

論文の内容の要旨

論文題目

24R, 25(OH)₂D₃による骨量増加に関する
組織学的研究

氏名

中村利孝

24R, 25-水酸化ビタミンD₃(24R, 25(OH)₂D)は血清中に存在するビタミンD代謝物の1つであるが、生理的濃度での機能は明らかではない。レセプターは軟骨以外では確認されておらず、ビタミンD欠乏状態の改善には24R, 25(OH)₂D₃は必須ではない。

一方、24R, 25(OH)₂D₃を薬剤として投与すると、骨やその他の組織で効果を発揮するというin vivo, in vitroの研究報告はあり、その効果は1, 25(OH)₂D₃や副甲状腺ホルモンが存在している条件下で最もよく作用が発現されている。また、その効果は大量に投与したときによく表れている。骨に24R, 25(OH)₂D₃の受容体は発見されていないが、これはビタミンD充足状態での、24R, 25(OH)₂D₃の薬理学的効果の存在を否定するものではない。

本研究は正常なビタミンD充足状態のラットに24R, 25(OH)₂D₃を大量に投与して骨量が正常以上に増加することを観察したのが始まりである。次に、24R, 25(OH)₂D₃による骨量増加作用がラットよりも骨代謝回転能の大きいウサギでも発揮されるか否かを検討し、骨量増加の組織学的機序を明らかにした。更に、骨量減少の病態モデルと

して卵巣摘除ビーグル犬を用い24R, 25(OH)₂D₃が骨量減少を防止し、骨粗鬆症の治療薬として使用しうる可能性を明らかにしたものである。

実験Iは24R, 25(OH)₂D₃をビタミンD充足状態のラットに大量投与して、骨量が正常以上に増加するか否かを明らかにするために、6週令のWistar系ラットを用い、2年間に渡る24R, 25(OH)₂D₃投与・飼育実験を行った。ラットは6群に分け、第1群は食飼のみ、第2群は食飼に担体であるglycineを混入させた(control)、第3群は24R, 25(OH)₂D₃ 1 micro-g/kg、第4群は40micro-g/kg、第5群は150 micro-g/kg、第6群は400 micro-g/kgをそれぞれ担体に混ぜて経口投与した。骨塩量の増加は尾椎、大腿骨、脛骨とも用量依存性に増加し、最高投与群(第6群)では正常対照群(第2群)の150%にまで増加していた。大腿骨の長軸方向の骨塩量分布をみると骨端部の海綿骨領域でも骨幹部の皮質骨領域でも同じ程度の骨塩量の増加が見られた。この実験によりビタミンD充足状態のラットに24R, 25(OH)₂D₃を長期間大量に投与すると骨量が増加することが明らかになった。大量投与にもかかわらず高カルシウム血症や腎機能の異常は生じなかった。増加した骨は組織学的には層板骨であり、石灰化障害もなかった。

実験IIは、骨代謝回転能がラットより大きいウサギを対象として24R, 25(OH)₂D₃が骨量を増加させるか否か、更に、破骨細胞と骨芽細胞の変化とBMUを中心とした骨代謝回転が如何に変化するかを明らかにするために行われた。20週令の雄NZWウサギ15匹を5匹ずつ3群に分け、8週間の24R, 25(OH)₂D₃投与・飼育実験を行った。第1群は担体のみ、第2群、第3群はおのおの10micro-g/kg、100micro-g/kgの24R, 25(OH)₂D₃を経口投与した。担体には1%エタノール含有のトリグリセライドを使用した。骨塩量は第3群で著明に増加し、第1群と比べ第6腰椎では34.7% ($p < 0.01$)、第7腰椎では23.0% ($P < 0.05$)、大腿骨では14.5%増加した。骨形態計測の静的指標では、骨量の増加が明らかであった。組織表面では吸収面と破骨細胞数の減少が著明であった。骨形成の指標では類骨面がやや減少した。テトラサイクリンラベルによる動的指標では、全骨表面に対するラベルされた面の割合およびBMUの中での骨石灰化面の割合を表すラベル面の類骨面に対する割合が、第3群では減少していた。しかし、個々の骨芽細胞の機能を表す類骨層幅や石灰化速度は著しく増加した。

この実験で24R,25(OH)₂D₃を大量に投与すると、ウサギでも骨量が増加することが明らかになった。高カルシウム血症や腎機能障害を生じなかったのもラットの場合と同様であった。骨量の増加は腰椎椎体や大腿骨骨端部などの海綿骨領域で有意であった。これは8週間という比較的短期間のために、細胞成分の豊富な海綿骨領域の方が皮質骨に先行して効果があらわれたものと考えられる。破骨細胞の数は減少し骨代謝回転は低下したが、個々のBMUレベルでは骨芽細胞の機能は亢進した。

本実験は大量の24R,25(OH)₂D₃投与が、ウサギでも骨量増加を生じる事を示したばかりでなく、組織学的分析から、24R,25(OH)₂D₃の骨への作用が2つある事を明らかにした点で極めて意義深い。1つは破骨細胞の数の減少作用であり、もう1つは骨芽細胞の機能亢進作用である。これらの作用が同時に生じて、比較的短期間で骨量が増加するものと思われる。

しかし、正常動物で見られた、骨量増加作用が、病態や疾患に対して薬剤として用いられたときに、発揮されるか否かは不明であり、また、極めて大量を使用したときにのみ生じる効果だけでは、ヒトの治療に使用される実現性はうすい。そこで、ヒトの骨粗鬆症に類似した疾患モデルを作成した。

実験IIIは卵巣摘出により骨量減少モデルが出来るか否か、また、卵巣摘出によって障害されるのは骨芽細胞なのか、破骨細胞なのかを明らかにするために、6頭のビーグル犬を用い、30ヶ月の飼育実験をおこなった。実験終了時の腸骨標本ではOVX群では明らかな骨萎縮があった。骨梁の数は減少し、幅は狭小化し、骨梁の断裂があり連続性が消失していた。形態計測では骨量はOVX群ではsham群の55.8%にまで減少していた。テトラサイクリンラベルによる骨芽細胞の石灰化速度は明らかに減少していた。

この実験により犬でも卵巣摘出により骨量が減少することが明らかになった。海綿骨領域に強い骨萎縮を生じ、皮質骨部分は著しい減少を示さなかった。これはヒトの閉経期骨粗鬆症と一致する所見であった。

組織学的観察では骨芽細胞面に変化があった。骨芽細胞面は増加し、BMUあたりに骨芽細胞が占める割合も増加した。破骨細胞の数は増加したが著しいものではなかった。骨量は明らかに減少しているのでこの骨芽細胞面の増加は骨形成の増加につなが

ってはいない。実際、石灰化速度は低下していた。即ち、卵巣摘出では骨芽細胞の機能低下が生じ、これが骨量減少の主因と考えられる。実験IIIは犬も卵巣摘出により骨量が減少し、ヒトの閉経期骨粗鬆症類似の病態が生じる事を明らかにし、更に、卵巣摘出により骨芽細胞の機能低下が生じていることを明らかにした点で、極めて意義深い。今後、estrogenの骨作用を明らかにしていくうえでの一つの指標となりうるものである。

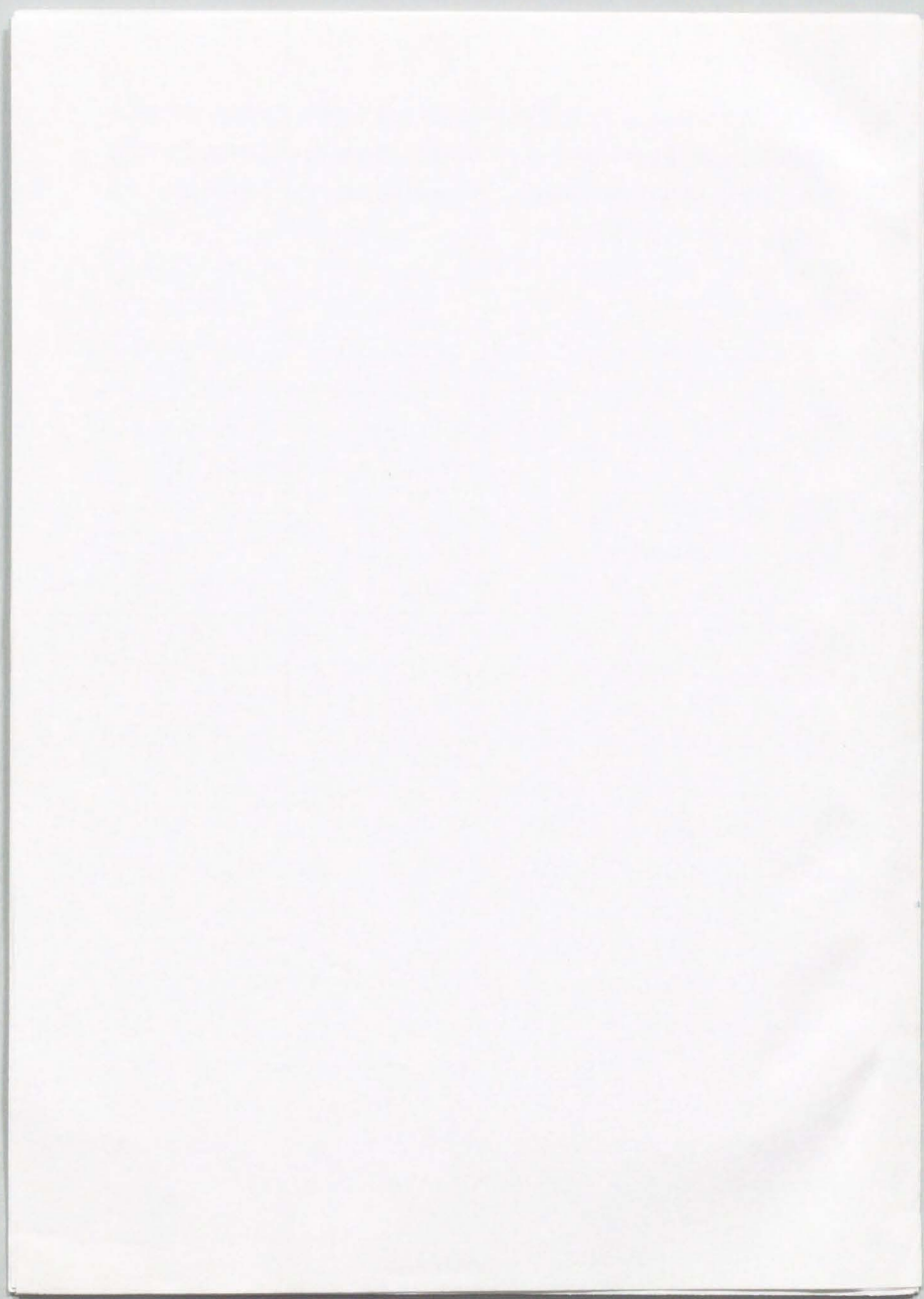
実験IVは24R, 25(OH)₂D₃がこのような病態に効果を発揮し、卵巣摘出後に生じる骨量減少を防止できるか否かを、明らかにするために、14頭のビーグル犬を用いて、30ヵ月の飼育実験を行った。第1群3頭はsham手術群、第2群3頭は卵巣摘出control群である。24R, 25(OH)₂D₃投与群は2つに分け、第3群4頭は卵巣摘出後1ヵ月後より2micro-g/kgを、第4群4頭は1ヵ月後より16ヵ月まで10、その後100micro-g/kgを、連日投与した。

実験終了時の第6腰椎のX線像では第2群には明らかな骨萎縮があった。24R, 25(OH)₂D₃投与群はどちらも明らかに骨量減少が予防されていた。腸骨の形態計測では低投与群も高投与群もsham群と同じ程度に骨量が維持されていた。骨形成、骨吸収の指標は低投与群ではsham群と同じであったが、高投与群では吸収面、形成面とも著しく減少していた。破骨細胞数も高投与群では明らかに減少していた。テトラサイクリンラベル幅はOVX群では狭小化していたが、24R, 25(OH)₂D₃投与群では、低投与群でも高投与群でもsham群と同じ幅を維持した。

低投与群では卵巣摘出によって生じる骨代謝の異常が完全に防止されていた。骨芽細胞の機能不全は生じず、骨形成面と吸収面の比率はsham群と同じであった。高投与群では骨芽細胞の機能は保たれたが、破骨細胞の数は抑制され、骨代謝回転が低下した。実験IIで示された24R, 25(OH)₂D₃の正常動物の骨の細胞に対する作用は2つとも卵巣摘出による骨粗鬆症モデルでも発揮されていた。

本研究によってビタミンD₃の代謝物の一つである24R, 25(OH)₂D₃に骨量増加作用があり、その組織学的機序は破骨細胞の数を減少させるとともに、骨芽細胞の機能をも増加させることがあきらかとなった。更に、骨芽細胞の機能不全による骨粗鬆症モデルである卵巣摘出ビーグル犬で、骨代謝異常を完全に正常化させ、骨萎縮の出現を

防止しうる事が明らかとなった。24R, 25(OH)₂D₃ の骨芽細胞の機能亢進と破骨細胞の抑制作用とでは、発現時の投与量に差があるので、作用機序がそれぞれ異なっている可能性がある。今後、これらの細胞レベルでの機序の解明には、それぞれ異なった実験系が必要であろう。



論文題目

24 R, 25(OH)₂D₃による骨量増加に関する組織学的研究

氏名

中村利孝

②

論文題目

24R, 25(OH)₂D₃ による骨量増加に関する組織学的研究

氏名

中村利孝

I. 緒言

II. 24R, 25(OH)₂D₃ の骨量増加作用

—実験 I—

- ・ 目的
- ・ 対象及び方法
- ・ 結果
- ・ 考察

III. 骨リモデリング

- ・ 骨リモデリング単位 (BMU)
- ・ 実験動物による骨の相違

IV. 24R, 25(OH)₂D₃ の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用

—実験 II—

- ・ 目的
- ・ 対象及び方法
- ・ 結果
- ・ 考察

V. 骨粗鬆症モデルの確立

—実験 III—

- ・ 目的
- ・ 対象及び方法
- ・ 結果
- ・ 考察

IV. 24R, 25(OH)₂D₃の骨粗鬆症モデルに対する効果

— 実験 IV —

- ・ 目的
- ・ 対象及び方法
- ・ 結果
- ・ 考察

VII. 結論

（要約）24R, 25(OH)₂D₃の効果を骨粗鬆症モデルに対する効果として検討する。骨粗鬆症モデルは、骨密度が低下し、骨質が脆化する。24R, 25(OH)₂D₃は、骨密度を増加させ、骨質を強化する効果を示した。また、24R, 25(OH)₂D₃は、骨粗鬆症モデルの進行を遅延させる効果を示した。以上の結果から、24R, 25(OH)₂D₃は、骨粗鬆症モデルに対する効果的な治療薬であると結論づけられる。

（本論文の要約）24R, 25(OH)₂D₃の効果を骨粗鬆症モデルに対する効果として検討する。骨粗鬆症モデルは、骨密度が低下し、骨質が脆化する。24R, 25(OH)₂D₃は、骨密度を増加させ、骨質を強化する効果を示した。また、24R, 25(OH)₂D₃は、骨粗鬆症モデルの進行を遅延させる効果を示した。以上の結果から、24R, 25(OH)₂D₃は、骨粗鬆症モデルに対する効果的な治療薬であると結論づけられる。

I. 緒言

ビタミンD代謝物の中では $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が最も強力なカルシウム動員効果があり生理学的にも重要な物質である(1)。もう一つのビタミンD₃代謝物である $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、血清中の濃度は $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ の約100倍に達するが(2)、その生理学的な役割は、なお明らかではない。少なくとも、ビタミンD欠乏状態での骨の石灰化の改善や腸管からのカルシウムの吸収に不可欠ではない(3,4)。

一方、 $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を薬剤として投与すると、骨やその他の組織で効果を発揮するという *in vivo*, *in vitro* の研究報告はあり(5-14)、その効果は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ や副甲状腺ホルモン(PTH)が存在している条件下で最もよく作用が発現されている。トリの胎生大腿骨の骨化の促進(6)、トリの産卵促進(8)、ラットの骨や腎臓での *adenylate cyclase* 活性の促進作用¹⁰などがあり、更に、これらの効果は大量に投与したときによく表れている(9,11,13)。また、 $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の骨への効果は *in vitro* でも *in vivo* でも、軟骨に対しての効果より高い使用量レベルで発現している(9,5,11,13,10)。骨の細胞に $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の受容体は発見されていないが、これはビタミンD充足状態での、 $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の薬理学的効果の存在を否定するものではない。

本研究は正常なビタミンD充足状態のラットに $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を大量に投与して、骨量が正常以上に増加することを観察したのが始まりである。次に、 $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による骨量増加作用がラットよりも骨代謝回転能の大きいウサギでも発揮されるか否かを検討し、骨量増加の組織学的機序を明らかにした。更に、骨量減少の病態モデルとして卵巣摘除ビーグル犬を用い $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が骨量減少を防止し、骨粗鬆症の治療薬として使用しうる可能性を明らかにしたものである。

II. $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の骨量増加作用

実験 I

<目的>

24R, 25(OH)₂D₃ にビタミンD充足状態のラットに大量投与して、骨量が正常以上に増加するか否かを明らかにするために、以下の実験を行った。

<対象および方法>

6週令のWistar系ラットを用い、2年間に渡る24R, 25(OH)₂D₃ 投与・飼育実験を行った。ラットは6群に分け、第1群は食飼のみ、第2群は食飼に担体であるglycineを混入させた(control)、第3群は24R, 25(OH)₂D₃ 1 micro-g/kg、第4群は 40micro-g/kg、第5群は 150 micro-g/kg、第6群は 400 micro-g/kg をそれぞれ担体に混ぜて経口投与した。

食飼は日本クレア製標準食(CE-2)を使用し、カルシウムは 1.35%、燐 1.13%、ビタミンD₂ 0.5 mg/100g を含んでいた。動物は通常の金属ケージで飼育し室温は 24+/- 2°C、湿度は 55+/-10% に維持された。各群とも 50 匹で開始した。

実験終了時に各群の死亡率や平均体重に相異はなかったので、8匹ずつ選んで血液および骨の評価を行った。血液はエーテル麻酔下に下大静脈より採取した。両大腿骨、脛骨、第一尾椎を採取し、骨のサイズを測定後、ノーランド社製骨塩定量装置(Model 2780)にて、骨塩量を測定した。さらに、右大腿骨遠位部で脱灰標本を作成し、骨幹部および第一尾椎にて、非脱灰標本を作り、形態計測を行った。

<結果>

各群の平均体重、血清カルシウム、クレアチニン、白血球数を表1に示した。24R, 25(OH)₂D₃ の長期大量投与でも高カルシウム血症は生じず、腎機能にも異常は生じなかった。骨髄抑制もなかった。

骨のサイズの計測では大腿骨、脛骨などの長管骨の長さは各群でほとんど同じであ

り、尾椎の椎体高にも差はなかった(表2)。骨塩量の増加は尾椎、大腿骨、脛骨とも用量依存性に増加し、最高投与群(第6群)では正常対照群(第2群)の150%にまで増加していた(表2)。大腿骨の長軸方向の骨塩量分布をみると骨端および骨幹端部の海綿骨領域でも骨幹部の皮質骨領域でも同じ程度の骨塩量に増加が見られた。

骨組織学的検査では椎体や大腿骨遠位部での海綿骨はすべて層板骨(lamellar bone)であり、woven boneはなかった。骨梁の数が増加し、骨梁幅も増加していた。骨梁面の破骨細胞数は減少していた。ラット皮質骨の大部分は骨膜性の第1次層板骨であった(図1)。

第1尾椎椎体の骨形態計測では全骨量(total bone volume%)は用量依存性に増加し、最高投与群では第2群の約2倍に達していた。類骨の占める割合(osteoid volume)は各群でほとんど同じであった。平均類骨幅は $24R, 25(OH)_2D_3$ 投与群でやや増加する傾向にあったが有意差はなかった(表3)。

<考察>

この実験によりビタミンD充足状態のラットに $24R, 25(OH)_2D_3$ を長期間大量に投与すると骨量が増加することが明らかになった。大量投与にもかかわらず高カルシウム血症や腎機能の異常も生じなかった。増加した骨は組織学的には層板骨であり、石灰化障害もなかった。

$24R, 25(OH)_2D_3$ の大量投与で生じた変化はビタミンD過剰症とは異なるものであった。高カルシウム血症や異所性石灰化がビタミンD過剰症では必発であり、骨の脱灰がすすんで骨量はむしろ低下し、骨のmineralization障害が生じる(19,20)。 $1,25(OH)_2D_3$ (21,22)や $25(OH)D_3$ (23)の大量投与では高カルシウム血症が生じ、骨の長軸方向の成長も障害される。 $24R, 25(OH)_2D_3$ の大量投与による骨の変化は、これらのいずれの状態とも異なり、正常な骨量が増加するものであった。

正常動物の骨量を増加させる物質にはエストロゲン (24) , カルシトニン (25,26) , 副甲状腺ホルモン (27) , diphosphonate (28) などがある。24R,25(OH)₂D₃ による効果は、これらのどの物質とも異なっていた。副甲状腺ホルモンでは皮質骨量の増加はなく (26) , diphosphonate では類骨が増加する。エストロゲンでは成長障害により骨の長軸成長が障害される (24,29) 。骨組織では破骨細胞の減少があり、層板骨が増加している点は、エストロゲンによる骨量増加と類似している。

本実験は24R,25(OH)₂D₃ が、高カルシウム血症や成長障害などの副作用を伴うことなく、正常動物の骨量を増加させることを明らかにし、ヒトの骨萎縮疾患の治療に利用しうる可能性を示したものとして意義深い。しかし、ラットは骨代謝回転能が極めて小さい動物であり、ラットでの結果をすぐにヒトに当てはめることはできない。

III. 骨とリモデリング

骨の器官としての役割は2つある。一つはカルシウムの貯蔵庫であり、もう一つはカルシウムの恒常性と、アパタイトとして作る結晶構造の安定性を利用した骨格構造である。支持機構としては支持力を恒常的に維持する必要がある。金属材料のように疲労現象が生じるのをなるべく抑えなければならない。この為に全身の細胞の内外での出入りと関連させて、骨の一部を常に作ったり壊したりしながら組織の質を維持している。これがリモデリングである。

骨リモデリング単位 (Bone Multicellular Unit)

骨吸収と骨形成が連続して起こると吸収期には骨量が減少し、形成期には増加する。骨全体が一つの単位として機能すると、たとえば腸管からのカルシウムの増減により簡単に骨量が変動することになる。全身的な代謝の要請に応ずるだけのカルシウム移動で、骨量が簡単に変動して骨の強度が変化しては支持器官としての機能は維持されない。

全身的な代謝に必要なカルシウム量の移動を許しながら、骨量の変動をなるべく少なくし、さらに局所的な力学的要請にも応えられるよう発達した機構が骨リモデリング単位 (BMU) である。骨は吸収量と形成量の平衡を維持してカルシウム移動量の増減に応じている。この時、吸収と形成とをそれぞれ細分化し、一つずつ小さな単位として組み合わせたのが骨リモデリング単位で、破骨細胞と骨芽細胞が機能連関単位を形成する。この単位 (BMU) は解剖学的には皮質骨では osteon、海綿骨では packet が相当する。

BMU は骨を形成するいわば量子 (quantum) であり、多数の BMU が吸収-形成の位相を僅かずつずらすことにより、大量のカルシウム移動を行いながら骨量の変動を最小に維持している。この BMU の数が骨代謝回転能 (bone remodeling capacity) である。骨のリモデリング能が大きいほど、全身のカルシウム代謝回転の変動による骨量の変動が少なくなる。

実験動物による骨の相違

一般に哺乳類では骨の支持器官としての安定性が必要な大動物ほど、骨のリモデリング単位の数が多い。小動物ではリモデリング単位の数少なく骨の材料であるカルシウム摂取の増減で簡単に骨量に変化してしまう。したがって、ラットはリモデリングの変化を観察するには適切な動物であるが、骨量の変化をすぐに大動物にも生じうる所見として類推するには適切な動物ではない。

IV. $24R, 25(OH)_2D_3$ の骨芽細胞および破骨細胞に対する作用

$24R, 25(OH)_2D_3$ のラットで見られた骨量増加作用を、ヒトの骨萎縮性疾患に対する治療剤として期待するには、もっと骨リモデリング能の大きな動物で調べる必要がある。また、骨量は骨吸収と骨形成の平衡関係で維持されているので、 $24R, 25(OH)_2D_3$ の投与が生体中で両者にどのような作用を生じるかを知る事も必要である。これらの

問題を明らかにする目的で、破骨細胞と骨芽細胞の機能と、BMU とを同時に評価できる骨形態計測を主な手法として、ウサギを対象動物として以下の実験を行った。ウサギは中動物で皮質骨の中3分の1の層にはosteonが発達しており、骨代謝回転能はラットより大きい。

実験II

<目的>

24R, 25(OH)₂D₃ の投与で、正常ウサギの骨量が増加するか否かを明らかにし、破骨細胞と骨芽細胞の変化とBMU を中心とした骨代謝回転の変化を検討することである。

<対象及び方法>

20週令の雄NZWウサギ15匹を5匹ずつ3群に分け、8週間の24R, 25(OH)₂D₃ 投与・飼育実験を行った。第1群は担体のみ、第2、第3群は各々10 micro-g/kg, 100 micro-g/kgの24R, 25(OH)₂D₃ を経口投与した。担体には1%エタノール含有のトリグリセライドを使用した。食飼はカルシウム1.36%、燐0.56%、ビタミンD₃ 60 IU/100gを含んだ日本クレア社製の標準食を使用した。6週目と7週目に塩酸テトラサイクリン(和光純薬)20 mg/kgを皮下に注射し骨のラベリングを行った。

実験直前、2週、5週、7週の時点で体重を測定し、血液を採取し、血清カルシウム、燐、クレアチニン、尿素窒素、アルカリホスファターゼを測定した。さらに、両下肢のX線撮影を行った。

実験終了後、体重測定し血液を採取し、血清ビタミンD代謝物、副甲状腺ホルモンも測定した。骨は左大腿骨と第6、第7腰椎を摘出し、骨塩定量装置で骨塩量を測定した。第7腰椎は脱灰しH-E染色を行い、第6腰椎で非脱灰標本を作成し、組織計測を行った。

<結果>

24R, 25(OH)₂D₃ の投与で血清カルシウム、磷、アルカリホスファターゼなどは全く変化しなかった。クレアチニン、尿素窒素なども各群間で差はなかった。血清24R, 25(OH)₂D₃ は用量依存性に増加した(表5)。

骨塩量は第3群で著明に増加し、第1群と比べ第6腰椎では34.7% ($p < 0.01$)、第7腰椎では23.0% ($p < 0.05$)、大腿骨では14.5%増加した。骨形態計測の静的指標では、骨量(BV)の増加が明らかであった。組織表面では吸収面(ES/BS)と破骨細胞数(N.Oc)の減少が著明であった。骨形成の指標では類骨面(OS)はやや減少した(表7)。

テトラサイクリンラベルを中心にした動的指標では、全骨表面に対するラベルされた面の割合(MS/BS)及びBMUの中での骨石灰化面の割合を表すラベル面の類骨面に対する割合(MS/OS)とも、第3群では減少した。しかし個々の骨芽細胞の機能を表す類骨層幅(O.Th)や石灰化速度(MAR)は著しく増加した(表8)。類骨面の単位長さあたりの骨形成量を示す補正石灰化速度(Aj.AR)は第3群でやや減少していた。骨形成率(MFR)は骨形成を示すOSやMS/BSの減少にもかかわらず、石灰化速度の増加の為、第3群でも第1群と同じレベルに維持されていた。形成される骨の質を表す類骨成熟時間(Omt)は、各群間で差はなかった。

<考察>

この実験で24R, 25(OH)₂D₃ を大量に投与すると、ウサギでも骨量が増加することが明らかになった。高カルシウム血症や腎機能障害を生じなかったのもラットの場合と同様であった。骨量の増加は腰椎椎体や大腿骨端及び骨幹端部など海綿骨領域で有意であった。これは8週間という比較的短期間の為に、細胞成分の豊富な海綿骨領域の方が皮質骨に先行して効果が表れたものと考えられる。

骨形態計測の指標では骨表面での吸収面と形成面の減少が明らかであった。即ち、

骨梁表面のBMUの数の減少により、代謝回転は定価していた。24R,25(OH)₂D₃ 10 micro-g/Kg 投与の第2群で破骨細胞(N.Oc)はすでに有意に減少し、吸収面(ES/BS)も減少した。吸収面と関連している形成面でも、類骨面(OS/BS)、テトラサイクリン標識面(dLS,sLS)とも減少していた。

しかし、骨芽細胞の機能を表す動的指標では、個々のBMUの中での骨芽細胞の作用は増強している事が明らかになった。類骨層幅(0.Th)や石灰化速度(MAR)は増加した。類骨形成能も石灰化能も、どちらも同じ程度に増強され、作られる骨の質を表す類骨成熟時間は正常と同じであった。

ウサギでの24R,25(OH)₂D₃の骨量増加の組織学的機序は図1のようになる。破骨細胞の数の減少により骨吸収面が減少し、引き続いて生じる骨形成面が減少する。即ちactiveなBMUの数は減少し、骨代謝回転は低下する。しかし、個々のBMUレベルでは骨芽細胞の機能は亢進し骨形成率は保存され、結果として骨量が増加する。

本実験は大量の24R,25(OH)₂D₃投与が、骨代謝回転能がラットより大きいウサギでも骨量増加を生じる事を示したばかりでなく、組織学的分析から、24R,25(OH)₂D₃の骨への作用が2つある事を明らかにした点で極めて意義深い。1つは破骨細胞の数の減少作用であり、もう1つは骨芽細胞の機能亢進作用である。これらの作用が同時に生じて、比較的短期間で骨量が増加するものと思われる。

V. 骨粗鬆症病態モデルの確立

実験I, 実験IIによって24R,25(OH)₂D₃はビタミンD充足状態の正常動物では代謝回転能の低いラットでも、osteonを有するウサギでも骨量増加作用を示す事が明らかとなった。

しかし、正常動物で見られた骨量増加作用が、病態や疾患に大して薬剤として用いられたときに、発揮されるか否かは不明であり、また、極めて大量を使用したときのみ生じる効果だけでは、ヒトの治療に使用される実現性はうすい。

24R,25(OH)₂D₃ が薬剤として使用されうる疾患の1つに骨粗鬆症がある。骨粗鬆症は閉経後の女性に多く見られ、骨量減少の機序に1つに卵巣の機能低下が考えられている疾患である。確かに、卵巣摘出による骨萎縮の作成はラットではすでに確立されている。しかし、ラットは前述の如く、ヒトの骨とはリモデリング能が異なり、ヒトの疾患モデルとしては適当ではない。

実験 III

<目的>

卵巣摘出によって骨量減少モデルができるか否か、また、卵巣摘出によって障害されるのは骨芽細胞なのか、破骨細胞なのかを明らかにすることである。

<対象及び方法>

6頭のビーグル成犬(6-10 kg)を用い、30ヵ月の飼育実験を行った。第1群3頭はsham手術群、第2群3頭は卵巣摘出群である。食飼は制限給餌とし、1日のカルシウム摂取量はヒトでの recommended daily calcium intake に相当する量として200 mgに設定した。磷は2 g、ビタミンD₃ 150単位とした。評価: 1. 血液、尿生化学。血清カルシウム、磷、アルカリホスファターゼ、尿素窒素、クレアチニン及び尿中 hydroxyproline を3ヵ月ごとに測定した。2. 骨塩定量、硬組織学的評価。実験終了時に第6腰椎と右大腿骨を採取し、骨塩定量装置(SPA)にて骨塩量(BMC)、骨密度(BMD)を採取した。第6腰椎では軟X線撮影を行った。また、実験前に右腸骨、実験終了時に左腸骨を採取し形態計測を行った。

<結果>

実験終了時の腰椎 X 線像では卵巣摘出群には明らかな骨萎縮があった (図 III)。骨塩量の測定では大腿骨は sham 群が 7.06 ± 0.66 g, 卵巣摘出 (OVX) 群は 6.59 ± 0.66 g, 第 6 腰椎では sham 群 1.97 ± 0.13 g, OVX 群 1.43 ± 0.25 g ($p < 0.05$) であった。椎体では BMC、BMD ともに有意な骨量減少を示したが、大腿骨では近位及び遠位の骨端・骨幹端部の海綿骨で骨量の減少は著明であった。皮質骨からなる骨幹部では、骨量はほとんど変わらなかった (図 IV)。

血清カルシウム、磷、アルカリホスファターゼは両群でほとんど変わらなかった。尿素窒素、クレアチニンなども各群で同じであった。

実験終了時の腸骨標本では OVX 群では明らかな骨萎縮があった (図 V)。骨梁の数は減少し、骨梁の幅は狭小化し、骨梁の断裂が有り連続性が消失していた。形態計測では骨量 (BV) は OVX 群では sham 群の 55.8% にまで減少していた。類骨量 (OV/BV) は両群とも同じで有った。骨形成の指標では、OVX 群では骨芽細胞面の割合 (Ob.S/OS)、即ち BMU に占める骨芽細胞面の割合は増加していた。破骨細胞数 (N.Oc) は増加する傾向に有った (図 VI)。Tetracycline-calceine 二重ラベルによって示される骨芽細胞の石灰化速度 (MAR) は OVX 群で明らかに減少していた (図 VII)。

尿中 hydroxyproline 排泄量は sham 群では実験期間中ほぼ一定に保たれたが、OVX 群では術後 1 年間は明らかな増加傾向を示し約 2.5 倍にまで増加した。1 年以後は徐々に減少する傾向があった。

< 考察 >

この実験により犬でも、ラットで観察されていたのと同じく、卵巣摘出により骨量が減少することが明らかになった。海綿骨部分に強い骨萎縮を生じ、皮質骨部分は著しい減少を生じなかった。これはヒトの閉経期骨粗鬆症と一致する所見で有る。

犬の卵巣摘出による骨粗鬆症モデル作成の試みは、今までにもいくつかなされている(30,31,32)。しかし、いずれも6ヵ月から1年の観察で骨量の減少は明らかではない。Martin らの指摘の如く、一般に犬の飼料はカルシウムの摂取がヒトの30倍~60倍と大量である。本実験ではカルシウム摂取量を200 mg/dayと制限した。このカルシウム摂取量で sham 群では骨量及び骨吸収、形成面にほとんど変化を生じていなかったで、卵巣摘出群で観察された骨の異常はすべて卵巣摘出により生じたものと考えて良い。今までの犬の卵巣摘出の実験系では、摘出後に高カルシウム治療を行っていたのと同様のものと考えられる。

卵巣摘出による組織学的観察では骨芽細胞面に変化があった。骨芽細胞面(Ob.S/BS)は増加し、BMUあたりに骨芽細胞が占める割合(Ob.S/OS)も増加した。破骨細胞数は増加を示したが著しいものではなかった。骨量は明らかに減少しているのでこの骨芽細胞面の増加は骨形成の増加につながってはいない。実際、骨芽細胞による石灰化速度は低下していた。即ち、卵巣摘出では骨芽細胞の機能低下が有り、これが骨量減少の主因と考えられる。骨芽細胞面の増加、即ち骨芽細胞の数の増加は、一個一個の細胞の機能の低下を補う為の代償作用によるものと考えられよう。

骨代謝回転は卵巣摘出によって一時的な増加を示した。尿中 hydroxyproline は卵巣摘出後一年間は増加した。その後減少し、30ヵ月目の実験終了時にはもとの状態に服していた。形態計測による破骨細胞数は、実験終了時には明らかな増加を示してはいなかったが、恐らく尿中 hydroxyproline が増加していた卵巣摘出後の早期では破骨細胞の増加があったものと思われる。

しかし、骨代謝回転の増加は骨量の減少を直接には生じない。BMUの中で骨形成の低下があってこそ骨量が減少するのである。従って、卵巣摘出による骨量減少の主因は、骨代謝回転の上昇よりも骨芽細胞の異常に求めるべきであろう。近年、骨芽細胞に estrogen 受容体が発見されており(33,34)、卵巣摘出により骨芽細胞の機能の低下が、直接生じる可能性はある。骨代謝回転の一時的な増加の原因は明らかではない

。骨芽細胞機能低下の代償作用として、副甲状腺ホルモンなどを介して二次的に生じるものなのか、又は estrogen に何らかの骨代謝回転抑制作用があるのか、今後の解明に待たねばならない。

本実験は犬も卵巣摘出により骨量が減少し、ヒトの閉経期骨粗鬆症が生じることを明らかにし、更に、卵巣摘出により骨芽細胞の機能低下が生じることを明らかにした点で、極めて意義深い。今後、estrogen の骨作用を明らかにしていくうえでの一つの指標となりうるものである。

VI. $24R, 25(OH)_2D_3$ の骨粗鬆症モデルに対する効果

実験 III によって、ビーグル成犬の卵巣摘出が、ヒトの閉経期骨粗鬆症類似の海綿骨を中心とした骨量減少を生じ、骨粗鬆症モデルとして妥当なことが明らかとなった。更に、病態として骨代謝回転の亢進と骨芽細胞の機能異常が生じていることが明らかになった。

$24R, 25(OH)_2D_3$ がこれらの病態に効果を発揮し、卵巣摘出後に生じる骨量減少を防止しうるか否かを知ることは、 $24R, 25(OH)_2D_3$ が治療剤としてヒトに使用しうるか否かを判断するうえで重要な指針となる。

また、病態モデルでは $24R, 25(OH)_2D_3$ が効果を表すのに、正常動物の骨量を増加させるのに必要としたほどの大量を要するか否かを明らかにすることも意味の有ることである。

実験 IV

<目的>

24R,25(OH)₂D₃ が卵巣摘出によるビーグル犬骨粗鬆症モデルでの骨量減少を防止しうるか否かを明らかにすること、及び卵巣摘出によって生じる病態に対する作用を明らかにすることである。

<対象及び方法>

14頭のビーグル犬(9~10 kg)を用い、30ヵ月の飼育実験を行った。第1群3頭は sham 手術群、第2群3頭は卵巣摘出 control 群である。24R,25(OH)₂D₃ 投与群は2つに分け、第3群4頭(低投与群)は卵巣摘出1ヵ月後より2 micro-g/kg を、第4頭(高投与群)は1ヵ月後より16ヵ月まで10、その後100 micro-g/kg を連日投与した。一日のカルシウム摂取は実験 IIIで述べたように200 mg とし、ビタミンD₃ は150 単位とした。評価: 1. 血液、尿生化学。血清カルシウム、磷、アルカリホスファターゼ、尿素窒素、クレアチニン及び尿中 hydroxyproline を2ヵ月ごとに測定した。2. 骨塩量、硬組織。実験終了後に第6腰椎を採取し、骨塩測定装置(SPA)にて骨塩量(BMC)と骨塩密度(BMD)を測定した。また卵巣摘出時に右腸骨、実験終了時に左腸骨を採取し形態計測を行った。

<結果>

X線像で第2群には明らかな骨萎縮があった。24R,25(OH)₂D₃ 2 micro-g/kg 及び10-100 micro-g/kg を使用した第3、第4群では明らかに骨量の減少が防止されていた(図 IX)。腸骨の形態計測では低投与群も高投与群も sham 群と同じ程度に骨量が維持されていた。骨形成、骨吸収の指標は低投与群は sham 群と同じであったが、高投与群では吸収面、形成面とも著しく減少していた。破骨細胞数も高投与群では明らかに低下していた(図 X, XI)。Tetracycline-calceine 二重ラベル幅は OVX (control) 群では狭小化が明らかであったが、24R,25(OH)₂D₃ 投与群では、低投与群でも高投与群でも sham 群と同じ幅を維持した(図 XII)。

血清カルシウム、磷、アルカリホスファターゼ、尿素窒素、クレアチニンなどは各群ともほとんど同じであった。尿中 hydroxyproline は低投与群では sham 群と同じ

レベルを維持したが、高投与群では投与早期から明らかに減少した。

<考察>

本実験で、 $24R,25(OH)_2D_3$ 2 micro-g/kg の投与は卵巣摘出によって生じる骨代謝の異常を完全に防止することが明らかになった。骨芽細胞の機能不全は生じず、tetracycline-calcein 二重ラベルの幅は sham 群と同じレベルを維持され、骨形成面と吸収面の比率も sham 群と同じレベルに維持された。骨量減少は完全に防止された。

$24R,25(OH)_2D_3$ 高投与群では骨芽細胞の機能は保たれたが、破骨細胞の数は抑制され、BMU の数、即ち骨代謝回転は強く抑制された。骨はいわゆる低リモデリング骨になっていた。骨量が sham 群と同じ量に維持されたのは、骨芽細胞の機能が維持された為と考えられた。

実験IIで明らかとなった $24R,25(OH)_2D_3$ の正常動物の骨に対する作用、即ち、1・骨芽細胞の機能亢進作用と 2・破骨細胞の数の抑制による骨代謝回転抑制作用の二つは、本実験の骨粗鬆症モデルでも発揮されていた。低投与群では骨芽細胞の機能低下に拮抗して、正常レベルまで引上げる作用が見られた。破骨細胞に対する作用は実験終了時の硬組織標本では明らかではない。しかし、卵巣摘出後1年くらいの間に見られる尿中 hydroxyproline の増加が抑制されており、骨代謝回転亢進に対する正常化には作用している可能性がある。 $24R,25(OH)_2D_3$ の高投与群では骨芽細胞機能は正常に維持されたが、強い破骨細胞の抑制により骨代謝回転は著しく低下した。投与開始後早期から尿中 hydroxyproline 低下状態を続けた。

$24R,25(OH)_2D_3$ 投与による骨芽細胞と破骨細胞に対する作用メカニズムは異なる可能性がある。破骨細胞抑制効果は低投与群で僅かに発現し、高投与群では強く作用した。しかし、骨芽細胞の機能亢進作用は卵巣摘出の状態では、高投与群でも正常以上には、達しなかった。

本実験で、卵巣摘出によって生じるビーグル犬の骨代謝異常を、 $24R,25(OH)_2D_3$ が完全に防止し、骨量を sham 群と同じレベルに維持したことは、極めて意義深い。しかし、本実験はあくまで予防効果を示したもので有り、ヒトの骨粗鬆症のように、既に骨量が減少した例に骨量増加作用があるかどうかは、なお明らかではない。また、 $24R,25(OH)_2D_3$ の直接作用なのか、 $24R,25(OH)_2D_3$ が他の代謝物に変化してから作用するものか、さらには副甲状腺など他の臓器への作用を介したものののかも全く不明で有る。ヒトにおける様々な骨萎縮疾患に対する治療手段の一つとして、 $24R,25(OH)_2D_3$ に期待する前に、もっと多くの研究成果の積み重ねが必要であろう。

VII . 結論

本研究によってビタミン D_3 の代謝物の一つである $24R,25(OH)_2D_3$ に骨量増加作用があり、その組織学的機序は破骨細胞の数を減少させるとともに、骨芽細胞の機能をも増加させることが明らかとなった。更に、骨芽細胞の機能不全による骨粗鬆症モデルである卵巣摘出ビーグル犬で、骨代謝異常を完全に正常化させ、骨萎縮の出現を防止した。

$24R,25(OH)_2D_3$ の *in vivo* での骨に対する作用で、骨芽細胞の機能亢進と破骨細胞の抑制作用とでは作用機序が異なっている可能性がある。正常ウサギでも、骨粗鬆症モデルビーグル犬でも、これらの2つの作用が発現する使用量は異なっていた。これらの各々の作用の細胞レベルでの機序の解明には、それぞれ異なった実験系が必要である。

$24R,25(OH)_2D_3$ の *in vivo* での作用は、高カルシウム血症や腎機能障害などの、副作用を全く生じずに、骨量増加のみが著明な点が特徴である。ヒトにおける骨萎縮疾患の治療薬として使用されうる可能性がある。

表 1

Group	1	2	3	4	5	6
Glycine mixture (%)	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
24R, 25(OH) ₂ D ₃ ng/100g/day	0	0	1x10 ²	40x10 ²	150x10 ²	400x10 ²
Body weight (g)	400 (32.2)	411 (44.2)	399 (20.7)	422 (36.6)	424 (28.1)	373 (45.3)
Serum calcium (mg/dl)	11.2 (0.52)	12.4 (0.92)	12.2 (0.66)	11.8 (0.50)	12.3 (0.79)	12.7 (0.93)
Serum phosphorus (mg/dl)	5.5 (0.87)	7.8 (2.10)	8.2 (3.12)	6.5 (0.80)	6.8 (0.80)	7.9 (0.73)
Alkaline- phosphatase (IU)	263.6 (97.6)	183.4 (56.9)	251.3 (178.3)	196.6 (62.0)	150.9 (78.1)	277.6 (205.2)
Creatinine (mg/dl)	0.68 (0.06)	1.05 (0.37)	0.82 (0.19)	0.77 (0.07)	0.74 (0.12)	0.82 (0.16)
Leukocyte (x10 ² /mm ³)	248.4 (56.5)	237.0 (53.2)	227.5 (54.1)	211.1 (45.7)	205.9 (65.4)	233.3 (38.3)

表 2

Group	1	2	3	4	5	6
Length (mm)						
Femur	41.3 (0.74)	41.7 (0.68)	41.4 (0.58)	41.5 (0.56)	41.1 (0.53)	41.7 (0.78)
Tibia	43.4 (0.48)	43.6 (0.35)	43.0 (0.59)	43.3 (0.48)	43.3 (0.50)	43.5 (0.48)
Coccyx	7.2 (0.52)	7.1 (0.32)	6.8 (0.25)	7.0 (0.25)	6.8 (0.27)	6.9 (0.31)
Mineral content (mg)						
Femur	567.2 (54.8)	607.7 (38.9)	577.6 (39.2)	648.5 (68.7)	716.7 ^b (53.1)	913.4 ^b (53.1)
Tibia	478.6 (26.9)	494.5 (38.6)	462.7 (39.2)	500.1 (49.1)	538.4 ^a (44.4)	701.2 ^b (68.8)
Coccyx	104.4 (17.3)	123.8 (11.8)	124.0 (4.6)	130.9 (19.6)	143.8 ^b (16.6)	189.4 ^b (21.4)

^a P<0.05; ^b P<0.01

表 3

Group	Total bone volume (%)	Mineralized bone volume (%)	Osteoid volume (%)	Mean osteoid thickness (micro-m)
I	25.1 (8.61)	97.8 (1.71)	2.16 (1.71)	8.98 (4.01)
II	26.5 (3.75)	98.3 (0.80)	1.70 (0.80)	13.0 (5.30)
III	29.6 (3.08)	99.0 (0.61)	1.03 (0.61)	12.7 (3.81)
IV	36.1 ^b (5.67)	99.0 (0.44)	0.96 (0.44)	12.1 (3.99)
V	43.0 ^b (7.43)	98.3 (1.43)	1.71 (1.43)	12.1 (3.99)
VI	59.8 ^b (6.21)	98.9 (0.57)	1.10 (0.57)	12.4 (4.12)

^b P<0.01

表 4

	Group	Pretreatment	2W	5W	7W	8W
Calcium (mg/dl)	I	12.3(0.23)	13.6(0.20)	14.0(0.34)	13.8(0.14)	12.4(0.26)
	II	12.0(1.38)	13.2(1.00)	14.0(0.66)	14.0(0.84)	12.1(0.52)
	III	12.8(0.80)	13.4(0.38)	14.0(1.00)	14.2(0.92)	13.8(0.46)
Phosphorus (mg/dl)	I	4.3(0.42)	5.1(0.51)	4.8(1.01)	3.5(0.57)	5.8(0.92)
	II	5.1(0.44)	5.3(1.44)	6.3(1.45)	4.5(1.01)	5.5(0.97)
	III	5.7(0.84)	5.8(1.83)	6.7(1.32)	6.2(0.70)	6.8(1.02)
Creatinine (mg/dl)	I	1.2(0.13)	1.3(0.15)	1.1(0.10)	1.1(0.10)	1.2(0.20)
	II	1.5(0.33)	1.4(0.42)	1.3(0.15)	1.1(0.10)	1.2(0.10)
	III	1.2(0.05)	1.2(0.26)	1.3(0.19)	1.4(0.20)	1.4(0.10)
Urea nitrogen (mg/dl)	I	14.5(1.29)	13.3(2.22)	20.3(2.08)	24.5(0.71)	21.8(2.05)
	II	25.8(13.2)	13.5(3.30)	20.8(3.00)	24.0(1.00)	22.4(3.40)
	III	17.5(3.40)	15.3(1.50)	23.8(1.00)	20.3(4.00)	24.8(2.50)
Alkaline phosphatase (mU/ml)	I	145.0(34.5)	133.8(37.2)	159.0(50.4)	85.5(9.20)	106.2(36.2)
	II	115.6(67.5)	80.0(31.0)	168.4(37.7)	83.0(22.7)	94.0(38.2)
	III	192.8(62.6)	138.0(52.0)	136.0(29.9)	159.6(60.4)	155.2(35.8)
Body weight (kg)	I	2.92(0.35)	3.08(0.27)	3.13(0.21)	3.25(0.21)	3.30(0.24)
	II	2.95(0.30)	3.06(0.15)	3.23(0.27)	3.26(0.23)	3.32(0.15)
	III	2.92(0.29)	3.00(0.13)	3.16(0.20)	3.18(0.19)	3.21(0.10)

表 5

	25(OH)D (ng/ml)	24.25(OH) ₂ D (ng/ml)	1.25(OH) ₂ D (pg/ml)	C-PTH (ng/ml)
Group I (control)	21.5 (9.85)	5.25 (3.40)	43.9 (29.2)	1.02 (0.35)
		**		
GROUP II (10μg/kg/day)	18.4 (5.77)	76.2 (19.90)	36.3 (18.0)	0.72 (0.43)
		**		
GROUP III (100μg/kg/day)	11.7 (2.58)	199.0 (30.90)	38.7 (25.5)	0.60 (0.44)

**P < 0.01 (Student's t-test)

表 6

Group	Mineral Contents (mg)				Mineral Densities (g/cm)				
	Whole	Proximal epi-metaphysis	Middle diaphysis	Distal epi-metaphysis	Whole	Proximal epi-metaphysis	Middle diaphysis	Distal epi-metaphysis	
Femur	I	5169.2 (521.6)	1605.2 (246.2)	2184.7 (162.1)	1379.3 (122.1)	0.461 (0.012)	0.390 (0.021)	0.482 (0.020)	0.510 (0.031)
	II	5262.1 (654.9)	1712.7 (335.4)	2128.8 (125.9)	1420.6 (231.0)	0.464 (0.031)	0.399 (0.032)	0.479 (0.015)	0.515 (0.057)
	III	5918.2 (581.7)	1895.4 (281.5)	2284.3 (162.7)	1738.5 (190.6)	0.522 (0.031)	0.452 (0.034)	0.488 (0.022)	0.626 (0.054)
Lumbar Vertebra (6)	I		1286.3(106.9)			0.413(0.029)			
	II		1380.6(76.2)			0.431(0.044)			
	III		1733.1(189.8)			0.513(0.045)			
Lumbar Vertebra (7)	I		1291.8(147.1)			0.448(0.025)			
	II		1142.2(107.7)			0.465(0.044)			
	III		1588.6(215.1)			0.572(0.070)			

* P<0.05 ** P<0.01 (Wilcoxon's U-test)

表 7

		Abbreviation	I	II	III
Area measurement					
Bone volume	BV	%	33.7 (2.03)	34.4 (2.98)	44.9 ^{**} (1.62)
Osteoid volume	OV	%	1.15 (0.665)	0.758 (0.365)	1.75 (0.354)
Osteoid volume	OV/BV	%	3.40 (1.88)	2.19 (1.09)	3.92 (0.91)
Length measurement					
Osteoid surface	OS/BS	%	43.6 (17.9)	45.5 (17.6)	35.2 (13.2)
Eroded surface	ES/BS	%	8.61 (2.92)	7.10 (1.99)	1.88 ^{**} (1.14)
Osteoblast surface	Ob.S/BS	%	17.3 (10.2)	18.5 (8.89)	19.1 (5.74)
Osteoblast surface (BMU)	Ob.S/OS	%	37.7 (8.76)	40.6 (7.45)	56.6 (10.5)
Single labeled surface	sLS/BS	%	11.5 (3.52)	9.45 (3.49)	8.68 (10.9)
Double labeled surface	dLS/BS	%	16.8 (8.08)	12.4 (4.50)	4.49 ^{**} (2.94)
Distance measurement					
Osteoid thickness	O.Th	μm	5.95 (1.06)	7.83 (2.70)	16.0 ^{**} (2.74)
Distance between labels		μm	14.3 (3.10)	15.0 (2.00)	30.9 ^{**} (2.43)
Number measurement					
Osteoclast number	N.Oc	N/mm	0.737(0.137)	0.485(0.087)	0.117 ^{**} (0.127)

* $P < 0.05$
 ** $P < 0.01$ Wilcoxon's U test

表 8

Index	Abbreviation	Formula		I	II	III
Mineralizing surface	MS/BS	$(dLS+sLS/2)/BS$	%	23.2 (6.94)	17.1 (5.62)	8.77 ^{**} (7.90)
Mineralizing surface (BMU)	MS/OS	$(dLS+sLS/2)/OS$	%	61.4 (26.9)	42.0 (18.4)	23.3 [*] (13.8)
Mineral apposition rate	MAR	$lr.L.Th/lr.L.t$	$\mu m/day$	1.79 (0.38)	1.88 (0.25)	3.86 ^{**} (1.28)
Adjusted apposition rate (BMU)	Aj.AR	$MAR(MS/OS)$	$\mu m/day$	1.11 (0.55)	0.772(0.275)	0.809(0.241)
Mineral formation rate	MFR	$MAR(MS/BS)$	$\mu m/day$	0.433(0.226)	0.347(0.148)	0.273(0.126)
Mineralization lag time	Mlt	$O.Th/Aj.AR$	days	6.46 (5.05)	6.47 (3.60)	17.7 [*] (8.35)
Osteoid maturation time	Omt	$O.Th/MAR$	days	3.01 (0.763)	2.29 (0.554)	3.38 (0.73)

* $P < 0.05$. ** $P < 0.01$ (Wilcoxon's U test)

Histological events by 24 R, 25 (OH)₂D₃

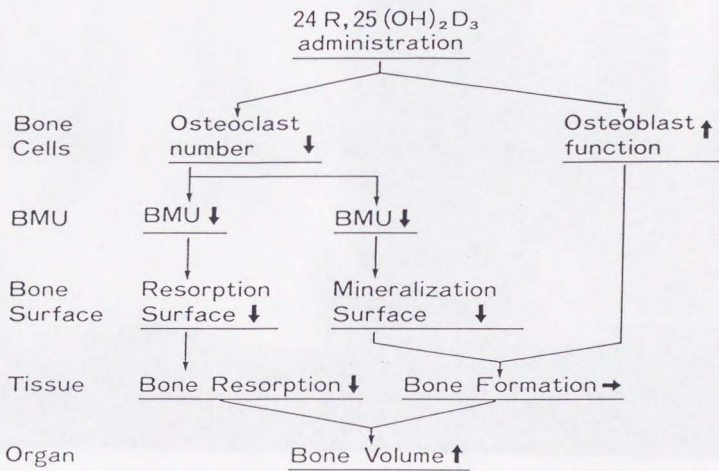
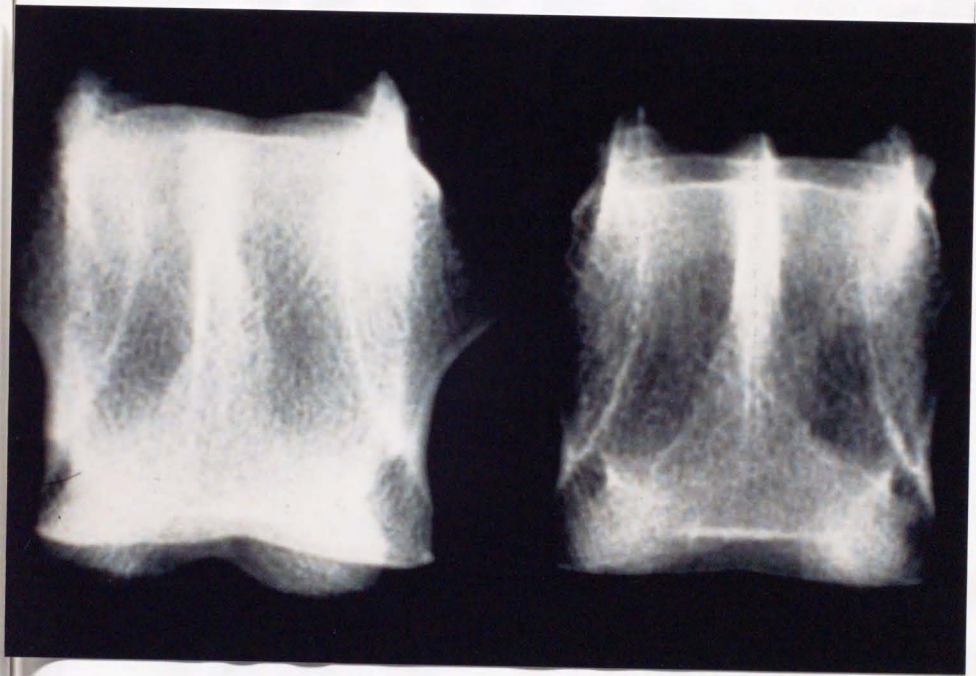


图 3



BMC and BMD in experimental dogs

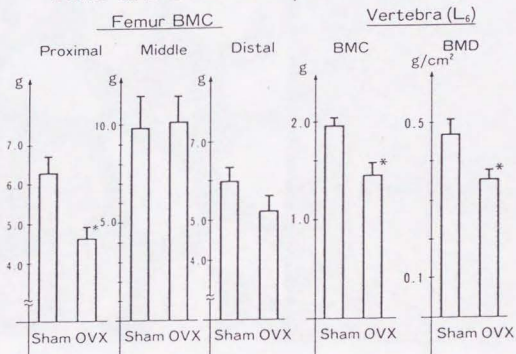
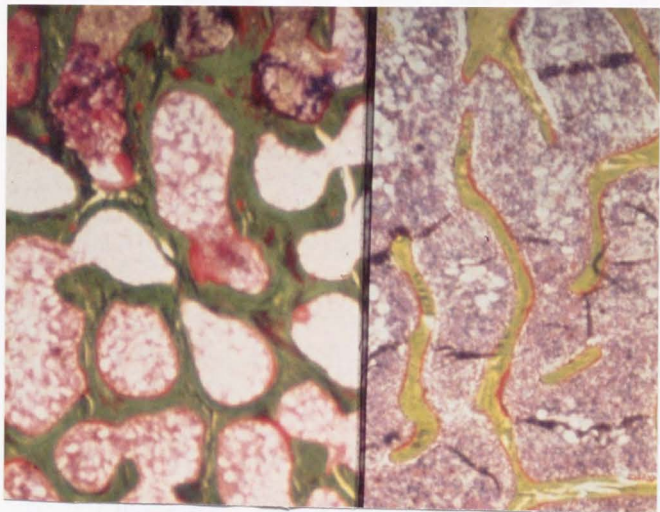
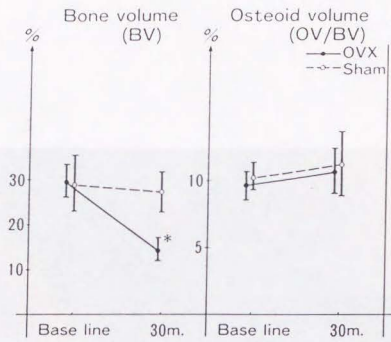


图 5



☒ 6

Area measurement



Bone formation

Bone resorption

Osteoid surface(OS) Osteoblast surface(Obs) Osteoblast surface -BMU-(Ob.S/OS) Eroded surface(ES) Osteoclast number(N.Oc)

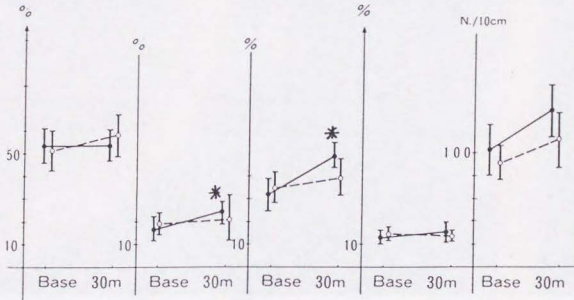
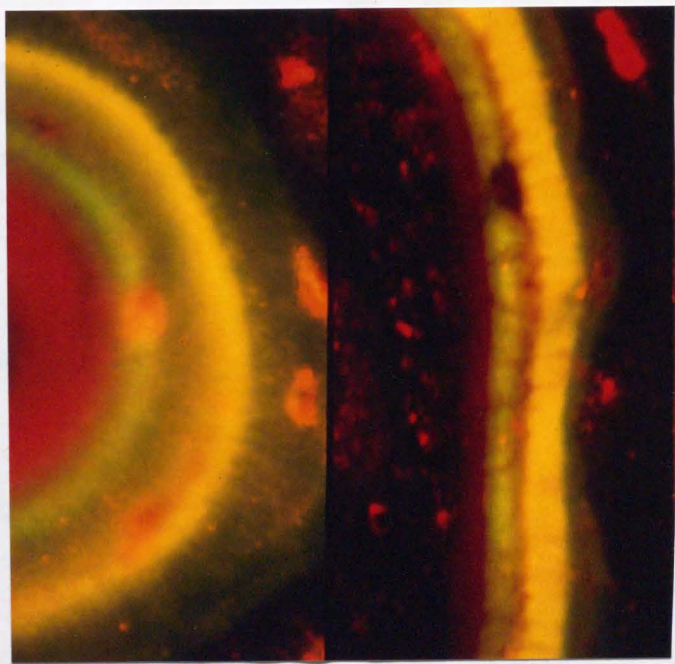


图 7



8



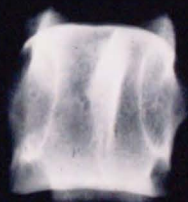
Sham



Ovx



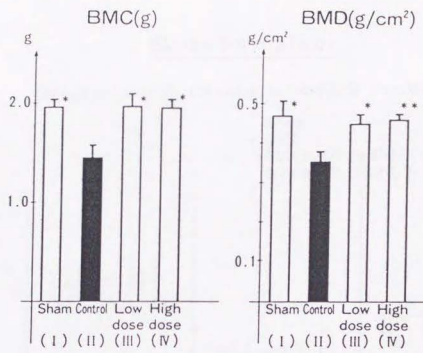
Ovx+2 μ g/kg



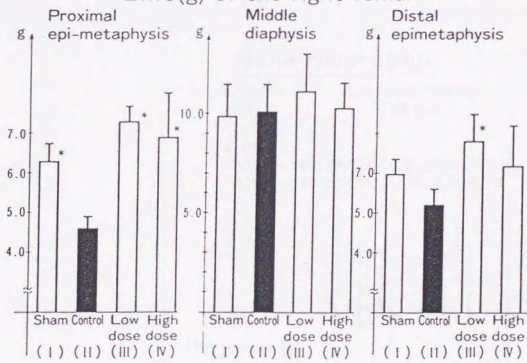
Ovx+10 μ g/kg

BMC and BMD of the Lumbar Vertebra(L₄)

☒ 9



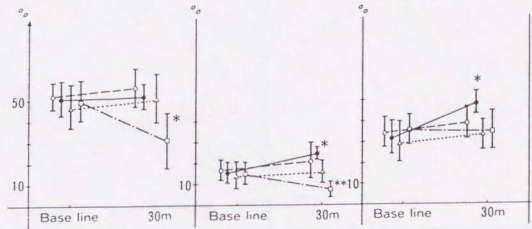
BMC(g) of the right femur



Bone formation

Osteoid surface(OS) Osteoblast surface(Ob.S) Osteoblast surface -BMU- (Ob.S/OS)

- Sham
- OVX
- OVX + 24R, 25(OH)₂D₃ 2 μg/kg
- OVX + 24R, 25(OH)₂D₃ 10 · 100 μg/kg



Bone resorption

Eroded surface (ES) Osteoclast number (N. Oc)

- Sham
- OVX
- OVX + 24R, 25(OH)₂D₃ 2 μg/kg
- OVX + 24R, 25(OH)₂D₃ 10 · 100 μg/kg

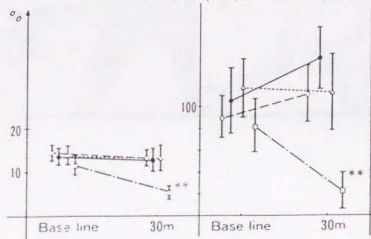


图 11

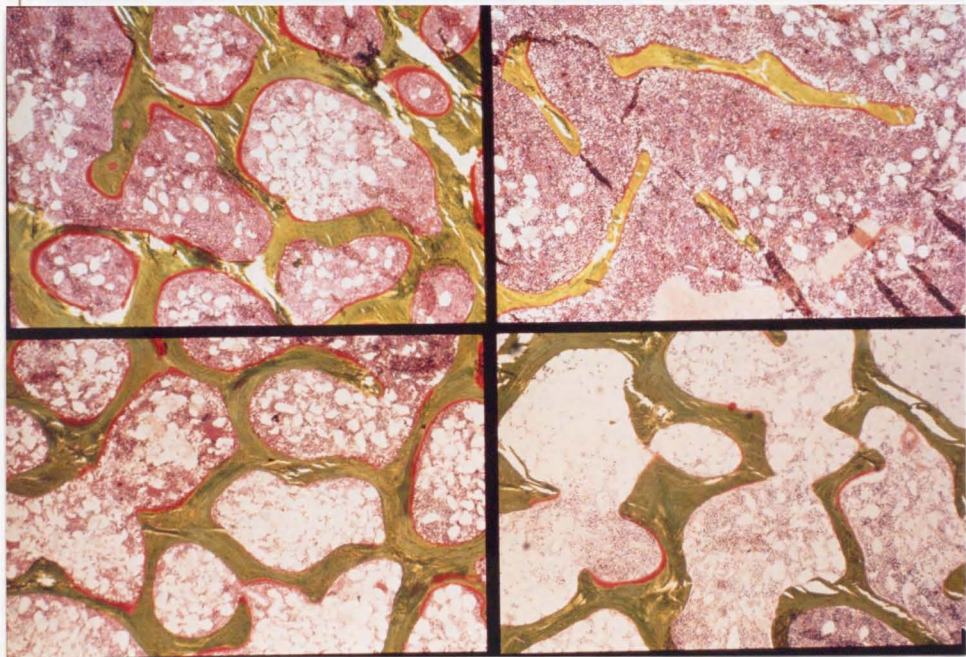


图 12

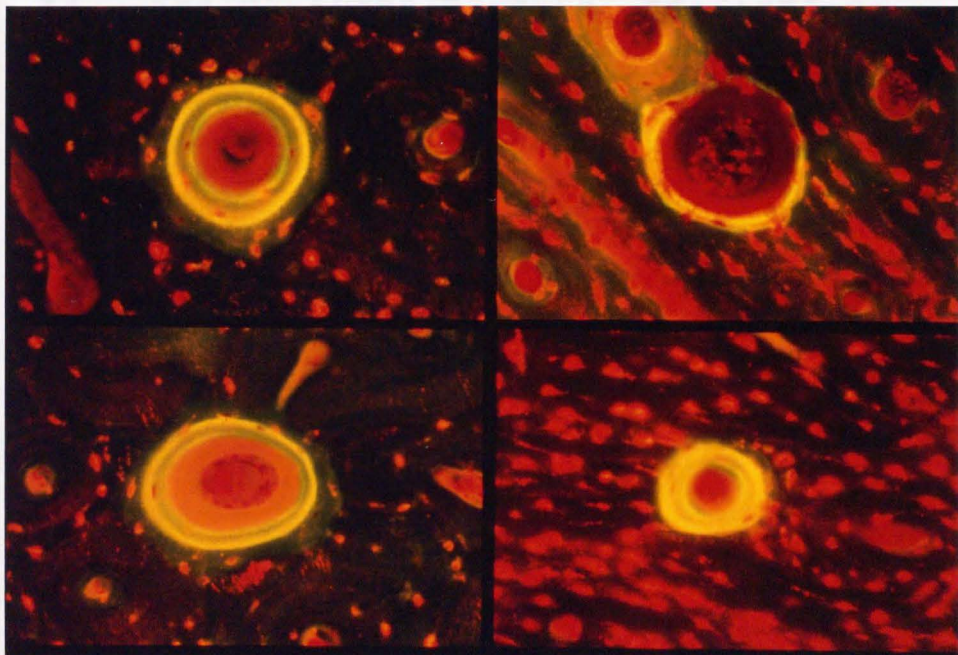


図 表

表 1 実験終了時ラットの体重および血液検査成績。すべての指標で、各群間に差はなかった。

表 2 実験終了時ラットの大腿骨、脛骨、第一尾椎の、骨サイズと骨塩量。サイズは同じで、骨塩量は $24R, 25(OH)_2D_3$ の用量依存性に増加した。

図 1 ラット大腿骨の骨幹中央部横断切片の非脱灰標本 (Villanueva 染色 X5)。

A-1 第二群 (コントロール群)

A-2 第六群 (最高投与群)

皮質骨の厚さは $24R, 25(OH)_2D_3$ 投与で明らかに増加した。

表 3 ラット第一尾椎椎体の組織計測。海綿骨量は $24R, 25(OH)_2D_3$ の用量依存性に増加した。全骨量にしめる類骨の割合は各群とも同じであった。

表 4 ウサギの体重および血液検査所見。各群の間で有意な差はなかった。

表 5 実験終了時ウサギのビタミンD代謝物および副甲状腺ホルモンの血清濃度 $24R, 25(OH)_2D_3$ は著しく増加した。

表 6 実験終了時ウサギの大腿骨、第六腰椎、第七腰椎の骨塩量と骨密度。海綿骨領域で骨塩量が著しく増加した。

表 7 ウサギ第六腰椎椎体の組織計測（静的指標）。第三群では骨量が増加した。骨吸収面 (ES/BS) の減少と、蛍光標識面 (sLs, dLs) の減少が明らかであった。二重標識間距離とオステオイドの厚さ (O.Th) は増加した。

表 8 ウサギ第六腰椎椎体の組織計測（動的指標）。骨石灰化面 (MS/BS) は第三群で減少した。骨石灰化速度 (MAR) は第三群で著しく増加した。

図 2 $^{24}\text{R}, ^{25}(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与による骨量増加の組織学的機序を、細胞レベル、BMU レベル、骨表面の吸収、形成（代謝回転）のレベル、組織レベル、臓器レベルで示した。

図 3 実験終了時のビーグル犬第 6 腰椎正面 X 線像。右は卵巣摘出群。明らかな骨萎縮があり、骨梁の数が減少している。

図 4 大腿骨と第 6 腰椎の骨塩量 (BMC) と骨密度 (BMD) 。大腿骨は近位および遠位の海綿骨領域で骨量が減少した。骨幹部皮質骨領域では骨量は変化しなかった。腰椎椎体は有意な骨量増加を示した。

図 5 実験終了時の腸骨標本。右はコントロール群、左は卵巣摘出群。骨梁の断裂、狭小化、数の減少を認める (Goldner 染色 $\times 20$) 。

図 6 腸骨標本での形態計測の指標。

図 7 蛍光二重標識像。右はコントロール、左は卵巣摘出群。ラベル間距離は明らかに低下した。

図 8 実験終了時第 6 腰椎椎体正面 X 線像。

図 9 第 6 腰椎の骨塩量 (BMC) と骨密度 (BMD)、右大腿骨の骨塩量 (BMC)。
24R, 25(OH)₂D₃ 投与で骨塩量は Sham 群と同じレベルに維持された。

図 11 腸骨標本 (Goldner 染色、x 50)。

右上: Sham 群、左上: 卵巣摘出群。

右下: 24R, 25(OH)₂D₃ 2.0 micro-g/kg.

左下: 24R, 25(OH)₂D₃ 10-100 micro-g/kg.

図 12 大腿骨皮質標本の蛍光像 (x 100)。

右上: Sham 群、左上: 卵巣摘出群。

右下: 24R, 25(OH)₂D₃ 2.0 micro-g/kg.

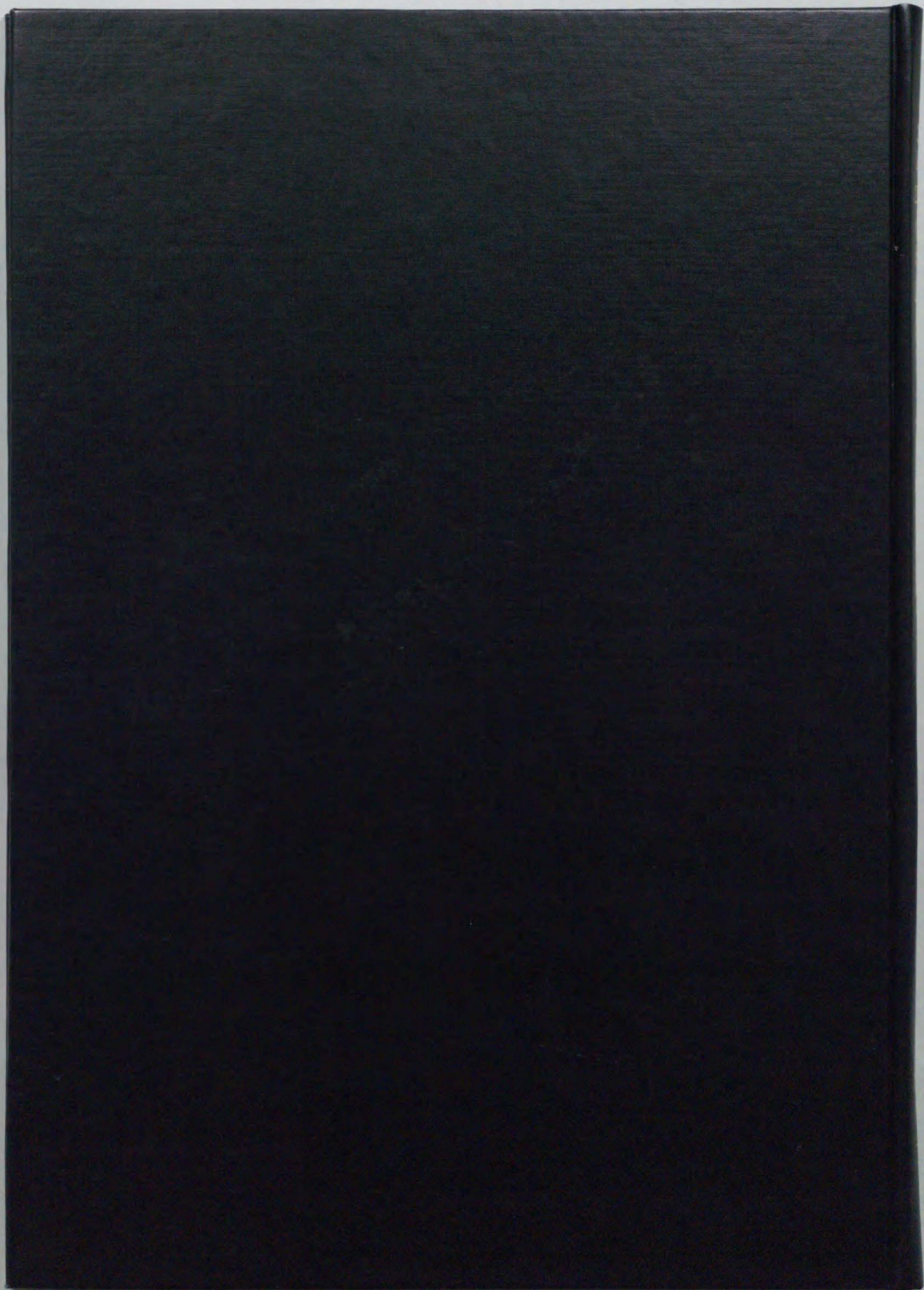
左下: 24R, 25(OH)₂D₃ 10-100 micro-g/kg.

References

- I. Walters MR, Hunziker W, Norman AW (1981) Ubiquitous effects of the vitamin D endocrine system. *Trends In Pharmacolog Sci* 2:42-44
2. Chan YL, Mason RS, Parmentier M, Savdie E, Lissner D, Posen D (1983) Vitamin D metabolism in nephrotic rats. *Kidney Int* 24: 336-341
3. Parfitt AM, Mathew CHE, Brommage R, Jarnagin K, DeLuca HF (1984) Calcitriol but no other metabolite of vitamin D is essential for normal bone growth and development in the rat. *J Clin Invest* 73: 576-586
4. Tanaka Y, DeLuca HF, Kobayashi Y, Taguchi T, Ikekawa N, Morisaki M (1979) Biological activity of 24,24-difluoro-25-hydroxyvitamin D₃. Effect of blocking of 24-hydroxylation of the functions of vitamin D. *J Biol Chem* 254:7163-7167
5. Corvol MT, Dumontier MF, Garabedian B, Rapport R (1978) Vitamin D and cartilage. II. Biological activity of 25-hydroxycholecalciferol and 24,25- and 1,25-dihydroxycholecalciferols on cultured growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 102:1209-1274
6. Endo H, Kiyoki M, Kawashima K, Naruchi T (1980) Vitamin D₃ metabolites and PTH synergistically stimulate bone formation of chick embryonic femur in vitro. *Nature* 286:262-264
7. Gordeladze JE, Gautvik KM (1986) Hydroxycholecalciferols modulate parathyroid hormone and calcitonin-sensitive adenylyl cyclase in bone and kidney of rats, a possible physiological role of 24,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J* 217:899-902
8. Henry HL, Norman AW (1978) Vitamin D: two dihydroxylated metabolites are required for normal chicken egg hatchability. *Science* 210: 835-837
9. Mahgoub A (1981) Interaction between 24R,25-dihydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol on ⁴⁵Ca release from bone in vitro. *Calcif Tissue Int* 33:663-666
- IO. Ornoy A, Goodwin D, NoffD, Edelstein S (1978) 24,25-Dihydroxyvitamin D is essential for bone formation. *Nature* 276:517-519
- II. Sömjen D, Binderman I, Weisman Y (1983) The effects of 24R,25-dihydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol on ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis in the epiphysis and diaphysis of rat bone and the duodenum. *Biochem J* 214:293-298

- I2. Tam CS, Heershe J, Jones G, Murray TM, Rasmussen H (1986) The effect of vitamin D on bone in vivo. *Endocrinology* 118:2217-2224
- I3. Wientroub S, Price PA, Reddi AH (1987) The dichotomy in the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ on bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein in serum and bone in vitamin D-deficient rats. *Calcif Tissue Int* 40:I66-I72
- I4. Wilhelm F, Ross Fp, Norman AW (1986) Specific binding of 24R,25-dihydroxyvitamin D₃ to chick intestinal mucosa: 24R,25-dihydroxyvitamin D₃ is an allosteric effector of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ binding. *Arch Biochem Biophys* 249:88-94
- I5. Manolagas SC, Deftos LJ (1981) Comparison of 1,25-, 25-, and 24,25-hydroxylated vitamin D₃ binding in fetal rat calvariae and osteogenic sarcoma cells. *Calcif Tissue Int* 33:655-661
- I6. Connerty HV, Briggs AR (1966) Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Pathol* 45(29)-296
- I7. Hagaman JR, Sanchez TV, Myers RC (1985) The effect of lactation on the mineral distribution profile of the rat femur by single photon absorptiometry. *Bone* 6:301-305
- I8. Rice E, Lapara CZ (1963) Rapid ultramicrospectrophotometric determination of magnesium. *Clin Chim Acta* 10:360-364
- I9. Hass GM, Tureheart RE, Taylor CB, Stumpe M (1958) An experimental histologic study of hypervitaminosis D. *Am J Pathol* 34:395-341
20. Schneider H, Steenbock H (1939) A low phosphorus diet and the response of rats of vitamin D₂. *J Biol Chem* 128:159-171
21. Gallager JA, Lawson DEM (1980) Histological observations on the failure of rachitic rat bones to respond to 1,25(OH)₂D₃. *Calcif Tissue Int* 31:215-223
22. Hartenbower DL, Stanley TM, Coburn JW, Norman AW (1977) Serum and renal histologic changes in the rat following administration of toxic amounts of 1,25(OH)₂D₃. In: Norman AW, Schaefer K, Coburn JW, DeLuca HF, Fraser D, Grigoleit HG, Herrath DV(eds) *Vitamin D: biochemical, chemical and clinical aspects related to calcium metabolism*. Walter de Gruyter, Berlin, pp587-589
23. Day GG, Follis RH (1941) Skeletal changes in rats receiving estradiol benoate as indicated by histological studies and determinations of bone ash, serum calcium and phosphatase. *Endocrinology* 28:83-93
24. Quelle ML, Miravet M, Bordier P, Redel J (1978) The action of vitamin D metabolites (25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃,

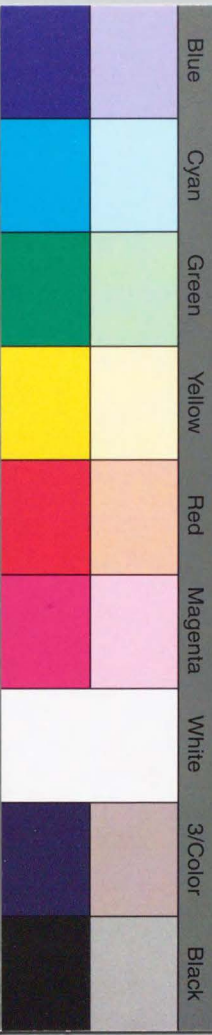
- 25,26(OH)₂D₃) on vitamin D-deficient rats. *Biomedicine* 28: 237-242
24. Foster GV, Doyle FH, Bordier PB, Matrajt J, Tun-Chot S (1967) Roentgenologic and histologic changes in bone produced by thyrocalcitonin. *Am J Med* 43:691-695
 26. Wase AW, Solewski J, Rickes E, Seidenberg J (1967) Action of thyrocalcitonin on bone. *Nature* 214:388-389
 27. Kalu DN, Pennock J, Doyle FH, Foster GV (1970) Parathyroid hormone and experimental osteosclerosis. *Lancet*(i):I363-I366
 28. Schenk R, Merz WZ, Huhlbauer R, Russell RGG, Fleisch H (1973) Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl₂MDP) on the calcification and resorption of cartilage metaphysis of rats. *Calcif Tissue Int* II:I96-2I4
 29. Urist MR, Budy AM, McLean FC (1950) Endosteal-bone formation in estrogen-treated mice. *J Bone Joint Surg* 32A:I43-I62
 30. Martin RB, Butcher R., Sherwood LL, Buckendahl P, Body RD, Farris D, Sharkey N, Dannucci G (1988) Effects of ovariectomy in beagle dogs. *Bone* 8:23-31
 31. Danucci GA, Martin RB, Patterson-Buckendahl P (1987) Ovariectomy and trabecular bone remodeling in the dog. *Calcif Tissue Int* 40:I94-I99
 32. Malluche HH, Faugere MC, Rush M, Friedler RM (1986) Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental Beagle dogs. *Endocrinology* II9:2649-2654
 33. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Kore M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR (1988) Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 241:81-83
 34. Eriksen EF, Colvar DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL (1988) Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast like cells. *Science* 241:84-86



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

