骨の老化に関する研究

——老人性骨粗鬆症における骨コラーゲンの変化——

林 泰 史 滝 沢 博 五十嵐三都男* 松 浦 美 喜 雄**

老人性骨粗鬆症についてカルシウム、リン等無機質の変化を捉えた研究は多いが、有機質、ことに骨コラーゲンの変化を追求した研究は少なく、老人性骨粗鬆症における骨コラーゲンの役割りについては不明の点が多い。この点を解明するための基礎研究として、皮膚コラーゲンの架橋とリジン、ヒドロキシリジンの関係、低カルシウム食投与によるラットの実験的骨粗鬆症と骨コラーゲンのリジン含有量の関係を調べ興味ある所見を得たのですでに報告した。これによるとコラーゲンの架橋形成とともにリジン含有量が減少し、ヒドロキシリジン含有量は変化しないことがわかった。また実験的骨粗鬆症の発現とともに骨コラーゲンのリジン含有量が増加し、骨コラーゲンにおける架橋が減少していることがわかった。

老人性骨粗鬆症を有する患者の骨についても骨コラーゲンに変化があるか否かを調べるために老人性骨粗鬆症を有する人となない人の大腿骨近位部の骨コラーゲンについてリジン含有量を林らの方法で、ヒドロキシリジン含有量を Blumenkrantz の方法で定量した。それによると老人性骨粗鬆症を有する骨の骨コラーゲン内リジン含有量は平均 31.5 ± 0.33 moles (コラーゲン 10^5 g 当り) で正常の骨の骨コラーゲン内リジン含有量平均 28.5 ± 0.40 moles に比べ増加している。ヒドロキシリジン含有量は前者が平均 3.98 ± 0.20 moles, 後者が平均 3.57 ± 0.30 moles と両者の間に有意の差がなかった。

実験的骨粗鬆症においても老人性骨粗鬆症においても骨コラーゲン内リジン含有量が増加していることから骨粗鬆症と骨コラーゲンの架橋との間に密接な関係があることがわかり、さらに骨コラーゲンの架橋と石灰化の関係を示す結果も得られたので考察を加えて報告する。

はじめに

まれにみられるページェット病のような特殊な骨疾患を除くと、加齢に伴う骨変化は老人性骨粗鬆症という形をとる。老人性骨粗鬆症の病因については古くは Albright の性ホルモン不均衡説があるが、Nordin のカルシウム欠乏説が現在のところ優勢である。その他種々の病因説があるが、その本態は依然として不明である。しかし最近では老人性骨粗鬆症はなんらかの原因による骨吸収亢進が主な原因で、そのために骨梁が減少すると考えられている。骨吸収亢進をもたらす原因についてはホルモン、ビタミン、カルシウムやリン等電解質、無機質の動態を生化学的アプローチで、造骨細胞、喰骨細胞の

活性、無機質の分布等を病理組織学的アプローチで研究されているが本質をつく結論は得られていない。それは今までの研究で骨有機質、とくに骨コラーゲンの研究が遅れていることも一因があると思われる。

骨に占める有機質は重量では 10% 以下と少ないが、骨の微細構造からも、骨の石灰化の始まる機構からも骨有機成分の関与、とくにその 94% 近くを占めるコラーゲン線維の関与が重要であろう。しかし骨コラーゲンに関する研究はコラーゲンの代謝、とくにプロリンの取り込み、ヒドロキシプロリンの形成等に限られ、コラーゲンのアミノ酸組成の比較、架橋との関係についての研究は少ない。

ラットの皮膚コラーゲンについて架橋の基礎的研究をするためにその物理化学的安定性、とくに抽出性とリジン含有量の関係を調べたところ、物理化学的安定性が増すとともに、すなわちコラーゲン内架橋が増加するとともにリジン含有量が減少してゆくことを見出し、リジン

* Y. Hayashi, H. Takizawa, M. Igarashi: 東京都養育院附属病院整形外科, 東京都板橋区栄町 35-2.

**M. Matsuura: 東京都老人総合研究所臨床生化学.
受付: 1973年1月18日.

が架橋形成に際して消費されることを確認した¹⁾。これは、哺乳類では遺伝子が同一であればその動物のコラーゲンのヘリックスの部分のアミノ酸組成は同一であるとの報告²⁾や、ラシリズムによる可溶性コラーゲンを一定時間加温すると不溶性コラーゲンになるという報告³⁾等に基づいている。続いて実験的骨粗鬆症における骨コラーゲンの架橋の程度をリジン含有量を測定することにより推定した。これによると、ラットでは低カルシウム食投与およびブレドニソロン筋注による実験的骨粗鬆症が形成されると、その骨コラーゲンの架橋の程度が減少することを見出した⁴⁾。同様の変化が老人性骨粗鬆症で生じるか否かを知るために、老人性骨粗鬆症を有する患者の骨の骨コラーゲンについてリジン、ハイドロオキシリジン含有量を測定し、骨の老化と骨コラーゲンの架橋の程度との関係について考察し、報告する。

対象および実験方法

東京都養育院附属病院整形外科および関連病院に入院し、人工股関節全置換術、大腿骨頭置換術、大腿骨近位部骨切り術等の際に不要となった骨を用いた。老人性骨粗鬆症は軀幹に近い骨に変化が強く、ことに大腿骨近位部のX線像は老人性骨粗鬆症の程度を適格に表現するので、大腿骨近位部の骨皮質のみを実験に用いた。老人性骨粗鬆症群は 69 才から 80 才までの女性 5 人で、大腿骨近位部の骨粗鬆症の程度が Singh M. の分類⁵⁾で 1 度から 4 度までのものを用いた。正常群は 18 才から 49 才までの男性 4 人、女性 1 人の同部の骨を用い、Singh M. の分類で 6 度のものに限った。両群の症例とも手術前に腰椎のX線撮影を行い、腰椎の骨粗鬆症像が大腿骨近位部のそれとはほぼ平行していることを確かめた。

エタノール中に保存された骨の骨皮質のみをリュール氏骨鉗子で剥り、乾燥重量に換算して約 300mg の骨小片を作る。骨小片をエタノール・エーテル等量混液中で 2 日間、2 回を取り変えつつ攪拌する。このようにして脱脂、乾燥させた骨小片のうちカルシウム含有量測定を行う一部の骨についてはさらに 24 時間、110°C の電気炉で乾燥させた。このようにして得られた骨の重量を乾燥重量とした。重量を測定した後、さらに電気炉で 5 時間、500°C で加熱し灰化した。これを少量の塩酸に溶解した後、蒸留水で稀釈し、Webster の方法⁶⁾でカルシウム含有量を比色定量した。

加熱しない残りの骨小片を pH 4.0、0.1 M クエン酸緩衝液に調整した 0.2 M EDTA 溶液中で数日間攪拌し、

脱灰した。続いて可溶性物質を除くために、さらに 0.5 M 酢酸溶液中で 48 時間攪拌した。これを蒸留水で数回透析し酸およびクエン酸、EDTA を除き再びエタノール・エーテル等量混液中で乾燥させ、不溶性骨コラーゲンとしてデシケーター中に保存した。

骨コラーゲンを細かく切り 6 規定塩酸中で 24 時間、110°C で加水分解した。加水分解産物の一部をとりキエルダール分解した後、ニンヒドリン反応を行い N 含有量を決めた。また一部については Neuman の Miyada 変法⁷⁾でハイドロオキシプロリン含有量を測定した。N 含有量をコラーゲンの 17.7% とし、ハイドロオキシプロリン含有量をコラーゲンの 12.7% とし蛋白含有量および純度をチェックした。

蛋白含有量のわかった加水分解産物について、次の方法でリジン含有量を測定した。1%フェノールフタレインを示指薬として加水分解産物を苛性ソーダーで中和した後、塩濃度が 0.5 モル以下となりかつ pH 5.2、0.1 M となるようにクエン酸緩衝液を加えリジン測定用検体とした。リジン測定には標準型コンウェイ容器を用い、操作中および測定時に炭酸ガスの汚染をできるだけ少なくするように工夫した。ブランク容器の外室には、検体作製時と同一の緩衝液に調整した 0.5 モル塩化ナトリウム溶液 3 ml を入れ、検体容器の外室には検体 3 ml を、標準容器の同部には検体 3 ml と 1 μ mole の標準リジン溶液を入れる。続いて外室に L-リジン脱炭酸酵素を加え、内室に約 10 μ mole の水酸化バリウムを正確に等量ずつ入れ、あらかじめ緑にシリコン・グリースを塗布した蓋をすばやく閉じる。外室の溶液と酵素をよく混ぜた後、重錘を載せ 37°C の孵卵器で 24 時間保温する。原理は外室の溶液に L-リジン脱炭酸酵素を作用させ、発生した炭酸ガスを内室の水酸化バリウムと結合させる。炭酸バリウムとなって減少した水酸化バリウムの量を稀塩酸で微量滴定し、リジン含有量を計算する。なお検体による塩濃度や蛋白濃度の違いが酵素の作用に与える影響を補正するために、各検体ごとに標準容器を加えて計算した⁸⁾。

ハイドロオキシリジン含有量測定には Blumenkrantz-Prockop 法⁹⁾を用いた。約 4 mg のアミノ酸を含んだ加水分解産物を真空乾燥させた後、アミノ酸 1 mg に対して 10~20 μ moles の割合で苛性ソーダーを加える。これをシリカゲル薄層クロマトグラフィーで展開し、プロリンとハイドロオキシリジンを分離する。ハイドロオキシリジンの部分のみをリン酸クエン酸緩衝液に溶解し、

sodium metaperiodate で酸化し *N*-pyrroline-5-carboxylic acid にする。これをさらに酸化してトルエンで抽出、*P*-ジメチルアミノベンズアルデヒドで発色させ、565 m μ で比色定量した。林らの微量拡散定量法で得た値から Blumenkrantz-Prockop 法で得たヒドロキシリジンの含有量に、0.31 (微量拡散定量法でのヒドロキシリジンの recovery) を乗じて減じた値がリジン量である。

結果および考察

骨コラーゲンのリジン含有量は図1に示すように正常群、平均 28.5 ± 0.4 moles (コラーゲン 10⁵g 当り)、老人性骨粗鬆症群、平均 31.5 ± 0.33 moles と両群の間に 0.1 % 以下の危険率で有意の差が認められた。

ヒドロキシリジン含有量は表1に示すように正常群、平均 3.98 ± 0.20 moles, 老人性骨粗鬆症群、平均 3.57 ± 0.30 moles と正常群のほうがやや多い傾向はあったが、*t* 検定で両者の間に有意の差がない。

同じ骨皮質について骨乾燥重量に対するカルシウム含有量の割合は正常群、平均 $26.8 \pm 1.0\%$ 、老人性骨粗鬆症群、 $22.3 \pm 1.2\%$ で 2 % 以下の危険率で有意の差を示していた。図2は骨乾燥重量に対するカルシウム含有量の割合とコラーゲン中のリジン含有量の関係をグラフに示したものであるが、骨コラーゲン中にリジン含有量が多く、カルシウム含有量の少ない老人性骨粗鬆症群とリジン含有量が少なくカルシウム含有量の多い正常群に分かれていることがわかる。

この結果を表2で示すラットの実験的骨粗鬆症の骨コラーゲンの場合と比べると人間の骨コラーゲンのほうが

リジン含有量が多く、ヒドロキシリジン含有量は少ない。しかし人間の正常群のリジン含有量とヒドロキシリジン含有量の合計は 32.5 moles で、ラットの正常群のそれらの合計 31.7 moles と比較的近い値を示している。また人間の老人性骨粗鬆症群のそれらの合計は 34.1 moles で、ラットの骨粗鬆症群 (グループ B) のそれらの合計は 34.8 moles とほぼ一致した値を示している。この結果は哺乳動物の同じ組織のコラーゲンではアミノ酸組成は同一であり、ただリジンの水酸化される数が異なっているのみであることを示唆している。しかし何故人間はラットに比べリジンが水酸化される数が少ないかは不明である。最近、皮膚、骨、筋膜のコラーゲン中にヒドロキシリジン含有量の少ない姉妹の1例が報告され、先天的なリジン水酸化酵素の減少または欠乏であろうと考察されている¹⁰⁾が、ヒトとラットの間にもリジ

表 1. The amount of lysyl and hydroxylysyl residues in insoluble collagen from human bones*

	Ca/Dry weight (%)	Lysyl residues (moles/10 ⁵ g collagen)	Hydroxylysyl residues (moles/10 ⁵ g collagen)
Normal bones	26.8 ± 1.0	28.5 ± 0.40	3.98 ± 0.20
Osteoporotic bones	$22.3 \pm 1.2^{**}$	$31.5 \pm 0.33^{***}$	$3.57 \pm 0.30^{\#}$

* The values presented in this table represent means with standard errors.

** Statistically significant difference. ($p < 0.02$)

*** Statistically significant difference. ($p < 0.001$)

[#] No statistical difference.

図 1. Lysyl residues in bone collagens

図 2. The relation of calcium per dry weight of bone and lysyl residues of collagen

表 2. The amount of lysyl and hydroxylysyl residues in insoluble collagen from bone*

	Treatment	Ca/dry weight of right tibia (%)	Lysyl residues (moles/10 ⁵ g collagen)	Hydroxylysyl residues (moles/10 ⁵ g collagen)
Group A	Normal calcium diet	24.3±0.3	23.2±0.6***	8.50±0.29
Group B	0.01% low calcium diet	23.7±0.5	26.4±0.6***	8.41±0.12
Group C	Low calcium diet+ prednisolone injection	22.9±0.9**	28.8±0.9***	8.38±0.17

* The values presented in this table represent means with standard errors.

** Statistically significant to group A. ($p<0.02$)

*** Statistically significant between any groups. ($p<0.01$)

ン水酸化酵素の活性に差があることも考えられる。

コラーゲンの架橋については Mechanic¹¹⁾, Bailey¹²⁾, Bornstein¹³⁾らの研究により詳しくわかってきた。それによるとコラーゲン中のリジンまたはヒドロキシリジンのε-アミノ基がアミン・オキシダーゼの作用を受けアルデハイド基となり、架橋の前駆物質であるアリジン、ヒドロキシアリジンを形成する。これがアルドール縮合体を作り架橋となる。また一方これがリジンまたはヒドロキシリジンとの間に Schiff 基を作りアルジミン結合となり、さらに還元されて還元型アルジミン結合となる。現在わかっている主な架橋は以上のべたものが基本となっている。シェーマ化して示すと図3のようになる。その他ヘキソースとリジン¹⁴⁾、ヘキソースとヒドロキシリジン¹⁵⁾が Schiff 基を作る架橋、アルドール縮合体とヒスチジンの組み合わせによる架橋が最近発見され報告されている。これら架橋の形成過程でリジンまたはヒドロキシリジンが消失する場合は次の二つの場合が考えられる。第1にリジンまたはヒドロキシリジンのε-アミノ基がアルデハイド基に変化する場合と、第2にアリジン、ヒドロキシアリジン、ヘキソースとの間に形成していたアルジミン結合が還元される場合である。これら二つの変化はいずれも不可逆的变化で、酸加水分解により再びリジン、ヒドロキシリジンとして分離せず検出できない。すなわち、コラーゲンの架橋が増すとともにこれらのアミノ酸含有量が減少することになる。以前にラットの皮膚コラーゲンについて物理化学的安定性ことに抽出性とリジン含有量の関係を調べたところ、中性塩可溶性コラーゲン 36.2 moles (コラーゲン 10%g 当りの平均値)、酸可溶性コラーゲン 27.9 moles、不溶性コラーゲン 24.2 moles と安定性が増すとともにリジン含有量が減少し、架橋に消費されているこ

図 3. Simplified presentation of the forms of cross-linking

とを証明し報告した¹⁾。Steven F. S.¹⁷⁾ は種々のコラーゲンについてトリブシンで分解した後フルオロジニトロベンゼンを作用させ、回収したジニトロフェニールリジン、ジニトロフェニールヒドロキシリジンを測定したところ、アミノ酸分析で得たリジン、ヒドロキシリジンに比べ減少していることを見出しアルジミン結合に消費されたためと考えた。

以上コラーゲンの架橋構造と得られた実験結果を結びつけると、老人性骨粗鬆症においては実験的骨粗鬆症の場合と同様、骨コラーゲンの架橋が減少していることになる。ラットについても人間の場合も骨のカルシウムの増減と骨コラーゲンの架橋の増減は平行しているが、ど

のような意味をもつのかは不明である。コラーゲンの構造とカルシウム沈着の関係についてはほとんどわかっていない。コラーゲンにおける石灰化の始まりについても、コラーゲンはグリシンなど荷電が中性のアミノ酸が多いためにカルシウムイオンが沈着するとの Urry D. W.¹⁸⁾ の説や、コラーゲン中の陰性荷電をもつアスパラギン酸やグルタミン酸がカルシウムを沈着さすという Davis N. R.¹⁹⁾ の説、リジンまたはヒドロキシリジンの ϵ -アミノ基が形成している水素結合が ATP によりブロックされ、リン酸化リジン、リン酸化ヒドロキシリジンを作り石灰化の“種”となりコラーゲンの立体構造内の水が追い出されて石灰化がすすむという Irving の説等がある。X線回折で腱コラーゲンに比べ骨コラーゲンは平均線維間隙が広くリンイオンがはいりうるという Katz E. D.²⁰⁾ の研究もある。架橋と石灰化に関する研究はもっとも遅れていて、Mechanic G.²¹⁾ が胎生と成長後のウシの骨、歯のコラーゲンを分離し、アリジン、ヒドロキシアリジンおよびそれらのアルジミン結合の半定量を行っているが、そこでは成長とともに骨コラーゲンが不溶性となるのはアルジミン結合が生体内で還元されるためだろうとのべ、カルシウムとの関係にはふれていない。老人性骨粗鬆症の原因究明のために骨コラーゲンの架橋と石灰化の関係をさらに研究する必要がある。

ま と め

老人性骨粗鬆症を有する人では正常人に比べその骨コラーゲンのリジン含有量が増加している。これは骨コラーゲン内の架橋が減少していることを示唆している。ヒドロキシリジン含有量には有意の差がない。この結果はラットの実験的骨粗鬆症の結果とも一致し、骨の石灰化と骨コラーゲンの架橋との間に密接な関係があることを示唆している。

文 献 1) 林泰史, 松浦美喜雄, 五十嵐三都男ほか: 皮膚コラーゲンの架橋に関する研究, 医学のあゆみ **84**: 685, 1973. 2) Piez, K.A.: Calcified Tissue., Academic Press, New York, 1971, p. 121. 3) Siegel, R.C. & Martin, G.R.: Collagen Crosslinking, J.Biol. Chem. **245**: 1653, 1970. 4) 林泰史, 吉野慎一, 五十嵐三都男: 骨の老化に関する研究, 医学のあゆみ **82**: 630, 1972. 5) Singh, M., Nagrath, A.R. & Maini, P.S.: Changes in trabecular pattern of the upper end of the femur as an

index of osteoporosis, J.Bone & Joint Surg. **52-A**: 457, 1970.

6) Webster, W.W.: A simple microspectrophotometric method for the determination of serum calcium, Amer. J.Clin. Path. **37**: 330, 1962. 7) Miyada, D.S. & Tappel, A.L.: Colorimetric determination of hydroxyproline, Anal. Chem. **28**: 909, 1956. 8) Hayashi, Y., Igarashi, M., Tsuyama, N., et al.: A simple method for determination of lysine in protein, Clin. Biochem. (in press). 9) Blumenkrantz, N. & Prockop, D.J.: Quantitative assay for hydroxylysine in protein hydrolyzates, Anal. Biochem. **39**: 59, 1971. 10) Pinnell, S.R., Krane, S.M., Glimcher, M.L. et al.: A heritable disorder of connective tissue., New Eng. J.Med. **286**: 1013, 1972.

11) Mechanic, G. & Tanzer, M.L.: Biochemistry of collagen cross-linking, Biochem. Biophys. Res. Commun. **41**: 1597, 1970. 12) Bailey, A.J., Peach, C.M. & Fowler, L.J.: Chemistry of collagen crosslinks., Biochem. J. **117**: 819, 1970. 13) Bornstein, P.: The Cross-linking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrism, Amer. J.Med. **49**: 429, 1970. 14) Robin, S.P. & Bailey, A.J.: Age-related changes in collagen, Biochem. Biophys. Res. Commun. **48**: 76, 1972. 15) Tanzer, M.L., Fairweather, R.B. & Gallop, P.M.: Collagen crosslinks, Arch. Biochem. Biophys. **151**: 137, 1972.

16) Fairweather, R.B., Tanzer, M.L. & Gallop, P.M.: Aldol-histidine, A new trifunctional collagen cross-link, Biochem. Biophys. Res. Commun. **48**: 1311, 1972. 17) Steven, F.S., Jackson, D.S. & Broady, K.: Unreactive ϵ -amino groups in collagen, Biochim. Biophys. Acta **188**: 334, 1969. 18) Urry, D.W.: Neutral sites for calcium ion binding to elastin and collagen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **68**: 810, 1971. 19) Davis, N.R.: The role of carboxyl groups in collagen calcification, Biochem. Biophys. Res. Commun. **48**: 1656, 1972. 20) Katz, E.P. & Li, S.: The molecular packing of collagen in mineralized and non-mineralized tissues, Biochem. Biophys. Res. Commun. **46**: 1368, 1972.

21) Mechanic, G., Gallop, P.M. & Tanzer, M.L.: The nature of crosslinking in collagen from mineralized tissues, Biochem. Biophys. Res. Commun. **45**: 644, 1971.

Abstract

Aging of Bone**—Collagen in the senile osteoporotic bone—**

Yasufumi Hayashi, M. D., Hiroshi Takizawa, M. D.,
Mitsuo Igarashi, M. D.* & Mikio Matsuura, M. D.**

Although there are many investigations of the inorganic matter of bone from senile osteoporosis, the relation between bone collagen and osteoporosis is not obscure yet. To investigate these problems, previously we reported that the number of lysyl residues from skin collagen of normal rat depended on its solubility. The lowering of solubility is explained by the decrease of collagen crosslinks. There are several forms of crosslinks in collagen. Allylsine and hydroxyallylsine which are the δ -aldehydes formed following enzymatic oxidative deamination of the ϵ -amino groups of peptide bound lysine and hydroxylysine are the precursors of collagen crosslinks. Their basic linkages are aldimine bond, reduced aldimine bond and aldol condensation product. However, reduced aldimine bond and aldol condensation product can not be hydrolyzed to produce any lysine or hydroxylysine molecules. As the number of collagen crosslinks increase, so we have the probability to get less lysyl or hydroxylysyl residues in the hydrolysate of collagen. On these knowledge, we explained the lowering of collagen solubility by the decrease of these residues.

The relation of bone collagen crosslinks to osteoporosis is not elucidated well. Thus the question of collagen structure related to crosslinks has led us to search for it at the amount of lysyl and hydroxylysyl residues of

collagen from bone. At first we reported the lysyl and hydroxylysyl residues in the rat bone collagen of experimental osteoporosis by low calcium diet. For the lysine determination, a microdiffusion method in the Conway vessel was devised by using purified L-lysine decarboxylase. Hydroxylysine was determined by the method of Blumenkrantz-Prockop. The lysyl residues increase parallel to the increase of the grade of experimental osteoporosis, but the hydroxylysyl residues have no difference between normal group and experimental osteoporosis groups. This result shows the decrease of crosslinks of bone collagen with experimental osteoporosis.

Now we proceed to the next problem of human senile osteoporosis. Specimens of cortices of femurs from marked senile osteoporosis, the age 69 to 80 years, 5 females were obtained during surgical treatments. Cortices of normal femurs were collected by the same way, the age 18 to 49 years, 4 males and 1 females. The lysyl residues increase in the senile osteoporotic bone collagen, but the hydroxylysyl residues are not statistically different between them. The number of lysyl residues from insoluble collagen of osteoporotic bone are larger than that of normal bone. This result suggests the decrease of bone collagen crosslinks with osteoporotic change.

*

*

*

* Department of Orthopaedic Surgery, Tokyo Metropolitan Geriatrics Hospital, Sakae-cho, 35-2, Itabashi-ku, Tokyo

**Department of Clinical Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology