

発表番号 54 (0523)

骨粗鬆症危険因子である低マグネシウム状態が骨塩ミネラルに及ぼす影響

網塚 憲生 (新潟大学超域研究機構)

骨基質は他の組織とは異なり石灰化された基質であり、石灰化の構成元素、結晶構造、結晶塊の配列、コラーゲン線維との微細関連などは骨基質の性状を左右する。また近年、「骨質」が注目を浴びてきている。骨質の規定要因として、骨代謝回転、骨基質の性状、マイクロダメージの蓄積、海綿骨・皮質骨の高次構築の4つの項目をあげることができ、その中でも「骨基質の性状」は骨質の重要な要因の一つと考えられる。一方で、低マグネシウム(Mg)飼料飼育ラットの骨は骨密度の上昇を示すにもかかわらず、力学強度が低下することが報告されている(小林ら Bone 35: 1136, 2004)。そこで、本研究において、生後4週雄性 Wistar 系ラットを用いてコントロール群(0.5% Ca・0.09% Mg 含有精製飼料)、低 Mg 飼育群(低 Mg 群: 0.5% Ca・0.006% Mg 含有精製飼料)を作製し、4週後の大腿骨と脛骨をアルカリ性ホスファターゼ(ALP)、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)組織化学、電子顕微鏡観察、electron probe microanalyzer(EMPA)、X線回折などの骨組織化学・元素分析的に解析を行った。その結果、低 Mg 群の骨幹端骨梁には波状縁を発達させた多数の破骨細胞が観察されたこと、ならびに皮質骨では多数のセメントラインを観察したことから、低 Mg

環境における骨吸収と骨改造の亢進が推測された。このような骨改造の亢進は骨強度の低下につながると思われる。次に、骨基質において EMPA にて元素マッピングを行うと、低 Mg 群の骨基質内における Mg の著しい減少と、それに伴ったカルシウム(Ca)値の上昇が認められた。さらにX線回折では、コントロール群では様々なアパタイト結晶が混在しているのに対して、低 Mg 群では合成型ハイドロキシアパタイト[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]のピークパターンに近い解析像を示した。電子顕微鏡観察すると、コントロール群では基質小胞・石灰化球の形成を介してコラーゲン線維が石灰化を受けるのに対して、低 Mg 群では、基質小胞性石灰化を介すことなく早期のコラーゲン性石灰化ならびにコラーゲン線維の崩壊を観察した。このように、低 Mg 群では、骨基質の Ca の上昇を誘導し石灰化度の高い合成型ハイドロキシアパタイトに置換しているため骨密度の上昇を招いたと考えられる。しかしながら一方で、コラーゲン線維の早期石灰化・早期崩壊は骨強度の低下を誘導してしまうと推測された。以上のことから、生理学的状況において、Mg は骨代謝回転および骨基質の石灰化の二つの作用点において骨基質の性状を維持していると考えられた。

助成番号 0523

骨粗鬆症危険因子である低マグネシウム状態が骨塩ミネラルに及ぼす影響

網塚 憲生 (新潟大学超域研究機構)

【要約】

低マグネシウム(Mg)飼料飼育ラットの骨は骨密度の上昇を示すにもかかわらず、力学強度が低下することが報告されている(小林ら Bone 35: 1136, 2004)。そこで、生後4週雄性 Wistar 系ラットを用いてコントロール群、低 Mg 飼育群(低 Mg 群)を作製し、4週後の大腿骨と脛骨の骨改造ならびに石灰化ミネラルについて検索した。その結果、低 Mg 群の骨幹端骨梁には波状縁を発達させた多数の破骨細胞が観察されたこと、ならびに皮質骨では多数のセメントラインの形成を観察したことから、低 Mg 環境において骨吸収と骨改造の亢進が示唆された。次に、electron probe microanalyzer にて元素マッピングを行うと、低 Mg 群の骨基質内における Mg の著しい減少と、それに伴ったカルシウム(Ca)値の上昇が認められた。さらに X 線回折では、合成型のハイドロキシアパタイト $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ のピークパターンに近い解析像を示した。電子顕微鏡観察すると、低 Mg 群では、基質小胞性石灰化を介することなく早期のコラーゲン性石灰化ならびにコラーゲン線維の崩壊を観察した。以上のことから、低 Mg 環境では、骨基質の Ca の上昇を誘導し石灰化度の高い合成型ハイドロキシアパタイトに置換しているため骨密度の上昇を招いたと考えられる。一方で、コラーゲン線維の早期石灰化・早期崩壊が骨強度の低下につながると推測された。

【緒言】

骨組織は人体の中でも細胞外基質が最も発達した組織であり、骨基質の性状・量・立体的構築などが「骨の丈夫さ」を規定するといっても過言ではない。近年、骨の量ばかりでなく、いかに質の良い骨を増やしてゆかといった「骨質」が注目を浴びてきている。「骨質」は、①骨代謝回転、②骨基質の性状、③マイクロダメージの蓄積、④海綿骨・皮質骨の高次構築の4つの観点から考察することができ¹⁾、その中でも「骨基質の性状」は骨質の重要な要因の一つと考えられる。また、骨基質は他の組織とは異なり石灰化された基質であり、石灰化の構成元素、結晶構造、結晶塊の配列、コラーゲン線維との微細関連などは「骨基質の性状」の大きな要素となる。

骨基質の石灰化ミネラルは、カルシウム(Ca)、リン酸(PO_4)が最も多いが、その他、マグネシウム(Mg)、ナトリウム(Na)、フッ素(F)、亜鉛、鉄などの微量元素も多く含まれる。特にマグネシウムは体内分布の半分以上が骨基質に取り込まれており、もはや微量元素とは考えにくい。そこで、低マグネシウム飼料飼育したラットの骨密度と骨強度を測定してみると、骨密度は減少していないにもかかわらず骨強度の低下が認められる、という興味深い結果が得られている²⁾。このことから、骨強度は石灰化度のみによっているのではなく、石灰化の構成元素、結晶構造、結晶塊の配列、コラーゲン線維との微細関連が影響を及ぼす可能性を示唆している。

骨基質における石灰化のメカニズムとしては、骨芽細

胞から分泌された基質小胞によって石灰化が開始されると考えられている。骨芽細胞の直下の類骨層から石灰化前線に至るまで、①基質小胞内でのハイドロキシアパタイト結晶 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ の析出、②石灰化球の形成、③コラーゲン性石灰化、といった広範な石灰化基質の一連の過程を観察することができる³⁾。石灰化骨基質を構成するハイドロキシアパタイトはほぼ $100\sim 200\text{Å} \times 50\text{Å} \times 50\text{Å}$ の大きさを有する。この結晶は純粋なハイドロキシアパタイトのみの結晶として存在しているのではなく、その結晶周囲には種々のイオンが存在しており、さらにその周りには水和層と呼ばれる層がある。すなわち、アパタイト結晶には結晶内部、結晶表面(イオン吸着層)、水和層の3層が認められる。そのため、Mg イオンと Na イオンは Ca イオンの位置で置換されうるし、F イオンや塩素イオンは水酸基の位置で置換する⁴⁾。これらイオンの役割として、F イオンの置換は微結晶の成長の溶解を、また、Mg イオンの置換は微結晶の成長を抑制することが示唆されている。このように、ハイドロキシアパタイト結晶は、リン酸とカルシウムの単純な結晶格子の状態ではなく、結晶格子の多次元的な構造とこのようなイオンの置換を絶えず受ける状態にあると考えてよい。

そこで我々は、コントロールラットおよび低マグネシウム飼育ラットにおける大腿骨・脛骨の組織化学、電子顕微鏡観察を行うと共に、その微細変化を骨基質の石灰化構造の観点から検索するために、EPMA(electron probe microanalyzer)、X 線回折などにより石灰化骨基質の解

析を行った。

【材料と方法】

生後4週齢の雄性 Wistar 系ラットを通常飼料飼育群 (コントロール群: 0.5% Ca・0.09% Mg 含有精製飼料)、低マグネシウム飼育ラット (低 Mg 群: 0.5% Ca・0.006% Mg 含有精製飼料) の2群にわけて、4週間飼育した。これらラットを 4% paraformaldehyde 溶液にて左心室から灌流固定を施し、右側の大腿骨および脛骨を採取し同固定液にて12時間浸漬した。脛骨は 10% EDTA 溶液にて脱灰後、上昇エタノール系列にて脱水し、パラフィン包埋した。パラフィン切片は、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 免疫染色⁵⁾、およびアゾ色素法による酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 組織化学⁶⁾ に用いられた。一方、大腿骨は 2.5% glutaraldehyde + 2% paraformaldehyde 溶液にて 12 時間浸漬固定し、長軸方向に半切した。その半切試料を 4.13% EDTA にて脱灰後、1.5% フェロシアン化カリウムを含む 1% OsO₄ にて後固定し、アセトン脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。また、大腿骨の他の半切試料は未脱灰のまま、同後固定液にて処理しエポキシ樹脂包埋を行った。エポキシ樹脂脱灰試料は超薄切片作成後、1% タンニン酸、酢酸ウラン、クエン酸鉛にて染色し、また、未脱灰試料はエチレングリコールを用いて超薄切片を作製した後、電子顕微鏡観察を行った (H-7000, Hitachi, Co., Ltd., Japan)。また、一部のラットはアルデヒド液にて固定せず、麻酔下にて屠殺し大腿骨・脛骨を摘出後、メタノール脱水を行いエポキシ樹脂に包

埋した。その後、大腿骨および脛骨の長軸面にて研磨し、EPMA にて元素分析を行った。さらに、一部の試料の石灰化粉末を作製して X 線回折を行った。

【結果および考察】

①コントロール群および低 Mg 群の骨幹端部骨梁の組織像

コントロール群、低 Mg 群の脛骨近位端を光学顕微鏡観察したところ、コントロール群に比べて低 Mg 群では短い骨幹端部骨梁を認めた (図 1)。また、TRAP 染色にて破骨細胞の局在を検索すると、コントロール群と比較して、低 Mg 群では多数の TRAP 陽性破骨細胞が骨梁端に集積している像を観察した (図 2)。さらに、破骨細胞を電顕観察すると、低 Mg 群では、良く発達した波状縁を有する破骨細胞が並んで骨基質上に局在した (図 3)。従って、低 Mg 群では、破骨細胞による骨吸収亢進が考えられる。

②コントロール群および低 Mg 群の皮質骨の組織像

低 Mg 群の骨幹部皮質骨において、骨外膜には多数の TRAP 陽性破骨細胞が、また内部の骨基質には複雑な TRAP 陽性セメントラインが観察された (図 4)。セメントラインは骨改造の組織学的軌跡を示しているため、低 Mg 群での多数のセメントラインは亢進した骨代謝回転を意味していると考えられる。さらに、骨芽細胞のマーカー酵素である ALP を検討したところ、低 Mg 群では、皮質骨の骨外膜、骨内膜ともに強い ALP 反応が観察され、特

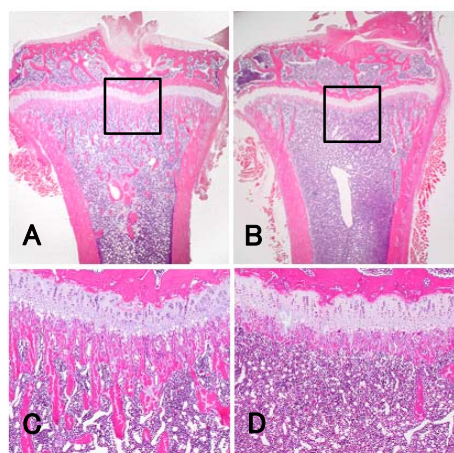


図 1 : A, C: コントロール群、B, D: 低 Mg 群の脛骨低倍像。C, D は A, B の枠内の拡大を示す。低 Mg 群では骨梁の発達が悪い。

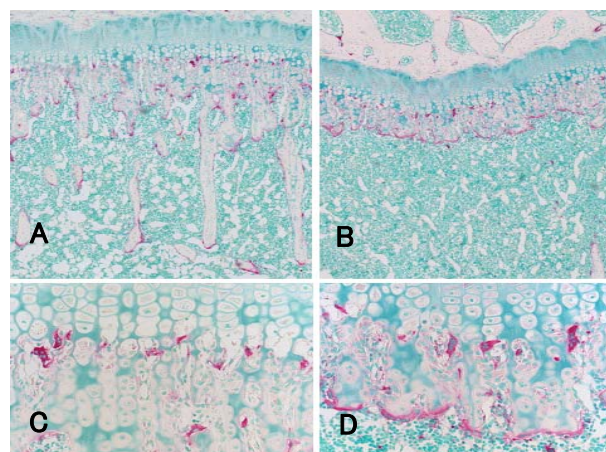


図 2 : A, C: コントロール群、B, D: 低 Mg 群の脛骨における骨幹端部の低倍像。C, D は A, B の一部拡大を示す。低 Mg 群では、骨梁の末端に赤く染められた TRAP 陽性破骨細胞の集積が認められる。

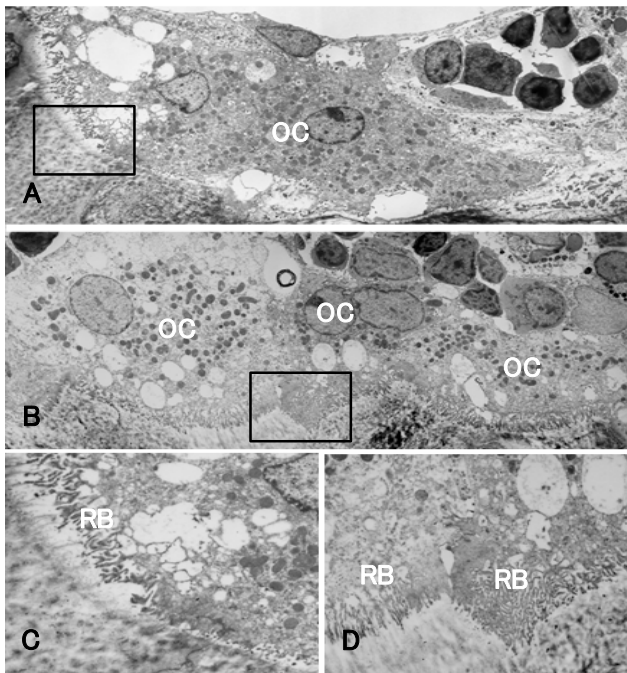


図 3 : A, C: コントロール群、B, D: 低 Mg 群の破骨細胞における電子顕微鏡低倍像。コントロール群の破骨細胞は基質に面している一部に波状縁 (RB) を観察するが、低 Mg 群の破骨細胞は数個が並んで骨基質上に局在し、基質面全てが波状縁 (RB) を示す。C, D は A, B の枠内拡大を示す。低 Mg 群では、基質に面する細胞膜が波状縁 (RB) を形成している。

に、骨内膜側では活発な骨形成を示唆する組織像を観察した。以上から、低マグネシウム環境で上昇した破骨細胞形成および活性⁷⁾に連動して骨芽細胞の活性も亢進し、骨代謝回転が上昇したと推測された。代謝回転が上昇することでセメントラインの増加が生じるが、新旧の骨基質を結合させているセメントラインが物性的に脆弱になる可能性は高く⁸⁾、低マグネシウム環境の骨の力学強度が減少する理由の一つとして骨代謝回転があげられると推測される^{9,10)}。

③骨基質の石灰化結晶に対する EPMA と X 線回折による解析

低 Mg 環境における骨代謝回転上昇は骨強度低下につながるが、骨密度 (石灰化度) の上昇に関しては骨代謝回転の亢進では説明できない。そこで、電子顕微鏡、EPMA ならびに X 線回折による解析を行った。

コントロール群の骨幹端部骨梁を電顕観察すると、骨芽細胞直下の類骨層に針状石灰化構造物を封入する基質小胞ならびに成長した石灰化球が観察された。さらに石灰化骨基質の近くでは石灰化球から周囲のコラーゲン線維に石灰化を波及させるといったコラーゲン性石

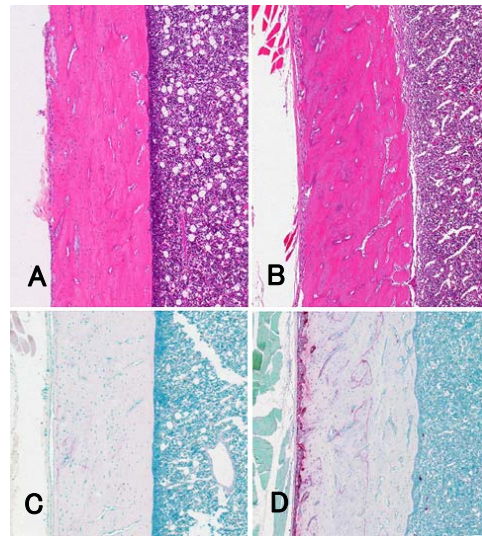


図 4 : A, C: コントロール群、B, D: 低 Mg 群の脛骨皮質骨の低倍像。C, D は A, B の連続切片における TRAP 染色を示す。低 Mg 群では、赤く染め出される TRAP 陽性破骨細胞の集積が骨外膜に認められるほか、皮質骨内部に TRAP 陽性セメントラインが多数存在する。

灰化を認めた。これに対して、低 Mg 群の類骨層では大型の石灰化球が観察されたことから、石灰化球における結晶塊の成長が亢進していると推測された。そこで、骨基質の石灰化結晶格子を電子回折にて解析すると、コントロール群、低 Mg 群ともに、ほぼ同じ数、直径、強度の電子リングが検出された (図 5)。このことは、低 Mg 群で認められた大型の石灰化球の結晶構造は、概ね、コントロール群とは変わらないことを示唆している。しかし、Mg の減少に伴い、石灰化結晶の周囲に存在する水和層では各イオン濃度が変化し、当然、石灰化結晶構造にも影響を及ぼすことが推測される¹¹⁾。

そこで、石灰化骨基質における Ca, リン (P), Mg のマッピングを EPMA で検索し、その相対濃度を疑似カラーで示した (図 6)。その結果、低 Mg ラットでは、骨幹端部骨梁および皮質骨の骨基質における Mg 濃度が減少していることが示された。さらに、低 Mg 群の骨基質では Ca 濃度の上昇が示された。このように Ca 濃度が大きな変動を示すのに対し、P はコントロール、低 Mg 群ともに変化を認めることはできなかった。

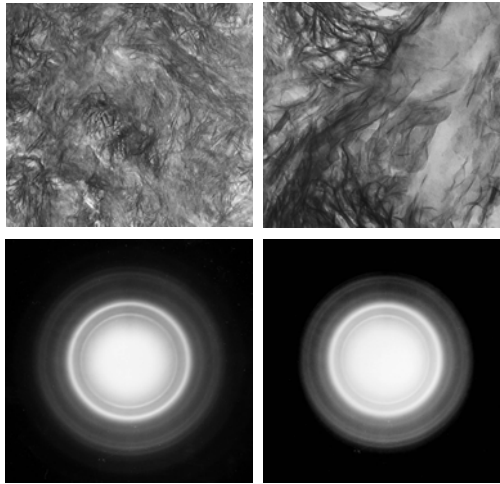


図 5 : A, C: コントロール群、B, D: 低Mg群の電子顕微鏡の高倍像(A, B)と電子回折(C, D)を示す。コントロール群(A)に比べて、低 Mg 群(B)では、大型の石灰化結晶塊を認めることができる(矢印)。電子回折ではコントロール群、低 Mg 群共に同じ直径、数、強度を持つことから結晶格子構造は大きく変わらない。

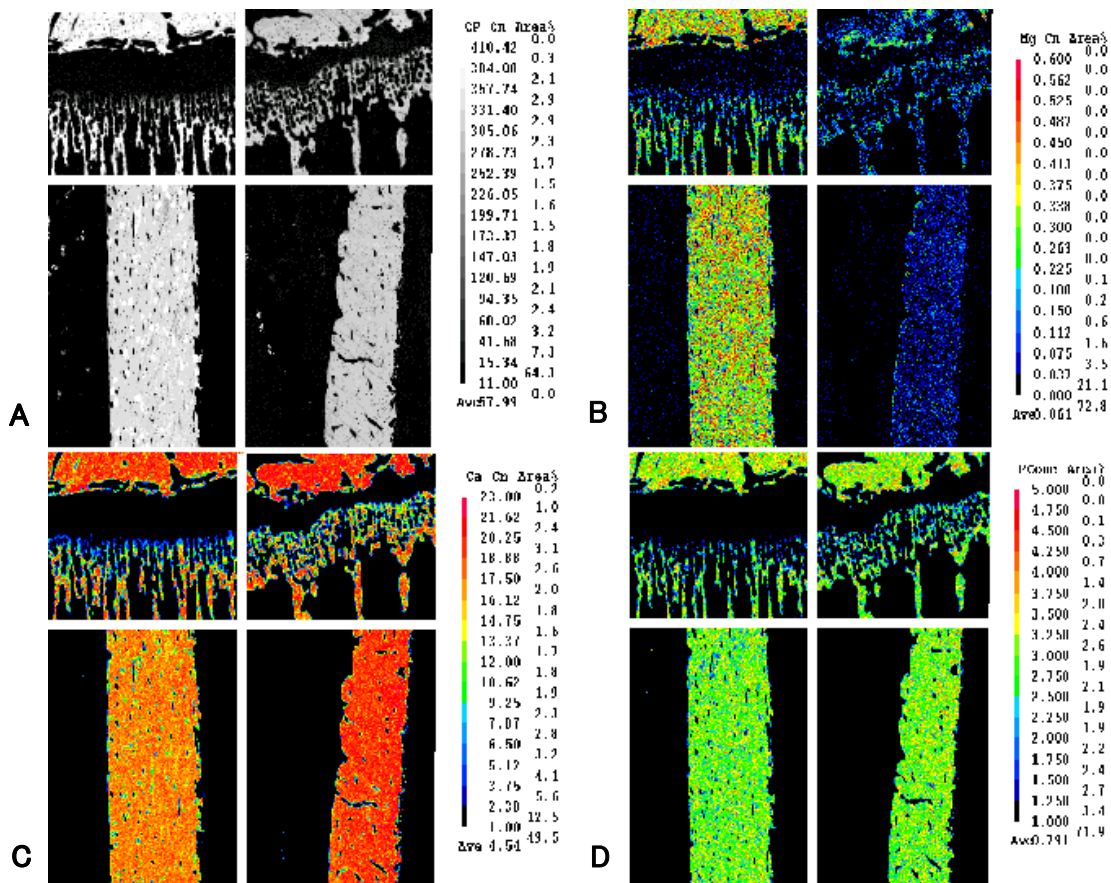


図 6 : EPMA による元素マッピングを示した所見。

A: 解析面領域、B: Mg の分布、C: Ca の分布、D: P の分布を示す。各パネル左はコントロール群、右は低 Mg 群、上は骨幹端部、下は皮質骨を示す。また、分布濃度は右の疑似カラーで示される。低 Mg 群における Mg 濃度はコントロール群より低値を示す(B)が、Ca 濃度はコントロール群より高い値を示す(C)。一方、P 濃度はコントロール群、低 Mg 群で差は認められない。

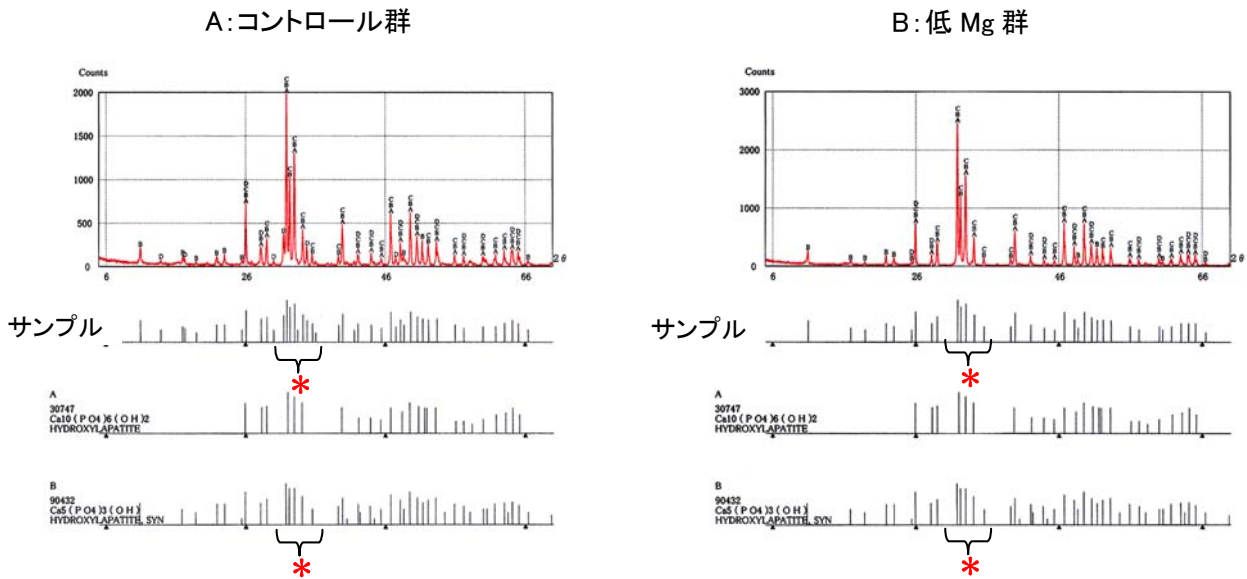


図 7 : X 線回折によるピークパターンを示した所見。

A: コントロール群、B: 低 Mg 群を示す。サンプル測定値の下に、native hydroxyapatite、合成型 hydroxyapatite のピークパターンを示す。コントロール群 (A) の最もピーク値の高い領域は、native hydroxyapatite、合成型 hydroxyapatite とも異なるパターンを示す。一方、低 Mg 群 (B) では、最もピーク値の高い領域は合成型 hydroxyapatite と同じピークパターンを示す。

この結果から、低マグネシウム環境は骨基質における Ca 濃度の上昇を誘導することが考えられるが、上昇した Ca は水和層内においても濃度上昇し、当然、リン酸カルシウム結晶において動的平衡を保とうとするため、結晶構造に影響を与えることが推測される。そこで、ラット骨粉末を作製し X 線回折にて化学構造式の解析を試みた (図 7)。その結果、コントロール群におけるカウント数のピークパターンは、native なハイドロキシアパタイトのそれよりも多くのピークが見られ実際の *in vivo* の骨基質には様々なリン酸カルシウム結晶あるいは炭酸カルシウム結晶が混在していることが考えられる。特に、合成型ハイドロキシアパタイトのピークパターンとは大きく異なることが理解できた。ところが、低 Mg 群におけるカウント数のピークパターンは purity の高い合成型ハイドロキシアパタイトのそれと類似しており、このことから、低マグネシウム環境では、結晶格子内の元素の脱落や置換のない純粋なハイドロキシアパタイト結晶が増加したことが考えられる。

すなわち、マグネシウム環境ではハイドロキシアパタイト結晶の purity が上昇すると考えられた。

④コラーゲン線維の石灰化

小林らは、低 Mg ラットでは骨密度が上昇するにもかかわらず、力学強度が低下することを報告していることから²⁾、今回、観察された低 Mg 群での石灰化異常が骨質にどのように関連するのか、骨基質の最も主要な有機成分であるコラーゲン線維を観察した (図 8)。

コントロール群では、コラーゲン線維周囲にコントロール群とほぼ大きさの等しい石灰化球が観察され、石灰化球に関連したコラーゲン線維の石灰化が誘導されること、また、多数のコラーゲン線維はしっかりとした構造を維持していることが電顕レベルで観察された。ところが、低 Mg

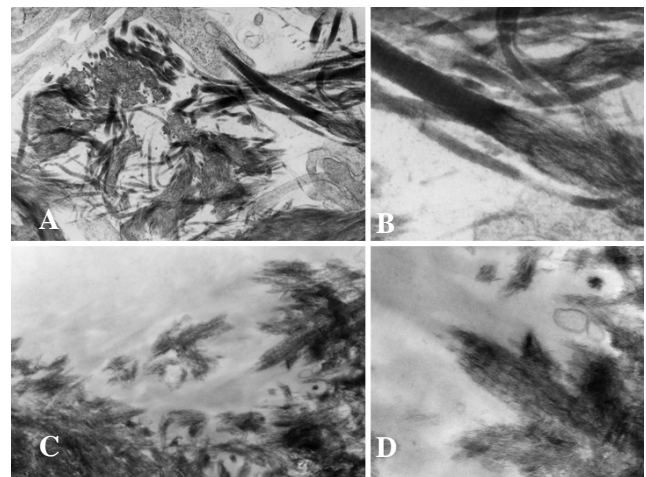


図 8 : 低 Mg 群のコラーゲン線維の石灰化を示した所見。

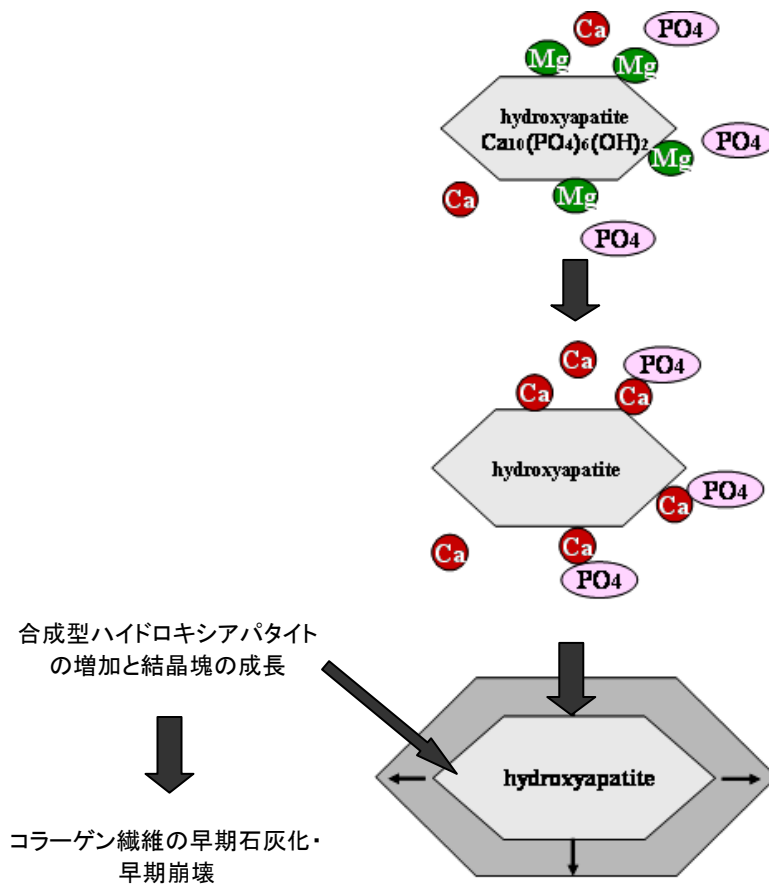
A: コラーゲン線維の低倍像を示す。コラーゲン線維はタンニン酸にて黒く染色されてある。B: A の一部拡大像を示す。コラーゲン線維が崩壊を占める部位を観察することができる (矢印)。C: コラーゲン線維の石灰化像 (黒色) の低倍像。石灰化球の存在は認められない。D: 図 B と同様の部位の石灰化を観察すると、コラーゲン線維の崩壊部位に一致して直接的な石灰化像を認めることができる。

群では、大型の石灰化球の存在ばかりでなく石灰化球を介さずにコラーゲン線維に一致した石灰化基質が沈着する像、また、それに一致してコラーゲン線維が細かな細線維へと崩壊する像を認めた。すなわち、低マグネシウム環境では、早期のコラーゲン線維の崩壊が誘導されていることが分かった。

このことから、低マグネシウム環境では、石灰化球が過成長するばかりでなく、コラーゲン線維が直接、石灰化を受けるといふ石灰化そのものの亢進が推測された。これは引き続き、コラーゲン線維の早期の微細崩壊を誘導すると思われる。コラーゲン線維の早期崩壊は、コラーゲンの架橋構造にも多大な影響を及ぼすため¹²⁾、弾性率などの力学的強度に大きく影響を及ぼすと推測される。

【まとめ】

低マグネシウム環境では、破骨細胞性骨吸収が亢進するため代謝回転が上昇し、脆弱な骨が形成されるので「骨質」を向上させることが考えられた。基質学的なメカニズムとして、低マグネシウム骨基質では、カルシウム濃度の上昇により、purityの高いハイドロキシアパタイトが形成されると考えられる。また、この現象は引き続き、石灰化結晶塊の成長を亢進させることでコラーゲン線維を直接的に石灰化させるために、コラーゲン線維の崩壊を誘導する。これら一連の結果は、「骨代謝」ばかりでなく「骨基質の性状」にMgなどのミネラル元素が参画し、石灰化結晶の微細環境に影響を及ぼすことを意味している。



【参考文献】

1. David B. Burr: Bone Quality as a Means of Assessing Strength and Fracture Risk. 24th Japanese Society of Bone Morphometry, 1st Asian Pacific Congress of Bone Morphometry. 日本骨形態計測学会雑誌 14(2): 77, 2004.
2. Kobayashi M., Hara K., Akiyama Y. Effects of vitamin K2 (menatetrenone) and alendronate on bone mineral density and bone strength in rat fed a low-magnesium diet. *Bone* 35(5): 1136-1143, 2004.
3. Anderson HC. : Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep.* 5(3): 222-226, 2003.
4. Boskey A: Bone mineral crystal size. *Osteoporosis J.* 14(Suppl 5): S16-S21, 2003.
5. Oda K, Amaya Y, Fukushi-Irie M, Kinameri Y, Ohsuye K, Kubota I, Fujimura S, Kobayashi J : A general method for rapid purification of soluble versions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins expressed in insect cells: An application for human tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J. Biochem.* 126, 694-699, 1999.
6. Burstone MS : Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates. *J Natl. Cancer Inst.* 21(3): 523-539, 1958.
7. Rude, R.K., Gruber, H.E., Wei, L.Y., Frausto, A., and Mills. B.G. Magnesium deficiency: Effect on bone and mineral metabolism in the mouse. *Calcif Tissue Int.* 72: 32-41, 2003.
8. Burr DB, Schaffler MB, and Frederickson RG. 1988. Composition of the cement line and its possible mechanical role as a local interface in human compact bone. *J Biochem.* 21: 939-945.
9. 網塚憲生, 下村淳子, 李 敏啓, 那須真樹子、坂上直子、野澤-井上佳世子, 前田健康, : 骨代謝回転に応じた骨基質の微細構造変化と骨原性細胞の分化. 日本骨粗鬆症学会雑誌 *Osteoporosis Japan*, 12(4): 14-18, 2004.
10. Amizuka N, Shimomura J, Li M, Nasu M, Ozawa H, Maeda T.: Histological evaluation for "Bone Quality" on two mouse models with different bone remodeling. *J Bone Miner Metab.* in press
11. Serre CM., Papillard M., Chavassieux P., Voegel JC., Boivin G., Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. *J Biomed. Mater. Res.* 42: 626-633, 1998.
12. Knott, L., and Bailey A.J. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22(3): 181-187, 1998.

0523

The effect of magnesium-insufficiency, a risk for osteoporosis, on bone minerals

Norio Amizuka

Center for Transdisciplinary Research, Niigata University

Summary

Mg-insufficient bone reveals fragility to mechanical loading despite normal or higher levels of bone mineral content (Kobayashi et al., *Bone* 35:1136, 2004). Therefore, we have examined bone remodeling and mineral of the tibiae and femora of 4-week-old Wistar male rats fed normal (control group, 0.09% Mg) or Mg-insufficient (low Mg group, 0.006% Mg) for 4-weeks. The termini of the shortened metaphyseal trabeculae of low Mg groups localized many osteoclasts with well-developed ruffled borders. In addition, the Mg-insufficient cortical bones showed complicated meshwork of cement lines, implying accelerated bone remodeling. Thus, Mg-insufficiency appeared to enhance osteoclastic bone resorption, thereby accelerating bone remodeling. An electron probe microanalyzer demonstrated an increased and decreased concentrations of Ca and Mg in the low Mg group, respectively. X-ray diffraction provided various chemical formulae of mineralized crystals including hydroxyapatites (HA) in the control group, but an extremely-elevated purity of HA [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] in the low Mg group. Consistently, Mg-insufficient bone showed large mineralized nodules and premature mineralization of collagen fibrils in the osteoid. Therefore, an increased concentration of Ca in the Mg-insufficient bone may cause the high purity of HA, larger mineralized nodules and premature collagenous mineralization. Thus, in a physiological state, Mg appears to take part in “bone quality” by different mechanisms on bone turnover and mineralization.