

健常犬における骨代謝メカニズムの基礎的研究
： 個体要因と血清骨代謝マーカーの関連性について

山口大学大学院連合獣医学研究科

山口 文

2021年 9月

目次

序文	(頁)
イヌの骨代謝研究の現状と課題	1
第一章	
健全な雌イヌにおける I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドおよびカテプシン K に対するエストラジオールの影響の検証	
1-1 緒言	7
1-2 材料および方法	8
1-3 結果	12
1-4 考察	14
1-5 結語	18
第二章	
健全な雌雄のイヌにおける I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドに対する年齢と不妊手術の影響の検証	
2-1 緒言	19
2-2 材料および方法	20
2-3 結果	22
2-4 考察	25
2-5 結語	31
総括	32
謝辞	36
引用文献	37
図表	46
Summary (要旨英文)	56

序文

イヌの骨代謝研究の現状と課題

脊椎動物が陸上で生活していくうえで骨格は重要である。骨は重力に耐えて体を支え、内臓を守り、関節によって様々な動作を可能にする。骨は常に代謝されており、骨形成と骨吸収そして再形成の一連の流れが死ぬまで繰り返される。

骨は細胞の無い骨基質が大部分を占めるが、その間に骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞の三種の細胞が主に存在し様々に働いている。

骨形成を担う骨芽細胞は多様な機能を有する。種々のホルモンや成長因子、サイトカイン等の受容体を発現しており、骨代謝の司令塔である。また、骨基質となる I 型コラーゲンと非コラーゲン蛋白質を形成する。骨はこの I 型コラーゲンにリン酸カルシウム塩であるハイドロキシアパタイトが沈着して石灰化する事で硬い組織になる。骨芽細胞はやがて骨細胞になり骨細胞は骨内でネットワークを形成し、ミネラル沈着や力学的強度の維持をコントロールする。破骨細胞は、酵素や酸により骨を侵食する（骨吸収）。破骨細胞と骨芽細胞とは密接に関連しており、お互いにシグナルを送りあって骨吸収と骨形成のバランスを取っている。骨芽細胞による骨形成は成長期に盛んに行われ、これをモデリングと呼ぶ。

骨は皮質骨（緻密骨）と海綿骨に大きく二分され、皮質骨はハバース管を中心として骨質が同心円状に添加された層板と呼ばれる円柱構造が見られる。この円柱構造をオステオン

(骨単位)と呼ぶ。成熟したヒト、イヌや大型動物ではオステオンを中心として骨吸収と骨形成を繰り返す。この過程をリモデリングと呼ぶ。海綿骨にはオステオンが存在せず細い骨梁が無数にあり、骨髓の血管から栄養や酸素を供給され、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が骨梁表面で行われている。

若齢のヒトの骨はモデリングとリモデリングを繰り返して成熟し、成人の骨ではリモデリングをメインにその形態と強度を維持する。

マウスやラットでは、皮質骨にオステオンが無く、リモデリング(骨吸収と骨形成が同部位で同時に起こる)ではなくモデリング(骨芽細胞と破骨細胞が単独で動いて骨形成する)が骨代謝のメインである。

ヒトの骨関連疾患の一つである骨粗鬆症は、骨量の減少と骨組織の微細構造の変化を特徴とする全身性の疾患であり、原発性のものと様々な疾患や栄養、薬剤などに起因する二次性骨粗鬆症に分けられ、原発性骨粗鬆症には、若年性特発性骨粗鬆症、閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症が分類される。骨粗鬆症による大腿骨頸部の骨折は、高齢者の寝たきりの原因になる事が指摘され、それによる寿命短縮との明らかな関連性を認められており、治療法の開発と改善はもとより、予防法の確立がヒト医療における大きな課題である(1)。

原発性骨粗鬆症の要因の中でも、年齢と性ホルモンの影響は甚大であると言える。女性の閉経後骨粗鬆症は、閉経によるエストロゲン減少に伴って、破骨細胞の抑制が弱まり、骨代謝回転が増加して骨密度と骨質の低下につながるという一連のメカニズムが明らかになっ

てきている。エストロゲンの中でも最大の活性を持つエストラジオールは、破骨細胞に直接作用し、破骨細胞内のエストロゲン受容体 ($Er\alpha$) を介してアポトーシスを誘導する II 型膜貫通型蛋白質である Fas Ligand の発現を正に調節、破骨細胞のアポトーシスを誘導し、破骨細胞の寿命をコントロールしている。また、破骨細胞から分泌される骨吸収を担うシステインプロテアーゼであるカテプシン K の発現調節による骨吸収機能をコントロールしている。(2, 3, 4, 5)。また、マウスにおける実験で、エストロゲンは、骨芽細胞と骨細胞が発現する骨保護因子の Semaphorin3A の発現増強作用を持っており、骨量維持に寄与している事が示されている。Semaphorin3A は細胞間の情報伝達因子であり、間接的に骨芽細胞の分化を促進し、破骨細胞の分化抑制も行っている。ヒトでは Semaphorin3A が閉経後女性では閉経前よりも低い事や加齢に伴って低下する事が示されており、閉経後骨粗鬆症や加齢に伴う骨減少症との関連性が示唆されている (6, 7)。

骨の研究において、卵巣摘出を行ったラットとウサギでは、骨量および海綿骨の減少を示し、高骨代謝回転状態を示すためヒトの骨粗鬆症研究に古くからモデル動物として用いられてきた (8, 9)。

イヌは骨組成や、成長期後の骨代謝をリモデリングに依存している点でヒトと類似性があるため骨研究においては有用であるとされてきた (10)。しかし、イヌの骨代謝は明らかになっていない部分が多く、これまでの報告においてもヒトやラットなどの傾向と一致しない点もあり、近年では卵巣摘出後による骨粗鬆症の動物モデルとしては用いられなくな

っている。

伴侶動物としてヒトと共に生きるイヌは、寿命は延長傾向にあり、様々な感染症や外傷、腫瘍等の疾病への対策は日進月歩である事から、今後は更に高齢化による影響への配慮が必要であると考えられる。イヌは伴侶動物としての地位が明確になるにしたがって、不妊手術による中性化が行われる事が増えてきており、性ホルモンの影響が小さい環境で高齢を迎えている状況も多いが、ヒトのように閉経後または老人性骨粗鬆症が観察される事は報告されていない。そして、この理由を説明できる犬の骨代謝に関する知見は少ないのが現状である。また、性腺摘出を若齢期に行われているにも関わらず、性ホルモンの変化が骨代謝に及ぼす影響のメカニズムの詳細は未解明である。

雌イヌの不妊手術によるエストロゲン低下に伴う骨代謝の変化に関しては、影響があるとする研究と無いとする研究の両方ある。Shen V ら（1992）は卵巣子宮摘出術（Ovariectomy; OHE）を行った雌イヌと Sham 手術を行った雌イヌで、腰椎の二重エネルギーX線検査法（DXA）による骨形態学的検査と骨代謝マーカーとしてのアルカリフォスファターゼ（ALP）とオステオカルシン（OC）濃度の変化を調査したが、有意な差は生じなかったと報告した（11）。また、Boyce RW ら（1990）は OHE を行った雌イヌの海綿骨の組織の生検を経時的に行い、一時的に骨代謝の高回転化が生じるものの 6 ヶ月後には OHE 以前と同程度に戻ると報告した（12）。しかし Faugere ら（1990）や Monier-Faugere ら（1999）の研究では、OHE 後の犬で骨量が減少したとしている（13, 14）。ま

た、Malluche ら (1986) は、卵巣摘出後に海綿骨量が有意に減少したと報告している (15)。

雄の精巣摘出手術に関しては、更に情報が少ないが骨量が減少するとする研究が散見される (16)。

臨床的には、不妊手術を行ったイヌにおいて骨粗鬆症のような病的な骨量や骨密度の減少、あるいは病的骨折の発生の増加などの報告は見当たらない。また、老齢動物が骨折しやすくなるという知見も報告されていない。

イヌの骨代謝に関する知見が不足する原因の一つには、健康な雌雄のイヌのサンプルを得る事の難しさもあると考えられる。不妊手術および加齢による骨代謝への影響の有無、およびその機序の解明には、イヌでも骨への影響が報告されている腎機能低下や (17)、ヒトで骨代謝への影響が説明されている糖尿病、内分泌疾患 (副腎皮質機能低下/亢進症、上皮小体機能低下/亢進症、甲状腺機能低下/亢進症など) および投薬 (糖質および鉱質コルチコイドやカルシウム製剤など) による影響を排除した健康で年齢幅が多様なイヌの基礎データを取得する事が不可欠である (18, 19, 20)。

そこで本研究では、健康なイヌにおける性別と年齢および不妊手術の骨代謝に与える影響を調査する事を主要な目的とした。我々は、一次診療施設である動物病院の協力を得て、2016年4月から2019年6月までの期間に健康診断の為に来院したイヌから採取した約480頭の血清のデータ、動物のカルテ情報、イヌのオーナーへの聴取をもとに、これらのサンプルの中から、骨代謝に大きな影響を与える基礎疾患が無く、臨床的に健康で、かつ健康診断

での血液生化学検査データで異常値を示さなかったイヌ 169 頭（雌 99 頭、雄 70 頭）の血清を用い、イヌの年齢と血中性ホルモン濃度と骨代謝マーカーとの関連性について比較検討を行った。

第一章では、ヒトの女性で問題になる閉経後骨粗鬆症がイヌに無いと言われる事の機序を解明する事を目的として、雌イヌの血清を用いて雌性ホルモンであるエストラジオールと 2 種の骨代謝マーカー（I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド、カテプシン K）との関連性を検証した。

第二章では、骨代謝マーカーである I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドに焦点を当て、雌雄と不妊手術の有無による違いと年齢との関連性を検証した。

第一章

健全な雌イヌにおける I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドおよびカテプシン K に対するエストラジオールの影響の検証

1-1 緒言

イヌの骨代謝研究の現状は序文にて述べたとおりである。イヌは、若齢期に不妊手術〔雌の卵巢子宮摘出術（OHE）あるいは卵巢摘出術、雄の精巣摘出術（Castration）〕を行う事が多いが、雌イヌでは OHE 後にヒトの閉経後女性に起こる骨粗鬆症のような病態は示さないと認識されている。

我々は、イヌでは OHE による骨代謝の変化が少ないことがその理由ではないかと仮定し、鹿児島市内の一次診療動物病院を受診したイヌを対象とした横断的研究において、健康な未避妊雌と避妊雌の血清エストラジオール（E2）濃度と二種類の骨代謝マーカー〔カテプシン K（CTK）と I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド（NTx）〕の変動について検索し、骨代謝に及ぼす OHE の影響を幅広い年齢層と様々な品種のイヌで検証する事を試みた。

CTK は破骨細胞から分泌されるシステインプロテアーゼであり、酸性条件下で骨基質中のコラーゲンを分解する。CTK レベルは、骨肉腫や骨転移を有する犬では増加していると報告されており（21）、また、炎症性疾患や心血管疾患を有するヒトでは増加しているとする報告もある（22, 23）。既出の骨粗鬆症治療薬とは一線を画した骨粗鬆症の新規治療薬と

して CTK 阻害剤を開発する試みがなされ、代表的な骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネート製剤は骨吸収と骨形成の両方に抑制的に働くが、CTK 阻害剤は骨吸収を抑制しつつ骨形成活性は一過性に低下させるだけであった事から画期的であった (23, 24)。しかしながら、一部の CTK 阻害剤は、脳卒中のリスクの増加に関連する有害反応のために中止された (25, 26)。

NTx は、ヒトおよびイヌの両方の医学において、最も広範囲に研究され、使用されている骨吸収マーカーの 1 つである (27, 28, 29)。破骨細胞によって分解される際に骨から放出されるピリジノリン架橋ドメインであり、骨吸収を迅速に察知するためのマーカーとして使用されている。

過去にこれらの骨代謝マーカーを不妊手術の有無で比較した文献は見当たらず、また、性ホルモンとの関連を幅広い年齢層で検証した文献も見当たらない事から、雌のイヌにおける骨代謝と性ホルモンの関連の知見を付加する事を目的とした。

1-2 材料および方法

1) 供試動物

試験動物は、2016 年 4 月から 2019 年 6 月までの間に鹿児島市内の一次診療施設で定期健康診断の一環として血液検査を受けた健康な犬 99 頭 (避妊雌 ; 56 頭、未避妊雌 ; 43 頭) とした。各イヌの飼い主に、研究の目的と方法について説明し、サンプルの使用についてイ

ンフォームドコンセントを行い、同意を得て、血清の余剰を使用した。

試験動物の平均年齢（平均±標準偏差（SD））は、個体群全体で 6.94±3.93 歳、避妊雌で 7.71±3.86 歳、未避妊雌で 5.95±3.85 歳であった（表 1-1）。

サンプルは、血液生化学検査項目〔総蛋白、アルブミン、アルカリフォスファターゼ(ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、血中尿素窒素、クレアチニン、カルシウム (Ca)、無機リン (P)〕に異常を認めないものを使用した。また、整形外科疾患、生殖器関連疾患（乳腺腫瘍、卵巣・子宮関連疾患）の既往歴がなく、採血前 1 ヶ月間にステロイド治療を受けていない個体を選択した。OHE の実施日は 47/56 例で判明していたが、他の 9 例は年齢が進んでおり、OHE の実施日を特定することができなかった。

2) 血液サンプルの処理

血液はイヌの経静脈あるいは伏在静脈から採取し、血清分離採血管に速やかに注入し、室温（約 20～25℃）で 30 分静置したのち、1450×g で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 1.5mL のポリプロピレンチューブに入れて-5℃で血液生化学検査まで保存した。血液生化学検査後の残りの検体は、各項目測定まで-20℃で保存した。

収集したすべてのサンプル（99 頭分）の血清 E2 濃度を測定した。12/56 匹の避妊雌と 12/43 匹の未避妊雌の血清サンプルで CTK 濃度を測定した。他の 44/56 頭の避妊雌と 31/43

頭の未避妊雌の血清サンプルを用いて NTx を測定した (表 1-2)。この研究のために選択した未避妊雌は、膣細胞診は実施できなかったものの飼い主への聴取と身体検査によって発情期ではないと判断した。

3) 血清 E2 濃度測定

血清 E 2 濃度の測定は、外部検査機関 (富士フイルムモノリス株式会社、東京、日本) にて測定し、データ収集を行った。サンプルは、酵素抗体免疫測定法 (ELISA) キット (Canine Estradiol ELISA kit, Endocrine Technologies, Inc., Newark, CA, USA) を使用し、方法は、競合的 ELISA であった。

4) 血清 CTK 分析

サンプルは、市販のイヌ血清カテプシン K 測定 ELISA キット [Dog cathepsin K (CTSK) ELISA kit, MBS937482, MyBioSource Inc., San Diego, USA] を用いて、分析方法は、定量的サンドイッチ ELISA を用いた。手順の概略は以下の通り。CTK 特異的抗体がプレコーティングしてあるマイクロプレートの各ウェルに標準試薬とサンプルを入れ、37°C で 2 時間インキュベートした。未結合物質を除去した後、CTK 特異的なビオチン結合抗体をウェルに添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。3 回洗浄後、アビジン結合ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) を各ウェルに添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。基

質溶液をウェルに添加し、37°Cで15～30分インキュベートしたのち、停止試薬を加え、吸光度計で（450nm および 540nm の波長）吸光度を測定し、標準検量線を用いて CTK 濃度を数値化した。単位は pg/mL で示した。キットの測定範囲は 6.25～400pg/mL、検出限界は 1.56pg/mL であった。キット内測定誤差は 8%以下、キット測定誤差は 10%以下であった。

5) 血清 NTx 分析

血清サンプルは、イヌ血清 NTx と良好な交差反応性を有する事が報告されている市販のヒト血清 NTx ELISA キット（Osteomark, アリーアメディカル株式会社, 東京都）を用いて分析した (28)。分析方法は、競合的 ELISA を用いた。

手順の概略は以下の通りである。NTx リガンドを固相化したマイクロプレート上のウェルにサンプルを注入し、その後、ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体を添加した。プレートを 90±5 分間放置し、ウェルを洗浄した。洗浄後、希釈した基質を各ウェルに添加し、30±2 分間インキュベートした。最後に停止試薬を添加し、5 分間インキュベートした後、プレートリーダーで吸光度（波長 450 nm/630 nm）を測定して標識抗体の結合量を測定した。NTx 濃度は標準検量線を用いて算出した。アッセイ値は、1 リットル当たりのナノモル骨コラーゲン等量 (nM BCE/L) で示した。測定範囲は 3.2～40.0 nM BCE/L であった。キット内測定誤差は 4.6%、キット間測定誤差は 6.9%であった。

6) 統計解析

血清 E2 濃度および NTx 濃度は、Shapiro-Wilk 検定を用いて正規性を検定したところ、避妊雌と未避妊雌共にデータが正規分布しておらず、また、F 検定を用いて検定したところ異なる母分散であったことから、Mann-Whitney の U 検定を用いて避妊雌と未避妊雌の間で比較した。年齢、血清 E2 濃度、血清 NTx 濃度、OHE からの経過時間、およびいくつかの血液生化学的値 (ALP、Ca、P) との相関を、避妊雌と未避妊雌の両方についてスピアマンの順位相関係数を用いて検定した。統計解析は Statcel 3 (OMS 出版社、埼玉県)を用いて行った。すべての解析において $P < 0.05$ で統計的有意とした。

1-3 結果

1) 血清 E2 濃度 (避妊雌 n=56 vs. 未避妊雌 n=43)

結果は、平均±標準偏差 (SD) で表した (表 1-2)。平均血清 E2 濃度は避妊雌と未避妊雌の間で有意差はなかった (13.14 ± 19.96 pg/mL vs. 11.31 ± 16.77 pg/mL) (図 1-1 a, b)。避妊雌 32 頭および未避妊雌 24 頭は、キットの信頼限界 (< 5 pg/mL) を下回っていた。血清 E2 濃度は避妊雌でも未避妊雌でも年齢と相関はなく、また避妊雌では OHE からの経過時間と相関はなかった (図 1-1 c)。

2) 血清 CTK 濃度 (避妊雌 n=12 vs. 未避妊雌 n=12)

血清中 CTK 濃度は、避妊雌 11/12 頭と未避妊雌 11/12 頭でキットの定量範囲 (6.25~400 pg/mL) 以下であった。1 頭の避妊雌 (1 歳、チワワ : 36.95 pg/mL) と 1 頭の未避妊雌 (3 歳、ミニチュアダックスフンド : 13.66 pg/mL) は定量可能であったが、いずれも炎症、心疾患、悪性腫瘍などの疾患の兆候を示していなかった。

3) 血清 NTx 濃度(避妊雌 n=44 vs. 未避妊雌 n=31)

血清 NTx 濃度は避妊雌と未避妊雌の間で有意差はなかった (22.68 ± 17.85 vs. 33.16±57.28)。血清 NTx は 避妊雌と未避妊雌の年齢、および OHE からの経過時間とは相関しなかった (図 1-2)。

4) 血清 E2 と NTx 濃度、血液生化学検査項目との相関

避妊雌では血清 E2 と NTx 濃度に相関は見られなかった (図 1-3)。未避妊雌の血清 E2 と NTx 濃度の間には、スピアマンの順位相関係数により非常に弱い相関が認められた (r=0.36)。

5) 血清 E2、NTx と血液生化学検査の相関性

血清 E2 および NTx 濃度は、避妊および未避妊雌 (2 歳以上) のいずれにおいても ALP、

Ca または P とは相関しなかった。

1-4 考察

我々は、イヌにおける骨代謝のメカニズムを解明することを目的とし、そのメカニズムの理解を深めることがヒト医学にも貢献する可能性があると考えている。今研究の結果、以下の4つのことが明らかになった。1)血清 E2 および NTx 濃度は避妊雌と未避妊雌で有意な差は認められなかった。2)血清 CTK 濃度は殆どすべての避妊雌と未避妊雌で定量下限濃度以下であった。3)血清 E2 と NTx 濃度との相関は避妊雌では認められず、未避妊雌では弱い相関しか認められなかった。4)血清 E2 および NTx 濃度は、避妊雌でも未避妊雌でも、年齢や OHE からの経過時間とは相関しなかった。

過去の研究では、避妊雌と未避妊雌と去勢雄および未去勢雄では、E2 濃度が類似していると報告しており (30)、同著者の別の研究でも避妊雌と去勢雄では血清 E2 に有意な差がないことが示されている (31)。今回の結果はこれらの知見と矛盾せず、OHE は雌イヌの血清 E2 や骨代謝に影響を与えないことを示唆している。ヒトでは、閉経前の健常女性では、いかなる生理周期においても血中 E2 濃度が閉経後よりも有意に高いため (32)、今回の結果および過去の報告はいずれも、ヒトで観察される閉経と雌イヌにおける不妊手術後の状態との大きな違いを意味していると考えられる。

イヌで血清 E2 濃度が OHE の有無で変化しなかった理由としては、卵巣以外の組織から

のエストロゲン分泌が考えられる。イヌでは性腺外 E2 の量や役割は明らかにされておらず、副腎や副腎外組織（脂肪線維芽細胞、皮膚線維芽細胞、毛包、肝臓など）から分泌されると報告されている性腺外 E2 について、更に検証を行う必要があると考える（29, 33）。

また、本研究の結果から、性ホルモンと骨代謝の関係はイヌと他の動物種でも大きく異なる可能性が予想された。イヌの性腺 E2 の骨代謝への影響は、エストロゲン欠乏状態に陥った時に骨代謝に影響が明瞭になる動物種、すなわちヒト、マウス、ラット、ウサギなどと比較して無視できるレベルであると考えられる。

これらの E2 の働きの違いには、発情サイクルの動物種差が関連する可能性がある。イヌの発情周期は 6~10 ヶ月で約 2 ヶ月間の前発情期と発情期があり、この間は E2 濃度が高いが、その後 4~8 ヶ月間は非発情期であり、この間は E2 濃度が低く、卵巣には機能的な卵胞も黄体も存在しない（34）。対して、マウスやラットは卵胞期を繰り返す不完全な生殖周期を持っており、黄体期を欠いているため、E2 レベルが常に高くなっている。ウサギは、常に卵巣内に機能的な卵胞が存在する、交尾排卵と呼ばれるユニークな繁殖形態である（35）。動物の生殖周期に伴う E2 分泌の増減は、種ごとに異なっている。

また、ヒトでは年代によって E2 レベルの低下に対する骨代謝の反応に差があることが報告されている。アロマターゼ欠乏症および性腺機能低下症を有する女性は、胎児期から生涯を通じての性腺 E2 の欠乏に起因した骨密度の低下と骨端線閉鎖遅延を示したと報告されている（36, 37）。対照的に、閉経前の女性における無排卵に伴う低 E2 状態は、骨量および

骨代謝マーカー（骨型 ALP、尿中ピリジノリン、デオキシピリジノリン、および I 型コラーゲン架橋 C テロペプチド）のレベルが正常女性と同様であった (38)。しかし、思春期の若い女性は、高レベルの身体運動および低エネルギー状態に起因する低 E2 状態によって骨密度の低下を示した (39)。

本研究では、我々は避妊雌と未避妊雌のイヌにおける年齢と既知の骨代謝マーカーとの関係も調査した。雌イヌの血清 E2 と NTx 濃度は、4 ヶ月齢から 17 歳までの範囲で、加齢に伴う有意な変化は見られなかった。この結果は、上記のヒトの年齢ごとの低 E2 状態への骨代謝の反応の変化とは対照的である。我々の知る限りでは、イヌでは E2 や NTx レベルの加齢に関連した変化は報告されていない。これには、イヌに閉経がない事が関連している可能性がある。イヌには閉経が無く、ヒトのような卵巣停止や卵胞の消失が無いため、産子数は加齢に伴って減少するものの、高齢であっても妊娠（受精）は可能である (34)。イヌと遺伝的に近縁であるオオカミもまた閉経は報告されておらず、11 歳というかなり高齢での出産の記録も存在する。

殆どの動物で、生殖能力を失った後の雌は長く生存しない。陸生哺乳類で閉経してその後長く生き続ける動物は、ヒトしか確認されていない。海生哺乳類の一部 [シャチ（学名 *Orcinus orca*）コビレゴンドウクジラ（学名 *Globicephala macrorhynchus*）、ベルーガ（シロイルカとも。学名 *Delphinapterus leucas*）、オキゴンドウ（学名 *Pseudorca crassidens*）、イッカク（学名 *Monodon monoceros*）] でのみ、閉経してその後も長く生存する種が確認され

ているが、性腺由来性ホルモンと骨代謝の関連性は未解明である (40, 41)。海生哺乳類、主に鯨類の骨は、ヒトやイヌとは異なり、皮質骨と呼べる構造が非常に少なく、緻密な海綿骨が多くを占める (42)。水中での生活は重力に抗する必要が無いため、海生哺乳類の骨代謝は、陸生哺乳類とは異なっている事が予想されるが、詳細は不明である。

また、ヒト以外の陸生哺乳類は季節繁殖が多く、1年のうち限られた期間にのみ高 E2 状態であってその他の期間は低 E2 状態となると考えられる。もしも、多くの陸生哺乳類でヒトやマウスやラット、ウサギと同様に E2 が破骨細胞活性に抑制的に作用している場合、季節繁殖動物あるいは長い非発情期を有する動物では、その期間に骨密度は顕著に低下してしまう可能性があり、生存には不利である事が予想される。

季節繁殖ではない動物として、ヒトの他にはウシやブタが挙げられる (35)。家畜化され、住環境の気温の変化が小さくなり、繁殖力の高い個体が選別され続ける事で繁殖の季節性が低下する。これら動物における性ホルモンと骨代謝の関連についてもまた、不明な点が多い。ウシやブタの性周期は約 21 日とヒトに近い為、卵巣摘出による骨の組織学的変化あるいは骨代謝マーカーの変化は興味深い。

骨代謝に対する性ホルモンの影響は種ごとに異なっている可能性が高く、骨代謝の研究を行う際、これらの種特異性に留意する必要があると考えられた。

今回の研究にはいくつかの制限があった。第一に、サンプル量が少ないため血清 NTx、CTK 以外の骨吸収マーカーや骨形成マーカー、E2 以外のホルモンの質量分析ができず、

同一個体でその他のホルモン動態との関連性が検討できなかった。また、イヌの来院時の血液を用いてマーカー測定を行った横断的な研究であるため、骨形態モニタリングの為に定量的 CT や DXA による画像評価による骨量との関連性についての検証を行う事が出来なかった。明らかな発情兆候を示す個体は除外しているが、膣細胞診は実施していないため性周期の明確な鑑別の根拠は十分ではない可能性が残っている。

1-5 結語

我々は、イヌにはヒトで観察される閉経後骨粗鬆症のような現象が確認されないことから、OHE 後の血清および組織 E2 レベルの保持のためのユニークなメカニズムがあるか、あるいは E2 とは無関係に骨代謝が保護されているという仮説を立て、雌イヌの血清 E2 濃度および骨代謝マーカーを測定、比較検証した。その結果、血清 E2 濃度および NTx 濃度が未避妊雌と避妊雌で有意差が無かった。このことから、イヌの雌では性腺エストロゲンに依存しない骨代謝維持の機構が存在する事が示唆された。

今後の研究では、イヌが低い E2 レベルで骨代謝を維持できるメカニズムの解明を目指し、これがヒトの骨疾患の治療に役立つ情報を提供できると考えている。

第二章

健全な雌雄のイヌにおける I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドに対する年齢と不妊手術の影響の検証

2-1 緒言

かつて、イヌは、年齢および性ホルモン欠乏に関連した状態をモデル化するための有望な候補と考えられていた。コンパニオンアニマルであるイヌは、ある程度の長寿を享受しており、多くの場合、老年期に達することが多い。イヌの骨格は、骨の組成、密度、および質の点で、他の脊椎動物よりもヒトの骨に類似している (43)。さらに、イヌは不妊手術を施される機会が多く、性腺由来の性ホルモンの生産を阻害する事が容易である。したがって、イヌは人間の老年期、閉経、および性腺機能低下症に類似した状態を作り出す事が可能であり、人の閉経後骨粗鬆症の解明に貢献する疾患モデルになり得ると考えられていた。しかし、イヌは不妊手術による性腺除去や、加齢に関連する骨への悪影響を示さない事から骨研究のモデル動物として用いられなくなってきたが、その理由の一つには、より幅広い健全犬における骨代謝のデータが不足している事がある (10)。

第一章では、未避妊雌と避妊雌の骨代謝マーカー値に有意な差が無かった事から、ヒトの閉経後骨粗鬆症はイヌではモデル化できない事を示唆した。更に、血清 E2 濃度は NTx 濃度と相関しないこと、血清 E2 および NTx 濃度は未避妊雌と避妊雌で差がないことを明ら

かにした。

多くのイヌの骨代謝の研究は、E2 減少状態のモデル条件に集中しており、狭い年齢範囲内で雌のイヌのみを対象としている。我々は、より広い年齢範囲で雌雄両方におけるイヌの骨代謝に関する更なる研究が必要であると考えた。

ヒトにおける加齢および性ホルモン欠乏に関連して発現する現象には、E2 減少状態となる閉経後女性における骨密度 (BMD) の低下だけでなく、高齢男性における性腺機能低下症に伴う骨量減少もある (44)。マウスにおいては、骨量減少に対するテストステロンの予防効果の実証がなされている (45)。しかし、イヌでのデータは少ない。

そこで第二章では、雌雄両方の不妊済みおよび未不妊のイヌを対象とし、イヌの血清 NTx 濃度に及ぼす年齢、性別、不妊手術の有無の影響の検証を行った。第一章で CTK と NTx の血清中濃度を測定したが、CTK は殆どのサンプルで定量可能下限値を下回ったため、我々は血清 NTx のみに焦点を絞り NTx の変動について評価を行った。

2-2 材料および方法

1) 供試動物・血清サンプル

2016 年 4 月から 2019 年 6 月までの間に鹿児島市内の一次診療動物病院に来院し、定期健康診断の一環で血液検査を受けた雌雄のイヌを対象とした。

第一章と同様に、血清サンプルは分析のために十分な残量があり、かつ通常の血液生化学

分析において基準範囲を大きく上回らない事を条件とした [血液生化学検査項目：総タンパク、アルブミン、ALP、ALT、AST、血中尿素窒素、クレアチニン、カルシウム (Ca)、およびリン (P)]。また、既往歴として整形外科疾患、生殖器系 (卵巣・子宮・精巣) 疾患がある場合、または採血前 1 ヶ月間にステロイド治療を受けていた場合には、本研究から除外した。

2) 血液サンプルの採取

頸静脈または伏在静脈からシリンジを用いて全血を採取し、血清分離管に移し、室温 (20~25°C) で約 30 分間静置した後、1450×g で 10 分間遠心分離し、上清を回収し、1.5mL のポリプロピレンチューブに入れて-20°Cで血液生化学検査まで保存した。血液生化学検査後の残りの検体は、血清 NTx 濃度測定まで-20°Cで保存した。

3) 血清 NTx 濃度測定

市販の ELISA キット (オステオマーク、アリーアメディカル株式会社、東京都) を用いて、血清中の NTx 濃度を測定した (詳細は第一章を参照)。

4) 統計解析

分析のために、動物を 4 つの群 (未去勢雄、去勢雄、未避妊雌、避妊雌) に分類した。そ

それぞれの群で全年齢および2歳以上の血清 NTx 濃度のデータを Shapiro-Wilk 検定を用いてデータの正規性を検定したところ、2歳より上の未去勢雄は正規分布であったが、去勢オス、未避妊メス、および避妊メスは正規分布ではなかった。そのため、血清 NTx 濃度は Kruskal-Wallis 検定を用いて4群間で比較した。2歳以下および2歳より上の年齢層の分散は、F 検定を用いて比較した。4群全てで2歳以下と2歳より上の年齢層での血清 NTx 濃度を、Mann-Whitney の U 検定を用いて比較した。また、不妊手術の影響の有無を検証するために、未去勢雄と去勢雄、未避妊雌と避妊雌の血清 NTx 濃度を、Mann-Whitney の U 検定を用いて比較した。年齢、血清 NTx 値、体重および血液生化学的パラメータ (ALP, Ca, P) の相関をスピアマンの順位相関係数を用いて全群で検討した。統計解析は Statcel 3 ソフトウェア (OMS 出版社、埼玉県) を用いて行った。有意水準は $P < 0.05$ で統計的有意とした。

2-3 結果

1) 供試動物の年齢および体重データ

研究には合計 145 頭の健康なイヌを用いた。未去勢雄 (n=38)、去勢雄 (n=32)、未避妊雌 (n=31)、避妊雌 (n=44) で構成されている。犬種は様々であった。群別の平均年齢と体重 [平均±標準偏差 (SD)] は、未去勢雄が年齢 7.00 ± 4.59 歳 (0.33~17.33 歳) / 体重 7.34 ± 5.38 kg (1.9~25.3kg)、去勢雄が 6.70 ± 4.71 歳 (1.00~18.33 歳) / 7.41 ± 6.28 kg (2.20

～32.55kg)、未避妊雌が 5.89 ± 3.66 歳 (0.33-12.00 歳) / 6.56 ± 5.05 kg (2.3～23.4kg)、避妊雌が 7.90 ± 3.94 歳 (0.58～17.70 歳) / 6.73 ± 4.55 kg (2.3～18.65kg) であった (表 2-1)。

2) 血清 NTx 濃度および年齢別コホート区分

解析の結果、未去勢雄、去勢雄、未避妊雌、避妊雌の血清 NTx 濃度はそれぞれ 54.29 ± 77.58 、 30.36 ± 18.42 、 33.16 ± 57.28 、 22.68 ± 17.58 nmol BCE/L であった (表 2-2)。

血清 NTx 濃度と年齢の関係性を散布図で示した (図 2-1)。この結果から、血清 NTx 濃度は 2 歳までは成長と共に低下し、その後は一定であることが示唆された。そこで本研究では、4 群を 2 歳以下と 2 歳より上の二つの年齢コホートに分けて、F 検定を用いてデータの分散を比較し、Mann-Whitney U 検定を用いて平均血清 NTx 濃度を比較した。F 検定の結果、血清 NTx データは 2 歳以下と 2 歳より上で母分散が異なっていた。Mann-Whitney U 検定では、血清 NTx 濃度の値は、未去勢雄、去勢雄、未避妊雌群で年齢コホート (2 歳以下 vs. 2 歳より上) 間で有意に異なっていた [未去勢雄 : 185.50 vs. 29.69 、 $p=0.0001$; 去勢雄 : 50.33 vs. 24.77 、 $p=0.0058$; 未避妊雌 : 104.21 vs. 16.11 、 $p=0.0023$ (表 2-2)]。避妊雌は 2 歳以下のコホートが $n=4$ であった事から年齢コホート間での差の検定は行わなかった。我々は、2 歳以下を幼若犬コホート、2 歳より上を成-老犬コホートとした。

3) 成-老犬コホートにおける性別および不妊手術の状況別血清 NTx 濃度

成-老犬コホート (>2 歳 ; n=122) では、血清 NTx 濃度の値 [平均値±SD (最小値-最大値)] は、未去勢雄で 29.69±10.70 (11.87-49.69)、去勢雄が 24.77±12.37 (5.88-63.88)、未避妊雌が 16.11±6.22(7.69-28.99)、および避妊雌が 19.02±7.79(9.03-48.73)nmol BCE/L であった。この年齢コホートの結果の詳細を図 2-2 の箱ひげ図で示した。血清 NTx は未去勢雄で最も高く、次いで去勢雄、避妊雌、そして未避妊雌の順であった。このコホートでは、不妊手術の有無による血清 NTx 濃度の差は雄で有意であったが、雌では有意ではなかった (Mann-Whitney U 検定)。

このコホートでは、4 群とも血清 NTx 濃度と年齢との有意な相関は認められなかった。

4) 幼若犬コホートにおける性別および不妊手術の状況別血清 NTx 濃度

幼若犬 (≦2 歳 ; n=23) における血清 NTx 濃度 [平均値±SD (最小値-最大値)] は、未去勢雄が 185.50±138.93(最小 52.42-最大 364.62)、去勢雄が 50.33±23.34(19.50-87.04)、未避妊雌が 104.21±109.51 (15.92-271.48)、避妊雌が 72.66±40.17 (27.71-105.03) nmol BCE/L であった。

避妊雌のサンプル数が 4 頭分であり、ノンパラメトリック検定を行える n 数に及ばないため、このコホートの雌雄および不妊手術の状況別の血清 NTx 濃度を統計的に比較することとは行わなかった。

年齢との関連性について、血清 NTx 濃度は、未去勢雄、去勢雄、未避妊雌で年齢と有意

な相関はなかった。避妊雌の数 (n=4) は、統計的分析には不十分であったため、統計を行っていない。

5) 血清 NTx、体重および血液生化学的パラメータの間の相関関係

体重と血清 NTx 濃度との関連性は、幼若犬コホートにおいては犬種がさまざまであり、一定の体重（体格）でなかったことから、相関検定は行わなかった。

成-老犬コホートでは、未不妊の雄雌と、不妊手術済みの雄雌の体重と血清 NTx 濃度との間に有意な相関は認められなかった（図 2-3）。血液生化学的パラメータと血清 NTx 濃度との相関は、避妊雌のみ、血清 ALP 濃度と NTx との間に弱い相関が認められた ($r=0.42$)。幼若犬コホートにおいては、血液生化学パラメータと血清 NTx 濃度との相関はいずれの項目においても認められなかった。

2-4 考察

本研究は、イヌの骨代謝に関する長期的な研究の一環である。我々の知る限りでは、骨吸収マーカーを測定した過去の研究の中で、最も広い年齢範囲（0.3~18.3 歳）と、最も数の多い雌雄のイヌ (n=145) を対象とした。

今回判明した、血清 NTx 濃度と年齢および不妊手術の有無との関連は、イヌの骨代謝に関する今後の研究に重要な意味を持つ新たな知見と考えられた。2 歳以下では血清 NTx 濃

度は年齢とともに低下する傾向があり、2歳より上の年齢では雌雄ともに一定となることが明らかになった。また、2歳より上の年齢コホートでは、雄は去勢手術の有無で血清 NTx 濃度に有意差を示したが、雌は OHE の有無で有意差がなかった。

成-老犬コホートのサンプル数が多いことから、2歳より上の年齢で血清 NTx 濃度が一定であるという結果の信頼性は高いことが示唆され、最大 18 歳まで年齢との相関がないことは非常に興味深い知見である。

幼若コホートのサンプル数が少なかったことから、幼若犬における血清 NTx の加齢による低下の存在を確定するためには、さらなる研究が必要であることが示唆された。

これらの知見は、ヒトの疾患のモデル化のためであれ、イヌの疾患そのものの調査のためであれ、イヌの骨代謝マーカーを含む将来的な研究において、集団の年齢範囲を設定する際に考慮されるべき点である。成犬を対象とした研究では、年齢の下限を 2 歳とし、年齢の上限は設定しなくてもよいと考えられる。

幼若犬を対象とする場合は、2 歳を年齢の上限とするべきであると考えられるが、これはより大きなサンプルサイズでの調査が必要であり、本研究の結果からは暫定的なものと考ええる。

幼若犬で血清 NTx 濃度が成-老犬コホートよりも高かった事は、若齢時の身体発達に伴って骨代謝が活発になる事に伴うものと予想される。若齢のイヌで 6 ヶ月から 36 ヶ月のビールの検体を用いて大腿骨の力学的特性を調査した研究では、加齢に伴って骨強度が増加

する傾向を認めており、この間、活発に骨リモデリングが行われている事が予想される (46)。

また、幼若犬で加齢に伴って血清 NTx 濃度が低下する傾向があった事は、イヌではこれまで報告が無い新しい知見である。ヒトでは同様のパターンが報告されており、Asagi ら (2012) と Mora ら (1998) は、ヒトは男女ともに 2 歳から 20 歳までの間に NTx 濃度が低下することを報告している (47, 48)。Orito ら (2009) は、若い女性で 12 歳から 20 歳の間に NTx 濃度が低下することを発見した (49)。これは、身体の発達が最も著しいのは出生直後であり、その後は骨伸長や骨量増加のスピードが緩徐になる、成長の特徴であると考えられた。

本研究で得られた知見から、幼若犬における骨代謝と成長に関する新たな研究の道筋が考えられる。血清 NTx 濃度が低下してくる時期と一定になる時期の境界線として、2 歳という年齢を設定することができれば、成長板閉鎖から骨吸収マーカーの安定化までのタイムラグは、イヌの方がヒトよりも長いことが証明されるかもしれない。ヒトでは成長板閉鎖は 20 歳までに生じるため骨代謝マーカーが一定になる時期と一致するが、イヌでは成長板は 1 歳前後で閉鎖すると報告されており (50)、我々の発見は、イヌの骨のターンオーバーが成長板閉鎖から更に 1 年間程度活発であることを示唆している可能性がある。骨代謝が安定する正確な年齢を特定するためには、より多くの幼若犬を用いた研究が必要である。更に、ヒトよりも体格や体質にバリエーションが豊富なイヌにおいては、小型犬と大型犬での比較も必要になってくると考えられる。また、人間では 12~14 歳頃に第二性徴に伴って

骨のターンオーバーが活発になる事が示されているが、イヌでも同様の骨代謝の変化が存在するかどうかを明らかにすることができるであろう。

本研究では、最高年齢（18 歳）まで血清 NTx 値が一定であったことから、ヒトとは対照的な結果が得られた。一般的に、ヒトの女性では血清 NTx 値は 50 歳前後になると閉経を迎え、性ホルモン分泌量の低下による高骨代謝回転に伴って骨密度が低下し、血清や尿の NTx 濃度の上昇が見られるようになる。男性は女性よりもはるかに長く血清 NTx 値は安定して維持されるが、性腺機能低下症を呈した一部の高齢男性では骨代謝の変化が起こる。しかし、今回の研究に用いたイヌの集団では、血清 NTx は 2 歳時点から最高年齢（未去勢雄 18.33 歳、去勢雄 17.33 歳、未避妊雌 17.58 歳、避妊雌 12.00 歳）まで一定であった。老年期における血清 NTx の一定化は今後の研究において非常に興味深いものである。現在までのところ、イヌの加齢が骨代謝に及ぼす影響を評価した研究はほとんど発表されていない。老犬が骨代謝を維持しているとする、そのメカニズムを解明することは、ヒトの加齢に伴う骨疾患の予防・治療に役立つ重要な情報を提供する可能性がある。

上述した血清 NTx の低下期と一定期の年齢区分に基づいて、研究集団を幼若犬コホート（2 歳以下）と成-老犬コホート（2~18 歳）に分けた。成-老犬コホートでは、血清 NTx は未去勢雄で最も高く、次いで去勢雄、そして避妊雌と未避妊雌の順であった。去勢雄と未去勢雄、および雄と雌の間に有意な差が認められたが、避妊雌と未避妊雌の間には有意な差は認められなかった。これらの知見は、過去に報告されたイヌの性ホルモンに対する不妊手術

の効果を反映している。Frank ら（2003 年）は、血清テストステロンのレベルが、未去勢雄と去勢雄の間で有意に異なり、去勢雄のレベルは雌犬とほぼ同等であることを報告している（30）。その研究では、E2 は未避妊雌と避妊雌の間では差がなく、両方とも低レベルであった。この研究と我々の先行研究から得られた知見から、各性における所見は別々に論じるべきであることが示唆される。

本研究では、未去勢雄の血清 NTx が有意に高値を示したことから、雄犬の骨代謝に去勢手術（精巣摘出術）が影響を与えると考えられる。Fukuda と Iida（2000）は、雄犬の精巣摘出後に骨折リスクは増加しないが、骨量は減少すると報告している。未去勢雄と去勢雄を比較すると、雌イヌの E2 の状況とは対照的に、雄イヌではアンドロゲンが骨代謝に何らかの影響を与えることが示唆されている（16）。しかしながら、性ホルモンの正確な役割と、それらがイヌの骨量あるいは骨密度保持にどのように寄与するかについては、まだ明らかになっていない。他の哺乳類では、Kawano ら（2003）がマウスの骨芽細胞にアンドロゲンが直接作用することを示唆しており（51）、Mohamad（2012）や Rochira ら（2006）がヒトを中心にアンドロゲンと骨代謝の関係をまとめている（44, 52）。このように、イヌの雄の骨代謝におけるアンドロゲンの役割をさらに解明することで、高齢男性に見られる性腺機能低下症関連の骨疾患のイヌモデルの可能性が明らかになると考えられる。

幼若犬コホートでは、性ホルモンの関係は不明であった。サンプルサイズが小さいため、不妊手術を行った個体と未不妊の個体の違いを検出するには不十分であった。また、サンプ

ル採集を行った一次診療動物病院での一般的な不妊手術の年齢は 6~12 ヶ月であり、本研究では最年少の去勢雄は約 1 歳、最年少の避妊雌は 7 ヶ月であった。若年期の骨代謝に及ぼす性ホルモンの影響を解明するためにはさらなる調査が必要である。高齢の雌イヌでは骨吸収に対する性ホルモンの影響は認められなかったが、2 歳未満ではそのような影響があることを現時点では否定できない。

本研究では、成-老犬コホートに限定した解析ではあったが、不妊および未不妊の雌雄のイヌの体重と血清 NTx との相関は認められなかった。しかし、今研究におけるイヌは体重のばらつきが少なく、小型犬が中心で体重 10kg 以下の犬が大半を占めていた。したがって、体重の役割についての結論を出すには、より幅広い体格のイヌを対象としたさらなる調査が必要であると考えられる。

成-老犬コホートにおいて血液生化学的パラメータは殆どが血清 NTx と相関しなかった。血清 ALP のみ、避妊雌において弱い正の相関を示した ($r=0.42$)。しかし、未避妊雌、未去勢雄、去勢雄のいずれにおいても相関は認められなかった。ALP はいくつかのアイソザイムが存在するため、骨特異的 ALP と血清 NTx の関係について、より詳細な検討が必要であると考えられる。

幼若犬コホートのサンプル数が少ないことに加えて、この研究にはいくつかの限界があった。第一に、一頭当たりの血清量が少なかったため、血清 NTx 以外の骨吸収や骨形成マーカーの調査ができなかったことである。第二に、動物の来院時には採血と身体検査のみ行

っており、骨形態学の定量的 CT や二重エネルギー X 線吸収法による骨評価などの追加検査を行うことができなかった。同様の理由で、また飼い主の意思に基づいて、腔細胞診を行うことはできなかった。

2-5 結語

本研究では、イヌの骨吸収の指標として、血清 NTx について過去に類を見ない広い年齢範囲で調査を行う事が出来た。我々は、イヌの血清 NTx が安定したレベルに到達する時期は 2 歳と推定した。

本研究で得られた知見より、雄イヌは高齢男性のテストステロンの低下に関連した骨減少症などの疾患モデルとなる可能性がある。しかし、雌イヌは閉経後の骨粗鬆症などの条件をモデル化するのに適していないことが示唆された。

我々は骨代謝を通じて、イヌとヒトの興味深い違いと類似性の両方を示した。今後の研究では、より多くのデータを作成し、他の骨代謝マーカーや骨形態学的変化を調査することが望まれる。

総括

イヌは骨組成や成長後の骨保持をリモデリングに依存している点などでヒトと相似性があるが、不妊手術による骨量あるいは骨密度の低下が臨床的に問題にならない点で異なっている。しかし、その理由は不明な部分が多い。

我々は本研究において、幅広い年齢層、多様な犬種の健康なイヌの血清を用いて、エストラジオール（E2）と骨代謝マーカとの関連性を検索した。

第一章では、主に雌のイヌが卵巣子宮摘出手術（OHE）を受けても骨減少を示さないとされている事から、未避妊雌および避妊雌の血清中の E2 濃度および、骨吸収マーカである I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド（NTx）と活性化破骨細胞が骨吸収を行う際に分泌するシステインプロテアーゼであるカテプシン K（CTK）を測定した。各項目を未避妊雌と避妊雌で比較し、年齢や避妊手術からの経過時間との関連性を検索した。研究には、未避妊雌 43 頭と避妊雌 56 頭分の血清を用いた。血清は、健康診断の為の血液生化学検査の余剰分であったため、血清 E2 濃度は全頭で測定したが NTx は未避妊雌で 31 検体、避妊雌で 44 検体、CTK は未避妊雌と避妊雌とも 12 頭ずつ測定した。

その結果、血清 E2 濃度と NTx 濃度は未避妊雌と避妊雌の間で有意差を認めず、CTK は両群とも殆どの検体で測定限界以下となった。

また、血清 E2 濃度と年齢あるいは OHE からの経過時間はいずれも相関を認めず、NTx

濃度と年齢あるいは OHE からの経過時間も相関を認めなかった。CTK も低値であったことから破骨細胞活性は OHE の影響を受けていないことが考えられた。血清 E2 濃度と NTx 濃度は、避妊雌で弱い相関を認めた。

この結果より、OHE は雌のイヌにおいて血清 E2 濃度や NTx 濃度に影響を与えないことが示唆された。これは、避妊した雌のイヌでは、卵巣摘出によるエストロゲンの変化が生じないことが、ヒトの閉経後女性におけるエストロゲン減少に伴う骨粗鬆症のような病態が観察されない事と一致する知見であった。

これらの結果には、イヌの繁殖周期が関連していると思われた。イヌは、約 6~10 ヶ月の繁殖周期で、E2 濃度が高くなるのはこのうち約 2 か月間の発情前期と発情期のみである。これに対してヒトは約 1 ヶ月の周期で E2 の増減を繰り返す。非発情期が無いラットや、常に活性化された卵胞が卵巣に存在しているウサギなどでの E2 欠乏に関連して骨密度が減少する事が証明されている動物とも異なっている。低 E2 状態の期間が長いイヌがヒトと同様に E2 が低下する事で高骨代謝回転状態になり、生存に不利な骨減少を引き起こすことにならないような骨代謝システムを有していると考えられた。

また、イヌは閉経しないと言われており、そもそも陸生哺乳類で閉経するのはヒトくらいなので、性ホルモンと骨代謝の関係の種による違いは重要な研究対象であると考えられた。

第二章では、血清 NTx に着目し、幅広い年齢層の雌雄の健康なイヌの血清サンプルを用

いて、未去勢雄、去勢雄、未避妊雌、避妊雌の4群で比較し、イヌにおける骨代謝マーカーへの雌雄の性ホルモンの影響を考察した。年齢や体重、血液生化学検査項目と NTx との関連の検索も行った。

その結果、いずれの群でも2歳以前は血清 NTx 濃度が高く、2歳までは成長に伴って減少する傾向が見られた。2歳を過ぎるといずれの群でも NTx 濃度は安定化して、最高齢に至るまで変化が認められなかった。そこで我々は、2歳以下の幼若犬コホートと、2歳より上の成-老犬コホートに分けて統計を行った。

成-老犬コホートでは、血清 NTx 濃度は未去勢雄、去勢雄、未避妊雌、避妊雌の順に高く、未避妊雌と避妊雌は有意差が無かった。また、年齢との相関は認められなかった。避妊雌群においてのみ、血清 ALP と NTx 濃度との弱い相関が認められた。幼若犬コホートは避妊雌群のサンプル数が少ないため、統計学的な4群間の比較および年齢との相関の検証は行わなかった。

これらの結果より、ヒトでも見られるような成長期におけるイヌの骨代謝の変化が、2歳くらいまで続く事と、その後は骨代謝が一定化する事が示唆された。不妊手術の有無による骨代謝の変化に対する全貌は不明な点が残されており、今後の課題である。

また、未避妊雌と避妊雌の NTx に有意差は無かったが、未去勢雄と去勢雄は血清 NTx 濃度には有意差があり、これは E2 とは対照的にイヌでも雄性ホルモンであるテストステロンが骨代謝に影響を与えている可能性を示唆していると考えられた。

雌のイヌはヒトの E2 欠乏状態に伴う骨代謝研究のモデル動物には適していないと考えられるが、その一方で、雄イヌは男性の性腺機能低下症に伴う骨量低下のモデル動物になり得る可能性がある。

本研究では、かつてなく幅広い年齢と多数のサンプルを得た事で、イヌの骨代謝と性ホルモンの変動に関して新知見を得たと考えられる。

今後も、イヌの骨代謝の詳細を紐解いていく事が望まれる。

謝辞

本論文を作成するにあたり、担当教官の藤木 誠教授に熱心かつ丁寧にご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。また、サンプル採集にご協力いただきました、鹿児島市のにし動物病院院長 西 洋志先生、スタッフの皆様、ELISA の技術を指導してくださいました内門浩美様、言語および論文構成にご助言くださいました Henry Ivan Smith 先生に心から感謝いたします。そして、研究活動と論文作成を長く応援してくれた京都と鹿児島の家族に感謝いたします。

引用文献

1. Cummings, S.R., and Melton, L.J.: Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet.*, 18, 1761-1767 (2002)
2. Miyamoto, T.: Mechanism Underlying Post-menopausal Osteoporosis: HIF1 α is Required for Osteoclast Activation by Estrogen Deficiency. *Keio. J. Med.*, 64, 44-47 (2015)
3. Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., Igarashi, K., Harada, Y., Azuma, Y., Krust, A., Yamamoto, Y., Nishina, H., Takeda, S., Takayanagi, H., Metzger, D., Kanno, J., Takaoka, K., Martin, T.J., Chambon, P., and Kato, S.: Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell.*, 7, 811-823 (2007)
4. Sowers, M.R., Zheng, H., Greendale, G.A., Neer, R.M., Cauley, J.A., Ellis, J., Johnson, S., and Finkelstein, J.S.: Changes in bone resorption across the menopause transition: effects of reproductive hormones, body size, and ethnicity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 98, 2854-2863 (2013)
5. Taguchi, Y., Gorai, I., Zhang, M.G., Chaki, O., Nakayama, M., and Minaguchi, H.: Differences in bone resorption after menopause in Japanese women with normal or low bone mineral density: quantitation of urinary cross-linked N-telopeptides. *Calcif. Tissue.*

- Int., 62, 395-399 (1998)
6. Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A., and Takayanagi, H.: Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature.*, 3, 69-74 (2012)
 7. Hayashi, M., Nakashima, T., Yoshimura, N., Okamoto, K., Tanaka, S., and Takayanagi, H.: Autoregulation of Osteocyte Sema3A Orchestrates Estrogen Action and Counteracts Bone Aging. *Cell. Metab.*, 29, 627-637.e5. (2019)
 8. Jensen, P.R., Andersen, T.L., Pennypacker, B.L., Duong, L.T., and Delaissé, JM.: The bone resorption inhibitors odanacatib and alendronate affect post-osteoclastic events differently in ovariectomized rabbits. *Calcif. Tissue. Int.*, 94, 212-222 (2014)
 9. Takakura, A., Takao-Kawabata, R., Isogai, Y., Kajiwara, M., Murayama, H., Ejiri, S., and Ishizuya, T.: Differences in vertebral, tibial, and iliac cancellous bone metabolism in ovariectomized rats. *J. Bone. Miner. Metab.*, 34, 291-302 (2016)
 10. Turner, A.S.: Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur. Cell. Mater.*, 22, 66-81 (2001)
 11. Shen, V., Dempster, DW., Birchman, R., Mellish, RW., Church, E., Kohn, D., and Lindsay, R.: Lack of changes in histomorphometric, bone mass, and biochemical parameters in ovariectomized dogs. *Bone.*, 13, 311-316 (1992)
 12. Boyce, R.W., Franks, A.F., Jankowsky, M.L., Orcutt, C.M., Piacquadio, A.M., White, J.M.,

- and Bevan, J.A.: Sequential histomorphometric changes in cancellous bone from ovariectomized dogs. *J. Bone. Miner. Res.*, 5, 947-953 (1990)
13. Faugere, M.C., Friedler, R.M., Fanti, P., and Malluche, H.H.: Bone changes occurring early after cessation of ovarian function in beagle dogs: a histomorphometric study employing sequential biopsies. *J. Bone. Miner. Res.*, 5, 263-272 (1990)
 14. Monier-Faugere, M.C., Friedler, R.M., Bauss, F., and Malluche, H.H.: A new bisphosphonate, BM 21.0955, prevents bone loss associated with cessation of ovarian function in experimental dogs. *J. Bone. Miner. Res.*, 8, 1345-1355 (1993)
 15. Malluche, H.H., Faugere, M.C., Rush, M., and Friedler, R.: Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental beagle dogs. *Endocrinology.*, 119, 2649-2654 (1986)
 16. Fukuda, S., and Iida, H.: Effects of orchidectomy on bone metabolism in beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 62, 69-73 (2000)
 17. Shipov, A., Shahar, R., Sugar, N., and Segev, G.: The Influence of Chronic Kidney Disease on the Structural and Mechanical Properties of Canine Bone. *J. Vet. Intern. Med.*, 32, 280-287 (2018)
 18. Murray, C.E., and Coleman, C.M.: Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 4873 (2019)

19. Hardy, R., and Cooper, M.S.: Adrenal gland and bone. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1, 137-145 (2010)
20. Malluche, H.H., Koszewski, N., Monier-Faugere, M.C., Williams, J.P., and Mawad, H.: Influence of the parathyroid glands on bone metabolism. *Eur. J. Clin. Invest.*, 36, 23-33 (2006)
21. Schmit, JM., Pondenis, HC., Barger, AM., Borst, LB., Garrett, LD., Wypij, JM., Neumann, ZL., and Fan, TM.: Cathepsin K expression and activity in canine osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.*, 26, 126-134 (2012)
22. Chapurlat, R.D., and Confavreux, C.B.: Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology (Oxford)*., 55, 1714-1725 (2016)
23. Li, X., Li, Y., Jin, J., Jin, D., Cui, L., Li, X., Rei, Y., Jiang, H., Zhao, G., Yang, G., Zhu, E., Y. Nan, Y., and Cheng, X.: Increased serum cathepsin K in patients with coronary artery disease. *Yonsei. Med. J.*, 55, 912-919 (2014)
24. Muise, ES., Podtelezhnikov, AA., Pickarski, M., Loboda, A., Tan, Y., Hu, G., Thomspou, JR., and Duong le, T.: Effects of long-term odanacatib treatment on bone gene expression in ovariectomized adult rhesus monkeys: differentiation from alendronate. *J. Bone. Miner. Res.* 31, 839-851 (2016)
25. Cabal, A., Williams, DS., Jayakar, RY., Zhang, J., Sardesai, S., and Duong, LT.: Long-

- term treatment with odanacatib maintains normal trabecular biomechanical properties in ovariectomized adult monkeys as demonstrated by micro-CT-based finite element analysis. *Bone. Rep.*, 7, 26-33 (2017)
26. McClung, MR., O'Donoghue, ML., Papapoulos, SE., Bone, H., Langdahl, B., Saag, KG., Reid, IR., Kiel, DP., Cavallari, I., Bonaca, MP., Wiviott, SD., de Villiers, T., Ling, X., Lippuner, K., Nakamura, T., Reginster, JY., Rodriguez-Portales, JA., Roux, C., Zanchetta, J., Zerbini, CAF., Park, JG., Im, K., Change, A., Grip, LT., Heyden, N., DaSilva, C., Cohn, D., Massaad, R., Scott, BB., Verbruggen, N., Gurner, D., Miller, DL., Blair, ML., Polis, AB., Stoch, SA., Santora, A., Lombardi, A., Leung, AT., Kaufman, KD., and Sabatine, MS.: Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: results of the LOFT multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial and LOFT Extension study. *Lancet. Diabetes. Endocrinol.* 7, 899-911 (2019)
27. Allen, M.J.: Biochemical markers of bone metabolism in animals: Uses and limitations. *Vet. Clin. Pathol.*, 32, 101-13 (2003)
28. Lucas, PW., Fan, TM., Garrett, LD., Griffon, DJ., and Wypij, JM. A comparison of five different bone resorption markers in osteosarcoma-bearing dogs, normal dogs, and dogs with orthopedic diseases. *J. Vet. Intern. Med.*, 22, 1008-1013 (2008)
29. Youkhanna, D., Griffon, D.J., Fredericks, P., Schaeffer, D., Fan, T.M., and Jasiuk, I.M.:

- Bone resorption markers and dual-energy x-ray absorptiometry in dogs with avascular necrosis, degenerative joint disease, and trauma of the coxofemoral joint. *Vet. Surg.* 41, 551-558 (2012)
30. Frank, L.A., Rohrbach, B.W., Bailey, E.M., West, J.R., and Oliver, J.W.: Steroid hormone concentration profiles in healthy intact and neutered dogs before and after cosyntropin administration. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 24, 43-57 (2003)
31. Frank, L.A., Mullins, R., Rohrbach, B.W.: Variability of estradiol concentration in normal dogs. *Vet. Dermatol.*, 21, 490-493 (2010)
32. Yasui, T., Matsui, S., Tani, A., Kunimi, K., Yamamoto, S., and Irahara, M.: Androgen in postmenopausal women. *Med. Invest.*, 59, 12-27 (2012)
33. Nelson, L.R., and Bulun, S.E.: Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 45, 116-124 (2001)
34. Onclin, K., Murphy, B., and Verstegen, J.P.: Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology.*, 57, 1957-1972 (2002)
35. Nakao, T., Tsumagari, S., Katagiri, S.: *Veterinary Theriogenology*. 4th ed. Buneido Publishing Co., Ltd., Tokyo, Japan., 2012
36. Shozu, M., Akasofu, K., Harada, T., and Kubota, Y.: A new cause of female

- pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 72, 560-566 (1991)
37. Harada, N., Ogawa, H., Shozu, M., Yamada, K., Suhara, K., Nishida, E., and Takagi, Y.: Biochemical and molecular genetic analyses on placental aromatase (P-450AROM) deficiency. *J. Biol. Chem.*, 5, 4781-4785 (1992)
38. Niethammer, B., Körner, C., Schmidmayr, M., Luppa, PB., and Seifert-Klauss, VR.: Non-reproductive effects of anovulation: bone metabolism in the luteal phase of premenopausal women differs between ovulatory and anovulatory cycles. *Geburtshilfe. Frauenheilkd.*, 75,1250-1257 (2015)
39. Hoch, AZ., Pajewski, NM., Moraski, L., Carrera, GF., Wilson, CR., Hoffmann, RG., Schimke, JE., and Gutterman, DD.: Prevalence of the female athlete triad in high school athletes and sedentary students. *Clin. J. Sport. Med.*, 19, 421-428 (2009)
40. Ellis, S., Franks, D.W., Natrass, S., Cant, M.A., Bradley, D.L., Giles, D., Balcomb, K.C., and Croft, D.P.: Postreproductive lifespans are rare in mammals. *Ecol. Evol.*, 31, 2482-2494 (2018)
41. Ellis, S., Franks, D.W., Natrass, S., Currie, T.E., Cant, M.A., Giles, D., Balcomb, K.C., and Croft, D.P.: Analyses of ovarian activity reveal repeated evolution of post-reproductive lifespans in toothed whales. *Sci. Rep.*, 27, 12833 (2018)

42. Cozzi, B., Huggenverger, S., Oelshlager, H. 山田 格, 監訳. イルカの解剖学-身体構造と機能の理解- (株) NST, 2020
43. Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G., and Dequeker, J.: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology.*, 139, 663–670 (1998)
44. Mohamad, N.V., Soelaiman, I.N., and Chin, K.Y.: A concise review of testosterone and bone health. *Clin. Interv. Aging.*, 22, 1317–1324 (2012)
45. Laurent, M.R., Jardí, F., Dubois, V., Schollaert, D., Khalil, R., Gielen, E., Carmeliet, G., Claessens, F., and Vanderschueren, D.: Androgens have antiresorptive effects on trabecular disuse osteopenia independent from muscle atrophy. *Bone*. 93, 33–42 (2016)
46. Luo, C., Junyi Liao, J., Zhu, Z., Wang, X., Lin, X., and Huang, W.: Analysis of Mechanical Properties and Mechanical Anisotropy in Canine Bone Tissues of Various Ages. *Biomed. Res. Int.*, 20, (2019)
47. Asagi, Y., Yamamoto, K., Ohshiro, T., and Ohshiro, T.: Bone metabolism in cerebral palsy and the effect of light-emitting diode (LED) irradiation. *Laser. Ther.* 21, 23–31 (2012)
48. Mora, S., Prinster, C., Proverbio, M.C., Bellini, A., de Poli, S.C., Weber, G., Abbiati, G., and Chiumello, G.: Urinary markers of bone turnover in healthy children and

- adolescents: age-related changes and effect of puberty. *Calcif. Tissue. Int.* 63, 369–374 (1998)
49. Orito, S., Kuroda, T., Onoe, Y., Sato, Y., and Ohta, H.: Age-related distribution of bone and skeletal parameters in 1,322 Japanese young women. *J. Bone Miner Metab.* 27, 698–704 (2009)
50. von Pfeil, D.J.F., and de Camp, C.E.: The epiphyseal plate: Physiology, anatomy, and trauma. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 31, E1–11. (2009)
51. Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Metzger, D., Chambon, P., Nakamura, K., Kawaguchi, H., and Kato, S.: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 9416–9421 (2003)
52. Rochira, V., Balestrieri, A., Madeo, B., Zirilli, L., Granata, A.R.M., and Carani, C.: Osteoporosis and male age-related hypogonadism: Role of sex steroids on bone (patho)physiology. *J. Clin. Transl. Endocrinol.*, 154, 175–185 (2006)

図表

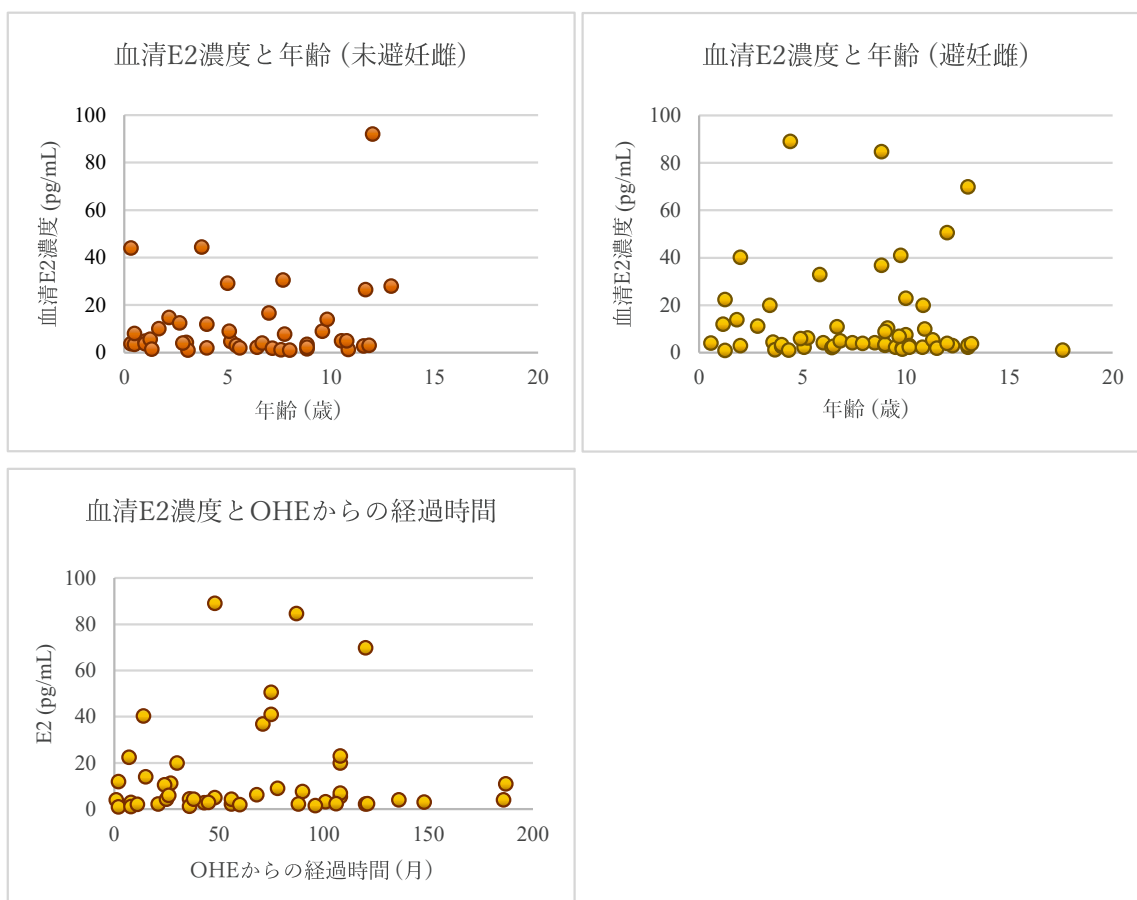


図 1-1 年齢および OHE からの経過時間と血清 E2 濃度との関連 (避妊雌 n=56, 未避妊雌 n=43)

Note : 未避妊雌、避妊雌ともに年齢と血清 E2 濃度に有意な相関関係は認められなかった。

また、避妊雌群における OHE からの経過時間と血清 E2 濃度にも有意な相関関係は認められなかった。

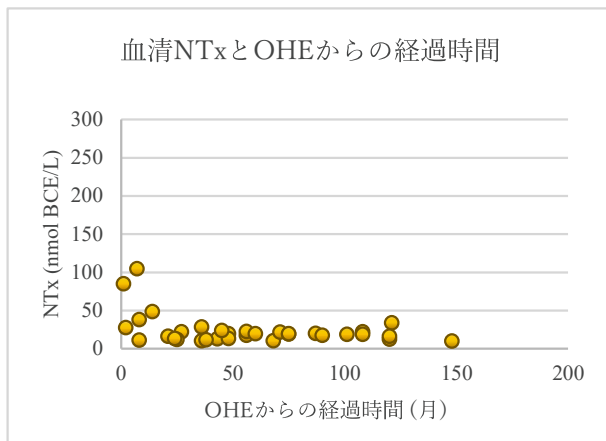


図 1-2 血清 NTx 濃度と OHE からの経過時間の関連(避妊雌 n=44)

Note : 有意な相関関係は認められなかった。

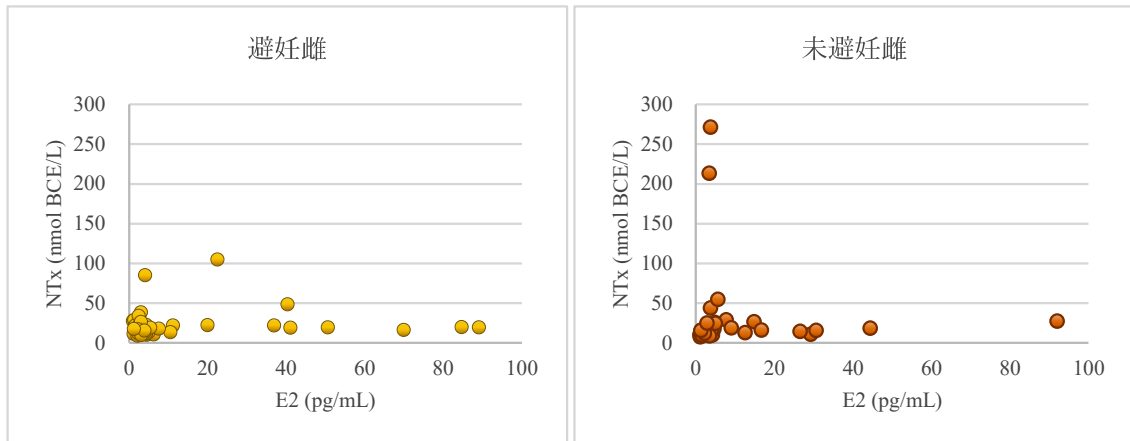


図 1-3 血清 E2 と NTx 濃度の関係

Note : 避妊雌群では血清 E2 と NTx に相関は認められなかった。未避妊雌群で弱い相関 ($r=0.36$) が認められた。

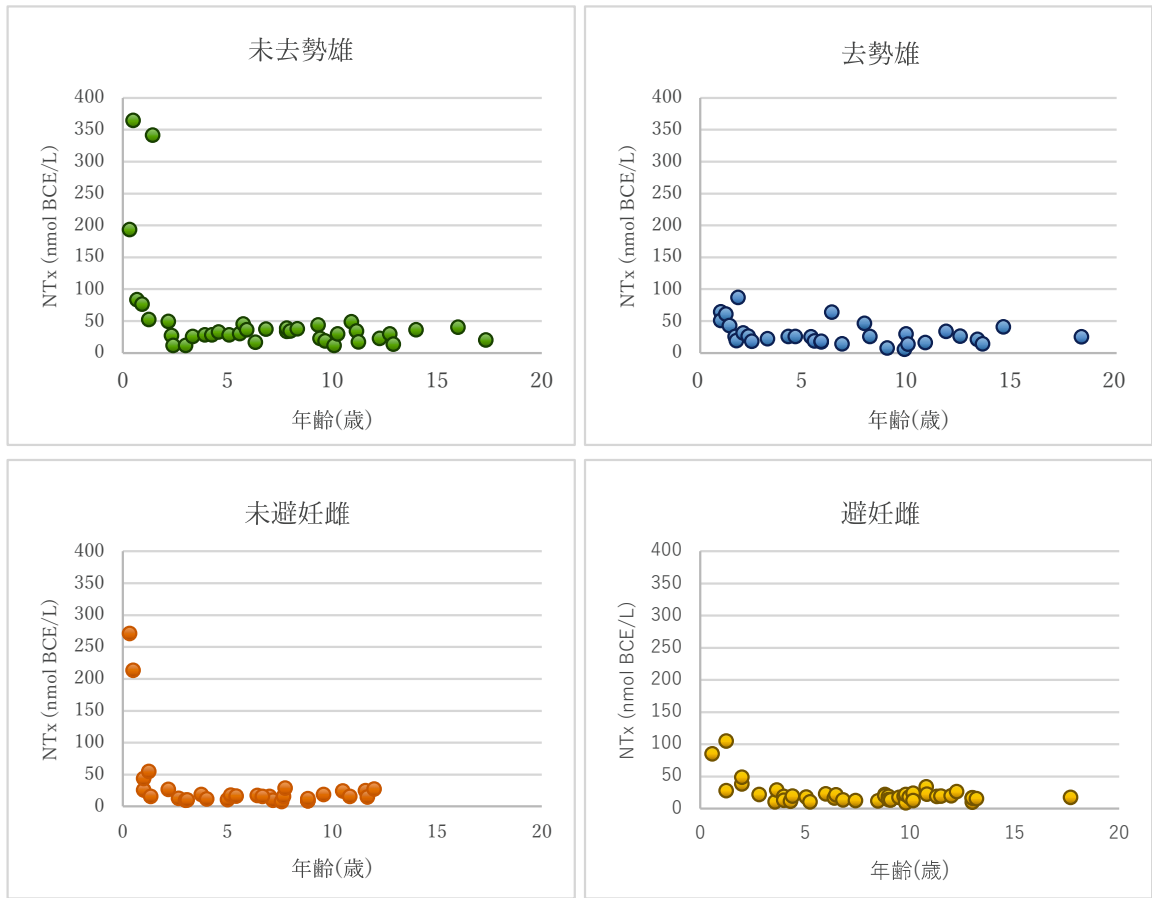


図 2-1 各群の年齢と血清 NTx 濃度の関係

Note : いずれの群でも 0 歳から 2 歳までは低下傾向にあり、2 歳以降は一定値になる傾向が認められた。

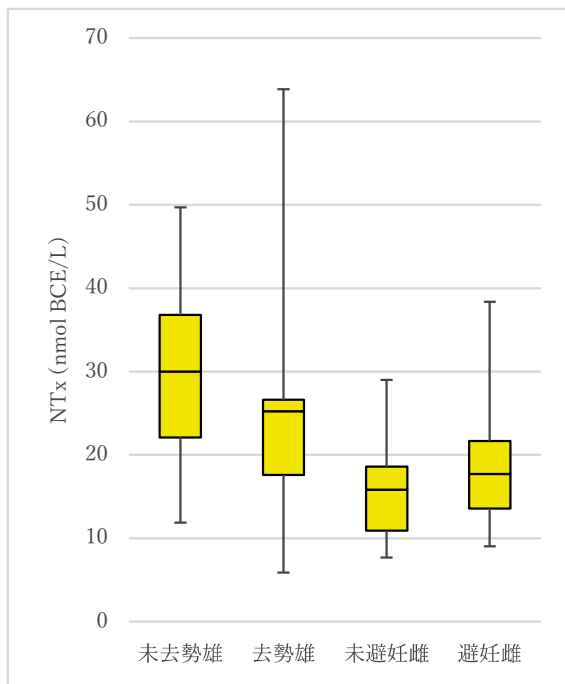


図 2-2 成-老犬コホート (>2 歳) における血清 NTx 濃度の箱ひげ図 (未去勢雄、去勢雄、未避妊雌、避妊雌)

Note : 血清 NTx 濃度は、4 群間に有意差が認められ (Kruskall-Wallis 検定)、未去勢雄、去勢雄、未避妊雌、避妊雌の順に高かった。未去勢雄は去勢雄よりも血清 NTx 濃度が有意に高かったが、未避妊雌と避妊雌の間に有意差は認められなかった。統計には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

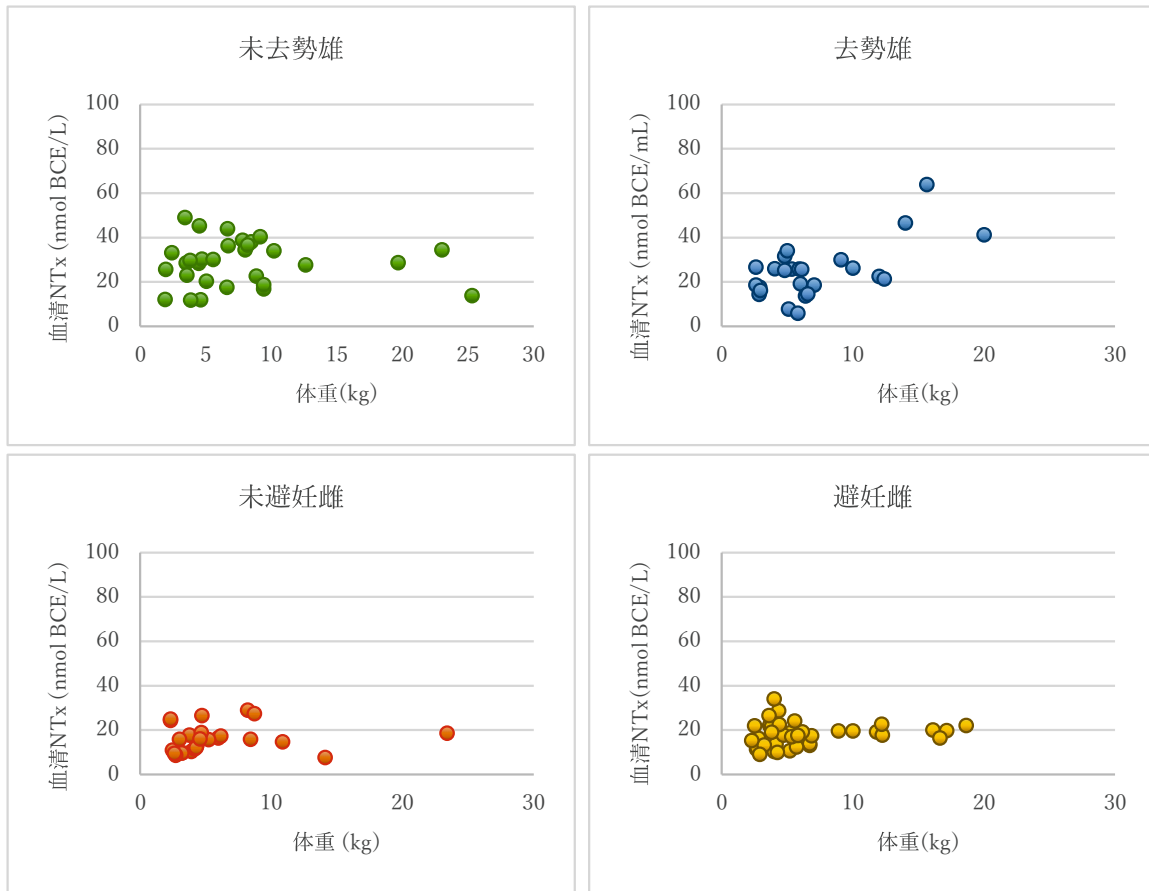


図 2-3 成-老犬コホート (>2 歳) における体重と血清 NTx 濃度の関係

Note: いずれの群でも体重と血清 NTx 濃度に有意な相関は認められなかった。ただし体重の分布が 10 kg 以下に偏っているため、体重のバリエーションを増やした上で再検討が必要と考えられる。

表 1 -1

	年齢 (歳)	OHE からの 経過時間(月)	品種
避妊雌 n=56	7.71±3.86 (0.58~17.58) 中央値: 8.21	64.44±49.11 (1.00~187.00) 中央値: 56.00 *不明: 9 頭	ミニチュアダックスフント, 柴犬, チワワ, トイプードル, ゴールデンレトリバー, ラブラドルレトリバー, ミニチュアシユナウザー, マルチーズ, パセットハウンド, ヨークシャーテリア, 雑種
未避妊雌 n=43	5.95±3.85 (0.33~12.91) 中央値: 5.58		ミニチュアダックスフント, 柴犬, チワワ, トイプードル, ゴールデンレトリバー, ラブラドルレトリバー, オーストラリアンホワイトシェパード, ビーグル, ウェルシュコーギー, ヨークシャーテリア, ボーダーコリー, アメリカンコッカースパニエル, シーズー, 雑種

第一章における供試動物データ

Note : 年齢 (単位は歳) および、卵巣子宮摘出手術 (OHE) からの経過時間 (単位は月)

は平均値±標準偏差 (最小値-最大値) で記載した。

表 1-2

	血清 E2 濃度 (pg/mL)	血清 NTx 濃度 (nmol BCE/L)	血清 CTK 濃度 (pg/mL)
避妊雌(n=56) 年齢：7.71±3.86 (0.58~17.58) 中央値：8.83	n=56 13.14±19.96 (1.00~89.10) 中央値：4.30 <u>27 頭：<5pg/mL</u>	n=44 22.68±17.85 (9.03~105.03) 中央値: 18.89	n=12 *13.66 (チワワ, 1 歳)
	未避妊雌 (n=43) 年齢：5.95±3.85 (0.33~12.91) 中央値：5.58	n=43 11.31±16.77 (1.00~92.0) 中央値：4.60 <u>24 頭：<5pg/mL</u>	n=31 33.16±57.28 (7.69~271.48) 中央値: 15.98

第一章の供試動物データ

Note：年齢および血清 NTx 濃度は平均値±標準偏差（最小値~最大値）で表記した。血清 E2 濃度測定に用いた ELISA キットの信頼限界は 5pg/mL であったが、避妊雌で 27 頭、未避妊雌で 24 頭が 5pg/mL を下回っていた。

表 2-1

	未去勢雄	去勢雄	未避妊雌	避妊雌
数 (頭)	38	32	31	44
年齢 (歳)	7.00±4.59 (0.33-17.33)	6.70±4.71 (1.00-18.33)	5.89±3.66 (0.33-12.00)	7.90±3.9 (0.58-17.70)
体重 (kg)	7.34±5.38 (1.9-25.3)	7.41±6.28 (2.20-32.55)	6.56±5.05 (2.3-23.4)	6.73±4.55 (2.3-18.65)
犬種	ミニチュアダックスフント(11), トイプードル(6), チワワ(3), 柴犬(2), ウェルシュコーギー(2), ラブラドルレトリバー(1), ヨークシャーテリア(1), ブルドッグ(1), アメリカンコッカースパニエル(1), ミニチュアシュナウザー(1), パピヨン(1), ビーグル(1), シーズー(1), キャバリアキングチャールズスパニエル(1), ベキニーズ(1), 雑種(5).	ミニチュアダックスフント(6), チワワ(5), トイプードル(3), ヨークシャーテリア(2), フレンチブルドッグ(1), シーズー(1), ウェルシュコーギー(1), ポメラニアン(1), パピヨン(1), トイマンチエスターテリア(1), ブルテリア(1), オールドイングリッシュシープドッグ(1), 雑種(8)	チワワ(8), トイプードル(5), シーズー(3), ミニチュアダックスフント(2), ビーグル(2), ヨークシャーテリア(2), 柴犬(1), ゴールデンレトリバー(1), オーストラリアンホワイトシェパード(1), ウェルシュコーギー(1), ボーダーコリー(1), アメリカンコッカースパニエル(1), 雑種(4).	トイプードル(10), ミニチュアダックスフント(7), チワワ(6), 柴犬(5), パセットハウンド(2), ゴールデンレトリバー(1), ラブラドルレトリバー(1), ヨークシャーテリア(1), 雑種(11).

第二章の供試動物データ

Note : 年齢および体重は平均値±標準偏差 (最小値-最大値) で表した。各群の犬種名および

カッコ内には各犬種の頭数を記した。

表 2-2

		頭数	平均値	標準偏差	最大値	最小値	中央値
未去勢雄	全体	38	54.29	77.58	364.62	11.87	33.64
	≤2 歳	6	185.50	138.93	364.62	52.42	138.78
	>2 歳	32	26.69	10.70	49.69	11.87	30.00
去勢雄	全体	32	30.36	18.42	87.04	5.88	25.78
	≤2 歳	7	50.33	23.34	87.04	19.50	51.15
	>2 歳	25	24.77	12.37	63.88	5.88	25.23
未避妊雌	全体	31	33.16	57.28	271.48	7.69	15.98
	≤2 歳	6	104.21	109.51	271.48	15.92	49.34
	>2 歳	25	16.11	6.22	28.99	7.69	15.83
避妊雌	全体	44	22.68	17.85	105.03	9.03	18.89
	≤2 歳	4	66.68	34.91	105.03	27.71	66.98
	>2 歳	40	18.28	6.25	38.35	9.03	17.73

血清 NTx 値（各群の全体、≤2 歳、>2 歳）

Note：単位は nmol BCE/L。いずれの群でも 2 歳以下が 2 歳より上の個体の血清 NTx 濃度よりも高かった。統計には Mann-Whitney の U 検定を用いた。避妊雌の群では、2 歳以下の個体数が 4 頭であったことから、統計は行っていない。

(Summary)

**A basic study on the mechanism of serum bone metabolism in healthy dogs—
relationships between individual factors and bone metabolic markers**

By

Fumi YAMAGUCHI

Osteoporosis is a systemic disease characterized by decreased bone mass and changes in the microstructure of bone. It can be divided into primary and secondary osteoporosis, and is caused by a range of diseases, nutritional problems, and some drugs.

Postmenopausal osteoporosis in women is one of the primary forms of osteoporosis, and is associated with a decrease in estradiol (E2) due to menopause, which weakens osteoclast inhibition and increases bone metabolic turnover, leading to a decrease in bone density and quality. Rats and rabbits have been used as animal models of postmenopausal osteoporosis because they exhibit a state of high bone metabolic turnover and reduced bone mass or bone mineral density after ovariectomy.

Dogs have been considered a useful animal model in bone research because of their similarity to humans in terms of bone composition and their dependence on remodeling for

bone metabolism after the growth phase. However, clinically, there are no reports of loss of bone mass or bone density, in neutered or elderly dogs. Furthermore, difficulties in obtaining samples from healthy male and female dogs may explain the current lack of knowledge about canine bone metabolism. In order to elucidate whether and how bone metabolism is affected by sterilization and aging, it is essential to obtain basic data from healthy dogs of a wide age range, free from the effects of diseases and medication.

Accordingly, as the primary objective of this study, we set out to investigate the effects of sex, age, and sterilization on bone metabolism in healthy dogs. We used serum from 169 clinically healthy dogs (99 females and 70 males) to compare the relationship between individual factors such as age, and serum sex hormone concentrations and markers of bone metabolism. My research comprised two chapters, one that focused on serum E2 levels and bone resorption markers in female dogs (Chapter I), and another that focused on factors affecting marker a bone resorption marker in male and female dogs (Chapter II).

In Chapter I, I targeted E2, type I collagen cross-linked N-telopeptide (NTx; a bone resorption marker), and cathepsin K (CTK; a cysteine protease secreted by osteoclasts) for quantification in sera from 43 intact females and 56 neutered female. Each item was compared between intact and neutered female dogs, and the relationships with age and time since ovariectomy were analyzed.

I found that neither serum E2 nor NTx concentration differed significantly between intact and neutered females, and CTK was below the lower limit of measurement in most of the samples from both intact and neutered female dogs.

Neither serum E2 nor NTx concentration correlated with age or time since sterilization. Serum E2 concentration and NTx concentration were weakly correlated in sterilized females.

These results suggest that sterilization has no effect on serum E2 or NTx concentrations in female dogs, and may reflect what appears to be a natural phenomenon in the canine reproductive cycle. This cycle lasts about six to 10 months, and E2 concentrations are high only during the early estrus and estrus phases, which account for two months of the cycle. Thus, female dogs experience prolonged periods of low E2 levels; if these low E2 levels caused higher bone metabolic turnover, as is the case in women, female dogs would then develop forms of osteopenia detrimental to their survival. Furthermore, since female dogs do not experience a menopause (humans are one of the few terrestrial mammals that do), I consider that species differences in the relationship between sex hormones and bone metabolism are an important area for future studies.

In Chapter 2, I discuss the effect of sex hormones on serum NTx concentrations as shown in comparisons of serum NTx concentration in four groups of dogs of various ages: intact males, neutered males, intact females, and neutered females. I also analyzed the relationship

between NTx and age, body weight, and blood biochemical parameters.

I found that the serum NTx concentrations in all four groups followed a similar pattern. This pattern for serum NTx consisted of an early peak followed by a steep, age-related decline which bottomed out by the age of two years, and subsequently constant levels through the maximum age in this study population. Therefore, I divided the study population into two age cohorts for statistical analysis comparing intact and neutered dogs: the juvenile-to-infant cohort (≤ 2 years of age) and the adult-to-geriatric cohort (> 2 years of age).

In the adult-to-geriatric cohort, serum NTx concentrations were highest in intact males, followed by neutered males, intact females, and neutered females, and there was no significant difference between intact and neutered females. Furthermore, serum NTx showed no correlation with age in this cohort, and the only correlation observed between serum ALP and NTx concentration was a weak one, in the neutered female dogs.

These results suggest that canine bone metabolism changes during the growth period up to about two years of age, after which it stabilizes. The effect of sterilization on bone metabolism during growth in the juvenile dogs remains unclear and is a subject for future study.

Furthermore, serum NTx significantly differed between intact and neutered males, but not females, which may suggest that male sex hormones may affect bone metabolism, unlike E2.

Female dogs may not be a suitable animal model for bone research associated with E2

deficiency states in women, whereas male dogs may be a potential animal model for bone loss associated with hypogonadism in men.

The present study, with its unprecedentedly wide age range and large number of samples, has created a unique opportunity to investigate the relationship between bone metabolism and sex hormone variation in dogs.