

学位論文

骨折の発生予防を目的とした
薬剤誘発骨脆弱性に関する研究

新潟薬科大学 薬学部

神田 循吉

目次

第1章	緒言	1
第2章	抗炎症力価の異なる合成グルココルチコイドの短期投与 による骨代謝への影響	6
2-1	目的	7
2-2	実験方法	8
2-3	結果	12
2-4	考察	16
2-5	小括	18
第3章	インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンの骨代謝に及ぼす影響	19
3-1	目的	20
3-2	実験方法	21
3-3	結果	23
3-4	考察	30
3-5	小括	32

第4章	新規抗てんかん薬の骨代謝に及ぼす影響	33
4-1	目的	34
4-2	実験方法	
	実験1：ガバペンチン、レベチラセタムの検討	34
	実験2：トピラマート、ラモトリギンの検討	36
	実験3：ペランパネルの検討	38
4-3	結果	
	実験1：ガバペンチン、レベチラセタムの検討	39
	実験2：トピラマート、ラモトリギンの検討	45
	実験3：ペランパネルの検討	51
4-4	考察	55
4-5	小括	59
第5章	総括	61
	参考文献	64

第 1 章

緒 言

超高齢社会を迎えた我が国では、長年の生活習慣や加齢による疾病、いわゆる生活習慣病などに罹患し、その結果、脳血管障害や虚血性心疾患、認知症などにより寝たきりや要介護状態となる高齢者が急増している。厚生労働省による国民生活基礎調査（平成 28 年）では、介護が必要となった主な原因として「認知症」、「脳血管疾患」、「高齢による衰弱」が挙げられ、次いで「転倒・骨折」が示されている（Fig. 1）。「転倒・骨折」の原因疾患は、骨減少症や骨粗鬆症などの骨代謝疾患で、その素因は骨脆弱性である。

骨は、体の支持組織としての役割だけではなく、常に骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により連続的な骨リモデリングを営む活動的な器官として捉えられている（1）。通常、骨形成と骨吸収のバランスは、ビタミン D や副甲状腺ホルモンなどの作用により常に一定に保たれ骨強度や骨量は維持される（2）。しかし、閉経や加齢、特定の疾患や薬物などの影響により正常な骨リモデリングのバランスが崩れると骨脆弱性が増大し、骨減少症や骨粗鬆症が誘発する（3）。現在、我が国における骨粗鬆症患者数は人口の急速な高齢化に伴い年々増加し、約 1,280 万人と推定されている（4, 5）。

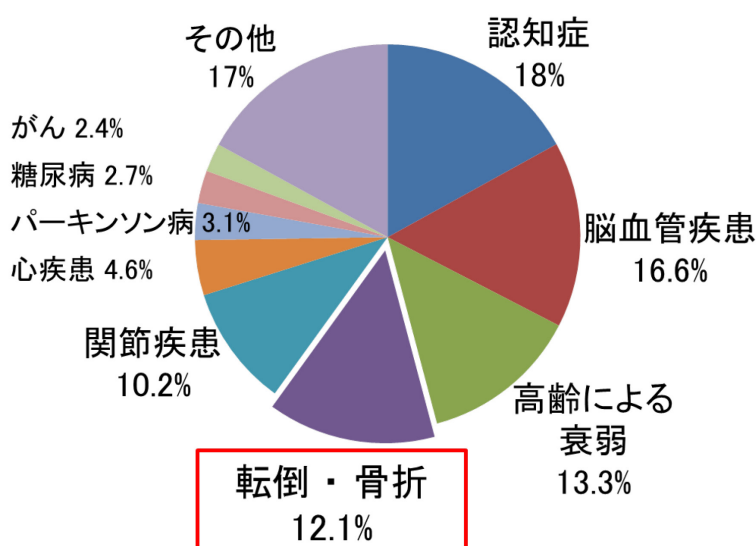


Fig. 1. 介護が必要となった主な原因
（厚生労働省「国民生活基礎調査（平成 28 年度）」より引用）

骨粗鬆症は、骨強度の低下を特徴とした骨折リスクが増大する疾患と定義され、閉経や加齢を原因とする原発性骨粗鬆症と特定の疾患や薬剤の影響により二次的に発症する続発性骨粗鬆症に分類される。骨粗鬆症の診断基準 (Table 1) には単位面積あるいは体積あたりのミネラル量を示す骨密度による評価が行われてきた (6)。しかし、近年では、続発性骨粗鬆症の中で最も発症頻度の高いステロイド性骨粗鬆症罹患による骨折リスクは、骨密度の減少率から推定される以上に高まっていること (7-10)、生活習慣病関連骨粗鬆症の主な原因となる2型糖尿病では、患者の骨密度は健常者と比べ同等もしくは高値にもかかわらず骨折リスクが有意に高まること (11-13) などが報告されている。これらの知見から、ステロイド性骨粗鬆症や生活習慣病関連骨粗鬆症など多くの続発性骨粗鬆症は、骨密度から推測される以上に骨脆弱性が進展しており、その骨折リスクは骨密度だけでは正確に評価することができないと考えられるようになった。

Table 1. 骨密度による骨粗鬆症の診断基準

正 常	骨密度値が若年成人の平均値の-1SD(標準偏差)以上
低骨量状態	骨密度値がTスコアで-1より小さく-2.5より大きい
骨粗鬆症	骨密度値がTスコアで-2.5以下
重症骨粗鬆症	骨密度値が骨粗鬆症レベルで1個以上の脆弱骨折あり

Tスコア: 若齢者の平均骨密度を0として標準偏差を1SDとして指標を規定した値
(参考文献 (6) より引用)

このような知見の集約から、2000年の米国国立衛生研究所でのコンセンサス会議において、骨密度以外の骨強度を規定する因子として骨微細構造や骨代謝回転、骨石灰化度などを要因とする「骨質 (bone quality)」の概念が提唱された (14)。それにより、骨粗鬆症は、骨密度と骨質の2つの要因により規定される骨強度の低下を特徴とした骨折リスクの高まる疾患と新たに定義された (15)。このような骨粗鬆症の病態の新たな解明により、ステロイド性骨粗鬆症や生活習慣病関連骨粗鬆症は、主に骨質の劣化を特徴とする病態であることが一部明らかとなってきた。原発性骨粗鬆症の大半を占める閉経後骨粗鬆症は、エスト

ロゲンの卵巣からの産生・分泌の低下に伴い骨吸収が骨形成を上回り、骨リモデリングのバランスが崩れた結果、骨量減少が生じる(16)。一方、続発性骨粗鬆症は、骨密度の減少ならびに骨質の劣化により骨折リスクが増大するため、その発症予防には骨密度の減少を改善することに加えて、骨質の維持・向上が極めて重要となる。さらに近年では、生活習慣病の病態に加えて、その治療薬も骨代謝に影響を及ぼす可能性が示唆されている。例えば、骨折リスクが低減すると報告されている薬剤に、スタチン(17-21)、 β 受容体遮断薬(22, 23)、アンギオテンシン変換酵素阻害薬(24)などがあり、一方、骨折リスクを高める薬剤として、ループ利尿薬(25)や選択的セロトニン再取り込み阻害薬(26)などが報告されている。生活習慣病の治療は生活習慣の改善が必須であるが、薬物治療では薬剤の服用期間も長期になることが多い。このような背景から、骨代謝に影響を及ぼす各種の疾患とその病態や治療薬による骨密度、骨質に及ぼす影響を正確に評価し把握することは、薬剤誘発性の骨減少症、骨粗鬆症の予防・治療の観点から極めて重要となる。そこで、本研究では、薬剤誘発骨脆弱性を予防し、結果的に骨折の発生予防と骨折による寝たきり状態を回避するために、これまでに主に骨量に影響を及ぼすことが報告されている合成グルココルチコイド、インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾン、古典的抗てんかん薬それぞれの薬剤の骨代謝に及ぼす影響について、新たに骨質への影響を評価するとともに、新規抗てんかん薬の骨組織形態に及ぼす影響について、骨微細構造、骨代謝回転、骨石灰化度などの骨組織レベルで検討、評価した結果を詳述する。

本論文は、以下の論文を基礎とするものである。

1. Junkichi Kanda, Atsushi Takahashi, Taketoshi Shimakura, Noriaki Yamamoto, Kenji Onodera, Hiroyuki Wakabayashi.
Effects of Short-Term Administration of Hydrocortisone, Prednisolone and Dexamethasone on Bone Metabolism in Rats.
Pharmacometrics, 92 (3/4), 75–81 (2017)
2. Junkichi Kanda, Nobuo Izumo, Yoshiko Kobayashi, Kenji Onodera, Taketoshi Shimakura, Noriaki Yamamoto, Hideaki E. Takahashi, Hiroyuki Wakabayashi.
Effect of the antidiabetic agent pioglitazone on bone metabolism in rats.
Journal of Pharmacological Sciences, 135, 22–28 (2017)
3. Junkichi Kanda, Nobuo Izumo, Yoshiko Kobayashi, Kenji Onodera, Taketoshi Shimakura, Noriaki Yamamoto, Hideaki E. Takahashi, Hiroyuki Wakabayashi.
Effects of the Antiepileptic Drugs Phenytoin, Gabapentin, and Levetiracetam on Bone Strength, Bone Mass, and Bone Turnover in Rats.
Biological and Pharmaceutical Bulletin, 40 (11), 1934–1940 (2017)
4. Junkichi Kanda, Nobuo Izumo, Yoshiko Kobayashi, Kenji Onodera, Taketoshi Shimakura, Noriaki Yamamoto, Hideaki E. Takahashi, Hiroyuki Wakabayashi.
Effects of the antiepileptic drugs topiramate and lamotrigine on bone metabolism in rats.
Biomedical Research, 38 (5), 297–305 (2017)
5. Junkichi Kanda, Nobuo Izumo, Yoshiko Kobayashi, Kenji Onodera, Taketoshi Shimakura, Noriaki Yamamoto, Hideaki E. Takahashi, Hiroyuki Wakabayashi.
Treatment with Antiepileptic Agent Perampanel Suppresses Bone Formation and Enhances Bone Resorption: A Bone Histomorphometric Study in Mice.
Journal of Hard Tissue Biology, 26 (4), 405–410 (2017)

第2章

抗炎症力価の異なる合成グルココルチコイドの 短期投与による骨代謝への影響

2-1 目的

合成グルココルチコイド (glucocorticoid, 以下 GC) は強力な抗炎症作用や免疫抑制作用を有し、自己免疫疾患や呼吸器疾患、腎疾患、炎症性腸疾患など多くの疾患の治療に汎用される。しかし、その副作用の 1 つにステロイド性骨粗鬆症の発症 (27-29) があり、長期 GC 治療を受けている患者の 30~50% に骨折が発生することが報告されている (30-32)。GC の長期投与による骨密度の減少は、投与開始 6 ヶ月以内に急激に生じること (33) や、GC の累積使用量や投与期間と相関すること (34, 35) も報告されている。しかし、GC の抗炎症力価の違い (Table 2) (36) による骨代謝に及ぼす影響の差異は不明である。また、ステロイド性骨粗鬆症では骨密度の減少が生じる前に骨脆弱性が高まり骨折リスクが増大する (7-10) ことから、その発症には骨密度の減少だけでなく骨質の劣化が関与する可能性が示唆されている (37-40)。本章では、抗炎症力価の異なる GC として、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、デキサメタゾンをを用い、それぞれ抗炎症作用が同等となる等価用量をラットに短期間の投与を行い、抗炎症力価の異なる GC の骨代謝に及ぼす影響について比較検討を行った。さらに、ステロイド性骨粗鬆症発症時の病態における骨質の関与を明らかにするために、骨組織形態の変化についての評価も行った。

Table 2. Anti-inflammatory potencies and equivalent doses of representative GCs .

GCs	Anti-inflammatory potency	Equivalent dose (mg)
Cortisone	0.8	25
Cortisol	1	20
Prednisone	4	5
Prednisolone	4	5
6 α -Methylprednisolone	5	4
Triamcinolone	5	4
Betamethasone	25	0.75
Dexamethasone	25	0.75

(Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics twelfth edition より引用)

2-2 実験方法

1. 動物

8 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本クレア，東京）を、室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクル（7：00 点灯）の実験動物室で飼育した。実験期間中、固形飼料（MF；オリエンタル酵母，東京）と飲料水を自由摂取させた。本動物実験は、新潟薬科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2. 薬物

ヒドロコルチゾンコハク酸エステルナトリウム（サクシゾン®；大正製薬，東京）、プレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム（プレドニン®；塩野義製薬，大阪）、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム（デカドロン®；萬有製薬，東京）の注射剤を用いた。各薬物は、投与直前に投与容量がラットの体重 100 g あたり 0.1 mL となるように生理食塩液（テルモ，東京）で用時調製した。

3. 実験手順

ラットを、対照群、ヒドロコルチゾン投与群、プレドニゾロン投与群、デキサメタゾン投与群の 1 群 6 匹からなる 4 群に分けた。薬物投与量は、各 GC の抗炎症作用が同等となる等価用量（Table 2）を設定し、ヒドロコルチゾンは 20 mg/kg、プレドニゾロンは 5.0 mg/kg、デキサメタゾンは 0.8 mg/kg とした。対照群には投与量の調製溶媒である生理食塩液を投与した。各薬物は午前 9 時に 14 日間の連日背部皮下投与を行った。最終薬物投与から 24 時間後に CO_2 麻酔下で全採血を行い、得られた血液は常法に従い血清を分取し、測定まで -80°C で保存した。大腿骨と脛骨は摘出し、付着する筋肉や腱などの組織を取り除き、大腿骨は骨密度の測定に、脛骨は骨組織形態計測に用いた。

4. 骨密度の測定

骨密度は、軟 X 線撮影装置 (SOFTEX-CMB; ソフテックス, 東京) と画像解析装置 (ASPECT; 三谷商事, 東京) を用いて、軟 X 線微粒子撮影法 (41) により計測した。計測領域は大腿骨の骨幹端 (metaphysis) と骨幹 (diaphysis) を対象とした (Fig. 2)。

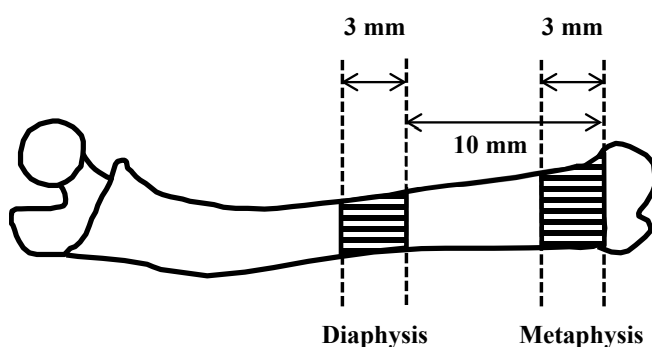


Fig. 2. Objective areas for the measurement of bone mineral density in femoral metaphysis and diaphysis.

5. 血清生化学マーカーの測定

血清カルシウム値とリン値は自動分析装置 (Hitachi7180; 日立ハイテクノロジーズ, 東京) により測定した。骨形成マーカーである血清オステオカルシン値は Osteocalcin rat ELISA system (GE ヘルスケアジャパン, 東京) を、骨吸収マーカーである血清酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase-5b) 値は Rat TRAP Assay kit (SBA-Sciences, Oulu, Finland) を用いて測定した。

6. 骨組織形態計測

摘出した脛骨を 70%エタノールで 7 日間固定し、骨幹端部をトリミングして Villanueva Bone Stain 液に 7 日間浸透染色した後、メチルメタクリレート樹脂に包埋した。樹脂ブロックはマイクローム (Leica RM2255; Leica Inc., Nussloch, Germany) を用いて 5 μm の薄切を行った。

計測範囲は、脛骨近位成長板から遠心に 2.0 mm から 4.0 mm の範囲内で、外側の皮質骨から 0.3 mm 離れた二次海綿骨領域を対象に、画像計測システム (Histometry RT CAMERA; システムサプライ, 長野) を用いて行った。

骨微細構造の指標として骨量 (BV/TV; bone volume/tissue volume)、骨梁幅 (Tb.Th; trabecular thickness)、骨梁数 (Tb.N; trabecular number)、骨梁間隙 (Tb.Sp; trabecular separation) を計測した。骨吸収の指標として浸食面 (ES/BS; eroded surface/bone surface)、破骨細胞数 (N.Oc/BS; osteoclast number/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS; osteoclast surface/BS) を、骨形成の指標として類骨面 (OS/BS; osteoid surface/BS)、類骨量 (OV/BV; osteoid volume/BV)、骨芽細胞面 (Ob.S/BS; osteoblast surface/BS)、骨芽細胞数 (N.Ob/BS; osteoblast number/BS) を計測した。骨形成の動的指標は、蛍光色素剤を用いた二重蛍光標識法により計測した。骨標識を行うため、ラットにテトラサイクリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 25 mg/kg を骨摘出 5 日前に、カルセイン (和光純薬, 大阪) 10 mg/kg を骨摘出 2 日前に皮下投与した。テトラサイクリンならびにカルセイン投与時の骨石灰化面を示す標識面は、蛍光顕微鏡 (BX50; Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA) を用いて計測し、1 重及び 2 重標識面 (sLS, dLS; single-, double-labeled surface)、標識幅及び標識時間 (Ir.L.Th, Ir.L.t; inter-label thickness, time) を求めた。これらを用いて骨石灰化面 (MS/BS; mineralizing surface/BS, $[\text{dLS} + \text{sLS}/2]/\text{BS}$)、骨石灰化速度 (MAR; mineral apposition rate, $[\text{Ir.L.Th}/\text{Ir.L.t}]$)、骨形成速度 (BFR; bone formation rate/BS, $[\text{MAR} \times \text{MS}/\text{OS}]/\text{BS}$) を算出した。これらの骨組織形態

計測により得られる主な指標の略図を Fig. 3 に示した (42)。用語の略語と単位は、米国骨代謝学会の Histomorphometry Nomenclature Committee (43) に準じた。

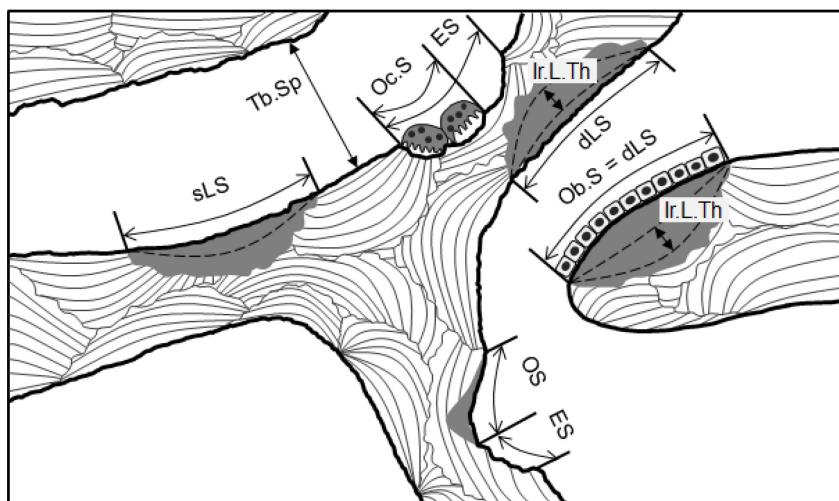


Fig. 3. The scheme of the primary bone histomorphometric parameters.

Tb.Sp; trabecular separation, dLS; double-labeled surface, sLS; single-labeled surface, Ir.L.Th; inter-labels thickness, Ob.S; osteoblast surface, OS; osteoid surface, ES; eroded surface, Oc.S; osteoclast surface.

7. 統計学的処理

全ての値は平均値±標準誤差で示した。多群間の比較は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、Dunnett's test を、2 群間の比較は student's *t*-test を用いた。

2-3 結果

1. 大腿骨骨幹ならびに骨幹端の骨密度

ヒドロコルチゾン投与群とプレドニゾロン投与群の大腿骨骨幹ならびに骨幹端の骨密度は、対照群と比較し有意な変化は認められなかった (Fig. 4A, B)。

しかし、デキサメタゾン投与群の骨幹の骨密度は、対照群と比較し約 13%の有意な減少が認められ、骨幹端の骨密度は約 10%の有意な増加が認められた。

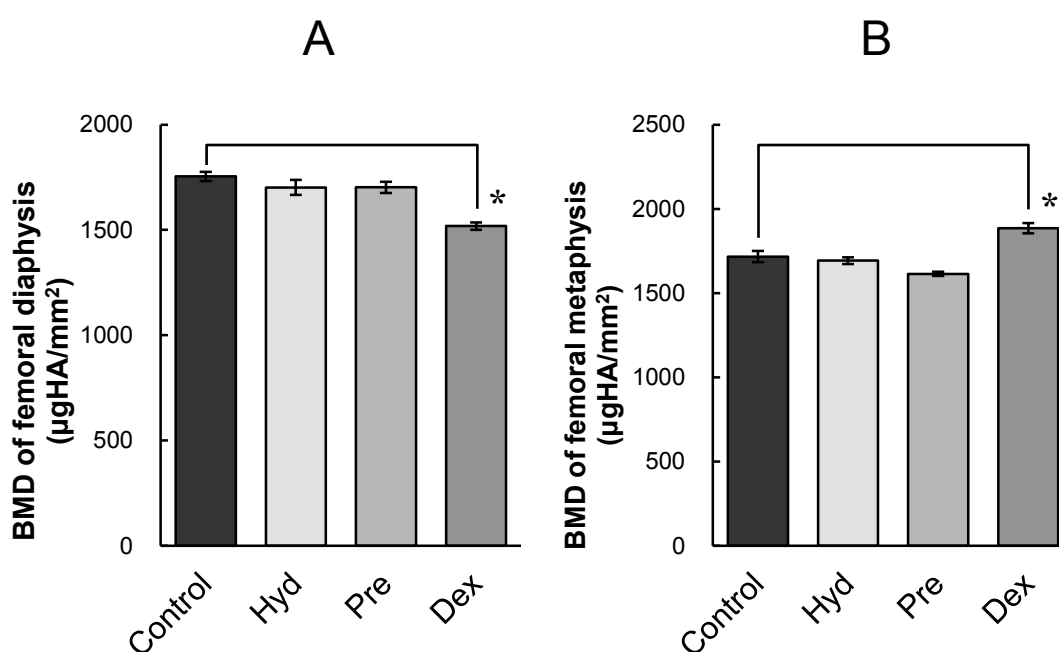


Fig. 4. Effects of hydrocortisone, prednisolone, and dexamethasone treatment on bone mineral density (BMD) of femoral diaphysis (A) and femoral metaphysis (B).

Hyd: hydrocortisone 20 mg/kg treated group, Pre: prednisolone 5.0 mg/kg treated group, Dex: dexamethasone 0.8 mg/kg treated group. Data represents the mean \pm S.E. (n = 6).

* $P < 0.05$

2. 血清カルシウム値、リン値、オステオカルシン値および TRAP 値

血清カルシウム値とリン値は、対照群と比較しすべての GC 投与群で有意な変化は認められなかった (Table 3)。血清オステオカルシン値ならびに血清 TRAP 値は、ヒドロコルチゾン投与群とプレドニゾン投与群では有意な変化は認められなかった。しかし、デキサメタゾン投与群では、対照群と比較し血清オステオカルシン値が約 84%、血清 TRAP 値が約 80%、それぞれ有意に減少した。

Table 3. Effects of hydrocortisone, prednisolone, and dexamethasone treatment on serum calcium, phosphorus, osteocalcin, and TRAP levels.

	Control	Hydrocortisone 20 mg/kg	Prednisolone 5.0 mg/kg	Dexamethasone 0.8 mg/kg
Calcium (mg/dL)	11.7 ± 0.47	11.8 ± 0.19	12.0 ± 0.34	12.1 ± 0.36
Phosphorus (mg/dL)	11.7 ± 0.45	11.8 ± 0.37	12.3 ± 0.48	10.8 ± 0.24
Osteocalcin (ng/dL)	78.4 ± 5.99	63.2 ± 3.81	63.2 ± 4.76	12.3 ± 0.91 *
TRAP (U/L)	11.7 ± 0.79	10.8 ± 0.24	10.4 ± 0.80	2.33 ± 0.24 *

TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase-5b. Data represents the mean ± S.E. (n = 6).

* $P < 0.05$ versus Control.

3. 骨組織形態計測

大腿骨骨幹ならびに骨幹端の骨密度に顕著な影響を及ぼしたデキサメタゾン投与群の骨組織形態計測を行った。デキサメタゾン投与群の類骨量 (OV/BV)、類骨面 (OS/BS)、骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR)、骨芽細胞面 (Ob.S/BS)、骨芽細胞数 (N.Ob/BS) は、対照群と比較し約 36%、33%、26%、41%、70%、70%、それぞれ有意に減少した (Table 4)。さらに、デキサメタゾン投与群の浸食面 (ES/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS) も、対照群と比較し約 30%、48%、53%、それぞれ有意に減少した。骨組織像 (Fig. 5) からも、デキサメタゾン投与群では対照群と比べ類骨量ならびに類骨面の顕著な減少が観察された。

Table 4. Bone histomorphometric analysis of the proximal tibial metaphysis in rats.

	Control	Dexamethasone 0.8 mg/kg
<i>Bone formation</i>		
OV/BV (%)	5.92 ± 0.74	3.78 ± 0.35 *
OS/BS (%)	39.6 ± 1.80	26.7 ± 2.87 *
MS/BS (%)	38.0 ± 2.50	28.1 ± 0.56 **
MAR (µm/day)	2.45 ± 0.12	1.45 ± 0.12 **
Ob.S/BS (%)	17.9 ± 2.90	5.36 ± 2.26 **
N.Ob/BS (N/mm)	15.9 ± 2.29	4.74 ± 1.91 **
<i>Bone resorption</i>		
ES/BS (%)	5.79 ± 0.47	4.07 ± 0.52 *
Oc.S/BS (%)	2.60 ± 0.35	1.35 ± 0.19 *
N.Oc/BS (N/mm)	2.03 ± 0.36	0.96 ± 0.09 *

OV; osteoid volume, BV; bone volume, OS; osteoid surface, BS; bone surface, MS; mineralizing surface, MAR; mineral apposition rate, Ob.S; osteoblast surface, N.Ob; osteoblast number, ES; eroded surface, Oc.S; osteoclast surface, N.Oc; osteoclast number. Data represents the mean ± S.E. (n = 6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Control.

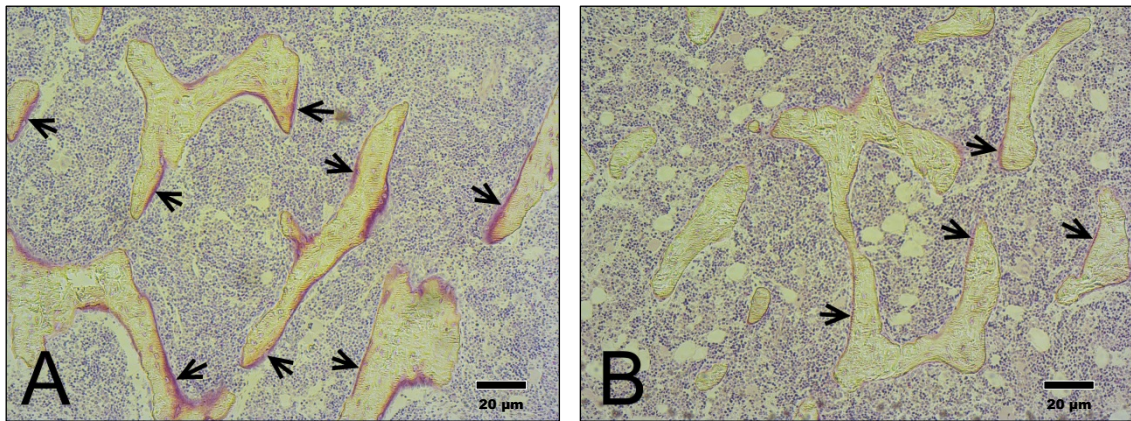


Fig. 5. Typical micrographs of the slices assessed by bone histomorphometry.

A: control group, B: dexamethasone 0.8 mg/kg treated group.

The osteoid surfaces are indicated by the arrows. It was observed that the dexamethasone 0.8 mg/kg treated group had decreased osteoid surface and volume relative to the control group. (Villanueva Bone Stain)

2-4 考 察

本検討では、抗炎症力価の異なる GC のヒドロコルチゾン、プレドニゾン、デキサメタゾンを用い、各 GC の抗炎症作用が同等となる等価用量をラットに 14 日間連日投与し、骨代謝に及ぼす影響について比較検討を行った。その結果、ヒドロコルチゾン 20 mg/kg ならびにプレドニゾン 5.0 mg/kg の 14 日間投与による骨密度への有意な影響は認められなかったが、デキサメタゾン 0.8 mg/kg の投与により、大腿骨の骨密度は骨幹部で有意に減少し、骨幹端部では有意に増加することが認められた。これらの結果から、抗炎症力価の異なる GC の等価用量を同一期間投与しても、骨密度に及ぼす影響は GC により異なること、また、デキサメタゾンは短期間の投与であっても骨密度に顕著な影響を及ぼすことが明らかになった。

ステロイド性骨粗鬆症の発症機序は単一ではなく複数の機序を介すると考えられており、GC は、骨芽細胞の分化・増殖抑制 (44, 45)、骨芽細胞のアポトーシス誘導 (46, 47)、骨芽細胞による骨基質合成低下 (48-51) などにより骨形成活性を抑制すると考えられている。一方、GC の骨吸収活性への影響については未だ明確にされていない。GC は、破骨細胞の分化促進 (52, 53)、破骨細胞のアポトーシス抑制 (54)、腸管でのカルシウム吸収抑制 (55-57) などにより骨吸収活性を亢進すると推測されている。一方、GC 投与により骨吸収マーカーが低下するとの臨床報告 (58-60) や、動物実験では破骨細胞数が減少するとの報告 (61) もある。このように実験条件によって GC の骨吸収活性への影響が異なることは、GC が破骨細胞数を減少させる一方で、その破骨細胞の寿命を延長するという相反した作用を示すことが一因と考えられる。また、これまでの臨床報告では、GC はその抗炎症力価にかかわらず、腰椎や大腿骨頸部などの骨密度を減少させることが示されている (59, 62-64)。しかし、本検討ではデキサメタゾン投与により、ラット大腿骨骨幹端の骨密度は有意に増加した。この結果は、臨床報告からの知見とは相違するが、GC 投与によりラットの骨量が投

与初期に増加したとの報告 (65-68) と一致する。

近年、ステロイド性骨粗鬆症は骨密度の明らかな減少が確認されない状態で脆弱性骨折を発生する症例が多いことが報告され、GCによる骨折リスクの増大には骨質の劣化が関与する可能性が示唆されている (37-40)。そこで、本検討では、骨密度が顕著に変化したデキサメタゾンの骨質への影響について骨組織形態計測により評価した。その結果、デキサメタゾン投与により骨形成の指標である類骨量 (OV/BV)、類骨面 (OS/BS)、骨芽細胞数 (N.Ob/BS)、骨芽細胞面 (Ob.S/BS) は有意に減少した。さらに、骨芽細胞の分化・増殖の指標である骨石灰化面 (MS/BS) と骨芽細胞の活動の指標である骨石灰化速度 (MAR) (69) もデキサメタゾン投与により有意に減少した。一方、骨吸収の指標である浸食面 (ES/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS) ならびに破骨細胞面 (Oc.S/BS) はデキサメタゾン投与により有意に減少した。これらの結果から、デキサメタゾンは骨芽細胞機能を低下させ骨形成活性を抑制すること、さらに、骨吸収活性を抑制することが明らかとなった。オステオカルシンは、骨芽細胞で特異的に生産されることから骨芽細胞特異的マーカーとして汎用される (70)。デキサメタゾン投与群の血清オステオカルシン値は対照群の約 16%の低値を示した。さらに、破骨細胞活性の状態を鋭敏に反映する骨吸収マーカー (71) の血清酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ値もデキサメタゾン投与群で対照群の約 20%の低値を示した。このような短期間投与による骨形成活性と骨吸収活性の顕著な抑制は、ヒドロコルチゾンならびにプレドニゾロンの投与では認められなかった。これらよりデキサメタゾンによる骨代謝回転の抑制は、血清骨代謝マーカーの測定結果からも裏付けられた。

2-5 小 括

1. 抗炎症力価の異なるヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、デキサメタゾンを用い、それぞれの抗炎症作用が同等となる等価用量をラットに 14 日間投与した結果、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン投与による骨代謝への有意な影響は認められなかった。しかし、デキサメタゾン投与群では骨密度への顕著な影響が認められた。
2. デキサメタゾンは、脛骨近位部骨幹端海綿骨において、骨形成の指標である類骨量、類骨面、骨芽細胞面、骨芽細胞数と骨芽細胞機能の指標である骨石灰化面、骨石灰化速度をそれぞれ有意に減少させ、さらに、骨吸収の指標である浸食面、破骨細胞面、破骨細胞数をそれぞれ有意に減少させた。

以上の結果から、GC の抗炎症作用強度と骨代謝に及ぼす影響との間に相関性がないことが明らかとなった。さらに、デキサメタゾンによるステロイド性骨粗鬆症の発症には、骨芽細胞機能の低下による骨形成活性の抑制および骨吸収活性の抑制を特徴とする骨質の劣化が大きく関与することが明らかとなった。

第 3 章

インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンの 骨代謝に及ぼす影響

3-1 目的

近年、生活習慣病は骨代謝に影響を及ぼし骨脆弱性を高めることなど骨代謝との関連が明らかにされてきた。糖尿病患者の大腿骨近位部の骨折リスクは、非糖尿病患者に比べ1型糖尿病で約6.3倍、2型糖尿病で約1.4倍に上昇し、1型糖尿病による骨折リスクの増加は、骨密度の減少が主因と考えられている(11, 72)。一方、2型糖尿病患者の骨密度は健常人と比べ同等あるいは高値であるにもかかわらず骨折リスクは有意に高まることが報告されている(11, 12)。さらに、近年では、糖尿病の病態だけではなく糖尿病治療薬が骨代謝に影響を及ぼす可能性が示唆されている。糖尿病治療薬の一つであるチアゾリジン薬は、PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) の強力なアゴニスト作用を有することからインスリン抵抗性改善薬として用いられる(73)。PPAR γ は核内受容体型の転写因子として脂肪細胞に高発現している脂肪細胞分化のマスターレギュレーター(74, 75)で、チアゾリジン薬によるPPAR γ の活性化により、肝臓や骨格筋での中性脂肪や脂肪酸の蓄積を抑制すること(76, 77)、糖の取り込みやエネルギー消費の促進作用を有するアディポネクチンの分泌を亢進すること(78)、インスリン抵抗性を惹起するTNF α の産生を抑制すること(79)などから、インスリン抵抗性を是正すると考えられている。このように優れた治療薬であるチアゾリジン薬は、糖尿病患者の骨折リスクを有意に高めることが報告されている。チアゾリジン薬の一つであるロシグリタゾン服用者では、他の糖尿病治療薬であるメトホルミンやグリベンクラミド服用者に比較して骨折発生率が有意に高いこと(80)、ロシグリタゾン服用者の腰椎および大腿骨頸部の骨密度に有意な減少が認められたこと(81)、チアゾリジン薬の服用により骨折リスクが有意に高まること(82, 83)などが報告されている。基礎研究では、チアゾリジン薬は骨芽細胞の分化を阻害し骨形成活性を抑制することが示唆されている(84-88)。しかし、骨吸収活性に対しては破骨細胞の分化を抑制するとの報告(89, 90)や破骨細胞の分化を促進するとの報告(91)

もあり、その詳細は未だ明確には呈示されていない。そこで、本章では、チアゾリジン薬の骨代謝に及ぼす影響に関して、特に骨吸収活性に及ぼす影響を明らかにするために骨組織形態学的な検討を行った。

3-2 実験方法

1. 動物

5 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本クレア，東京）を、室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクル（7：00 点灯）の実験動物室で飼育した。実験期間中、固形飼料（MF；オリエンタル酵母，東京）と飲料水を自由摂取させた。本動物実験は、新潟薬科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2. 薬物

ピオグリタゾン塩酸塩（アクトス®；武田薬品工業，大阪）は錠剤を均一に粉碎した後、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC-Na；carboxymethylcellulose sodium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）の 0.2% 溶液で懸濁し、ラットへの投与容量が体重 100 g あたり 0.1 mL となるように用時調製した。

3. 実験手順

ラットを、対照群、ピオグリタゾン 15 mg/kg 投与群、30 mg/kg 投与群の 1 群 10 匹からなる 3 群に分けた。薬物投与量は、ラットを用いて抗糖尿病作用を検討した報告（92-94）を参考に設定した。対照群には投与量の調製溶媒である 0.2% CMC-Na 溶液を投与した。薬物投与は午前 9 時に行い 24 週間の連日経口投与を行った。ラットの血糖値は、簡易血糖測定器（FreeStyle Freedom；ニプロ，大阪）を用い、尾静脈から採血し同一時刻に週 1 回測定した。最終薬物投与から 24 時間後に CO_2 麻酔下で全採血を行い、得られた血液は常法に従い血清を分取し、測定まで -80°C で保存した。大腿骨と脛骨は摘出し、付着する筋肉

や腱などの組織を取り除き、大腿骨は骨強度と骨密度の測定に、脛骨は骨密度の測定と骨組織形態計測に用いた。

4. 骨強度の測定

大腿骨骨幹の骨強度は、強度試験機（EZ-S; 島津製作所, 京都）を用いて 3 点曲げ法により測定した。大腿骨を 15 mm 離れた 2 点の支点上に置き、その中点に骨折を生じるまで一定の速度（1.0 mm/min）で荷重を加えた。骨に加えられた荷重と変位曲線をオペレーションソフトウェア（TRAPEZIUM X; 島津製作所, 京都）で計測し、得られた荷重-変位曲線から骨強度パラメーターである最大荷重、破断エネルギー、剛性を算出した。

5. 骨密度の測定

大腿骨ならびに脛骨の海綿骨骨密度、皮質骨骨密度、皮質骨厚は、動物実験用 QCT 装置（LaTheta LCT-100; Hitachi Aloka Medical, 東京）を使用して、ピクセルサイズ 250×250 μm、スライス幅 1.0 mm で測定した。

6. 血液生化学マーカーの測定

第 2 章に準じて行った。

7. 骨組織形態計測

第 2 章に準じて行った。計測範囲は、脛骨近位成長板から遠心に 0.7 mm から 2.7 mm の範囲内で、外側の皮質骨から 0.2 mm 離れた二次海綿骨領域を対象に行った。

8. 統計学的処理

全ての値は平均値±標準誤差で示した。多群間の比較は one-way ANOVA の後、Dunnett's test を用いた。

3-3 結果

1. 血糖値の変動

実験期間中の対照群と薬物投与群の血糖値に有意な差は認められなかった (Fig. 6)。

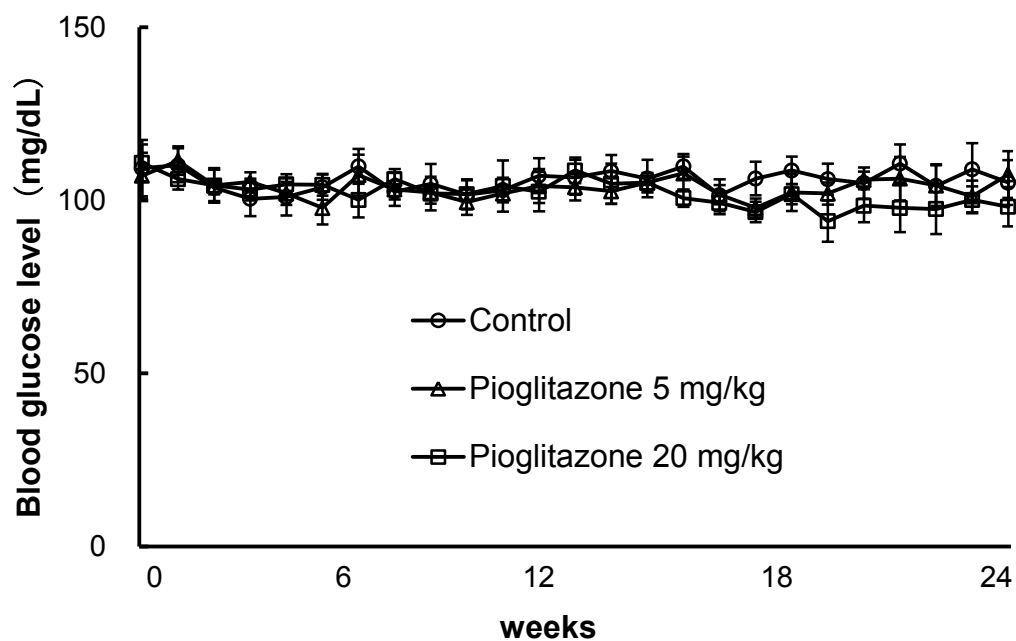


Fig. 6. Effects of pioglitazone treatment on blood glucose levels in rats. Data represents the mean \pm S.E. (n = 10).

2. 大腿骨骨幹の骨強度

大腿骨骨幹の骨強度は、ピオグリタゾン 5 mg/kg 投与群では有意な変化は認められなかった。しかし、ピオグリタゾン 20 mg/kg 投与群では、対照群と比較して最大荷重が約 15% (Fig. 7A)、破断エネルギーが約 24% (Fig. 7B)、それぞれ有意に減少した。

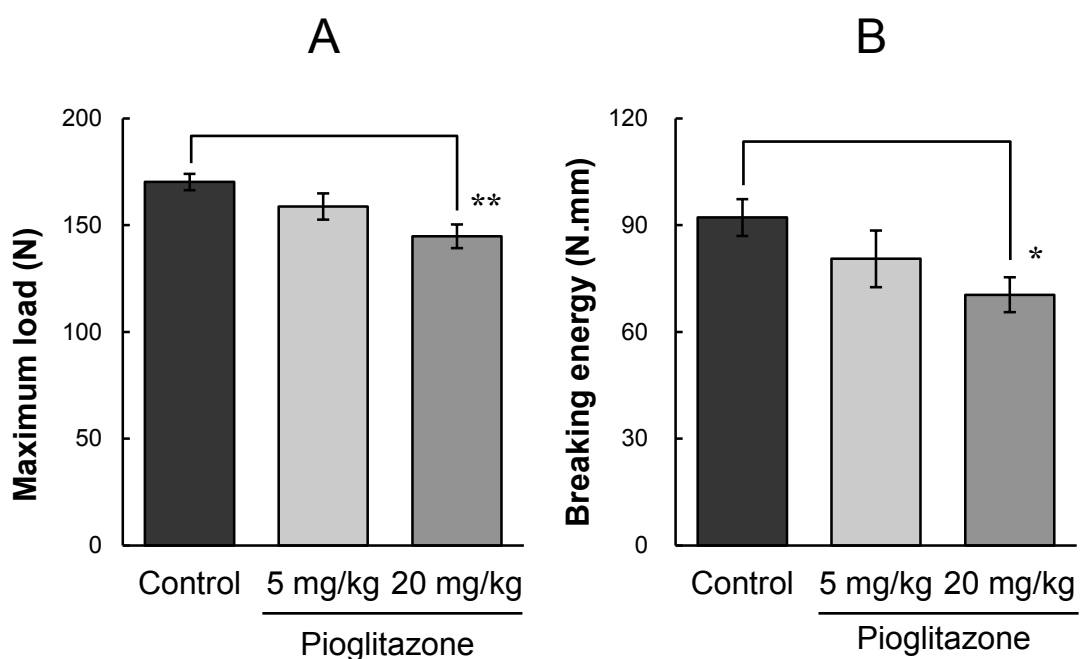


Fig. 7. Effects of pioglitazone treatment on bone strength properties (A: maximum load, B: breaking energy) of the femoral mid-diaphysis.

Data represents the mean \pm S.E. (n = 10). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3. 大腿骨ならびに脛骨の皮質骨骨密度、海綿骨骨密度、皮質骨厚

大腿骨の皮質骨骨密度、海綿骨骨密度、皮質骨厚は、対照群と比較してピオグリタゾン 5 mg/kg 投与群ではそれぞれ約 2.4%、7.2%、7.6%の有意な減少を示し、20 mg/kg 投与群でもそれぞれ約 3.5%、9.4%、8.0%の有意な減少が認められた (Table 5)。さらに、ピオグリタゾン 20 mg/kg 投与群の脛骨の海綿骨骨密度ならびに皮質骨厚は、対照群と比較しそれぞれ約 8.1%の有意な減少が認められた。

Table 5. Effects of pioglitazone treatment on cortical bone mineral density (BMD), trabecular BMD, and cortical thickness of the whole femur and tibia.

	Control	Pioglitazone	
		5 mg/kg	20 mg/kg
<i>Whole femur</i>			
Cortical BMD (mg/cm ³)	1105 ± 4.13	1079 ± 9.04 *	1067 ± 6.00 **
Trabecular BMD (mg/cm ³)	448 ± 6.64	416 ± 11.0 *	406 ± 3.71 **
Cortical thickness (mm)	0.58 ± 0.01	0.54 ± 0.01 **	0.53 ± 0.01 **
<i>Whole tibia</i>			
Cortical BMD (mg/cm ³)	1126 ± 4.74	1119 ± 5.98	1110 ± 6.05
Trabecular BMD (mg/cm ³)	400 ± 6.95	389 ± 6.70	368 ± 4.18 **
Cortical thickness (mm)	0.62 ± 0.02	0.59 ± 0.01	0.57 ± 0.01 *

Data represents the mean ± S.E. (n = 10). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Control.

4. 血清カルシウム値、オステオカルシン値、TRAP 値

ピオグリタゾン投与による血清カルシウム値の有意な影響は認められなかった (Fig. 8A)。しかし、血清オステオカルシン値は、対照群と比べピオグリタゾン 20 mg/kg 投与群で約 24% 有意に減少し (Fig. 8B)、血清 TRAP 値はピオグリタゾン 20 mg/kg 投与群で約 50% もの有意な増加が認められた (Fig. 8C)。

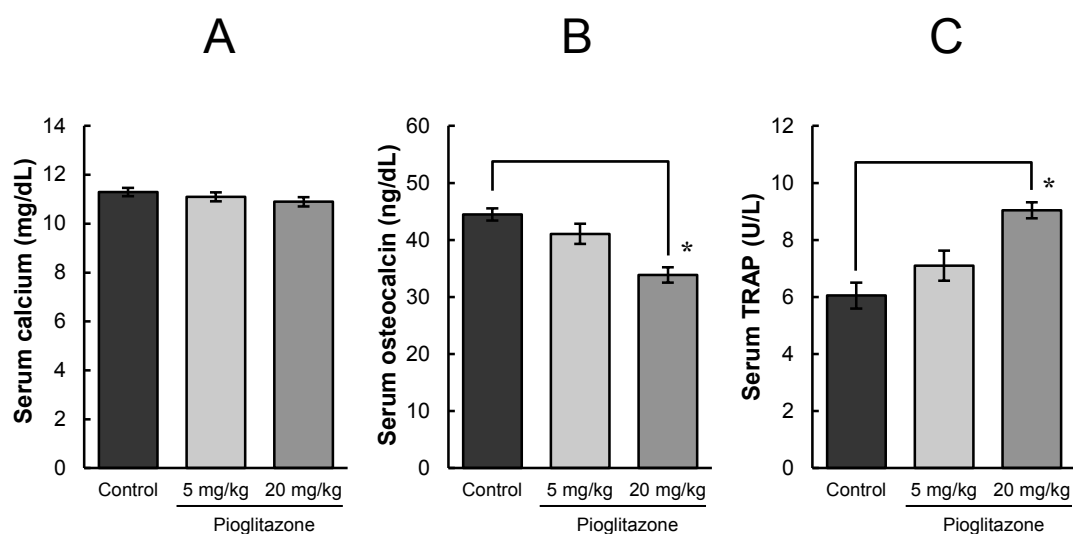


Fig. 8. Effects of pioglitazone treatment on serum calcium (A), osteocalcin (B), and TRAP levels (C).

TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase-5b. Data represents the mean \pm S.E. (n = 10).

* $P < 0.05$.

5. 骨組織形態計測

ピオグリタゾン 20 mg/kg 投与群の骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N) は、対照群と比較し約 42%、19%、29%とそれぞれ有意に減少し、骨梁間隙 (Tb.Sp) は約 63%もの有意な増加が認められた (Table 6)。また、20 mg/kg 投与群の類骨量 (OV/BV)、類骨面 (OS/BS)、骨芽細胞面 (Ob.S/BS) は、対照群と比較し約 57%、42%、59%とそれぞれ有意に減少した。さらに、5 mg/kg 投与群と 20 mg/kg 投与群の骨石灰化面 (MS/BS) はそれぞれ約 15%と 17%、骨石灰化速度 (MAR) はそれぞれ約 17%と 20%、骨形成速度 (BFR/BS) はそれぞれ約 28%と 38%と有意に減少した。また、20mg/kg 投与群の浸食面 (ES/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS) は、対照群の約 2.6 倍、3.6 倍、2.6 倍もの有意な増加が認められた。骨組織像 (Fig. 9) からピオグリタゾン 20 mg/kg 投与群では対照群と比べ、類骨量、類骨面、標識幅の減少と浸食面および破骨細胞数の顕著な増加が観察された。

Table 6. Bone histomorphometric analysis of the proximal tibial metaphysis in rats.

	Control	Pioglitazone	
		5 mg/kg	20 mg/kg
<i>Bone structure</i>			
BV/TV (%)	24.7 ± 1.61	20.7 ± 1.05	14.3 ± 1.47 **
Tb.Th (µm)	81.3 ± 2.97	70.6 ± 5.51	66.2 ± 2.99 *
Tb.N (N/mm)	3.02 ± 0.11	3.00 ± 0.19	2.14 ± 0.13 **
Tb.Sp (µm)	251 ± 13.5	273 ± 20.1	409 ± 28.5 **
<i>Bone formation</i>			
OV/BV (%)	2.40 ± 0.35	1.59 ± 0.38	1.03 ± 0.29 *
OS/BS (%)	24.7 ± 1.68	20.5 ± 2.03	14.4 ± 2.01 *
Ob.S/BS (%)	12.9 ± 1.15	8.11 ± 1.38 *	5.37 ± 0.87 **
MS/BS (%)	42.2 ± 1.76	36.0 ± 1.44 *	35.1 ± 1.12 **
MAR (µm/day)	1.53 ± 0.04	1.28 ± 0.06 *	1.23 ± 0.06 **
BFR/BS (mm ³ /mm ² /year)	0.18 ± 0.02	0.13 ± 0.02 *	0.11 ± 0.01 **
<i>Bone resorption</i>			
ES/BS (%)	3.30 ± 0.45	5.39 ± 0.55	8.60 ± 1.23 **
Oc.S/BS (%)	1.50 ± 0.34	2.97 ± 0.39	5.39 ± 0.58 **
N.Oc/BS (N/mm)	1.11 ± 0.09	1.56 ± 0.18	2.85 ± 0.23 **

BV: bone volume, TV: tissue volume, Tb.Th: trabecular thickness, Tb.N: trabecular number, Tb.Sp: trabecular separation, OV: osteoid volume, OS: osteoid surface, BS: bone surface, Ob.S: osteoblast surface, MS: mineralizing surface, MAR: mineral apposition rate, BFR: bone formation rate, ES: eroded surface, Oc.S: osteoclast surface, N.Oc: osteoclast number. Data represents the mean ± S.E. (n = 10). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Control.

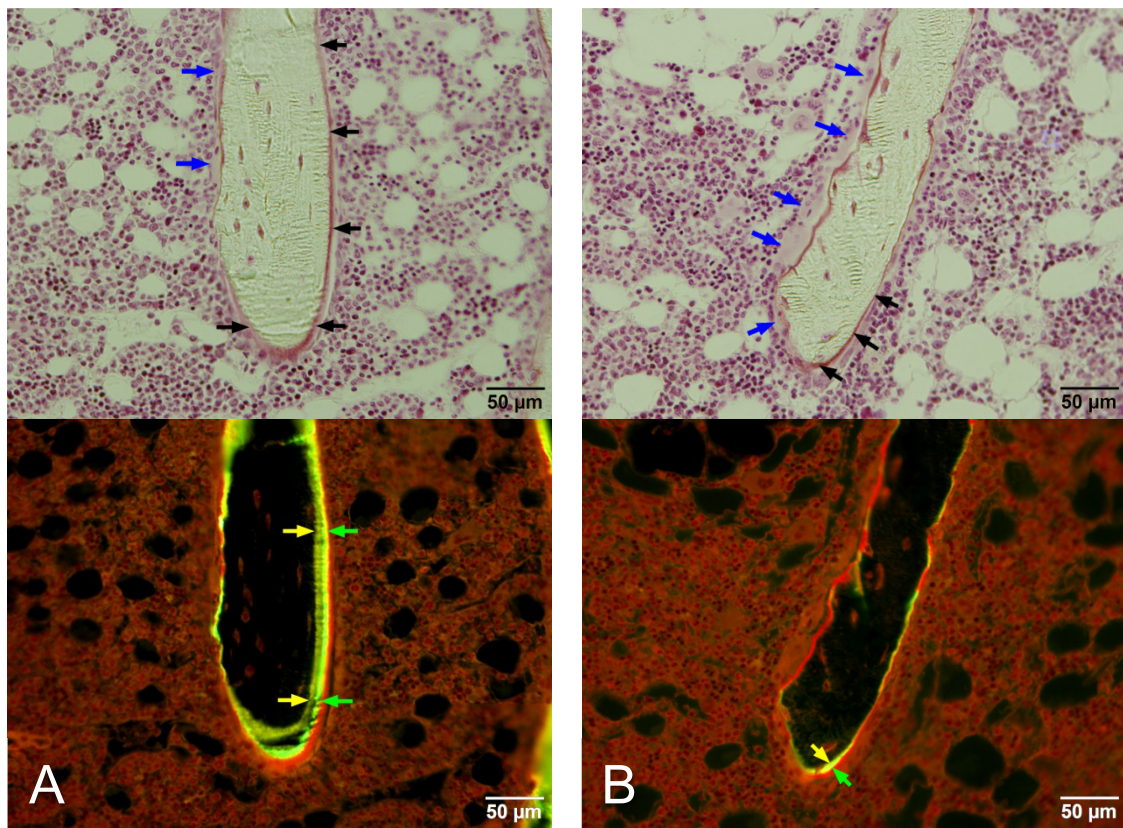


Fig. 9. Typical micrographs of the slices assessed by bone histomorphometry under natural light (upper photos) and fluorescence (lower photos). A: control group, B: pioglitazone 20 mg/kg treated group.

In the upper photos, the osteoid surface and the osteoclast are indicated by the black arrows and the blue arrows, respectively. In the lower photos, the labeling surface with tetracycline and calcein are indicated by the yellow arrows and the green arrows, respectively. (Villanueva Bone Stain)

3-4 考 察

チアゾリジン薬は 2 型糖尿病治療薬として臨床で幅広く用いられている。しかし、チアゾリジン薬の長期間服用により骨密度が減少し骨折リスクが高まることが報告されている (80-83)。糖尿病の薬物治療は薬剤の長期間服用が一般的であるため、糖尿病患者のアドヒアランス遵守には、副作用の発現予防が重要である。本検討ではピオグリタゾンの骨強度に及ぼす影響について、大腿骨骨幹部の 3 点曲げ法による骨強度試験を行い評価した。その結果、ラットへのピオグリタゾン 20 mg/kg の 24 週間投与により、骨破断に至るまでに負荷された最大荷重と破断エネルギーが有意に減少した。ピオグリタゾン投与群の骨密度の減少率を対照群と比較すると、大腿骨の皮質骨骨密度では 5 mg/kg 投与群と 20 mg/kg 投与群でそれぞれ約 2.4 %と 3.5 %、海綿骨骨密度ではそれぞれ約 7.2 %と 9.4 %であった。また、脛骨の皮質骨骨密度には有意な変化は認められなかったが、海綿骨骨密度は 20 mg/kg 投与群で約 8.1 %の有意な減少が認められた。ピオグリタゾンは、皮質骨に比べて海綿骨の骨密度に影響を及ぼすことが明らかとなった。

PPAR γ の過剰発現は、多分化能を有する骨髄間質細胞から脂肪細胞への分化を誘導する一方で、相対的に骨芽細胞への分化を抑制することが報告されている (84)。さらに、チアゾリジン薬は骨髄間質系細胞から骨芽細胞への分化を調節するマスター遺伝子である Runx2 の発現を低下させる (85-87)、PPAR γ 遺伝子ヘテロ欠損マウスは野生型に比べて骨芽細胞数が多く、骨形成の亢進を伴う骨量の増加が観察される (88) ことが報告されている。これらの知見から、チアゾリジン薬は骨芽細胞の分化を阻害し骨形成活性を抑制すると考えられている。一方、チアゾリジン薬の破骨細胞や骨吸収活性に及ぼす影響については、破骨細胞の形成を抑制し骨吸収活性を抑制するとの *in vitro* による報告 (89, 90) や、破骨細胞分化誘導因子の RANKL (receptor activator of NF κ B ligand) 発現を制御し、破骨細胞形成能を増強させるとの *in vitro* による報告 (91) も

あり、その見解は未だ一致していない。さらに、ロシグリタゾンの14週間服用により骨密度の減少と骨形成マーカーの有意な低下が認められたが、骨吸収マーカーに変動は認められなかったとの報告(95)もあり、チアゾリジン薬の骨吸収活性に及ぼす影響については未だ明確には呈示されていない。本研究では、ピオグリタゾンの骨代謝回転に及ぼす影響を明らかにするため骨代謝マーカーを測定した。その結果、20 mg/kg 投与群では血清オステオカルシン値の有意な減少と血清 TRAP 値の有意な増加が認められ、ピオグリタゾン投与により骨形成活性は抑制され骨吸収活性は亢進することが明らかとなり、この骨形成と骨吸収の不均衡が骨密度の減少ならびに骨強度の低下を誘発したものと推測された。このピオグリタゾンの骨代謝回転への影響について、さらに脛骨近位部骨幹端における骨組織形態の変化を検討した。その結果、20 mg/kg 投与群では、骨微細構造の指標である骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th) および骨梁数 (Tb.N) の有意な減少と骨梁間隙 (Tb.Sp) の有意な増加が認められた。これらの結果より、ピオグリタゾン投与により海綿骨の粗雑化が誘発され、骨微細構造が劣化することが明らかとなった。さらに、20 mg/kg 投与群では、骨形成の指標である類骨量 (OV/BV)、類骨面 (OS/BS)、骨芽細胞面 (Ob.S/BS)、骨形成速度 (BFR/BS) は有意に減少し、骨芽細胞の分化・増殖の指標である骨石灰化面 (MS/BS)、骨芽細胞の活動の指標である骨石灰化速度 (MAR) は 5 mg/kg、20 mg/kg の両投与群で有意な減少が認められた。本検討の結果、ピオグリタゾン投与により骨芽細胞活性が抑制され、さらに骨芽細胞の分化・増殖能の抑制も起こり、その帰結として骨形成活性の抑制が生じたものと推測された。一方、浸食面 (ES/BS) は 20 mg/kg 投与群で有意な増加が認められ、さらに、破骨細胞数 (N.Oc/BS) と破骨細胞面 (Oc.S/BS) も共に増加したことから、ピオグリタゾンは破骨細胞機能を促進し骨吸収活性を亢進することが明らかとなった。これらの結果は、チアゾリジン薬による破骨細胞機能の促進と骨吸収活性の亢進を骨組織形態学的に裏付けた初めての報告である。

3-5 小 括

1. ピオグリタゾン 20 mg/kg の 24 週間投与により、ラットの骨密度の有意な減少と骨強度の有意な低下が認められた。
2. ピオグリタゾンは、脛骨近位部骨幹端において、骨微細構造の指標である海綿骨骨量、骨梁幅、骨梁数を有意に減少させ骨梁間隙を有意に増加した。
3. ピオグリタゾンは、骨形成の指標である類骨量、類骨面、骨芽細胞面、骨形成速度と、骨芽細胞機能の指標である骨石灰化面、骨石灰化速度を有意に減少した。
4. ピオグリタゾンは、骨吸収の指標である浸食面、破骨細胞面、破骨細胞数を有意に増加した。

以上の結果より、ピオグリタゾン誘発性の骨強度の低下は、骨密度の減少だけでなく、海綿骨の骨微細構造の劣化を伴うこと、さらに、これまで報告されているピオグリタゾンの骨形成活性の抑制に加え、骨吸収活性の亢進により骨リモデリングの破綻による骨質の劣化が大きく関与することが明らかとなった。

第 4 章

新規抗てんかん薬の骨代謝に及ぼす影響

4-1 目的

てんかんは脳ニューロンが過剰に興奮することにより、けいれん発作が反復して現れる慢性の脳神経疾患である (96)。てんかんの治療は、抗てんかん薬による発作予防を目的とした薬物療法が中心となり、てんかんと診断された患者の約半数は抗てんかん薬の長期間服用が必要となる。そのため、患者の服薬アドヒアランス維持には、副作用の発現予防が重要となる。抗てんかん薬の長期間服用による重大な副作用の一つに、骨密度の減少を伴う骨折リスクの増大が報告されている (97-100)。従来から汎用されてきたフェニトインは骨代謝に影響を及ぼす薬物として知られており (101)、その服用者の骨密度減少率は 1 年間で約 1.8%にも及ぶことが報告されている (102)。また、動物実験による基礎研究より、フェニトインはラットの骨吸収活性を亢進することで骨代謝に影響を及ぼすことが報告されている (103, 104)。フェニトインのように 1990 年以前から使用されてきた薬物を“古典的抗てんかん薬”と呼称するが、1990 年以降に発売された抗てんかん薬は“新規抗てんかん薬”として分類され、本邦でも 2006 年以降にガバペンチン、トピラマート、ラモトリギン、レベチラセタム、ペランパネルなどが承認され臨床適応されている。しかし、新規抗てんかん薬が古典的抗てんかん薬と同様に骨代謝に影響を及ぼすかについては未だに明らかにされていない。そこで、本章では、フェニトインを陽性対照として、ガバペンチン、トピラマート、ラモトリギン、レベチラセタム、ペランパネルの骨代謝に及ぼす影響について検討を行った。

4-2 実験方法

実験 1. ガバペンチン、レベチラセタムの検討

1. 動物

5 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット (日本クレア, 東京) を、室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクル (7:00 点灯) の実験動物室で飼育した。

実験期間中、固形飼料（MF；オリエンタル酵母，東京）と飲料水を自由摂取させた。本動物実験は、新潟薬科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2. 薬物

フェニトイン（アレビアチン®；大日本住友製薬，東京）、ガバペンチン（ガバペン®；ファイザー，東京）、レベチラセタム（イーケプラ®；ユーシービーージャパン，東京）を用いた。ガバペンチンとレベチラセタムは錠剤を均一に粉砕した後、0.2% CMC-Na 溶液で懸濁した。フェニトインは散剤を 0.2% CMC-Na 溶液で希釈した。それぞれの薬物はラットへの投与容量が体重 100 g あたり 0.1 mL となるように用時調製した。

3. 実験手順

ラットを、対照群、フェニトイン 20 mg/kg 投与群、ガバペンチン 30 mg/kg 投与群、150 mg/kg 投与群、レベチラセタム 50 mg/kg 投与群、200 mg/kg 投与群の 1 群 9 匹からなる 6 群に分けた。薬物投与量は、フェニトイン（105）、ガバペンチン（106, 107）、レベチラセタム（108）を用いて抗てんかん作用を検討した報告を参考に決定した。対照群には 0.2% CMC-Na 溶液を投与した。薬物投与は午前 9 時に行い 12 週間の連日経口投与を行った。最終薬物投与から 24 時間後に CO₂ 麻酔下で全採血を行い、得られた血液は常法に従い血清を分取し、測定まで -80 °C で保存した。大腿骨と脛骨は摘出し、付着する筋肉や腱などの組織を取り除き、大腿骨は骨強度と骨密度の測定に、脛骨は骨密度の測定と骨組織形態計測に用いた。

4. 骨強度の測定

第 3 章に準じて行った。

5. 骨密度の測定

第3章に準じて行った。

6. 血清生化学マーカーの測定

血清カルシウム値、血清オステオカルシン値、血清 TRAP 値の測定は、第2章に準じて行った。血清 25-ヒドロキシビタミン D₃ (25(OH)D₃) 値は、25(OH) vitamin D enzyme-linked immunosorbent assay キット (Immundiagnostik GmbH, Bensheim, Germany) を、血清副甲状腺ホルモン (PTH) 値は、Rat Intact PTH ELISA キット (Immutopics, San Clement, CA, USA) を用いて測定した。

7. 骨組織形態計測

第3章に準じて行った。

8. 統計学的処理

全ての値は平均値±標準誤差で示した。多群間の比較は one-way ANOVA の後、Dunnett's test を用いた。

実験 2. トピラマート、ラモトリギンの検討

1. 動物

本章の実験 1 に準じて行った。

2. 薬物

フェニトイン (アレビアチン®; 大日本住友製薬, 東京)、トピラマート (トピナ®; 協和発酵キリン, 東京)、ラモトリギン (ラミクタール®; グラクソスミスクライン, 東京) を用いた。トピラマートとラモトリギンは錠剤を均一に粉碎した後、0.2% CMC-Na 溶液で懸濁した。フェニトインの調製は本章の実験 1 に準じた。それぞれの薬物はラットへの投与容量が体重 100 g あたり 0.1 mL となるように用時調製した。

3. 実験手順

ラットを、対照群、フェニトイン 20 mg/kg 投与群、トピラマート 5 mg/kg 投与群、20 mg/kg 投与群、ラモトリギン 2 mg/kg 投与群、10 mg/kg 投与群の 1 群 10 匹からなる 6 群に分けた。薬物投与量は、フェニトイン (105)、トピラマート (109, 110)、ラモトリギン (111, 112) を用いて抗てんかん作用を検討した報告を参考に決定した。対照群には投与量の調製溶媒である 0.2% CMC-Na 溶液を投与した。薬物投与は午前 9 時に行い 12 週間の連日経口投与を行った。最終薬物投与から 24 時間後に CO₂ 麻酔下で全採血を行い、得られた血液は常法に従い血清を分取し、測定まで -80 °C で保存した。大腿骨と脛骨は摘出し、附着する筋肉や腱などの組織を取り除き、大腿骨は骨強度と骨密度の測定に、脛骨は骨密度の測定と骨組織形態計測に用いた。

4. 骨強度の測定

第 3 章に準じて行った。

5. 骨密度の測定

第 3 章に準じて行った。

6. 血清生化学マーカーの測定

本章の実験 1 に準じて行った。

7. 骨組織形態計測

第 3 章に準じて行った。

8. 統計学的処理

本章の実験 1 に準じて行った。

実験 3. ペランパネルの検討

1. 動物

6 週齢の C57BL/6 系雄性マウス（日本クレア，東京）を、室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクル（7：00 点灯）の実験動物室で飼育した。実験期間中、固形飼料（MF；オリエンタル酵母，東京）と飲料水を自由摂取させた。本動物実験は、新潟薬科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2. 薬物

フェニトイン（アレビアチン®；大日本住友製薬，東京）とペランパネル（フィコンパ®；エーザイ，東京）を用いた。ペランパネルは錠剤を均一に粉碎した後、0.2% CMC-Na 溶液で懸濁した。フェニトインは散剤を 0.2% CMC-Na 溶液で希釈した。それぞれの薬物はマウスへの投与容量が体重 20 g あたり 0.1 mL となるように用時調製した。

3. 実験手順

マウスを、対照群、フェニトイン 30 mg/kg 投与群、ペランパネル 3.0 mg/kg 投与群の 1 群 12 匹からなる 3 群に分けた。薬物投与量は、フェニトイン(113)、ペランパネル(114)を用いて抗てんかん作用を検討した報告を参考に決定した。対照群には 0.2% CMC-Na 溶液を投与した。薬物投与は午前 9 時に行い 6 週間の連日経口投与を行った。最終薬物投与から 24 時間後に CO₂ 麻酔下で安楽死後、脛骨を摘出し、付着する筋肉などの組織を取り除き骨組織形態計測に用いた。

4. 骨組織形態計測

第 3 章に準じて行った。計測範囲は、脛骨近位成長板から遠心に 0.23 mm から 1.40 mm の範囲内で、外側の皮質骨から 0.2 mm 離れた二次海綿骨領域を対象にした。

5. 統計学的処理

本章の実験 1 に準じて行った。

4-3 結果

実験 1. ガバペンチン、レベチラセタムの検討

1. 大腿骨骨幹の骨強度

フェニトイン 20 mg/kg 投与群の最大荷重 (Fig. 10A)、破断エネルギー (Fig. 10B)、剛性 (Fig. 10C) は、対照群と比較しそれぞれ約 16%、20%、16%と有意に減少した。一方、ガバペンチン投与群ならびにレベチラセタム投与群では、その投与量にかかわらず骨強度への有意な影響は認められなかった。

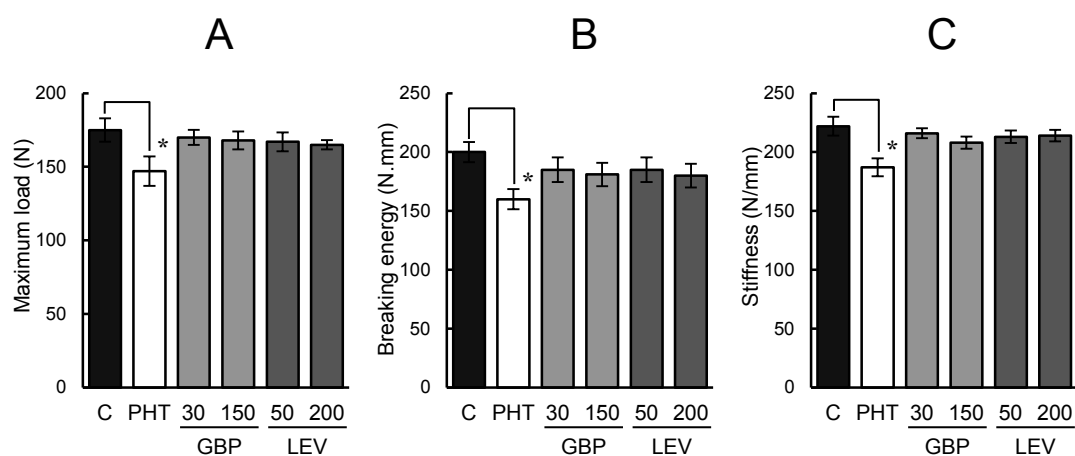


Fig. 10. Effects of phenytoin, gabapentin, and levetiracetam treatment on bone strength properties (A: maximum load, B: breaking energy, C: stiffness) of the femoral mid-diaphysis.

C: control group, PHT: phenytoin 20 mg/kg treated group, GBP: gabapentin 30 or 150 mg/kg treated group, LEV: levetiracetam 50 or 200 mg/kg treated group. Data represent the mean \pm S.E. (n = 9) * $P < 0.05$.

2. 大腿骨ならびに脛骨の骨密度

フェニトイン 20 mg/kg 投与群の大腿骨骨密度 (Fig. 11A) ならびに脛骨骨密度 (Fig. 11B) は、対照群と比較しそれぞれ約 5.2%と 4.3%と有意に減少した。一方、ガバペンチン投与群とレベチラセタム投与群では、いずれの骨部位においても骨密度の有意な変化は認められなかった。

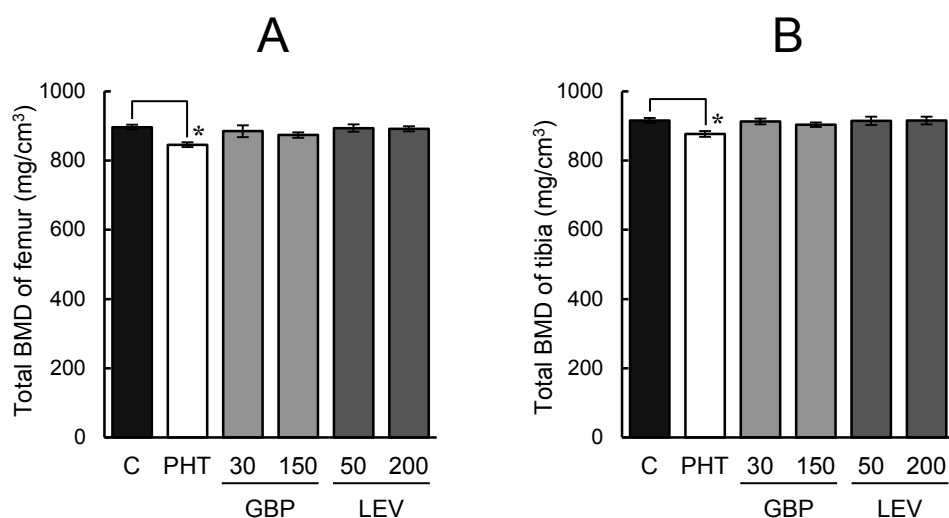


Fig. 11. Effects of phenytoin, gabapentin, and levetiracetam treatment on total bone mineral density (BMD) of the femur (A) and tibia (B).

C: control group, PHT: phenytoin 20 mg/kg treated group, GBP: gabapentin 30 or 150 mg/kg treated group, LEV: levetiracetam 50 or 200 mg/kg treated group. Data represent the mean \pm S.E. (n = 9) * $P < 0.05$.

3. 血清カルシウム値、オステオカルシン値、TRAP 値、25(OH)D₃ 値、PTH 値

血清カルシウム値、血清 25(OH)D₃ 値、血清 PTH 値は、どの薬物投与群においても対照群と比較し有意な差は認められなかった (Table 7)。フェニトイン 20 mg/kg 投与群の血清 TRAP 値は、対照群の約 2 倍の有意な増加を示した。一方、ガバペンチン 150 mg/kg 投与群では、対照群と比較し血清オステオカルシン値が約 22%の有意な減少と、血清 TRAP 値が約 60%の有意な増加を示した。

Table 7. Effects of phenytoin, gabapentin, and levetiracetam treatment on serum calcium, osteocalcin, TRAP, 25(OH)D₃, and PTH levels.

	Control	Phenytoin 20 mg/kg	Gabapentin		Levetiracetam	
			30 mg/kg	150 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg
Calcium (mg/dL)	10.3 ± 0.10	10.1 ± 0.08	10.0 ± 0.15	10.1 ± 0.18	10.3 ± 0.10	10.2 ± 0.07
Osteocalcin (ng/dL)	41.7 ± 1.54	38.9 ± 2.26	36.5 ± 1.26	32.7 ± 1.82 *	40.1 ± 1.84	39.2 ± 1.19
TRAP (U/L)	13.3 ± 1.68	26.4 ± 2.49 *	17.0 ± 1.32	21.2 ± 2.67 *	13.7 ± 0.64	14.1 ± 1.13
25(OH)D ₃ (mol/L)	215 ± 10.2	190 ± 12.6	209 ± 11.5	211 ± 13.6	215 ± 17.8	216 ± 20.1
PTH (pg/mL)	41.5 ± 7.00	49.7 ± 7.34	41.2 ± 8.22	45.3 ± 7.12	41.7 ± 5.44	43.5 ± 4.80

TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase-5b, 25(OH)D₃: 25-hydroxy vitamin D₃, PTH: parathyroid hormone. Data represents the mean ± S.E. (n = 9). * *P* < 0.05 vs Control.

4. 骨組織形態計測

骨組織形態計測結果を Table 8 に示した。フェニトイン 20 mg/kg 群 (PHT) とガバペンチン 150 mg/kg 投与群 (GBP) では、対照群と比較し骨量 (BV/TV: PHT; 39%, GBP; 18%)、骨梁幅 (Tb.Th: PHT; 29%, GBP; 13%)、骨梁数 (Tb.N: PHT; 32%, GBP; 14%) の有意な減少と骨量間隙 (Tb.Sp: PHT; 32%, GBP; 20%) の有意な増加が認められた。さらに、フェニトイン 20 mg/kg 投与群の浸食面 (ES/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS) は、対照群と比較しそれぞれ約 69%、85%、61%の有意な増加が認められた。ガバペンチン 150 mg/kg 投与群の類骨面 (OS/BS)、類骨量 (OV/BV)、骨芽細胞面 (Ob.S/BS)、骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR) は、対照群と比較しそれぞれ約 31%、26%、14%、18%、13%と有意に減少し、浸食面 (ES/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS) はそれぞれ約 41%、49%、40%と有意に増加した。骨組織像 (Fig. 12) から、ガバペンチン 150 mg/kg 投与群では対照群と比較し、類骨面、類骨量、標識幅の減少が観察された。一方、レベチラセタム投与群では低用量、高用量共に骨組織形態への有意な影響は認められなかった。

Table 8. Bone histomorphometric analysis of the proximal tibial metaphysis in rats.

	Control	Phenytoin 20 mg/kg	Gabapentin		Levetiracetam	
			30 mg/kg	150 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg
<i>Bone structure</i>						
BV/TV (%)	28.3 ± 1.28	17.3 ± 0.87**	25.4 ± 0.77	23.3 ± 1.46*	27.2 ± 1.29	27.4 ± 0.93
Tb.Th (µm)	85.9 ± 2.25	61.0 ± 0.87**	82.2 ± 2.47	75.0 ± 2.54*	88.3 ± 1.90	87.4 ± 2.61
Tb.N (N/mm)	2.93 ± 0.11	1.99 ± 0.12**	2.65 ± 0.12	2.51 ± 0.10*	2.88 ± 0.07	2.88 ± 0.13
Tb.Sp (µm)	263 ± 16.9	349 ± 12.5**	284 ± 7.80	318 ± 10.5*	271 ± 15.6	263 ± 17.9
<i>Bone formation</i>						
OV/BV (%)	3.09 ± 0.15	2.89 ± 0.22	2.60 ± 0.18	2.30 ± 0.16*	2.86 ± 0.25	2.77 ± 0.21
OS/BS (%)	19.9 ± 2.02	18.4 ± 1.63	16.4 ± 1.04	13.8 ± 1.15*	19.4 ± 1.92	19.2 ± 1.11
Ob.S/BS (%)	11.3 ± 1.88	10.6 ± 0.70	9.53 ± 0.44	8.51 ± 0.74*	10.8 ± 0.64	10.5 ± 0.68
MS/BS (%)	31.2 ± 1.29	29.8 ± 1.35	27.7 ± 0.83	25.4 ± 1.19*	29.4 ± 1.68	29.0 ± 1.85
MAR (µm/day)	1.74 ± 0.05	1.69 ± 0.05	1.61 ± 0.04	1.52 ± 0.06*	1.69 ± 0.07	1.67 ± 0.60
<i>Bone resorption</i>						
ES/BS (%)	10.4 ± 0.93	17.7 ± 0.92**	12.8 ± 0.74	14.7 ± 0.70*	10.7 ± 0.94	10.8 ± 1.27
Oc.S/BS (%)	7.11 ± 0.64	13.1 ± 1.00**	9.17 ± 0.88	10.6 ± 0.62*	7.88 ± 0.67	7.50 ± 0.94
N.Oc/BS (N/mm)	1.96 ± 0.18	3.15 ± 0.22**	2.35 ± 0.13	2.75 ± 0.11*	1.97 ± 0.19	1.99 ± 0.32

BV: bone volume, TV: tissue volume, Tb.Th: trabecular thickness, Tb.N: trabecular number, Tb.Sp: trabecular separation, OV: osteoid volume, OS: osteoid surface, BS: bone surface, Ob.S: osteoblast surface, MS: mineralizing surface, MAR: mineral apposition rate, ES: eroded surface, Oc.S: osteoclast surface, N.Oc: osteoclast number. Data represents the mean ± S.E. (n = 9). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Control.

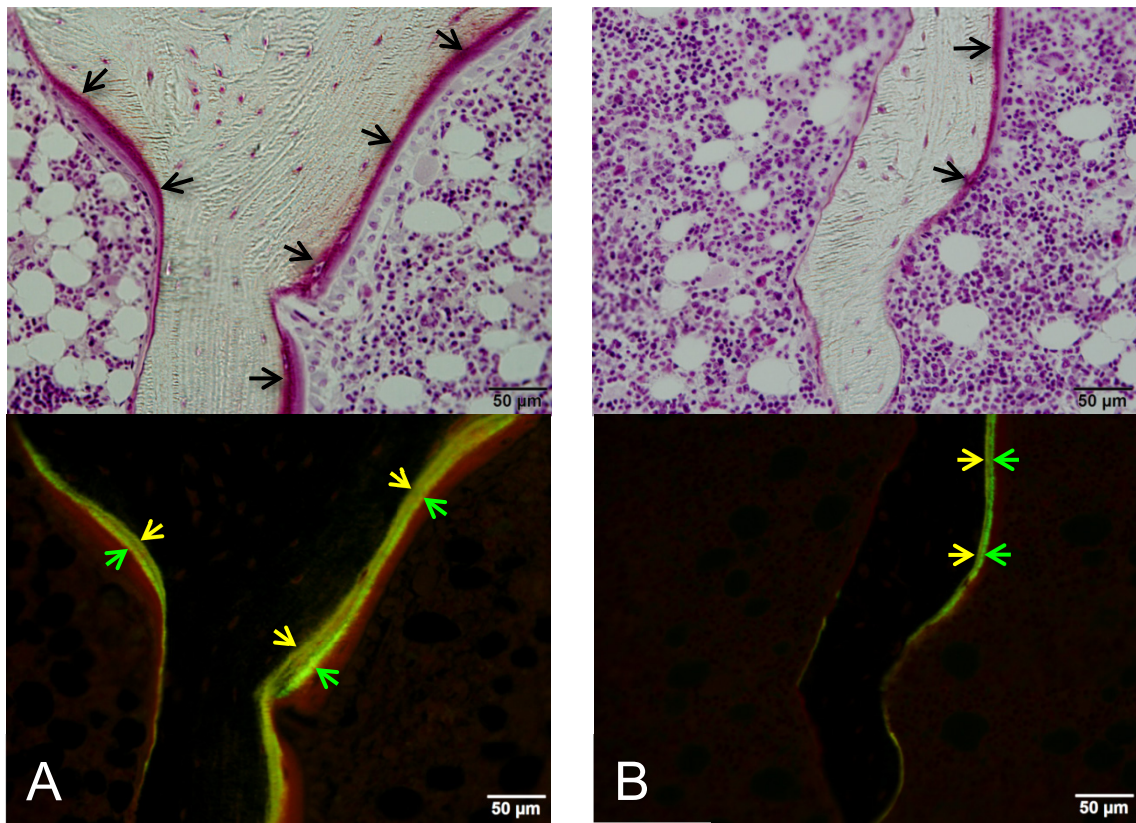


Fig. 12. Typical micrographs of the slices assessed by bone histomorphometry under natural light (upper photos) and fluorescence (lower photos). A: control group, B: gabapentin 150 mg/kg treated group.

In the upper photos, the osteoid surface is indicated by the black arrows. In the lower photos, the labeled surface with tetracycline and calcein are indicated by the yellow arrows and the green arrows, respectively. (Villanueva Bone Stain)

実験 2. トピラマート、ラモトリギンの検討

1. 大腿骨骨幹の骨強度

フェニトイン 20 mg/kg 投与群の最大荷重 (Fig. 13A)、破断エネルギー (Fig. 13B)、剛性 (Fig. 13C) は、対照群と比較しそれぞれ約 18%、33%、20%と有意に減少した。一方、トピラマートとラモトリギン投与による骨強度への影響は認められなかった。

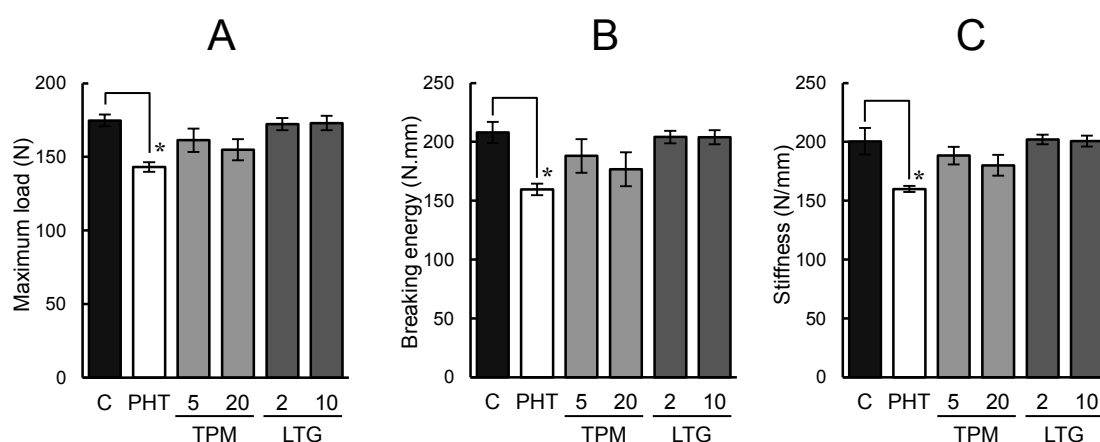


Fig. 13. Effects of phenytoin, topiramate, and lamotrigine on bone strength properties (A: maximum load, B: breaking energy, C: stiffness) of the femoral mid-diaphysis.

C: control group, PHT: phenytoin 20 mg/kg treated group, TPM: topiramate 5 or 20 mg/kg treated group, LTG: lamotrigine 2 or 10 mg/kg treated group. Data represent the mean \pm S.E. (n = 10) * $P < 0.05$.

2. 大腿骨ならびに脛骨の骨密度

フェニトイン 20 mg/kg 投与群の大腿骨骨密度 (Fig. 14A) ならびに脛骨骨密度 (Fig. 14B) は、対照群と比較しそれぞれ約 7.8%、5.2%と有意に減少した。一方、トピラマート投与群、ラモトリギン投与群共に骨密度の有意な変化は認められなかった。

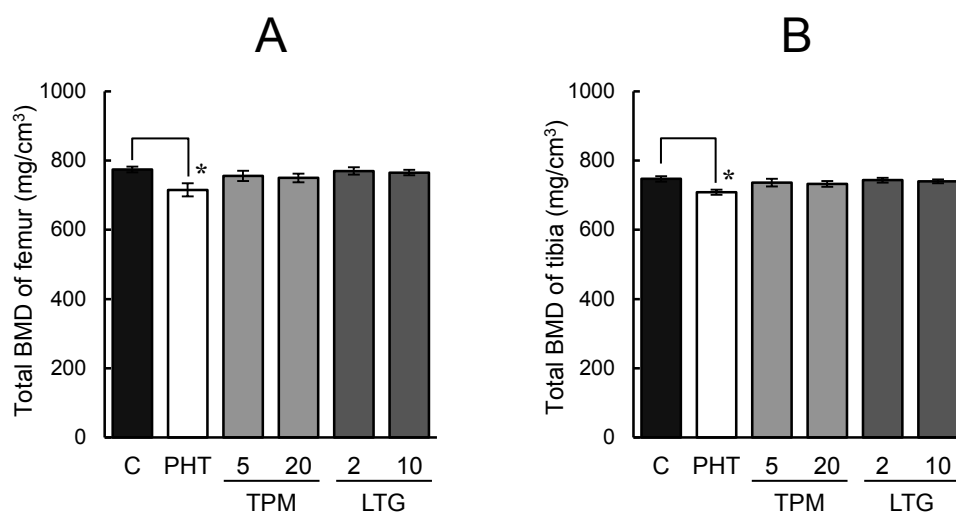


Fig. 14. Effects of phenytoin, topiramate, and lamotrigine treatment on total bone mineral density (BMD) of the femur (A) and tibia (B).

C: control group, PHT: phenytoin 20 mg/kg treated group, TPM: topiramate 5 or 20 mg/kg treated group, LTG: lamotrigine 2 or 10 mg/kg treated group. Data represent the mean \pm S.E. (n = 10) * $P < 0.05$.

3. 血清カルシウム値、オステオカルシン値、TRAP 値、25(OH)D₃ 値、PTH 値

血清カルシウム値、血清 25(OH)D₃ 値、血清 PTH 値は、どの薬物投与群においても有意な変化は認められなかった (Table 9)。フェニトイン 20 mg/kg 投与群の血清 TRAP 値は、対照群と比較して約 60%の有意な増加を示した。トピラマート 20 mg/kg 投与群の血清オステオカルシン値は、対照群と比較し約 29%の有意な減少を示した。

Table 9. Effects of phenytoin, topiramate, and lamotrigine treatment on serum calcium, osteocalcin, TRAP, 25(OH)D₃, and PTH levels.

	Control	Phenytoin	Topiramate		Lamotrigine	
		20 mg/kg	5 mg/kg	20 mg/kg	2 mg/kg	10 mg/kg
Calcium (mg/dL)	10.3 ± 0.13	10.1 ± 0.10	10.2 ± 0.12	10.2 ± 0.10	10.2 ± 0.12	10.2 ± 0.12
Osteocalcin (ng/mL)	43.2 ± 3.26	35.6 ± 1.53	34.7 ± 3.00	30.6 ± 2.48 *	41.7 ± 2.87	42.4 ± 2.81
TRAP (U/L)	12.9 ± 1.80	21.4 ± 2.43 *	11.7 ± 0.99	11.1 ± 0.87	12.9 ± 1.04	12.2 ± 1.32
25(OH)D ₃ (nmol/L)	206 ± 11.8	184 ± 16.2	203 ± 13.9	205 ± 10.5	218 ± 9.17	225 ± 11.7
PTH (pg/mL)	39.1 ± 4.48	46.6 ± 5.72	34.9 ± 4.24	34.9 ± 5.22	39.3 ± 6.03	38.4 ± 4.85

TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase-5b, 25(OH)D₃: 25-hydroxy vitamin D₃, PTH: parathyroid hormone. Data represents the mean ± S.E. (n = 10). * *P* < 0.05 vs Control.

4. 骨組織形態計測

フェニトイン 20 mg/kg 投与群では、対照群と比較し骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N) がそれぞれ約 33%、26%、32%有意に減少し、骨量間隙 (Tb.Sp) が約 33%有意に増加した (Table 10)。さらに、フェニトイン投与群では、対照群と比較し浸食面 (ES/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS) がそれぞれ約 35%、53%、63%と有意に増加した。トピラマート 20 mg/kg 投与群では、対照群と比較し類骨面 (OS/BS)、類骨量 (OV/BV)、骨芽細胞面 (Ob.S/BS)、骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR) がそれぞれ約 23%、36%、32%、26%、22%と有意に減少した。骨組織像 (Fig. 15) から、トピラマート 20 mg/kg 投与群では、対照群と比較し類骨面、類骨量、標識幅の減少が観察された。一方、ラモトリギン投与群では低用量、高用量共に骨組織形態への有意な影響は認められなかった。

Table 10. Bone histomorphometric analysis of the proximal tibial metaphysis in rats.

	Control	Phenytoin 20 mg/kg	Topiramate		Lamotrigine	
			5 mg/kg	20 mg/kg	2 mg/kg	10 mg/kg
<i>Bone structure</i>						
BV/TV (%)	24.8 ± 1.17	16.6 ± 0.68 *	23.4 ± 1.43	21.9 ± 0.93	24.3 ± 1.44	24.3 ± 1.29
Tb.Th (µm)	83.5 ± 4.09	61.5 ± 4.05 *	80.8 ± 3.76	74.4 ± 3.71	85.0 ± 2.61	81.3 ± 2.03
Tb.N (N/mm)	29.1 ± 0.12	2.01 ± 0.15 *	2.66 ± 0.13	2.54 ± 0.16	2.81 ± 0.14	2.88 ± 0.12
Tb.Sp (µm)	263 ± 14.7	349 ± 15.3 *	281 ± 12.3	295 ± 11.6	263 ± 9.65	262 ± 7.79
<i>Bone formation</i>						
OV/BV (%)	2.76 ± 0.23	2.60 ± 0.11	2.22 ± 0.20	1.77 ± 0.24 *	2.70 ± 0.29	2.60 ± 0.32
OS/BS (%)	21.6 ± 1.31	20.1 ± 0.74	18.6 ± 1.11	16.6 ± 0.72 *	20.2 ± 1.12	20.4 ± 1.36
Ob.S/BS (%)	10.2 ± 0.79	9.24 ± 0.43	8.22 ± 0.73	6.96 ± 0.87 *	9.24 ± 0.71	9.09 ± 0.86
MS/BS (%)	29.6 ± 2.34	26.3 ± 1.36	26.5 ± 1.90	21.8 ± 1.79 *	28.0 ± 1.68	29.0 ± 2.17
MAR (µm/day)	1.78 ± 0.05	1.69 ± 0.05	1.62 ± 0.07	1.56 ± 0.05 *	1.71 ± 0.06	1.68 ± 0.06
<i>Bone resorption</i>						
ES/BS (%)	11.6 ± 1.07	15.6 ± 1.13 *	10.8 ± 0.85	9.80 ± 0.53	11.4 ± 0.53	11.1 ± 0.56
Oc.S/BS (%)	6.93 ± 0.76	10.6 ± 1.05 *	6.39 ± 0.53	5.60 ± 0.53	6.98 ± 0.66	7.09 ± 0.80
N.Oc/BS (N/mm)	1.99 ± 0.28	3.25 ± 0.26 *	1.68 ± 0.32	1.45 ± 0.46	1.97 ± 0.19	1.99 ± 0.32

BV: bone volume, TV: tissue volume, Tb.Th: trabecular thickness, Tb.N: trabecular number, Tb.Sp: trabecular separation, OV: osteoid volume, OS: osteoid surface, BS: bone surface, Ob.S: osteoblast surface, MS: mineralizing surface, MAR: mineral apposition rate, ES: eroded surface, Oc.S: osteoclast surface, N.Oc: osteoclast number. Data represents the mean ± S.E. (n = 10). * $P < 0.05$ versus Control.

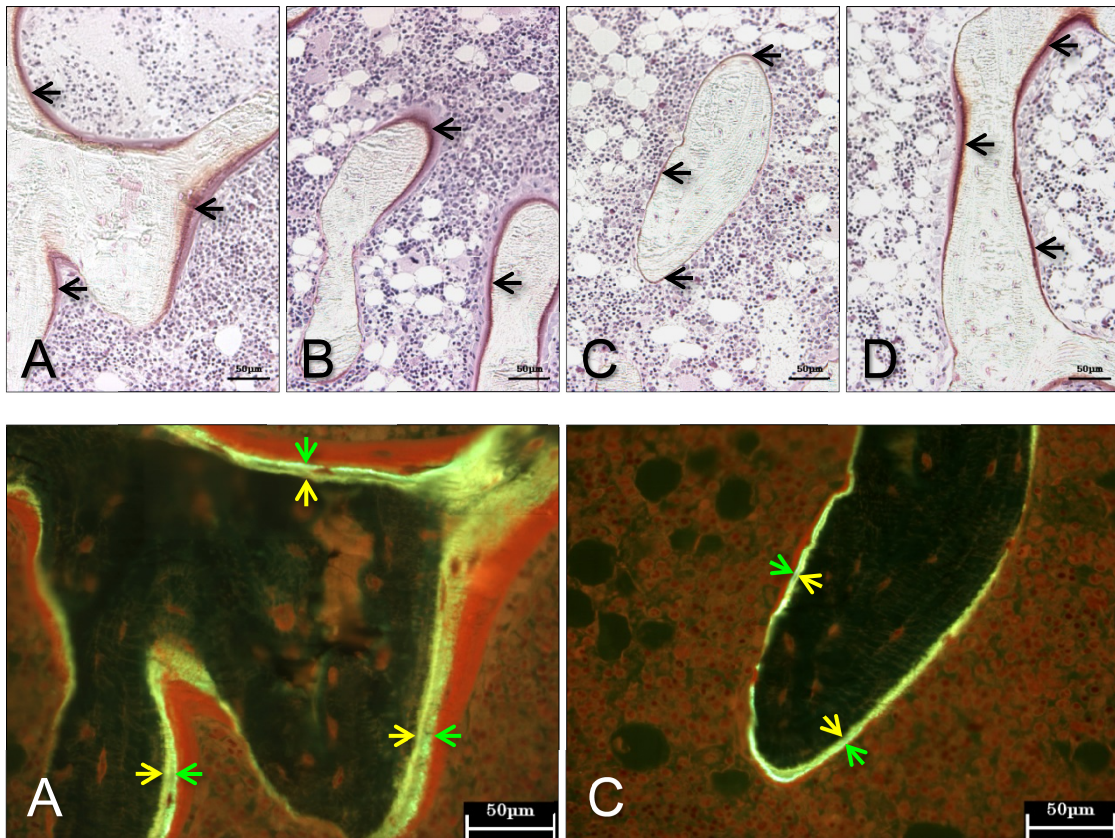


Fig. 15. Typical micrographs of the slices assessed by bone histomorphometry under natural light (upper photos) and fluorescence (lower photos). A: control group, B: phenytoin 20 mg/kg treated group, C: topiramate 20 mg/kg treated group, D: lamotrigine 10 mg/kg treated group.

In the upper photos, the osteoid surface is indicated by the black arrows. In the lower photos, the labeled surface with tetracycline and calcein are indicated by the yellow arrows and the green arrows, respectively. (Villanueva Bone Stain)

実験 3. ペランパネルの検討

1. 骨微細構造パラメーター

フェニトイン 30 mg/kg 投与群では、対照群と比較し骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N) がそれぞれ約 18%、16%、15%の有意な減少を認め、骨量間隙 (Tb.Sp) が約 29%の有意な増加を認めた (Fig. 16)。一方、ペランパネル 3.0 mg/kg 投与群では骨微細構造パラメーターへの有意な影響は認められなかった。

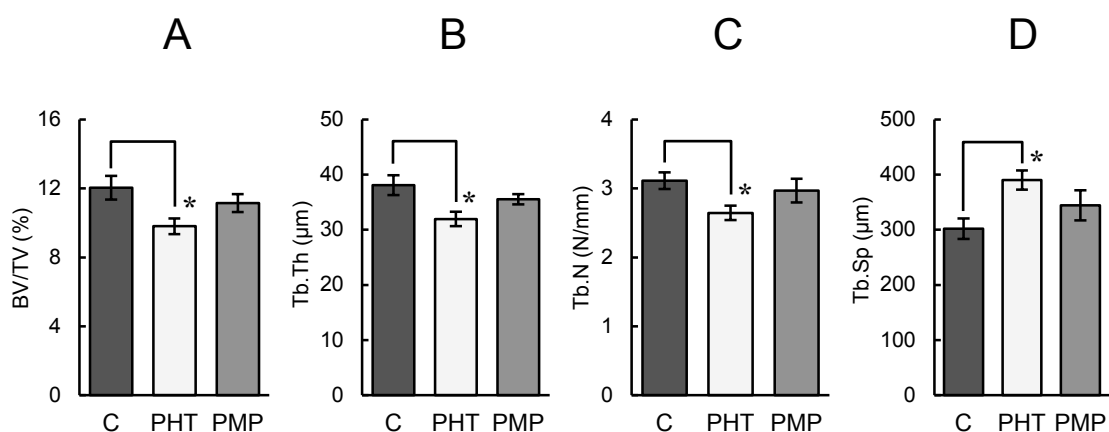


Fig. 16. Effects of phenytoin and perampanel treatment on bone structural parameters (A: BV/TV, B: Tb.Th, C: Tb.N, D: Tb.Sp) according to bone histomorphometry of the proximal tibia metaphysis.

C: control group, PHT: phenytoin 30 mg/kg treated group, PMP: perampanel 3.0 mg/kg treated group. BV: bone volume, TV: tissue volume, Tb.Th: trabecular thickness, Tb.N: trabecular number, Tb.Sp: trabecular separation. Data represent the mean \pm S.E. (n = 12).

* $P < 0.05$.

2. 骨形成パラメーターならびに骨吸収パラメーター

フェニトイン 30 mg/kg 投与群では、対照群と比較し浸食面 (ES/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS) がそれぞれ約 40%、50%、66%と有意に増加した (Fig. 17)。ペランパネル 3.0 mg/kg 投与群では、対照群と比較し浸食面 (ES/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS) がそれぞれ約 17%、24%、32%と有意に増加し (Fig. 17)、骨芽細胞面 (Ob.S/BS)、骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR)、骨形成速度 (BFR/BS) がそれぞれ約 14%、14%、17%、17%と有意に減少した (Fig. 18)。骨組織像 (Fig. 19) からも、ペランパネル投与群では対照群と比較し類骨量と標識幅の減少と破骨細胞の増加が観察された。

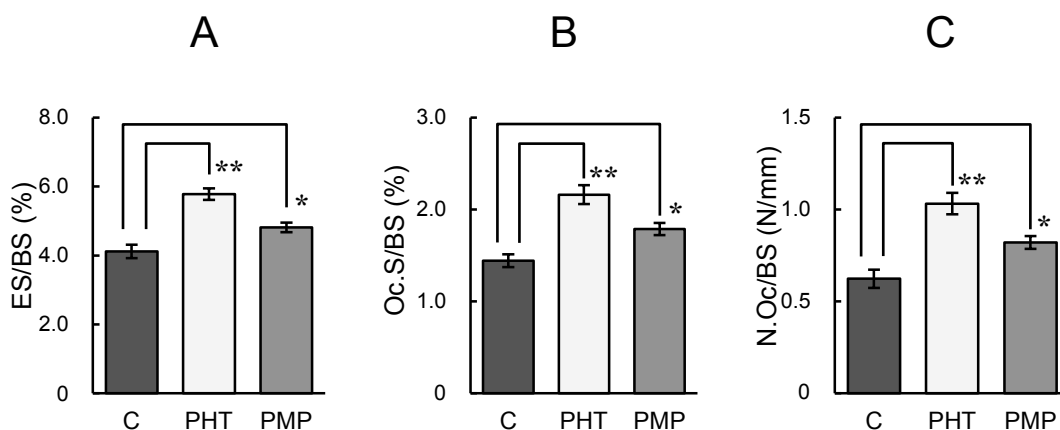


Fig. 17. Effects of phenytoin and perampanel treatment on bone resorption parameters (A: ES/BS, B: Oc.S/BS, C: N.Oc/BS) according to bone histomorphometry of the proximal tibia metaphysis.

C: control group, PHT: phenytoin 30 mg/kg treated group, PMP: perampanel 3.0 mg/kg treated group. ES: eroded surface, Oc.S: osteoclast surface, N.Oc: osteoclast number, BS: bone surface. Data represent the mean \pm S.E. (n = 12). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

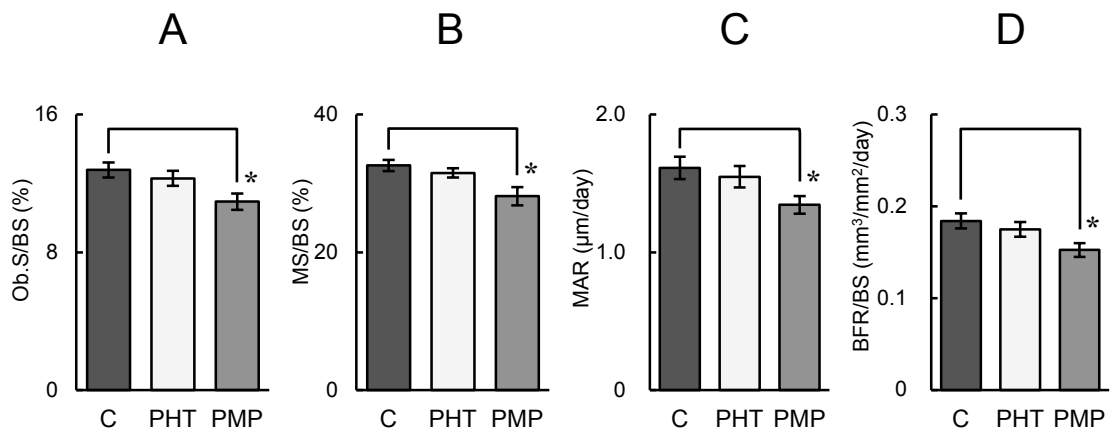


Fig. 18. Effects of phenytoin and perampanel treatment on bone formation parameters (A: Ob.S/BS, B: MS/BS, C: MAR, D: BFR/BS) according to bone histomorphometry of the proximal tibia metaphysis.

C: control group, PHT: phenytoin 30 mg/kg treated group, PMP: perampanel 3.0 mg/kg treated group. Ob.S: osteoblast surface, MS: mineralizing surface, MAR: mineral apposition rate, BFR: bone formation rate, BS: bone surface. Data represent the mean \pm S.E. (n = 12).

* $P < 0.05$.

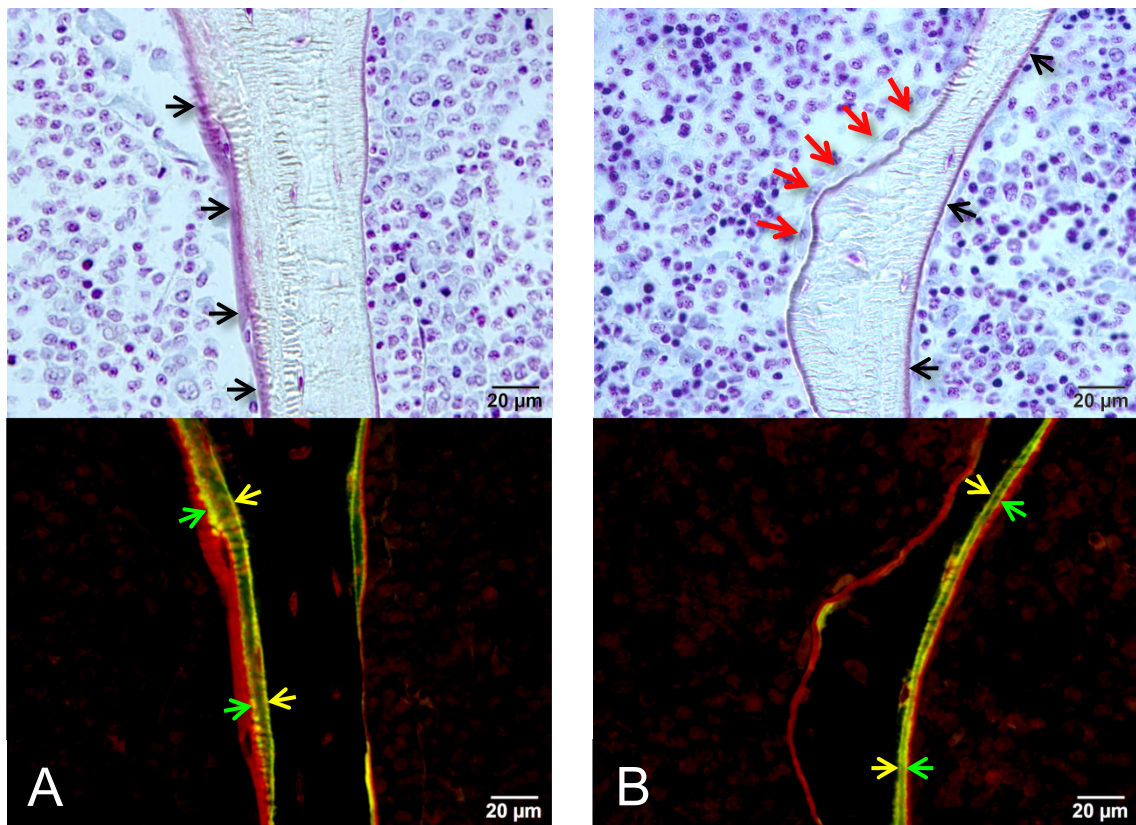


Fig. 19. Typical micrographs of the slices assessed by bone histomorphometry under natural light (upper photos) and fluorescence (lower photos). **A:** control group, **B:** perampanel 3.0 mg/kg treated group.

In the upper photos, the osteoid surface and the osteoclast are indicated by the black arrows and the red arrows, respectively. In the lower photos, the labeled surface with tetracycline and calcein are indicated by the yellow arrows and the green arrows, respectively. (Villanueva Bone Stain)

4-4 考察

フェニトインなどの古典的抗てんかん薬の長期投与はてんかん患者の骨密度を減少させ骨折リスクを高めることが報告されている(97-100)。しかし、近年、開発された新規抗てんかん薬の骨代謝に及ぼす影響についてはその詳細がほとんど報告されていない。本検討では、古典的抗てんかん薬フェニトインを陽性対照として、新規抗てんかん薬のガバペンチン、レベチラセタム、トピラマート、ラモトリギン、ペランパネルについて、それぞれの薬剤が骨代謝に及ぼす影響について広汎な検討を行った。実験 1 ならびに実験 2 では、フェニトイン 20 mg/kg の 12 週間連日投与により、ラットの骨密度が有意に減少し骨強度は低下することが認められた。しかし、ガバペンチン、レベチラセタム、トピラマート、ラモトリギン投与による骨強度ならびに骨密度への有意な影響は認められなかった。抗てんかん薬による骨密度減少の発生機序は未だその詳細が明らかではないが、ビタミン D の代謝促進を介した機序の可能性が考えられている(115-117)。25 ヒドロキシビタミン D₃ および 1,25 ジヒドロヒドロキシビタミン D₃ の減少は、腸管におけるカルシウム吸収を減少させ、二次性副甲状腺機能亢進症を誘発し、骨吸収活性の亢進を伴う骨量減少を誘発する(118)。古典的抗てんかん薬服用者では、血中副甲状腺ホルモン値の上昇(119)や血中 25 ヒドロキシビタミン D₃ 値の減少(120)が報告されている。一方、抗てんかん薬による骨量減少にビタミン D 代謝は関与しないとの報告(121, 122)もある。そこで、本研究では、抗てんかん薬のビタミン D 代謝に及ぼす影響を評価するために、血清中のカルシウム値、25(OH)D₃ 値、PTH 値を測定した。その結果、すべての測定値において抗てんかん薬投与による有意な変化は認められなかったことから、抗てんかん薬の骨代謝に及ぼす影響にはビタミン D 代謝が関与しないことが明らかとなった。

近年のメタ解析では、てんかん患者の骨折リスクの増大は骨密度の減少率から推定される以上にそのリスクは高いことが報告されており、抗てんかん薬に

よる骨脆弱性の進展には骨質の劣化が関与する可能性が示唆されている (123)。そこで、本研究では、骨組織形態計測による抗てんかん薬の骨質に及ぼす影響を検討した。

実験 1 では、ガバペンチンとレベチラセタムについて検討を行った。Lee ら (124) の後ろ向きコホート研究では、フェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピンなどの従来の抗てんかん薬服用者には骨密度の減少が認められたが、ガバペンチンやレベチラセタムなどの新規抗てんかん薬服用者の骨密度に有意な変化は認められなかった。一方、高齢の男性てんかん患者を対象とした前向きコホート研究 (125) では、ガバペンチン服用者の大腿骨頸部骨密度に有意な減少が認められており、集団ベース研究 (126) でもガバペンチン服用により骨折リスクが有意に高まることが報告されている。しかし、ガバペンチンの骨代謝に及ぼす影響を詳細に検討した報告は極めて少なく、骨代謝への作用メカニズムは不明である。本検討での骨組織形態計測結果から、フェニトインとガバペンチン 150 mg/kg のいずれの投与でも、骨微細構造の指標である骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N) が有意に減少し、骨梁間隙 (Tb.Sp) が有意に増加したことから、これらの薬物投与により海綿骨の粗雑化が誘発され、骨微細構造が劣化することが明らかとなった。骨吸収の指標である浸食面 (ES/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS) は、フェニトイン 20 mg/kg 投与群ならびにガバペンチン 150 mg/kg 投与群でそれぞれ有意に増加した。本結果とは対照的に、骨形成の指標である類骨面 (OS/BS)、類骨量 (OV/BV)、骨芽細胞数 (N.Ob/BS) は、ガバペンチン 150 mg/kg 投与群でのみ有意に減少した。さらに、骨芽細胞の分化・増殖の指標である骨石灰化面 (MS/BS) と骨芽細胞の活動の指標である骨石灰化速度 (MAR) も、ガバペンチン 150 mg/kg 投与群で有意に減少した。以上の結果から、フェニトインとガバペンチンは破骨細胞機能を促進し骨吸収活性を亢進させること、さらに、ガバペンチンは骨芽細胞機能を低下させ骨形成活性を抑制することが明らかとな

った。本検討では、レベチラセタム投与による骨密度ならびに骨代謝への有意な影響は認められなかった。レベチラセタムと骨代謝に関する知見は極めて限られており、レベチラセタム単剤服用によるてんかん患者の骨強度や骨代謝に異常は認められなかったとの臨床報告がある(127)。本検討はラットでの結果ではあるが、レベチラセタムは骨代謝への影響は認められず、骨脆弱性の誘発の可能性も極めて低いことが示された。

実験 2 では、トピラマートとラモトリギンについて検討を行った。トピラマートは、炭酸脱水酵素阻害作用により代謝性アシドーシスを誘導することで骨代謝に影響を及ぼす可能性が示唆されている(128)。しかし、臨床報告では、トピラマートの服用と骨折リスクには関連性がないこと(129)や、トピラマートを含めた多剤併用療法により骨密度の減少を認めたとの報告(130)もあり、その詳細は未だ明確には呈示されていない。本検討における骨組織形態計測の結果、トピラマート投与による浸食面(ES/BS)、破骨細胞面(Oc.S/BS)、破骨細胞数(N.Oc/BS)などの骨吸収の指標に有意な変化は認められなかった。しかし、トピラマート 20 mg/kg 投与により、骨形成の指標である類骨量(OV/BV)、類骨面(OS/BS)、骨芽細胞面(Ob.S/BS)が有意に減少し、骨芽細胞の分化・増殖の指標である骨石灰化面(MS/BS)と骨芽細胞の活動の指標である骨石灰化速度(MAR)も共に有意に減少した。このトピラマートの骨芽細胞機能や骨形成活性に及ぼす影響は、血清骨代謝マーカーの測定結果からも裏付けられた。トピラマート 20 mg/kg 投与群では、骨吸収マーカーである血清 TRAP 値に変化は認められなかったが、骨形成マーカーの血清オステオカルシン値が有意に低下した。これらの結果より、トピラマートは骨吸収活性には影響を及ぼさず、骨芽細胞機能を低下させ骨形成活性を抑制することが明らかとなった。ラモトリギンの骨代謝に関連した近年の報告では、骨代謝への有意な影響は認められないことが報告されている(120, 131, 132)。本検討でも、ラモトリギン投与による骨組織形態学的な変化は認められず、ラモトリギンの骨脆弱性を誘発する

可能性は極めて低いことが示された。

実験 3 では、2016 年に本邦でも臨床適応されたペランパネルの骨組織形態に及ぼす影響について検討を行った。ペランパネルは、 α - amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体に対する選択的拮抗薬として、米国やヨーロッパを含む 45 개국以上で承認されている最新の抗てんかん薬である (133)。ペランパネルは副作用発現率が低く、有効性と安全性の高い抗てんかん薬であると評価されている (134) が、骨代謝への影響の有無についての報告はない。本実験において、ペランパネル投与による骨微細構造への影響について検討した結果、どの計測項目にも有意な影響は認められなかった。しかし、ペランパネル投与群では、骨吸収の指標である浸食面 (ES/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (N.Oc/BS) が有意に増加したことから、ペランパネルは破骨細胞機能を促進させ骨吸収活性を亢進させることが明らかとなった。一方、ペランパネル投与群の骨形成の指標である骨芽細胞面 (Ob.S/BS)、骨形成速度 (BFR/BS)、骨芽細胞の分化・増殖の指標である骨石灰化面 (MS/BS)、骨芽細胞の活動の指標である骨石灰化速度 (MAR) はそれぞれ有意に減少した。すなわち、ペランパネルは、破骨細胞機能を促進し骨吸収活性を亢進すること、さらに、骨芽細胞機能を低下させ骨形成活性を抑制することが明らかとなった。

4-5 小括

1. 古典的抗てんかん薬のフェニトイン 20 mg/kg の 12 週間投与により、ラットの骨強度の有意な低下と骨密度の有意な減少が認められた。
2. フェニトインは、脛骨近位部骨幹端海綿骨において、骨吸収の指標となる浸食面、破骨細胞数、破骨細胞面を有意に増加させ、骨微細構造の劣化を誘発した。
3. 新規抗てんかん薬のガバペンチン、トピラマート、ラモトリギン、レベチラセタム投与による骨強度ならびに骨密度への有意な影響は認められなかった。
4. ガバペンチンは、脛骨近位部骨幹端の海綿骨において、骨吸収の指標となる浸食面、破骨細胞数、破骨細胞面を有意に増加させた。さらに、骨形成の指標である類骨量、類骨面、骨芽細胞面と骨芽細胞機能の指標である骨石灰化面、骨石灰化速度を有意に減少させ、骨微細構造の劣化を誘発した。
5. トピラマートは、脛骨近位部骨幹端の海綿骨において、骨形成の指標である類骨量、類骨面、骨芽細胞面と骨芽細胞機能の指標である骨石灰化面、骨石灰化速度を有意に減少させた。
6. ペランパネルは、脛骨近位部骨幹端の海綿骨において、骨吸収の指標である浸食面、破骨細胞数、破骨細胞面を有意に増加させ、骨形成の指標である骨芽細胞面、骨形成速度と骨芽細胞機能の指標である骨石灰化面、骨石灰化速度を有意に減少させた。
7. レベチラセタムおよびラモトリギン投与による骨組織形態への有意な影響は認められなかった。

以上の結果から、フェニトインが誘発する骨脆弱性は、骨密度の減少だけではなく、破骨細胞機能の促進による骨吸収活性の亢進と骨微細構造の劣化を伴うことが明らかとなった。一方、新規抗てんかん薬の骨密度への有意な影響は認められなかった。しかし、ガバペンチンは、骨芽細胞機能を低下し骨形成活性を抑制すること、破骨細胞機能を促進し骨吸収活性を亢進することで骨微細

構造の劣化を誘発することが明らかとなった。また、トピラマートは、骨吸収活性には影響を及ぼさず、骨芽細胞機能を低下し骨形成活性を抑制することが明らかとなった。さらに、ペランパネルは、破骨細胞機能を促進し骨吸収活性を亢進すること、骨芽細胞機能を低下し骨形成活性を抑制することが明らかとなった。レベチラセタムとレベチラセタムは、他の抗てんかん薬と比べて骨脆弱性を誘発する可能性は極めて低いことが示された。

本章では、ガバペンチン、トピラマート、ペランパネルは骨微細構造、骨代謝回転、骨石灰化度に有意な影響を及ぼし骨質の劣化を誘発すること、さらに、その影響は薬剤により多様であることが骨組織形態学的に明らかとなった。現在のてんかん薬物療法において、新規抗てんかん薬は古典的抗てんかん薬と併用投与されることが多く、これらの薬剤の骨代謝への相加的な悪影響が高まる可能性も考えられる。新規抗てんかん薬の骨代謝に及ぼす影響は、古典的抗てんかん薬に比べてかなり弱く限定的であると推察されるが、長期服用や高用量での使用の際には、骨代謝への影響が顕著に発現する可能性も否定できない。そのため、新規抗てんかん薬の長期間の服用による骨代謝への影響について、今後は基礎と臨床でのより詳細な検討が必要である。

第5章

総括

本研究では、薬剤誘発骨脆弱性とその結果生じる骨折の発生予防を目的として、合成グルココルチコイド（GC）、インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンおよび古典的抗てんかん薬の骨代謝に及ぼす影響を骨組織レベルで精査するとともに、骨代謝への影響の有無について報告がなされていない新規抗てんかん薬の骨代謝に及ぼす影響を検討し、以下の知見を得た。

1. GCの抗炎症作用強度と骨代謝に及ぼす影響との間に相関性はないことが明らかとなった。
2. デキサメタゾンによるステロイド性骨粗鬆症の発症には、骨芽細胞機能の低下による骨形成活性の抑制および骨吸収活性の抑制を特徴とする骨質の劣化が大きく関与することが明らかとなった。
3. ピオグリタゾン誘発性の骨強度の低下は、骨密度の減少だけでなく、海綿骨の微細構造の劣化を伴うこと、さらに、これまで報告されている骨形成活性の抑制に加え、骨吸収活性の亢進により骨リモデリングの破綻による骨質の劣化が大きく関与することが明らかとなった。
4. 古典的抗てんかん薬のフェニトインが誘発する骨脆弱性は、骨密度の減少だけでなく、破骨細胞機能の促進による骨吸収活性の亢進と、海綿骨の微細構造の劣化を伴うことが明らかとなった。
5. 新規抗てんかん薬のガバペンチンは、骨芽細胞機能を低下し骨形成活性を抑制すること、破骨細胞機能を促進し骨吸収活性を亢進することで、海綿骨の微細構造の劣化を誘発することが明らかとなった。
6. トピラマートは、骨吸収活性には影響を及ぼさず、骨芽細胞機能を低下し骨形成活性を抑制することが明らかとなった。
7. ペランパネルは、破骨細胞機能を促進し骨吸収活性を亢進すること、骨芽細胞機能を低下し骨形成活性を抑制することが明らかとなった。
8. レベチラセタムとラモトリギンは、他の抗てんかん薬と比べて骨脆弱性を誘発する可能性は極めて低いことが示された。

本研究では薬剤誘発骨脆弱性に関して、特に骨質への影響を中心に評価し新たな知見が得られた。この薬剤の骨質への影響を正確に理解・把握することは、薬剤誘発性骨代謝疾患の予防と治療に重要な知見となる。骨脆弱性が亢進し骨折が発生すると患者の QOL や日常生活動作 (ADL) は著しく低下し、骨折の治療後も生活機能の制限により要介護状態となる可能性が高くなるため、医療経済学的観点からも骨脆弱性の改善と骨折予防は重大な課題である。我が国の高齢者は服用している薬剤の種類や数が多く、多剤併用により転倒率も上昇するとの報告 (135) もある。本研究で得られた新たな知見は、特に高齢患者の薬剤誘発骨脆弱性による転倒・骨折の予防に大きく寄与し、身体・認知機能低下の予防推進にもつながり、超高齢社会における健康寿命の延伸ならびにその帰結としての健康長寿社会の実現のための一助になると考える。

参考文献

- 1 Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem.* 45, 1353–1358 (1999)
- 2 Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int.* 11, S18–S29 (2000)
- 3 Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 289, 1508–1514 (2000)
- 4 Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Cohort profile: research on Osteoarthritis/Osteoporosis Against Disability study. *Int J Epidemiol.* 39, 988–995 (2010)
- 5 Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, et al. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab.* 27, 620–628 (2009)
- 6 Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO study group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 843, 1–129 (1994)
- 7 Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, de Laet C, Melton III LJ, et al. A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk. *J Bone Miner Res.* 19, 893–899 (2004)
- 8 Nawata H, Soen S, Takayanagi R, Tanaka I, Takaoka K, Fukunaga M, et al. Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis of the Japanese Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Metab.* 23, 105–109 (2005)
- 9 Hayashi K, Yamamoto M, Murakawa Y, Yamauchi M, Kaji H, Yamaguchi T, et al. Bone fragility in male glucocorticoid-induced osteoporosis is not defined by bone mineral density. *Osteoporos Int.* 20, 1889–1894 (2009)
- 10 Kaji H, Yamauchi M, Chihara K, Sugimoto T. The threshold of bone mineral density for vertebral fracture in female patients with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocr J.* 53, 27–34 (2006)

- 11 Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 18, 427–444 (2007)
- 12 Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Diabetic patients have an increased risk of vertebral fractures independent of BMD or diabetic complications. *J Bone Miner Res.* 24, 702–709 (2009)
- 13 Schwartz AV, Vittinghoff E, Bauer DC, Hillier TA, Strotmeyer ES, Ensrud KE, et al. Association of BMD and FRAX score with risk of fracture in older adults with type 2 diabetes. *JAMA.* 305, 2184–2192 (2011)
- 14 Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH Consensus Statement. 17, 1–45 (2000)
- 15 NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA.* 285, 785–795 (2001)
- 16 Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 11, 1043–1051 (1996)
- 17 Bauer DC. HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review. *Osteoporos Int.* 14, 273–282 (2003)
- 18 Lupattelli G, Scarponi AM, Vaudo G, Siepi D, Roscini AR, Gemelli F, et al. Simvastatin increases bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Metabolism.* 53, 744–748 (2004)
- 19 Watanabe S, Fukumoto S, Takeuchi Y, Fujita H, Nakano T, Fujita T. Effects of 1-year treatment with fluvastatin or pravastatin on bone. *Am J Med.* 110, 584–587 (2001)
- 20 Bauer DC, Mundy GR, Jamal SA, Black DM, Cauley JA, Ensrud KE, et al. Use of statins and fracture: results of 4 prospective studies and cumulative meta-analysis of observational studies and controlled trials. *Arch Intern Med.* 164, 146–152 (2004)
- 21 Hatzigeorgiou C, Jackson JL. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors and osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 16, 990–998 (2005)

- 22 Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA*. 292, 1326–1332 (2004)
- 23 Wiens M, Etminan M, Gill SS, Takkouche B. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J Intern Med*. 260, 350–362 (2006)
- 24 Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *J Hypertens*. 24, 581–589 (2006)
- 25 Carbone LD, Johnson KC, Bush AJ, Robbins J, Larson JC, Thomas A, et al. Loop diuretic use and fracture in postmenopausal women: findings from the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med*. 169, 132–140 (2009)
- 26 Wu Q, Bencaz AF, Hentz JG, Crowell MD. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment and risk of fractures: a meta-analysis of cohort and case-control studies. *Osteoporos Int*. 23, 365–375 (2012)
- 27 Dykman TR, Gluck OS, Murphy WA, Hahn TJ, Hahn BH. Evaluation of factors associated with glucocorticoid-induced osteopenia in patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 28, 361–368 (1985)
- 28 Adinoff AD, Hollister JR. Steroid-induced fractures and bone loss in patients with asthma. *N Engl J Med*. 309, 265–268 (1983)
- 29 Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Pathogenesis and management. *Ann Intern Med*. 112, 352–364 (1990)
- 30 Lane NE, Lukert B. The science and therapy of glucocorticoid-induced bone loss. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 27, 465–483 (1998)
- 31 Weinstein RS. Clinical practice: glucocorticoid-induced bone disease. *N Engl J Med*. 365, 62–70 (2011)
- 32 Angeli A, Guglielmi G, Dovo A, Capelli G, de Feo D, Giannini S, et al. High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in post-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: a cross-sectional outpatient study. *Bone*. 39, 253–259 (2006)

- 33 Boling EP. Secondary osteoporosis underlying disease and the risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clin Ther.* 26, 1–14 (2004)
- 34 Laan RF, van Riel PL, van de Putte LB, van Erning LJ, van't Hof MA, Lemmens JA. Low-dose prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis. A randomized, controlled study. *Ann Intern Med.* 119, 963–968 (1993)
- 35 McKenzie R, Reynolds JC, O'Fallon A, Dale J, Deloria M, Blackwelder W, et al. Decreased bone mineral density during low dose glucocorticoid administration in a randomized, placebo controlled trial. *J Rheumatol.* 27, 2222–2226 (2000)
- 36 Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, twelfth edition. McGraw-Hill Medical, New York, 1209–1235 (2011)
- 37 Van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 13, 777–787 (2002)
- 38 Van Staa TP, Laan RF, Barton IP, Cohen S, Reid DM, Cooper C. Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy. *Arthritis Rheum.* 48, 3224–3229 (2003)
- 39 Weinstein RS. Glucocorticoids, osteocytes, and skeletal fragility: the role of bone vascularity. *Bone.* 46, 564–570 (2010)
- 40 Paggiosi MA, Peel NF, Eastell R. The impact of glucocorticoid therapy on trabecular bone score in older women. *Osteoporos Int.* 26, 1773–1780 (2015)
- 41 Takahashi A, Onodera K, Kamei J, Sakurada S, Shinoda H, Miyazaki S, et al. Effects of chronic administration of zonisamide, an antiepileptic drug, on bone mineral density and their prevention with alfacalcidol in growing rats. *J Pharmacol Sci.* 91, 313–318 (2003)
- 42 Takahashi E H. Histomorphometric parameters of trabecular bone. In: *Handbook of Bone Morphometry*, ed by Takahashi E H, Nishimura Co. Ltd., Niigata, 76–82 (1997)
- 43 Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA,

- Malluche H, et al. 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 (2013)
- 44 Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 318, 259–264 (2004)
- 45 Pereira RC, Delany AM, Canalis E. Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone.* 30, 685–691 (2002)
- 46 Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 102, 274–282 (1998)
- 47 OBrien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology.* 145, 1835–1841 (2004)
- 48 Dietrich JW, Canalis EM, Maina DM, Raisz LG. Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology.* 104, 715–721 (1979)
- 49 Canalis E. Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae. *Endocrinology.* 112, 931–939 (1983)
- 50 Canalis E. Effect of cortisol on periosteal and nonperiosteal collagen and DNA synthesis in cultured rat calvariae. *Calcif Tissue Int.* 36, 158–166 (1984)
- 51 Chyun YS, Raisz LG. Stimulation of bone formation by prostaglandin E2. *Prostaglandins.* 27, 97–103 (1984)
- 52 Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new

- members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 20, 345–357 (1999)
- 53 Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology.* 140, 4382–4389 (1999)
- 54 Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, et al. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest.* 109, 1041–1048 (2002)
- 55 Hahn TJ, Halstead LR, Baran DT. Effects off short term glucocorticoid administration on intestinal calcium absorption and circulating vitamin D metabolite concentrations in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 52, 111–115 (1981)
- 56 Suzuki Y, Ichikawa Y, Saito E, Homma M. Importance of increased urinary calcium excretion in the development of secondary hyperparathyroidism of patients under glucocorticoid therapy. *Metabolism.* 32, 151–156 (1983)
- 57 Paz-Pacheco E, Fuleihan GE, LeBoff MS. Intact parathyroid hormone levels are not elevated in glucocorticoid-treated subjects. *J Bone Miner Res.* 10, 1713–1718 (1995)
- 58 Szulc P, Seeman E, Delmas PD. Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents. *Osteoporos Int.* 11, 281–294 (2000)
- 59 Yonemura K, Kimura M, Miyaji T, Hishida A. Short-term effect of vitamin K administration on prednisolone-induced loss of bone mineral density in patients with chronic glomerulonephritis. *Calcif Tissue Int.* 66, 123–128 (2000)
- 60 Ton FN, Gunawardene SC, Lee H, Neer RM. Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. *J Bone Miner Res.* 20, 464–470 (2005)
- 61 Ikeda S, Morishita Y, Tsutsumi H, Ito M, Shiraishi A, Arita S, et al. Reductions in bone turnover, mineral, and structure associated with mechanical properties of lumbar vertebra and femur in

- glucocorticoid-treated growing minipigs. *Bone*. 33, 779–787 (2003)
- 62 Pearce G, Tabensky DA, Delmas PD, Baker HW, Seeman E. Corticosteroid-induced bone loss in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 83, 801–806 (1998)
- 63 Fujita T, Satomura A, Hidaka M, Ohsawa I, Endo M, Ohi H. Acute alteration in bone mineral density and biochemical markers for bone metabolism in nephrotic patients receiving high-dose glucocorticoid and one-cycle etidronate therapy. *Calcif Tissue Int*. 66, 195–199 (2000)
- 64 Briot K, Cortet B, Roux C, Fardet L, Abitbol V, Bacchetta J, et al. 2014 update of recommendations on the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Joint Bone Spine*. 81, 493–501 (2014)
- 65 Ferretti JL, Vazquez SO, Delgado CJ, Capozza R, COUNTRY G. Biphasic dose-response curves of cortisol effects on rat diaphyseal bone biomechanics. *Calcif Tissue Int*. 50, 49–54 (1992)
- 66 Turner RT, Hannon KS, Greene VS, Bell NH. Prednisone inhibits formation of cortical bone in sham-operated and ovariectomized female rats. *Calcif Tissue Int*. 56, 311–315 (1995)
- 67 King CS, Weir EC, Gundberg CW, Fox J, Insogna KL. Effects of continuous glucocorticoid infusion on bone metabolism in the rat. *Calcif Tissue Int*. 59, 184–191 (1996)
- 68 Wang Y, Ohtsuka-Isoya M, Shao P, Sakamoto S, Shinoda H. Effects of methylprednisolone on bone formation and resorption in rats. *Jpn J Pharmacol*. 90, 236–246 (2002)
- 69 Recker RR, Kimmel DB, Dempster D, Weinstein RS, Wronski TJ, Burr DB. Issues in modern bone histomorphometry. *Bone*. 49, 955–964 (2011)
- 70 Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin: Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop*. 226, 267–291 (1988)
- 71 Oddie GW, Schenk G, Angel NZ, Walsh N, Guddat LW, de Jersey J, et al. Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone*. 27, 575–584 (2000)
- 72 Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review

- of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol.* 166, 495–505 (2007)
- 73 Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 270, 12953–12956 (1995)
- 74 Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8, 1224–1234 (1994)
- 75 Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 79, 1147–1156 (1994)
- 76 Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.* 101, 1354–1361 (1998)
- 77 Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem.* 276, 41245–41254 (2001)
- 78 Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 116, 1784–1792 (2006)
- 79 Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci.* 25, 331–336 (2004)
- 80 Kahn SE, Zinman B, Lachin JM, Haffner SM, Herman WH, Holman RR, et al. Rosiglitazone-associated fractures in type 2 diabetes: an Analysis from A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT). *Diabetes Care.* 31, 845–851 (2008)
- 81 Yaturu S, Bryant B, Jain SK. Thiazolidinedione treatment decreases bone mineral density in type 2 diabetic men. *Diabetes Care.* 30, 1574–

- 1576 (2007)
- 82 Meier C, Kraenzlin ME, Bodmer M, Jick SS, Jick H, Meier CR. Use of thiazolidinediones and fracture risk. *Arch Intern Med.* 168, 820–825 (2008)
- 83 Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Nesto R, Kupfer S, Perez A, et al. Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial. *JAMA.* 299, 1561–1573 (2008)
- 84 Takada I, Suzawa M, Matsumoto K, Kato S. Suppression of PPAR transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts. *Ann NY Acad Sci.* 1116, 182–195 (2007)
- 85 Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem.* 278, 23270–23277 (2003)
- 86 Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell.* 3, 379–389 (2004)
- 87 Rzonca SO, Suva LJ, Gaddy D, Montague DC, Lecka-Czernik B. Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology.* 145, 401–406 (2004)
- 88 Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, et al. PPAR gamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest.* 113, 846–855 (2004)
- 89 Okazaki R, Toriumi M, Fukumoto S, Miyamoto M, Fujita T, Tanaka K, et al. Thiazolidinediones inhibit osteoclast-like cell formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology.* 140, 5060–5065 (1999)
- 90 Mbalaviele G, Abu-Amer Y, Meng A, Jaiswal R, Beck S, Pittenger MF, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem.* 275, 14388–

- 14393 (2000)
- 91 Xu F, Dong Y, Huang X, Chen P, Guo F, Chen A, et al. Pioglitazone affects the OPG/RANKL/RANK system and increase osteoclastogenesis. *Mol Med Rep.* 14, 2289–2296 (2016)
- 92 Sugiyama Y, Shimura Y, Ikeda H. Effects of pioglitazone on hepatic and peripheral insulin resistance in Wistar fatty rats. *Arzneimittelforschung.* 40, 436–440 (1990)
- 93 Kotchen TA, Reddy S, Zhang HY. Increasing insulin sensitivity lowers blood pressure in the fructose-fed rat. *Am J Hypertens.* 10, 1020–1026 (1997)
- 94 Ishida H, Kato S, Nishimura M, Mizuno N, Fujimoto S, Mukai E, et al. Beneficial effect of long-term combined treatment with voglibose and pioglitazone on pancreatic islet function of genetically diabetic GK rats. *Horm Metab Res.* 30, 673–678 (1998)
- 95 Grey A, Bolland M, Gamble G, Wattie D, Horne A, Davidson J, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 92, 1305–1310 (2007)
- 96 Kotsopoulos IA, van Merode T, Kessels FG, de Krom MC, Knottnerus JA. Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures. *Epilepsia.* 43, 1402–1409 (2002)
- 97 Pack A. Bone health in people with epilepsy: is it impaired and what are the risk factors? *Seizure.* 17, 181–186 (2008)
- 98 Nissen-Meyer LS, Svalheim S, Tauboll E, Gjerstad L, Reinholt FP, Jemtland R. How can antiepileptic drugs affect bone mass, structure and metabolism? Lessons from animal studies. *Seizure.* 17, 187–191 (2008)
- 99 Swanton J, Simister R, Altmann D, Watts H, Keen R, Duncan JS, et al. Bone mineral density in institutionalised patients with refractory epilepsy. *Seizure.* 16, 538–541 (2007)
- 100 Nicholas JM, Ridsdale L, Richardson MP, Grieve AP, Gulliford MC. Fracture risk with use of liver enzyme inducing antiepileptic drugs in

- people with active epilepsy: cohort study using the general practice research database. *Seizure*. 22, 37–41 (2013)
- 101 Pack AM, Morrell MJ, Marcus R, Holloway L, Flaster E, Done S, et al. Bone mass and turnover in women with epilepsy on antiepileptic drug monotherapy. *Ann Neurol*. 57, 252–257 (2005)
- 102 Ensrud KE, Walczak TS, Blackwell T, Ensrud ER, Bowman PJ, Stone KL. Antiepileptic drug use increases rates of bone loss in older women: A prospective study. *Neurology*. 62, 2051–2057 (2004)
- 103 Feldkamp J, Becker A, Witte OW, Scharff D, Scherbaum WA. Long-term anticonvulsant therapy leads to low bone mineral density—evidence for direct drug effects of phenytoin and carbamazepine on human osteoblast-like cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 108, 37–43 (2000)
- 104 Takahashi A, Onodera K, Shinoda H, Mayanagi H. Phenytoin and its metabolite, 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin, show bone resorption in cultured neonatal mouse calvaria. *Jpn J Pharmacol*. 82, 82–84 (2000)
- 105 Hoshino M, Ikarashi N, Hirobe R, Hayashi M, Hiraoka H, Yokobori K, et al. Effects of menthol on the pharmacokinetics of triazolam and phenytoin. *Biol Pharm Bull*. 38, 454–460 (2015)
- 106 Dominick MA, Robertson DG, Bleavins MR, Sigler RE, Bobrowski WF, Gough AW. Alpha 2u-globulin nephropathy without nephrocarcinogenesis in male Wistar rats administered 1-(aminomethyl)cyclohexaneacetic acid. *Toxicol Appl Pharmacol*. 111, 375–387 (1991)
- 107 Ling Q, Liu M, Wu MX, Xu Y, Yang J, Huang HH, et al. Anti-allodynic and neuroprotective effects of koumine, a Benth alkaloid, in a rat model of diabetic neuropathy. *Biol Pharm Bull*. 37, 858–864 (2014)
- 108 Gower AJ, Noyer M, Verloes R, Gobert J, Wulfert E. ucb L059, a novel anti-convulsant drug: pharmacological profile in animals. *Eur J Pharmacol*. 222, 193–203 (1992)
- 109 Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of

- epilepsy. *Epilepsia*. 45, 1478–1487 (2004)
- 110 Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Richard D. Topiramate reduces energy and fat gains in lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats. *Obes Res*. 8, 656–663 (2000)
- 111 Arora T, Mehta AK, Sharma KK, Mediratta PK, Banerjee BD, Garg GR, et al. Effect of carbamazepine and lamotrigine on cognitive function and oxidative stress in brain during chemical epileptogenesis in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 106, 372–377 (2010)
- 112 Huang HY, Lee HW, Chen SD, Shaw FZ. Lamotrigine ameliorates seizures and psychiatric comorbidity in a rat model of spontaneous absence epilepsy. *Epilepsia*. 53, 2005–2014 (2012)
- 113 Khanna S, Pillai KK, Vohora D. Bisphosphonates in phenytoin-induced bone disorder. *Bone*. 48, 597–606 (2011)
- 114 Hanada T, Hashizume Y, Tokuhara N, Takenaka O, Kohmura N, Ogasawara A, et al. Perampanel: a novel, orally active, noncompetitive AMPA-receptor antagonist that reduces seizure activity in rodent models of epilepsy. *Epilepsia*. 52, 1331–1340 (2011)
- 115 Collins N, Maher J, Cole M, Baker M, Callaghan N. A prospective study to evaluate the dose of vitamin D required to correct low 25-hydroxyvitamin D levels, calcium, and alkaline phosphatase in patients at risk of developing antiepileptic drug-induced osteomalacia. *Q J Med*. 78, 113–122 (1991)
- 116 Pascussi JM, Robert A, Nguyen M, Walrant-Debray O, Garabedian M, Martin P, et al. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest*. 115, 177–186 (2005)
- 117 Menon B, Harinarayan CV. The effect of anti epileptic drug therapy on serum 25-hydroxyvitamin D and parameters of calcium and bone metabolism--a longitudinal study. *Seizure*. 19, 153–158 (2010)
- 118 Fitzpatrick LA. Pathophysiology of bone loss in patients receiving anticonvulsant therapy. *Epilepsy Behav*. 5, S3–S15 (2004)
- 119 Valimaki MJ, Tiihonen M, Laitinen K, Tahtela R, Karkkainen M, Lamberg-Allardt C, et al. Bone mineral density measured by

- dual-energy x-ray absorptiometry and novel markers of bone formation and resorption in patients on antiepileptic drugs. *J Bone Miner Res.* 9, 631–637 (1994)
- 120 Pack AM, Morrell MJ, Randall A, McMahon DJ, Shane E. Bone health in young women with epilepsy after one year of antiepileptic drug monotherapy. *Neurology.* 70, 1586–1593 (2008)
- 121 Tsukahara H, Kimura K, Todoroki Y, Ohshima Y, Hiraoka M, Shigematsu Y, et al. Bone mineral status in ambulatory pediatric patients on long-term anti-epileptic drug therapy. *Pediatr Int.* 44, 247–253 (2002)
- 122 Andress DL, Ozuna J, Tirschwell D, Grande L, Johnson M, Jacobson AF, et al. Antiepileptic drug-induced bone loss in young male patients who have seizures. *Arch Neurol.* 59, 781–786 (2002)
- 123 Vestergaard P. Epilepsy, osteoporosis and fracture risk - a meta-analysis. *Acta Neurol Scand.* 112, 277–286 (2005)
- 124 Lee R, Lyles K, Sloane R, Colon-Emeric C. The association of newer anticonvulsant medications and bone mineral density. *Endocr Pract.* 14, 1–22 (2012)
- 125 Jette N, Lix LM, Metge CJ, Prior HJ, McChesney J, Leslie WD. Association of antiepileptic drugs with nontraumatic fractures: a population-based analysis. *Arch Neurol.* 68, 107–112 (2011)
- 126 Ensrud KE, Walczak TS, Blackwell TL, Ensrud ER, Barrett-Connor E, Orwoll ES. Antiepileptic drug use and rates of hip bone loss in older men: a prospective study. *Neurology.* 71, 723–730 (2008)
- 127 Koo DL, Joo EY, Kim D, Hong SB. Effects of levetiracetam as a monotherapy on bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* 104, 134–139 (2013)
- 128 Mirza N, Marson AG, Pirmohamed M. Effect of topiramate on acid-base balance: extent, mechanism and effects. *Br J Clin Pharmacol.* 68, 655–661 (2009)
- 129 Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Fracture risk associated with use of antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 45, 1330–1337 (2004)

- 130 Coppola G, Fortunato D, Auricchio G, Mainolfi C, Operto FF, Signoriello G, et al. Bone mineral density in children, adolescents, and young adults with epilepsy. *Epilepsia*. 50, 2140–2146 (2009)
- 131 Kim SH, Lee JW, Choi KG, Chung HW, Lee HW. A 6-month longitudinal study of bone mineral density with antiepileptic drug monotherapy. *Epilepsy Behav*. 10, 291–295 (2007)
- 132 Sheth RD, Hermann BP. Bone mineral density with lamotrigine monotherapy for epilepsy. *Pediatr Neurol*. 37, 250–254 (2007)
- 133 Rogawski MA, Hanada T. Preclinical pharmacology of perampanel, a selective non-competitive AMPA receptor antagonist. *Acta Neurol Scand Suppl*. 197, 19–24 (2013)
- 134 Rosenfeld W, Conry J, Lagae L, Rozentals G, Yang H, Fain R, et al. Efficacy and safety of perampanel in adolescent patients with drug-resistant partial seizures in three double-blind, placebo-controlled, phase III randomized clinical studies and a combined extension study. *Eur J Paediatr Neurol*. 19, 435–445 (2015)
- 135 Kojima T, Akishita M, Kameyama Y, Yamaguchi K, Yamamoto H, Eto M, et al. High risk of adverse drug reactions in elderly patients taking six or more drugs: analysis of inpatient database. *Geriatr Gerontol Int*. 12, 761–762 (2012)