

200400317A

厚生科学研究補助金  
長寿科学総合研究事業

骨粗鬆症における  
テーラーメイド医療の確立に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 折茂 肇

平成17年3月31日

## 目次

### I. 総括研究報告書

#### 骨粗鬆症におけるテーラーメイド医療の確立に関する研究

折茂 肇----- 1

### II. 分担研究

#### ① *in vivo* 骨梁構造評価法の検討

伊東昌子-----14

#### ② 骨吸収マーカーとしての尿中・ $\beta$ -GTP 測定の意義

池田恭治-----24

#### ③ 骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定

浦野友彦-----28

#### ④ 骨量決定遺伝子に関する検討

細井孝之-----33

#### ⑤ 成人女性における過去のカルシウム摂取と現在の骨密度、および若年女性の カルシウム摂取と骨量の経年変化（2年間の介入研究）

上西一弘-----38

#### ⑥ 若年女性における骨粗鬆症の発症予防戦略 ー各種栄養摂取量・身体活動量と骨代謝状態に関する研究ー

太田博明-----50

#### ⑦ 骨粗鬆症における介入ポイントの決定と骨折危険因子の解析

白木正孝-----65

#### ⑧ 統計手法の基礎的検討：日常診療データを用いた骨粗鬆症薬併用効果の 時間依存性交絡を調整した解析

大橋靖雄-----81

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----90

## 総括研究報告書

### 骨粗鬆症におけるテーラーメイド医療の確立に関する研究

主任研究者 折茂 肇 健康科学大学学長

**研究要旨** 骨粗鬆症の予防と治療において、個人レベルでの最適化をおこなうための総合的研究を行なった。研究内容は、1. *in vivo* 骨梁構造評価法の検討、2. 骨吸収マーカーとしての尿中・ $\gamma$ -GTP 測定の意義、3. 骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定、4. 骨量決定遺伝子に関する検討、5. 成人女性における過去のカルシウム摂取と現在の骨密度、および若年女性のカルシウム摂取と骨量の経年変化（2年間の介入研究）、6. 若年女性における骨粗鬆症の発症予防戦略、7. 骨粗鬆症における介入ポイントの決定と骨折危険因子の解析、8. 統計手法の基礎的検討、にわけられる。本研究班で得られたこれらの研究をもとに、高齢化社会における骨粗鬆症の実態を踏まえた総合的な診療指針が得られることが期待される。

#### A. 研究目的

骨粗鬆症は骨量の病的減少が骨微細構造を破壊させ、易骨折性をもたらす疾患である。本症は高齢者人口の飛躍的な増加にともない、患者数の増加が著しい。脊椎圧迫骨折、前腕骨折、大腿骨頸部骨折などの骨折が本症の合併症であり、骨粗鬆症治療の目的はこれらを予防することである。近年、骨量、臨床所見や骨代謝マーカーなどを参考にした治療方針の決定、骨折発症の有無に関するフォローアップなどからなる骨粗鬆症診療の体系が構築されてきた。治療の方法は運動療法や食事療法からなる非薬物療法を基礎治療とし、それに薬物療法を加える。従来の治療効果の判定は、各治療を行った群間で比較され、個人差が存在することを考慮に入れていない。骨粗鬆症における治療効果には個人レベルでのばらつきが大きく、より効率のよい治療を進めるためにはテーラーメイド医療の立場から、これまでの治療法を再評価し、再構築することが必要である。本研究では骨粗鬆症における食事療法、薬物療法について個人レベルでの最適化をおこない、より効率のよい治療を行うための新しい診療体系を確立することを目的とする。

#### B. 方法

1. *in vivo* 骨梁構造評価法の検討：ヒト脊椎海綿骨の高解像度 CT 画像に基づいて得られた骨梁構造パラメーターの、脊椎圧迫骨折予知における有用性を検討するために臨床用の多列検出器を有する CT 装置 multi-detector row CT (MDCT) (Siemens SOMATOM Plus4 VolumeZoom) を用いた。最適撮像条件を決定するために、ヒト摘出椎体を対象に臨床用 CT とマイクロ CT でスキャンし、臨床用 CT 画像およびデータを gold standard であるマイクロ CT と対比させた。これには被曝線量の検討も同時に行った（以上は前年度までに施行）。種々の画像処理を行ったのち、骨梁構造解析を行った。臨床における骨梁構造パラメーターの有用性の検討として、骨折リスクの評価能に関して、従来の骨密度測定法 DXA と比較した。

さらに、より簡便に骨梁構造解析の可能な方法を検討する目的で、200 ミクロンの高解像度二次元 CT 画像に対して二次元的解析により得たパラメーターが、骨梁構造の変化を反映しうるか否かを検討した。脛骨骨密度を pQCT (Densiscan 1000) で測定し、遠位部海綿骨骨密度と骨幹部皮質骨主体の全骨密度を求め、遠位部と骨幹部脛骨 CT 画像（解

像度 200 ミクロン) も同時に得た。また、脊椎・踵骨 DXA および踵骨超音波測定 QUS も施行した。女性ホルモンの存在の有無による、運動の骨梁構造に対する効果の差違も検討した。脛骨骨密度を pQCT (Densiscan 1000) で測定し、遠位部海綿骨骨密度と骨幹部皮質骨主体の全骨密度を求め、遠位部と骨幹部脛骨 CT 画像 (解像度 200 ミクロン) も同時に得た。また、脊椎・踵骨 DXA および踵骨超音波測定 QUS も施行し、QUS は骨梁構造をどのように反映しているかについて検討した。

2. 骨吸収マーカーとしての尿中  $\gamma$ -GTP 測定の意義：骨吸収マーカーとしての尿中  $\gamma$ -GTP 測定の意義について検討を行った。国立長寿医療センター病院を 2003 年 4 月から 2004 年 8 月までに受診した閉経後骨粗鬆症患者において、アレンドロネート治療前後の尿中  $\gamma$ -GTP 排泄と I 型コラーゲン N 端テロペプチド (NTX) を測定した。 $\gamma$ -GTP 活性は、クレアチニン濃度で補正後、データ解析を行った。

3. 骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定：Wnt- $\beta$  カテニンシグナル伝達因子の遺伝子多型が骨量に与える影響ならびに骨芽細胞や破骨細胞における発現パターンに関して検討を行った。JSNP に報告のある Kremen1 遺伝子イントロン 1 における遺伝子多型ならびに、sFRP4 遺伝子エクソン内における Arg262 の SNP (CGC $\rightarrow$ CGT) に関して、genotype の分類を行った。閉経後女性 379 人を対象として BMD との関連を検討した。

4. 骨量決定遺伝子に関する検討：骨代謝関連遺伝子のうち、tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNSALP) 遺伝子を取りあげた。TNSALP は骨芽細胞の表面に存在し、石灰化部位へのリン酸、本遺伝子について、日本人集団における cSNP の探索、骨量との関連解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。変性 HPLC 法をもちいて TNSALP 遺伝子の 12 エクソンすべてについて SNPs の検索を行った。対象は日本国内のある地域において、

検診を目的に独歩で集合した高齢女性とした。骨量は dual energy X-ray absorptiometry (DXA) で前腕骨遠位端を測定した。TNSALP 遺伝子の多型性に対応する遺伝子産物を得るための発現ベクターを作成した。それぞれを COS 7 細胞に遺伝子導入し、発現させた後に形質膜分画を得た。このマイクロゾームを用いて alkaline phosphatase 活性を測定した。

5. 成人女性における過去のカルシウム摂取と現在の骨密度、および若年女性のカルシウム摂取と骨量の経年変化 (2 年間の介入研究)：成人女性を対象に過去のカルシウム摂取と現在の骨量の関係を検討した。対象者は長野県在住の女性 582 名で、平均年齢は  $64.6 \pm 10.4$  歳 (24~87 歳)。骨密度は DXA 法 (Lunar DPX-L) により測定し、初診時の数値を用いた。初経時、20 歳時、結婚時、現在の食事を簡易の食物摂取頻度調査により聞き取り調査し、過去のカルシウム摂取と現在の骨量の関係について検討した。ついで、8~21 歳の健康な女子大学生 96 名を対象に若年女性に 2 年間のカルシウム付加を行い、骨量の変化を観察した。対象者には 250ml 牛乳 1 本 (カルシウム量 270mg) あるいはカルシウム剤 (炭酸カルシウムとアスパラギン酸カルシウム、カルシウム量 270mg) のいずれかを選択させた。摂取状況は飲用記録で確認した。また 6 ヶ月ごとに食事調査を行い、カルシウム摂取状況を把握した。骨量測定は DXA 法で 1 年ごと、超音波法 (ルナー社、アキレス) にて 6 ヶ月ごとに行った。超音波法ではステフネス値を骨量の指標とした。

6. 若年女性における骨粗鬆症の発症予防戦略—各種栄養摂取量・身体活動量と骨代謝状態に関する研究—：本邦の女性におけるライフスタイルと骨の関係に対する evidence を構築するために、若年女性を対象とした横断的研究を実施した。18 歳以上 25 歳以下の女性 (健常人) を対象とした。年齢、

出生時体重・週数、初経年齢、現在の月経の状況、身長、体重、腰椎 L2-4 骨密度、大腿骨近位 total 骨密度、SUZUKEN LIFECORDER による歩数・運動強度、血清ならびに尿の骨代謝マーカーを測定した。さらに栄養素摂取量（食習慣）ならびに身体活動量調査を行った。

7. 骨粗鬆症における介入ポイントの決定と骨折危険因子の解析：新規脊椎骨折の発生頻度からみてもどの程度の骨密度レベルから介入を行うべきかを検討した。登録された骨粗鬆症患者は無作為に各種治療に割り付けられ、一方非骨粗鬆症患者は介入なしに経過観察されている。登録時には年齢、身長、体重、骨密度（腰椎）が測定され、脊椎レントゲン撮影が行われ、脊椎既存骨折の有無が検討されている。脊椎レントゲン撮影と腰椎骨密度は 1-2 年間隔でくり返され、新規骨折の発生の有無と腰椎骨密度の推移が検討されている。尿中 DPD は尿サンプルを加水分解後 HPLC にて測定した。新規骨折率の計算は総骨折数を観察期間で除した年人法で計算した。Cox 比例ハザードモデルを危険因子の新規骨折に対する効果の確認に用いた。カットオフ値の検定には diagnostic test の検定に用いる標準的な方法を用いた。

8. 統計手法の基礎的検討：日常診療データを用いた骨粗鬆症薬併用効果の時間依存性交絡を調整した解析：治療が 3 通り以上の場合に g 推定を行うためのモデルを提案すること、及び日常診療データを用いた骨粗鬆症治療薬の単剤及び併用療法の評価へ適用することを目的とした。対象者にはビスフォスフォネート製剤、活性型ビタミン D3 製剤、ビタミン K2 製剤、エストロゲン製剤が用いられていた。エンドポイントは、1 年あたりの新規骨折数であり、年人法に基づく新規骨折発生率を求めた。判定する部位は、大腿骨、橈骨、鎖骨などに発生する症候性の臨床骨折 6 箇所及び第 4 胸椎から第 5 腰椎に発生する無症候性及び有症状の脊椎骨折 14

箇所とした。脊椎骨折の判定は、Genant の半定量的骨折変形判定基準に基づいた。BMD の測定は、2 重エネルギー X 線吸収測定法を用いて、腰椎骨密度を 1 年毎に行った。生化学検査として血清カルシウム (Ca)、血清リン (P)、血清アルカリフォスファターゼ (ALP) が測定され、尿中 Ca 排泄率として尿カルシウム/尿クレアチニン比 (Ca/Cr 比) を用いた。骨吸収マーカーとして、デオキシピリジノリン、デオキシピリジノリン、I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドが測定され、これらはいずれも骨吸収の指標であるため、T-score 化（標準化）することで、1 つの骨吸収マーカーに併合して解析に用いた。

まず、予備的解析として、背景因子の分布と骨折発生の状況の集計、時間依存性交絡の検討を行った。本研究では特に BMD と既存骨折数とその候補と考えられたため、BMD と既存骨折数が薬剤選択に与える影響、BMD と既存骨折数が骨折の発生に与える影響及び薬剤が BMD に与える影響について、回帰モデルを用いた検討を行った。

BMD と既存骨折数が薬剤選択に与える影響の検討には、多項ロジスティック回帰を用いた BMD と既存骨折数が骨折の発生に与える影響の検討には、GEE-Poisson 回帰を用いた。薬剤が BMD に与える影響の検討には、対象者内相関を CS 構造により考慮した線型モデルを用いた。更に、g 推定による治療効果の推定を行い、GEE-Poisson 回帰及び通常の Poisson 回帰と比較した。

### C. 結果

1. *in vivo* 骨梁構造評価法の検討：骨折リスクの評価能を 1 標準偏差の変化量におけるオッズ比は、DXA より高値を示すパラメータも多く認められ、骨折リスクの評価には DXA 以上の感度であることが示された。また、骨梁構造パラメータと骨密度を併用すると、オッズ比は改善され、臨床において十分有用であると考えられた。バスケットボール

選手は対照群に比べて、皮質骨面積、全骨面積が有意に大きく、駅伝選手に比べて皮質骨面積が有意に大きかった。海綿骨骨梁構造に対しては、バスケットボール選手は対照群に比べて、構造がより複雑（緻密）で骨梁連結性が高かった。駅伝選手よりも骨梁連結性が高かった。駅伝選手はコントロールに対して、皮質骨面積が有意に大きかったが、その他には有意の変化は認めなかった。

エストロゲン欠乏状態における骨梁構造の変化を知るために、つまり閉経前対照群と閉経後対照群を比較すると、エストロゲン欠乏状態では腰椎・踵骨 BMD、QUS の低下のほか、骨梁連結性の低下、皮質骨面積の減少がみられた。エストロゲンの存在下において、バレーボール運動は腰椎・踵骨 BMD、QUS を増加させ、骨梁構造の複雑性・連結性を向上させた。皮質骨・全骨面積を有意に増加させ、外骨膜性骨増加をきたしたと考えられた。また、エストロゲン欠乏状態におけるバレーボール運動の刺激は、BV/TV、骨梁幅、骨梁連結性を維持し、皮質骨幅も維持した。

踵骨BMD、QUSとも加齢、体重と有意に強く相関するが、踵骨骨梁構造のなかで、BV/TV、骨梁形態(SMI)が加齢変化をよく反映していた。一方、BV/TV、骨梁の複雑性(fractal dimension)、骨梁形態(SMI)は体重と相関が高かった。どの測定値もBV/TVとは $r=0.5$ くらいの相関であった。全体的に、QUS parameterが骨梁構造との相関が高く、中でも、SMIとの相関が高かった。つまり骨梁の形態と関係が強いと考えられる。Stepwise regressionの結果では、BMDはTb. Sp, Euler数, BV/TVが有意に相関し、stiffnessはSMI, Tb. Th, Euler数と、SOSはSMI, Euler数、BUAはfractal dimension, SMI, Euler数と有意の相関を示した。

2. 骨吸収マーカーとしての尿中 $\gamma$ -GTP 測定の意義： 閉経後骨粗鬆症患者において、アレンドロネートによる治療の前後で、尿中デオキシピリジ

ノリンは、63%減少するのに伴って、尿中 $\gamma$ -GTP 排泄は、24%減少した。住民検診に参加した 551 人の閉経後女性において、確立された骨吸収のマーカーである尿中デオキシピリジノリンとクレアチニンで補正した尿中 $\gamma$ -GTP 排泄との間に強い相関が認められた ( $p<0.0001$ )。全体の尿中 $\gamma$ -GTP は  $35.1 \pm 51.1$  IU/g Cr、デオキシピリジノリンは  $6.5 \pm 8.7$  nmol/mmol Cr であった。明らかな骨吸収亢進のカットオフ値として、デオキシピリジノリンの  $7.6$  nmol/mmol Cr が定められているが、これを超える群の尿中 $\gamma$ -GTP 排泄は、 $85.7 \pm 95.0$  IU/g Cr であり、デオキシピリジノリンがカットオフ値以内におさまっている群の  $22.0 \pm 12.0$  IU/g Cr より有意に高値を示した。

3. 骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定： Kremen1 のイントロン 1 に存在する SNP に関して、T アレルを持つ群 (TT+CT;  $n=336$ ) では持たない群 (CC;  $n=43$ ) に比べ有意に骨密度が高いことを見出した (Total BMD Z score;  $0.33$  vs  $-0.13$ ;  $p=0.022$ , Lumbar Spine BMD Z score;  $-0.14$  vs  $-0.69$ ;  $p=0.022$ )。また、Secreted Frizzled Related Protein 4 (sFRP4) エクソン内の Arg262 の SNP (CGC  $\rightarrow$  CGT) に関して、T アレルを持つ群 (CT+TT;  $n=246$ ) では持たない群 (CC;  $n=133$ ) に比べ有意に腰椎骨密度が低いことを認めた (Z score;  $-0.33$  vs  $0.03$ ;  $p=0.023$ )。昨年度報告した遺伝子多型と骨量との間に相関があった LRP5 遺伝子と今回、骨量との相関が明らかになった sFRP4 ならびに Kremen1 の骨芽細胞 (osteoblasts) 分化に伴う mRNA レベルでの発現変化に関して検討を行った。その結果 LRP5、sFRP4 ならびに Kremen1 はともにその発現が培養開始後 16 日以降でピークを迎えることが明らかとなった。これは骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) 遺伝子の発現ピークとほぼ一致していた。一方、破骨細胞 (osteoclasts: OC) での LRP5、sFRP4 ならびに Kremen1 遺伝子の発

現は骨芽細胞に比して劇的に低下していた。

4. 骨量決定遺伝子に関する検討：TNSALP 遺伝子のエクソン内について SNP 検索を行った結果、4 つの SNP が検出された。このうちエクソン 7 のもの (787C>T) は 246 番目のアミノ酸である Tyr が His に置換する non-synonymous SNP であった。787C>T の遺伝子型分布はにそれぞれのホモが全体の約 4 分の一を、ヘテロがほぼ半数を占めるかなり common な多型性であった。高齢女性集団において前腕骨の骨量と 787C/T 多型性との関連を検討したところ、この集団の平均年齢である 74 才を境に年齢で層別した上で解析すると、74 才以上の集団では遺伝子型間で有意な骨量の差が見出された ( $p < 0.002$ )。787C または 787T の TNSALP 遺伝子について発現ベクターを作成し、COS 7 細胞に遺伝子導入した。遺伝子発現を確認した後、それぞれの細胞から plasma membrane 分画を調製した。これを酵素サンプルとし TNSALP の酵素活性を測定した。その結果、 $V_{max}$  には差がないものの、787C の  $K_m$  値は 787T に比較して有意に低かった。

5. 成人女性における過去のカルシウム摂取と現在の骨密度、および若年女性のカルシウム摂取と骨量の経年変化 (2 年間の介入研究)：骨密度区別のカルシウム摂取量は、Osteoporosis に分類される者では、初経時、20 歳時、結婚時のカルシウム摂取量が少なかった。40 歳代、50 歳代では Osteoporosis グループの若年時のカルシウム摂取量が少ない傾向にあるが、60 歳代以降では特に差は見られなかった。ステフネス値、全身骨塩量 (BMC) は有意な変動は見られなかった。

2 年間で骨密度が減少したグループと、増加したグループに分けてエネルギーおよび栄養素摂取状況、身体状況、骨代謝マーカーなどについて検討した。食事調査結果では、減少グループと増加グループで有意差が見られたのは、エネルギー、糖質、カルシウムであり、減少グループの摂取量が

少ない結果であった。カルシウム代謝関連指標を見ると、減少グループでは、PTH が高値、IGF-1、T3 が低値であった。

カルシウム摂取量が 700mg 以上である者 55 名のうち骨密度が減少した者が 33 名、一方増加していたものは 22 名であった。摂取量が多いにも関わらず骨密度が減少したグループでは PTH が有意に高値、IGF-1 と T3 の値が有意に低値であった。

6. 若年女性における骨粗鬆症の発症予防戦略—各種栄養摂取量・身体活動量と骨代謝状態に関する研究—：対象 282 例の平均年齢は  $20.7 \pm 1.5$  歳、BMI は  $21.3 \pm 2.7 \text{ kg/m}^2$  であり身長に比べ体重の分布の幅は広がった。身長、体重 (BMI)、出生時体重、iOC、コレステロール摂取量、過去の運動歴、現在の総エネルギーと骨密度に有意な相関関係が認められた。相関関係から選出された項目および過去の研究から骨密度との関係が想定される項目として、BMI、出生時体重、初経年齢、身体活動量、質問表の現在の総エネルギー、過去の運動歴、栄養素摂取量、カルシウム、コレステロール、ビタミン D、ビタミン K、カリウム、リン、マグネシウムを投入因子として選出した。なお栄養素は、総摂取エネルギーで除した値を投入した重回帰分析から、BMI、過去の運動歴、現在の活動総エネルギーが骨密度へ有意に影響していることが判明した。

骨密度は過去の運動における 1 回あたりの時間と有意な相関を示した。また、過去の運動種目の評価から、バスケットボール、ダンス、バレエと腰椎 L2-4 骨密度が、陸上 (中・長距離)、バスケットボール、卓球、ダンスと大腿骨 total 骨密度が相関することが確認された。

7. 骨粗鬆症における介入ポイントの決定と骨折危険因子の解析：対象のうち、骨粗鬆症 (OP) と診断されたものは 124 例 (22.3%)、骨減少 (PN) と診断されたものは 283 例 (51.0%)、骨密度正常 (NR) と診断されたものは 148 例 (26.7%) であった。診断は WHO

基準に従った。既存骨折はこのように骨密度 T-score で細分化してもなお骨密度が低下するほど既存骨折有病率が高まった。既存骨折を有する群では新規脊椎骨折発生率はもたない群に比べて新規脊椎骨折の発生率高く、かつ年齢および観察開始時骨密度と相関しなかった。一方、既存骨折がない群においては新規脊椎骨折の発生率には明らかな骨密度依存性と年齢依存性が観察され、骨密度階層別にみると-2.0-2.5SD 領域から、また年齢階層別にみると 65-69 才代から急激な骨折率の増加を観察した。これらの例では新規脊椎骨折発生リスクは極めて高く、新規骨折発生にいたる期間の中央値は 3-4 年であった。既存骨折がない群においては OP 群と PN(L) 群の骨折発生率が他群にくらべ高値であった。既存骨折をもたない群において新規脊椎骨折の発生に寄与する危険因子解析を Cox 回帰にて検討した。有意な危険因子であると抽出されたものは年齢、基礎骨密度、および対数変換した尿中 DPD 値であった。同様に時間変数を考慮できる Weibull モデルにて検討し、全く同様の危険因子が抽出された。また、骨密度の新規骨折予測率に対する効果はより高年齢で増幅される傾向があったが、低骨密度領域で新規骨折発生率はかえって低下する傾向を示した。新規脊椎骨折発生率は-2.0-2.5SD の領域で急速に立ち上がり、特に高齢者ほどその傾向は顕著であった。既存骨折がない症例においてどの程度の骨密度から介入を行うべきかを検討したところ、ROC 解析による AUC は年齢が 0.793、骨密度が 0.769、対数変換 DPD が 0.800 であった。従ってどの要因も介入ポイント決定に対し同程度の有効性を有すると考えられた。骨密度と年齢を同時にロジスティック解析したところ AUC は 0.844 となり、3つのパラメータを同時に用いた場合には AUC は 0.874 であった。従って3つのパラメータを同時に代入すればより有効な骨折介入ポイントが決定しうるものと考え

られた。骨密度の介入に関するカットオフ値を -2.0 t score とした場合の感度と特異度はそれぞれ 0.80 と 0.68 であり、それを-2.5 Tscore に引き下げても感度が 0.3 低下し、特異度が 0.17 上昇したに留まった。同様の検討を年齢と logDPD で行ったところ、年齢のカットオフ値は 70 才であり、log DPD のそれは 2 であった。

8. 統計手法の基礎的検討：日常診療データを用いた骨粗鬆症薬併用効果の時間依存性交絡を調整した解析：初回に投与された薬剤により 4 通りに分類した。本研究の対象集団は、閉経前の患者や骨減少症患者を含んでおり、多くの臨床試験で想定される集団より状態のよいものであった。また、初診時の治療で、既存骨折数が多く初診時 BMD が低い対象者に選択的に薬剤の投与が行われる傾向があり、初診時から追跡終了時への BMD の変化からビスフォスフォネートの BMD 増加作用が見られた。各対象者、各時点の BMD と既存骨折数を治療切り替えのパターンにより分類し、薬剤選択前、選択時、選択後の 3 時点について平均と標準偏差を求めたものである。薬剤選択前から薬剤選択時にかけて薬剤が選択される際の BMD と既存骨折数の推移が、薬剤選択後では治療切り替えの影響が示されている。少なくとも 1 種類の薬剤の投与が行われていた時点を投与、それ以外を非投与とし、切り替えパターンは、非投与→投与、非投与→非投与、投与→非投与、投与→投与の 4 通りとした。BMD の推移を見ると、薬剤の投与が行われた対象者では BMD が低く、治療開始に伴い上昇していることが分かった。また、治療が始まる前後で骨折数が増加しており、骨折の発生を契機に投与が始まる傾向が認められた。治療が中止になった対象者では、投与が継続された対象者に比べ、既存骨折数と BMD の状態がともによい。

BMD と既存骨折数は、薬剤の選択に有意に関連しており、更に、年齢と骨吸収マーカーが薬剤の決

定へ影響していた。すなわち、状態の悪い患者に治療を行う傾向があり、それは特にビスフォスフォネート投与で顕著であった。前時点の治療と時点は10%水準で有意であった。

骨折判定の1時点前のBMDと既存骨折数は、骨折の発生に有意に関係しており、骨折新規発生の強い予後因子となっていた。また、前時点のビスフォスフォネート、併用、年齢、ALP、骨吸収マーカー及び時点は10%水準で有意であった。

薬剤のBMDに与える影響について、回帰分析を行った結果の一部である。1時点前のビスフォスフォネート単剤投与または併用療法により、BMDは有意に上昇していた。このように治療の結果により変化する変数は、中間変数となっている可能性があり、回帰モデルの説明変数として用いたときに回帰パラメータを治療効果として解釈することは適切ではない。また、投与時の既存骨折数、初診時の既存骨折数、年齢、ALP、P及びCa/Cr比は10%水準で有意であった。以上の結果は、BMD、既存骨折数が交絡因子であり、かつ中間変数でもあることを示しており、本研究では時間依存性交絡が生じていると考えられる。

g推定の結果、ビスフォスフォネート単剤の非投与に対する率比は0.31であり10%水準で有意となった。また、併用療法の率比は0.24であり、この点推定値は他の治療より有効というものであるが、信頼区間は広く10%水準で有意とはならなかった。ビタミンD3の率比は0.66であり有意ではなかった。一方、通常のPoisson回帰、GEE-Poisson回帰、GEE-Poisson回帰の順に、治療効果が低く推定され、これらの回帰モデルに基づく推定値は全て、g推定の結果に比べ治療効果を過小評価する傾向にあった。

#### D. 考察

1. *in vivo* 骨梁構造評価法の検討：臨床用CT装置を用いてヒト脊椎骨梁構造を200x200x300

ミクロンで描出可能であった。本法による脊椎骨梁構造解析は、脊椎DXA以上のオッズ比を示した。その中でも、SMIとEuler数が高いオッズ比を示した。被曝線量(CTDI<sub>w</sub>=146.7)は決して低くはないが、閉経後女性においての年1-2回の検査では問題ないと考える。

2. 骨吸収マーカーとしての尿中 $\gamma$ -GTP測定の意義：尿中 $\gamma$ -GTP排泄は、生体内の骨吸収活性を反映することが示唆される。治療の指標としてはNTXほど鋭敏ではないと考えられたが、NTXをはじめとする骨代謝マーカーの測定は高価であり、現在のところ、治療方針決定の際と、治療後の効果判定の2回にしか保険適応が認められていない。また測定は検査会社に外注する場合はほとんどで、結果の通知には1週間程度かかるのが通例である。一方、 $\gamma$ -GTPは、自動測定装置を用いて短時間に多数の検体を処理することが可能でコストも比較的安価である。住民検診などに利用して、骨吸収が高まることにより骨折のリスクが大きい集団を一次スクリーニングするのに適しているよう。尿中 $\gamma$ -GTPの分子形態、骨由来の近位尿管刺激物質と排泄促進のメカニズムの解明が必要である。

3. 骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定：今回の解析からsFRP4やKremen1といったWnt・ $\beta$ カテニンシグナルを負に制御する因子が骨形成に大きく関与している可能性が考えられた。またこれら因子が初代培養骨芽細胞の系において分化のステージによってこの活性が変化していることが示唆された。これらは骨形成特異的な遺伝子マーカーを開発するにあたって有用な遺伝子群であることが示唆された。

4. 骨量決定遺伝子に関する検討：エクソン7の787T/C SNPはいわゆる機能的なSNPであり、その酵素としての特性の差を通して、高齢女性の骨量における個人差をもたらしていることが示唆された。Km値が低いことは、より少ない基質において

も効率よく反応が触媒されることを意味する。今回の結果は高齢女性の骨代謝におけるリン酸代謝の重要性を示唆するものでもあり、骨粗鬆症の予防と治療を目指した今後の研究に対して一つの方向性をしめすものと考えた。

5. 成人女性における過去のカルシウム摂取と現在の骨密度、および若年女性のカルシウム摂取と骨量の経年変化（2年間の介入研究）：今回の研究結果により、20歳未満に骨密度のピーク値があるものの、微視的な骨の代謝を観察すると決して完全な休止状態にはなっていないことが判明し、介入によっては20歳から25歳の期間でも骨密度増加の可能性が示唆された。また骨密度に対する影響因子としては、栄養素摂取量でなく、BMI、過去の運動歴、現在の活動総エネルギーであることが明確化された。

6. 若年女性における骨粗鬆症の発症予防戦略—各種栄養摂取量・身体活動量と骨代謝状態に関する研究—：また、身体活動に関する解析においては、過去の運動において一回あたりの実施時間が骨密度に影響すること、種目としてはバスケットボール等の過重負荷の発生する種目が効果的であることが判明した。20歳で休止することなく、その後も連続して運動を実施することが重要であろう。

今回の研究により、骨粗鬆症の発症を予防するためのライフスタイルの改善目標として、第一には、中学・高校の時点でのクラブ活動を通じたスポーツの励行が推奨された。特にその中でも実施時間の長い種目または加重的な種目への取り組みが高骨密度の獲得により効果的であると推測された。また20歳以降では、骨密度は一見して平常状態のごとく推移するが、形成・吸収とも動的な状態にあるため、スポーツの継続は推奨されるものと考えられる。しかしながら今回の検討は、横断的研究であり、20歳以降の介入の可能性に関しては明確な評価ができていない。今後、具体的な種目や時間・期間の提案のため、縦断的な調査を実施することが必須と考えられた。

7. 骨粗鬆症における介入ポイントの決定と骨折危険因子の解析：新規骨折リスクは年齢、骨折部位、および他の骨折リスクにより異なり、骨密度に無

関係にこれらリスク依存性に介入ポイントを決定しなくてはならないとされる。本 cohort 研究の最大の問題は2001年度以後、新規に登録された骨粗鬆症患者を無介入のまま経過観察することを禁止した点である。アレンドロネートのような強力な骨折予防薬が本邦に導入されたため、倫理面を考慮して無介入を禁止した。従って骨粗鬆症患者で無介入の例は症例数が限定され、かつ selection bias が存在している可能性が高い。Cox 回帰分析により新規脊椎骨折の危険因子として尿中 DPD 高値がとりあげられた意義は大きい。このことは新規骨折が骨密度や年齢要因ばかりでなく骨の質の問題をも包含している一つの証拠と考えられる。骨の質はいくつかの要因により規定されているが、現在臨床的に容易に評価しうるのは骨代謝マーカーによる骨代謝回転の評価のみである。骨密度の低下および年齢の上昇とともに新規脊椎骨折リスクは加速度的に高まった。ここでも骨密度が $-2.0$  T score を下回ると急速に骨折リスクが高まった。このモデルは今後ある個人のある期間内における骨折リスクを予測する際に有用であろう。

今回我々は新規骨折予防のための介入ポイントを $-2.0$  T score 付近にあげるべきであるとの提案を行いたい。しかしこのような基準は基準の内部精度を高めると同時に外部評価も行わなければならない。今回の検討から、日本人閉経後女性の介入ポイントについて新しい提案を行った。しかしこの提案はかならずしも診断基準のみなおしを提案するものではない。なぜならば、このカットオフ値はおそらく65才以上の老年女性にとって必要な基準であり、一方診断基準には全年齢に対する普遍的基準である必要があるからである。

8. 統計手法の基礎的検討：日常診療データを用いた骨粗鬆症薬併用効果の時間依存性交絡を調整した解析：本研究では、3通り以上の治療が繰り返行われている状況で時間依存性交絡を考慮するた

めの方法論として、g 推定の枠組みで、治療を受ける確率を多項ロジスティック回帰によりモデル化することを提案した。

予備的解析では、初期治療において BMD と既存骨折数による交絡が見られ、回帰モデルを用いた検討でもこれらの変数が時間依存性交絡因子となっていることが強く疑われた。また、時間依存性交絡を適切に扱っていないとされる GEE-Poisson 回帰による解析では、g 推定の結果と比べても、これまでの臨床試験のリスク比 0.3 から 0.6 という結果と比較しても、過小評価の傾向が見られた。これは、本研究で g 推定などの時間依存性交絡を考慮した解析を行う必要があったこと、GEE などの回帰モデルに基づく交絡の調整ではバイアスが生じることを示唆していると考えられる。ただし、提案した手法の性能評価は行っていないため、g 推定による推定値の小標本での挙動や GEE におけるバイアスの定量的評価については、シミュレーションなどによる検討を行う必要がある。

また、多項ロジスティック回帰を用いるために、治療を初診時から 1 年毎に単純化して解析を行った。定期的を受診が行われていること、治療が 1 年に何度も切り替わることはないことから、時点を 1 年毎とすることに問題はないと考えられる。Robins らは、生存時間解析の枠組みで、治療時点があらかじめ決まっているような状況を離散時間、治療時点が決まっていない状況を連続時間と呼び、連続時間の状況で g 推定を行うために、Cox 回帰を用いて治療が行われるまでの時間をモデル化することを提案している。本研究では、日常診療データに基づいて、ビスフォスフォネート、ビタミン D3 の単剤及び併用療法の評価を行い、ビスフォスフォネート単剤は、非投与に比べ骨折を抑制することが示された。本研究は、対象集団はやや異なるものの、エンドポイントや追跡期間は海外の大規模臨床試験と同様のものとなっている。ビスフ

ォスフォネート単剤の結果は、それらの先行する試験に近いものとなっており、骨折をエンドポイント、日本人を対象とした試験結果はこれまで報告されていないため、海外の試験成績と同様の治療効果が確認されたことは、意義のあることと考えられる。また、ビスフォスフォネートとビタミン D3 の併用療法については、信頼区間は広いものの、点推定値は最も治療効果が高いという結果となった。これまでの臨床的または薬理的な議論でも併用療法の有用性は指摘されている。カルシウム欠乏症などの栄養状態の悪い患者への併用療法や、ビスフォスフォネートの長期使用に伴う効果の減少や副作用が現れた場合のビタミン D3 の補助的追加などが有効と思われる。

治療効果の推定結果に影響を与える要因として、打ち切りとコンプライアンスが考えられ、今後の検討を要する。更に、本研究のような観察研究では、ランダム化が行われていないため、no unmeasured confounder の仮定の下でしか治療効果を推定することはできない。この仮定はデータから検証することは不可能であり、そのもつともらしきは臨床的観点から判断するしかない。本研究でも、未測定の変数によるバイアスの可能性は残されている。しかし、日常診療では、多くの因子が治療方針の決定に関係していたとしても、実際に治療を行っている医師はそれらの因子がどのように薬剤の選択に関係しているかを把握しているはずである。本研究のデータは 1 人の医師による日常診療のものであり、当該医師との議論により交絡因子の候補を選択しているため、疾患の予後因子を探索する状況に比べ、治療を受ける確率のモデルは信頼できるとと思われる。

本研究では未測定の変数や打ち切り、コンプライアンスなどの問題があり、十分に管理された臨床試験レベルのエビデンスを得ることは不可能である。しかし、現在得られている骨粗鬆症

薬に関する知見を考えると、本研究の結果は現段階での骨粗鬆症治療の方向性を示すものと考えられる。また、g 推定と既存の手法を比較した結果は、時間依存性交絡を考慮した解析が観察研究で必要であることが示唆している。提案した手法は広く応用することが可能と思われ、本研究は新しい方法論の提案としての意義を有するものであろう。

#### E. 結論

二次元・三次元CT画像を用いた骨梁構造解析は臨床応用可能であり、骨折リスクの評価や骨病態解明において有用であると考えられた。クレアチニン値で補正した尿中 $\gamma$ -GTP 排泄量は、生体内の骨吸収活性を反映し、住民検診などでのスクリーニングに応用できる可能性がある

骨形成を特異的に制御する遺伝子群である Wnt  $\beta$  カテニンシグナル制御因子のなかからその遺伝子多型が閉経後女性の骨量を規定する遺伝子として、昨年報告した LRP5 に加え新たに Kremen1 ならびに sFRP4 を見出した

骨密度に対しては40歳～59歳までは若年時のカルシウム摂取量が影響を与えている可能性が強いが、60歳以降になるとカルシウム摂取よりも加齢の影響がより大きくなると考えられる。若年時の骨量の増加、維持にはカルシウム代謝および骨代謝関連ホルモン以外にも、IGF-1 や T3 が関与している可能性が示された。カルシウム吸収率が低いと考えられる場合には、積極的なビタミン D の摂取を行うことも必要であろう。

若年期の骨密度に対する影響因子を明確化するため、ボランティア女性を対象に、栄養素摂取量・身体活動と骨密度・代謝の状態を確認した。その結果、骨密度は20歳以前にピークを迎えるもののその代謝は動的であること、および身体活動が中心となって骨密度を規定していることが判明した。

脊椎新規骨折の危険因子につき無治療閉経後女

性例について検討した。既存骨折の存在はそれだけで、骨密度や年齢と無関係に強い新規骨折のリスクであった。既存骨折のない例においては年齢、骨密度および尿中 DPD が有意な骨折リスクとしてとりあげられた。骨密度からみた介入ポイントは診断ポイントである-2.5 T score よりも高値 (-2.0 T score) においたほうが新規骨折の予測効率がよかった。

3 通り以上の繰り返し治療がある状況で時間依存性交絡を考慮するための方法論として、g 推定の枠組みで、治療を受ける確率を多項ロジスティック回帰によりモデル化することを提案した。また、提案した手法を用いて、日常診療データからビスフォスフォネート、ビタミン D3 の単剤及び併用療法の新規骨折発生率への治療効果を推定した結果、ビスフォスフォネート単剤は非投与に比べ骨折を有意に抑制することが示され、ビスフォスフォネートとビタミン D3 の併用療法が有効であることが示唆された。

#### 研究発表

##### (1) 出版物

伊東昌子. 骨梁構造と骨力学特性についての最近の知見. 整形外科 55: 833-840, 2004

大橋靖雄: 臨床統計学・臨床試験を中心として. 数理科学 2004; 3(489): 60-67.

大橋靖雄: 日本の医療情報伝達分野における問題点. 薬理と治療 2004; 32(10): 707-710.

Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, et al.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase stimulates RANKL expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor.

J Biol Chem 279: 5752-5756, 2004

Kondo K, Ikeda K, Matsuo K: Detection of osteoclastic cell-cell fusion through

- retroviral vector packaging.  
Bone 35:1120-1125, 2004
- Urano T, Shiraki M, Ezura Y, et al. Association of a single nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. J. Bone Miner. Metab. (in press)
- Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, et al. EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer. Int. J. Cancer 2003; 106: 310-315.
- Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S. Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2003; 85: 101-104.
- Aoki T, Inoue S, Imamura H, et al. EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. Eur. J. Cancer 2003; 39: 1552-1561.
- Goseki-Sone M, Sogabe N, Fukushi-Irie M et al. Functional analysis of the single-nucleotide polymorphism (787T>C) in tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene associated with bone mineral density. J Bone Miner Res in press
- Sawabe M, Arai T, Kasahara I, et al. Tokyo Metropolitan Geriatric Medical Center; Japan Science and Technology Agency Developments of geriatric autopsy database and Internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). Mech Ageing Dev. 2004 Aug;125(8):547-52.
- Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, et al. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. J Neuropathol Exp Neurol. 2004 Jul;63(7):742-9.
- Ezura Y, Kajita M, Ishida R, et al. Association of multiple nucleotide variations in the pituitary glutaminy cyclase gene (QPCT) with low radial BMD in adult women. J Bone Miner Res. 2004 Aug;19(8):1296-301.
- Urano T, Shiraki M, Ezura Y, et al. Association of a single-nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. J Bone Miner Metab. 2004;22(4):341-5.
- Kazama H, Ruberu NN, Murayama S, et al. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with neurofibrillary tangles. Dement Geriatr Cogn Disord. 2004;18(2):145-50.
- Horiuchi T, Kazama H, Araki A, et al. Impaired gamma carboxylation of osteocalcin in elderly women with type II diabetes mellitus: relationship between increase in under-carboxylated osteocalcin levels and low bone mineral density. J Bone Miner Metab. 2004;22(3):236-40.
- Fukunaga M, Nakamura T, Shiraki M, et al. Absolute height reduction and percent height ratio of the vertebral body in incident fracture in Japanese women. J Bone Miner Metab. 2004;22(2):104-10
- Muraki S, Yamamoto S, Ishibashi H, et al. Impact of degenerative spinal diseases on bone mineral density of the lumbar spine in elderly women. Osteoporos Int. 2004 Sep;15(9):724-8.
- Sone H, Yoshimura Y, Ito H, Ohashi Y, et al: Energy Intake and Obesity in Japanese Patients with Type 2 Diabetes. The Lancet 2004; 363(9404): 248-249.

Sone H, Yamada N, Mizuno S, Ohashi Y, et al: Requirement for Hypertension and Hyperlipidemia Medication in U.S. and Japanese Patients with Diabetes. The American J. of Medicine 2004; 117(1):711-712.

Sone H, Yamada N, Mizuno S, Ohashi Y.: Alcohol Use and Diabetes Mellitus. Annals of Int. Medicine 2004; 141(5):408-409.

Sone H, Yamada N, Mizuno S, Ohashi Y.: Type 2 Diabetes Prevalence in Asian Subjects. Diabetes Care 2004; 27(5):1251-1252.

## (2) 口頭発表

### 国際学会

Masako Ito, Akifumi Nishida, Masataka Uetani, et al. Assessment of bone quality using micro-CT and synchrotron CT. The 8<sup>th</sup> Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy, 2004.6.7, Kanazawa

Masako Ito Assessment of bone structure and biomechanical strength using micro-CT. The 1<sup>st</sup> Asian Pacific Congress of Bone Morphometry, 2004.6.26, Kagawa

Masako Ito, Kyoji Ikeda, Masahiko Nishiguchi, et al. Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for evaluation of fracture risk. Second Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society, 25-29 June 2005, Geneva, Switzerland (発表予定)

Hiramatsu K, Tatsumi S, Nimura Y, et al. GGT (gamma-glutamyltranspeptidase) as a pathogenic factor of bone loss. The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10月1日-10月5日 Seattle, Washington, USA.

Urano T, Fujita M, Hoshino S et al. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5* Gene with Bone Mineral Density (2003. 11. 24-28) The 7<sup>th</sup> Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology (Tokyo, Japan)

Fujita M, Urano T, Horie K, et al. Estrogen Activates Cyclin-Dependent Kinases 4 AND 6 through Induction of Cyclin D in Rat Primary Osteoblasts (2003. 6. 3-7) 1st Joint Meeting of International bone and mineral society (IBMS) and the Japanese society for bone and mineral Research (JSBMR) 2003 (Osaka, Japan)

### 国内学会

伊東昌子 骨粗鬆症の画像診断

第23回日本画像医学会、2004.2.20、東京

伊東昌子、西田暁史、河野順、ほか

骨折リスク評価における *in vivo* 骨梁構造計測の検討 第22回日本骨代謝学会学術集会、2004.8.6、大阪

平松聖史, 辰巳佐和子, 新飯田俊平, 伊東昌子, 仁村雄次、池田恭治:  $\gamma$ -GTP と骨・カルシウム代謝、第41回日本臨床分子医学会、7月16、17日、福岡

平松聖史, 辰巳佐和子, 高須 尚、新飯田俊平, 伊東昌子, 仁村雄次、池田恭治:  $\gamma$ -GTP を過剰発現するマウスにおける骨粗鬆症、第22回日本骨代謝学会、8月4-7日、大阪

池田恭治: 骨粗鬆症の病因を分子レベルから探る、第6回日本骨粗鬆症学会 特別講演、大宮、11月20日、2004

浦野友彦、星野真二郎、白木正孝、ら: 骨粗鬆症における LRP5 遺伝子の関与(2003. 6. 18-20) 第45回日本老年医学会 (名古屋)

藤田雅代、浦野友彦、堀江公仁子ら 骨芽細胞に  
おけるエストロゲンの分子標的の探索と機能解析  
(2003. 12. 10-13) 第26回日本分子生物学会年会  
(神戸)

伊東昌子 骨量・骨質からみた骨力学特性の研究  
第4回岐阜骨粗鬆症フォーラム、2004. 2. 28、岐阜

伊東昌子 骨粗鬆症における骨量と骨質とは 第  
3回骨折予防とビスフォスフォネート研究会、  
2004. 8. 26、高知

伊東昌子 骨粗鬆症治療からみた骨量と骨質につ  
いて 第12回香川オステオポロシス研究会、  
2004. 11. 13、高松

知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

*in vivo* 骨梁構造評価法の検討

分担研究者 伊東昌子（長崎大学医学部・歯学部附属病院 放射線部助教授）

研究要旨

今年度の研究成果は、1) 2年間で構築した臨床用 CT による *in vivo* 脊椎骨梁構造解析システムを用いてヒト脊椎の骨梁構造解析パラメータを求めたが、そのパラメータは骨折リスク評価において骨密度測定法 DXA に比べて著しく優れていることを確認した。2) 簡便な *in vivo* 骨梁構造解析法として、二次元 CT 画像データを用いて同様の解析を施行し、女性ホルモン欠乏状態や運動における骨梁構造の変化を捉えることができた。3) 骨質を反映していると考えられている超音波測定法(QUS)が、どの程度に骨梁構造を反映しているかを検討した。QUS は骨密度測定法 DXA 以上に骨梁構造と強く関連していた。

はじめに

2000 年 NIH コンセンサスステートメントでは、骨強度は骨密度と骨質（骨梁構造、骨代謝回転、微小骨折、石灰化など）の両者で規定されていると提唱された。しかし現状として、骨粗鬆症に伴う骨折リスクの評価は骨密度測定のみで行われ、骨質を *in vivo* で評価する手法は確立されていない。骨質の1つで骨強度に大きく関与すると考えられている骨梁構造は、数年来マイクロCTを用いて *in vitro* において評価されてきたが、それで得られるデータは骨強度と有意に相関することが知られている。マイクロCTと同等の空間分解能を臨床において *in vivo* に得ることは不可能であるが、近年の多列検出器を有する臨床用 CT 装置(multi-detector row CT=MDCT)では、かなり高い解像度の画像を提供できるようになった。そこで、我々は、MDCT を用いてヒト脊椎骨梁構造を描出し、そのデータの解析によって骨梁構造パラメータを算出する

システムを構築した。これには被曝線量の算出も行い、臨床検査として問題がないことも確認した。次いでこの方法により求めた骨梁構造パラメータがどのように臨床に役立つかを、骨折リスクの評価において検討した。

また臨床における汎用性を考慮すると、より簡便な評価法として二次元 CT 画像の解析は望ましい。通常の診療用 CT 装置で得られる 200 ミクロンの解像度を持つ CT 画像を、上記の解析システムを用いて解析し、骨梁構造の変化を捉えることが可能であるか否かを検討した。これには、高校女子生徒のバスケットおよび駅伝選手（いずれも全国レベル）と運動部に属していない女子生徒の下腿（脛骨）CT 画像を得て解析し、運動による骨梁構造の違いを検討した。また閉経前・後のママさんバレー選手においても同様な脛骨 CT 画像を得て解析し、女性ホルモンの有無における運動の骨梁構造に対する効果を検討した。これより二次元 CT 画像による骨梁構造の評

価法が、変化を抽出する感度を有するか否かを知ることができる。

最後の検討として、超音波測定法 QUS と骨梁構造の関係を検討した。QUS は骨密度のほか骨質を反映した測定法として知られ、広く普及しているが、どの程度に骨梁構造を反映しているかについては、これまで摘出骨を用いた報告のみで臨床例での報告はない。そこで、QUS、踵骨 DXA と踵骨 CT 画像が得られた女性データを対象に、QUS 値と骨密度・骨梁構造パラメータの関係を検討した。これは今後 QUS 値の解釈において何らかの示唆を与える可能性も考えられる。

#### 研究テーマ 1：ヒト脊椎骨梁構造解析の骨折リスク評価における有用性

##### A. 目的

ヒト脊椎海綿骨の高解像度 CT 画像に基づいて得られた骨梁構造パラメータの、脊椎圧迫骨折予知における有用性を検討する。

##### B. 研究方法

###### 1. データ収集

データの収集には、臨床用の多列検出器を有する CT 装置 multi-detector row CT (MDCT) (Siemens SOMATOM Plus4 VolumeZoom) を用いた。最適撮像条件を決定するために、ヒト摘出椎体を対象に臨床用 CT とマイクロ CT でスキャンし、臨床用 CT 画像およびデータを gold standard であるマイクロ CT と対比させた。これには被曝線量の検討も同時に行った (以上は前年度までに施行)。空間分解能 200 x 200 x 300 ミクロンの骨梁構造 CT 三次元画像の取得を可能にした。

###### 2. データ解析

CT データは DICOM データとして PC に取り込み、RATOC 社製 TRI/3D-BON を用いて、種々の画像処理 (Median filter、ROI 設定、binarization、labeling) を行ったのち、骨梁構造解析を行った。

骨梁構造パラメータには、次のようなものがある。

bone volume fraction (BV/TV) : 組織量に対する骨量比

trabecular thickness (Tb.Th) : 骨梁幅

trabecular number (Tb.N) : 骨梁数

trabecular separation (Tb.Sp) : 骨梁間距離

fractal dimension : 構造の複雑性を定量化するパラメータ

structure model index (SMI) : 骨梁形態 (棒状・板状) を定量化するパラメータ

degree of anisotropy (DA) : 骨梁の方向性を定量化するパラメータ

connectivity density : 骨梁の連結性を定量化するパラメータ

###### 3. 被曝線量の検討

被曝線量を検討した結果は、120kV、300mAs の撮像条件で Slice-thickness=0.5mm、scan-length=71mm、feed/rotation=0.8 で、CTDI<sub>w</sub>: weighted computed tomography dose index は、77.1 mGy であった。

###### 4. 骨折リスク評価の検討の対象と方法

臨床における骨梁構造パラメータの有用性の検討として、骨折リスクの評価能に関して、従来の骨密度測定法 DXA と比較した。対象は、閉経後女性で骨折既往のない 33 例

と骨折既往のある 31 例であり、第 3 腰椎を MDCT で撮像し、上記方法で骨梁構造パラメターを求めた。

#### C. 結果

図 1 に骨折のない 62 歳女性（左）と骨折既往のある 62 歳女性（右）の腰椎の二次元・三次元骨梁構造 CT 画像を示す。

骨折リスクの評価能を 1 標準偏差の変化量におけるオッズ比として算出した結果を表 1 に示す。骨密度測定法 DXA のオッズ比は 5.3 (95%IC: 1.6-17.2) であるのに対して、SMI 13.9 (3.5-55.3), Euler 数 13.7 (4.1-46.7), Tb.N 6.8 (2.2-20.5), Tb.Sp 6.8 (2.2-20.5), Tb.Th 4.0 (1.1-14.3), DA 4.0 (1.1-14.3) であり、DXA より高値を示すパラメターも多く認められ、骨折リスクの評価には DXA 以上の感度であることが示された。

また、骨梁構造パラメターと骨密度を併用すると、オッズ比は改善され、臨床において十分有用であると考えられた。

#### D. 考察と結論

臨床用 CT 装置を用いてヒト脊椎骨梁構造を 200x200x300 ミクロンで描出可能であった。本法による脊椎骨梁構造解析は、脊椎 DXA 以上のオッズ比を示した。その中でも、SMI と Euler 数が高いオッズ比を示した。

被曝線量 (CTDI<sub>w</sub>=146.7) は決して低くはないが、閉経後女性においての年 1~2 回の検査では問題ないと考える。

#### 研究テーマ 2: 2D *in vivo* 骨梁構造計測の有用性

(1) 運動負荷の違いによる皮質骨と海綿骨骨梁構造の差異について

##### A. 目的

より簡便に骨梁構造解析の可能な方法を検討する目的で、200 ミクロンの高解像度二次元 CT 画像に対して二次元的解析により得たパラメターが、骨梁構造の変化を反映しうるか否かを検討する。

##### B. 対象と方法

高校女子生徒 (16~17 歳) で、全国レベルのバスケットボール選手 10 名 (体重: 60.4 ± 5.1、身長: 166.1 ± 4.9)、同じく全国レベルの駅伝選手 8 名 (体重: 47.9 ± 3.4、身長: 160.5 ± 4.2) と、対照群として 運動部に所属していない女子 9 名 (体重: 49.3 ± 4.0、身長: 156.2 ± 5.3) を研究対象とした。脛骨骨密度を pQCT (Densiscan 1000) で測定し、遠位部海綿骨骨密度と骨幹部皮質骨主体の全骨密度を求め、遠位部と骨幹部脛骨 CT 画像 (解像度 200 ミクロン) も同時に得た。また、脊椎・踵骨 DXA および踵骨超音波測定 QUS も施行した。腰椎 DXA は EXP5000、踵骨 DXA は HeelScan、QUS は A-1000+ を用いて測定した。

##### C. 結果

図 2 に、3 群の代表的な二次元 CT 画像を示す。表 2 に、3 群の骨密度・超音波測定値、2D 骨梁構造パラメターの比較とその有意差を示す。

バスケットボール選手は対照群に比べて、皮質骨面積、全骨面積が有意に大きく、駅伝選手に比べて皮質骨面積が有意に大きかった。海綿骨骨梁構造に対しては、バスケットボール選手は対照群に比べて、構造がより複雑 (緻密) で骨梁連結性が高かった。駅伝選手より

も骨梁連結性が高かった。駅伝選手はコントロールに対して、皮質骨面積が有意に大きかったが、その他には有意の変化は認めなかった。

#### D. 考察

バスケットボールも駅伝も下腿に強い負荷のかかるスポーツであるが、衝撃の程度に差があると考えられ、より衝撃の強いバスケットボールの方が皮質骨面積、全骨面積は有意に大きく、また骨梁構造の複雑性や連結性に優れていた。

#### (2) 皮質骨と海綿骨骨梁構造における女性ホルモンと運動の影響について

##### A. 目的

より簡易に骨梁構造解析の可能な方法を検討する目的で、200 ミクロンの高解像度 CT 画像に対して、二次元的解析を行い求められたパラメーターが骨梁構造の変化を反映しうるか否かを検討する。女性ホルモンの存在の有無によって、運動の骨梁構造に対する効果の差違を検討する。

##### B. 対象と方法

ママさんバレーボール選手 34名と年齢・月経状況を一致させた対照女性 44名を研究の対象とした。ママさんバレーボール選手には閉経前女性 24名・閉経後女性 10名、対照女性には閉経前女性 21名・閉経後女性 23名を含む。対照群の年齢、閉経時年齢、体重、身長を表3に示す。

脛骨骨密度を pQCT (Densiscan 1000) で測定し、遠位部海綿骨骨密度と骨幹部皮質骨主体の全骨密度を求め、遠位部と骨幹部脛骨 CT 画像(解像度 200 ミクロン)も同時に得た。また、脊椎・踵骨 DXA および踵骨超音波測定 QUS も施行した。腰椎 DXA は EXP5000、踵

骨 DXA は HeelScan、QUS は A-1000+ による。

#### C. 結果

図3に、3群の代表的な二次元 CT 画像を示す。表3に、3群の骨密度・超音波測定値、2D 骨梁構造パラメーターの比較とその有意差を示す。

エストロゲン欠乏状態における骨梁構造の変化を知るために、つまり閉経前対照群と閉経後対照群を比較すると、エストロゲン欠乏状態では腰椎・踵骨 BMD、QUS の低下のほか、骨梁連結性の低下、皮質骨面積の減少がみられた。エストロゲンの存在下において、バレーボール運動は腰椎・踵骨 BMD、QUS を増加させ、骨梁構造の複雑性・連結性を向上させた。皮質骨・全骨面積を有意に増加させ、外骨膜性骨増加をきたしたと考えられた。また、エストロゲン欠乏状態においてのバレーボール運動の刺激は、BV/TV、骨梁幅、骨梁連結性を維持し、皮質骨幅も維持した。

#### D. 考察

エストロゲン欠乏によって皮質骨内膜面に骨吸収が生じて皮質骨は菲薄化する。運動負荷は、エストロゲンの存在下で外膜面に骨形成を促進し、エストロゲン欠乏状況では、内膜面骨吸収を抑制すると考えられる。

エストロゲン欠乏によって骨梁連結性は低下する。運動負荷は、エストロゲンの存在下で連結性を増加させ、エストロゲン欠乏状況では維持に働く。骨梁幅の減少予防にも働くと考えられた。

今回は直接荷重が強くなる頸骨を対象に検討したが、それよりも荷重の程度の低い脊椎などでは同じような効果が得られるか否かについては、今後検討の必要がある。

## <研究テーマ2についてのまとめ>

*In vivo* 二次元骨梁構造解析（空間分解能 200 ミクロン）により、臨床的な骨梁構造の評価は可能と考えられた。ただし、その限界については確認されていない。

## 研究テーマ3:超音波測定法 QUS は本当に骨梁構造を反映しているか

### A. 目的

QUS は骨質を反映した測定値といわれているが、それを裏付ける *in vivo* データは少ない。われわれは QUS 値と踵骨 MDCT による骨梁構造パラメータの関係を求め、QUS は骨梁構造をどのように反映しているかについて検討した。

### B. 対象と方法

閉経後女性 65 例（年齢 65.3±6.4、閉経時年齢 49.8±3.5）を対象に、踵骨を MDCT (200x200x300 micron)により水平断像を求め、脊椎での評価と同様に三次元骨梁構造を解析した。求めた骨梁構造パラメータは前述した通りである。MDCT による踵骨計測部位を図 4 に示す。同時に、踵骨 DXA と超音波測定 QUS も求めた。踵骨 DXA は HeelScan、QUS は A-1000+による。

### C. 結果

#### (1) 骨梁構造パラメータと年齢・体重との相関（表 4）

踵骨 BMD、QUS とも加齢、体重と有意に強く相関するが、踵骨骨梁構造のなかで、BV/TV、骨梁形態(SMI) が加齢変化をよく反映していた。一方、BV/TV、骨梁の複雑性(fractal dimension)、骨梁形態(SMI)は体重と相関が高かった。

#### (2) 踵骨骨密度、QUS と骨梁構造パラメータとの相関（表 5）

どの測定値も BV/TV とは  $r=0.5$  くらいの相関であった。全体的に、QUS parameter が骨梁構造との相関が高く、中でも、SMI との相関が高かった。つまり骨梁の形態と関係が強いと考えられる。Stepwise regression の結果では、BMD は Tb.Sp, Euler 数, BV/TV が有意に相関し、stiffness は SMI, Tb.Th, Euler 数と、SOS は SMI, Euler 数、BUA は fractal dimension, SMI, Euler 数と有意の相関を示した。

### D. 考察

QUS パラメータの方が DXA よりも、骨梁構造との相関が高かった。DXA は骨梁間距離、Euler 数、BV/TV と、QUS は SMI、Euler 数と相関が高かった。これらの結果は、今後 QUS 値の解釈において、何らかの示唆を与える可能性が考えられる。

### E. まとめ

二次元・三次元 CT 画像を用いた骨梁構造解析を行った。得られるパラメータは臨床応用可能であり、骨折リスクの評価や骨病態解明において有用であると考えられる。

骨梁構造解析には、MRI を用いた方法が国際的に報告されているが、信号—ノイズ比が小さいため、データ収集に時間がかかること、表面コイルを用いてデータ収集が可能であるが、躯幹骨のような深部の骨評価ができない、という問題点がある。その点において、CT ではデータ収集時間は著しく短く、躯幹骨の描出は問題なく可能である。CT を用いた骨梁構造解析法の問題としては被曝線量が比較的高いことにある。しかしながら骨粗鬆症を対象とした場合、閉経後女性において年 1-2 回の検査としては問題ないとする。