の骨壊死発生率は 32%であった。これは、過去の単剤投与による骨壊死予防実験の結果と同程度であった^{5,7,8)}。血中濃度に関しては、点滴開始後 30 分、1.5 時間値共にヒトでの研究報告の 5~10 倍、7 時間値も、Rho-kinase を阻害する必要血中濃度よりも高かった⁹⁾。更に本研究では薬剤を 1 日 2 回投与していたことより、薬剤投与期間中、高い血中濃度が維持出来ていたと考えられる。従って、脂質代謝異常、凝固能亢進、血管運動性障害といった多面的作用により骨壊死に至ることが推察されている中で、本研究では、Fasudil により血管運動性障害をある程度予防できたことより、骨壊死発

生率を半分程度(75%→32%)に抑制できたと考えられた。

骨壊死の病因に関しては、NO 産生低下や活性酸素の上昇といった血管運動性障害の経路に vasospasm が関与していることが示唆された。

5. 結論

- ① MPSL + Fasudil 群の骨壊死発生率は 32%であり、MPSL 単独投与群に比し、有意に骨壊死発生率が抑制されていた。
- ② 免疫組織化学的検討により、血管平滑筋における ET_A 受容体の発現は、Fasudil 投与により抑制されていた。
- ③ 血管攣縮が骨壊死発生のメカニズムに関与している事が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikemura S, Yamamoto T, Nishida K, Motomura G, Iwamoto Y. Gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1128-1132.
- 2) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Nakashima Y, Mawatari T, Iwamoto Y. MRI evaluation of collapsed femoral heads in patients 60 years of age or older: the differentiation of subchondral insufficiency fracture from osteonecrosis of the femoral head. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;195:W63-68.
- 3) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Nakashima Y, Mawatari T, Motomura G, Iwamoto Y. A histopathological evaluation of a concave-shaped low-intensity band on T1-weighted MR images in a subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Skeletal Radiol*. 2010;39:185-188.
- 4) Zhao G, Yamamoto T, Ikemura S, Motomura G, Mawatari T, Nakashima Y, Iwamoto Y. The radiological outcome analyses of transtrochanteric curved varus osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 2010;92:781-786.
- 5) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Iwasaki K, Yamaguchi R, Zhao G, Iwamoto Y. Lipid metabolism abnormalities in alcohol-treated

rabbits: a morphometric and haematologic study comparing high and low alcohol doses. *Int J Exp Pathol.* 2011;92:290-295.

2. 学会発表

- 1) Ikemura S, Yamamoto T, Zhao G, Nakashima Y, Mawatari T, Motomura G, Iwamoto Y. Prediction of the outcome of transtrochanteric curved varus osteotomy for osteonecrosis. The AAOS 2010 Annual Meeting, March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- 2) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Nakashima Y, Mawatari T, Iwamoto Y. Collapsed femoral heads in patients 60 years of age or older: histopathologic correlation with MRI. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- 3) Ikemura S, Yamamoto T, Nishida K, Motomura G, Iwamoto Y. Gender difference in the development of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- 4) Ikemura S, Yamamoto T, Iwasaki K, Motomura G, Yamaguchi R, Zhao G, Iwamoto Y. Bone marrow fat cell changes in alcohol-treated rabbits. The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 9-13, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- 5) 池村聡、山本卓明、岩崎賢優、本村悟朗、山口亮介、趙嘸日達、岩本幸英:アルコール投与家兎における骨髓脂肪細胞径の検討、第 83 回日本整形外科学会学術総会、東京、5.27-30. 2010.
- 6) 池村聡、山本卓明、本村悟朗、中島康晴、馬渡太郎、岩本幸英:大腿骨頭の圧潰を呈した 60 歳以上症例における病理組織学的所見と MRI 所見の対比、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、10.14-15. 2010.
- 7) 池村聡、山本卓明、岩崎賢優、本村悟朗、山口亮介、趙嘸日達、岩本幸英:アルコール投与家兎における脂質代謝異常、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、10.14-15. 2010.

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Yamamoto T, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1997;40:2055-2064.
- 2) Hirano K, et al. Histopathologic alterations of retinacular vessels and osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;342:192-204.
- 3) Iuchi T, et al. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2003;92:81-87.
- 4) Drescher W, et al. Endothelin-1-induced femoral head epiphyseal artery constriction is enhanced by long-term corticosteroid treatment. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:173-179.
- 5) Motomura G, et al. Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3387-3391.
- 6) Kerachian MA, et al. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114:121-128.
- 7) Nishida K, et al. Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits: a preliminary histological study. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466:1054-1058.
- 8) Kuribayashi M, et al. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Acta Orthop.* 2010;81:154-160.
- 9) Suzuki Y, et al. Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil-ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post-marketing surveillance study. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2008;48:241-247.

ステロイド性家兎骨壊死モデルにおけるエンドセリン誘発血管攣縮の関与

— 予備的実験報告 —

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

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

1. 研究目的

NO 貼付薬や血管攣縮予防薬ファスジルによるステロイド性骨壊死抑制効果が報告されており^{1, 2)}、ステロイド性骨壊死に血管攣縮が関与している可能性が示唆されている。血管運動の調節因子として、血管収縮因子であるエンドセリンやトロンボキサン A2 や血管拡張因子である NO やプロスタサイクリン等があるが、本研究は強い血管収縮因子であるエンドセリンに注目した。

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

2. 研究方法

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

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

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

評価項目として骨壊死発生率を評価した。骨壊死は、両大腿骨及び上腕骨の近位 1/3 及び遠位部 (計 8 部位) の HE 染色標本を用いて病理組織学的に診断し、いずれかの部位に骨壊死が認められたものを骨壊死発生ありと判定した⁵⁾。また、脂質、血糖値などの血液学的データを比較検討した。

3. 研究結果

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

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

図1 総コレステロール

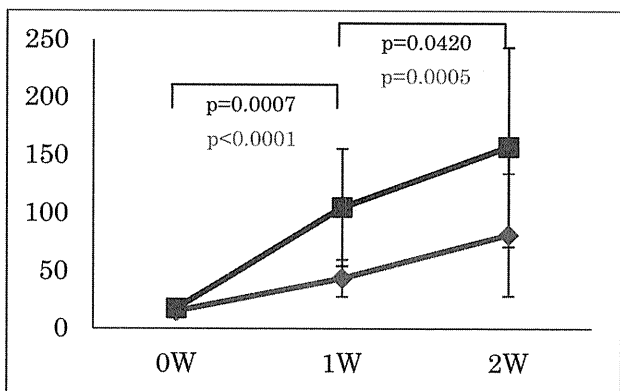


図2 中性脂肪

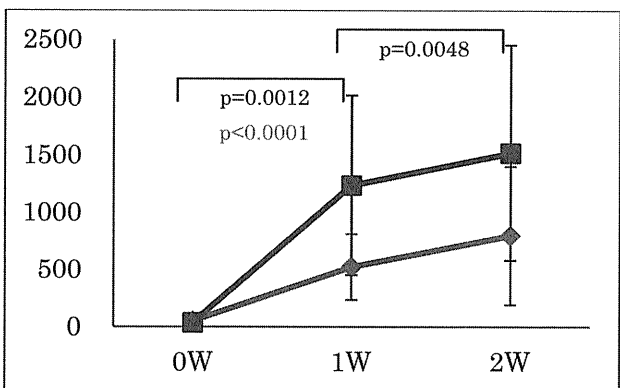
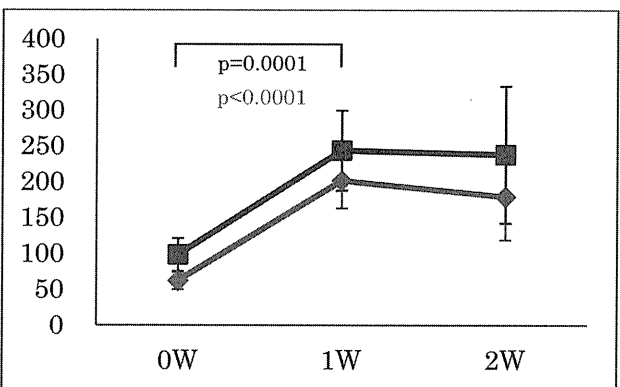


図3 血糖値



4. 考察

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

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

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

5. 結論

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

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwamoto Y. MRI-detected Double Low-Intensity Bands in Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Orthop Sci.* 2011 Jul;16(4):471-5
- 2) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Drug on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Jul 8 in press
- 3) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, 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) Drescher W, Beckmann R, Kasch R, Pufe M, Knoke M, Kweider N, Hassenpflug J, Tingart M, Pufe T, Kadyrov M. Nitrate patch prevents steroid-related bone necrosis. *J Orthop Res.* 2011 Oct;29(10):1517-20..
- 2) 池村聡, 山本卓明, 本村悟朗, 山口亮介, 趙嘎日達, 岩崎賢優, 岩本幸英. ステロイド性家兎骨壊死モデルにおける血管攣縮予防薬ファスジルを用いた骨壊死発生抑制効果の検討—予備的実験報告—. 平成22年度総括・分担研究報告書, 109-11, 2010
- 3) Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet.* 2001 Oct 6;358(9288):1119-23.
- 4) Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2002 Mar 21;346(12):896-903.
- 5) Yamamoto T, Iriya T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 1997 Nov; 40(11):2055-64.
- 6) Kerachian MA, Séguin C, Harvey EJ. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral