

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20010

研究課題名(和文)ステロイド性骨壊死予防の臨床応用可能な条件の確立-高磁場MRIの定量評価を用いて

研究課題名(英文) Establishment of clinically applicable conditions for prevention of steroid induced osteonecrosis using quantitative evaluation by higher-resolution MRI

研究代表者

石田 雅史 (Ishida, Masashi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40725660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は電気刺激が家兔ステロイド性骨壊死モデルの大腿骨内血流に与える影響をDCE-MRIを用いて評価することである。家兔7羽を対照群とし、他の7羽は電気刺激を与える電気刺激(ES)群とした。DCE-MRIはステロイド投与前、投与前直前、投与後1、5、10、14日に両大腿骨近位を撮像した。骨内血流の3パラメーターER、IS、AUCを算出した。対照群では、全てのパラメーターでステロイド投与後最小値が投与前に比べ有意に低下したが、ES群では有意な変化は無かった。対照群で3本の大腿骨で骨壊死を認めES群では認めなかった。電気刺激はステロイド性大腿骨頭壊死症の発生予防に有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate femoral perfusion using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) in a steroid-induced osteonecrosis (ON) model. Seven rabbits underwent electrical stimulation (ES) (ES group), and seven rabbits did not (control group). DCE-MRI was performed before steroid and 1, 5, 10, and 14 days after steroid. The enhancement ratio, initial slope, and area under the curve were analyzed. These parameters were evaluated after steroid administration in each group and between the two groups, and the ratios of ON in both groups were compared. In the control group, the minimum values of all parameters decreased significantly after steroid administration ($P < 0.05$), but in the ES group, the parameters did not decrease. In the control group, ON was detected in three of five rabbits. In the ES group, ON was not detected. These results suggest that increased femoral blood flow elicited by ES may be related to ON prevention after steroid administration.

研究分野：特発性大腿骨頭壊死症

キーワード：特発性大腿骨頭壊死症 MRI 電気刺激

1. 研究開始当初の背景

ステロイド性大腿骨頭壊死症 (steroid induced osteonecrosis of the femoral head, steroid-induced ONFH)は阻血性壊死を生じた骨頭が圧潰し、股関節機能が失われる難治性疾患である。確立された保存療法はなく、手術療法の侵襲や長期成績には課題がある。基礎疾患の治療に伴う医原性疾患の側面もあるため、予防法の確立は患者の望みであると同時に医療者の責務である。

ステロイド性大腿骨頭壊死症はステロイド投与後早期の骨内虚血が主な原因である。ステロイドは血管内皮細胞障害、血管内圧上昇、血管新生抑制作用を持つ。大腿骨頭壊死症早期の選択的血管造影で大腿骨頭の栄養血管の途絶が確認されている。ステロイド投与後2週間以内には骨頭壊死の原因が生じている。dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI)を用いた研究で、家兎ステロイド骨壊死モデルにおいてステロイド投与後5日目には大腿骨内の血流が減少し始めることが報告されている。ステロイド投与後3-5日で骨髄の細胞内に vascular endothelial growth factor (VEGF)が発現している。これらの結果は、骨内虚血がステロイド投与後2週間以内に起こっていることを示唆している。骨壊死初回発生後の壊死領域拡大や壊死再発の割合は0.3%と極めて少なく、ステロイド投与開始12週以上経過してから新たに壊死発生することは無い。発生時期が特定できるため、予防法が確立できればその特定期間に予防処置を講じることで効率的に壊死を予防できる。ステロイド性大腿骨頭壊死の予防には、ステロイド投与2週間以内の血流低下を抑制する必要があると考えた。

骨内の循環動態を改善しうる方法として、電気刺激がある。電気刺激には軟部組織において血管を拡張させ、VEGFやFGF-2などの血管新生因子の発現を増加させて血管新生を促進し、血流を増加させる作用が報告されている。電気刺激はステロイド投与後の骨内血流低下を抑制し骨壊死の発生を予防できる可能性があると考えた。しかし、電気刺激後の大腿骨内血流を実際に測定した研究は報告されていない。

組織内の血流評価の方法としてDCE-MRIが広く使用されており、同一個体内において経時的に、ステロイド投与後の骨内血流の半定量的な評価をすることが可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ステロイド投与と同時に開始した電気刺激が大腿骨内血流動態に与える影響をDCE-MRIを用いて評価し、骨壊死の予防に有用かを検討することである。

3. 研究の方法

・対象

28週齢以上の3-4kgの体重の日本白色家兎を使用し(Oriental BioService, Kyoto,

Japan)1匹毎1ゲージで飼育した。京都府立医科大学の中央動物飼育室で飼育し(Kyoto, Japan)、適切な補助栄養剤の含んだ食料と清潔な水を毎日与えた。本研究は京都府立医科大学の動物倫理委員会のガイドラインに従って施行された。

・方法

家兎ステロイド関連特発性大腿骨頭壊死症モデルは、メチルプレドニゾロン(methylprednisolone; MPSSL) (20 mg/kg body mass)を単筋肉注射することで作成し、本研究では14羽の家兎骨壊死モデルを使用した。過去の報告では、この家兎ステロイド関連骨壊死のモデルは、およそ70%の大腿骨壊死発生頻度を有する。7羽は電気刺激群として、電気刺激を投与した。他の7羽は対照群として、電気刺激は与えなかった。電気刺激はOrthoPak Non-invasive Bone Growth Stimulator System(Biomet Osteobiologics, Parsippany, NJ, USA)によって電流(出力波形: 正弦波, 出力周波数: 60kHz, 出力電圧: 6.8 V, 出力電流: 10mA)を発生する。両大腿部に電極パッド(直径30mm)を設置し、経皮的に投与した。電気刺激は、ステロイド投与と同時に開始しステロイド投与後2週間投与した。投与時間は、同様の血管拡張と血管新生効果のある電磁場刺激でステロイド投与後の骨内血流低下抑制と壊死予防効果の認められた1日10時間とした。全ての家兎は動物用檻で飼育した。電気刺激を投与している間は、家兎は自由に水と食料を摂取できるようにした。

・DCE-MRI 撮像方法

装置は7.04Tの横置き型動物用MRI装置を使用した。MRIにおける撮像範囲は両大腿骨の近位半分までとし、ステロイド投与前、ステロイド投与後1, 5, 10, 14日目に行った。家兎に対する麻酔はイソフルレン(2.5L/min)の吸入麻酔で行った。耳介静脈にプラスチック製の留置針を設置した。家兎はコイル内に腹臥位で設置した。

グラディエントエコー法(TR/TE = 18/3ms, flip angle = 20°)で3.4秒ごとに40回連続撮像した。撮像条件は以下の通りである: slice thickness, 2 mm; imaging matrix, 128x128; and square field of view, 50 mm. Acquisition time was 2.3s per image and the interval between acquisitions was 1.1s. 40回撮像中10回目の撮像時に、耳介静脈から0.2 mmol/kgの造影剤 gadopentetate dimeglumine (Gd-DTPA, Magnevist®, Schering, Berlin, Germany)を急速静注した後、5mlの生理食塩水を静脈注入した。10回目の撮像時に造影剤投与した後、引き続いて30回連続で撮像した。その30回のうち初めの15回は組織内に造影剤が流入する造影効果が上昇していく相であり、後の15回は造影効果が組織内で一定量となった定常状態の相であった。撮像時間の合計は136秒であった。

・DCE-MRI データの解析方法

家兎における大腿骨内の骨壊死の好発部位は近位骨幹端部から近位の骨幹部である。両大腿骨の骨壊死好発部位に関心領域 (region of interest: ROI) を設定した。その ROI 中の信号強度 (signal intensity, SI) を測定した。

造影剤投与前の 10 回の SI の平均値 (preSI) を算出した。造影前後を含めた全 40 回の撮像で得られたそれぞれの両大腿骨の SI を preSI で除算し、relative intensity (RI) を算出した。時間 t の RI を RI(t) とあらわす。RI(t) を経時的にプロットして、両大腿骨の RI(t) の time signal intensity curve を作成した (Fig. 3)。作成した time signal intensity curve を造影剤投与前の 10 回の a 相、造影剤投与直後の RI が増加する時期の 15 回の b 相、および造影剤投与後定常状態に達した段階の 15 回の c 相に分類した。DCE-MRI を用いた血流評価は、パラメーターが血流速度、血管容積、微小血管の透過性、細胞・血管外容積などの様々な影響を受けるため、複数のパラメーターに基づいて包括的に行う必要がある。本研究では、以下の 3 つのパラメーターによって骨内血流を評価した。

・ Enhancement ratio (ER) の算出

造影剤投与後定常状態に達した c 相の 15 回の RI(t) の平均値を造影剤投与前 a 相の 10 回の RI(t) の平均値 (すなわち preSI) で除算することで ER を算出した。

・ Initial slope (IS) の算出

IS は造影剤投与後の signal intensity curve の傾きと定義した。

a 相の SI 平均 (preSI) と比較して SI の有意な上昇が始まる時期から、直前の SI と比較しての有意な上昇が終わる時期までのグラフの傾きとした。本研究では t=34 秒から t=61.2 秒までの 20.4 秒間であった。

$$\text{Initial slope} = (\text{RI}(61.2) - \text{RI}(34)) / 20.4$$
 の計算式で算出した。 [Karahaliou et al., 2010]

・ Area under the curve (AUC) の算出

AUC は b 相の RI(t) の値の総和として算出した。

・パラメーターの評価

ER, IS および AUC について以下のように評価した。各群内で、各撮像日の値をステロイド投与前の値と比較した。各撮像日における値を両群間で比較した。各群内で、各大腿骨におけるステロイド投与後 2 週間以内の最小値をステロイド投与前の値と比較した。両群において、最小値をとった大腿骨数の割合を撮影日ごとに算出した。

・組織学的評価

ステロイド投与後 28 日後に、腹腔内にペントバルビタールを投与して犠牲死とした。両大腿骨を半割して近位半分の組織学的評価を行った。両大腿骨を 10% ホルマリンで固定して 1 週間後に 10% EDTA で 5 週間脱灰した。

脱灰後、大腿骨をパラフィン包埋した。HE 染色標本を 1 大腿骨当たり冠状断の 3 枚作製した。骨壊死は、骨梁の骨細胞の empty lacunae (骨小腔) と核濃縮または骨髓内の造血細胞と脂肪細胞のびまん性壊死が存在するものと定義した。3 枚中 1 枚でも骨壊死の所見がある大腿骨は壊死ありと判定した。

・統計

すべてのデータは平均値 [第 1-第 2 四分位数] で示した。各群内において、ER, IS および AUC の各撮像日の値および最小値を、ステロイド投与前と比較するために Wilcoxon signed-ranks test を用いて解析した。両群間において、各撮像日における ER, IS および AUC それぞれの値について Mann-Whitney U test で比較した。両群間の骨壊死発生率は 2 for independence test で比較した。P < 0.05 を有意な値と判断した。

4. 研究成果

・大腿骨近位の ER の値の変化

対照群では 14 日間通じて ER の有意な変化は無かったが、電気刺激群では電気刺激前と比べてステロイド投与後 5, 10, 14 日目で有意に上昇した (day 5, 10, 14; P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01)。各撮像日の比較では、ステロイド投与後 14 日目で電気刺激群が対照群よりも有意に高値であった (P < 0.01)。対照群では、ER のステロイド投与後最小値が投与前と比較して有意に低下していた (1.32 [1.29-1.35] vs. 1.37 [1.34-1.41], P < 0.05)。しかし、電気刺激群では、ER のステロイド投与後最小値は、投与前と有意差は認めなかった (1.32 [1.27-1.38] vs. 1.30 [1.26-1.38], P=0.88)。対照群で ER が最小値となったのは、ステロイド投与後 1 日目で 14 大腿骨中 5 本 (37%), 5 日目で 6 本 (43%), 10 日目で 3 本 (21%), 14 日目で 0 本 (0%) であった。電気刺激群で ER が最小値となったのは、ステロイド投与後 1 日目で 14 大腿骨中 10 本 (71%), 5 日目で 4 本 (29%), 10 日目で 0 本 (0%), 14 日目で 0 本 (0%) であった。

・大腿骨近位の IS の値の変化

対照群では 14 日間通じて IS の有意な変化は無かったが、電気刺激群では電気刺激前と比べて、ステロイド投与後 10, 14 日目で有意に上昇した (day 10, 14; P < 0.05, P < 0.01)。各撮像日での比較では、ステロイド投与後 14 日目で電気刺激群が対照群よりも有意に高値であった (P < 0.01)。対照群では、IS のステロイド投与後最小値が投与前と比較して有意に低下していた (0.92×10^{-2} [$0.77 \times 10^{-2} - 1.45 \times 10^{-2}$] vs. 1.74×10^{-2} [$1.37 \times 10^{-2} - 1.87 \times 10^{-2}$], P < 0.01)。しかし、電気刺激群では、IS のステロイド投与後最小値は、投与前と有意差を認めなかった (1.46×10^{-2} [$1.21 \times 10^{-2} - 1.61 \times 10^{-2}$] vs. 1.56×10^{-2} [$1.50 \times 10^{-2} - 1.75 \times 10^{-2}$], P=0.08)。対照群で IS が最小値となったのはステロイド投与後 1 日目で 14 大腿骨中 2 本 (14%), 5 日目

で9本(64%),10日目で1本(7%),14日目で2本(14%)であった。電気刺激群でISが最小値となったのは,ステロイド投与後1日目14大腿骨中5本(36%),5日目7本(50%),10日目2本(14%),14日目0本(0%)であった。

・大腿骨近位のAUCの値の変化

対照群では14日間通じてAUCに有意な変化は無かったが,電気刺激群では電気刺激前と比べてステロイド投与後10,14日目有意に上昇した(day10, 14; $P < 0.05$, $P < 0.01$)。各撮像日の比較では,ステロイド投与後5,14日目電気刺激群が対照群よりも有意に高値であった($P < 0.01$)。対照群では,AUCのステロイド投与後最小値が投与前と比較して有意に低下していた(17.8 [16.8-18.3] vs. 19.3 [18.7-20.1], $P < 0.01$)。しかし,電気刺激群では,AUCのステロイド投与後最小値は,投与前と有意差を認めなかった(18.7 [18.5-19.3] vs. 18.8 [18.2-19.5], $P=0.83$)。対照群でAUCが最少値となったのは,ステロイド投与後1日目14大腿骨中0本(0%),5日目13本(93%),10日目1本(7%),14日目0本(0%)であった。電気刺激群でAUCが最小値となったのは,ステロイド投与後1日目14大腿骨中8本(57%),5日目5本(36%),10日目1本(7%),14日目0本(0%)であった。

・組織学的評価

対照群では3大腿骨(3羽)で骨髓内の造血細胞と脂肪細胞のびまん性壊死を認め,そのうち1大腿骨で骨細胞のempty lacnae(骨小腔)と核濃縮を認めた。ES群では骨髄壊死や骨細胞壊死は認めなかった。

われわれは,家兎ステロイド性骨壊死モデルにステロイド投与と同時に電気刺激を投与し,DCE-MRIを使用して大腿骨内の血流評価を行った。ステロイド投与後の大腿骨内の血流は,対照群では有意に減少していたが,電気刺激群ではステロイド投与後有意な減少は無く,むしろ経時的に増加傾向を示した。組織学的評価では,電気刺激群で骨壊死を認めなかった。本研究結果から,電気刺激はステロイド性大腿骨頭壊死症の発生予防に有望であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Hiroki Yamamoto, Keiichiro Ueshima, Masazumi Saito, Kazuya Ikoma, Masashi Ishida, Tsuyoshi Goto, Shigeki Hayashi, Akira Ikegami, Mikihiro Fujioka, Osam Mazda, Toshikazu Kubo
Evaluation of femoral perfusion using dynamic contrast-enhanced MRI after simultaneous initiation of electrical stimulation and steroid treatment in an

osteonecrosis model

Electromagn Biol Med. 2018;37(2):84-94. doi: 10.1080/15368378.2018.1466310. Epub 2018 Apr 30.

〔学会発表〕(計6件)

山本浩基, 上島圭一郎, 石田雅史, 齊藤正純, 生駒和也, 林 成樹, 池上 徹, 藤岡幹浩, 久保俊一

ステロイド投与と同時に電気刺激を開始した家兎ステロイド性骨壊死モデルにおける大腿骨内の血流評価

日本医療研究開発機構(AMED)研究費 難治性疾患実用化研究事業 平成27年度 第2回班会議, 2015.12.5.大阪市

山本浩基, 上島圭一郎, 石田雅史, 齊藤正純, 生駒和也, 林 成樹, 池上 徹, 藤岡幹浩, 久保俊一

ステロイド投与と同日に電気刺激を開始した家兎ステロイド性骨壊死モデルにおける大腿骨内の血流評価-第2報-

日本医療研究開発機構(AMED)研究費 難治性疾患実用化研究事業 平成28年度 第1回班会議, 2016.8.20.大阪市

山本浩基, 上島圭一郎, 石田雅史, 齊藤正純, 後藤 毅, 生駒和也, 林 成樹, 池上 徹, 藤岡幹浩, 松田 修, 久保俊一

ステロイド投与と同日に電気刺激を開始した家兎ステロイド性骨壊死モデルにおける大腿骨内の血流評価

第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016.10.26.福岡市

山本浩基, 上島圭一郎, 石田雅史, 齊藤正純, 後藤 毅, 生駒和也, 林 成樹, 池上 徹, 藤岡幹浩, 松田 修, 久保俊一

ステロイド投与と同日に電気刺激を開始した家兎ステロイド性骨壊死モデルにおける大腿骨内の血流評価

第44回日本生体電気・物理刺激研究会, 2017.3.11.京都市

Yamamoto H, Keiichiro U, Ikoma K, Ishida M, Saito M, Goto T, Hayashi S, Ikegami A, Fujioka M, Kubo T

Evaluation of Femoral Perfusion using DCE-MRI after Simultaneous Initiation of Electrical Stimulation and Steroid in an Osteonecrosis Model

63th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2016.3.19-22. San Diego, California, USA

Yamamoto H, Keiichiro U, Ikoma K, Ishida M, Goto T, Saito M, Hayashi S, Ikegami A, Fujioka M, Kubo T

Evaluation of Femoral Perfusion using DCE-MRI after Simultaneous Initiation of Electrical Stimulation and Steroid in an Osteonecrosis Model

25th Annual Meeting of the European Orthopaedic Research Society, 2017.9.13-15. Munich, Bayern, Germany

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

出願状況 なし

取得状況 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 雅史 (ISHIDA Masashi)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究員)・講師

研究者番号：40725660

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

生駒 和也 (IKOMA, Kazuya)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究員)・講師

研究者番号：50516044