

高齢ラットにおける骨中ミネラルが雌で高値をとる？

－肥満ラット：Minko ratに関する研究(17)－

武田 隆 司^{1,2)}, 中村 孝 志¹⁾, 石田 円 香²⁾,
今 西 雅 代²⁾, 武田 隆 久²⁾, 木 村 美 恵 子²⁾

(¹⁾京都大学大学院医学研究科筋・骨格系病態学*,

²⁾タケダライフサイエンスリサーチセンター・疾病予防センター**)

Are magnesium and calcium concentrations in bone of female rats higher than that in male rats? – A study on Spontaneously Obese Rat (Minko Rat) with abnormal lipid metabolism (17) –

Ryuji TAKEDA^{1,2)}, Takashi NAKAMURA¹⁾, Madoka ISHIDA²⁾,
Masayo IMANISHI²⁾, Takahisa TAKEDA²⁾, Mieko KIMURA²⁾

¹⁾Graduate School of Medicine, Kyoto University, ²⁾Takeda Research Institute of Life Science

Summary

Osteoporosis is a major public health problem also in Japan. Although bone densitometry is often used as an indicator to evaluate bone fragility, bone mineral density isn't always reflexed bone strength. There are well known many factors affected bone strength. In this paper, the relationship between strength and mineral concentration in bone of spontaneously obese male and female rats (39 weeks old) named "Minko Rat" with abnormal lipid metabolism is studied. Mechanical study in bone indicated that the stiffness of male rats was significantly high compared to that of female rats. On the other hand, Mg, Ca, P, Na, Zn, Sr and Fe concentrations in male rats were significantly low compared to that of female rats, S and K concentrations in male rats were significantly high compared to that of female rats. These results suggested that bone strength isn't depending on only mineral concentrations such as Ca, Mg and P and sex-related variation in elemental concentrations of rats bone was found.

今日、高齢化社会を迎え、“元気で長生き”，“quality of life”に人々の大きな関心が寄せられている。この“quality of life”を妨げる因子のひとつとして、加齢による骨の老化や骨折があげられる。健康な骨の維持・増進や骨粗鬆症など骨老化の予防、診断の精度の高い知見が不足している¹⁾。骨の老化・栄養状態の診断方法として、一般的には骨密度測定が広く行われているが、骨中カルシウムを中心としたミネラル量を示す骨密度の高低のみで、骨の強さ、骨折の危険性が判断できない場合もあることが報告^{2),3)}されている。そして、年齢、性別、遺伝、栄養、運動など多方面から骨の老化について検討されている⁴⁾。

今回、高齢の遺伝的肥満・脂質代謝異常をともなうラット“Minko Rat”^{*}の大腿骨折り曲げ試験による骨強度測定を実施し、同時に骨中カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg) などをはじめとする種々のミネラルを分析、骨強度、骨中ミネラル濃度及びその雌雄差について検討を行った。

^{*}今回、実験に用いたラットは、1992年 Wistar 系雄ラットを用いた栄養実験中、体格の非常に大きいラットを見出し、

*所在地：京都市左京区吉田近衛町 (〒606-8501)

**所在地：京都市下京区中堂寺南町134 (〒600-8813)

Minkoラットと命名し、現在まで継代飼育している31代のラットである。本Minkoラットは、高体重、高中性脂肪・高コレステロール血症、腹腔内への高度の脂肪蓄積などの脂質代謝異常を特色としている。

実験方法

3週齢のWistar系由来Minkoラット雌雄に、市販の固形飼料MF（オリエンタル酵母社製）、水道水を自由摂取させ、39週齢になるまで、23～25℃の室温下でステンレス製の個別ケージにて飼育した。飼育期間終了後、一晩絶食の後、ネンプター麻酔下にて、腹部大動脈から採血し、失血死後、大腿骨、脛骨をはじめとする各種組織を摘出した。骨強度（Stiffness値）の測定には大腿骨の折り曲げ試験による骨強度試験を骨強度試験機（TK-252C室町機械社製）にて行った。脛骨はマイクロウェーブサンプル分解装置（MULTIWAVE Perkin Elmer社製）を用い、硝酸にて湿式灰化し、カルシウム（Ca）、リン（P）、硫黄（S）、ナトリウム（Na）、マグネシウム（Mg）、カリウム（K）、亜鉛（Zn）、ストロンチウム（Sr）、鉄（Fe）濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES Perkin Elmer社製）にて測定した。データの2群間の比較には、危険率5%でStudentのt検定を用いた。

実験結果

ラット飼育期間中の体重変化を図1に示す。5週齢までは雌雄間の体重に有意の相違はみられなかったが、その後は雄の体重が雌に比較し有意の高値をとり、39週齢では、雌の約2倍（204%）の体重を示した。

表1に大腿骨重量、長さ、大腿骨折り曲げ試験による骨強度測定の結果を示す。大腿骨重量、大腿骨長、骨強度パラメーターStiffness値は雌に比較し、雄が有意の高値を示した。大腿骨の重さの相違は、長さの相違よりも大きく、雄は雌の114%の長さを示したのに対し、その重量は雌の167%であった。骨強度パラメーターStiffness値は、雄では雌の132%の値を示し、その相違は体重が2倍もの相違を示したのに比較すると小であった。

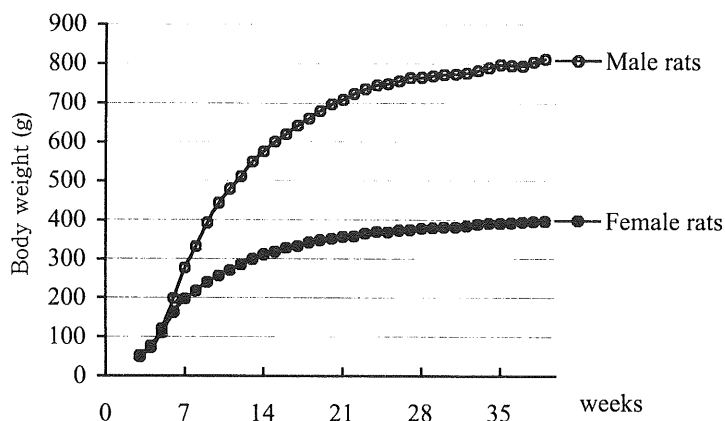


Fig. 1 Growth Curve.

Date are mean. Body weight showed significantly higher levels in male Minko rats than in female Minko rats at 6 weeks after birth.

Table 1 Bone parameters of female and male Minko rats

	Female rats	Male rats
Femur weight (g)	1.12 ± 0.016	1.87 ± 0.026 * ↑
Femur length (cm)	3.69 ± 0.028	4.22 ± 0.028 * ↑
Stiffness (N/mm)	329 ± 21.6	434 ± 26.0 * ↑

Data are mean ± SE (n=10-13)

*; P < 0.01 vs. female Minko rats.

表2に脛骨中各種ミネラル濃度の測定結果を示す。雄ラットは雌に比較し、Ca, P, Na, Mg, Zn, Sr, Fe濃度の有意の低値, S, K濃度は有意の高値を示した。

Stiffness値と脛骨中各種ミネラル濃度の相関関係を表3, 4に示す。雌ではStiffness値とZn ($p=0.038$), CaとP ($p<0.001$), CaとMg ($p<0.001$), CaとNa ($p<0.001$), PとMg ($p<0.001$), PとNa ($p=0.003$), MgとNa ($p<0.001$),

Table 2 Mineral concentrations in tibia of female and male Minko rats

		Female rats	Male rats	
Ca	(mg/g)	200 ± 2.2	190 ± 0.9	** ↓
P	(mg/g)	95.7 ± 0.90	92.2 ± 0.48	** ↓
Na	(mg/g)	4.83 ± 0.047	4.70 ± 0.026	* ↓
S	(mg/g)	3.92 ± 0.056	4.07 ± 0.021	* ↑
Mg	(mg/g)	3.40 ± 0.029	3.21 ± 0.020	** ↓
K	(mg/g)	0.82 ± 0.009	0.97 ± 0.006	** ↑
Zn	(μg/g)	118 ± 1.7	105 ± 1.1	** ↓
Sr	(μg/g)	98.1 ± 0.86	89.7 ± 0.93	** ↓
Fe	(μg/g)	36.0 ± 0.99	30.5 ± 1.60	* ↓

Data are mean ± SE (n=8-11)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. female Minko rats.

Table 3 Correlation coefficients between bone parameters and mineral concentrations of female Minko rats

	Ca	P	Mg	Na	Zu	Fe	S	K	Sr	Stiffness	Tibia weight	Femur weight
Ca	1											
P	0.952**	1										
Mg	0.986**	0.946**	1									
Na	0.958**	0.895**	0.964**	1								
Zu	0.223	0.275	0.174	0.094	1							
Fe	-0.123	-0.051	-0.240	-0.313	0.401	1						
S	-0.441	-0.231	-0.336	-0.421	-0.122	-0.060	1					
K	-0.704	-0.633	-0.607	-0.549	-0.555	-0.409	0.718*	1				
Sr	0.462	0.347	0.544	0.599	0.251	-0.572	-0.127	-0.119	1			
Stiffness	0.187	0.285	0.234	0.191	0.733*	0.099	0.309	-0.161	0.582	1		
Tibia weight	-0.571	-0.508	-0.483	-0.604	0.081	0.053	0.774*	0.576	0.010	0.351	1	
Femur weight	-0.594	-0.629	-0.541	-0.682	-0.195	0.170	0.422	0.384	-0.251	-0.101	0.788*	1

n = 8, *: statistically significant at the $p < 0.05$ level, **: statistically significant at the $p < 0.01$, level.

Table 4 Correlation coefficients between bone parameters and mineral concentrations in tibia of male Minko rats

	Ca	P	Mg	Na	Zu	Fe	S	K	Sr	Stiffness	Tibia weight	Femur weight
Ca	1											
P	0.668*	1										
Mg	0.916**	0.724*	1									
Na	0.847**	0.295	0.814**	1								
Zu	-0.389	-0.234	-0.544	-0.468	1							
Fe	-0.307	0.020	-0.242	-0.439	0.060	1						
S	0.597	0.758**	0.560	0.327	-0.324	0.054	1					
K	-0.325	-0.140	-0.326	-0.145	-0.008	0.479	0.097	1				
Sr	0.513	0.794**	0.479	0.098	-0.265	-0.156	0.580	-0.236	1			
Stiffness	0.242	-0.195	0.089	0.232	0.310	-0.263	-0.307	-0.597	-0.304	1		
Tibia weight	0.297	0.183	0.208	0.214	-0.265	0.173	0.132	0.161	0.183	0.177	1	
Femur weight	0.432	0.426	0.457	0.430	-0.421	0.155	0.265	0.455	0.347	-0.258	0.723*	1

n = 11, *: statistically significant at the $p < 0.05$ level, **: statistically significant at the $p < 0.01$, level.

SとK ($p=0.045$) 間に有意の正の相関関係が認められ、雄ではCaとP ($p=0.025$), CaとMg ($p<0.001$), CaとNa ($p=0.001$), PとMg ($p=0.012$), PとS ($p=0.007$), PとSr ($p=0.004$), MgとNa ($p=0.002$) 間に有意の正の相関関係が認められた。

考 察

骨強度 (Stiffness値) は雌に比較し雄が高値をとったが、骨の強さの指標として汎用されている骨密度¹⁾の原点である骨の主要構成元素Ca, P濃度は雌が雄よりも高値を示し、多くの元素も雌が雄に比較して高値を示したことは、骨の強さは骨中Ca, Pを中心としたミネラル濃度が高いという概念を覆す新しい知見であると考えられる。また、骨中ミネラルとStiffness値との相関関係をみると、正の相関関係が認められたのは今回測定した元素では雌のZn濃度のみであり、CaやP濃度との間には有意の相関関係は認められず、骨強度値の高い雄の骨中主要ミネラルが低値であったことの裏付けであろう。また、我々は、幼若雄ラットを用いた実験で、Caの多量摂取 (標準量の2倍, 5倍, 10倍) が血液や、脛骨中のCa濃度の上昇にはつながらず、血中および、脛骨中Mg濃度の有意の低下をきたし、骨の脆化を招くことを報告した⁵⁾。そして、多くの疫学調査においても、必ずしもCa摂取量と骨量の関係は一致した結果が得られておらず⁶⁾、より多いCaの摂取が骨折の危険性を直ちに低減させるわけではないことが報告されている^{7), 8)}。また、骨粗鬆症患者と健常者の腸骨皮質骨中のNa, K, Mg, 銅 (Cu), Zn, Fe, Sr, アルミニウム (Al), ホウ素 (B), ケイ素 (Si) 濃度を測定した結果、これらミネラル濃度に骨粗鬆症患者と健常者間に有意の相違は認められず、骨粗鬆症患者の骨密度の低下はこれらミネラル濃度の検出可能な変化ではないことが報告されている⁹⁾。今回の実験においても、雌に比較し骨強度の高い雄で骨中Ca濃度が低いという結果が得られ、Ca濃度のみが骨の強度を規定しているのではないことが確認され、脛骨中P, Na, Mg, Zn, Sr, Fe濃度も雄が低値を示し、骨強度はこれらのミネラル濃度のみで規定されるのではないことが改めて示唆された。そして、骨密度検査の結果のみで、骨健康を評価している現状に問題を投げかけるものである。

また、骨と関連深いビタミンのひとつであるビタミンK^{10), 11)}について、ビタミンKの投与によりCaの尿中排泄が減少することなどの報告¹²⁾や、*in vitro*の実験でPTHによる骨吸収をビタミンK₂が抑制するとの報告¹³⁾などがみられるが、我々はラット血漿中VK1, MK-4が雄に比較し、雌で高値をとることを確認している¹⁴⁾。多くのミネラルで雌が高濃度を示したのはビタミンK動態との何らかの関連も示唆される。また、エストロゲンは軟組織や骨へのMgの取り込みを増強することも報告されており¹⁵⁾、ビタミン、ホルモンなど多くの因子が骨中ミネラル濃度の雌雄による相違に影響していることが改めて推察される。今回、遺伝的高脂血症をもつラットを用いて実験を行ったが、高脂血症治療薬のスタチンが骨粗鬆症の治療にも有効であるなど¹⁶⁾脂質代謝と骨代謝の関連も報告されてきており、今後さらに検討が必要である。

文 献

- 1) Orimo, H., Hashimoto, T., Sakata, K., Yoshimura, N., Suzuki, T., Hosoi, T. (2000) *J. Bone Miner. Metab.* 18: 126.
- 2) Kains, J. A., McCloskey, E. V., de Takats, D., Pande, K. (1999) *Osteoporos Int.* 9 (suppl 2): S24.
- 3) Rosen, C. J. (1998) *Lancet* 351: 927.
- 4) Suzuki, T. (2001) *J. Bone Miner. Metab.* 19: 133.
- 5) Kimura, M. (1997) Growth check and magnesium imbalance on young rats by over intakes of calcium. in *Current Status and New Developments*, ed. by Theophanides, T. and Anastassopoulou, J., Kluwer Academic Publishers: pp.151 - 168.
- 6) Cumming, R. G. (1990) *Calcif. Tissue Int.* 47: 194.
- 7) Cooper, C., Barker, D. J. P., Wickham, C. (1988) *B. M. J.* 297: 1443.
- 8) Wickham, C. A. C., Walsh, K., Cooper, C., Barker, D. J. P., Margetts, B. M., Morris, J., Bruce, S. A. (1989) *Br. Med.*

J 299: 889.

- 9) Basle, M. F., Mauras, Y., Audran, M., Clochon, P., Rebel, A., Allain, P. (1990) *J. Bone Miner. Res.* 5: 41.
- 10) Bouckaert, J. H., Said, A. H. (1960) *Nature* 185: 849.
- 11) Binkley, N. C., Suttie, J. W., (1995) *J. Nutr.* 125: 1812.
- 12) Knapen, M. H., Jie, K. S., Hamulyak, K., Vermeer, C., (1993) *Calcif. Tissue Int.* 53: 81.
- 13) 秋山康博, 原久仁子, 田島鉄弥 (1995) *薬理と治療* 23: 217.
- 14) 武田厚子, 平池秀和, 初田直樹, 上野菜採, 今西雅代, 武田隆司, 武田隆久, 玉井浩, 木村美恵子 (2002) *微量元素研究* 19: 67.
- 15) Seelig, M. S. (1993) *J. Am. Coll. Nutr.* 12: 442.
- 16) Mundy, G., Garrett, R., Harris, S., Chan, J., Chen, D., Rosseni, G., Boyce, B., Zhao, M., Gutierrez, G. (1999) *Science* 286: 1946.