



Title	進行期慢性腎臓病を伴う骨粗鬆症に対するビスフォスフォネート製剤の低用量高頻度投与と高用量低頻度投与の治療効果および安全性の比較検討
Author(s)	藤田, 諒
Description	配架番号 : 2624
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14503号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14503
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81523
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Fujita.pdf



学 位 論 文

進行期慢性腎臓病を伴う骨粗鬆症に対するビスフォスフォネート製剤の低用量高
頻度投与と高用量低頻度投与の治療効果および安全性の比較検討

(Comparison of the efficacy and renal safety of bisphosphonate between low-dose/high-
frequency and high-dose/low-frequency regimens in a late-stage chronic kidney disease)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

藤田 諒
Fujita Ryo

学 位 論 文

進行期慢性腎臓病を伴う骨粗鬆症に対するビスフォスフォネート製剤の低用量高
頻度投与と高用量低頻度投与の治療効果および安全性の比較検討

(Comparison of the efficacy and renal safety of bisphosphonate between low-dose/high-
frequency and high-dose/low-frequency regimens in a late-stage chronic kidney disease)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

藤田 諒

Fujita Ryo

目 次

発表論文目録および学会発表目録		1 頁
要旨		3 頁
略語表		6 頁
緒言		7 頁
第一章		
緒言		11 頁
実験方法		13 頁
実験結果		14 頁
考察		15 頁
第二章		
緒言		16 頁
実験方法		18 頁
実験結果		22 頁
考察		31 頁
統括及び結論		35 頁
謝辞		36 頁
利益相反		37 頁
引用文献		38 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. R. Fujita, M. Ota, D. Sato, D. Nakazawa, H. Kimura-Suda, F. Nakamura, T. Shimizu, H. Kobayashi, N. Iwasaki, and M. Takahata

Comparison of the efficacy and renal safety of bisphosphonate between low-dose/high-frequency and high-dose/low-frequency regimens in a late-stage chronic kidney disease rat model

Calcified Tissue International and Musculoskeletal Research 2020 Oct; 107(4):389-402.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 藤田諒, 高畑雅彦, 太田昌博, 清水智弘, 佐藤大, 小林英之, 中沢大悟, 木村-須田廣美, 中村郁哉, 岩崎倫政 進行期慢性腎臓病におけるビスフォスフォネート製剤の骨粗鬆症治療効果および安全性の検討

平成 31 年 1 月 26 日

第 136 回北海道整形災害外科学会.

札幌医科大学 臨床教育研究棟 (札幌市)

2. 藤田諒, 高畑雅彦, 太田昌博, 清水智弘, 佐藤大, 小林英之, 中沢大悟, 木村-須田廣美, 中村郁哉, 岩崎倫政

進行期慢性腎臓病におけるビスフォスフォネート低用量高頻度製剤と高用量低頻度製剤の治療効果と安全性

令和 1 年 7 月 4 - 6 日

第 39 回日本骨形態計測学会.

北九州国際会議場 (北九州市)

3. 藤田諒, 高畑雅彦, 太田昌博, 清水智弘, 佐藤大, 小林英之, 中沢大悟, 木村-須田廣美, 中村郁哉, 岩崎倫政
進行期慢性腎臓病におけるビスフォスフォネートの治療効果と安全性は低用量高頻度製剤と高用量低頻度製剤では同等か？
令和1年10月11-13日
第21回日本骨粗鬆症学会
神戸国際会議場 (神戸市)
4. 藤田諒, 高畑雅彦, 太田昌博, 清水智弘, 佐藤大, 小林英之, 中沢大悟, 木村-須田廣美, 中村郁哉, 岩崎倫政
進行期慢性腎臓病におけるビスフォスフォネートの治療効果と安全性は低用量高頻度製剤と高用量低頻度製剤は同等か？
令和1年10月17-18日
第34回日本整形外科学会基礎学術集会.
パシフィコ横浜 (横浜市)
5. R. Fujita, M. Takahata, T Shimizu, M Ota, D Sato, H Kobayashi, D Nakazawa, H Kimura-Suda, F Nakamura, N Iwasaki
Comparison of efficacy and safety of high-dose low-frequency and low-dose high-frequency bisphosphonate treatment in a rat model of late-stage chronic kidney disease
February, 8-11, 2020
The Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting
Phoenix Convention Center (Phoenix)

要旨

【背景と目的】慢性腎臓病（Chronic kidney disease; CKD）は慢性に経過するすべての腎臓病を指し、本邦でも患者数は 1330 万人にものぼる。また、原発性骨粗鬆症も本邦では現在 1280 万人が罹患していると推定されている。共に高齢者のコモンディージーズであり、CKD と骨粗鬆症を合併した患者は相当数存在するものと考えられている。CKD 自体も続発性骨粗鬆症のリスク因子とされており、病期（stage）が進行すると骨質劣化により骨密度から想定されるよりも骨折率が増加すると報告されており、CKD stage 1-3 までは骨粗鬆症治療方針が確立している。しかし易骨折性がもっとも問題となる late-stage CKD (stage 4 and 5) については、骨粗鬆症治療法が確立していない。その理由の一つは、late-stage CKD 患者に対する骨粗鬆症治療薬の臨床試験が倫理面、安全面から行われていないためである。これはほとんどの骨粗鬆症治療薬が腎排泄・代謝であり、進行期 CKD 患者では薬剤の蓄積による効果の増強や腎毒性などの懸念があるためである。原発性骨粗鬆症の第一治療選択薬である Bisphosphonate (BP) 製剤も腎排泄により代謝される薬剤であり、臨床試験が行われておらず安全性と効果の検証が確立していないという理由から late-stage CKD 患者に対しては慎重投与あるいは禁忌となっている。BP 製剤には、総投与量は同じだが一回投与量が少なく投与頻度が多い daily, weekly 製剤（Low dose/High frequency: LDHF 製剤）と、一回投与量が多いが投与頻度が少ない monthly, yearly 製剤（High dose/Low frequency: HDLF 製剤）がある。これらは腎機能が正常な患者では同等の骨密度改善効果と安全性を有するとされているが、腎機能障害を伴う late-stage CKD 患者でも同等の治療効果と安全性を示すかは明らかになっていない。そこで本研究では LDHF 製剤と HDLF 製剤の 2 種類の BP 投与方法が骨に与える効果と腎機能障害に及ぼす影響の違いを CKD stage 4 ラットモデルを用いて調査した。

【材料と方法】雄性 SD (Sprague Dawley) ラットを用い、8 週齢で片側 2/3 腎臓摘出を行い、10 週齢で対側の腎臓全摘出を施行した段階的 5/6 腎摘出モデルを作成した。Sham 群は CKD 群と同じ週齢で Sham 手術を 2 度行った。20 週齢時の採血で腎機能の重症度を検証し、CKD 群が人における CKD stage4 相当になっていることを確認した。Sham-vehicle, Sham-LDHF, Sham-HDLF, CKD-vehicle, CKD-LDHF, CKD-HDLF の 6 群を作成し、20 週齢時より BP 製剤の一種であるアレンドロネート (ALN: alendronate) を LDHF 群は 0.05mg/kg/day, HDLF 群は 0.7mg/Kg/2 week で 10 週間投与した。30 週齢で安楽死させ血液、尿、第 5 腰椎、両大腿骨、腎臓を採取した。安楽死 10 日前と 3 日前にカルセインを用いて骨ラベリングを行った。マイクロ CT、骨密度測定、力学試験、骨形態計

測, フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) を用いて ALN の骨粗鬆症治療の有効性を検討した. また血液検査, 尿検査, 腎病理を用いて ALN が腎機能障害に及ぼす影響を検討した.

【結果】CKD ラットは20 週齢時点で血清 BUN と CRE の上昇および高 P 血症を認めたが, 血清 Ca 値に変化はなかったことより CKD ステージ4 に相当する腎機能障害を発症した. CKD ラットに10 週間 ALN を投与すると, LDHF, HDLF のいずれの投与法でも大腿骨遠位骨幹端, 第5 腰椎の骨密度や骨梁構造が有意に改善したが, 投与法による差は認めなかった. また, 力学試験においても ALN は LDHF, HDLF のいずれの投与法でも大腿骨遠位骨幹端の骨強度を改善したが, 投与法による差は認めなかった. 骨組織形態計測では CKD ラットは Sham と比較して高骨代謝回転状態となっており, FTIR による骨質評価では骨基質の石灰化度が低下することがわかった. これに対し ALN 投与は骨代謝回転を有意に抑制し, 骨基質石灰化度を回復させた. ALN による骨代謝回転抑制効果は CKD-LDHF 群よりも CKD-HDLF 群でより顕著であり, 石灰化度の増加も CKD-HDLF 群でより高いという骨形態計測と矛盾しない結果となった. 以上のことから CKD stage 4 ラットに対する10 週間の ALN 投与では総投与量は同じでも HDLF 投与の方が LDHF 投与よりも有意に高骨代謝回転を抑制し, 石灰化度を高める可能性が示唆された. 腎機能は30 週齢時点の採血検査で CKD-vehicle, CKD-LDHF, CKD-HDLF 群の間で BUN, CRE, P, Ca に統計学的有意差は認めなかった. また, 腎病理検査で glomerulus number per area で腎機能評価を, elastica-masson 染色で薬剤性間質障害の程度を評価したが, CKD-vehicle は Sham-vehicle と比べて有意に glomerulus number per area の低下 elastica-masson 染色領域 (間質障害領域) の増加を認めたが, ALN の投与による更なる腎障害の増悪はなかった.

【考察】本研究結果により二次性副甲状腺機能亢進症 (Secondary hyperparathyroidism: SHPT)により高骨代謝回転状態にある進行期 CKD 患者に対し, BP 製剤は腎機能障害を悪化させることなく有効に使用できる可能性が示唆された. また, HDLF の方が LDHF よりも有意に高骨代謝回転状態を抑制し, 骨の石灰化度を回復させたことから, 進行期 CKD 患者に対する ALN 投与は LDHF 投与よりも HDLF 投与の方がより効果的である可能性が示唆された. しかし, HDLF 投与による骨代謝回転抑制効果は“過剰な”骨代謝回転抑制 (SSBT: Severe suppression of bone turnover) を惹起する可能性もあり, マイクロダメージの蓄積などによる非定型骨折リスクの増加を来す可能性があることから長期的投与には注意を有する. また, 実際の CKD 患者の骨病変は高骨代謝回転ばかりでなく, 無形成骨を呈する部分や, それらが混在する複雑な病態をとることが多く, 本研究結果はその病態一部に対する BP 剤の治療効果を検証したにすぎないことに注意して結果を解釈する必要がある.

【結論】CKD stage 4 モデルラットに対する ALN 製剤の投与は LDHF, HDLF のいず

れの投与法でも CKD に伴う骨脆弱性を改善して、腎機能障害を認めなかった。ALN 製剤は、SHPT による高骨代謝回転状態にある進行期 CKD 患者に対して LDHF, HDLF のいずれの投与法でも腎機能障害を来さず、骨密度増加効果、骨質改善効果を有する可能性が示唆されたが、HDLF の方が有意に骨代謝回転を抑制したことから、進行期 CKD 患者に対する ALN 製剤の投与は HDLF 製剤の方が LDHF 製剤より適している可能性がある。また CKD stage 4 を伴う骨粗鬆症患者に対する ALN 投与は LDHF, HDLF のいずれの投与法でも薬剤性腎機能障害をきたさない可能性が示唆された。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ALN	alendronate
Alb	albumin
Ca	calcium
CRE	creatinine
CKD	chronic kidney disease
CKD-MBD	chronic kidney disease-mineral and bone disorder
eGFR	estimated glomerular filtration rate
HDLF	high-dose/ low-frequent
IP	inorganic phosphorus
IV	intravenous
LDHF	low-dose/ high-frequent
NAG	N-acetyl- β -D-glucosaminidase
Nx	nephrectomy
P.O.	per os
PTH	parathyroid hormone
SD	sprague dawley
SHPT	secondary hyperparathyroidism
SSBT	sever suppression of bone turnover
P	phosphorus

緒 言

1. 慢性腎臓病は続発性骨粗鬆症をきたす原因疾患である

慢性腎臓病（Chronic kidney disease: CKD）は慢性に経過するすべての腎臓病を指し、腎臓の障害（血尿や蛋白尿など）、もしくは GFR（糸球体濾過量） $60\text{mL}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 未満の腎機能低下が 3 ヶ月以上持続するものと定義される(KDIGO, 2013). 腎臓は、副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone: PTH）をはじめとする様々なホルモンの標的臓器になると同時に、自ら骨・ミネラル代謝に重要なビタミン D の活性化を行っており(Fukagawa et al., 2006), 生体のミネラルバランスの維持に重要な臓器である.

骨粗鬆症は全身の骨強度が低下して骨折しやすくなった状態のことであり、世界保健機関 WHO により「低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が増大する疾患である」と定義されている(Kanis, 1994). 本邦における骨粗鬆症患者は約 1260 万人にのぼると推定されており、高齢人口の増加とともに罹患患者は増加の一途をたどっている. 遺伝的素因や閉経および加齢によって骨代謝障害が生じる原発性骨粗鬆症がもっとも多いが、副甲状腺機能亢進症やクッシング症候群を始めとする内分泌疾患、糖尿病・CKD・慢性閉塞性肺疾患に代表される生活習慣病、関節リウマチ、ステロイド薬などによって、骨量減少や骨質劣化という骨粗鬆症の病態を惹起する原因が認められるものは続発性骨粗鬆症と称されている.

CKD は、加齢に伴う腎機能障害を含め慢性に経過するすべての腎障害を包括する疾患概念であり、本邦では約 1,330 万人の患者がいると推測されている(日本腎臓学会, 2012). 原発性骨粗鬆症と同様に高齢者では罹患率が上昇していて(日本腎臓学会, 2012), 新たな国民病として認識されるようになってきた. CKD は糖尿病と並んで二次的に骨折リスクを上昇させる疾患とされており(日本骨粗鬆学会, 2011), CKD は早期から骨折リスクが上昇する(Ensrud et al., 2007b)ことを考慮すると、CKD を原因とする続発性骨粗鬆症の患者は相当数いると考えられている.

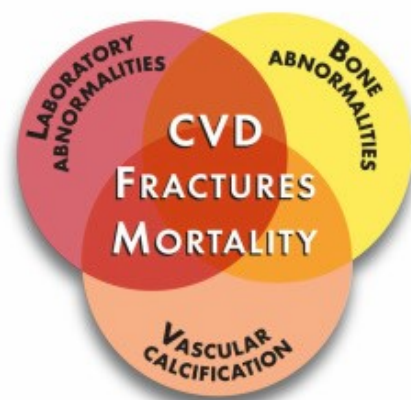
2. 進行期慢性腎臓病を伴う骨粗鬆症患者に対する骨粗鬆症治療法は確立していない

CKD 患者では腎機能正常者と比して骨折率が 2~14 倍にも昇ると報告されている(Alem et al., 2000, Nickolas et al., 2006). また, CKD の病期 (stage)が進行するに伴い骨折率が増加することも明らかになっている (Ensrud et al., 2007b, Naylor et al., 2014). CKD に伴う骨折率の増加は骨量の減少によるものだけでなく, CKD に伴う骨質異常が原因であると考えられており, それゆえ CKD を伴う骨粗鬆症患者は骨密度から想

定される骨折率より高い確率で骨折をきたしていることが報告されている(Jamal et al., 2006, Ensrud et al., 2007a).

CKD は近年になって、その早期から骨や副甲状腺だけでなく、心血管系にも異常を生じ、生命予後に悪い影響を与える全身の病気として認識されてきた(Dhingra et al., 2007, Wolf et al., 2011). このことより、CKD に伴うカルシウム(Ca)/リン(P)代謝異常を、骨の病気ではなく、血管石灰化なども含む全身の病気としてとらえようというパラダイムシフトが起き、“CKD-MBD” (慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常: chronic kidney disease-mineral and bone disorder) という新しい用語が提唱された(Moe et al., 2006) (図 1). 図に示すように、CKD-MBD は、Ca, P, PTH などの検査値異常、骨の異常、血管石灰化の3種類の以上の組み合わせによって構成される. それぞれの異常を有効に予防、治療する努力をすることは従来と同じであるが、その結果として心血管イベントの低下、骨折率の低下、そして生存率の改善を最終的な目標にしているところが、その趣旨である. CKD に伴うビタミン D 欠乏症は二次性副甲状腺機能亢進症 (Secondary hyperparathyroidism: SHPT), P 血症をきたし骨代謝回転異常及び石灰化異常をきたす. 現状中等度～高度腎機能低下を伴う CKD 患者に対しては P 制限食に加えて、P 吸着剤、活性化ビタミン D 製剤などが治療薬として用いられているが(Svára, 2009, 2009, Ketteler, 2011, Melamed and Thadhani, 2012), これらは CKD-MBD に対する有効性は証明されている一方で、骨折予防効果を有するかは明らかになっていない.

CHRONIC KIDNEY DISEASE— MINERAL AND BONE DISORDER



CKD-MBD

図 1. CKD-MBD は、Ca, P, PTH などの検査値異常、骨の異常、血管石灰化の 3 種類の異常の組み合わせによって構成される。(KDIGO より引用)

※KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcome)

欧米、オーストラリアの各ガイドライン機構が中心となって共通した国際的腎臓病ガイドラインを構築するために設立された非営利団体。

原発性骨粗鬆症の第一選択薬として用いられている、骨吸収抑制薬のビスフォスフォネート (BP) 製剤は CKD stage 3 以下の患者では腎機能正常者と同様に骨折予防効果を有することが証明されており (Ensrud et al., 2007b, Miller et al., 2013), 進行期 CKD (stage 4, 5) でもその効果を有する可能性が期待できる。しかし, BP 製剤が腎代謝であることから人での臨床試験が倫理面, 安全面から困難であり, 進行期 CKD に対する BP 製剤の骨折予防効果は明らかになっていない。過去に当研究室では CKD stage 4 ラットに対して BP 製剤を 4 週投与したところ腎機能増悪を認めず, 大腿骨遠位骨幹部において皮質骨の骨質を改善させ, 骨量を増加させたことを報告している (Ota et al., 2017)。このことから, 臨床においても進行期 CKD を有する骨粗鬆症患者に対して BP 製剤は安全かつ有効な骨折予防効果を有する可能性が期待できる。

3. 進行期慢性腎臓病に対するビスフォスフォネート製剤の適切な投与方法は明らかになっていない

実臨床において BP 製剤は総投与量が同じだが“投与頻度”と“一回投与量”が異なる様々な製剤が存在する (図 2)。Daily, weekly 製剤などの一回投与量は少ないが, 投与頻度が多い (Low dose/ High frequent: LDHF) ものから, 近年では monthly, yearly 製剤などの一回投与量が多いが, 投与頻度が少ない (High dose/ Low frequent: HDLF) ものまで様々な投与方法が存在し, これらは腎機能正常者や CKD stage 3 以下では骨密度改善効果, 腎機能に及ぼす影響に差がないことが確認されている (Seedor et al., 1991, Uchida et al., 2005)。しかし, 進行期 CKD である stage 4, 5 でのこれらの投与方法による骨への効果, 腎機能障害に与える影響が同等であるかは明らかになっていない。

	Daily	Weekly	Monthly	Yearly
Alendronate	5mg (p.o.)	35mg (p.o.)	900µg (iv)	-
Risedronate	2.5mg (p.o.)	17.5mg (p.o.)	75mg (p.o.)	-
Minodronate	1mg (p.o.)	-	50mg (p.o.)	-
Zoledronic acid	-	-	-	5mg (iv)

図 2. 現在本邦で使用可能な BP 製剤と投与方法の一覧

LDHF 製剤である daily 製剤から HDLF 製剤である yearly 製剤まで存在する

4. 本研究の目的

本研究では進行期 CKD ラットモデルをまず作成し（第 1 章），作成したモデルを用いて骨粗鬆症患者に対する BP 製剤の適切な投与方法を BP 製剤の一種であるアレンドロネート（Alendronate: ALN）を用いて，総投与量は同じだが一回投与量と投与頻度が異なる 2 種類の投与方法（LDHF と HDLF）のどちらが適しているかを検討した（第 2 章）．我々は primary end point を ALN が骨に与える効果とし，secondary end point を薬剤性腎機能障害として評価した．本研究は進行期 CKD に対する ALN の適切な投与方法を検討した初めての研究である．

第 一 章

進行期 CKD モデルラットの作製

緒 言

透析治療が必要となる CKD stage 5 の患者を除くと、骨質異常に対する治療が問題となるのは主に CKD stage 4 の患者であり、骨粗鬆症治療薬の有効性と安全性を検証するためには CKD stage 4 相当のモデル動物を用いた実験が妥当であると考えられる。

腎機能に影響を及ぼす因子としては、直接的な腎臓へのダメージ（腎摘出や薬剤投与など）以外に食料に含まれる栄養素によってかかる腎臓への負担も考慮しなければならない(Handu et al., 2016, Gansevoort et al., 1995)。よって動物モデルの作製には腎摘出の程度と、食餌内容を検討する必要がある。Miller らはラットに対して部分腎摘出を行い、食餌に含まれる Ca と P の含有量を調整することで、腎摘ラットが様々な程度の腎機能障害とミネラルバランス異常や SHPT を呈することを報告している(Miller et al., 1998)。本研究では、この先行研究を参考に CKD ステージ 4 相当のモデル動物を作成することとした。

ヒトにおける CKD の病期分類 (staging)は、年齢と性別および採血で血清クレアチニン値 (creatinine: CRE) を計測することによって、推算糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate: eGFR) を計算し (日本人の eGFR 計算式: $eGFR(\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2) = 194 \times \text{Cr}^{-1.094} \times \text{年齢(歳)}^{-0.287}$, 女性はこの値に 0.739 を乗ずる) (Matsuo et al., 2009), その値に応じて病期分類を行う。しかし、動物モデルにおいては eGFR を算出する手法がないため、CRE の計測では CKD stage を決定することができない。

実際の臨床においては CKD stage 2 からすでに線維芽細胞増殖因子 23 (fibroblast growth factor 23: FGF23) が上昇し始め(Isakova et al., 2011), CKD stage 3 から PTH が上昇, CKD stage 4 から高 P 血症, CKD stage 5 から低 Ca 血症を呈するということがわかっている(Diniz and Frazao, 2013) (図 3) ので、本章では CKD stage 4 の動物モデル作成を目指しているため、血清学的 P, Ca 検査を行うことでモデル動物の CKD ステージングを行い、目的とする CKD stage 4 相当のモデルラットが作製されたかどうかを調査した。

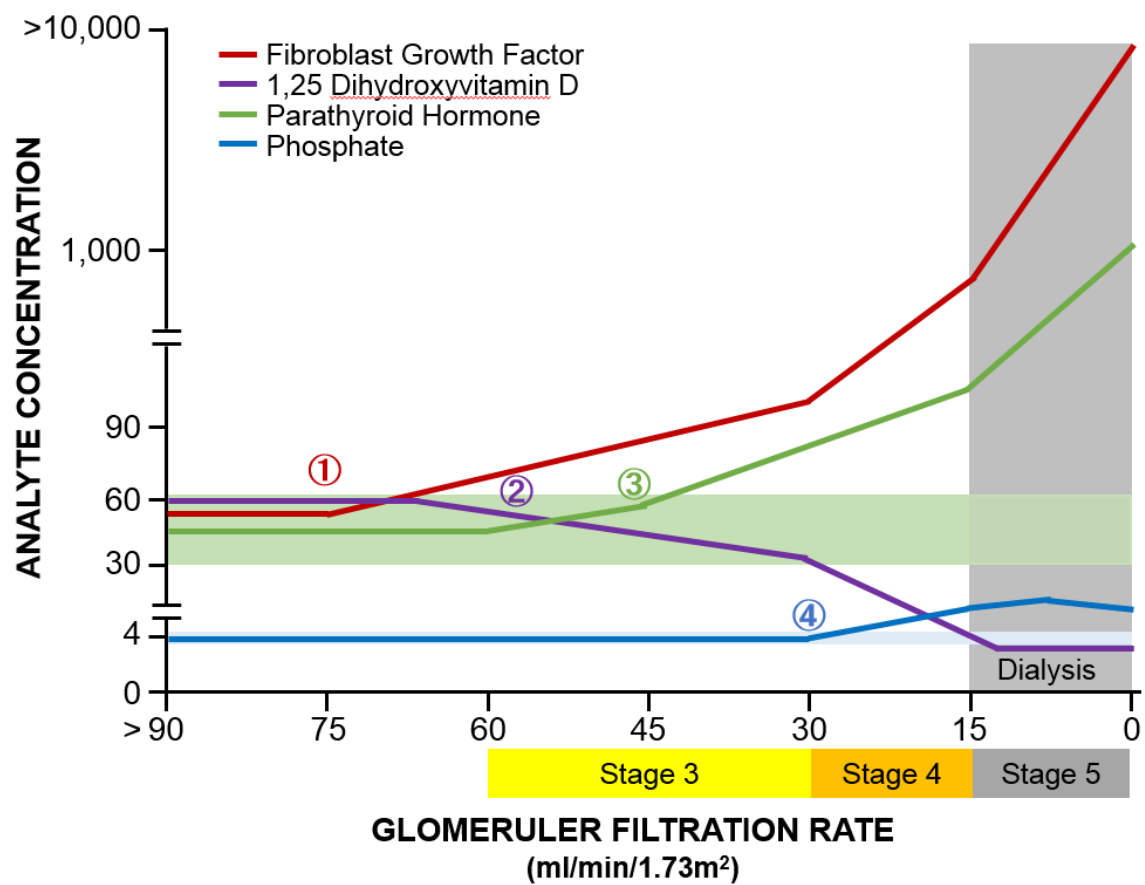


図 3. 糸球体濾過量と各検体濃度との関係

FGF-23 は CKD 早期から上昇し始め、副甲状腺ホルモンは CKD stage 3 から上昇する。血清 P 値は CKD stage 4 になって上昇する。

Diniz et al, 2013, Nefrologia より改変

実験方法

倫理規定

本研究は北海道大学における研究倫理審査委員会の承認を得ており、実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した。

実験動物

Miller らの方法に準じて(Miller et al., 1998)雄性 Sprague Dawley (SD)ラット (日本クレア, 東京, 日本) に対して 5/6 腎摘出 (nephrectomy; Nx) する群 (CKD) と後腹膜切開のみを行う群 (Sham) とに分けた。食餌は本学の動物実験施設で通常使用されている Ca 含有 0.98%, P 含有 0.80%のラボ MR ストック(日本農産工業, 神奈川, 日本) で飼育し, 8 週齢で左腎臓を 2/3 摘出し, 2 週間の回復期間をおいた後に, 10 週齢で右腎臓を全摘してトータル 5/6Nx とし, 10 週後の 20 週齢で内頸動脈採血を行い CKD モデルの検証をした。

血清電解質, 腎機能と体重の測定

20 週齢時点で麻酔下に内頸動脈採血を行った。採取した動脈血は遠心分離機で 4°C, 3000rpm で 5 分遠心し, 血清のみを抽出した。

血清電解質(Ca, P)と腎機能(BUN, CRE)測定はオリエンタル酵母工業株式会社長浜ライフサイエンスラボラトリー (滋賀, 日本) に委託検査を依頼した。

また 20 週齢時点で SD ラットの体重を測定した。

統計分析

得られたデータは, Student's T-test を用いて有意差検定を行い, 判定は P 値<0.05 で有意差ありとした。データは mean±SD で表した。

実験結果

5/6Nx とラボ MR ストックの飼育でモデルラットは CKD ステージ 4 に相当する腎障害を呈した

10 週齢時の 5/6Nx と、Ca 含有 0.98%、P 含有 0.80%の通常飼料による 10 週間の飼育後、CKD の重症度がどの程度進んでいるかを評価するために血清学的検査を行った。20 週齢時点の採血で、Sham 群と比較し CKD 群は腎機能障害と高 P 血症を認め、血清 Ca 値に変化はなかった (図 5)。

CKD 群では体重が $500.6 \pm 10.2\text{g}$ であったのに対して Sham 群では $563.9 \pm 7.4\text{g}$ であり、CKD 群は Sham 群に対して有意に体重が軽かった。

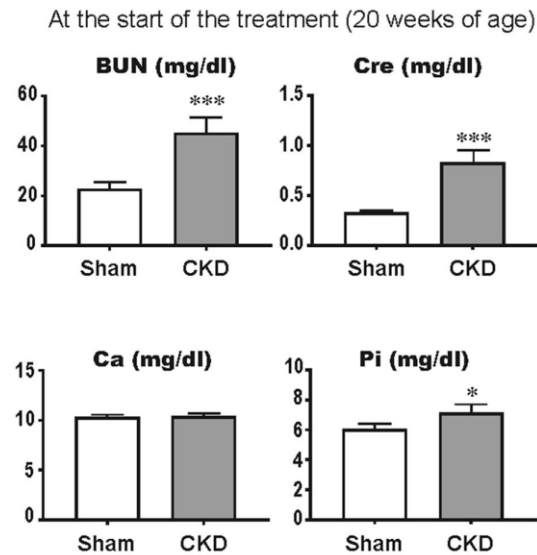


図 4. 20 週齢時の腎機能、ミネラルの結果

CKD 群は腎機能障害、高 P 血症を呈したが、血清 Ca 値に変化はなかった。

考 察

Miller らの報告によると(Miller et al., 1998), 10 週齢で 5/6Nx を施行したラットに対して Ca 含有 1%, P 含有 0.7% で飼育すると, 20 週齢の時点で高 PTH 血症となるが高 P 血症は呈さず, Ca 含有 0.6%, P 含有 0.8% の場合ではより重度の高 PTH 血症と高 P 血症を呈するが低 Ca 血症は呈さないとなっていたため, 本動物モデル(Ca 含有 0.98%, P 含有 0.80%) はその中間程度の腎不全となることが予想された. 実際に CKD 群では血清 Ca 濃度は変化なく, 高 P 血症を呈する状態となり, 実験の再現性が得られた. 高 P 血症を認めるが, 血清 Ca 値は変化しないという結果から, SHPT を呈する CKD ステージ 4 に相当する腎不全モデル動物を, 単純な外科的処置と通常の飼育飼料で作製するプロトコルを確立した.

第 二 章

進行期 CKD モデルラットに対する骨吸収抑制剤の 骨への治療効果と安全性の検討 ～低用量高頻度投与と高用量低頻度投与の比較検討～

緒 言

実臨床において骨吸収抑制剤の一種である BP 製剤は総投与量が同じでも、一回投与量と投与頻度が異なる daily, weekly 製剤などの LDHF 製剤から, monthly, yearly 製剤などの HDLF 製剤まで幅広く存在する. これらは CKD stage 3 以下と腎機能正常者では同等の骨への効果および安全性を有していることを確認されているが(Seedor et al., 1991, Uchida et al., 2005), 倫理面, 安全面の理由により臨床試験を行うことが出来ず, 進行期 CKD (stage 4 and 5)で同等の効果を有するかは明らかになっていない.

BP 製剤の腎クリアランスは腎機能正常者でも血中 BP 濃度が高くなるほど低くなる傾向にあることが報告されている(Lin, 1996). そのため, CKD 患者では一回投与量が多い HDLF 製剤の方が LDHF 製剤と比して腎臓で排泄される BP が少なくなり結果として骨への沈着量が多くなる可能性がある. その結果 BP(HDLF)製剤では骨代謝回転の過剰な抑制 (Severe suppression of bone turnover: SSBT) をきたし, マイクロダメージの蓄積や, 過度な石灰化度の増加をきたす可能性がある. SSBTは大腿骨非定型骨折(図 5)のリスクを増加させる可能性がある為, 現状 CKD 患者では BP 投与後 3 年程度で薬剤の変更を検討する必要があると提唱されている(Miller, 2014). また薬剤性腎機能障害は一回投与量と投与速度に規定されるため, BP 製剤においても HDLF 製剤は LDHF 製剤よりも薬剤性腎機能障害をきたす可能性がある.

そこで, 本章では第一章で作製した進行期 CKD モデルラットを用いて総投与量は同じだが一回投与量と投与頻度が異なる HDLF と LDHF の 2 種類の投与方法で BP 製剤を投与し, 骨への効果および腎機能障害に与える影響を調査した.



図 5. SSBT に伴う大腿骨非定型骨折

大腿骨内側に **spike** 形成を伴った横骨折、もしくは短い斜骨折で、骨片の粉碎を伴わないものでかつ大腿骨転子下、もしくは骨幹部に生じるものと米国骨代謝学会（ASBMR）で定義されている。

Shane et al, 2014, Minireview Research

実験方法

使用動物及びCKDモデルの作製

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した。SD ラット(日本クレア, 東京, 日本) 36 匹を用いて実験を行った。

治療スケジュール

SD ラットを 20 週齢で CKD モデルとした後, 無作為に CKD-vehicle 群, CKD-LDHF 群, CKD-HDLF 群に分け(各群 n=6), sham 手術を受けた SD ラットも同じく無作為に Sham-vehicle 群, Sham-LDHF 群, Sham-HDLF 群に分けた(各群 n=6)。ALN (LKT Laboratories, Inc., MN) を LDHF 群には 50 μ g/kg/day で, HDLF 群には 700 μ g/kg で 2 週毎に計 10 週間皮下投与した。Vehicle 群には生理食塩水を毎日投与した。

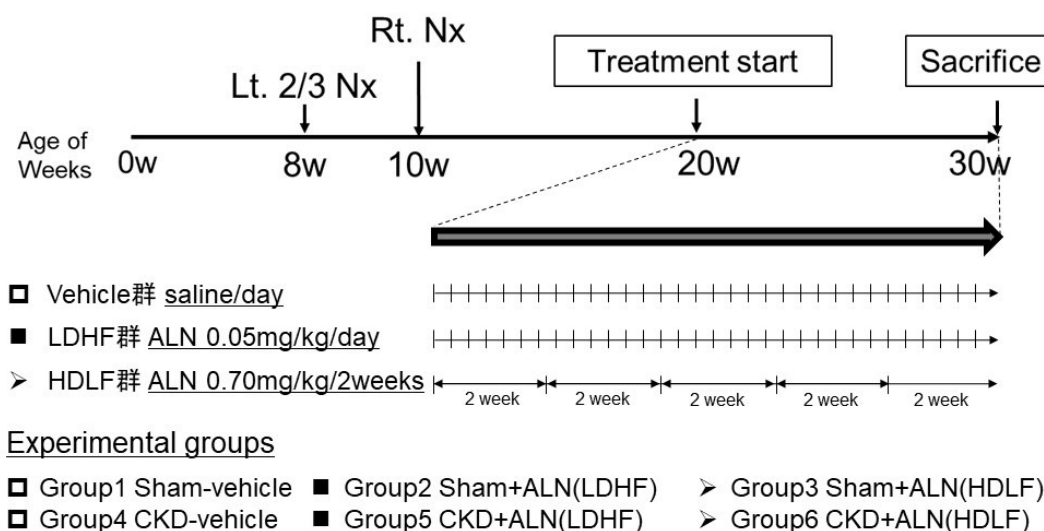


図 6. 治療スケジュール (研究デザイン)

血清電解質の測定

治療開始前と終了時の差を見るために, 20 週齢から 10 週間投薬後の 30 週齢の時点で麻酔下に内頸動脈採血を行った。採取した動脈血は遠心分離機で 4°C, 3000rpm で 5 分遠心し, 血清のみを抽出した。

血清電解質(Ca, P)と腎機能(BUN, CRE)測定をオリエンタル酵母工業株式会社長浜ライフサイエンスラボラトリー (滋賀, 日本) に委託検査を依頼した。

マイクロ CT

右大腿骨, および第 5 腰椎をマイクロ CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて 1 ピクセルあたり 20 μm の解像度で撮影した. 骨微細構造や 3 次元的骨形態計測の解析はアメリカ骨代謝学会のガイドラインに従い, ラトック社の骨量解析ソフト TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan)を用いて行った(Bouxsein et al., 2010). 大腿骨の測定関心領域は成長板から 500 μm 近位の 2000 μm の範囲とし, 第 5 腰椎の測定関心領域は上端と下端の成長板までの間の海綿骨領域とした.

海綿骨領域の評価の指標として骨密度(volumetric bone mineral density: vBMD), 骨量 (Bone Volume/ Tissue Volume: BV/TV), 骨梁幅(Trabecular Thickness: TbTh), 骨梁数 (Trabecular Number: TbN)を算出した.

力学試験

マイクロ CT 撮像後右の大腿骨および第 5 腰椎を力学試験に供した. 右大腿骨遠位骨幹端部, および第 5 腰椎を 5 mm の厚さに平行に切除し, 万能力学試験器 (RTC-1310, AND Corp., Tokyo, Japan)を用いて圧縮試験を行った(Thomsen et al., 1999). 大腿骨の遠位部, 椎体の底面を治具の底面に固定し, 上方から垂直に圧縮力がかかるように設置した. 押し込みは 1.0 mm/min の速度で破壊するまで行った. 破断強度 (N), 剛性 (N/mm), 吸収エネルギー (J)を強度-変位曲線より算出した.

組織学的検討

左大腿骨を 70 %エタノールで 3 日間浸漬固定した後, Villaneuva Bone 染色を行い, 非脱灰硬組織標本作製した. 安楽死させる 10 日前, 3 日前にカルセイン(20 mg/kg ; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) をそれぞれ皮下投与し, 骨形成を観察するための骨標識を行った. 非脱灰硬組織標本の作製は新潟骨の科学研究所(新潟, 日本)で行った.

Villaneuva Bone 染色は非脱灰骨組織標本の染色法として用いられ, 類骨や石灰化骨の観察に適している. また, カルセインやテトラサイクリンで標識する事により, 骨形成の動的な指標の測定が可能である. 以下に標本の作製方法の概略を述べる.

摘出した大腿骨を 70 %エタノールで固定後, Villaneuva Bone Stain に 4 日間浸透させる. Villaneuva Bone stain の調整は以下の通りである.

Azull III.5 g

酢酸 Na 三水和物 13.6 g

ベーシックフクシン 5 g

Fast Green FCF1.5 g

Orange G3.75 g

95 %エタノール 100 ml

酢酸 6 ml

蒸留水 900 ml

染色後、エタノールで脱水し、メチルメタクリレートモノマー樹脂に包埋し、30-40 °Cで約 10 日間重合させる。出来上がったブロックを成型し、ミクロトームを用いて厚さ 5 μ m の薄切切片を切り出し、封入する。

骨切り周囲の仮骨の組織量、骨量、類骨量、骨面、骨芽細胞数、骨芽細胞面、類骨面、浸食面、類骨幅、カルセインで標識された面、標識幅、一重標識面、二重標識面を測定した。得られたパラメータから、破骨細胞数/骨面、骨吸収面/骨面、骨芽細胞面、骨石灰化速度、骨形成速度/骨面、骨石灰化面/骨面、骨石灰化遅延時間、一重標識面/骨面、二重標識面/骨面を算出した(Dempster et al., 2013)。

フーリエ変換型赤外分光(FTIR)イメージング

FTIR イメージングを用いて骨の組成の変化を解析した。組織形態学的評価用に作成した左大腿骨の厚さ 3 μ m の冠状断未脱灰薄切切片をフッ化バリウム基板(ピアオプティックス) にマウントし、Spectrum Spotlight 400 Imaging System (Perkin Elmer, MA, USA) により赤外イメージングと赤外スペクトルを得た。骨質解析では、 PO_4^{3-} (1,173 $\sim$ 929 cm^{-1})、Amide I (1,704 $\sim$ 1,604 cm^{-1})バンドの高さや面積を用いて石灰化度(PO_4^{3-} /Amide I)、ミネラル成熟度{ PO_4^{3-} (1030 cm^{-1})/ PO_4^{3-} (1110 cm^{-1})}を大腿骨遠位において測定した(Boskey and Pleshko Camacho, 2007)。

尿検査

30 週齢の時点で採尿ケージにて 3 時間尿を採取して、遠心分離機で 15 分遠心し、上清のみを採取した。尿アルブミン(U-Alb)を ELISA キット(AKRAL-020S, Shibayagi, Gunma, Japan)で測定し、尿クレアチニン(U-Cre)、尿 N アセチルグルコサミニダーゼ(U-NAG)活性をオリエンタル酵母工業株式会社長浜ライフサイエンスラボラトリー (滋賀, 日本) に委託検査を依頼した。

腎病理

左腎臓を 4%パラホルムアルデヒドで固定、3 μ m で切り出して、エラスチカマッソン染色で染色した。エラスチカマッソン染色は線維化した間質障害領域を青く染色する為、薬剤性間質障害の程度をエラスチカマッソン染色領域/全面積で算出した(Yamamoto et al., 2017)。エラスチカマッソン染色領域は WinROOF イメージソフトウェア(Mitani Corporation, Tokyo, Japan)を用いて測定した。腎機能障害の程度を表す指標として面積あたりの糸球体の数も算出した(Nyengaard, 1993)。

統計分析

30 週時点での血清学的検査, 尿検査, 力学検査, マイクロ CT 検査, 骨形態計測検査は 2 元配置分散分析(Two-way ANOVA)を用いて評価した. Sham 群および CKD 群の中での群間検定には Tukey's post hoc test を用いて, Sham 群および CKD 群の群間検定には Bonferroni's post hoc test を用いた. また CKD 群における CRE の 20 週時点と 30 週時点での比較を行うために繰り返しのある 2 元配置分散分析を用いて評価をした. FTIR 検査の結果は Kruskal-Wallis test を用いて評価した. 判定は P 値<0.05 で有意差ありとした. データは mean±SD で表した.

実験結果

アレンドロネートが CKD stage 4 ラットの骨量と骨微細構造に与える影響

マイクロ CT を用いて、大腿骨遠位部と第 5 腰椎の骨量と骨微細構造の変化を評価した (図 7)。

大腿骨遠位部では CKD も ALN の投与も海綿骨の骨量(Bone Volume/ Tissue Volume: BV/TV), 骨梁幅(Trabecular thickness: TbTh), 及び骨梁数(Trabecular number: TbN)に有意に影響を与えているという結果となった。また ALN の投与は海綿骨骨密度(volumetric bone mineral density: vBMD)を Sham 群, CKD 群のグループ内において有意に増加させた。vBMD, BV/TV, TbTh, 及び TbN のいずれのパラメータにおいても CKD-LDHF 群, CKD-HDLF 群はいずれも CKD-vehicle 群と比べて有意に CKD に伴う骨質劣化の改善を認めたものの, CKD-LDHF 群と CKD-HDLF 群の間には統計学的有意差を認めなかった。また, CKD と ALN による治療における統計学的に有意な相互作用を BV/TV 及び TbTh に認めた。CKD も ALN の投与もその他の皮質骨パラメータを含む骨微細構造に統計学的に有意な変化をもたらさなかった。ALN が大腿骨遠位部の海綿骨に与える効果は Sham とラットと比して CKD ラットで有意に大きかったが, LDHF 投与と HDLF 投与の間に差は認めなかった。

第 5 腰椎では CKD も ALN の投与も vBMD 及び BV/TV に有意に影響を与えているという結果となった。CKD ラットでは Sham ラットと比して有意に vBMD 及び BV/TV が低かった。また, CKD-LDHF 群と CKD-HDLF 群は共に有意に CKD-vehicle 群より BV/TV が高かった。しかし CKD-LDHF 群と CKD-HDLF 群における統計学的有意差は認めなかった。

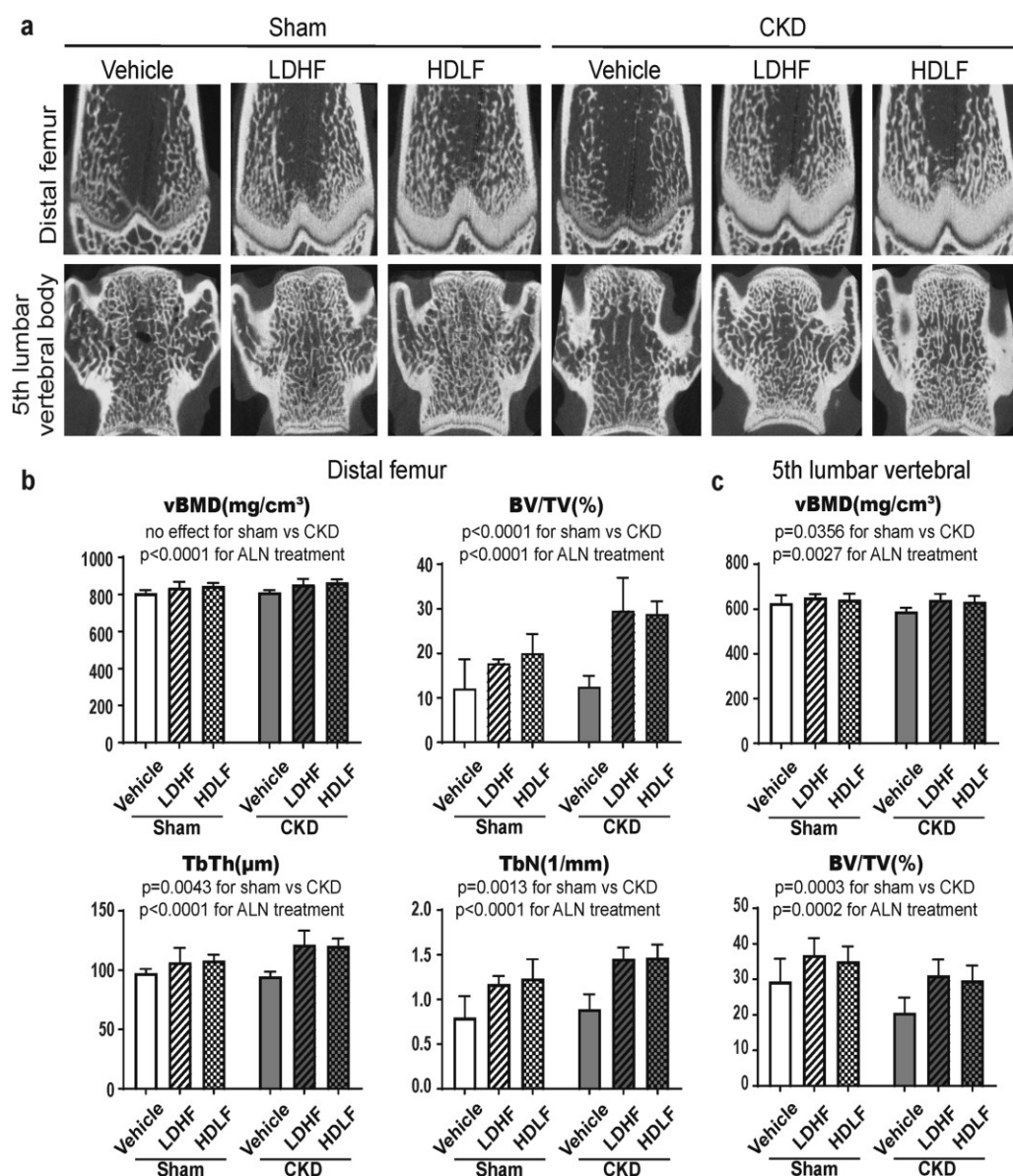


図 7. 骨量、骨微細構造の評価

各群 n=6. a) 30 週齢時の大腿骨遠位および第 5 腰椎のマイクロ CT イメージ. b) 大腿骨遠位部の骨量及び骨微細構造パラメータ c) 第 5 腰椎の骨量及び骨微細構造パラメータ

アレンドロネートが CKD stage 4 ラットの力学的特性に与える影響

ALN によって CKD stage 4 ラットの骨の強度がどのように変化するかを大腿骨遠位骨幹端部及び第 5 腰椎の圧縮試験を用いて評価した(図 8).

大腿骨遠位骨幹端部圧縮試験では CKD 群の最大荷重 (Ultimate load), 剛性 (Stiffness), 吸収エネルギー (Energy to failure)のいずれの項目でも Sham 群と同等であった. ALN の効果は Sham 群の中では認めなかったが, CKD 群の中では Ultimate load,

Stiffness, Energy to failure のいずれのパラメータでも認めた。ALN の投与により Ultimate load は CKD-LDHF と CKD-HDLF 群で CKD-vehicle 群より有意に高かった。また CKD-HDLF 群は Stiffness が CKD-vehicle 群と比して有意に高かった。いずれのパラメータにおいても CKD-LDHF 群と CKD-HDLF 群の間に有意差は認めなかった(図 8A)。

第 5 腰椎圧縮試験の結果では CKD による影響は Ultimate load, Stiffness, Energy of failure のいずれでも認めなかったが, ALN の投与による影響を Ultimate load で認め, CKD-LDHF 群と CKD-HDLF 群はいずれも CKD-vehicle 群と比して有意に Ultimate load が高かった。ALN による治療効果と CKD による相互作用はいずれのパラメータでも認めなかった(図 8B)。

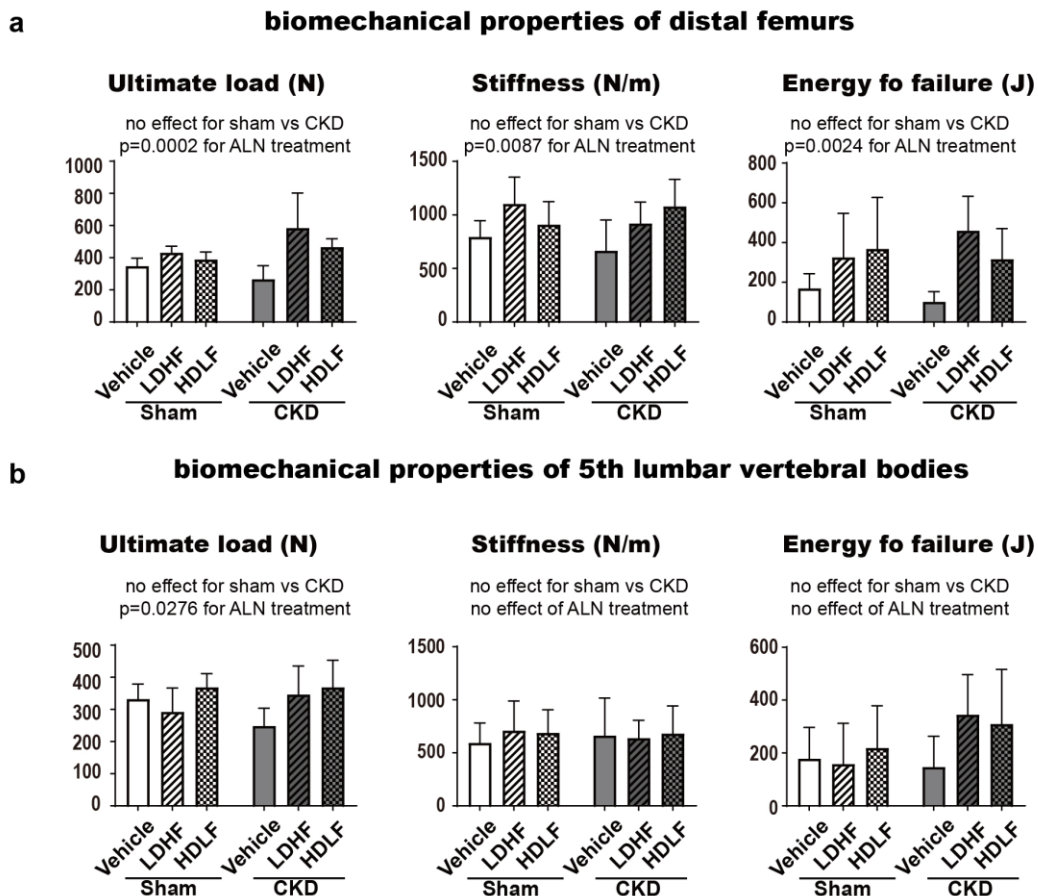


図 8. ALN の CKD stage 4 ラットにおける大腿骨遠位骨幹端部及び第 5 腰椎の力学的特性に対する影響の評価

各群 n = 6. a) 大腿骨遠位骨幹端部圧縮試験の結果。CKD の影響は最大荷重(Ultimate load), 剛性(Stiffness), 吸収エネルギー(Energy to failure)のいずれの項目でも認めず, ALN による影響をすべてのパラメータで認めた。b) 第 5 腰椎圧縮試験の結果。CKD の影響はいずれのパラメータでも認めなかったが, ALN による影響を Ultimate load でのみ認めた。

アレンドロネートが CKD stage 4 ラットの腎機能に与える影響

ALN によってラットの腎機能がどのように変化するかを血清学的検査, 尿検査, 腎病理を用いて評価した (図 9, 10)

病理検査においては腎機能障害の程度を示す面積あたりの糸球体の数でも, 間質障害の程度を示すエラスチカマッソン染色領域においても CKD による影響は認めたものの ALN による影響は認めなかった. 単位面積あたりの糸球体の数では CKD-vehicle の時点で Sham-vehicle と比して有意に少なくなっていたが, ALN の投与による更なる糸球体数の減少は認めなかった. またエラスチカマッソン染色領域に関しても同様に CKD-vehicle の時点で Sham-vehicle と比して有意に全面積に対する染色領域の割合が高かったが ALN の投与による更なる増悪は認めなかった (図 9A,B).

30 週齢時点での尿検査では腎機能障害の指標となる尿アルブミン(U-Alb)/尿クレアチニン(U-Cre)および間質障害の指標となる尿 N アセチルグルコサミニダーゼ活性 (U-NAG) において共に CKD の影響は認めたが, ALN 投与による影響は認めなかった. また CKD-Vehicle 群, CKD-LDHF 群, CKD-HDLF 群の間における統計学的有意差は認めなかった(図 9C).

30 週齢時点での血液生化学検査では CKD 群で Sham 群と比して BUN と CRE が有意に高かったが, CKD-vehicle 群, CKD-LDHF 群, CKD-HDLF 群間における統計学的有意差は認めなかった. また Ca と IP においても CKD-vehicle 群, CKD-LDHF 群, CKD-HDLF 群における統計学的有意差は認めなかった(図 10).

以上の腎病理, 尿検査, 血液生化学検査のいずれの結果でも CKD-vehicle 群は Sham-vehicle 群と比して有意に腎機能の増悪を認めたが, ALN の投与によるさらなる腎機能増悪を LDHF, HDLF の投与方法に関わらず認めなかった.

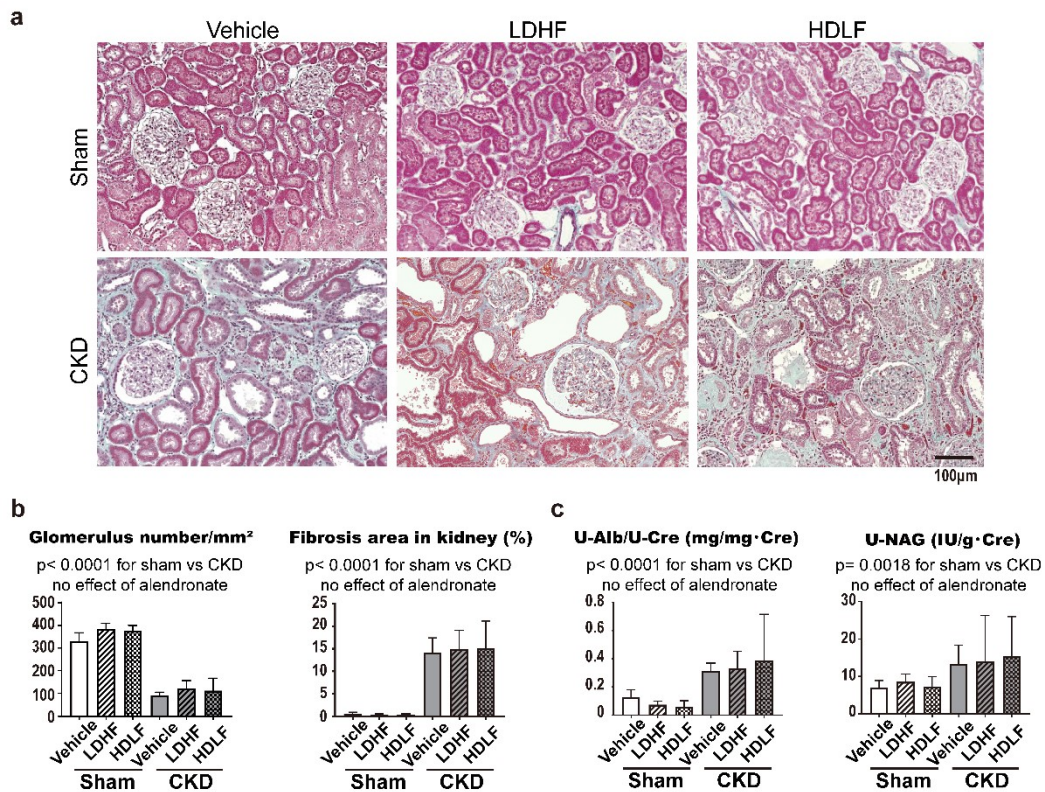


図9. ALN の CKD stage 4 ラットにおける腎機能に対する影響の評価 (腎病理検査・尿検査)

各群 n=6. a) 腎病理のエラスチカマッソン染色. 上段が Sham 群で下段が CKD 群. b) 腎病理の評価. 糸球体の面積あたりの数(Glomerulus number/mm²)およびエラスチカマッソンで染色された間質障害領域 (Fibrosis area in kidney) c) 30 週齢時点での尿検査結果. 腎機能障害の程度を示す U-Alb/U-Cre および間質障害の程度を示す U-NAG といずれの項目でも CKD-vehicle の時点で Sham-vehicle と比して有意な腎機能増悪を認めるが ALN の投与によるさらなる腎機能増悪を認めないという結果となった.

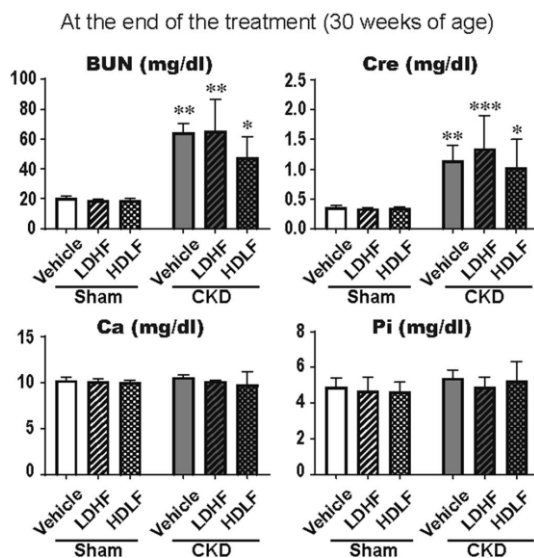


図 10. ALN の CKD stage 4 ラットにおける腎機能に対する影響の評価（血液生化学）

CKD-vehicle の時点で Sham-vehicle と比して有意に BUN, CRE が高値となっていたが、全ての項目において CKD-vehicle, CKD-LDHF, CKD-HDLF 間における統計学的有意差は認めない。

アレンドロネートが CKD stage 4 ラットの骨代謝に対する影響

CKD による骨代謝への影響と薬剤の効果を明らかにするために、我々は投与 10 週間後の大腿骨遠位を用いて組織学的評価を行った。明視野で赤紫色に観察される部分は、骨を作る細胞である骨芽細胞が分泌した類骨であり、類骨は Ca や P などのミネラル成分が沈着して硬い骨に置換される。その際、類骨に取り込まれる Ca にカルセインが結合するため、動物の屠殺前に間隔をあけて投与されたカルセインは、骨が形成されている部分では二重にラベリングされ、その間隔から骨形成の速度を算出することができる。形態計測では骨量 (B.Ar/T.Ar: Bone volume area/ Tissue volume area), 骨吸収パラメータとして吸収面 (E. Pm/B. Pm: Eroded Perimeter/ Bone Perimeter), 骨形成パラメータとして類骨量 (O.Ar/T.Ar: Osteoid volume area/ Bone volume area), 骨芽細胞面 (Ob.Pm/B.Pm: Osteoblast Perimeter/ Bone Perimeter), 骨石灰化速度 (MAR: Mineral Apposition Rate), 骨形成速度 (BFR/BS: Bone Formation Rate/ Bone Surface), 骨石灰化面 (M.Pm/B.Pm: Mineralized Perimeter /Bone Perimeter), 一重標識面/骨面 (sL/BS: Single labeled surface/Bone surface), 二重標識面/骨面 (dL/BS: Double labeled surface/Bone surface), 骨石灰化障害の指標として骨石灰化遅延時間 (Mlt: mineralization lag time) を計測した。得られた結果を二元配置分散分析を用いて評価した (図 11, 12)。

ALN の投与による統計学的に有意な効果を骨量 (B.Ar/T.Ar) で認めた。CKD-LDHF 群において CKD-vehicle 群と比して有意に骨量 (B.Ar/T.Ar) の増加を認めた。Sham-vehicle 群と比較して CKD-vehicle 群は類骨が多くなっており、カルセインの 2 重標識間隔も広がっていることから二次性副甲状腺機能亢進症を反映した高骨代謝回転になっていることがわかった。また、CKD-LDHF 群と CKD-HDLF 群でも類骨量は多くなっており、石灰化遅延時間 (Mlt) も遅いことから石灰化障害が示唆された。また CKD-HDLF 群で CKD-LDHF 群よりさらに有意に Mlt の増加を認めた。Sham-vehicle 群と比べて Sham-LDHF 群および Sham-HDLF 群は共に骨形成 (MAR, BFR/B. Pm, M. Pm/B. Pm) および骨吸収 (E. Pm/B. Pm) が低下していたが、Sham-LDHF 群と Sham-HDLF 群における統計学的有意差は認めなかった。その一方で CKD 群では CKD-vehicle 群と比べて CKD-LDHF 群と CKD-HDLF 群は共に骨形成 (MAR, BFR/B. Pm, M. Pm/B. Pm) および骨吸収 (E. Pm/B. Pm) が統計学的に有意に低下していたが、CKD-HDLF 群は CKD-

LDHF 群と比べてもさらに骨形成 (MAR, BFR/B. Pm, M. Pm/B. Pm) および骨吸収 (E. Pm/B. Pm) が統計学的に有意に低下していた。

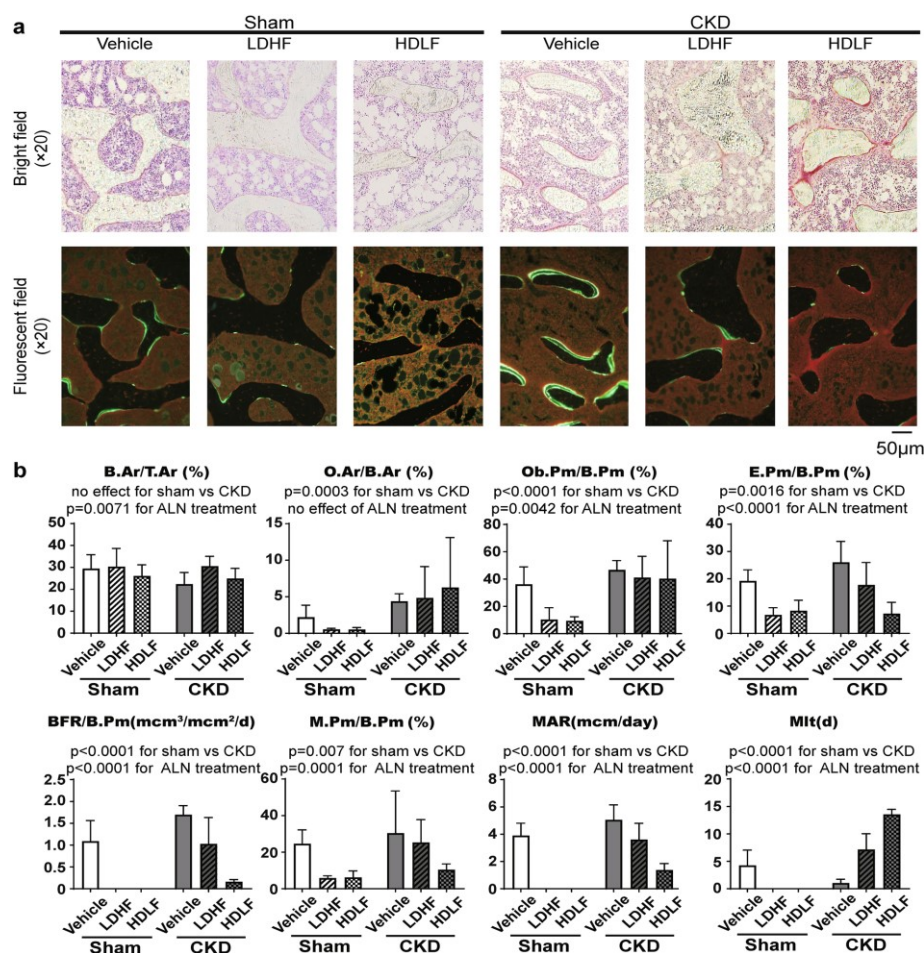


図 11. 大腿骨遠位の組織を用いた骨形態計測結果

各群 n=6. a) ビラヌーバ染色における冠状断像 (上段: 自然光, 下段: 蛍光). b) 骨形態計測結果.

Vehicle 群は二次性副甲状腺機能亢進症を反映した高骨代謝回転となっていた. CKD-LDHF, CKD-HDLF 群は共に CKD に伴う高骨代謝回転を抑制していたが, CKD-HDLF 群は CKD-LDHF 群よりもさらに有意に骨代謝回転を抑制していた.

	Sham-vehicle	Sham-LDHF	Sham-HDLF	CKD-vehicle	CKD-LDHF	CKD-HDLF
sL/BS (%)	15.07 ± 6.28	11.67 ± 2.46	12.4 ± 7.14	12.42 ± 1.95	18.16 ± 5.85	18.16 ± 5.85
dL/BS (%)	17.11 ± 7.68	0	0	39.41 ± 4.30*	20.87 ± 13.28 [†]	7.61 ± 1.50 ^{‡§}

* $P < 0.0001$, Sham-vehicle vs CKD-vehicle

[†] $P < 0.001$, Significant difference compared to CKD-vehicle

[‡] $P < 0.0001$, Significant difference compared to CKD-vehicle

[§] $P < 0.0001$, Significant difference compared to CKD-LDHF

図 12. 大腿骨遠位の組織を用いた骨形態計測結果

一重標識面/骨面 (sL/BS) と二重標識面/骨面 (dL/BS)

CKD-LDHF 群, CKD-HDLF 群は共に有意に dL/BS が CKD-vehicle 群と比して低下しているが, CKD-HDLF 群は CKD-LDHF 群よりもさらに低下している

アレンドロネートが CKD stage 4 ラットの骨質に与える影響

骨の材質を可視化する手法である FTIR イメージングを用いて, 骨質への影響を評価した. 大腿骨遠位の海綿骨と皮質骨を用いて骨質のパラメータである石灰化度 ($\text{PO}_3^{4-}/\text{Amide I}$) とミネラル成熟度 $\{\text{PO}_4^{3-}(1030 \text{ cm}^{-1})/\text{PO}_4^{3-}(1110 \text{ cm}^{-1})\}$ を計測した. CKD-vehicle 群は海綿骨において Sham-vehicle 群と比べて石灰化度が低下しており, CKD による高骨代謝回転を反映した結果と考えられた. CKD-LDHF 群, CKD-HDLF 群は共に海綿骨における石灰化度, ミネラル成熟度が CKD-vehicle 群と比して亢進していたが, CKD-HDLF 群は CKD-LDHF 群よりもさらに海綿骨における石灰化度とミネラル成熟度が亢進していたことから骨形態計測から得られた骨代謝回転のデータと矛盾しない結果となった. 皮質骨においては石灰化度, ミネラル成熟度はともに CKD-HDLF 群と CKD-LDHF 群の間に有意差は認めなかった (図 13).

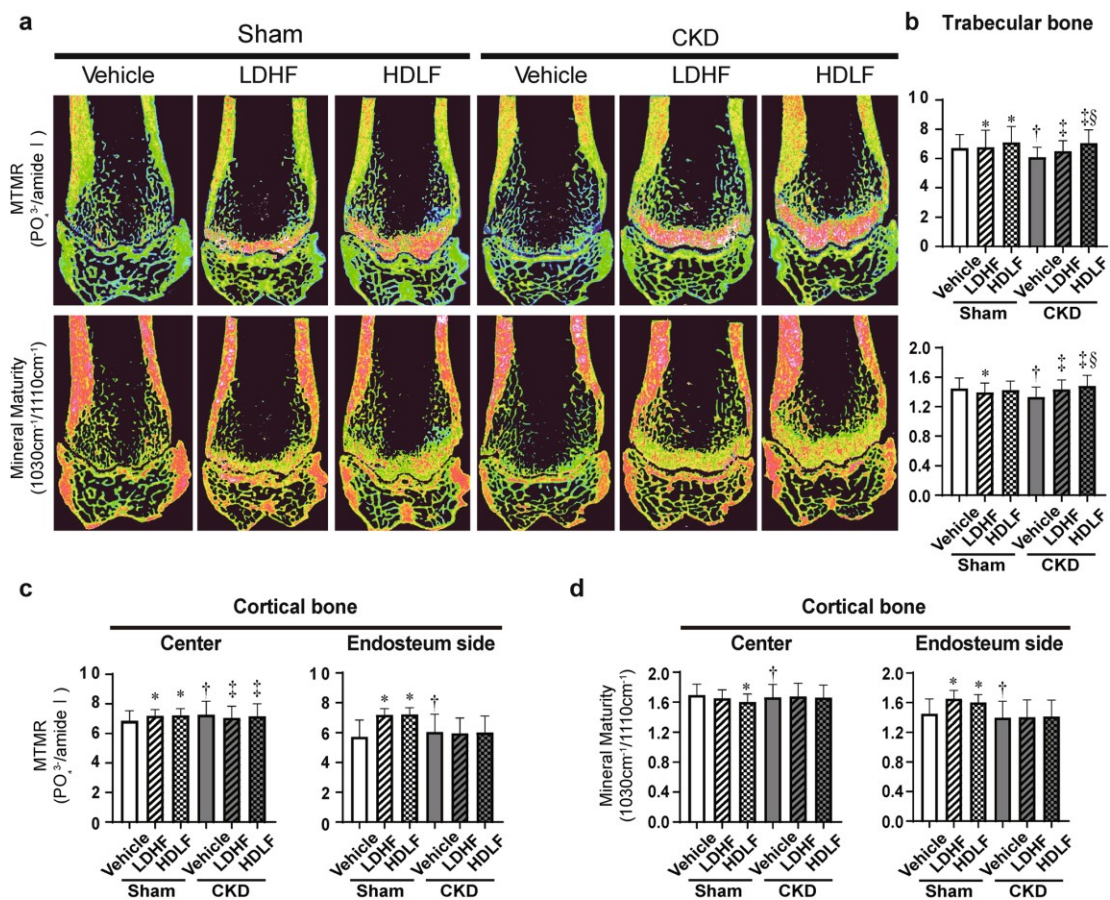


図 13. 大腿骨遠位の組織を用いたフーリエ変換型赤外分光(FTIR)イメージングによる骨質評価

各群 n=6. a) 大腿骨遠位部の石灰化度 (上段) とミネラル成熟度 (下段) を表す FTIR イメージ像.

b, c, d) 海綿骨と皮質骨における定量的な解析結果. 海綿骨において CKD による石灰化度とミネラル成熟度の低下が認められた. CKD 群では ALN 投与により石灰化度とミネラル成熟度が増加し, CKD-HDLF 群は CKD-LDHF 群よりもさらに有意に石灰化度とミネラル成熟度が増加した.

*Indicates significant differences between Sham-vehicle (Dunn's multiple comparison test; $*P < 0.05$).

†Indicates significant differences between the sham-vehicle and CKD-vehicle groups (Dunn's multiple comparison test; $†P < 0.01$).

‡Indicates significant differences between the CKDvehicle group (Dunn's multiple comparison test; $‡P < 0.01$).

§Indicates the significant differences between the CKD-LDHF group (Dunn's multiple comparison test; $§P < 0.01$).

Values shown are the mean $\pm$ SD

考 察

本章の目的は進行期 CKD を伴う骨粗鬆症患者に対する BP 製剤の投与において LDHF 製剤と HDLF 製剤のどちらが適切かを明らかにすることである。本研究結果で解析を行った CKD モデルラットは、高骨代謝回転の CKD stage 4 に相当する進行期 CKD モデルである。

本研究ではまず ALN の LDHF 投与と HDLF 投与が CKD stage 4 ラットの骨に与える影響の違いに着目した。腎機能正常ラットでは ALN の LDHF 投与と HDLF 投与は骨量および骨代謝回転に与える影響に差がなかったのに対して、CKD stage 4 ラットでは ALN の HDLF 投与は LDHF 投与に比べて有意に骨代謝回転を抑制しているという結果となった。5/6 腎摘によって作成された CKD stage 4 ラットは SHPT に伴い、高骨代謝回転になっており Sham ラットと比べて石灰化度が低下していた。ALN の LDHF 投与、HDLF 投与は共に CKD stage 4 ラットの石灰化度を増加させたが、HDLF 投与で LDHF 投与よりもさらに統計学的に有意に石灰化度を増加させた。また力学試験において CKD stage 4 ラットに対する ALN の LDHF 投与と HDLF 投与による骨強度に与える影響に統計学的有意差は認めなかったものの、HDLF 投与により剛性が有意に増加したのに対して、LDHF 投与では増加を認めなかった。このように CKD stage 4 ラットに対する ALN の投与は HDLF 投与の方が LDHF 投与と比してより高骨代謝回転を抑制したことから CKD stage 4 に対する ALN の投与は HDLF 製剤の方が骨に与える影響の側面からは適している可能性が示唆された。しかし、この ALN の HDLF 投与による骨代謝回転の抑制は SSBT と捉えることもできる。SSBT はマイクロダメージの蓄積や石灰化度の増加のため非定型大腿骨骨折のリスクと報告されているため、更なる研究が必要と考える。

次に我々は ALN の LDHF 投与と HDLF 投与が CKD stage 4 ラットの腎機能に与える影響を調査した。我々の予想では薬剤性腎機能障害は“一回投与量”と“投与速度”に規定されるため、HDLF 投与の方が LDHF 投与よりも腎機能障害をきたす可能性が高いと考えていた。しかし、腎病理、血液生化学検査、尿検査のいずれでも、進行期 CKD ラットに対する ALN の投与は LDHF 投与も HDLF 投与も共にさらなる腎機能障害をきたさないという結果となった。もっとも、本研究で用いた CKD stage 4 ラットは CKD-LDHF 群と CKD-HDLF 群のみならず CKD-vehicle 群も 20 週から 30 週にかけて腎機能が増悪していたモデルであったということには留意するべきではある(図 14)。我々のこの結果は近年の臨床研究の報告と合致する(Jamal et al., 2007, Miller et al., 2005)。ALN を閉経後骨粗鬆症患者に対して 5mg/day で 2 年、そして 3 年目は 10mg/day で投

与された大規模臨床試験である FIT 試験では進行期 CKD の中で eGFR が 15 mL/min まで低下した患者においても ALN の投与による腎機能障害は認めなかったと報告されている。また BP 製剤による薬剤性腎機能障害は一回投与量と投与速度だけでなく BP 製剤の種類にも起因するとされている。BP 製剤はその種類によって蛋白結合率と腎組織の半減期 (renal tissue half-life) が異なることが報告されており (Miller et al., 2013, Perazella and Markowitz, 2008, Pfister et al., 2003), ラットモデルにおいてゾレドロン酸の renal tissue half-life が 150-200 日なのに対して, イバンドロネートの renal tissue half-life は約 24 日と報告されている (Pfister et al., 2003, Body et al., 2005)。BP 製剤の腎組織における半減期が短ければ腎細胞内における BP の濃度を低く保つことができ腎毒性を防げる可能性が示唆されている。以上のことを踏まえて本研究結果から CKD stage 4 に対する ALN の投与は投与方法に関わらず腎機能障害をきたさない可能性が示唆されるが, ALN 以外の BP 製剤の CKD stage 4 に対する安全性に関してはさらなる研究が必要だと考えられる。

本研究では, CKD stage 4 ラットの方が Sham ラットと比べても有意に ALN の投与により骨量増加および骨強度の増加を認めた。この理由としては ALN の投与が CKD stage 4 ラットの SHPT に伴う高骨代謝回転により効果的であった可能性や ALN の腎排泄率が低下している CKD stage 4 ラットの方が結果として骨への沈着率が腎機能正常ラットよりも高かった可能性などがあげられる (Swallow et al., 2018)。本研究結果より CKD stage 4 に伴う骨粗鬆症患者に対する BP 製剤の必要量と閉経後骨粗鬆症患者に対する BP 製剤の必要量が異なる可能性も示唆された。また, 本研究結果で用いた 5/6 腎摘出モデルラットは SHPT に伴う高骨代謝回転モデルであることから, 本研究結果は CKD stage 4 患者の中でも高骨代謝回転をきたす患者にのみ参考となる結果である。実臨床では進行期 CKD に伴う腎性骨症にも様々なタイプがあり, SHPT に伴う高骨代謝回転をきたす繊維性骨炎タイプや, 低骨代謝回転をきたす無形成骨タイプ, 混合型腎性骨症のように高骨代謝回転と石灰化障害を伴う繊維性骨炎と骨軟化症の混合型タイプなど存在する。

本研究の限界点として, 第一には進行期 CKD に対する ALN の投与は結局 LDHF 投与と HDLF 投与のどちらが適切かは本研究のみでは結論できない点が挙げられる。HDLF の方が高骨代謝回転を有意に抑制した一方で, SSBT を来している可能性もあるため長期投与では LDHF 投与の方がより適している可能性もある。第二に本研究結果では骨のサンプル数の問題から骨質評価の一種である材料特性のさらなる評価が行えていない点が挙げられる。ALN は HDLF 投与の方が LDHF 投与と比べて進行期 CKD ラットの大腿骨の石灰化度を亢進した一方で, 力学試験では傾向はあったものの

CKD-LDHF 群と CKD-LDHF 群に有意差は認めなかった。骨質評価として非破壊性試験の一種であるナノインデンテーション試験などを用いれば材質特性の差が認められる可能性がある。第三に本研究では ALN の LDHF 投与と HDLF 投与間における骨沈着率や尿排泄率を直接確認していないことが挙げられる。過去の報告でも用いられている放射性同位元素で標識された ALN を用いることで ALN の LDHF 投与と HDLF 投与の骨代謝における差をより直接的に観察できる可能性がある(Tower et al., 2014, Jacobs et al., 2009)。そして最後に本研究では進行期 CKD の主要な合併症である血管石灰化に対して ALN の LDHF 投与と HDLF 投与のどちらが石灰化抑制効果があるかを評価していない点が挙げられる。本研究で用いた CKD stage 4 ラットは高 P 血症を来していたが、大動脈のマイクロ C T を撮影しても血管の石灰化病変は認められなかった。これは本研究で用いた CKD stage 4 ラットの餌が高 P 食ではなかったことによる可能性がある。

本章の研究をまとめると、骨代謝回転の亢進を伴う進行期 CKD stage 4 ラットの骨粗鬆症に対する治療として、ALN の投与は LDHF 投与、HDLF 投与に関わらず腎機能障害をきたさず、骨への有効性を認めた。また、CKD stage 4 に対する ALN の投与は HDLF 投与が LDHF 投与よりもより骨代謝回転を抑制し、石灰化度を増加させたことから、CKD stage 4 を伴う高骨代謝回転型の骨粗鬆症患者には HDLF 投与の方が LDHF 投与よりも適している可能性が示唆された。

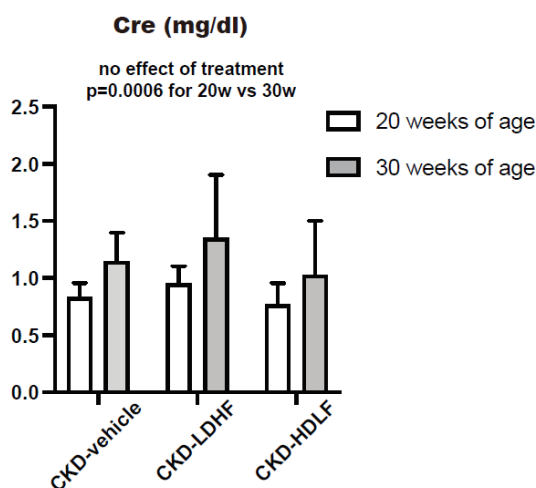


図 13. CKD 群における血清 CRE の 20 週齢と 30 週齢時点での縦断的变化

20 週齢と 30 週齢における統計学的有意差は認めるが, ALN 投与による CRE のグループ間の有意差は認めない.

総括および結論

- SHPT による高骨代謝回転状態にある CKD stage 4 ラットに対する ALN 投与は LDHF 投与と HDLF 投与は共に骨量、骨強度の増加を認め、腎機能障害もきたさなかった。
- SHPT による高骨代謝回転状態にある CKD stage 4 ラットに対する ALN の投与は、HDLF 投与で LDHF 投与より高骨代謝回転の抑制を認め、石灰化度の亢進を認めた。
- 本研究結果から進行期 CKD を伴う高骨代謝回転型の骨粗鬆症患者に対する ALN 投与は骨代謝回転および石灰化度の観点から LDHF 投与より HDLF 投与の方が優れている可能性が示唆された。

本研究は、進行期 CKD を伴う骨粗鬆症患者に対する ALN の適切な投与方法を骨への有効性および腎機能障害に焦点を当て、CKD stage 4 ラットモデルを用いて検討した。総投与量は同じでも、一回投与量と投与頻度が異なる低用量高頻度(LDHF)製剤と高用量低頻度(HDLF)製剤が実臨床では存在するが、本研究結果では進行期 CKD でも ALN の投与は LDHF 製剤も HDLF 製剤も腎機能障害をきたさず、骨量、骨強度の増加に有効である可能性が示唆された。また、本研究結果では HDLF 製剤の方が LDHF 製剤と比して有意に骨代謝回転を抑制し、石灰化度の亢進をきたしたことから、進行期 CKD を伴う高骨代謝回転型骨粗鬆症患者に対する ALN の投与は HDLF 製剤の方が LDHF 製剤と比べてより適している可能性が示された。

実臨床において骨粗鬆症治療は長期に渡り、休薬できる患者はわずかである。本研究ではヒト換算で 5 年程度に相当する 10 週間の ALN 投与をラットに施行したが、HDLF 製剤では SSBT を来している可能性も示唆された。進行期 CKD を伴う高骨代謝回転型骨粗鬆症患者に対する ALN の長期投与において HDLF 製剤と LDHF 製剤のどちらが適しているかはさらなる検討が必要であると考えられる。

CKD-MBD では骨の異常や検査値の異常を是正するだけでなく、血管石灰化の予防や治療も重要であるが、本研究では血管の異所性石灰化などは評価していない。BP 製剤において HDLF 製剤と LDHF 製剤が石灰化におよぼす影響は非常に興味深いところであり、CKD ステージ 4 の患者における BP(HDLF), BP(LDHF)製剤が、心血管組織にどのように影響するかについても今後の研究課題である。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究院 専門医学系部門 機能再生医学分野 整形外科学教室博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授 岩崎倫政先生に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、腎機能評価の解釈および手法にご助言・ご指導頂いた北海道大学大学院医学研究院 免疫代謝内科学教室助教 中沢大悟先生、骨質の材質特性の測定および解釈にご助言・ご指導頂いた千歳科学技術大学理工学部 応用生物学科 木村-須田廣美教授、に深い感謝の意を表します。

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院 専門医学系部門 機能再生医学分野 整形外科学教室准教授の高畑雅彦先生をはじめ、整形外科学分野の諸先生方、研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます。

利益相反

なし

引用文献

Alem, A.M., Sherrard, D.J., Gillen, D.L., Weiss, N.S., Beresford, S.A., Heckbert, S.R., Wong, C., and Stehman-Breen, C. (2000). Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 58, 396-399.

Body, J.J., Pfister, T., and Bauss, F. (2005). Preclinical perspectives on bisphosphonate renal safety. *Oncologist* 10 Suppl 1, 3-7.

Boskey, A., and Pleshko Camacho, N. (2007). FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials* 28, 2465-2478.

Bouxsein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B.A., Guldberg, R.E., Jepsen, K.J., and Muller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25, 1468-1486.

Dempster, D.W., Compston, J.E., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R., and Parfitt, A.M. (2013). Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 28, 2-17.

Dhingra, R., Sullivan, L.M., Fox, C.S., Wang, T.J., D'Agostino, R.B., Sr., Gaziano, J.M., and Vasan, R.S. (2007). Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med* 167, 879-885.

Diniz, H., and Frazao, J.M. (2013). The role of fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Nefrologia* 33, 835-844.

Ensrud, K.E., Ewing, S.K., Taylor, B.C., Fink, H.A., Stone, K.L., Cauley, J.A., Tracy, J.K., Hochberg, M.C., Rodondi, N., Cawthon, P.M., *et al.* (2007a). Frailty and risk of falls, fracture, and mortality in older women: the study of osteoporotic fractures. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62, 744-751.

Ensrud, K.E., Lui, L.Y., Taylor, B.C., Ishani, A., Shlipak, M.G., Stone, K.L., Cauley, J.A., Jamal, S.A., Antonucci, D.M., Cummings, S.R., *et al.* (2007b). Renal function and risk of hip and

vertebral fractures in older women. *Arch Intern Med* 167, 133-139.

Fukagawa, M., Hamada, Y., Nakanishi, S., and Tanaka, M. (2006). The kidney and bone metabolism: Nephrologists' point of view. *J Bone Miner Metab* 24, 434-438.

Gansevoort, R.T., de Zeeuw, D., and de Jong, P.E. (1995). Additive antiproteinuric effect of ACE inhibition and a low-protein diet in human renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 10, 497-504.

Group, K.D.I.G.O.K.C.-M.W. (2009). KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl*, S1-130.

Handu, D., Moloney, L., Wolfram, T., Ziegler, P., Acosta, A., and Steiber, A. (2016). Academy of Nutrition and Dietetics Methodology for Conducting Systematic Reviews for the Evidence Analysis Library. *J Acad Nutr Diet* 116, 311-318.

Isakova, T., Wahl, P., Vargas, G.S., Gutierrez, O.M., Scialla, J., Xie, H., Appleby, D., Nessel, L., Bellovich, K., Chen, J., *et al.* (2011). Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int* 79, 1370-1378.

Jacobs, S.A., Harrison, A.M., Swerdlow, S.H., Foon, K.A., Avril, N., Vidnovic, N., Joyce, J., DeMonaco, N., and McCarty, K.S. (2009). Radioisotopic localization of (90)Yttrium-ibritumomab tiuxetan in patients with CD20+ non-Hodgkin's lymphoma. *Mol Imaging Biol* 11, 39-45.

Jamal, S.A., Bauer, D.C., Ensrud, K.E., Cauley, J.A., Hochberg, M., Ishani, A., and Cummings, S.R. (2007). Alendronate treatment in women with normal to severely impaired renal function: an analysis of the fracture intervention trial. *J Bone Miner Res* 22, 503-508.

Jamal, S.A., Gilbert, J., Gordon, C., and Bauer, D.C. (2006). Cortical pQCT measures are associated with fractures in dialysis patients. *J Bone Miner Res* 21, 543-548.

Kanis, J.A. (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 4,

368-381.

KDIGO (2013). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* 3.

Ketteler, M. (2011). Phosphate Metabolism in CKD Stages 3-5: Dietary and Pharmacological Control. *Int J Nephrol* 2011, 970245.

Lin, J.H. (1996). Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 18, 75-85.

Matsuo, S., Imai, E., Horio, M., Yasuda, Y., Tomita, K., Nitta, K., Yamagata, K., Tomino, Y., Yokoyama, H., and Hishida, A. (2009). Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis* 53, 982-992.

Melamed, M.L., and Thadhani, R.I. (2012). Vitamin D therapy in chronic kidney disease and end stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 7, 358-365.

Miller, M.A., Chin, J., Miller, S.C., and Fox, J. (1998). Disparate effects of mild, moderate, and severe secondary hyperparathyroidism on cancellous and cortical bone in rats with chronic renal insufficiency. *Bone* 23, 257-266.

Miller, P.D. (2014). Bone disease in CKD: a focus on osteoporosis diagnosis and management. *Am J Kidney Dis* 64, 290-304.

Miller, P.D., Jamal, S.A., Evenepoel, P., Eastell, R., and Boonen, S. (2013). Renal safety in patients treated with bisphosphonates for osteoporosis: a review. *J Bone Miner Res* 28, 2049-2059.

Miller, P.D., Roux, C., Boonen, S., Barton, I.P., Dunlap, L.E., and Burgio, D.E. (2005). Safety and efficacy of risedronate in patients with age-related reduced renal function as estimated by the Cockcroft and Gault method: a pooled analysis of nine clinical trials. *J Bone Miner Res* 20, 2105-2115.

Moe, S., Drueke, T., Cunningham, J., Goodman, W., Martin, K., Olgaard, K., Ott, S., Sprague,

S., Lameire, N., and Eknoyan, G. (2006). Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 69, 1945-1953.

Naylor, K.L., McArthur, E., Leslie, W.D., Fraser, L.A., Jamal, S.A., Cadarette, S.M., Pouget, J.G., Lok, C.E., Hodsman, A.B., Adachi, J.D., *et al.* (2014). The three-year incidence of fracture in chronic kidney disease. *Kidney Int* 86, 810-818.

Nickolas, T.L., McMahon, D.J., and Shane, E. (2006). Relationship between moderate to severe kidney disease and hip fracture in the United States. *J Am Soc Nephrol* 17, 3223-3232.

Nyengaard, J.R. (1993). Number and dimensions of rat glomerular capillaries in normal development and after nephrectomy. *Kidney Int* 43, 1049-1057.

Ota, M., Takahata, M., Shimizu, T., Kanehira, Y., Kimura-Suda, H., Kameda, Y., Hamano, H., Hiratsuka, S., Sato, D., and Iwasaki, N. (2017). Efficacy and safety of osteoporosis medications in a rat model of late-stage chronic kidney disease accompanied by secondary hyperparathyroidism and hyperphosphatemia. *Osteoporos Int* 28, 1481-1490.

Perazella, M.A., and Markowitz, G.S. (2008). Bisphosphonate nephrotoxicity. *Kidney Int* 74, 1385-1393.

Pfister, T., Atzpodien, E., and Bauss, F. (2003). The renal effects of minimally nephrotoxic doses of ibandronate and zoledronate following single and intermittent intravenous administration in rats. *Toxicology* 191, 159-167.

Seedor, J.G., Quartuccio, H.A., and Thompson, D.D. (1991). The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res* 6, 339-346.

Svára, F. (2009). Chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD): a new term for a complex approach. *J Ren Care* 35 Suppl 1, 3-6.

Swallow, E.A., Aref, M.W., Chen, N., Byiringiro, I., Hammond, M.A., McCarthy, B.P., Territo, P.R., Kamocka, M.M., Winfree, S., Dunn, K.W., *et al.* (2018). Skeletal accumulation of fluorescently tagged zoledronate is higher in animals with early stage chronic kidney disease. *Osteoporos Int* 29, 2139-2146.

Thomsen, J.S., Mosekilde, L.I., and Gasser, J.A. (1999). Long-term therapy of ovariectomy-induced osteopenia with parathyroid hormone analog SDZ PTS 893 and bone maintenance in retired breeder rats. *Bone* 25, 561-569.

Tower, R.J., Campbell, G.M., Müller, M., Will, O., Glüer, C.C., and Tiwari, S. (2014). Binding kinetics of a fluorescently labeled bisphosphonate as a tool for dynamic monitoring of bone mineral deposition in vivo. *J Bone Miner Res* 29, 1993-2003.

Uchida, S., Taniguchi, T., Shimizu, T., Kakikawa, T., Okuyama, K., Okaniwa, M., Arizono, H., Nagata, K., Santora, A.C., Shiraki, M., *et al.* (2005). Therapeutic effects of alendronate 35 mg once weekly and 5 mg once daily in Japanese patients with osteoporosis: a double-blind, randomized study. *J Bone Miner Metab* 23, 382-388.

Wolf, M., Molnar, M.Z., Amaral, A.P., Czira, M.E., Rudas, A., Ujaszasi, A., Kiss, I., Rosivall, L., Kosa, J., Lakatos, P., *et al.* (2011). Elevated fibroblast growth factor 23 is a risk factor for kidney transplant loss and mortality. *J Am Soc Nephrol* 22, 956-966.

Yamamoto, J., Nishio, S., Hattanda, F., Nakazawa, D., Kimura, T., Sata, M., Makita, M., Ishikawa, Y., and Atsumi, T. (2017). Branched-chain amino acids enhance cyst development in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 92, 377-387.

日本腎臓学会 (2012). CKD 診療ガイド.

日本骨粗鬆学会 (2011). 生活習慣病骨折リスクに関する診療ガイド. ライフサイエンス出版.