Vitamin D 大量投与で発生するラット骨 萎縮性病変に対する EHDP の影響

福岡県立粕屋新光園

川 村 秀 哉

九州大学医学部整形外科

江 口 正 雄・柴 田 堅一郎

和 田 文 夫・島 内 卓

塩 田 悦 仁・高 杉 紳一郎

高 村 和 幸・白 石 浩 一

渡 辺 浩 一

Effect of EHDP(Ethane-1-Hydroxy-1, 1-Diphosphonate) on Osteopenia of Hypervitaminosis D in rats

by

Hideya Kawamura*, Masao Eguchi, Kenichiro Shibata,
Fumio Wada, Takashi Shimauchi, Etsuji Shiota,
Shinichiro Takasugi, Kazuyuki Takamura,
Kooichi Shiraishi, and Kooichi Watanabe

Department of Orthopedics, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka, Japan.

* Shinko-en Handicapped Children's Hospital, Fukuoka, Japan.

Everybody knows the fact that hypervitaminosis D rats have osteopenia of diaphysis and osteopetrosis of metaphysis in the long bones. This osteopenia has been attributed to the activation of osteoclasts by vitamin D. Now we investigated the effect of EHDP on osteopenia which was induced by high doses of parent vitamin D₃ (Cholecalciferol). EHDP prevented the absorption of osteoclasts and gave the osteopenia improvement. These phenomena were proved by soft-Xray films, microdensitometry method and histology.

はじめに

ビタミンDの骨軟骨代謝に及ぼす影響については、近年、その生体内での代謝をはじめとして詳細に検討されてきている。従来より、実験的に大量のビタミンDを投与することによって、骨幹部での骨吸収と骨幹端部での骨硬化を発生させ得ることは、よく知られた事実であるが¹⁾、その詳細については不明な点も多い。現在ではこの現象は、生体内で活性化されたビタミンDが小腸でのカルシウムとリン酸の吸収を高めると共に、骨組織における骨塩の溶出を促進させて、血清のカルシウムとリン酸のイオン積を高め、これによ

って更に二次的に、あるいは直接的に骨の石灰化や骨形成を亢進させる為であると考えられている²⁾。

今回、parent Vitamin D₃である Cholecalciferol を大量に投与することによって発生するラット骨病変、特に、骨幹部の骨萎縮性病変に対して、骨吸収抑制作用と石灰化障害作用という2面の効果を有するEHDPを投与して、これがいかなる影響を及ぼすかを検討した。

実験材料と方法

生後4週令の Fisher 344 雌ラット (体重60~70g) 45頭を用い、日本クレア CE-2 固型飼料 (Ca

1.16%, P0.96%, ビタミンD 2,000 IU/kg) にて飼育した。食餌及び水は自由に摂取させた。(九州大学医学部動物実験施設SPF)

このラットを対照群, D群, EHDP 併用群に大別した。対照群は無処置とした。D群には propylene glycol に溶解した Cholecalciferol (以下Dと略す) を 10^5 又は 1.5×10^5 IU/kg (2.5 又は 3.75 mg/kg) 連日皮下投与した。EHDP 併用群には上記D投与と同時に、生食に溶解した EHDP (Ethane-1-Hydroxy-1, 1-Diphosphonate) を 5 又は 10, 30 mg/kg 連日併用投与した。

実験期間は2週間とし、全例15日目に脱血屠殺して下肢肢骨を採取し、Softex レントゲン撮影, Microdensitometry (MD), 光顕組織等により比較検討した。

結 果

実験開始日及び1週目、2週目にラット体重を測定した。1週平均、対照群では 22.5 g の体重増加を示したのに対し、D 10^5 IU/Kg 投与群では -7.7 g, D 1.5×10^5 IU/kg 投与群では -8.0 g と体重減少を示した。これに対し、EHDP 併用群では表1のごとく、Dによる体重減少を抑制する傾向があることが認められた。

表1

図1に D 1.5×10^5 IU/kg 投与群及び EHDP 併用群の脛骨 Softex 像を示した。D群では骨幹部の骨梁や骨皮質密度の減少などの強い骨萎縮像が認められた。また、骨幹端部においては棍棒状変形や骨硬化像が認められた。これに対し、EHDP 併用群では、骨幹部骨梁の残存、骨皮質の温存の傾向が、EHDP の用量に応じて惹起されているのが認められた (図1)。以

図1 脛骨 Softex 撮影: Vitamin D の大量投与により、骨幹部皮質密度や骨梁の減少等の著しい骨萎縮が発生している。これに対し、EHDP の併用投与により、その用量に応じて、骨萎縮の発生が阻害されている。

A. 対 照 群

C. V. D.+EHDP 5 mg/kg 投与群

E. V. D.+EHDP 30 mg/kg 投与群

B. Vitamin D 1.5×10^5 IU/kg 投与群

D. V. D.+EHDP 10 mg/kg 投与群

表2 Bone Mineral Contents in Tibia Diaphysis by Microdensitometry Method

Group	BMC(μ AL)	%BMC
Control	751.7 $\pm$ 27.6	128.5
Vit. D ₃ 1.5 $\times$ 10 ⁵ IU/kg	584.7 $\pm$ 35.4 [#]	100.0
V.D.+EHDP 5 mg/kg	679.6 $\pm$ 19.9 [*]	116.2
" 10	723.8 $\pm$ 13.6 [*]	123.7
" 30	718.9 $\pm$ 26.3 [*]	122.9

BMC (Bone Mineral Contents) = $\sum$ GS/D
data presented "mean $\pm$ SD" N=5

[#] P<0.01 v.s. Control

^{*} P<0.01 v.s. V.D 1.5 $\times$ 10⁵ IU/kg

上の結果はD 10⁵ IU/kg 投与群においても、また、大腿骨々幹部においても同様に認められた。

次に、Microdensitometry (MD) 法を用いて、D 1.5 $\times$ 10⁵ IU/g 投与群及び EHDP 併用群における脛骨々幹部中央の Bone Mineral Contents (BMC) を測定した(表2)。対照群に比し、D群では BMC は著しく低下し、骨萎縮が示唆された。一方、EHDP 併用群では、BMC は EHDP の用量に応じて上昇の傾向を示し、D群に比し、有意に上昇し、レ線上の EHDP による骨吸収抑制作用が確認された。この傾向は大腿骨々幹部中央における BMC の測定結果でも認められた。

図2に、D 1.5 $\times$ 10⁵ IU/kg 投与群及び EHDP 併用群の脛骨々幹部中央の骨皮質の光顕所見を示した。

対照群では、健全な骨組織と内部の血管腔等が観察されたが、これに比べて、D群では、骨皮質での吸収腔の領域が著しく拡大して、健全な骨組織が減少し、エオジンに濃染した類骨の堆積が広範囲で観察された。吸収腔は著しく大きく不整で、その内壁には多数の破骨細胞や骨芽細胞が観察された。一方、EHDP 併用群においては、その用量に応じて吸収腔のしめる面積は減少し、健全な骨組織が温存されていた。D群とEHDP 併用群では、堆積した類骨の量に関しては差が認められなかったが、吸収腔内の破骨細胞の数は、D群に比べて EHDP 併用群では減少の傾向を示していた。

考 察

Diphosphonate の代表的な薬剤である EHDP には、その基本的な生理作用として、in vitro における Hydroxyapatite の形成及び溶解の阻害、また、in vitro における骨吸収抑制や石灰化障害作用などがある⁹⁾。in vitro の実験においては、EHDP は少量投与では骨吸収抑制作用を、大量投与では石灰化障害作用を示し⁸⁾、我々は従来より、この薬剤を用いて種々の実験モデルを作成し、主として、ビタミンDやカルシトニンの作用を検討してきた³⁾⁵⁾。

今回はビタミンDの骨吸収亢進作用に注目し、これに及ぼす EHDP の影響を検討した。parent Vitamin D である Cholecalciferol は、7-dehydro-

図2 脛骨々幹部中央の皮質骨、塩化シアヌル固定後脱灰 EH染色 $\times$ 50: 対照群ではエオジンに濃染した類骨には乏しいが、Vitamin D 群では、多量の類骨が堆積し、吸収腔のしめる領域が拡大し、健全な骨組織が著しく減少している。EHDP の併用投与により、吸収腔領域の減少、健全な骨組織の温存が観察される。

A. 対 照 群

B. Vitamin D 1.5 $\times$ 10⁵ IU/kg 投与群

C. V. D+EHDP 5 mg/kg 投与群

D. V. D+EHDP 10 mg/kg 投与群

E. V. D+EHDP 30 mg/kg 投与群

cholesterol より紫外線照射にて体内で形成されると共に、食物より摂取されて、肝・腎にて $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ や $24, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 等に活性化され、その効果を発揮するとされている⁷⁾。その骨形成に及ぼす効果の機序については、詳細は今だに不明であるが、破骨細胞を賦活化して骨幹部等より骨吸収を亢進させ、血清のカルシウム値を高める作用については異論はないと思われる⁸⁾。

今回の実験により、ビタミンDによる骨吸収亢進の病態に対し、EHDP の併用により、その用量に応じて骨吸収を阻害することが判明した。この作用機序としては、第1に、EHDP の Hydroxyapatite に対する直接的な物理化学的作用が考えられる、しかし、大量の EHDP の投与により、腸管からのカルシウムの吸収が低下したり、ビタミンDの代謝にも影響を及ぼすことも報告されている^{11, 12)}。また、更に、Bone Cell に対する効果についての詳細は不明であり、これらを介しての機序については明らかでない。従って、更に、これらの機序に関する検討が今後の研究課題と考えられた。

結 論

ビタミンD大量投与により、ラット骨幹部に、吸収腔の拡大や類骨の堆積による骨皮質密度の減少及び骨梁の減少等の著しい骨萎縮性病変が発生した。

この病変に対し、EHDP を同時併用投与することによって、骨萎縮性病変の発生が阻害された。そして、その吸収抑制作用は、EHDP の容量に応じて強まっていた。

参 考 文 献

- 1) Baxter, L. A. et al.: Inhibition of vitamin D metabolism by ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate. Arch. Biochem. Biophys. 164: 655-662, 1974.
- 2) Baxter, L. A. et al.: Effect of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate and vitamin D on bone mineralization. Calcif. Tiss. Int. 28: 73-78, 1979.
- 3) 江口正雄・他: Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) による骨軟骨石灰化障害に関する実験的研究—EHDP 大量投与ラットに発

生する骨軟骨石灰化障害におよぼす活性型ビタミンDの影響—。整形外科基礎科学 8: 353-361, 1981.

- 4) Ham, A. W. and Lewis, M. D.: Hypervitaminosis D Rickets—The Action of Vitamin D, Bri. J. Exp. Patho. 15, 228-234, 1934.
- 5) 川村秀哉・他: EHDP 大量投与で発生する石灰化障害に対するエルカトニンの石灰化促進作用—実験的異所性骨形成モデルにおける検討—。整形外科基礎科学, 11: 195-198, 1984.
- 6) Schenk, R. et al.: Effect of Ethane-1-Hydroxy-1, 1, -Diphosphonate (EHDP) and Dichloromethylene Diphosphonate ($\text{Cl}_2\text{-MDP}$) on the Calcification and Resorption of Cartilage and Bone in the Tibial Epiphysis and Metaphysis of Rats, Calc. Tiss. Res. 11, 195-214, 1973.
- 7) Shepard, R. M. and DeJuca, H. F.: Plasma Concentrations of Vitamin D_3 and its Metabolites in the Rat as Influenced by Vitamin D_3 or 25-Hydroxyvitamin D_3 Intakes, Arch. Biochem. and Biophys. 202, 43-53, 1980.
- 8) 塩田悦仁・他: Diphosphonate による骨・軟骨石灰化障害及び骨吸収障害に関する実験的研究—Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) 及び Dichloromethylene Diphosphonate ($\text{Cl}_2\text{-MDP}$) 投与によるラット骨、軟骨変化のX線学的及び光顕組織学的検討—。整形外科と災害外科, 30, 175-179, 1981.
- 9) Urist, M. R.: Fundamental and Clinical Bone Physiology, Lippincott, Philadelphia 1980.

質 問

Vitamin D 大量投与で類骨も観察されたとの事ですが、これは骨芽細胞性活動がどのような状態だったのでしょうか。

解 答

柏屋新光園 川村 秀哉

Vitamin D 大量投与によるラット骨皮質の萎縮性病変における変化で、破骨細胞による骨吸収と共に、骨芽細胞による骨形成も十分に認められました。しかし、今回の実験系では、V.D による吸収作用が有意に観察されました。