

表3各治療方法別骨密度 3 年目変化率の分布
(パーセンタイル)

Q	No	VD3	VK2	CEE	EHDP	BP
25%	-7.0	-6.0	-6.3	-0.3	-0.7	6.1
50%	-3.7	-1.3	-2.5	4.1	3.1	9.7
75%	-0.3	2.7	-0.2	9.1	7.2	16

第一の方法に従って薬効を評価する場合、腰椎骨密度測定精度は一般的に±3%程度と考えられているので、+3%以上の変動を認めた場合を有効とし、-3%以下を無効、その中間は維持と判定する場合が一般的である。本研究においても、この基準をまず採択した（機器精度判定）。

第二の方法に準じて有効、無効を論ずる場合、表 1-3 に示したようなデータベースが活用できる。即ち、無治療群の 75percentile 値以上の変動を示せば、少なくとも無治療群における骨密度の低下は阻止できたと考えられるので、1-3 年間のいずれの時点でもそれに対応する対照群の 75percentile 値以上をもって有効と判断した(対対照判定)。

表 1-3 において明らかなことは各骨粗鬆症治療薬の骨密度に対する効果は薬剤により大きく異なる。ゆえに第一から第二の方法のように相互の有効性を比較できる方法の他にある薬剤投与例のなかで相対的にみて有効であるか否かを検討するための判定基準も必要となる。従って、第三の判定方法としては当該

薬剤の骨密度効果の分布から 25percentile 以下を無効、25-75percentile 間に含まれる例を有効、75percentile 以上を示す例を著効と判定することとした(薬剤内判定)。表 4 には機器精度判定の基準値を、表 5 には対対照群判定基準を、また表 6 には薬剤内判定基準をまとめた。

表 4 機器精度判定基準

効果	無効	維持	有効
精度判定	-3.1% 以下	±3% 以内	+3.1% 以上

表 5 対対照群判定基準(1年)

効果	無効	有効
対対照	+1.3% 以下	+1.31% 以上

表6では本来、観察期間ごとに基準値をしめさなければならないが、煩雑なので一年目のそれのみ示した。

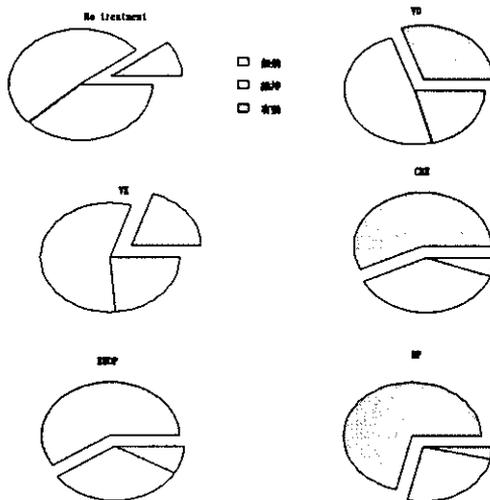
図 9 にはまず機器精度からみた各治療群の有効率と無効率の割合を示した。CEE、EHDP、BP 群の有効

率が高く、一方 VD や VK では有効率が低かった。

表6薬剤内判定基準(1年目)

効果	無効	有効	著効
対照	-3.7 以下	-3.69- +1.4	+1.41 以上
VD	-2.0 以下	-1.9- +4.0	+4.1 以上
VK	-3.0 以下	-2.9- +2.4	+2.41 以上
CEE	+1.2 以下	+1.21- +7.7	+7.8 以上
EHDP	+1.0 以下	+1.1- +7.6	+7.61 以上
BP	+2.8 以下	+2.81- 10.5	+10.51 以上

図 9 各治療群の機器精度からみた有効率(実線斜線部分)



その他の基準で有効率は各薬剤別にみても、傾向として図 9 の内容と同様であった。

2) 有効性判断基準の感度と合理性

VD、VK および BP 治療群において、各種方法により治療反応性を求め、その反応性からみて、有効例と

無効例に分類し、その反応を規定する因子が合理的に抽出できるかを検討した。結果を表7に示す。VD 治療群の骨密度反応を規定している因子は AI-P が有意の因子として機器精度から求めた基準および薬剤内反応分布から求めた基準で抽出できた。しかし、対対照の減少率から求めた基準では AI-P は有意の因子とならなかった。薬剤内反応基準ではまた、PTH が高値であるものほど反応が良好である傾向が伺えた。

VK 治療群では明らかに血清オステオカルシン値が反応規定因子となっており、どのような測定系においてもオステオカルシンが低いもののほうが反応は良好であった。また血清 PTH が低い例のほうが反応は良好であった。これらの現象はやはり対対照基準では観察されなかった。

BP 治療群においては PTH が高値なものほど反応が良好であった。やはり対対照を基準とした場合にはこのことを抽出できなかった。

E. 考案

以上の結果は機器精度からみた反応基準と薬剤内で反応を基準化する方法が比較的同等の感度で薬剤反応規定因子を抽出できることを示しており、対照の変動から基準を作

成すると感度が低下することを示している。抽出された反応規定因子も合理的であり、理解可能であった。従って、骨粗鬆症治療の有効性を議論する場合には測定に使用された骨密度測定装置の最小検出感度を自施設で求めておくことと、大きなデータベースを用いてある薬剤の骨密度反応の大きさを決定しておくべきである。

今後、骨粗鬆症のテーラーメイド医療は AI-P, PTH, オステオカルシン

表 7 判定基準の合理性

治療法	マーカー	機器精度基準	対対照基準	薬剤内基準
		無効 有効	無効 有効	無効 有効
VD	AI-P	203IU 179IU p=0.0416	Ns	205IU 182IU p=0.0129
	PTH	Ns	Ns	34pg/ml 38pg/ml p=0.0875
VK	PTH	43pg/ml 34pg/ml p=0.0072	Ns	43pg/ml 35pg/ml p=0.0116
	Total OC	14.2ng/ml 12.4ng/ml p=0.0369	Ns	14.2ng/ml 12.5ng/ml p=0.0390
	Intact OC	9.0ng/ml 6.4ng/ml p=0.0062	Ns	9.0ng/ml 7.4ng/ml p=0.0224
	IRMA OC	10.8ng/ml 4.2ng/ml p=0.0047	Ns	Ns
BP	PTH	30pg/ml 42pg/ml p=0.0047	Ns	30pg/ml 41pg/ml p=0.0102

などのカルシウム骨代謝マーカーを測定してあらかじめ治療方針を決定するやりかたにこれら代謝因子の変動を制御している遺伝子の多型を検討することでより完全なものとなるであろう。このことが可能となれば医療の効率化には大きく寄与するであろうとおもわれる。

E. 結論

骨粗鬆症治療への反応性には個人差があり、その反応の大小は長期の治療継続でも一貫した反応を示す。この反応が骨粗鬆症治療として有効であるか否かを判定するための基準を作成した。結果的に基準値は測定機器の精度からみた基準かまたはある治療への反応のばらつきからみた基準を採用するのが適当と考えられた。これらの基準により判定した有効、無効の結果に寄与する因子がいくつか抽出されたが、いずれも合理的であった。

F. 健康危険情報:とくになし。

G. 研究発表:平成 15 年度関連学会にて発表後論文化予定。

H. 知的財産権の出願・登録:とくになし。

厚生労働省科学研究費補助金(長寿科学研究総合研究事業)
分担研究報告書

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
分担研究:閉経前における腰椎骨密度減少に関する検討
分担研究者 東京女子医科大学 太田 博明

研究要旨

閉経後骨粗鬆症という用語があるごとく、閉経後に急激な骨量の減少が認められる。しかし、エストロゲンの低下が骨量の低下を招くことからすると、閉経はいきなり到来するものではなく、その少し前から卵巣機能の低下、即ちエストロゲンの低下がある筈である。すると、閉経前にも骨量の低下があって然るべきである。この点に関して、臨床ではいくつかの研究がなされているが一定の見解がなく、閉経前の骨量の低下の有無については議論のあるところである。そこで本研究では、卵巣機能の低下を時に来すことが想定される閉経前の 40 歳代健常者を対象に、閉経前に腰椎骨密度が減少することがあるか否かを検討するとともに、その背景となる下垂体・性ホルモンおよび骨代謝指標について検討した。その結果、閉経前の骨量の低下があることが判明し、しかも個体差があるところから閉経前から個別的対応、すなわちテーラーメイド医療の必要性が示唆された。

A. 研究目的

閉経後や卵摘後の早期に骨密度の減少が加速することは各種の臨床研究によってよく知られており、その対応も論議され尽くしている。

一方、閉経前の婦人に明らかな骨量減少があるか否かについては未だ論争があり必ずしも決着していない。明らかな骨量減少があるとするものが多いものの、否定的な意見もある。閉経の有無を厳密に規定すれば統計学的に有意差を見出し得るような僅かな減少は多分あるだろうが、臨床的には問題にならないともいわれている。

B. 研究方法

本研究では 48.2±2.3 歳の閉経開始婦人 197 例について、12 ヶ月間の L2-4BMD の変化率 (%L2-4BMD) を検討した。

C. 研究結果

全例における %L2-4BMD は -1.5 ± 8.5 % と有意な変動はなかった。しかし、卵巣機能の低下を示唆する月経周期が 12 ヶ月間に 2 周期以上不順な症例に限定すると 12 ヶ月間の %L2-4BMD は -2.2 ± 3.9 % と有意な骨量減少を認めた。月経不順を呈することは、月経正順に比べて E2 値および FSH 値は各々有意 ($p < 0.05$) な低下および上昇を認めた。さらにこれらを反映して血清 Ca 値、ALP 値および intact osteocalcin 値は各々有意 ($p < 0.05$) 上昇を認めた。一方これらの月経不順例における %L2-4BMD 値は、FSH 値と負相関 ($r = -0.238$,

$p = 0.077$) を intact osteocalcin 値とも負相関 ($r = -0.194$, $p = -0.0479$) を呈した。すなわち、FSH 値が高い卵巣機能不全を呈している例では骨量の低下が著しく、また intact osteocalcin 値が高い、骨代謝が亢進している例では骨量の低下が著しいことが判明した。

D. 結論および考察

結論として、閉経前婦人では一過性であれ E2 値が低下し、FSH 値が上昇する卵巣機能に低下がみられる例では、12 ヶ月間で明らかな骨量の低下が認められる。このようにエストロゲン低下により骨吸収の抑制不全を呈している例では、Alp および intact osteocalcin 値が高値を呈する、いわゆる骨代謝が亢進しているため、骨量の低下が著しいことが判明した。

閉経後の骨量低下が必至であることを考えると、閉経前の骨量低下も無視できるものではなく、この時期に十分な対応を行うことが、閉経後の骨量低下を減じ、後年における骨折防止にもつながる筈である。従って、閉経前の僅かな骨量減少も無視し得ないものであり、それを同定し、個別的に対応するテーラーメイド医療は将来の骨粗鬆症罹患の防止に不可欠である。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1 論文発表

S. Komukai, H. Ohta, K. Makita, S. Yanamoto, K. Takamatsu, H. Okano, M., Yajima, S. Nozawa. One-Year Spinal Bone Change in Pre- and Perimenopausal Japanese Women

A Prospective Observational Study Horm Res 59: 79-84, 2003

2 学会発表

太田 博明 他

第 17 回日本更年期医学会学術集会（平成 14 年 10 月 26 日）於：鹿児島

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得 なし

2 実用新案登録 なし

3 その他 なし

平成 14 年度 厚生労働省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
分担研究報告書

「安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験によるカルシウム吸収率の推定」の臨床応用への検討」

分担研究者 女子栄養大学 上西一弘

研究要旨

日本人若年成人女性 20 名を被験者とし、安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験を実施し、尿中 ^{44}Ca 排泄量と骨密度、骨代謝マーカーの関係を検討した。 ^{44}Ca は朝食と同時に摂取させ、摂取後 2 時間ごとの尿を採取し、尿中の ^{44}Ca 排泄量を測定した。骨代謝マーカーとしては、血中 $1.25(\text{OH})_2\text{D}$ 、インテグ PTH、および尿中 NTx、DPD を測定した。同時に腰椎骨密度を測定した。その結果、24 時間尿中 ^{44}Ca 排泄量と骨代謝マーカーの間には明確な関係はみられなかった。しかし、腰椎骨密度との間には正の相関がみられた。これは尿中 ^{44}Ca 排泄量が多いということは、カルシウム吸収率が高いことであり、その結果骨密度が高いと考えることができる。

また、24 時間の蓄尿とスポット尿の比較検討を行ったが、スポット尿での検討では正確な判定ができず、安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験の結果を検討するためには 24 時間蓄尿が必要と考えられる。

A. 目的

骨粗鬆症は様々な原因により発症する多因子疾患である。カルシウムの摂取不足もその一因である。平成 13 年度の国民栄養調査結果によれば平均カルシウム摂取量は 550mg であり、平均所要量 621mg を充足していない。女性の結果をみると 15~19 歳で 516mg、20~29 歳 457mg、30~39 歳 477mg、40~49 歳 489mg と少ない摂取量となっている¹⁾。ところでカルシウムは消化管での吸収率が低い栄養素であり、第六次改定の日本人の栄養所要量では成人女性のみかけのカルシウム吸収率は 30%とされている²⁾。しかし、カルシウム吸収率は年齢によって異なり、われわれのこれまで研究ではカルシウムのみかけの吸収率は若年成人女性(19~20 歳)で 20~30%、高齢者男性(平均年齢 67 歳)で 22~27%、高齢者女性(平均年齢 67 歳)で 9~14%となっている^{3,4)}。特に骨粗鬆症の発症の多い高齢者女性でカルシウムの吸収率は低い。また

同じ年齢でも個人差が大きいこともわかっている。

本研究はカルシウム吸収率の個人差を推定し、骨粗鬆症のテーラーメイド医療の確立に貢献することを目的とする。

今年度は実際の臨床応用を前に、基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

1. 安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験による尿中 ^{44}Ca 排泄と骨密度、骨代謝マーカーの関係
若年成人女性 20 名(年齢 20~23 歳)を対象に朝食摂取時に安定同位体 ^{44}Ca を経口負荷し、その後 12 時間後まで 2 時間ごとに採尿、ついで 12 時間後から 24 時間後まで蓄尿し、尿中の ^{44}Ca 排泄量を測定、カルシウム吸収率を推定した。対象者の腰椎骨密度(Hologic QDR2000)、血中 $1.25(\text{OH})_2\text{D}$ 、インテグ PTH、および尿中骨代謝マーカー(NTx、DPD)を測定し、尿中 ^{44}Ca 排泄との関係を検討した。

2. 24 時間蓄尿とスポット尿の比較

本法を実際の臨床の現場で使用するにあたり、24 時間の蓄尿は対象者に対する大きな負担になると考えられる。したがって、スポット尿で推定できるかどうかを、24 時間尿と 2 時間ごとの尿を比較することにより検討した。

C. 研究結果および考察

1. 安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験による尿中 ^{44}Ca 排泄と骨密度、骨代謝マーカーの関係

表 1 に個人ごとの年齢、身長、体重、BMI、腰椎 L2-4BMD、血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 、インタクト PTH、24 時間尿中総 Ca 排泄量、尿中リン排泄量、NTx、DPD と 24 時間尿中 ^{44}Ca 排泄量、 ^{44}Ca 排泄率（摂取した ^{44}Ca に対する排泄された ^{44}Ca の割合）を示した。

^{44}Ca 排泄量（排泄率）と各指標の相関をみたところ、尿中総カルシウム排泄量、リン排泄量および腰椎骨密度との間に正の相関がみられた。

われわれは先に ^{44}Ca 負荷試験によるカルシウム吸収率の推定について報告した^{5,6}。そのなかで、カルシウム出納がほぼ平衡状態にあると考えられる人では、24 時間 ^{44}Ca 排泄量と出納試験によるカルシウム吸収率が相関することを示した。今回の検討はこのことを前提にしたものである。今回の対象者は健康な若年女性であり、しかも対象者数が少ないこともあり、尿中 ^{44}Ca 排泄と骨代謝マーカーの間には明確な関係はみられなかった。しかし、尿中 ^{44}Ca 排泄量と腰椎骨密度の間には正の相関がみられた。これは尿中 ^{44}Ca 排泄量が多いということは、カルシウム吸収率が良いことであり、その結果、骨密度が高いと考えることもできる。今回は若年女性の検討であったが、次年度以降は対象者をより高齢な女性に広げ、検討を加える予定である。

2. 24 時間蓄尿とスポット尿の比較

24 時間尿中 ^{44}Ca 排泄量と 2 時間ごとの尿中 ^{44}Ca 排泄量、および 2 時間ごとの尿中 ^{44}Ca 排泄量の 24 時間尿中 ^{44}Ca 排泄量に対する割合を検討したところ。1 名を除き摂取後 2 から 4 時間の 2 時間ごとの尿中 ^{44}Ca 排泄量が最も多いことがわかる。

2 時間ごとの尿中 ^{44}Ca 排泄量と 24 時間尿中 ^{44}Ca 排泄量の相関をみたが、特に相関はみられなかった。以前のわれわれの検討では採尿時間を長くするほど、みかけの吸収率との相関が高くなることを確認している⁶。前報および今回の検討から、現時点では 24 時間の尿の採取が望ましいと考えられる。しかし、実際の臨床の現場で、24 時間尿の採取は困難であろう。今回クレアチニン補正も試みたが、結果は変わらなかった。今後、高齢女性で安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験による尿中 ^{44}Ca 排泄と骨密度、骨代謝マーカーの関係を検討する際に、可能な限り時間尿の検討を合わせて行う予定にしている。

D. 結論

日本人若年成人女性 20 名を対象に、安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験を実施し、尿中 ^{44}Ca 排泄量と骨密度、骨代謝マーカーの関係を検討した。その結果、24 時間尿中 ^{44}Ca 排泄量と骨代謝マーカーの間には明確な関係はみられなかった。しかし、腰椎骨密度との間には正の相関がみられた。これは尿中 ^{44}Ca 排泄量が多いということは、カルシウム吸収率が高いことであり、その結果骨密度が高いと考えることができる。

また、24 時間の蓄尿とスポット尿の比較検討を行ったが、スポット尿での検討では正確な判定ができず、安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験の結果を検討するためには 24 時間蓄尿が必要と考えられる。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室栄養調査係：平成 13 年度国民栄養調査結果の概要、臨床栄養、102、209-224、(2003)
- 2) 健康・栄養情報研究会、第六次改定日本人の栄養所要量 食事摂取基準、第一出版、(1999)
- 3) 上西一弘、石田裕美、亀井明子、白木正孝、江澤郁子、五島孜郎、福岡秀興、細井孝之、折茂肇：若年女性のカルシウム必要量－高齢者との比較－、Osteoporosis Jpn. 8, 217-219 (2000)
- 4) Uenishi, K., Ishida, H., Kamei, A., Shiraki, M., Ezawa, I., Goto. S., Fukuoka, H., Hosoi, T. and Orimo, H.: Calcium requirement estimated by balance study in elderly Japanese people. Osteoporos. Int., 12, 858-863 (2001)
- 5) 上西一弘、石田裕美、亀井明子、細井孝之、白木正孝：経口カルシウム負荷試験によるカルシウム吸収率の推定とその意義に関する検討（Ⅰ）、Osteoporosis Jpn. 9, 625-629 (2001)
- 6) 上西一弘、石田裕美、亀井明子、細井孝之、白木正孝：経口カルシウム負荷試験によるカルシウム吸収率の推定とその意義に関する検討（Ⅱ）、Osteoporosis Jpn. 10, 723-730 (2001)

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

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
—遺伝子解析からのアプローチ—

分担研究者 細井孝之 東京都老人医療センター医長

研究要旨 骨粗鬆症はその発症に生活習慣因子のみならず、複数の遺伝的素因とが関与することが知られている。さらにその治療に対する反応性の個人差も遺伝的に決定されていることが予想される。本研究では、骨粗鬆症の治療、とくに薬物療法における個人差を決定する遺伝子多型性を見出すことにより、本疾患のテーラーメイド医療確立に寄与することを目指している。本年度は個人ごとの薬剤反応性を検討するための対象集団を確定し、候補遺伝子の多型性を検索した。さらに染色体全領域をカバーする系統的SNPsを用いた検討に向けて準備を行った。

A. 研究目的

骨粗鬆症はその発症に生活習慣因子のみならず、複数の遺伝的素因とが関与することが知られている。さらにその治療に対する反応性の個人差も遺伝的に決定されていることが予想される。本研究では、骨粗鬆症の治療、とくに薬物療法における個人差を決定する遺伝子多型性を見出すことにより、本疾患のテーラーメイド医療確立に寄与することを目指している。本年度は個人ごとの薬剤反応性を検討するための対象集団を確定し、候補遺伝子の多型性を検索した。さらに染色体全領域をカバーする系統的SNPsを用いた検討に向けて準備を行った。

B. 方法

①薬物療法の効果における個人差を明らかにするための臨床データの解析：成人病診

療研究所（白木所長）を受診した骨粗鬆症患者について、治療開始前後の骨量（L2-4BMD by DXA）を測定し、その変化率をもとめた（%change/year）。治療方法としては、活性型ビタミンD3製剤、ビタミンK2製剤、女性ホルモン製剤、ビスフォスフォネート製剤について検討した。これらの対象者からは、インフォームドコンセントを得た後に、遺伝子解析に用いる血液の採取が行われた。

②候補遺伝子の選定と多型性（SNPs）の検索：治療薬ごとの作用機序を勘案し、薬剤反応性を規定する候補遺伝子群を選定した。それぞれの遺伝子における多型性をデータベースまたは、degenerative HPLCによるスクリーニングによって検索した。活性型ビタミンD3（1 α -vitamin D3）に対してはVDR, vitamin D binding protein, alkaline phosphatase, calbindin、ビタミンK2製

剤 (vitaminK2) に対してはapolipoprotein E、 γ -carboxylase、CYP2C9、女性ホルモン製剤に対してはestrogen receptors (α 、 β)、efp、etidronateやalendronateなどのbisphosphonatesに対してfarnesyl diphosphatase synthaseを候補遺伝子として取り上げた。

③候補遺伝子アプローチと体系的SNPsアプローチ：genome-wideに分布する約1200SNPsを共同研究者の日本医科大学江見らとともにタイピングし、薬物療法との関連を検討する準備をした。

C. 結果と考察

骨粗鬆症に対する治療効果をDXA法による腰椎骨密度の変化で見た場合、その個人差の分布が各薬剤ごとに得られた。活性型ビタミンD3製剤やビタミンK2製剤における治療効果には個人差が大きかったものの、bisphosphonate製剤の無効例は極めてすくなかった。これらのデータが候補遺伝子の多型性との関連を検討する基盤が得られた。しかしながら、responderとnon-responderの定義については①BMDの変化について4分割位をとり、1位をresponder、4位をnon-responderとする、②BMDの変化が正の者をresponder、負のものをnon-responderとする、③BMDが3%以上増加したものをresponder、その他をnon-responderとする、などいくつかの考えかたがあり、この点をどうとりあつかうかが、大きな課題として残された。骨折予防が骨粗鬆症治療の目的であり、骨折予防効果をもって薬物療法の有効性を判定すべきであるが、そのためには期間、症例数を飛躍的に長くあるいは多くする必要があり、本研究のなか

では困難なエンドポイントである。今後、これらの3つの考え方それぞれに沿った解析を試みていくが、実際には③の手法が用いられるべきであろう。

D. 結論

骨粗鬆症治療の個別化を遺伝子多型性の観点から解析するためのシステムが構築された。

E. 健康危険情報

今年度の研究においては健康危険情報は得られなかった。

F. 研究発表

論文発表

1. Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Swensen J, Orimo H. Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR typing. *Bone*. 2003 Feb;32(2):185-90.
2. Ishida R, Emi M, Ezura Y, Iwasaki H, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Orimo H. Association of a haplotype (196Phe/532Ser) in the interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK1) gene with low radial bone mineral density in two independent populations. *J Bone Miner Res*. 2003 Mar;18(3):419-23.
3. Hosoi T, Yoda T, Yamaguchi M, Amano H, Orimo H Elderly women with oral exostoses

- had higher bone mineral density. *J Bone Miner Metab.* 2003;21(2):120-2.
4. Kajita M, Ezura Y, Iwasaki H, Ishida R, Yoshida H, Kodaira M, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M Association of the -381T/C promoter variation of the brain natriuretic peptide gene with low bone-mineral density and rapid postmenopausal bone loss. *J Hum Genet.* 2003;48(2):77-81.
5. Kazama H, Usui S, Okazaki M, Hosoi T, Ito H, Orimo H. Effects of bezafibrate and pravastatin on remnant-like lipoprotein particles and lipoprotein subclasses in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2003 Mar;59(3):181-9
6. Ota N, Nakajima T, Ezura Y, Iwasaki H, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Ito H, Emi M. Association of a single nucleotide variant in the human tumour necrosis factor alpha promoter region with decreased bone mineral density. *Ann Hum Biol.* 2002 Sep-Oct;29(5):550-8.
7. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo H, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, Kawaguchi H. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2002 Oct;17(10):1744-51.
8. Ogata N, Koshizuka Y, Miura T, Iwasaki M, Hosoi T, Shiraki M, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Association of bone metabolism regulatory factor gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity. *Spine.* 2002 Aug 15;27(16):1765-71.
9. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata A. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet.* 2002;47(8):400-6
10. Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, Kawano K, Koshizuka Y, Hosoi T, Nakamura K, Kuro-o M, Kawaguchi H Association of klotho gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women. *Bone.* 2002 Jul;31(1):37-42
11. Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature.* 2002 Jun 20;417(6891):871-5
12. Horiuchi T, Onouchi T, Inoue J, Shionoiri A, Hosoi T, Orimo H A strategy for the management of elderly women with primary hyperparathyroidism: a comparison of etidronate therapy with parathyroidectomy. *Gerontology.* 2002 Mar-Apr;48(2):103-8.
13. Hashimoto M, Miyao M, Akishita M, Hosoi T, Toba K, Kozaki K, Yoshizumi M, Ouchi Y Effects of long-term and reduced-dose hormone replacement therapy on endothelial function and

intima-media thickness in postmeno—
pausal women. Menopause. 2002 Jan-
Feb;9(1):58-64.

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(長崎大学医学部附属病院 放射線科講師)

研究要旨

骨折リスクの評価は骨密度測定を中心に行われているが、その感度には限界がある。マイクロ CT を用いた骨梁構造の三次元的定量化で求めた *in vitro* 骨梁構造パラメータは、骨力学特性と強く相関し、また薬物療法の効果を評価するのにも有用であることが明らかになってきた。ところが現在、*in vivo* に臨床において骨梁構造を正確に評価できる方法は確立されていない。

我々は、臨床用のマルチスライス CT 装置を用いて、高解像度 CT 画像の骨梁構造を定量化する診断システムを構築することを目的に、基礎的検討をおこなった。その検討には、まずヒト摘出椎体を用いたファントム実験に基づき、被曝線量を測定しながら解析可能な撮像条件を決定した。その撮像方法をもとに、新鮮圧迫骨折症例群と対照群の第3腰椎海綿骨の骨梁構造を解析した。今回の症例の検討によると、骨折症例群と対照群の2群間には dual X-ray absorptiometry (DXA) で測定した骨密度には有意差がみられなかったが、骨梁構造パラメータには有意差が認められた。

従って、臨床用 CT 装置を用いた *in vivo* 脊椎骨梁構造計測は、被曝線量の許容範囲内で、臨床的に有用な結果が得られることが確認できた。

キーワード： 三次元骨梁構造、コンピュータ断層法、骨粗鬆症

A. 研究目的

骨粗鬆症の病態の中核をなすのは、骨量の減少と骨微細構造の悪化による脆弱性であり、高齢者では転倒などをきっかけに骨折が発生し、寝たきりの要因となる。わが国では、骨密度測定による骨粗鬆症の診断基準が整備され、主として骨量の減少に基づいて骨粗鬆症の診断、骨折リスクの評価、薬物治療の必要性の判断、治療効果の評価などが行われており、骨粗鬆症の診療に大きく貢献してきた。このように骨折リスクの評価は骨密度測定を中心に行われているが、その感度には限界がある。

一方、近年マイクロ CT 装置が開発され、その装置を用いて高い解像度で生検材料や小動物の摘出骨の三次元データを得て、骨の解剖学的構造および海綿骨梁構造の解明が進んできた。骨梁構造定量化パラメータは、骨力学特性と強く関連しており、その評価は骨折リスク予知に貢献できると考えられる。しかし、マイクロ CT は *in vitro* の検査であり臨床に適用できない。

また骨梁構造を *in vivo* に評価する方法としては、従来からのレントゲン写真による骨梁構造の視覚的(主観的)評価法があり、骨折リスクや骨粗鬆症治療効果の評価には十分ではない。magnetic resonance imaging (MRI) は、骨梁構造を評価するには被曝もなく適切な評価法と期待されているが、現在の一般臨床で用いられる装置では解像度の限界と、躯幹骨における計測の困難さが問題である。そこで、我々は放射線学的な技術を用いて、骨密度以上の感度で骨折リスクを評価できる *in vivo* 骨梁構造評価システムを構築し、その有用性を確認することを研究の目的とした。

B. 研究方法

1. マルチスライス CT 装置、マイクロ CT 装置

マルチスライス CT (Multi-detector-row CT=MDCT) 装置は、シーメンス社製 SOMATOM Plus4 を用いた。マイクロ CT 装置は SCANCO Medical 社 μ CT40 である。

1. 骨梁構造解析プログラム

三次元骨梁構造解析プログラムには、市販のプログラムである RATOC TRI/3D-BON を使用した。MDCT から得られた DICOM データを非圧縮にて直接読み込み、median filter でノイズ除去し、関心領域を設定、二値化し、ラベリングを行った。

得られるパラメーターは、bone surface density (BS/BV), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp), fractal dimension (Fractal D), Euler number (Euler N), trabecular bone pattern factor (TbPF), structure model index (SMI), degree of anisotropy (DA) および node-strut 解析である。

2. 摘出椎体を用いた検討

ヒト脊椎(第1, 2, 3椎体)をマイクロ CT でスキャンする場合に用いるホルダー(径 39mm)にゼラチンにて包埋固定し、マイクロ CT で解像度を変化させてスキャンした。ホルダーに固定した状態で、水等価ファントム内に固定し、撮像条件を変化させてスキャンした。撮像条件は管電圧 120kV(一定)とし、管電流に 250, 300, 350mAs の3段階を設定した。0.5mm スライス厚でスキャンするが、500ミクロンの gapless と(200ミクロンオーバーラップ)300 ミクロンスライス厚の2種の解像度で再構成を行った。被曝線量測定は、水等価ファントム内の摘出骨を管電圧 250, 300, 350 mAs (120kV, 54sec, 0.5 mm スライス厚は一定)と変化させてスキャンした際の、脊椎部の被曝線量を測定した。線量計はPTW社製CT用電離箱検出器 Model77336 であり、1cm スライス幅での被曝線量 dose length product (DLP: mGycm)を算出した。

4. 臨床例での検討

新鮮脊椎圧迫骨折10例(年齢 66.6±2.2 歳、閉経時年齢 48.5±4.1 歳、骨粗鬆症治療薬投与 6ヶ月未満)と骨折既往のない対照例12例(年齢 66.1±6.7 歳、閉経時年齢 49.3±4.3 歳)である。摘出骨ファントムで検討した適切な撮像条件

によりスキャンし、得られた DICOM データは TRI/3D-BON を用いて、二値化(骨梁と骨梁以外の成分に分離する)のための閾値を変化させて、得られる計測値の変動をみた。コンピュータの二値化自動設定プログラムをもちいても解析した。解析領域は椎体の皮質骨と栄養孔を含まない最大の立方体とした。

全症例は、dual X-ray absorptiometry (DXA)(GE 社 EXP5000)で第2・4腰椎骨密度を求め、また同X線 CT 装置を用いて B-MAS200 により quantitative computed tomography (QCT) で第3腰椎骨密度を測定した。

B. 研究結果および考察

1. 撮像条件の検討結果

管電圧 250mAs, 300mAs, 350mAs でのそれぞれの DLP は 2547, 3070, 3584 mGycm であり、管電圧増加に伴って直線的に増加した。300mAs での被曝線量は、腹部 CT 撮影で単純 CT・造影CT(動脈相)、造影CT(静脈相)の3シリーズ撮影に比較して、やや多いくらいのレベルであり、通常の臨床検査として問題のないレベルであると考えられた。

2. mAs の影響を受けにくいパラメーター

ファントムでの実験結果、管電圧の影響については下記の結果が得られた。

mAs の影響を受けにくいパラメーターは、TRI-BS/BV, TRI-Th, fractal D

mAs の影響を受けやすいパラメーターは、TRI-BV/TV

mAs の影響を強く受けるパラメーターは、TRI-N, TRI-Sp, Euler number, DA であった。

2. 解像度の影響を受けにくいパラメーター

ファントムでの実験結果、解像度の影響については下記の結果が得られた。

解像度の影響を受けにくいパラメーターは、TRI-BS/BV, TRI-BV/TV, SMI, DT-Th, DA

解像度の影響を受けやすいパラメーターは、TRI-Th, TRI-N

解像度の影響を強く受けるパラメーターは、connectivity density であった。

3. 閾値の影響を受けにくいパラメーター

臨床例での検討の結果、閾値の影響については下記の結果が得られた。

閾値の影響を受けにくいパラメーターは、fractal D, DA, NdNd/TSL

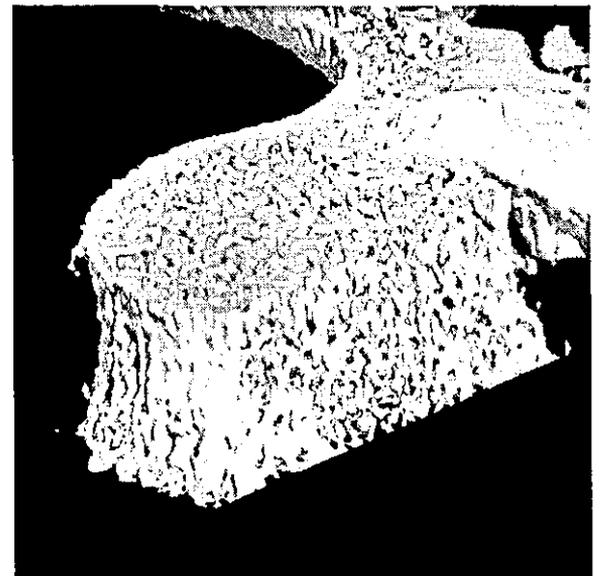
閾値の影響を受けやすいパラメーターは、TRI-BV/TV, TRI-BS/BV, TBPf

閾値の影響を強く受けるパラメーターは、Euler number, SMI, NdTm/TSL であった。

4. 有用性の検討

骨折症例群と対照群の2群間には、DXA 腰椎骨密度には有意差は認められなかった。QCT腰椎骨密度には軽度の有意差 ($p < 0.05$) を認めた。骨梁構造パラメーターのうち、有意差を認めたものは、BS/BV ($p < 0.05$), BV/TV ($p < 0.005$), Tb.Th ($p < 0.05$), Tb.N ($p < 0.01$), Tb.Sp ($p < 0.05$), Fractal D ($p < 0.05$), Euler N ($p < 0.01$), TBPf ($p < 0.05$), SMI ($p < 0.05$), N.Nd/T ($p < 0.01$), TSL/TV ($p < 0.005$), NdNd/TV ($p < 0.005$) であり、DXA骨密度よりも骨折例と非骨折例を分離する能力は有意であった。

右にin vivo 三次元椎体CT画像を示す。



62歳女性 第3腰椎三次元CT画像

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroshi Jinnai, Masako Ito, et al. Surface Curvatures of Trabecular Bone Microarchitecture Bone 30: 191-194, 2002
- 2) Masako Ito, et al. Differences of three-dimensional trabecular microstructure in osteopenic rat models caused by ovariectomy and neurectomy Bone 30:594-598, 2002
- 3) Ayako Shiraishi, Masako Ito, et al. A comparison of alfacalcidol and menatetrenone for the treatment of bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis Calcif Tissue Int 71: 69-79, 2002
- 4) Masako Ito, et al. Contribution of trabecular and cortical components to the mechanical properties of bone and their regulating parameters Bone 31: 351-358, 2002

2. 学会発表

- 1) 伊東昌子、ほか。アルファカルシドールの骨梁構造に及ぼす作用特性の検討 —アルファカルシドールはエストロゲン欠乏による骨梁構造の脆弱化に対してアナボリック作用を示し骨強度の増強に寄与する— 第20回日本骨代謝学会

2) 西田暁史、伊東昌子、ほか。不動化およびエストロゲン欠乏ラットの骨梁構造に対するエチドロネートの治療効果 第20回日本骨代謝学会

3) 有田 忍、伊東昌子、ほか。卵巣摘除ラットのhPTH(1-34)間歇投与による腰椎骨強度の回復は皮質骨量の増加に依存する 第20回日本骨代謝学会

4) 白石綾子、伊東昌子、ほか。骨粗鬆症病態モデルラットにおけるアルファカルシドールの薬理効果と経口的カルシウム負荷との作用比較 第20回日本骨代謝学会

5) S. Arita, M Ito, et al. Intermittent hPTH administration increase bone strength in rat lumbar vertebral body after ovariectomy with cortical bone mass increase Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

6) A. Shiraishi, M Ito, et al. Pharmacological efficacy of alfacalcidol for the treatment of osteoporosis is not achieved by the use of a calcium supplement Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

7) M. Ito, et al. Anabolic effect of active Vitamin D3 analog, alfacalcidol, is strongly related to bone strength through thickening of transverse trabeculae Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

8) A. Nishida, M Ito, et al. Effect of etidronate on three-dimensional trabecular structure of ovariectomized or immobilized rats Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

9) M.M. Hurley, M Ito, et al. The anabolic effect of parathyroid hormone is impaired in bones of Pgf2 Null mice Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

10) M. Ito, et al. Anabolic effect of active Vitamin D3 analog, alfacalcidol, is strongly related to bone strength through thickening of transverse trabeculae Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

11) 西田暁史、伊東昌子、ほか。老齢卵巣摘出ラットに対するアルファカルシドール、アレンドロネートおよびその併用療法の骨梁構造に対する治

療効果 第4回日本骨粗鬆症学会

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用案登録

なし

3. その他

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

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
—骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定—

分担研究者 浦野友彦 東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座

研究要旨 臨床において積極的な骨形成促進薬は開発されていないことは骨粗鬆症治療の多様性を制限しており、テーラーメイド医療を確立するためにも重要な問題である。そこで本研究では DNA チップを用いて骨芽細胞における骨形成制御因子を新たに同定することを行った。さらに骨形成に関与する遺伝子に存在する SNP と骨量の関連を検討することにより、骨形成を主眼においた新規遺伝子マーカーを検索した。前者においてはエストロゲンからエストロゲン受容体を介した骨芽細胞増殖応答遺伝子としてサイクリン D2 とサイクリン D3 を同定した。後者においては近年注目されている Wnt- LRP 経路における key regulator である LRP5 遺伝子上に存在する SNP を骨量を規定する遺伝子マーカーとして同定した。来年度以降、この手法を発展、応用することにより骨形成に主眼をおいた骨粗鬆症でのテーラーメイド医療の確立を目指す。

A. 研究目的

骨粗鬆症とそれに伴う骨折は高齢者が寝たきりとなる主要な原因であり、老人医療において重要な問題として知られている。この治療においては積極的に骨芽細胞の機能を制御し、骨形成を亢進させて骨量増加作用をおこすことが理想ではあるが現在まで強力な骨形成促進薬は存在していない。しかしながら、*in vitro* で骨芽細胞の分化、増殖を制御するサイトカインや内分泌ホルモンは複数存在することから、これらの下流シグナルを詳細に検討、解明することは骨粗鬆症の病態解明、ひいては骨形成を主眼においたテーラーメイド医療の確立において最も重要なステップであると考えた。

エストロゲンは内分泌ホルモンとして骨代謝に関与していることは知られており、この

ホルモンの欠落が女性での骨粗鬆症の大きな要因であることは周知の事実である。特に骨吸収に関してはエストロゲンが破骨細胞の機能を抑制することによりその作用を制御することが *in vitro*、*in vivo* において明らかにされてきた。その一方でエストロゲンの作用を媒介するエストロゲン受容体(ER)はそのサブタイプである ER α ならびに ER β の両者が破骨細胞ばかりでなく骨芽細胞にも存在することが示されている。このことはエストロゲンが骨芽細胞においても増殖と分化の制御を行っていることを示唆させる。しかしながらその下流シグナルに関しては未だ十分な検討がなされていなかった。そこでこの下流に位置するシグナル伝達を解明することがエストロゲンをモデルとした内分泌ホルモンによる骨形成制御の解明において最も重要な研究と考

え、その応答遺伝子の探索を DNA チップ法を用いて行った。

また近年、脊椎動物のシグナル伝達においては Wnt シグナル伝達経路が様々な細胞の増殖と分化を制御していることが明らかにされており重要視されてきた。特に骨芽細胞における骨形成のシグナル伝達においては Wnt に対するレセプターとして機能する LRP5 が注目されてきた。そこで本研究ではこの LRP5 の遺伝子多型が骨量に与える影響に対して検討を加えた。

B. 方法

1, エストロゲン受容体低応答性ラットを利用した骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の検索

エストロゲン受容体(ER)低応答性ラットならびに野生株ラット由来の胎児頭蓋骨を酵素処理することにより初代培養骨芽細胞を作成、培養した。ER 低応答性ラットは ER α ならびに ER β 両者を介するエストロゲンシグナルを遮断する ER ドミナントネガティブ体を過剰発現させたモデル動物であり、分担研究者が所属する研究室にて作成した。すでにこのラットは卵巣摘出後に誘導される低骨量に対して、エストロゲンを添加しても骨量の回復が誘導されないことが示されている(Ogawa S *et al. J Biol Chem* 2000)。実験に際しては継代数を 2nd passage に限定した。これら細胞を 10%血清にて培養し、この時の細胞増殖能を BrDU ラベリング法を用いて評価した。

次にこれら初代培養骨芽細胞から RNA を採取した。これら RNA から DNA チップ法(Affimetrix)を用いて野生株骨芽細胞に比べトランスジェニックラット由来の骨芽細胞にて発現に差違のある遺伝子をリストアップす

ることにより、骨芽細胞によるエストロゲン応答遺伝子を探索した。

これら応答遺伝子が生理的濃度(10^{-9} M)にて実際に応答することを野生株骨芽細胞にエストロゲンを添加後、細胞抽出液を採取し、Western blot 法により確認した。

2, LRP5 遺伝子多型の骨量に及ぼす影響

JSNP に報告のある LRP5 の遺伝子のイントロン中に存在する遺伝子多型 5 種類に関し、SNP-dependent PCR法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性 310 人を対象として BMD との関連を検討した。

C. 研究結果

1, エストロゲン受容体低応答性ラットを利用した骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の検索

エストロゲン低応答性ラット由来の骨芽細胞の増殖能は野生株に比べ低下していた。

この時の遺伝子変化を検討するため表 1 のようにエストロゲン低応答性トランスジェニックラット由来初代培養骨芽細胞を用いて、野生株と比して変化のあった遺伝子をリストアップした。この中からサイクリン D2 に注目した(表 1、下線)。サイクリン D2 は細胞周期の正の進行役として CDK4 ならびに CDK6 と複合体を形成し、その酵素活性を上昇させることが知られている。そこで、骨芽細胞に生理的濃度のエストロゲンを添加し、その増殖が誘導されるときにサイクリン D2 の発現変化を Western blot 法を用いて検討したところサイクリン D2 の発現増加が確認された。さらにそのファミリーであるサイクリン D3 の発現も同時に増多することも確認した。同時に免疫沈降法を用いてエストロゲン添加により骨芽細胞内でサイクリン D2 と D3 が

CDK4 ならびに CDK6 と複合体を形成し CDK4 ならびに CDK6 の酵素活性を上昇させることも確認した。以上よりエストロゲンによる骨芽細胞増殖にはサイクリン D2, D3/CDK4, CDK6 を介した経路が機能していることが示された。

2. LRP5 の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響

今回解析した遺伝子多型のうち LRP5 遺伝子のイントロンに存在する遺伝子多型 5 種類中、一種類の多型では、全身骨ならびに腰椎骨密度(Z score)において有意差を呈していた。特に全身骨密度(Z score)においては2群間で $p=0.0051$ と強い相関係数を示した。

それ以外でも腰椎骨密度(Z score)のみで有意差を呈する遺伝子多型、全身骨密度(Z score)において有意差を示す遺伝子多型がそれぞれ一種類ずつ存在していた。

D. 考察

エストロゲン低応答性ラット由来の骨芽細胞の増殖能は野生株に比べ低下していた。既報にて、初代培養骨芽細胞においてエストロゲンは増殖を刺激することが報告されている。このことはエストロゲンが骨芽細胞においてエストロゲン受容体を介し、増殖因子として機能することを示唆させる。実際に DNA チップを用いた解析においても増殖の制御因子であるサイクリン D2 が同定され、実際に増殖システムにおいて重要な役割を果たしていることが示された。近年、シグナル伝達研究において DNA チップ法を用いたアプローチにより様々な応答遺伝子が同定されており。今回の報告においてもエストロゲンを介した増殖における応答遺伝子が同定出来ている。今後、この手法を用いて、骨形成に関与するサイトカインならびに内分泌ホルモンでの応

答遺伝子を探索し、骨形成のメカニズムを解明してゆく予定である。

LRP5 と骨形成に関連した研究は 2001 年と 2002 年の 2 年間で、飛躍的に進歩した。2001 年には遺伝性の骨量減少を認める、骨粗鬆症-偽神経膠腫症候群の原因遺伝子であることが報告された。さらに 2002 年には高骨量の家系調査の結果、LRP5 遺伝子において活性型変異体が発見されたことから LRP5 は骨芽細胞の分化を介した骨形成における Key regulator であることが他のグループから示されてきた。さらに興味深いことに LRP5 のノックアウトマウスでも骨量減少が認められ、骨芽細胞の機能異常も認められたが、この経路においては今まで骨芽細胞の分化において中心的な役割をはたしていると考えられてきた Cbfa1 を介していないことが示されている。今回我々は、LRP5 のイントロン中に存在する遺伝子多型が骨量に劇的な変化を及ぼすことを世界にさきがけて示した。本研究にて日本人女性における LRP5 遺伝子のヘテロ、ホモを合わせた出現頻度は約 47% と非常に高頻度であることから、骨量を規定する遺伝子マーカーとして有用である可能性が高い。

来年度以降、この多型での薬剤による反応性の相違を検討することでこの Wnt-LRP5 に関与する薬剤と関与しない薬剤との判別が明らかとなる可能性がある。さらにこの遺伝子多型によって反応性があった薬剤に関しては、骨芽細胞による添加実験を行い Wnt-LRP5 経路のシグナル伝達にどのような影響を与えるかを *in vitro*, *in vivo* の系を用いて明らかにする予定である。

E. 結論

本年度は ER を介した骨形成制御の応答遺伝子としてはサイクリン D2 ならびにサイク