

2型糖尿病ラットにおける海綿骨微細構築

— マイクロCTを用いた三次元解析 —

三好 秀直

従来より2型糖尿病は、1型糖尿病と異なり骨量減少の頻度が低く、骨粗鬆症の原因としては疑問視されてきた。ところが、最近2型糖尿病が骨折リスクの増加と関連していることが報告され、その原因として骨量以外の要因の関与が示唆されている。そこで本研究では、糖尿病における骨微細構築の変化を2型糖尿病ラットを用いて検討し、糖尿病性骨粗鬆症における海綿骨微細構築を部位別および週齢別に検討した。

対象には、14週齢、28週齢、42週齢および56週齢の2型糖尿病ラット (OLETF, 各群 $n = 7 \sim 11$) およびコントロールラット (LETO, 各群 $n = 8 \sim 11$) を用いた。屠殺後、第5腰椎椎体、脛骨近位および遠位骨幹端を、マイクロCTにてスライス厚14.1～18.6 μm 、画素径17.6～23.2 μm の条件で撮像した。得られた三次元画像データから海綿骨の骨体積比、骨梁の厚さ、数、間隙と連結性、骨梁パターン因子、構造モデル指標を算出した。また、第3腰椎椎体を圧縮し、その破壊強度を求めた。

すべての週齢で体重および血糖値はOLETFラットの方が高値を示した。骨体積比は、14週齢の腰椎およびすべての週齢の脛骨遠位骨幹端でOLETFラットの方が高値を示した。一方、42週齢と56週齢の脛骨近位骨幹端ではOLETFラットの方が低い骨体積比を示した。また、28週齢、42週齢、56週齢において、腰椎はOLETFラットの方が棒状で連結性の低い骨梁構造を、脛骨遠位骨幹端は板状で連結性の高い骨梁構造を示した。椎体の圧縮強度は42週齢と56週齢においてOLETFラットの方が低値を示した。

これらの結果は、糖尿病ラットでの骨変化には部位による差が大きいことを示しており、また、荷重負荷の影響が少ない腰椎などでは、海綿骨微細構築の劣化が骨強度の低下に強く関与していることを示唆している。

(平成15年8月9日受理)

Microarchitecture of Trabecular Bone in Type 2 Diabetic Rats

— Three-dimensional Analysis Using Microcomputed Tomography —

Hidenao Miyoshi

Unlike type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes shows a low frequency of low bone mass, and it has been questioned as a cause of osteoporosis. However, it has recently been reported that type 2 diabetes is related to the increase in a fracture risk, and the existence of the factor except for low bone mass is suggested as the mechanism. In this study, the change of microarchitecture of trabecular bone in diabetes mellitus was studied using type 2 diabetic rats, and its significance in the

pathophysiology of the diabetic osteoporosis was examined.

Type 2 diabetic rats (OLETF, $n = 7 - 11$ for each group) of 14, 28, 42 and 56 weeks old and control rats (LETO, $n = 8 - 11$ for each group) of the same week old were used for the study. After the sacrifice, the fifth lumbar vertebral body (LV), proximal tibial metaphysis (PT), and distal tibial metaphysis (DT) were scanned by microcomputed tomography (micro-CT) with the slice thickness of 14.1–18.6 μm and the pixel size of 17.6–23.2 μm . Three-dimensional image data were analyzed by the image analysis system to evaluate trabecular bone volume fraction, trabecular thickness, number, separation and connectivity, trabecular bone pattern factor, structure model index, and degree of anisotropy. The third lumbar vertebral body was compressed to obtain the breaking force.

In all week groups, body weight and blood glucose levels were higher in OLETF rats. OLETF rats showed higher values of bone volume fraction in LV at 14 weeks old and in DT at all week groups. On the other hand, at 42 and 56 weeks old OLETF rats showed lower bone volume fraction in PT. The trabecular structure of LV in OLETF rats was rod-like and less connected at 28, 42 and 56 weeks old, whereas DT in OLETF rats showed plate-like and more connected structure at all week groups. The breaking force of LV was significantly lower in OLETF at 42 and 56 weeks old.

These results indicate that the bone change in diabetes mellitus greatly varies among the skeletal sites, and suggest that, in the mechanically less loaded site like lumbar vertebra, the deterioration of trabecular microstructure is highly responsible for the decrease in bone strength. (Accepted on August 9, 2003) *Kawasaki Igakkaishi 29(2) : 131–143, 2003*

Key Words ① Osteoporosis ② Type 2 diabetes ③ Trabecular bone
④ Microarchitecture ⑤ Microcomputed tomography

はじめに

骨粗鬆症は、国際的に「低骨量と骨の微細構築の劣化が特徴的で、その結果骨の脆弱性が増加し、骨折を起こしやすい全身性の骨疾患」と定義されている¹⁾。近年、高齢者人口の急増により、骨粗鬆症の患者数は年々増加傾向にある。特に高齢者における骨折は、急性期の合併症のほか、骨折に続発する機能障害や慢性の疼痛を生じ、その後のQOLに大きな影響を与える。

糖尿病の合併症として骨粗鬆症がみられることは古くから報告されており^{2),3)}、特に1型糖尿病では高頻度に骨量減少が合併することが知られている⁴⁾。1型糖尿病のうちでも、血糖のコントロールが悪く、高用量のインスリン治療を受けている患者で骨量減少の頻度が高い⁵⁾。一方、2型糖尿病は、非糖尿病患者に比べ骨量

が減少している^{6)~10)}、差がみられない^{11)~14)}、増加している^{15)~19)}などの相反する報告がみられ、未だに一定の見解が得られていない。その原因としては、年齢、罹病期間、インスリン分泌能など糖尿病の病態が多様化していることや、用いられた骨量測定法が報告により異なっていることが挙げられる。

2型糖尿病と骨折率との関係をみた最近の検討によると、糖尿病患者では非糖尿病患者に比べ骨密度は同等あるいは高いにも拘らず、骨折頻度が有意に増加するとの報告があり^{20),21)}、糖尿病性骨粗鬆症における骨脆弱性の原因として、骨微細構築や骨質などの骨密度以外の要因が目玉されている。骨強度の低下は、骨密度のほか、骨微細構築や骨質の変化などにも規定されることが知られているが²²⁾、これまでの動物やヒトの摘出骨を用いた検討から、一般的には骨強度の70~80%が骨密度によって説明できる

とされる^{23)~25)}。そのため、原発性骨粗鬆症の診断は骨密度を客観的指標として行われる^{22), 26)}。従来の糖尿病性骨粗鬆症に関する研究は、骨塩定量や骨代謝マーカーに関する報告が中心で、骨微細構築に注目した報告は動物モデルを用いたものも含め殆んどみられない。一般に、骨量が正常であっても骨微細構造の著しい劣化があれば骨強度は低下する可能性があり、糖尿病患者の骨折に骨微細構造の劣化が関与している可能性も考えられる。そこで本研究では、2型糖尿病モデルラットにおける三次元骨微細構築の特徴をマイクロCT (microcomputed tomography) を用いて解析し、糖尿病性骨粗鬆症における海綿骨微細構築を部位別および週齢別に検討した。

対象及び方法

1. 実験動物

実験には、14週齢、28週齢、42週齢および56週齢の2型糖尿病モデル雄性ラット OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ($n = 7 \sim 11$) と同週齢のコントロール雄性ラット LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ($n = 8 \sim 11$) を用いた。これらのラットは、温度と湿度がそれぞれ $23 \pm 3^\circ\text{C}$ と30~90%に維持された環境で飼育された。

飼料には固形飼料 (MF; オリエンタル酵母)、飲料水には水道水を用いた。いずれの週齢においても飼料および飲料水の摂取量の制限は行わなかった。なお、本実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認 (01-085) を受け、川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施された。

2. 骨および血液の採取

各週齢に達したラットは、エーテル麻酔下で体重測定を行うとともに大腿静脈から採血を施行し、ネンプタールの過剰投与により屠殺した。なお、採血は絶食下で行わなかった。その後、直ちに腰椎と両下肢骨を摘出し、右脛骨と第5腰椎は70%のエタノール溶液に浸潤固定し、第3腰椎は -30°C にて凍結保存した。採取した血

液は血糖値をメディセーフ (TERUMO) により測定した後、残りを血清分離し -30°C にて凍結保存した。

3. 血液生化学検査

14週齢、42週齢および56週齢のラットは、血清フルクトサミン (FRA)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール、カルシウム (Ca) およびリン (P) 濃度が測定された。FRA は比色法、TG は GPO・HDAOS 法、総コレステロールはコレステロールオキシダーゼ・HDAOS 法、Ca はキレート発色法、P はモリブデン酸直接法を用いて測定した。

4. マイクロCTによる画像取得

マイクロCT装置はELESCAN (日鉄エレクトクス) を使用した。Figure 1 に脛骨 (近位および遠位骨幹端) および腰椎の撮影領域を示す。脛骨の長軸が回転軸と平行になるように位置決めし、撮影中心領域として遠位骨幹端では脛骨遠位関節面から1.5 mm、近位骨幹端では脛骨近位関節面から4.0 mm 離れた位置に設定した。また、管電流 $100 \mu\text{A}$ 、管電圧30 kV、マトリックス数 512×512 、画素径 $17.58 \mu\text{m}$ 、スライス厚 $14.06 \mu\text{m}$ 、プロジェクション数450、積算回数6の条件で撮影した。第5腰椎は、骨の長軸が回転軸と垂直になるように位置決めし、撮影中心領域を椎体中央部に設定し、管電流 $100 \mu\text{A}$ 、管電圧30kV、マトリックス数 512×512 、画素径 $23.20 \mu\text{m}$ 、スライス厚 $18.56 \mu\text{m}$ 、プロジェクション数450、積算回数6の条件で撮影した。いずれも250枚の連続断層画像を取得した。

5. 三次元骨梁構造パラメータの算出

三次元骨梁構造パラメータは、マイクロCTにより得られた三次元の画像データから三次元画像解析ソフト (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング) を用いて算出した。まず、フィルター処理により画像ノイズを除去した後、閾値処理により骨 (緻密骨) と軟部組織領域 (骨髄、筋肉など) に分離した。次いで、コンピュータ上のマニュアル操作により海綿骨領域を設定し、Table 1 に示す三次元骨梁構造パラメータを算出した。骨梁構造パラメータは、

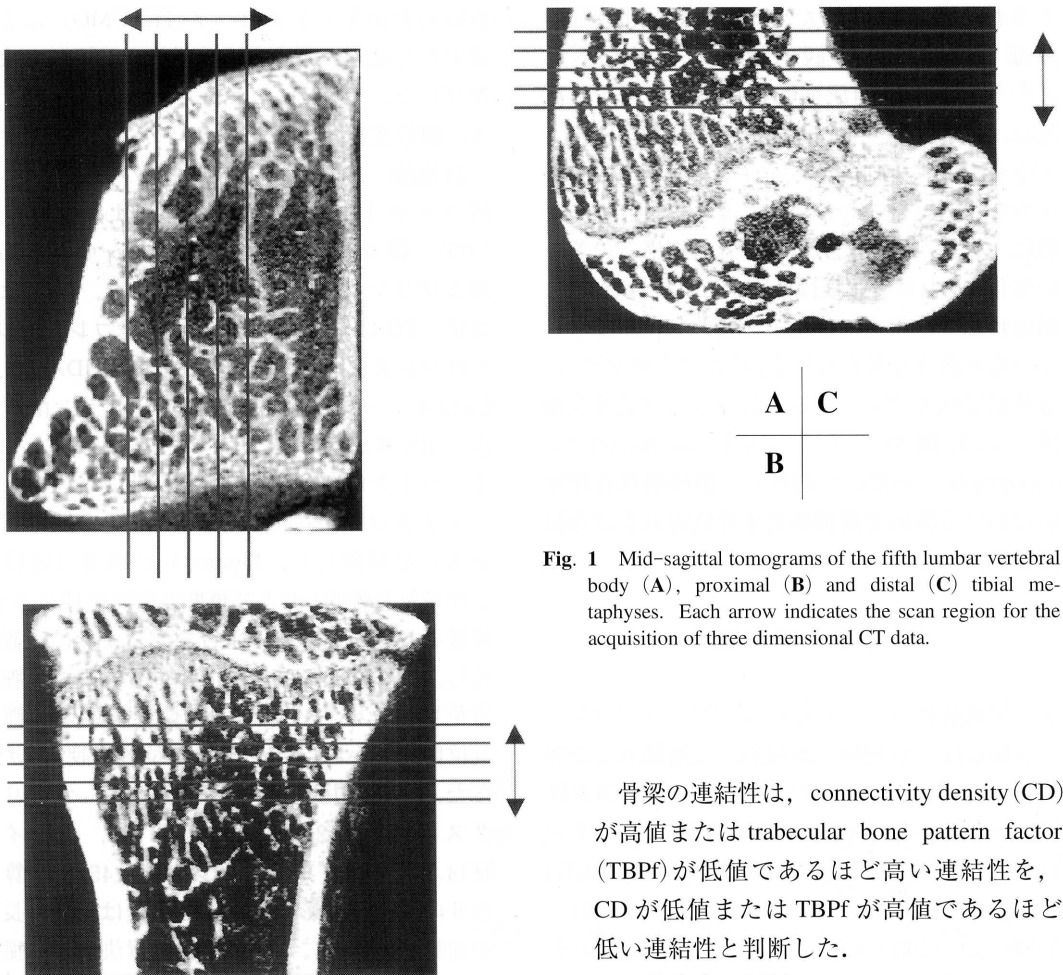


Fig. 1 Mid-sagittal tomograms of the fifth lumbar vertebral body (A), proximal (B) and distal (C) tibial metaphyses. Each arrow indicates the scan region for the acquisition of three dimensional CT data.

基本的な幾何学的指標としての骨梁の長さ、面積、体積の他に位相幾何学的指標として骨梁の連結性と異方性の指標を求めた。三次元パラメータのうち、tissue volume (TV), bone volume (BV), bone surface (BS), bone surface density (BS/BV), bone volume fraction (BV/TV) は三次元データから直接算出し、trabecular thickness (Tb. Th), trabecular number (Tb. N), trabecular separation (Tb. Sp) は Parfitt らの parallel plate model²⁷⁾ の定義に基づいて求めた。structure model index (SMI) は Hildebrand と Rüegsegger によって提唱された計測法²⁸⁾ により算出し、degree of anisotropy (DA) は mean intercept length (MIL) 楕円球²⁹⁾ の最大径と最小径の比から求めた。

骨梁の連結性は、connectivity density (CD) が高値または trabecular bone pattern factor (TbPf) が低値であるほど高い連結性を、CD が低値または TbPf が高値であるほど低い連結性と判断した。

6. 骨強度の評価

骨強度試験の試料には14週齢、42週齢および56週齢の第3腰椎を用いた。上下の椎間板を除く海綿骨領域を頭尾方向に高さ4 mmに切離し、強度試験用サンプルとした。次いで、骨強度測定装置 (Autograph AG2000E, 島津製作所) により、圧縮速度2 mm/minにて破壊的圧縮試験を実施し、最大荷重 (N) を求めた。

7. 統計学的検定

OETFとLETOの2群間における各指標の差はMann WhitneyのU検定により評価した。また、骨強度(最大荷重)および血糖値と三次元骨梁構造パラメータの関係は、Pearsonの相関係数により評価した。すべて $p < 0.05$ を有意な差と判定した。

Table 1. Parameters for the quantification of three-dimensional cancellous bone architecture

Tissue Volume (TV)
Bone Volume (BV)
Bone Volume Fraction (BV/TV)
Trabecular Thickness (Tb.Th)
Trabecular Number (Tb.N)
Trabecular Separation (Tb.Sp)
Connectivity Density (CD)
Trabecular Bone Pattern Factor (TBPf)
Structure Model Index (SMI)
Degree of Anisotropy (DA)

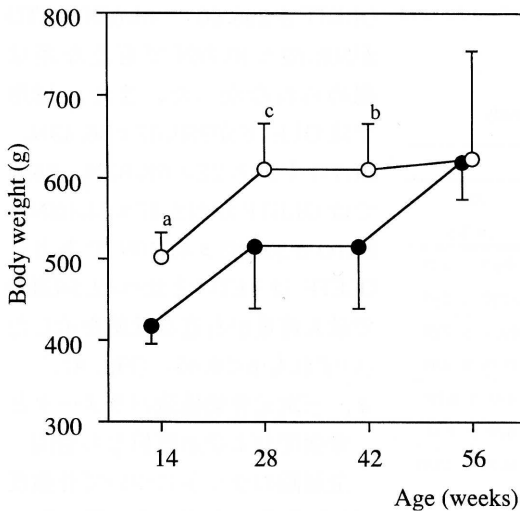


Fig. 2 Body weight changes of OLETF (open circles) and LETO (closed circles) rats from 14 to 56 weeks of age. Mean \pm SD. OLETF vs LETO rats; ^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$, and ^c $p < 0.05$.

結 果

1. 体重, 血糖値および血液生化学所見

Figure 2 に経時的な体重変化を, **Table 2** に血糖, FRA, TG, 総コレステロール, Ca, P の値を示す. 体重は14週齢から42週齢まで, 血

糖とFRAは42週齢を除いて, TG, 総コレステロールは14週齢から56週齢まで, OLETFの方が高値を示した(いずれも $p < 0.05$). 血清CaとPはいずれの週齢にてもOLETFとLETOの間に有意差を認めなかった.

2. 三次元骨梁構造

Table 3 に第5腰椎の海綿骨領域のマイクロCTによる解析結果を示す. BV/TVは, 14週齢のみでOLETFの方が有意な高値を示し ($p < 0.01$), 他の週齢では2群間に有意な差は認められなかった. Tb. Nは, 28週齢以降でOLETFの方が有意な低値を示した ($p < 0.05$). 連結性は, 28週齢以降で

OLETFの方が低値(CDの低値またはTBPfの高値)を示した(いずれも $p < 0.05$). SMIは, 28週齢以降でOLETFの方が有意な高値を示した(いずれも $p < 0.05$). DAは, 56週を除く週齢でOLETFの方が有意な低値を示した(いずれも $p < 0.05$).

Table 4 に脛骨近位骨幹端の海綿骨領域のマイクロCTによる解析結果を示す. BV/TVとTb. Nは, 42週齢および56週齢でOLETFの方が有意な低値を示した(いずれも $p < 0.01$). Tb. Spは42週齢および56週齢でOLETFの方が有意な高値を示した(いずれも $p < 0.01$). 連結性は, 28週齢以降でOLETFの方が低値(CDの低値またはTBPfの高値)を示した(いずれも $p < 0.05$). SMIは, すべての週齢においてOLETFの方が有意な高値を示した(いずれも $p < 0.05$). DAは一定の傾向を示さなかった.

Table 5 に脛骨遠位骨幹端の海綿骨領域のマイクロCTによる解析結果を示す. BV/TVは, すべての週齢でOLETFの方が有意な高値を示した(いずれも $p < 0.01$). Tb. Th, Tb. Nは, すべての週齢でOLETFの方が有意な高値を示した(いずれも $p < 0.01$). Tb. Spは, すべての週齢でOLETFの方が有意な低値を示した(い

Table 2. Blood glucose, fructosamin, triglyceride, cholesterol, Ca, and P levels in OLETF and LETO rats

	group	age (weeks)		
		14w	42w	56w
		(n=7~10)	(n=7)	(n=11)
Glucose (mg/dl)	OLETF	370.9 ± 107.3 ^b	375.0 ± 120.4	525.6 ± 204.3 ^a
	LETO	250.3 ± 48.3	286.8 ± 69.6	243.6 ± 75.5
Fructosamine (μ mol/L)	OLETF	582.7 ± 36.1 ^c	358.7 ± 53.2	380.0 ± 60.4 ^a
	LETO	526.3 ± 30.8	316.3 ± 17.7	299.0 ± 36.0
Triglyceride (mg/dl)	OLETF	120.4 ± 34.9 ^c	376.4 ± 201.9 ^b	529.1 ± 250.2 ^a
	LETO	72.7 ± 25.0	67.6 ± 27.8	69.3 ± 21.3
Cholesterol (mg/dl)	OLETF	110.0 ± 10.4 ^b	175.6 ± 36.6 ^b	243.2 ± 47.4 ^a
	LETO	91.9 ± 3.2	99.9 ± 11.8	106.0 ± 11.1
Ca (mg/dl)	OLETF	10.0 ± 0.3	10.0 ± 0.4	10.5 ± 0.8
	LETO	10.3 ± 0.2	10.6 ± 1.4	10.5 ± 1.1
P(mg/dl)	OLETF	7.4 ± 1.0	5.9 ± 0.7	6.5 ± 1.5
	LETO	8.3 ± 0.9	7.7 ± 3.4	6.5 ± 2.3

Values are mean±SD. OLETF vs LETO rats ; ^ap<0.001, ^bp<0.01, and ^cp<0.05.

Table 3. Trabecular bone parameters in the fifth lumbar vertebral body

	group	age			
		14w	28w	42w	56w
		(n=10)	(n=10)	(n=7~8)	(n=11)
BV/TV (%)	OLETF	45.05 ± 2.55 ^b	48.99 ± 3.17	35.28 ± 2.13	30.92 ± 4.15
	LETO	41.00 ± 3.29	48.49 ± 5.56	36.71 ± 2.34	32.97 ± 2.95
Tb.Th (μ m)	OLETF	78.42 ± 3.46 ^b	96.02 ± 7.57	72.91 ± 3.59	69.71 ± 7.58
	LETO	70.92 ± 4.90	91.68 ± 10.33	71.33 ± 4.35	71.75 ± 6.91
Tb.N (/mm)	OLETF	5.74 ± 0.14	5.11 ± 0.17 ^c	4.84 ± 0.22 ^c	4.43 ± 0.25 ^c
	LETO	5.78 ± 0.10	5.29 ± 0.15	5.15 ± 0.06	4.60 ± 0.17
Tb.Sp (μ m)	OLETF	95.81 ± 6.28	99.89 ± 6.30	134.06 ± 9.53 ^c	156.70 ± 15.95
	LETO	102.22 ± 7.11	97.52 ± 11.54	123.01 ± 5.18	145.88 ± 8.31
CD	OLETF	105.38 ± 8.21	60.81 ± 7.32	65.65 ± 9.99	54.78 ± 7.07
	LETO	106.53 ± 5.41	63.50 ± 8.64	69.21 ± 4.73	54.33 ± 12.72
TBPf (/mm)	OLETF	-2.74 ± 1.63	-6.57 ± 1.25 ^c	2.37 ± 1.36 ^b	3.93 ± 1.30 ^a
	LETO	-2.27 ± 2.08	-8.38 ± 1.55	-0.26 ± 0.70	0.77 ± 1.58
SMI	OLETF	0.54 ± 0.22	0.34 ± 0.32 ^c	0.94 ± 0.10 ^b	1.00 ± 0.13 ^b
	LETO	0.51 ± 0.22	-0.02 ± 0.33	0.46 ± 0.12	0.66 ± 0.22
DA	OLETF	1.82 ± 0.08 ^a	1.75 ± 0.05 ^a	1.87 ± 0.09 ^c	1.83 ± 0.11
	LETO	1.98 ± 0.04	1.87 ± 0.05	1.97 ± 0.05	1.90 ± 0.07

Values are mean±SD. OLETF vs LETO rats ; ^ap<0.001, ^bp<0.01, and ^cp<0.05.

OLETFの方が高い値 (CDの高値またはTBPfの低値)を示した (いずれも p<0.01). SMIは、すべての週齢において OLETFの方が有意な低値を示した (いずれも p<0.01). DAは、28週を除く週齢で OLETFの方が有意な高値を示した (いずれも p<0.01).

Figure 3に OLETF と LETO の典型例の第5腰椎椎体の三次元再構成画像を示す。OLETFでは LETO と比べ棒状の骨梁が板状の骨梁よりも多く、骨梁の連結性が低下している像が観察される。

3. 椎体の圧縮強度

Figure 4に第3腰椎の圧縮試験による結果を示す。14週では OLETF が 296.60 ± 40.68N, LETO が 308.62 ± 40.78N で有意な差は認められなかった。また、42週では OLETF が 259.07 ± 56.43N, LETO が 347.22 ± 68.87N, 56週では OLETF が 242.47 ± 64.02N, LETO が 305.83 ± 44.10N であり、OLETF は LETO と比べ42, 56週齢で最大荷重が有意な低値を示した (いずれも p<0.05) (**Fig. 4**)。

4. 三次元骨梁構造パラメータと骨強度および血糖値との相関

全週齢のラットについて骨強度 (最大荷重) と Tb. N, Tb. Sp, TBPf, SMI との間には、それぞれ r = 0.292 (p<0.05), -0.295 (p<0.05), -0.339 (p<0.01), -0.332 (p<0.05) の有意な相関が認められた。他の三次元骨梁構造パラメータと骨強度 (最大荷重) との間には有意な相関は認められなかった。

血糖値と BV/TV, Tb. N, Tb. Sp,

TBPf, SMI との間には、それぞれ r = -0.286

Table 4. Trabecular bone parameters in the proximal tibial metaphysis

		age			
group		14w (n=10)	28w (n=10)	42w (n=7~8)	56w (n=11)
BV/TV (%)	OLETf	33.08 ± 4.68	31.98 ± 3.30	17.82 ± 3.66 ^b	13.53 ± 4.90 ^a
	LETO	29.20 ± 3.20	36.32 ± 4.88	24.73 ± 3.04	21.40 ± 3.85
Tb.Th (μm)	OLETf	65.37 ± 4.08 ^c	73.69 ± 3.73	61.14 ± 6.39	63.60 ± 8.38
	LETO	61.51 ± 3.34	76.60 ± 4.03	65.89 ± 3.54	67.52 ± 4.56
Tb.N (1/mm)	OLETf	5.04 ± 0.44	4.34 ± 0.35	2.90 ± 0.31 ^b	2.07 ± 0.57 ^a
	LETO	4.74 ± 0.27	4.73 ± 0.50	3.74 ± 0.28	3.15 ± 0.45
Tb.Sp (μm)	OLETf	134.49 ± 22.13	158.34 ± 21.04	287.65 ± 40.87 ^b	459.19 ± 172.65 ^a
	LETO	150.26 ± 14.79	136.77 ± 23.54	202.75 ± 23.95	257.13 ± 62.64
CD	OLETf	88.46 ± 17.32	64.35 ± 14.53	31.78 ± 3.65 ^b	14.71 ± 5.42 ^a
	LETO	84.06 ± 7.64	71.26 ± 13.01	46.99 ± 5.25	29.23 ± 7.13
TbPpf (1/mm)	OLETf	10.39 ± 2.72	0.44 ± 1.26 ^c	15.29 ± 1.86 ^c	16.53 ± 2.92 ^c
	LETO	11.34 ± 1.75	-1.68 ± 2.57	12.70 ± 1.41	13.80 ± 2.08
SMI	OLETf	2.03 ± 0.20 ^c	1.82 ± 0.13 ^c	2.22 ± 0.16 ^b	2.29 ± 0.25 ^c
	LETO	1.83 ± 0.14	1.63 ± 0.28	1.90 ± 0.17	2.03 ± 0.22
DA	OLETf	1.55 ± 0.04	1.34 ± 0.05 ^b	1.24 ± 0.05	1.19 ± 0.06
	LETO	1.56 ± 0.02	1.26 ± 0.05	1.27 ± 0.04	1.22 ± 0.07

Values are mean ± SD. OLETf vs LETO rats ; ^ap < 0.001, ^bp < 0.01, and ^cp < 0.05.

Table 5. Trabecular bone parameters in the distal tibial metaphysis

		age			
group		14w (n=10)	28w (n=10)	42w (n=7~8)	56w (n=11)
BV/TV (%)	OLETf	49.84 ± 4.24 ^a	52.10 ± 3.04 ^a	41.13 ± 3.50 ^b	42.99 ± 5.82 ^a
	LETO	27.45 ± 2.06	29.16 ± 3.86	23.87 ± 1.89	24.49 ± 3.22
Tb.Th (μm)	OLETf	94.70 ± 6.52 ^a	105.01 ± 6.79 ^a	92.81 ± 5.45 ^b	101.00 ± 10.24 ^b
	LETO	67.32 ± 2.11	78.90 ± 3.99	78.91 ± 2.36	87.39 ± 6.96
Tb.N (1/mm)	OLETf	5.26 ± 0.19 ^a	4.97 ± 0.26 ^a	4.43 ± 0.27 ^b	4.25 ± 0.18 ^a
	LETO	4.08 ± 0.22	3.68 ± 0.36	3.02 ± 0.20	2.80 ± 0.28
Tb.Sp (μm)	OLETf	95.63 ± 10.57 ^a	96.70 ± 8.85 ^a	133.57 ± 14.75 ^b	134.96 ± 18.68 ^a
	LETO	178.73 ± 14.39	195.22 ± 33.38	253.10 ± 22.68	273.20 ± 40.16
CD	OLETf	72.29 ± 5.19 ^a	58.60 ± 14.06 ^a	41.02 ± 6.41 ^b	27.20 ± 2.81 ^a
	LETO	52.24 ± 6.56	29.56 ± 5.03	16.51 ± 2.12	10.96 ± 4.20
TbPpf (1/mm)	OLETf	2.82 ± 1.89 ^a	-5.37 ± 0.68 ^a	5.84 ± 0.65 ^b	4.60 ± 1.85 ^a
	LETO	10.54 ± 0.56	-0.59 ± 0.65	10.58 ± 0.64	9.91 ± 0.91
SMI	OLETf	1.25 ± 0.24 ^a	1.26 ± 0.21 ^a	1.39 ± 0.09 ^b	1.03 ± 0.18 ^a
	LETO	1.88 ± 0.07	1.96 ± 0.13	2.06 ± 0.12	2.03 ± 0.14
DA	OLETf	1.51 ± 0.04 ^a	1.34 ± 0.06	1.56 ± 0.08 ^b	1.52 ± 0.10 ^b
	LETO	1.35 ± 0.05	1.30 ± 0.04	1.38 ± 0.06	1.34 ± 0.10

Values are mean ± SD. OLETf vs LETO rats ; ^ap < 0.001, and ^bp < 0.01.

0.438 (p < 0.001), 0.461 (p < 0.005) の有意な相関が認められた。他の三次元骨梁構造パラメータと血糖値との間に有意な相関は認められなかった。

考 察

2型糖尿病のモデル動物である雄性 OLETf ラットは離乳直後から過食と肥満を呈し、糖尿病を自然発症する³⁰⁾。すなわち、生後12週頃から血漿グルコース、インスリン、腹腔内の脂肪重量が LETO ラットに比べ高値を示し、24週齢ではほぼ100%が経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) において糖尿病と診断される。糖尿病の発症後は慢性に経過し、インスリン治療がなくても65週齢以上の生存が可能である。これまでに、OLETF ラットは2型糖尿病のモデル動物として、インスリン抵抗性と糖尿病発症の関係や膵β細胞増殖能障害の研究などに広く用いられているが³¹⁾、骨粗鬆症に関する報告は Omi らによる骨密度および血液生化学マーカーの検討に限られる³²⁾。今回の実験でも、Omi らによる報告と同様に、56週齢の体重、42週齢の血糖、FRA を除いて、いずれの週齢においても、体重、血糖、FRA、TG、総コレステロールの平均値は、OLETF の方が高かったが、血清 Ca と P はコントロール群と有意差を示さなかった。なお、42週齢の血糖、FRA の平均値は OLETf と有意差は認められなかったが高値であった。

(p < 0.05), -0.272 (p < 0.05), 0.314 (p < 0.05),

本研究では、高インスリン血症の発症時期、

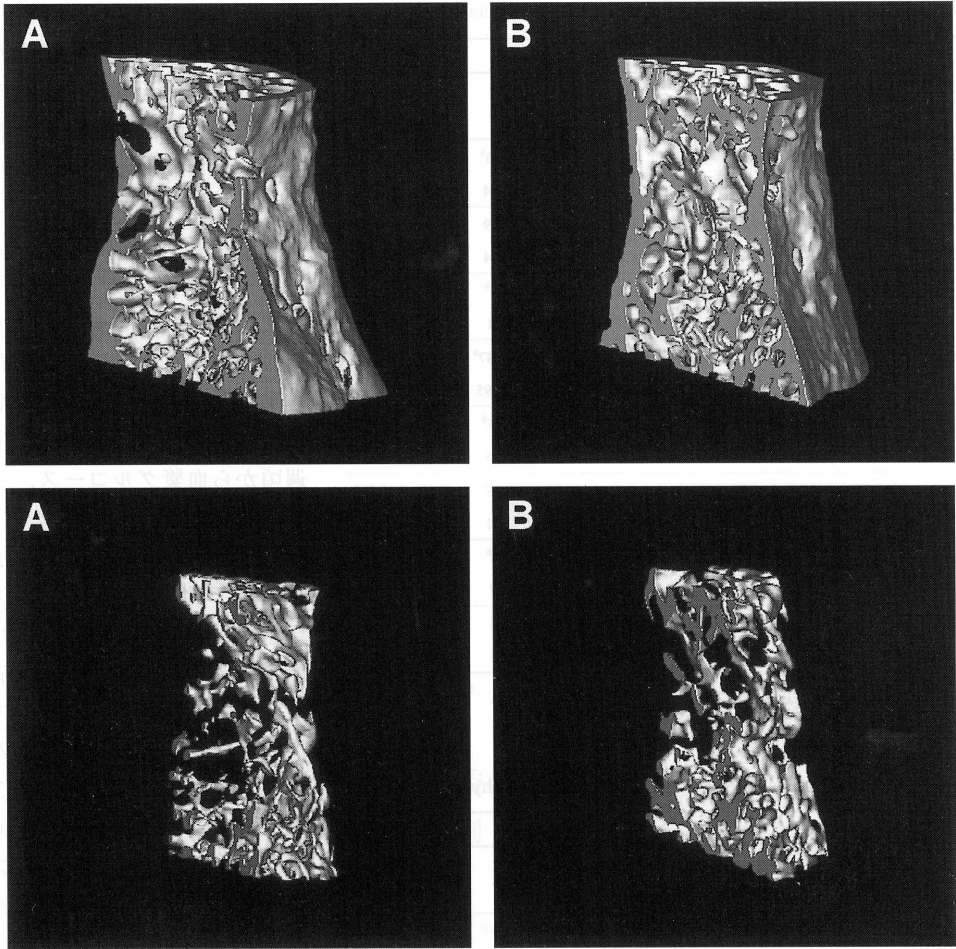


Fig. 3 Typical three-dimensional images by micro-CT of the fifth lumbar vertebral body in OLETf(A) and LETO(B) rats. The whole bone (upper panel) and the trabecular bone (lower panel). The trabecular structure of the fifth lumbar vertebral body in the OLETf rat was rod-like and less connected than LETO rat.

OGTTによる糖尿病診断の確定時期，低インスリン血症の時期，高齢期を仮定して，それぞれ14, 28, 42, 56週齢のラットを用い，各週齢における海綿骨の形態学的特徴をマイクロCTを用いて解析した。本装置は，微小焦点のX線源と高分解能検出器が装備されており，拡大率に応じて画素径が変化し，最小画素径 $5\mu\text{m}$ までの撮影が可能である。X線源と検出器は固定されており，試料を支持体上で回転させることにより投影データが取得され，回転軸に垂直な面の連続断層画像が得られる。マイクロCTによる解析は，従来から用いられてきた骨組織形態

計測法とは異なり，骨梁の三次元的構築を直接評価することが可能である^{33)~35)}。形態学的指標としては，骨体積比率(BV/TV)，骨梁の平均的な幅(Tb.Th)，骨梁間の間隙(Tb.Sp)，骨梁数(Tb.N)および骨梁の空間的構築の指標であるCD，TBPf，SMIおよびDAの計測を行った。骨粗鬆症では骨の吸収量が形成量を上回った結果，海綿骨の骨梁が菲薄化する。

連続した骨梁で比較的均一に菲薄化が進むと骨梁が消失するが，菲薄化が局所的に進むと骨梁の断裂が生じる。骨梁の菲薄化や消失が海綿骨の広い範囲で起こると骨量(骨密度)の低下

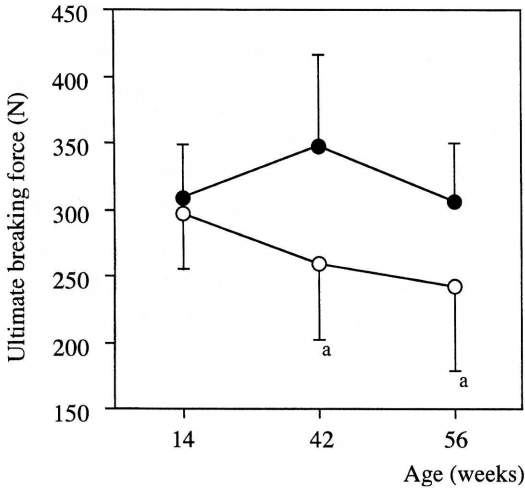


Fig. 4 Ultimate breaking force of the third lumbar vertebral body in OLETF (open circles) and LETO (closed circles) rats. Mean \pm SD. OLETF vs LETO rats; * $p < 0.05$.

を導くが、骨梁の断裂のみでは骨量の大きな低下はみられない。骨梁の断裂は、骨粗鬆症での骨梁変化の一つとして古くから注目されており^{36), 37)}、CDの低下やTBPfの増加として計測できる。また、骨梁は棒状のものと板状のものが混在しており、骨粗鬆症では健常者の海綿骨に比べて、板状の形態をした骨梁が減少し、棒状形態の骨梁の比率が増加する。SMIは平均的な形態つまり板状と棒状の構造比率を表す指標で、完全な板の場合SMIは0、棒では3、球では4であり、SMIの増加は棒状比率の増加を示す²⁸⁾。さらに、骨梁の異方性を示す指標としてDAを計測した。Wolffの法則に示されるように骨梁は力学的負荷に対して最も有効に支持できるように配列する³⁸⁾。力学的負荷は通常一定の方向性を有するため、力学的負荷に対する反応が強いほど骨梁の異方性は増加する。無重力状態では骨梁の異方性は低下し、進行した原発性骨粗鬆症でも骨梁異方性の低下がみられる^{39), 40)}。

OLETFラットの骨密度変化については、Omiらは8週齢から69週齢までの腰椎および脛骨近位部での二重エネルギーX線吸収測定法(DXA)による結果を報告している³²⁾。そ

れによると、腰椎と脛骨近位部のいずれも40週齢まではOLETFの方が高値を示すが、それ以降は有意差がなくなり、69週齢の脛骨近位部ではOLETFの方が低値を示すとしている。今回の研究とは測定方法が異なり、測定部位も正確には一致しないため詳細な比較は困難であるが、今回の実験でのBV/TVと同様の傾向と考えられる。

海綿骨の形態学的指標は、OLETFとLETOにおいて種々の相違を示し、その傾向は骨部位によって大きく異なっていた。すなわち、脛骨遠位端では若齢期と高齢期ともに、BV/TV、Tb.Th、Tb.N、CD、DAが高値を、Tb.Sp、TBPf、SMIが低値を示した。これは、OLETFの方が骨量が多く、海綿骨の三次元構築の点からも強度の高い骨であることを意味する。一方、高齢ラットの脛骨近位骨幹端および腰椎では、OLETFがLETOと比べ、やや骨量が低く、海綿骨の三次元構築もOLETFの方が強度的に弱い傾向を示した。このような骨部位間差が生じる原因としては、骨部位による荷重負荷の相違が強く影響していることが考えられる。ラットのような四足動物では腰椎の荷重負荷は脛骨より低く、脛骨の中でも遠位部の方が近位部よりも大きな荷重を受ける⁴¹⁾。また、脛骨遠位部は近位部よりも断面積が小さいことから、単位面積当たりの荷重負荷はさらに大きい。ラットの走行運動実験でも、運動による骨増加効果はこれらの3部位のうちで脛骨遠位部が最も大きい値を示している⁴¹⁾。荷重負荷の相違以外の原因としては、赤色髄と黄色髄の比率が骨部位によって異なることなどが考えられる。卵巣摘出ラットでは、骨代謝の亢進は全身の骨でみられるが、骨量減少は腰椎や脛骨近位部などの赤色髄に富んだ部位に限られ、脛骨遠位端などの黄色髄で占められる部位の骨量減少は殆どみられない⁴²⁾。また、骨髄脂肪の増加はステロイド⁴³⁾や不動⁴⁴⁾などによる骨量減少とも関連していることが知られており、今回の実験結果も骨部位による骨髄脂肪量の相違が影響している可能性が考えられる。

高齢ラットの腰椎では、OLETFとLETOの間で有意なBV/TVの差がなく、TbPfやSMIなどの海綿骨骨梁の三次元構築を示す指標にのみ有意差が認められた。これらの変化は骨強度の低下と関連することが予想され、圧縮試験の結果から実際に骨強度が低下していることが確認された。これは、糖尿病性骨粗鬆症では、海綿骨微細構築の劣化が骨の脆弱性に大きく寄与していることを示唆する結果と考えられる。なお、今回の実験では、圧縮試験で正確なデータを得るために、圧縮試験用の試料はマイクロCT撮影後の乾燥試料ではなく、摘出後直ちに凍結保存したものをを用いた。そのため、マイクロCT撮影と圧縮試験を同一部位で実施することが出来なかった。したがって、マイクロCT撮影には第5腰椎を、圧縮試験には第3腰椎を用いたが第3腰椎と第5腰椎との間には骨粗鬆症の程度がほぼ同等と仮定した。

14週齢では、荷重負荷の影響の少ない腰椎でも、OLETFの方がBV/TVとTb.Thの高値を示した。OmiらによるDXA測定の結果でも同様であり、OLETFの方が高い骨密度を示している³²⁾。OLETFは若齢時に高インスリン血症を呈し、糖尿病の発症後も高インスリン血症が持続し、40週齢頃から低インスリン血症となることが知られている³⁰⁾。インスリンの骨での主たる標的細胞はインスリン受容体を持つ骨芽細胞であり、インスリンはこの受容体を介して骨芽細胞の増殖・分化を促進し、骨形成を亢進させる⁴⁵⁾。このため、若齢時でのOLETFの骨量増加は高インスリン血症による影響が考えられる。

糖尿病性骨粗鬆症の病態には、インスリンの作用不足、高血糖状態および糖尿病に伴う合併症の骨代謝に及ぼす影響などが関与する。TbPfやSMIの変化は28週齢のOLETFで既に認められており、海綿骨微細構築の劣化は糖尿病発症の比較的早期から発生しているものと思われる。今回はブドウ糖負荷試験やインスリン濃度の測定は行っていないが、28週齢のOLETFでは血中インスリンレベルは比較的高

いことが予想され³⁰⁾、糖尿病による骨変化には高血糖状態による骨芽細胞機能不全が強く関与していることが考えられる⁷⁾。臨床的にも高血糖持続による骨芽細胞機能の低下を示す所見が、明らかな合併症のみられない発症直後の2型糖尿病患者で観察されている⁴⁶⁾。糖尿病での骨強度低下の発生機序については、今後、骨代謝の状態や微小血管障害の進行程度などと対比検討することにより、さらに明らかにされるものと思われる。

ま と め

1. 2型糖尿病モデルラットの海綿骨微細構築をマイクロCTにより解析し、糖尿病性骨粗鬆症の骨微細構造を部位別および週齢別に検討した。
2. 糖尿病ラットの海綿骨微細構築の変化には骨部位間差が存在し、脛骨遠位骨幹端では骨量増加と骨梁連結性の増加を示す変化が、脛骨近位骨幹端と腰椎では骨梁構造の劣化を示す変化がみられた。骨部位間差の原因として、2型糖尿病ラットは過食となり体重増加が著しく、著明な肥満になる。特に脛骨遠位骨幹端には、これらの体重増加による荷重負荷が強く作用するためと考えられた。
3. 荷重の影響が少ない腰椎では、糖尿病発症後の比較的早期から海綿骨微細構築の劣化が観察された。
4. 糖尿病性骨粗鬆症での骨脆弱性には、海綿骨微細構築の劣化が強く関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導および御高閣を頂きました川崎医科大学放射線医学(核医学)福永仁夫教授、曾根照喜助教授、また、実験動物を御提供下さいました大塚製薬株式会社徳島研究所河野一弥氏に深甚なる謝意を表します。本研究の一部は川崎医科大学プロジェ

クト研究費（14-502）の援助によって行われたもので（平成15年4月，横浜）において発表した。
ある。本論文の要旨は第62回日本医学放射線学会総会

文 献

- 1) Consensus Development Conference : Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94 : 646-650, 1993
- 2) Silberberg R : The skeleton in diabetes mellitus : a review of the literature. *Diabetes Res* 3 : 329-338, 1986
- 3) Forst T, Pflutzner A, Kann P : Peripheral osteopenia in adult patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 12 : 874-879, 1995
- 4) Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Ronnema T : Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22 : 1196-1200, 1999
- 5) McNair P : Bone mineral metabolism in human type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. *Dan Med Bull* 35 : 109-121, 1988
- 6) Levin ME, Boisseau V-C, Avioli LV : Effects of diabetes mellitus on bone mass in juvenile and adult-onset diabetes. *N Engl J Med* 294 : 241-245, 1976
- 7) Ishida H, Seino Y, Matsukura S, Ikeda M, Yawata M, Yamashita G, Ishizuka S, Imura H : Diabetic osteopenia and circulating levels of vitamin D metabolites in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Metabolism* 34 : 797-801, 1985
- 8) Isaia G, Bodrato L, Carlevatto V, Mussetta M, Salamano G, Molinatti GM : Osteoporosis in type II diabetes. *Acta Diabetol Lat* 24 : 305-310, 1987
- 9) Gregorio F, Cristallini S, Santeusano F, Filippini P, Fumelli P : Osteopenia associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus : what are the causes? *Diabetes Res Clin Pract* 23 : 43-54, 1994
- 10) Kwon DJ, Kim JH, Chung KW, Kim JH, Lee JW, Kim SP, Lee HY : Bone mineral density of the spine using dual energy X-ray absorptiometry in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol Res* 22 : 157-162, 1996
- 11) Giacca A, Fassina A, Caviezel F, Cattaneo AG, Caldirola G, Pozza G : Bone mineral density in diabetes mellitus. *Bone* 9 : 29-36, 1988
- 12) Weinstock RS, Goland RS, Shane E, Clemens TL, Lindsay R, Bilezikian JP : Bone mineral density in women with type II diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* 4 : 97-101, 1989
- 13) Wakasugi M, Wakao R, Tawata M, Gan N, Koizumi K, Onaya T : Bone mineral density measured by dual energy X-ray absorptiometry in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Bone* 14 : 29-33, 1993
- 14) Sosa M, Dominguez M, Navarro MC, Segarra MC, Hernandez D, de Pablos P, Betancor P : Bone mineral metabolism is normal in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 10 : 201-205, 1996
- 15) Johnston CC, Hui SL, Longcope C : Bone mass and sex steroid concentrations in postmenopausal Caucasian diabetics. *Metabolism* 34 : 544-550, 1985
- 16) Barrett-Connor E, Holbrook T-L : Sex differences in osteoporosis in older adults with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *JAMA* 268 : 3333-3337, 1992
- 17) Van Daele PL, Stolk RP, Burger H, Algra D, Grobbee DE, Hofman A, Birkenhager JC, Pols HA : Bone density in non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Rotterdam Study. *Ann Intern Med* 122 : 409-414, 1995
- 18) Rishaug U, Birkeland KI, Falch JA, Vaaler S : Bone mass in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 55 : 257-262, 1995
- 19) Stolk RP, Van Daele PL, Pols HA, Burger H, Hofman A, Birkenhager JC, Lamberts SW, Grobbee DE :

- Hyperinsulinemia and bone mineral density in an elderly population : the Rotterdam Study. *Bone* 18 : 545-549, 1996
- 20) Nicodemus KK, Folsom AR : Iowa Women's Health Study : type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care* 24 : 1192-1197, 2001
- 21) Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, Cauley JA, Tabor HK, Schreiner PJ, Jamal SA, Black DM, Cummings SR : Study of Osteoporotic Features Research Group : older women with diabetes have an increased risk of fracture : a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 86 : 32-38, 2001
- 22) NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy : Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285 : 785-795, 2001
- 23) Carter DR, Hayes WC : The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. *J Bone Joint Surg Am* 59 : 954-962, 1977
- 24) Currey JD : Power law models for the mechanical properties of cancellous bone. *Eng Med* 15 : 153-154, 1986
- 25) Turner CH : Yield behavior of bovine cancellous bone. *J Biomech Eng* 111 : 256-260, 1989
- 26) 折茂 肇, 林 泰史, 福永仁夫, 曾根照喜, 藤原佐枝子, 白木正孝, 串田一博, 宮本繁仁, 宗圓 聰, 西村純二, 大橋靖雄, 細井孝之, 五来逸雄, 田中弘之, 猪飼哲夫, 岸本英彰 : 原発性骨粗鬆症の診断基準 (2000年度改訂版). *日骨代謝会誌* 18 : 76-82, 2002
- 27) Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR : Bone histomorphometry : standardization of nomenclature, symbols, and units : report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2 : 595-610, 1987
- 28) Hildebrand T, Rüegsegger P : Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 1 : 15-23, 1997
- 29) Harrigan TP, Mann RW : Characterization of microstructural anisotropy in orthotropic materials using a second rank tensor. *J Mater Sci* 19 : 761-767, 1984.
- 30) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T : Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications : Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 41 : 1422-1428, 1992
- 31) 島 健二 : OLETF ラット. *日本臨床*56 (増刊号) : 725-731, 1998
- 32) Omi N, Maruyama T, Suzuki Y, Ezawa I : Bone loss in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus, the OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty strain) rat. *J Bone Miner Metab* 16 : 250-258, 1998
- 33) Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M : The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4 : 3-11, 1989
- 34) Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA, Goulet RW, Jesion G : Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res* 8 : 833-842, 1990
- 35) 曾根照喜, 福永仁夫 : 非破壊的骨梁構造検査法の種類と特徴. *日骨形態誌*10 : 47-51, 2000
- 36) Compston JE : Connectivity of cancellous bone : assessment and mechanical implications. *Bone* 15 : 463-466, 1994
- 37) Odgaard A : Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone* 20 : 315-328, 1997
- 38) Wolff J : The law of bone remodeling, translated by Maquet P, Furlong R, Berlin, Springer-Verlag. 1986
- 39) Homminga J, McCreadie BR, Ciarelli TE, Weinans H, Goldstein SA, Huiskes R : Cancellous bone mechanical properties from normals and patients with hip fractures differ on the structure level, not on the bone hard tissue level. *Bone* 30 : 759-764, 2002
- 40) Sugita H, Oka M, Toguchida J, Nakamura T, Ueo T, Hayami T : Anisotropy of osteoporotic cancellous bone. *Bone* 24 : 513-516, 1999
- 41) Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF : Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone* 24 : 163-169, 1999

- 42) Li M, Shen Y, Qi H, Wronski TJ : Comparative study of skeletal response to estrogen depletion at red and yellow marrow sites in rats. *Anat Rec* 245 : 472 - 480, 1996
- 43) Warman M, Boskey A L : Effect of high levels of corticosteroids on the lipids of the long bones of the mature rabbit. *Metab Bone Dis Rel Res* 4 : 319 - 324, 1983
- 44) Minaire P, Meunier PJ, Edouard C, Bernard J, Courpron J, Bourret J : Quantitative histological data on disuse osteoporosis. *Calcif Tissue Res* 17 : 57 - 73, 1974
- 45) Levy JR, Murray E, Manolagas S, Olefsky JM : Demonstration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. *Endocrinology* 119 : 1786 - 1792, 1986
- 46) Inaba M, Nishizawa Y, Mita K, Kumeda Y, Emoto M, Kawagishi T, Ishimura E, Nakatsuka K, Shioi A, Morii H : Poor glycemic control impairs the response of biochemical parameters of bone formation and resorption to exogenous 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in patients with type 2 diabetes. *Osteoporos Int* 9 : 525 - 531, 1999