

ステロイド投与家兔における静脈病変 ステロイド性大腿骨頭壊死症の病因病態に注目して

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/2297/9118

ステロイド投与家兎における静脈病変

—ステロイド性大腿骨頭壊死症の病因病態に注目して—

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

西 村 立 也

ステロイドは大腿骨頭壊死症の成因の一つと考えられているが、その機序に関しては未だ不明である。ステロイドが大腿骨頭に虚血をおこす原因として、近年、静脈側の因子が注目されてきたが、これまで実験的にステロイド投与により静脈に変化を認めたという報告はなかった。本研究では、ステロイド投与による静脈の変化を明らかにする目的で、家兎にメチルプレドニゾロンを8週間投与し、その骨頭周囲静脈・耳静脈・大腿静脈・下大静脈を免疫組織染色および電子顕微鏡を用いて検討した。ステロイド投与群30羽中7羽において、静脈の内膜における泡沫様細胞の増殖が認められた。これを平滑筋およびマクロファージに対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、この泡沫様細胞は主に平滑筋細胞由来であることが明らかになった。また、コラーゲンをタイプ別に染色したところ、ステロイド投与群ではI型およびIII型コラーゲンに変化はみられなかったが、内膜におけるV型コラーゲンの増加が認められた。従って、このことから静脈に内膜肥厚性の変化が起こっていることが示唆された。また、ステロイド投与群の耳静脈を電子顕微鏡により検討したところ、走査電顕では内皮細胞の表面不整が認められ、透過電顕では平滑筋細胞内の筋原線維の変性、および内皮細胞内に空胞が認められた。このことからステロイドが内皮細胞ならびに平滑筋細胞を障害することが推察され、電顕的にもステロイドが静脈を障害することが証明された。ステロイドは内皮細胞を障害することによって血栓形成を促進し、虚血による大腿骨頭壊死症が発生しやすい状態を形成する一つの環境因子であると考えられた。今回の実験より、ステロイドが静脈を障害することが病理組織学的に証明され、この静脈における還流障害は血流のうっ滞および骨頭内圧の上昇をまねいて大腿骨頭壊死症の要因の一つになっている可能性が示唆された。

Key words avascular necrosis, femoral head, steroid, vein

成人の大腿骨頭壊死症は、ステロイド性、アルコール性、および狭義の特発性に分けられるが、近年、ステロイド性の割合が増加している¹⁾。これは、膠原病などの治療に副腎皮質ステロイド剤が万能薬的に利用されていることと無縁ではない。また、腎移植をはじめとする臓器移植の普及に伴って免疫抑制剤としてのステロイド剤の利用は増加し、ステロイド性大腿骨頭壊死症はさらに増加するものと思われる。ステロイド由来の骨壊死は、多発性で壊死範囲が広く、ステロイド性大腿骨頭壊死症の病因・病態の解明、および予防は重大な課題となっている。

大腿骨頭壊死症が虚血によって発症し、ステロイドの投与が重要な外的因子の一つであることは一般に認められているが、ステロイドが大腿骨頭の虚血を起こす機序に関しては未だ不明な点が多い。これまで大腿骨頭に虚血が起こる原因として、骨頭内・外の細動脈の変性・破壊や、骨頭周囲の血管の脂肪塞栓など、動脈側の因子が重要視されてきた。しかし、松本ら²⁾は、ステロイド投与家兎の大腿骨頭の血流量と骨内圧を測定したところ、血流量は低下していたが骨内圧は上昇していたことから、大腿骨頭壊死症発生前段階においては大腿骨頭血液循環の流出部、すなわち静脈側に障害が起きている可能性があることを報告した。また、ステロイドを投与された臨床例の大腿骨頭に

おいても同様の結果を得たと報告した³⁾。その後、居石ら⁴⁾は、ステロイド投与症例の剖検において壊死巣部を還流する被膜下静脈の髓外流出部から髓外領域にかけて高度の内腔狭窄がみられたが、同部の動脈系には著明な変化がなかったことから、静脈系の還流障害が大腿骨頭壊死症の一因となった可能性があることを報告した。このように大腿骨頭壊死症の成因として、近年、静脈側の因子が注目されてきたが、これまで実験的にステロイド投与により静脈に変化を認めたという報告はない。今回、ステロイド投与による静脈の変化を明らかにする目的で、家兎にステロイドを投与して全身の静脈の変化を免疫組織染色および電子顕微鏡を用いて検討した。

対象および方法

体重3~3.5kgの雌性の日本白色家兎を用いて実験を行った。体重1kgあたり4mgのメチルプレドニゾロン(日本アップジョン、東京)を週1回8週間右殿筋内に注射した群をステロイド投与群、ステロイドの投与をせず同一条件で飼育した群をコントロール群とした。

1. 光学顕微鏡による検討

全身の動静脈を検索する目的で、骨頭周囲動静脈、耳動静脈、大腿動静脈、腹部大動脈および下大静脈を検討対象とし

平成6年12月14日受付, 平成7年2月2日受理

Abbreviations: EVG, Elastica van Gieson; 走査電顕, 走査型電子顕微鏡; 透過電顕, 透過型電子顕微鏡

た。対象群10羽, ステロイド投与群30羽に対し, ネブタール(大日本製薬, 大阪)を急速に静注することによって屠殺し, 軟部組織をつけた左大腿骨頭, 左耳動静脈, 左大腿動静脈, 腹部大動脈および下大静脈を採取した。採取した検体を10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬して固定し, パラフィン包埋ののちマイクロトームで厚さ1~2 μ mの切片を作成した。摘出大腿骨頭については, ホルマリン固定後 Cutting grinding system (Exakt, Hamburg, Germany)を用いて頸部軸に垂直に厚さ約2.5mmにスライスした。これをEDTAで脱灰してパラフィン包埋ののち, 同様の切片を作成した。これらを, HE染色およびエラスチカワンギーソン (Elastica van Gieson, EVG)染色し, 光学顕微鏡にて観察した。

II. 免疫組織学的検討

1. 抗平滑筋抗体および抗マクロファージ抗体による検討

光学顕微鏡による検討にて得られた標本をアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex method) 法にて検索した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィン後, 0.03%過酸化水素加無水メタノールにて30分間反応させ, 内因性ペルオキシダーゼを阻止した。一次抗体には抗平滑筋抗体 HHF35⁷⁾および抗マクロファージ抗体 RAM11⁸⁾ (いずれも東京医科歯科大学第三内科, 塚田豊広先生より供与)を用いた。一次抗体を冷室で一晩反応させた後, リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS)にて10分間3回洗浄し, ついで二次抗体であるビオチン化抗マウスIgG抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)に30分間反応させた。その後, ジアミノベンチジン (diaminobenzidine, DAB)で発色し, メチルグリーンで核染色して光学顕微鏡にて観察した。

2. 抗コラーゲン抗体による検討

対象群5羽, ステロイド投与群10羽の耳静脈, 大腿静脈, 下大静脈について, モノクローナル抗体を用いて, I, III, V型コラーゲンをタイプ別に蛍光抗体間接法にて染色した。

屠殺後即座に検体を液体窒素に浸して新鮮凍結標本を作成し, クリオスタット Tissue-Tek II (Miles, Naperville, Illinois,

USA)により5 μ mに薄切して, アセトンにて5分間固定した。一次抗体には, ラビットコラーゲンと交差反応する抗ヒトI型コラーゲン抗体 (富士薬品, 高岡), 抗ヒトIII型コラーゲン抗体 (富士薬品), 抗ヒトV型コラーゲン抗体 (富士薬品)を用いた。正常血清と10分間反応させた後, 一次抗体と90分間反応させた。ついで, 二次抗体であるイソチオシアン酸フロオレセイン (fluorescein-isothiocyanate, FITC) 標識抗体 (CAPPEL, Durham, USA)と60分間反応させ, 蛍光顕微鏡 VANOX-T (オリンパス, 東京)で観察した。

III. 電子顕微鏡による検討

対象群5羽, ステロイド投与群5羽の右耳静脈について電子顕微鏡による検討を行った。

1. 走査型電子顕微鏡 (走査電顕) による検討

耳動脈よりヘパリン加生理食塩水 (1000単位/100ml)にて十分灌流した後, 2.5%グルタルアルデヒド-0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)溶液を用いて灌流固定を行い耳静脈を摘出した。5℃で同一液内に2時間浸し, 1%オスミウム酸-0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)にて1時間後固定した。エタノール系列で脱水, 酢酸イソアミルで置換し, 臨界点乾燥 HCP-AUTO (日立, 東京)を行った後, 試料台に載せ, 金蒸着して走査型電子顕微鏡 JSM-5400 (日本電子, 東京)にて観察した。

2. 透過型電子顕微鏡 (透過電顕) による検討

走査電顕による検討と同様に固定した標本をエタノール系列により脱水し, エポキシ樹脂に包埋した。この材料から超薄切片を作製し, 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)にて観察した。

成 績

1. 光学顕微鏡による検討

コントロール群10羽では動脈, 静脈とも病変は認められなかった (図1, 2)。

ステロイド投与群の動脈では30羽中20羽において中膜に空胞化が認められ, その一部に内膜肥厚や内弾性板の破壊が認めら

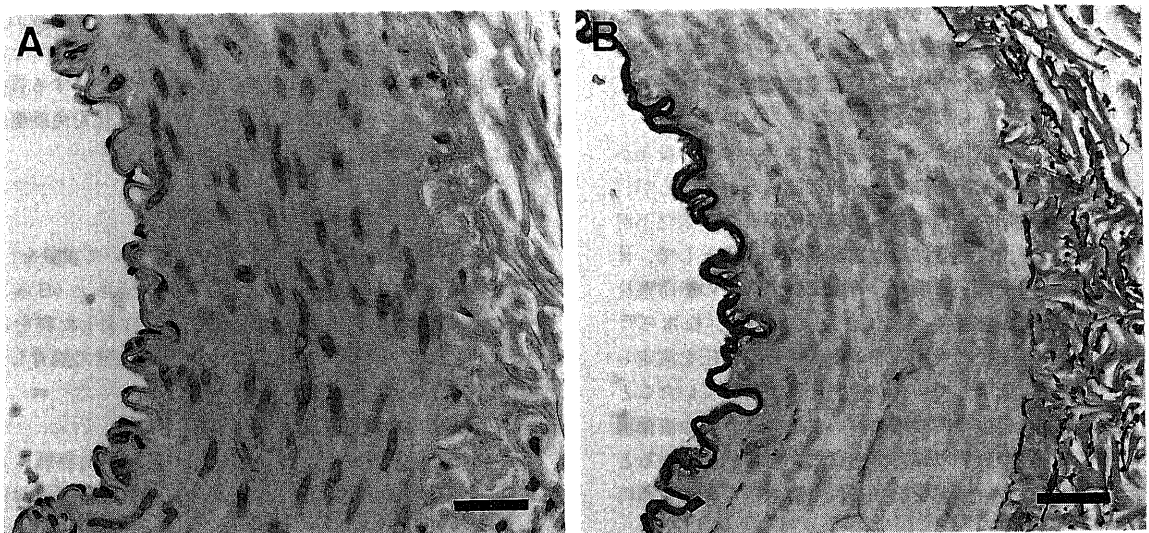


Fig. 1. Light micrographs of ear artery in the control group. There are no abnormalities in intima, media, and adventitia (A, HE; B, EVG). Bars indicate 30 μ m.

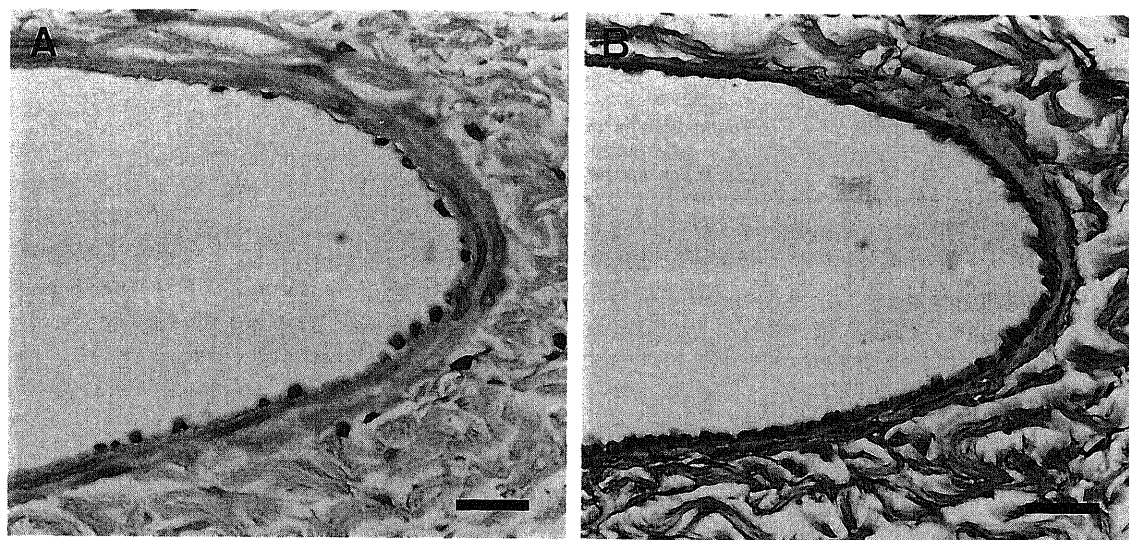


Fig. 2. Light micrographs of ear vein in the control group. No remarkable changes are seen (A, HE; B, EVG). Bars indicate 20 μ m.

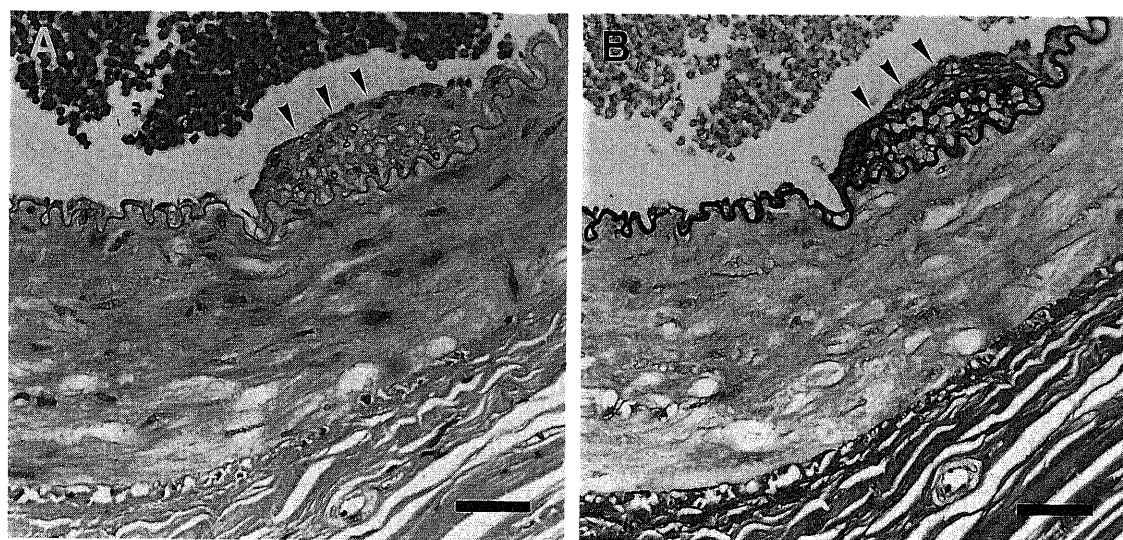


Fig. 3. Light micrographs of ear artery in the steroid-treated group. Vacuolarization of the tunica media and mild intimal thickening (arrows) are seen. The vessel lumen is at the top of the picture (A, HE; B, EVG). Bars indicate 30 μ m.

Table 1. Histopathological changes of arteries in 30 steroid-treated rabbits

Arteries	Number of rabbits showing	
	Vacuolarization of the tunica media	Intimal thickening or disruption of internal elastic lamina
Artery around the femoral head	9	0
Ear artery	17	6
Femoral artery	7	0
Aorta	1	0

Table 2. Histopathological changes of veins in 30 steroid-treated rabbits

Veins	Number of rabbits showing	
	Foamy cells in the intima and vacuolarization of the tunica media	Disruption of internal elastic lamina
Vein around the femoral head	4	3
Ear vein	2	1
Femoral vein	2	2
Inferior vena cava	1	0

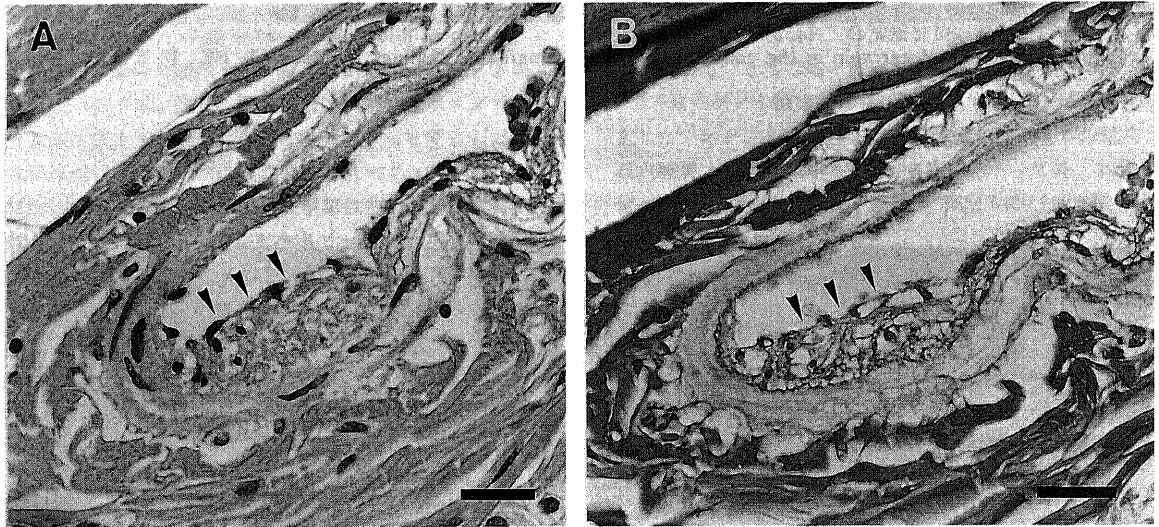


Fig. 4. Light micrographs of ear vein in the steroid-treated group. Proliferation of foamy cells in the intima (arrows) and vacuolarization of the tunica media are seen (A, HE; B, EVG). Bars indicate 20 μ m.

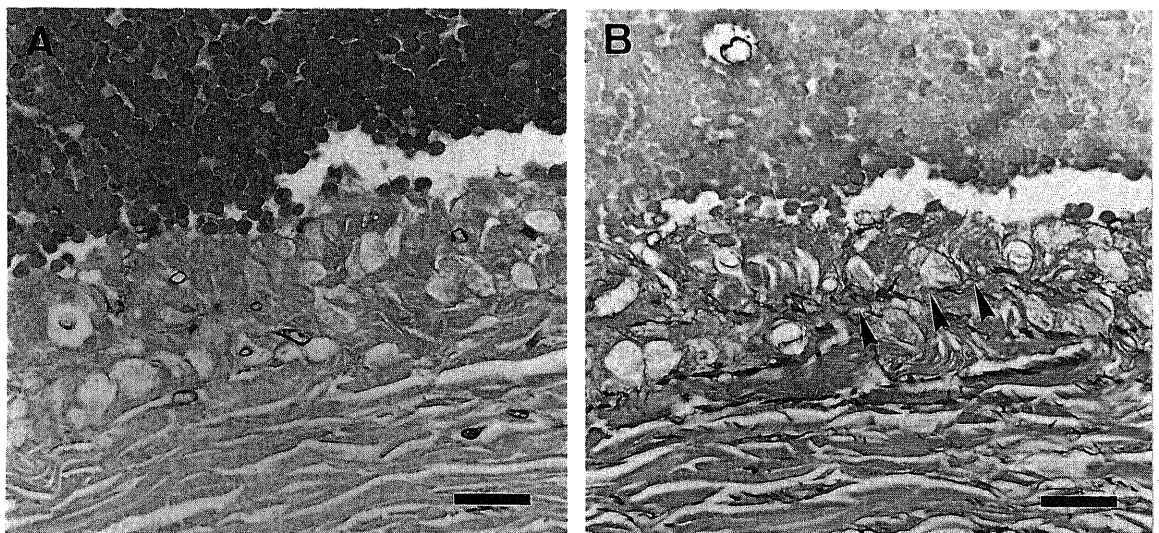


Fig. 5. Light micrographs of femoral vein in the steroid-treated group. Proliferation of foamy cells in the intima and disruption of internal elastic lamina (arrows) are seen. The vessel lumen is at the top of the picture (A, HE; B, EVG). Bars indicate 20 μ m.

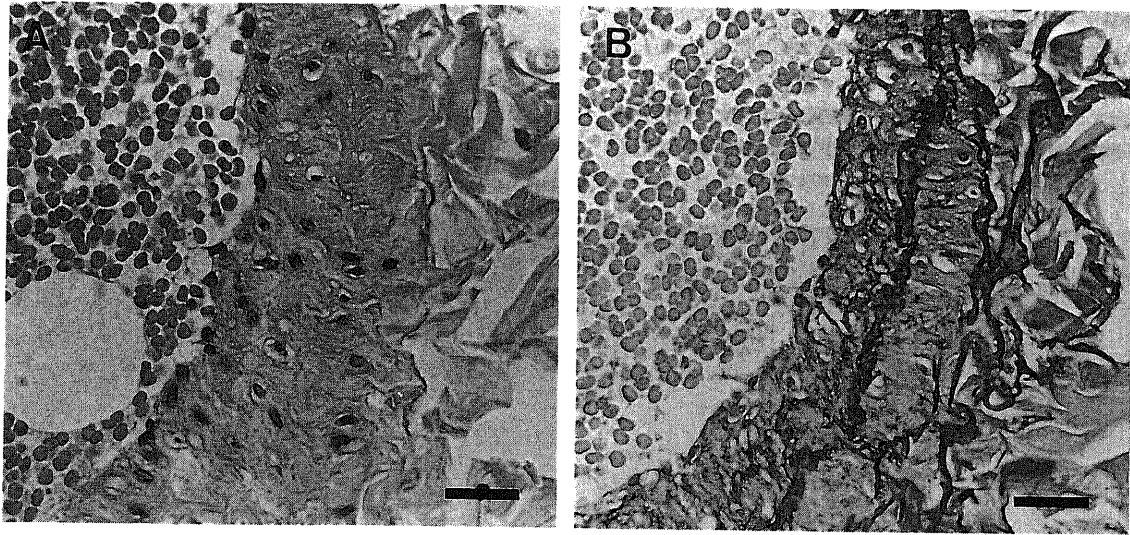


Fig. 6. Light micrographs of vein around the femoral head in the steroid-treated group. Proliferation of foamy cells in the intima is seen. The vessel lumen is at the left side (A, HE; B, EVG). Bars indicate 20 μm .

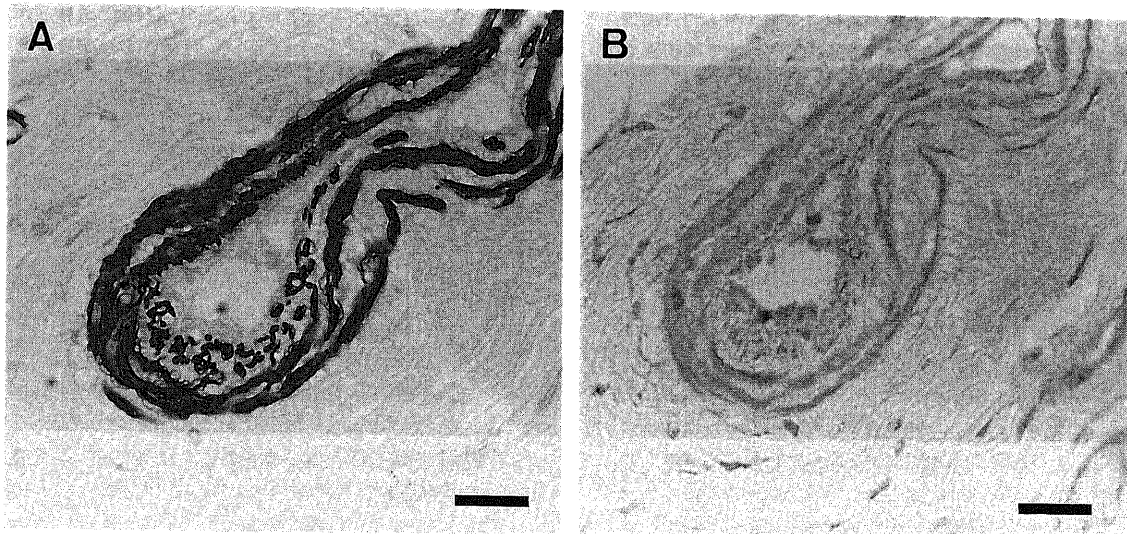


Fig. 7. Immunohistochemical staining of ear vein in the steroid-treated group, using antimuscle cell antibody HHF35 (A), and antimacrophage antibody RAM11 (B) by the avidin-biotin complex method. Note that the foamy cells in the intima are HHF35-positive, but RAM11-negative. Bars indicate 20 μm .

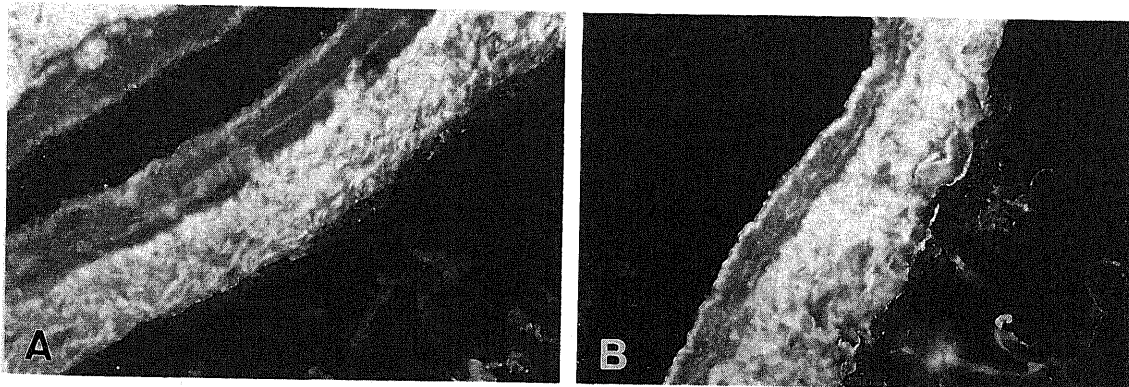


Fig. 8. Indirect fluorescence micrographs for type I collagen of inferior vena cava. A, the control group; B, the steroid-treated group. There is no significant difference between the control group and the steroid-treated group. Original magnification $\times 50$.

れた(表1, 図3)。これらの変化は, 耳動脈や骨頭周囲動脈など小さい動脈に多く認められ, 大動脈にはほとんど認められなかった。

一方, ステロイド投与群の静脈では30羽中7羽において, 内膜における泡沫様細胞の増殖や中膜の空胞化が認められ, その

一部に内弾性板の破壊が認められた。これらの変化は, 骨頭周囲静脈では30羽中4羽, 耳静脈では30羽中2羽, 大腿静脈では30羽中2羽, 下大静脈では30羽中1羽に認められ, 静脈でも比較的小さい静脈に変化がみられやすい傾向にあった(表2, 図4~6)。

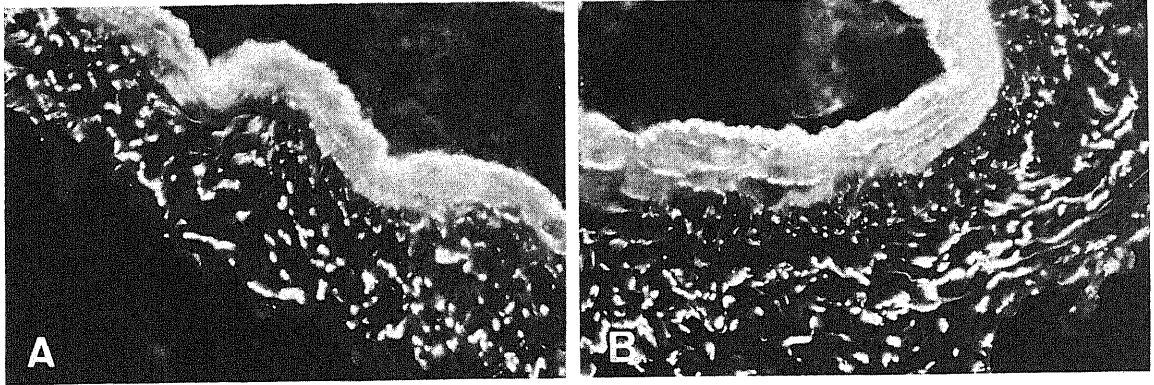


Fig. 9. Indirect fluorescence micrographs for type III collagen of inferior vena cava. A, the control group; B, the steroid-treated group. There is no significant difference between the control group and the steroid-treated group. Original magnification $\times 50$.

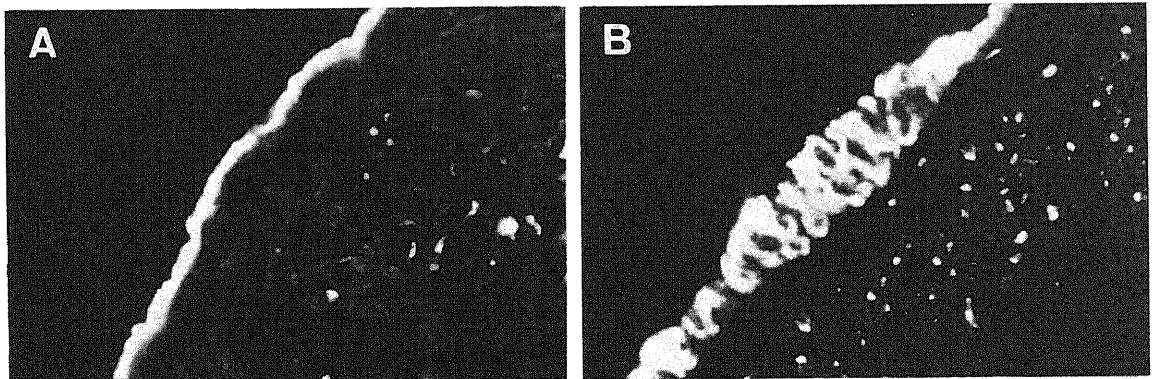


Fig. 10. Indirect fluorescence micrographs for type V collagen of inferior vena cava. A, the control group; B, the steroid-treated group. Note an increase of type V collagen in the intima of the steroid-treated group compared with the control group. The vessel lumen is at the left side. Original magnification $\times 50$.

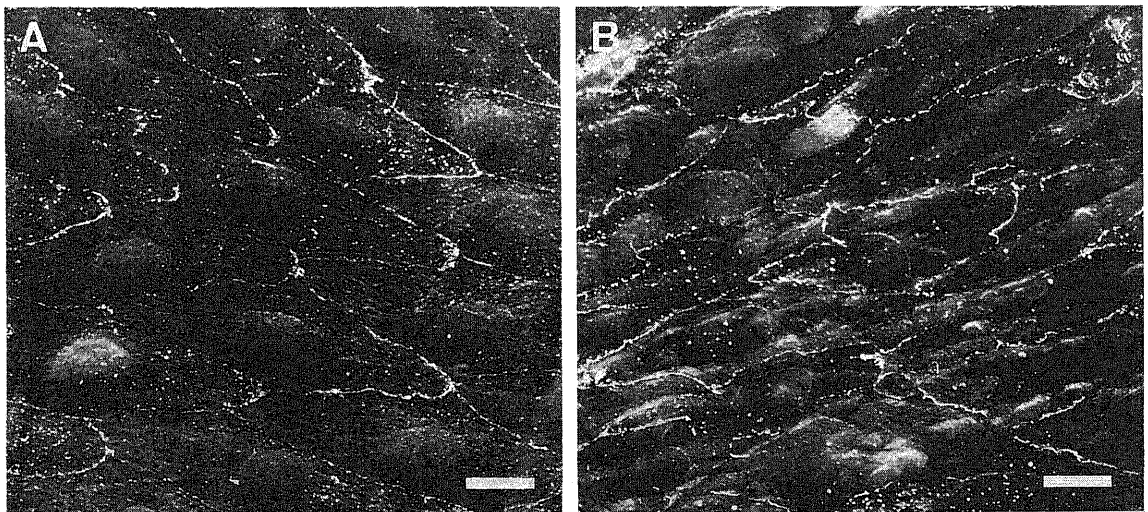


Fig. 11. Scanning electron micrographs of the luminal surface of an ear vein. A, the control group; B, the steroid-treated group. Note that the endothelial surface in the steroid-treated group is uneven. Bars indicate $10 \mu\text{m}$.

II. 免疫組織学的検討

1. 抗平滑筋抗体および抗マクロファージ抗体による検討

光学顕微鏡による検討でステロイド投与群の静脈の内膜に泡沫様細胞が認められた標本は9検体であるが、これらの泡沫様細胞のうち、抗マクロファージ抗体により染色されたものは1検体のみで、他はすべて抗平滑筋抗体により染色された(図7)、このことから、静脈における内膜の泡沫様細胞は主に平滑筋細胞由来であることが明らかになった。

2. 抗コラーゲン抗体による検討

I型およびIII型コラーゲンにおいてはコントロール群とステロイド投与群の間に変化はみられなかった(図8, 9)、一方、V型コラーゲンは、コントロール群では内皮細胞表面および中膜平滑筋細胞の細胞外マトリックスと思われる部分が染色されていたが、ステロイド投与群では内膜において幅広く染色され、内膜におけるV型コラーゲンの増加が認められた(図10)。

III. 電子顕微鏡による検討

1. 走査電顕による検討

走査電顕により耳静脈の内面を観察すると、コントロール群では均一な内皮細胞が規則正しく並んでいたが、ステロイド投与群では5羽中2羽において、内皮細胞の不均一化や表面の不整が認められた(図11)。

2. 透過電顕による検討

コントロール群の耳静脈には異常はみられなかったが、ステロイド投与群の耳静脈では5羽中2羽において、中膜平滑筋細胞内の筋原線維の変性、ミトコンドリアの膨化、および内皮細胞内に空胞が認められた(図12)。

考 察

大腿骨頭壊死症の発症にステロイドの投与が関連していることは、1957年に Pietrogrande ら⁹⁾により最初に報告され、これまでに数多くの臨床的^{10)~16)}ならびに基礎的^{17)~24)}な研究が報告されている。しかし、ステロイドが大腿骨頭に虚血を起こす原因に関してはいまだに不明であり、推論の域を出ていない。現在、大腿骨頭に虚血が起こる機序として、脂肪塞栓説^{11)~14)17)}、コ

ンパートメント説¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁸⁾、動脈障害説^{25)~31)}などが提唱されている。Jones ら¹²⁾は、ステロイド投与により脂肪肝となった肝臓から脂肪が血中に遊離し、骨頭周囲の血管を閉塞して循環障害を引き起こすという脂肪塞栓説を提唱した。しかしながら、脂肪肝由来の脂肪塞栓がなぜ肺塞栓をおこさず骨頭に生じるのか、正常骨頭にも同程度の脂肪塞栓がみられることはどう説明するのか、などの疑問がある。Ficat¹⁵⁾、Wang ら¹⁹⁾は、ステロイド投与により大腿骨頭内の脂肪細胞が増大して骨髄内圧が上昇し、これによって血管(ジスソイド)が圧迫されて血流が低下するというコンパートメント説を提唱した。しかし、この説も骨幹部と交通した骨頭に本当にコンパートメントが存在するのか、脂肪細胞増大による骨頭内圧の亢進で壊死を起こすほどの血流低下がみられるのか、などの疑問が残る。

一方、本邦では、厚生省の特発性大腿骨頭壊死症調査研究班を中心に、大腿骨頭内・外の動脈の変化が重要視されてきた。大園²⁵⁾、Saito ら²⁶⁾は、骨頭内細動脈に内弾性板の断裂および中膜弾性線維の消失を観察してこの細動脈壁の破壊が循環障害を起こす重要な因子であると報告し、杉岡²⁷⁾は骨頭外被膜下動脈に内膜肥厚、内弾性板の破断、外膜の線維化を観察している。また、動物実験においても、井上²⁸⁾は、ステロイドを投与したミニチュアダッグでは頸部被膜下動脈に内皮細胞の内腔への立ち上がり、内皮基底部の空胞形成が認められたと報告し、小泉²⁹⁾はステロイド投与家兎の動脈では中膜に空胞化が認められたと報告している。このように、ステロイド投与による虚血の原因として動脈側の因子が重要視されてきた。

しかし、松本³⁰⁾が、ステロイド投与家兎の大腿骨頭の骨内圧と血流量を測定し、血流量は低下していたが骨内圧は上昇していたことから、大腿骨頭壊死発生の前段階においては大腿骨頭血流循環の流出部に障害が起きている可能性があることを報告して、静脈の変化が注目されてきた。なぜならば、動脈が障害された場合には、大腿骨頭の血流量は低下するが、同時に骨内圧も低下するはずだからである。これまで、ステロイド投与による動脈の変化を検索した報告は数多くみられるが、ステロイド投与による静脈の変化について記載した報告は少ない。長期ステロイド投与患者では皮下出血が多くみられ、静脈注射が困難なことが多いことから、この血管脆弱性の原因を検索した報告がいくつかみられる。Nashelsky ら³¹⁾はステロイドを投与されたリウマチ患者の皮下静脈を検討し、血管脆弱性は細胞間基質の減少によるもので、血管壁に変化はみられなかったと報告している。また、Lorenzen ら³²⁾はヒトにステロイドを3週間投与して伏在静脈を検討し、細胞間基質に変化がみられたが、一般光学顕微鏡による所見に変化はみられなかったと報告している。この他にもステロイド投与による静脈の変化を検索した報告はみられるが³³⁾、ステロイド投与により静脈に変化はみられないと報告されていた。しかし、松本の報告³⁰⁾の後、居石³⁴⁾は、ステロイド投与症例の剖検において、壊死巣部を還流する被膜下静脈の髓外流出部から髓外領域にかけて高度の内腔狭窄がみられたが、同部の動脈系には著明な変化がなかったことから、静脈系の還流障害が大腿骨頭壊死発生の一因となった可能性があることを報告した。また、小池³⁵⁾も、ステロイドを長期投与された患者の伏在静脈に著しい内膜肥厚がみられたと報告するなど、臨床例でステロイド投与による静脈の変化を記載した報告は散見されるようになったが、これを実験的に検討した報告はなかった。

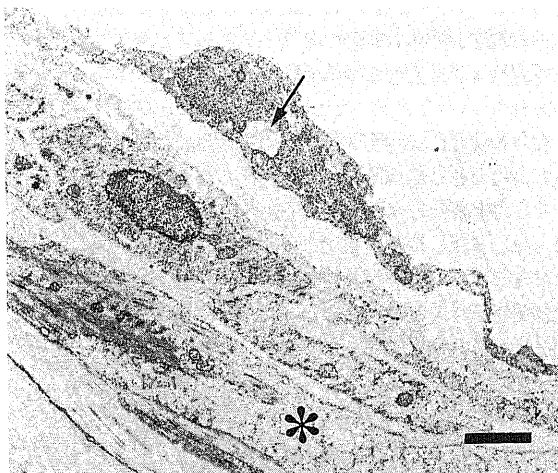


Fig. 12. Transmission electron micrograph of ear vein in the steroid-treated group. *, degeneration of the myofilaments in the smooth muscle cells; An arrow, vacuoles in the endothelial cells. Bar indicates 3 μ m.

我々の実験において、家兎に大量のステロイドを8週間投与することにより、静脈においても内膜における泡沫様細胞の増殖や中膜の空胞化が認められ、動脈だけではなく静脈にも変化が起こることが明らかになった。変化が認められたのは30羽中7羽と全例に認められたわけではないが、検索したのは全身の静脈の極く一部であり、実際にはかなりの確率で静脈にも変化が起こっているものと考えられる。

これまで静脈には変化がみられないと報告されていたが、この理由として次のことが考えられる。まず第一に、動脈に比べて静脈が重要視されなかったことが挙げられる。動脈には冠血管や脳血管の動脈硬化など、致死の疾患が数多く存在するが、静脈にはそのような重篤な疾患はみられない。従って、静脈については動脈ほど詳しい検索がなされなかったものと考えられる。第二に、静脈は動脈に比べて血管壁が薄く、変化がわかりにくいことが挙げられる。我々の実験では比較的小さな静脈の内膜と中膜に変化が認められたわけであるが、血管径が小さくなると弾性板は不明瞭となって内膜・中膜・外膜の区別は難しく、血管壁の薄い静脈の変化を光学顕微鏡で同定するのはさらに困難であると考えられる。また、これまでの報告はステロイド投与期間が4週以内と短期間のもので多かったこともその理由の一つと考えられる。ステロイドは二相性に作用し³⁹⁾、短期投与では細胞増殖を抑制して内膜肥厚を抑制することが報告されている³⁹⁾。従って、長期投与でなければ、今回みられた内膜における泡沫様細胞の増殖はみられなかったと考えられる。

今回の実験により、ステロイド投与家兎の静脈において内膜における泡沫様細胞の増殖が認められたが、内膜における泡沫様細胞の増殖は動脈硬化初期病巣の特徴的所見である。そして、動脈硬化においては、この泡沫細胞の起源として、中膜平滑筋細胞およびマクロファージが考えられ、動脈硬化の初期ではマクロファージ由来が多いが、進行すると平滑筋由来の泡沫細胞の割合が増えてくると考えられている^{39,40)}。今回、ステロイド投与家兎の静脈においてみられた泡沫様細胞の起源を明らかにする目的で、抗平滑筋抗体 (HHF35) および抗マクロファージ抗体 (RAM11) を用いて免疫組織染色を行ったところ、この泡沫様細胞は主に抗平滑筋抗体により染色され、中膜平滑筋細胞由来であることが明らかになった。Tsukada ら⁴¹⁾は、伏在静脈を用いて冠動脈バイパス手術を行った剖検例の検討で、動脈硬化の内膜肥厚はマクロファージ由来であったが、移植静脈にみられた内膜肥厚は平滑筋細胞由来であったと報告している。また、Numano ら⁴²⁾は、家兎に静脈を移植して動脈硬化を作成し、動脈における粥状硬化 (内膜肥厚) はマクロファージ由来の泡沫細胞よりなるが、静脈における粥状硬化はおもに平滑筋細胞よりなることを報告し、動脈と静脈の違いは静脈の内弾性板や中膜が薄いことによるとしている。我々の実験において、静脈の内膜でみられた泡沫様細胞が主に抗平滑筋抗体により染色された理由として、泡沫様細胞の増殖が起こってから長期間経過していたために、平滑筋細胞由来の割合が増加したという可能性も考えられるが、静脈では内弾性板が薄いために中膜平滑筋細胞が内皮下に移動しやすかったと考えた方が妥当である。

また、本実験ではステロイド投与家兎の静脈において、泡沫様細胞の増殖による内膜の肥厚が認められたが、近年、動脈硬化の内膜肥厚部ではコラーゲンのタイプ別局在に変化がみられることが明らかになってきた。そこで、ステロイド投与家兎の静脈においてみられた内膜の変化をコラーゲンの面から検証す

るために、モノクローナル抗体を用いてコラーゲンをタイプ別に染色した。正常血管ではI型コラーゲンは血管壁の外膜に多く存在し、III型コラーゲンはI型と共存するが、より細い線維成分に分布する。また、IV型は基底膜に存在し、V型コラーゲンは、内皮細胞の表面および中膜平滑筋細胞の細胞外マトリックスに存在すると言われている。一方、動脈硬化巣においては、I型コラーゲンがIII型に比較して増加すると報告されていたが⁴³⁾、Ooshima ら^{44,45)}が、モノクローナル抗体を用いて動脈硬化巣におけるV型コラーゲンの増加を証明してから、現在では、動脈硬化における内膜肥厚部ではV型コラーゲンが増加するものと考えられている。今回、ステロイド投与家兎の静脈について、コラーゲンをタイプ別に染色したところ、内膜におけるV型コラーゲンの増加が認められた。従って、このことからステロイド投与により静脈に内膜肥厚性の変化が起こっていることが裏付けされた。

また、ステロイド投与家兎の静脈を電子顕微鏡により検討したところ、走査電顕では内皮細胞の不均一化とその表面不整が認められ、透過電顕では平滑筋細胞内の筋原線維の変性、および内皮細胞内に空胞が認められた。従って、ステロイドが内皮細胞ならびに平滑筋細胞を障害することが推察され、ステロイド投与により静脈が障害されることが電顕的にも証明された。

ステロイドが内皮細胞におけるプロスタグランジン I_2 (prostaglandin I_2 , PGI_2) の産生を抑制して抗血栓性を低下させることは報告されている⁴⁶⁾が、今回の実験より、形態学的にもステロイド投与により静脈の内皮細胞が障害されることが明らかになった。血栓発生に関与する因子として、内皮の障害、血流の停滞、血液凝固能の亢進が挙げられるが、ステロイドが血液凝固能を亢進することは以前より報告されている⁴⁷⁾。従って、ステロイドは血液凝固能を亢進するだけではなく、内皮細胞をも障害して血栓形成を促進し、虚血による大腿骨頭壊死症が発生しやすい状態を形成しているものと考えられた。動脈における血栓は、血小板が主役を演じて粘着凝集した白色血栓が多いが、静脈における血栓は血流の停滞と凝固能の亢進によるものが主体である⁴⁸⁾。また、ステロイド投与による凝固能の亢進は5日後には起こると報告されているが⁴⁹⁾、血小板凝集能の亢進は高脂血症になってから二次的に起こると報告されている⁴⁹⁾。従って、ステロイド投与後早期では、動脈よりも静脈の方が血栓が形成されやすい状態になっていることが考えられ、ステロイド投与により動脈よりも先に静脈が障害される可能性が推察された。

我々の実験により、ステロイド投与家兎の静脈において、内膜における泡沫様細胞の増殖や中膜の空胞化が認められ、ステロイドは動脈だけではなく静脈をも障害することが明らかになった。また、免疫組織化学や電子顕微鏡を用いることによりこれを裏付けることができた。ステロイドは静脈を障害して還流障害を引き起こし、この静脈における還流障害は血流のうっ滞、および骨頭内圧の上昇をまねいて大腿骨頭壊死症の環境因子となっていることが明らかになった。

結 論

ステロイド性大腿骨頭壊死症の病因病態を検索する目的で、ステロイド投与家兎における静脈の変化を病理組織学的および免疫組織学的に検討した。

1. ステロイドを8週間投与した家兎の静脈では、内膜にお

ける泡沫様細胞の増殖や中膜の空胞化が認められた。免疫組織染色により、この泡沫様細胞は主に平滑筋細胞由来であることが明らかになった。

2. ステロイド投与家兎の静脈では、内膜におけるV型コラーゲンの増加が認められた。

3. ステロイド投与家兎の静脈を電子顕微鏡により検討したところ、走査電顕では内皮細胞の表面不整が認められ、透過電顕では平滑筋細胞内の筋原線維の変性および内皮細胞内に空胞が認められた。

4. 以上の結果より、ステロイドは静脈にも障害をもたらす、これによる還流障害が血流のうっ滞、および骨頭内圧の上昇をまねいて大腿骨頭壊死発生の要因の一つになっている可能性が示唆された。

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松本忠美助教授に深謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、貴重な御助言を賜りました病理学第一講座中西功夫教授に感謝いたします。さらに、HHF35 および RAM11 を供与していただいた東京医科歯科大学第三内科塚田豊広先生に謝意を表します。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血流班の先生方、ならびに第一病理学教室技術員の方々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特発性大腿骨頭壊死症調査研究班平成5年度第1回班会議(福岡, 1993)、第9回日本整形外科学会基礎学術集会(神戸, 1994)および ARCO 5th International Symposium on Bone Circulation (South Carolina, 1994)において発表した。本研究の一部は、厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班平成5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) 小野啓郎, 西塔 進: 大腿骨頭壊死症研究の進歩. 日整会誌, 61, 1323-1341 (1987).
- 2) 松本忠美, 西村一志, 川北 哲, 勝木保夫, 西野 暢, 富田勝郎: 大腿骨頭血流および骨内圧に対するステロイドの影響. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班, 平成2年度研究報告書, 53-56 (1991).
- 3) 西村一志: ステロイド投与家兎における大腿骨頭内血液循環に関する研究. 十全医会誌, 101, 817-826 (1992).
- 4) 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症調査研究班, 平成3年度研究報告書, 87-89 (1992).
- 5) 居石克夫, 平野 薫, 筒井秀樹, 村岡洋一: SLEに合併した超早期大腿骨頭壊死の1例-病理組織学的検索を中心に-. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班, 平成2年度研究報告書, 79-85 (1991).
- 6) 居石克夫, 平野 薫, 筒井秀樹, 村岡洋一: 剖検時採取大腿骨頭の病理組織学的検討-骨頭栄養血管(静脈系)の検索-. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班, 平成2年度研究報告書, 93-97 (1991).
- 7) Tsukada, T., Tippers, D., Gordon, D., Ross, R. & Gown, A. M.: HHF35, A muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. Immunocytochemical and biochemical characterization. *Am. J. Pathol.*, 126, 51-60 (1987).
- 8) Tsukada, T., Rosenfeld, M., Ross, R. & Gown, A. M.: Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis*, 6, 601-613 (1986).
- 9) Pietrogrande, V. & Mastromarino, R.: Osteopatia da prolungato trattamento cortisonico. *Ortop. Traum. Appar. Mot.*, 25, 791-810 (1957).
- 10) Cruess, R. L., Blennerhassett, J., Macdonald, F. R., Maclean, L. D. & Dossetor, J.: Aseptic necrosis following renal transplantation. *J. Bone Joint Surg.*, 50-A, 1577-1590 (1968).
- 11) Kahlstrom, S. C., Burton, C. C. & Phemister, D. B.: Aseptic necrosis of bone: II. Infarction of bones of undetermined etiology resulting in encapsulated and calcified areas in diaphyses and in arthritis deformans. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 68, 631-641 (1939).
- 12) Jones, J. P., Engleman, E. P., Steinbach, H. L., Murray, W. R. & Rambo, O. N.: Fat embolization as a possible mechanism producing avascular necrosis. *Arthritis Rheum.*, 8, 449 (1965).
- 13) Fisher, D. E. & Bickel, W. H.: Corticosteroid-induced avascular necrosis. *J. Bone Joint Surg.*, 53-A, 859-873 (1971).
- 14) Fisher, D. E.: The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid-induced avascular necrosis: Clinical and experimental results. *Clin. Orthop.*, 130, 68-80 (1978).
- 15) Ficat, R. P.: Idiopathic bone necrosis of the femoral head. *J. Bone Joint Surg.*, 67-B, 3-9 (1985).
- 16) Zizic, T. M., Marcoux, D., Hungerford, D. S. & Stevens, M. B.: The early diagnosis of ischemic necrosis of bone. *Arthritis Rheum.*, 29, 1177-1186 (1986).
- 17) Fisher, D. E., Bickel, W. H., Holley, K. E. & Ellefson, R. D.: Corticosteroid-induced aseptic necrosis II. Experimental study. *Clin. Orthop.*, 84, 200-206 (1972).
- 18) Jaffe, W. L., Epstein, M., Heyman, N. & Mankin, H. J.: The effect of cortisone on femoral and humeral heads in rabbits. An experimental study. *Clin. Orthop.*, 82, 221-228 (1972).
- 19) Wang, G. J., Sweet, D. E., Reger, S. I. & Thompson, R. C.: Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J. Bone Joint Surg.*, 59-A, 729-735 (1977).
- 20) Gold, E. W., Fox, O. D., Weissfeld, S. & Curtiss, P. H.: Corticosteroid-induced avascular necrosis: An experimental study in rabbits. *Clin. Orthop.*, 135, 272-280 (1978).
- 21) Kawai, K., Maruno, H., Watanabe, Y. & Hirohata, K.: Fat necrosis of osteocytes as a causative factor in idiopathic osteonecrosis in heritable hyperlipemic rabbits. *Clin. Orthop.*, 153, 273-282 (1980).
- 22) Kawai, K., Tamaki, A. & Hirohata, K.: Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. *J. Bone Joint Surg.*, 67-A, 755-763 (1985).
- 23) Warner, J. J. P., Philip, J. H., Brodsky, G. L. & Thornhill, T. S.: Studies of nontraumatic osteonecrosis. *Clin. Orthop.*, 225, 128-140 (1987).
- 24) Matui, 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 (1992).
- 25) 小野啓郎, 高岡邦夫, 西塔 進, 大園健二, 仁科哲彦, 清水信幸: 特発性大腿骨頭壊死症の早期病理における血管病変. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班, 昭和60年度研究報告書, 143-147 (1986).
- 26) 小野啓郎, 高岡邦夫, 西塔 進, 大園健二: 大腿骨頭壊死症の早期病理. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班, 昭和62年度研究報告書, 121-126 (1988).
- 27) 大内郁夫, 船山完一, 安倍吉則, 若松英吉: 特発性大腿骨頭壊死の血管病変に関する病理組織学的研究. *臨整外*, 17, 551-556 (1982).
- 28) 大園健二: Microangiography からみた特発性大腿骨頭壊死の病態. *Orthopaedics*, 8, 15-21 (1988).
- 29) Saito, S., Inoue, A. & Ono, K.: Intramedullary haemorrhage as a possible cause of avascular necrosis of the femoral head: The histology of 16 femoral heads at the silent stage. *J. Bone Joint. Surg.*, 69-B, 346-351 (1987).
- 30) 杉岡洋一: 大腿骨頭特発性壊死の病態と治療. *日整会誌*, 50, 1173-1192 (1976).
- 31) 井上明生, 木下 斎, 大川孝浩, 杉山 治, 吉田和博, 樋口富士男: ステロイド性大腿骨頭壊死に関する実験的研究 (第2報). 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班, 昭和63年度研究報告書, 39-43 (1989).
- 32) 小泉富美朝, 深瀬真之: プレドニン投与実験における血管および筋肉病変. *医学のあゆみ*, 123, 53-61 (1982).
- 33) Nashelsky, G. M. & Smyth, C. J.: Subcutaneous haemorrhages in rheumatoid patients treated with prednisone. *Ann. Rheum. Dis.*, 17, 76-82 (1958).
- 34) Lorenzen, I. & Hansen, L. K.: Effect of glucocorticoids on human vascular connective tissue. *Vasc. Dis.*, 4, 335-341 (1967).
- 35) 小野啓郎, 高岡邦夫, 大園健二, 西塔 進, 仁科哲彦, 清水信幸: microvenogram から見た特発性大腿骨頭壊死症. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班, 昭和62年度研究報告書, 53-56 (1988).
- 36) 小池 龍, 須磨久善, 奥 孝彦, 佐藤晴端, 澤田吉英, 武内敦郎: ステロイド療法を要する狭心症例に対する冠血行再建術の経験. *日胸外会誌*, 38, 2314-2319 (1990).
- 37) Oxlund, H.: Changes in connective tissues during corticotrophin and corticosteroid treatment. *Dan. Med. Bull.*, 31, 187-206 (1984).
- 38) Manthorpe, R., Garbarsch, C. & Lorenzen, I.: Glucocorticoid effect on repair processes in vascular connective tissue. *Acta Endocr.*, 80, 380-397 (1975).
- 39) Watanabe, T., Hirata, M., Yoshikawa, Y., Nagafuchi, Y., Toyoshima, H. & Watanabe, T.: Role of macrophages in atherosclerosis. *Lab. Invest.*, 53, 80-90 (1985).
- 40) Gown, A. M., Tsukada, T. & Ross, R.: Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.*, 125, 191-207 (1986).
- 41) Tsukada, T., Tejima, T., Amano, J., Suzuki, A. & Numano, F.: Immunocytochemical investigation of atherosclerotic changes observed in aortocoronary bypass vein grafts using monoclonal antibodies. *Exp. Mol. Pathol.*, 48, 193-205 (1988).
- 42) Numano, F., Tsukada, T., Amano, J. & Suzuki, A.: Experimental studies on vein graft atherosclerosis (I) histochemical studies using monoclonal antibodies for smooth muscle cells and macrophages. *Jpn. Circ. J.*, 54, 1398-1406 (1990).
- 43) McCullagh, K. A. & Balian, G.: Collagen characterization and cell transformation in human atherosclerosis. *Nature*, 258, 73-75 (1975).
- 44) Ooshima, A. & Muragaki, Y.: Collagen metabolism in atherogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 598, 582-584 (1990).
- 45) 大島 章: 量的にコラーゲン代謝異常を考える. *Mebio*, 8, 46-50 (1991).
- 46) Caterina, R. & Weksler, B. B.: Modulation of arachidonic acid metabolism in human endothelial cells by glucocorticoids. *Thromb. Haemos.*, 55, 369-374 (1986).
- 47) van Giezen, J. J. J. & Jansen, J. W. C. M.: Correlation of in vitro and in vivo decreased fibrinolytic activity caused by dexamethasone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 667, 199-201 (1992).
- 48) 森下剛久, 平野正美: 動脈硬化と血液凝固. *現代医療*, 14, 135-141 (1982).
- 49) 松本忠美, 柳瀬茂樹, 西村立也, 西野 暢, 中村琢哉, 藤井秀人: ステロイド投与家兎の大腿骨頭に対する末梢血流改善剤の効果 (第2報). 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班, 平成5年度研究報告書, 95-97 (1994).

Histopathological Study of Veins in Steroid-Treated Rabbits Tatsuya Nishimura, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **104**, 121—131 (1995)

Key words avascular necrosis, femoral head, steroid, vein

Abstract

Steroids are one of the causal factors of avascular necrosis of the femoral head, although the mechanisms are unclear. In recent years, more attention has been paid to the venous factors because steroid treatment brings about an increase in the intraosseous pressure in spite of a decrease in the blood flow in the femoral head. To clarify the pathogenesis of avascular necrosis of the femoral head, the present study was performed to examine the changes in the veins of steroid-treated rabbits. Forty adult rabbits were used: 30 rabbits (the steroid-treated group) were injected with methylprednisolone acetate (4 mg/kg) weekly, while 10 rabbits, as the control group, were treated without steroids. The veins around the femoral head, ear veins, femoral veins, and inferior vena cava were obtained 8 weeks after the treatment, and were examined by immunohistochemical staining and electron microscopy. In the steroid-treated group, proliferation of foamy cells was observed in the intima of the vein in seven of 30 rabbits. Immunohistochemical studies, using monoclonal antibodies for smooth muscle cells and macrophages, demonstrated that the foamy cells were mainly derived from smooth muscle cells in the tunica media. Indirect immunofluorescence studies, using monoclonal antibodies for type I, III, and V collagen, showed an increase of type V collagen in the intima of the vein. Scanning electron micrography showed that the endothelial surface of the vein was uneven. Transmission electron micrography showed degeneration of the myofilaments in smooth muscle cells and vacuoles in endothelial cells. These results indicated that steroids damaged not only the arterial system but also the venous system. It is suggested that steroid-induced disturbance of draining veins causes stasis and increases intraosseous pressure of the femoral head and that steroids are one of the important factors responsible for avascular necrosis of the femoral head.