Histopathological Study of Steroi-induced Osteonecrosis in Rabbits

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9486

金沢大学十全医学会雑誌　第109巻　第4·5合併号　262－278（2000）

ステロイド性骨壊死モデルの作成とその病理組織学的検討

－ステロイド性骨壊死の発生機序およびアポトーシスとの関連について－

金沢大学医学部医学科整形外科学講座（主任：富田勝郎教授）
加　畑　多　文

ステロイド性骨壊死は，最終的に骨内の虚血によって発生すると考えられているが，虚血に至る機序は未だ解明されていない．発生機序の解明のためには，再現性の良好な動物モデルの確立が必要である．そこで本研究では，家兎にステロイドを投与して骨壊死モデルを作成し，その投与量や投与期間を変え，ステロイド性骨壊死の発生機序や発生時期および血液生化学的検査値との関連について検討した．また，近年組織の虚血と密接な関連を示すといわれるアポトーシスについても，同様の家兎モデルを用いて検討した．体重1kgあたり4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを週1回ずつ，最大8週間まで投与したステロイド投与家兎を作成し，経時的にその病理組織像を観察した．骨壊死は，大腿骨近位部，大腿骨遠位部，上腕骨近位部の骨幹端部から骨幹部にかけて発生しており，その発生率は，4週間のステロイド投与でそれぞれ70％，30％，40％であった．また本骨壊死は，初回ステロイド投与後1週目より観察でき，2週目以降はステロイドを継続的に投与してもその発生率は増加しなかった．その病理組織像は，ステロイドの投与期間に応じ特徴的な所見を示す一方で，ステロイドの投与期間が延びても，新たな骨壊死の発生や壊死範囲の拡大は認められなかった．同様の方法で，家兎にステロイドを1回のみ投与し4週間飼育したたモデルと，4週間投与し，その後4週間投与を休止したモデルとを作成したところ，それらのモデルの骨壊死部の修復は，同期間ステロイドを継続投与したモデルに比べ旺盛であったものの，骨壊死発生率に差はなかった．血液生化学的な検討では，ステロイドを継続的に投与した場合，1回のみ投与した場合のいずれにおいても，著明な高脂血症と凝固亢進状態が骨壊死発生時期に一致して認められた．以上の結果から，ステロイド性骨壊死は，慢性的な，あるいは繰り返し生じる虚血エピソードにより生じるものではなく，ステロイド投与後比較的早期のある限局した期間にのみ生じる急性虚血発作により生じるものと考えた．そして，その発生機序としては，ステロイド投与により生じた急激な高脂血症が，凝固亢進状態を引き起こし，これらを一因として骨内血管での血栓形成を促し，骨内虚血を発生させるという機序を考えた．一方，同様の方法で作成したステロイド性骨壊死において，アポトーシスの関与を検討したところ，修復のほとんど行われていない骨壊死部周辺にはアポトーシス細胞の集簇が観察されたが，修復の進んだ骨壊死部周辺には，ほとんどアポトーシス細胞は観察されなかった．ステロイド投与により生じた骨内の虚血発作は，骨内細胞のネクローシスとともにアポトーシスをも誘発し，骨壊死成立に少なからぬ影響を与えていると推察した．

Key words　steroid, osteonecrosis, rabbit, apoptosis

近年日常診療において，ステロイドがその多様な薬理学的効果からさまざまな疾患の治療に用いられている．しかし，その投与量や投与期間に応じてさまざまな副作用を伴うことは周知の事実である[1]．骨壊死症 (osteonecrosis) は，種々の自己免疫疾患や膠原病などの治療，臓器移植後などにステロイドが用いられた際にしばしば生じることが知られている[2]．このステロイド性骨壊死は全身の骨に多発性に発生し，大腿骨頭，大腿骨顆部，上腕骨頭が好発部位である[3]．これらの部位に広範囲に骨壊死が生じた場合には，関節表面の圧壊をきたし，関節破壊を急速に進行させる．いったん骨壊死による関節の圧潰 (collapse) が生じると，その強い疼痛のために患者は日常活動性を著しく制限され，人工関節置換などの手術的治療を余儀なくされることが多い[4]．しかしながら，現時点においては有効な予防方法が確立されておらず，ステロイド療法の普及と使用量の増大に伴ってその発生頻度は増加傾向にある[5]．予防方法の確立のためにもその発生機序や発生時期，危険因子の解明が早急に望まれている．

ステロイド性骨壊死の発生機序については，最終的に骨内の虚血によって発生するという点では意見が一致しているが[4)6)7]，虚血に至る機序は未だ解明されていない．同様に，どのくらいの量のステロイドを投与すると骨壊死が発生するのか，ステロイド投与後いつごろに骨壊死が発生するのかなどについても明らかになっていない．その原因として，骨壊死が生じても無症候性の症例がしばしば存在すること[8]，症状が認められるときには壊死発生時よりかなり時間が経過しており，既に壊死が完成してしまっているため，発生機序の手がかりとなる早期の病

平成12年8月3日受付，平成12年9月6日受理

Abbreviations：HDL, high density lipoprotein; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotine nick end-labeling

理像をとらえることが困難であること，再現性の良好な動物モデルが存在しなかったことなどが挙げられる．前述の理由で臨床例における病態の解明が困難な本疾患においては，動物モデルの確立が研究の発展に重要である．

一方，近年になり局所の血流低下や低酸素血症によりひきおこされる虚血性心疾患や虚血性脳血管障害に，アポトーシスが関与するという知見が急速に広まりつつある[9)10)]．アポトーシスが虚血と関連があるという事実はきわめて興味深いものであり，ステロイド性骨壊死発生にもアポトーシスが関与している可能性が十分に考えられる．

そこで本研究では，1）家兎にステロイドを投与して実験的骨壊死モデルを作成すること，2）ステロイドの投与量や投与期間を変え，ステロイド性骨壊死の発生機序や発生時期，血液生化学的検査値との関連について検討すること，3）ステロイド性骨壊死におけるアポトーシスの関与を検討すること，以上の三点を目的とした．

対象および方法

実験動物には体重約3.5kgの成熟雌性日本白色家兎を用いた．また本研究のプロトコールは，金沢大学医学部動物実験倫理委員会の規約に基づいて行われたものである．

Ⅰ．ステロイド性骨壊死モデルの確立 (実験1)

家兎にステロイドを投与することにより，骨壊死がどの部位にどのくらいの頻度で作成できるかを知る目的で以下の実験を行った．

体重1kgあたり4mgの酢酸メチルプレドニゾロン（日本アップジョン，東京）を週1回右殿筋部に筋注し，4週間投与したステロイド投与家兎 (ステロイド群：4週群) と，ステロイドを投与せず同一条件で飼育した対照用家兎 (対照群) をそれぞれ10羽ずつ作成した．処置の終了後にネンブタール (大日本製薬，大阪) の急速静注によって家兎を安楽死させ，ただちに両側の大腿骨と上腕骨を摘出した．摘出の後に組織切断機（Exakt, Hamburg, Germany) を用いて，大腿骨近位部，大腿骨遠位部，上腕骨近位部をそれぞれの関節面より約4cmの位置で切断し，大腿骨と上腕骨の近位部を冠状面で，大腿骨の遠位部を矢状面で，それぞれ最大割面が得られるように割断した．割断後直ちに10％ホルマリンに浸漬して約1週間固定し，EDTA液で脱灰の後，HE染色標本を作成して光学顕微鏡で観察した．おのおのの標本につき，骨壊死発生の有無とその病理組織学的所見について検討した．骨壊死の発生率は，用いた家兎数に対する骨壊死を認めた家兎数の割合で算出した．採取した両側の骨のどちらか一方にでも骨壊死を認めた場合は，骨壊死ありとした．

Ⅱ．ステロイド継続投与に伴う骨壊死部の病理組織学的変化と骨壊死範囲および骨壊死発生率の経時的変化についての検討 (実験2)

骨壊死はステロイド投与後いつ頃発生し，その壊死範囲や発生率は，ステロイドを継続投与することによりどのように変化するのかを知る目的で以下の実験を行った．

実験1と同様に，体重1kgあたり4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを右殿筋部に1回筋注し，3日後，1週後に屠殺したモデルをそれぞれ3日群，1週群とした．さらに，週1回筋注し，2週間，4週間，8週間投与したモデルをそれぞれ2週群，4週群，8週群とし，それぞれ15羽ずつ作成した．4週群の15羽のうち10羽は実験1のものを用いた．これらに実験1の対照群 (10羽) を加え計6群で検討した (図1A)．これらを実験1と同様の方法で屠殺後，大腿骨近位部のHE染色標本を作成し，以下の項目につき比較検討した．

1．骨壊死発生率

骨壊死の発生率は，実験1と同様に算定した．有意差の検定にはFisherの直接確率計算法を用い，危険率5％未満 ($p<0.05$) の場合を有意差ありとした．

2．骨壊死発生部位

骨壊死の発生部位は，大腿骨近位部を骨端部 (骨頭部，大転子部)，骨幹端部 (内側，外側)，転子下部 (内側，外側)，骨幹部 (内側，外側) の8区域に分け評価した．

3．骨壊死巣数および面積

骨壊死巣数は，1大腿骨あたりに観察し得た骨壊死巣数の平均値を各群間で比較した．得られた値は$\bar{x}\pm SD$で表し，有意差の検定にはKruskal-Wallisの順位和検定を用いた．危険率5％未満 ($p<0.05$) の場合を有意差ありとした．

骨壊死部の面積は，光学顕微鏡で撮影した骨壊死部の写真をパーソナルコンピューター (Power Macintosh 8100/ 80, Apple Computer, Inc., Cupertino, USA) に取り込み，画像解析用のパブリックドメインソフトNIHイメージ (U.S. National Institutes of HealthのWayne Rasband作) を用い，各骨壊死部の断面積を測定した．方法は，コンピューター上で骨壊死部の外縁をトレースしてこの部分の面積を測定し，これを5回繰り返した平均を各々の断面積の値とした．得られた値は$\bar{x}\pm SD$で表し，有意差の検定にはKruskal-Wallisの順位和検定を用いた．危険率5％未満 ($p<0.05$) の場合を有意差ありとした．

4．病理組織学的変化

それぞれの群に認められた骨壊死部の病理組織学的な変化について検討した．

Ⅲ．ステロイド投与量および投与期間と骨壊死部修復反応についての検討 (実験3)

ステロイドの投与量や投与期間が異なると，骨壊死部の病理組織像，特に修復像がどのように変化するのかを知る目的で以下の実験を行った．

実験1と同様に，体重1kgあたり4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを週1回4週間投与した後に，さらに4週間ステロイドを投与せずに飼育したモデル (4週＋4週群) と，酢酸メチルプレドニゾロンを1回のみ投与し，その後4週間ステロイドを投与せずに飼育したモデル (1回投与群) とをそれぞれ10羽ずつ作成した．それらに実験2で用いた4週群，8週群を加え，計4群で検討した (図1B)．これらを屠殺後，大腿骨近位部のHE染色標本を実験1と同様の方法で作成し，以下の項目を比較検討した．

1．骨壊死発生率および発生部位

実験2と同様の方法で，骨壊死の発生率および発生部位を各群間で比較した．骨壊死発生率の有意差検定にはFisherの直接確率計算法を用い，危険率5％未満 ($p<0.05$) の場合を有意差ありとした．

2．病理組織学的変化

それぞれの群に認められた骨壊死部の病理組織学的な変化について検討した．

Ⅳ．ステロイド投与に伴う血液生化学的検査値の経時的変化と骨壊死発生との関連についての検討 (実験4)

ステロイドの投与に伴い，家兎の生体内に生じる血液生化

学的な変化と骨壊死発生との関連を知る目的で以下の実験を行った.

1．ステロイド継続投与における血液生化学的検査値の経時的変化

実験2で用いた家兎 (3日群，1週群，2週群，4週群，8週群) より，ステロイド投与前および初回ステロイド投与後1日，3日，1週間，2週間，4週間，8週間の時点で耳動脈より採血を行い，血液生化学的検査値の変動を脂質系〔総コレステロール，トリグリセライド，遊離脂肪酸，高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) コレステロール〕と凝固系 (血小板数，活性化部分トロンボプラスチン時間，アンチトロンビンⅢ，フィブリノーゲン，Dダイマー) について検討した.

これらの検査値は$\bar{x}\pm SD$で表し，計測時別の平均値の比較には二元配置分散分析法を用い，有意差が出た場合の群間の多重比較はScheffeのF検定を用いた．また，骨壊死を認めた群と認めなかった群との測定値の有意差の検定には，Mann-WhitneyのU検定を用いた．危険率5％未満 ($p<0.05$) の場合を有意差ありとした.

2．ステロイド1回投与における血液生化学的検査値の経時的変化

実験3で用いた1回投与群の家兎より，ステロイド投与前および初回ステロイド投与後1日，3日，1週間，2週間，4週間の時点で耳動脈より採血を行い，前項と同様の項目について検討した.

これらの検査値は$\bar{x}\pm SD$で表し，統計学的処理も前項と同様に行った.

Ⅴ．ステロイド性骨壊死におけるアポトーシスの関与についての検討 (実験5)

ステロイド性骨壊死の発生段階におけるアポトーシスの関与について検討する目的で以下の実験を行った.

実験3と同様に，酢酸メチルプレドニゾロンを4週間投与したモデル (4週群) と，4週間投与した後にさらに8週間ステロ

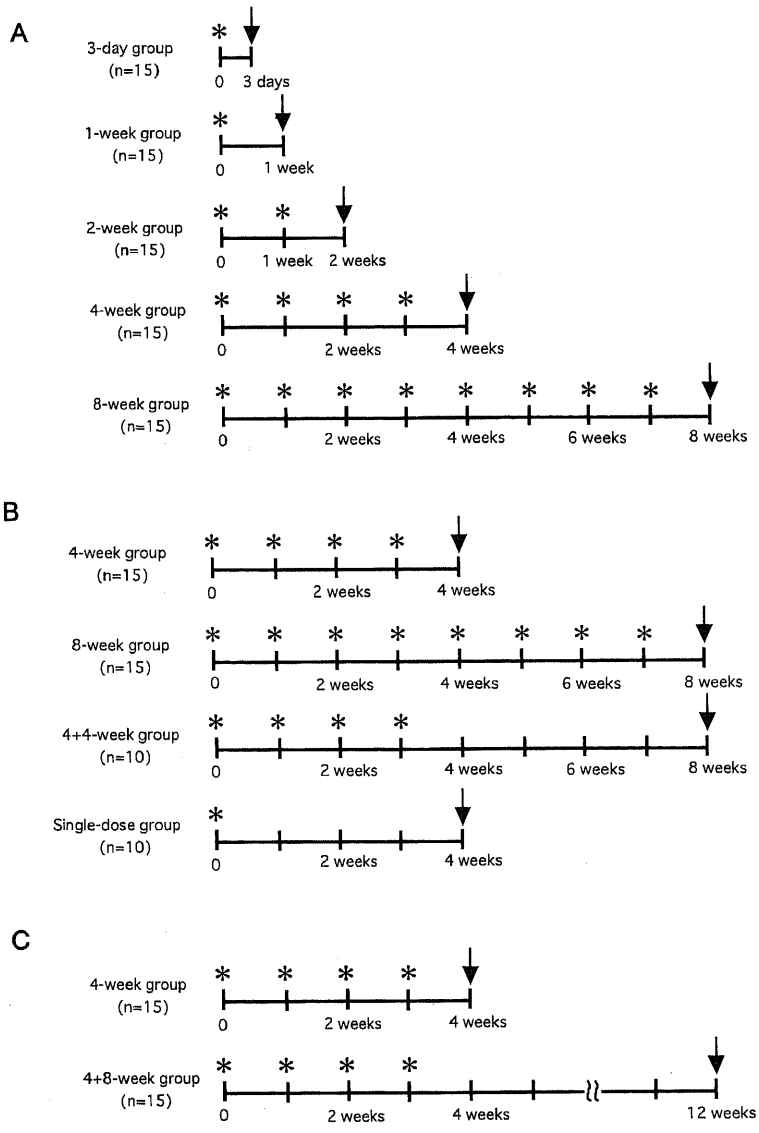


Fig. 1. Schematic representation of the treatments. ＊, Intramuscular injections of methylprednisolone (4mg/kg); ↓, Euthanasia and removal of the femora.
(A) Treatments in study 2. (B) Treatments in study 3. (C) Treatments in study 4.

イドを投与せずに飼育したモデル (4週＋8週群) をそれぞれ15羽ずつ作成し，これに対照群の10羽を加え，計3群で比較検討した (図1C)．これらを屠殺後，4週群，4週＋8週群の10羽および対照群の5羽については，大腿骨近位部のパラフィン包埋標本を実験1と同様の方法で作成した．また各群残りの5羽ずつは，透過型電子顕微鏡による検討に用いた．これらについて以下の項目を比較検討した．

1．病理組織学的変化

HE染色標本を作成し，それぞれの群に認められた骨壊死部の病理組織学的な変化について検討した．

2．TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) 法による検討

HE染色標本の連続切片をTUNEL法で染色し，骨壊死部におけるアポトーシス細胞の発現の有無を評価した．TUNEL法は，Gavrieli ら[11]の方法に基づき，アポトーシスによって生じたDNA断端の3' OH末端部分にターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase) を用いてビオチン標識dUTPを取り込ませ，このビオチンをペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて酵素化学的方法で可視化した．

3．透過型電子顕微鏡による検討

大腿骨を摘出後，近位部を組織切断機で環状面で半割し，4℃でKarnovsky液[12]に約2時間浸した．次に骨髄を注意深く摘出し，アセトンで脱脂したカミソリで1～2mm角に切り出し，さらに同一溶液に4℃で24時間浸し固定した．その後0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で3回洗浄し，1％オスミウム酸－0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で後固定を約2時間行った．エタノール希釈系列で脱水後，エポン樹脂に包埋し，超薄切片を作成した．最後に酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を施し，透過型電子顕微鏡H-600 (日立，東京) にて観察した．なお，骨髄採取部位は大腿骨近位部の骨幹端部から骨幹部にかけての内側骨皮質に接する部位とし，マクロ標本で骨壊死部が明らかなものでは，同部を含めた骨髄組織を採取した．

4．TUNEL陽性細胞数

TUNEL法により濃染し，かつ形態の保たれている核を有する細胞をTUNEL陽性細胞とみなした．各標本における骨幹から骨幹端部にかけての骨壊死のない健常領域から無作為に3視野 (×400倍) を抽出し，TUNEL陽性細胞数を3群間で比較した．4週群と4週＋8週群においては，骨壊死の中心部，辺縁部，骨壊死部以外の健常部から同様に3視野を抽出し，TUNEL陽性細胞数を比較した．得られた値は$\bar{x}\pm SD$で表し，これらの群間の比較には二元配置分散分析法を用い，有意差が出た場合の群間の多重比較はScheffeのF検定を用いた．危険率5％未満 ($p<0.05$) の場合を有意差ありとした．

成　績

Ⅰ．ステロイド性骨壊死モデルの確立 (実験1)

1．病理組織像

1) マクロ像

組織切断機にて割断された骨組織の断面は，通常，骨端部は

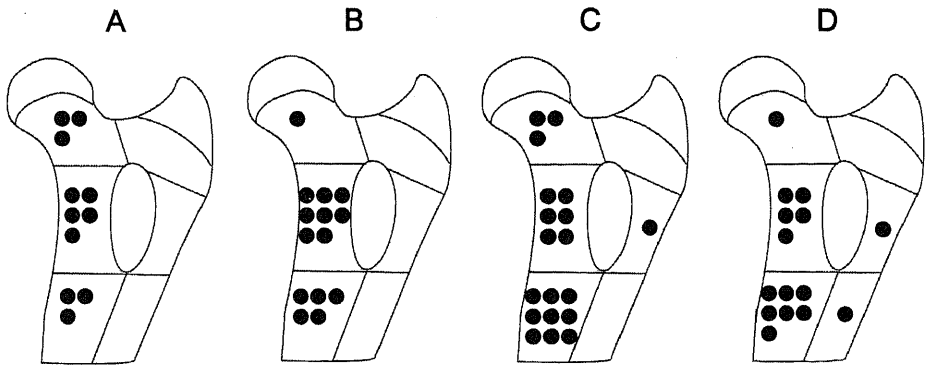


Fig. 3.　Schematic drawings of the location of osteonecrosis in the proximal femur.
●, necrotic focus. (A) 1-week group, (B) 2-week group, (C) 4-week group, (D) 8-week group.

Table 1. Prevalence of osteonecrosis, number of necrotic foci, and size of necrotic area in various groups (study 2).

Groups	No.of animals	No. (%) of cases with osteonecrosis		No. of necrotic foci ($\bar{x}\pm SD$)		Necrotic area ($\bar{x}\pm SD$, mm^2)	
Control	10	0 (0)		0		0	
3-day	15	0 (0)		0		0	
1-week	15	7 (47)	NS [a]	1.38±0.51	NS [b]	5.58±1.79	NS [b]
2-week	15	9 (60)		1.27±0.47		3.80±2.64	
4-week	15	11 (73)		1.46±0.66		5.11±5.04	
8-week	15	10 (67)		1.23±0.44		5.12±2.53	

NS, not statistically significant.
a) Determined with Fisher's exact test.
b) Determined with Kruskal-Wallis test.

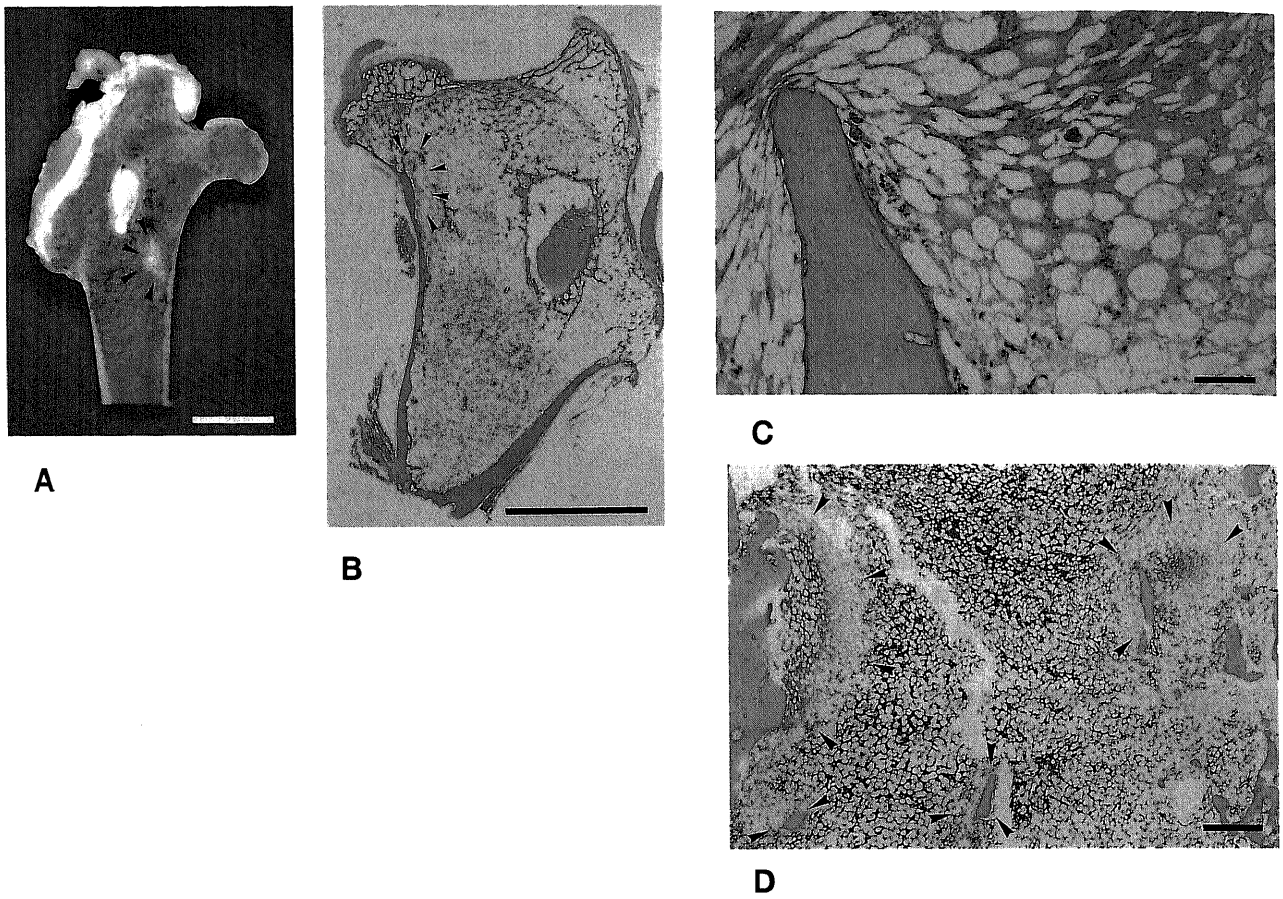


Fig. 2. Macroscopic and histopathologic findings of osteonecrosis in the femur of steroid-treated rabbits at 4 weeks.
(A) Cross section of proximal femur. Macroscopically, osteonecrosis was observed in the metaphysis and diaphysis as yellowish-colored areas (arrow heads). (B) Coronal section of proximal femur. Osteonecrosis was typically localized in the area of the metaphysis and diaphysis, particularly in the periphery of the marrow cavity (arrow heads). (C) Typical osteonecrosis. Histologically, typical osteonecrosis showed an accumulation of bone marrow cell debris and bone trabeculae demonstrating empty lacunae or osteocyte ghosts. (D) Multifocal osteonecrosis. Osteonecrosis is locally distributed and multifocally dispersed (arrow heads).
(B, C, D) HE staining. Original magnification, (B) × 0.9, (C) × 200, (D) × 20. Scale bars, (A, B) 1cm, (C) 20 μm, (D) 200 μm.

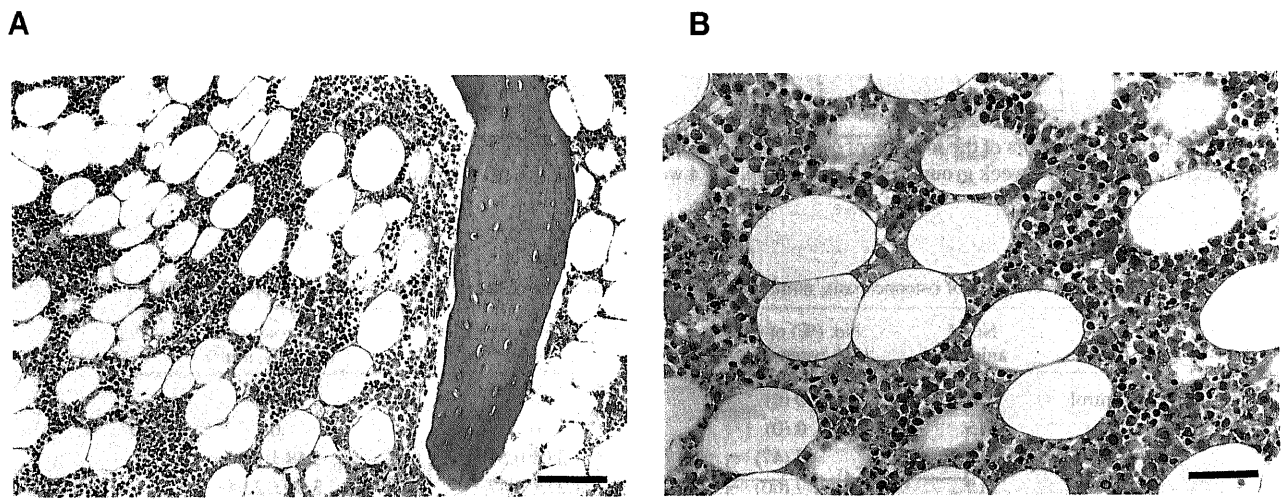


Fig. 4. Histopathologic findings of osteonecrosis in 1-week group.
(A) and (B), The necrotic area showed an accumulation of degenerative or necrotic marrow and fat cells, and bone trabeculae showing either empty lacunae or osteocyte ghosts. Although the fat cells showed degenerative or necrotic change, their architectures did not collapse.
HE staining. Original magnification, (A) × 200, (B) × 400. Scale bars, (A) 20 μm, (B) 10 μm.

黄褐色，骨幹端部および骨幹部は赤褐色を呈していたが，骨壊死部は黄白色を呈していた (図2A).

2) ミクロ像

骨壊死部においては，周囲の骨髄に比べ明らかに好酸性が上昇していた (図2B)．同部においては，骨髄造血細胞は完全に壊死に陥っており核の破砕物が観察され，脂肪細胞も同様に壊死に陥り著しく虚脱していた．骨梁の骨細胞は，壊死して核が不染性化しているか，あるいは空虚骨小窩 (empty lacunae) を示していた (図2C)．壊死骨梁周囲には明らかな添加骨形成は認められなかったが，修復像と考えられる新生血管や線維芽細胞，組織球の出現を壊死骨髄周辺に認めていた．このような病変は各々の標本の骨幹端から骨幹にかけての骨髄腔辺縁部に好発する傾向があり，多発性に発生していた (図2D)．また骨端部や関節面より3cm以上離れた骨幹部には観察されず，ヒトの骨壊死病変でしばしば認められる関節面の圧潰も認められなかった．以上の病理所見は，Arletら[13]により提唱された骨壊死

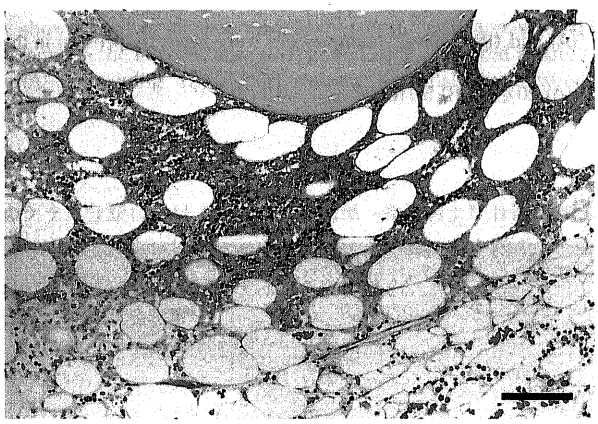


Fig. 5. Histopathologic findings of osteonecrosis in 2-week group.
The necrotic area showed an accumulation of cell debris, the disappearance of hematopoietic and fat cells which became completely necrotic, lost their architectures, and thus collapsed. Bone trabeculae also underwent necrosis.
HE staining. Original magnification, × 200. Scale bar, 20 μm.

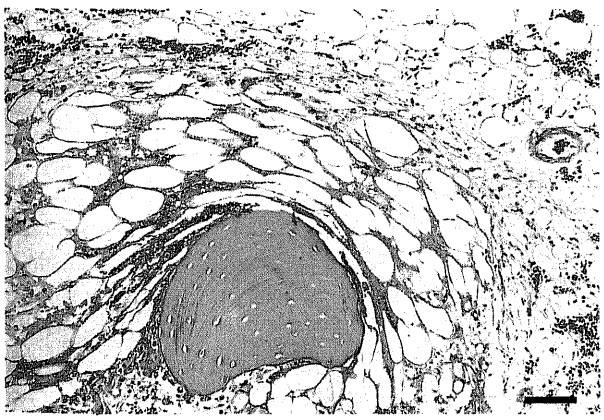


Fig. 6. Histopathologic findings of osteonecrosis in 4-week group.
The bone marrow cells showed evidence of cytolysis, karyorrhexis, and karyolysis, while necrotic fat cells had markedly collapsed. In the border area, fibroblasts and histiocytes were found, but appositional bone formation around the necrotic bone trabeculae was not observed.
HE staining. Original magnification, × 150. Scale bar, 20 μm.

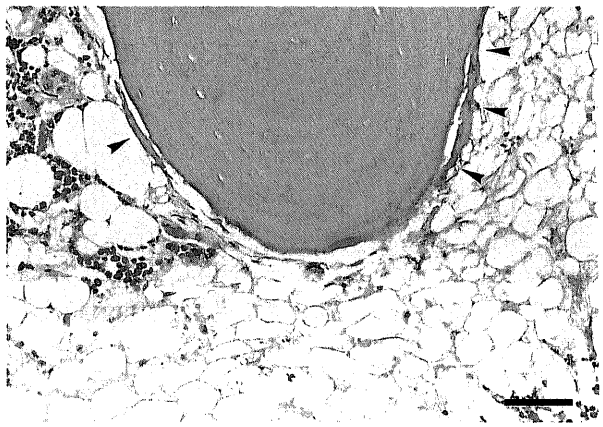


Fig. 7. Histopathologic findings of osteonecrosis in 8-week group.
The dead trabecula with empty lacunae is surrounded by immature appositional bone formation (arrow heads).
HE staining. Original magnification, × 200. Scale bar, 20 μm.

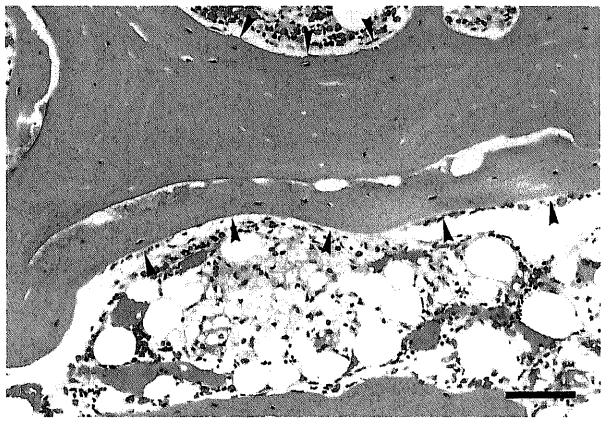


Fig. 8. Histopathologic findings of osteonecrosis in 4+4-week group.
Necrotic bone tissue was surrounded by prominent appositional bone formation (arrow heads) and repair tissue.
HE staining. Original magnification, × 200. Scale bar, 20 μm.

Table 2. Prevalence of osteonecrosis in various groups (study 3).

Groups	No.of animals	No. (%) of cases with osteonecrosis	
4-week	15	11 (73)	NS a)
8-week	15	10 (67)	
4+4-week	10	6 (60)	
Single-dose	10	7 (70)	

NS, not statistically significant.
a) Determined with Fisher's exact test.

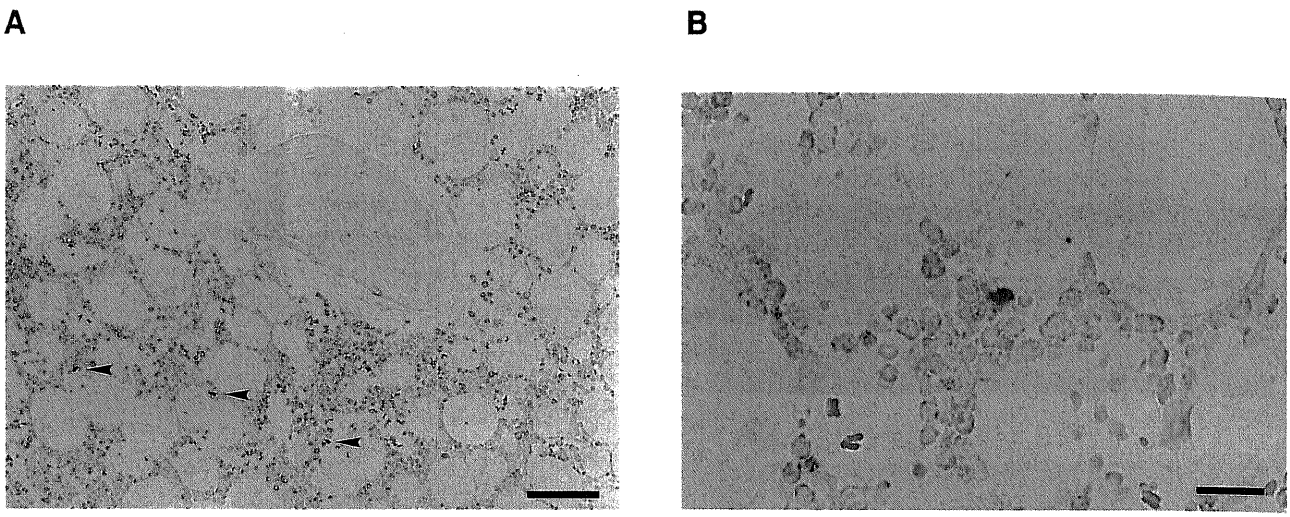


Fig. 14. Findings of in situ detection of fragmented DNA in control group. (A) and (B), TUNEL-positive cells were scatterly present in the bone marrow (arrow heads).
TUNEL staining. Original magnification, (A) × 200, (B) × 800. Scale bars, (A) 20 μm, (B) 5 μm.

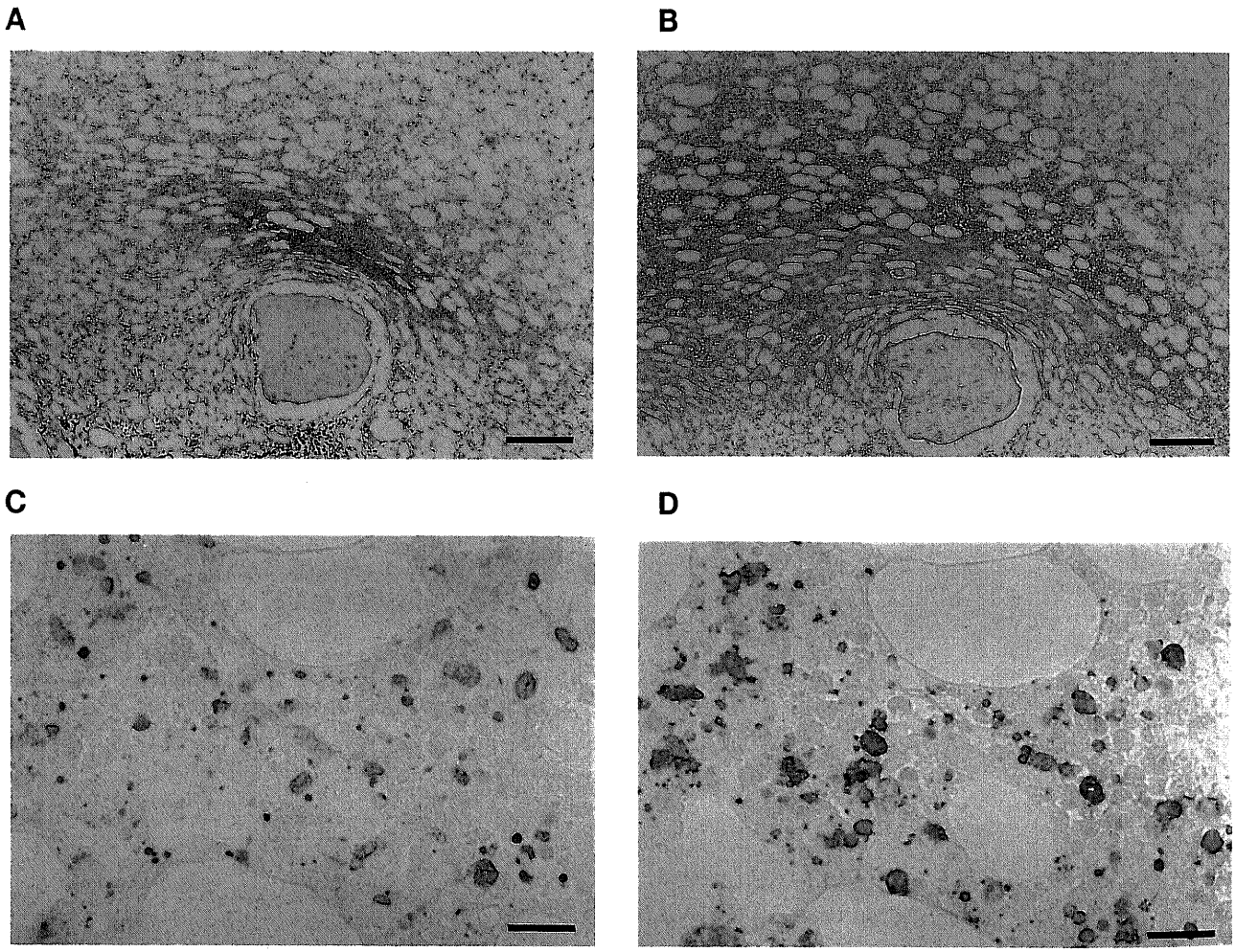


Fig. 15. Histopathological findings and findings of in situ detection of fragmented DNA in 4-week group. (A) Empty lacunae were found in the bone trabeculae, and the surrounding bone marrow tissue also showed necrotic changes. (B) TUNEL-positive cells were not present in the center of necrotic lesion, but they were accumulated in the surrounding area of the lesion. (C) The necrotic area showed an accumulation of cell debris, and karyolysis was observed in hematopoietic and fat cells. Some cells showed nuclear fragmentation and condensation of chromatin. (D) TUNEL-positive cells showed nuclear fragmentation and chromatin condensation.
(A, C) HE staining. (B, D) TUNEL staining. Original magnification, (A, B) × 100, (C, D) × 800. Scale bars, (A, B) 40 μm, (C, D) 5 μm.

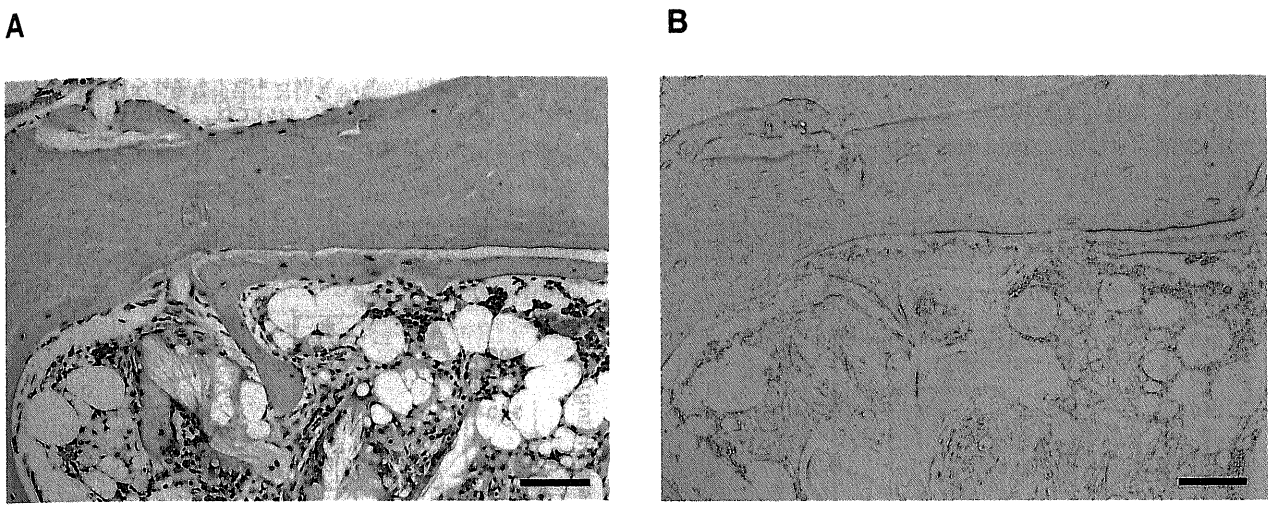


Fig. 16. Histopathological findings and findings of in situ detection of fragmented DNA in 4+8-week group. (A) Necrotic bone trabeculae showing empty lacunae were surrounded by the appositional bone formation and granulation tissue. (B) TUNEL-positive cells were not found in the necrotic area surrounded by the repaired tissue.
(A) HE staining. (B) TUNEL staining. Original magnification, (A, B) × 200, Scale bars, (A, B) 20 μm.

のクラス分類におけるタイプ3の基準（骨梁および骨髄の壊死像）を満たしていた．一方で対照群においては，上記のような組織学的変化をきたした領域は全く観察されなかった．

2．骨壊死発生率

骨髄の造血細胞壊死および脂肪細胞壊死を伴い，ある一定領域の骨細胞がびまん性に壊死した上記のような変化を骨壊死と定義すると，大腿骨近位部で10羽中7羽（70％），大腿骨遠位部で10羽中3羽（30％），上腕骨近位部で10羽中4羽（40％）に骨壊死を認めた．

Ⅱ．ステロイド継続投与に伴う骨壊死部の病理組織学的変化と骨壊死範囲および骨壊死発生率の経時的変化についての検討（実験2）

1．骨壊死発生率

骨壊死は対照群，3日群には認められなかったが，1週群で15羽中7羽（47％），2週群で15羽中9羽（60％），4週群で15羽中11羽（73％），8週群で15羽中10羽（67％）に認めた．1週群から8週群までの4群間で壊死発生頻度に統計学的な有意差はなかったが，発生頻度はステロイド投与後1～2週で増加し，その後プラトーになる傾向がみられた（表1）．

2．骨壊死発生部位

大半の骨壊死は骨幹端部，転子下部，骨幹部の内側に集中しており，その分布状態も骨壊死を認めた各群間において差異を認めなかった（図3）．

3．骨壊死巣数および面積

一大腿骨あたりの壊死巣数および面積は，骨壊死を認めた各群間で有意差を認めなかった（表1）．

4．病理組織学的変化

コントロール群および3日群には特に著変を認めなかった．

1週群では，骨壊死部は好酸性が上昇して，周囲の正常骨髄との境界が明瞭であった．骨梁の骨細胞は，壊死して核が不染性化しているか，あるいは空虚骨小窩（empty lacunae）を示していた．その周囲の骨髄造血細胞は壊死に陥った細胞と変性した細胞とが混在した状態であった．脂肪細胞は壊死に陥っているもののその細胞構築は保たれていた（図4A，B）．壊死部周囲にはしばしば出血がみられ，正常骨髄との境界には軽度の浮腫がみられた．

2週群では，1週群に比べ骨壊死部の好酸性は増強し，壊死骨梁周囲の骨髄造血細胞はほぼ完全に壊死に陥っていた．また，1週群においてみられた変性細胞はほとんど認められなくなり，核の破砕物が目立つようになっていた．壊死した脂肪細胞はその構築を失い虚脱していた．壊死部周辺の充血や浮腫は1週群よりも強くなっていた（図5）．

4週群では，骨壊死部の好酸性はさらに増強し，壊死した造血細胞は完全に細胞溶解，核溶解，核崩壊などを呈して細胞影が不明瞭となっていた．脂肪細胞の変形は2週群に比べさらに著しくなっていた．また実験1で述べたように，壊死部周囲には新生血管や線維芽細胞，組織球の出現をわずかに認めていたが，明らかな添加骨形成は認められなかった（図6）．

8週群では，壊死部の好酸性は低下して淡明化するようになり，壊死部周囲に線維芽細胞や組織球の出現が明らかとなっていた．また，一部の標本には幼弱な添加骨形成が認められ（図7），この時点ではArletら[13]の骨壊死クラス分類におけるタイプ4の基準（骨梁と骨髄の壊死および添加骨の形成）を満たしていた．

これらの組織像は各群で特徴的であり，4週群や8週群に1週群の組織像が認められることはなかった．また両側の大腿骨に骨壊死がある場合や，一つの標本内に2つ以上の骨壊死巣がある例においても，それらの病理所見が時間的に大きく異なることはなかった．

Ⅲ．ステロイド投与量および投与期間と病理組織像についての検討（実験3）

1．骨壊死発生率および発生部位

骨壊死は，4週＋4週群で10羽中6羽（60％）に，1回投与群で10羽中7羽（70％）に認められた．またその発生部位は実験1，2と同様であった．これらの骨壊死発生頻度は，各群間で有意差はなかった（表2）．

2．病理組織学的変化

4週群および8週群の病理組織像は実験2と同様であった．

4週＋4週群では，壊死した骨髄の周囲に著明なマクロファージや異物巨細胞の集簇を認め，周囲から修復が進んでいた．壊死骨梁周囲には旺盛な添加骨形成を認めた．この修復反応は8週群にわずかに認められた修復反応とは明らかに異なるものであった (図8)．またこの組織像は，骨壊死を認めた6羽中6羽ともに認められ，その修復の程度も同程度であった．

1回投与群においても，全例に4週＋4週群と同様の修復反応が認められていた．4週群においては，添加骨形成が全く認められなかったのに対し，1回投与群では，全例に認められていた．

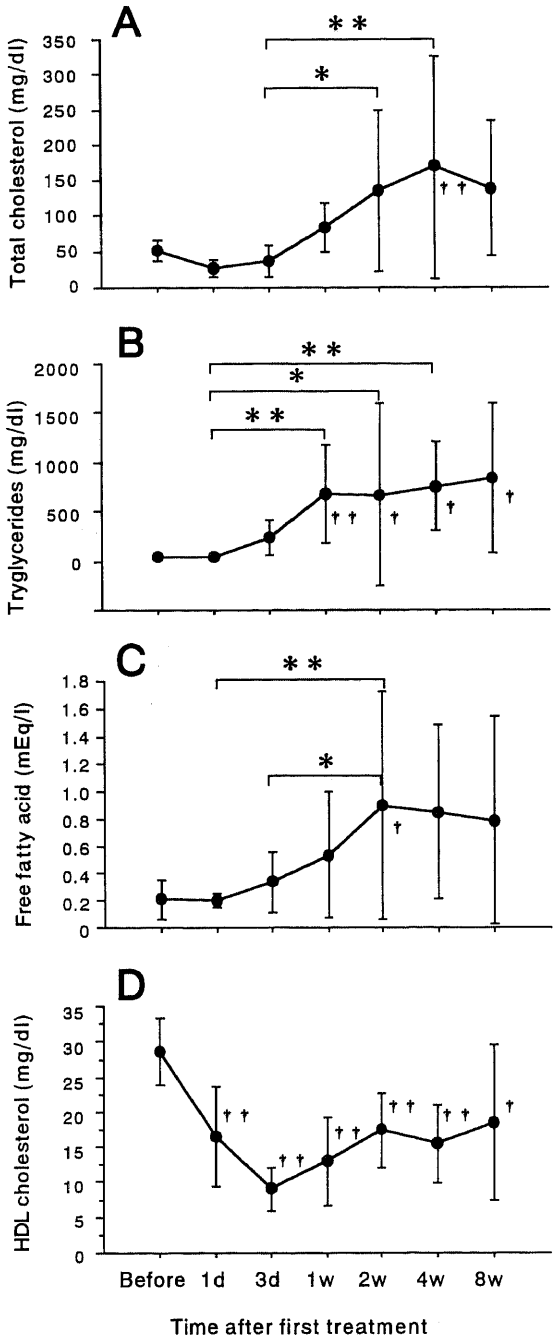


Fig. 9. Sequential changes in plasma lipid levels. (A) Total cholesterol. (B) Tryglycerides. (C) Free fatty acid. (D) High density lipoprotein cholesterol. HDL, High density lipoprotein. * P<0.05; ** P<0.01; † P<0.05; †† P <0.01 versus values before steroid treatment. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

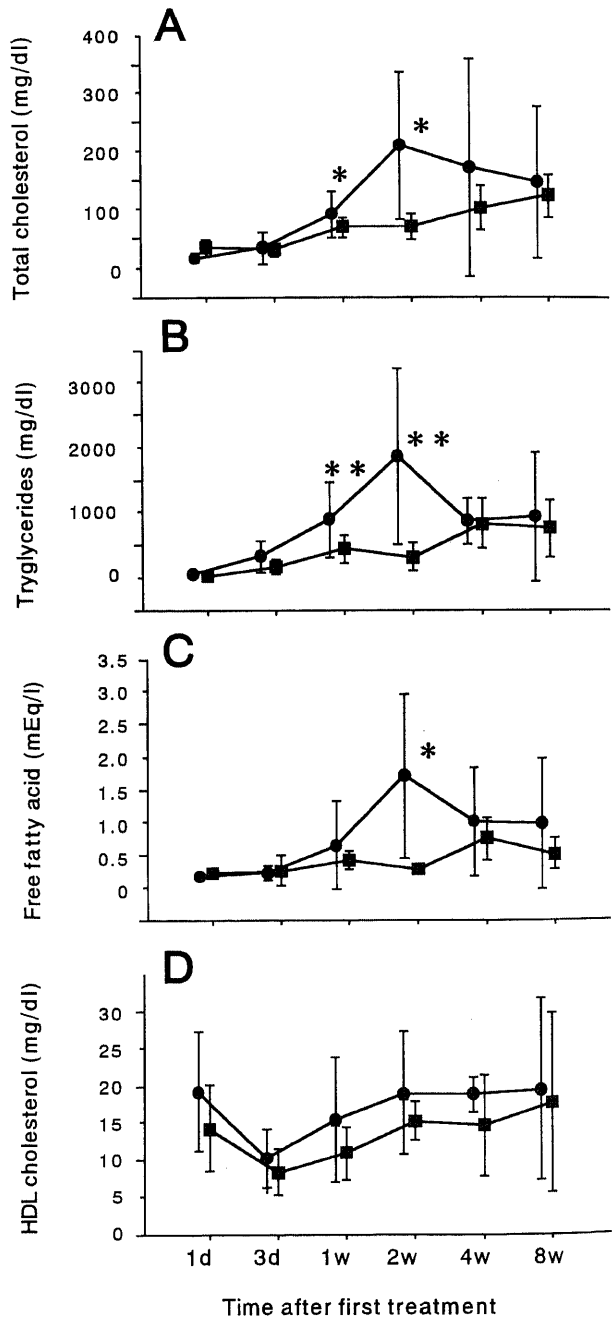


Fig. 10. Sequential changes in plasma lipid levels in rabbits with and without osteonecrosis. (A) Total cholesterol. (B) Tryglycerides. (C) Free fatty acid. (D) High density lipoprotein cholesterol. HDL, High density lipoprotein. ●, rabbits with osteonecrosis; ■, rabbits without osteonecrosis. * P<0.05; ** P<0.01 by Mann-Whitney's U-test. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

Ⅳ．ステロイド投与に伴う血液生化学的検査値の経時的変化と骨壊死発生との関連についての検討 (実験4)

1．ステロイド継続投与における血液生化学的検査値の経時的変化

脂質系の変化としては，総コレステロール，トリグリセライド，遊離脂肪酸の著明な上昇が，初回ステロイド投与後1週から2週にかけて認められ，その後高値を維持したままプラトーとなっていた．一方でHDLコレステロールは，初回ステロイド投与後3日～1週で著明に減少していた (図9A～D)．これを骨壊死発生例と非発生例に分けて比較すると，骨壊死発生例

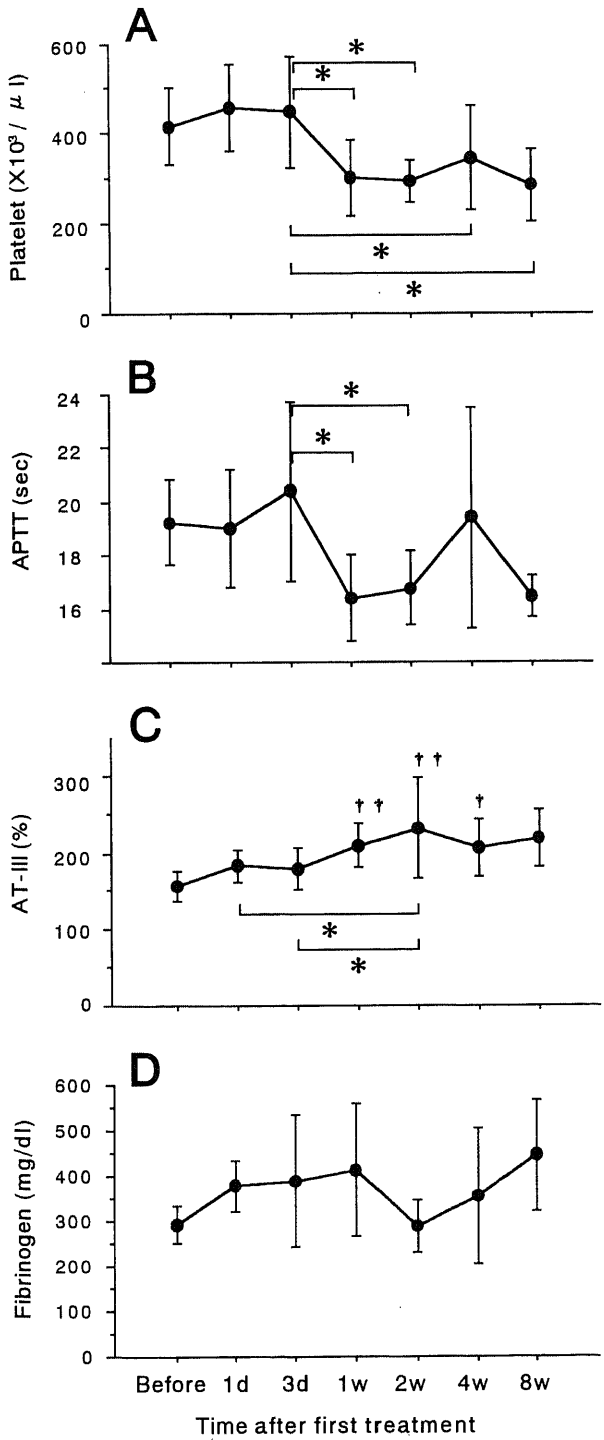


Fig. 11. Sequential changes in hemostatic parameters. (A) Platelet. (B) Activated partial thromboplastin time. (C) Antithrombin III. (D) Fibrinogen. APTT, Activated partial thromboplastin time; AT-III, Antithrombin III. ＊ P<0.05; † P<0.05; †† P <0.01 versus values before steroid treatment. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

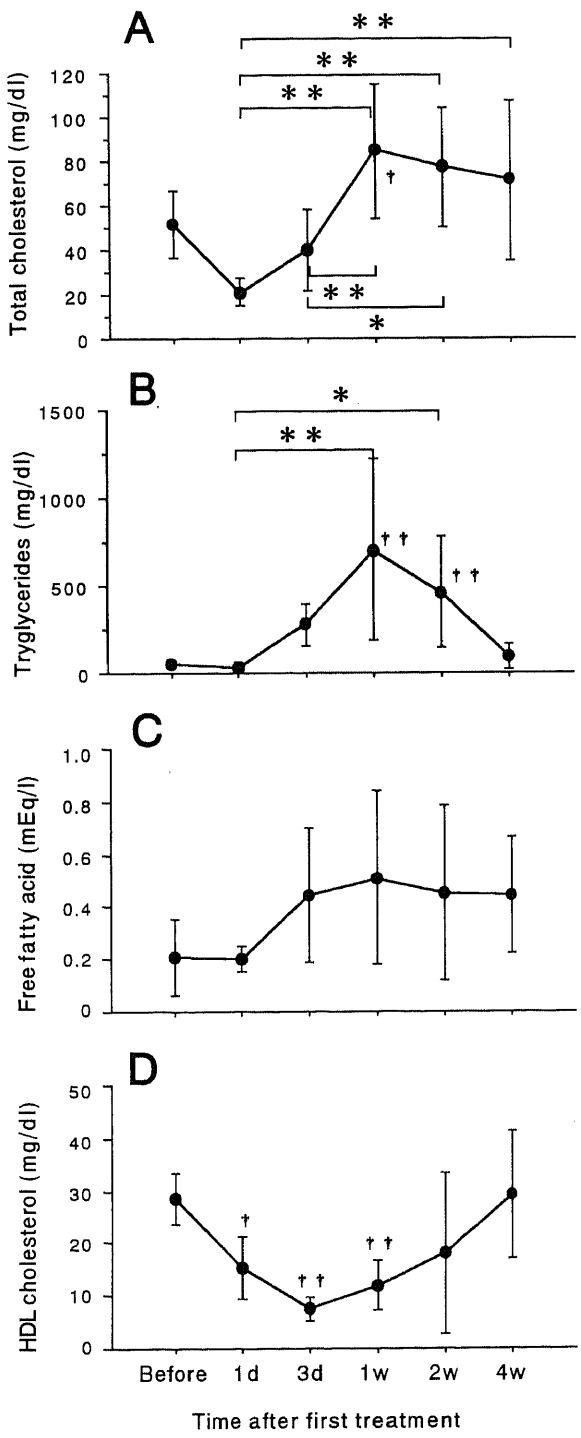


Fig. 12. Sequential changes in plasma lipid levels in single dose group. (A) Total cholesterol. (B) Tryglycerides. (C) Free fatty acid. (D) High density lipoprotein cholesterol. HDL, High density lipoprotein. ＊ P<0.05; ＊＊ P<0.01; † P<0.05; †† P <0.01 versus values before steroid treatment. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

は非発生例に比べ初回ステロイド投与後1週から2週にかけて総コレステロール，トリグリセライド，遊離脂肪酸が有意に上昇していた．HDLコレステロールは両群で差はなかった (図10A～D)．

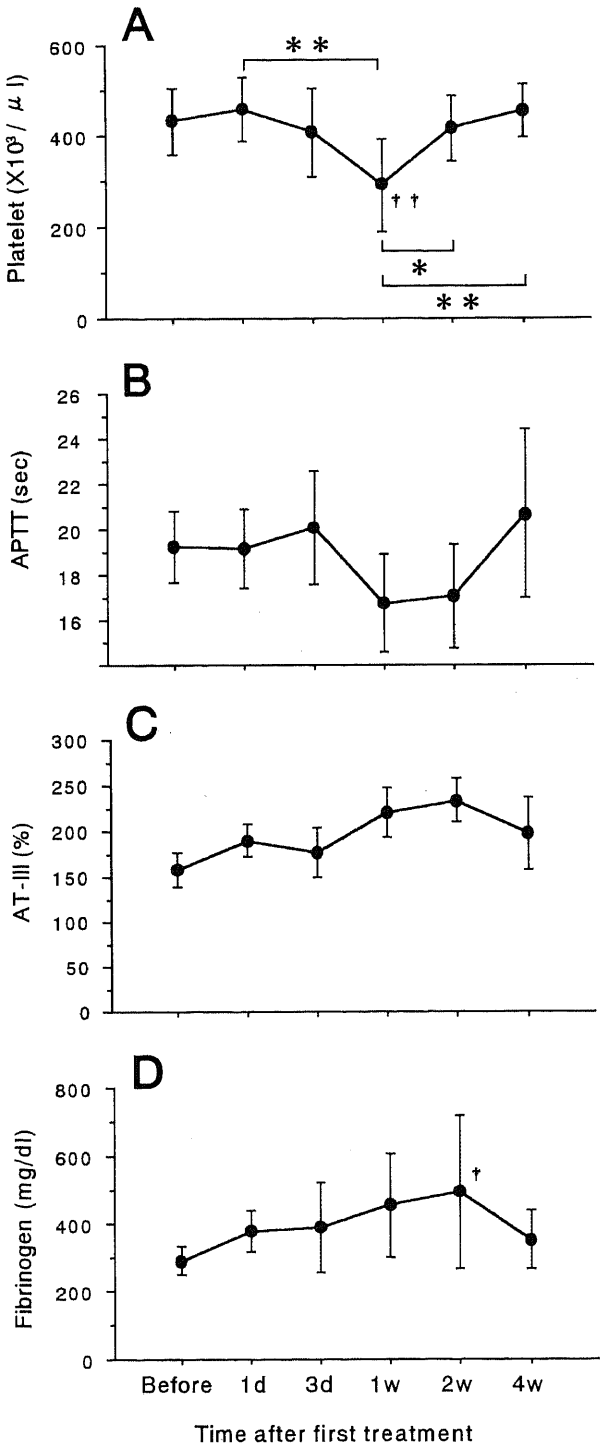


Fig. 13. Sequential changes in hemostatic parameters in single dose group. (A) Platelet. (B) Activated partial thromboplastin time. (C) Antithrombin III. (D) Fibrinogen. APTT, Activated partial thromboplastin time; AT-III, Antithrombin III. * P<0.05; † P<0.05; †† P <0.01 versus values before steroid treatment. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

凝固系の変化としては，初回ステロイド投与後1週より血小板数の減少，活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮，アンチトロンビンⅢ値の上昇を認めた (図11A～D)．Dダイマーはステロイド投与前はほとんどが基準値以下であったが，投与後は1日目より上昇し，終始基準値を超えた計測値が測定された．しかし凝固系の検査値は骨壊死発生例と非発生例で差は認めなかった．

2．ステロイド1回投与における血液生化学的検査値の経時的変化

脂質系の変化としては，ステロイド継続投与例と同様に，総コレステロール，トリグリセライド，遊離脂肪酸の著明な上昇を，初回ステロイド投与後1週から2週にかけて認めた．その後，総コレステロール，遊離脂肪酸はやや漸減，トリグリセライドは徐々に下降し正常化した．HDLコレステロールは，初回ステロイド投与後3日～1週で著明に減少し，その後正常化した (図12A～D)．骨壊死発生例と非発生例を比較すると，実験2の結果と同様に，初回ステロイド投与後1週から2週にかけて総コレステロール，トリグリセライド，遊離脂肪酸が骨壊死発生例において上昇していたが，骨壊死非発生例の例数が4未満であったため，有意差の検定は不能であった．

凝固系の変化としては，初回ステロイド投与後1週で一時的な血小板数の減少を認め，その後正常化していた．また1週から2週にかけて一時的に活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮とアンチトロンビンⅢ，フィブリノーゲンの上昇がみられた (図13A～D)．Dダイマーは，投与後は1日目より上昇し，2週まで基準値を超えた計測値が測定されていたが，4週目ではほとんどの例において再び基準値以下となっていた．

Ⅴ．ステロイド性骨壊死におけるアポトーシスの関与についての検討 (実験5)

1．病理組織学的変化

4週＋8週群では，実験3の4週＋4週群と同様に，壊死した

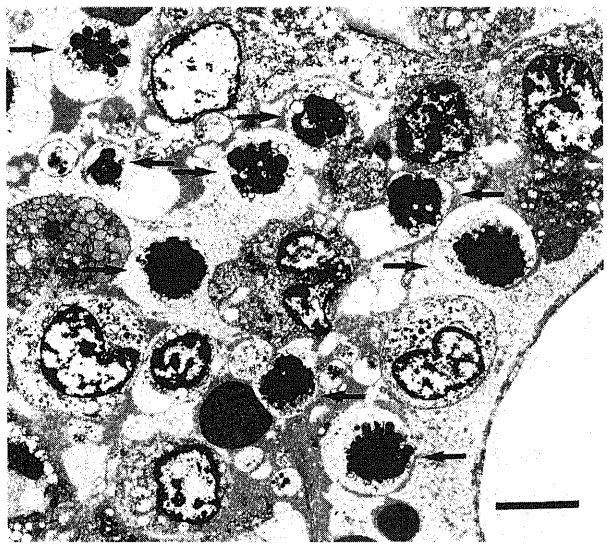


Fig. 17. Electron micrograph of osteonecrosis lesion in 4-week group.
In the surrounding area of osteonecrosis, where TUNEL-positive cells were accumulated, there were cells with fragmented and condensed chromatin. Morphology of these fragmented cells agreed with that of apoptotic cell.
Original magnification, × 2500. Scale bar, 5μm.

骨髄の周囲に著明なマクロファージや異物巨細胞の集簇を認め，周囲から修復が進んでいた．壊死骨梁周囲には旺盛な添加骨形成を認めた (図16A)．

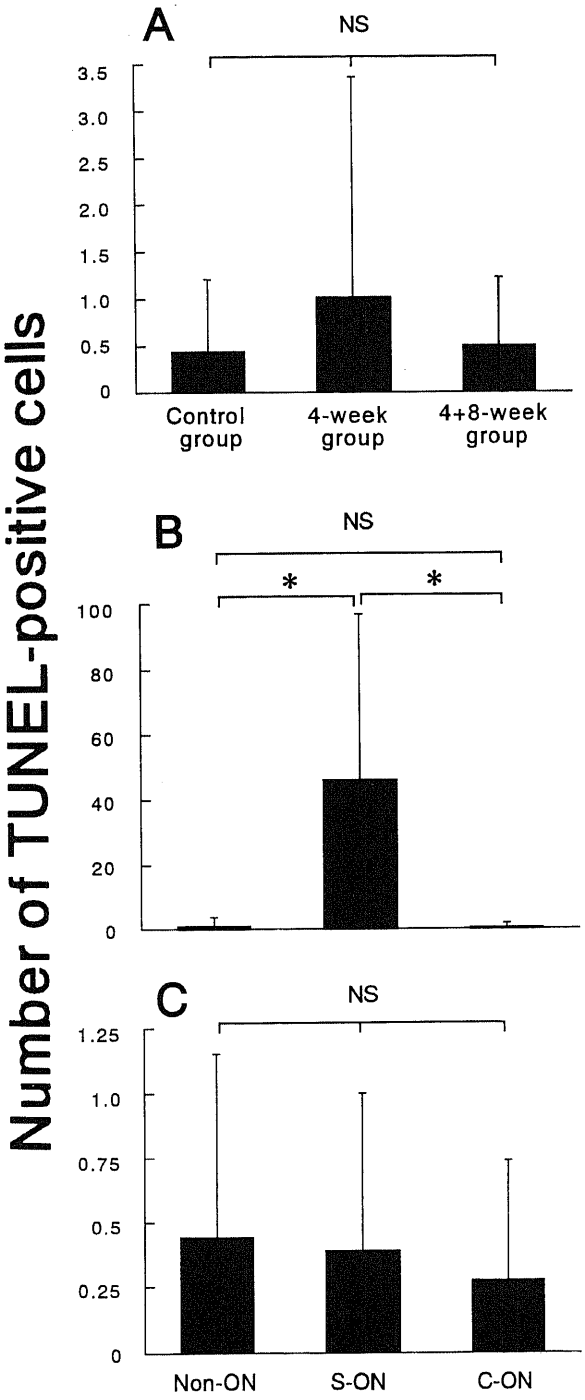


Fig. 18. Number of TUNEL-positive cells.
(A) Number of TUNEL-positive cells among the non-osteonecrosis lesion of control group, 4-week group and 4+8-week group. (B) Number of TUNEL-positive cells in 4-week group. (C) Number of TUNEL-positive cells in 4+8-week group. Non-ON, non-osteonecrosis lesion; S-ON, surrounding area of osteonecrosis; C-ON, center of osteonecrosis. * $P<0.01$ by Mann-Whitney's U-test. NS, not statistically significant. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

2．TUNEL法による検討

対照群においては，正常骨髄内にまばらにTUNEL陽性細胞が観察された (図14A, B)．

4週群の健常骨髄部においては，対照群と同様にまばらにTUNEL陽性細胞が観察された．一方，骨壊死部においては，その中心部にはTUNEL陽性細胞はほとんど認められなかったが，周辺部にはTUNEL陽性細胞の集簇が認められた (図15A, B)．TUNEL陽性細胞がある部分を強拡大で観察すると，ヘマトキシリンで強く染色されるクロマチンの凝縮した核を持つ細胞が多数存在し，これらはTUNEL陽性であった．さらに，アポトーシス小体と考えられる油滴状の構造物もTUNEL法で強く染色されていた．骨壊死部の骨梁に存在する骨細胞はTUNEL陰性であった (図15C, D)．

4週＋8週群の健常骨髄部においては，対照群と同様にまばらにTUNEL陽性細胞が観察されたが，修復部を含めた骨壊死中心部および周辺部にTUNEL陽性細胞はほとんど認められなかった (図16B)．

3．透過型電子顕微鏡による検討

4週群より得られた骨壊死の中心部では，ほぼすべての細胞が著しく膨潤化し，ミトコンドリアの膨大化，リボゾームの分解，細胞内容物の流出などが認められ，典型的な壊死像を呈していた．一方骨壊死の辺縁部から正常骨髄との境界部においては，健常細胞に混在して濃縮したクロマチンを有する細胞が集簇していた．これらの細胞は，核が濃縮かつ分葉化しており，胞体にはしばしば空胞形成を認め形態的にアポトーシス細胞であると判断した (図17)．対照群，4週＋8週群および4週群の正常骨髄部では，上記のような所見は得られなかった．

4．TUNEL陽性細胞数

対照群および4週群，4週＋8週群の健常部におけるTUNEL陽性細胞数には統計学的有意差は認められなかった (図18A)．一方4週群においては，骨壊死の中心部，健常部に比べ辺縁部におけるTUNEL陽性細胞数が有意に多かった (図18B)．4週＋8週群においては，骨壊死の中心部，辺縁部，健常部で差はなかった (図18C)．

考　　察

ステロイド性大腿骨頭壊死は，外傷性股関節脱臼などの際に栄養血管が損傷されて発生する外傷性大腿骨頭壊死と病理組織学的にきわめて類似していることから[14]，骨頭の虚血が引き起こされて発生すると考えられている[4)6)7)]．しかしながら，その発生機序や発生時期については未だ解明されていない．これまでにステロイド性大腿骨頭壊死症の病因論として，骨頭栄養血管の粥状動脈硬化や血栓によるという説[15]，脂肪塞栓説[16)~18)]，脂肪細胞の増殖や肥大，骨髄浮腫など何らかの原因で骨髄内圧の上昇が生じ，血行障害が惹起されるという説[13)19)]，静脈系還流障害説[20)~23)]，血管内血液凝固の亢進と線溶系異常によるという説[24)25)]，血管炎など血管自体の障害によるという説[26]，骨髄内出血によるという説[27]など，様々なものが報告されてきたが，これらはいずれも骨壊死が完成された後の事象をもとに推測されたものであった．しかし，それらの事象には修復等のさまざまな二次的修飾が加わっており，真の初期変化を捉えたものであるとは言い難い．臨床的に大腿骨頭壊死症は，発見されたときには既に壊死が完成しているため，病初期における変化をとらえることが困難な疾患である．このことが，その病態解

明を遅らせている要因の一つともいえる．したがって大腿骨頭壊死症の発生機序および病態の解明には，有効な動物モデルを用いた検討が必要である．

Ⅰ．ステロイド性大腿骨頭壊死の動物モデルについて

これまでにさまざまな動物を用いてステロイド性大腿骨頭壊死を作成しようという試みがなされてきたが，有効な動物モデルは存在しなかった[19)28)~34)]．ことに家兎に関してはステロイドを投与した実験が多数報告されてきたが，Goldら[34)]の作成した1羽を除いて骨頭壊死を作成することはできず，家兎では骨頭壊死は生じないと考えられてきた[19)30)~36)]．しかし近年，Yamamotoら[37)]はメチルプレドニゾロンを家兎に大量投与することで，骨幹端から骨幹部にかけて病理組織学的にヒトの骨壊死と類似した骨壊死が生じることを最初に報告した．今回の実験で作成したモデルも，方法は異なるものの同様の組織像を有するモデルであり，やはり骨壊死は骨幹端から骨幹部にかけて生じていた．これまでの家兎を用いた報告は，いずれも主に骨頭における骨壊死，または骨頭の圧潰の有無を調べたものであったため，大腿骨の骨幹端から骨幹部にかけての組織学的な記載はほとんどなされていない．したがって，同様の薬剤を使用したこれまでの実験において骨壊死が見つからなかった理由として，骨幹端から骨幹部には十分な注意が向けられていなかったこと，病変部に圧潰が生じないため，組織学的に骨壊死であっても無視されていたことなどが可能性として考えられる．

過去にステロイド以外の薬剤を用いて作成した家兎の骨壊死モデルが報告されているが[38)39)]，これらのモデルにおいても，骨壊死は主に骨幹端から骨幹部にかけて生じていた．このことは誘因が何であれ，家兎の場合は，骨壊死の好発部位が骨幹端から骨幹部にかけての領域であることを示している．骨壊死の発生部位の違いは，種の相違，骨形態や脈管形態などの解剖学的な相違，あるいは二本足動物と四本足動物の荷重伝達様式の相違，などといった骨壊死の発生要因とは別な要素が関与している可能性が高い．

本実験のモデルに認められた骨壊死は，一定した部位に好発し，骨梁と骨髄の壊死を伴ったびまん性壊死であること，時間とともに添加骨形成や肉芽組織などによる修復反応が認められること，大腿骨近位部および遠位部，上腕骨近位部など多発性に骨壊死が生じること[3)]，などの点でヒトのステロイド性骨壊死と共通している．これらの所見は，Arletら[13)]により提唱された骨壊死のクラス分類におけるタイプ4の基準（骨梁と骨髄の壊死および添加骨の形成）を満たしている．したがって本モデルは，ヒトの骨壊死と同様かあるいはきわめて類似したものと考えられ，ステロイド性骨壊死の発生機序の解明や予防法，治療法の確立に有用な動物モデルである．

Ⅱ．ステロイド性骨壊死の発生時期について

ステロイド性骨壊死発生時期を知ることは，骨壊死発生のメカニズムを解明し，かつ予防法を確立する上で非常に重要である．しかしながら，従来の画像診断法では骨壊死の早期発見が困難であったため，発生時期については長年の間不明なままであった．近年MRIの普及とともに骨壊死の早期発見が可能となり，ステロイド性骨壊死の発生時期の予測がたつようになってきた．Kuboら[40)]は，腎移植後に伴う大腿骨頭壊死症について，MRIを経時的に撮影し，その発生時期についての検討を行っている．またShimizuら[41)]，Sakamotoら[42)]は，ステロイド投与後の大腿骨頭壊死発生に関する前向き研究をMRIを用いて行っている．それらの研究では，ステロイド大量投与後6週~10週で骨頭壊死の存在を示すバンド像がみられたと報告されている．一方で，MRIでのバンド像は，壊死部に対しての修復像を捉えたものであることが，実際の摘出骨頭標本からわかっている[43)]．またSuganoら[44)]による大腿骨頸部骨折の報告例やNakamuraら[45)]の外傷性股関節脱臼の動物実験からは，骨頭の虚血が生じてから修復組織が骨壊死部周囲にみられ，それがMRIでバンド像として確認できるまでに約4週を要することが明らかにされている．これらを考慮すると，ヒトのステロイド性大腿骨頭壊死症の発生時期は，バンド像が確認される時点より少なくとも約4週間はさかのぼった時期であり，ステロイド大量投与後2週から6週ということになる．ステロイドの壊死組織に対する修復抑制作用を考慮すると[46)~49)]，さらに早い時期である可能性も考えられる．実験2の結果では，ステロイド投与後3日では骨壊死は認められず，1週後より認められるようになり，2週後以降は骨壊死発生率がプラトーとなっていた．このことから，本モデルにおける骨壊死発生時期は初回ステロイド投与後1週前後であると判断できる．この値は前述したヒトのステロイド性大腿骨頭壊死の予想発生時期にきわめて近似している．ステロイドにより誘発される骨内の虚血エピソードは，投与後1~2週というきわめて早い時期に生じるものと考えられる．

Ⅲ．ステロイド性骨壊死の再発について

ステロイド性骨壊死が，虚血発作を繰り返して完成するものなのかについては現在も議論となる点である．Inoueら[50)]は，特発性大腿骨頭壊死症の摘出標本においてしばしば修復組織に部分的な壊死巣が見られることから，繰り返し虚血エピソードが生じることにより壊死が完成すると述べた．その壊死再発頻度は83％であると報告されている．同様にSaitoら[51)]も，繰り返し起こる骨髄内出血により骨頭の虚血が生じ，それに伴い壊死部が拡大すると述べた．これらの報告では，大腿骨頭壊死を引き起こす虚血エピソードは，慢性的な骨頭の虚血状態のもとで断続的に生じるものと解釈されている．しかし近年になり，骨頭壊死を引き起こす虚血エピソードはほとんどの場合1回のみであるという報告がなされるようになってきた．Yamamotoら[52)]は，606例の特発性大腿骨頭壊死症の摘出標本を病理組織学的に検討し，壊死の再発が認められたのは2例（0.3％）のみであったと報告している．またMRIによる前向き研究では，生じた壊死範囲は縮小することはあっても拡大したものはなく，また壊死の再発が認められた症例はなかったと報告されている[41)42)53)]．これらの報告では，ステロイド性大腿骨頭壊死があたかも心筋梗塞や脳梗塞のごとく，きわめて急性に生じる疾患であると解釈されており，その虚血発作はステロイドの継続投与の有無にかかわらず1回の発作であることを示唆している．実験2の結果では，ステロイドを継続的に投与しても2週以降骨壊死発生率は増加せずプラトーとなっていた．また，新たな骨壊死が発生した形跡や骨壊死範囲が拡大した形跡も認められなかった．同様に，実験2の4週群の骨壊死発生率は，実験3の1回投与群の骨壊死発生率とほぼ等しく，ステロイドの継続投与は骨壊死の発生率を増加させてはいなかった．したがって，本モデルの骨壊死を引き起こした虚血エピソードは，初回ステロイド投与後1週前後で1回のみ生じたものと考えられる．これらの結果は，近年のMRIによる研究から得られた結

果と全く一致するものである．

今回の実験により，ステロイド性骨壊死の発生時期が初回ステロイド投与後1週前後であり，かつステロイドにより誘発される骨内の虚血発作が非再発性であることを組織学的に初めて証明することができた．この知見は今後ステロイド性骨壊死症の予防法を確立するうえで極めて重要である．

Ⅳ．ステロイド性骨壊死の修復について

これまで，ステロイドの投与量や投与期間と大腿骨頭壊死発生率との関係についてはさまざまな臨床研究が行われてきたが[5)7)54)55)]，その組織像との関係について検討された研究はほとんどなされていない．そこで実験3では，ステロイドの投与期間と投与量を変えたモデルを作成し，その組織像を比較した．その結果，ステロイドが継続投与された場合は，著しくその修復反応が抑制されていた．一方で，メチルプレドニゾロンを1回のみ投与したモデルにおいては，屠殺した4週の時点で旺盛な添加骨形成が認められていた．本モデルの5倍量のメチルプレドニゾロンを投与した家兎においては，ステロイド投与後8週から10週で添加骨形成が認められたとの報告もあり[37)]，これらのことからも，骨壊死部の修復機構の発現時期はステロイドの投与量に依存していることがわかる．実際の臨床例においても，ステロイド性大腿骨頭壊死は非ステロイド性に比べ，組織像上の修復能が低いことが指摘されている[56)]．これは，ステロイドによるアラキドン酸代謝産物産生の抑制作用[46)]，サイトカイン産生の抑制作用[47)]，炎症細胞の炎症巣への流入に重要な役割を果たす接着分子の発現抑制作用[48)]，コラーゲン，コラゲナーゼ合成を抑制することによる血管新生抑制作用[49)]などの効果により，骨壊死部の修復が著しく抑制されることによるものと考えられる．この事実は，MRIでのバンド像の出現時期に重要な影響を与えるものと思われる．すなわち，骨壊死が発生してからMRIでバンド像が出現するまでの期間が，ステロイドの投与量や投与法により変化してくる可能性がある．また大腿骨頭壊死症の場合は，修復の進行に伴って骨壊死範囲が縮小するものが認められるが[41)53)57)]，これに関してもステロイドの投与量や投与法が大きく関与すると考えられ，ひいてはその後の骨髄内浮腫の出現や骨頭圧壊への進行などの自然経過にも影響を与えるものと考える．

Ⅴ．ステロイド性骨壊死の発生と血液生化学的検査値との関連について

ステロイド継続投与モデルにおいては，骨壊死発生時期と考えられる初回ステロイド投与後1週前後において急激な血中脂質値の上昇が認められ，それに伴い凝固亢進状態がみられていた．1回投与群においても同様で，血中脂質値がステロイド投与後1週前後で一峰性にピークを形成し，それに同調して血小板数が一過性に減少していた．これらの事実は，骨壊死発生とこれらの検査値の変動が密接な関係を持つことを意味している．脂質代謝異常や凝固線溶異常とステロイド性大腿骨頭壊死症との関連については，以前より指摘されており，重要なリスクファクターの一つと考えられている[16)~19)24)25)]．しかし，骨壊死発生とこれらの検査値の変動が時間的に同調していることを示した報告はない．それを確認できたのは今回の実験が初めてである．

血中脂質値に関しては，総コレステロール，トリグリセライド，遊離脂肪酸が，ステロイド投与後1週前後で投与前値の約3～10倍に達しており，同時期において，これらの値に骨壊死発生例と非発生例で有意差が認められた．この事実から，急激な血中脂質値の上昇が，骨壊死発生のトリガーとなった可能性が十分考えられる．この可能性を示唆する臨床的事実がいくつか報告されている．ヒトに大量のステロイドを連日投与した場合，中性脂肪は投与開始後約2週で，総コレステロールは4週から8週で急激に血中濃度が上昇して最高値をとり，以後漸減またはプラトーとなるといわれている[58)]．この血中脂質値の経時的な変動は，今回の家兎で認められたものときわめて類似しており，興味深いことに，血中濃度が急上昇して最高値となる時期は，前述したMRIでの研究で予想されたステロイド性大腿骨頭壊死発生時期に一致している．またJonesら[59)]は，ステロイド投与に伴い急激な高脂血症が生じ，それに同調して種々の塞栓症状が生じ，剖検で著しい脂肪塞栓による梗塞巣が全身の諸臓器に観察された症例を報告しているが，その報告での血中脂質値の変動も，今回の結果と極めて類似している．

一方，凝固系の変化としては，ステロイド投与後1～2週で血小板数の有意な減少を認め，活性化部分トロンボプラスチン時間の低下，アンチトロンビンⅢ，Dダイマーの上昇をきたしていた．すなわち凝固亢進状態が形成されたとともに，家兎の体内に血栓形成が生じた可能性が考えられる．ステロイド自体に凝固能を亢進させる作用があり[60)]，加えて高脂血症が生じることによっても凝固能は亢進するため[61)]，著明な高脂血症が認められたステロイド投与後1週時において，家兎の凝固能は著しく亢進していたものと思われる．一方で，家兎にステロイドを投与すると，大腿骨内の類洞が著しく拡張し，血流が停滞して鬱血状態となり，血栓形成が生じやすい環境が形成されることが堀井ら[62)]の実験で明らかにされている．したがって，本モデルにおいては大腿骨内に血栓が容易に形成される状況であったものと推察できる．

以上から本実験における骨壊死発生の機序を推察すると，ステロイドの大量投与により，凝固能が亢進した家兎の体内に著しい高脂血症が急激に生じ，それによるさらなる凝固亢進状態が誘発され，ステロイドにより血流が停滞して鬱血状態となった大腿骨内血管に血栓形成を生じ，その支配領域の虚血を引き起こしたものと考えた．したがって，ステロイド投与に伴う高脂血症と凝固亢進状態を何らかの手段で抑制してやることにより，その予防が可能であると考えた．

Ⅵ．ステロイド性骨壊死とアポトーシスとの関連について

近年，脳や腎臓の虚血性細胞死，急性心筋梗塞に代表される虚血性心疾患に対するアポトーシスの関与が相次いで報告され[9)10)]，局所の虚血や低酸素血症，再潅流障害とアポトーシスとの関連が注目されている．これらのことから，虚血により発生するとされるステロイド性骨壊死にアポトーシスがおこっていることが予想される．実際，今回の結果において，骨壊死部周辺に一致してTUNEL陽性細胞の集簇が認められた．しかも，修復が進んだ骨壊死部にはほとんどTUNEL陽性細胞が認められなかったことから，ステロイド性骨壊死発生の初期段階にアポトーシスが関与していることが示唆された．Weinsteinら[63)]は，ステロイドを投与したマウスやステロイド性骨粗鬆症の患者において，骨芽細胞と骨細胞のアポトーシスが有意に増加することを報告し，ステロイド性の骨壊死にもアポトーシスが関与している可能性を示唆している．しかし，彼らはステロイド投与量が増えるにつれアポトーシス細胞も増えていることを示してはいるものの，実際の骨壊死部におけるアポトーシス

細胞は示してはいない．今回の実験が実際の骨壊死部にアポトーシス細胞の存在を示した初めての報告である．アポトーシスの誘発機序について，前述の報告では，ステロイドの直接的な作用によると考察されている[63]．しかし，本実験の4週群においてみられたTUNEL陽性細胞は，その局在が骨壊死部周辺に一致して集簇していること，およびその細胞の種類に選択性がないことなどから，ステロイドの直接的な作用により生じているとは考えにくい．むしろ脳や心臓での虚血性細胞死に見られるアポトーシスとネクローシスの混在した状態に類似しているため[64)65)]，ステロイド性骨壊死においても局所の虚血や低酸素血症などによりアポトーシスが生じている可能性が強いと考えた．

今回の実験で，ステロイド性骨壊死部におけるアポトーシス細胞を示すことに成功した．ステロイド性骨壊死での病初期においての細胞死にはアポトーシスが関与し，骨壊死成立に少なからぬ影響を与えていると推察できる．これは，アポトーシスを抑制し，骨壊死範囲を縮小させるという新たな治療法の可能性を示唆する重要な所見であると考えた．

結　　論

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序を明らかにする目的で，家兎を用いたステロイド性骨壊死モデルを作成し，骨壊死部の病理組織学的な変化およびステロイド投与に伴う血液生化学的な変化について検討を加え，以下の結論を得た．

1．家兎に酢酸メチルプレドニゾロンを投与することにより，大腿骨近位部，大腿骨遠位部，上腕骨近位部の骨幹端から骨幹にかけ骨壊死を作成できた．本モデルはステロイド性骨壊死モデルとして有用であると考えた．

2．本モデルのステロイド性骨壊死は，ステロイド投与後1週前後に起こる非再発性の急性虚血発作により生じるものと考えた．

3．著明な高脂血症と凝固亢進状態が骨壊死発生時期に一致して認められ，これらは骨壊死発生のトリガーに強く関与していると考えた．

4．ステロイドは，骨壊死部の修復に抑制的に働くものと考えられ，その投与量や投与期間は骨壊死の自然経過に大きく影響するものと考えた．

5．ステロイド性骨壊死における壊死発生後早期の細胞死にはアポトーシスが関与し，骨壊死成立に少なからぬ影響を与えていると推察できた．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚の謝意を捧げるとともに，直接の御助言と多大なる御指導をいただきました金沢医科大学整形外科松本忠美教授に深謝いたします．また研究の遂行にあたり，貴重な御助言を賜りました金沢医科大学病理学第二講座勝田省吾教授，金沢医科大学整形外科西野　暢講師，京都府立医科大学整形外科久保俊一助教授，鹿児島大学臨床検査医学講座北島　勲助教授に感謝いたします．最後に，本研究の遂行に御協力をいただきました金沢大学整形外科第二研究室の先生方，病理標本作製に御協力を惜しまれなかった笠井洋子氏，改田美奈子氏に感謝の意を表します．

なお，本論文の要旨は，厚生省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班特発性大腿骨頭壊死症分科会平成9年度第2回分科会会議（東京，1998），平成10年度第2回分科会会議（東京，1999），平成11年度第2回分科会会議（東京，2000）において発表した．本研究の一部は，厚生省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班特発性大腿骨頭壊死症分科会平成9年度および平成10年度研究費の援助を受けたことを付記し，謝意を表します．

文　　献

1）竹田亮祐．ステロイド薬の使い方，第1版，117-128頁，永井書店，大阪，1992

2）Fisher DE, Bickel WH. Corticosteroid-induced avascular necrosis. J Bone Joint Surg Am 53: 859-873, 1971

3）飯田　哲，秋田　徹，清水　耕，坂本雅昭，萩原雅司，中馬　敦，小泉　渉，守屋秀繁．ステロイド性大腿骨頭壊死における多発性骨壊死の検討．Hip Joint 20: 223-227, 1994

4）Mont MA, Hungerford DS. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Am 77: 459-474, 1995

5）二ノ宮節夫．特発性大腿骨頭壊死症研究の現状．リウマチ 39: 784-788, 1999

6）Mankin HJ. Nontraumatic necrosis of bone (osteonecrosis). N Engl J Med 326: 1473-1479, 1992

7）Chang CC, Greenspan A, Gershwin ME. Osteonecrosis: current perspectives on pathogenesis and treatment. Semin Arthritis Rheum 23: 47-69, 1993.

8）Lee CK, Hansen HT, Weiss AB. The "silent hip" of idiopathic ischemic necrosis of the femoral head in adults. J Bone Joint Surg Am 62: 795-800, 1980

9）Tominaga T, Kure S, Narisawa K, Yoshimoto T. Endonuclease activation following focal ischemic injury in the rat brain. Brain Res 608: 21-26 1993

10) Ito G. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. Am J Pathol 146: 1325-1331 1995

11) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493-501, 1992

12) Karnovsky MJ. A formaldehyde-gluteraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 27: 137A-138A, 1965

13) Arlet J, Ficat P, Durroux P. Les formes anatomo-cliniques de l'ischémie chronique et de l'ostéonécrose dite primitive de l'épiphyse fémorale supérieure. Rev Rhum 26: 41-49, 1971

14) Milgram JW. Radiologic and histologic pathology of nontumorous disease of bone and joints, 1st ed, p1027-1044, Lea&Febiger, Philadelphia, London, 1990

15) Atsumi T, Kuroki Y. Role of impairment of blood supply of the femoral head in the pathogenesis of idiopathic osteonecrosis. Clin Orthop 277: 22-30, 1992

16) Fisher DE. The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid-induced avascular necrosis. Clin Orthop 130: 68-80, 1978

17) Jones JP, Engleman EP, Steinbach HL, Murray WR, Rambo ON. Fat embolization as a possible mechanism producing avascular necrosis. Arthritis Rheum 8: 449, 1965

18) Jones JP. Fat embolism and osteonecrosis. Orthop Clin North Am 16: 595-633, 1985

19) Wang GJ, Sweet DE, Reger SI, Thompson RC. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. J Bone Joint Surg Am 59: 729-

735, 1977
20) 松本忠美，勝木保夫，西野　暢，中村琢哉，柳瀬茂樹，武田秀之．ステロイド投与下における大腿骨頭内圧．厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班，平成3年度研究報告書，87-89頁，1992
21) Arnordi CC. Vascular aspects of degenerative joint disorders. Acta Orthop Scand Suppl 261: 1-82, 1994
22) Starklint H, Lausten GS, Arnordi CC. Microvascular obstruction in avascular necrosis. Acta Orthop Scand 66: 9-12, 1995
23) 居石克夫，平野　薫，筒井秀樹，杉岡洋一．特発性大腿骨頭壊死症の臨床病理学的研究．整・災外 36: 3-12, 1993
24) Zalavras C, Dailiana Z, Elisaf M, Bairaktari E, Vlachogiannopoulos P, Katsaraki A, Malizos KN. Potential aetiological factors concerning the development of osteonecrosis of the femoral head. Eur J Clin Invest 30: 215-221, 2000
25) Glueck CJ, Freiberg R, Tracy T, Stroop D, Wang P. Thorombophilia and Hypofibrinolysis; Pathophysiologies of osteonecrosis. Clin Orthop 334: 43-56, 1997
26) Wang TY, Wang TY, Avlonitis EG, Relkin R. Systemic necrotizing vasculitis causing bone necrosis. Am J Med 84: 1085-1086, 1988
27) Saito S, Inoue A, Ono K. Intramedullary haemorrhage as a possible cause of avascular necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Br 69: 346-351, 1987
28) Gosling DC, Sampson WFD, MacLeod M, Hanby AM, Slapak M. Susceptibility of the rabbit and the rat to steroid osteonecrosis: An experimental study. Transplantation 43: 751-753, 1987
29) Bouteiller G, Arlet J, Blasco F, Vigoni F, Elefterion A. Is osteonecrosis of the femoral head avascular? Bone blood flow measurements on femoral parts after long-term treatment with corticosteroids. *In* J Arlet, RP Ficat, DS Hungerford (eds), Bone circulation, 1st ed, p44-47, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984
30) Jones LC, Hungerford DS. Models of ischemic necrosis of bone. *In* J Arlet, RP Ficat, DS Hungerford (eds), Bone circulation, 1st ed, p30-34, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984
31) 木下　斎．ステロイド性大腿骨頭壊死に関する実験的研究．久留米医学会雑誌 50: 1117-1135, 1987
32) Fisher DE, Bickel WH, Holley KE, Ellefson RD. Corticosteroid-induced aseptic necrosis II: Experimental study. Clin Orthop 84: 200-206, 1972
33) Warner JJP, Philip JH, Brodsky GL, Thornhill TS. Studies of nontraumatic osteonecrosis. Clin Orthop 225: 128-140, 1987
34) Gold EW, Fox OD, Weissfeld S, Curtiss PH. Corticosteroid-induced avascular necrosis: An experimental study in rabbits. Clin Orthop 135: 272-280, 1978
35) Jaffe WL, Epstein M, Heyman N, Mankin HJ. The effect of cortisone on femoral and humeral heads in rabbits. Clin Orthop 82: 221-228, 1972
36) Kawai K, Tamaki A, Hirohata K. Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. J Bone Joint Surg Am 67: 755-763, 1985
37) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues. Arthritis Rheum 40: 2055-2064, 1997
38) Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, Sueishi K. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. Clin Orthop 316: 235-243, 1995
39) Matsui M, Saito S, Ohzono K, Sugano N, Saito M, Takaoka K, Ono K. Experimental steroid-induced osteonecrosis in adult rabbits with hypersensitivity vasculitis. Clin Orthop 277: 61-72, 1991
40) 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 9: 1017-1023, 1997
41) Shimizu K, Moriya H, Akita T, Sakamoto M, Suguro T. Prediction of collapse with magnetic resonance imaging of avascular necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Am 76: 215-223, 1994
42) Sakamoto M, Shimizu K, Iida S, Akita T, Moriya H, Nawata Y. Osteonecrosis of the femoral head: A prospective study with MRI. J Bone Joint Surg Br 79: 213-219, 1997
43) 久保俊一，山本卓明，居石克夫．特発性大腿骨頭壊死症のMR画像と組織像．整形外科 48: 761-768, 1997
44) Sugano N, Masuhara K, Nakamura N, Ochi T, Hirooka A, Hayami Y. MRI of early osteonecrosis of the femoral head after transcervical fracture. J Bone Joint Surg Br 78: 253-257, 1996
45) 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 334: 68-72, 1997
46) Nusing R, Ullrich V. Regulation of cyclooxygenase and thromboxane synthase in human monocytes. Eur J Biochem 206: 131-136, 1992
47) 村上康弘，大澤仲昭．ステロイドホルモンとサイトカイン．最新医学 46: 2196-2203, 1991
48) van de Stolpe A, Caldenhoven E, Raaijmakers JA, van der Saag PT,Koenderman L. Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesionmolecule-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell lines. Am J Respir Cell Mol Biol 8: 340-347, 1993
49) 原田育生．血管新生におよぼすグルココルチコイドの影響．日整会誌 66: 763-770, 1992
50) Inoue A, Ono K. A histological study of idiopathic avascular necrosis of the head of the femur. J Bone Joint Surg Br 61: 138-143, 1979.
51) Saito S, Ohzono K, Ono K. Early arteriopathy and postulated pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop 277: 98-110, 1992.
52) Yamamoto T, DiCarlo EF, Bullough PG. The prevalence and clinicopathological appearance of extension of osteonecrosis in the femoral head. J Bone Joint Surg Br 81: 328-332, 1999.
53) 飯田　哲，秋田　徹，原田義忠，清水　耕，坂本雅昭，池之上純男，萩原雅司，小泉　渉，中馬　敦，守屋秀繁．ステロイド性骨壊死のprospective study．Hip Joint 21: 525-530, 1995
54) 廣田良夫，竹下節子．特発性大腿骨頭壊死症の分析疫学．

別冊整形外科 35: 8-15, 1999
55) Kubo T, Fujioka M, Yamazoe S, Yoshimura N, Oka T, Hasegawa Y, Hirasawa Y. Relationship between steroid dosage and osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation as measured by Magnetic Resonance Imaging. Transplant Proc 30: 3039-3040, 1998
56) 安部吉則，高橋 新，船山完一，若松英吉．病理組織像からみた特発性大腿骨頭壊死症の病態．別冊整形外科 35: 18-24, 1999
57) 森 俊仁，三上凱久．MRIで大腿骨頭壊死病変の修復を観察しえた1例．別冊整形外科 35: 114-119, 1999
58) 白井厚治，鏡味正勝，森 聖二郎，斉藤 康，吉田 尚．ステロイドの生化学的メカニズム：脂質代謝におよぼす影響．最新医学 39: 1532-1537, 1984
59) Jones JP, Engleman EP, Najarian JS. Systemic fat embolism after renal homotransplantation and treatment with corticosteroids. N Engl J Med 273: 1453-1458, 1965
60) van Giezen JJJ, Jansen JWCM. Correlation of *in vitro* and *in vivo* decreased fibrinolytic activity caused by dexamethasone. Ann N Y Acad Sci 667: 199-201, 1992
61) Kim WM, Merskey C, Deming QB, Adel HN, Wolinsky H, Clarkson TB, Lofland HB. Hyperlipidemia, hypercoagulability, and accelerated thrombosis: studies in congenitally hyperlipidemic rats and in rats and monkeys with induced hyperlipidemia. Blood 47: 275-286, 1976
62) 堀井健志，松本忠美，西村立也，西野 暢．ステロイド投与家兎における骨内血管系の変化．別冊整形外科 35: 54-59, 1999
63) Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastgenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. J Clin Invest 102: 274-282, 1998
64) Charriaut-Marlangue C, Margaill I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y: Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. J Cereb Blood Flow Metab 16: 186-94, 1996
65) Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. Lab Clin Invest 74: 86-107, 1996

Histopathological Study of Steroid-induced Osteonecrosis in Rabbits Tamon Kabata, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **109**, 262 — 278 (2000)

Key words steroid, osteonecrosis, rabbit, apoptosis

Abstract

Although it is widely accepted that steroids are one of the causal factors of osteonecrosis (ON), the pathogenic mechanism of the relationship between steroids and ON is still the source of considerable dispute. Since animal experiments are essential for clarification of this mechanism, the incidence of ON in steroid-treated rabbits was investigated under various conditions. Involvement of apoptosis in steroid-induced ON was also investigated in the same rabbit model. Mature Japanese white rabbits (mean body weight: 3.5 kg) were given weekly intramuscular injections of methylprednisolone acetate (4 mg/kg) for several weeks (maximum 8 weeks). At the end of the treatment, the femur and humerus were histopathologically examined for the presence, location, and incidence of ON. ON was typically localized in the area of the metaphysis and diaphysis, while no necrotic lesions were observed in the epiphysis. The incidence of ON was 70% in the proximal femur, 30% in the distal femur, and 40% in the proximal humerus after 4-week steroid treatment, and the onset of ON was observed 1 week after the first steroid administration. However, continuation of steroid treatment did not increase the incidence and area of ON, nor did it produce any new necrotic foci. Interruption of the steroid treatment accelerated the repair process of the necrotic lesion, but did not increase the incidence of ON. These findings suggest that the steroid-induced ON is caused not by a recurrent ischemic episodes or a chronic condition which produces repeated infarction but by acute single ischemic events which occurs in the early period after steroid administration. Serial hematologic examinations revealed both a hypercoagulable state and hyperlipidemia which were detected 1 to 2 weeks after the first injection of methylprednisolone, thus at approximately the same time as the occurrence of ON. Hypercoagulability and hyperlipidemia caused by steroid administration seem to play an important part in the development of steroid-induced ON. As for involvement of apoptosis in steroid-induced ON, numerous TUNEL-positive cells were found in the area surrounding ON without repair tissue, but only a few of these cells were seen around the ON associated with repair tissue. These findings provide evidence that apoptosis occurs early in the lesion of steroid-induced ON and have important implications for future studies on the pathology and developmental mechanism of this disease, as well as for the development of new treatments and preventive methods.