

〔研究ノート〕

卵巣摘出ラットにおける脛骨近位端の骨微細構造

加 藤 文 之¹, 玉 越 敬 悟²

要 旨

本研究は、卵巣摘出ラットにおける脛骨近位端の骨微細構造の解析を目的とした。Wistar系雌性ラットを用いて、偽手術群（SHAM群）と卵巣摘出群（OVX群）に分けた。OVX群は両側の卵巣摘出術を施行した。自然飼育8週後に脛骨を採取して、CTスキャンと骨微細構造解析ソフトを用いて骨密度（BV/TV）、骨梁幅（Tb.Th）、骨梁数（Tb.N）、骨梁間隙（Tb.Sp）を算出した。BV/TV、Tb.Th、Tb.Nにおいて、OVX群はSHAM群と比較して有意に低値を示した。また、Tb.Spにおいて、OVX群はSHAM群より有意に高値を示した。卵巣摘出によって骨量減少し、骨梁幅、骨梁数、骨梁間隙の変化が関わっていることが分かった。本研究の結果は、骨粗鬆症の治療や予防の新規開発のための有用なデータとなりうる。

キーワード：卵巣摘出ラット、脛骨近位端、骨微細構造、骨粗鬆症

はじめに

骨粗鬆症は、骨密度の低下や骨質構造の粗雑化によって骨強度が脆弱化する疾患であり、骨折の危険性を高める。骨粗鬆症の罹患は、男性より女性が多いと言われている。これは、女性特有の閉経によるエストロゲン枯渇が骨吸収を促進させるためである。閉経後骨粗鬆症に関わる動物実験を用いた研究では、ラットの卵巣を摘出し、恣意的にエストロゲンを枯渇させた閉経後骨粗鬆症モデルラットが汎用されている。先行研究で、本モデルラットは、脛骨近位端で骨密度（BMD）の低下や骨梁構造が粗雑化し、骨強度が低下することが報告されている [3,4,13]。しかし、エストロゲン枯渇による骨量減少の具体的なメカニズムは不明な点が多いため、治療法や予防法の新規開発のために病態メカニズムの解明が必要であると言える。骨粗鬆症において、骨の力学的脆弱性は骨量と骨質の量的もしくは質的变化が影響を及ぼしていることが知られている。そのうち、骨質とは骨梁構造を指し、骨

1 名古屋学院大学リハビリテーション学部

2 新潟医療福祉大学医療技術学部

Correspondence to: Fumiyuki Kato

E-mail: fukato@ngu.ac.jp

Received 21 December, 2015

Revised 18 January, 2016

Accepted 21 January, 2016

粗鬆症では、その骨梁の微細構造が粗雑化する。骨梁の微細構造パラメータとして骨梁幅、骨梁数、骨梁間隙、骨量構造指数などがあり、これらはCTスキャンや微細構造ソフトウェアを用いて解析することができる。微細構造の各パラメータを検証することは、骨粗鬆症による力学的脆弱化に影響を与えている因子を明らかにすることができ、薬物療法や運動療法の新規開発に役立つ。

そこで、本研究では、卵巣摘出ラットにおける8週間の自然飼育が脛骨近位端の骨微細構造に与える影響について検討することとした。

材料と方法

1. 実験動物および飼育条件

対象は8週齢、雌性Wistarラット（ $n=14$ ）とした。1週間の順応飼育後、対象を無作為に偽手術群（SHAM群； $n=6$ ）と卵巣摘出群（OVX群； $n=8$ ）に分けた。OVX群には、ペントバルビタールナトリウムによる深麻酔下にて、傍正中切開による両側卵巣摘出術を施行した。SHAM群は、傍正中切開のみ施行した。飼育環境は、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間の昼夜サイクルで、飼料と飲水はともに自由摂取とした。

なお、この実験は名古屋学院大学動物実験委員会の承認を得て実施した（許可番号2012-01）。

2. 骨断面像撮影および骨微細構造解析

術後8週後、全てのラットから両側脛骨を取り出し、軟部組織を除去して乾燥器を用いて 44.0°C 下で24時間乾燥させた。骨断面像の撮影はmicroCT（CBSTAR MCT-100CB；日立メディコ株式会社、東京）を用いた。撮影条件は管電圧：62kV、管電流：100 μA 、フィルタ関数：Curve8.tbl、画種：CTO、CTモード：通常、F加算枚数：8、計測領域：LL、計測枚数：512枚、拡大率：7.00倍、テーブルの高さ：0mm、焦点サイズ：S、LIフィールド：3.0型、画素サイズ：0.019mmに設定した。骨微細構造の解析は3次元画像解析ソフトであるTRY/3D-BON（ラトックシステムエンジニアリング株式会社、東京）を用いた。解析条件は断面間隔：0.01875mm、断面枚数101枚、画像サイズ：512ピクセル $\times$ 512ピクセル、画像スケール：0.01875mm/ピクセル $\times$ 0.01875mm/ピクセル、画像Intensity range；16ビット/ピクセルに設定した。骨梁微細構造パラメータとして骨量（BV/TV）、骨梁幅（Tb.Th）、骨梁数（Tb.N）、骨梁間隙（Tb.Sp）を算出した。

3. 統計学的分析

卵巣摘出による骨梁構造パラメータに対する影響を調べるため、Student t検定を用いた。 $P < 0.05$ で有意差ありとした。

結果

OVX群およびSHAM群の脛骨近位端における海綿骨の骨断面像を3次元画像解析ソフトにて3次元構築した。その結果、OVX群は、SHAM群と比較して、骨梁構造の粗雑化が認められた（図1）。

卵巣摘出ラットにおける脛骨近位端の骨微細構造

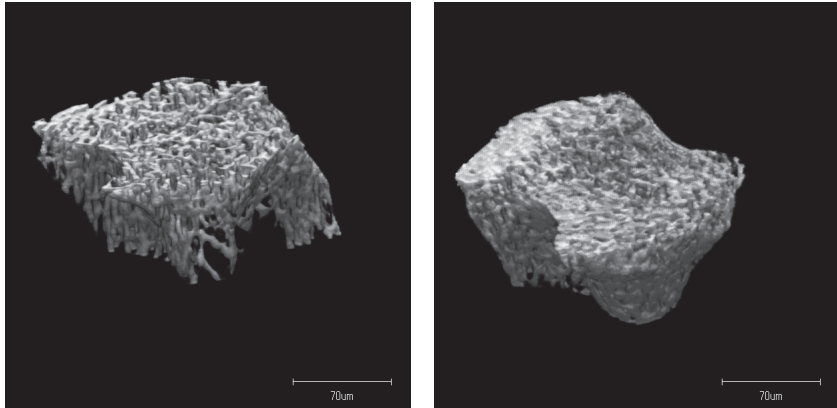


図1 脛骨近位端における骨梁画像：OVX群（左）・SHAM群（右）

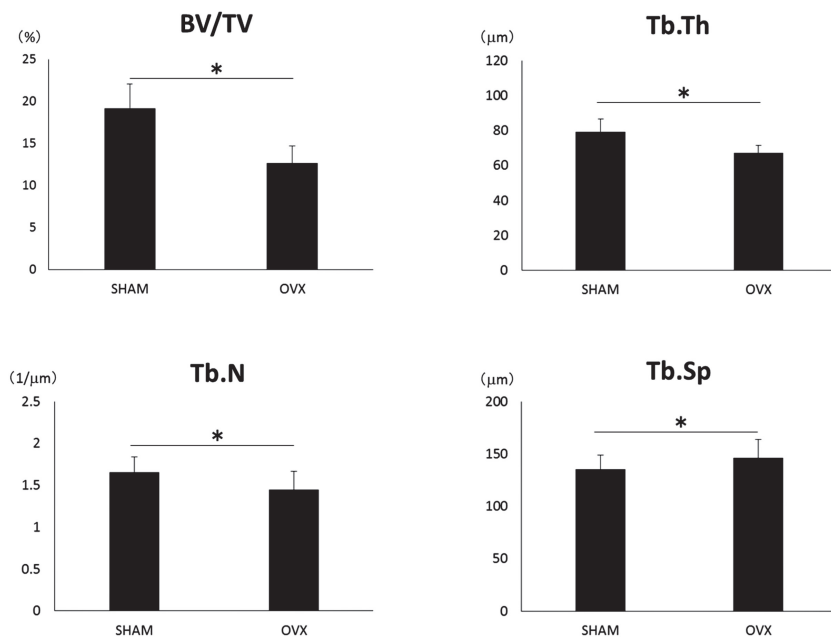


図2 卵巣摘出ラットの脛骨における骨微細構造パラメータ
OVX群のBV/TV, Tb.Th, Tb.NはSHAM群より有意に低値を示した。OVX群のTb.SpはSHAM群より有意に高値を示した。（* $P < 0.05$ vs SHAM群）

BV/TV, Tb.Th, Tb.Nにおいて、OVX群はSHAM群と比較して有意に低値を示した（図2, $P < 0.05$ ）。また、Tb.Spにおいて、OVX群はSHAM群より有意に高値を示した（図2, $P < 0.05$ ）。卵巣摘出術から8週後に脛骨近位端の骨微細構造を解析したところ、骨量、骨梁幅、骨梁数が著しく低下しており、骨梁間隙が著しく増加していた。骨量は35%の減少、骨梁幅は16%の減少、骨梁数は13%の減少、骨梁間隙は7%の増加を示した。

考察

卵巣摘出ラットにおける脛骨近位端は、5週後には力学的脆弱性が生じることが報告されている。Hoganらの報告では、卵巣摘出後21週目の脛骨近位端において、最大応力は20%、極限応力は25%、弾性係数は33%減少すると示されている [3]。これは、骨塩量の減少に加え、骨質構造の粗雑化が要因であることが考えられている。髄腔における海面骨量の割合を示すBV/TVは、健常ラットでは約30%であるが、卵巣摘出ラットでは約100日後までに5%まで減少し、その後は維持されることが示されている [13]。骨梁の微細構造の変化として、骨梁幅と骨梁数の減少、骨梁間隙の増加が起こることが先行研究で報告されており [4]、本研究の結果は過去の研究と類似していると言える。骨微細構造のパラメータには、Tb.Th, Tb.N, Tb.Spだけでなく、骨形状指数であるStructure Model Index, 骨梁の交差数を示す骨連結指数 (Conn.D), 骨梁の方向を示す骨異方性指数 (degree of anisotropy) などがあり、卵巣摘出後に次第に変化することが知られている。今後の研究では、これらのパラメータも解析して骨微細構造の特徴を明らかにする必要がある。

エストロゲンは、女性ホルモンの一つであり、骨代謝と密接な関係がある。骨代謝による骨リモデリングは骨芽細胞と破骨細胞のバランスを維持して行われ、エストロゲンは、破骨細胞のエストロゲン受容体に作用して、骨吸収を調整する [6]。エストロゲンの枯渇によって、エストロゲン受容体を介した破骨細胞の抑制が低下し、骨吸収が活発になる。骨吸収の活発化は細胞外カルシウム濃度を上昇させる。そして、副甲状腺ホルモンが抑制されることで、骨へのカルシウム吸収能が低下する [8]。本研究において、卵巣摘出によるエストロゲンの枯渇は、破骨細胞の活性化だけでなく、細胞外のカルシウム調整機構も破綻させ、骨量減少を誘導した可能性が考えられる。

閉経後骨粗鬆症に対する治療や予防には、薬物療法と運動療法がある。代表的な薬物療法として、ビスフォスネート薬があり、骨吸収能を抑制する働きをもつ。臨床試験において、腰椎と大腿骨近位部の骨密度上昇効果が示されており、臨床現場では最も使用されている薬物治療である [2]。運動療法は、骨量の維持や上昇効果をもつことで知られ、その効果は、多くの臨床研究や基礎研究で示されている。WolffらやWallaceらによるRCTのメタアナリシスでは、運動は閉経後女性の腰椎と大腿骨近位部の骨密度を上昇させることが報告されている [10, 12]。また、基礎研究においても、卵巣摘出ラットを用いて、様々な運動の効果が調査されている。卵巣摘出ラットにおけるトレッドミル走行の効果に関する報告では、脛骨や大腿骨の骨密度を上昇させることが示されている [9]。さらに、速度、頻度や期間の運動条件によって、その効果が異なることも分かっている [5, 7]。走行運動だけでなく、ジャンプ運動による高荷重刺激や振動刺激もポジティブな効果が示されている [1, 11]。

本研究の結果は、薬物療法や運動療法による作用機序の解明に向けた発展的研究に対して、有用なデータになると考えている。しかし、卵巣摘出後の脛骨における骨微細構造の解析に留まっているため、骨の脆弱性に関する力学的解析や、骨形成能もしくは骨吸収能に関する生化学的解析による調査が今後の課題である。また、骨微細構造のその他のパラメータ解析や、それらの経時的変化の解析から治療のタイミングや期間についても吟味する必要がある。

謝辞

本研究は2013年度名古屋学院大学リハビリテーション学部研究奨励金の一部を使用して行った。

参考文献

- [1] Brouwers JE, van Rietbergen B, Ito K, Huiskes R. Effects of vibration treatment on tibial bone of ovariectomized rats analyzed by in vivo micro-CT. *J Orthop Res* 2010; 28: 62–9.
- [2] Hagino H, Nishizawa Y, Sone T, Morii H, Taketani Y, Nakamura T, Itabashi A, Mizunuma H, Ohashi Y, Shiraki M, Minamide T, Matsumoto T. A double-blinded head-to-head trial of minodronate and alendronate in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone* 2009; 44: 1078–84.
- [3] Hogan HA, Ruhmann SP, Sampson HW. The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 284–92.
- [4] Ito M, Nishida A, Nakamura T, Uetani M, Hayashi K. Differences of three-dimensional trabecular microstructure in osteopenic rat models caused by ovariectomy and neurectomy. *Bone* 2002; 30: 594–8.
- [5] Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Effects of exercise on bone mineral density in mature osteopenic rats. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 1308–17.
- [6] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 2007; 130: 811–23.
- [7] Peng ZQ, Väänänen HK, Tuukkanen J. Ovariectomy-induced bone loss can be affected by different intensities of treadmill running exercise in rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 441–8.
- [8] Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23: 279–302.
- [9] Sakakura Y, Shide N, Tsuruga E, Irie K, Yajima T. Effects of running exercise on the mandible and tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2001; 19: 159–67.
- [10] Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 370: 657–66.
- [11] Umemura Y, Nagasawa S, Sogo N, Honda A. Effects of jump training on bone are preserved after detraining, regardless of estrogen secretion state in rats. *J Appl Physiol* (1985) 2008; 104: 1116–20.
- [12] Wallace BA, Cumming RG. Systematic review of randomized trials of the effect of exercise on bone mass in pre- and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2000; 67: 10–8.
- [13] Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1988; 43: 179–83.

[Note]

Bone Microstructure of Proximal Tibia in Rat with Ovariectomy

Fumiyuki Kato¹, Keigo Tamakoshi²

Abstract

We focused on the effect of ovariectomy on the cancellous bone microarchitecture of tibia in rats. Female Wistar rats were assigned to either SHAM or OVX group. The OVX group rats underwent ovariectomy. Eight weeks postoperation, the bilateral tibia was removed and BV/TV, Tb.Th, Tb.N, and Tb.Sp were analyzed using computed tomography scan and bone microarchitecture software. The BV/TV, Tb.Th, and Tb.N of the OVX group were significantly lower and the Tb.Sp was significantly higher than that of SHAM group. The results of this study demonstrated that in rats, the observed bone loss and reduction in the thickness and spacing of the trabecular bone related to negative change were caused by ovariectomy. These data will be useful to investigate the effect of various osteoporosis therapies in future.

Keywords: ovariectomized rat, tibia, bone microstructure, osteoporosis

1 Faculty of Rehabilitation Sciences, Nagoya Gakuin University

2 Faculty of Medical Technology, Niigata University of Health and Welfare