

ビニルシクロヘキサジオキシド投与マウスモデルを用いた骨粗鬆症への運動効果

眞下 葵¹⁾, 押田 竜河¹⁾, 川端 空¹⁾, 高須 千晴¹⁾,
二瓶 孝太¹⁾, 曾根 賢太¹⁾, 岡 優一郎²⁾,
須永康代³⁾, 金村 尚彦³⁾, 村田 健児^{3)*}

要旨：【目的】化学物質 4-ビニルシクロヘキサジオキシド（VCD）を投与して緩徐な卵巣機能低下を誘発するマウスモデルを用い、骨粗鬆症の発症と長期間の中等度運動による骨への影響を検証した。【方法】5週齢のICR雌性マウスにVCDまたは胡麻油を投与し、運動介入群（VCD + Ex）と非運動群（VCD）、偽注射群（SHAM）に分けて16週間のトレッドミル走行を実施した。解析は、骨体積密度、骨破断強度、皮質骨を組織学で検証した。【結果】VCD群では骨体積密度と力学強度が有意に低下し、皮質骨厚に大きな変化がないにもかかわらず骨の脆弱性が誘導された。一方、運動介入による骨体積密度や破断強度の改善は認められなかった。【結論】VCDモデルはエストロゲン低下に伴う骨脆弱性を再現し得る一方、設定した運動条件では骨体積密度の改善が得られなかった。今後は骨質評価や運動プロトコルのさらなる検討が必要である。

キーワード：ビニルシクロヘキサジオキシド, マウスモデル, 運動, 骨

はじめに

骨粗鬆症は、日本国内で約1,280万人が罹患していると推定され¹⁾、50歳台と比較して80歳台では、男性は約2倍、女性では約14倍も発症率が増加する。その病態は、骨吸収が骨形成を上回ることによってリモデリング機構の崩壊からはじまり、骨密度の低下に伴う骨の力学的脆弱化を特徴とする。本病態の発症には、老化に加えて、低栄養に伴うビタミンDの減少や低活動に伴う骨への機械的ストレス減少などの多因子が複雑に関与しているが、なかでも女性は男性よりも罹患率が高く、性差は重要な発症因子の1つである。実際、Binxiangらは、世界22の地域すべてにおいて男性よりも女性に好発すると報告している²⁾。

骨粗鬆症において、女性の発症率が高い背景に、閉経に伴うエストラジオール（Estradiol：以下、E2）の低下が大きく関与している。視床下部から分泌されるゴナドトロピン放出ホルモンが、下垂体を刺激することで黄体形成ホルモン（Luteinizing Hormone：LH）や卵胞刺激ホルモン（Follicle-Stimulating Hormone：FSH）を分泌させ、これらのホルモンによって卵巣内に存在する卵胞のうち成熟したものからE2が分泌される。この視床下部-下垂体-卵巣軸が機能することで分泌量を調節している女性ホルモンであるが、閉経期には卵巣内の卵胞が減少・消失することで卵巣機能の低下が原因となり、E2やプロゲステロンの分泌は著しく減少する。

このような骨粗鬆症の病態や付随する治療方法の開発において、閉経期間中のホルモン変動を再現するラットやマウスなどの齧歯モデルは不可欠となっている。しかしながら、齧歯類の自然閉経では60～70%の個体が持続的なE2の高値を示し、ホルモン変動に個体差を示すため、閉経を実験的に誘導する必要がある³⁾。その手法として外科的手法（卵巣摘出、Ovariectomized：以下、OVX）、および化学的手法（4-ビニルシクロヘキサジオキシド、4-Vinylcyclohexene dioxide：以下、VCD）が報告されてお

1) 埼玉県立大学大学院保健医療福祉学研究所
(〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮820)

2) 北海道大学大学院保健科学研究院

3) 埼玉県立大学保健医療福祉学部理学療学科

受付日：2025年3月7日

受理日：2025年9月22日

* E-mail: murata-kenji@spu.ac.jp

り、骨粗鬆症の再現にも用いられている⁴⁾⁵⁾。これまで卵巣を摘出する OVX モデルが広く使用されてきたが⁴⁾、OVX モデルには、視床下部-下垂体-卵巣軸の機能が排除され、自然な生殖加齢に伴うフィードバック機構の適応が正常でないことが問題視され、人間の自然な閉経環境から逸脱することが課題となっている。一方、この課題を解決する VCD モデルは、PI3K/AKT シグナル経路の抑制⁶⁻⁹⁾によって、原始・一次卵巣を標的にアポトーシスを誘導する。これにより、二次卵巣以降の成長を妨げることなく、原始・一次卵巣の枯渇を生じさせ、緩徐な卵巣減少を可能にしている。さらに、VCD モデルは、外科的侵襲を伴わないモデルであり、OVX では再現できなかった E2 の緩徐な低下に加え、卵巣組織の保存によってアンドロゲンの産生能力が残存している¹⁰⁾。

これらの背景から、VCD モデルは OVX モデルと比較して、ヒト閉経を再現し、骨粗鬆症の原因や予防法の開発に適したモデルであるといえる。特に、本モデルを利用することによって、閉経期を再現した女性ホルモン変化に並行した運動効果の検証が可能となる。一般的に、骨粗鬆症の予防策として運動が推奨される背景には、運動によって骨に機械的負荷がかかり、骨形成が促進される一方、骨吸収が抑制されるメカニズムがあると考えられている。しかし、閉経期に伴うホルモン変化による骨量減少と、低活動に伴う骨への機械的ストレス低下による骨量減少が、それぞれ独立した要因であるのかどうかは解明されていない。本研究では、1) VCD モデルを利用した骨粗鬆症発症を誘発できるか検証し、2) 閉経期における長期間の運動効果を調査することを目的とした。

対象および方法

1. 実験計画ならびに動物実験倫理

埼玉県立大学実験動物倫理委員会の承認（承認番号：2023-12）後、動物実験実施計画書にしたがい、実験を遂行した。実験に際して、使用動物数は最小限にとどめ、ARRIVE ガイドラインの項目にしたがって、実施した。

2. 対象と研究デザイン

5 週齢の ICR 雌性マウス（三協ラボサービス株式会社、東京、日本）31 匹（平均体重 29.5 ± 1.43 g）を対象とした。マウスは吸入麻酔下で VCD（シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京、日本）の投与ならびに胡麻油（ナカライテスク株式会社、京都、日本）のいずれかを投与された。15 日間の投与終了後、VCD が投与されたマウスは、運動群（VCD + Ex, n=10）と非運動群（VCD, n=10）、胡麻油を投与した偽注射群（SHAM, n=11）に分類された。

飼育環境は、明暗サイクル 12 時間（点灯時間：午前 7 時から午後 7 時まで）、温度 23°C、湿度 55% の条件設定された動物実験施設で飼育した。プラスチック製のケージ内に床敷ペーパークリーン（日本エスエルシー株式会社、静岡、日本）を敷き詰め、1 ケージ毎に 3 匹あるいは 2 匹で飼育

した。固形飼料 CLEA Rodent Diet CE-2（日本クレア株式会社、東京、日本）や水は自由摂取できる環境で飼育した。すべての群は、VCD 投与開始から 5 ヶ月後で実体顕微鏡による骨形態評価、力学強度試験、マイクロ CT 測定による骨形態評価、骨の組織学的解析を行った。

3. VCD マウスモデルの作成

実験動物に 160 mg/kg（2.5 ml/kg 体重）の濃度で投与するため、VCD を胡麻油で 6% の濃度に希釈した。SF-487 実験動物用イソフルラン麻酔装置（株式会社シンファクトリー、福岡、日本）を用いて、イソフルラン（富士フィルム和光純薬株式会社、東京、日本）による吸入麻酔を行った。投与毎に、体重を測定し、 $\text{体重 (g)} / 1000 \text{ g} \times 2.5 \text{ ml/kg} = \text{注射液量 (ml)}$ を決定、マイクロシリンジを利用して、VCD 群ならびに VCD + Ex 群には、VCD 溶液をマウスの背側頸部に皮下注射を行った。SHAM 群には胡麻油を同様の手順で皮下注射した。週 5 日投与し、2 日休息の合計 15 日間を 3 週間かけて投与した。

なお、本研究で用いた VCD の皮下投与方法は、実験動物における卵巣毒性の誘導手法として広く用いられており、特に原始卵巣および一次卵巣に選択的なアポトーシスを誘導することが複数の研究で報告されている。これらの影響はレビュー論文でも取り上げられており、VCD が卵巣予備能を選択的に低下させるモデルとして一般的に認知されている³⁾¹⁰⁾¹¹⁾。また、3 週間の投与終了後に追加で VCD を投与する必要はない。

4. 運動プロトコル

中等度の運動強度を決定するため、マウスの最大速度を測定した。傾斜 0%、6 m/min の速度で 3 分間走らせ、3 分毎に 3 m/min ずつ速度を増加させた。3 分間維持できた速度を最大速度とし、その 60% の速度を本研究における中等度の強度として設定した。トレッドミル環境への適応として運動開始以前に 1 日の馴化日を設けた。プロトコルは速度 14 m/min、時間 60 min、週 5 日行った。運動開始は、VCD 投与終了から 6 週間後とし、4 ヶ月間継続した。なお、今回設定した運動プロトコルは、先行研究を参考に用いた¹²⁾。

5. 大腿骨の形態測定

VCD 投与開始から 5 ヶ月後（運動開始 4 ヶ月後）に骨断面積測定のため、左大腿骨を採取した。周囲の軟部組織をすべてトリミングし、ワンショット 3D 形状測定機 VR-6000 シリーズ（株式会社キーエンス、東京、日本）に、大腿骨を固定し、360°撮影した。解析には VL-700 シリーズのアプリケーションを使用し、測定データを読み込ませた。間引き率は 1/2 に設定し、大腿骨の基準面を決定した。大腿骨骨頭から全長の 1/4, 1/2, 3/4 の位置で断面積 (mm²) を測定し、平均値を算出した。

6. 大腿骨の力学強度試験

VCD 投与開始から5ヵ月後（運動開始4ヵ月後）に力学強度試験のため、右大腿骨を採取した。周囲の軟部組織をすべてトリミングし、引張強度試験機 UniVert（オレンジサイエンス株式会社，神奈川，日本）に、大腿骨の midpoint が荷重点になるように固定した。各試験サンプルに 0.5 N の予荷重から一軸荷重（5 mm/min）で右大腿骨を破断させた際の最大破断強度を記録した。

7. マイクロ CT 解析による大腿骨の構造分析

骨構造解析は、マイクロ CT X 線装置である Skyscan 1272（ブルカー・ジャパン株式会社，神奈川，日本）を使用し、2D および 3D の形態計測を行った。画像パラメータは、10 μm の解像度で、露光時間 100 msec および電圧 100 kV、電流 100 μA にて 180° の撮像を行った。フィルターには 1 mm 厚のアルミニウムフィルターを使用してスキャンを行い、1024×820 ピクセルの画像を 300 枚作成した。三次元画像は、NRecon ソフトウェア（Bruker, USA）を使用して、標準的なポストアライメント補正アルゴリズムを用いて最適化後、スムージングフィルターにて処理され、アーチファクト補正を行うことで再構成された。

解析は、大腿骨骨頭中央における 10 枚スライス ROI に設定し、画像は 0 から 255 までのスケールを用いてグレースケールに変換された。これらの値は、ROI 内に位置する海綿骨構造の視覚化に基づいて 2 値化され、セグメント化された骨量（Bone volume：以下、BV）の骨組織体積（Tissue volume：以下、TV）に対する比（BV/TV）を表す骨体積密度を算出した。なお、骨量低下を示すパラメータには骨密度が挙げられる。こちらは、単位面積あたりの骨のミネラル（主にカルシウム）の量を測定しており、主に DXA でよく測定される。今回測定した骨体積密度は、ある一定の体積に占める骨の体積の割合を示し、主にマイクロ CT や組織学的解析など、立体的に骨を捉える方法で用いられる。骨体積密度は、マイクロ CT を用いた微細構造解析によって、三次元的かつ局所的な骨量の変化をより高精度に捉えられ、特に小動物モデルにおける微細な骨構造の評価には適していると判断したため採用した。

8. 組織学的解析

採取した左脛骨をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（富士フィルム和光純薬株式会社，東京，日本）で 4°C、24 時間浸漬固定した。固定後は、脱灰液 B（EDTA 処方）（富士フィルム和光純薬株式会社，東京，日本）を用いて、室温、7 日間の脱灰期間を設けた後、パラフィン包埋した。包埋組織は、リトラトーム YAMATO REM-700（大和光機工業株式会社，埼玉，日本）を用いて、脛骨全長が切片になるまで切り出し、厚さ 8 μm 、矢状断で薄切し、切片を作製した。切片は 1 スライドガラスにつき 2 枚とした。これらをヘマトキシリン・エオジンで染色した。

9. 統計解析

得られた各データに対して、R version 4.3.3 を用いて、Shapiro-Wilk 検定により正規性の検定、等分散の検定（Levene の検定）を行った後、力学強度、形態測定、マイクロ CT、そして組織学の結果は 3 群比較のため一元配置分散分析を実施、SHAM 群と VCD 群、VCD 群と VCD + Ex 群、SHAM 群と VCD + Ex 群の比較に対する後検定は、t 検定を用いて比較し、Bonferroni による補正をした。なお、すべての統計解析において有意確率は 5% とした。

結 果

- VCD マウスに対しては、運動は骨断面積を低下させる
VCD 群は 3 匹が投与期間中に死亡し、VCD + Ex (n=10) と VCD (n=7)、SHAM (n=11) の合計 28 匹にて解析を進めた。3 群における体重については、投与期間中ならびに組織採取日に統計学的有意差を認めなかった。骨断面積について、VCD マウスモデルにおける 16 週の運動介入を行った VCD + Ex 群は、骨断面積を有意に低下させた (vs SHAM, $p = 0.012$; vs VCD, $p = 0.042$)。SHAM 群と VCD 群の間に有意な差はなかった ($p = 0.647$) (図 1)。
- VCD は骨強度を低下させるが、運動によって改善しない
VCD マウスモデルは、SHAM 群と比較して大腿骨の力学強度を有意に低下させた ($p = 0.048$)。しかし、VCD + Ex 群は、他の 2 群に対して有意な差は示さず運動による改善効果を認めなかった (vs SHAM, $p = 0.319$; vs VCD, $p = 0.122$) (図 2)。
- VCD は骨体積密度を低下させるが、運動によって改善しない
左大腿骨骨頭における骨体積密度は、SHAM 群と比較して VCD 群 (vs SHAM, $p = 0.038$) と VCD + Ex 群 (vs SHAM, $p = 0.043$) では骨体積密度が有意に低下した。しかし、VCD 群と VCD + Ex 群との間に有意な差はなかった ($p = 0.890$) (図 3)。
- 運動介入は皮質骨の厚さを低下させる
HE 染色画像から脛骨皮質骨は、SHAM 群と VCD 群の間に有意な差はなかった ($p = 0.802$) が、VCD + Ex 群は、他の 2 群と比較して有意に皮質骨の厚さが低下 (vs SHAM, $p < 0.001$; vs VCD, $p < 0.001$) した (図 4)。

考 察

- 若齢マウスにおける VCD の投与は骨の脆弱性を誘導する
本研究では、VCD マウスモデルが骨の脆弱性を誘導するか検証した。結果、VCD 群と VCD + Ex 群は、胡麻油を投与した SHAM 群と比較して、有意に骨体積密度が低下した。VCD モデルを利用した Wright ら¹³⁾ と Reinwald ら¹⁴⁾ は、大腿骨遠位部の骨密度に変化がないと報告して

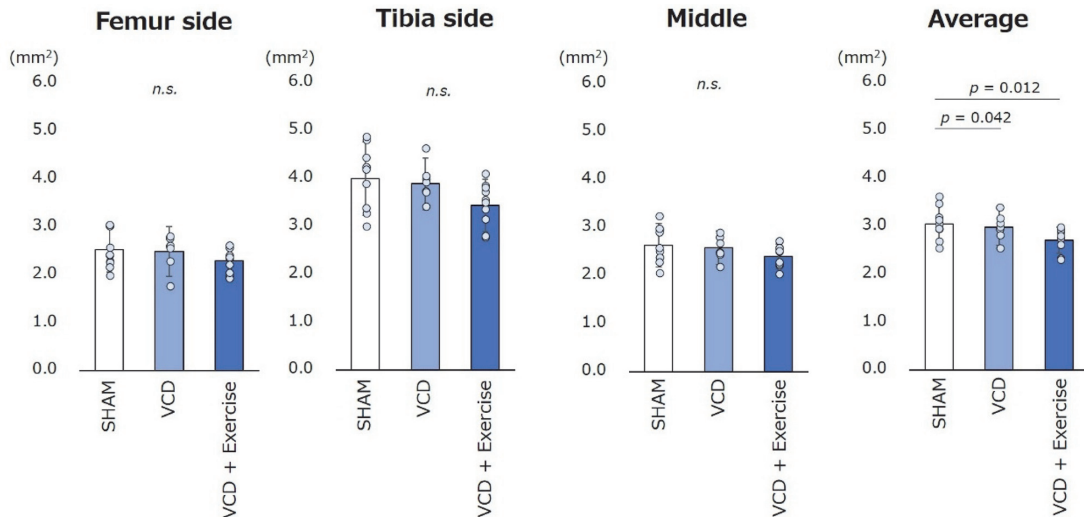


図1 左大腿骨の骨断面積の結果
 投与開始から5ヵ月後における左大腿骨の断面積を測定した結果を示す。骨断面積の平均は、SHAM群3.1 mm²、VCD群3.0 mm²、VCD + Ex群2.7 mm²であった。VCD + Ex群は、他の2群と比較して有意に骨断面積が低下 (vs SHAM, $p = 0.012$; vs VCD, $p = 0.042$) した。

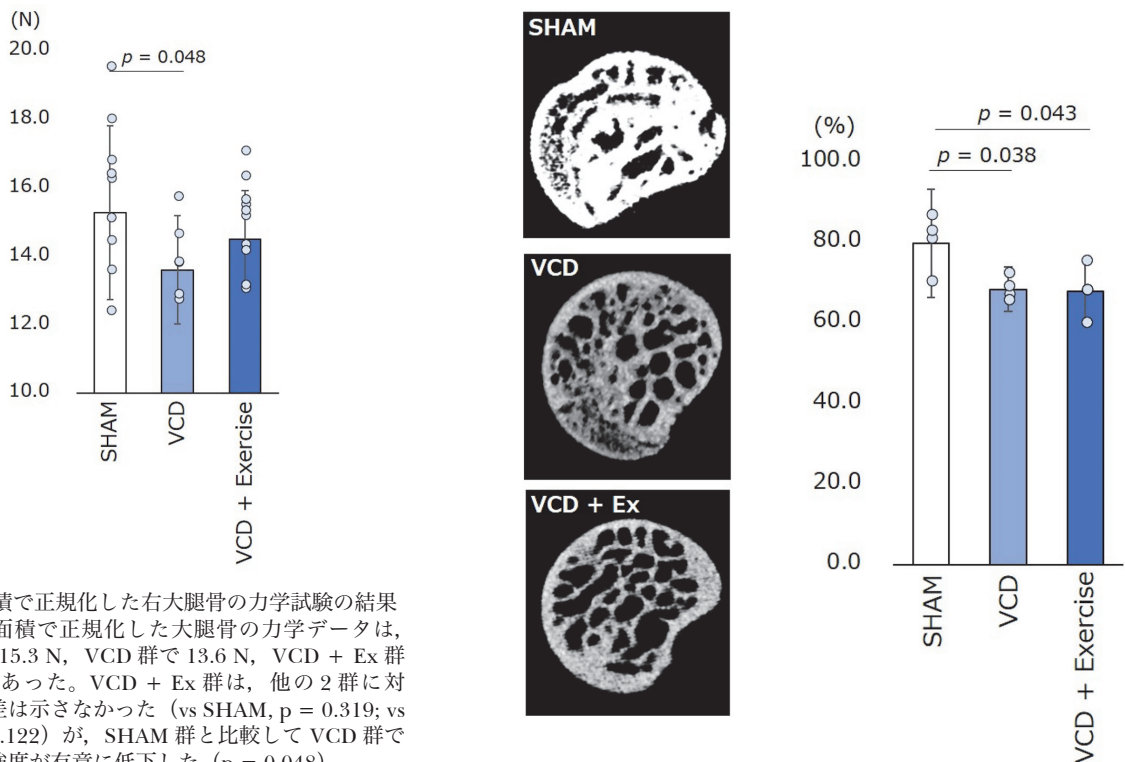


図2 断面積で正規化した右大腿骨の力学試験の結果
 実測値を断面積で正規化した大腿骨の力学データは、SHAM群で15.3 N、VCD群で13.6 N、VCD + Ex群で14.5 Nであった。VCD + Ex群は、他の2群に対して有意な差は示さなかった (vs SHAM, $p = 0.319$; vs VCD, $p = 0.122$) が、SHAM群と比較してVCD群では最大破断強度が有意に低下した ($p = 0.048$)。

図3 マイクロCTによる左大腿骨骨頭の骨体積密度の結果
 投与開始から5ヵ月後における左大腿骨骨頭における骨体積密度を測定した結果を示す。CT画像は、大腿骨骨頭中央における10枚スライスをROIに設定し、水平方向へのスライスで画像を作成した。大腿骨頭中央部骨体積密度の平均は、SHAM群で79.8%、VCD群で68.4%、VCD + Ex群で67.7%であった。VCD群とVCD + Ex群との間に有意な差はなかった ($p = 0.89$) が、SHAM群と比較してVCD群 (vs SHAM, $p = 0.038$) とVCD + Ex群 (vs SHAM, $p = 0.043$) では骨体積密度が有意に低下した。

いる一方、Lukefahrら¹⁵⁾とCaoら¹⁶⁾は、大腿骨遠位部や脛骨近位部にて骨密度の有意な低下を報告している。本研究では、有意に骨体積密度が低下し、Lukefahrら¹⁵⁾とCaoら¹⁶⁾の先行研究と同様の結果を示した。この1つの要因に使用動物の週齢が関与している可能性がある。骨密度に有意な変化をもたらしたLukefahrら¹⁵⁾とCaoら¹⁶⁾の論文は、生後34日と28日であり若齢を使用しているが、骨密度に有意な変化がないWrightら¹³⁾とReinwaldら¹⁴⁾の論文では、3ヵ月齢と16週齢を使用している。本研究

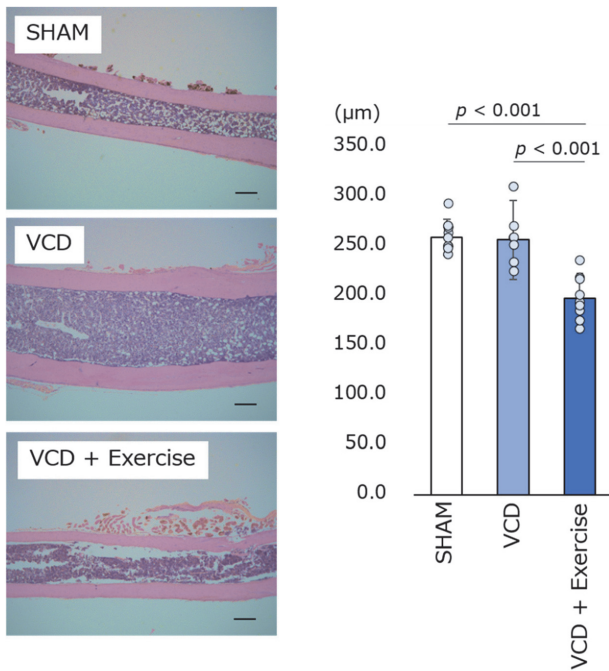


図4 HE染色における左脛骨皮質骨の厚さの測定結果
投与開始から5ヵ月後における左脛骨の皮質骨の厚さをHE染色より測定した結果を示す。左脛骨中央皮質骨の厚さの平均は、SHAM群 259.6 μm 、VCD群 256.7 μm 、VCD + Ex群 197.5 μm であった。SHAM群とVCD群の間に有意な差はなかった ($p = 0.802$) が、VCD + Ex群は、他の2群と比較して有意に骨断面積が低下 (vs SHAM, $p < 0.001$; vs VCD, $p < 0.001$) した。スケールバーはすべて300 μm を示す。

で用いたのは、5週齢のマウスであり、若齢を使用した Lukefahrら¹⁵⁾とCaoら¹⁶⁾の先行研究と類似した週齢であった。

骨密度を変化させるメカニズムとして、正常な骨は、Wnt/ β -カテニンシグナル経路の活性によって骨形成が促進される。破骨細胞では、核因子 κB 受容体活性化因子 (Receptor Activator of Nuclear Factor- κB : RANK) が発現しており、核因子 κB 受容体活性化因子リガンド (Receptor Activator of Nuclear Factor- κB Ligand: 以下、RANKL) と結合することで骨吸収が促進され、オステオプロテゲリン (Osteoprotegerin: 以下、OPG) と結合することで骨吸収が抑制される。VCDマウスモデルのメタ分析では、有意にE2を減少させること¹⁷⁾が示されており、WuらはE2の減少によってWnt3aの発現を抑制することでWnt/ β -カテニンシグナル経路を抑制することを示した¹⁸⁾。また、Chengらは、OPGの抑制とRANKLの促進によって骨吸収を促進すること¹⁹⁾を報告した。これらのメカニズムは骨形成が盛んな若年齢で活性化され、骨の成長に重要な役割を果たしている。骨密度に有意な変化がないWrightら¹³⁾とReinwaldら¹⁴⁾の論文では、骨の成長がある程度成熟し、VCDの効果が低下している可能性があり、本研究では、週齢の類似するLukefahrら¹⁵⁾とCaoら¹⁶⁾の論文のVCDマウスモデルと同様に骨の脆弱性が誘導されたと推察される。

また、本研究において、VCDマウスモデルは3点曲げ

試験において、力学強度の有意な低下を示した。3点曲げ試験は長管骨の中間部で行われるため、主に皮質骨の力学強度を反映するが、本研究ではVCD投与による皮質骨厚の変化は確認されなかった。Reinwaldら¹⁴⁾はVCD投与が大腿骨の皮質骨厚や骨密度、大腿骨および脛骨の最大破断強度に及ぼす影響は有意でないことを報告している。上述した骨密度の知見を踏まえると、本研究において皮質骨厚に変化がみられなかったにもかかわらず力学強度が低下したのは、骨体積密度の低下が一因になったと推察される。すなわち、VCDは外形的な骨の厚さを維持しながら、骨内部の微細構造 (骨梁など) や骨組織自体の占める体積を減少させ、骨強度を低下させると考えられる。

しかし、本研究においては、VCDの毒性自体が、直接骨へ影響を及ぼしたかについて、検証は難しい。Mayerらは、15日間の投与では卵胞以外の組織への影響はない²⁰⁾と報告していることから、VCD投与によって生じたホルモン変化が引き起こした可能性が高い。しかしながら、VCD投与によるホルモン経過を計測していない点が本研究の限界の1つである。

2. VCDによる骨体積密度の低下は運動介入によって改善しない

第2の目的として、VCDマウスモデルを用いた運動が骨に及ぼす影響を検証した。しかしながら、VCDによって低下した骨体積密度が運動によって改善されることはなかった。先行研究では、OVXモデルで低下した骨体積密度は運動介入によって有意に改善すると報告されている²¹⁾。骨強度は、骨密度と骨質によって構成されるが、骨質は骨リモデリングとは独立した要因とされており、たとえ骨密度が正常値でも、骨質が悪化すると力学強度は低下するとされる²²⁾。一方で、運動によって骨質が改善するとする報告もあり²³⁾、本研究でVCD + Ex群がSHAM群と同程度の力学強度を維持できた要因の1つとして、運動による骨質の強化が考えられる。骨質は骨の微細構造やコラーゲンの架橋、ミネラル結晶の配列など多面的に構成されることが知られており、骨体積密度だけでは捉えきれない骨力学的特性に影響を及ぼす重要な因子であることを認識する必要がある。今後は、骨体積密度だけでなく骨質にも注目した詳細な解析として「ペントシジン」という物質をラマン分光法や高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いることで、運動が骨の微細構造や材料特性に及ぼすメカニズムの解明が期待される。

一方、VCD + Ex群では皮質骨の厚さが低下した。しかし、Bonnetら²⁴⁾はOVXモデルを用いた実験で、13 m/minの速度で60分間、週5日のトレーニングを9週間実施したところ、皮質骨の厚さが有意に増加したと報告している。本研究の運動強度 (14 m/min, 60分間, 週5日) はBonnetらの条件と近いと見られ、同様の皮質骨肥厚が起こる可能性もあったと考えられる。しかし、先行研究の介入期間が合計9週間であったのに対し、本研究では16週間というより長期の介入を行った点が結果の相違に大きく影

響した可能性がある。そのため、中等度の強度で短期間実施することが、過度な運動負荷を抑える運動プロトコルになり得る。

以上のことから、VCD 群で低下した骨密度が改善しなかった要因としても、骨質の変化を十分に評価していないことが挙げられる。そのため、骨密度だけでは説明しきれない骨力学特性の変動を捉えきれない点が示唆される。骨質は、骨をしなやかに強くする善玉架橋と無秩序に分子をつなぎとめ、骨を過剰に硬くし、脆くする悪玉老化架橋 (Advanced Glycation End Products: 以下, AGEs) に分類される。AGEs の代表的なものにペントシジンがあり、この物質を測定することで AGEs の過剰形成を確認することができ、骨質の評価を行うことができ、骨強度の構成因子である骨質の評価についても追加検証が必要である。また、運動介入のタイミング・強度・期間などが影響を検討する必要がある。一般に、OVX モデルにおける骨密度の低下は、早くて5週間後に観察され²⁵⁾、VCD マウスモデルにおける骨密度の低下はホルモン低下が緩慢なことから、OVX より遅い。このように、骨密度の低下時期が異なるモデルを用いる場合は、運動開始のタイミングや期間を慎重に設定する必要があることが推察される。また、VCD マウス特有のホルモン動態や骨代謝の変化が、運動による骨形成促進効果を十分に引き出せなかった可能性を考慮する必要がある。

本研究では、VCD による卵巣機能低下モデルや、運動介入の効果に関する今回の結果は、骨代謝のメカニズムを理解するうえで基礎的かつ汎用性の高いものであり、加齢に伴う骨粗鬆症における骨量減少や骨脆弱性の進行にも応用可能であると考えられる。今後は加齢マウスを用いた同様のプロトコルによる検証や、より長期的な観察を行うことで、高齢者に対する介入戦略の一助となる可能性がある。

本研究の限界

本研究にはいくつかの限界がある。1つ目に本研究では骨力学強度が骨密度および骨質の両要素によって構成されることを踏まえつつも、骨粗鬆症による健康被害が主に骨折によって生じる点に着目し、予後に直接影響を及ぼす要因として骨密度の評価を優先的に行った。そのため、骨質に関する詳細な解析は本研究の範囲外となっており、今後は骨質の定量的評価も含めた多角的な検討が必要である。

2つ目に本研究では、運動群 (n=10) および非運動群 (n=10) は1ケージあたり2匹、偽注射群 (n=11) は1ケージのみ3匹で飼育を行った。使用したケージは、実験動物倫理上5匹までの飼育が許容されている仕様であり、飼育密度としては適切な範囲内に収まっている。そのため、ケージ内のマウス数の違いによって極端な栄養摂取量や運動量の差が生じた可能性は低いと考えられる。ただし、飼育匹数の違いが行動や摂食行動に及ぼす影響については本研究では定量的な検証を行っておらず、今後の検討課題として考慮する必要がある。

3つ目に VCD 投与終了後の経過において E2 が確実に低下しているかどうかについては、現時点では明確に断言することは難しい。VCD モデルは E2 が緩やかに低下していく特性をもつため、ホルモン値の推移にも個体差や時間的変動があると考えられる。また、VCD 投与終了後の比較的短期間 (6週間程度) における血中エストラジオール濃度を定量的に評価している報告は、現在のところ多くは見当たらない。そのため、本研究においても E2 が低下している可能性は高いと考えられるが、確実な裏付けを示すデータが不足しているのが現状である。

最後に運動介入前の体重を測定し、運動介入期間中の体重変化を把握することは、運動介入が体重に影響を及ぼしていないことを示すうえで重要であり、本来実施すべきであった。しかしながら、本研究では介入期間中の体重変化について検討することができない。

結 論

VCD マウスモデルは、骨形態に影響を及ぼすことなく、骨体積密度の低下を引き起こし、力学強度の低下を示した。よって、本研究で用いた VCD マウスモデルにおいて骨粗鬆症は誘発された。しかし、VCD によって低下した骨強度は運動介入によって改善を認めなかったことから、VCD 投与に伴うホルモン変化による骨量減少は、運動による骨への機械的ストレスの増加では十分に補えない可能性が示唆された。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) The Japanese Osteoporosis Society. Guidelines for the Prevention and Treatment of Osteoporosis 2015 Edition. Life Science Publishing, Tokyo, 2015.
- 2) Zhu B, Hu S, et al.: Differences in the global exposure, mortality and disability of low bone mineral density between men and women: the underestimated burden in men. BMC Public Health. 2023; 88: 991.
- 3) Kempen TAV, Milner TA, et al.: Accelerated Ovarian Failure: a novel, chemically-induced animal model of menopause. Brain Res. 2011; 1379: 176-187.
- 4) Kalyanaraman H, Ramdani G, et al.: A Novel, Direct NO Donor Regulates Osteoblast and Osteoclast Functions and Increases Bone Mass in Ovariectomized Mice. J Bone Miner Res. 2016; 32(1): 46-59.
- 5) Lukefahr AL, Frye JB, et al.: Decreased Bone Mineral Density in Rats Rendered Follicle Deplete by an Ovotoxic Chemical Correlates with Changes in Follicle-Stimulating Hormone and Inhibin A. Calcif Tissue Int. 2012; 90(3): 239-249.
- 6) Lane NE, Haupt D, et al.: Early Estrogen Replacement Therapy Reverses the Rapid Loss of Trabecular Bone Volume and Prevents Further Deterioration of Connectivity

- in the Rat. *J Bone Miner Res.* 2009; 14(2): 206–214.
- 7) Keating AF, Fernandez SM, et al.: Inhibition of PIK3 Signaling Pathway Members by the Ovotoxicant 4-Vinylcyclohexene Diepoxide in Rats. *Biol Reprod.* 2011; 84(4): 743–751.
 - 8) Bhattacharya P, Madden JA, et al.: Glutathione S-transferase class mu regulation of apoptosis signal-related kinase 1 protein during VCD-induced ovotoxicity in neonatal rat ovaries. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 267(1): 49–56.
 - 9) Chen Z, Kang X, et al.: Rictor/mTORC2 Pathway in Oocytes Regulates Folliculogenesis, and Its Inactivation Causes Premature Ovarian Failure. *J Biol Chem.* 2015; 290(10): 6387–6396.
 - 10) Reis FMCV, Pestana-Oliveira N, et al.: Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopausal animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 49: 130–140.
 - 11) Carolino ROG, Barros PT, et al.: Endocrine profile of the VCD-induced perimenopausal model rat. *PLOS One.* 2019; 14(12): e02226874.
 - 12) Chen X, Li L, et al.: Treadmill running exercise prevents senile osteoporosis and upregulates the Wnt signaling pathway in SAMP6 mice. *Oncotarget.* 2016; 7(44): 71072–71086.
 - 13) Wright LE, Christian PJ, et al.: Comparison of skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure in mice. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(8): 1296–1303.
 - 14) Reinwald S, Mayer LP, et al.: A longitudinal study of the effect of genistein on bone in two different murine models of diminished estrogen-producing capacity. *J Osteoporos.* 2010; 145170.
 - 15) Lukefahr AL, Frye JB, et al.: Decreased Bone Mineral Density in Rats Rendered Follicle Deplete by an Ovotoxic Chemical Correlates with Changes in Follicle-Stimulating Hormone and Inhibin A. *Calcif Tissue Int.* 2012; 90(3): 239–249.
 - 16) Cao LB, Leung CK, et al.: Systemic changes in a mouse model of VCD-induced premature ovarian failure. *Life Sciences.* 2020; 262: 118543.
 - 17) Mashimo A, Oshida R, et al.: Hormonal fluctuations in rodent models using 4-vinylcyclohexene diepoxide: A systematic review and meta-analysis. *Horm Behav.* 2025; 168: 105680.
 - 18) Wu R-W, Lian W-S, et al.: Piezoelectric Microvibration Mitigates Estrogen Loss-Induced Osteoporosis and Promotes Piezo1, MicroRNA-29a, and Wnt3a Signaling in Osteoblasts. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(17): 9476.
 - 19) Cheng C-H, Chen L-R, et al.: Osteoporosis Due to Hormone Imbalance: An Overview of the Effects of Estrogen Deficiency and Glucocorticoid Overuse on Bone Turnover. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(3): 1376.
 - 20) Mayer LP, Devine PJ, et al.: The Follicle-Deplete Mouse Ovary Produces Androgen. *Biol Reprod.* 2004; 71(1): 130–138.
 - 21) Kim J-S, Jeon J, et al.: Interval running training improves age-related skeletal muscle wasting and bone loss: Experiments with ovariectomized rats. *Exp Physiol.* 2019; 104(5): 691–703.
 - 22) Karim L, Bouxsein ML: Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties. *Bone.* 2016; 82: 21–27.
 - 23) Sierra-Ramírez JA, Saucedo-Bueno L, et al.: Moderate aerobic exercise on bone quality changes associated with aging and oxidative stress in BALB/c mice. *J Biomech.* 2022; 135: 111035.
 - 24) Bonnet N, Beaupied H, et al.: Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(4): 578–588.
 - 25) Tenger K, Komori K, et al.: High molecular weight hyaluronic acid alleviates ovariectomy-induced bone loss in mice. *BMC Musculoskelet Disord.* 2024; 25: 1048.

Effects of Exercise on Osteoporosis Using a 4-Vinylcyclohexene Dioxide-Treated Mouse Model

Aoi Mashimo¹⁾, Ryuga Oshida¹⁾, Sora Kawabata¹⁾, Chiharu Takasu¹⁾,
Kota Nihei¹⁾, Kenta Sone¹⁾, Yuichiro Oka²⁾, Yasuyo Sunaga³⁾,
Naohiko Kanemura³⁾, Kenji Murata^{3)*}

- ¹⁾ Department of Health and Social Services, Graduate School of Saitama Prefectural University
²⁾ Department of Rehabilitation Science, Faculty of Health Sciences, Hokkaido University
³⁾ Department of Physical Therapy, School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University

Abstract: **【Aim】** Using a mouse model of gradual ovarian dysfunction induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD), this study investigated the onset of osteoporosis and effects of long-term moderate exercise on bone health. **【Methods】** Five-week-old female ICR mice were administered VCD or sesame oil and divided into the exercise intervention, non-exercise (VCD), and sham-injected groups. Treadmill running was conducted for 16 weeks. Bone density, fracture strength, and cortical bone were analyzed histologically. **【Results】** The VCD group showed significantly decreased bone volume density and mechanical strength, leading to bone fragility despite minimal changes in cortical bone thickness. Exercise intervention did not improve bone density or fracture strength; however, a trend toward cortical bone reduction was observed. **【Conclusion】** The VCD model successfully replicates bone fragility associated with estrogen decline. However, the applied exercise conditions did not improve bone density. Further studies on bone quality assessment and exercise protocols are needed.

Key words: VCD, Mouse model, Exercise, Bone