

骨粗鬆症疾患モデルとその評価方法

西崎 泰司

(株) 林原生物化学研究所 藤崎研究所

はじめに

高齢化社会に伴う骨粗鬆症の急速な増加により、その予防、治療法の確立が大きな課題となっている。近年、骨・カルシウム代謝に関する研究は飛躍的な発展を遂げており、基礎的研究分野では、細胞生物学、分子生物学、組織化学などの新しい手法が導入され、骨に存在する細胞の由来や分化・増殖および機能の調節機構の解明が進められている。骨粗鬆症の予防や治療薬の開発には、動物を用いた疾患モデルが不可欠であり、本稿では骨粗鬆症疾患モデルとその評価方法に関して、我々が実際に使用したモデルを中心に報告する。はじめに、骨粗鬆症疾患の理解を深めるために必要と思われる骨組織・骨代謝の調節機構と骨粗鬆症についての基礎知識について取り上げた。次に、本題である疾患モデルとその評価方法について、比較的短い期間で評価可能なマウス、ラット、ウサギを用いたモデルを中心に述べている。また、骨量の新しい評価方法として、マイクロフォーカスX線拡大撮像システムを用いた小動物での骨密度の測定方法と組織学的手法による評価方法を紹介する。最後に、最近注目されている糖質であるトレハロースの骨粗鬆症の疾患モデルに対する作用について報告する。

I. 骨組織と骨代謝調節機構¹⁾

骨組織は、骨質、関節軟骨、骨膜、骨髄の4組織からなり、これに豊富に分布する血管や神経が加わる。骨の主体である骨質は、主として外側を覆う皮質骨とその内側に位置し網目状を呈する海綿骨に分けられる。海綿骨は、網目状のネットワーク構造を有し、外力に対して抵抗力の大きくなるような方向性を持っている。骨組織の細胞としては、骨形成系細胞である骨芽細胞(osteoblast)や骨細胞(osteocyte)、骨吸収を営む破骨細胞(osteoclast)、さらには骨髄に多種類の細胞が存在する。骨芽細胞はI型コラーゲンをはじめとする種々の骨基質蛋白を産生し、この基質にハイドロキシアパタイト結晶を沈着させ、石灰化を行い、骨を形成する。骨芽細胞の一部は、自ら産生した骨基質に埋没し、骨細胞になると考えられている。一方、破骨細胞は、酸や蛋白分解酵素を分泌し、骨を形成する骨基質を分解し、骨吸収を行う。

骨組織は、生体での支持組織として、その各部位に負荷される外力に応じて形態を変化させている。同時に、生体内でのカルシウムの貯蔵庫として、 Ca^{2+} 濃度の維持にも不可欠である。すなわち、血中の Ca^{2+} 濃度が低下すると、副甲状腺から副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌が亢進する。PTHは、骨芽細胞を介して破骨細胞を活性化し、骨吸収を促進する。甲状腺においては骨吸収抑制因子であるカルシトニン(CT)の分泌が抑制され、骨吸収が亢進され、骨からの Ca^{2+} の動員が高まる。また、PTHは腎にも作用し、 1α -ヒドロキシラーゼを活性化し、活性化型ビタミン D_3 の合成が促進される。その結果、腸管における Ca^{2+} 吸収が促進され、血中の Ca^{2+} 濃度を正常化する。

骨組織では、常に骨吸収と骨形成が繰り返され、古い組織が新しい組織に置き換えられている。この骨の再構築を骨リモデリングと呼んでいる。骨リモデリングの過程は、組織学的にいくつかの相に分類されている。活発な骨吸収や骨形成を営んでいない骨表面は、lining cellと呼ばれる扁平な骨芽細胞に覆われ(静止相)、PTHやIL-1のような骨吸収促進因子がlining cellに作用すると、lining cellは活性化され、立方状に形態が変化し、細胞間にすきまができる(活性化相)。同時に、骨芽細胞から破骨細胞への情報が伝達され、破骨細胞が活性化され、骨吸収が開始される(吸収相)。その後、CTなどの骨吸収抑制因子により、骨吸収が停止し、骨吸収部位にマクロファージが出現する(逆転相)。その後、骨基質中に存在するTGF- β やIGF-1などの骨形成促進因子が、骨吸収に伴ない放出され、骨芽細胞を活性化し、骨形成が開始される(形成相)。骨形成が完了すると、骨表面は再びlining cellに覆われ、再び静止相になる。ヒトの場合、約4%の骨が1年間で入れ替わると考えられている。

II. 骨粗鬆症²⁾

骨リモデリングは、1サイクルに120から150日程度を要する過程である。通常の骨リモデリングでは、骨吸収量と骨形成量はほぼ等しく、骨リモデリングによって骨量は変動せず、これを骨吸収と骨形成のカップリングと呼んでいる。何らかの原因でこのバランスが崩れ、骨吸収が骨形成を上回る状態が持続

した場合に骨粗鬆症が発症する。骨粗鬆症は、骨成分はほぼ正常に保たれた状態で、骨量すなわち骨密度が減少し、骨の微細構造が変化し、骨折の危険性が高まる疾患と定義されている。骨粗鬆症のほとんどは、加齢に伴う退行性骨粗鬆症であり、閉経後骨粗鬆症と老人性骨粗鬆症に大別される。患者数が最も多い閉経後骨粗鬆症は、閉経に伴う女性ホルモンであるエストロゲンの急激な分泌低下により、骨吸収が亢進し発症する。これに対して、老人性骨粗鬆症は、加齢に伴う生体機能の衰えから、骨形成が低下して発症すると考えられている。一般には、閉経後骨粗鬆症は、高回転型骨粗鬆症で、老人性骨粗鬆症は、低回転型骨粗鬆症と言われている。老人性骨粗鬆症では、皮質骨と海綿骨の両方の骨量が減少するが、閉経後骨粗鬆症では、主に海綿骨の骨量が減少する。

Ⅲ. 骨代謝評価方法と骨粗鬆症疾患モデル

1. 骨代謝評価方法

動物を用いた疾患モデルにおける骨代謝の評価には、大きく分けて骨量と骨代謝マーカーが用いられる。骨量の評価は、骨重量、骨密度、骨強度の測定に分類される。骨代謝マーカーは、骨代謝を反映して、血液、尿中に増減するパラメーターで、骨吸収に関連する骨吸収マーカーと骨形成に關与する骨形成マーカーに分類される。最近では骨密度と合わせて、骨粗鬆症の診断や治療効果を評価する手段として、重要な役割を果たしている。

1) 骨重量

摘出した骨の軟部組織を除去し、完全に乾燥させた乾燥重量、及びCa、Pなどの無機物のみの灰化重量を測定し評価する。

2) 骨密度

骨密度は、骨の単位面積あるいは単位体積あたりの骨塩量のこと、骨の強度と相関が高いと言われている。測定には、二重エネルギーX線吸収測定法(dual energy X-ray absorptiometry: DXA)と、末梢骨定量的CT法(peripheral quantitative computed tomography: pQCT)がよく用いられる^{3), 4)}。DXA法は、2種類の異なる単一の波長のX線を用いることにより、骨と軟部組織を分離して評価することが可能で、測定値の再現性が高い。精度は約1%程度である。pQCTは、CT装置を骨密度の測定用に改良した骨密度専用の測定装置であり、既知量の標準ファントムと測定対象物と同時に撮影し、骨のCT値とファントムのCT値を比較して、骨密度を測定する。海綿骨と皮質骨を別々に評価することが可能で、骨密度は体積密度で算出することができる。

3) 骨強度

骨強度は万能強度試験機による折曲げ試験で測定する。骨に力をかけて行き、センサーによって、骨

が折れた時点の最大の力(骨破断力)と面積強度である破断エネルギーを測定し、骨の力学的な強度を評価する手法である⁴⁾。

4) 骨代謝マーカー⁵⁾

(1) 骨吸収マーカー

酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)、ピリジノリン(Pyr)、デオキシピリジノリン(D-Pyr)やハイドロキシプロリン(HOP)がよく用いられる。TRAPは、骨組織では比較的破骨細胞に特異的であることから、血清中の濃度が骨吸収の程度を反映する。コラーゲンの分子間架橋物質であるPyrとD-pyrやコラーゲンの代謝物であるHOPは、骨吸収によりコラーゲンが分解されるときに尿中に排出される。特にD-Pyrは、その組織分布が骨に特異的であることからよく測定される。

(2) 骨形成マーカー

骨型アルカリフォスファターゼ(B-ALP)、オステオカルシン(OC)、I型コラーゲン末端プロペプチド(PICP)の3つが挙げられる。B-ALPは、骨芽細胞の活性化に伴い血中濃度が上昇するマーカーで、ヒトやラットのB-ALPは測定可能である。OCは、骨芽細胞が産生する非コラーゲン性蛋白であり、産生されたOCの一部は血中に放出されるので、マーカーとして利用できる。PICPは、I型コラーゲンが、細胞外で、プロコラーゲンからコラーゲン分子にプロセッシングされる時に切り出されて血中に放出される物質であり、骨芽細胞の活動性すなわち骨形成を反映するパラメーターである。

2. 骨粗鬆症疾患モデル

骨粗鬆症の研究を行う上では、動物を用いた疾患モデルが重要であり、Table 1に示すようなさまざまな骨粗鬆症モデルが提唱されている^{6), 7), 8), 9), 10), 11), 12)}。骨粗鬆症モデルには比較的試験期間を要するものが多く、最もよく用いられているラットの卵巣摘出モデルでは6ヵ月を要する。今回は、我々が実際に使用した比較的短期間で評価可能な3種類のモデルについて簡単に紹介する。

Table 1 骨粗鬆症疾患モデル

卵巣摘出モデル	低Ca食モデル
神経切除モデル	グルココルチコイド投与モデル
懸垂モデル	胃切除モデル

1) 卵巣摘出マウスモデル

卵巣摘出モデルの骨減少メカニズムは、卵巣摘出によるエストロゲンの分泌低下が主因で骨減少が起こることから、閉経後骨粗鬆症に近い疾患モデルである^{2), 13)}。エストロゲンの低下による骨減少のメカニズムに関しては研究が進んでおり、次のように考

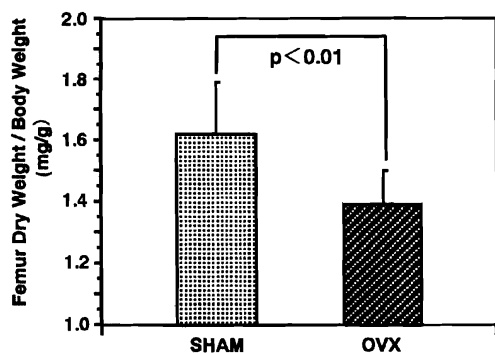


Figure 1 Ovariectomized mice model

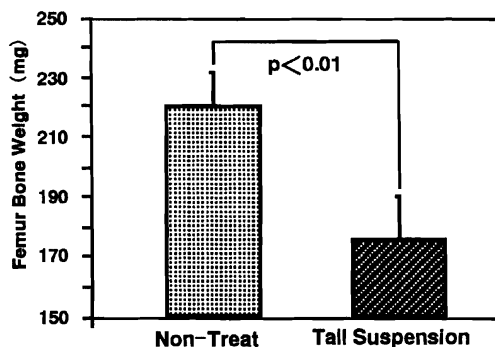


Figure 2 Rat tail suspension model

えられている。エストロゲンの分泌低下は、IL-1やTNFなどの骨吸収促進因子の分泌を促進し、骨吸収を亢進するとともに腎に作用し、活性化型ビタミンD₃の合成を低下させ、腸管でのCa²⁺吸収が抑制される。また、甲状腺でのCTの分泌低下、肝でのTGF-βやIGFなどの骨形成促進因子の産生低下により骨形成が抑制され、骨代謝のバランスが崩れ、骨量の減少が導かれる。最もよく用いられる動物はラットであるが、骨粗鬆症を誘導するまでに6ヵ月を要する。マウスを用いた場合が、最も骨粗鬆症を誘導するまでの期間が短く、卵巣を摘出してから1ヵ月後には大腿骨重量が約10%程度減少した ($p < 0.01$, Figure 1)。

2) ラット懸垂モデル

骨組織は、運動や体重などの負荷が低減したとき、すなわち骨にかかる力学的ストレスが軽減した時に最も変化し、骨量が減少すると考えられている。この現象を利用したのが懸垂モデルである¹⁰⁾。尻尾をつり上げることで、下肢を浮上させ、重力の負荷を減少させると、懸垂初期では骨吸収が亢進される。その後、PTHの分泌が低下し、腎での活性化型ビタミンD₃合成が減少し、腸管からのCa²⁺吸収が抑制される。また、副腎からのグルココルチコイドの分泌が促進され、骨芽細胞の機能が抑制され、骨形成が低下し、その結果、骨減少が起こると考えられている。大腿骨乾燥重量は、懸垂1週間で対照群と比較して約20%の減少が確認された (Figure 2, $p < 0.01$)。

3) 卵巣摘出+不動物ウサギモデル

ウサギの骨粗鬆症モデルの作出を試みた。ウサギを用いた骨粗鬆症の疾患モデルの報告はほとんどなく、卵巣摘出によるモデルの作出を試みたが、卵巣摘出2ヵ月後においても大腿骨重量の低下がほとんどなかった。骨の減少をさらに亢進させるために、坐骨神経切除による不動物と卵巣摘出の併用モデルを検討した。その結果、約1ヵ月で大腿骨重量の減少傾向が認められた。

4) 疾患モデルの利点と欠点

マウスの卵巣摘出モデルの利点は、取り扱いやすく、n数や試験群を確保することができるとともに、投与するサンプル量が少なくすむことから、スクリーニングには最も適している。欠点としては、血液や尿の採取量が少ないため、骨代謝マーカーの測定に限られること、また、B-ALPやOCの測定が確立していない点が挙げられる。

ラットの懸垂モデルは、実験期間が非常に短いという利点の反面、骨減少があまりに急激に起こるため、投与物質の微妙な反応を捕えにくい欠点がある。また、利点としては、ラットを用いたモデルの研究は盛んで、基礎データも多く、実験データの解析がしやすいことや血流量や尿量も十分確保できるので、ほとんどの骨代謝マーカーの測定が可能である点が挙げられる。しかし、マウスと比べるとより広い飼育スペースが必要となる。

ウサギの卵巣摘出+不動物モデルでは、中動物としては、約1ヵ月という非常に短い期間で試験を実施できることや、同一個体から経時的に採血が可能で血中パラメーターを経時的に追跡できる点、また持続点滴が可能であることが挙げられる。しかし、手術に手間がかかる点や、動物のメンテナンスが大変であり、一度に大量のスケールで実験を行うことが困難であることからスクリーニングには適していない。

今回紹介したモデルは、短期間で評価できるそれぞれ特徴のある疾患モデルであるが、初期のスクリーニングに用いるにはマウスの系が最も適当と考えられる。

IV. 新しい骨量の評価方法

1. μFXを用いた骨密度測定法

今回、我々は、最近開発されたマイクロフォーカスX線拡大撮像システム (μ-FXシステム:富士写真フィルム株) を用いて、マウスの骨密度の定量を試みた。X線撮影装置内に被験物をセットし、高感度

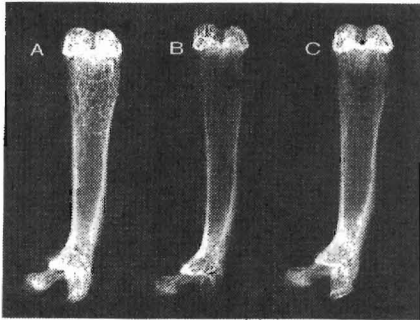


Figure 3 X-ray photograph of femur in ovariectomized mice using μ -FX system

放射線エネルギーセンサーであるイメージングプレート (IP) 上に撮影する。IP の情報は、バイオイメージングアナライザーを用いて読み取り、コンピューターを用いて画像解析を行い、骨密度を算出する。

μ -FX システムで撮影したマウスの大腿骨の拡大写真を Figure 3 に示した。マウスのような小動物でも拡大撮影が可能であり、皮質骨と海綿骨を明瞭に観察することが可能であった。既知量の標準ファントムと測定骨を同時に撮影し、X線の透過量とファントムのハイドロキシアパタイト含量から求めた検量線から、関心領域 (骨密度測定領域) の骨密度を算出する。Figure 4 にマウスの大腿骨の骨密度の測定結果を示した。卵巣摘出 4 週間後の骨密度は偽手術群と比べると有意に低下していた ($p < 0.01$)。この装置の最大の特徴は、拡大撮影が可能である点である。

2. 組織学的手法

骨量の新しい評価方法として、組織学的手法を検討した。定法に従ってウサギの大腿骨のパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、光学顕微鏡で観察した。海綿骨部分の写真を撮影し、スキャナーで写真をコンピューターに取り込んで、NIH の画像処理ソフトを用いて、写真の面積あたりの骨梁の割合を算出し、定量化した。骨梁部分の写真全体に対する割合は、偽手術群では約 40% であったが、卵巣摘出 + 不動化群では約 25% に減少し、骨梁の有意な低下が認められた ($p < 0.01$)。大腿骨重量では、卵巣摘出と不動化により有意な骨重量の低下は認められなかったが、視点を変えて組織学的に評価した結果、骨重量で評価するよりも感度よく骨量の減少を定量化することが可能であった。

V. トレハロースの骨粗鬆症に対する作用

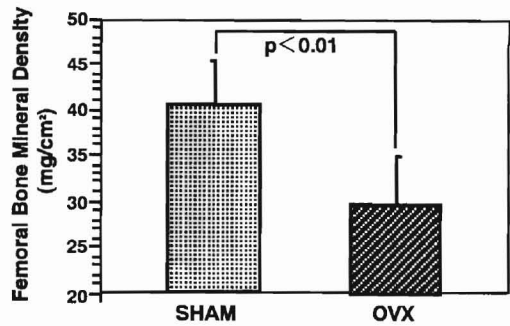


Figure 4 Femoral bone mineral density of ovariectomized mice using μ -FX system

トレハロース (α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside) はグルコースが 2 個結合した非還元性の糖質であり、自然界では動植物・微生物にわたって広く遊離の状態が存在している¹⁴⁾。最近ではトレハロースの大量製造方法が確立され、様々の有効な作用が明らかにされてきており、食品や化粧品分野などにおいて広く利用されている。今回はトレハロースの新しい生理機能の開発を目的として、骨粗鬆症疾患モデルに対する作用について検討した結果、興味深い結果が得られたので紹介する。

1. 卵巣摘出マウスにおけるトレハロースの骨減少抑制作用¹⁵⁾

4 週齢、ddY 雌マウスの卵巣を摘出し、翌日からトレハロースを 10mg、100mg/kg の用量で 5 回/週、4 週間連続して経口投与した。対照群には偽手術 (蒸留水投与) 群と卵巣摘出 (蒸留水投与) 群を設定した。手術 4 週間後、卵巣摘出群ではエストロゲンの分泌低下によって、脛骨海綿骨の骨梁は偽手術群に比べると明らかに減少していた。これに対して、卵巣摘出翌日からトレハロース (100mg/kg) を投与したマウスでは、骨梁の減少が抑制され、偽手術群のそれに近い状態に保持されていた (Figure 5)。また、卵巣摘出 1 ヶ月後にはマウスの体重に占める大腿骨の乾燥重量の割合は、有意に低下していた。しかし、トレハロース投与群では、骨重量の減少が用量依存的に抑制され、100mg/kg 投与群では卵巣摘出対照群と比較しても、有意な骨重量減少抑制作用が認められた (Figure 6)。さらに、大腿骨を 950°C、6 時間で灰化して測定した灰分重量も乾燥重量と同じ傾向が認められた (Table 2)。1g/kg の用量においても 100mg/kg と同程度の効果が得られた (Data not shown)。

大腿骨の灰化重量あたりの Ca、P 量およびその比率 (Ca/P) は、群間に差はなかった (Table 2)。すなわ

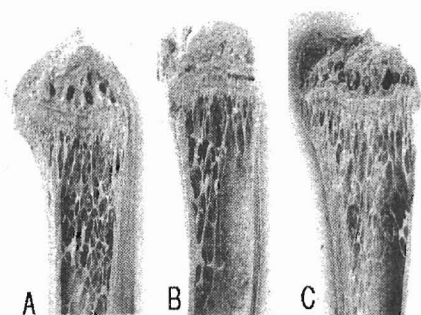


Figure 5 Low-vacuum scanning electron microscopic findings of the trabeculae of tibia in ovariectomized mice

A:SHAM mice administered vehicle (distilled water) only.

B:OVX mice administered vehicle only.

C:OVX mice administered 100mg/kg of trehalose.

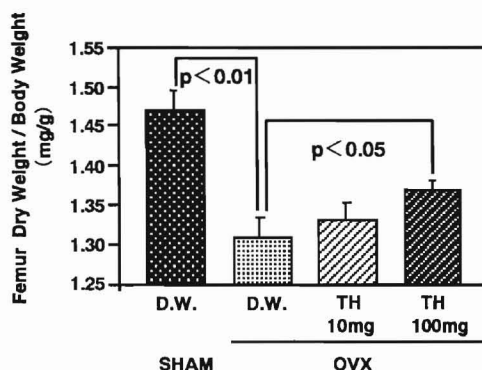


Figure 6 Effect of trehalose on femur weight in ovariectomized mice

Table.2 Effect of trehalose on femoral weight, calcium and phosphorus contents in ovariectomized mice

	SHAM/D. W.	OVX/D. W.	OVX/TH 10mg/kg	OVX/TH 100mg/kg
Dry (mg/g, B. W.)	1.47±0.11	1.31±0.09 *	1.33±0.10	1.37±0.08 **
Ash (mg/g, B. W.)	0.93±0.07	0.81±0.05 *	0.81±0.07	0.84±0.05
Ca (%/Ash)	37.1±1.5	37.8±1.6	37.7±1.6	37.9±1.8
P (%/Ash)	17.5±0.4	17.6±0.5	17.2±0.5	17.5±0.5
Ca/P	2.12±0.08	2.16±0.09	2.20±0.09	2.17±0.08

Values are the means and Standard deviations (n=34)

* Statistically significant at the p<0.01 level when compared with sham/D.W.

** Statistically significant at the p<0.05 level when compared with OVX/D.W.

ち、卵巣摘出手術やトレハロースの投与により、骨重量、CaやPの絶対量は変動したが、骨成分は、ほぼ正常に保たれていた。血清中のCa、P、ALP活性も卵巣摘出およびトレハロース投与による影響はみられなかった。

卵巣摘出手術4週間後の子宮重量は、偽手術群のそれより約70%減少していた。エストラジオールを腹腔内投与した場合、そのホルモン作用により子宮重量は明らかに増加したが、トレハロース投与群では子宮重量に対する影響は認められず、エストロゲンのようなホルモン作用はないと考えられる。

2. トレハロースの破骨細胞誘導能に対する作用

今回用いた疾患モデルは、骨吸収の亢進モデルであることから、トレハロースの作用メカニズムとし

ては骨吸収の抑制が推測される。卵巣摘出動物ではエストロゲンの減少により、骨代謝のバランスが崩れる。そこで、マウスの脛骨骨髓細胞中の前破骨細胞、破骨細胞の分化誘導が亢進することが知られて胞から破骨細胞への分化に及ぼすトレハロースの作用について検討した。4週齢、ddY雌マウスにトレハロースを100mg/kgの用量で5回/週、2週間連続して経口投与した後に卵巣を摘出し、さらに2週間経口投与を継続した。対照群には偽手術(蒸留水投与)群と卵巣摘出(蒸留水投与)群を設定した。投与終了後、脛骨を摘出し、骨髓細胞を採取し、活性化型ビタミンD₃存在下で6-7日間培養して、破骨細胞を誘導した。酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色を行い、核が3個以上でTRAP陽性細胞を破骨細胞としてカウントした。

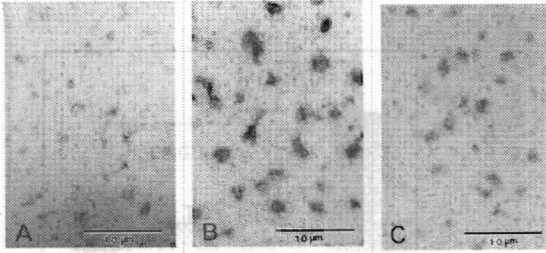


Figure 7 Light electron microscope photograph of the osteoclasts derived from co-cultures of osteoblasts and bone marrow cells from ovariectomized mice
 A:SHAM mice administered vehicle (distilled water) only.
 B:OVX mice administered vehicle only.
 C:OVX mice administered 100mg/kg of trehalose.

Figure 7に骨髓細胞から誘導された破骨細胞を示した。卵巣摘出マウスの骨髓細胞から分化誘導された破骨細胞数は、偽手術群に比べると2～3倍に増加し、骨吸収の亢進が認められた。一方、トレハロースを投与した卵巣摘出群では、破骨細胞への分化が抑制されていた。

おわりに

今日、我々はトレハロースの骨粗鬆症に対する作用をスクリーニングするため、いくつかの実験動物の骨減少モデルを作製する機会を得た。これらの系のなかからそれぞれの特徴について紹介した。日常食品として摂取するものには、栄養学的な面ばかりではなく、様々な機能を持つものがある。医薬品開発の実験系からみると、その作用は小さく、とらえにくいのが、モデルを有効に利用することでそれらを見出すことができる。糖質にも様々な作用が知られ、トレハロースの骨に対する作用を今回見出すことができた。わが国の骨粗鬆症の患者数は、500万人～1000万人と言われており、今後も高齢化社会に伴い、さらに患者数の増加が予想される。トレハロースは、安全性の高い糖質で毎日摂取することが可能であることから、骨粗鬆症の予防的な役割を果たすことができるのではないかと期待している。

REFERENCES

1. 小澤英浩：骨粗鬆症（松本俊之，編）. 南江堂, pp149-161, 1998
2. 武谷雄二，井上大輔：骨粗鬆症（松本俊之，

- 編）. 南江堂, pp181-190, 1998
3. Gasser JA. Assessing bone quantity by pQCT. *Bone* 17:145S-154S (1995)
4. Kubota M, Maki K, Murayama H, Shibasaki Y. Relationship between bone mineral density measurement and mechanical properties of bone. *J Jpn Soc Bone Morphom* 6:243-251 (1996)
5. 福永仁夫他：骨粗鬆症 分子メカニズムから病態・診断・治療まで（松本俊之，編）. 羊土社, pp124-132, 1995
6. Goda T, Suruga K, Takase S et al. Dietary maltitol increases calcium content and breaking force of femoral bone in ovariectomized rats. *J Nutr* 125:2869-2873 (1995)
7. Broulik PD. Tamoxifen prevents bone loss in ovariectomized mice. *Endocrine Regulations* 25:217-219 (1991)
8. Woo JT et al. Suppressive effect of N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-tyrosinal on bone resorption in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 300:131-135 (1996)
9. Izawa Y, Makita T, Hino S et al. Immobilization osteoporosis and active vitamin D:Effect of active vitamin D analogs on the development of immobilization osteoporosis in rats. *Calcif Tissue Int* 33:623-630 (1981)
10. Globus RK et al. Effects of simulated weightlessness on bone mineral metabolism. *Endocrinology* 114:2264-2270 (1984)
11. Uno H, Izawa Y, Sagara K et al. Effect of 1 α -hydroxyvitamin D3 on bone metabolic disorders in gastrectomized rats. *JBMM* 8:10-17 (1990)
12. Kukreja SC, Bowser EN, Hargis GK et al. Mechanisms of glucocorticoid-induced osteopenia:Role of parathyroid glands. *Proc Soc Exp Biol Med* 152:358-361 (1976)
13. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15:175-192 (1991)
14. 杉本利行 酵素を用いた澱粉糖化法によるトレハロースの生産とその利用. *食品工業* 38:34-39 (1995)
15. Nishizaki Y, Hanaya T, Arai S, Ikeda M and Kurimoto M. Effect of trehalose on the murine osteoporosis model. *Medicine and Biology* 137:91-96 (1998)