

骨粗鬆症に対するビタミンCの効果

塚 本 幾 代 (奈良女子大学生活環境学部教授)

1. 緒 言

高齢化社会を迎え、骨粗鬆症の予防と症状の改善が重要な課題となっている。加齢とともに骨量の減少が起こるが、その病的な変化の代表的なものが骨粗鬆症である。骨粗鬆症は、骨老化の代表的疾患である。ビタミンC欠乏症としては壊血病が代表的なものであるが、骨への影響もまた大きいことが知られている。妊娠時のビタミンC欠乏は胎児の骨形成を阻害し、成人においても骨折修復の阻害遅延を起こすことが知られている¹⁾。しかし、骨老化予防に対してはカルシウムの重要性ばかりが強調され、ビタミンC（アスコルビン酸）の影響については、これまで全く検討されていない。今回、我々はビタミンCの骨形成と骨吸収に対する影響を明らかにすることによって、骨粗鬆症の予防と症状の改善に対するビタミンCの機能を評価し、健康の維持と向上に貢献しようとするものである。

ビタミンCの骨に対する作用機構については、培養細胞を用いた実験が多く行われてきた。マウス骨芽細胞系培養細胞 MC3T3 において、アスコルビン酸欠乏下ではプロコラーゲンのプロリンのハイドロキシル化が起こらず、三重鎖構造を形成できない。そのため細胞外分泌が阻害され、細胞外コラーゲンマトリックス形成が阻害され、骨芽細胞への分化、組織構築に障害がもたらされると報告されている²⁾。MC3T3 は、膜性骨化を行う細胞であるが、一方、内軟骨性骨化に対するビタミンCの影響はトリ軟骨初代培養系を用いて行わ

れた。その結果、コラーゲンのハイドロキシル化阻害剤の存在下でも、ビタミンCによるアルカリホスファターゼの合成量の増加が認められた³⁾。このように、ビタミンCの骨に対する作用機構は、培養細胞系においてもまだ十分に明らかにされていない。さらに、生体の骨 (in vivo bone system) は、いくつかの点で培養細胞系 (culture system) とは異なっている。骨組織では、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞およびそれらの前駆細胞等、種々の細胞が同時に局在しており、ビタミンC欠乏開始時に、既にコラーゲンマトリックスは存在し、骨芽細胞は分化しており、type I collagen, alkaline phosphatase, osteocalcin を発現している。ビタミンC欠乏は、骨にどのようなメカニズムでいつ何を引き起こすのであろうか。生体の骨のレベルでその機構はほとんど明らかにされていない。

ヒトはビタミンCを自ら合成できないが、ラット、マウスは完全な合成酵素群を有しているため、ヒトのようなビタミンC欠乏症状を表さない。1973年牧野らによって発見された ODS ラットは、L-gulonolactone oxidase 遺伝子を欠損しているためビタミンC要求性である⁴⁾。この ODS ラットを用いてビタミンC欠乏のモデル病態を作成することができる。我々は既に、ODS ラットを用いてビタミンC欠乏状態における実験的骨折治癒過程の解析を行った。その結果、ビタミンC欠乏状態において、軟骨細胞の成熟および、新生骨の形成が全く起こらないという組織学的所見を得た。今回、この ODS ラットというビタミンC欠乏の

in vivo bone system を用いて、骨組織におけるビタミンCの作用、ビタミンC欠乏とカルシウム欠乏との相互作用を明らかにするために、ビタミンC欠乏とカルシウム欠乏時の骨代謝の生化学的マーカーを測定し、さらに骨塩量を測定するとともに、骨組織切片を作成し組織学的特徴の観察を行った。

2. 実験方法

2.1 動物

9週齢 ODS 雌ラットをビタミンCを含まない食餌 (C-free Diet) とビタミンCを含む水 (C水 1 mg/ml) で1週間予備飼育をした後、Ovariectomyを行った。Ovariectomyは、飼育終了時の血中エストラジオール量によって確認された。Ovariectomy後、各群4匹ずつ7群にわけ、6週間飼育した。C-free Diet とC水で6週間飼育したものを Control, C-free Diet とC水を与え、その4週間後にビタミンCを含まない水に換え、2週間飼育したものをC2群とした。3週間後にビタミンCを含まない水に換え、3週間飼育したものをC3群、2週間後にビタミンCを含まない水に換え、4週間飼育したものをC4群とした。C-freeのかわりにCaとビタミンCを含まない食餌 (Ca/C-free Diet) を与えて、同様の飼育を行ったものをCa/C2群、Ca/C4群とした。Ovariectomyをした後、Ca/C-free Diet とC水で6週間飼育したものをCa群とした。全実験動物について、定期的に体重測定を行い、飼育終了前の24時間の尿を採取し、尿中のCreatinine, Hydroxyproline の定量を行った。飼育終了後、エーテル麻酔科で開腹し、血液を及び大腿骨・脛骨を採取した。血液は、血漿中のエストラジオール、I型コラーゲン-C-テロペプチド (Pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen : ICTP), アルカ

リホスファターゼ活性、酸ホスファターゼ活性の測定に用いられた。大腿骨・脛骨は、軟X線撮影と骨組織標本作成に用いられた。

2.2 生化学的測定方法

尿中のCreatinineは、クレアチニンテストワコーを用いて、Hydroxyprolineは、Bergman & Loxleyの方法を用いて測定された⁵⁾。

血漿中のICTPは、RIA法によって定量された⁶⁾。アルカリホスファターゼ活性、酸ホスファターゼ活性は、4-ニトロフェニルリン酸を基質として、0.1M ジエタノールアミン (pH 9.8), 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.8) でそれぞれ測定された⁷⁾。Tartrate resistant 酸ホスファターゼ活性 (TRAP) は、16mM 酒石酸ナトリウムの存在下で測られた。アルカリホスファターゼアイソザイムは、セルロースアセテート膜電気泳動法により同定された⁸⁾。

2.3 骨組織切片および組織標本の作成

大腿骨・脛骨は、摘出後4%パラホルムアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で浸漬固定した。エタノール系列で脱水後、クロロホルムで脱脂し、再び加水した組織を0.5MEDTA (pH 7.2) で脱灰した。脱灰後、組織をパラフィンに包埋し、4 μm の切片を作成した。パラフィン切片をヘマトキシリン/エオシン染色し、組織学的特徴を観察した。

2.4 TRAP 染色

パラフィン切片を脱パラフィン後、Diagnostic kit (Acid Phosphatase, leukocyte, Sigma) をもちいて37°C, 30min 反応した。対比染色は、ヘマトキシリンで行った。

3. 結果と考察

3.1 体重および生化学的骨代謝マーカー

(1) 体重変化 Fig. 1に示すように、Ca, Ca/C2, C2, C3群においては、Control群と

同様に順調な体重増加がみられた。しかし、V.C 欠乏 4 週間の群、Ca/C 4、C 4 群においては、V.C 欠乏 2 週間までは Control 群と同様の体重増加を示すものの、3 週以降に、体重減少した (Fig. 1)。

(2) 尿中ヒドロキシプロリン/クレアチニン Table 1 に示すように、Hyp/Cre 比は、C 2、C 3 群において Control 群の約 2 倍に上昇した。この結果は、C 2 と C 3 群においてコラーゲンの分解が増加していることを示唆しているものと考えられる。C 4、Ca、Ca/C 2 群では、Control 群との差異は、認められなかった。しかし、Ca/C 4 群では、尿中 Hyp/Cre 比が有意に減少した。

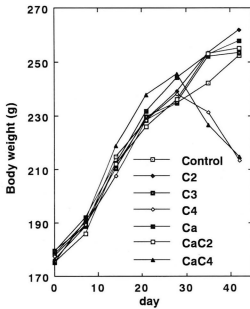


Fig. 1 Weight gain in each group. Each point represents the mean of four rats.

これらの群では、既に分解されるべきコラーゲンが消失しており、新たな形成も阻害されたためと思われる。

(3) 血中アルカリフォスファターゼ活性 骨形成の指標と考えられている血中アルカリフォスファターゼ活性は、V.C 欠乏食 4 週間の群、C 4、Ca/C 4 群において Control 群の各々約 50%、30% に減少した。C 2、C 3、Ca、Ca/C 2 群では、Control 群との差はみられなかった。さらに、アイソザイムを見てみると、V.C 欠乏食 4 週間のアルカリフォスファターゼ活性の減少は、骨アルカリフォスファターゼ活性の減少であることが明らかとなった (Table 1)。

(4) 血中酸性フォスファターゼ活性 酸性フォスファターゼ活性は、いずれの欠乏食群においても、Control 群と比べて上昇傾向が認められた。特に、破骨細胞から放出されたものと考えられる血中 TRAP の活性は、C 2 群と Ca、Ca/C 2、Ca/C 4 群の Ca 欠乏群において有意に上昇した。血中 TRAP の上昇は、これらの欠乏食群において破骨細胞の活性化、骨吸収の増加を示唆するものである (Table 1)。

(5) 血中 ICTP 破骨細胞による骨吸収時には、骨組織中の I 型コラーゲンが分解されて血中に放出される。このとき、I 型コラーゲンの C 末端部分からピリジノリンまたはデオキシピリジノリンによって架橋されたまま放出されるペプチド

Table 1 Biochemical analysis of serum and urine.

	Urine	Serum		ICTP (ng/ml)	Acid phosphatase activity (U/l)	
	Hyp/Cre ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Alkaline phosphatase activity (U/l) Total-	Bone-		Total-	TRAP
Control	0.49 ± 0.09	180.1 ± 40.7	155.2 ± 36.5	3.33 ± 0.37	7.23 ± 1.22	4.83 ± 0.72
C2	$0.90 \pm 0.03^*$	180.6 ± 35.3	153.1 ± 31.1	3.60 ± 0.20	$14.97 \pm 2.29^*$	$9.85 \pm 1.97^*$
C3	$0.94 \pm 0.01^*$	138.6 ± 14.9	114.9 ± 13.2	3.05 ± 0.92	$15.06 \pm 1.02^*$	$9.69 \pm 0.57^*$
C4	0.57 ± 0.03	$85.5 \pm 4.9^*$	$72.5 \pm 3.6^*$	$4.40 \pm 0.57^*$	$15.66 \pm 4.01^*$	$11.14 \pm 3.69^*$
Ca	0.48 ± 0.05	143.8 ± 35.2	112.4 ± 26.9	3.50 ± 0.36	$15.04 \pm 4.58^*$	$13.55 \pm 1.12^*$
CaC2	0.40 ± 0.04	152.2 ± 12.3	124.6 ± 15.0	3.37 ± 0.29	13.80 ± 2.98	$9.43 \pm 0.92^*$
CaC4	$0.29 \pm 0.10^*$	$50.0 \pm 6.9^*$	$33.9 \pm 9.0^*$	$6.18 \pm 1.23^*$	12.72 ± 4.17	$9.68 \pm 2.05^*$

Data were shown as means $\pm$ SD of 4 rats.

Asterisks indicate significantly different from the control value ($p < 0.05$).

が、I型コラーゲン-C-テロペプチド (ICTP) であり、血中の ICTP 濃度は骨組織の骨吸収量を反映する指標と考えられている。血中 ICTP は、V.C 欠乏 4 週間の群、C 4、Ca/C 4 群において、Control 群のそれぞれ 1.3、1.9 倍に有意に上昇していた。C 2、C 3、Ca、Ca/C 2 群では、血中 ICTP の上昇は認められなかった (Table 1)。

骨代謝の生化学的マーカーの結果は、V.C 欠乏 2 週間の Phase I の C 欠乏でまず破骨細胞による骨吸収の活性化が起こり、その後体重減少、体毛の粗雑化、眼や鼻孔周辺の出血、歩行異常などのアスコルビン酸欠乏の臨床症状が観察される Phase II の V.C 欠乏において、アルカリホスファターゼが減少し骨形成阻害が起こった事を示唆している。

3.2 骨塩量

軟 X 線による骨塩量の結果を、Fig. 2 に示した。コントロールと比較すると大腿骨、脛骨ともに、C 欠乏 2 週間ですでに骨幹端 (metaphysis) 部分の骨塩量の減少が認められた。さらに 3 週間、4 週間と減少して、4 週間になると関

節部位 condyle, tibial tuberosity の消失、fibula, 遠位大腿骨 (distal femur) や近位けい骨 (proximal tibia) の骨幹端 (metaphysis) 骨端 (epiphysis) の骨塩量の著しい減少が認められた。Ca では全体的に骨塩量の減少がみられ、Ca/C 2 ではさらに大腿骨と脛骨の骨幹端 (metaphysis) 部分の骨塩量が減少した。2 週間の V.C 欠乏においては、まだ V.C 欠乏の臨床症状を呈していないにもかかわらず、大腿骨 (distal femur) や脛骨 (proximal tibia) の骨幹端 (metaphysis) 骨端 (epiphysis) 部分の骨塩量の減少を引き起こすことが明らかとなった。

デンストメーターで測定した結果、大腿骨では C 2、C 3、C 4、で各々、86、77、44%、Ca では 41%、Ca/C 2 では 29% にまで減少していた。カルシウム欠乏による骨塩量減少は C 欠乏によってさらに増大した。

さらに骨幹端部だけを測定した値では、C 2 で既に 60%、C 3 で 50%、C 4 では 6% に減少していた。また、Ca では 24%、Ca/C 2 では 9% にまで減少していた。骨塩量の骨幹端部での減少が著しいことが判明した。脛骨でも同様の傾向がみられた。

3.3 骨の組織観察

大腿骨 (femur) の脱灰後のパラフィン切片のヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色標本の大腿骨骨幹端部分を、Fig. 3 に示す。コントロールでは十分な小柱骨の発達が見られたが、C 2 では骨が浸食され、小柱骨の骨基質が細く短くなっていた。C 3 ではその傾向が進み、C 4 では小柱骨の骨基質と軟骨肥大細胞がほとんど消失している様子がうかがえた。Ca においては、小柱骨の骨基質が短くなっており、Ca/C 2 では、小柱骨の骨基質が細く繊維状になっていた。骨塩量の減少は同時に骨基質の減少を伴っており、V.C 欠乏 2 週間目から、骨吸収の上昇が起こっていること

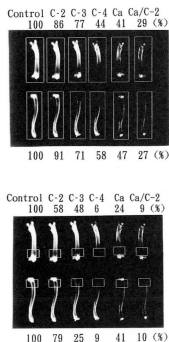


Fig. 2 Soft X-ray of femur and tibia

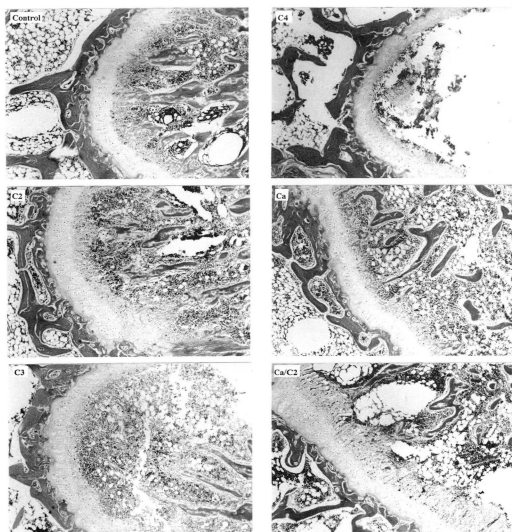


Fig. 3 H & E 染色組織像 (original magnification×16)

が明らかとなった。V.C 欠乏 3 週間では、軟骨肥大細胞 (hypertrophic chondrocyte) の減少が認められ軟骨の分化に V.C が重要な役割を果たしていることが示唆された。

3.4 TRAP 染色

破骨細胞のマーカー酵素である TRAP の酵素活性をジアゾニウム塩を用いて、in situ で大腿骨骨幹端部分の組織切片で酵素染色を行った結果を Fig. 4 に示した。

Control では小柱骨の骨基質の周りに破骨細胞が点在しているが、C2 では酵素染色が小柱骨の骨基質の周囲を覆うように存在しており、さらに内側からも骨が浸食されている様子が見られた。

C3 では軟骨細胞まで浸食が進んでいた。C4 では骨が浸食され尽くして、破骨細胞の付着するところがなく、コントロールより酵素染色が少なかった。Ca では Control と同様に、小柱骨の骨基質の周囲に破骨細胞がみられた。Ca/C2 では、Ca とはかなり異なり、C3 と同様、小柱骨の骨基質の内側深くまで酵素染色が見られた。H-E 染色の場合に見られたように、Ca/C2 では Ca よりも骨基質が繊維状に残存しており、そのため破骨細胞もそこにより多く接着しているように思われる。

TRAP 染色により、C 欠乏 2 週目以降において、組織学的に大腿骨骨幹端部分の破骨細胞、骨吸収

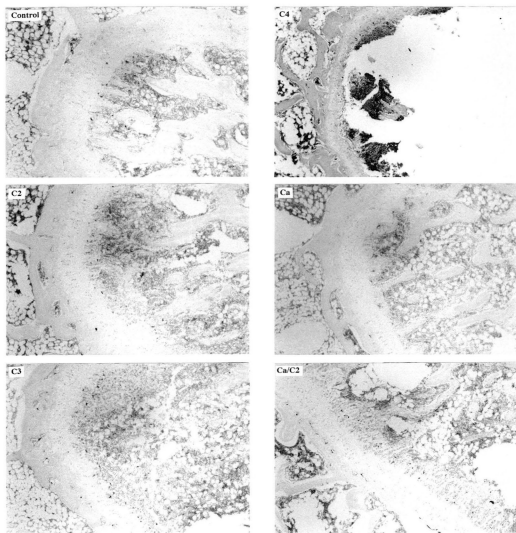


Fig. 4 TRAP 染色組織像 (original magnification×16)

活性の増加が認められた。

4. おわりに

subclinical な V.C 欠乏状態においても、すでに骨塩量の低下が起きていることが明らかとなり、Ca 欠乏状態が存在することによって、その影響はさらに大きくなることが判明した。V.C 欠乏はとくに、軟骨細胞に対する影響が大であり、遠位大腿骨 (distal femur)、近位けい骨 (proximal tibia) の骨幹端部分の骨塩量の低下、さらには関節部位の消失をもたらした。エストロゲン欠乏によっても近位脛骨 (proximal tibia) における骨塩量の低下が報告されているが、V.C 欠乏は、

閉経後のエストロゲン欠乏による骨塩量の低下を助長するものと考えられる。即ち、Ca とともに、十分量の V.C の摂取は、骨塩量の減少を阻止するために必須であると思われる。

本研究を行うにあたり、ご援助賜りました浦上食品・食文化振興財団に心より深く感謝の意を表しますとともに貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。

文 献

- 1) Bourne GH (1972) In The Biochemistry and Physiology of Bone, vol. 2, 231-279, Academic Press, New

- York, San Francisco and London.
- 2) Franceschi RT and Bhanumathi SI (1992) J. Bone Min. Res. 7, 235-246.
 - 3) Sullivan TA, Uschmann B, hough R. and Leboy PS (1994) J. Biol. Chem. 269, 22500-22506.
 - 4) konishi T, Makino S, Mizushima Y, Haraauchi T, Hasegawa Y, Yoshizaki T, Kishimoto Y and Oohara T (1990) In Vitamin C and the scurvy-Prone ODS rat (Fujita T, Fukase M and Konishi T, eds.), pp.3-21. Elsevier science Publishers Biomedical Division, Amsterdam.
 - 5) Bergman I and Loxley R (1970) Clin. Chim. Acta, 347-349.
 - 6) Risteli J et al. (1993) Clin. Chem. 39, 635-640.
 - 7) Walter K and Schutt C (1974) In Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer HU ed) vol. 2 pp856-860.
 - 8) Cadeau BJ and Malkin A (1973) Clin. Chim. Acta, 45, 235.

Effect of Vitamin C on Bone

Ikuyo Tsukamoto (Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University)

Osteoporosis, one of the most important disorders associated with aging, is a serious public health problem. Hormonal, dietary and other life-style factors, as well as genetic factors, may all contribute to bone loss that leads to the development of osteoporosis. An association between diet and incidence of osteoporosis has been suspected. It has been well known that a state of severe ascorbic acid deficiency, scurvy, results in the failure of injured bone to undergo repair. To investigate the effect of vitamin C on bone remodeling, the determination of the biochemical markers of bone formation (serum and bone-specific alkaline phosphatase) and bone resorption (urinary hydroxyproline, serum carboxy-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen (ICTP), serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)), bone mineral content measurements by soft X-ray and histological analysis were done in ovariectomized Osteogenic Disorder Shionogi (ODS) rats, which have an inherited defect in ascorbic acid synthesis. ODS rats were divided 7 groups and fed for 6 weeks after ovariectomy. They received control diet for 6 weeks (control), control diet for 4, 3, or 2 weeks followed by a V.C-free diet for 2, 3 or 4 weeks, respectively (C 2, C 3, or C 4), calcium-free diet for 6 weeks (Ca), calcium-free diet for 4 weeks followed by V.C and calcium-free diet for 2 weeks (Ca/C 2), or calcium-free diet for 2 weeks followed by V.C and calcium-free diet for 4 weeks (Ca/C 4). The loss of weight gain and the decrease in alkaline phosphatase activity (bone formation marker) were observed only in 4 week-V.C-deficient groups, C 4 and Ca/C 4. The activities of TRAP in all experimental groups were significantly higher than the control while the higher level of ICTP was observed in C 4 and Ca/C 4 group. The increase in the urinary hydroxyproline was obtained in C 2 and C 3 group. These biochemical parameters suggested that the increase in bone resorption occurred under subclinical ascorbic acid deficiency and was followed by the decrease in bone formation at severe ascorbic acid deficiency with weight loss. The soft X-ray photograph also showed the decrease in mineral content in metaphysis of femur and tibia as early as 2 weeks of V.C deficiency. Microscopic examinations confirmed that ossification zone was infiltrated with cells and osteoclasts in the metaphyseal region of femur of V.C deficiency rats after 2 weeks. The metaphyseal trabecular bone matrix almost disappeared at 3 weeks. The epiphyseal cartilage was totally devoid of the underlying bone and the hypertrophic chondrocytes were fewer at 4 weeks of ascorbic acid deficiency. The effects of Ca deficiency and ascorbic acid deficiency on bone loss were additional. These results indicate that even the subclinical vitamin C deficiency

causes the bone loss, especially in metaphysis of femur and tibia and that the intake of vitamin C as well as calcium is needed to keep health of bone.