

原 著

自然発症インスリン非依存性糖尿病マウス における骨減少症

鈴 藤 勝 巳

東北大学歯学部口腔外科学第一講座

(指導: 茂木克俊教授)

東北大学歯学部歯科薬理学講座

(指導: 篠田 壽教授)

(平成7年10月4日受付, 平成7年11月13日受理)

Osteopenia in KK-A^y mice with non-insulin-dependent diabetes mellitus

Katsumi Suzufuji

Department of Oral and Maxillofacial Surgery I

(Director: Prof. Katsutoshi Motegi),

Department of Pharmacology

(Director: Prof. Hisashi Shinoda),

Tohoku University School of Dentistry

Abstract: While insulin-dependent (Type I) diabetes mellitus is considered to be a risk factor for the development of osteopenia, the effect of non-insulin-dependent (Type II) diabetes mellitus on bone metabolism is still a matter of debate. The objective of the present study was to investigate whether type II diabetes mellitus is associated with osteopenia. One hundred ten male KK-A^y mice with genetic diabetes (Type II), aged 5 to 25 weeks, and 80 age-matched male ICR non-diabetic mice were used. Bone mineral density (BMD) of the tibial metaphysis and diaphysis, bone formation rate in the femoral diaphysis, and several biochemical bone remodeling markers in the serum were determined. Histological examinations of the tibial metaphysis were also made. The following results were obtained:

- 1) The bone mineral density of the tibia of the KK-A^y mice was significantly lower than that of ICR mice at 5, 10, 15, 20 and 25 weeks of age.
- 2) The bone formation rate of the femur of KK-A^y mice, as determined by chronological labeling with NTA-Pb, was significantly lower than that of ICR mice.
- 3) Incomplete differentiation of chondrocytes in the epiphyseal growth plate, arrest of growth in length of trabecular bone, and loss of capillary invasion into calcified cartilage of the growth plate were observed in KK-A^y mice, suggesting incomplete enchondral ossification in type II diabetes mellitus. In addition, the number of osteoclasts or chondroclasts and that of active cuboidal osteoblasts seen in the metaphysis were significantly lower in KK-A^y mice as compared with ICR mice, indicating low bone resorption and formation in KK-A^y mice.

The results showed that osteopenia may occur due to decreased bone turnover in non-insulin-dependent diabetes mellitus.

Key words: non-insulin-dependent diabetes mellitus, KK-A^y mouse, osteopenia, bone mineral density, bone turnover

緒 言

糖尿病患者に骨減少症が高率に合併することは、1948年に Albright と Reifstein¹⁾ が指摘して以来多くの報告²⁻⁹⁾ がなされている。その頻度については、糖尿病の病型や人種差、測定されたパラメーターや、採用した測定法の違いなどにより一定の見解が得られるには至っていないものの、20~50%程度とするものが多い。1976年 Levin ら³⁾ はインスリン依存性糖尿病 35人およびインスリン非依存性糖尿病 101人について、前者の 54%、後者の 59% に 10% 以上の骨塩量の減少を見だしている。Ringe ら⁴⁾ もインスリン依存性糖尿病患者の 40% について 8.4% 以上の骨塩量の減少を報告している。さらに、Rosenbloom ら⁵⁾ によればインスリン依存性糖尿病患者 196人中、正常値以下の骨密度を示した割合は女子で 48%、男子で 29% の高率であったという。一方実験的に惹き起こした糖尿病動物においても、様々な骨代謝異常の存在が報告されている。例えば、インスリン依存性糖尿病モデルの一つとみなされるストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットでは、骨塩量の低下⁸⁻¹¹⁾ のみならず、腸管におけるカルシウム吸収能の低下¹²⁻¹⁴⁾、腎におけるビタミン D₃-1 α 水酸化酵素活性¹⁵⁻¹⁷⁾ やコラーゲン合成能¹⁸⁾ の低下、血中オステオカルシン¹⁹⁻²¹⁾ やビタミン C 濃度^{22,23)} の低下などが報告されている。従ってこれまでの臨床的あるいは実験的な研究結果を総合的に見れば、糖尿病状態において何らかの骨代謝異常が存在することは十分に推測され、特にインスリン依存性糖尿病患者においては、骨減少症が合併する確率が大きいことが次第に認められつつある。一方、糖尿病患者の大多数をしめるインスリン非依存性糖尿病患者についてみた場合、その報告は必ずしも一致しない。骨減少症の存在を認めた Levin³⁾ や Ringe⁴⁾ の報告がある一方で、その存在を認めなかったとする DeLeeuw ら²⁴⁾ の報告もあり、いずれとも確定されるにいたっていない。このように一定の所見が得られない原因には、糖尿病の病因、病態が極めて複雑多様であること、肥満に伴う体重負荷の増加や運動、食事療法が骨塩量に影

響することなどに加え、これまでインスリン非依存性糖尿病に近い動物実験モデルが無く、この病態に特有な骨病変や骨代謝の実体についての基礎データがほとんど存在しなかったことが大きな原因の一つと考えられる。本研究では、これらの点を考慮し、近年インスリン非依存性糖尿病の自然発症モデルとして西村ら²⁵⁾ によって開発された KK-A^y マウスを用い、この動物の骨病変や骨代謝の実体について、骨密度や骨形成量の測定、組織学的検索、骨代謝に関連した血清生化学的パラメータの測定等を行い、インスリン非依存性糖尿病状態における骨代謝について、基礎的な検討を行った。

材料および方法

1. 実験動物

自然発症糖尿病マウスである KK-A^y マウス (♂, 日本クレア, 東京) 110 匹およびその対照群として糖代謝異常の認められない ICR マウス (♂) 80 匹を用いた。実験に用いた KK-A^y マウスは、糖尿病症状として耐糖能低下、高血糖および尿糖陽性を発現するポリジェニックな KK マウス^{26,27)} に、肥満、黄色毛、および低耐糖能を多面発現する優性遺伝子 (A^y 遺伝子) を導入した合併型²⁵⁾ のインスリン非依存性自然発症糖尿病マウスである。実験期間中これらの動物は、1 ケージに 1 匹ずつの単独飼育とし、室温 24±2.5°C、湿度 55±5%、12 時間-12 時間の明暗サイクルのもとで生後 4 週齢から最長生後 25 週齢まで飼育した。飼料として、ラット・マウス用固形飼料、F-1 (船橋農場, 千葉; カルシウム: 1.26 g, リン: 0.95 g, ビタミン D₃: 300 IU/100 g) を与え、水道水を自由に摂取させた。また、実験動物の取り扱いに関しては、東北大学医学部・歯学部の内規に従い、動物に不必要な苦痛を与えぬように配慮した。

2. 実験方法

1) 試料の採取

生後 5, 10, 15, 20 および 25 週齢に達した KK-A^y マ

ウス (実験群) と ICR マウス (対照群) を各週齢ごとに各群それぞれ 10 から 15 匹ずつ総計 117 匹を断頭にて屠殺し、血液及び両側の脛骨を採取した。採取した血液は血清を分離した後、後述する血清生化学パラメーターの測定に用いるまで -20°C で冷凍保存した。左側脛骨は 70% エタノール中に浸漬保存し骨塩量の測定に用いた。また右側脛骨はカルノフスキー溶液に固定した後、後述する組織学的検索に供した。また、以上の実験とは別に、生後 7 週目と 11 週目に硬組織内時刻描記を施した 12 週齢の KK- A^{y} マウスと ICR マウス各 7 匹を断頭にて屠殺した。左右大腿骨を摘出した後、カルノフスキー溶液中に固定し、後述する骨形成量の測定に用いた。

2) 骨塩量の測定

篠田ら²⁸⁾の方法を用いた。即ち、各週齢のマウスよ

り採取し、70% エタノール中に浸漬保存した脛骨標本について、付着した筋肉および軟組織を除去した後、これらの軟 X 線写真 (ソフテックス社製, SOFTEX, Type CMB, 東京) を得た (図 1)。なお撮影した骨標本と同一フィルム (SOFTEX FILM, Type FR, 富士写真フィルム) 上には、必ずハイドロキシアパタイト (HA) 粉末を用いて作製した既知の厚みを持つ濃度基準尺 (ステップウエッジ) を置いて撮影し (図 2)、以後の定量の基準とした。撮影後、RENDOL (富士写真フィルム) を用いて 20°C , 4 分間現像し、15% 酢酸で停止後、RENFIX (富士写真フィルム) にて 10 分間定着処理を行った。現像した軟 X 線フィルムを、高周波数の安定光源を持つライトボックス (Carry View, 9 V, 5 W, きもと社) 上に置き、対象試料の画像をビデオカメラ (TI-23A, NEC) を介して、20 倍の画像とし

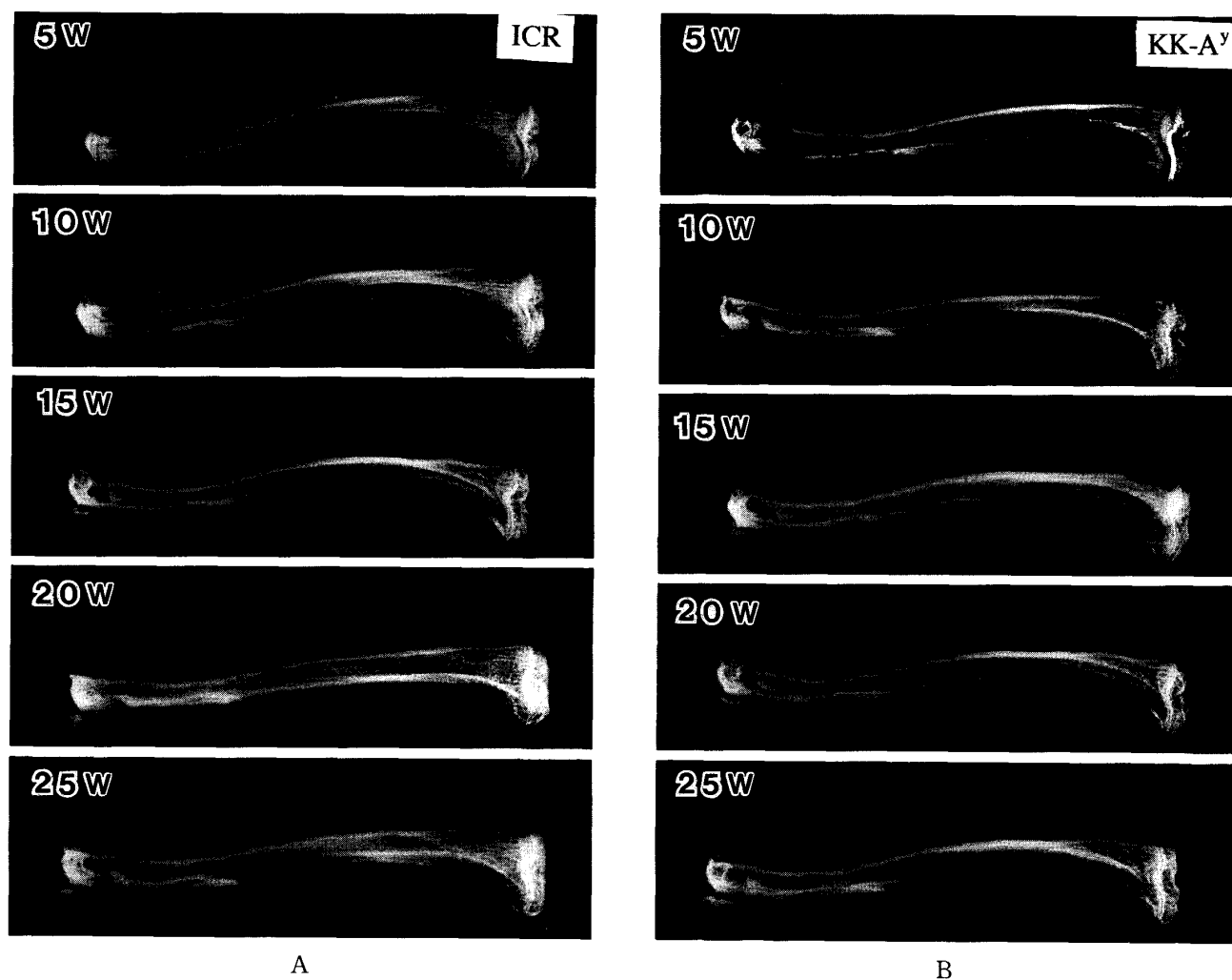


図 1 マウス脛骨 (5 週齢から 25 週齢) の軟 X 線画像
 A: ICR マウス B: KK- A^{y} マウス
 各週齢とも KK- A^{y} マウスの方が ICR マウスに比べ、X 線透過性が増している。

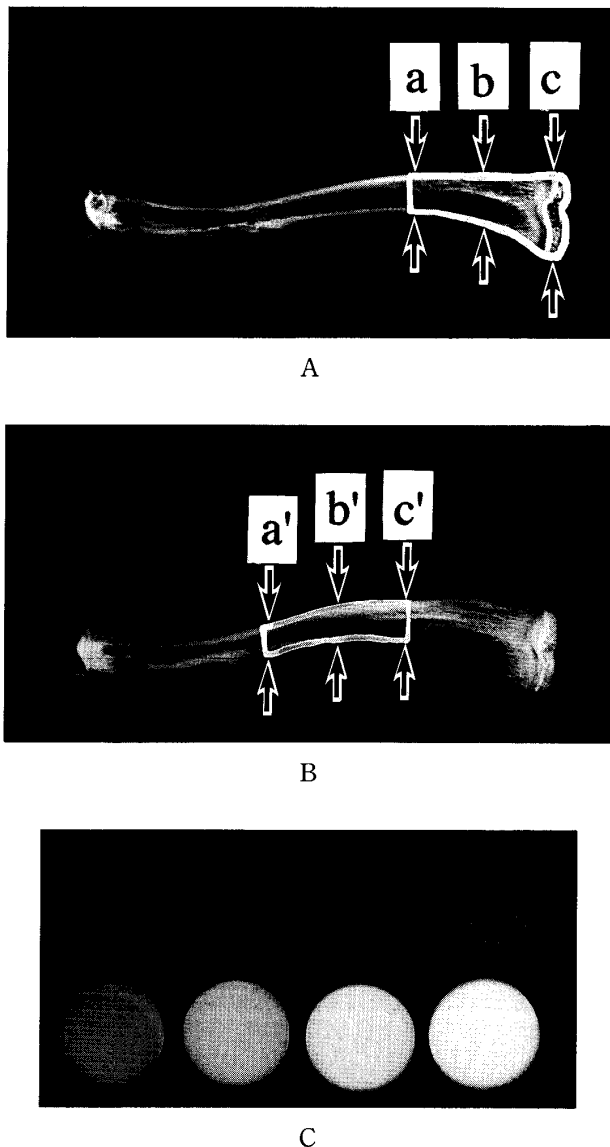


図2 骨塩量の測定範囲とハイドロキシアパタイト濃度基準尺の軟X線画線

測定野：白線の閉曲線領域

A. 脛骨近心端：脛骨の近位端から骨の全長の3分の1の範囲

$d = (a+b+c)/3$ d：試料の厚さの平均

B. 骨幹部：骨幹部中央3分の1の範囲

$d' = (a'+b'+c')/3$ d'：試料の厚さの平均

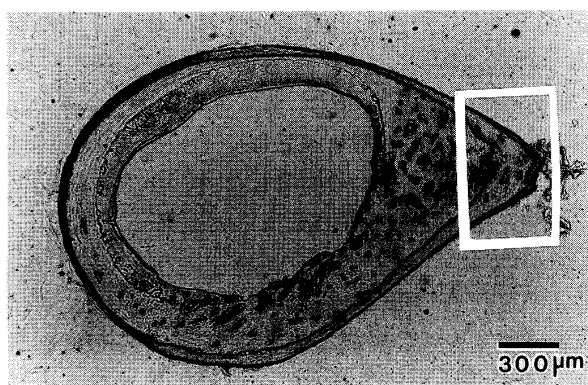
C. 8段階のハイドロキシアパタイト濃度基準尺

これらの画像の一部をビデオカメラを介してビデオモニターに取り込み、測定領域の黒化度を画像解析装置を用いて測定した。

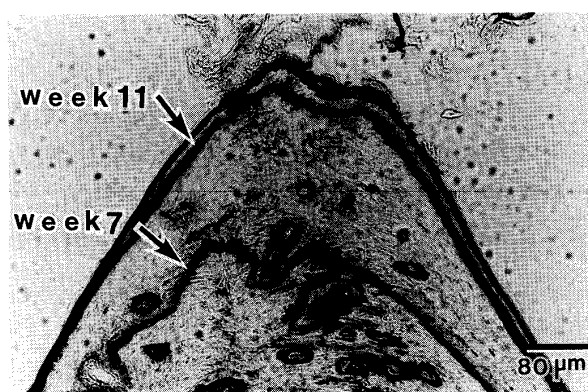
てビデオモニター (Type TMP-712B, NEC) 上に取り込んだ。その後、画像解析装置 (Aspect, 三谷商事) を用いて、まず取り込んだ HA 濃度基準尺の画像の黒化度 (256 階調) と既知のカルシウム密度 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) との関係性を求めた。本実験で用いた撮影条件 (80 V, 1 mA, 45-60 秒) では、黒化度とカルシウム密度の対数値との間には一定の直線関係が成り立つので、濃度基準尺について、各フィルムごとにその関係式を求めた。次いで、ビデオモニターに取り込んだ試料画像の特定の骨領域 (脛骨の近位端から骨の全長の 3 分の 1 までの範囲および骨幹部中央 3 分の 1) における黒化度を測定し (図 2), あらかじめ作成しておいた標準直線を用いて測定野内の骨塩量 (BMC: Bone Mineral Content) を画素点ごとの総計としてコンピューター上で求めた。次いで、この BMC を、現在臨床的に広く使われている MD 法²⁹⁾ に準じ、試料の厚さの平均で割り、この値を、骨密度 (BMD: Bone Mineral Density) として求めた。試料の厚さの平均値として、近心端 3 分の 1 の骨塩量の測定に際しては、図 2-A に示した部位 (a, b, c) の厚みの平均値を、また骨幹部中央 3 分の 1 の骨塩量測定に際しては、図 2-B に示した部位 (a', b', c') の厚みの平均値を採用した。

3) 骨形成量の測定

各系統マウスの、7 週齢目と 11 週齢目の 2 度にわたり硬組織内時刻描記を施す目的でニトリロトリ酢酸鉛溶液 (NTA-Pb, 3 mg/kg) を背部皮下に注射した^{30,31)}。1 週間後断頭にて屠殺した後、大腿骨を摘出し、カルノフスキー溶液にて、浸漬固定した。次に、この骨組織に沈着した鉛塩を不溶性の硫化鉛に置換し、明瞭な時刻描記線として観察するために、硫化水素で飽和した 0.1 N 塩酸で 2 日間脱灰した。脱灰試料を 30% ゼラチンで包埋後、通法によりクリオスタット (OTF/AS, Bright Instrument Co., England) にて大腿骨中央部より厚さ 15 μm の横断標本を作製した。0.1% 塩化金酸溶液に切片を漬け鍍金処理を施した後、5% チオ硫酸ナトリウムで調色した。次いでヘマトキシリンで染色した後、グリセリンゼリーにて封入した。組織像を透過型顕微鏡 (Axiophoto, Carl Zeiss, Germany) およびビデオカメラを介して、ビデオモニターに取り込んだ。画像解析装置を用いて、取り込んだ画面上で 2 本の時刻描記線に囲まれている部分の面積を測定し (図 3), これを 4 週間における骨の形成量とした。なお、時刻描記線で囲まれた骨添加領域は、内側皮質骨の骨膜側と外側皮質骨骨髓側の 2 箇所認められたが、これ



A



B

図3 硬組織内時刻描記像

- A. 大腿骨骨幹中央部の横断標本
2本の時刻描記線に囲まれた骨添加領域が、内側皮質骨の骨膜側と外側皮質骨骨髄側に認められる。
- B. 写真Aの白枠内の拡大図
7週目と11週目に施した時刻描記線を示す。

らのうち後者の領域では、1回目の時刻描記線が骨変化により消失している場合が多かったため、前者の領域のみを測定対象とした(図3)。

4) 組織学的検索

カルノフスキー溶液中に浸漬固定した脛骨は、10% EDTA 溶液にて2週間脱灰し、パラフィン包埋後、厚さ3 μmの脛骨近位端の矢状縦断面パラフィン切片を作製した。この切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施し、骨端軟骨板および骨幹端の組織像について比較検討を加えた。また一部の試料については、骨端軟骨板直下の特定範囲(1,000×1,000 μm)(図4)における破骨細胞数の計測およびその出現状態を観察するために、トリジンブルー染色を併用した酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRACP)染色を行った。破骨細

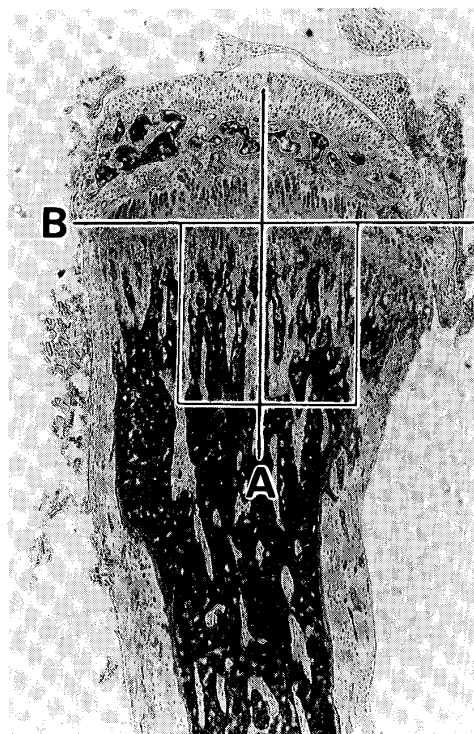


図4 TRACP陽性細胞数の計測

骨標本の長軸方向に沿って脛骨中心部に線を引き(直線A)、次に軟骨板下縁に沿って直線Aに対し垂線(直線B)を引いた。さらに直線Aを対称軸とする正方形(1,000×1,000 μm)を、直線Bを上辺とし設定した。

胞の同定基準としては、TRACP陽性で3個以上の核を持ちかつ骨表面に近接している多核細胞とした。

5) 血清の生化学的測定

採取した血液から速やかに分離した血清を用い、グルコース、カルシウム、無機リン、および骨性アルカリ性ホスファターゼ(ALP)活性を測定した。グルコースはムタローゼ・グルコースオキシダーゼ(GOD)法^{32,33)}により測定した。またカルシウムは、キレート発色法であるオルトクレゾールフタレインコンプレキソン(OCPC)法³⁴⁾により、無機リンは、P-メチルアミノフェノール還元法³⁵⁾にて測定した。ALP活性は、小麦胚芽由来のレクチンを用いた沈殿法^{36,37)}により、血清中の総ALP活性と残存ALP活性から求めた。

6) 統計的処理

測定値は平均値±標準偏差で示した。多群間における有意差検定は、二元配置分散分析法にScheffeの多重比較を併用して行った。また、2群間における有意差検定には、Studentのt検定あるいは、Welchのt検定を用いた。危険率5%以下を有意の差とした。

結 果

1. 体 重

図5にKK-A^yおよびICRマウスの実験期間中の体重の変化を示した。肥満型のKK-A^yマウスの体重増加はICRマウスに比べて大きく、その差は15週齢より次第に明らかになった。

2. 骨塩量

骨幹端領域を中心とした近心端3分の1における骨塩量はKK-A^yマウス、ICRマウスともに5-15週にかけて次第に増加し、以後横ばい状態となった。KK-A^yマウスの骨塩量はICRマウスの骨塩量に比べ5, 10, 15, 20および25週いずれの週齢においても約30%程

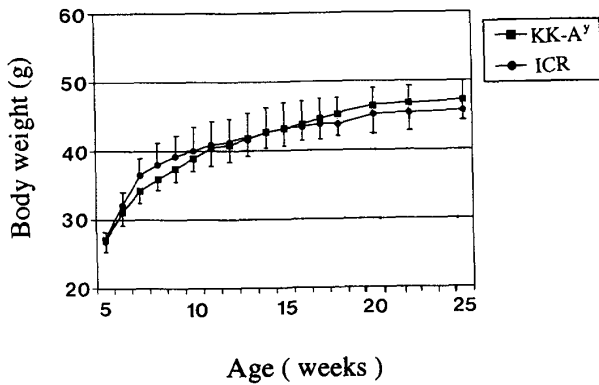


図5 KK-A^yマウスとICRマウスの体重曲線 5週齢から25週齢

脛骨近心端

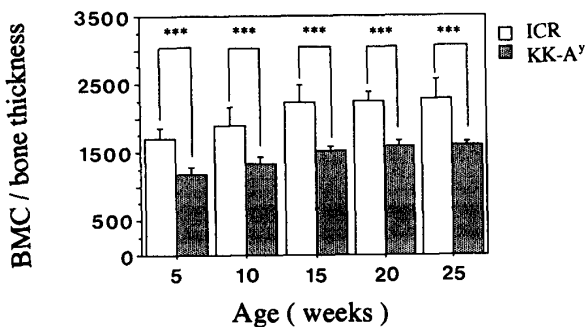


図6 脛骨近心端の骨塩量
測定値は平均値 (μg Ca/mm³) ± 標準偏差を示す (n=9-10)。多群間における有意差検定は、二元配置分散分析法に Scheffe の多重比較を併用した。2群間における有意差検定には Student の t 検定あるいは、Welch の t 検定を用いた。***: P<0.001

度減少を示しておりその差はいずれも統計学的に有意であった (p<0.001) (図6)。骨幹中央部におけるKK-A^yマウスの骨塩量は、ICRマウスに比べて、いずれの週齢においても低い値を示した。その低下の程度は近心端3分の1の骨塩量の場合に比べて少なく、ICRマウスに比べて20%前後の減少にとどまった (図7)。

3. 骨形成量 (表1)

KK-A^yマウスの形成量はICRマウスのそれと比較して有意に低下しており (p<0.01), ICRマウスの形成量のおよそ74%であった。

4. 組織学的所見

5週齢 (図8, 9, 10, 11)

ICRマウス: 骨端軟骨板から骨幹端にかけて活発に軟骨内骨化が進行していた。軟骨板の幅は比較的広く、軟骨細胞が休止層から増殖層、肥大細胞層、石灰化層へと分化していた。増殖層から肥大細胞層にかけ

脛骨骨幹部

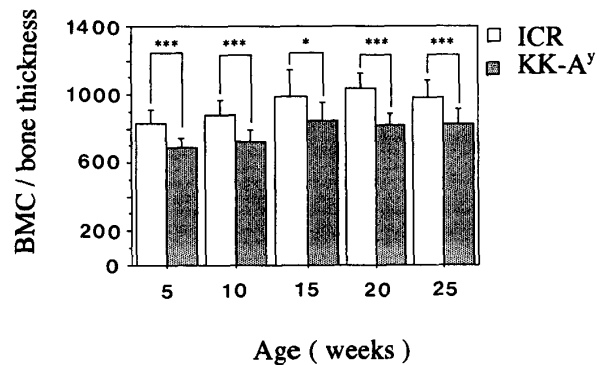


図7 脛骨骨幹部の骨塩量
測定値は平均値 (μg Ca/mm³) ± 標準偏差を示す (n=9-15)。二元配置分散分析法および Student の t 検定を用いた。
*: P<0.05, ***: P<0.001

表1 大腿骨骨幹中央部における骨形成量

	ICRマウス	KK-A ^y マウス
骨形成量 (mm ²)	0.30 ± 0.04	0.22 ± 0.01**
例数	7	6

測定値は平均値 ± 標準偏差を示す (n=6-7)。有意差検定には Welch の t 検定を用いた。**: P<0.01

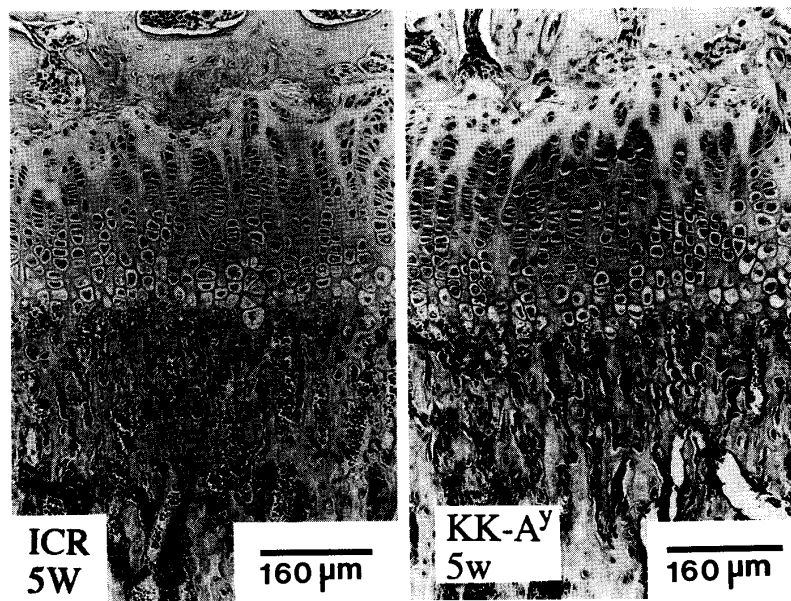


図8 マウス脛骨骨幹端の組織像
5週齢 ヘマトキシリン染色

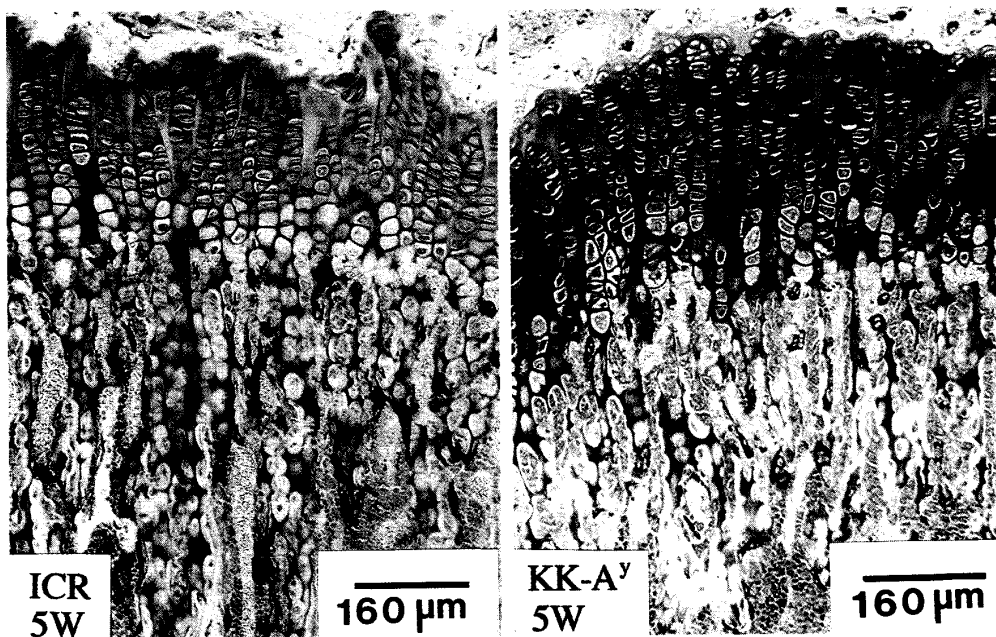


図9 マウス脛骨近位端のTRACP染色像
5週齢 トルイジンブルー染色

で見られる軟骨細胞柱は整然と配列していた。石灰化した軟骨板下縁には多くの血管が侵入し、軟骨板下縁や一次骨梁、二次骨梁の表層には多数の吸収窩が存在していた。それらの部位にはTRACP陽性の破軟骨細胞や破骨細胞が多数認められた。その近傍の骨梁の表

層には立方形をした背の高い骨芽細胞が多数存在した。骨端皮質骨内側にも重層した立方形の骨芽細胞が厚い層を形成していた。

KK-A^yマウス：肥大細胞層から石灰化層における細胞の肥大化と空胞化が充分にみられず、これらの層

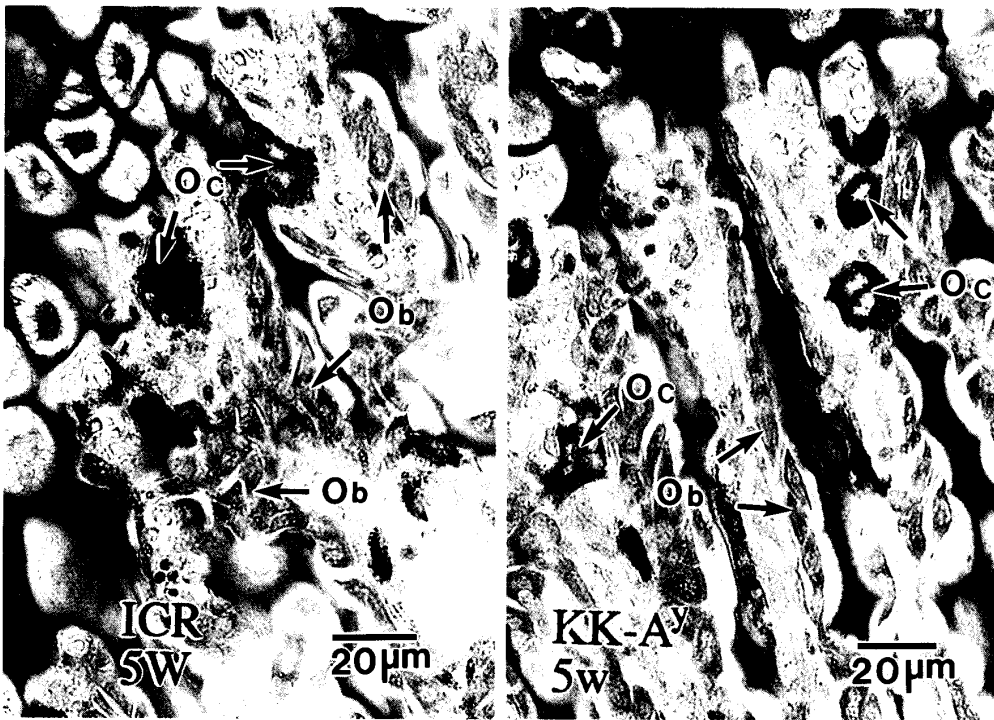


図 10 TRACP 染色像の強拡大図
 脛骨骨幹端 5 週齢 トルイジンブルー染色
 Ob: 骨芽細胞, Oc: 破骨細胞

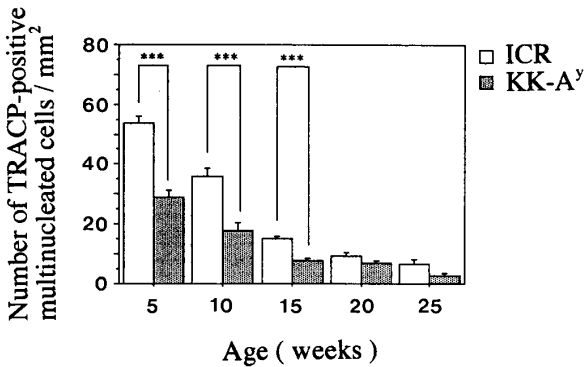


図 11 TRACP 陽性細胞数の測定
 計測部位は図 4 に示す。
 測定値は平均値±標準偏差を示す (n=5-6)。二
 元配置分散分析法に Scheffe の多重比較を併
 用した。***: P<0.001

の軟骨細胞の数が多く認められなかった。石灰化した軟骨板下縁への血管の侵入が少なく、血管の侵入部位周辺に多く見られる破軟骨細胞あるいは破骨細胞の数も ICR マウスに比べてはるかに少なかった (ICR マウス 54/mm² に対して KK-A^y マウス 29/mm², 図 11)。また、その形態もやや小型で扁平なものが多かった。軟

骨板下縁付近にある一次骨梁から二次骨梁の表層に多数存在する立方形で比較的背の高い大型の骨芽細胞の数が少なく全体に小型で扁平なものが目立った。皮質骨骨髄側に背の高い骨芽細胞が重層して配列する所見はみられず、骨芽細胞は扁平化しているものが多数を占めていた。骨梁の形態は、長軸方向への長さが ICR マウスに比べて全体に短く、骨梁表層に多くみられる吸収窩の数が減少し、骨梁表層が ICR マウスのそれと比べ平滑であった。

10 週齢 (図 11, 12, 13, 14)

ICR マウス, KK-A^y マウスの両群とも 5 週齢に比べ骨端軟骨板内における軟骨細胞柱の数が減少し、その配列も不規則になり、静止層, 増殖層, 肥大細胞層, 石灰化層の区別も不明瞭で軟骨細胞の分化が 5 週齢に比べて著しく不完全とみられる様相を呈していた。また、軟骨板下縁への血管の侵入が減少し、軟骨板下縁, 一次骨梁, 二次骨梁表層に存在する吸収窩の数が減り破骨細胞の数にも大きな減少がみられた。骨芽細胞も 5 週齢に比べると全体に小型化, 扁平化したものの数が多くなっていった。以上のような加齢に伴う変化は ICR マウスに比べると KK-A^y マウスにおいて全体に

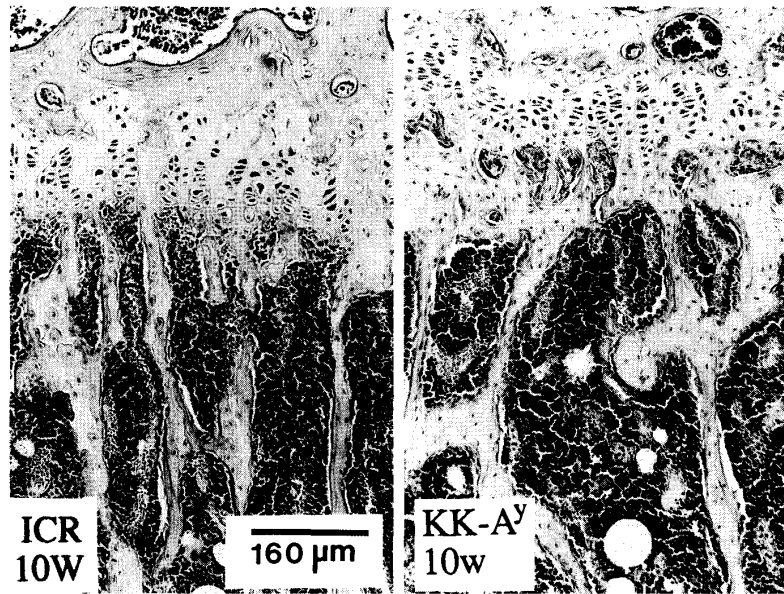


図 12 脛骨骨幹端の組織像
10 週齢 ヘマトキシリン染色

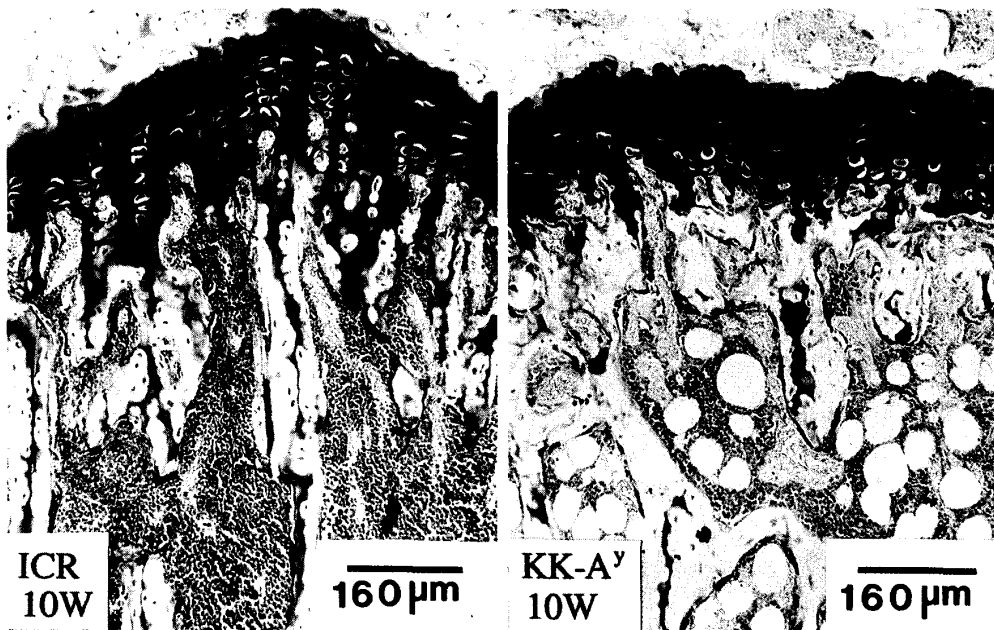


図 13 脛骨近位端の TRACP 染色像
10 週齢 トルイジンブルー染色

顕著であった。特に KK-A^y マウスでは、石灰化層にまで完全に分化したと思われる軟骨細胞がほとんどみられず、周辺の軟骨基質も ICR マウスのようにトルイジンブルーやヘマトキシリンに対してメタクロマジーを示すことなく色素本来の青色に濃染したままであ

た。また、軟骨板下縁への血管の侵入が少ないため一次骨梁として残存する石灰化軟骨の幅が広くなり骨梁の数が減少し個々の骨梁の太さが ICR マウスのそれに比べて太くなっているのが観察された。骨梁表面や皮質骨内側の吸収窩の数も少なく全体に骨梁表面が平

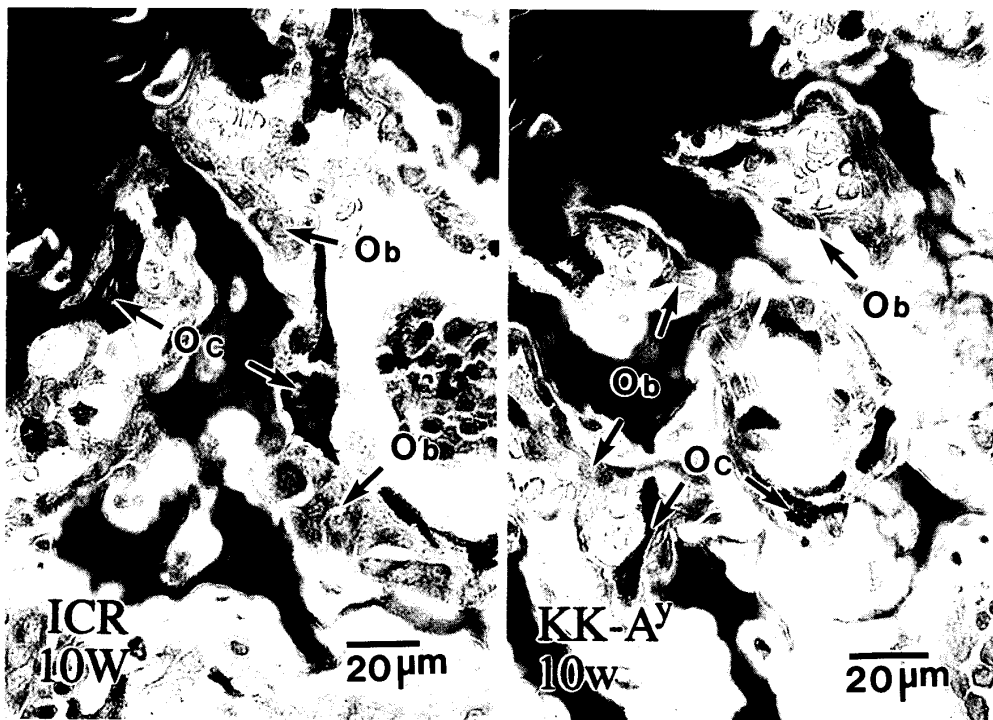


図 14 TRACP 染色像の強拡大図
 脛骨骨幹端 10 週齢 トルイジンプルー染色
 Ob: 骨芽細胞, Oc: 破骨細胞

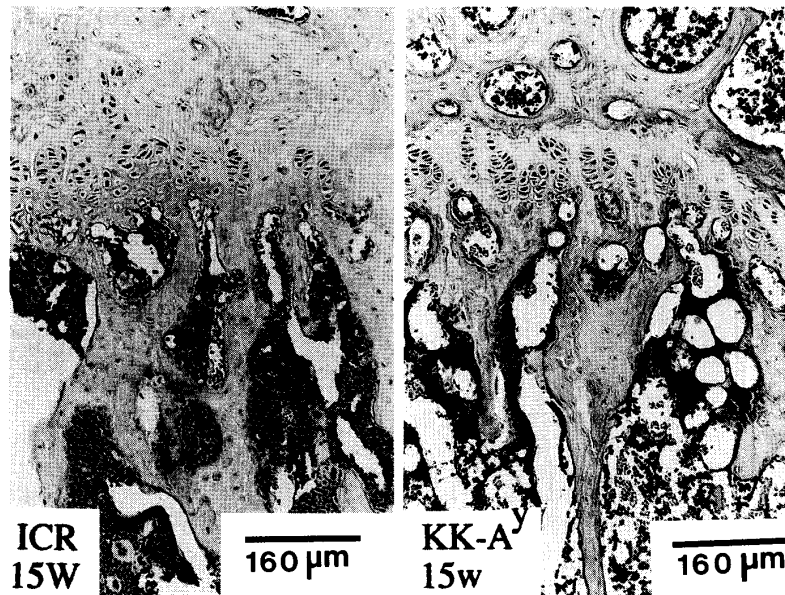


図 15 脛骨骨幹端の組織像
 15 週齢 ヘマトキシリン染色

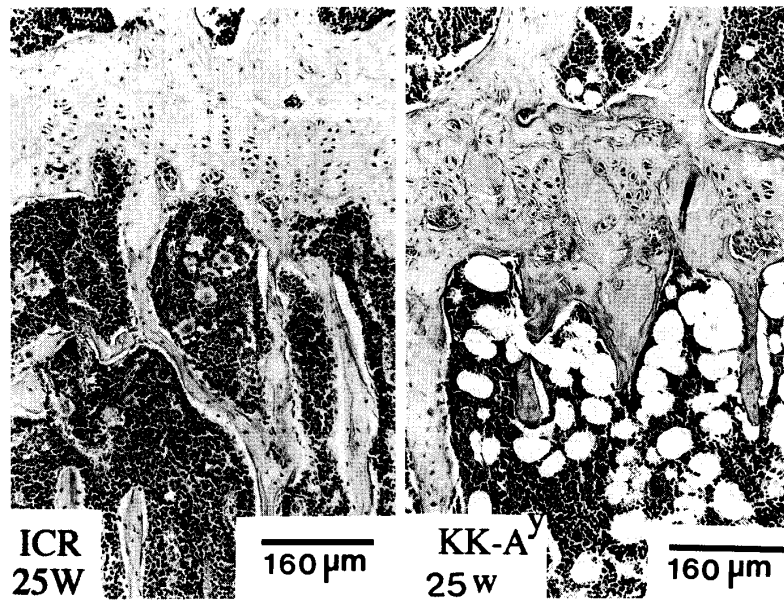


図 16 脛骨骨幹端の組織像
25 週齢 ヘマトキシリン染色

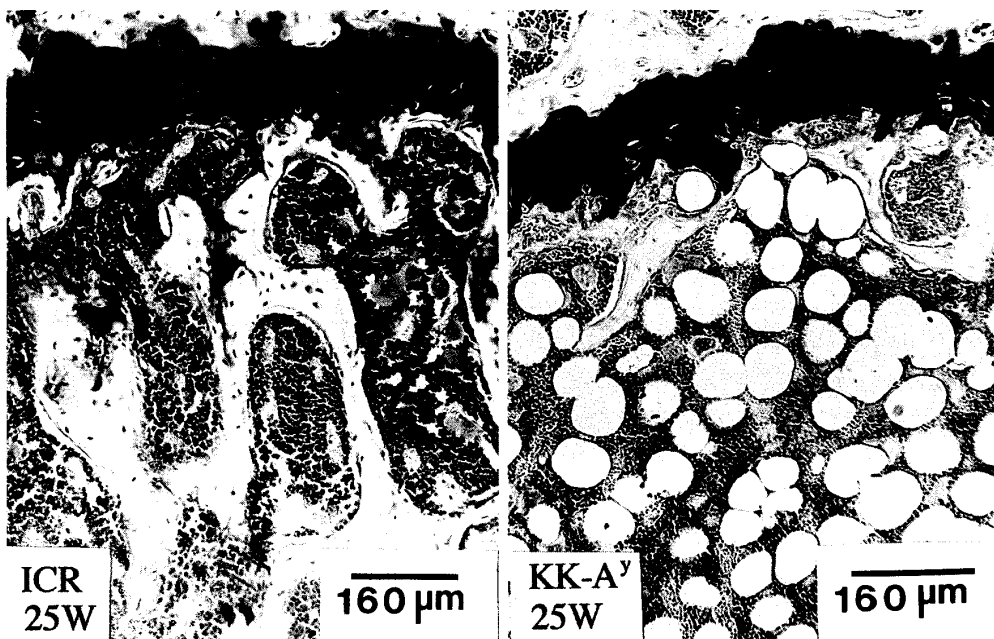


図 17 脛骨近位端の TRACP 染色像
脛骨骨幹端 25 週齢 トルイジンブルー染色

滑で破骨細胞の数も ICR マウスの $36/\text{mm}^2$ に対して $18/\text{mm}^2$ と半減していた (図 11)。

また、その骨梁の長さは ICR マウスに比べて短いものが多く、長軸方向への骨梁の伸長が著しく抑制された像を示していた。さらに、骨梁表層に存在する骨芽

細胞の数が減少し全体に扁平なものが多かった。また、KK-A^y マウスでは、その骨髓腔に脂肪細胞の増加を示す空胞が多数出現しているのが観察された。

15-25 週齢 (図 11, 15, 16, 17)

ICR マウス：軟骨細胞柱の数はさらに減少傾向を

示し、その配列の不規則性の度合いも一層強くなっていった。軟骨細胞の分化も不完全で肥大細胞層および石灰化層を形成する軟骨細胞はほとんど認められなくなった。骨梁の長軸方向への長さは短くなり、石灰化した軟骨板下縁への血管の侵入も次第にみられなくなった。破骨細胞数は著しく減少し骨芽細胞の数の減少、扁平化も顕著となった。

KK-A^y マウス：増殖層から、肥大細胞層、石灰化細胞層における軟骨細胞は20, 25週齢ではほとんど認められなかった。個々の骨梁の長軸方向への長さが著しく短くなり軟骨板下縁への血管の侵入、破軟骨細胞、破骨細胞による骨吸収が行われなくなるため、軟骨下縁が吸収されないまま連続して板状の骨様構造を形成していた。骨梁骨や皮質骨の表層にはほとんど扁平化した骨芽細胞しか認められなかった。また、骨髓腔における脂肪細胞の数もKK-A^y マウスにおいて明らかに多く認められ、その差は週齢が進むに従って明瞭となった。

5. 血清生化学値

1) 血清グルコース濃度 (図18)

ICR マウス：5週齢から20週齢まで暫増し、20週齢で平均160 mg/dlに達した。25週齢ではやや減少を示した。

KK-A^y マウス：10週齢時の血糖値がすでに200 mg/dlを越え、その後も上昇を続け25週齢ではその平均値が400 mg/dlを越えていた。

2) 血清カルシウム濃度 (図19)

各週齢とも血清カルシウム濃度についてはICRとKK-A^y マウスとの間に有意の差は認められなかつ

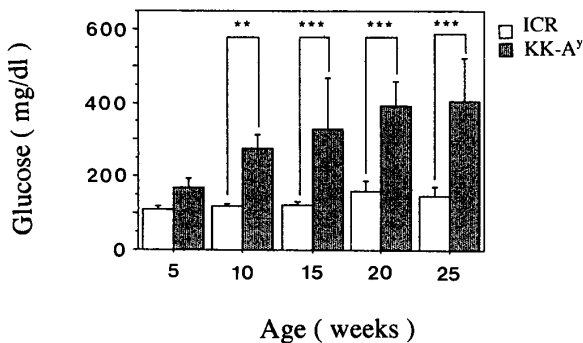


図18 血清グルコース濃度
測定値は平均値±標準偏差を示す (n=10-15)。二元配置分散分析法に Scheffe の多重比較を併用した。**: P<0.01, ***: P<0.001

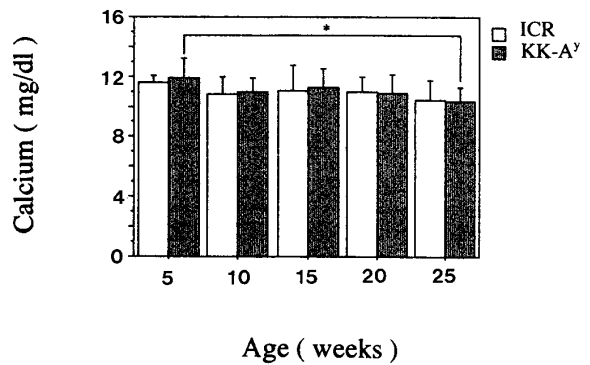


図19 血清カルシウム濃度
測定値は平均値±標準偏差を示す (n=10-15)。二元配置分散分析法に Scheffe の多重比較を併用した。
*: P<0.05

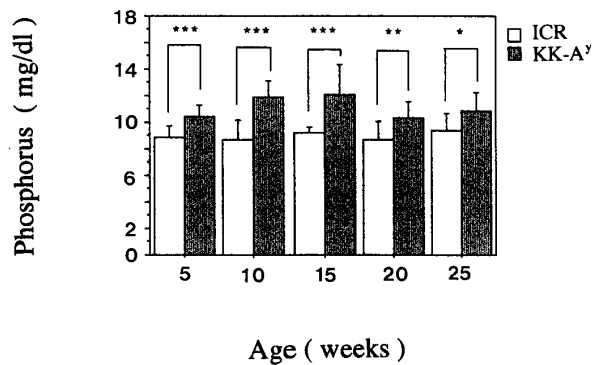


図20 血清無機リン濃度
測定値は平均値±標準偏差を示す (n=10-15)。二元配置分散分析法と Student の t 検定を用いた。*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001.

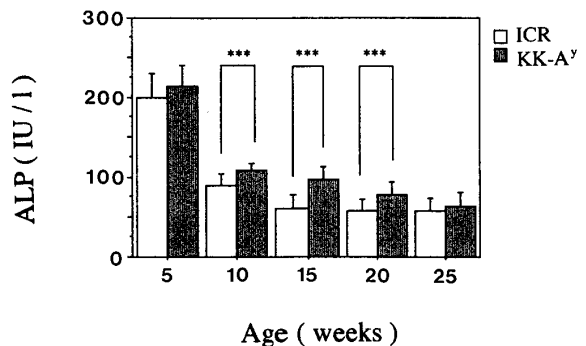


図21 骨性アルカリ性ホスファターゼ活性
測定値は平均値±標準偏差を示す (n=8-10)。二元配置分散分析法および Student の t 検定を用いた。IU: 国際単位 ***: P<0.001.

た。25 週齢の KK-A^y マウスの血清カルシウム濃度だけが、5 週齢に比べ有意に低下していた ($p < 0.05$)。

3) 血清無機リン濃度 (図 20)

KK-A^y マウスは ICR マウスに対し 5, 10, 15, 20 および 25 週齢いずれの週齢においても有意に高値を示した。特に 10 週齢および 15 週齢において高い値を示した。

4) 骨性アルカリ性ホスファターゼ活性 (図 21)

KK-A^y, ICR マウスともに週齢と共に減少した。週齢ごとにみると KK-A^y マウスが ICR マウスに比べ高値を示す傾向にあり、特に 10, 15, 20 週齢における値は統計学的にも有意の差を示した ($p < 0.001$)。

考 察

1. 糖尿病性骨減少症の存在

KK-A^y マウスの骨塩量は ICR マウスの骨塩量に比べ、5 週齢から 25 週齢までの各週齢とも有意の低値を示し、インスリン非依存性の糖尿病状態では骨減少症が存在することが確認された。またその骨塩量の減少は皮質骨を主とする骨幹部よりも骨梁骨を多く含む骨幹部端部において明瞭であった。一般に、体全体の皮質骨と骨梁骨の骨代謝回転全体に占める割合は、前者において 20%、後者において 50~80% 程度である^{38,39)} ことが報告されており、骨粗鬆症をはじめ代謝性骨疾患の多くにおける骨塩量の減少は、まずはじめに骨梁骨に現れることが知られている。今回、骨梁骨を多く含む骨幹部端部の測定において骨塩量の大きな減少が見られたのも、インスリン非依存性糖尿病状態のもとで骨の代謝回転が大きな影響を受けたことを示すものである。また、KK-A^y マウスの骨塩量は、血糖値がまだ ICR のそれと有意の差を示していない 5 週齢の時点で既に明瞭な低下を示していた。こうした事実は、遺伝的な糖尿病動物である KK-A^y マウスが高血糖、尿糖陽性という明らかな糖尿病状態を示す以前の早い段階からすでに骨減少症が発現している可能性を示すものと考えられる。

2. 糖尿病性骨減少症の本態

糖尿病性骨減少症の本態に関しては、これが骨粗鬆症なのか、くる病・骨軟化症なのか、あるいは糖尿病に特異的な骨病変なのかいまだに不明である。ヒトにおいてインスリン依存性糖尿病およびインスリン非依存性糖尿病の腸骨生検標本を用いた Deleeuw ら⁴⁰⁾ の

組織計測学的検討によると、インスリン依存性糖尿病では、骨吸収面および類骨の増加は認められるがビタミン D 欠乏の際に認められるような石灰化の障害を示すような所見はなく、インスリン非依存性糖尿病では類骨の量は正常であったという報告がなされている。くる病・骨軟化症の特徴としては骨端軟骨板内の肥大層軟骨細胞の巨大化、骨性 ALP 活性の上昇、石灰化の未熟な類骨組織の増加が挙げられる。本研究で用いた KK-A^y マウスの骨端軟骨板周囲の組織学的検索では、骨端軟骨板における軟骨細胞の分化不全が認められたが、これは肥大層軟骨細胞の巨大化ではなく、むしろ肥大層軟骨細胞の減少であった。また、5 週齢から 25 週齢を通して KK-A^y マウスの骨に類骨組織が増加しているという所見は認められず、くる病・骨軟化症に特有と思われる組織像を得ることはできなかった。さらに、血清生化学値はくる病・骨軟化症では通常血清リン濃度が低値となるが、KK-A^y マウスの血清リン濃度は 5 週齢から 25 週齢を通じて ICR マウスに比べ平均 24% と有意に高値を示していた。したがって、本研究の KK-A^y マウスで見られた糖尿病性骨減少症の本態は、少なくとも骨軟化症とは異なる骨変化であろうと推測される。一方、骨粗鬆症との比較についてみると、骨粗鬆症では血中オステオカルシン値は上昇しているのに対し、糖尿病性骨減少症ではその値は低下する例が多いとの報告^{19-21,41)} がなされている。Bessho&Hayashi⁴²⁾ はヒト大腿骨頸部の骨組織学的検討から、糖尿病性骨減少症は骨粗鬆症とも骨軟化症とも異なると報告しており、その本態についてはさらに詳細な検討が必要と思われる。

3. 糖尿病性骨減少症の骨代謝回転

I 型糖尿病では骨代謝回転の遅延が認められるという報告がいくつか知られている。Verhaeghe ら⁴³⁾ は 12 週齢の自然発症の I 型糖尿病動物である BB ラットにおいて、その骨の組織学的検討の結果から海綿骨骨量の減少と類骨の減少および骨芽細胞の減少を認め、I 型糖尿病性骨減少症の代謝回転は骨形成が正常より減少した低回転型であるとしている。骨芽細胞によって合成される非コラーゲン蛋白質であり骨形成の指標の 1 つとされるオステオカルシンの低下¹⁹⁻²¹⁾ がストレプトゾトシン糖尿病ラット²⁰⁾ や BB ラット²¹⁾ において報告されており、I 型糖尿病性骨減少症は低回転型であることを支持している。また、糖尿病患者においても血中オステオカルシン濃度の低下が報告さ

れており、骨芽細胞の機能低下を示唆した報告もある。しかし、糖尿病患者の骨を病理組織学的に検討した報告は依然として極めて少なく、さらに一方では、Selby⁴⁴⁾によってI型糖尿病性骨減少症は骨形成の減少よりも骨吸収の亢進によってもたらされているとの報告もある。本研究では骨代謝回転のうちの骨形成系および骨吸収系のそれぞれの過程が、はたして抑制されているのか亢進しているのかについて検討する目的で直接骨形成量を測定する一方で、最も骨の改造機転(吸収・形成)が盛んに行われている成長期の脛骨骨幹端部を検索の対象に選び検討を加えた。

(1) 骨形成系について

この実験では、骨吸収から独立しており、一方向性の骨添加が比較的長期間観察できる大腿骨の中央部を選び、1ヶ月間における骨形成量を直接測定した。その結果KK-A^yマウスの骨形成量はICRマウスに比べおよそ26%低下していることが示された。この時期は、両群とも体重が著しく増加し、骨塩量の測定結果からもその増加率ももっとも高い期間であり、最大骨塩量 (peak bone mass) を決定するのに極めて重要な段階である。この時期の骨形成量に差が認められたことは、KK-A^yマウスでは明らかに骨形成が低下していることを証明したものと考えられる。また、KK-A^yマウスの組織学的検討からも、骨端軟骨板内の肥大層に肥大・空胞化した軟骨細胞がICRマウスのように認められず、軟骨性骨化の障害を示唆する所見が見られたことや、各週齢を通じて骨梁や皮質骨表層の骨芽細胞が扁平化しているものが多く、数も減少していたことは、このマウスにおける骨形成が明らかに低下していることを支持する所見と考えられた。なお、本研究において測定した血清中ALP活性はICRマウスに比べKK-A^yマウスにおいて高値を示す傾向にあった。血清中ALP活性の上昇は一般には骨形成が上昇した際や、骨軟化症発症時に見られるが、今回KK-A^yマウスに見られた上昇は次のような理由から骨形成の上昇にもとづくものとは考えにくい。即ち、Ishidaら²⁰⁾によればストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットに血中ALP活性の上昇とともに、肝障害の指標となるアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (GOT) の増加を認め、血中ALP活性の上昇と肝障害との関係を示唆している。本研究で使用したレクチン沈殿法による骨性ALP

活性の測定法は、従来の測定法に比べ骨の反応をより鋭敏にとらえているものの、その一方で本法のみではultrafast型あるいはI型ALP/胎盤型/小腸型ALPの分離ができないなど、必ずしも骨由来のアイソザイムだけを反映したものではないことも報告されている³⁷⁾。従って、本研究で測定された血清中ALP活性の上昇は、骨代謝の状態のみならず、糖尿病による肝障害をも反映している可能性もあると考えられる。

(2) 骨吸収系について

骨吸収系については、破骨細胞数の計測を含む組織学的所見を中心に検討を加えた。破骨細胞数に関しては、5週齢から25週齢にいたるまで、KK-A^yマウスはICRマウスに比べ低値を示しており、5週齢、10週齢および15週齢では、特定部位の破骨細胞数はICRマウスの50%程で、明らかに低値を示していた。KK-A^yマウスの破骨細胞は、骨端軟骨板直下及び骨梁下縁への分布は少なく、小型で扁平な形態をしており細胞の活性が低下していることもうかがわせた。また石灰化した軟骨板下縁への血管の侵入もICRマウスに比べて少ないことなど、骨吸収系の低下が推測された。さらに、骨梁についてみると、ICRマウスに比べてKK-A^yマウスでは、長軸方向の長さが短く、幅が太く、吸収窩を欠いた平滑な形態をしており、週齢を追うごとに軟骨板下縁が吸収されないまま骨が板状に石灰化し、連続した骨様組織を形成していた。かかる所見は、KK-A^yマウスでは長軸方向への骨梁骨の劣成長が起こっていると同時に、その骨組織が十分な骨吸収を受けずに、骨改変が十分に行われなかった結果であると推測される。以上のことから、インスリン非依存性糖尿病では、骨形成系及び骨吸収系がともに低下した状態、即ち、低回転型となっていることが推測された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤な御指導と御教示を賜りました本学口腔外科学第一講座茂木克俊教授ならびに歯科薬理学講座篠田 壽教授に謹んで感謝の意を表します。また、終始様々な御協力と御援助を頂きました本学口腔外科学第一講座および歯科薬理学講座の皆様に合わせて厚く感謝いたします。

内容要旨：糖尿病性骨減少症は、インスリン依存性 (I型) 糖尿病患者ではその存在が一般に認められているが、インスリン非依存性 (II型) 糖尿病患者では確定されていない。本研究の目的は、II型糖尿

病における骨減少症の存在と病態について明らかにする事にあった。

実験には、ヒトの II 型糖尿病モデルに近い KK-A^y マウス (5 週齢から 25 週齢) を用い、骨塩量、骨形成量、血清生化学値の測定、組織学的検索等の多面的な検討を行い、以下の結果を得た。

1) 5 週齢から 25 週齢までの KK-A^y マウスの脛骨骨塩量は対照の ICR マウスの骨塩量に比べて低値を示した。

2) KK-A^y マウスの骨形成量は、対照の ICR マウスに比べ、有意の低値を示した。

3) KK-A^y マウスでは、骨端軟骨板内の軟骨細胞の分化不全、骨梁の長軸方向への劣成長、軟骨板直下への侵入血管の減少等の組織学的所見が得られ、インスリン非依存性糖尿病状態においては、軟骨内骨化機転が抑制されていることが示唆された。また、骨芽細胞の小型化、扁平化、破骨細胞の数の著しい減少と小型化を認め、これらの細胞の機能低下が推測される所見を得た。

以上の結果より、II 型糖尿病では骨減少症が発現し、その本態は骨形成と骨吸収の両機能が低下する低回転型骨代謝であると考えられた。

文 献

- 1) Albright, F. and Reifenstein, E.C.: Parathyroid glands and metabolic bone disease. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1948, Selected studies, p. 150.
- 2) Berney, P.W.: Osteoporosis and diabetes mellitus. *J. Iowa Med. Soc.* **42**: 10-12, 1952.
- 3) Levin, M.E., Boisseau, V.C. and Avioli, L.V.: Effects of diabetes mellitus on bone mass in juvenile and adult-onset diabetes. *N. Engl. J. Med.* **294**: 241-245, 1976.
- 4) Ringe, J.D., Kuhlencordt, F. and Kuhnau, J. Jr.: Mineralgehalt des Skeletts bei Langzeitdiabetikern. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **101**: 280-282, 1976.
- 5) Rosenbloom, A.L., Lezotte, D.C., Weber, F.T., Gudat, J., Heller, D.R., Weber, M.L., Klein, S. and Kennedy, B.B.: Diminution of bone mass in childhood diabetes. *Diabetes* **26**: 1052-1055, 1977.
- 6) McNair, P., Madsbad, S., Christiansen, C., Faber, O.K., Transbøl, I. and Binder, C.: Osteopenia in insulin treated diabetes mellitus. Its relation to age at onset, sex and duration of disease. *Diabetologia* **15**: 87-90, 1978.
- 7) McNair, P., Madsbad, S., Christiansen, M.S., Christiansen, C., Faber, O.K., Binder, C. and Transbøl, I.: Bone mineral loss in insulin-treated diabetes mellitus: Studies on pathogenesis. *Acta Endocrinol.* **90**: 463-472, 1979.
- 8) 折茂 肇, 細井孝之: 糖尿病性骨減少症. 日本臨床 **49**(増刊号): 256-268, 1991.
- 9) Bouillon, R.: Diabetic bone disease. *Calcif. Tissue Int.* **49**: 155-160, 1991.
- 10) Shires, R., Teitelbaum, S.L., Bergfeld, M.A., Fallon, M.D., Slatopolsky, E. and Avioli, L.V.: The effect of streptozotocin-induced chronic diabetes mellitus on bone and mineral homeostasis in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* **97**: 231-240, 1981.
- 11) Goodman, W.G. and Hori, M.T.: Diminished bone formation in experimental diabetes: relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes* **33**: 825-831, 1984.
- 12) Schneider, L.E. and Schedl, H.P.: Diabetes and intestinal calcium absorption in the rat. *Am. J. Physiol.* **223**: 1319-1323, 1972.
- 13) Schneider, L.E., Omdahl, J. and Schedl, H.P.: Effects of vitamin D and its metabolites on calcium transport in the diabetic rat. *Endocrinology* **99**: 793-799, 1976.
- 14) Nyomba, B.L., Verhaeghe, J., Thomasset, M., Lissens, W. and Bouillon, R.: Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. I. Abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption. *Endocrinology* **124**: 565-572, 1989.
- 15) Schneider, L.E. and Schedl, H.P.: Experimental diabetes reduces circulating 1, 25-dihydroxyvitamin D in the rat. *Science* **196**: 1452-1454, 1977.
- 16) Spencer, E.M., Khalil, M. and Tobiassen, O.: Experimental diabetes in the rat causes an

- insulin-reversible decrease in renal 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase activity. *Endocrinology* **107**: 300-305, 1980.
- 17) Nyomba, B.L., Bouillon, R., Lissens, W., Van Baelen, H. and De Moor, P.: 1,25-dihydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein are both decreased in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* **116**: 2483-2488, 1985.
 - 18) Spanheimer, R.G., Umpierrez, G.E. and Stumpf, V.: Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes* **37**: 371-376, 1988.
 - 19) Glajchen, N., Epstein, S., Ismail, F., Thomas, S., Fallon, M. and Chakrabarti, S.: Bone mineral metabolism in experimental diabetes mellitus: osteocalcin as a measure of bone remodeling. *Endocrinology* **123**: 290-295, 1988.
 - 20) Ishida, H., Seino, Y., Taminato, T., Usami, M., Takeshita, N., Tsutsumi, C., Moriuchi, S., Akiyama, Y., Hara, K. and Imura, H.: Circulating levels and bone contents of bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein are decreased in streptozotocin-induced diabetes: possible marker for diabetic osteopenia. *Diabetes* **37**: 702-706, 1988.
 - 21) Verhaeghe, J., Suiker, A.M.H., Nyomba, B.L., Visser, W.J., Einhorn, T.A., Dequeker, J. and Bouillon, R.: Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. II. Impaired bone turnover and decreased osteocalcin synthesis. *Endocrinology* **124**: 573-582, 1989.
 - 22) McLennan, S., Yue, D.K., Fisher, E., Capogreco, C., Heffernan, S., Ross, G.R. and Turtle, J.R.: Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes: relationship with collagen and polyol pathway abnormalities. *Diabetes* **37**: 359-361, 1988.
 - 23) Yue, D.K., McLennan, S., Fisher, E., Heffernan, S., Capogreco, C., Ross, G.R. and Turtle, J.R.: Ascorbic acid metabolism and polyol pathway in diabetes. *Diabetes* **38**: 257-261, 1989.
 - 24) DeLeeuw, I. and Abs, R.: Bone mass and bone density in maturity-type diabetes measured by the ¹²⁵I photon absorption technique. *Diabetes* **26**: 1130-1135, 1977.
 - 25) Nishimura, M.: Breeding of mice strains for diabetes mellitus. *Exp. Anim.* **18**: 147, 1969.
 - 26) Nakamura, M.: A diabetic strain of the mouse. *Proc. Jap. Acad.* **38**: 348, 1962.
 - 27) 西村正彦: 自然発症糖尿病. 阿部正和編: バイオメジカルシリーズ・糖尿病. 講談社サイエンティフィック, 東京, 1974, pp.19-44.
 - 28) 篠田 壽, 莊司佳奈子, 鈴藤勝巳: 小動物骨塩量の簡易測定法. *東北歯誌* **13**: 122-129, 1994.
 - 29) 串田一博, 井上哲朗, 山下源太郎: 手部 X 線による microdensitometry 法. 森田陸司編: 骨ミネラル測定と骨粗鬆症. メディカルレビュー社, 大阪, 1989, pp.33-41.
 - 30) 麻生田亮, 佐野恒吉, 市川明美: ニトリロトリ酢酸亜鉛キレートによる硬組織内時刻描記の試み. *東京医科歯科大学難治疾患研究所年報* **10**: 87-89, 1982.
 - 31) Shinoda, H. and Okada, M.: Diurnal rhythms in the formation of lamellar bone in young growing animals. *Proc. Japan Acad.* **64**, Ser. B: 307-310, 1988.
 - 32) Miwa, I., Okuda, J., Maeda, K. and Okuda, G.: Mutarotase effect on colorimetric determination of blood glucose with β -D-glucose oxidase. *Clin. Chim. Acta.* **37**: 538-540, 1972.
 - 33) 奥田 潤, 三輪一智: D グルコースおよびそのアノマーの酵素的微量定量法. *蛋白質 核酸 酵素* **17**: 216-224, 1972.
 - 34) Gitelman, H.J.: An improved procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.* **18**: 521-531, 1967.
 - 35) Drewes, P.A.: Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. *Clin. Chim. Acta.* **39**: 81-88, 1972.
 - 36) 菰田二一, 三浦雅一, 小山岩雄, 海上 智: ヒトアルカリホスファターゼアイソザイムの鑑別法. *臨床検査* **30**: 1575-1579, 1986.
 - 37) 三浦雅一, 松崎廣子: 小麦麦芽由来レクチン(WGA)を利用した沈殿法による骨型アルカリ性ホスファターゼ測定法の評価. *生物試料分析* **13**(別冊): 46-51, 1990.
 - 38) Fleisch, H.: Bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient. Stampfli Co. Ltd, Berne, 1993, pp.16-17.
 - 39) Eriksen, E.F., Axelrod, D.W. and Melsen, F.: Bone Histomorphometry. Raven Press, New York, 1994, pp.3-12.
 - 40) DeLeeuw, I., Mulken, N., Vertommen, J. and

- Abs, R.: A histo-morphometric study on the trabecular bone of diabetic subjects. *Diabetologia* **12**: 385-386, 1976.
- 41) 石田 均, 清野 裕: 糖尿病性骨減少症. 春日雅人, 清野 裕編: 最新医学(臨時増刊号). 糖尿病の臨床 1995. 最新医学社, 大阪, 1995, pp. 149-157.
- 42) Bessho, K. and Hayashi, Y.: Diabetic osteopathy in human femoral head. *J. Bone Miner. Metab.* **3**: 49, 1980.
- 43) Verhaeghe, J., Herck, E.V., Visser, W.J., Suiker, A.M.H., Thomasset, M., Einhorn, T.A., Faierman, E. and Bouillon, R.: Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes, decreased bone turnover and osteoporosis. *Diabetes* **39**: 477-482, 1990.
- 44) Selby, P.L.: Osteopenia and diabetes. *Diabetic Med.* **5**: 423-428, 1988.