

5. 結論

- ① ヒト骨髓液と血液中の各種アディポカインについて比較検討を行った。
- ② Adiponectin と Leptin の骨髓液中と血液中の濃度は同等であったが、PAI-1 は骨髓液中の濃度は血液中より明らかに高かった。
- ③ ステロイド投与によりレプチンは血液、骨髓液で、total PAI-1 は血液中で明らかに増加していた。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hozumi A, Osaki M, Sakamoto K, Goto H, Fukushima T, Baba H, Shindo H. Dexamethasone-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in human primary bone marrow adipocyte. *Biomedical Research* 2010; 31:281-286
- 2) Sakamoto K, Osaki M, Hozumi A, Goto H, Fukushima T, Baba H, Shindo H. Simvastatin suppresses dexamethasone-induced secretion of plasminogen activator inhibitor-1 in human bone marrow adipocytes. *BMC Musculoskeletal Disord* 2011;12:82

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) M.A.Mont, L.C Jones, D.S Hungerford, Current concepts review : nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *J Bone Joint Surg Am* 88 (2006) 1117-1132.
- 2) Hozumi A, Osaki M, Sakamoto K, Goto H, Fukushima T, Baba H, Shindo H. Dexamethasone-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in human primary bone marrow adipocyte. *Biomedical Research* 2010;31: 281-286
- 3) Sakamoto K, Osaki M, Hozumi A, Goto H,

- Fukushima T, Baba H, Shindo H. Simvastatin suppresses dexamethasone-induced secretion of plasminogen activator inhibitor-1 in human bone marrow adipocytes. *BMC Musculoskeletal Disord* 2011;12:82
- 4) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Kadowaki T et al. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2461/8.
- 5) Oshima K, Nampei A, Matsuda M et al: Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 520-6, 2005.
- 6) Chiba T, Shinozaki S, Nakazawa T, Kawakami A, Ai M, Kaneko E, Kitagawa M, Kondo K, Chait A, Shimokado K: Leptin deficiency suppresses progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):68-75. 2007.
- 7) Reseland JE, Syversen U, Bakke I et al: Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res*: 1426-1433. 2001
- 8) Halleux CM, Declercq PJ, Tran SL, Detry R, Brichard SM: Hormonal control of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and production in human adipose tissue: stimulation by glucocorticoids and inhibition by catecholamines. *J Clin Endocrinol Metab*. 84(11):4097-105. 1999
- 9) Ferrari P, Schroeder V, Anderson S, Kocovic L, Kohler HP et al: Association of plasminogen activator inhibitor-1 genotype with avascular osteonecrosis in steroid-treated renal allograft recipients. *Transplantation*: 27; 74(8):1147-52. 2002
- 10) Kerachian MA, Segulin C, Harvey EJ. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action. *L Steroid Biochem Mol Biol*: 114(3-5);121-8. 2009

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 Stage 間比較

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)25 例 25 関節の関節液中サイトカイン濃度を測定し、stage 間で比較した。内訳は stage3A:6 関節、stage3B:8 関節、stage4:11 関節であった。stage 3B は stage 4 に比して有意に IL-6 濃度が高値であった。stage3B は stage3A に比して有意に IL-1 β , IL-6, 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)}。以前、我々は、ION stage 3B は stage 4 に比して関節液中 IL-6 濃度が高値であることを報告したが、stage 3A 以前の関節液中サイトカイン濃度については明らかではない。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、stage 3A、stage 3B、stage 4 における関節液中サイトカイン濃度を検討し、ION stage とサイトカイン濃度の関連の有無を明らかにすることである。

2. 研究方法

2004~2012年に股関節手術を施行したION:25関節を対象とし、末期変形性股関節症(OA):35関節、前初期股関節形成不全2次性OA(DDH):10関節、急速破壊

型股関節症(RDC):34関節を比較対象とした。IONの内訳は、stage 3A:6関節、stage3B:8関節、stage4:11関節であった。ION stage 4、末期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 法(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。関節破壊の程度と関節液中サイトカイン濃度の関連の有無を検討するため、関節IONでの stage 間と、末期 OA と DDH の比較を行った。また末期 OA と RDC の比較を行った。

統計に Turkey-Kramer test、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 stage 3A、stage 4 に対し有意に高値であった(stage 3A: 594 \pm 569 pg/ml、Stage 3B: 2120 \pm 1860pg/ml、stage 4: 729 \pm 686pg/ml、 $p=0.03$) (表 2)。末期 OA と DDH の比較では、末期 OA が DDH に比して IL-6 (末期 OA: 751 \pm 635、DDH: 302 \pm 348、 $p=0.02$)、IL-8(末期 OA: 1006 \pm 1121、DDH: 270 \pm 189、 $p=0.001$)が高値であった(表 3)

また、DDH と ION stage 3A、末期 OA と ION stage 4 間にも差を認めず、ION stage 3B は DDH、末期 OA に対しても有意に高値であった(図 1)。

RDCとOAの比較では、RDCがOAに対し、測定したすべてのサイトカイン濃度が有意に高値であった(表4)。

表 1:患者背景比較

	N(関節)	年齢(歳)	性別(男/女)
ION	25	46±17	13/12
stage 3A	6	32±11	5/1
stage 3B	8	42±12	3/5
stage 4	11	57±17	5/6
OA	35	66±10	3/32
DDH	10	36±9	0/10
RDC	34	75±7	5/29

表 2:ION 病期間関節液中サイトカイン濃度比較(pg/ml)

	stage 3A	stage 3B	stage 4	p value
IL-1β	117±48	1035±1237	739±1178	0.29
IL-6	594±569	2120±1860	729±686	0.03
IL-8	378±106	3130±3946	1925±2364	0.2
TNF-α	219±94	1276±1829	794±985	0.31

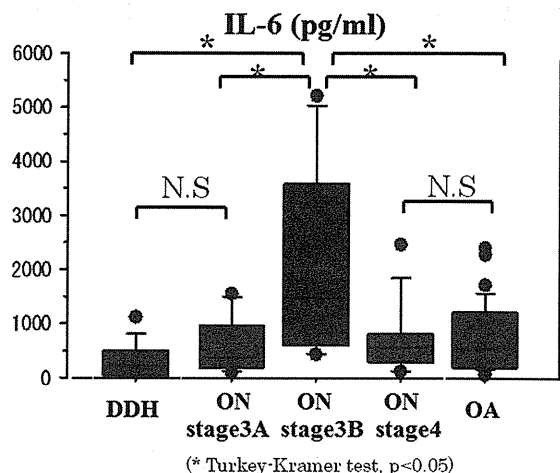
表 3:末期 OA と DDH 関節液中サイトカイン濃度比較 (pg/ml)

	DDH	OA	p value
IL-1β	125±142	360±962	0.25
IL-6	302±348	751±635	0.02
IL-8	270±189	1006±1121	0.001
TNF-α	235±196	436±892	0.53

表 4:RDC と OA の股関節液中サイトカイン濃度比較 (pg/ml)

	OA	RDC	p value
IL-1β	360±962	773±1178	0.002
IL-6	751±635	1354±1349	0.04
IL-8	1006±1121	3247±2486	<0.0001
TNF-α	436±892	1000±1459	0.003

図 1:箱ひげ図。ION 病期間、末期 OA、DDH 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 3A、stage 4 に比して有意に高値であることが示された。また、DDH と ION stage 3A に差がなく、ION stage 4 は末期 OA と同等のサイトカイン濃度を示していた。このことは、高度圧潰時には IL-6 濃度は高値となるが、軽度圧潰時は軽度 OA と同等であり、ION に 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 のマーカーとしては、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。本検討では RDC は OA に比して関節液中 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 濃度が高値であった。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。サイトカイン濃度の上昇が、関節破壊後の影響なのか、原因なのかは、現段

階では明らかではない。今後 stage 1 および stage 2 の関節液における検討が必要と考えられる。

5. 結論

ION において関節液中 IL-6 濃度は stage3B で stage 3A、stage 4 よりも高値であった。大腿骨骨頭圧潰の程度と関節液中 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) Abe, H, Sakai, T, Ando, W, Nishii, T, Takao, M, Nakamura, N, Yoshikawa, H, Sugano, N: High IL-8 Level of Synovial Joint Fluid in Hips with Rapidly Destructive Coxopathy. 58th annual meeting of Orthopaedic Research Society (ORS), San Francisco, California, 2012.2.4
- 2) 阿部 裕仁、坂井 孝司、安藤 渉、西井 孝、高尾 正樹、中村 宣雄、大園 健二、吉川 秀樹、菅野 伸彦。股関節疾患における関節液中サイトカイン濃度。第 39 回日本股関節学会，新潟，2012.12.7

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

- 1) 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 osteoarthritis 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.

酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける HSP27 発現の検討

市堰徹、金子聖司、兼氏歩、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は、酸化誘発剤(BSO)投与後7日で約40%の大腿骨頭壊死発生を認めている。本モデルでは全ての個体に同様の酸化を誘発するにも関わらず、骨壊死の発生には個体による相違がみられる。今回、細胞が障害を受けた際に発現が亢進する Heat shock protein(HSP)に注目し、本モデルにおける酸化誘発後の HSP27 の発現を検討した。

1. 研究目的

当科が報告した酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルは、BSO 投与による酸化誘発後5日で約10%、7日で約35-40%の個体に骨壊死発生を認める¹⁾。本モデルでは全ての個体に同様の酸化を誘発するにも関わらず、骨壊死発生に個体による相違が見られる。

一方、骨壊死の原因として、最終的には骨内の虚血であることは意見の一致が得られており、本モデルにおいても BSO 投与後3時間で全ての個体の大腿骨頭内に虚血が生じることを昨年度の本学会で報告した。全ての個体で虚血が生じるにも関わらず、骨壊死が発生する個体と発生しない個体があることに関して、虚血後の過程に差がある可能性が考えられた。そこで今回、細胞が障害を受けた際に発現が亢進し、細胞の保護や修復を行う因子である Heat shock protein(HSP)²⁾に注目し、酸化誘発後の大腿骨頭内における HSP27³⁾の発現を検討した。

2. 研究方法

BSO 単回投与ラット大腿骨頭壊死モデル¹⁾(24週齢の雄性 Wister 系ラットに BSO500 mg/kg を1回のみ腹腔内投与)を用い、大腿骨頭内の HSP27 の発現を確認した。

項目1:免疫組織学的検討

BSO 投与後1時間、3時間、6時間、12時間、1日、3日、5日目に犠牲死として両側の大腿骨頭を取り出し、パラフィン切片を作製した。それぞれ B1h 群、B3h 群、B6h 群、B12h 群、B1d 群、B3d 群、B5d 群とした(各群 n=5)。対照群(N 群)として BSO 非投与のラット

(n=5)を検討に加えた。作成した切片に抗 HSP27 抗体を用いた免疫染色を行い検討した。

項目2:Western blot 法による検討

項目1と同様の群(B1h 群~B5d 群:各群 n=5)を新たに作製し、両側の大腿骨頭からタンパク質を抽出した。また、対照群(N 群)として BSO 非投与のラット(n=5)も検討に加えた。Western blot 法を用いて各群におけるタンパク質の発現を確認し、発現したタンパク質の定量を行った。

3. 研究結果

項目1:免疫組織学的検討

N 群では陽性細胞はほとんど見られないが、B6h 群では骨頭内に陽性細胞の集簇を認めた。陽性細胞は B6h 群から B1d 群にみられた。

項目2:Western blot 法による検討

N 群、B1h 群、B3h 群では、個体によって軽度の発現を認めるのみであった。しかし、B6h 群以降では明らかに HSP27 の発現が増加しており、B1d 群以降の群ではタンパク質の発現に明らかな個体による相違を認めた。定量によって各群の発現量の平均値を求めると、BSO 投与後6~12時間の群で発現のピークを認め、N 群と比して B6h 群で約10倍、B12h 群で約12倍と有意な発現増加を認めた。

4. 考察

今回の検討で着眼した Heat shock protein (HSP)は、有害刺激や障害を受けた細胞に出現し、細胞内のタンパク質を修復することで細胞の保護・修復機能を有

する因子として知られている。

以前報告した HIF-1 α を用いた検討から、本モデルでは BSO 投与後 3 時間で全ての個体の大腿骨頭内に同程度の虚血が発生することが示されている。今回の検討より、修復因子である HSP27 は BSO 投与後 6 時間群以降に発現亢進を認め、虚血性障害が発生した後に HSP27 の発現亢進がみられた。また、以前の検討から BSO 投与後 3 時間における HIF-1 α の発現には差はほとんどみられなかったが、BSO 投与後 12 時間以降には HIF-1 α の発現量に明確な個体差を認めており、本検討から HSP27 の発現は 6~12 時間で N 群と比して有意な発現増加と発現量において個体による相違を認めた。このことから、時間経過とともに虚血の程度と障害の過程において個体による相違が生じている可能性が示唆された。

酸化ストレスによって虚血が生じ骨壊死が発生する過程で、細胞障害の過程において個体による相違が骨壊死発生に関与している可能性が考えられた。

5. 結論

酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおいて酸化ストレス誘発後に生じる HSP27 の発現に個体による相違を認め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) 金子聖司、市堰徹、兼氏歩、福井清数、植田修右、松本忠美:酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける HSP27 発現の検討 第 39 回日本股関節学会(2012 年 12 月、新潟)

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, 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; 63(7): 2138-41.

- 2) Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E et al: Heat shock protein, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem* 2003; 304: 505-12.

- 3) 村岡里奈、中野敬介、川上俊之ら. 歯科矯正学的メカニカルストレスによりマウス歯根膜組織に発現する熱ショックタンパクの免疫組織学的観察 *Journal of Hard Tissue Biology* 2009; 18[4]: 193-98.

酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける α トコフェロール投与による 予防効果の検討

金子聖司、市堰徹、兼氏歩、松本忠美
(金沢医科大学 整形外科)

酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルを用いて、 α トコフェロール(ビタミン E)投与による骨壊死の予防効果についての検討を行った。 α トコフェロール投与によって統計学的に有意な骨壊死発生の抑制効果はみられなかったが、骨壊死発生の抑制傾向はみられた。今後は投与方法や投与量、投与時期などの検討が必要と考えられた。

1. 研究目的

当科では以前、ステロイド投与家兎に抗酸化ビタミンであるビタミン E(α トコフェロール)を投与する事で骨壊死の発生を有意に抑制した事を報告した¹⁾。一方、当科が作成報告した酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルでは、酸化誘発後7日で約40%の骨壊死発生を認める。今回、酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルを用いて α トコフェロールによる骨壊死発生の予防効果についての検討を行った。

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 BSO500mg/kg を 1 回のみ腹腔内投与)を用いた。

実験 1:BSO 投与の 6 時間前に α トコフェロールを 50mg/kg 腹腔内に単回投与し、以降は連日同量の α トコフェロールを腹腔内投与し、BSO 投与後 7 日目に犠牲死として両側の大腿骨頭を取り出し、H-E 切片を作製し病理組織学的に骨壊死の有

無を評価した(n=20)。対照群として α トコフェロール非投与の群(BSO のみ投与のラット:n=20)も検討に加えた。

実験 2:BSO 投与後早期の大腿骨頭内の虚血状態の有無を確認するため、HIF-1 α を虚血の指標として検討を行った。実験 1 と同様に α トコフェロールを BSO 投与の 6 時間前に腹腔内投与し、BSO 投与後 6 時間と 1 日目に犠牲死として両側大腿骨を取り出した群を作成した

(各群 n=3)。各群の大腿骨頭からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法で HIF-1 α の発現について検討した。また、対照として α トコフェロール非投与、BSO のみ投与し、BSO 投与後 6 時間で犠牲死としたラット(n=3)、未処置(薬剤非投与)のラット(n=3)も検討に加えた。

3. 研究結果

実験 1:病理組織学的検討

・ α トコフェロール+BSO 投与群

大腿骨頭壊死発生率 15% (3/20 匹)

・BSO 単独投与群

大腿骨頭壊死発生率 40% (8/20 匹)

実験 2:骨頭内の HIF-1 α 発現について

何も薬剤を投与していない個体では、HIF-1 α はほとんど発現していない。 α トコフェロール非投与、BSO のみ投与した個体では、薬剤投与後 6 時間ですべての個体で HIF-1 α の発現を強く認めた。

ビタミン E 投与モデルでは、BSO 投与後 6 時間でも HIF-1 α の発現が弱い個体もあったが、HIF-1 α の発現を強く認めた個体もあった。BSO 投与後 1 日目でも同様に HIF-1 α 発現の強弱が見られた。

4. 考察

以前報告したステロイド投与家兎骨壊死モデル(MPSL 40mg/kg 単回投与)を用いた検討では、骨壊死/骨髄壊死発生率 93%が α トコフェロール投与によって 10%と有意な抑制をみた。しかし、本モデルでは骨壊死

発生率40%が α トコフェロール投与によって15%と、統計学的に有意な抑制とはならなかったが、壊死の発生を減少させる傾向はみられた。

今回の検討における α トコフェロールの壊死抑制効果が低い理由に関して考察した。脂溶性ビタミンである α トコフェロールは体内に吸収後、主にLDL,VLDLによって運搬され、細胞膜レベル(リン脂質)で抗酸化作用を発揮するとされている。ステロイド投与家兔壊死モデルでは脂質異常、高脂血症が生じており、ステロイド投与後、血中のLDL値は1週で約3倍、2週で約4倍に増加したとの報告³⁾があり、血中のLDLが増加したことで、ステロイド投与モデルではより効果的に α トコフェロールが運搬され、骨内の組織にも十分に供給された可能性がある。一方、本モデルでは明らかな脂質異常は生じておらず、BSOをラットに投与した他の報告でもLDLの上昇は軽度であったと報告されている。そのため、組織の細胞まで十分な量の α トコフェロールが運搬されていない可能性があり、壊死発生を抑えるには不十分だった可能性が考えられた。今後は α トコフェロールの投与時期や投与量などの検討が必要と考えられた。

5. 結論

酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおいて、 α トコフェロール投与によって骨壊死発生の抑制傾向がみられた。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 金子聖司、市堰徹、兼氏歩、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ビタミンE投与と骨内の虚血の検討第27回日本整形外科学会基礎学術集会(2012年10月、名古屋)

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) 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; 15: 674-7.
- 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; 63(7): 2138-41.
- 3) 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(6): 1128-32.

ステロイド性大腿骨頭壊死症ラットモデルにおける酸化ストレス

岡崎俊一郎^{1),2)}、名越 智¹⁾、松本博志²⁾

(札幌医科大学 生体工学・運動器治療開発講座)¹⁾

(札幌医科大学 法医学講座)²⁾

近年、特発性大腿骨頭壊死症の発生機序に酸化ストレスが関与すると報告されている。一方、我々は、ラットにおけるステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序には自然免疫シグナリングが関与していることを報告してきた。自然免疫シグナリングの活性化により、酸化ストレスが亢進することが報告されていることから、我々のラットモデルにおける大腿骨頭壊死症の発生にも酸化ストレスの関与が示唆される。今回、酸化ストレスを測定した結果、本モデルにおける大腿骨頭壊死症の発生率と酸化ストレスの間には関連がないことが明らかとなった。

1. 研究目的

我々は、ラットのステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序に、基礎疾患の病態に共通する自然免疫異常とステロイド投与による転写制御因子活性の変動が関与することを報告してきた。一方、酸化誘発剤単剤の投与によってもラット大腿骨頭壊死症の発生が報告されている¹⁾。酸化ストレスは Toll-like receptor signaling(TLR)を介する自然免疫の活性化により誘発されるとの報告もあり²⁾、ラットにおけるステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序にも酸化ストレスが関与していることが示唆される。本研究では我々が報告したステロイド性大腿骨頭壊死症ラットモデルにおける酸化ストレスの関与について検討を行った。

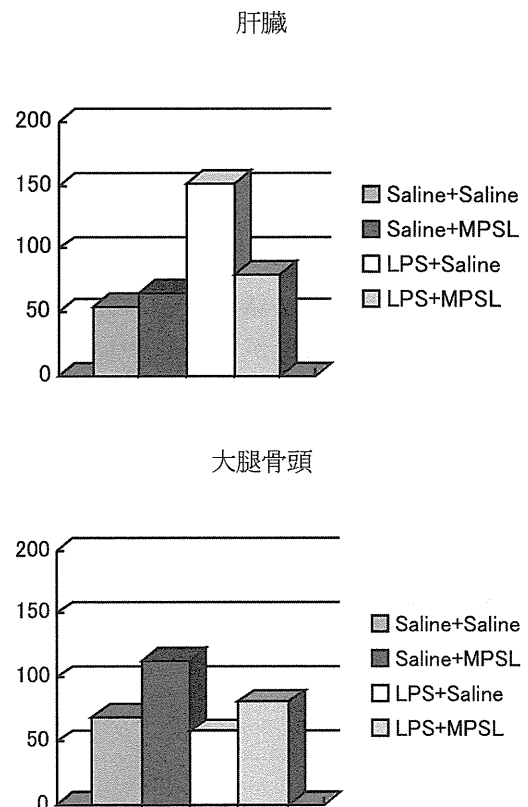
2. 研究方法

Wistar 系雄ラットを用い、生理食塩水(生食) 1.0 mL/kg もしくは TLR4 の ligand である LPS 1.0mg/kg を投与し、24 時間後に生食 1.0 mL/kg もしくはメチルプレドニゾン 20 mg/kg の投与を行い、薬剤投与後1日もしくは 14 日目に屠殺した。肝臓および両大腿骨を摘出した。1 日目に屠殺した群では、酸化ストレスのひとつの指標として、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)活性を肝臓、大腿骨頭、大腿骨骨幹部にて測定した。14 日目に屠殺した群では、大腿骨の組織染色を行った。

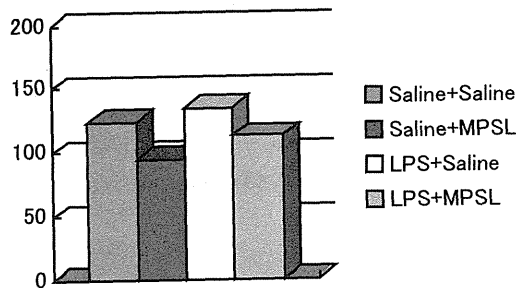
3. 研究結果

大腿骨頭壊死症は生食+メチルプレドニゾン投与

群では発生を認めず、LPS+生食投与群では 10%、LPS+メチルプレドニゾン投与群では 50%に大腿骨頭壊死が生じていた。肝臓における GPx 活性は、生食+生食群、生食+メチルプレドニゾン群と比較し、LPS+生食群で有意に活性が上昇し、LPS+メチルプレドニゾン群では LPS+生食群に対し、有意に低値を示した。一方、大腿骨頭および大腿骨骨幹部における GPx 活性は、いずれの群においても有意な変動を認めなかった。



大腿骨骨幹部



4. 考察

自己免疫疾患等の臓器障害の発生には、自然免疫異常による酸化ストレスが関与すると報告されている³⁾。本研究では、肝臓におけるGPxを指標とした酸化ストレスに関しては、LPS+生食群でのGPx活性が最も高く、LPS+メチルプレドニゾン群では、LPS+生食群より有意に低値を示した。これは過去に報告されているステロイド剤の抗酸化作用によるものと解釈できる⁴⁾。一方、大腿骨頭壊死症は、LPS+生食群でも生じていたことから酸化ストレスが大腿骨頭壊死の発生に関与していることは示唆されるものの、抗酸化作用が働いていたLPS+ステロイド群では、より高率に大腿骨頭壊死が発生していた。また、大腿骨頭や大腿骨骨幹部でのGPx活性は各群で変動を認めなかった。このことから、ラットにおけるステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序には酸化ストレスの関与はないことが示唆された。

5. 結論

ステロイド性大腿骨頭壊死症ラットモデルにおける酸化ストレスを測定した。その結果、肝臓ではLPS投与により酸化ストレスは亢進したが、LPS+ステロイド投与では有意に減弱していた。大腿骨頭および大腿骨骨幹部では、薬物投与による酸化ストレスの変動を認めず、ステロイド性大腿骨頭壊死症ラットモデルにおける酸化ストレスの影響はないことが示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
1) 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, 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 and rheumatism* 2011, 63:2138-2141.
- 2) Lubos E, Mahoney CE, Leopold JA, Zhang YY, Loscalzo J, Handy DE: Glutathione peroxidase-1 modulates lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression in endothelial cells by altering CD14 expression. *FASEB journal* 2010, 24:2525-2532.
- 3) Narshi CB, Giles IP, Rahman A: The endothelium: an interface between autoimmunity and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus? *Lupus* 2011, 20:5-13.
- 4) Jose HJ, Berenice SG, Cecilia VR: Induction of antioxidant enzymes by dexamethasone in the adult rat lung. *Life sciences* 1997, 60:2059-2067.

Kinase inhibitor のステロイド性大腿骨頭壊死症に対する予防効果

岡崎俊一郎^{1), 2)}、名越 智¹⁾、松本博志²⁾
(札幌医科大学 生体工学・運動器治療開発講座)¹⁾
(札幌医科大学 法医学講座)²⁾

我々は、ラットにおけるステロイド性大腿骨頭壊死症の発生は、ステロイド投与による転写制御因子活性の変動、相対的な IRF7 の活性化が関与していることを報告してきた。このことから、ステロイド投与と同時に分子生物学的製剤を用いて IRF7 を不活化させることで、大腿骨頭壊死症の発生予防効果が期待される。今回、ステロイドと kinase inhibitor を同時投与したところ、大腿骨頭壊死症の発生を認めず、その機序は IRF7 の不活化であることが明らかとなった。

1. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死症に対する有効な予防法は確立されていない。我々は、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序に自然免疫機構が関与していること、toll-like receptor のリガンド投与による転写制御因子 NF- κ B および IRF7 の活性化の後、ステロイド投与によって NF- κ B 活性が抑制された結果として大腿骨頭壊死症が発生することを報告してきた。このことから、ステロイド投与による NF- κ B 活性の抑制と同時に IRF7 活性の抑制をおこなえば、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生予防が出来ると考えられる。そこで、NF- κ B および IRF7 の阻害につながる I κ B kinase inhibitor である BAY11-7082 1)を用いた予防実験をおこなった。

2. 研究方法①

Wistar 系雄性ラットに TLR7 のリガンドであるイミキモド 30mg/kg を単回投与し、24時間後に I κ B kinase inhibitor である BAY11-7082 1, 3, 5, 10mg/kg およびメチルプレドニゾロン 20mg/kg の単回投与をおこなった。投与後2週間で屠殺し、大腿骨頭壊死症の発生率を検討した。

3. 研究結果①

イミキモドおよびステロイド投与群では、10 匹中 5 匹 (50%) に大腿骨頭壊死症の発生を認めたが、BAY11-7082 投与群では、BAY11-7082 濃度依存的に大腿骨頭壊死症の発生を抑制し、BAY11-7082 5mg/kg

投与群では 9 匹中 0 匹とイミキモドおよびステロイド投与群と比較し統計学的に有意差を認めた。しかしながら、BAY11-7082 1~5mg/kg 投与群では、1/10 匹のラットが死亡し、10 mg/kg 投与群では 3/6 匹が BAY11-7082 投与後 6~8 日目に死亡した。

次に、BAY11-7082 のステロイド性大腿骨頭壊死症に対する予防機序の検討を行った。

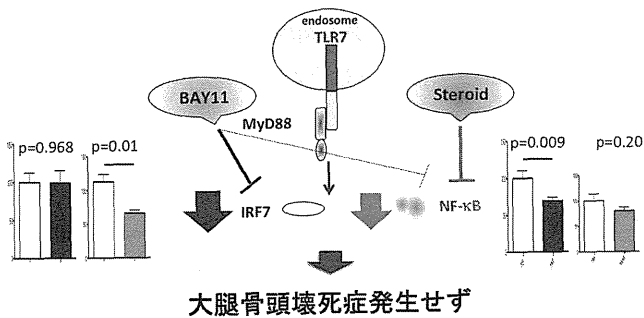
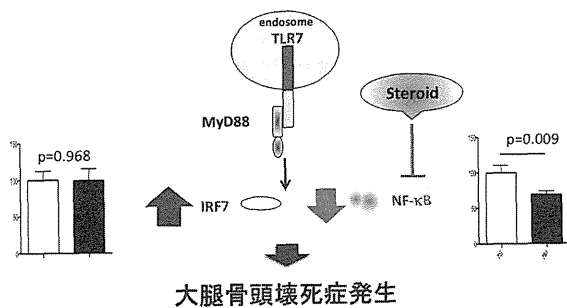
4. 研究方法②

研究結果①の結果から、BAY11-7082 のステロイド性大腿骨頭壊死症に対する予防機序の検討を行った。Wistar 系雄性ラットに TLR7 のリガンドであるイミキモド 30mg/kg を単回投与し、24時間後に I κ B kinase inhibitor である BAY11-7082 5mg/kg およびメチルプレドニゾロン 20mg/kg の単回投与をおこなった。投与後24時間で屠殺し、転写制御因子活性(NF- κ B, IRF7)、血中炎症性サイトカイン濃度(IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6IL-10, TNF a, IFN a)の検討を行った。

5. 研究結果②

転写制御因子である NF- κ B 活性は、イミキモド投与により活性化し、ステロイド投与により不活化することを昨年報告したが、BAY11-7082 投与によりさらに不活化する傾向を認めた。一方、IRF7 活性は、イミキモド投与により活性化するが、ステロイド投与では変化を認めなかったが、BAY11-7082 投与により有意に不活化していることが明らかとなった。また、血中サイトカイン濃度は ELISA

kit を用いて検討を行ったが、いずれも検出感度以下であった。



6. 考察

昨年度、ラットモデルにおけるステロイド性大腿骨頭壊死症は転写制御因子であるNF-κB, IRF7が活性化した後ステロイド投与によりNF-κBが不活化することで発生することを報告した。今回、IkB kinase inhibitorであるBAY11-7082をステロイドと同時に投与することにより、NF-κBが不活化すると同時にIRF7を不活化することで、大腿骨頭壊死症の予防が出来たことから、ラットでのステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序には、ステロイド投与による転写制御因子の変動が関与することが明らかとなった。

7. 結論

ラットでのステロイド性大腿骨頭壊死症はTLRのリガンド投与によるNF-κBおよびIRF7の活性化の後、ステロイド投与によってNF-κB活性が抑制された結果として発生することが、今回の結果から確認できた。また、本研究の結果から、BAY11-7082のようなtoll-like receptor signalingを阻害する新規生物学的製剤の開発によりステロイド性大腿骨頭壊死症が予防出来ることが示唆された。

8. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
1) 岡崎俊一郎、名越智、館田健児、片田竜一、水尾圭祐、渡邊智、山下敏彦、松本博志:分子標的薬を用いた特発性大腿骨頭壊死症予防の可能性、第27回日本整形外科学会基礎学術集会.名古屋、2012.10.26

9. 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

10. 参考文献

- 1) Miyamoto R, Ito T, Nomura S, Amakawa R, Amuro H, Katashiba Y, Ogata M, Murakami N, Shimamoto K, Yamazaki C, Hoshino K, Kaisho T, Fukuhara S. Inhibitor of IkappaB kinase activity, BAY11-7082, interferes with interferon regulatory factor 7 nuclear translocation and type 1 interferon production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R87

Dynamic contrast-enhanced MRI を用いた ステロイド性家兎骨壊死モデルの血行動態の評価

林 成樹、藤岡幹浩、池上 徹、齊藤正純、上島圭一郎、池上 徹、生駒和也、久保俊一
(京都府立医大大学院 運動器機能再生外科学)
松田 修
(京都府立医大大学院医学研究科 免疫学)

これまでステロイド投与後早期に骨内の変化を *in vivo* で捉えることは困難であった。ステロイド投与後早期の骨内の循環動態を明らかにするために、高磁場 MR 装置を用いて大腿骨骨壊死好発部位の dynamic contrast-enhanced MRI を撮像した。得られた画像から骨壊死好発部位の time signal intensity curve を作成して enhancement ratio、initial slope および area under the curve を算出し、ステロイド投与前後の血流変化を評価した。これらの値は 3 項目ともにステロイド投与前と比較してステロイド投与後に有意に低下しており、ステロイド投与後に大腿骨の血流が低くなっていることが確認できた。本研究の結果はステロイド性骨壊死の病態解明につながる結果であると考えられる。

1. 研究目的

われわれは腎移植患者においてステロイド投与後最短 6 週で MR 画像における band 像が確認できることを報告した¹⁾。実験的研究では、阻血を発生させてから MRI で band 像が出現するまでの期間は 4 週であったと報告されている²⁾。これらのことからステロイド性骨壊死では大腿骨内に骨壊死が発生する時期はステロイド投与後 2 週以内であると推察される。動物モデルを使用した最近の報告で、ステロイド投与後 3～5 日目から VEGF が発現する³⁾ということや酸化ストレスが発生している⁴⁾ことが述べられている。したがってステロイド投与後 2 週以内に阻血にかかわるイベントが起こっていると考えられる。しかし、実際にステロイド投与後早期の血流変化を確認したという報告はない。本研究ではステロイド投与後早期の血行動態を検討することを目的とした。

MR 装置は同一個体に対して非侵襲的に、*in vivo* で繰り返し評価することができるという点で経時的な評価に有用である。血流評価をするための撮像方法は dynamic contrast-enhanced MRI(DCE-MRI)がよく用いられる⁵⁾。そこで本研究では、DCE-MRI で大腿骨内の血流を評価することとした。ステロイド投与後ごく早期から血流が変化することを捉えることができた

ばステロイド性骨壊死の病態解明につながると思われる。

2. 研究方法

28 週齢以上の雄性日本白色家兎 9 羽の右殿筋内にメチルプレドニゾロン(methylprednisolone: MPSL) 20mg/kg を単回注射し、骨壊死モデルを作成した⁶⁾。

MR 装置は Agilent 社製動物用横置き型 MRI system、7.04T を使用した(図 1)。撮像時期は、ステロイド投与前とステロイド投与後 1、5、10、14 日目とした。家兎をイソフルラン吸入麻酔下に腹臥位とし、MR 装置に固定した。

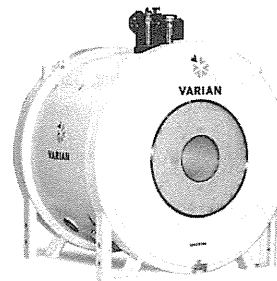


図 1

①DCE-MRI

Spoiled gradient echo 法を用いた DCE-MRI で両股

関節と大腿骨骨幹部を含む画像(図 2)を 40 回連続で撮像した。10 回目撮像時に 0.2 mmol/kg の MRI 用造影剤 (Gadolinium Diethylenetriaminepenta-acetic Acid: Gd-DTPA) を外側耳静脈から急速投与した。大腿骨近位部の骨壊死好発部位と筋肉内に region of interest(以下 ROI)を設定した(図 2)。

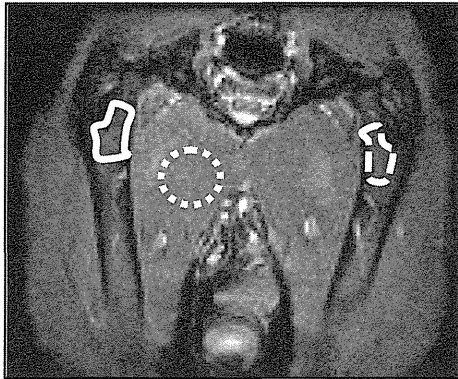


図 2 dynamic contrast-enhanced MRI の画像
 :右大腿骨好発部位、 \square :左大腿骨好発部位、 \circ :筋肉の ROI

②評価方法

撮像開始時の信号強度(signal intensity: SI)を基準に relative intensity(RI)を次の式で算出した。

$$RI(t) = SI(t) / SI(0)$$

(RI(t): 時間 t における relative intensity、

SI(t): 時間 t における SI、SI(0): 時間 0 における SI)

この RI(t) の値を経時的にプロットして time signal intensity curve を作成した(図 3a)。

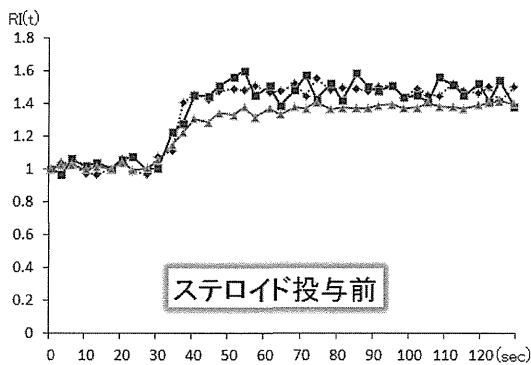


図 3a time signal intensity curve の 1 例

◆: 右大腿骨好発部位、■: 左大腿骨好発部位、▲: 筋肉の ROI

40 回連続で撮像した RI(t) の値を造影剤投与前の 10 回の a 相、造影剤投与直後に SI が増加しつつある時期の 15 回の b 相と造影剤投与後定常状態となった 15 回の c 相の 3 相に分けた(図 3b)。

I. Time signal intensity curve の経時的な変化を確認した。

II. Enhancement ratio(ER)は c 相の RI(t) の値の平均を a 相の平均で除算することで算出した。

III. Initial slope(IS)は time signal intensity curve の造影剤投与直後の傾きとして算出した。

IV. Area under the curve(AUC)は b 相の RI(t) の値を総和することで算出した。

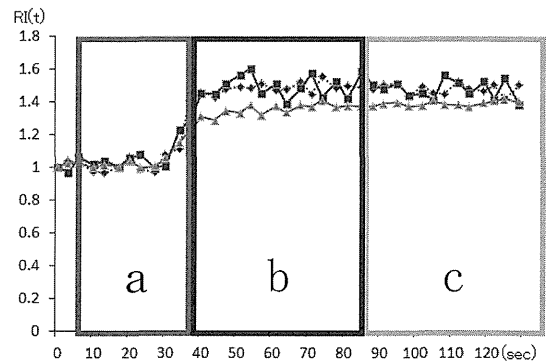


図 3b a. 造影剤投与前 10 回、b. 造影剤投与直後に造影剤投与直後の SI が増加しつつある時期の 15 回、c. 造影後定常状態となった 15 回

③統計学的評価

ER、IS と AUC に対して、ステロイド投与前の値とステロイド投与後 1 日目、5 日目、10 日目および 14 日目の中で最小となった値とを Wilcoxon signed-rank test で統計学的に解析した。

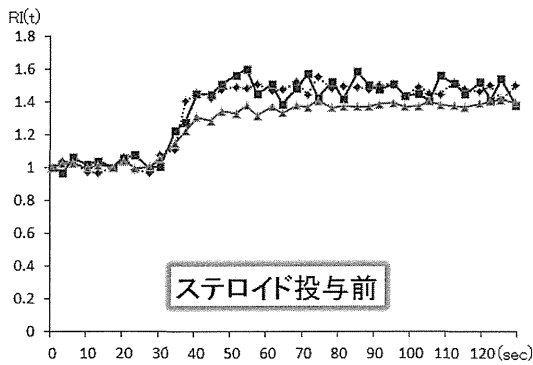
④組織学的評価

ステロイド投与後 14 日目に MRI を撮像した後、ペントバルビタールを大量に静脈内投与することで犠牲死とした。HE 染色の組織標本を大腿骨近位部の前額断で作製した。周囲の骨髄造血細胞壊死を伴う骨梁内骨細胞の空虚化と明らかな核濃縮、あるいは造血細胞と脂肪細胞がともに広範に壊死を生じている部位を骨壊死部位と定義した⁷⁾。

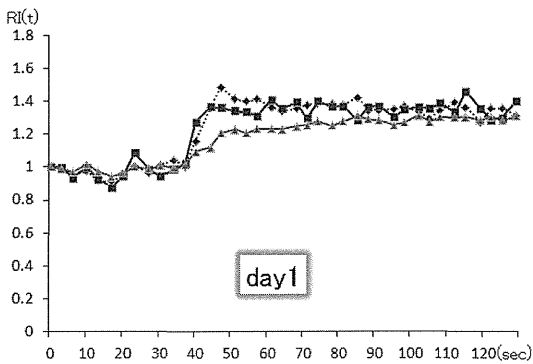
3. 研究結果

典型的な経過をたどった 2 例の time signal intensity curve の経時的な変化を提示する。

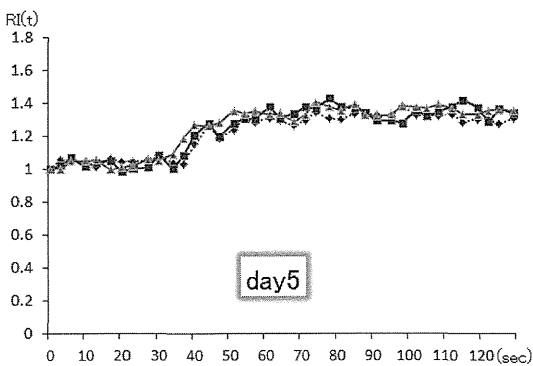
1 羽目は、ステロイド投与後 5 日目にステロイド投与前と比較して造影剤投与後の信号強度が低下した。ステロイド投与後 10 日目および 14 日目にはステロイド投与前と同じレベルまで信号強度は改善した(図 4a-e)。



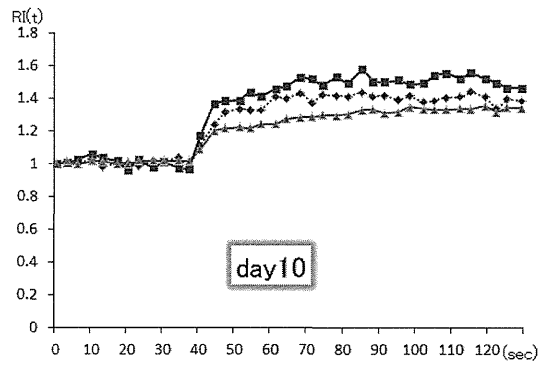
4a



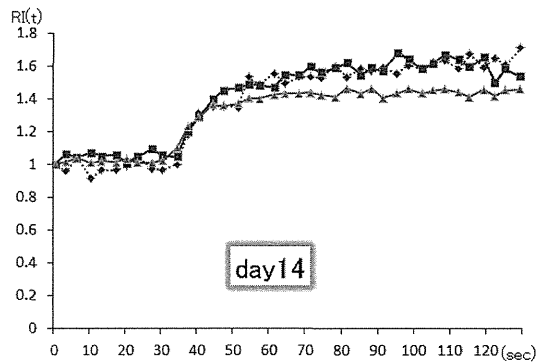
4b



4c



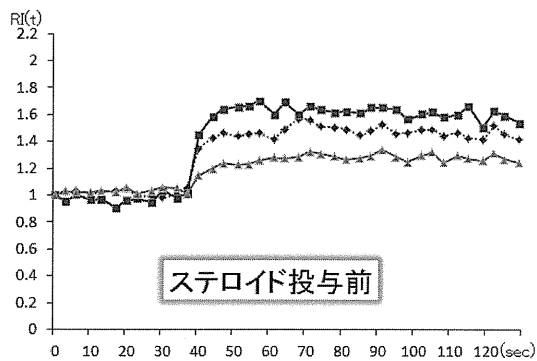
4d



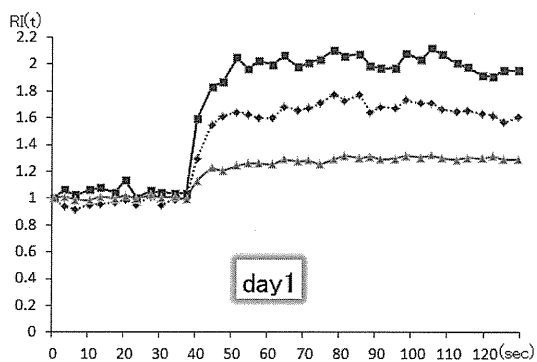
4e

図 4a~e 1 羽目の経時的な time signal intensity curve

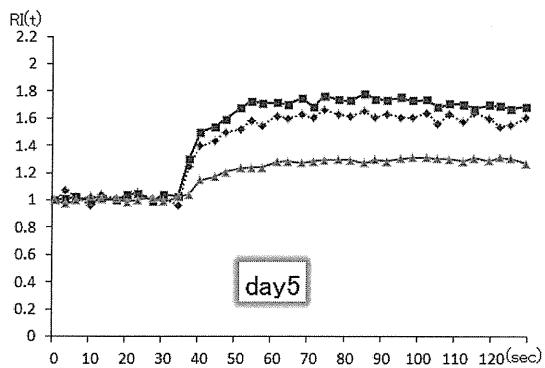
2羽目はステロイド投与後1日目に両大腿骨特に左大腿骨で信号強度が上昇した。ステロイド投与後10日目にはステロイド投与前と比較して信号強度が低下したが、14日目には改善した(図5a-e)。



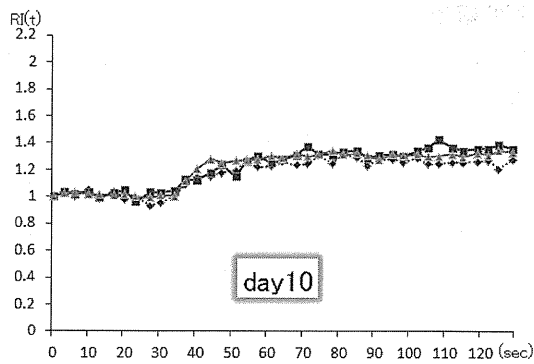
5a



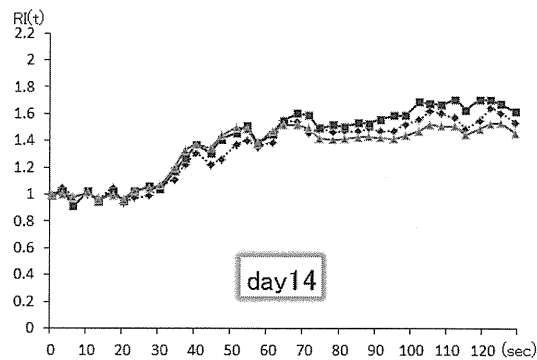
5b



5c



5d



5e

図5a~e 2羽目の経時的な time signal intensity curve

II. 骨壊死好発部位の ER の変化

18 大腿骨中 3 大腿骨で ER が上昇したが、残りの 15 大腿骨すべてで ER は低下した (図 6a)。ステロイド投与前と比較してステロイド投与後に ER は統計学的に有意に低下した。最も低下した時期は、ステロイド投与後 1 日目が 5 大腿骨(28%)、5 日目が 5 大腿骨(28%)、10 日目が 3 大腿骨(17%)で 14 日目が 2 大腿骨(11%)であった。

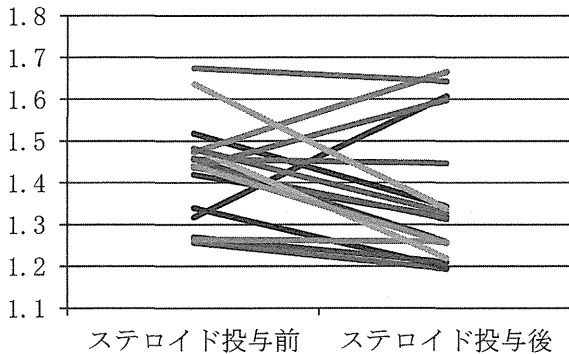


図 6a 骨壊死好発部位内の ER の変化

III. 骨壊死好発部位の IS の変化

18 大腿骨中 2 大腿骨で IS が上昇したが、残りの 16 大腿骨すべてで IS は低下した (図 6b)。ステロイド投与前と比較してステロイド投与後に IS は統計学的に有意に低下した。最も低下した時期は、ステロイド投与後 1 日目が 4 大腿骨(22%)、5 日目が 6 大腿骨(33%)、10 日目が 2 大腿骨(11%)で 14 日目が 4 大腿骨(22%)であった。

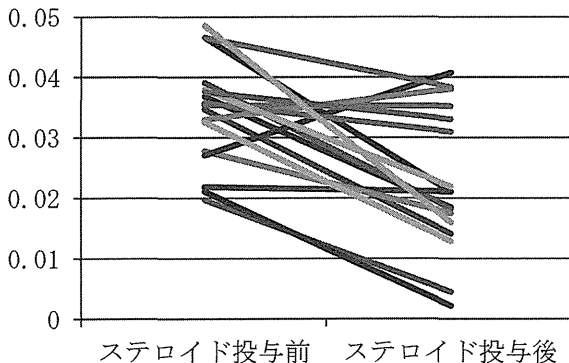


図 6b 骨壊死好発部位内の IS の変化

IV. 骨壊死好発部位の AUC の変化

18 大腿骨中 3 大腿骨で AUC が上昇したが、残りの 15 大腿骨すべてで AUC は低下した (図 6c)。ステロイド投与前と比較してステロイド投与後に AUC は統

計学的に有意に低下した。最も低下した時期は、ステロイド投与後 1 日目が 5 大腿骨(27%)、5 日目が 5 大腿骨(27%)、10 日目が 2 大腿骨(11%)で 14 日目が 3 大腿骨(17%)であった。

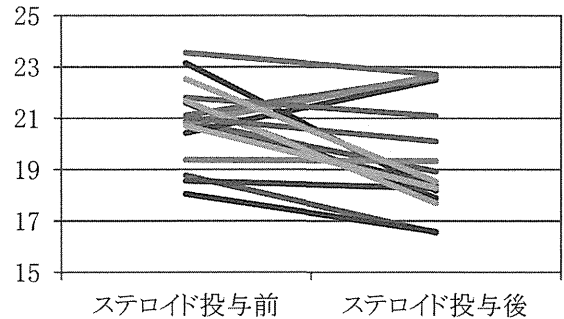


図 6c 骨壊死好発部位の AUC の変化

MRI を撮像した 9 羽中、6 羽 12 大腿骨で組織学的評価を行った。12 大腿骨中、1 大腿骨(6 羽中 1 羽)で骨壊死を認めた。骨壊死のある大腿骨の ER、IS および AUC はステロイド投与後 5 日目に低下していた。ER と IS の低下の程度は 18 大腿骨中 3 番目で、AUC の低下の程度は 2 番目であった。

4. 考察

MRI を用いた血流評価には DCE-MRI が用いられることが多い。評価方法としては、ER、IS、AUC、relative signal intensity、time to peak enhancement や washout slope などがあげられている。これらの値に関して、検者間差や motion artifact などの影響が関与するため、一つのパラメータだけでは正確な事象を説明することができないので、複数のパラメータで総合的に判断すべきであると報告されている⁵⁾。本研究ではこれらの中から ER、IS と AUC の 3 つのパラメータを併用して評価した。骨壊死好発部位において、3 つのパラメータともに統計学的に有意に低下していた。3 つのパラメータすべてで低下しているため、実際に血流が低下していると考えた。83%の大腿骨が 14 日目までに血流が低下しており、67%では 10 日目までに血流が低下していた。

過去の報告でステロイド投与後 3 日目に VEGF が発現するという事³⁾や、ステロイド投与後 5 日目までに DNA の酸化障害が生じる⁴⁾と述べられている。今回の結果では 10 日目までに 67%の大腿骨で血流が低下しており、これまでに報告されている組織学的変化が出現する時期に実際に血流が低下していること

を証明できた。

本研究で実際に大腿骨内の血流が低下していることを経時的に in vivo で確認することができた。われわれはこれまでに vitamin E 投与と電磁場刺激による骨壊死抑制効果を報告した^{8),9)}。しかし、vitamin E や電磁場刺激が骨壊死を抑制する機序は十分に明らかになっていない。本研究の手法を用いれば、vitamin E 投与や電磁場刺激後の血流を評価することが可能であり、vitamin E や電磁場刺激が血流にどのような効果を与えているかを確認できると期待される。DCE-MRI では vitamin E や電磁場刺激だけでなく、これまでに骨壊死予防効果があると報告されている薬物療法や物理療法が血流にどのような影響を与えているかを in vivo で確認できるであろう。この点で今後の壊死予防法研究に大きな役割を果たすことを期待する。

5. 結論

①ステロイド投与後に有意に ER、IS および AUC が低下した。

②血流が低下する時期は 83%が 14 日目まで、67%が 10 日目までに低下した。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 研究発表

- 1) 林 成樹、藤岡幹浩、生駒和也、齊藤正純、池上 徹、栗林正明、石田雅史、上島圭一郎、久保俊一：高磁場 MR 装置を用いた家兔ステロイド性骨壊死モデルの血行動態の検討、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会。名古屋、2012.10.27
- 2) 藤岡幹浩、久保俊一：特発性大腿骨頭壊死症に対する MRI による病態解析、第 85 回日本整形外科学会学術総会。京都、2012.5.19
- 3) 藤岡幹浩、久保俊一：MRI を用いたステロイド性骨壊死の病態解析、第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会。東京、2012.4.28

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

- 1) Kubo T, Yamazoe S, Sugano N, Fujioka M, Naruse S, Yoshimura N, Oka T, Hirasawa Y. Initial MRI findings of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in renal allograft recipients. *Magn Reson Imaging* 1997; 15: 1017-23.
- 2) Nakamura T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K, Kadoya M. Early magnetic resonance imaging and histologic findings in a model of femoral head necrosis. *Clin Orthop Relat Res* 1997 Jan; (334): 68-72.
- 3) 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 Dec; 35(12): 2383-90.
- 4) Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda, Sugimori T, Matsumoto T. DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology(Oxford)* 2005; 44: 456-60.
- 5) Yang X, Knopp MV. Quantifying tumor vascular heterogeneity with dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging: a review. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 732-848.
- 6) 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) Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, Sueishi K. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. *Clin Orthop Relat Res* 1995 Jul; (316): 235-43.
- 8) 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.

- 9) Ishida M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Kubo T. Electromagnetic fields: a novel prophylaxis for steroid-induced osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res 2008 May; 466(5): 1068-73.