

「大腿骨頭壊死症の病態の解明における高血圧自然発症ラット及び高脂血症ラットモデルでの解析」

長崎大学医学部整形外科

熊谷謙治

はじめに本研究に助成金をいただき、またこのような発表の場を設けていただいた伊丹先生に深謝いたします。

我々は高血圧自然発症ラット(以下SHRと略)を使用して大腿骨頭壊死を研究しています。

SHRは青木と岡本等により高血圧を呈したウイスター京都ラットを継代近親交配し、純系化された本態性高血圧症のモデルで心血管系、自律神経系、腎機能、免疫系などの異常も存在します。更に脳卒中を発生しやすい亜系である易卒中高血圧自然発症ラット(以下SHRSPと略)も分離されています。

本教室のHiranoらはこのSHRの大腿骨頭に無腐性壊死、骨化障害が起きることに着目し、荷重ストレス、血管の走行などの観点から1988年より調査、研究を行っています¹⁾。その研究によると雄ラットに好発し、15週齢から20週齢にかけてみられ、その頻度は雄ラットで約40から50%で、壊死は繰り返さず一度のみでまた修復機転が働いていることが判っています。また生殖年齢に着目するとラットの15週齢から20週齢は人間の20から40歳に相当します。一度しか壊死が生じず、修復機転が働いていることや発生年齢は大腿骨頭壊死の臨床的特徴に類似しています。またSHR内には純系化された亜系も多種存在しその間で発生頻度に差があるようで最近の我々の研究から特にSHRSPにその頻度が高く、またその壊死像も典型的であるとおもわ

れます^{3, 5)}。

大腿骨頭壊死の実験モデルとして使用される動物をmedlineで検索するとブタ、犬、ニワトリ、ウサギ、ラットの約70件の文献がヒットしてきます。実験方法としては、ステロイドホルモンの薬物負荷、外科的に血行遮断がみられます。ラットにおいては血行遮断の報告はみられますがステロイドホルモンの負荷は成功していないようです。

一方厚生労働省の特定疾患班研究では大腿骨頭壊死とステロイドホルモンやアルコールとの因果関係が主に疫学的調査から解明されつつあります⁶⁾。ウサギなどの大腿骨頭壊死実験ではステロイドホルモン投与による高脂血症の関与が報告されています⁴⁾。一方、ラットは高脂血症を呈しにくい動物ですが他の動物に比較して純系で実験条件が均一化しやすく病因を解析することに適していると思われます。故にラットで高脂血症のモデルを樹立し大腿骨頭壊死の研究をすることは有意義と考えます。ラットでの高脂血症作成はIkeda等がSHRSPに心筋梗塞を作成した方法を応用しました²⁾。一酸化窒素合成酵素阻害剤(NOSinhibitor)と高コレステロール食を与えることで酸化コレステロールが作成されそれが血管壁に作用し取り込まれ動脈硬化や高脂血症を来すと考えられる為です。

以上から実験①を行い、実験方法の修正をして②を行いました。

実験①

【材料 & 方法】

ラットは Charles River Japan 社から購入した SHR ラット (SHR/Ncrj)、SHR 等疾患モデル共同研究会 (SHR ラット共同研) から購入した SHR/SP イズモラット (SHRSP/Izm) を使用し、8 から 15 週齢で種々の実験群を設定し L-NNA (NG-nitro-L-arginine) 含有高コレステロール食 (以下 HFC 固形飼料と略) (表 1) を約 2 週間与え、一部の群 (A、B) では食塩水添加しました。屠殺後、生化学検査、標本採取観察を計画しました (図 1)。

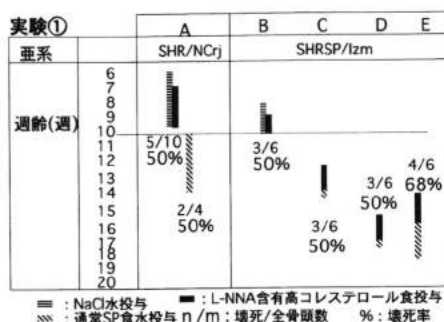


図 1 実験①の計画および結果

ラットは SHR/Ncrj、SHRSP/Izm を使用し、8 から 15 週齢で A から E の実験群を設定し L-NNA (NG-nitro-L-arginine) 含有高コレステロール食を約 2 週間与え、一部の群 (A、B) では食塩水添加しました。

結果

大腿骨頭の壊死の頻度は各群概ね 50% でやや E 群が 68% と高いようでした。また SHR/Ncrj では壊死自然発生頻度の低い 10 週齢でその頻度は上昇傾向がみられました。このことは NOS はかなり若い時期に末梢循環の何らかの key enzyme と成っていると思われま

表 1 L-NNA 含有高コレステロール食 (HFC 固形飼料) の組成

L-NNA 含有高コレステロール食 (HFC 固形飼料) :	
SP 飼料	68%
コレステロール	5%
コール酸	2%
牛脂粉末	25%
L-NNA	0.023%

飼育は長崎大学医学部附属動物実験施設で通常ラットケージを使用し、定期的観察し各週に血圧、体重を検量しました。

【結果】

体重と血圧について:HFC 固形飼料を与える増加傾向はみられなく、特に食塩水負荷群では 2 週間で瀕死の状態まで陥っていました。即ち心臓では心筋に空胞形成、冠動脈は閉塞し、腎臓や肝臓は脂肪変性し肺は無気肺を呈していました (図 2)。血液生化学検査では総コレステロール値トリグリセライド値が著明に上昇し高脂血症を呈し、電解質の異常も呈していました (表 2)。

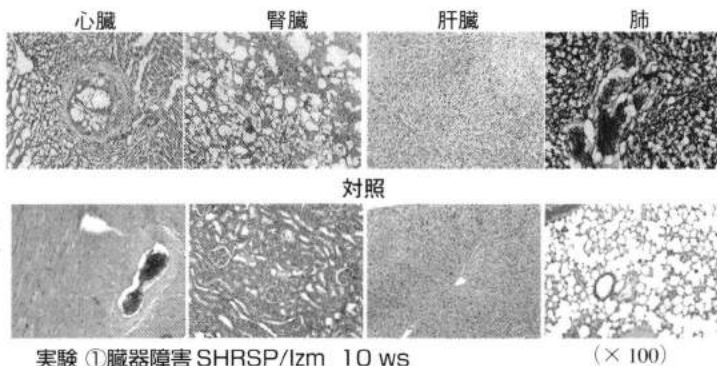
大腿骨頭の壊死の頻度は各群概ね 50% でやや E 群が 68% と高いようです (図 1)。

大腿骨頭血管の光顕観察 (H&E 染色) では NOS inhibitor 投与による影響は見出せませんでした。

この実験での大腿骨頭の壊死の頻度は各群概ね 50% でやや高いですが実験の基本が心筋梗塞発生に設定されており、HFC 固形飼料を

図 2 実験①臓器障害 SHRSP/Izm 10 週齢

心臓では心筋に空胞形成、冠動脈は閉塞し、腎臓や肝臓は脂肪変性し肺は無気肺を呈していました。



実験①臓器障害 SHRSP/Izm 10 ws

(× 100)

表2 実験① Labo-data

垂種	group		n	週齢			T-CHO	TG	Na	K	Cl
				開始	終了	屠殺					
SHR/Ncrj	A		3	6	10	10	230.3	62.3	187.6	4.2	86.7
SHRSP/Izm	B		1	8	10	10	126		148	3.9	107
	C		2	12	14	15	700	124	151	7.5	86.5
	E		3	14	16	19	123.3	117	141.3	5.4	95

正常値	週齢	T-CHO	TG
SHRSP/Izm	8	70.4 ± 2.7	40.2 ± 3.9
	10	66.8 ± 4.1	47.6 ± 1.8
SHR/Izm	8	75.4 ± 5.5	36.8 ± 4.9
	10	64.8 ± 3.9	34.4 ± 4.7

実験① 血液生化学検査
 総コレステロール値やトリグリセライド値が著明に上昇し高脂血症を呈し、電解質の異常も呈していました。

与えると特に食塩水負荷群では2週間で瀕死の状態まで陥っています。使用した薬物のNOS inhibitorであるL-NNAの特に濃度が0.023%は高濃度ではないか?投与時期?投与方法?などの疑問に検討の余地がありそうです。

追加実験の際には再現性、安全性を考慮してHFC固形飼料とSP食(通常のSHRSP飼料)を等量混ぜたものを2週間与えることにしました。またラットの週齢、垂系の選択に関しては私どもが以前行った大腿骨頭壊死のモデルとしてSHRを使用する際の至適条件(発生時期、発生頻度、典型的壊死像検出)検索で、SHRSP/Izmの17週齢が大腿骨頭壊死のモデルとして至適と考えられたことから実験②を行いました³⁾。

実験②

【材料&方法】

ラットはSHRラット共同研から購入した6匹のSHR/SPイズモラット(SHRSP/Izm)を使用し、15週齢から2週間HFC固形飼料とSP食を等量混合したものを2週間を与え、対照として3匹の同じ週齢のSHR/SPにSP食のみを2週間を与えました。

飼育法や屠殺後、生化学検査、標本採取観察は実験①と同様です。

【結果】

体重と血圧について:HFC固形飼料とSP食を等量混合したものを与えると増加傾向がみられ、(図3)。血液生化学検査では総コレステロール値やトリグリセライド値が対照群の倍値に上昇し高脂血症を呈しましたが、電解質は正常でした(図4)。

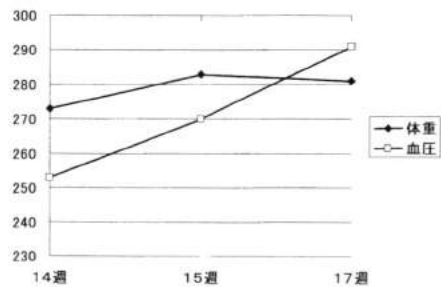
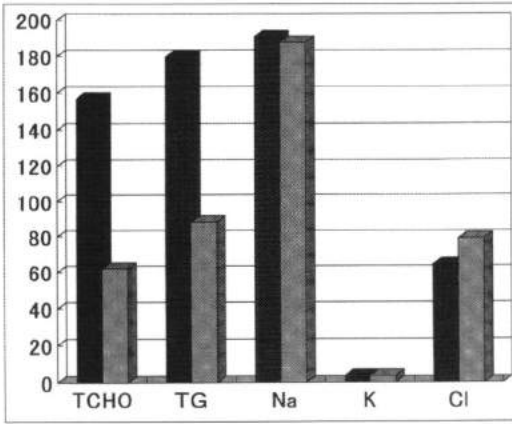


図3 実験② 体重と血圧の推移

実験①と異なり、増加傾向がみられた。



実験② Labo-data

大腿骨頭の壊死の頻度は実験数が少ない為か対照群が0%に比して75%でした(表3、図5)。

大腿骨頭血管の光顕観察(H&E染色)ではNOS inhibitor投与による影響は見出せませんでしたが大腿骨頭骨端の骨髓腔の脂肪細胞に着目すると若干膨化していました。

図4 実験①
血液生化学検査

総コレステロール値やトリグリセライド値が対象群の倍値に上昇し高脂血症を呈しましたが、電解質は正常でした。

表3 実験②計画及び結果

ラットは6匹のSHRSP/1zmを使用し、15週齢から2週間HFC固形飼料とSP食を等量混合したものを2週間与え、対照として3匹の同じ週齢のSHR/SPにSP食のみを2週間与えました。

結果

大腿骨頭の壊死の頻度は対照群が0%に比して75%でした。

実験② (♂ SHRSP/1zm)

		週齢 (Wks)		壊死率 %
		15	17	
HFC食+SP食投与群	壊死骨頭数	9	×	75
	対象総骨頭数	12		
対照 (SP食のみ)	壊死骨頭数	0	×	0
	対象総骨頭数	6		

× : sacrificed

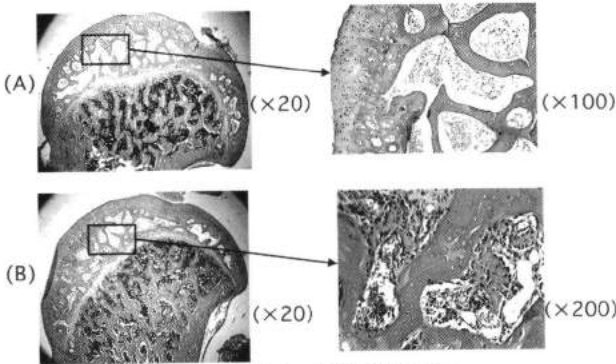


図5 実験② 組織学的所見

(A): 早期大腿骨頭壊死例

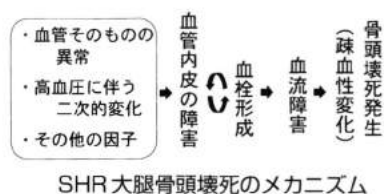
epiphysisに骨髓脂肪壊死と骨髓の不完全壊死がみられ修復機転がはたらいてなく、また骨細胞の壊死がない早期壊死と思われる所見がみられます。

(B): 修復期大腿骨頭壊死例

骨梁の骨細胞に広範にわたって壊死がみられますが、骨髓腔には肉芽形成や appositional bone formationがみられます。

【考察】

大腿骨頭の無腐性壊死のメカニズムとしての疎血性変化の原因に血液凝固系の異常、血管およびその内皮の異常が最も考えられます。血管内皮に注目してみますと内皮が傷害されると血栓をつくり、また血栓が生じれば血管内皮が傷害されるという悪循環が想定されます(図6)。



SHR大腿骨頭壊死のメカニズム

図6 SHR大腿骨頭壊死の原因の基本的考え方

またNOは血管内皮細胞内のNOSで産生され血管平滑筋に作用し、主に血管拡張作用を有しているといわれています。

そこでNOS inhibitor投与でNO産生を阻害すれば大腿骨頭壊死発生に於ける血管内皮およびNOの関与が強調されるはずです。

また酸性コレステロールの存在下でNO産生を阻害すれば高脂血症、動脈硬化を呈することも知られています。

高脂血症は家兎にステロイドを投与し作成された大腿骨頭壊死モデルに於いてその壊死に対する関与の報告がみられます⁴⁾。

実験①でSHR/NCrjでは壊死自然発生頻度の低い10週齢でその頻度は上昇傾向がみられました。このことはNOSはかなり若い時期に末梢循環の何らかのkey enzymeと成っていると思われる。

今回大腿骨頭血管の光顕観察(H&E染色)ではNOS inhibitor投与による影響は見出せませんでした。eNOS iNOS それに関連するendothelin I, II等の免疫組織化学検索を行えば何らかの差異が見出せるかとおもわれま

す。

今回の実験②でSHRSP/Izmの大腿骨頭壊死とNOS inhibitor、高コレステロール食の因果関係があるという仮定に沿った好成績が得られましたが6匹と実験数が少なく追加実験を行わなくてはなりません。感染症のためにSHRラット共同研からSHRSP/Izmを購入できなく、残念ながら追加実験が滞っています。

今後実験数の増加、餌の改良を行う予定です。

また、現在ステロイドホルモン負荷実験も並行して行っており、これらで壊死発生頻度の向上が得られましたら、次にワーファリンやビタミンEで予防、治療に関する実験を考えております。

今回の研究奨励金及び発表内容の一部は以下の学会で使用、発表させていただきました。

第28回日本リウマチ・関節外科学会

(平成12年10月21日岡山市)

第37回SHR学会

(平成13年10月6日長崎市)

第10回国際SHR学会

(2000年5月2~4日ドイツ国ベルリンブッフ市)

本研究にあたり、共同研究者の和田政浩医師、鈴木暢彦医師、村田雅和医師および研究の指導、助言を戴きました進藤裕幸教授、丹羽正美教授に感謝致します。

【まとめ】

- ・SHRにNOS inhibitor含有高コレステロール食を投与し大腿骨頭壊死の動態を観察しました。
- ・実験数が少ないですがSHRSP/Izmにおいて高頻度の壊死発生がみられ、血管内皮細胞、NOSや高脂血症、更に動脈硬化の壊死への関与が示唆されました。

【参考文献】

- 1) Hirano, T., Iwasaki, K. and Yamane Y. : Osteonecrosis of the Femoral Head of Growing Spontaneously Hypertensive Rats. *Acta Orthop.* 59:530-535 1988.
- 2) Ikeda .K.: Nitric Oxide Deficiency Induces Myocardial Infarction in Hypercholesterolaemic Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 24. 0344-348, 1997.
- 3) Kenji kumagai, Masahiro Wada, Masahiko Suzuki, Masami Niwa, Hiroyuki Shindo: Osteonecrosis of the Femoral Head in Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). *Clinical and experimental hypertension* 23(5). 408, 2001.
- 4) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. : A High Low-density Lipoprotein Cholesterol to High-density Lipoprotein Cholesterol Ratio as a Potential Risk Factor for Corticosteroid-induced Osteonecrosis in Rabbits. *Rheumatology* 40(2):196-201 ,2001.
- 5) Naito S et al.: Femoral Head Necrosis and Osteopenia in Stroke-prone Spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). *Bone*, 14(5). 745-753, 1993
- 6) 田中隆、山本博司、廣田良夫 竹下節子：特発性大腿骨頭壊死症定点モニタリングー 4 年間の集計報告。厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成 12 年度研究報告書 . 1 ~ 4

以上です。

伊丹 どうもありがとうございました。さらなるご研究を祈念しております。