

表 題 小児腎疾患におけるステロイド治療の骨強度への影響の解析  
ー骨密度と骨代謝マーカーによる検討ー

論文の区分 論文博士

著 者 名 青柳 順

所 属 自治医科大学 小児科学講座  
\_\_\_\_\_

2021 年 2 月 15 日申請の学位論文

紹介教員 地域医療学系 専攻 成育医学  
職名・氏名 准教授・金井孝裕

## 目次

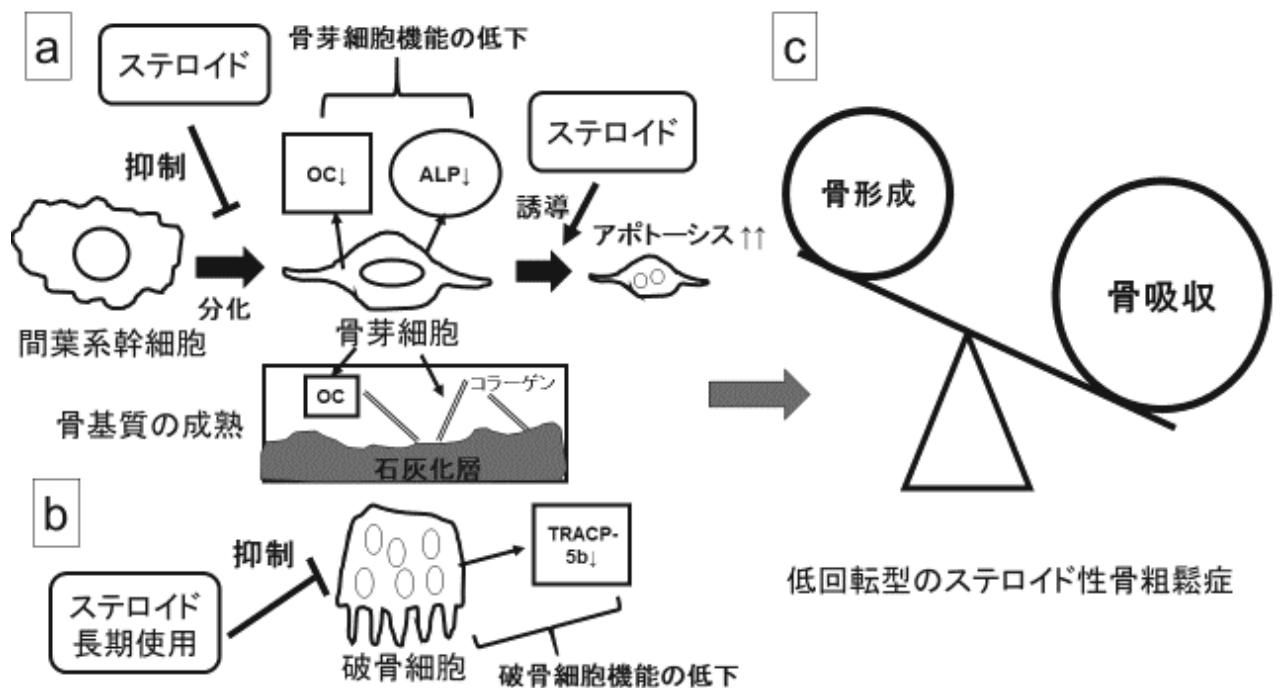
	頁
I. 背景	3
II. 方法	
① 対象	7
② 各疾患のステロイド治療プロトコルと、骨密度—骨代謝マーカーの検査時期	8
③ 骨強度の評価方法	9
III. 結果	
①-1 ISSNS群における、ステロイド積算量（各測定時点間における）の推移	11
①-2 ISSNS群における、尿蛋白/クレアチニン (Up/Ucr) の推移	12
①-3 ISSNS群における、ステロイド治療開始前～3か月後の骨強度の推移	12
①-4 ISSNS群における、性差の骨強度への影響	15
②-1 IgA腎症群における、ステロイド積算量（各測定時点間における）の推移	16
②-2 IgA腎症群における、尿蛋白/クレアチニン (Up/Ucr) の推移	16
②-3 IgA腎症群における、ステロイド治療開始前～24か月後の骨強度の推移	17
②-4 IgA腎症群における、性差の骨強度への影響	21
IV. 考察	
① ISSNS群における、ステロイド治療の骨強度への影響	22
② IgA腎症群における、ステロイド治療の骨強度への影響	23
③ ISSNS群とIgA腎症群間における、ステロイド治療の骨強度への影響の比較	26
④ 性差や年齢によるステロイド治療の骨強度への影響	28
V. 結論	29
VI. 参考文献	30

## I. 背景

ステロイドは、その強力な抗炎症作用と免疫抑制作用を有するため、腎疾患を始め様々な疾患に汎用され、わが国では約 200 万人が 3 か月以上の長期間、使用している(1)。一方、ステロイドの長期使用は種々の代謝障害を生じる。特にステロイドによる骨代謝（骨形成＋骨吸収＋骨基質成熟）異常であるステロイド性骨粗鬆症は、ステロイドによる最多の副作用であり、ステロイドによる副作用全体の約 25%を占める(1)。そして、ステロイド性骨粗鬆症により発生する脆弱性骨折は、生活の質を著しく低下させる。このため、ステロイド性骨粗鬆症に伴う骨折防止に向け、2004 年に日本骨代謝学会からステロイド性骨粗鬆症の予防・管理とその治療のためのガイドラインが発表された。しかし、それは、成人を対象とするものである(2)。

小児領域においてもステロイドを使用する機会は多い。実際、小児腎疾患の管理でも、ステロイド治療は重要な位置を占める(3, 4)。しかし、小児を対象としたステロイド性骨粗鬆症の予防・管理とその治療のためのガイドラインは存在しない。小児におけるステロイド性骨粗鬆症は、生活の質を著しく低下させるだけではなく、成長抑制の一因ともなる。このため、小児期においても、ステロイド性骨粗鬆症の予防・管理とその治療のためのガイドラインは必要であり、そのためのデータの蓄積を必要とする。

ステロイドによる骨代謝異常の発症機序は、次の 2 つのことがわかっている。① 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を阻害し、同時に、骨芽細胞のアポトーシスを誘導して、骨形成機能を低下させる（図 1a）。② ステロイドの長期使用は、骨形成、骨吸収、骨基質成熟（すなわち骨代謝）をすべて低下させ（図 1b）(5)、①の作用も加わることで、相対的に骨吸収優位となる。つまり、ステロイドの長期使用は、相対的に骨吸収優位となる低回転型のステロイド性骨粗鬆症を発症する（図 1c）。



(図 1a, b, c) ステロイドによる骨代謝異常の発症機序

- a, ステロイドは、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を阻害し、同時に、骨芽細胞のアポトーシスを誘導して、骨形成機能を低下させる。
- b, ステロイドの長期使用により、骨吸収機能も低下し、骨代謝自体が低下する。
- c, 相対的に骨吸収優位となる低回転型のステロイド性骨粗鬆症を発症する。
- ALP; アルカリフォスファターゼ、OC; オステオカルシン、TRACP-5b; 骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ

骨密度は、骨の単位体積あたりのミネラル（カルシウムやリン）量で規定される。ステロイド性と原発性の骨粗鬆症を比較した時、両方が同程度の骨密度の場合は、ステロイド性骨粗鬆症の方が、より脆弱性骨折を発症しやすいことが、近年報告された(6)。実際、Sbrocchi らは、骨密度は基準範囲内である 10 歳の頻回再発型ネフローゼ症候群の男児が、ステロイドの長期使用に伴い、胸椎の圧迫骨折を発症したことを報告した(7)。このように骨密度の評価だけでは、骨折リスクを評価することが困難であるため、2001 年の NIH コンセンサスでは、骨強度という概念を取り入れ、骨強度は、骨密度（70%）と骨質（30%）によって規定されるとした（図 2）(8)。この骨質の構成要素は、① 骨代謝回転 ② 微細構造 ③ 微小骨折 ④ 石灰化である。①の骨代謝回転は、骨リモデリングともよばれ、骨梁表面で破骨細胞による骨吸収の後、骨芽細胞による骨形成が起こる一連の流れである。②の微細構造は、海綿骨における骨梁の、幅と数と方向、そして、皮質骨内血管

周囲での骨吸収亢進の程度で規定される。③の微小骨折は、骨組織に対する荷重初期により発生する、骨組織の微小損傷である。④の石灰化は、ハイドロキシアパタイトが結晶化する現象であり、骨の硬化に作用する。

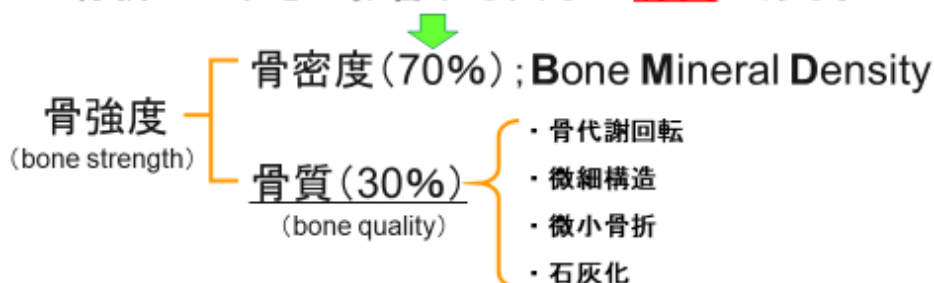
## “骨強度、”という概念

同じ骨密度でも、骨折しやすい骨と骨折しにくい骨がある。

⇒ 代表的なものが、ステロイド性骨粗鬆症

(Van Staa, Laan et al. 2003)

骨折しやすいに影響する因子が**骨質**である。

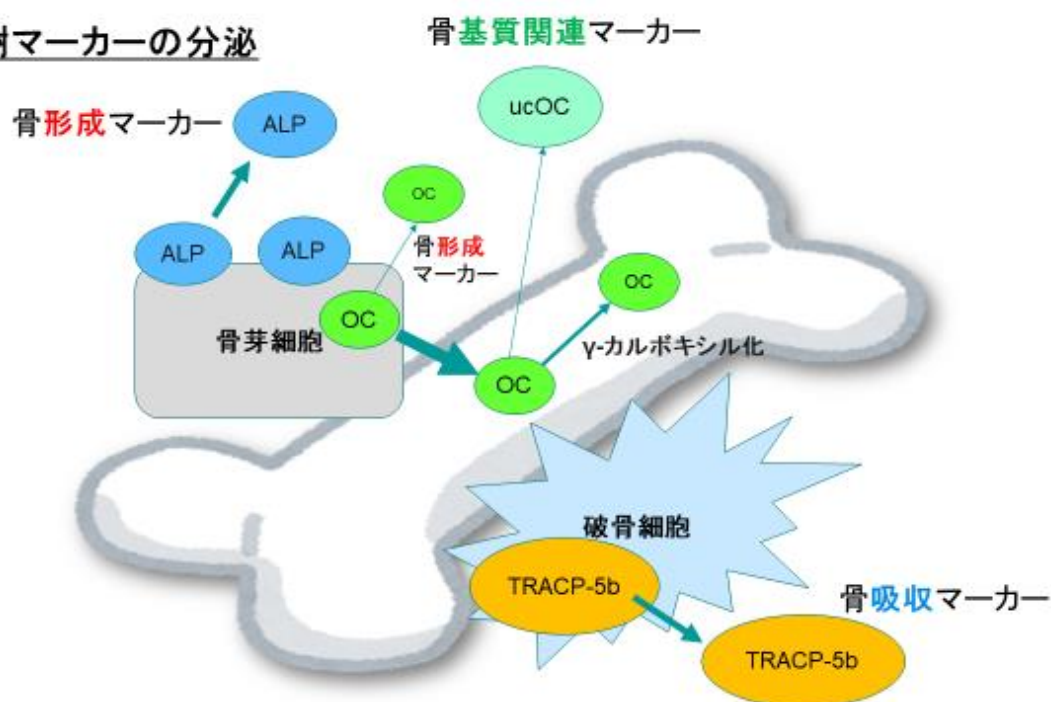


(Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention and Therapy 2001)

(図 2) 骨強度という新たな概念

上記の骨質評価4項目のうち、臨床の現場では、骨代謝回転を反映する血清や尿中の骨代謝マーカーの測定が汎用されている(9)(10)。そのうち、血清中の骨代謝マーカーの代表を図3に示し、それぞれの特徴を述べる。ALPは、骨芽細胞の細胞膜に結合して存在し、骨の石灰化に必要な結晶形成を阻害するピロリン酸を分解し、骨形成を促進させる。ほとんどのALPは骨芽細胞の細胞膜に結合して存在するが、一部は血中に存在する。その血中に存在するALPは、骨形成の過程で血中に放出され、骨芽細胞機能を反映する(11)。TRACP-5bは、骨吸収の際に破骨細胞から分泌され、骨を融解する酵素で、破骨細胞機能を反映する(12)。オステオカルシン(OC)は骨基質を構成する非コラーゲン性蛋白質で成熟骨芽細胞から産生される、骨形成マーカーの1つである。多くは骨基質に取り込まれるが、一部は血中に放出される。このOCのうち、骨内のビタミンK不足でOCがγ-カルボキシル化されないと、骨基質に取り込まれず、低カルボキシル化OC(ucOC)として血中に放出される。血清ucOC値上昇は、骨脆弱性に関与している(13)。

## 骨代謝マーカの分泌



(図 3) 代表的な骨代謝マーカー3 種

**ALP, アルカリフォスファターゼ;** 骨形成の際に骨芽細胞膜から分泌され、骨芽細胞機能を反映する (骨形成マーカー)。

**TRACP-5b, 骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ;** 骨吸収の際に破骨細胞から分泌され、骨を融解する酵素で、破骨細胞機能を反映する (骨吸収マーカー)。

**OC, オステオカルシン;** 成熟骨芽細胞から産生される、骨基質を構成する非コラーゲン性蛋白質 (骨形成マーカー)。

**ucOC, 低カルボキシル化オステオカルシン;** 骨内のビタミン K 不足により  $\gamma$ -カルボキシル化が不十分な OC である。ucOC は骨基質に取り込まれず、血清 ucOC 値の上昇は骨質の劣化を意味する (骨基質関連マーカー)。

実際、成人の骨粗鬆症診療では、骨密度と骨代謝マーカーを組み合わせることで骨強度を評価する手法が広まっており(14)、骨代謝マーカーの測定は保険診療の適用がある。

一方、長期ステロイド使用患児における骨密度と骨代謝マーカーの経時的変化を解析した報告は少ない(15-17)。このため、小児におけるステロイド性骨粗鬆症の診療に十分なエビデンスはない。小児の健やかな発育に、運動は必要である。しかし、ステロイド性骨粗鬆症による骨折の危険性から、運動制限に対する明確な基準がないままに、長期ステロイド使用患児が、運動制限の指示をうけている現状がある(18)。

小児における特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群と、IgA 腎症の寛解率は、ステ

ロイド治療により、それぞれ 100%、98%（当科成績）であり、生命予後は非常に良好である。しかし、長期ステロイド治療を必要とするため、同疾患罹患児たちの多くは、学校生活で運動制限を指示されており、このことは健やかな発育を促す意味で、大きな問題である。小児におけるステロイド治療の骨強度への影響を、骨密度だけでなく骨代謝マーカーにより骨質も含めて検討・解析し、その知見を得ることは、運動を通した小児の健やかな発育に役立つものとなる。

今回、小児慢性腎疾患の主要な位置を占める、特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群（ISSNS）と IgA 腎症（IgAN）において、ステロイド治療が骨強度に与える影響を、骨密度と、骨質として 3 種類の骨代謝マーカー（骨形成、骨吸収、骨基質関連マーカー）を前方視的に同時測定し、解析した。

本研究において、ISSNS 群と IgAN 群を検討対象としたのは、① 有意な解析結果を示すことができる症例数があることと、② ステロイド治療プロトコルのガイドラインがあるため、ステロイド治療方針にばらつきがないためである。

## II. 方法

本研究は、自治医科大学臨床研究等倫理委員会の承認（B12-86）を得て、患児と保護者に説明し、書面にて同意を得たのちに行った。

### ① 対象

A) ISSNSの患児11名、うち男児6名、女児 5名、平均年齢は $8.8 \pm 3.5$ 歳。

B) IgANの患児13名、うち男児7名、女児6名、平均年齢は $12.4 \pm 3.7$ 歳。

ISSNS患児は全例、ネフローゼ症候群の初発例とし、IgAN患児は、本プロトコルに先行するステロイド治療歴のない児を対象とした（表 1）。

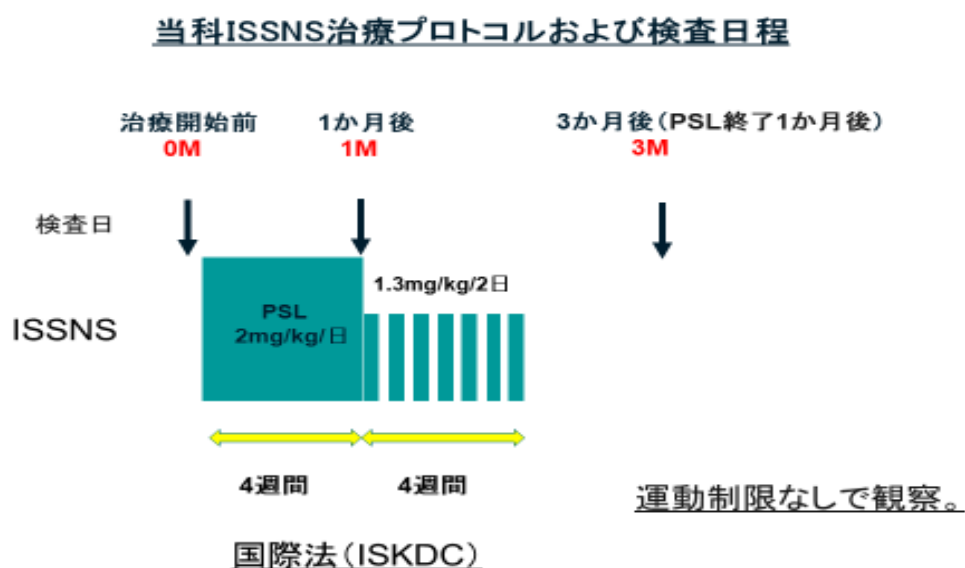
（表1）対象

	患児数	平均年齢	男女比
ISSNS	11名	$8.8 \pm 3.5$ 歳	6:5
IgAN	13名	$12.4 \pm 3.7$ 歳	7:6

## ② 各疾患のステロイド治療プロトコルと、骨密度—骨代謝マーカ—の検査施行時期

### ISSNS

国際小児腎臓病研究会（ISKDC）の治療プロトコルに準じて、プレドニゾロン 2 mg/kg/日（最大 60 mg/日）分3を4週間内服し、寛解を確認後に、プレドニゾロン1.3 mg/kg/日分1の隔日内服に減量し、4週間内服して終了とした（図4）。



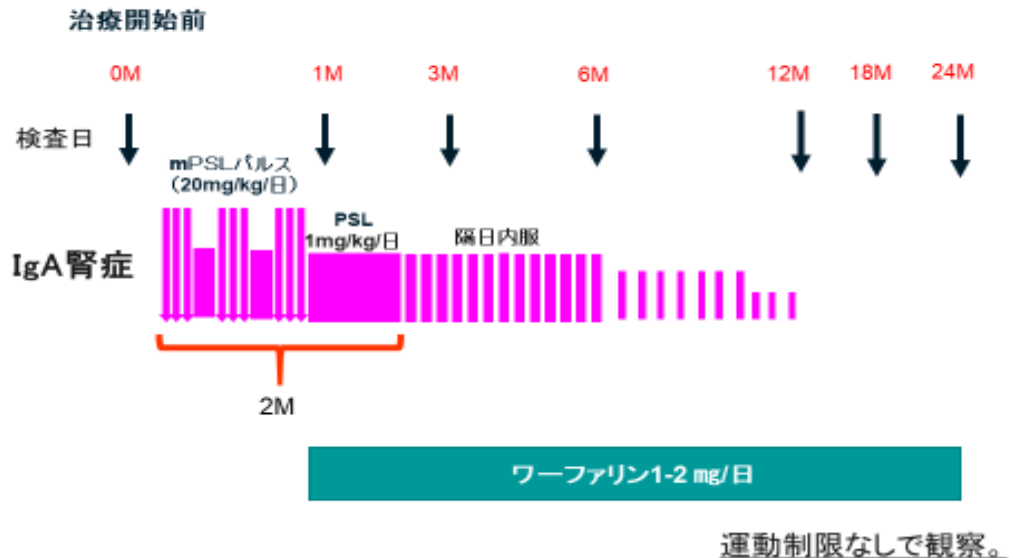
（図4）ISSNS 群のステロイド治療プロトコルと検査日程

### IgAN

両側口蓋扁桃を摘出後に、3コースのステロイドパルス療法を行った。メチルプレドニゾロン 20 mg/kg（最大500 mg）を3日間点滴静注し、プレドニゾロン1 mg/kg/日（最大30 mg/日）を4日間内服する。これを1コースとして、3コース行い、以降はプレドニゾロン1 mg/kg/日（最大30 mg/日）を4週間継続し、同量の隔日内服に減量し、尿蛋白の陰性化まで継続した（内服期間 平均 3.9±0.9 か月）。以降は、5 mgずつまたは前回量の20%減で漸減を開始し、ステロイド治療を開始してから12か月後を目途に終了した。また、ステロイドパルス療法後からワーファリン1-2 mg/日を内服し、Prothrombin Time-International Normalized Ratio (PT-INR)を1.5-2.0を目標に用量を調整した。ステロイド治療開始24か月後に、ワーファリンを終了した（図5）。



### 当科IgA腎症治療プロトコルおよび検査日程



(図5) IgA 腎症群のステロイド治療プロトコルと検査日程

ISSNS群、IgAN群共に、今回の観察期間中に、カルシウム製剤、ビタミンD、そしてアレンドロン酸ナトリウム水和物等の骨強度に影響する薬の使用はなかった。

### ③ 骨強度の評価方法

#### 1. 測定項目

骨密度の評価指標としては、二重エネルギーX線吸収測定法 (dual-energy X-ray absorptiometry; DEXA) を用いて、骨の単位面積あたりのミネラル量であるBone mineral density (BMD) を、第2-4腰椎正面で測定した (The Discovery A, Hologic 社)。管電圧 140 kVp/100 kVpの2つのエネルギー量を発生するX線管を用いた。X線走査はファンビームモードで行い、腰椎正面の測定時間は約50秒であった。X線走査で得られた胸椎下部～仙骨上部正面像において、第12肋骨付着部を基準として第1～5腰椎を決定し、第2～第4腰椎 (L2～L4) の平均値を腰椎骨密度 (BMD値) とした。

骨質の評価指標としては、血清中の骨代謝マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) と、骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP-5b) と、そして低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) を用いた (図3)。これらの3種類の骨質評価のため

の骨代謝マーカーは、骨代謝回転の異なる異相（骨形成、骨吸収、骨基質成熟）をそれぞれ反映し、ステロイド使用下における骨代謝回転を多角的に解析できるため、この3者を測定対象とした。

以下に、今回測定した血清中の3種類の骨代謝マーカーの測定方法を述べる。

#### 【血清ALP】

血清2.5  $\mu$ Lに、p-ニトロフェニルリン酸を注入し、アルカリ下で血清中のALPと反応させて、p-ニトロフェノールとリン酸を生成させる。このp-ニトロフェノールは405 nm付近に吸収極大をもつので、この吸光度の増加速度を測定して血清ALP活性値を測定した（酵素免疫法、EIA法；Enzyme immunoassay）。

#### 【血清TRACP-5b】

血清50  $\mu$ Lを、抗TRACP-5b抗体固相化プレートに注入し、室温下で60分間、振盪させた。検体中の活性型TRACP-5bを抗TRACP-5b抗体に結合させる。洗浄後に、基質2-クロロ-4-ニトロフェニルリン酸を添加し、酵素反応を行い（37℃、60分）、反応停止後30分以内にマイクロプレートリーダーにて、波長405 nmの吸光度を測定した。同時に測定した検量線から、検体の吸光度と対応するTRACP-5b量を算出した（酵素免疫法、EIA法；Enzyme immunoassay）。

#### 【血清ucOC】

血清50  $\mu$ Lに、抗ucOC抗体結合ビーズとルテニウム標識抗OC抗体を注入し、血清中のucOCに結合させる。その後、電極上で電気エネルギーを加えると、血清中のucOCと結合したルテニウム標識抗OC抗体量に応じてルテニウム錯体が発光する。この発光量は、検体中のucOC量を反映しているので、その発光量を標準抗原液、または、キャリブレーション液の発光量と対比して、血清ucOC値を測定した（電気化学発光免疫測定法、ECLIA法；Electro-chemiluminescence immunoassay）。

## 2. 測定時点

### ISSNS

ステロイド治療開始前（0M）、開始1か月後（1M）、ステロイド治療終了1か月後（ステロイド治療開始3か月後；3M）の、3時点において、BMDと各骨代謝マーカーを測定した（図4）。

## IgAN

ステロイド治療開始前(0M)、開始1か月(1M)、3か月(3M)、6か月(6M)、12か月(12M)、18か月(18M)、24か月後(24M)の、7時点において、BMDと各骨代謝マーカーを測定した(図5)。

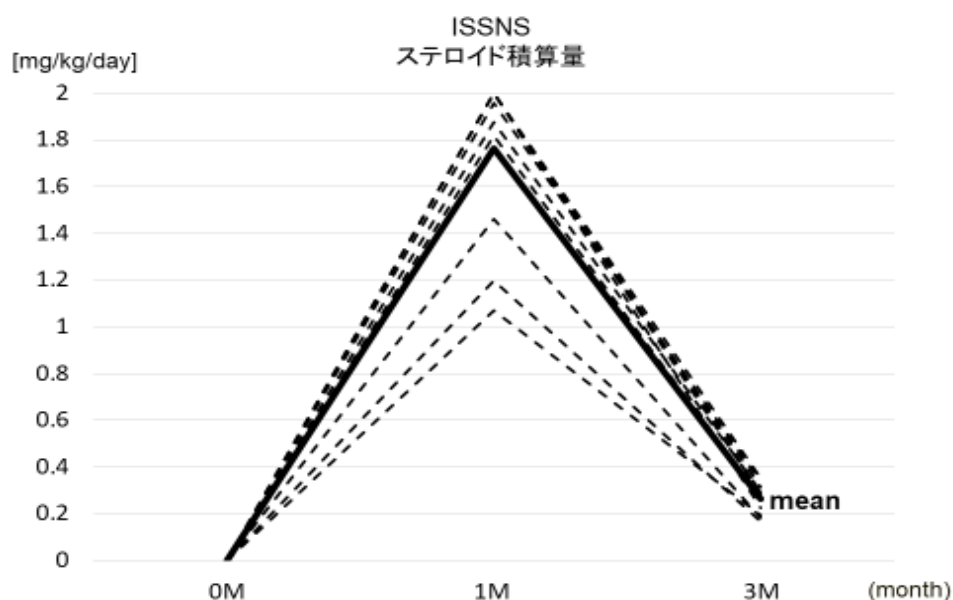
### 3. 統計学的評価

各測定時点(Xか月)の、BMD値と各骨代謝マーカー値を、ステロイド治療開始前のそれぞれの値と比較し、変化率{例;(Xか月のALP値-0か月のALP値)/0か月のALP値}を算出し、その推移をThe paired t-testを用いて解析した。また、BMDと各骨代謝マーカーの関連性は、スピアマンの順位相関係数を用いて解析した(JMP13, SAS社)。

## Ⅲ. 結果

### ①-1 ISSNS群における、ステロイド積算量(各測定時点間における)の推移

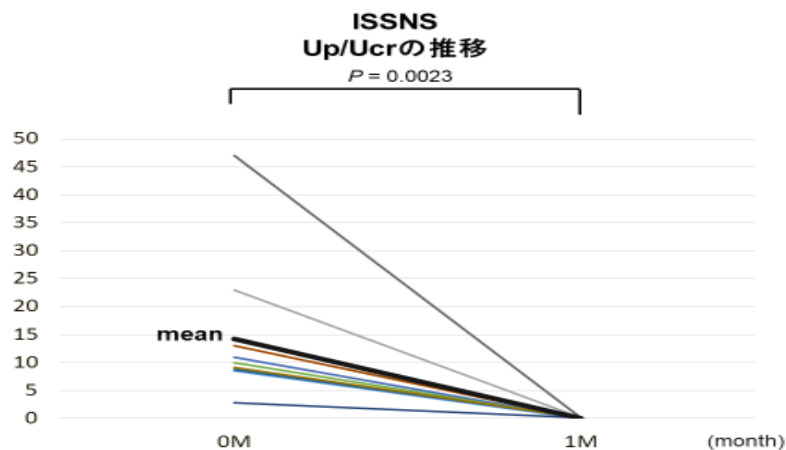
最初の1か月間の平均総ステロイド量は、 $1.8 \pm 0.3$  mg/kg/日で、8週間の平均総ステロイド量は、 $1.2 \pm 0.2$  mg/kg/日であった(図6)。



(図6) ISSNS 群における、ステロイド積算量(期間毎;0M~1M、1M~3M での総量)の推移  
治療開始1か月間の平均総ステロイド量は、 $1.8 \pm 0.3$  mg/kg/day で、  
全例2か月間でステロイドを漸減中止した。

### ①-2 ISSNS 群における、尿蛋白/クレアチニン(Up/Ucr)の推移

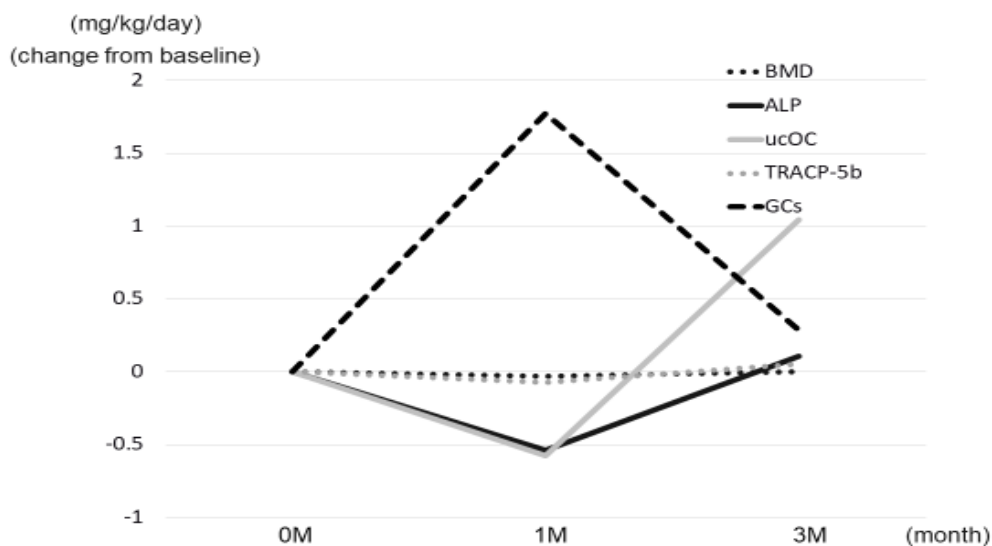
ISKDC の治療プロトコルにより、1M の時点で全例寛解した (図 7)。



(図 7) ISSNS 群における、尿蛋白/クレアチニン(Up/Ucr)の推移  
1M で全例寛解し、観察期間内に再発はなかった。

### ①-3 ISSNS群における、ステロイド治療開始前～3か月後の骨強度の推移

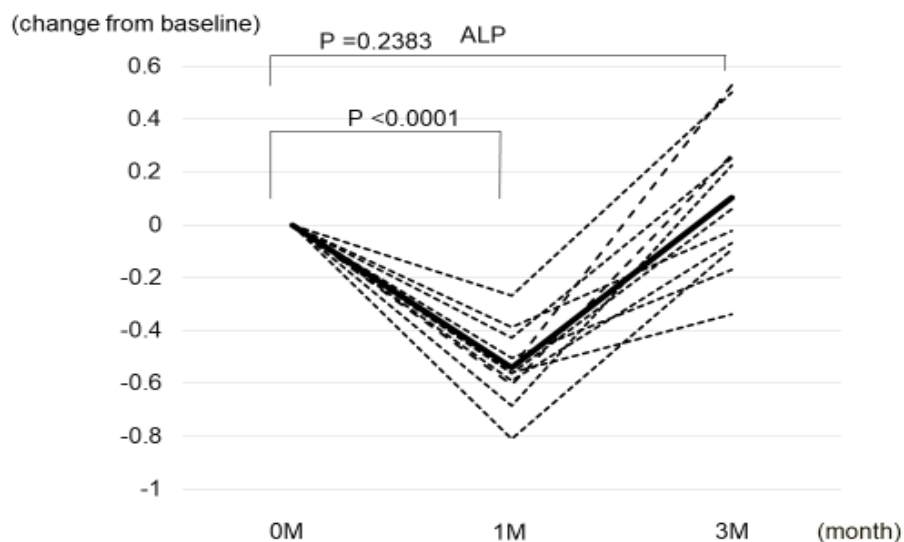
ステロイド量 (プレドニゾロン換算) の推移と、BMD値、血清ALP値、ucOC値と、TRACP-5b値の平均変化率の推移を示す (図8)。



(図 8) ISSNS 群における、ステロイド (GCs) 量(期間毎)の推移と、BMD 値、血清 ALP 値、ucOC 値と、TRACP-5b 値の平均変化率の推移

ステロイド治療開始 1 か月 (1M) で、血清 ALP 値と ucOC 値は低下し、治療終了 1 か月後 (3M) には、治療前値に回復または上昇した。血清 TRACP-5b 値と BMD 値に変化はなかった。

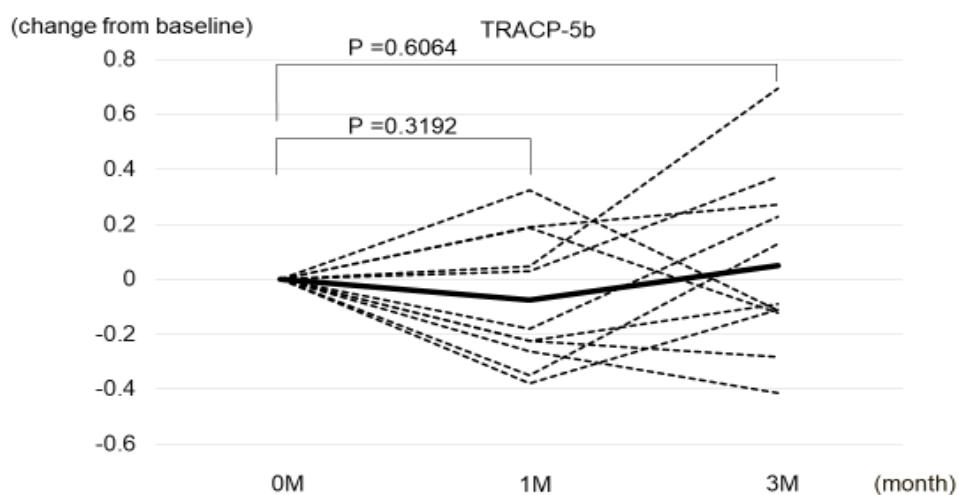
血清ALP値は、PSL 2 mg/kg/日を4週間継続（1M）すると、平均値の推移で有意に低下し（ $P < 0.0001$ ）、PSL終了1か月後（治療開始3か月後；3M）にはOMと比較し、有意差はなかった（ $P = 0.2383$ ）（図8）。全例、同じ推移であった（図9）。



（図 9）ISSNS 群における、血清 ALP 値変化率の推移

血清ALP値は、1Mで有意に低下し、3Mで治療前値に戻った。

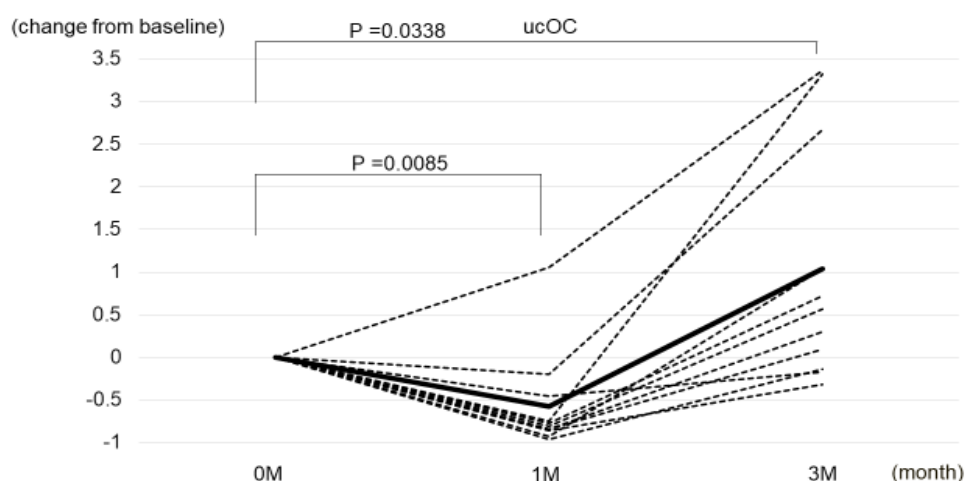
血清TRACP-5b値は、8週間のステロイド治療中に有意な変化はなく（ $P = 0.3192$ ， $P = 0.6064$ ）（図8）、全例の推移に一定の傾向はなかった（図10）。



（図 10）ISSNS 群における、血清 TRACP-5b 値変化率の推移

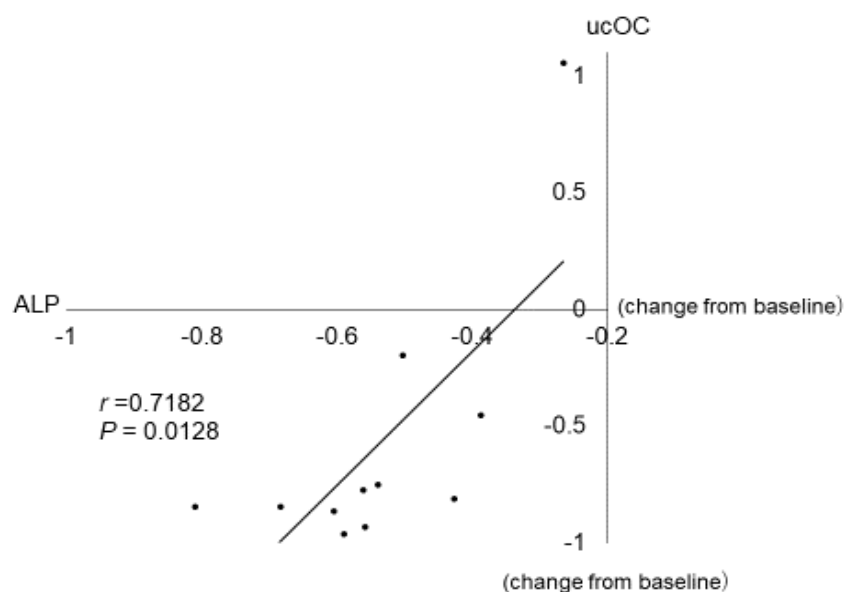
血清 TRACP-5b 値に、有意な変化はなかった。

血清ucOC値は、PSL 2 mg/kg/日を4週間継続（1M）し、有意に低下したが（ $P = 0.0085$ ）、終了1か月後（3M）に0Mと比較し、有意に上昇した（ $P = 0.0338$ ）（図8）。1例、1Mでも上昇したが、他の全例は1Mに低下した（図11）。



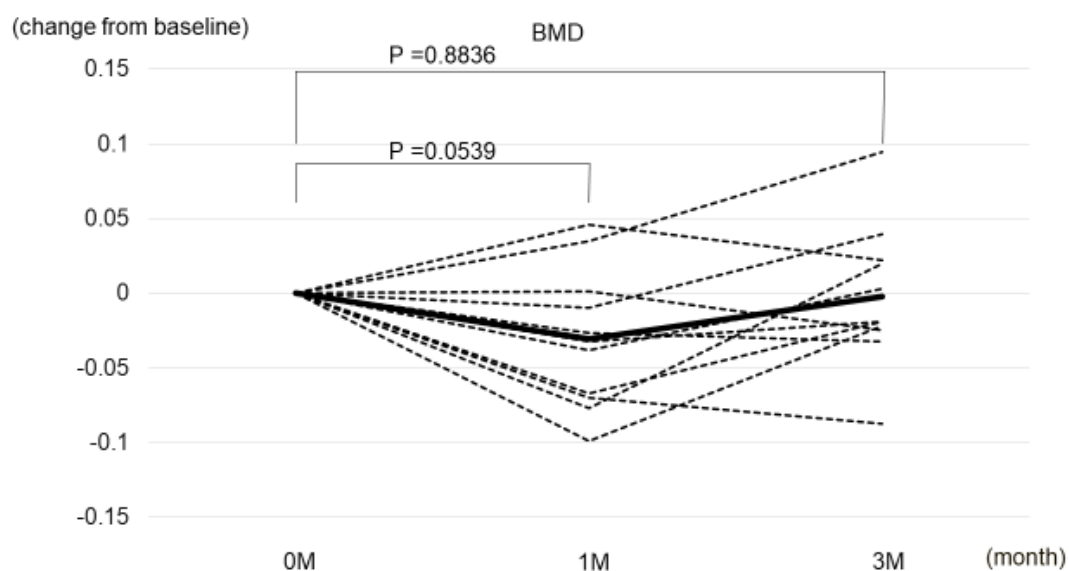
（図 11）ISSNS 群における、血清 ucOC 値変化率の推移  
血清ucOC値は、1Mで有意に低下し、3Mで治療前値より上昇した。

1M時点で、血清ALP値の低下が強い例ほど血清ucOC値の低下も高度で、正の相関があった（ $r = 0.7182$ ,  $P = 0.0128$ ）（図12）。



（図 12）ISSNS 群（1M）における、血清 ALP 値と血清 ucOC 値の変化率の関連性  
1M で、血清 ALP 値と ucOC 値の変化率に正相関があった。

8週間のステロイド治療中にはBMD値に有意な変化はなく ( $P = 0.0539$ 、 $P = 0.8836$ ) (図8)、全例の推移に一定の傾向はなかった (図13)。



(図13) ISSNS 群における、BMD 値変化率の推移  
BMD 値に、有意な変化はなかった。

#### ①-4 ISSNS群における、性差の骨強度への影響

ISSNS群では、男児6名で平均年齢は $8.3 \pm 3.6$ 歳、女児は5名で平均年齢は $9.4 \pm 3.4$ 歳であった。思春期早発症や遅発症の児はいなかった。

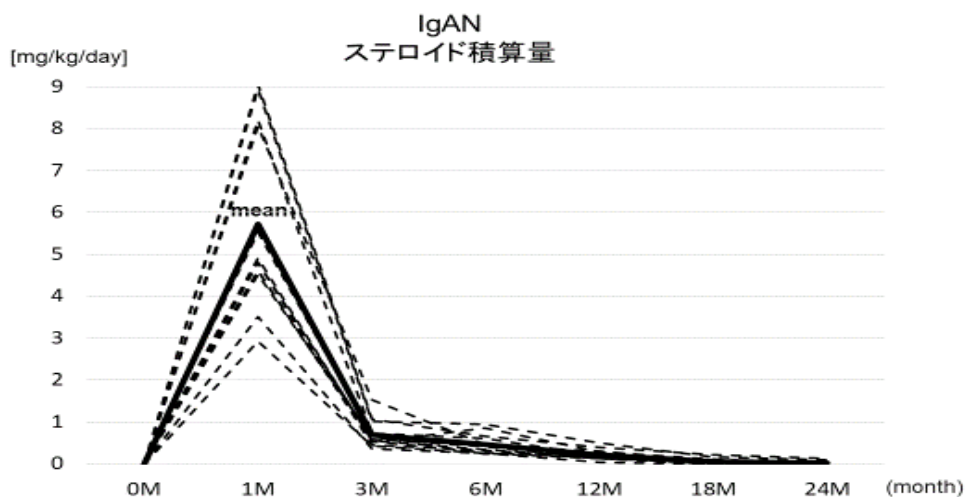
3Mでの血清ALP値は、男児は0Mより上昇したが ( $P = 0.0444$ )、女児では有意差はなかった ( $P = 0.4411$ )。血清TRACP-5b値、ucOC値、BMD値は、性差による動態の違いはなかった (表2)。

(表2) ISSNS群における、性差の骨強度への影響

ISSNS群	
ALP	3Mにおいて、男児は有意に上昇。
TRACP-5b	性差なし
ucOC	性差なし
BMD	性差なし

## ②-1 IgAN群における、ステロイド積算量（各測定時点間における）の推移

最初の1か月間の平均総ステロイド量（プレドニゾロン換算）は、 $5.7 \pm 2.0$  mg/kg/日で、24か月間の平均総ステロイド量は、 $0.43 \pm 0.17$  mg/kg/日であった（図14）。

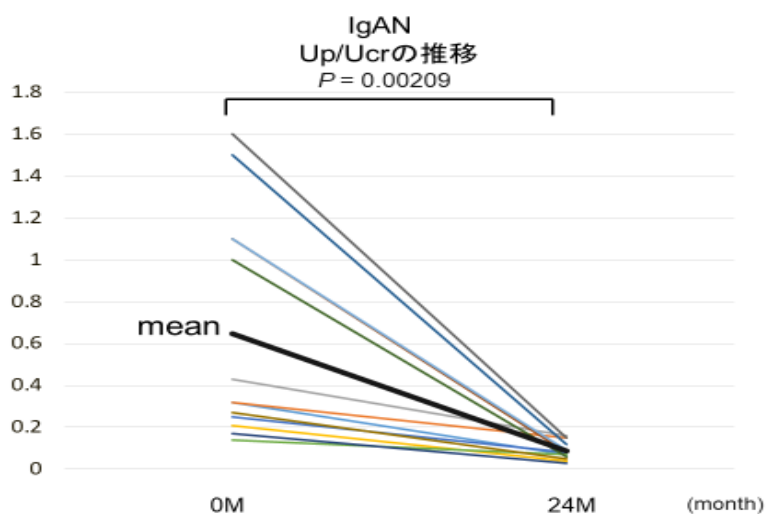


（図14）IgAN群における、ステロイド積算量（期間毎:0M～1M、1M～3M…18M～24Mでの総量）の推移

最初の1か月間の平均総ステロイド量（プレドニゾロン換算）は、 $5.7 \pm 2.0$  mg/kg/日。尿蛋白量と尿沈渣赤血球数の推移を評価して、ステロイドを漸減終了した。

## ②-2 IgAN群における、尿蛋白/クレアチニン(Up/Ucr)の推移

当科治療プロトコルにより、全例で観察期間内に尿蛋白の陰性化を確認した（図15）。



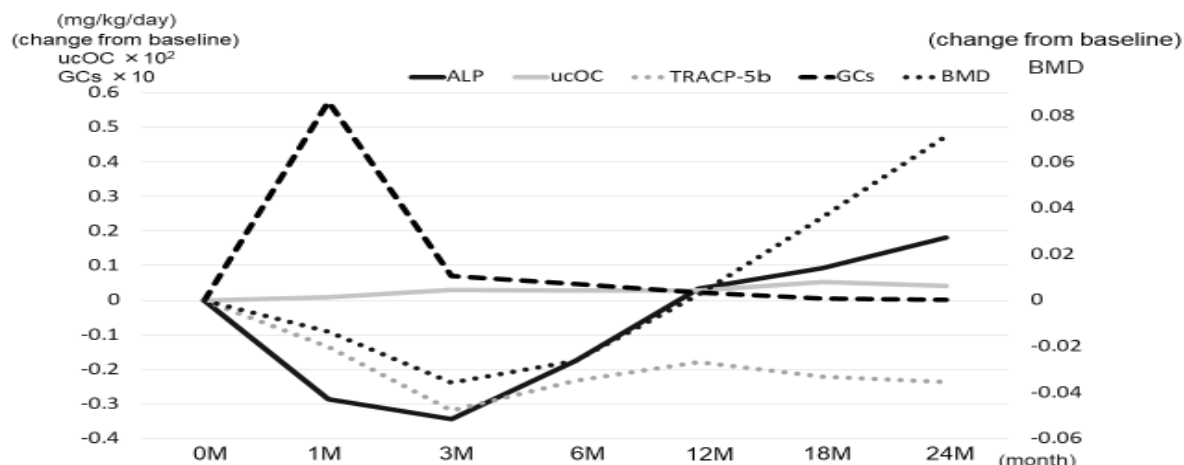
（図 15）IgA 腎症群における、尿蛋白/クレアチニン(Up/Ucr)の推移

全例で観察期間内に、尿蛋白は陰性化した。



### ②-3 IgAN群における、ステロイド治療開始前～24か月後の骨強度の推移

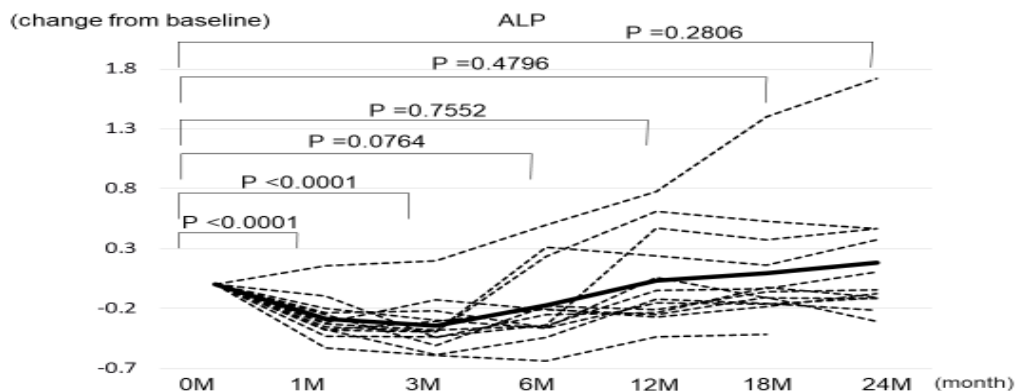
ステロイド量（プレドニゾン換算）と、BMD値、血清ALP値、ucOC値、そしてTRACP-5b値、の平均変化率の推移を示す（図16）。



（図 16）IgA 腎症群における、ステロイド（GCs）量(期間毎)の推移と、血清 ALP 値、ucOC 値、TRACP-5b 値、と BMD 値の平均変化率の推移

ステロイドパルス終了後（1M）に、血清 ALP 値は低下し、3M に血清 TRACP-5b 値も低下した。3M に血清 ALP 値と TRACP-5b 値の両者が低下すると、BMD 値も低下した。6M～24M の期間で、血清 ALP 値＞血清 TRACP-5b 値（骨形成＞骨吸収）になると、BMD 値が上昇した。

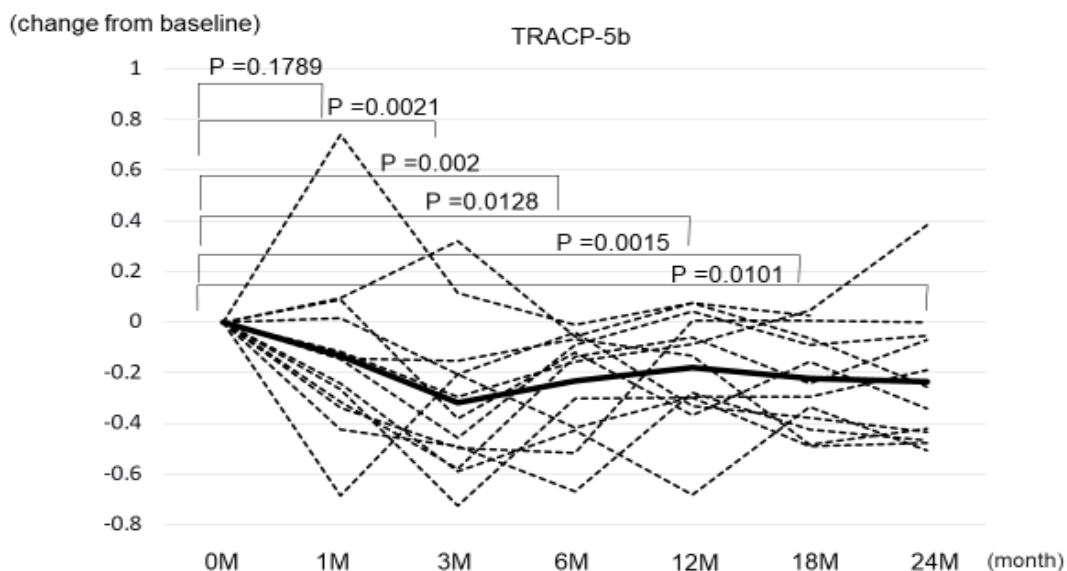
血清ALP値は、ステロイド治療開始1か月後(1M)、3か月後(3M)において、治療開始前(0M)と比較し、有意に低下した（ $P < 0.0001$ 、 $P < 0.0001$ ）が、6M～24Mでは有意差がなかった（ $P = 0.0764$ 、 $P = 0.7552$ 、 $P = 0.4796$ 、 $P = 0.2806$ ）（図16）。1例、1Mから上昇し続けたが、他の全例は1M～3Mに低下し、6M以降で上昇傾向を示した（図17）。



（図 17）IgA 腎症群における、血清 ALP 値変化率の推移

血清ALP値は、1M、3Mで有意に低下したが、6Mで治療前値に戻り、その状態を維持した。

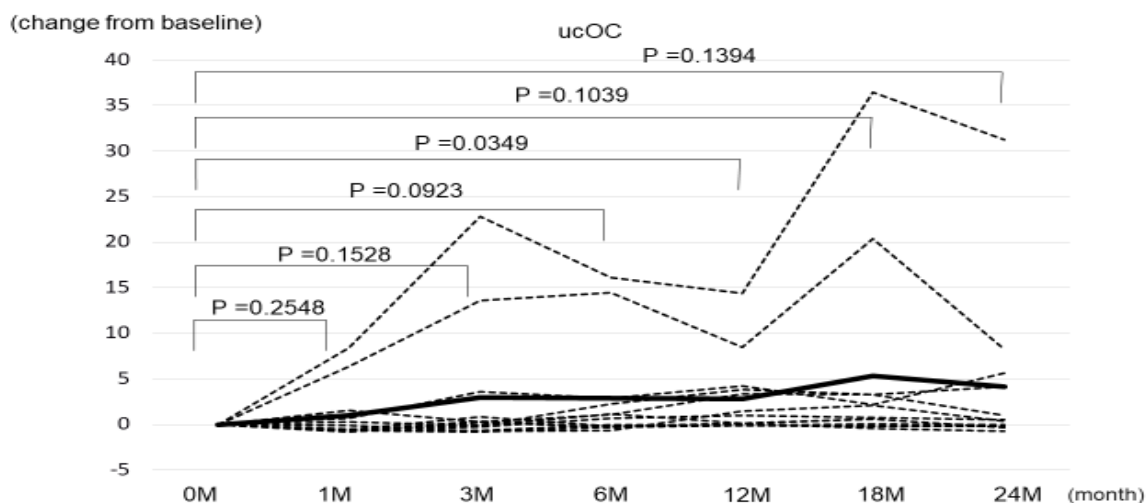
血清TRACP-5b値は、3M、6M、12M、18M、24Mで、0Mと比較し、有意に低下した ( $P = 0.0021$ 、 $P = 0.002$ 、 $P = 0.0128$ 、 $P = 0.0015$ 、 $P = 0.0101$ ) (図16)。2例で1M~3Mに上昇したが、その他全例で3Mに低下した (図18)。



(図 18) IgA 腎症群における、血清 TRACP-5b 値変化率の推移

血清TRACP-5b値は、3Mで有意に低下し、以降は24Mまで治療前値より低い値で推移した。

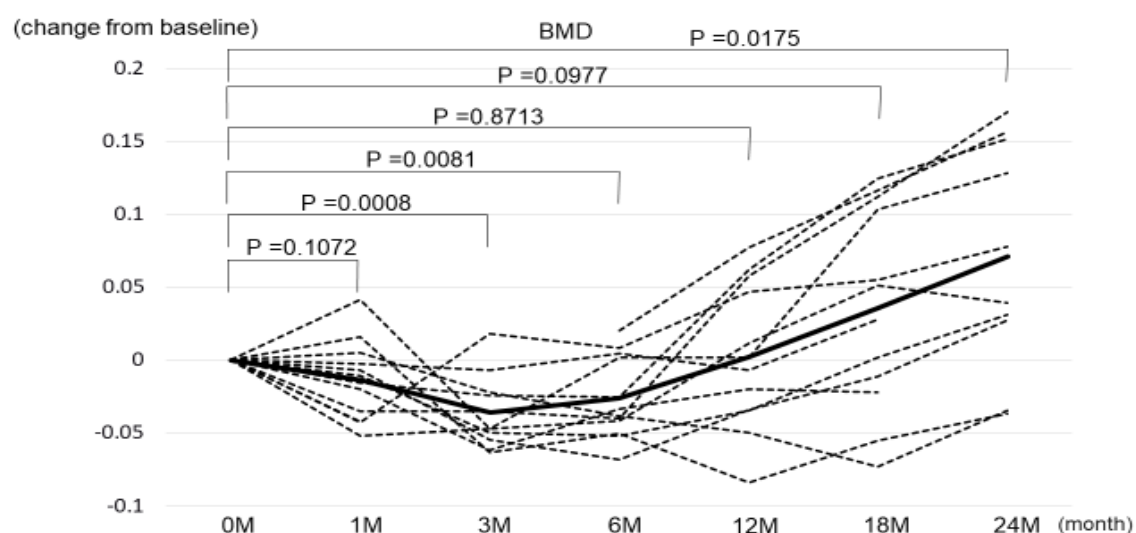
血清ucOC値は、1M、3M、6Mで0Mと比較して有意差なく ( $P = 0.2548$ 、 $P = 0.1528$ 、 $P = 0.0923$ )、12Mでのみ有意に上昇した ( $P = 0.0349$ ) (図16)。2例で治療前値より高いまま推移したが、その他では一定の傾向はなかった (図19)。



(図 19) IgA 腎症群における、血清 ucOC 値変化率の推移

血清ucOC値は、6Mまで変化なく、12Mでのみ有意に上昇した。

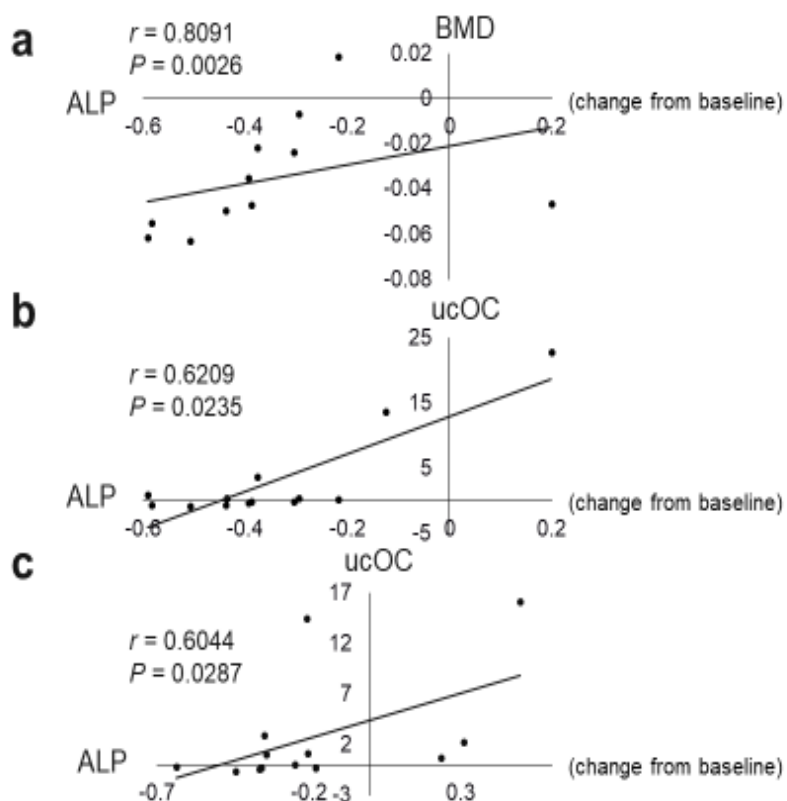
BMD値は、3Mと6Mで有意に低下したが（ $P = 0.0008$ 、 $P = 0.0081$ ）、12M～18Mでは有意差なく（ $P = 0.8713$ 、 $P = 0.0977$ ）、24Mでは0Mと比較し、有意に上昇した（ $P = 0.0175$ ）（図16）。1例を除いて、全例で3Mに低下していた（図20）。



（図 20）IgA 腎症群における、BMD 値変化率の推移

BMD 値は、3M と 6M で有意に低下したが、12M で治療前値に戻り、24M では治療前値より上昇した。

3M で、血清 ALP 値の低下が強い例ほど BMD 値の低下も高度で、血清 ALP 値と BMD 値の変化率に正相関があった ( $r = 0.8091$ ,  $P = 0.0026$ ) (図 21a)。また、3M と 6M において、血清 ALP 値と血清 ucOC 値の変化率に正相関があった ( $r = 0.6209$ ,  $P = 0.0235$ ,  $r = 0.6044$ ,  $P = 0.0287$ ) (図 21b, c)。



(図 21) IgA 腎症群における、BMD、骨代謝マーカー間の関連性

- a. 血清 ALP 値と BMD 値の変化率の相関；3M で、血清 ALP 値と BMD 値に正相関があった。
- b. 血清 ALP 値と ucOC 値の変化率の相関；3M で、血清 ALP 値と ucOC 値に正相関があった。
- c. 血清 ALP 値と ucOC 値の変化率の相関；6M で、血清 ALP 値と ucOC 値に正相関があった。

#### ②-4 IgAN群における、性差の骨強度への影響

男児7名で平均年齢は $11.0 \pm 3.9$  歳、女児は6名で平均年齢は  $14.0 \pm 2.7$  歳であった。思春期早発や遅発症の症例はいなかった。

血清TRACP-5b値 は24Mにおいて、男児では0Mと有意差はなかったが( $P = 0.2562$ )、女児では有意に低下した( $P = 0.0061$ )。BMD値は18Mと24Mにおいて、男児では0Mと比較して有意に上昇したが( $P = 0.0250$ 、 $P = 0.0081$ )、女児では有意差がなかった( $P = 0.9840$ 、 $P = 0.4471$ )。血清ALP値と血清ucOC値では、性差による動態の違いはなかった (表3)。

(表3) IgAN群における、性差の骨強度への影響

IgAN群	
ALP	性差なし
TRACP-5b	24Mにおいて、女児は有意に低下。
ucOC	性差なし
BMD	18Mと24Mにおいて、男児は有意に上昇。

#### IV. 考察

本研究では、以下の3点を明らかにした(19)。

(1) **血清ALP（骨形成）は血清TRACP-5b（骨吸収）より鋭敏な骨質マーカーである。**

ISSNS群とIgAN群の両群において、ステロイド開始1か月後に、血清ALP値は低下したが、血清TRACP-5b値に変化はなかった。以上から、血清ALPは、ステロイドの骨質に対する影響を、より鋭敏に反映する骨質マーカーといえる。

(2) **血清ALP値と血清TRACP-5b値が低下することで、BMD値が低下する。**

IgAN群では、ステロイド開始3か月後に、血清ALP値と血清TRACP-5b値の両者が低下し、BMD値も同時に低下した。一方、血清ALP値のみ低下したISSNS群では、BMD値は低下しなかった。以上は、血清ALP値と血清TRACP-5b値が共に低下することで、BMD値が低下することを示す。

(3) **血清ucOCは、骨強度を直接は反映しない。**

ステロイドにおける血清ucOC値の低下は、骨形成マーカーであるOCの低下を反映しており、血清ucOCは、直接的な骨強度の指標とはなりにくい。

我々の知る限り、小児ISSNSと小児IgANにおいて、骨密度の評価としてBMD値、および、骨質の評価として3種類の骨代謝マーカーの値、つまり、血清ALP値、TRACP-5b値、ucOC値を用いて、ステロイド治療の骨強度に与える影響を解析した報告は、本研究が初めてである。

以下に、ISSNS群とIgAN群、それぞれの群で、上記の点に関して詳細な考察を示す。

##### ① ISSNS群における、ステロイド治療の骨強度への影響

ISSNS群においては、ISKDCプロトコルに準じてステロイドを1か月間使用すると、ステロイドによる骨形成抑制を反映して、血清ALP（骨形成マーカー）値は低下した。同時に血清ucOC（骨基質関連マーカー）値も低下したが、これは骨形成抑制に伴い、血清オステオカルシン（OC；骨形成マーカー）値が低下したことが影響した可能性がある。その理由は、ステロイドは、血清総OC値とucOC値を低下させるためである(20)。実際、ステロイド終了後には、血清ALP値の上昇にともない、血清ucOC値も再上昇した。これは、ステロイド終了による骨形成の回復に伴う血清OC値の上昇を反映して、血清ucOC値も上昇したためと考えられる。このため、3Mの血清ucOC値が治療前値と比較し上昇したこと

は、ステロイドによる強力な骨形成抑制からの反動による血清総OC値の上昇に起因した血清ucOC値の上昇を反映している可能性がある。本来であれば、血清ucOC値の上昇が骨質の劣化を示唆する(13)。しかし、ステロイドは血清ucOC値を低下させるので、ステロイド使用下では、血清ucOC値の低下が骨質低下を示唆する可能性がある。

血清TRACP-5b（骨吸収マーカー）値に有意な変化はなかった。これは、ステロイドは骨吸収と比較し、骨形成をより強力に抑制することに起因する(21)。ISKDCプロトコルに準じたステロイド治療は、骨吸収に統計学上有意な影響を与えない可能性がある。

BMD値も有意な変化はなかった。腎疾患において、BMD値は、ステロイド治療の期間および積算量と負の相関にあることが分かっているが(22)、ISKDCの治療プロトコルに準じた8週間の総ステロイド量（平均  $1.2 \pm 0.2$  mg/kg/日）は、BMD値に影響しない可能性がある。

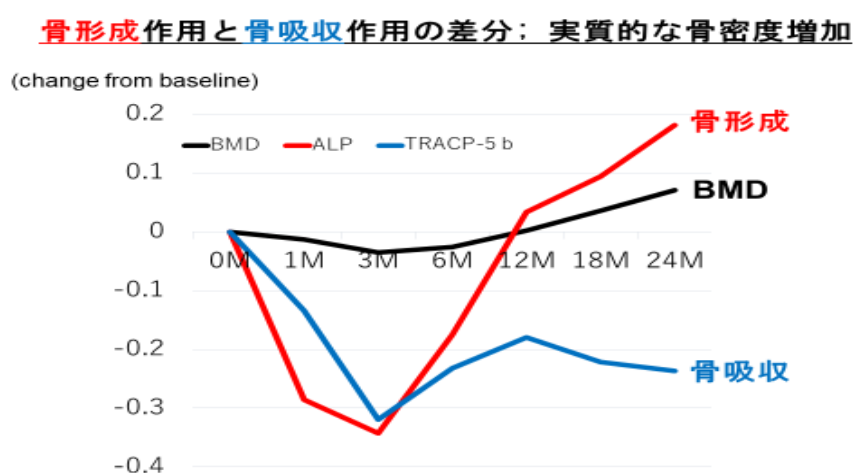
ISSNS群において、ステロイドは、BMD値に影響を与えなかったが、骨形成を反映する血清ALP値を低下させたため、骨強度は低下した。骨密度が正常であるものの、骨質低下によると考えられる骨折をきたしたネフローゼ男児の報告があるのは、先に紹介した通りである(7)。ステロイド治療中は、骨密度のみの経過観察では不十分であり、骨代謝マーカーの測定による骨質評価も同時に行う必要があると考えられる。

## ② IgAN群における、ステロイド治療の骨強度への影響

IgAN群では、1M～3Mにかけて血清ALP値が低下し、3Mで血清TRACP-5b値が低下し、3MからBMD値も低下した。3Mにおいては、BMD値と血清ALP値に正相関があった。そして、血清ALP値と血清TRACP-5b値が上昇し始めると、遅れてBMD値は治療前値に戻った。これらの結果は、血清ALP値と血清TRACP-5b値の推移を同時に評価することで、BMD値の変化を予測できる可能性を示唆する。我々の以前の検討においても、IgAN群では、BMD値の低下に先行して、血清ALP値が低下した(23)。また、これまでの報告では、骨吸収抑制薬の開始1か月後に、骨形成マーカーであるI型プロコラーゲン-N-プロペプチド

(P1NP)の血中濃度が上昇すると、薬剤開始12か月後にはBMD値も上昇した、とするものもある(24)。これらの報告は、BMD値の変化を予測するために、血清ALP値と血清TRACP-5b値を同時に評価することの有用性を支持している。

結果から推定される骨代謝バランスの経過を図22に示したが、6M～24Mの期間における骨形成と骨吸収のバランスは、骨形成に傾いていた可能性がある（図22）。なぜなら、その期間に骨形成マーカーである血清ALP値は治療前値に回復していたが、骨吸収マーカーである血清TRACP-5b値は治療前値と比較し、低いまま推移していたからである。実際に、骨形成が優位な状態が持続すると、BMD値が上昇することが報告されており(25)、本研究では、6M～24Mの期間に骨形成が優位な状態となったことで、12MのBMD値の回復と、24MにおけるBMD値の上昇につながった可能性がある。



(図 22) IgAN観察期間内の、骨形成と骨吸収のバランス

骨形成、骨吸収とBMDの経過を示す。3Mまで、骨形成、骨吸収とも低下したが、6M以降、骨形成は上昇し、骨吸収は0Mより低いまま推移した。6M～24Mの期間に骨形成>骨吸収となったことで、12MにBMD値が回復し、24MにBMD値が上昇した。

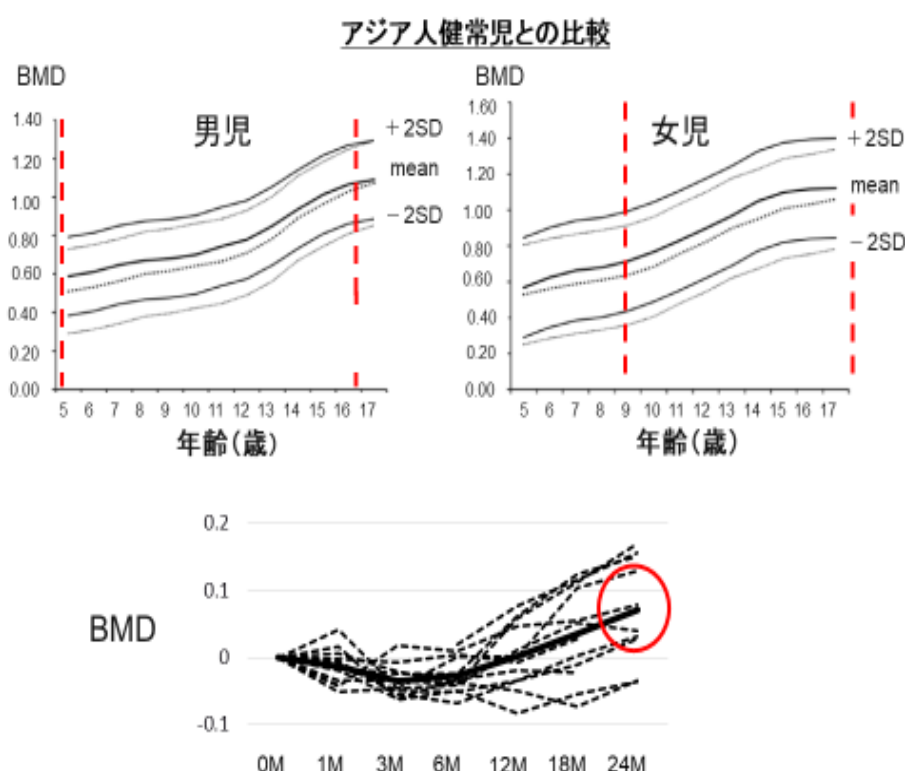
1M～3Mにおいて血清ALP値は低下したが、血清ucOC値に有意な変化はなかった。当科治療プロトコルでは、IgAN群はビタミンK拮抗薬であるワーファリンを2年間内服していた。Nambaらは、心房細動の患者において、ワーファリン使用群は非使用群と比較して、血清ucOC値が3倍であったと報告している(26)。骨芽細胞が分泌するOCは、ビタミンKサイクルを利用して、 $\gamma$ カルボキシル化され、カルボキシル化OC(cOC)となり、骨基質の構造安定化に寄与する。このカルボキシル化が不十分だと、低カルボキシル化OC(ucOC)となり、血中に放出され、血清ucOC値が上昇する。ワーファリンはビタミンKに拮抗して作用を発現するため、ビタミンKサイクルの阻害により、OCの $\gamma$ カルボキシル化が不十分となると、血清ucOC値は上昇する(27)。このために、我々の症例では、ワーファリンのビタミンK拮抗作用による血清ucOC値の上昇によって、ステロイドによる



血清 ucOC 値の低下が相殺されることで、血清 ucOC 値に有意な変化が現れなかった可能性がある。ワーフアリン療法中は、血清 ucOC 値は骨代謝の適切な指標にはならないと、考えられる。実際に、図 19 で他児と異なる変動パターンを呈した 2 名のうち 1 名（12 歳男児）では、ワーフアリン治療下における無症候性ビタミン K 欠乏症によって、独特な血清 ucOC 値の変動パターンを誘導した可能性がある。

BMD 値は 3M と 6M で低下し、ステロイド治療の終了した 12M には回復した。BMD 値は、ステロイドの使用期間と積算量と負の相関があり (22)、ステロイド治療の終了後に自然経過で回復する (28)。これらの知見は、本研究の経過と合致している。

また、小児期では、年齢の上昇とともに BMD 値も上昇する (図 23) (29)。これは、本研究において 24M での BMD 値が治療前値と比較し、上昇していた事実とも一致している。この 24M での BMD 値の上昇は、ステロイド終了後の生理的な上昇を示しているものと考えられる。



(図 23) IgA 腎症群患児とアジア人健常児における、BMD 値の比較

上図；アジア人健常児の男女における、BMD 値の推移 (29)。

下図；IgA 腎症群（本研究）における、BMD 値の推移。

24M の BMD 値が治療前値より上昇していたが、これはアジア人健常児における BMD 値の推移と同様の傾向であった。

IgAN群の、図18と図19において、それぞれ2人ずつ、血清TRACP-5b値と血清ucOC値の動態が他症例の変動と異なる症例がいた。これらそれぞれ2名は同一症例ではなかった。

図18において、この2名の血清TRACP-5b値は3Mまで、治療前値と比較して高値で推移した。成人の膠原病症例において、1週間のステロイド治療によって骨吸収マーカー値が上昇した報告がある(30)。この報告では、その骨吸収マーカー値の上昇の理由を、ステロイドによる破骨細胞の寿命の延長による、ステロイド治療下の早期かつ一過性の骨吸収亢進を反映している、と結論付けている。我々の2名の独特な血清TRACP-5b値の推移も、ステロイド治療下の、早期かつ一過性の骨吸収亢進を反映している可能性がある。

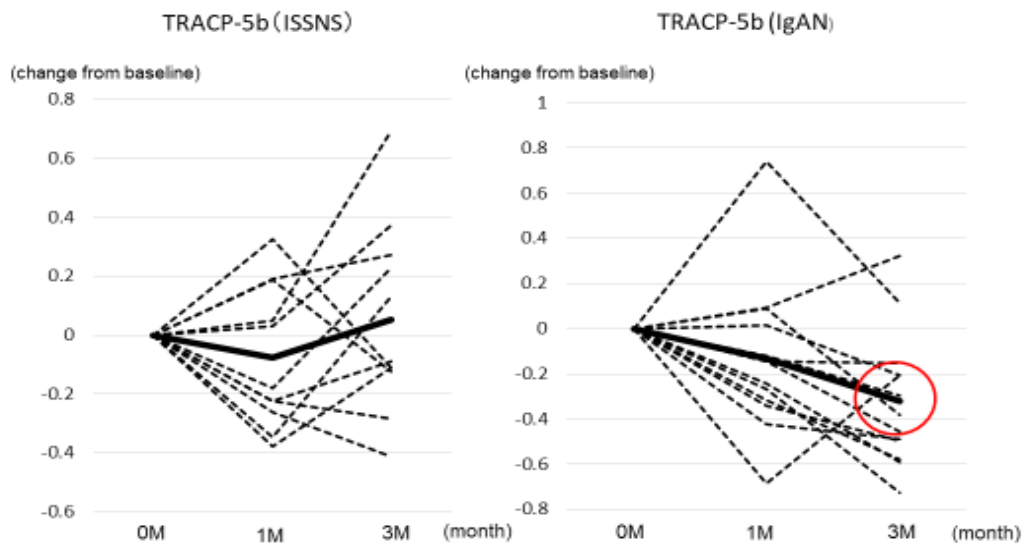
図19において、他症例と変動パターンの異なった2名のうち1名は11歳男児で、観察期間を通して血清ucOC値と血清ALP値は治療前値と比較して高値で推移した。特に、この男児では、血清ALP値、ucOC値そしてTRACP-5b値は24Mにおいて、対象群の中で最大の上昇を示し、24MのBMD値は治療前値より上昇していた。この結果は、本男児の骨代謝が他児より活発であったことを示唆しており、実際に、観察期間内に11.7cmの身長増加を示した。

### ③ ISSNS群とIgAN群間における、ステロイド治療の骨強度への影響の比較

ISSNS群とIgAN群では、ステロイド治療開始から3か月後までの、BMD値と3種類の骨代謝マーカー値の推移は異なる経過であった(図24、25、26)。

IgAN群では、BMD値と血清TRACP-5b値は、3Mで低下していたが、ISSNS群では変化なかった(図24、26)。ISSNSやIgANという腎疾患自体が骨強度に影響を与えるという報告はなく、ステロイド累積量と骨吸収マーカー値には負の相関がある、とする報告(15)があるため、この動態の相違は平均ステロイド量の違い(ISSNS群; 0.27 mg/kg/日、IgAN群; 0.70 mg/kg/日)に起因している可能性がある。

### ISSNSとIgANの比較: TRACP-5b(骨吸収)



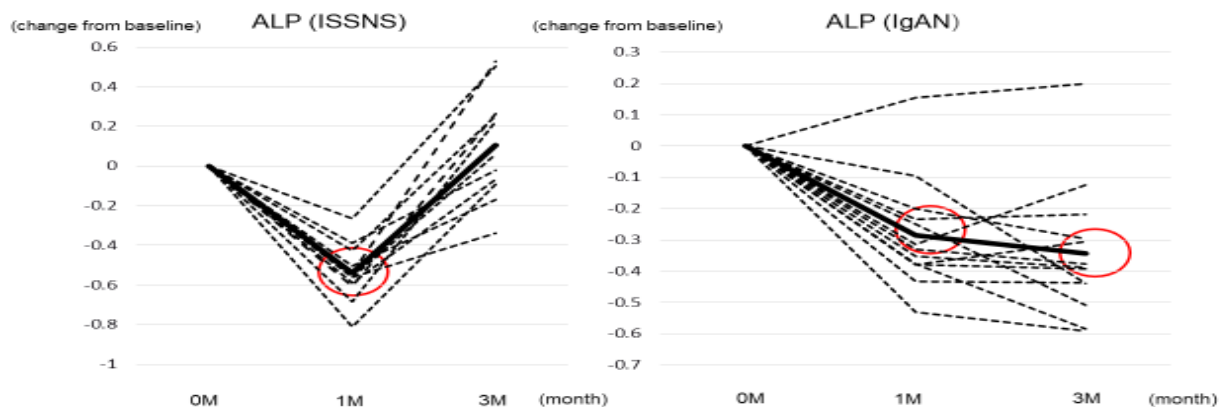
(図 24) ISSNS 群 (左図) と IgA 腎症群 (右図) 間の血清 TRACP-5b 値推移の比較

TRACP-5b は、IgAN (3M) で低下したが、ISSNS では低下なし。

ステロイド量の違い (0.27 vs 0.70 mg/kg/day) に起因した可能性があった。

IgAN群では、BMD値が低下した3Mに、血清ALP値と血清TRACP-5b値の両者も低下しており、ステロイドによる骨形成と骨吸収の抑制が示唆された。一方、ISSNS群では血清ALP値のみ低下し、BMD値と血清TRACP-5b値に有意な変化はなかった (図24、25、26)。この両群における動態の相違から、ステロイド治療下では、骨形成と骨吸収の両者が抑制されて初めてBMD値が低下する可能性が示唆される。

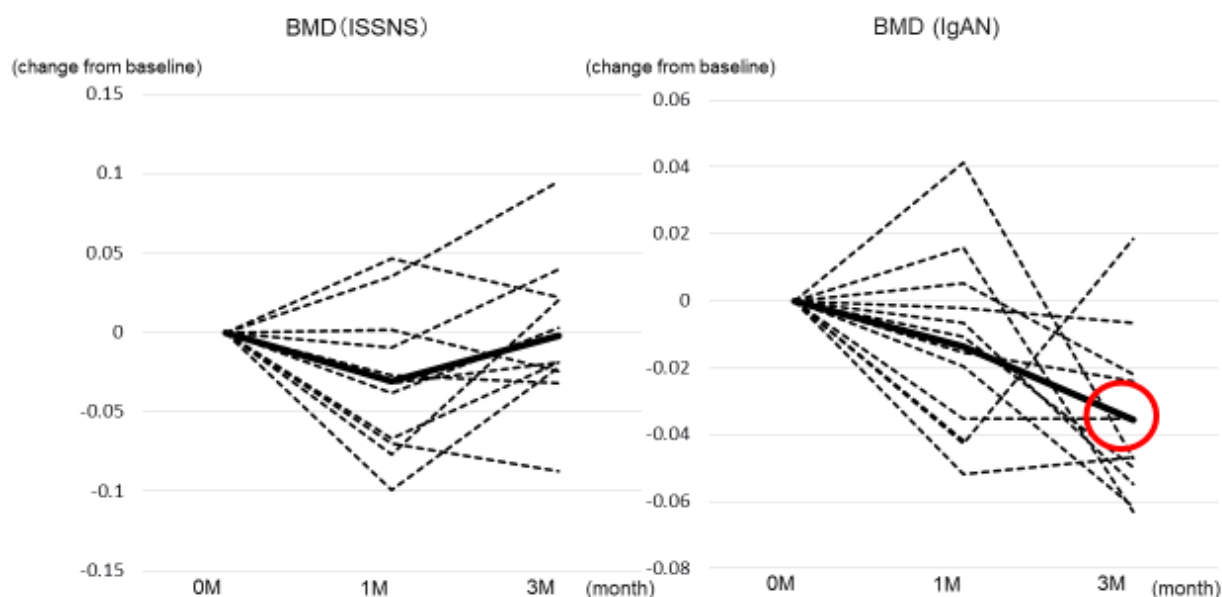
### ISSNSとIgANの比較: ALP(骨形成)



(図 25) ISSNS 群 (左図) と IgA 腎症群 (右図) 間の血清 ALP 値推移の比較

1Mで、ISSNS群とIgAN群で速やかに低下したが、3Mでは、IgAN群のみ低下した。

## ISSNSとIgANの比較: BMD (骨密度)



(図 26) ISSNS 群 (左図) と IgA 腎症群 (右図) 間の BMD 値推移の比較

BMD 値は、IgAN (3M) のみ低下した。血清 ALP 値かつ血清 TRACP-5b 値の両者が低下して初めて、BMD 値が低下する可能性があった。

### ④ 性差や年齢によるステロイド治療の骨強度への影響

#### ISSNS群

男児 6 名で平均年齢は  $8.3 \pm 3.6$  歳、女児は 5 名で平均年齢は  $9.4 \pm 3.4$  歳であった。思春期早発や遅発症の症例はいなかった。ISSNS 群では、3M の血清 ALP 値が、男児では有意に上昇していたが、女児では有意な変化はなかった。Tobiume らは、男児の骨型 ALP 値は、7 歳から 14 歳にかけて徐々に上昇するのに対して、女児では 11 歳から 16 歳にかけて徐々に低下すると報告している (31)。この年齢に関連した骨型 ALP 値の変化が、男児における 3M での血清 ALP 値の上昇に寄与した可能性がある。

#### IgAN 群

男児 7 名で平均年齢は  $11.0 \pm 3.9$  歳、女児は 6 名で平均年齢は  $14.0 \pm 2.7$  歳であった。思春期早発や遅発症の症例はいなかった。血清 TRACP-5b 値は 24M において、男児では 0M と比較して有意差がなかったが、女児では有意に低下していた。Rauchenzauner らは、女児の血清 TRACP-5b 値は、男児よりおよそ 2 年早く、12.5 から 17.5 歳にかけて

より大きな低下傾向になることを報告している(32)。性差による血清 TRACP-5b 値の推移の違いが、24M の血清 TRACP-5b 値に影響した可能性があった。BMD 値は 18M と 24M において、男児では 0M と比較して上昇していたが、女児では有意差がなかった。女児では、年齢に伴う BMD 値の上昇は 15～16 歳で横ばいになるのに対して、男児では 18～19 歳まで上昇し続ける(29)。この性差による BMD 値の推移の違いが、IgAN 群における 18M と 24M での動態に影響した可能性がある。

これらの ISSNS 群と IgAN 群における BMD 値と骨代謝マーカー値の推移の違いは、対象群の年齢層（平均  $8.8 \pm 3.5$  歳 vs  $12.4 \pm 3.7$  歳）と観察期間（3 か月 vs 24 か月）の違いが影響した可能性が考えられる。

## V. 結論

小児腎疾患におけるステロイド治療は、骨密度と骨質で構成される、骨強度を低下させる。その骨強度の評価には、骨密度だけでなく、骨質を評価することも重要である。そして、本研究は以下の3点を明らかにした。

- ① 血清ALP（骨形成）は血清TRACP-5b（骨吸収）より鋭敏な骨質マーカーである。
- ② 血清ALP値かつ血清TRACP-5b値が低下することで、BMD値が低下する。
- ③ 血清ucOCは、骨強度を直接は反映しない。

本研究の知見は、小児におけるステロイド性骨粗鬆症の管理の改善につながると同時に、ステロイド治療下での適切な運動を通じた小児の健やかな発育に役立つものと考えられる。

一方、本研究の限界として、対象群に骨折発症例が含まれていない点がある。本研究で得た知見を、長期ステロイド使用下の骨折危険群や骨折例でも検討し、骨密度と骨代謝マーカーを組み合わせた骨強度の推移と、骨折との関連性を明らかにする必要がある。また、小児ステロイド使用下におけるucOCの動態、そして、脆弱性骨折との関連性に関する既報は、ともにない。今後症例数を蓄積し、かつ骨折例での検討を経たのちに、骨質評価におけるucOC測定の意義を明らかにすることが求められる。

## VI. 参考文献

1. 田中 良. 【骨粗鬆症関連ガイドラインと日常診療】続発性骨粗鬆症の診断、治療 治療関連骨粗鬆症 ステロイド性骨粗鬆症. THE BONE. 2016;30(1):71-5.
2. Nawata H, Soen S, Takayanagi R, Tanaka I, Takaoka K, Fukunaga M, Matsumoto T, Suzuki Y, Tanaka H, Fujiwara S, Miki T, Sagawa A, Nishizawa Y, Seino Y, Subcommittee to Study Diagnostic Criteria for Glucocorticoid-Induced O. Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis of the Japanese Society for Bone and Mineral Research (2004). J Bone Miner Metab. 2005;23(2):105-9.
3. Hodson EM, Knight JF, Willis NS, Craig JC. Corticosteroid therapy in nephrotic syndrome: a meta-analysis of randomised controlled trials. Arch Dis Child. 2000;83(1):45-51.
4. Pozzi C, Andrulli S, Del Vecchio L, Melis P, Fogazzi GB, Altieri P, Ponticelli C, Locatelli F. Corticosteroid effectiveness in IgA nephropathy: long-term results of a randomized, controlled trial. J Am Soc Nephrol. 2004;15(1):157-63.
5. LoCascio V, Bonucci E, Imbimbo B, Ballanti P, Adami S, Milani S, Tartarotti D, DellaRocca C. Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy. Bone Miner. 1990;8(1):39-51.
6. 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. 2003;48(11):3224-9.
7. Sbrocchi AM, Rauch F, Matzinger M, Feber J, Ward LM. Vertebral fractures despite normal spine bone mineral density in a boy with nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol. 2011;26(1):139-42.
8. Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention D, Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA. 2001;285(6):785-95.
9. Compston J. Bone quality: what is it and how is it measured? Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006;50(4):579-85.
10. Nishizawa Y, Ohta H, Miura M, Inaba M, Ichimura S, Shiraki M, Takada J, Chaki O, Hagino H, Fujiwara S, Fukunaga M, Miki T, Yoshimura N. Guidelines for the use of bone metabolic markers in the diagnosis and treatment of osteoporosis

(2012 edition). *J Bone Miner Metab.* 2013;31(1):1-15.

11. 更田 恵, 出山 義, 吉村 善, 鈴木 邦, 山崎 裕. ヒトアルカリ性ホスファターゼの基質選択性と阻害剤に対する感受性の相違. *北海道歯学雑誌.* 2017;38(1):48-55.
12. 望月 善. 【最新の骨粗鬆症学-骨粗鬆症の最新知見】骨粗鬆症の診断 骨代謝マーカー 骨吸収マーカー TRACP-5b. *日本臨床.* 2013;71(増刊 2 最新の骨粗鬆症学):243-7.
13. Suzuki Y, Maruyama-Nagao A, Sakuraba K, Kawai S. Level of serum undercarboxylated osteocalcin correlates with bone quality assessed by calcaneal quantitative ultrasound sonometry in young Japanese females. *Exp Ther Med.* 2017;13(5):1937-43.
14. Mori Y, Kasai H, Ose A, Serada M, Ishiguro M, Shiraki M, Tanigawara Y. Modeling and simulation of bone mineral density in Japanese osteoporosis patients treated with zoledronic acid using tartrate-resistant acid phosphatase 5b, a bone resorption marker. *Osteoporos Int.* 2018;29(5):1155-63.
15. Esbjorner E, Arvidsson B, Jones IL, Palmer M. Bone mineral content and collagen metabolites in children receiving steroid treatment for nephrotic syndrome. *Acta Paediatr.* 2001;90(10):1127-30.
16. Kosan C, Ayar G, Orbak Z. Effects of steroid treatment on bone mineral metabolism in children with glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome. *West Indian Med J.* 2012;61(6):627-30.
17. Tsampalieros A, Gupta P, Denburg MR, Shults J, Zemel BS, Mostoufi-Moab S, Wetzsteon RJ, Herskovitz RM, Whitehead KM, Leonard MB. Glucocorticoid effects on changes in bone mineral density and cortical structure in childhood nephrotic syndrome. *J Bone Miner Res.* 2013;28(3):480-8.
18. 上村 治, 山田 拓, 永井 琢. 【子どもの運動】腎疾患と運動制限. *小児内科.* 2009;41(8):1209-13.
19. Aoyagi J, Kanai T, Ito T, Odaka J, Saito T, Betsui H, Kurosaki M, Maru T, Yamagata T. Glucocorticoid effects on bone strength in children with renal diseases. *Nephrology (Carlton).* 2021;26(2):119-25.
20. Parker L, Lin X, Garnham A, McConell G, Stepto NK, Hare DL, Byrnes E,

- Ebeling PR, Seeman E, Brennan-Speranza TC, Levinger I. Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance in Men Is Associated With Suppressed Undercarboxylated Osteocalcin. *J Bone Miner Res.* 2019;34(1):49-58.
21. Wojnar J, Roszkowska-Blaim M, Panczyk-Tomaszewska M. [Dynamics of bone biochemical markers in nephrotic children treated with prednisone and metabolites of vitamin D]. *Przegl Lek.* 2007;64(9):552-8.
  22. Haris A, Szabo A, Lanyi E, Mucsi I, Polner K. Acute and long-term effects of corticosteroid therapy on bone metabolism in patients with kidney diseases. *Clin Nephrol.* 2012;78(1):17-23.
  23. Aoyagi J, Kanai T, Ito T, Odaka J, Saito T, Betsui H, Yamagata T. The Effects of Glucocorticoids on Bone Strength in Children with Renal Diseases. *Journal of Comprehensive Pediatrics.* 2016;7(4):e38727.
  24. Niimi R, Kono T, Nishihara A, Hasegawa M, Matsumine A, Nakamura T, Kono T, Sudo A. An algorithm using the early changes in PINP to predict the future BMD response for patients treated with daily teriparatide. *Osteoporos Int.* 2014;25(1):377-84.
  25. Nakatoh S. Bone turnover rate and bone formation/resorption balance during the early stage after switching from a bone resorption inhibitor to denosumab are predictive factors of bone mineral density change. *Osteoporos Sarcopenia.* 2017;3(1):45-52.
  26. Namba S, Yamaoka-Tojo M, Hashikata T, Ikeda Y, Kitasato L, Hashimoto T, Shimohama T, Tojo T, Takahira N, Masuda T, Ako J. Long-term warfarin therapy and biomarkers for osteoporosis and atherosclerosis. *BBA Clin.* 2015;4:76-80.
  27. Shearer MJ. Vitamin K. *Lancet.* 1995;345(8944):229-34.
  28. Ward LM, Konji VN, Ma J. The management of osteoporosis in children. *Osteoporos Int.* 2016;27(7):2147-79.
  29. Nakavachara P, Pooliam J, Weerakulwattana L, Kiattisakthavee P, Chaichanwattanakul K, Manorompatarasarn R, Chokeyphaibulkit K, Viprakasit V. A normal reference of bone mineral density (BMD) measured by dual energy X-ray absorptiometry in healthy thai children and adolescents aged 5-18 years: a new reference for Southeast Asian Populations. *PLoS One.* 2014;9(5):e97218.



30. Tanaka Y, Mori H, Aoki T, Atsumi T, Kawahito Y, Nakayama H, Tohma S, Yamanishi Y, Hasegawa H, Tanimura K, Negoro N, Ueki Y, Kawakami A, Eguchi K, Saito K, Okada Y. Analysis of bone metabolism during early stage and clinical benefits of early intervention with alendronate in patients with systemic rheumatic diseases treated with high-dose glucocorticoid: Early DIagnosis and Treatment of OsteopoRosis in Japan (EDITOR-J) study. *J Bone Miner Metab.* 2016;34(6):646-54.
31. Tobiume H, Kanzaki S, Hida S, Ono T, Moriwake T, Yamauchi S, Tanaka H, Seino Y. Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker for bone formation and response to GH therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(7):2056-61.
32. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, Finkenstedt G, Hogler W. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):443-9.