

## 発育期ラット脛骨の構造に及ぼす 短期間不動の影響

Effects of short term immobilization on tibial structure in growing rat

飛田 哲也\*      秋山 和歌子\*      大迫 正文\*  
TOBITA Tetsuya    AKIYAMA Wakako    OHSAKO Masafumi

### 要旨

本研究は、発育段階にあるラットに短期間の不動処置を施し、脛骨近位海綿骨の骨形成および骨吸収の変化を形態学的に観察することにより、不動化に伴う骨梁の密度や配列に及ぼす影響を、海綿骨の部位別にみた骨梁の機能と、それに及ぼす加重低減の影響に関連づけて検討することを目的とした。5週齢のウィスター系雄性ラットを実験材料とし、それらを対照群、1日不動群、2日不動群および4日不動群に無作為に分類した。実験期間終了後、後肢膝関節を周囲組織と共に一塊として摘出し、種々の標本を作製することにより、肉眼および組織学的に観察した。

二次海綿骨の骨梁は、不動期間が長くなるにしたがって骨吸収が進み、細く疎となるが、それは特に前後の中央部の下方部から骨吸収が始まっていた。対照群の破骨細胞は骨表面から離れた骨髓腔内に存在するものが多く見られたが、不動期間が長くなるにしたがって、骨梁表面に破骨細胞様の細胞や吸収窩が二次海綿骨の広い範囲で観察されるようになった。脛骨の切片にマッソン・トリクローム染色を施すと、二次海綿骨の中央部の骨基質には朱色に染まる部分が多くみられるが、前方および後方部のそれは青色に染色された。

骨基質の染色性の違いから、中央部の骨基質は疎構な状態にあり、逆に、前方および後方部は密構で強度的に高い骨基質で構成されていると考えられた。このように、不動化の影響は海綿骨の中でも、大腿骨の加重を脛骨の皮質骨に分散・伝達するのに重要な部位ほど影響が出にくく、そのような部位は骨組織の分化度が高い状態にあることが理解された。

キーワード：海綿骨、組織分化、短期間不動

### はじめに

現在、我が国では約1200万人もの骨粗鬆症患者がおり、それは寝たきり状態を招く原因の第3位とされている。骨粗鬆症は骨量が減少しても自覚症状がないことが多いため、骨折してはじめて骨粗鬆症とわかる場合が多く、患者のうち治療を受けているのは200万人程度と推計されている。これが骨粗鬆症を「沈黙の病気」とする所以である<sup>1)</sup>。

---

\* 東洋大学ライフデザイン学部健康スポーツ学科 Toyo Univ. Faculty of Human Life Design  
連絡先：〒351-8510 埼玉県朝霞市岡 48-1

骨粗鬆症は、その病因や病態から見て原発性（一次性）と続発性（二次性）に区別されているが、前者には女性ホルモンの欠如、老化、カルシウム摂取不足および運動不足などの危険因子が加わって発症する。この疾患は高齢者、特に女性に多くみられ、それには初経前における適切な栄養とカルシウム摂取および成長期における運動歴の有無が影響することから<sup>2-6)</sup>、骨粗鬆症予防は若年期から行われるべきと考えられている。このことから、骨粗鬆症予防を考える上で、発育期の骨について検討することは意義があると考えられる。

円背は骨粗鬆症のひとつの症状であり、それは椎骨海綿骨の骨量減少によって引き起こされる<sup>7)</sup>。骨に加えられる外力は骨梁を介して周囲の皮質骨に分散されることから、骨梁の配列方向はその力線に一致すると考えられている<sup>8)</sup>。そのため、骨への加重減少は骨梁の太さや密度を低下させ、脆弱な構造をもたらすことが推測されるが、事実、このことは無重力条件<sup>9)</sup>や不動状態<sup>10-16)</sup>においた研究によって、明らかにされている。一方、海綿骨は一次および二次の海綿骨から成り、発育期においてはそれらの構造上の違いが明瞭であるが、無重力や不動の影響を一次・二次海綿骨に分けて検討した報告はなされていない。また、不動による初期の変化についても報告はない。

以上のことから、材料として発育期にある5週齢のラットを用いて、脛骨近位海綿骨における骨形成および骨吸収の変化を形態学的に観察することにより、骨梁構造に及ぼす加重低減の影響について検討することを目的とする。

## 実験方法

### <材料および標本摘出>

本研究では、5週齢のウィスター系雄性ラット32匹を材料として用い、それらを実験群と対照群に分類した。実験群のラットには、血行障害が生じぬように十分に注意しながら、歯科用材を用いて作成した不動装置を両後肢足関節に1、2および4日間装着した。

このとき、組織の形成過程を観察するために、生体に無害なCaキレート剤（実験開始時：テトラサイクリン、終了時：カルセイン）を腹腔内に注射し、硬組織に時刻描記を行った。

実験期間終了後、各群のラットをジエチルエーテルにて深く麻酔し、安楽死させた。死亡を確認した上で、ラット後肢の皮を剥離し、後肢膝関節を周囲組織と共に一塊として摘出した。摘出した骨の膝関節面を歯科用エンジンにてトリミングし、脛骨の内外的中央部で矢状方向に切断した。それを速やかに4%パラフォルムアルデヒド液、カルノブスキー固定液または70%エタノール溶液に浸漬し、染色法別に固定時間を変え1～7日間固定した。

### <肉眼的観察および走査電子顕微鏡観察用の標本の作製と観察>

肉眼的観察では、固定された標本を水酸化カリウムに浸漬して有機質を除去した後、水洗、乾燥し実体顕微鏡により観察した。同様に、水酸化カリウム処理した標本を試料台に装着し、カーボンとプラチナを真空蒸着して、走査電子顕微鏡により観察した。また、矢状切断した脛骨にTRAP染色を施し、反応部位を実体顕微鏡により観察した。

#### <組織学的観察用標本の作製と観察>

固定された標本をモースソルン液にて脱灰し、脱水、透徹の後パラフィンに包埋して、マイクロトームにより厚さ5ミクロンの完全連続切片を作成した。それらにマッソン・トリクローム染色を施し、光学顕微鏡により観察した。

#### <樹脂包埋研磨標本の作製と観察>

固定された標本を通法に従い、脱水、透徹の後リゴラック樹脂に包埋し、加温重合した。各ブロックを厚さ約100ミクロンの厚さになるまで丁寧に研磨し、酸エッチングの後トルイジンブルー染色を施して、光学顕微鏡と蛍光顕微鏡にて観察した。

#### <骨形態計測による数値的観察>

各群の脛骨のリゴラック樹脂包埋研磨標本を用いて、二次海綿骨（約50ヶ所）を計測してその数値データを得た。その後、t検定により平均値の差の有意性について統計処理を行った。

## 所 見

#### <形態計測による所見>

骨の形態学的な分析に先だって、次のようなパラメーターを骨形態計測学的手法により求めた。

まず、各群における骨梁の面積を比較すると、不動処置2日後および4日後では、対照群に比べ有意 ( $P<0.05$ ) に低い値が認められる (図1)。また、各群の海綿骨における骨梁数を比較すると、群間の差は統計的に有意ではないが、不動1日後からすでに骨梁が減少し、その後も徐々に減少していく傾向が認められる (図2)。さらに、各群の海綿骨にみられる骨梁の厚さを比較すると、不動2日群および4日群は対照群に比べ、これも統計的には有意ではないが、減少の傾向がみられる (図3)。また、各群の骨梁表面にみられる吸収窩の長さを対照群と比較すると、すでに不動処置1日後から吸収窩が有意 ( $P<0.01$ ) に増加する (図4)。

#### <肉眼観察による所見>

水酸化カリウム処理した脛骨の海綿骨を肉眼的に観察すると、短期間の不動処置によって海綿骨の減少が見られる。いずれの群においても、骨端板はその処理によって溶解され消失している。また、骨端板直下には板状の構造物として見える一次海綿骨が存在するが、これに関してもその上下的な厚さに群間でほとんど違いが認められない。しかし、二次海綿骨に関しては、不動の影響が顕著に認められる。まず、対照群のそれは上下的な幅が厚く、骨端板からかなり離れた部位にまで広がっている。不動1日および2日後では、二次海綿骨の中でも下方の領域の骨梁が消失している。さらに、不動4日後ではその消失が顕著となり、対照群に比べて二次海綿骨の上下的な厚さの減少が明瞭に観察される (図5)。

脛骨の矢状切断標本にTRAP染色を施して肉眼的に観察した。対照群では、骨端海綿骨の表層部、すなわち関節軟骨と骨端海綿骨との境界部付近、ならびに骨端板と骨端海綿骨の境界部付近にTRAP

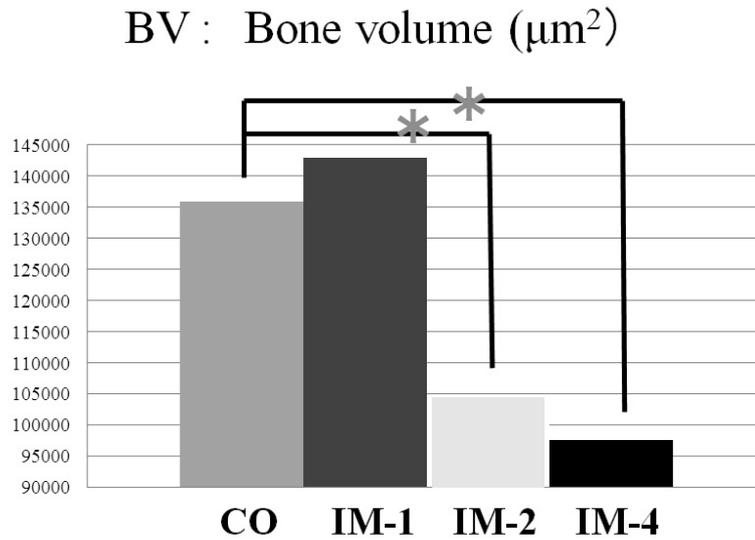


図1. 各群における骨梁の面積の比較

不動処置2日後および4日後において、対照群より有意 ( $P < 0.05$ ) な骨梁面積の減少がみられる。

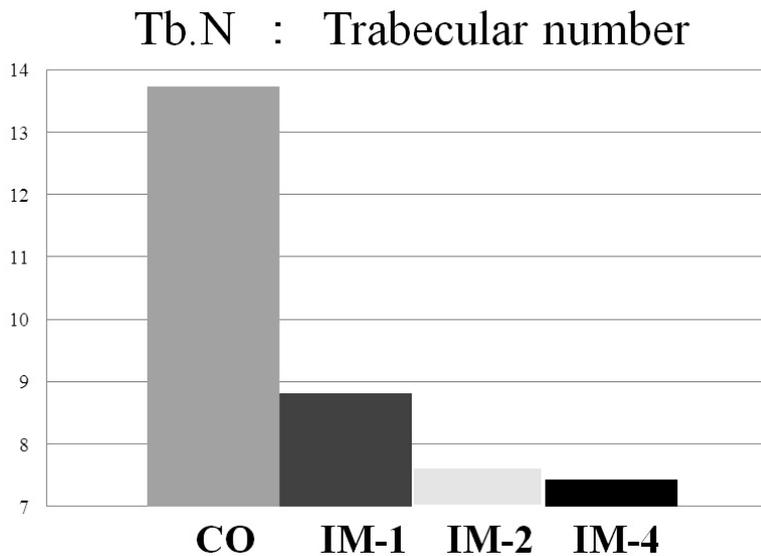


図2. 各群の海綿骨における骨梁数の比較

対照群と各群の差は統計的には有意でなかったが、不動1日後からすでに骨梁が減少し、その後も徐々に減少していく傾向が認められる。

染色で強い陽性反応が認められる。また、骨端板直下の一次海綿骨においては、その弱い反応が観察される。1日不動群では、対照群で見られた骨端海綿骨表層部や骨端板直下のTRAP染色の反応がやや低下している。しかし、不動2日後から不動4日後になるにしたがって、骨端および骨幹端（骨端板直下）におけるTRAP染色の反応は強くなり、特に4日不動群ではその陽性反応を示す範囲は不動1日後に比べて、かなり広がる（図6～9）。

Tb.Th : Trabecular Thickness (μm)

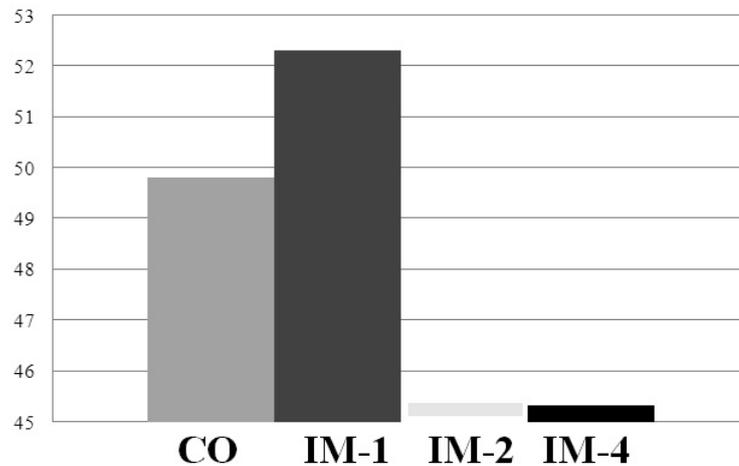


図3. 各群の海綿骨にみられる骨梁の厚さの比較

対照群に比べ、不動2日群および4日群では骨梁の幅の減少傾向がみられるが、その差は有意ではない。

ES : Eroded surface(μm)

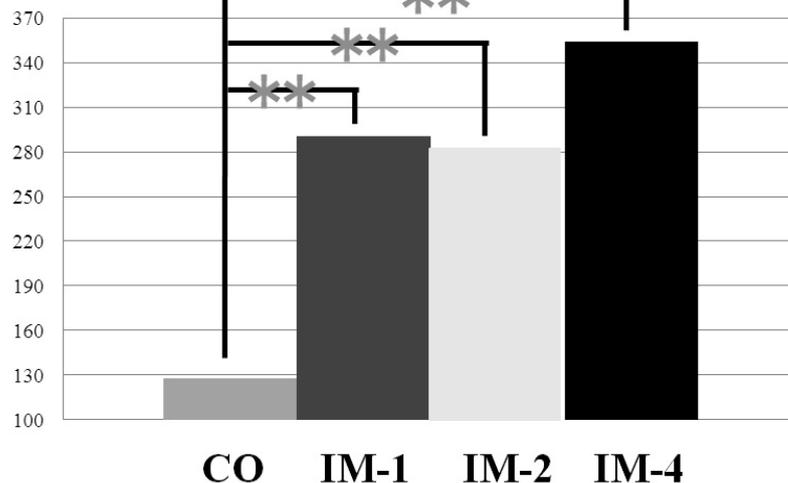


図4. 骨梁表面にみられる吸収窩の長さに関する群間の比較

対照群の骨梁に比較して、すでに不動処置1日後から吸収窩が有意 (P<0.01) に増加し、その後も同様に吸収窩が多く存在する。

<組織学的観察による所見>

水酸化カリウム処理した二次海綿骨を走査電子顕微鏡で観察した。対照群では、前方の骨梁は後上方から前下方に配列し、それ以外の部位の骨梁は前上方から後下方に向かって配列しているが、いずれもその下端は前方または後方の皮質骨に融合している。1日不動群では、対照群の海綿骨の密度や配列状態とほとんど変わらないが、海綿骨全体の骨梁の太さにやや減少が認められ、前方下端部では骨梁の消失も見られ始める。2日不動群では、海綿骨下部の中でも前方および中央部の骨梁の消失が

顕著となり、後方部においても骨梁の密度の低下が観察される。4日不動群では、そのような前方および中央部の骨梁減少に加え、後方部の骨梁も消失し始める。また、この群では海綿骨下部における骨梁減少に加え、二次海綿骨上部の骨梁に配列の乱れも観察される(図10～図13)。

海綿骨をさらに拡大して観察すると、対照群では前上方から後下方に向かって配列する骨梁の間を連結するように、横方向に配列する骨梁が存在しており、それによって海綿骨全体は目の粗い網状構造を形成している。1日不動群では、骨梁が全体的に細くなるとともに、横方向に配列した骨梁が消失し始め、網状構造の目はさらに粗くなる。不動2日後では、骨梁の密度および太さの減少が顕著となり、最終的に不動4日後では、多くの骨梁が消失する(図14～図17)。

不動2日後における二次海綿骨の骨梁表面を走査電子顕微鏡により弱拡大で観察すると、そこには粒子状の構造物が多数見られる。それを拡大すると、破骨細胞様の細胞が骨梁表面に付着し、その近傍の骨梁表面には吸収窩と思われる窪みが認められる(図18・19)。同様に、不動4日後において残存する二次海綿骨下部の骨梁表面を観察すると、骨梁の表面、特にその下端部付近において粒子状の構造物が多数存在している。そのような部位を拡大すると、不動2日後に見られるものよりも大型の破骨細胞様細胞が、骨梁表面を覆うように存在しているのが認められる(図20・21)。

トルイジンブルー染色したりゴラック樹脂包埋研磨標本を用いて、対照群および不動4日群における二次海綿骨の骨梁を拡大して観察すると、対照群の骨梁表面の多くの部位には、青く染まる骨前質が形成されているが、4日不動群ではそのような状態はほとんど観察されない(図22・23)。同部位を蛍光顕微鏡で観察すると、図22のように、対照群の骨梁表面に見られる骨前質の存在部位に相当して、テトラサイクリンおよびカルセインのラベルが認められる。図23の4日不動群においてもそれらのラベルが観察されるが、それは対照群に比べてかなり少ない(図24・25)。

エポキシ樹脂包埋厚切り切片にトルイジンブルー染色を施して観察すると、対照群では二次海綿骨の骨梁表面に、骨芽細胞が上皮様に配列しているのが認められる。その細胞を拡大して観察すると、核は球形で偏在し、明瞭な1個の核小体を有している。細胞質全体はトルイジンブルー染色で濃い青色に染まるが、細胞中央部には発達したゴルジ野が存在する(図26・27)。2日不動群では、骨梁表面に上皮様に配列した骨芽細胞は少なく、その多くはborn lining cell様となり、また、その中には骨梁表面の骨前質を介して存在するものも観察される(図28・29)。不動4日後では、骨梁表面に大型の破骨細胞が付着した状態が多く認められる。また、骨梁表面付近の骨髓腔内に破骨細胞様の細胞が見られることもあり、そのような細胞にはそれに類似した構造を有する他の細胞との融合像が観察される(図30～33)。

対照群の脛骨矢状断切片にマッソン・トリクローム染色を施すと、二次海綿骨の中でも、前方および後方部の骨梁は全体的に朱色に染まるが、中央部の骨梁はやや青みがかって観察される(図34)。同切片の前方または後方部の骨梁を拡大すると、この部位の骨梁は太く上下方向に配列しているが、基質はボンソーフクシンのみならず、オレンジGの色素もとって朱色に染まる(図35)。二次海綿骨の中でも前後的中央部の骨梁は、前方および後方部に比べてやや細く、また骨の基質もボンソーフクシンによってのみ染色され、赤色に観察される(図36)。

## 考 察

本研究は、発育期の骨形成および骨吸収の変化を形態学的に観察することにより、海綿骨の部位別にみた骨梁の機能とそれに及ぼす加重低減の影響について検討するものであり、以下に観察された所見をもとに考察する。

小野寺ら<sup>11)</sup>は本研究と同様な不動実験を行い、骨形態計測によりその影響について検討している。それによると、骨量・骨梁数・骨梁幅の減少とそれに伴う骨梁間隙の増加を主体とし、類骨幅の増加を認めなかったとされている。本研究においても、不動化に伴う骨構造の変化の観察法として、骨形態計測の手法を用いて計測し、不動群の脛骨海綿骨で骨梁の面積減少を認めている。骨梁の面積減少は、骨梁の数の減少または個々の骨梁の太さの減少によって生じる可能性があるが、本研究ではそれらの減少がみられていない。不動群で吸収窩の長さが有意に増大しており、このことから骨梁面積の減少は骨吸収による骨梁表面の窪みが多く形成されたためにみられたと考えられる。しかし、骨梁表面に窪みが多く形成されれば、やはり骨梁の幅の減少や、最終的には骨梁減少をも引き起こすであろうが、そのような計測結果は得られていない。これらのことから、本研究における骨梁面積の低下は、骨吸収による個々の骨梁の表面の窪みや変形によって生じたであろうことが推測される。

一方、本研究では走査電子顕微鏡によって各群の骨梁を観察し、二次海綿骨における骨梁の数と幅の減少を認めている。骨形態計測学的な手法によるデータは、走査電子顕微鏡による定性的な所見とは異なり、確かに結果の統計的な検証が可能であるが、前者は二次元的な空間での計測であるために、やはりデータの解釈には双方の所見をもとに検討することが必要とされる。そのような見地から、本研究では三次元的な広がりデータを解釈し、骨梁は不動化に伴って数、太さならびに面積も低下すると考えている。

骨への加重は海綿骨の骨梁を介して周囲の皮質骨に分散されるが、Wolffの法則として知られているように、海綿骨の骨梁パターンは、その伸長方向が加重の主応力方向とほぼ一致する<sup>8)</sup>。本研究における対照群の観察では、骨梁が前上方から後下方に向かって真っすぐ配列しているものが多いのに対して、不動4日後では骨梁方向に乱れが生じ、目の粗い網状構造をなしている。このことから、短い不動期間であっても、骨への加重低減は骨梁の配列変化に速やかに影響を及ぼすことが理解される。

不動の影響は、そのような骨梁の配列方向を変化させるのに留まらず、骨梁の消失さえも招く<sup>12)</sup>。本研究における観察では、不動1日後に海綿骨の中でも前方下端部の骨梁が消失し始め、2日後では前方および中央部の骨梁が完全に消失している。そして、4日後になると前方、中央部に加え、後方部の骨梁も減少しており不動期間が延びるにしたがって、骨梁の消失部位が前方から後方に拡大する。この部位の海綿骨の中でも、中央および後方部の骨梁は、前上方から後下方に向かって配列し、その下端は後方の皮質骨に連結し、骨梁を介する大腿骨側からの加重は、後方の皮質骨に伝達される。したがって、脛骨骨幹端の骨梁の中でも大腿骨側からの加重を伝えるのに重要なのは後方部の骨梁であり、反対に前方部の骨梁には不動化に伴う非加重の影響が最も現れやすい。このように、海綿骨の骨梁には、部位によって不動の影響が早期に現れる部位と、緩やかに現れる部位があると思われる。また、このことから、海綿骨の骨梁の中でも大きな加重伝達に関わる部位と、小さな加重伝達に関わる部位があるであろうことが推測される。

伊東<sup>7)</sup>は、椎骨のX線像を用いた三次元骨構造解析により、骨粗鬆症患者の椎骨海綿骨の骨梁の構造について検討している。それによると、骨粗鬆症の初期段階では椎骨の骨梁のなかで、横方向に配列するものから消失すると述べている。本研究の観察では、1日不動群の場合、横方向に配列した骨梁が消失し始め、海綿骨は全体として目の粗い網状構造を示す。不動2日後では、骨梁の密度および太さの減少が顕著となり、最終的に不動4日後では、多くの骨梁が消失することを認めている。脛骨の海綿骨においても、伊東<sup>7)</sup>が示すように横方向に配列する骨梁から消失しており、その後縦方向に配列する骨梁が消失する。以上のことから、不動化の影響は、骨梁の太さ、数ならびに配列方向に影響をもたらすが、それは横方向に配列する骨梁から見られ始めること、そして、海綿骨の部位別には前方の下端部から生じることが理解される。

大島<sup>9)</sup>の報告によると、無重力条件下に置かれたラットでは、皮質骨骨膜下の骨形成速度、骨基質形成量および骨ミネラル形成量の低下などが見られることから、無重力によって骨形成が低下するとされている。また、大迫<sup>13)</sup>は不動処置されたラットで、実験開始1日後に骨形成が抑制され、2日以降に骨吸収が促進されることを認めている。しかし、本研究の肉眼的観察所見では、不動1日後でTRAP反応が対照群よりも低下している。骨芽細胞が発現するRANKLに破骨細胞前駆細胞のRANKが結合して反応することにより、破骨細胞の分化・誘導がなされる<sup>17)</sup>。したがって、破骨細胞の分化・誘導には骨芽細胞の存在が必要であり、不動1日後で破骨細胞の反応が低下したことは、その時点で生じる骨芽細胞の活性低下が関わると考えられる。

東<sup>14)</sup>は、げっ歯類の後肢を不動化することによって、後肢の骨端部海綿骨と骨幹部皮質骨の減少が誘導されることを報告している。また、大迫<sup>15)</sup>もラットの後肢足関節を5週間不動状態におき、成熟期と発育期のいずれのラットも、大腿骨および脛骨の骨幹端には海綿骨の減少がみられ、骨幹中央部では皮質骨の厚さが減少したことを示している。不動による骨梁の減少が海綿骨のいかなる部位から生じるかについて検討した報告<sup>16)</sup>によると、その減少は海綿骨の下方の部位から起こり始めるとされている。

大迫<sup>18)</sup>は光学および透過電子顕微鏡を用いて、ラット下顎骨関節突起の切片を観察し、基質線維の密度や配列状態から骨組織の分化度について検討している。その結果、下顎頭軟骨の直下では分化度の低い骨組織が形成されるが、下方に向かうにしたがって順次分化度の高い組織が形成されるようになることを見いだしている。本研究では対照群の脛骨矢状断切片にマッソン・トリクローム染色を施すと、二次海綿骨の中でも、前方および後方部の骨梁は全体的に朱色に染まるが、中央部の骨梁はやや青みを帯びて観察される。マッソン・トリクローム染色で青色に染まる部位を透過電子顕微鏡で観察すると、その基質線維は疎で、配列が不規則である。反対に、朱色や赤色に染まる部位は基質線維が密で、規則的な配列をなすことが示されている。このような光学顕微鏡による所見と、電子顕微鏡による所見との関連性について検討した報告に、本研究の二次海綿骨の染色結果をあてはめて考えると、次のようなことが推測される。すなわち、二次海綿骨の中でも前方および後方部の骨梁は朱色に染まることから、この部位の骨は基質線維が密で配列が規則的であり、逆に、中央部は青みを帯びて染まることから、前方および後方部よりも基質線維が疎で、配列も不規則であると思われる。つまり、海綿骨の中央部は前方および後方部に比べて組織分化度的に低い骨組織が形成されていると思われる。前方および後方部の骨梁下端部は、それぞれ前方および後方の皮質骨に融合するものであり、

このことから海綿骨の中では大腿骨の加重を皮質骨に分散・伝達する重要な働きをなす部位ほど、骨組織の分化度が高いこと、そして、骨組織の分化には加重が重要な要因となっているであろうことが推測される。

1週間の尾部懸垂実験<sup>19)</sup>では、重力負荷の減少によって、その初期では骨吸収が促進されるが、その後はPTHの分泌や腎での活性化型ビタミンD<sub>3</sub>合成が減少し、腸管からのCa<sup>2+</sup>吸収が抑制されることによって、骨芽細胞の機能が抑制され、骨量減少が起こるとされている。また、永田ら<sup>20)</sup>はRANKLの刺激によって効率的に破骨細胞様多核細胞を形成するマクロファージ様細胞株RAW264cellIDクローンを用いて、前破骨細胞融合過程について報告している。それによると、培養1日目には単核細胞のみが認められ、2日目にはほとんどの単核細胞（前破骨細胞）はTRAP陽性破骨細胞様多核細胞に変化する。そして、3日目ではその細胞の発現状態に2日目と大きな違いは認められなかったが、多核細胞の大型化が見られたとしている。このことから、RANKLの刺激が破骨細胞誘導に重要であること、そしてそれが培養時間の経過に伴ってより顕著な効果を示すことが理解される。RANKは骨芽細胞の発現するRANKLとの結合が不可欠である。bone lining cellにPTHやIL-1のような骨吸収促進因子が作用すると、それは活性化されて破骨細胞へ情報が伝達され、破骨細胞が活性化される<sup>19)</sup>。このことから、本研究の不動化で観察された骨吸収においても、このようなbone lining cellから分泌されるサイトカインが破骨細胞を活性化していた可能性が示唆される。

以上のように、海綿骨の骨梁の中でも大きな加重伝達に関わる部位と、小さな加重伝達に関わる部位があり、不動化の影響は、横方向に配列する骨梁から見られ始めること、そして、海綿骨の部位別には前方の下端部から生じる。また、破骨細胞の分化・誘導には骨芽細胞の存在が必要であり、不動1日後で破骨細胞の反応が低下したことは、その時点で生じる骨芽細胞の活性低下が関わっていると考えられる。さらに、海綿骨の中では大腿骨の加重を皮質骨に分散・伝達する重要な働きをなす部位ほど骨組織の分化度が高いこと、そして、骨組織の分化には加重が重要な要因となっているであろうことが推測される。

## 結 論

不動化の影響は、海綿骨の中でも大腿骨の加重を脛骨の皮質骨に分散・伝達するのに重要な部位ほど影響が出にくく、そのような部位は骨組織の分化度が高い状態にあることが理解される。

本研究はライフデザイン学部研究等倫理委員会の審査により承認された。

## 謝 辞

本研究を進めるに当たり、多くのご協力をいただいた研究室の大学院生および学部生の方々に深謝致します

## 参考文献

- 1) 石見桂子：骨の健康と生活習慣病。薬事日報社。2010

- 2) 笠巻純一：運動実践者における健康度評価尺度の信頼性・妥当性に関する研究 生活習慣病危険因子からの検討. 現代社会文化研究 32：105-122, 2005
- 3) 加藤尊, 山下剛範, 本田亜紀子, 梅村義久：若年時の運動が骨を太くする. 体力科学 57：690, 2008
- 4) 孫麗曼, 玉城一, 老松聡, 石丸哲二, 大田豊, 勝出直文, 知念功：カルシウム欠乏食による骨粗鬆症に対する運動, ナトリウム, カリウムの効果. 琉球大学農学部学術報告 51:113-118, 2004
- 5) 藤沢政美：女子学生のボディイメージとライフスタイル. 園田学園女子大学論文集 Vol. 45, 2011.
- 6) 孫麗曼, 玉城一, 老松聡, 石丸哲二, 大田豊, 勝山直文, 知念功：カルシウム欠乏食摂食により誘発する骨粗鬆症の特徴. 琉球大学農学部学術報告 51: 119-125, 2004
- 7) 伊東昌子：骨質の定量評価と薬物による改善. 生体医工学 44：496-502, 2006.
- 8) 中野貴由, 馬越佑吉：骨組織における生体アパタイト結晶の配向性とその力学機能. 生体医工学 44：503-510, 2006.
- 9) 大島博：微小重力と骨代謝. THE BONE Vol. 24, 2010.
- 10) 春名正太郎, 柴野純一, 小林道明, 三浦節男, 大森誠一, 根本昌宏, 村林宏骨：粗鬆症ラット大腿骨の強度・構造特性. 北海道支部講演会講演概要集 46：171-172. 2007.
- 11) 小野寺憲治, 栗林義和, 高橋温：抗てんかん薬による骨粗鬆症の動物モデルの有用性について. 日本薬理学雑誌 127：375-380, 2006.
- 12) 大迫正文, 鈴木哲郎, 野中卓, 中村千秋, 古川覚, 金子元彦：ラット後肢不動化に伴う骨形成の初期変化に関する観察. 体力科学 5：591. 2002
- 13) 大迫正文, 鈴木哲郎, 藤原浩隆：短期間のラット後肢不動化に伴う骨吸収過程に関する観察. 体力科学 55：630, 2006.
- 14) 東由明：骨粗鬆症モデル動物と骨粗鬆症治療薬の研究開発動向. 日本薬理学雑誌 130：201-205, 2007.
- 15) 大迫正文, 鈴木哲郎, 藤原浩隆：運動する身体 運動しない身体－骨に関する不動実験のデータを中心に, 形からデータをよむ－. 体力科学 57：70, 2008.
- 16) 鈴木哲郎, 大迫正文, 玉川明朗：加重低減に伴う骨構造の初期変化. 日本体育学会大会号 48：313, 1997.
- 17) 伊藤雅波, 高橋直之：破骨細胞の形成・機能の制御. 松本俊夫編：骨・軟骨代謝と注目の骨疾患. pp60-63. 羊土社, 2002.
- 18) 大迫正文：ラット下顎骨関節突起の発育と機能に関する組織学的研究. 口腔学会雑誌 60：47-96, 1993.
- 19) 西崎泰司：骨粗鬆症疾患モデルとその評価方法. 岡山実験動物研究会報 16：11-16, 1999.
- 20) 永田健吾, 久木田敏夫, 久木田明子, 飯島忠彦：前破骨細胞の融合過程における接着因子LFA-1とICAM-1の関与. Journal of oral biosciences 46：463, 2004.

## 付図説明

### 図 5. 短期間の不動処置による海綿骨の減少

(次亜塩素酸ナトリウム処理標本、肉眼的観察)

左から対照群、1日不動群、2日不動群および4日不動群の結果を示す。一次海綿骨の上下的な厚さに関しては群間でほとんど違いが認められない。二次海綿骨に関しては、不動1日および2日後で下方の領域の骨梁が消失し、不動4日後ではその消失が顕著となる。

### 図 6～9. TRAP染色を施した脛骨矢状断面の肉眼的観察像

(図 6：対照群、図 7：1日不動群、図 8：2日不動群、図 9：4日不動群)

2日および4日では、骨端および骨幹端（骨端板直下）における TRAP 染色の反応が強くみられ、特に4日不動群ではその反応に陽性を示す範囲は不動1日後に比べて、かなり広い。

### 図 10～図 13. 二次海綿骨の走査電子顕微鏡による弱拡大像

(KOH 処理標本、走査電子顕微鏡像)

(図 10：対照群、図 11：1日不動群、図 12：2日不動群、図 13：4日不動群)

1日不動群では、海綿骨全体の骨梁の太さにやや減少が認められ、前方下端部で骨梁の消失も見られ始める。2日不動群では、前方および中央部における海綿骨下部の骨梁の消失が顕著となり、後方部においても、骨梁の密度の低下が観察される。4日不動群では後方部の骨梁も消失し始める。

### 図 14～図 17. 二次海綿骨後下部における骨梁の密度および配列状態

(KOH 処理標本、走査電子顕微鏡像)

(図 14：対照群、図 15：1日不動群、図 16：2日不動群、図 17：4日不動群)

1日不動群では、骨梁が全体的に細くなるとともに、横方向に配列した骨梁が消失し始め、網状構造の目はさらに粗くなる。不動2日後では、骨梁の密度および太さの減少が顕著となり、最終的に不動4日後では、多くの骨梁が消失する。

### 図 18・19. 2日不動群における骨梁表面の破骨細胞

(KOH 処理標本、走査電子顕微鏡像)

(図 19：図 18 の□部分の拡大像)

不動2日後における二次海綿骨の骨梁表面を弱拡大で観察すると、そこには粒子状の構造物が多数見られる。それを拡大すると、破骨細胞様の細胞が骨梁表面に付着し、その近傍の骨梁表面には吸収窩と思われる窪みが認められる。

### 図 20・21. 4日不動群における骨梁表面の破骨細胞

(KOH 処理標本、走査電子顕微鏡像)

(図 21：図 20 の□部分の拡大像)

不動4日後では、二次海綿骨下部の骨梁表面の下端部付近において粒子状の構造物が骨梁を覆うように存在している。そのような部位を拡大すると、不動2日後に見られるものよりも大型の破骨細胞様細胞が、骨梁表面を覆うように存在しているのが認められる。

### 図 22・23. 対照群および不動4日群における二次海綿骨の骨梁の拡大像

(リゴラック樹脂包埋研磨標本、トルイジンブルー染色、光学顕微鏡像)

(図 22：対照群、図 23：4日不動群)

対照群における骨梁表面の多くの部位には、青く染まる骨前質が形成されているが、4日不動群ではそのような状態はほとんど観察されない。

#### 図 24・25. 対照群および不動4日群における二次海綿骨のラベリング像

(テトラサイクリンおよびカルセインの二重標識の蛍光顕微鏡像)

(図 24：対照群. 図 25：4日不動群)

図 22 (対照群) で見られた骨梁表面の骨前質の存在部位に相当して、テトラサイクリンおよびカルセインのラベルが認められる。図 23 (4日不動群) においても、ラベルが観察されるが、そのような部位は対照群に比べてかなり少ない。

#### 図 26・27. 対照群における二次海綿骨の組織切片像

(エポキシ樹脂包埋厚切り切片、トルイジンブルー染色)

(図 27：図 26 の□部分の拡大像)

対照群の骨梁表面には、骨芽細胞が上皮様に配列している。その細胞全体はトルイジンブルー染色で濃い青色に染まるが、細胞中央部には発達したゴルジ野が存在する。

#### 図 28・29. 2日不動群における二次海綿骨の組織切片像

(エポキシ樹脂包埋厚切り切片、トルイジンブルー染色)

(図 29：図 28 の□部分の拡大像)

不動2日後では、骨梁表面上皮様に配列した骨芽細胞は少なく、扁平な born lining cell 様の細胞が多く認められ、中には骨梁表面に骨前質を介してその細胞が位置している。

#### 図 30～33. 4日不動群における二次海綿骨の組織切片像

(エポキシ樹脂包埋厚切り切片、トルイジンブルー染色)

(図 31・33：それぞれ図 30・32 の□部分の拡大像)

不動4日後では、骨梁表面に大型の破骨細胞が付着した状態が多く認められる。また、骨梁表面付近の骨髓腔内に破骨細胞様の細胞が見られることもあり、そのような細胞は構造的に類似する点を多く有する細胞との融合を推測させる状態も観察される。

#### 図 34. マッソン・トリクローム染色を施した対照群の脛骨矢状断切片の弱拡大像

脛骨二次海綿骨の中でも、前方および後方部の骨梁 (青色の□部分) は全体的に朱色に染まるが、中央部の骨梁 (黄色の○部分) はやや青みがかって観察される。

#### 図 35. 対照群の二次海綿骨における前方または後方部の骨梁の拡大像

(マッソン・トリクローム染色)

(図 34 の青色の□部分)

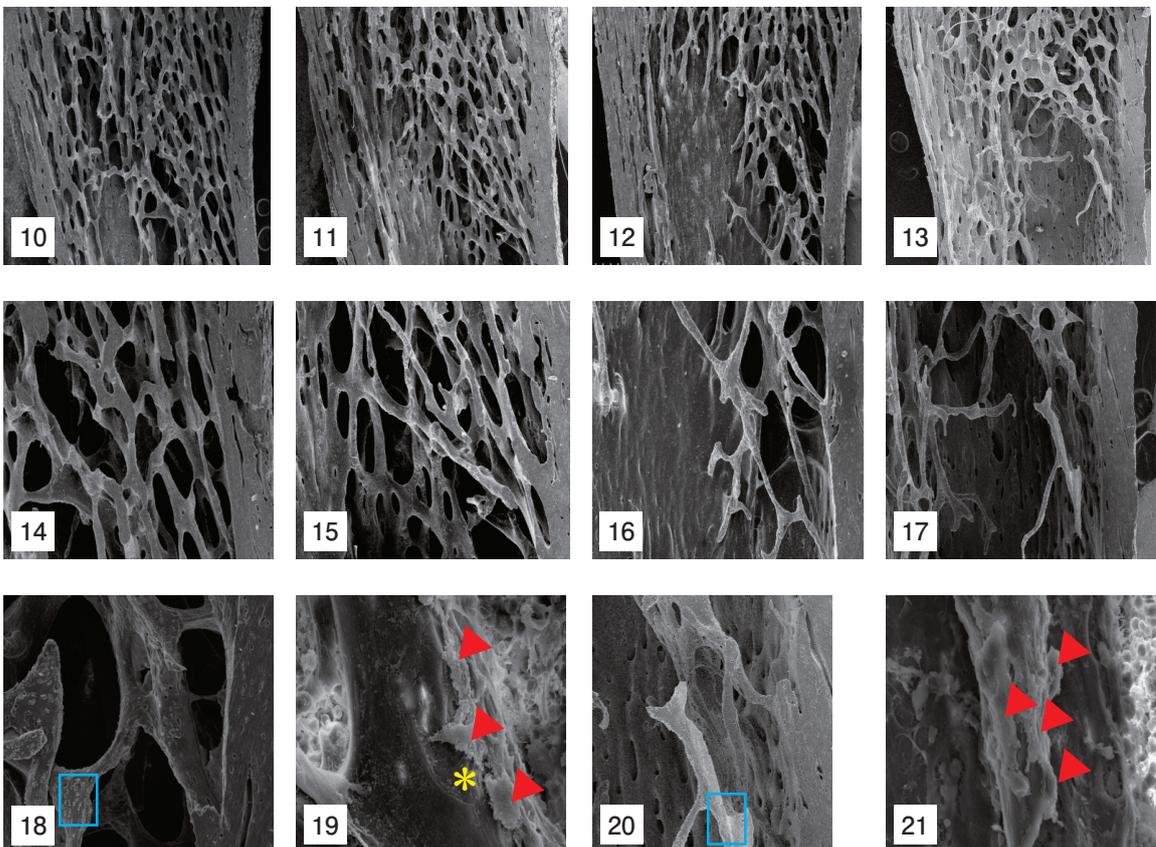
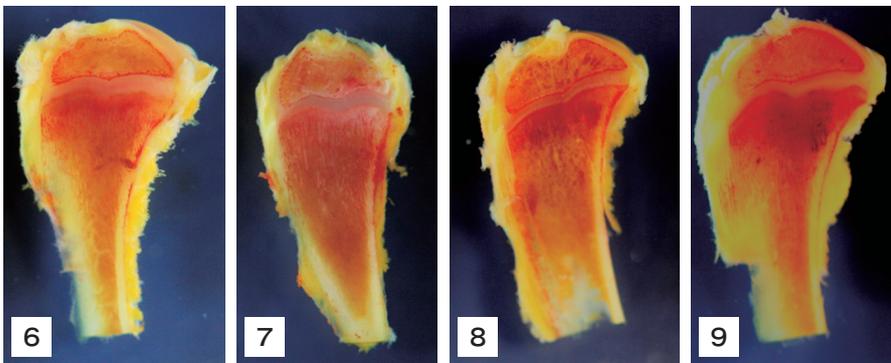
この部位の骨梁は太く上下方向に配列しているが、基質はポンソーフクシンのみならず、オレンジ G の色素をとって朱色に染まる。

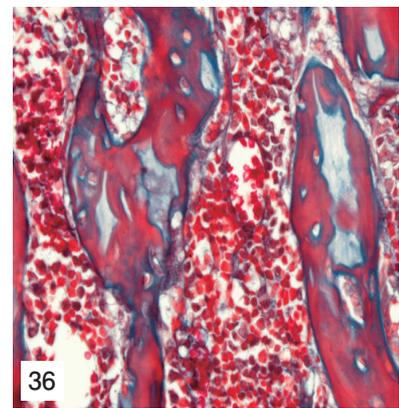
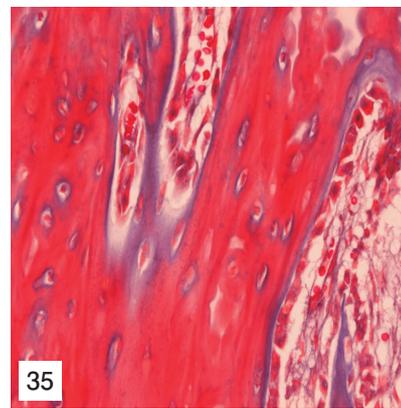
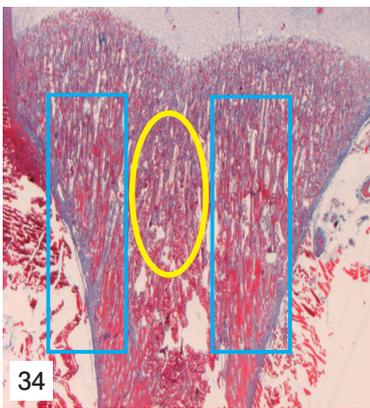
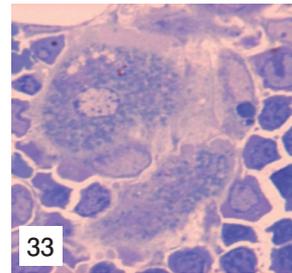
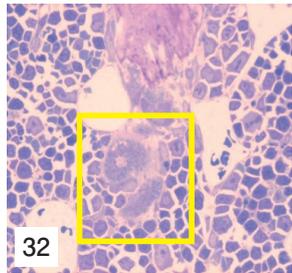
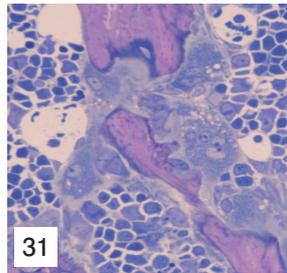
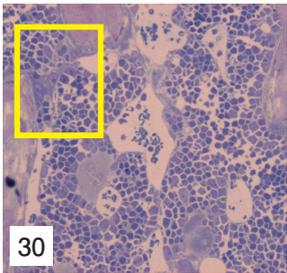
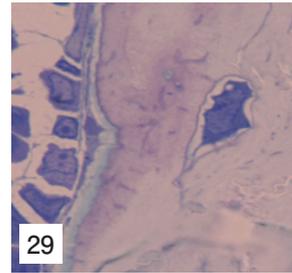
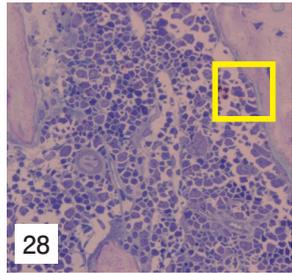
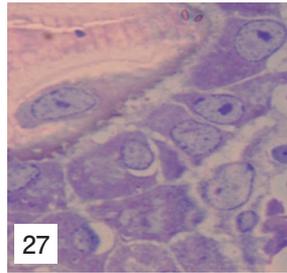
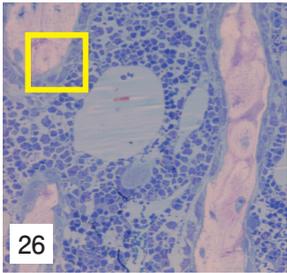
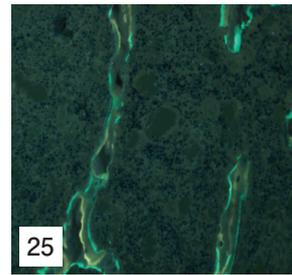
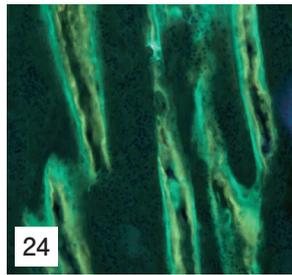
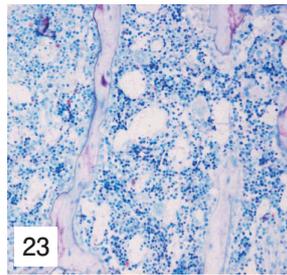
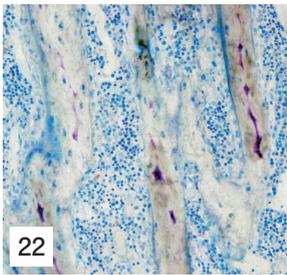
#### 図 36. 対照群の二次海綿骨における前後的中央部の骨梁の拡大像

(マッソン・トリクローム染色)

(図 34 の黄色の○部分)

二次海綿骨の中でも前後的中央部の骨梁は、前方および後方に比べてやや細く、また骨の基質もポンソーフクシンのみによって染色され、赤色に観察される。





## Effects of short term immobilization on tibial bone structure in growing rat

TOBITA Tetsuya

AKIYAMA Wakako

OHSAKO Masafumi

### SUMMARY

The purpose of this study was to investigate effects of short term immobilization on structures of bone trabeculae in each portion (anterior, middle and posterior) , due to observe changes of bone formation and absorption in tibial cancellous bone. Knee joints of growing rats were immobilized and they were observed macro-and-microscopically. Bone trabeculae decreased at the middle portion, but the decrease of those hardly observed at the anterior and posterior portions. It was recognized that bone structures differentiated highly at the anterior and posterior portions, compared to middle portion. From these observations, it was suggested that effects of immobilization didn't appeared easily at the higher differentiated portions that played important roles in meaning that mechanical loads from femur were dispersed and transmitted to tibial cortical bone.

**keywords:** cancellous bone, cell differentiation, short term immobilization