

ラット大腿骨に及ぼす物理的刺激的要因に関する  
形態学的解析

福祉社会デザイン研究科ヒューマンデザイン専攻博士後期課程  
4730160007 中井 真悟

# 目 次

略語表	1
第一章 序論	
第 1 節 学術的背景	2
1.1 栄養的アプローチ	2
1.2 薬剂的アプローチ	3
1.3 運動的アプローチ	4
1.3.1 運動または不動実験	4
1.4 物理的アプローチ	5
1.4.1 鍼を用いた実験	5
1.4.2 電気刺激を骨に用いた実験	6
1.5 物理的刺激が骨に及ぼす影響と根拠	8
第 2 節 本博士論文の目的	10
第二章 ラット大腿骨の基本構造（実験 1, 2）	
第 1 節 発育に伴うラット大腿骨の構造と骨強度の変化に関する研究	
1. 緒言	11
2. 材料および方法	11
2.1 実験動物	11
2.2 標本の摘出および固定	12
2.3 組織学的標本の作製と観察	12
2.4 骨基質の分類	12
2.5 骨形態計測	13
2.6 破断試験の条件設定	13
2.7 統計処理	14
3. 結果	14
3.1 皮質骨の組織構造	14
3.2 皮質骨の計測パラメータ	16
3.3 骨破断試験	16
4. 考察	16
5. 結語	21
6. 付図説明	22
第 2 節 ラット大腿骨における腱附着部の構造と骨膜の血管分布に関する研究	
1. 緒言	26
2. 材料および方法	26
2.1 実験動物	26
2.2 血管鋳型樹脂および血管墨汁注入標本の作製	26
2.3 組織学的標本の作製と観察	27

3. 結果	28
3.1 皮質骨の肉眼的観察	28
3.2 皮質骨の組織構造	28
4. 考察	29
5. 結語	32
6. 付図説明	33
第3節 まとめ	36

### 第三章 骨の発育と骨折線の形状（実験3，4）

第1節 発育に伴う骨の構造変化が骨幹中央部の骨折線に及ぼす影響	
1. 緒言	37
2. 材料および方法	37
2.1 実験動物	37
2.2 破断試験の条件設定	37
2.3 標本の摘出および固定	37
2.4 組織学的標本の作製と観察	38
3. 結果	38
3.1 皮質骨の組織構造	38
3.2 各週齢の破折面	39
4. 考察	40
5. 結語	42
6. 付図説明	44
第2節 発育に伴う骨の構造変化が骨幹端部の骨折線に及ぼす影響	
1. 緒言	46
2. 材料および方法	46
2.1 実験動物	46
2.2 破断試験の条件設定	46
2.3 標本の摘出および固定	47
2.4 組織学的標本の作製と観察	47
3. 結果	47
3.1 皮質骨の組織構造	47
3.2 各週齢の破折面	48
4. 考察	49
5. 結語	51
6. 付図説明	52
第3節 まとめ	55

### 第四章 骨に及ぼす鍼通電刺激の影響（実験5～8）

第1節 異なる非加重条件によるラット大腿骨の骨量減少に対する鍼通電刺激の影響	
1. 緒言	56

2. 材料および方法	56
2.1 実験動物	56
2.2 非加重条件	57
2.3 刺鍼部位および鍼通電刺激条件	57
2.4 標本の摘出および固定	58
2.5 骨形態計測	58
2.6 破断試験の条件設定	59
2.7 組織学的標本の作製と観察	59
2.8 骨基質の分類	60
2.9 統計処理	60
3. 結果	61
3.1 骨形態計測	61
3.2 皮質骨の組織構造	61
3.3 骨強度試験	62
4. 考察	63
5. 結語	66
6. 付図説明	67
<b>第2節 ラット不動化モデルの大腿骨骨折線に及ぼす鍼通電刺激の影響</b>	
1. 緒言	72
2. 材料および方法	72
2.1 実験動物	72
2.2 不動および鍼通電刺激条件	72
2.3 破断試験の条件設定	73
2.4 標本の摘出および固定	73
2.5 組織学的標本の作製と観察	73
3. 結果	74
3.1 皮質骨の組織構造	74
3.2 皮質骨の破断像	74
4. 考察	75
5. 結語	77
6. 付図説明	78
<b>第3節 異なる介入頻度の鍼通電刺激がラット大腿骨の骨構造に及ぼす影響</b>	
1. 緒言	81
2. 材料および方法	81
2.1 実験動物	81
2.2 実験条件	82
2.3 標本の摘出および固定	82
2.4 組織学的標本の作製と観察	82
2.5 破断試験法の条件設定	83
2.6 骨形態計測	83

2.7 統計処理	83
3. 結果	84
3.1 皮質骨の組織構造	84
3.2 皮質骨の計測パラメータ	84
3.3 骨破断試験	84
4. 考察	85
5. 結語	87
6. 付図説明	88
第4節 ラット尾部懸垂への介入時期による鍼通電刺激の影響	
1. 緒言	91
2. 材料および方法	91
2.1 実験動物	91
2.2 標本の摘出および固定	92
2.3 組織学的標本の作製と観察	92
2.4 骨形態計測	92
2.5 刺鍼部位および鍼通電刺激条件	93
2.6 破断試験の条件設定	93
2.7 統計処理	93
3. 結果	94
3.1 皮質骨の組織構造	94
3.2 皮質骨の計測パラメータ	94
3.3 骨破断試験	95
4. 考察	95
5. 結語	98
6. 付図説明	99
第5節 まとめ	103

## 第五章 骨に及ぼす経皮通電刺激の影響（実験 9, 10）

第1節 後肢不働化ラットにおける置鍼および通電鍼刺激による大腿骨の構造変化	
1. 緒言	105
2. 材料および方法	105
2.1 実験動物	105
2.2 実験条件	106
2.3 組織学的標本の作製と観察	106
2.4 骨形態計測	107
2.5 破断試験の条件設定	107
2.6 統計処理	107
3. 結果	107
3.1 皮質骨の組織構造	108
3.2 皮質骨の計測パラメータ	108

3.3 骨破断試験	109
4. 考察	109
5. 結語	112
6. 付図説明	113
第2節 後肢不動化したラットの大腿骨構造に及ぼす経皮的直流通電刺激の効果	
1. 緒言	118
2. 材料および方法	118
2.1 実験動物	118
2.2 不動および鍼通電刺激条件	119
2.3 破断試験の条件設定	119
2.4 骨形態計測	119
2.5 標本の摘出および固定	120
2.6 組織学的標本の作製と観察	120
2.7 統計処理	120
3. 結果	121
3.1 皮質骨の構造	121
3.2 骨形態計測および骨強度パラメータ	122
4. 考察	122
5. 結語	125
6. 付図説明	126
第3節 まとめ	131
第六章 結論	132
実験動物への配慮	134
参考文献	135
謝辞	147

## 略語表

ADL . . . Activities of Daily Living

AFF . . . Atypical Femoral Fracture

AGEs . . . Advanced Glycation End Products

ARONJ . . . Antiresorbant Related Osteonecrosis of the Jaw

HE 染色 . . . Hematoxylin Eosin 染色

PTH . . . Parathyroid Hormone

PFA . . . Paraformaldehyde

RANKL . . . Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ -B Ligand

SEM . . . Scanning Electron Microscope

TB 染色 . . . Toluidine Blue 染色

TRAP 染色 . . . Tartrate resistant Acid-phosphate 染色

## 第一章 序論

### 第1節 学術的背景

近年、骨強度や運動能力の低下によって骨折を含めさまざまな運動器障害を引き起こす「ロコモティブシンドローム」の概念が提唱されており<sup>1,2)</sup>、健康寿命の延伸を図るためには運動器疾患の対策や、骨粗鬆症などの骨の脆弱化の予防・改善が課題とされている<sup>3)</sup>。

骨の脆弱化の予防として身体活動や、その効果を高めるために栄養や薬剤、物理的刺激的な面からもさまざまなアプローチがなされている。

#### 1.1 栄養的アプローチ

骨代謝に関与する栄養としてビタミン D3 とビタミン B6 が代表的である<sup>4)</sup>。ビタミン D3 の主な作用は、腸管からのカルシウム吸収の促進である。骨芽細胞に存在するビタミン D 受容体と結合することによってコラーゲンの架橋を改善するが<sup>5)</sup>、骨密度の増加にはあまり関与しない<sup>4)</sup>。一方で、中枢神経や筋肉に作用して、高齢者の転倒頻度を低下させるという点では、骨折に対する予防効果を認めるとの報告もみられる<sup>6)</sup>。また、ビタミン B6 に関しては、これが不足すると酵素性架橋が低形成となり、糖化および酸化ストレスが増加することによって、骨の劣化に関わる AGEs 架橋が形成される。一方、糖尿病ラットへのビタミン B6 投与は骨質を改善することが報告されている<sup>7)</sup>。



## 1.2 薬剂的アプローチ

骨代謝に関わる薬剤は、骨吸収抑制を目的としてビスホスホネート、デノスマブやカルシトニン、骨形成促進剤としてはテリパラチドが主に用いられている<sup>8-11)</sup>。骨粗鬆症患者へ使用されるビスホスホネートは、破骨細胞による骨吸収を抑制し、骨密度を高める。しかし、酵素依存性架橋の形成には関与せず、骨代謝が抑制される期間が長期化されると骨基質内のコラーゲン代謝も抑制されることによって、AGEs 架橋が経時的に増加することから、マイクロクラックが生じやすくなる<sup>12)</sup>。近年では、デノスマブというヒト型抗 RANKL 抗体も使用されている。この薬剤は、ビスホスホネートよりも強力に骨量を増加して、骨代謝回転を抑制する<sup>13,14)</sup>。しかし、この2つの薬剤には副作用も存在する。典型例として、悪性腫瘍患者がビスホスホネートを静注・点滴などで使用している場合に抜歯などを行うと、下顎骨に骨髄炎や骨壊死が起こることが報告されており<sup>15)</sup>、これを Antiresorbant Related Osteonecrosis of the Jaw (ARONJ) と呼ぶ。また、近年では疲労骨折様の非定型大腿骨骨幹部骨折 Atypical Femoral Fracture (AFF) を引き起こすことも報告されている<sup>16,17)</sup>。このようなことから、骨密度を高めるだけでなく、骨基質の構造や代謝について検討することが重要な課題である。

また、カルシトニンは骨量の減少抑制よりも、骨粗鬆症の鎮痛作用効果が注目されている<sup>10)</sup>。一方、テリパラチドは PTH 製剤であり、骨代謝回

転を高める。これは、骨形成・骨吸収ともに促進させることによって骨リモデリングが旺盛となり、特に骨吸収より骨形成の方が促進するために骨折リスクを低減させる骨形成促進剤として用いられている。テリパラチドは低骨密度かつ骨質劣化型の骨粗鬆症に効果的である<sup>18)</sup>。前述のビスホスホネートやデノスマブを長期服用している患者には、骨質の劣化による骨折例もみられ、代謝亢進により骨質の改善を図る<sup>19)</sup>ために本薬の使用が推奨されている<sup>7)</sup>。さらに原発性骨粗鬆症だけでなく、ステロイド性骨粗鬆症などに対しても効果的であることが報告されている<sup>20-22)</sup>。

以上のことから、ビスホスホネートやデノスマブは代謝を下げることによって骨量維持を図っており、ARONJ や AFF を生じるリスクがあったが、テリパラチドはそれらのリスクを減らすことから、副作用が強いビスホスホネートの代替薬として期待されている。しかし、骨の溶出も促進されるため、長期間の服用ができないのが現状である<sup>2)</sup>。

### 1.3 運動的アプローチ

#### 1.3.1 運動または不動実験

松村ら<sup>23)</sup>はラット大腿骨を用い、異なる運動負荷によって筋付着部の骨リモデリングを促進することを報告している。また、筋付着部と緻密骨の厚さは関連性が高いことが知られ<sup>24)</sup>、七五三木ら<sup>25)</sup>も発育期ラットにトレッドミル運動を行わせて、脛骨骨膜面ではほぼ全周にかけて骨形成が亢

進し、骨内膜面では反対に骨形成能が低下したことを報告している。これは、メカニカルストレスによって骨内に生じた電位が骨芽細胞による骨形成を促進したことを示している<sup>26,27)</sup>。一方、Wronski ら<sup>28)</sup>は、発育期ラットを space flight などの無重力を想定した尾部懸垂環境下に置き、脛骨骨幹部の骨膜面に骨形成の抑制を認めたことから、これは筋張力の減少や体重減少による加重負荷の低下が要因であると結論付けている<sup>29,30)</sup>。一般に、無重力環境では骨への負荷がほぼ無いことから、その状態を日常生活に置き換えると、寝たきり状態やギプス固定による不動化状態に類似すると考えられている<sup>31)</sup>。これらは、メカノスタット理論にしたがっており、機械的刺激が至適な状態にあれば骨形成は促進されるが<sup>32)</sup>、刺激がそのような閾値以下の場合や、逆に高強度や長時間運動の場合にも骨形成は抑制される<sup>32,33)</sup>。

## 1.4 物理的アプローチ

### 1.4.1 鍼を用いた実験

鍼治療は、『こり（硬結部位）』に刺入して鍼体の抵抗感や鍼入時の『ひびき（鈍痛感）』を観察しつつ、筋緊張の改善を図る<sup>34)</sup>。ここでは置鍼・雀啄法を用いることが一般的であるが、シールに短鍼をつけて疼痛局所に貼付する円皮鍼・皮内鍼も一般に普及している。また、低周波通電法を応用して刺入した鍼に電極をつなぎ、深部から交流電気刺激を行う方法も行

われており，これを鍼通電刺激法という．これは，筋・筋膜性腰痛などの疾患別の用途によって，筋パルスと神経パルスに大別される．前者は筋緊張の緩和を目的に行い，後者は腰椎椎間板ヘルニアによる坐骨神経痛の神経根症状に対して行う<sup>34)</sup>．このように疾患に対する対症療法として発展してきた鍼治療であるが，その効果については先行研究によって徐々に明らかにされてきた．運動器を対象とした実験としては，ラットへの鍼刺激によって神経切断部位の筋血流量が増加した報告<sup>35)</sup>や短時間の鍼通電刺激によって血管内皮細胞が増殖して，毛細血管の拡張や血管新生が起こるとの報告がある<sup>36)</sup>．また，池宗ら<sup>37)</sup>は不動処置によって筋萎縮させたラットに鍼通電刺激を行い，マクロファージによる筋衛星細胞の活性化が筋回復を促進したことを示している．一方で，このような軟組織だけではなく硬組織についてもわずかであるが報告されている．中島ら<sup>38)</sup>は骨折モデルを作成して直流鍼通電刺激を骨折部に行い，局所の仮骨形成を促進したことを報告している．このことは後述するピエゾ電位の応用であり，硬組織に及ぼす鍼通電刺激の効果を理解する上で重要な示唆をもたらしている．このような硬組織に対する通電刺激の様式は，後述する直流電流と交流電流に大別される．

#### **1.4.2 電気刺激を骨に用いた実験**

##### **a. 直流電流**

Brighton ら<sup>39)</sup> は *in vitro* で低電圧 (1V 未満) と, それより高い電圧 (1V 以上) の条件で直流電流を骨に対して通電し, 前者の陰極側で酸素が消費されることによって局所的に酸素濃度が低くなることを報告している. このような骨組織の低酸素化は骨形成に必要な条件とされており, 低 PO<sub>2</sub> 環境は骨・軟骨接合部の増殖層や骨折後の修復過程にみられる<sup>39)</sup>. また, 軟骨の増殖層や骨細胞では嫌氣的代謝が行われており, *in vitro* では低酸素状態においても骨形成がみられる. このような低酸素状態はアルカリ性を示し, 骨の石灰化に適した環境である<sup>39)</sup>. さらに, このような微小電流は間葉細胞の増殖を促進させ, 骨芽細胞から骨細胞への分化を促進する<sup>40)</sup>.

一方で, それらと異なる結果も報告<sup>41,42)</sup> されている. 杉山ら<sup>43)</sup> はウサギの大腿骨骨幹中央部を露出した後, 錐で直径 0.5mm の穴を 2 カ所あけ, その部位に電極を刺して固定した後, 近位を陽極として 2.5V の条件で直流電流を通電した. 骨髄内では陽極周囲に壊死や変性, ガスの貯留が確認されたことを報告している<sup>43)</sup>. また, 元文<sup>44)</sup> は直流電流による刺激の影響について観察するためにウサギの脛骨近位成長板を用いた実験を行い, 局所の壊死を示した.

このように, 直流電流は一定の効果がみられるものの, 電気分解によるイオン化が生じることが報告されており<sup>45,46)</sup>, 近年では交流電流を用いることが主流になっている.

## b. 交流電流

藤沢<sup>47)</sup>は微小電流(0.5mV, 50Hz)を発生する圧電性フィルム(VDF/TrFEシート)を用いた実験を行い、対照群と比較して早期に骨リモデリングが起こることを報告している。さらに、田中ら<sup>48)</sup>も同様のフィルムを用いて骨形成の促進を認めている。高橋<sup>49)</sup>は骨窩洞を形成してその部位にシートを用いることにより、骨再生に關与する骨髓側の血管の新生と成長が早期に行われること、さらにその血管供給が骨再生を促進することを認めており、骨折修復に先行して血管が形成されることの重要性を示唆している。また、中尾ら<sup>50)</sup>は骨折部の毛細血管形成が骨膜血管網外層、骨髓血管網、骨膜血管網内層の順に形成されることを示している。血管新生は、血流量の増加によって血管内壁へのずり応力が増大することによって起こることも報告されている<sup>51)</sup>。以上のように、生体に対する交流電流の効果は数多く報告されているが、これらの方法では侵襲性が高いためヒトへの応用は難しいのが現状である。

## 1.5 物理的刺戟が骨に及ぼす影響と根拠

深田<sup>52)</sup>は、電氣刺戟が細胞に及ぼす影響は「(1)細胞外液に誘導電流を発生する。(2)細胞膜表面での電氣化学的現象を起こす。(3)細胞質内での化学反応を起こす。(4)細胞の成長や分化の促進あるいは阻害する。」と述べている。電氣分極は誘電体の結晶に対する応力の強さに比例し、こ

の現象を圧電効果または Piezo 電位という<sup>52)</sup>。結晶軸の配列が乱れている状態では圧電効果は弱く、結晶の長軸方向に整然と配列することで発現した電位は相殺されずに、効率よく得ることができる<sup>53)</sup>。このような高分子物質の圧電効果は、深田ら<sup>54)</sup>によって木材セルロース、骨や腱などのコラーゲン線維などで測定されており、コラーゲンの結晶性線維をお互いに剪断するような力、すなわち、ずり応力を与えると、その力の面に直角方向に電気分極が観測されることが報告されている。さらに、深田<sup>55)</sup>は長骨を湾曲させると電気分極を起こし、凹側は負に分極して骨が形成され、凸側は正に分極するため骨が吸収されることも報告している。また、骨折部の両側に小さい電極を挿入して微弱な電流（1.5V）を流すと仮骨の成長が促進されて、早期に骨癒合が起こることが報告されており、これを逆圧電効果という<sup>55)</sup>。

一方、逆圧電効果による骨形成は Piezo 電位よりも、液性の反復流動による流動電位の要素が大きく関わるとの報告<sup>56)</sup>もある。オステオンの長軸に直交する細管が圧縮される部位では、ハバース管内の液体が伸張部のハバース管内に流入することにより、骨が変形して細胞外液の流動が起こるために流動電位が発生し、圧縮される部位に骨が形成される<sup>57)</sup>。さらに、この説を補うように、Wolff の機能適応現象が人工歯根と人工骨髄チャンバーを用いて明らかにされている<sup>58-60)</sup>。それによると、生体への反復性の力学刺激が流動電位に変換され、未分化間葉細胞に作用して細胞の

遺伝子の発現を誘導する。すなわち、流動電位によって骨代謝が促進されることにより、モデリングやリモデリングが起こるとされている<sup>58-60)</sup>。しかし、生体内において材料係数 (Young 率と Poisson 比) の異なるアパタイト人工骨を骨髓腔内に密着させても、加重下では両者の異なる動きを示すために癒合することはない<sup>61)</sup>。

以上のように、Piezo 電位と流動電位の 2 つの説に大別されているが、どちらかの一方によるものではなく、両因子が協調しあってメカニカルストレスを骨形成因子に変換していると考えられている。また、このことはメカニカルストレスだけではなく、電氣的ストレスにも影響され、低侵襲的な電気刺激が生体内の骨組織に及ぼす効果の臨床応用性が期待されている。

## 第 2 節 本博士論文の目的

わが国では高齢化に伴って、寝たきり状態や ADL の低下を引き起こす可能性のある骨粗鬆症患者が増加しており、このことは長期入院や在宅介護の増加にも繋がるため、大きな社会問題となっている。本博士論文では、そのような骨の脆弱化の予防を図るための基礎研究として、ラット大腿骨を用いて増齢に伴う骨構造の変化やその破折面の形状を組織学的に解析し、また、その応用研究として物理的的刺激が骨強度や構造に及ぼす骨吸収抑制効果について、組織学的に検討することを目的とした。



## 第二章 ラット大腿骨の基本構造（実験1，2）

### （実験1）

#### 第1節 発育に伴うラット大腿骨の構造と骨強度の変化に関する研究

##### 1. 緒言

骨密度の低下は骨折リスクの要因となるが<sup>62)</sup>，一方で，骨密度が同程度であってもしばしば強度に差がみられることから，骨の強度には微細な構造が重要な鍵を握っている<sup>63)</sup>．著者ら<sup>64)</sup>はこれまでに成熟期ラットの大腿骨を用いて割断面に酸腐食を施し，その溶解度の違いから，単一の骨内に石灰化度の異なる基質が混在する微細構造を組織学的に観察している．骨折の治療方針を立てる際に，基質の構造的特徴の理解は，重要な意味を持つと思われるが，発育期におけるそれらの基質の形成過程や，その変化が強度に及ぼす影響を検討した報告はない．本研究はラット大腿骨を用いて，骨構造の発育変化を観察し，それを骨強度の変化に関連づけて検討することを目的とした．

##### 2. 材料および方法

###### 2.1 実験動物

一般に，ラットは3週齢で離乳して6～7週齢で妊娠可能となり，11～13週齢でほぼ成熟した状態になることが知られる．このことから，本実験では3，7および13週齢のウィスター系雄性ラット各12匹を用いた．

## 2.2 標本の摘出および固定

ラットを炭酸ガス吸引によって安楽死させた後，筋や神経，結合組織などの軟組織を丁寧に除去し，骨膜が付着した状態で大腿骨を摘出した．右脚の大腿骨を骨強度測定用とし，左脚を組織構造観察および骨形態計測用とした．大腿骨の全長は大転子尖から外側顆先端までとし，それをノギスにて計測した．さらに，その中間点（以下，骨幹中央部とする）を求め，そこを組織学的観察および計測の部位とした．それぞれの標本は，破断後，速やかに4%パラホルムアルデヒド水溶液（PFA）または0.1M カコジル酸ナトリウム水溶液（pH7.4）にて緩衝されたカルノブスキー液（4℃，一晚）で固定した．

## 2.3 組織学的標本の作製と観察

標本を摘出後速やかに，4%PFA または 0.1M カコジル酸ナトリウム水溶液（pH7.4）にて緩衝されたカルノブスキー液に浸漬し，種々の標本作製して，光学および走査電子顕微鏡（SEM）にて観察した．なお，観察に際しては大腿骨の骨幹部の横断標本を用い，大腿骨を前，後，内および外面に区分した．

## 2.4 骨基質の分類

大迫<sup>65)</sup>は骨基質の物理染色による結果と透過電子顕微鏡の観察所見から，

基質線維の密度および配列状態によって骨基質を分類している。その分類では、マッソントリクローム染色によって淡い青に染まる骨基質は、透過電子顕微鏡的に基質線維が疎で配列が不規則であり、赤色に染まる骨基質は透過電子顕微鏡的に基質線維が密で配列が不規則である骨基質や、層板構造を示す基質に相当することが示されている。さらに、トルイジンブルーによる染色性は石灰化軟骨基質と骨基質で異なり、酸性ムコ多糖類を含む石灰化軟骨基質は好塩基性を示すことから<sup>66,67)</sup>、メタクロマジーを起こして赤紫色に濃染することが知られている<sup>68)</sup>。

以上のことから、本研究では大迫<sup>65)</sup>の分類に従い、基質線維が疎で、配列が不規則な骨<sup>65)</sup>を Type A とした。また、層板構造を成す部位は最も分化した骨であり、Type C とした。Type A から Type C にかけて分化度が増し、その移行的な骨基質を Type B とした。

## 2.5 骨形態計測

骨幹中央部における横断面のリゴラック樹脂研磨標本作製し、トルイジンブルー染色を施した。その標本を水封入後に光学顕微鏡によって撮影後、モニターに投影し、画像解析ソフト (WinROOF V7.4) を用いて、前後および内外径を求めた。内外径は前額面に平行な線のうち最長のものとし、その中点の垂線上で計測した<sup>69,70)</sup>。

## 2.6 破断試験の条件設定

破断試験器（TK-252C，室町機械社製）を用い，以下の方法により **Three-Point Bending Test** を行った．摘出した大腿骨は破断するまで 0.9%塩化ナトリウムを含む生理食塩液に浸漬した．骨幹中央部の前面にマーキングし，その部位を上方に向け，装置のクロスヘッドがその部位に正確に当たるように標本を機械へセットした．また，支点間距離を 10mm，クロスヘッド速度を 10mm/min に設定し，骨の前方から破断した<sup>70)</sup>（図 2-1）．**Three-Point Bending Test** のパラメータは骨にかかる荷重と骨の変位量との関係を示すグラフ（曲線）の傾き（N/mm）を骨の剛性 **Stiffness** とし，弾性限度を超えた破断時の最大荷重（N）を骨の強度 **Strength** を表す指標とした．さらに，最大荷重時の骨の変位量（mm）を骨の柔軟性 **Deformation** の指標とした（図 2-2）．

## 2.7 統計処理

形態計測および破断試験によって得られた各パラメータから平均値と標準偏差を求め，IBM SPSS Statistics Ver.24 により，対応のない t-test を行った．危険率は 5%水準未満を有意とした．

## 3. 結果

### 3.1 皮質骨の組織構造

ラット大腿骨を骨幹中央部で横断すると，3 週齢の皮質骨は円形をなして薄く，皮質骨内には横断された血管腔が多く認められた．それらの血管

腔の径は、骨内膜側から骨膜側に向かうにしたがって増した。皮質骨前面には血管腔が少なく、緻密であったが、外面にはそれが多く、多孔質であった（図 2-3, 4）。7 週齢になると、大腿骨外面が外方に突出することによって内外径が増し、大腿骨の断面は全体的に楕円形をなした（図 2-3）。また、皮質骨の厚さの増大と緻密化が進むとともに、大腿骨のすべての面において骨内膜側に薄い環状層板が形成された。しかし、後面から外面においては横断された細い血管腔が多く存在するが、3 週齢で多くみられた血管腔とは異なり、それを取り巻くようにハバース層板様の構造が観察された（図 2-4）。また、後面の骨膜側にはいまだ 3 週齢でみられたような広い血管腔を有し、多孔性の部位も認められた。13 週齢の横断面の構造は、基本的に 7 週齢に類似しているが、血管腔の狭小化がその特徴であった（図 2-4）。また、大腿骨のすべての面における骨内膜側で多く添加され、皮質骨の横断面積が増加した。それに伴って、大腿骨の前面および内面では、骨膜側および骨内膜側に環状層板が形成されたが、後面および外面では、それは骨内膜側においてのみ形成された。いずれの週齢においても、石灰化軟骨基質はトルイジンブルー染色でメタクロマジーを起こして紫色に染まった（図 2-5）。3 週齢の皮質骨では石灰化軟骨基質が占める割合が高かったが、7~13 週齢ではその割合が低下し、皮質骨の深部のみに認められた。割断された皮質骨を研磨後、酸腐蝕を施して SEM で観察すると、皮質骨表面には異なる深さの陥凹がみられた。石灰化軟骨基質は最も深く陥

凹するが、その周囲にも石灰化軟骨基質に次いで深く陥凹する骨基質が認められ、これは Type A と一致した。さらに、その周囲には深く陥凹しない骨が存在し、皮質骨の骨膜および骨内膜側には環状層板 (Type C) が存在した (図 2-5)。

### 3.2 皮質骨の計測パラメータ

3 週齢の皮質骨の横断面は、前後および内外径がほぼ等しい円形をなした。発育に伴っていずれの径は有意に増したが、特に内外径の増加が顕著であった (図 2-6)。

### 3.3 骨破断試験

骨の硬さ (以下, Stiffness) および強度 (以下, Strength) は 3 週齢から 13 週齢になるまで、ほぼ直線的な増加を示した。骨のしなやかさ (以下, Deformation) には 3 週齢から 13 週齢までに、有意な変化は認められなかった (図 2-7)。

## 4. 考察

本研究の観察では、横断された大腿骨の外径は 3 週齢以降の活発な骨形成によって増加した。3 週齢の皮質骨は薄く、骨膜側には横断された血管腔が多く存在し、全体的に多孔性であった。7 週齢になると血管腔の狭小化が顕著となり、皮質骨の緻密化が進んだ。このことは、胎生期および出

生後のラット骨口蓋における血管腔の発育変化を観察した江川の報告<sup>72)</sup>と一致した。骨強度には骨の外径や皮質骨の厚さが関わるとされている<sup>73)</sup>が、血管腔の狭小化による皮質骨の緻密化もそれに影響する要因と考えられる。本研究の観察によると、3週齢では石灰化軟骨基質が皮質骨内で占める割合は高く、その表面への骨の添加量はいまだ少なかった。しかし、発育に伴い、皮質骨の骨膜および骨内膜側へ徐々に骨が添加され、その結果、石灰化軟骨基質は皮質骨深部のみに位置するようになった。このことから、皮質骨内の石灰化軟骨基質と骨基質の割合は個体の分化度を反映していると思われる。

本研究では、大迫の分類<sup>65)</sup>をもとに、基質線維の密度と配列状態の面から分化度の低い骨を **Type A**、分化度の高い骨を **Type C** とし、それらの中間的な骨を **Type B** として観察した。その結果、**Type A** は3週齢では皮質骨全体に分布したが、7および13週齢では皮質骨深部の石灰化軟骨基質の周囲にのみ存在した。また、**Type B** に加え、内・外環状層板を構成する **Type C** は、それらの週齢で皮質骨の前面および内面に厚く形成された。一般に、皮質骨は古いオステオンが新たなオステオンに改造されることによって、骨の無機質含有率が一定に保たれることが知られている。本研究で観察された石灰化軟骨基質や **Type A** は、皮質骨の深部に位置することから環状層板より形成後の時間は長く経過している。骨の無機質は時間依存的に結晶が成長することから<sup>74)</sup>、石灰化軟骨基質や **Type A** は皮質

骨の表面側に位置する Type B や Type C に比べて硬いことが推測され、これが皮質骨の芯をなすと考えられる。それに対し、基質線維が密で層板構造をなす Type C は 3 週齢で認められず、7 週齢でその芯となる骨を包み込むように存在した。13 週齢においても Type A の存在部位は、基本的に 7 週齢と同様であったが、大腿骨の後面および外面では Type B が、また、前面および内面には Type C が厚く形成された。石灰化軟骨基質周囲の骨基質は石灰化軟骨基質よりも石灰化度が低いことが示されている<sup>68)</sup>。本研究における Type A のように、皮質骨の中でも深部の骨基質は表層の骨基質に比べて形成後長い時間が経過している。先に述べたように、骨基質の無機質の結晶は時間経過に伴って成長し、骨基質の硬さを高めることから<sup>74)</sup>、Type B と Type C は Type A に比べて石灰化度が低いことが推測される。事実、皮質骨表面に酸腐蝕を施して SEM で観察すると、皮質骨表面には異なる深さの陥凹がみられた。石灰化軟骨基質は最も深く陥凹するが、その周囲の Type A は石灰化軟骨基質に次いで深く陥凹し、さらにその周囲の Type B と Type C は Type A より深く陥凹しなかった。これは酸腐蝕によって溶出する無機質の結晶量の違いを意味するものであり、無機質の含有率の多い骨基質は溶出が顕著となる。このことから、皮質骨内では石灰化軟骨基質が最も無機質含有率が高く、硬いことが分かる。また、それに次いで Type A、さらに Type B と Type C という順で無機質含有率が低下する。石灰化軟骨基質や Type A が皮質骨の深部に位置し、それを



取り巻くようにして Type B と Type C が形成される構造は，石灰化度の高い石灰化軟骨や Type A を皮質骨の芯にしなから，硬軟両組織を合わせ持つことによって機械的刺激に対して柔軟に対応し得る特徴を示すものと思われる。

本研究では，発育に伴って大腿骨前面の皮質骨の骨膜面および骨内膜面に Type C が形成されるが，後面の皮質骨骨膜面には Type B が形成された。ラットの大腿骨は骨幹中央部が前方に凸なアーチを描く。立石ら<sup>75)</sup>は，長骨の長軸方向から圧縮力をかけると，凸な面には近遠心方向から伸張される力が働くと述べている。一方，凹な面には圧迫力が作用し，そこは圧迫力に抵抗するために石灰化度が高いとしている。ラットの大腿骨は全体的に前方に凸なカーブを描いた。このことを，前述<sup>75)</sup>の報告に当てはめると，ラット大腿骨は加重によって前面には伸張する力が作用し，この部位における Type C の存在は，その高い柔軟性によって伸張力に抵抗するためのものと思われる。本研究で分類した Type B と Type C とでは，前者の方が早期に形成され，石灰化度は高いことが推測される<sup>74)</sup>。このように，大腿骨後面には骨の長軸方向からの圧縮力に抵抗するために，皮質骨の芯となる Type A 以外の骨基質の中でも，Type C に比べれば石灰化度の高い Type B が皮質骨後面に形成されていたであろうことが推測される。

3 週齢では皮質骨内に石灰化軟骨基質や Type A が多く占めており，

Stiffness が高いと予期されたが他の週齢より低かった。このことは皮質骨全体の厚さや断面積などの骨構造が影響したが、石灰化度の高い骨基質が占める割合も Stiffness を決定する大きな因子であると考えられる。

Stiffness と Deformation の 2 つの要素は Strength を決定する大きな要因であり<sup>76)</sup>、均質中空性試料の場合、Strength は断面積に比例することが示されている<sup>77)</sup>。本実験では発育期の骨は Deformation を一定に維持し、Stiffness を高めることによって Strength を上昇させたという結果であった。このことは、石灰化軟骨基質の線維間にプロテオグリカンが多く存在して、基質線維が疎で、その広い線維間隙に時間依存的に多くの無機質が沈着することが関連していると推測される。一方で、7 および 13 週齢では基質線維が密な Type C が増加し、これは線維間隙が狭く、無機質の結晶の発育には不適切な環境と考えられる。したがって、発育に伴う Stiffness の増加は、Type A および Type B では無機質の結晶の発育が大きく関わる可能性がある。皮質骨の中では石灰化軟骨基質と Type A が芯をなすが、それに加えて Type B の石灰化度の上昇が発育期における Strength を高める大きな因子であると推測される。

以上のことから、ラット大腿骨は異なる基質線維の密度や配列状態ならびに石灰化度からなる骨基質を合わせ持つこと、そして、発育に伴って石灰化度が高まることが最終的には Strength の上昇に大きく関わることを示唆された。

## 5. 結語

ラット大腿骨には、同一骨内に硬さとしなやかさの異なる基質が混在すること、また、発育に伴ってしなやかさが維持され、硬さが増加することによって骨全体の強度が増すことが示唆された。

## 6. 付図説明

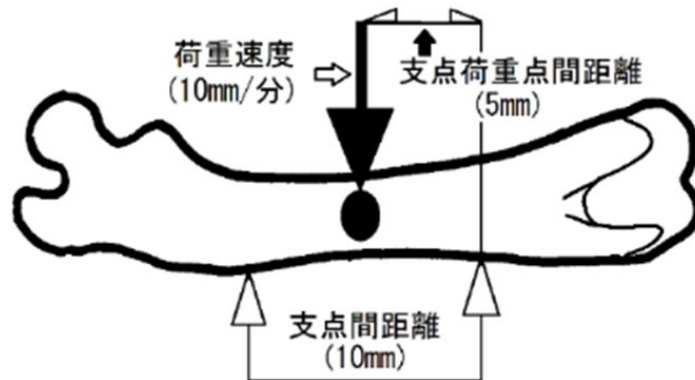


図2-1. 破断部位

支点間距離を10mm，クロスヘッド速度を10mm/minに設定し，骨の前方から破断した。

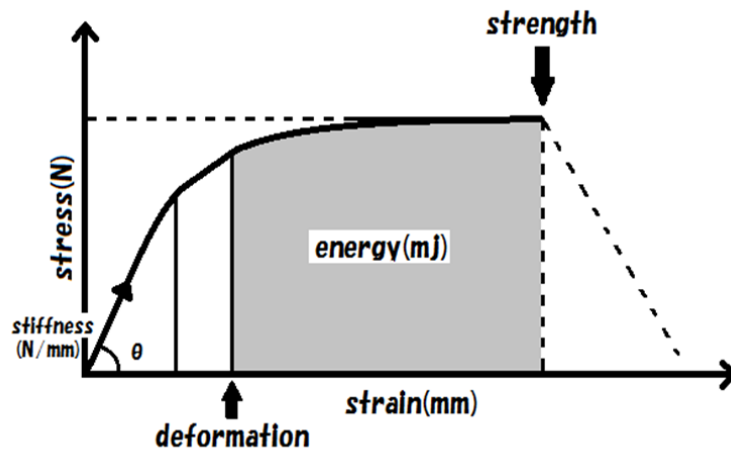


図2-2. 応力ひずみ曲線

Three-Point Bending Testのパラメータは骨にかかる荷重と骨の変位量との関係を示す傾き (N/mm) を骨の剛性Stiffnessとし，弾性限度を超えた破断時の最大荷重 (N) を骨の強度Strengthを表す指標とした。さらに最大荷重時の骨の変位量 (mm) を骨の柔軟性Deformationの指標とした。

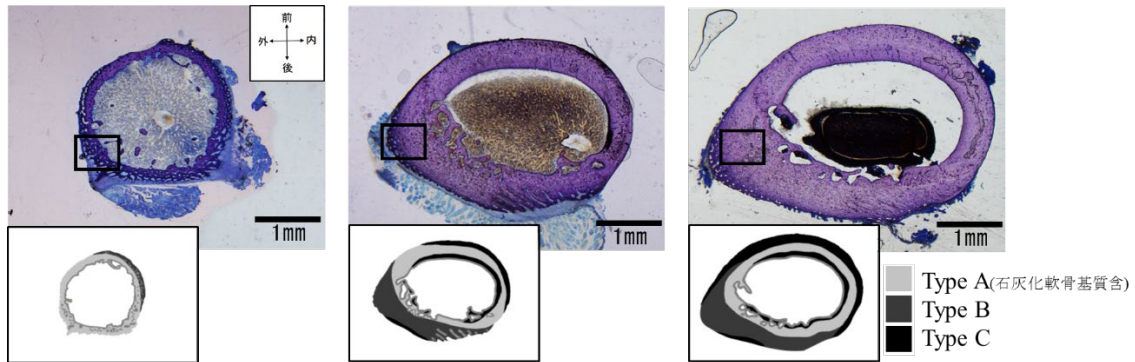


図2-3. 大腿骨骨幹部における断面形態の発育変化  
左から3, 7, 13週齢を示し、下図はType別の分布を示す.

発育に伴って皮質骨の厚さを増すとともに、外方に突出して径が増大した.

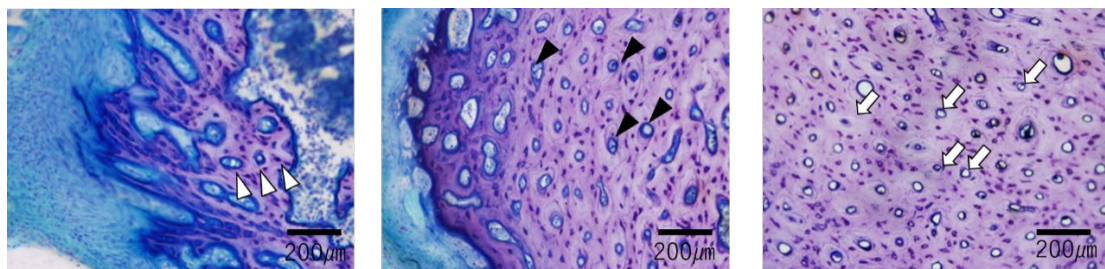


図2-4. 各週齢の大腿骨外側部の構造 (図2-3. の口部の拡大)

白矢頭：血管腔      黒矢頭：血管腔周囲のハバース層板様構造  
白矢印：狭小化した血管腔      (左から3, 7, 13週齢を示す)

3週齢の皮質骨の厚さは薄く、皮質骨内には横断された血管腔が多く認められた。発育に伴って、それを取り巻くようにハバース層板様の構造が観察された。

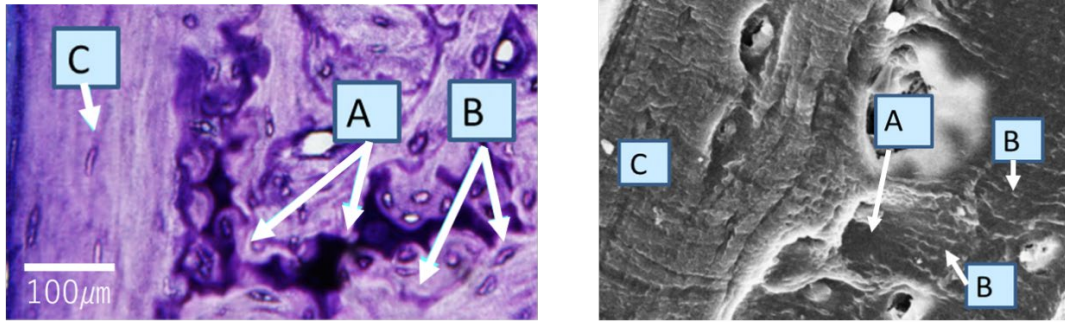


図2-5. 骨基質の分類 (左：非脱灰研磨標本，右：非脱灰酸腐食SEM標本)

- A：基質線維が疎で不規則な配列を示す骨基質 (Type A)
- B：基質線維の密度と配列状態の面からType AとType Cの中間的な骨基質 (Type B)
- C：層板構造を示す骨基質 (Type C)

エッチングした標本をSEMで観察すると，Type Aの骨基質は深く陥凹し，Type BはType Aに比べれば浅いが凹んでみられた．それに対してType Cの骨基質にはほとんど陥凹がみられないが、層板構造が認められた．

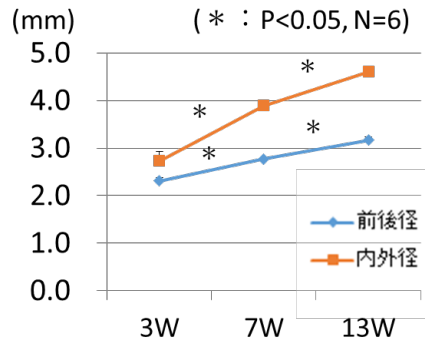


図2-6. 発育に伴う皮質骨直径の変化

発育に伴って前後および内外径ともに有意に増したが、特に内外径の増加が顕著であった。

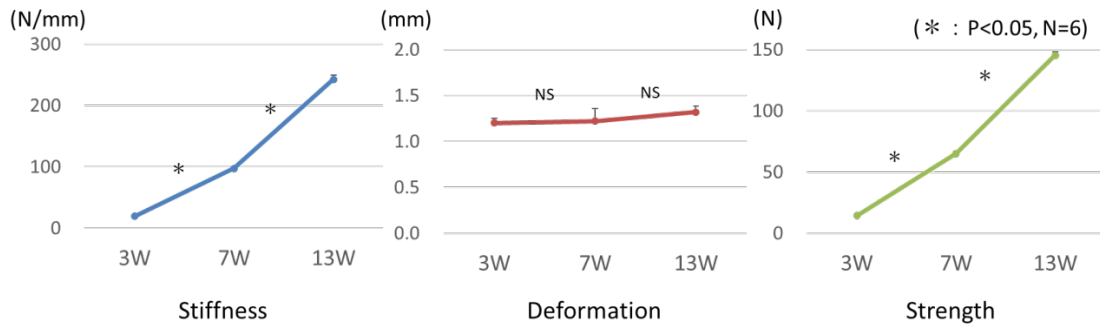


図2-7. 発育に伴う骨強度パラメータの変化

StiffnessおよびStrengthは3週齢から13週齢になるまで、ほぼ直線的な増加を示した。Deformationには3週齢から13週齢までに、有意な変化は認められなかった。

## (実験2)

### 第2節 ラット大腿骨における腱付着部の構造と骨膜の血管分布に関する研究

#### 1. 緒言

筋は、発育によって肥大し、それに伴って骨の腱付着部にも構造変化が生じる<sup>24)</sup>。さらに、骨膜には血管が豊富に分布しており、これにも発育による変化がみられる<sup>78)</sup>。しかしながら、筋と骨膜が緩く連結する部位と強固に連結する部位における骨膜の構造上の違いは明らかにされていない。さらに、それらの部位における血管分布の違いについて検討した報告もない。

本研究は、ラット大腿骨を用いて、異なる筋の付着部位における骨膜の構造上の特徴を明らかにするとともに、それらと血管分布との関連性について検討することを目的とした。

#### 2. 材料および方法

##### 2.1 実験動物

13 週齢のウィスター系雄性ラット 10 匹を用いた。

##### 2.2 血管鋳型樹脂および血管墨汁注入標本の作製

ラットにソムノペンチルを腹注 (40mg/kg) した後、以下の手順にて標



本を作製した。

血管鑄型標本の作製では、生理食塩液に続いて、2.5%グルタルアルデヒドと2%パラホルムアルデヒド(PFA)を倍希釈したカルノブスキー液(40ml)を用いてラットに灌流固定した。その後、腹大動脈から血管鑄型標本作製用樹脂(メルコックス)を灌流し、大腿骨を摘出した。その標本から有機質を除去するため、15%KOH水溶液に2週間浸漬し、硬化した樹脂を走査電子顕微鏡(SEM)にて観察した。また、血管墨汁注入標本の作製では、上記と同じ手順で生理食塩液および固定液を灌流した後、生理食塩水にて希釈された墨汁を灌流し、リゴラック樹脂に包埋し、加温重合した。そのブロックを研磨、染色し、光学顕微鏡(LM)標本として用いた。

### 2.3 組織学的標本の作製と観察

ラットを炭酸ガス吸引によって安楽死させた後、大腿骨を摘出し、以下の手順でSEMおよびLM観察用標本作製し、観察した。

SEM用標本の作製では、摘出した標本をカルノブスキー液にて浸漬し、大腿骨の骨幹中央部の横断標本作製した。0.1または1molHClで骨表面に酸腐食を行い、石灰化分を溶出させた。その後、SEMで観察できるように、四酸化オスミウムにより後固定し、脱水・凍結乾燥を行い、さらにカーボンおよびプラチナ蒸着を行った。なお、SEM観察に際しては大

腿骨を前，後，内および外面に区分した．組織観察用標本の作製では，摘出した標本を 4%PFA にて浸漬固定した標本を，真空下で脱水，透徹を行った後，リゴラック樹脂に包埋し，血管の走行を観察した．

### 3. 結果

#### 3.1 皮質骨の肉眼的観察

大腿骨近位前面には，腱線維が骨表面に対して垂直方向から付着しており，骨幹中央部より遠位にかけては骨表面に平行な方向から付着する大腿四頭筋が存在した．さらに，大腿四頭筋と骨膜の間には脂肪体を認め，特に骨幹中央部から骨幹端部にかけて発達した．一方，後面では全体的に垂直方向から付着する内転筋が分布した．また，横断標本は図に示すように大腿骨前内面は骨膜が薄く，後外面は厚かった（図 2-8）．

#### 3.2 皮質骨の組織構造

骨幹中央部の腱付着部における骨膜と骨基質，ならびにそれらの境界部を SEM にて観察した．皮質骨深部に局在する石灰化軟骨基質周囲の皮質骨断面は滑沢であった（図 2-9）．さらに，その周囲の断面は粗造であった．皮質骨断面の前，後，内，外面を拡大すると骨膜の薄い部位では骨と骨膜との結合が弱く，骨膜の厚い部位は骨膜と骨との間に太い線維が多く密接に結合していた（図 2-10）．

血管鋳型標本を用い，前面と外面における腱付着部の骨膜下に分布する

血管を観察した。腱線維が骨表面に対して垂直に近い方向から埋入された部位（以下，垂直埋入部位）では血管が網状に分布し，さらに，拡大して観察するとループ状をなした。一方，腱線維が骨表面に対して平行に近い方向から埋入された部位（以下，平行埋入部位）では，血管が骨表面を這うように走行した。太い血管から分枝を多く出し，垂直埋入部位に比べて血管の密度は高かった（図 2-11）。垂直埋入部位を横断すると，筋線維の周囲を取り囲むように血管が分布した。一方，斜断または縦断された部位は，筋に平行な方向に分布しており，それらの血管が適宜，吻合しながら骨内に埋入されていく様子が観察された（図 2-12）。

#### 4. 考察

本研究では，大腿骨骨幹中央部から遠位にかけて，皮質骨の前面には腱線維が骨表面と平行に近い方向へ配列するものが多く存在した。大腿前面に位置する大腿四頭筋と骨膜の間には脂肪体が存在し，特に骨幹中央部から骨幹端部にかけて発達した。一般に脂肪体は筋収縮に伴う摩擦が大きい部位に存在することから，中間広筋の付着する大腿骨骨幹端部には強い摩擦力を生じることが推測された。一方，後面では全体的に垂直方向から付着する筋が存在した。そのため，この面には大腿骨の長軸方向からの荷重と同時に，大腿骨に対して水平方向からの牽引力にも耐える必要がある。本実験で用いた実験動物はラットであり，股関節は常に屈曲している。歩

行時や跳躍時には直立二足歩行のヒトに比べて股関節を大きく伸展することになる。そのため、ラットの場合には地面を蹴り出すために股関節伸展位で強い収縮力が必要となり、骨表面に対して垂直方向から付着することによって運動効率を高めると推測される。このような結果は四足歩行動物の特性であり、ヒトとは異なる点も存在するが、ヒトの基本的な骨構造や運動の有無による影響を検討していく上でも重要な示唆を与えるものと思われる。大腿骨骨幹中央部の前内面は骨膜が薄く、後外面は厚かった。このことは、前内面の平行埋入部位では滑走性が優先されるため、骨膜と骨基質の連結はゆるく、かつ薄いことによって摩擦力に対する有利性を得ていると考えられる。一方、後外面のような垂直埋入部位は、応力が局所に集中しないように分散させるために骨膜を厚く、連結を強くすることによって牽引力に耐えうる構造となっていることが推測された。

骨膜は外側の線維層と内側の細胞層の二層構造であり、線維層は前述の力学的抵抗性を示し、細胞層には血管が発達していることから、栄養や代謝に関与することが知られている<sup>78)</sup>。このような構造を立体的に観察するため、骨幹中央部の筋付着部における骨膜および骨基質とその境界部をSEMにて観察した。皮質骨深部に局所的に存在する石灰化軟骨基質周囲には滑沢な部位が認められ、その周囲は基質線維を含む有機質が露出して粗造であった。骨膜および骨内膜面には層板をなす構造がみられた。著者は大迫の分類<sup>65)</sup>を参照にして、基質線維の密度と配列状態の面から分化

度の低い骨を Type A, 分化度の高い骨を Type C とし, それらの中間的な骨を Type B に分類している. それらの骨基質では酸腐食による石灰化成分の溶出度が異なることから, 皮質骨深部の石灰化軟骨基質周囲に存在した滑沢な部位は Type A に相当し, その周囲は粗造であったことから Type B, そして層板構造をなす部位が Type C に相当する. 実験 1 で報告したように, Type A は石灰化軟骨基質とともに皮質骨深部にのみ存在し, 後外側には Type B が広く分布し, Type C は, 皮質骨の前内面に厚く形成されていた. ラットの大腿骨は骨幹中央部が前方に凸であり, その骨は加重によって前面には伸張する力が作用して, この部位における Type C の存在は高い柔軟性をもたらし, それによって大腿骨が伸張力に抵抗する<sup>75)</sup>と考えられる.

さらに, 各面を拡大して観察すると, 骨膜が薄い部位の腱線維は骨との結合が弱かった. 一方で骨膜の厚い部位は太い線維が骨膜と骨の間に多く存在し, それらの間の強い結合によって剥離しなかった. すなわち, 前面および内面は線維が細くて結合が弱く, 後面および外面は線維が太くて結合が強いことがわかった.

骨基質と骨膜の分布を観察すると, 後外側面のような骨膜の厚い部位と Type B の存在する位置が一致していた. このことは, 腱からの牽引力に耐えうるために骨膜を貫通する線維が太く, また, 石灰化度が高いことが加重時の圧迫力に耐え得る構造となっていたためと思われる. 一方, 前内

面には Type C が分布しており，加重時に生じる伸張力に抗するが，骨膜を貫通する線維が微細であるために骨基質との結合は弱いであろうことが推測された．

四肢の筋の長軸方向における血管走行からも推測されるように，前面の血管では骨表面へ平行に血管が走行しており，筋によるポンピング作用で血行を促進するため有利であると思われる．一方，後面では骨表面に平行ではなく，その腱線維は骨表面に垂直な方向に配列していた．このような部位の血管は鋳型標本ではリング状となっていた．また，墨汁注入標本では腱線維束を血管が取り囲むように走行しており，これは血管鋳型標本の血管走行に一致するものであった．このように腱線維が骨表面に垂直に埋入される部位では腱線維束が骨に埋入される状況を阻害しないように血管が走行していたと思われる．以上のことから，骨膜内の血管の走行には筋の走行方向が密接に関連し，部位によって血行を優先すべきか，または骨内に埋入される筋線維束の配列を優先すべきかが決定されていると思われる．

## 5. 結語

ラット大腿骨における骨膜内の血管の走行方向には，腱線維の骨内への埋入方向が関わっていた．

## 6. 付図説明

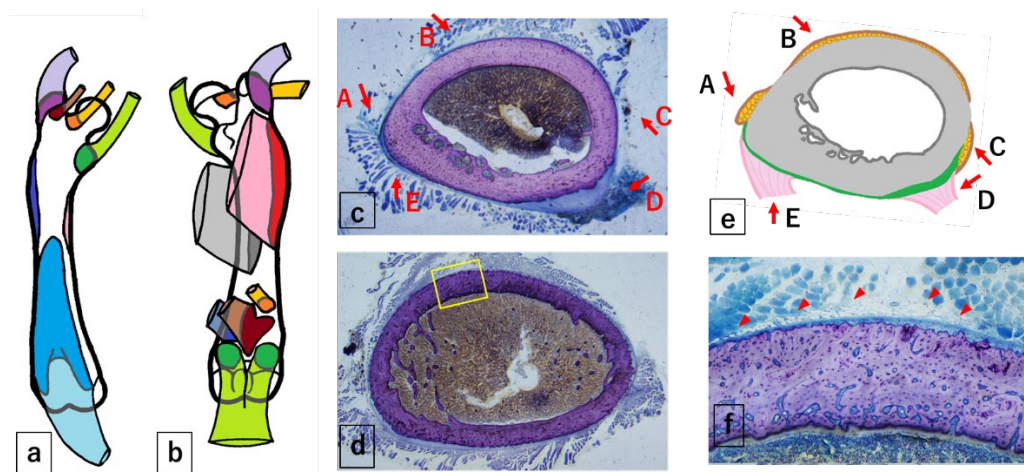


図2-8. 骨膜と筋付着部の関連性

**a, b** : 筋付着部の模式図(**a**前面、**b**後面)、**c, d** : 骨幹中央部(上段)および骨幹端部(下段)の弱拡大像、**e** : 図**c**のシェーマ、**f** : 図**d**の□部の拡大  
**A** : 外側広筋、**B** : 中間広筋、**C** : 内側広筋、**D** : 長内転筋、**E** : 大内転筋、  
 赤矢頭 : 脂肪体

大腿骨近位前面には骨に対して垂直方向から付着する筋が多く、中央部より遠位にかけては骨表面に平行な方向から付着する筋が存在していた。大腿前面に位置する大腿四頭筋と骨膜の間に脂肪体を認め、特に中央部から遠位部にかけて発達していた。一方、後面では全体的に垂直方向から付着する筋が分布していた。

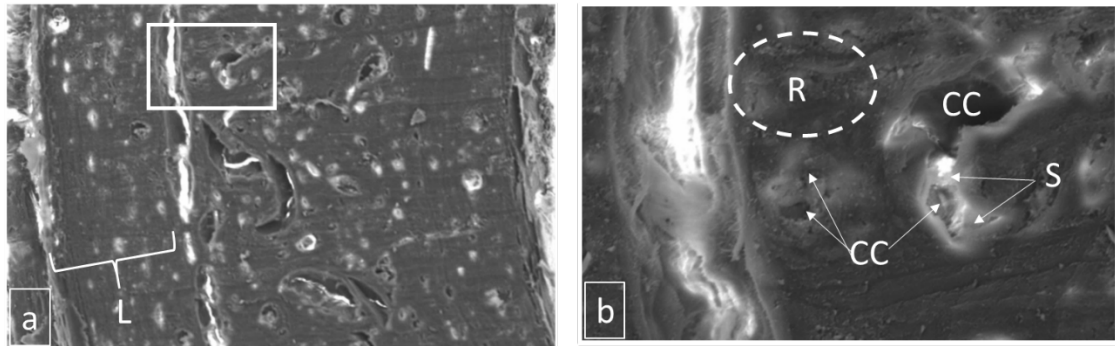


図2-9. 異なる石灰化度の骨基質 (SEM像)

a : 皮質骨の構造、b : 図Aの拡大像

L : 層板骨、R : 粗面部位、S : 滑面部位

皮質骨の骨膜面および骨内膜面には層板構造(L)がみられた。皮質骨深部に局在する石灰化軟骨基質(CC)周囲の骨の断面は滑沢(S)であった。さらに、その周囲の基質の断面は粗造(R)であった。

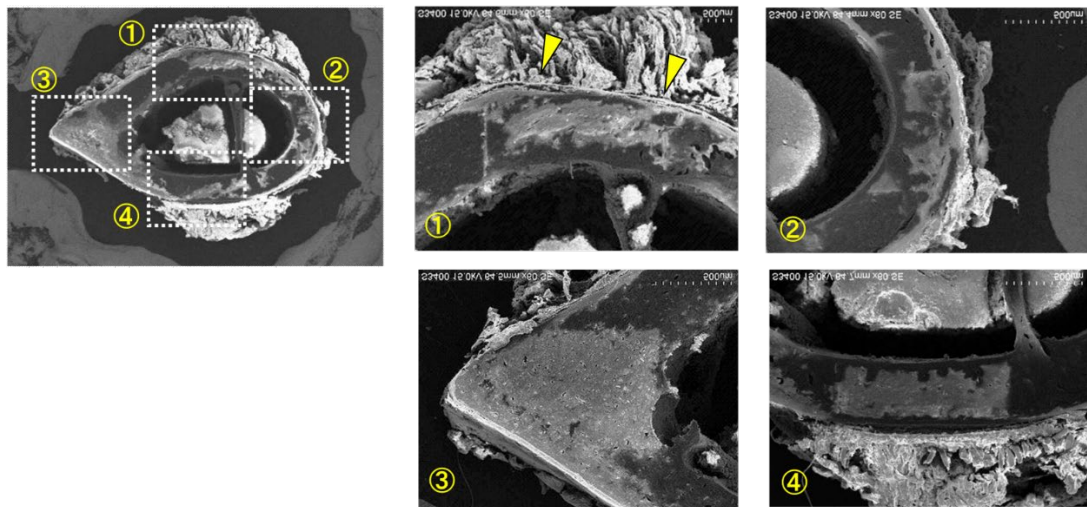


図2-10. 骨膜と骨基質の境界部の拡大像 (SEM像)

右側の4つの図(①~④)は、左図の拡大である。筋付着部周囲における骨膜と骨基質の境界部で、骨膜が薄い部位は基質との結合が弱く、固定の際に剥離していた (矢頭)。



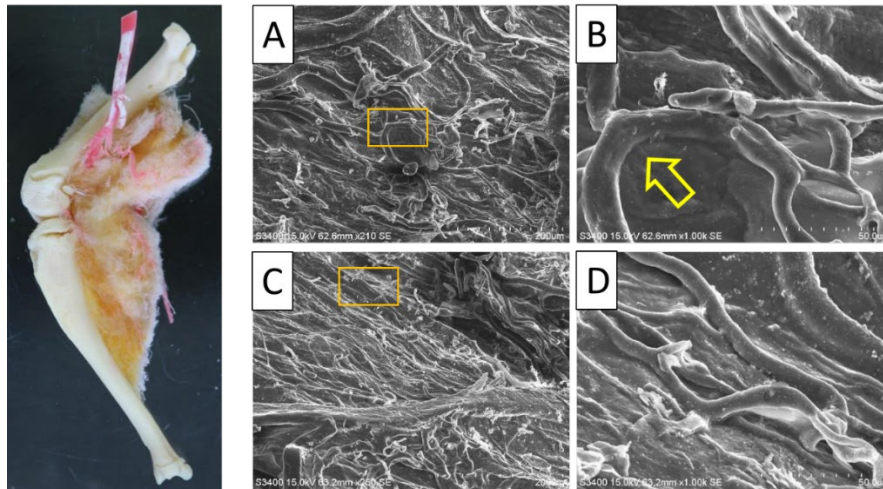


図2-11. 血管鋳型標本（左：肉眼観察像、右：SEM像）

骨基質に対して斜め方向から腱が付着する部位の血管は網状に配列し(A)，□部を拡大するとループ状に走向していた(B：矢印)。一方，筋が骨膜に平行に近く走行する部位(C)の□部を拡大すると，血管が骨表面を這うように分布していた(D)。

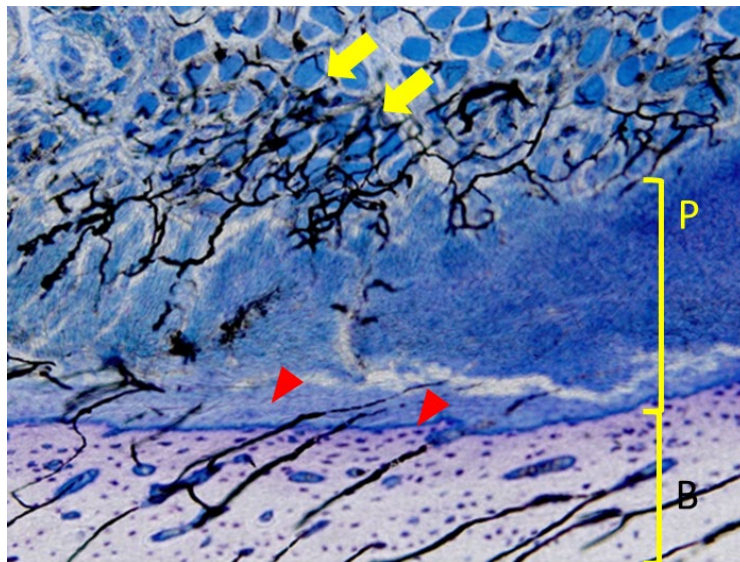


図2-12. 垂直埋入部位の横断像（P：骨膜、B：骨）

筋線維の周囲を取り囲むように血管が分布していた（矢印）。一方，斜断または縦断された部位（矢頭）は，筋と平行に分布していた。

### 第3節 まとめ

本章では 3, 7 および 13 週齢のウィスター系雄性ラットの大腿骨を材料とした。実験 1 では骨構造の発育変化を観察し、それを骨強度の変化に関連づけて検討した。同一骨内に硬さとしなやかさの異なる基質が混在すること、また、発育に伴ってしなやかさが維持され、硬さが増加することによって骨全体の強度が増していた。実験 2 では異なる筋の付着様式の部位における骨膜の構造的特徴を明らかにするとともに、それらと血管分布との関連性について検討し、骨膜内の血管の走行方向には、腱線維の骨内への埋入方向が関わっていた。このように発育に伴う骨構造の変化と強度の上昇は密接に関連しており、骨周囲に存在する骨膜は、その部位によって血行を優先すべきか、または骨内に埋入される筋線維束の配列を優先すべきかが決定されていることが示唆された。

### 第三章 骨の発育と骨折線の形状（実験 3， 4）

#### （実験 3）

#### 第 1 節 発育に伴う骨の構造変化が骨幹中央部の骨折線に及ぼす影響

##### 1. 緒言

骨折の好発部位に加え，骨折線の形状も年齢によって異なることが知られ，その分類は整復や固定の方法や期間を決定する際の基準としてしばしば用いられる<sup>79)</sup>．しかし，骨構造が骨折線の形状にどのように関連するかについては報告がない．本研究はラット大腿骨を用い，発育に伴う基質の構造変化を骨折線の特徴に関連付けて検討することを目的とした．

##### 2. 材料および方法

###### 2.1 実験動物

3， 7 および 13 週齢のウィスター系雄性ラットを 6 匹ずつ用いた．

###### 2.2 破断試験の条件設定

摘出した大腿骨は破断するまで生理食塩液に浸漬した．その標本を破断試験器（TK-252C， 室町機械， 東京）により， 支点間距離を 10mm， クロスヘッド速度を 10mm/min とする条件下で， 骨幹中央部を骨の前方から破断した．

###### 2.3 標本の摘出および固定

それぞれの標本は、破断後、速やかに 4%パラホルムアルデヒド水溶液 (PFA)または 0.1M カコジル酸ナトリウム水溶液 (pH7.4) にて緩衝されたカルノブスキー液 (4°C, 一晚) で固定した。

## 2.4 組織学的標本の作製と観察

4%PFA で固定された大腿骨を用いて骨幹中央部の横断標本を作製し、非脱灰樹脂研磨標本を作製した。研磨面を酸腐食 (0.1mol または 1mol 塩酸に 30 秒浸漬) した後、トルイジンブルー (TB) 染色を施した。また、同固定液で固定された他の標本を用いて矢状断脱灰パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。いずれも大腿骨前面骨幹中央部における内外的中央部を光学顕微鏡により観察した。

## 3. 結果

### 3.1 皮質骨の組織構造

HE 染色を施した脱灰パラフィン切片を光学顕微鏡で観察すると、各週齢ともに皮質骨内には染色性の低い石灰化軟骨基質を取り囲むようにエオジンに淡染する骨が存在した。3 週齢では、そのような骨が皮質骨深部に認められ、それは骨内膜側の緻密な骨に移行した。一方、骨膜面側には骨の長軸と平行な方向に延びる多くの血管腔を有する骨に移行した。7 週齢では、層板骨と層板構造を持たない骨の境をなす接合線が形成され、その骨膜面側に薄い層板骨が存在しており、その内部に休止線が認められた。

石灰化軟骨基質周囲の分化度の低い骨はその骨内膜側に位置していたが、さらにその表面側には層板構造が観察された。13 週齢では深部の石灰化軟骨基質周囲の骨の表面に明瞭な接合線が認められ、その骨膜側に層板構造を有する骨が厚く形成された。しかし、深部の石灰化軟骨基質周囲の骨の骨内膜側には 7 週齢と同部位の骨とほとんど変わらない厚さの骨が存在した (図 3-1)。

### 3.2 各週齢の破折面

破折面を樹脂包埋し、TB 染色を施して観察すると、3 週齢では破断方向に一致して亀裂を認めたが、7 週齢以降、休止線や接合線に沿って、破断方向に直交するような亀裂を認めた。その深部に存在する赤紫色に染まった石灰化軟骨基質周囲に島状の骨片が観察された (図 3-2)。すなわち 3 週齢では破断方向と同方向に入った亀裂が、発育にしたがってそれに直交する方向、すなわち骨の長軸方向へ入るようになった。

次に、破折面の立体構造を観察するために SEM 標本を用いた。いずれの週齢もアタッチメントの当たった皮質骨前面から後面に向かって亀裂が生じ、それは相対的にアタッチメントの接した点 (以下、接点) より遠位方向にかけて認められた。3 週齢の前面では、先の結果と同様に破断方向への亀裂を認め、7 週齢の骨表面には網状の微細な亀裂を生じ、皮質骨前面には骨長軸方向に大きく亀裂が入り、皮質骨が 2 層に分かれるような

亀裂を生じた。13 週齢では皮質骨内には骨長軸方向に数本の裂け目が入り、皮質骨が 3 層以上に分けられた (図 3-3)。さらに拡大して観察すると、皮質骨が扇状に裂けており、このような状態は特に遠位端に顕著であった。それに対し、後面のような層板構造が見られない部位では、破折面に凹凸が少なく、破断方向の亀裂が入っていることを認めた (図 3-4)。

#### 4. 考察

外科領域では骨折線の形状によって分類<sup>80)</sup>がなされているが、破断された時点の骨折線を骨基質の分化度に関連づけた報告がない。そのため、本実験では破断試験器を用いて破断点すなわち物性的に破綻する点で条件を揃え、骨折線を形態学的に観察した。

HE 染色を施された脱灰パラフィン切片は、いずれの週齢も脱灰によって石灰化軟骨基質が白く抜けていた。また、非脱灰樹脂標本に TB 染色を施すと、石灰化軟骨基質が残存しているため、メタクロマジーによって赤紫色に染色された。3 週齢の皮質骨の骨内膜側は比較的、緻密な構造を有しており、骨膜側には血管腔が多く存在した。7 週齢では皮質骨の骨内膜側は緻密化し、厚さの増大によって全体の厚さを増した。さらに、石灰化軟骨基質を含む分化度の低い骨は相対的に骨膜側へと位置し、接合線を境に骨膜面に薄い層板構造を認めた。すなわち、このことは 3 週齢では横径の拡大を図るため、骨膜側に向かって骨形成が活発に行われ、7 週齢まで

に血管腔を閉鎖して緻密化することを示している。また、7週齢は骨膜側の骨吸収が盛んであるのに対して、骨内膜側への骨形成が旺盛であるため、皮質骨の厚さを増していた。13週齢では皮質骨内に明瞭な接合線を認め、その骨膜側に層板骨が厚く形成されており、このことは7～13週齢に間に骨膜側からの吸収を受けたことを意味する。一方で、深部の石灰化軟骨基質周囲の骨内膜側には7週齢と同部位の骨とほとんど厚さが変わらなかったことから、骨内膜側からの吸収はほとんど行われなかったと推測される。

基質線維の密度や石灰化度の違いによって染色性が異なることが報告されており<sup>65)</sup>、層板状に見える休止線やType BとCの境界部にみられる接合線などの非コラーゲン性の有機質を多く含む部位では周囲よりも濃く染まった。休止線や接合線が多く形成される部位は、骨リモデリングが活発であることが知られる<sup>81)</sup>。この部位には多量の非コラーゲン性タンパク質が沈着して膠原線維の配向性が不規則かつ不均一となり<sup>68)</sup>、時間依存的に無機質が沈着することから、石灰化沈着が起こりやすい環境であると考えられる。

骨幹中央部前面の発育に伴う骨折線の変化を観察すると、3週齢では破断方向に一致して亀裂を認めた。このことは骨基質の石灰化度が低く、均質であったために破断方向と一致したと考えられる。7週齢では皮質骨の深部に骨長軸方向へ向かう大きな亀裂を認め、皮質骨が二分された。13

週齢になると様相が変化し、骨長軸方向に亀裂を多数認めた。このことは発育に伴う構造変化、特に層板構造の新たな形成が大きく関わっていることが考えられる。また、前面では扇状に基質部分が裂けるように破断されている部位も見られた。このような亀裂は、接合線に沿って骨長軸方向に認められ、Zimmermann ら<sup>82)</sup>と同様の所見であった。さらに、その深部の石灰化軟骨基質周囲に島状の骨片が形成されていたが、これは周囲との石灰化度の違いから生じたものと考えられる。これらのことは、骨基質の分化度や石灰化度の差異が骨折線の方角に関わることを示している。本実験では、層板間に線状の亀裂を認めたが、周囲よりも石灰化度が高く、層板間の線維連絡が乏しいために力学的脆弱部位となっていたと推測される。それに加え、深部に島状の骨片が観察された。これは島状に存在する石灰化軟骨基質や Type A とその周囲の石灰化度が異なることが影響し、表層部、深部ともに硬軟の移行部位が力学的脆弱部位となることを示していると考えられる。一方で、後面には破断方向への亀裂を認め、骨長軸方向に引張する応力が加わったと考えられる。引張応力は膠原繊維によって、圧縮応力はアパタイトによって受けることが知られ<sup>83)</sup>、層板骨の分布により弾力性が高い前面よりも、相対的に石灰化度の高い後面は引張力に対して脆弱であるため、離開した結果であると考えられる。

## 5. 結語





## 6. 付図説明

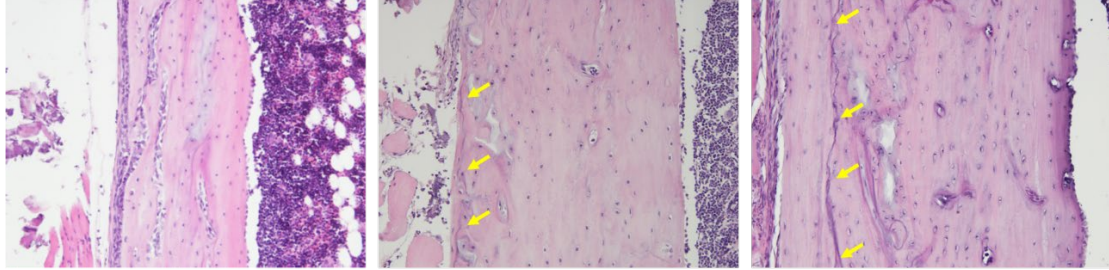


図3-1. 発育に伴う骨幹中央部の構造変化  
(左から3,7,13週齢を示す, 縦断像)

3週齢には層板骨を認めなかったが, 7週齢で層板骨とそうでない骨の境をなす接合線を認め, 13週齢では明瞭な接合線がみられた.  
(黄色矢印)

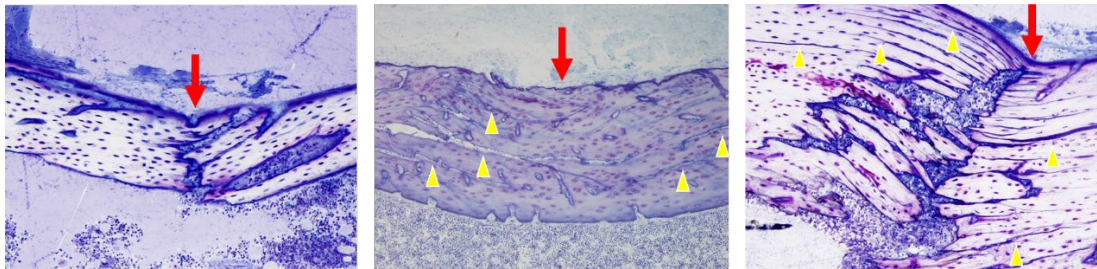
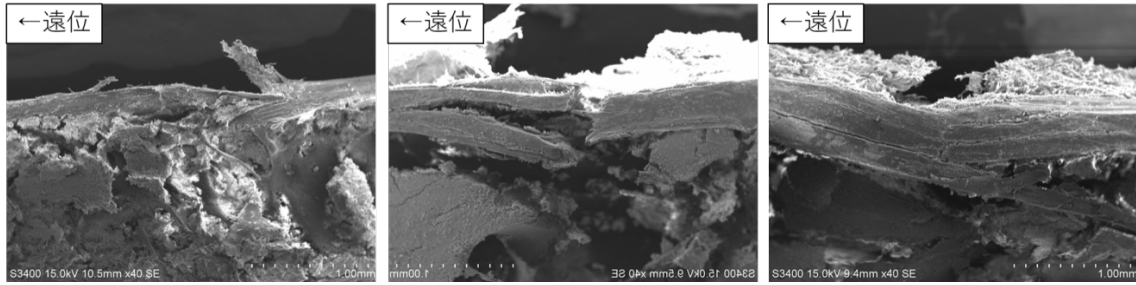


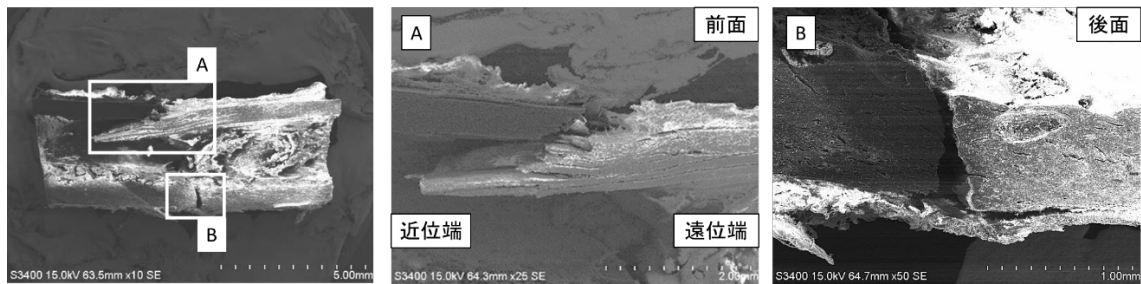
図3-2. 発育に伴う破折面の変化  
(左から3,7,13週齢を示す, 縦断像) 赤矢印: 接点

3週齢では破断方向に一致して亀裂を認めたが, 7週齢以降, 休止線や接合線に沿って, 破断方向と直交するように亀裂を認めた(矢頭). その深部に存在する赤紫色に染まった石灰化軟骨基質周囲に島状な骨片が観察された.



**図3-3. 破折面の立体構造**  
(左から3,7,13週齢を示す, 縦断像)

3週齢の前面では, 先の結果と同様に破断方向への亀裂を認め, 7週齢の骨表面には網状の微細な亀裂を生じ, 皮質骨前面には骨長軸方向に大きく亀裂が入り, 皮質骨が2層に分かれるような亀裂を生じた. 13週齢では皮質骨内には骨長軸方向に数本の裂け目が入り, 皮質骨が3層以上に分けられた (7週齢は反転) .



**図3-4. 13週齢の破折面 (縦断像)**

皮質骨前面における遠位端は扇状に裂けていたが, 後面のような層板構造が見られない部位では, 破折面に凹凸が少なく, 破断方向へ亀裂が入っていることを認めた.

## (実験4)

### 第2節 発育に伴う骨の構造変化が骨幹端部の骨折線に及ぼす影響

#### 1. 緒言

実験3では骨破断状態を組織学的に観察し、発育に伴う骨の構造変化が骨幹中央部の骨折線に及ぼす影響について報告した。しかし、長骨の骨折は骨粗鬆症などの影響を受けやすく、骨幹部より骨幹端部に生じやすいことが知られているが<sup>84)</sup>、骨幹端部で骨基質の発育変化が骨折線に及ぼす影響については報告がない。本実験では、実験3と同様に破断試験器を用い、破断点すなわち物性的に破綻する部位で条件を揃え、骨折線を形態学的に比較、検討することを目的とした。

#### 2. 材料および方法

##### 2.1 実験動物

3, 7 および 13 週齢のウイスター系雄性ラットを 6 匹ずつ用いた。

##### 2.2 破断試験の条件設定

実験3と同様に、摘出した大腿骨は破断するまで生理食塩液に浸漬した。その標本を破断試験器 (TK-252C, 室町機械, 東京) により、7, 13 週齢は支点間距離を 10mm とした。ただし、3 週齢は骨長の関係上、支点間距離を確保できなかったため、その距離を 5mm に設定した。クロスヘッド

速度を 10mm/min とする条件下で，骨幹端部の骨を前方から破断した．

## 2.3 標本の摘出および固定

実験 3 と同様の方法にてラットから摘出した大腿骨は，破断後，速やかに 4%パラホルムアルデヒド水溶液(PFA)または 0.1M カコジル酸ナトリウム水溶液 (pH7.4) にて緩衝されたカルノブスキー液 (4℃，一晚) で固定した．

## 2.4 組織学的標本の作製と観察

4%PFA で固定された標本は非脱灰樹脂研磨標本の作製に用いた．研磨面を酸腐食 (0.1mol 塩酸に 30 秒浸漬) した後，トルイジンブルー (TB) 染色を施した．また，同液で固定された他の標本を用いて矢状断脱灰パラフィン切片を作製し，ポリクローム染色を施した．大腿骨前面の皮質骨の内外的中央部を光学顕微鏡により観察した．いずれも観察部位を骨幹端部とした．

## 3. 結果

### 3.1 皮質骨の組織構造

脱灰パラフィン切片にポリクローム染色を施して，骨幹端部前面における層板骨の形成過程を観察した．いずれの週齢も皮質骨の骨膜側には石灰化軟骨基質や，層板構造を示さない骨が存在しており，皮質骨におけるこの部位の厚さは発育に伴う変化を認めなかった．一方，骨内膜側には層板

骨が形成され、発育にしたがってその厚さを増し、層板骨とそれより深部の骨基質との境界には接合線を認めた。すなわち、骨幹端部の皮質骨では骨膜側の骨基質を残した状態で発育に伴って骨内膜側に層板骨が形成されていた（図 3-5）。

### 3.2 各週齢の破折面

破折面を樹脂包埋して TB 染色を施し、発育に伴う大腿骨遠位骨幹端前面の骨折線の変化を観察すると、3 および 7 週齢では破断方向に入った亀裂が、13 週齢では骨の長軸方向に入った。すなわち、3 および 7 週齢では破断方向に一致して亀裂を認めたが、13 週齢は休止線や接合線に沿って、骨長軸方向の亀裂を認めた。さらに、骨片を生じて遠位端との離開がみられ、骨髓側の皮質骨が遠位方向に向けて舌状に突出し、近位端の骨髓側は剥離していた（図 3-6）。その様子をトレースし、接点を揃えて週齢ごとに並べると、発育に伴って接点より離れた位置に亀裂が生じることが示された（図 3-7）。

次に、骨幹端前面における破折面の立体構造を観察するために SEM 標本を用いた。3 週齢では接点より遠位部が破断され、若木をしならせたような様相であった。7 週齢では接点に一致して亀裂が生じ、破断方向と一致していた。13 週齢では 7 週齢と同様に接点に亀裂を生じたが、さらに遠位骨片に骨長軸方向への亀裂も認められた（図 3-8）。

#### 4. 考察

一般に、四肢などの長骨は骨幹部よりも骨幹端部付近に海綿骨を多く認め、このような部位は骨脆弱化による影響を受けやすく、骨梁密度の低下によって剪断力に弱くなるために、骨折を生じやすくなることが知られている。しかし、骨幹端部で骨基質の発育変化が骨折線に及ぼす影響については報告がない。本実験では、実験 3 と同様に破断試験器を用い、破断点すなわち物性的に破綻する点で条件を揃え、骨折線を形態学的に比較、検討した。

実験 1 で基質線維の密度や配向性によって骨基質の分化度を分類している。この分類に照らし合わせて骨幹端部前面を観察すると、骨膜側には石灰化軟骨基質や、基質線維が粗造である分化度の低い骨、すなわち Type A または B が存在した。その骨内膜側には、Type C に相当する層板骨が形成され、その境界部に接合線を認めた。このことは、骨幹端部の前面では内側に骨形成が行われたことを示すと考えられる。また、骨膜側の骨基質の厚さには発育に伴う変化はみられなかったことから、骨表面の骨吸収はほとんど行われておらず、骨幹端部の皮質骨では骨膜側の骨基質を残した状態で、発育に伴って骨内膜側に形成されることが示唆された。実験 3 で示したように骨幹中央部の前面では内外環状層板が形成されて 3 層構造となるが、骨幹端部ではいずれの週齢も 2 層構造となっていた。このことは遠位骨端板より形成された骨が、骨幹中央部に向かって発育する部位

であり、まだ外環状層板の形成がなされていないためであると推測される。

3 および 7 週齢では破断方向に入った亀裂が、13 週齢では休止線や接合線に沿って骨の長軸方向へ変化し、骨片を生じた。その骨片は遠位皮質骨と離開し、骨髄側の皮質骨が舌状に突出して近位皮質骨の骨髄側は剥離していた。これは接合線と休止線の存在が大きく関わっていると考えられる。すなわち、実験 1 で述べたように、接合線は貫通線維が少なく線維密度が低いことから、時間依存的に石灰化度が増すことにより、周囲の骨基質に比べて相対的に硬化が進み、骨長軸方向への亀裂が舌状の骨片をもたらしたと考えられる。

破断像をトレースし、接点を揃えて週齢ごとに並べると、発育に伴って接点より離れた位置に亀裂が生じることが理解された。骨幹中央部では外環状層板が存在しており、破断時の応力を骨長軸方向に分散されていたが、骨幹端部では存在していないために、このような亀裂が生じたと推測される。

小児期の骨折に生じるように<sup>85)</sup>若木をしならせたような破断像を 3 週齢で観察した。7 週齢ではそのような破断像はみられなかったが、接点に生じた亀裂は破断方向と一致した。13 週齢では 7 週齢と同様に、接点に亀裂を生じたが、遠位骨片にも骨長軸方向への亀裂を生じた。この部位はまだ外環状層板の形成されておらず、内環状層板のみの形成であったために深部に微細な骨片を生じず、2 層に分断されていたと推測される。



## 5. 結語

發育に伴う大腿骨遠位骨幹端部における骨折線の形状には、骨構造の發育変化が密接に関わっていた。

## 6. 付図説明

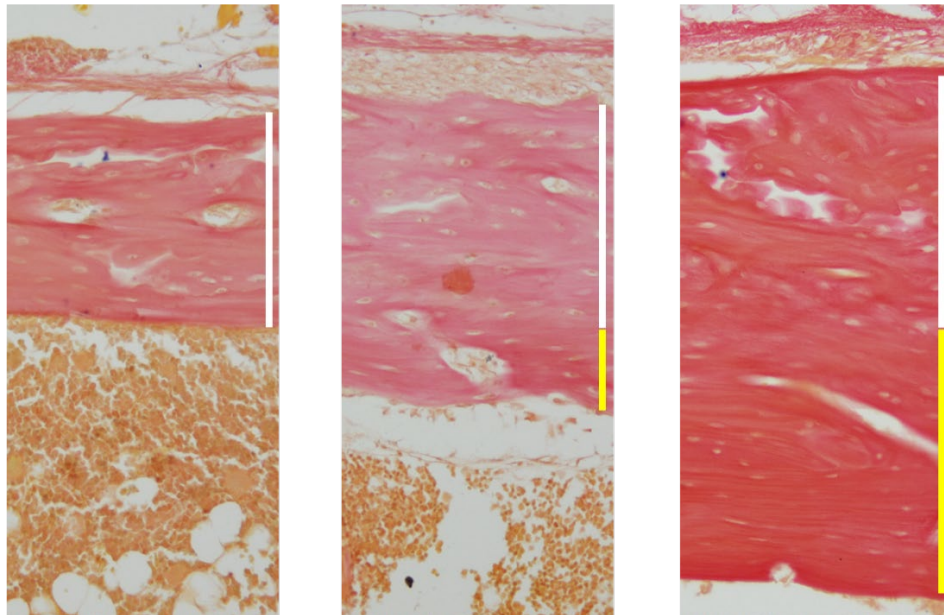


図3-5. 発育に伴う骨幹端部の構造変化  
(左から3, 7, 13週齢を示す, 縦断像)

いずれの週齢も骨膜面側には石灰化軟骨基質や基質線維が粗造な分化度が低い骨(白線)が存在しており, この部位の厚さには発育に伴う変化はみられなかった. 一方, 骨内膜側には層板骨(黄線)が形成され, 発育にしたがってその厚さを増し, その境界部には接合線を認めた.

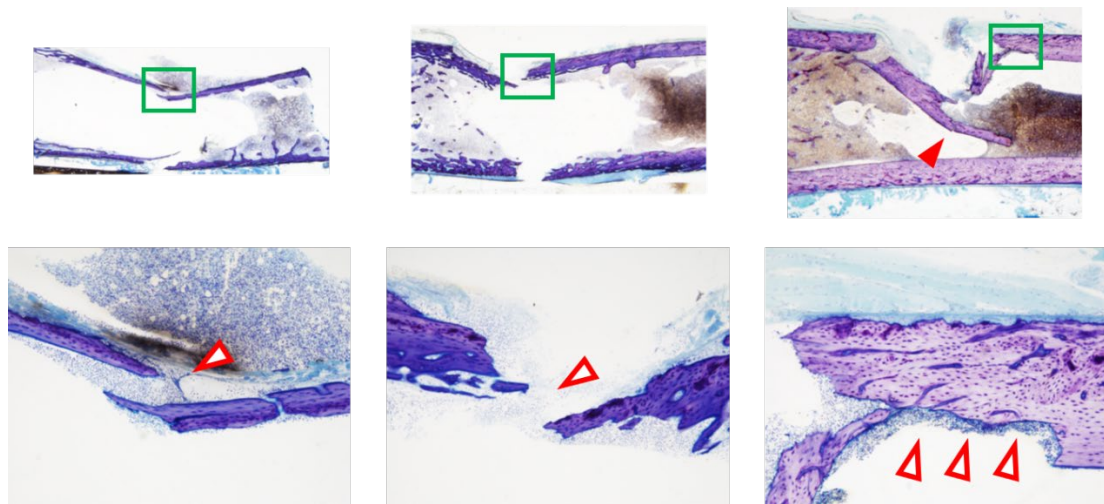


図3-6. 発育に伴う破折面の変化（左から3,7,13週齢を示す，縦断像）  
上段：破断部位の弱拡大像 下段：口部の拡大像

3および7週齢では破断方向に一致して亀裂を認めたが，13週齢は休止線や接合線に沿って，骨長軸方向に亀裂を認めた（白矢頭）．さらに，骨片を生じて遠位端との離開がみられ，骨髓側の皮質骨が遠位方向に向けて舌状に突出し，近位端の骨髓側は剥離していた（赤矢頭）．

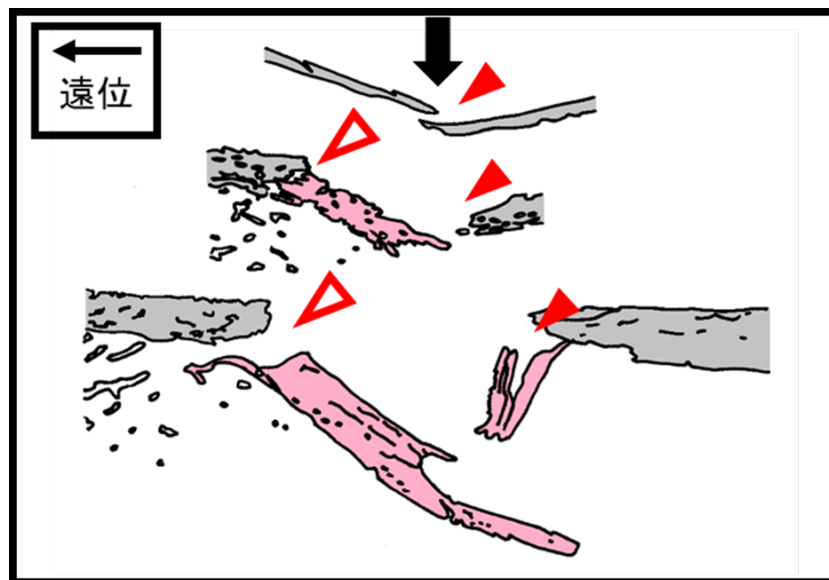


図3-7. 破折面のシェーマ像（上から3,7,13週齢を示す）

発育に伴って接点より離れた位置に亀裂が生じることが示された（ピンク:骨片）．

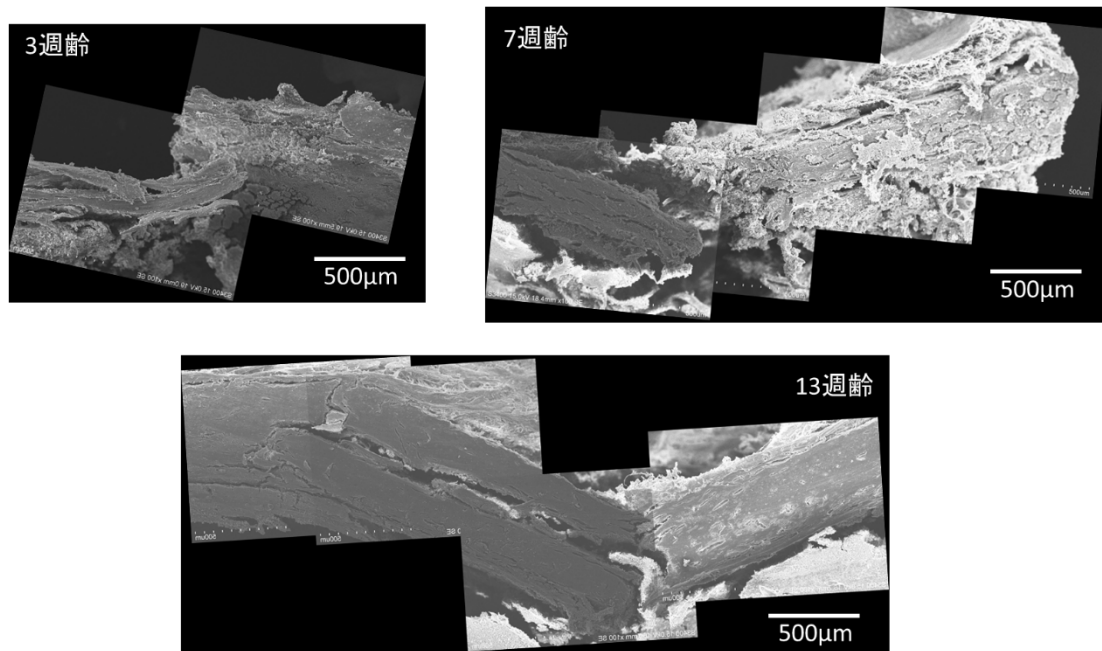


図3-8. 破折面の立体構造（縦断像）

3週齢は若木をしならせたような破折形状であったが、7週齢では接点に一致して亀裂が生じ、破断方向と一致していた。13週齢では7週齢と同様に接点に亀裂を生じたが、さらに遠位骨片に骨長軸方向への亀裂を認めた。

### 第3節 まとめ

本章では 3, 7 および 13 週齢のウィスター系雄性ラットの大腿骨を材料とし, 破断試験器を用い, 破断点すなわち物性的に破綻する点で条件を揃え, 発育に伴う基質の構造変化を骨折線の特徴に関連付けて検討した. 実験 3 では骨幹中央部, 実験 4 では骨幹端部を観察した. 発育初期の皮質骨は層板構造を示さない骨で形成されるが, 発育に伴って層板骨が出現し, その内部には休止線や, 層板構造を示さない骨との境界には明瞭な接合線が出現した. 破折された標本を観察すると, 3 週齢では休止線や接合線の方角とは無関係な方向に亀裂を生じたが, 発育に伴って層板骨内の休止線や接合線に一致して亀裂が入ることが認められた.

## 第四章 骨に及ぼす鍼通電刺激の影響（実験5～8）

### （実験5）

#### 第1節 異なる非加重条件によるラット大腿骨の骨量減少に対する 鍼通電刺激の影響

##### 1. 緒言

実験動物を用い、下肢の不動化<sup>86)</sup>や尾部懸垂<sup>87)</sup>のようなメカニカルストレス減による骨量や周囲の軟組織の減少については多く報告されている。鈴木ら<sup>88)</sup>は両者の異なる非加重条件下で関節軟骨と関節包を比較しており、加重低減状態であっても自動および他動運動の介入によって、骨量減少や関節包の萎縮抑制を示している。さらに池宗ら<sup>37)</sup>は、鍼通電刺激が筋の増加を抑制する遺伝子（Miyostatin）発現の抑制によって筋湿重量が維持されることを報告している。しかし、硬組織に及ぼす影響について組織学的に比較、検討した報告はない。ラット大腿骨を用いて非加重条件下での関節運動の有無や、それらに対する鍼通電刺激による筋収縮がどのような影響を及ぼすのかについて組織学的に比較、検討することを目的とした。

##### 2. 材料および方法

###### 2.1 実験動物

7 週齢のウィスター系雄性ラット 8 匹ずつを、以下に述べる 5 群に分けた。尾部懸垂-不動群 (Ts-Im), Ts-Im-鍼通電刺激群 (TI-EA), 尾部懸垂-可動群 (Ts-Mo), Ts-Mo-鍼通電刺激群 (TM-EA), それらに対する対照群 (CO) に分類し, CO 以外の群は尾部懸垂により加重低減を施した。

## 2.2 非加重条件

Ts-Mo および TM-EA は, 後肢に加重が掛からないようにするため, ラットの尾部を約 50cm の高さの天井から 2 週間懸垂した。さらに, Ts-Im および TI-EA にはジャケット型不動装置を用いて, 股関節および膝関節を伸展位に固定し, 股関節の内転および外転を制限した (図 4-1)。

## 2.3 刺鍼部位および鍼通電刺激条件

著者ら<sup>89)</sup>の先行研究に従い, TI-EA と TM-EA には非加重期間と同時期に大腿骨の骨膜まで鍼を刺入し, 連続的交流鍼通電刺激を行った。刺鍼部位は大腿部中央部および遠位 1/3 部とし, ポピドンヨードにて消毒した後, 大腿骨の骨膜まで刺入した。低周波刺激装置 (ラスパーエース, テクノリンク社製) を用い, 通電刺激として 250 $\mu$ sec, 50Hz, 0.24mA (500 $\Omega$  負荷時) の条件で実験期間中 10 分/日, 毎日, 2 週間実施した<sup>89)</sup> (図 4-2)。筋が収縮した際に鍼が抜けないようにするため, 鍼は皮膚表面に対して 45°の角度で刺鍼した (図 4-3)。いずれの群も実験期間終了後に大腿骨を摘出し, 後述する方法で骨幹中央部と骨幹端部を決定し, 組織学的および

形態計測学的に観察した。

## 2.4 標本の摘出および固定

標本摘出に伴う苦痛を軽減させるために、ラットを炭酸ガス吸引によって安楽死させた。死亡を確認後、筋や神経、結合組織などの軟組織を丁寧に除去し、骨膜が付着した状態で大腿骨を摘出した。右脚の大腿骨を骨強度測定用とし、左脚を組織構造観察および骨形態計測用とした。また、大腿骨はノギスにて大転子尖から外側顆先端までの長さを計測することにより全長を求め、その中間点および遠位 1/3 部を決定して、それらをそれぞれ大腿骨における骨幹中央部および骨幹端部とした。右大腿骨は摘出後、未固定のまま破断試験を行った。左大腿骨は骨形態計測および組織学的観察用の標本作製のために、まず、ハンドモーターにて両部位の上下 2mm の位置を水平割断し、それらを後述する樹脂包埋後に観察部位まで研磨し、この部位を各部位における横断標本とした。また、両部位を上下端として矢状割断し、これを縦断標本とした。それらを速やかに観察項目ごとの固定液に浸漬固定を行った。

## 2.5 骨形態計測

実験 1 と同様に大腿骨の中央および骨幹端部における横断面のリゴラック樹脂研磨標本を作製し、トルイジンブルー染色を施した。その標本を光学顕微鏡により撮影後、画像解析ソフト (WinROOF V7.4) を用いて、



以下に述べるパラメータを計測した。骨幹中央部および骨幹端部における大腿骨断面の前後および内外径を求め、皮質骨全体の断面積を計測した。

## 2.6 破断試験の条件設定

実験 1 と同様に、破断試験器（TK-252C，室町機械社製）を用い、以下の方法により Three-Point Bending Test を行った。摘出した大腿骨は破断するまで 0.9%塩化ナトリウムを含む生理食塩液に浸漬した。骨幹中央部の前面にマーキングし、その部位を上方に向け、装置のクロスヘッドがその部位に正確に当たるように機械にセットした。また、支点間距離を 10mm，クロスヘッド速度を 10mm/min に設定し、骨の前方から破断した<sup>6)</sup>。

## 2.7 組織学的標本の作製と観察

大腿骨の横断および縦断標本は、摘出後速やかに 4%パラホルムアルデヒド液または 0.1M カコジル酸ナトリウム（pH7.4）にて緩衝されたカルノブスキー液に浸漬した。4%PFA で固定したものは、その後 8%EDTA 水溶液（pH7.4）にて約 3 週間脱灰した。それらを水洗後、脱水用アルコール系列（70，90，100%）にて真空条件下で脱水し、安息香酸メチルおよびベンゼンにて透徹を行い、パラフィンを十分に浸透させ包埋した。その包埋したブロックをマイクロトームにより、厚さ約 4 $\mu$ m の連続切片を作製し、HE 染色を施した。また、カルノブスキー液で固定された標本は脱

灰せずに脱水し，その後アセトンによる透徹を行い，リゴラック樹脂を十分に浸透させ，徐々に加温重合した（38，45，55 および 60°C:各 1 日）．重合したブロックをトリミングした後，砥石および 3 段階の研磨用フィルムにて丁寧に研磨し，厚さ約 150 $\mu$ m の矢状断ならびに水平断標本を作製した．それらを 1N の塩酸で標本の表面をエッチング（酸腐蝕）し，十分に水洗した後，トルイジンブルー染色を施した．これらの脱灰および非脱灰の染色標本を光学顕微鏡にて観察した．

## 2.8 骨基質の分類

本研究では，大迫ら<sup>65)</sup>の分類法にしたがい，骨基質を以下の 3 つに分類した．すなわち，基質線維が疎で不規則な配列を示すものを分化度の低い骨基質（以下，Type A），層板構造を示すものを分化度の高い骨基質（以下，Type C），および基質線維の密度と配列状態の面から Type A と Type C の中間的な骨基質（以下，Type B）とした．このように，各週齢の骨幹中央部および骨幹端部における分化度の異なる骨基質の分類を行い，各群の骨基質の差異を観察した．

## 2.9 統計処理

形態計測によって得られたデータの平均値と標準偏差を求め，IBM SPSS Statistics Ver.24 を用いて各パラメータの一元配置分散分析を行い，有意差が認められた場合は Turkey-HSD 法によって各群間での多重比較

を行った。危険率は5%水準未満を有意とした。

### 3. 結果

#### 3.1 骨形態計測

骨幹中央部および骨幹端部における大腿骨の前後および内外径は、CO は TM-EA, TI-EA と同程度であったが、鍼通電刺激をしていない Ts-Im, Ts-Mo は他の群に比較し、低い傾向を示した (図 4-4)。皮質骨断面積も同様に鍼通電刺激を行った TM-EA, TI-EA と CO では維持されていたが、Ts-Im, Ts-Mo は有意に減少した (図 4-5)。

#### 3.2 皮質骨の組織構造

皮質骨の横断面を弱拡大像で見ると、Ts-Mo と Ts-Im の骨幹中央部後外面および骨幹端部前面が薄くなり、それは Ts-Im で顕著にみられた。それに対し、通電刺激を行った群では、いずれも皮質骨の厚さが維持された (図 4-6)。また、TI-EA 以外の実験群には骨幹端部前面にトルイジンブルー染色で濃染する部位 (以下、濃染部位) が見られ、その部位を中心に内外の骨内膜面に広がっていた。この濃染部位は石灰化軟骨基質などの赤紫に染色 (メタクロマジー) される部位や、骨前質特有の水色に染まる像とは異なり、青色であった。そのような濃染部位を拡大して観察すると、骨幹端部前面は櫛または網状の構造で石灰化軟骨基質は認められなかった (図 4-7)。

皮質骨前面の縦断された骨小腔の形態は、次に示すように皮質骨内の部位や大腿骨の高さによる差異を認めた。まず、皮質骨を骨膜側から骨膜部、深部、骨内膜部に3等分して観察すると、中央および骨幹端部では深部が最も狭小化していた。また、分化度の異なる骨内の骨小腔を比較すると、TypeAである骨幹端部骨膜側は個々の骨小腔の間隔が狭く、密に存在した。また、TypeBに相当する骨幹中央部骨膜側と骨幹端部骨膜側の骨小腔の形状は同様な形態を示し、骨細管はそこから放射状に配列した。TypeCに相当する骨幹中央部骨内膜側の骨小腔は、層板構造内に存在して圧平されていた(図4-8)。

脱灰パラフィン矢状断切片にTRAP (Tartrate resistant Acid-phosphate)染色を施して、大腿骨の中央部および骨幹端部を観察すると、大腿骨前面に濃染部位が存在し、さらに骨の表面には大小の吸収窩や破骨細胞が認められた。この状態は骨幹中央部より骨幹端部で多く観察され、TRAP陽性細胞の染色性が高かった。このような染色性を群間で比較すると、Ts-MoおよびTs-ImではCOに比べ、TRAP陽性反応を示す細胞や骨基質が多く見られた。一方、その反応は鍼通電刺激を施したTM-EAと特にTI-EAでは低く、これらの群ではTRAP陽性細胞が少なかった(図4-9)。

### 3.3 骨強度試験

硬性を示す **Stiffness** の値は CO に比較して、いずれの群も低値を示した。一方、靱性の指標である **Deformation** は鍼通電刺激を行った群が CO とほぼ同値であったが、強度を示す **Strength** において実験群は CO より有意な低値を示した。その他の群間では有意な差を認めなかったが、通電刺激によって増加傾向がみられた (図 4-10)。

#### 4. 考察

筋付着部は加重低減の影響を受けることが報告されており<sup>90)</sup>、このことは、以下に述べる骨形態計測の結果を理解する上で重要である。大腿骨の太さを示す前後および内外径を比較すると、CO の前後径は骨幹中央部および骨幹端部ともに鍼通電刺激を施した TM-EA, TI-EA と同程度であった。しかし、鍼通電刺激をしていない Ts-Im, Ts-Mo は他の群よりも有意に低い値を認め、いずれの群も前後径よりも内外径に影響を認めた。筋の牽引力によって骨芽細胞が活性化する<sup>91)</sup> ことから、実験 2 で述べたように皮質骨外面の第三転子に付着する筋の張力の影響であると考えられる。TM-EA と TI-EA を比較した際に付着部に差がみられたのは、両群ともに非加重条件下であるが、関節運動の有無が影響したと考えられる。

皮質骨断面積は通電刺激を施していない Ts-Mo および Ts-Im が CO よりも有意に減少したが、鍼通電刺激を行った群では、その値は維持された。前者は、メカニカルストレス減によって破骨細胞の吸収能亢進や骨芽細胞

の骨形成能の低下が起こり，高回転に骨量低下が起こったと考えられる．一方，後者は通電刺激による筋収縮が付着部に張力を生じたことによって，骨量が維持されたと推測される．

次に，皮質骨内の縦断された骨小腔の面積を比較した．いずれの群も骨幹中央部に比べて骨幹端部の方が大きかった．このことは，骨幹端部から骨の分化度を増して，中央に向かって骨小腔の狭小化が起こるためである．大腿骨の成長板が遠位骨幹端に存在していることが大きく関わりと考えられる．大腿前面の骨小腔の大きさを比較すると，通電刺激を施していない Ts-Mo および Ts-Im は CO より有意に大きな値を示し， TI-EA は CO と同程度であった．

一般的に，骨細胞およびその突起は，骨基質中のそれぞれ骨小腔および骨細管内に位置し，上皮小体ホルモン（PTH）投与によってそれらは開大することが知られている<sup>92,93</sup>．本実験においても，骨小腔や骨細管の開大がみられたが，これは骨小腔や骨細管壁から骨内の無機質が溶出（骨細胞性骨溶解）を引き起こす PTH 投与時と類似した．骨細管の太さに関して同様の傾向を認めた．このことから，非加重条件によって骨細胞性骨溶解が進行するが，鍼通電刺激を施した TM-EA と TI-EA ではそれが抑制されたと推測される．

CO では発育に伴って第三転子が発達して，見かけ上，皮質骨の後外方に移動するように形成されていた．この部位の皮質骨が厚いことから，骨

内膜側からの吸収はあまり活発なものではなかったと考えられる。骨内膜側に小さな血管腔がいくつかみられ、全体的に緻密な状態にあった。実験群は全体的に皮質骨が菲薄化し、特に骨幹中央部では外面に骨幹端部では全体的に認められ、さらに通電刺激を施していない Ts-Mo および Ts-Im で顕著であった。特に Ts-Im には骨内膜側に大きな骨髓腔が認められ、最も皮質骨が薄かった。すなわち、骨膜側での骨形成が抑制されると同時に骨内膜側での吸収が著しく促進されたことを示している。一方で、鍼通電刺激を施すと組織学的に骨内膜側の骨吸収が抑制されており、CO と類似していた。皮質骨後面は CO, TM-EA および TI-EA で厚く、腱付着部は CO, Ts-Mo および TM-EA で発達しており、筋の張力の有無が関わると考えられる。次に、骨吸収能にかかわる破骨細胞の活性範囲を観察するため TRAP 染色を施した。骨の表面には大小の吸収窩や破骨細胞などの TRAP 陽性細胞の染色性が高く、いずれの群も骨幹中央部より骨幹端部で多く観察された。通電刺激を施していない Ts-Mo および Ts-Im は CO に比べて TRAP 陽性反応を多く認めたが、鍼通電刺激を施した TM-EA と TI-EA では抑制された。このことは鍼通電刺激によって破骨細胞の活性または前破骨細胞の分化が抑制されたことを示唆している。

骨強度は石灰化度や基質線維の密度と深く関連している。すなわち、石灰化度が高まると Stiffness 値が上昇し、Deformation が低下することが知られており<sup>77)</sup>、古い骨基質では石灰化沈着が促進し、新生された骨基

質ほど低いこととも関連している。骨強度を計測すると、Stiffness の値は CO よりも実験群で低値を示したが、Deformation では鍼通電刺激を行った IMEA と TI-EA は CO とほぼ同値であった。強度を示す Strength では実験群は CO よりも有意に低い値を示したものの、いずれの群も鍼通電刺激を施すと CO ほどではないが維持されていた。

以上のことから、不動化や加重低減処置は一つの骨の中でも活発な形成および吸収が行われている部位、すなわち高代謝回転のみられる部位ほど顕著な影響が示された。それらの影響は鍼通電刺激によって抑制された。

## 5. 結語

Ts-Im・Ts-Mo では、皮質骨の骨膜側の吸収像が多く認められ、骨内膜側の血管腔や皮質骨内の骨小腔の増大化がみられた。TI-EA、TM-EA ではそのような骨構造の変化が抑制され、強度の維持に影響を及ぼしていることが示唆された。



## 6. 付図説明

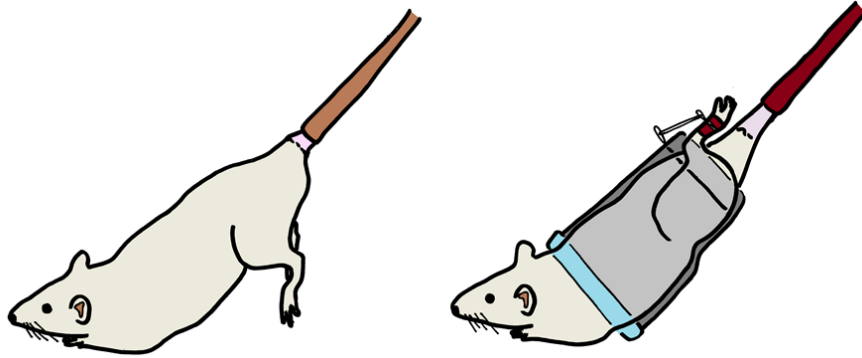


図4-1. 非加重条件（左：尾部懸垂、右：ジャケット型不動装置）

Ts-MoおよびTM-EAは、後肢に加重が掛からないようにするため、ラットの尾部を約50cmの高さの天井から2週間懸垂した。さらに、Ts-ImおよびTI-EAにジャケット型不動装置を用いて、股関節および膝関節を伸展位に固定し、股関節の内転および外転を制限した。

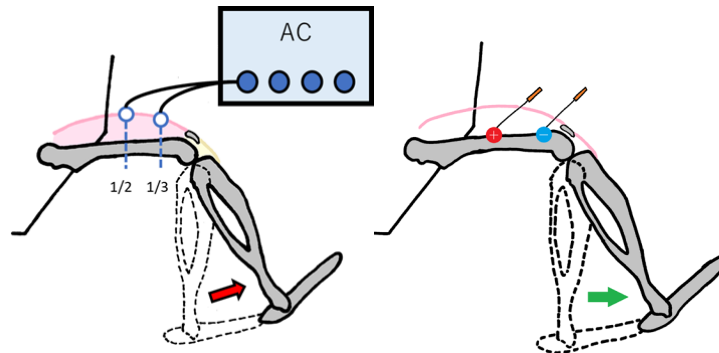


図4-2. 鍼通電条件

AC, 250 $\mu$ sec, 50Hz, 0.24mA (500 $\Omega$ 負荷時)の条件で実験期間中10分/日, 毎日, 2週間実施した。

図4-3. 刺鍼条件

筋が収縮した際に鍼が抜けないようにするため, 鍼は皮膚表面に対して45°の角度で刺鍼した。

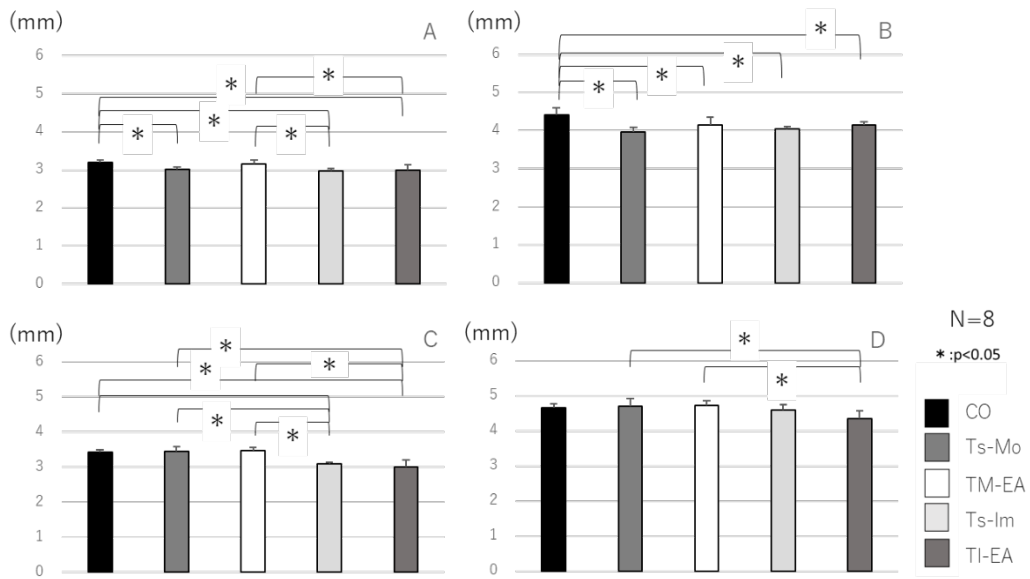


図4-4. 骨幹中央部および骨幹端部の前後径・内外径の比較  
 (A : 骨幹中央部前後径、B : 骨幹中央部内外径、  
 C : 骨幹端部前後径、D 骨幹端部内外径)

骨幹中央部および骨幹端部における大腿骨の前後および内外径は、COはTM-EA、TI-EAと同程度であったが、鍼通電刺激をしていないTs-Im、Ts-Moは他の群に比較し、低い傾向を示した。

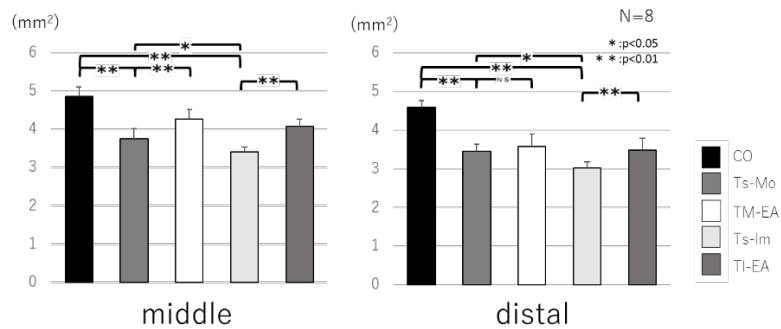


図4-5. 各群における横断面積の比較

鍼通電刺激を行ったTM-EA、TI-EAはCOと維持されていたが、Ts-Im、Ts-Moは有意に減少した。

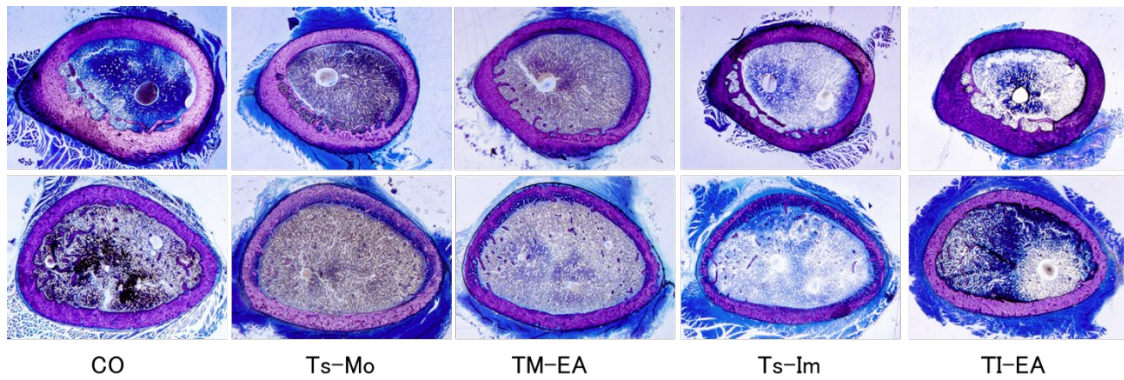


図4-6. 皮質骨外形の比較 (上段:中央部 下段:遠位部)

COに比べ，Ts-MoおよびTs-Imの中央部では後外面，遠位部では前面の皮質骨が薄くなり，特にTs-Imで顕著にみられた．それに対し，通電刺激を行った群ではいずれも皮質骨の厚さが維持された．

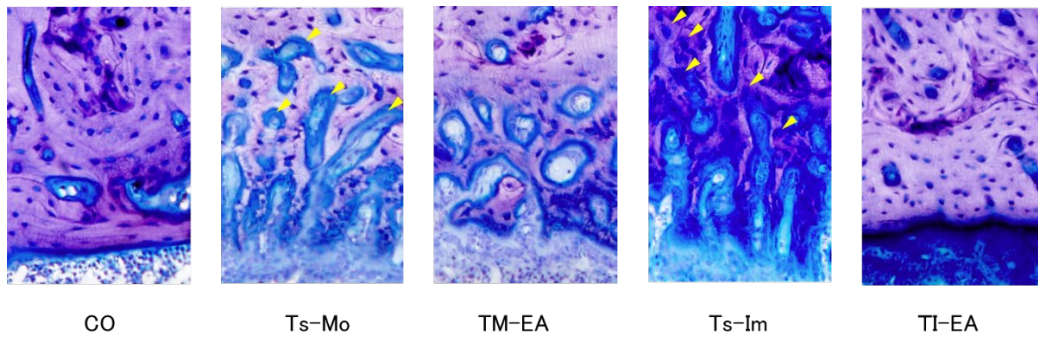


図4-7. 皮質骨前面の拡大像

骨幹端部前面の濃染部位には楕または網状の構造(矢頭)で石灰化軟骨基質は認められなかった．

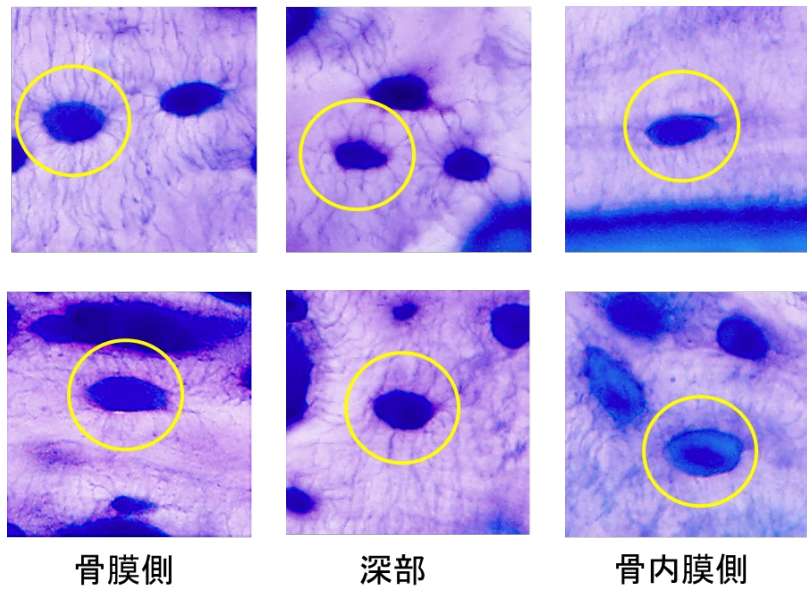


図4-8. COにおける骨小腔の比較  
(上段：骨幹中央部、下段：骨幹端部)

皮質骨を骨膜側から骨膜部，深部，骨内膜部に3等分して観察すると，中央および骨幹端部では深部が最も狭小化していた。

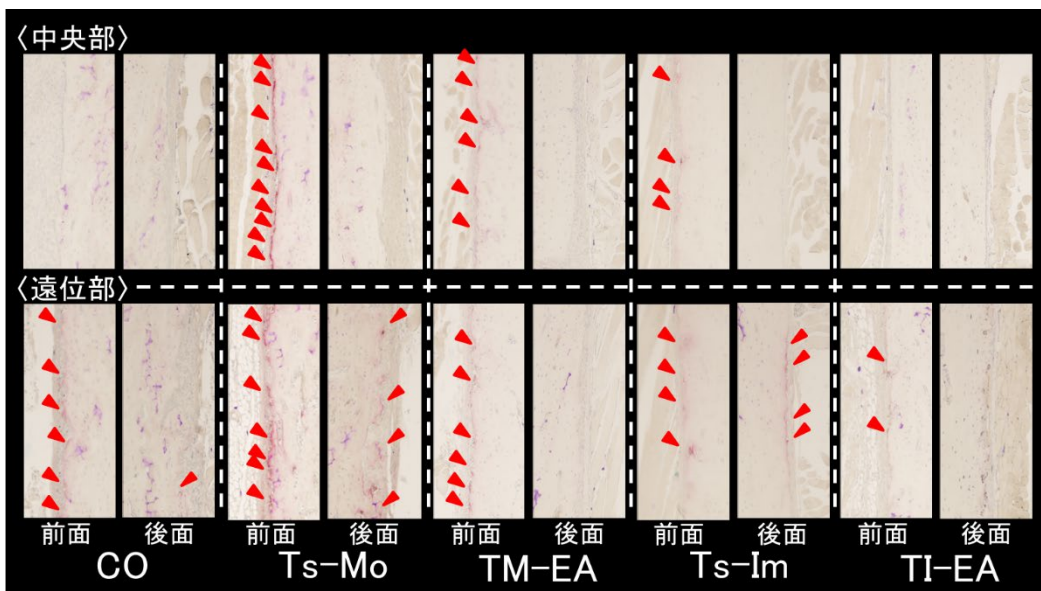


図4-9. 皮質骨骨膜面における骨吸収像

COに比べ，Ts-MoおよびTs-ImではTRAP陽性反応を示す細胞や骨基質(矢頭)が多く見られたが，それはTMEAと特にTIEAでは少なかった。

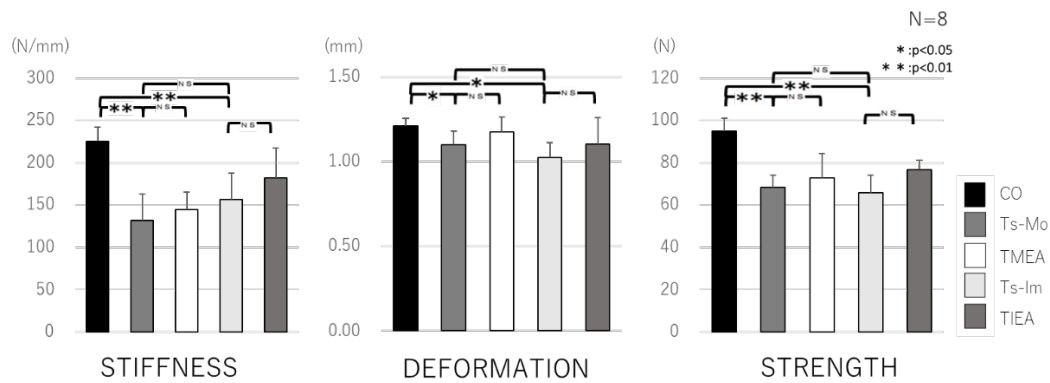


図4-10. 骨強度パラメータ

Stiffnessの値はCOに比較して、いずれの群も低値を示した。一方、Deformationは鍼通電刺激を行った群がCOとほぼ同値であったが、Strengthにおいて実験群はCOより有意な低値を示した。その他の群間では有意な差を認めなかったが、通電刺激によって増加傾向がみられた。

## (実験6)

### 第2節 ラット不動化モデルの大腿骨骨折線に及ぼす鍼通電刺激の影響

#### 1. 緒言

実験1で大腿骨における基質線維の配向性や密度による骨基質の分化度を分類し、実験5で加重低減による骨構造の変化に鍼通電刺激が及ぼす影響について検討してきた。しかし、そのような加重低減による変化が骨折線に及ぼす影響については明らかにされていない。発育期ラット大腿骨を用い、関節不動化によって皮質骨に生じた基質線維の配列状態や密度の構造の違いが、骨折線の現れ方に与える影響について比較、検討することを目的とした。

#### 2. 材料および方法

##### 2.1 実験動物

7週齢のウィスター系雄性ラット36匹を用いた。後肢を不動状態にした群(IM)、その不動状態と同期間に鍼通電刺激を施した群(IMEA)および対照群(CO)に分類した。

##### 2.2 不動および鍼通電刺激条件

実験5に従い、IMEAには尾部懸垂および不動処置を施し、同時に大腿骨の骨膜まで鍼を刺入して連続的交流鍼通電刺激を行った。刺鍼部位は大

腿部中央および遠位 1/3 部とし，ポピドンヨードにて消毒した後，大腿骨の骨膜まで刺入した．低周波刺激装置（ラスパーエース，テクノリンク社製）を用い，通電刺激は，250 $\mu$ sec，50Hz，0.24mA（500 $\Omega$  負荷時）の条件で実験期間中 10 分/日，毎日，2 週間実施した．筋が収縮した際に鍼が抜けないようにするため，鍼は皮膚表面に対して 45°の角度で刺鍼した．

### 2.3 破断試験の条件設定

実験 3，4 と同様に，摘出した大腿骨は破断するまで生理食塩液に浸漬した（4°C）．その標本を破断試験器（TK-252C，室町機械社製）により，支点間距離を 10mm，クロスヘッド速度を 10mm/min とする一定の条件下で，骨幹中央部および骨幹端部を骨の前方から破断した．

### 2.4 標本の摘出および固定

実験 3，4 と同様に，それぞれの標本は，破断後，速やかに 4%パラホルムアルデヒド水溶液(PFA)または 0.1M カコジル酸ナトリウム水溶液（pH7.4）にて緩衝されたカルノブスキー液（4°C，一晚）で固定した．

### 2.5 組織学的標本の作製と観察

実験 3 と同様に，4%PFA で固定された標本は非脱灰樹脂研磨標本の作製に用い，酸腐食した後にトルイジンブルー（TB）染色を施した．また，同液で固定された他の標本を用いて矢状断脱灰パラフィン切片を作製し，

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、大腿骨前面の皮質骨の内外的中央部を光学顕微鏡により観察した。いずれも観察部位を骨幹中央部および骨幹端部とした。

### 3. 結果

#### 3.1 皮質骨の組織構造

HE 染色を施して皮質骨の骨基質を観察すると、CO と IMEA では、接合線が層板構造をなす骨基質と、その深部の層板構造をもたない骨基質の境に存在した。また、休止線が層板間にみられたが、IM ではそのような構造は認めなかった (図 4-11)。

次に、SEM を用いて各群の骨表面にある吸収窩を観察した。IM の骨表面には深い吸収窩を多数認めたが、CO ではその数は多くなかった。また、IMEA は CO の骨表面の構造に類似していた (図 4-12)。

#### 3.2 皮質骨の破断像

Three-point bending によって破断点に達し、不可逆的に変性した標本の骨幹中央部または骨幹端部の前面を観察した。CO および IMEA では見かけ上、骨幹中央部の皮質骨は 3 層に、骨幹端部は 2 層に剥離されたが、IM では観察できなかった。骨幹中央部を詳細に観察すると CO および IMEA では内・外環状層板に挟まれた深部に微細な骨片が形成されたが、IM ではそのような骨片は認めなかった。CO および IMEA では、接合線



または休止線の近傍に骨長軸方向へ走行する亀裂を認め、特に接合線に沿って大きな亀裂が生じた。一方、IM の破断方向に垂直な亀裂はわずかであり、概ね破断方向と一致していた (図 4-13, 14)。

#### 4. 考察

接合線は破骨細胞によって形成された骨表面の吸収窩に骨芽細胞が骨を添加した部位を示し<sup>94)</sup>、この存在はモデリングおよびリモデリングの活性度を示す指標になると考えることができる。本研究では CO および IMEA では層板構造をなす骨基質とその他の骨基質の境に接合線、層板間に休止線を認めたが、IM では不明瞭であった。このことから、IMEA は CO と同程度のモデリングおよびリモデリングが行われていることが推測され、一方で、IM ではその活性度が低かったと考えられる。

さらに、CO と IMEA には基質線維が規則的に配列する層板骨を認めたが、IM ではそのような骨はわずかしかなら形成されていなかった。このことは、実験 1 の骨基質の分類で述べたように Type B と Type C の間に接合線、Type C 内に休止線が存在していることと一致している。骨に加重が加わると骨は変形するが、このことは応力 - ひずみ曲線で表わすことが可能である<sup>95)</sup>。弾性域では一定の割合でひずみ、降伏点を超えると不可逆性の変性を生じて、さらに力が加わると限界強度 (破断点) を超えて骨折に至る。骨折が生じるまでのひずみ量を韌性、石灰化度などの硬さは剛性

で示し、これらが骨の強度に密接にかかわる。本実験では Three-point bending によって破断点に達して不可逆的に変性した標本の骨幹中央部または骨幹端部の前面を観察した。骨幹中央部では CO および IMEA に内・外環状層板に挟まれた深部に微細な骨片が形成されていたが、これは石灰化軟骨基質や、その周囲の骨基質の分化度が異なる部分に亀裂が生じたことによるものであった。一方、IM ではそのような骨片は認められなかった。このことは、実験 3, 4 で示したように骨の形成過程や分化度と密接に関連していると推測される。すなわち、通常飼育された CO は成長板で形成された骨の表面から吸収を受け、深部が残存しており、その部分を基礎として骨表面に添加される。一方、IM では非加重かつ関節不動環境下であったため、骨吸収が促進し、骨形成が抑制された。しかし、通電刺激を施した IMEA では骨吸収が抑制され、骨形成を阻害しなかったため、CO と構造が類似していたと考えられる。また、CO および IMEA でみられた亀裂は、接合線または休止線の近傍に骨長軸方向へ走行しており、特に接合線に沿って大きな亀裂が生じていた。しかし、IM ではそのような亀裂は認められなかった。このことは、前述のように接合線の存在が亀裂方向に影響したために CO および IMEA は骨長軸方向へ亀裂が波及し、見かけ上、3 層に分かれたことを意味すると思われる。一方、IM には接合線の形成が明瞭ではなかったことから、破断方向に垂直な亀裂はわずかであり、破断方向と一致したと考えられる。さらに、骨幹端部では各群に

における亀裂の違いは骨幹中央部より顕著であった。この部位は遠位骨端板より形成された骨が、骨幹中央部に向かって発育する部位であり、まだ外環状層板が形成されておらず、内環状層板のみの形成であったために深部に微細な骨片を生じず、2層に分断されていたと推測される。

下肢骨へのメカニカルストレスを減少した状況にすると、骨表面の破骨細胞による骨吸収が活性化されるため皮質骨が薄くなるが、それは鍼通電刺激によって抑制されることを実験5にて報告している。本実験では、IMの骨表面には深い吸収窩を多く認めたが、COとIMEAではその数は多くなかった。吸収窩の存在は、破骨細胞の吸収能に依存しており、実験5と同様に関節不動化によって骨吸収が促進され、COとIMEAではIMほど旺盛でなかったと推測される。

この吸収窩は骨折線の始点となり、骨強度にも影響することが報告されている<sup>95)</sup>。本実験では非脱灰樹脂研磨標本を用いて破断部周囲の微細構造を観察し、吸収窩から伸びる薄い線状の亀裂を認めたが、始点となっている様子は明瞭に観察できなかったため、今後の検討課題としたい。

## 5. 結語

不動化によって生じるラット大腿骨の脆弱化は鍼通電刺激によって抑制され、このことが骨折線の現われ方に影響することが示唆された。

## 6. 付図説明

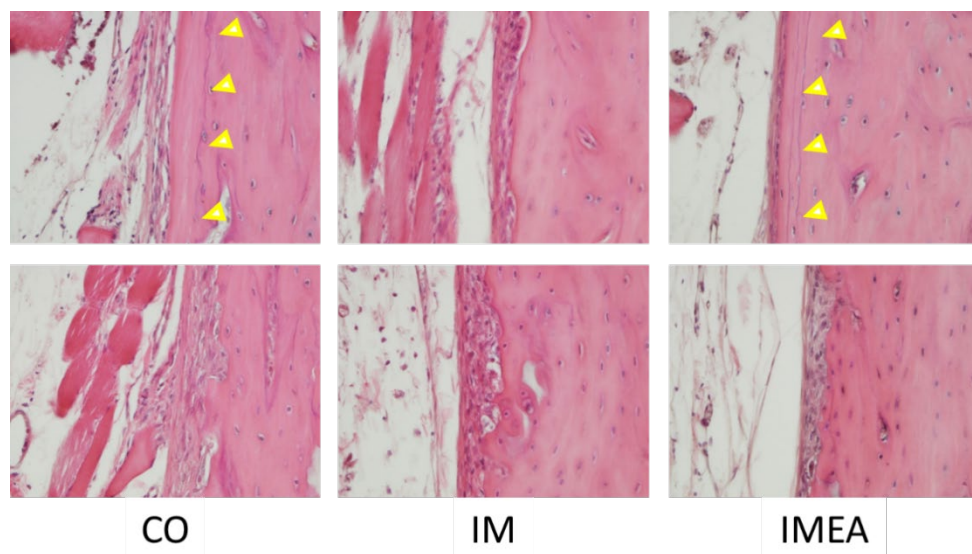


図4-11. 皮質骨前面の拡大像 (矢頭：接合線，縦断像)  
上段：骨幹中央部 下段：骨幹端部

COとIMEAでは接合線は層板構造をなす骨基質とその他の骨基質の境に存在し，休止線が層板間にみられ，基質線維が規則的に並ぶ層板構造を明瞭に認めたが，IMではそのような構造は認めなかった。

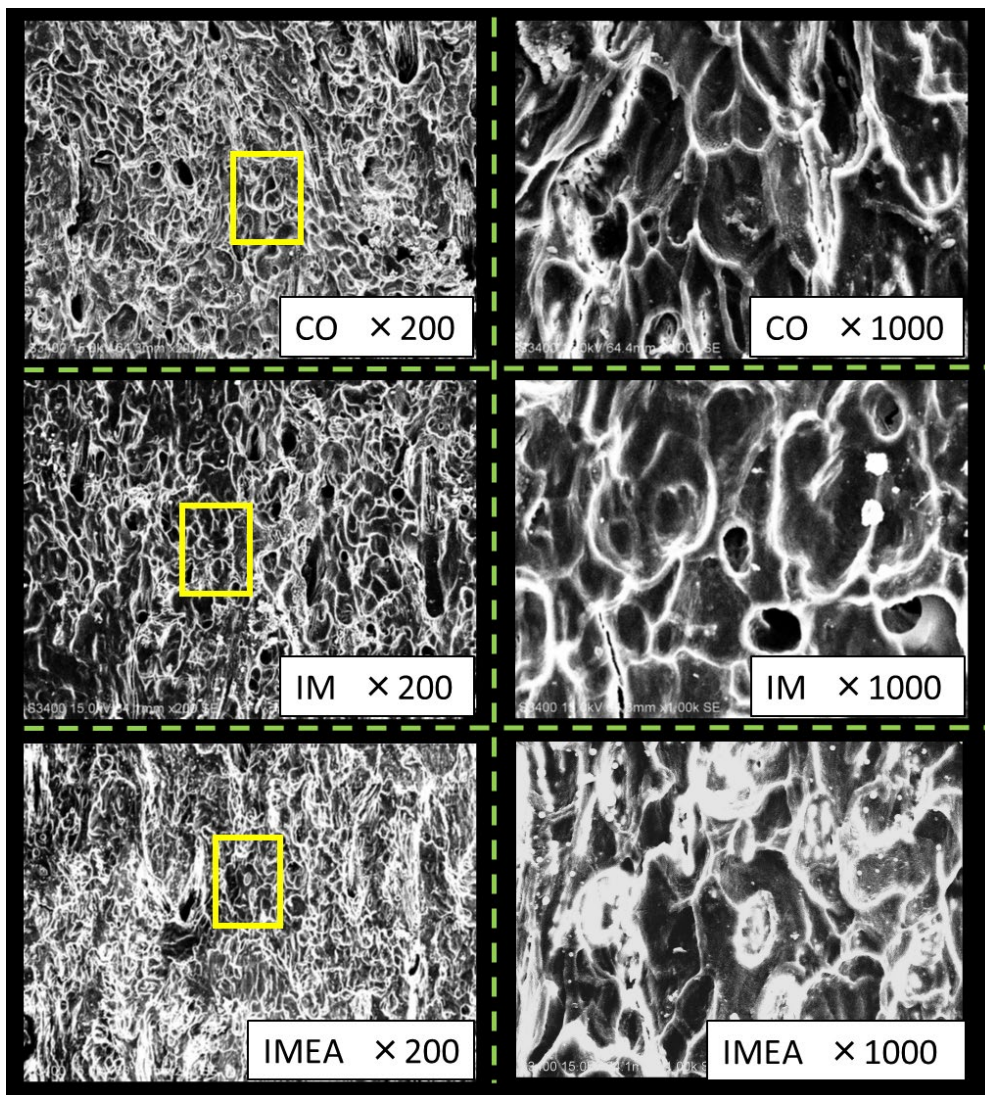


図4-12. 骨幹端部における骨表面の微細構造  
(右図は黄枠の拡大)

IMの骨表面には深い吸収窩を多数認めたが、COではその数は多くなかった。また、IMEAはCOの骨表面の構造に類似していた。

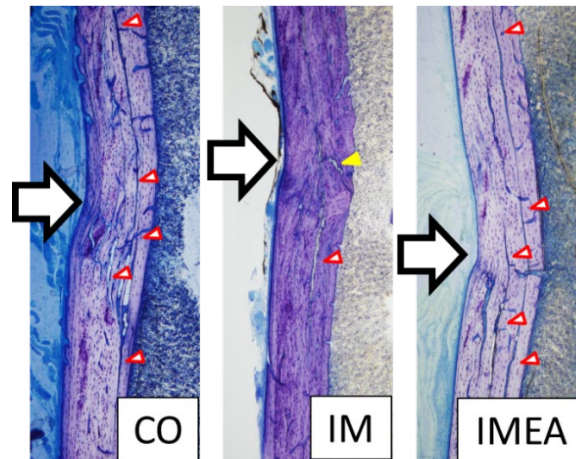


図4-13. 骨幹中央部における破折面の微細構造（縦断像）  
（赤矢頭：骨長軸方向の亀裂、黄矢頭：破断方向への亀裂）

COおよびIMEAでは内・外環状層板に挟まれた深部に微細な骨片が形成されており，IMではそのような骨片は認めなかった．COおよびIMEAでは見かけ上，3層に剥離されたが，IMでは認められなかった．さらに，COおよびIMEAでは，接合線または休止線の近傍に骨長軸方向へ走行する亀裂を認め，特に接合線に沿って大きな亀裂が生じていた．一方，IMではそのような亀裂は認められなかった．

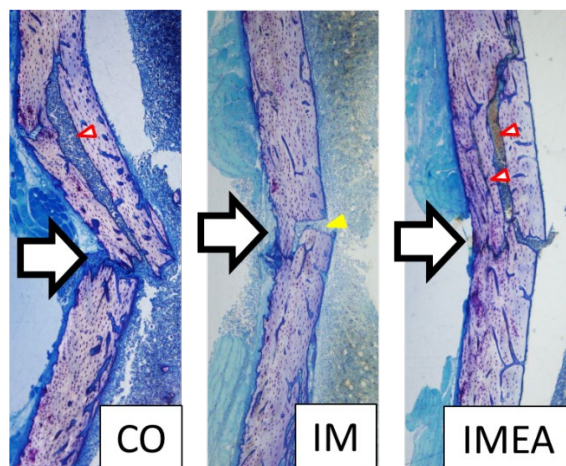


図4-14. 骨幹端部における破折面の微細構造（縦断像）  
（赤矢頭：骨長軸方向の亀裂、黄矢頭：破断方向への亀裂）

COおよびIMEAでは皮質骨深部に存在する接合線に沿って骨長軸方向へ裂けるような亀裂を認めたが，IMの破断方向に垂直な亀裂はわずかであり，概ね破断方向と一致していた．COおよびIMEAでは見かけ上，2層に剥離されたが，IMでは認められなかった．

## (実験7)

### 第3節 異なる介入頻度の鍼通電刺激がラット大腿骨の骨構造に及ぼす影響

#### 1. 緒言

これまでに実験5, 6にて非加重条件下の下肢骨の皮質骨は菲薄化し、強度の低下や破断像に影響することを認め、非加重の期間と同時期に通電刺激を行うことによって、そのような廃用性変化を抑制または維持することを示してきた。しかし、そのいずれの実験結果も実験期間中に連日行っており、その介入頻度による影響については検討されていない。本実験では、ラット後肢の加重低減による骨量減少に対して、異なる頻度の鍼通電がどのような影響をもたらすかについて組織学的に比較、検討することを目的とした。

#### 2. 材料および方法

##### 2.1 実験動物

7週齢のウィスター系雄性ラット48匹を用い、尾部懸垂と同時に鍼通電刺激を施した群(EA)および対照群(CO)に分類した。さらに、EAは介入頻度の違いから、週に1回をEA1, 3回をEA3, 7回をEA7とした。なお、本実験の計測パラメータのTSについては、参考データとして実験5の数値を引用し、比較した。

## 2.2 実験条件

EAは後肢に加重が掛からないようにするため、ラットの尾部を約50cmの高さの天井から2週間懸垂し、同期間に連続的交流鍼通電刺激を行った。導子にはステンレス鍼を用い、低周波電気刺激装置（ラスパーエース、テクノリンク社製）により通電刺激を行った。大腿中央および遠位部の骨膜まで刺鍼して250 $\mu$ sec, 50Hz, 0.24mA（500 $\Omega$  負荷時）の条件で、実験期間中10分/日、2週間通電した。

## 2.3 標本の摘出および固定

実験期間終了後、ラットを炭酸ガス吸入により安楽死させ、骨膜が付着した状態で大腿骨を摘出した。右脚の大腿骨は骨強度測定に用い、左脚は水平または矢状方向に割断した後、組織構造観察および骨形態計測に用いた。

## 2.4 組織学的標本の作製と観察

実験期間終了後、大腿骨を速やかに摘出し、0.1M カコジル酸ナトリウム水溶液（pH7.4）にて緩衝された固定液カルノブスキー液または4%パラホルムアルデヒド液に浸漬した。矢状割断した標本はEDTAにて脱灰し、パラフィンに包埋した。また、水平割断した非脱灰標本はリゴラック樹脂に包埋した。それらを薄切または研磨し、種々の染色を施して光学顕



微鏡にて観察した。それらの測定および観察部位は大腿骨の骨幹中央部とした。

## 2.5 破断試験法の条件設定

これまでの実験手法と同様に、摘出した大腿骨は破断するまで生理食塩液に浸漬した（4℃）。その標本を破断試験器（TK-252C，室町機械社製）により，支点間距離を 10mm，クロスヘッド速度を 10mm/min とする一定の条件下で，骨幹中央部を骨の前方から破断した。

## 2.6 骨形態計測

これまでの手法と同様に，大腿骨中央部のリゴラック樹脂包埋非脱灰研磨横断標本を作製してトルイジンブルー染色を施した。その標本を光学顕微鏡により撮影後，モニターに投影し，画像解析ソフト（WinROOF V7.4）を用いて計測した。なお，データの適切性および再現性を高めるために各計測項目を 2 度計測し，その平均値を求めた。

## 2.7 統計処理

破断試験と形態計測によって得られたデータの平均値と標準偏差を求め，IBM SPSS Statistics Ver.24を用いて各パラメータの一元配置分散分析を行い，有意差が認められた場合はTurkey-HSD 法によって各群間での多重比較を行った。危険率は5%水準未満を有意とした。

### 3. 結果

#### 3.1 皮質骨の組織構造

HE 染色を施した脱灰パラフィン切片を観察すると、CO の皮質骨内では骨膜側の吸収窩はほとんどみられず、EA1 および EA3 には吸収窩が多く認められたが、EA7 では骨表面の吸収窩はわずかであった (図 4-15).

TRAP (Tartrate resistant Acid-phosphate) 染色を施した矢状断標本を観察すると、CO に TRAP 陽性細胞を認めなかったが、EA1 では広い領域にみられた。その細胞は EA3 および EA7 では減少を示し、EA7 ではわずかに認めただけであった (図 4-16).

#### 3.2 皮質骨の計測パラメータ

各群の皮質骨断面積は TS が最も低値で他群との有意差を生じたが、EA のいずれの群も CO との間に有意な差は認めなかった (図 4-17). さらに、層板構造が皮質骨の中で占める割合を群間で比較した。CO に対して他群は減少を示したが、有意性を示したのは TS のみであり、EA では示さなかった。特に EA3 および EA7 では層板構造の占める割合が高く、CO とほぼ同値であった (図 4-18).

#### 3.3 骨破断試験

骨の硬さ (以下, Stiffness) は CO が他群よりも有意に高く、骨のしなやかさ (以下, Deformation) は EA7 のみ CO と有意な差はなかった。

強度（以下，Strength）は全群とも CO より有意に低かったが，TS より EA が高い値を示し，EA 間ではほぼ同値であった（図 4-19）。

#### 4. 考察

これまでの実験から，大腿骨のような加重骨へのメカニカルストレスが減少すると，骨吸収が旺盛となって皮質骨の菲薄化が促進され，鍼通電刺激によって抑制されることを明らかにしてきた。介入頻度について比較すると EA1 および EA3 では吸収窩を多く認めたが，EA7 ではわずかであった。一般に骨表面の吸収窩は破骨細胞によって形成され，非加重環境で活性化することが知られていることから，本実験では各群の切片に TRAP 染色を施した。CO には TRAP 陽性細胞はみられなかったが，EA1 では広い領域に認めた。EA3 および EA7 では減少しており，EA7 ではほとんど認めなかった。以上のことから，TRAP 陽性細胞や吸収窩は鍼通電刺激の介入頻度とは反比例して減少したことが示唆された。すなわち，通電刺激の骨吸収抑制の効果という観点からは，介入頻度が高いほど骨吸収が抑制されていた。

次に，各群の皮質骨断面積を計測すると，TS は他群より有意に低値であったが，このことは，これまでに述べてきたように，加重骨へのメカニカルストレス減が，皮質骨の菲薄化を促進することと一致している。しかし，EA のいずれの群も CO との間に有意な差を認めず，ほぼ同値であっ

た。このことも、上述の結果と一致しており、鍼通電刺激によって TRAP 陽性細胞の活性が抑制されたため、吸収窩の形成が阻害されて菲薄化が抑制され、骨量が維持されたと考えられる。一方、骨形成能を観察するために層板構造が皮質骨の中に占める割合を算出した。CO に対して他群は減少傾向を示したが、EA3 および EA7 は CO とほぼ同値であり、TS が最も低かった。このことから、非加重状態では骨形成能が低下するが、鍼通電刺激によって CO とほぼ同値を示しており、骨形成能を阻害するものではなかった。

骨強度を測定する三点支持試験では構造的力学特性のパラメータ（骨が抵抗し得る最大加重を示す **Strength**、剛性を示す **Stiffness** から、内在的力学特性のパラメータである靱性 **Deformation**）を求めることができる<sup>96)</sup>。この特性を応用し、実験 1 にて基質線維の配向性や密度、石灰化度などにより、分化度の高い骨の方が強度は高くなることを示している。本実験では **Stiffness** は CO が他群に比べて有意に高値を示し、**Deformation** は EA7 のみ、CO との有意な差を認めなかった。**Strength** は CO が他群より有意に高く、TS が最も低値であった。EA はその中間的な値であり、EA の各群間に有意な差は認められなかった。このことは、皮質骨の菲薄化だけでなく、骨吸収窩に応力が集中して強度的に弱点となることに関連していると推測される。すなわち、通常飼育された CO の骨幹中央部では骨表面に層板骨が形成されて、吸収窩をほとんど認めず、EA7 も CO に類似した

構造をなしていた。このことが強度試験の結果に影響したと考えられる。さらに、通電刺激による石灰化度への影響も報告されており<sup>97)</sup>、このこともEA間に有意な差を認めなかったことに関連していることが示唆された。

## 5. 結語

ラット尾部懸垂によって皮質骨に生じた脆弱化への鍼通電刺激は頻度依存的な効果が得られた。

## 6. 付図説明

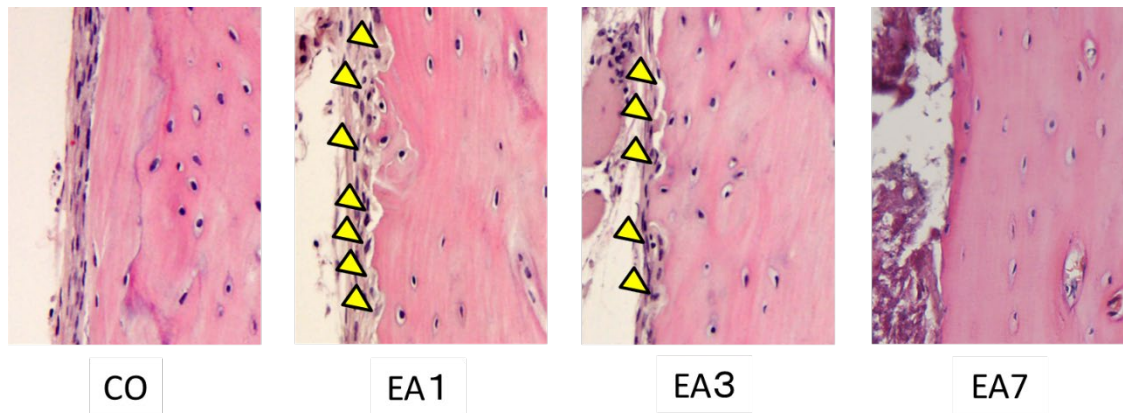


図4-15. 破断部位に相当する骨幹中央部前面のHE染色像(×200)

COの皮質骨内では骨膜側の吸収窩はほとんどみられず，EA1およびEA3には吸収窩が多く認められたが，EA7では骨表面の吸収窩はわずかであった。

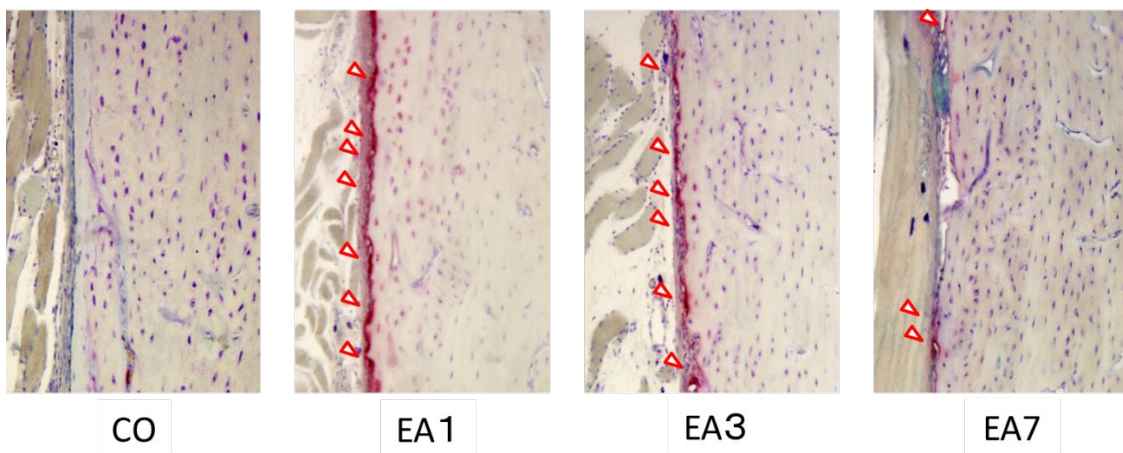


図4-16. 破断部位に相当する骨幹中央部前面のTRAP染色像(×100)

COにTRAP陽性細胞を認めなかったが，EA1では広い領域にみられた。その細胞はEA3およびEA7では減少し，EA7ではわずかに認めたのみであった。

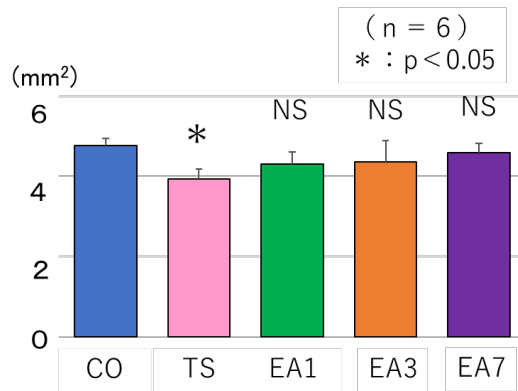


図4-17. 形態計測パラメータ (COに対する有意差を示す)

各群の皮質骨断面積はTSが最も低値で他群との有意差を生じたが、COとEAとの間に有意な差は認めなかった。

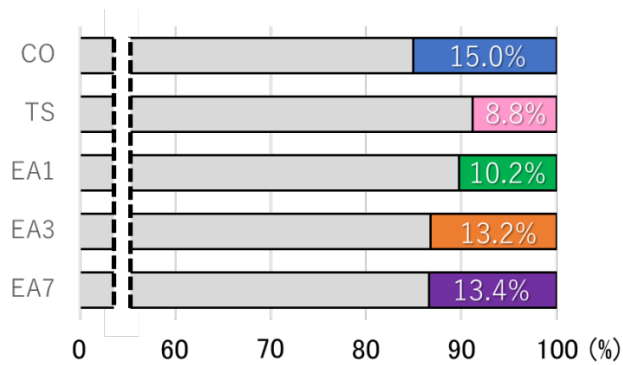


図4-18. 皮質骨内に層板構造が占める割合

COに対して他群は減少を示したが、有意性を示したのはTSのみであり、EAでは示さなかった。特にEA3およびEA7では層板構造の占める割合が高く、COとほぼ同値であった。

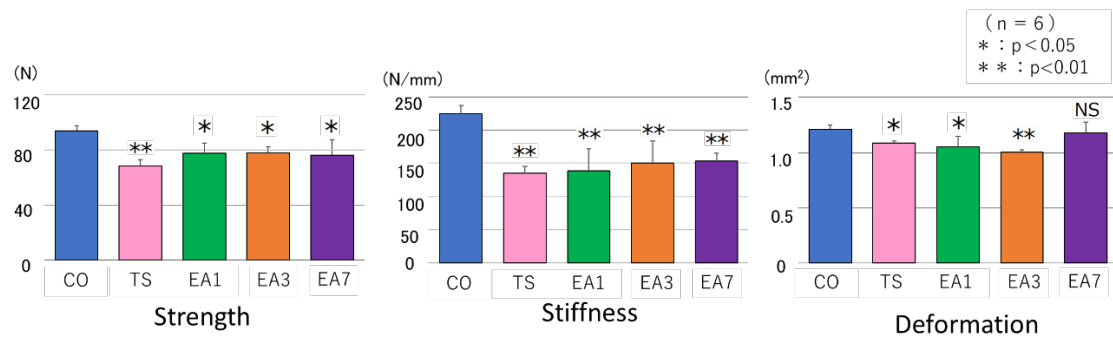


図4-19. 骨強度パラメータ (COに対する有意差を示す)

StiffnessはCOが他群よりも有意に高く、DeformationはEA7のみCOと有意な差はなかった。Strengthは全群ともCOより有意に低かったが、TSよりEAが高い値を示し、EA間ではほぼ同値であった



## (実験8)

### 第4節 ラット尾部懸垂への介入時期による鍼通電刺激の影響

#### 1. 緒言

これまでに、実験5, 6でラット大腿骨の皮質骨の構造に及ぼす不動化の影響について報告している。さらに、実験7では非加重条件中の鍼通電刺激は、頻度依存的に骨量維持の効果があることを明かにしてきた。骨量減少が生じた後に、鍼通電を施すと骨形成が促進されることが報告されているが<sup>14)</sup>、その効果を加重低減中に鍼通電したものと比較した報告はない。本研究は、ラット大腿への鍼通電を、尾部懸垂の後またはその期間中に行い、それらが骨の構造および強度に及ぼす影響を比較、検討することを目的とした。

#### 2. 材料および方法

##### 2.1 実験動物

5週齢のウィスター系雄性ラット60匹を用いた。それらを2週間の尾部懸垂後、2週間の正常飼育する群(TS-1)および前半の2週間は正常飼育し、後半の2週間は尾部懸垂する群(TS-2)に分類した。また、TS-1のうち後半2週間に鍼通電を行う群(TS-1・EA)と、TS-2のうち後半2週間に鍼通電を行う群(TS-2・EA)、さらに5週齢から4週間正常飼育する群(CO)を設けた(図4-20)。骨の形成状態について観察するため

に、実験開始日にテトラサイクリン、サンプリング 4 時間前にカルセインを腹注し、骨ラベリングを行った。

## 2.2 標本の摘出および固定

ラットを炭酸ガス吸引によって安楽死させた後、筋や神経、結合組織などの軟組織を丁寧に除去し、骨膜が付着した状態で大腿骨を摘出した。右脚の大腿骨を骨強度測定用とし、左脚を組織構造観察および骨形態計測用とした。大腿骨の全長は大転子尖から外側顆先端までとし、それをノギスにて計測した。さらに、その中間点（以下、骨幹中央部とする）を求め、そこを組織学的観察および計測の部位とした。

## 2.3 組織学的標本の作製と観察

標本を摘出後速やかに、4%PFA または 0.1M カコジル酸ナトリウム水溶液（pH7.4）にて緩衝されたカルノブスキー液に浸漬し、種々の標本作製して、光学および走査電子顕微鏡（SEM）にて観察した。なお、観察に際しては大腿骨の骨幹中央部および骨幹端部の横断標本を用い、大腿骨を前、後、内および外面に区分した。

## 2.4 骨形態計測

これまでの手法と同様に、骨幹中央部および骨幹端部における横断面のリゴラック樹脂研磨標本作製してトルイジンブルー（TB）染色を施し

た。その標本を光学顕微鏡により撮影後、モニターに投影し、画像解析ソフト (WinROOF V7.4) を用いて、骨幹中央部および骨幹端部における皮質骨の横断面積を求めた。

## 2.5 刺鍼部位および鍼通電刺激条件

著者ら<sup>89)</sup>の先行研究に従い、刺鍼部位は大腿部中央および骨幹端部とし、ポピドンヨードにて消毒した後、大腿骨の骨膜まで刺入した。低周波刺激装置 (ラスパーエース, テクノリンク社製) を用い、通電刺激として 250 $\mu$ sec, 50Hz, 0.24mA (500 $\Omega$  負荷時) の条件で実験期間中 10 分/日, 毎日, 2 週間実施した。筋が収縮した際に鍼が抜けないようにするため、鍼は皮膚表面に対して 45°の角度で刺鍼した。

## 2.6 破断試験の条件設定

これまでの実験手法と同様に、摘出した大腿骨は破断するまで生理食塩液に浸漬した。その標本を破断試験器 (TK-252C, 室町機械社製) により、支点間距離を 10mm, クロスヘッド速度を 10mm/min とする一定の条件下で、骨幹中央部を骨の前方から破断した。

## 2.7 統計処理

形態計測によって得られたデータの平均値と標準偏差を求め、IBM SPSS Statistics Ver.24 を用いて各パラメータの一元配置分散分析を行い、

有意差が認められた場合は Turkey-HSD 法によって各群間での多重比較を行った。危険率は 5%水準未満を有意とした。

### 3. 結果

#### 3.1 皮質骨の組織構造

横断された大腿骨骨幹端部の前面の皮質骨を TB 染色した標本を光学顕微鏡で観察し、同部位のラベリングした部位を蛍光顕微鏡にて観察した。TS-2 および TS-2・EA の骨内膜側に TB 染色で濃染する部位（以下、濃染部位）がみられたが、CO、TS-1 および TS-1・EA では濃染部位は観察されなかった。また、血管腔の構造は TS-1・EA と CO が類似しており、血管腔内に同心円状に骨が形成されて狭小化し、皮質骨全体は他群より緻密であった。TS-1・EA では皮質骨のほぼ全層にわたってテトラサイクリンとカルセインのラベルは明瞭で CO に類似していたが、TS-1 や TS-2 では骨内膜側のラベルは不明瞭であった（図 4-21）。

次に、骨吸収能を観察するために脱灰パラフィン切片に TRAP (Tartrate resistant Acid-phosphate) 染色を施した標本を観察した。TRAP 陽性細胞は、全体的に骨幹中央部に比べて骨幹端部に多くみられた。また、それは CO より TS-1 と TS-2 で多く認めたが、通電刺激を行った TS-1・EA と、特に TS-2・EA ではわずかであった（図 4-22）。

#### 3.2 皮質骨の計測パラメータ

骨幹中央部の断面積は、TS-2 が最も低く、TS-1 および TS-2・EA は CO とほぼ同値で有意な差を認めなかった。一方、骨幹端部では、TS-2 と TS-2・EA が他群よりも有意に低い値を示した (図 4-23)。次に、大腿骨骨幹端部前面の血管腔の断面積を計測した。血管腔は骨幹中央部では有意な差を認めなかったが、骨幹端部では TS-1 および TS-1・EA は CO とは有意な差を認めず、それらは TS-2 や TS-2・EA より有意に低値であった (図 4-24)。皮質骨内に濃染部位が占める割合は TS-2 が 18% と最も高値を示した (図 4-25)。

### 3.3 骨破断試験

骨破断試験のいずれの測定項目においても、TS-1 および TS-1・EA は CO と有意差は認められなかった。TS-2 および TS-2・EA に関しては、Stiffness と Strength が CO よりも有意に低値であったが、TS-2・EA は TS-2 より有意に高かった (図 4-26)。

## 4. 考察

実験 2 および 4 で述べたように、大腿骨骨幹端部は通常発育に伴って内側に層板骨を添加し、分化した骨基質を形成する。しかし、本実験では、いずれの群においてもそのような構造が明瞭にみられなかった。このことは、本実験で用いたラットが発育期中のものであり、骨のような運動器の成熟度がやや低かったと思われる。また、血管腔の構造は TS-1・EA と CO

が類似しており，血管腔内に同心円状に骨が形成されて狭小化し，他群より緻密であった．これは，骨基質が分化する過程でとても重要である．すなわち，実験 2 および 4 で述べたように幼若な段階であるほど血管腔は広く，また加重低減によって血管腔の開大化がみられることから，本実験では明瞭な層板構造を観察できなかつたと推測される．

さらに，TS-2 および TS-2・EA の骨幹端部前面には骨内膜側に濃染部位を認め，その部位が皮質骨に占める割合は TS-2 が最も高かつた．この濃染部位は，実験 7 で述べたように非加重条件下に置かれると特異的にみられ，胎児骨に類似して疎な基質線維が不規則に配列する骨であると考えられる．

テトラサイクリンやカルセインは石灰化物に沈着する特性があることから<sup>98)</sup>，骨形成能を示す指標として用いた．TS-1・EA では皮質骨のほぼ全層にわたってラベルが明瞭で CO に類似していたことから，実験期間中に骨形成が進められていたと推測される．それに対し，TS-1 や TS-2 では骨内膜側のラベルは不明瞭であった．このことは，TS-1 では尾部懸垂から解放された実験期間の後期でリカバリーされたが，尾部懸垂終了とともに実験が終了した TS-2 ではリカバリーされなかつたことを示している．また，TS-1・EA は TS-2・EA に比べて骨形成が促進され，骨の緻密化がなされたことを反映している．

次に，骨吸収能について組織学的観察を行うために TRAP 染色を施し

た。TRAP 陽性細胞が骨幹端部に多く存在していること認め、それは CO より TS-1 と TS-2 で多く存在したが、通電刺激を行った TS-1・EA と、特に TS-2・EA ではその数は減少した。このことは、これまでの実験で得られた結果と同様であり、鍼通電刺激によって TRAP 陽性細胞が減少したと考えられ、骨幹端部に大きな抑制効果がみられた点においても一致していたことから、再現性の高い実験結果であることが示された。

骨幹中央部では TS-2 が低値を示したものの、他群には有意な差はみられなかった。一方、骨幹端部の断面積は、TS-2 だけでなく TS-2・EA も他群より有意に低い値を示した。このことは、実験 5 でも同様な結果を得ており、非加重状態におかれると骨の菲薄化がみられ、成長に大きく関わる成長板の直下にある骨幹端ではその影響を強く受けていた。この結果と類似した報告では、宇宙遊泳環境の実験結果が挙げられる。その報告では骨の菲薄化のみならず、血管腔の開大化についても言及されている<sup>28)</sup>

本実験では大腿骨前面の血管腔の断面積を計測し、骨幹端部では他群に比べて TS-2 や TS-2・EA が有意に高値を示したが、骨幹中央部では有意な差はみられなかった。このことは、血管腔の開大化は骨幹端部で顕著であるが、骨幹中央部では鍼通電刺激によって開大化が抑制されていたことを示している。

また、強度試験によって得られたいずれの測定項目においても、TS-1 および TS-1・EA は CO との間に有意差を認められなかったが、TS-2 およ

びTS-2・EAはStiffnessとStrengthがCOよりも有意に低かったものの、TS-2・EAはTS-2より有意に高く、一定の抑制効果があったと推測される。

## 5. 結語

加重低減後の鍼通電刺激は骨形成を顕著に促進し、加重低減中の鍼通電刺激は骨吸収を抑制すること、また、この結果はラット大腿骨の骨強度にも影響することが示唆された。



## 6. 付図説明

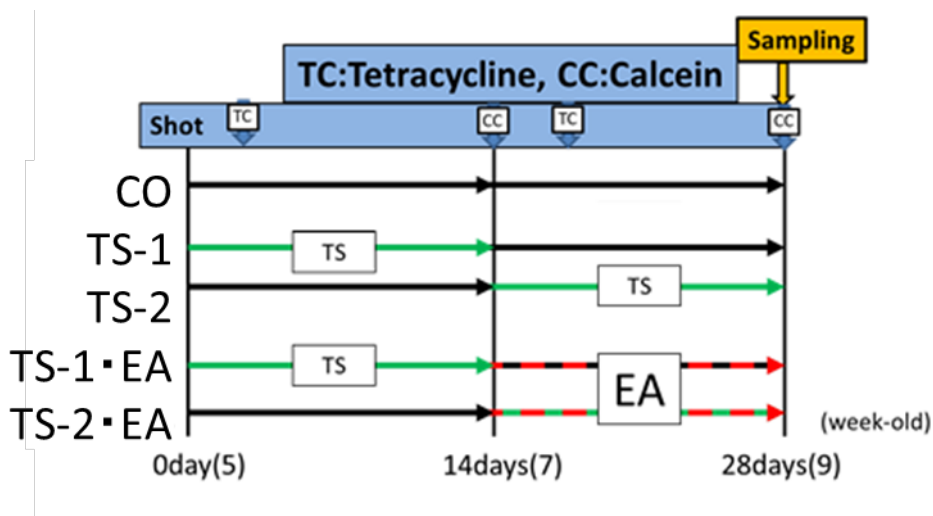


図4-20. 実験プロトコル

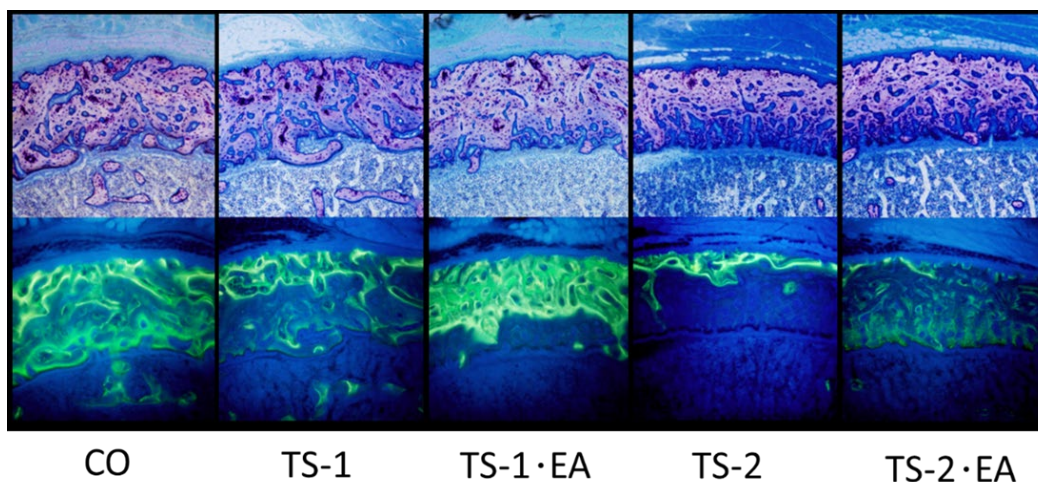


図4-21. 骨幹端部前面の横断像と骨ラベリング

TS-2およびTS-2・EAの骨内膜面側にTB染色で濃染部位がみられたが、CO、TS-1およびTS-1・EAでは濃染部位は観察されなかった。また、血管腔の構造はTS-1・EAとCOが類似しており、血管腔内に同心円状に骨が形成されて狭小化し、他群より緻密であった。TS-1・EAでは皮質骨のほぼ全層にわたってテトラサイクリンとカルセインのラベルは明瞭でCOに類似していたが、TS-1やTS-2では骨内膜側のラベルは不明瞭であった。

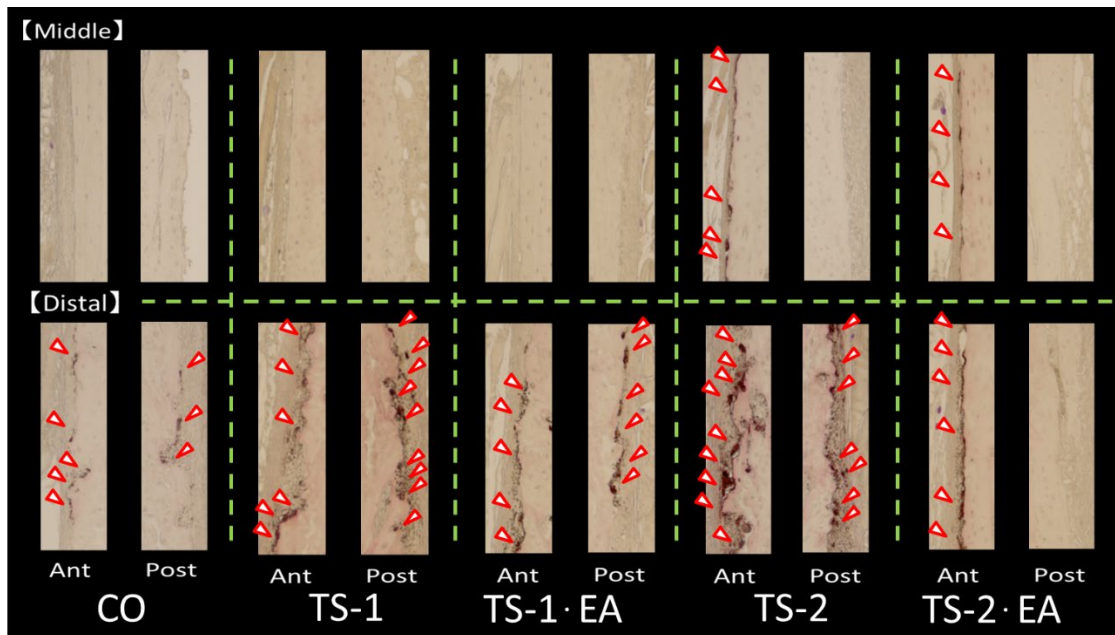


図4-22. 皮質骨骨膜側の骨吸収像（縦断像）

TRAP陽性細胞は，全体的に骨幹中央部に比べて骨幹端部に多くみられた．また，COよりTS-1とTS-2で多く認めたが，通電刺激を行ったTS-1・EAと，特にTS-2・EAではわずかであった．

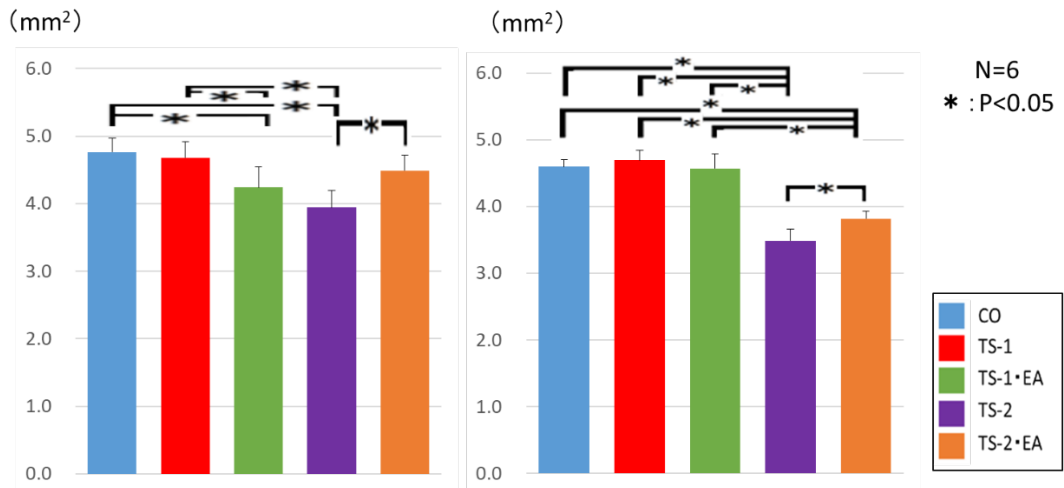


図4-23. 骨形態計測パラメータ

骨幹中央部の断面積は，TS-2が最も低く，TS-1およびTS-2・EAはCOとほぼ同値で有意な差を認めなかった．一方，骨幹端部では，TS-2とTS-2・EAが他群よりも有意に低い値を示した．

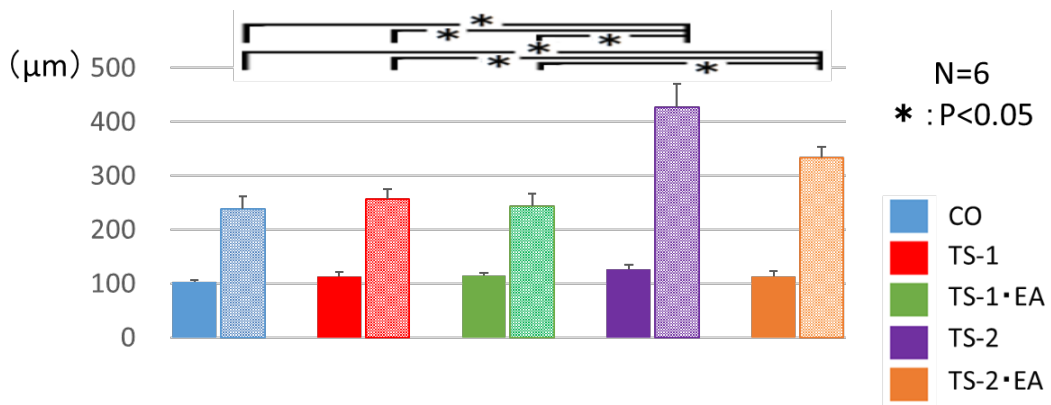


図4-24. 皮質骨前面における血管腔の大きさの比較

骨幹中央部の断面積は、TS-2が最も低く、TS-1およびTS-2・EAはCOとほぼ同値で有意な差を認めなかった。一方、骨幹端部では、TS-2とTS-2・EAが他群よりも有意に低い値を示した。

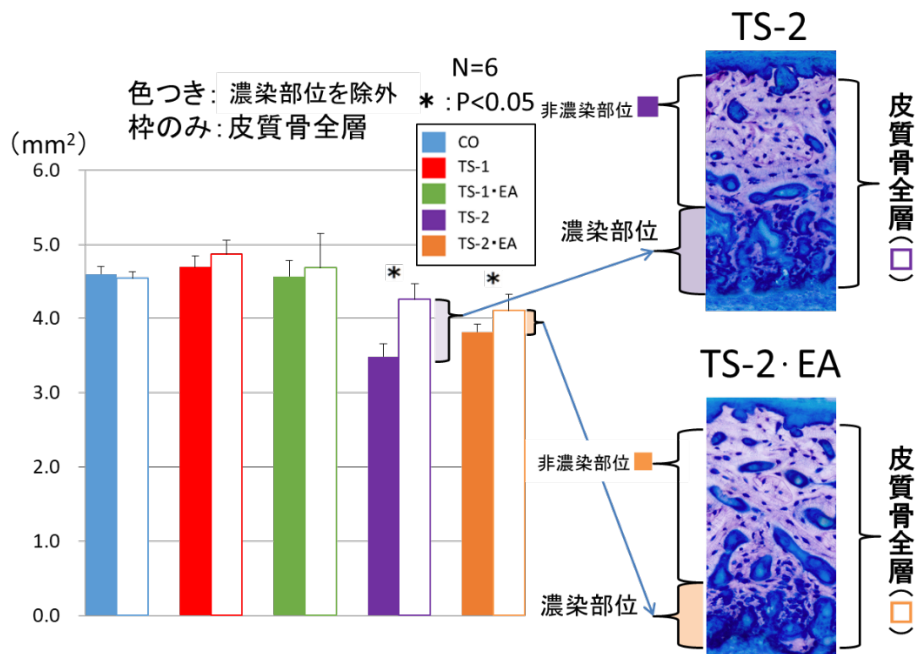


図4-25. 皮質骨内に濃染部位が占める割合

皮質骨内に濃染部位が占める割合はTS-2が18%と最も高値を示した。

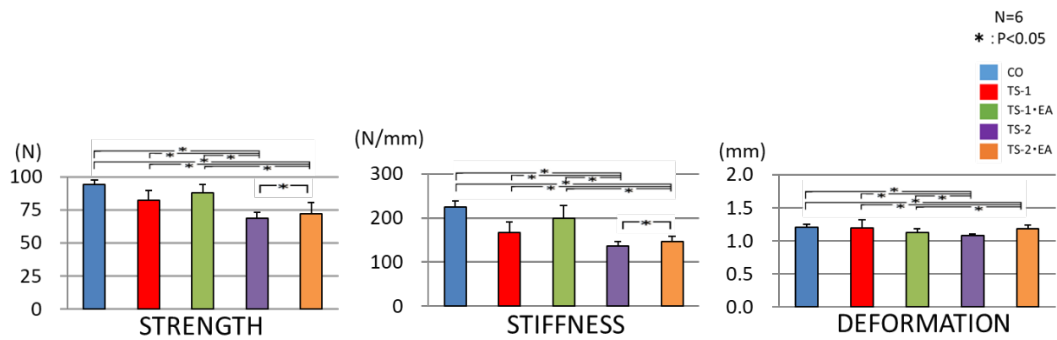


図4-26. 骨強度パラメータ

いずれの測定項目においても、TS-1およびTS-1・EAはCOと有意差は認められなかった。TS-2およびTS-2・EAに関しては、StiffnessとStrengthがCOよりも有意に低値であったが、TS-2・EAはTS-2より有意に高かった。

## 第5節 まとめ

本章では、主に7週齢のウィスター系雄性ラットの大腿骨を材料とし、鍼通電刺激が骨に与える影響について検討した。実験5では加重低減中の関節運動の有無を比較し、さらに、それらに対する鍼通電刺激が骨構造に与える影響を組織学的に比較、検討した。非加重かつ不動化環境により最も皮質骨の骨膜側の吸収像が旺盛となり、皮質骨の骨内膜側における血管腔、皮質骨内の骨小腔の開大化がみられた。鍼通電刺激によって、そのような骨構造の変化が抑制され、強度の維持に影響を及ぼすことが示唆された。実験6では、関節不動化によって皮質骨に生じた基質線維の配列状態や密度の構造の違いが、骨折線の現れ方に与える影響について検討した。不動化によって生じる骨の脆弱化は物性のみならず、構造の変化によっても影響されることが示唆された。しかし、そのような変化は鍼通電刺激によって抑制されていた。実験7では、ラット後肢の加重低減による骨量減少に対して、異なる頻度の鍼通電がどのような影響をもたらすかについて検討し、関節不動化によって皮質骨に生じた脆弱化への鍼通電刺激は頻度依存的に有効であった。実験8では、ラット大腿への鍼通電を、尾部懸垂の後またはその期間中に行い、それらが骨の構造および強度に及ぼす影響を検討した。加重低減後の鍼通電は骨形成を顕著に促進し、加重低減中の

鍼通電は骨吸収を抑制した。このことはいずれも骨強度に影響することが示唆された。

本章のいずれの実験も、鍼通電刺激によって骨強度の維持および骨吸収抑制を示しており、再現性の高い実験結果であった。

## 第五章 骨に及ぼす経皮通電刺激の影響（実験 9, 10）

### （実験 9）

#### 第 1 節 後肢不働化ラットにおける置鍼および通電鍼刺激による大腿骨の構造変化

##### 1. 緒言

加齢や長期臥床などの不活動状態に伴う骨強度の低下は、比較的軽度な外力に対して易骨折性を示す<sup>99)</sup>。このことは、骨形成量の低下と骨吸収量の増加によって骨量の低下が起こるためであるが、加重低減による骨量減少後に鍼通電刺激を行うことにより、骨強度の回復が促進されることが示されている<sup>100)</sup>。それに対して、著者らは、前述の報告<sup>100)</sup>とは異なり、後肢不働中に鍼通電刺激を施し、大腿骨での骨吸収が抑制されることを実験 5 で報告している。生体への通電刺激の方法には表面電極を用いることが一般的であるが、骨への影響については検討されていない。本研究では鍼または経皮による通電刺激の方法上の差異に着目し、不働期間と同時に通電刺激を行うことによって、それらが皮質骨に与える影響について比較、検討することを目的とした。さらに、非通電型の置鍼の影響についても検討した。

##### 2. 材料および方法

###### 2.1 実験動物

7 週齢のウィスター系雄性ラット 45 匹を用い、無作為に不動群 (IM)、不動・置鍼群 (IMA)、不動・経皮通電刺激群 (IMTE)、不動・鍼通電刺激群 (IMEA) および対照群 (CO) の 5 群に分けた。

## 2.2 実験条件

実験 5 と同様に、ジャケット型不動装置を用いて、股関節および膝関節を伸展位で固定し、股関節の内転および外転を制限した。IMA および IMEA の刺鍼部位は大腿前面の中央および骨幹端部をポピドンヨードにて消毒した後に、通法に従って骨膜まで鍼を刺入した。IMTE は同部位の皮膚表面に電極を添付した。IMEA および IMTE は連続的交流通電とし、250 $\mu$ sec, 50Hz, 0.24mA (500 $\Omega$  負荷時) の条件で、鍼または経皮通電を 10 分/日、毎日行った。IM は後肢不動化を図り、IMA は不動中にステンレス鍼を刺入し、CO は正常飼育した。

## 2.3 組織学的標本の作製と観察

標本摘出に際して、苦痛の軽減を図るためにラットを炭酸ガス吸引によって安楽死させ、死亡を確認後、左右の大腿骨を摘出した。ノギスを用いて両脚の大腿骨の長さを計測後、中点を決定し大腿骨の骨幹中央部とした。右脚を骨強度試験用として速やかに破断し、左脚を速やかに固定液（カルノブスキー液）に浸漬した後、骨形態計測および組織構造観察用の標本作製した。



## 2.4 骨形態計測

実験 1 および 5 と同様に，大腿骨の中央部のリゴラック樹脂包埋非脱灰研磨標本を作製し，トルイジンブルー染色を施した．その標本を光学顕微鏡により撮影した後，画像解析ソフト（WinROOF V7.4）を用いて，モニター投影した画像を項目ごとに計測した．骨小腔の計測部位を骨幹中央部水平断の前面にし，縦断された骨小腔を 20 個選択しその平均および最大値を求めた．

## 2.5 破断試験の条件設定

これまでの実験手法と同様に，摘出した大腿骨は破断するまで生理食塩液に浸漬した．その標本を破断試験器（TK-252C，室町機械，東京）により，支点間距離を 10mm，クロスヘッド速度を 10mm/min とする一定の条件下で，骨幹中央部および骨幹端部を骨の前方から破断した．

## 2.6 統計処理

破断試験と形態計測によって得られたデータの平均値と標準偏差を求め，IBM SPSS Statistics Ver.24を用いて各パラメータの一元配置分散分析を行い，有意差が認められた場合はTurkey-HSD 法によって各群間での多重比較を行った．危険率は5%水準未満を有意とした．

## 3. 結果

### 3.1 皮質骨の組織構造

横断された大腿骨骨幹中央部を観察すると、COの後外側部の骨内膜面側に小さな血管腔がいくつかみられたものの、皮質骨は全体的に緻密な状態にあった。それに対して、不動化を行った群では置鍼や通電刺激の有無に関わらず、骨内膜面側に大きな骨髓腔が形成されており、IMの皮質骨が最も菲薄化していた（図5-1）。さらに、各群の皮質骨を前面、後面、外面および内面に分け、拡大して観察すると、以下のような所見が得られた。COの前面では、皮質骨の深部約2/3を主として石灰化軟骨基質と、石灰化度が高く分化度の低い骨（以下、皮質骨の芯となる骨）が占め、その骨膜側および骨内膜側に環状層板が存在したが、この層板は骨内膜側の方が厚かった。骨膜側の環状層板は薄かったが、それとほぼ同様の厚さを示したのはIMEAのみで、IM、IMAおよびIMTEはすべて外環状層板の存在を認めなかった（図5-2）。皮質骨の芯となる骨が骨膜側にまで露出しており、特に、IMはその表面に多くの吸収窩が認められた。さらに、骨破折面に合わせて骨幹中央部前面を拡大すると、COよりもIMとIMAに開大した骨小腔や骨細管が多く観察された（図5-3）。

### 3.2 皮質骨の計測パラメータ

各群の骨幹中央部の外径を比較すると、不動化した4群の前後および内外径はいずれもCOより有意に低い値を示したが、処置群の間には有意な

差は見られなかった。皮質骨の前後および内外面の厚さならびに断面積は、IM が CO より有意に低い値を示した。また、処置群では IM より高い値を示したが、群間に有意な差は認められなかった（図 5-4）。皮質骨内に層板構造が占める割合を比較すると、CO と IMEA は近似した値を示したが、その他は低値であった（図 5-5）。

各群における皮質骨内の骨小腔の断面積を比較すると、IM、IMA および IMTE は CO より有意に大きい値を示したが、IMEA と CO との間には違いは認められなかった（図 5-6）。

### 3.3 骨破断試験

骨の機械的特性への影響についてみると、Stiffness は IMTE を除くほとんどの群で CO より有意に低い値を示したが、IMTE と CO との差は有意でなかった。Deformation は IM と IMTE で有意な低下がみられたが、IMA と IMEA と CO との差は有意ではなかった。Strength は IM と IMTE の間に有意差を認めなかったが、他群よりも有意に低かった（図 5-7）。

## 4. 考察

実験 5 にて不動化や尾部懸垂による加重低減によって皮質骨の厚さが減少することを報告してきたが、メカニカルストレス減の期間が長期化することによって回復に時間を要し、不可逆的になる場合もある<sup>10)</sup>。

本研究では、ラット後肢を 2 週間不動状態に置き、大腿前面への置鍼や

通電刺激を施した群を設けた。不動化の影響は前内側部より後外側部に骨吸収の影響が強く現れ、骨髓腔が形成されていた。実験 1, 2 で述べたように第三転子に相当するこの部位は、通常発育によって増大が図られる。本研究においても同様に CO では第三転子が発達し、皮質骨が後外方に移動するために、その部位の骨膜側では骨形成が旺盛であり、骨内膜面側では吸収が促進されていた。一方、IM では骨内膜面側に大きな骨髓腔が存在し、他の群に比べて皮質骨が最も薄かったことから、この群では骨膜側での骨形成が抑制されると同時に、骨内膜側での吸収が著しく促進されたと推測される。IMA および IMTE では、骨内膜両側に大きな骨髓腔が出現しており、不動化に伴う骨内膜側からの吸収は抑制されていなかった。また、皮質骨の厚さは IM に比べて処置群はいずれも厚かったが、その中でも IMA が最も薄く、IMEA が最も厚かった。以上のことから、不動化に伴うこの部位の骨膜側の骨形成の抑制は、その皮質骨の厚さが示すように IMA より IMTE、そしてさらに IMEA という順で、大きな効果がもたらされていた。実験 3, 4 で述べたが、これまでにラット大腿骨を用いて骨幹中央部および骨幹端部の構造に関する発育変化について検討している。本研究においても、それらと同様に骨幹中央部の中でも前内側部に層板構造が形成されており、後外側には層板構造を形成しない骨が厚く形成されることを認めた。層板構造の有無と、基質線維の密度および配列状態から骨の形成速度や組織の分化度について検討した実験 1 では、典型的な

層板構造が形成される骨は分化度が高く、形成にも長い時間を要することが示唆されている。この報告にラット大腿骨の前内側部と後外側部の構造上の違いを当てはめて考えると、前者の骨は緩やかに形成される分化度の高い骨であり、後者は比較的短時間のうちに形成される骨である。皮質骨内に層板構造が占める割合は、CO と IMEA でほぼ同値であった。このことから皮質骨の厚さ、分化度ともに CO と IMEA は類似していると考えられる。骨基質に埋入された骨細胞は、成熟の度合いによって形態や細胞内小器官の量に変化が生じ、骨形成能は休止すると考えられている<sup>102)</sup>。

大腿前面の骨小腔の大きさを群間で比較すると、IM、IMA および IMTE では CO より有意に大きい値を示したが、IMEA と CO との間には有意な差を示さなかった。また、IMEA は組織像で観察すると骨細管の太さに関しても同様な傾向が認められた。実験 6 で述べたように骨粗鬆症では骨小腔や骨細管壁から無機質が溶出することによって、その小腔壁や骨細管が開大する。このことから、不動化によって骨細胞性骨溶解が促進し、IMEA では抑制されていたと考えられる。一方、物性を示す骨強度試験の結果を比較すると、Strength の値は CO に次いで IMEA の値が高く、IM より維持されていることが分かった。このことは、硬さとしなやかさの積である Strength に、層板構造の占める割合や骨小腔の開大が関連したことを反映していると考えられる。このことは、不動化の影響のみならず、介入の影響についても大腿骨の後外側部で明瞭であったことから、この部位は

活発な形成および吸収が行われている。すなわち高代謝回転のみられる部位に顕著な影響をもたらし，鍼通電刺激によって構造的，強度的に維持されることを意味する。

## 5. 結語

不働化によってラット大腿骨に生じる骨量減少の影響は，刺鍼のみや経皮的な微弱電流では抑制されなかったが，鍼通電刺激によって抑制されることが示唆された。

## 6. 付図説明

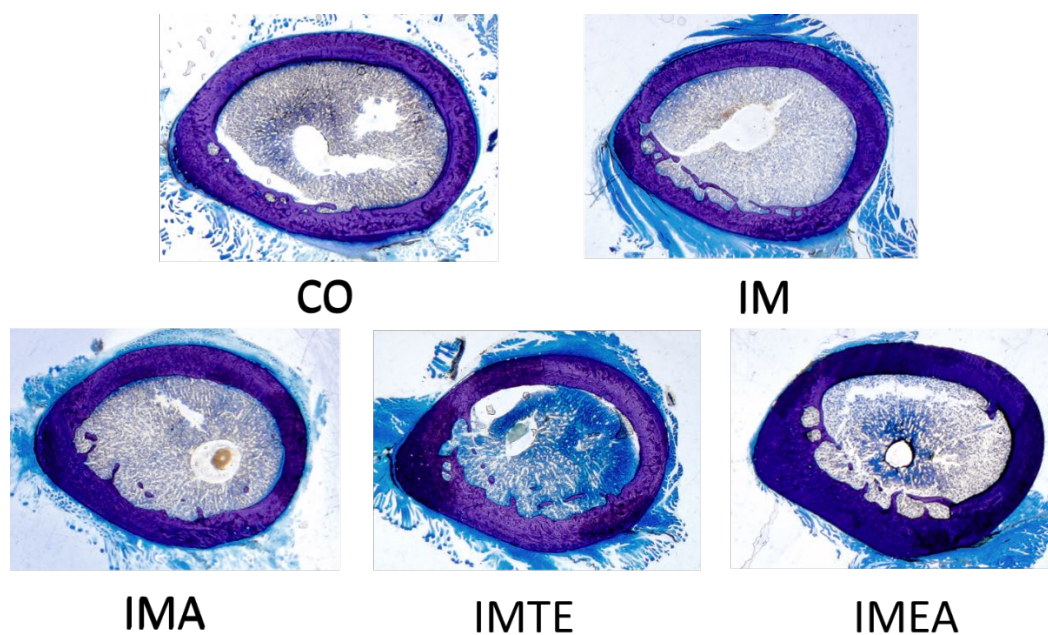


図5-1. 各群における骨幹中央部の弱拡大像（横断像）

COの後外側部の骨内膜面側に小さな血管腔がいくつかみられたものの、皮質骨は全体的に緻密な状態にあった。それに対して、不動化を行った群では置鍼や通電刺激の有無に関わらず、骨内膜面側に大きな骨髓腔が形成されており、IMの皮質骨が最も菲薄化していた。

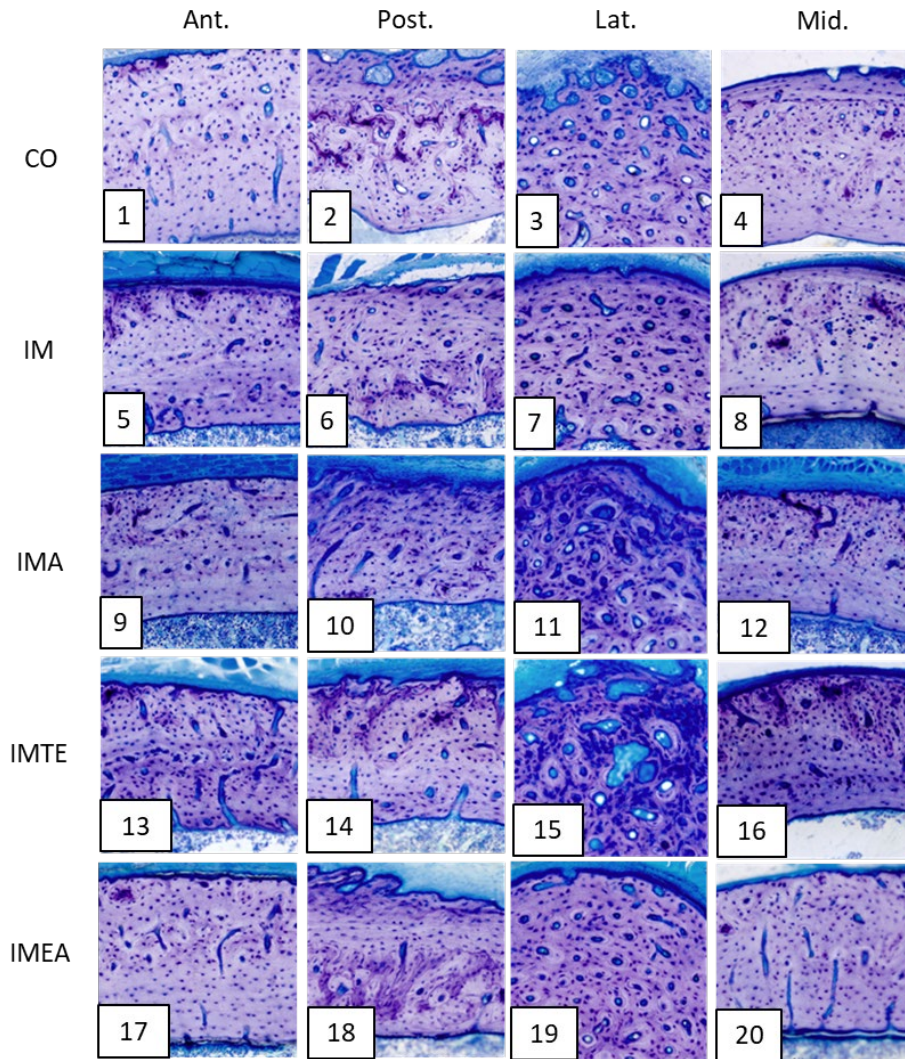


図5-2. 各群における骨幹中央部の拡大像（横断像）  
 (1-4: CO 5-8: IM 9-12: IMA 13-16: IMTE 17-20: IMEA  
 1,5,9,13,17: 前面 2,6,10,14,18: 後面  
 3,7,11,15,19: 外面 4,8,12,16,20: 内面)

COの前面では、皮質骨の深部約2/3を主として石灰化軟骨基質と石灰化度の高い幼若な骨が占め、その骨膜面および骨内膜面に環状層板が存在したが、この層板は骨内膜面側の方が厚かった。



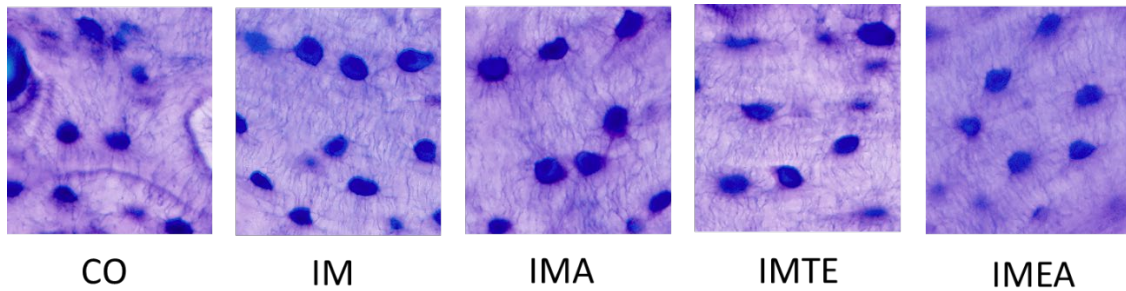


図5-3. 皮質骨前面における骨小腔の比較

COよりもIMとIMAに開大した骨小腔や骨細管が多く観察された。

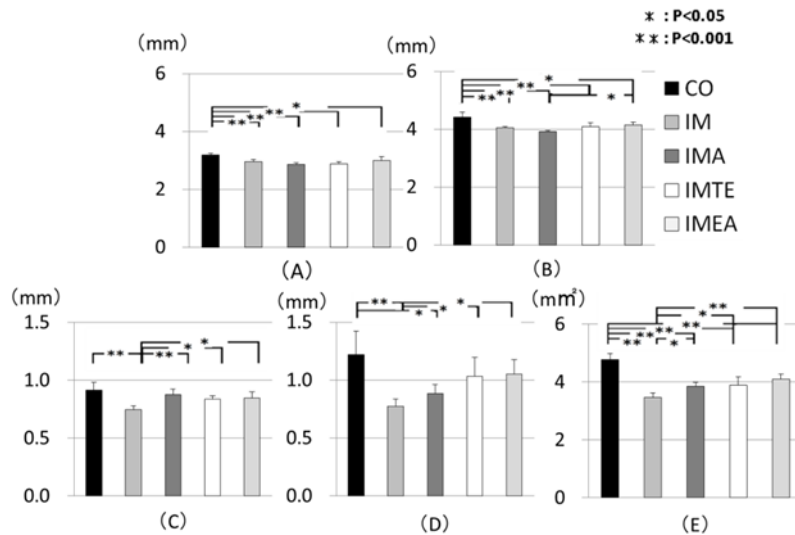


図5-4. 骨形態計測パラメータ

(A) 前後径, (B) 内外径, (C) 前後厚, (D) 内外厚, (E) 横断面積

各群の骨幹中央部の外径を比較すると、不動化した4群の前後および内外径はいずれもCOより有意に低い値を示したが、処置群の間には有意な差は見られなかった。皮質骨の前後および内外面の厚さならびに断面積は、IMがCOより有意に低い値を示した。また、処置群ではIMより高い値を示したが、群間に有意な差は認められなかった。

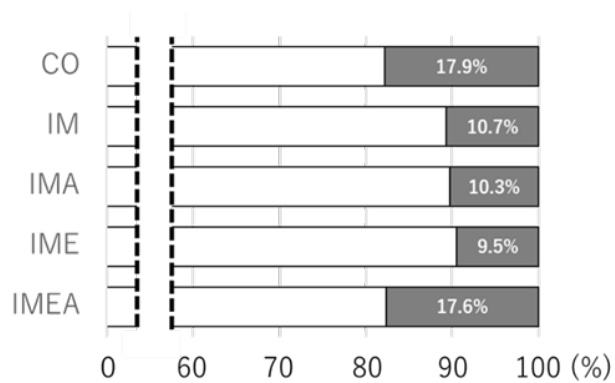


図5-5. 皮質骨内に層板構造が占める割合

COとIMEAは近似した値を示したが、その他は低値であった。

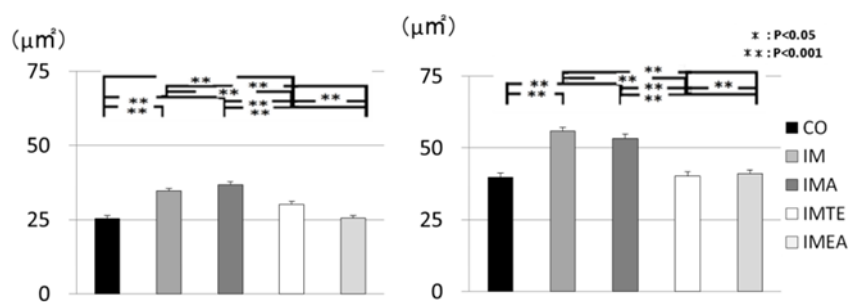


図5-6. 骨小腔の横断面積の比較

IM, IMAおよびIMTEはCOより有意に大きい値を示したが、IMEAとCOとの間に有意差を認めなかった。

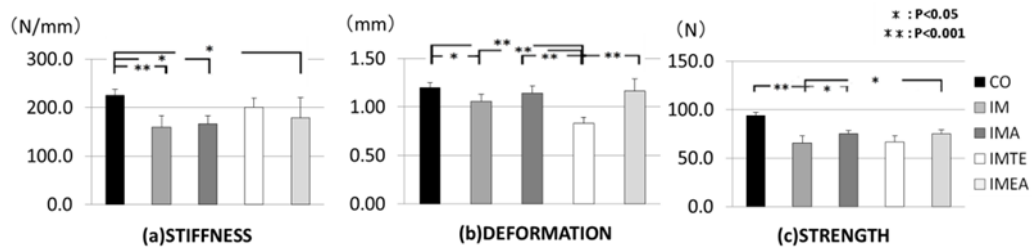


図5-7. 骨強度パラメータ

StiffnessはIMTEを除くほとんどの群でCOより有意に低い値を示したが、IMTEとCOとの差は有意でなかった。DeformationはIMとIMTEで有意な低下がみられたが、IMAとIMEAとCOとの差は有意ではなかった。StrengthはIMとIMTEの間に有意差を認めなかったが、他群よりも有意に低かった。

## (実験 10)

### 第 2 節 後肢不動化したラットの大腿骨構造に及ぼす経皮的直流通電刺激の効果

#### 1. 緒言

第三章ではラット後肢の加重低減を図るとともに鍼通電刺激を行うことにより、大腿骨の骨量減少の抑制効果を認めている。しかし、この結果を応用してヒトに対して行うためには、医師または鍼灸師免許が必要である。それらの資格を持たぬ一般人への普及化を考えると、経皮的電流による通電刺激が骨に与える効果について検討すべきであると考えられる。先の実験 9 においては、経皮通電刺激装置を用いて、経皮通電刺激の効果を置鍼のみや鍼通電刺激の効果と比較したが、経皮通電刺激では良好な結果が得られなかった。そこでは交流電流の刺激装置を用いた。直流電流の刺激装置、特に搬送波を伴う直流電流が発生可能な刺激装置が最近開発されたが、これによる骨形成の影響については報告がない。本研究は後肢不動状態にあるラットへの経皮的直流通電刺激が、大腿骨皮質骨の構造に及ぼす影響を組織学的に比較、検討することを目的とした。

#### 2. 材料および方法

##### 2.1 実験動物

7 週齢のウィスター系雄性ラット 42 匹を用いた。後肢を不動状態にし

た群 (IM), その不動状態と同期間に経皮通電を施した群 (TE) および対照群 (CO) に分類した. 骨の形成状態について観察するために, 実験開始日にテトラサイクリン, サンプリング 4 時間前にカルセインを腹注した.

## 2.2 不動および鍼通電刺激条件

実験 5 の手法に従い, IM および TE には尾部懸垂および不動処置を施した. さらに TE には同期間に大腿部表面を剃毛し, そこに電極パッドを貼付して連続的直流通電刺激を行った. 貼付部位は大腿部中央および遠位 1/3 部とした. 低周波刺激装置 (バイオトレーナー I, 大島製作所社製) を用い, 通電刺激は, 200 $\mu$ sec, 31Hz (搬送波 80kHz), 60V の条件で実験期間中 10 分/日, 毎日, 2 週間実施した.

## 2.3 破断試験の条件設定

これまでの実験手法と同様に, 摘出した大腿骨は破断するまで生理食塩液に浸漬した. その標本を破断試験器 (TK-252C, 室町機械社製) により, 支点間距離を 10mm, クロスヘッド速度を 10mm/min とする一定の条件下で, 骨幹中央部および骨幹端部を骨の前方から破断した.

## 2.4 骨形態計測

これまでの実験の手法と同様に, 骨幹中央部における横断面のリゴラッ

ク樹脂研磨標本を作製してトルイジンブルー (TB) 染色を施した。その標本を光学顕微鏡により撮影後、モニターに投影し、画像解析ソフト (WinROOF V7.4) を用いて、骨幹中央部および骨幹端部における皮質骨の横断面積を求めた。

## 2.5 標本の摘出および固定

それぞれの標本は、破断後、速やかに 4%パラホルムアルデヒド水溶液 (PFA) または 0.1M カコジル酸ナトリウム水溶液 (pH7.4) にて緩衝されたカルノブスキー液 (4°C, 一晚) で固定した。

## 2.6 組織学的標本の作製と観察

これまでの実験と同様に、4%PFA で固定された標本は非脱灰樹脂研磨標本の作製に用いて、酸腐食した後、TB 染色を施した。また、同液で固定された他の標本を用いて矢状断脱灰パラフィン切片を作製し、TRAP (Tartrate resistant Acid-phosphate) 染色を施した。いずれも大腿骨前面の皮質骨の内外的中央部を光学顕微鏡により観察した。いずれも観察部位を骨幹中央部および骨幹端部とした。

## 2.7 統計処理

破断試験と形態計測によって得られたデータの平均値と標準偏差を求め、IBM SPSS Statistics Ver.24 を用いて各パラメータの一元配置分散分

析を行い、有意差が認められた場合は Turkey-HSD 法によって各群間での多重比較を行った。危険率は 5%水準未満を有意とした。

### 3. 結果

#### 3.1 皮質骨の構造

リゴラック樹脂包埋標本を用いて、大腿骨中央および骨幹端部の横断研磨標本を作製し、両者を比較すると、CO に比べて IM の骨幹中央部では後外面、骨幹端部では全体的に皮質骨が菲薄化した。しかし、TE では、そのいずれの部位も厚さは維持されていた (図 5-8)。

次に、テトラサイクリンとカルセインでラベルされた標本を用い、骨幹中央部および骨幹端部の形成状態を観察した。いずれの群も、骨幹中央部の前内側部は骨膜側および骨内膜側にラベルがみられ、後外側面には骨膜側のみラベリングされていた。さらに、外側を拡大すると CO では皮質骨深部にラベルを認めたが、TE ではやや骨表面にみられ、IM は骨膜側の骨表面にあった (図 5-9) 次に、骨幹端部を観察すると骨幹中央部とは異なり、全周にわたってラベルが観察された。前面を拡大すると CO のラベルは深部に存在していたが、その他の群は主に骨内膜側の骨表面にみられた (図 5-10)。

骨吸収能を観察するために矢状断された脱灰パラフィン切片を用い、骨幹中央部と骨幹端部の前、後面における TRAP 染色陽性細胞の状態につ

いて観察した。いずれの群も骨幹中央部では陽性細胞は認めなかったが、骨幹端部で観察された。さらに骨幹端部を各群で比較すると、前、後面ともに IM に最も多くの陽性細胞を認めたが、TE は CO よりも少ない傾向にあった (図 5-11)。

### 3.2 骨形態計測および骨強度パラメータ

皮質骨横断面積は、いずれの実験群も骨幹中央部、骨幹端部の皮質骨の断面積が CO より有意に減少した。TE は、IM より有意に高い値を示した (図 5-12)。次に、骨幹中央部の骨小腔の大きさを各群で比較すると、IM は他群よりも有意に高値を示したが、CO および TE の間には有意な差を認めなかった (図 5-13)。骨強度を示す Strength は CO が他群と比較して有意な高値を示したが、TE は IM より有意に高い値を示した (図 5-14)。

## 4. 考察

序論で述べたように、これまでに骨へ直接的に電極を装着する実験<sup>47-49)</sup>が行われ、良い結果が多く報告されてきたが、骨を露出するという手法はヒトへの応用が困難であった。そのような点を解消するためにステンレス鍼を電極として用い通電刺激を行うと、前述の報告と同様な骨量の維持がみられた。これは、ヒトへの臨床応用を想定したときに大きな前進であった。しかし、鍼を刺入するには医師または鍼灸師の資格免許が必要である



ことから、一般に普及させていくには簡便に体外からの刺激によって骨量維持が図られる必要があると考えられる。

本実験では、CO に比べて IM の骨幹中央部の後外面、骨幹端部は全体的に皮質骨が菲薄化していたが、TE では、そのいずれの部位も厚さが維持されていた。このことは、これまでの報告と類似した結果であった。また、実験 9 で行った交流電流による経皮通電では、皮質骨の横断面積にほとんど影響を与えなかったが、本実験条件では横断面積が維持されていた。このことから、深部まで到達しにくいとされる経皮通電であっても、本実験条件であれば、体の深部に存在する骨の吸収を抑制することが示された。皮質骨断面積や骨強度パラメータを計測すると TE は CO と IM の中間的な値を示しており、骨幹中央部の骨小腔の大きさは、IM は他群よりも有意に高値を示したものの、CO と TE の間には有意な差は認められなかった。このことも、経皮通電が深部まで到達していることを裏付けると考えられる。

各群の骨形成状態を観察すると、いずれも骨幹中央部の前内側部は骨膜側および骨内膜側にラベルがみられ、後外側面では骨膜側のみラベルが確認された。前内側部のラベルより骨表面側には分化した骨基質である層板骨が形成されていた。一方、後外側面では層板構造は認められなかった。これは実験 2 で述べたように、後外側面は筋の付着部であり、筋からの張力による影響を受けやすい部位には Type B に相当する骨基質が存在する。

いずれの部位においてもラベリングより表面に存在する骨は腹注後に形成されたことを示している。また、実験 1 で述べたように形成速度の面からみると、層板構造を有する Type C は比較的分化度の低い Type B よりも形成が遅い。このことを反映するように、CO では皮質骨深部にラベルを認め、その表面には骨が添加されていた。さらに TE でも骨の添加が骨表面にみられたが、IM では骨膜面側の骨表面にラベルが存在しており、これは新たな骨の添加がなかったことを意味する。このことから、通電刺激によって生じた筋の牽引力による違いが、群間の差をもたらしたと推測される。すなわち、CO では通常飼育でケージ内を自由に動くことができたが、IM は関節が固定されていたため一切の筋収縮が無かった。しかし、同条件で関節固定されていた TE は、経皮通電刺激によって筋に収縮力を生じ、IM よりも骨形成が行われていたと考えられる。

骨幹端部を観察すると骨幹中央部とは異なって、全周にわたってラベルがみられた。これは、遠位骨幹端部から骨形成が行われ、骨幹中央部よりも旺盛であることと関連しているものと考えられる。前面を拡大すると CO のラベルは深部に存在し、その他の群は骨内膜面側の骨表面にみられた。実験 4 で述べたように骨幹端部では、主に内側への形成が行われており、この報告と一致していた。すなわち、ラベルよりも骨内膜面にかけて形成されているために深部にラベルが存在したが、IM および TE ではほとんど形成されていなかった。

各群のパラフィン切片に TRAP 染色を施して、骨吸収能について観察した。いずれの群も骨幹中央部に TRAP 陽性細胞を認めなかったが、骨幹端部でみられた。このことは、先にも述べたように、骨幹端部は骨代謝が旺盛な部位であることから骨吸収も盛んである。骨幹端部を各群で比較すると、前、後面ともに IM に最も多くの TRAP 陽性細胞を認めたが、TE は CO と同様または少ない傾向にあった。関節不動化または加重低減などによって、メカニカルストレス減少の環境下におくと破骨細胞が増加する。しかし、鍼通電刺激によってそれらが抑制されるが、今回の結果はこれと類似していた。この両者の刺激で共通している点は電気刺激による筋収縮が起こることであるが、このことがどの部位に影響を与え、骨形成促進および吸収抑制がどのような代謝系のもとで行われているかについては今回、検討するに至らず、今後の課題としたい。

## 5. 結語

ラット後肢の関節不動化による骨量減少に対して、経皮通電刺激は骨吸収の抑制によって皮質骨の断面積の減少を防止し、また、硬さを維持していた。

## 6. 付図説明

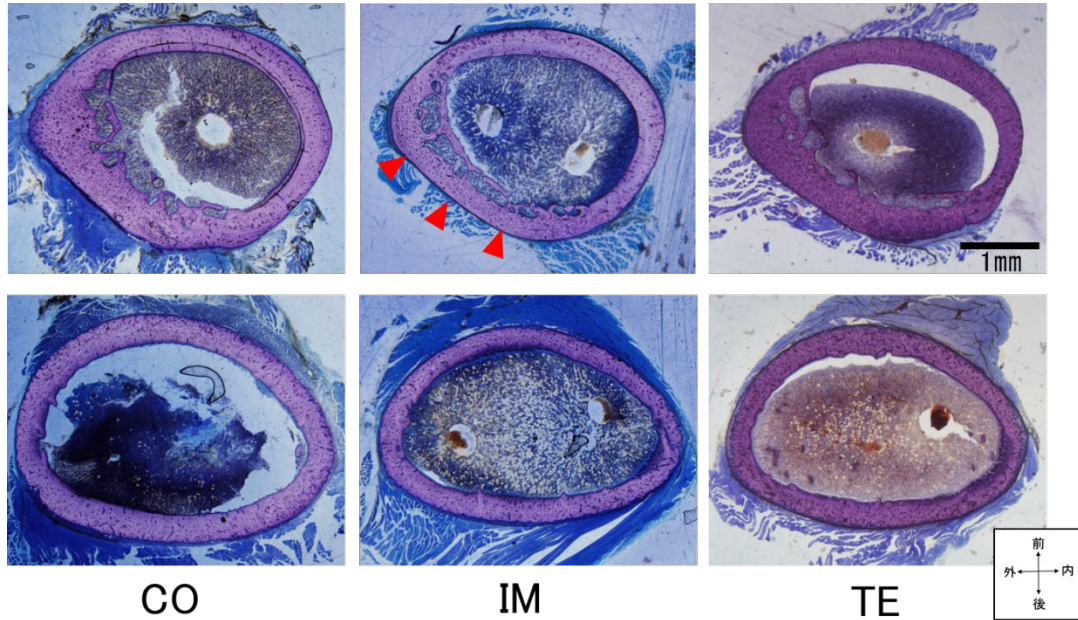


図5-8. 皮質骨外形の比較 (上段:骨幹部 下段:骨幹部端部, 横断像)

COに比べてIMの骨幹中央部では後外面, 骨幹部端部では全体的に皮質骨が菲薄化した. しかし, TEでは, そのいずれの部位も厚さは維持されていた.

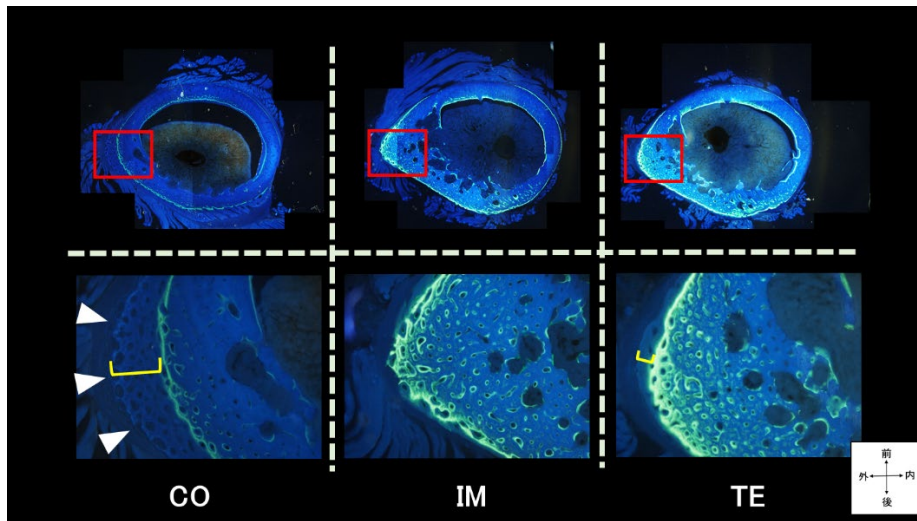


図5-9. 骨幹中央部における骨の形成状態(テトラサイクリンのラベリング)  
 上段：弱拡大像、下段：赤枠の拡大（横断像）

いずれの群も、骨幹中央部の前内側部は骨膜面および骨内膜面にラベルがみられ、後外側面には骨膜側のみラベリングされていた。さらに、外側を拡大するとCOでは皮質骨深部にラベルを認めたが、TEではやや骨表面にみられ、IMは骨膜面側の骨表面にあった。

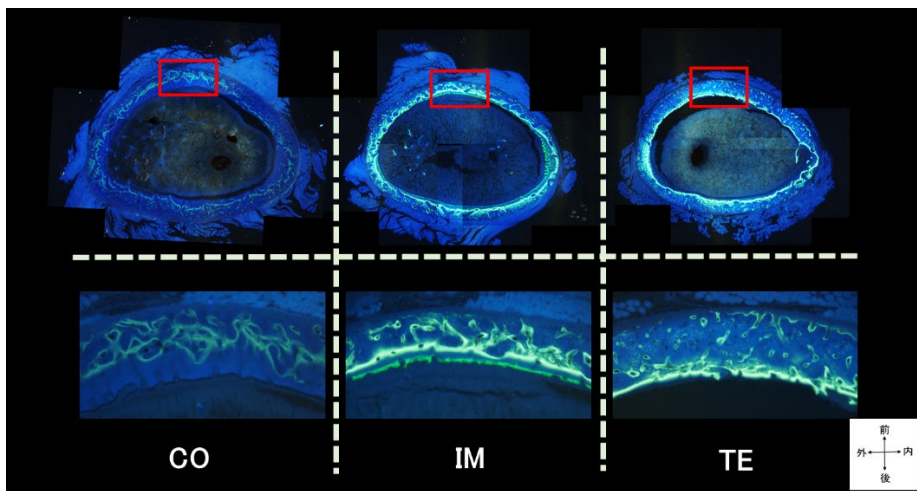


図5-10. 骨幹端部における骨の形成状態(テトラサイクリンのラベリング)  
 上段：弱拡大像、下段：赤枠の拡大（横断像）

骨幹中央部とは異なり、全周にわたってラベルが観察された。前面を拡大するとCOのラベルは皮質骨の深部に存在していたが、その他の群は主に骨内膜側の骨表面にみられた。

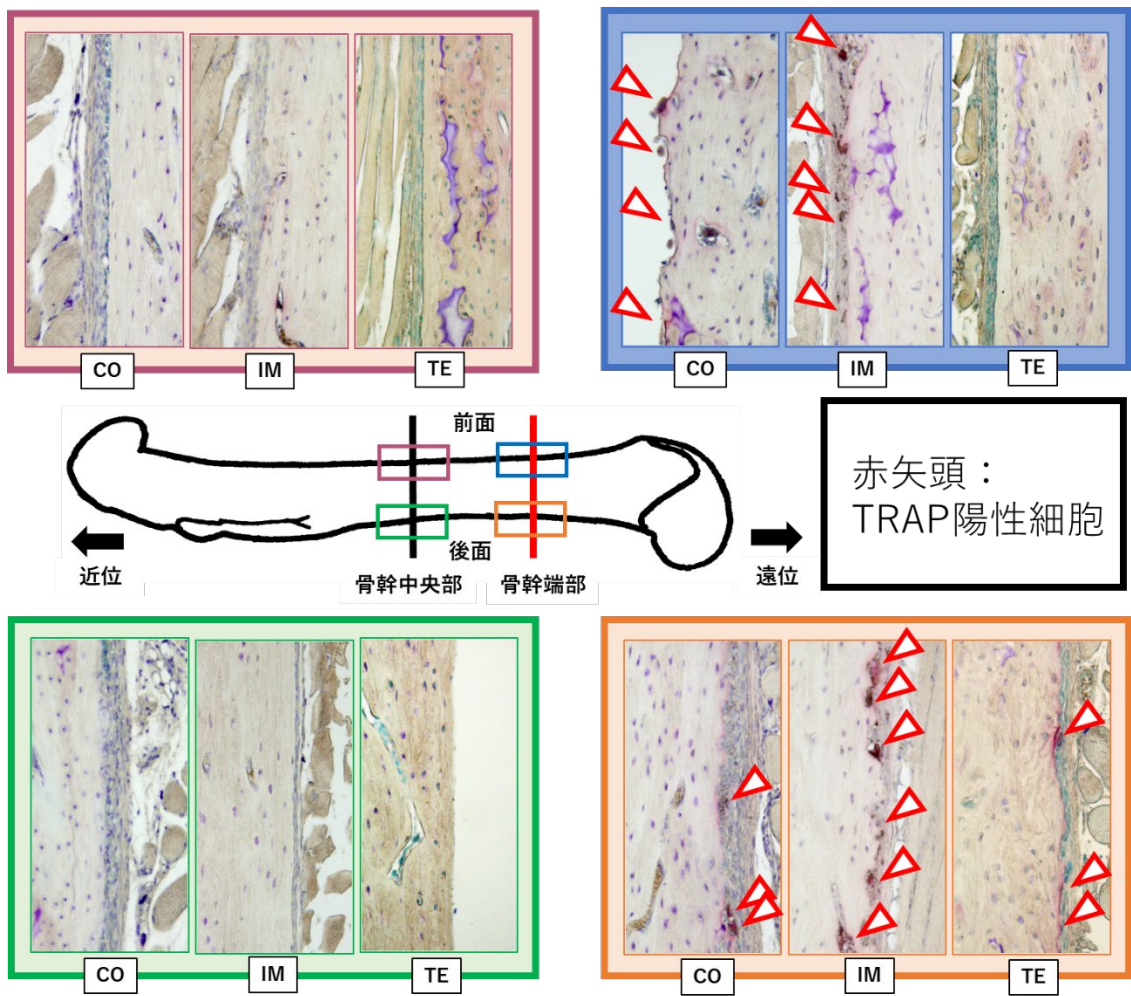


図5-11. 大腿骨前後面における骨膜側の骨吸収像（縦断像）

いずれの群も骨幹中央部では陽性細胞は認めなかったが、骨幹端部で観察された。さらに骨幹端部を各群で比較すると、前、後面ともにIMに最も多くの陽性細胞を認めたが、TEはCOよりも少ない傾向にあった。

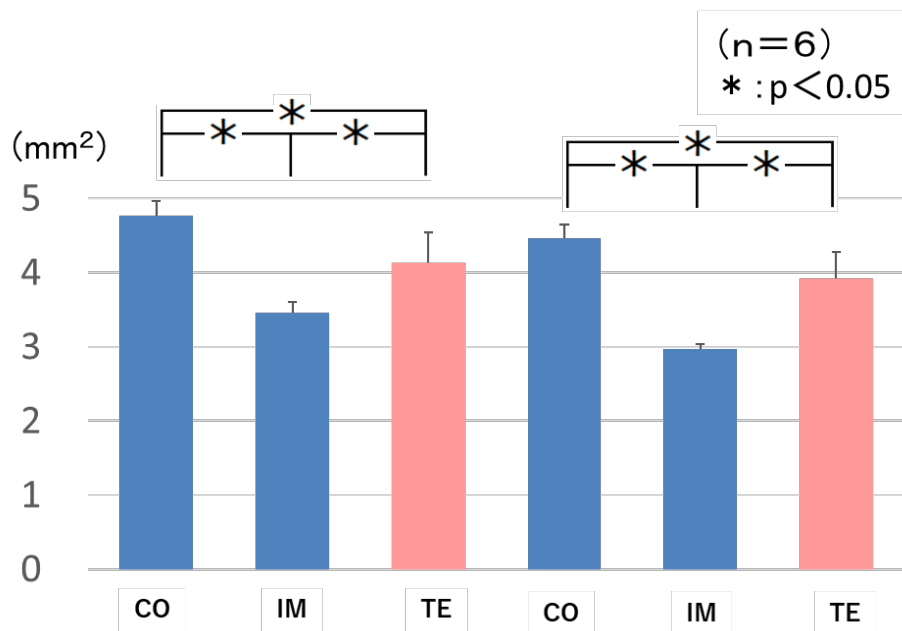


図5-12. 骨形態計測(皮質骨断面積) 左図:骨幹部 右図:骨幹部端部

皮質骨横断面積は、いずれの実験群も骨幹中央部、骨幹端部の皮質骨の断面積がCOより有意に減少した。TEは、IMより有意に高い値を示した。

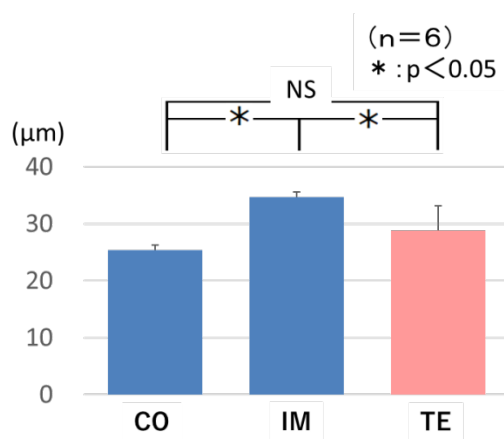


図5-13. 骨幹中央部前面における骨小腔の比較

IMは他群よりも有意に高値を示したが、COおよびTEの間には有意な差を認めなかった。

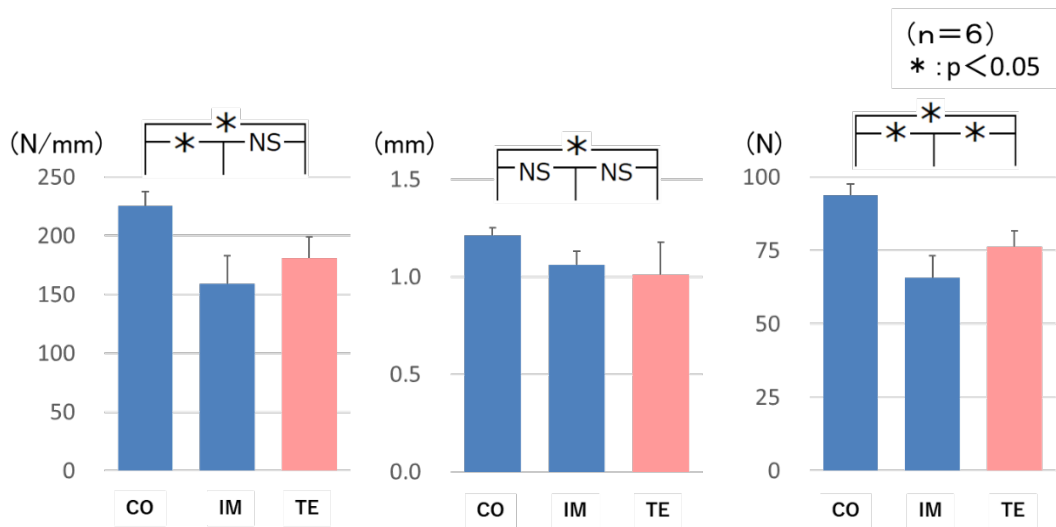


図5-14. 骨強度パラメータ

StrengthはCOが他群と比較して有意な高値を示したが、TEはIMより有意に高い値を示した。



### 第3節 まとめ

実験9では、鍼または経皮による通電刺激の方法上の差異に着目し、不動期間と同時に通電刺激を行うことによって、それらが皮質骨に与える影響について検討した。さらに、非通電型の置鍼の影響についても検討した。不動化によって骨に生じる影響は、置鍼や皮膚からの交流電流では抑制されなかったが、導子を直接的に体内へ入れて通電を行う鍼通電刺激によって抑制された。実験10では、後肢不動状態のラットへ経皮的に直流電流通電刺激を施し、大腿骨皮質骨の構造に及ぼす影響を検討した。ラット後肢の関節不動化による骨量減少に対して、通電刺激は骨吸収の抑制によって皮質骨の断面積の減少を防止し、また、硬さを維持していた。すなわち、置鍼のみでは有意な効果はみられず、侵害刺激による骨への影響はなかった。経皮通電では、直流電流のみに骨量減少抑制の効果を認めた。これは、本章で行った交流電流の実験条件下では筋収縮を伴わず、直流電流の実験条件下では筋収縮を伴っていたことから、このことが骨量減少抑制に関わっていると推測された。

## 第六章 結論

本博士論文では、発育に伴う骨構造の変化と強度の上昇は密接に関連し、骨膜は部位によって血管の走行または筋線維束の配列が決定されていることを認めた。このように発育に伴う構造変化を理解した上で、三点支持試験によって生じた骨幹中央部または骨幹端部の破折面を観察し、亀裂が層板骨内の休止線や接合線に一致して骨の長軸方向に生じることを認めた。この研究結果は、骨折部位を整復する際に、その部位の骨の状況を推測、診断するのに重要な示唆をもたらす可能性があり、そのため臨床にもつながる有用な情報となる。

次に、不動化によって生じる骨の変化を観察および計測し、物性のみならず構造の脆弱化していることが分かった。しかし、そのような変化は鍼通電刺激によって抑制され、しかも頻度依存的な効果があることを認めた。さらに、加重低減後の鍼通電は骨形成を促進し、加重低減中の鍼通電は骨吸収を抑制した。このように、いずれの実験も鍼通電刺激によって骨強度の維持および骨吸収抑制を示しており、高い再現性が得られた。以上の結果は、鍼通電を用いた物理的的刺激が骨量の維持に寄与すること、そして、このことが寝たきり状態の患者やリハビリ期におけるアスリートにも応用しうる可能性、発展性を有することを示すものである。

しかし、鍼の刺入には医師または鍼灸師の資格免許が必要であり、通電刺激によって骨量維持を図る方法を一般に普及させるには、体外からの刺

激によって簡便に骨量維持を図る方法を確立することが必要であると考えられる。このことから、応用研究としてパッドを用いて経皮的に通電刺激を行ったところ、本実験条件の直流電流刺激を施した群においてのみ骨吸収の抑制を認めた。これは、先の鍼通電と共通している点が電気刺激による筋収縮であり、このことが骨基質と強度に影響することが示唆された。

本博士論文における一連の実験は、ヒトへの応用を想定して実験動物を用いたものであるが、皮下組織の厚さや骨の大きさが異なっており、本研究で得た結果をヒトに当てはめることができない。さらに、一連の実験で得た知見は、電気刺激が骨に直接影響するのか、または、筋収縮を介して生じた牽引力が骨に影響したのかについて断定するに至っていない。また、骨形成促進および吸収抑制にどのような代謝系のもとで行われているかについても検討するに至らず、今後の課題としたい。

## 実験動物への配慮

本博士論文は、「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和 48 年法律第 105 号），平成 17 年改正」および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年環境省告示第 88 号）」において定められた動物福祉の 3R の原則（Replacement, Reduction, Refinement）に基づいて実施した。すなわち，科学上の利用の目的を達することができる範囲において，できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用する（Replacement）とともに，できる限りその利用に供される動物の数を少なくする（Reduction）。また，苦痛の軽減（科学上の利用に必要な限度において，できる限り動物に苦痛を与えない方法（Refinement）等について十分に検討した。なお，一連の実験は東洋大学動物実験委員会および福祉社会デザイン研究科研究等倫理委員会の審査により承認され，実施された。（2014-012 号，2014-013 号，2016-016 号，2016-017 号，2016-018 号，2017-003 号，2017-004 号，2018-5 号）

## 参考文献

- 1) 日本整形外科学会：ロコモティブシンドローム診療ガイド．2010．
- 2) 川口浩：骨粗鬆症の薬物療法．日本ペインクリニック学会誌 22：1-10，2014．
- 3) Bliuc D., et al. : Mortality risk associated with low trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. JAMA 301 : 513-521, 2009.
- 4) 中塚喜義, 他：高齢者ではビタミン D 欠乏が存在し, 骨芽細胞機能は短期の活性型ビタミン D3 の投与により亢進する．日本老年医学会雑誌 34 : 733-738, 1997.
- 5) Nagaoka H., et al. : 1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> regulates collagen quality in an osteoblastic cell culture system. 377 : 674-678, 2008.
- 6) Matsumoto T., et al. : A new active vitamin D<sub>3</sub> analog, eldecalcitol, prevents the risk of osteoporotic fractures a randomized, active comparator, double-blind study. Bone 49 : 605-612, 2011.
- 7) 斉藤充：なぜ高い骨密度でも骨折するのか -骨密度と骨質からみた新たな骨脆弱化の分類と薬剤の使い分け-. 歯薬療法 32:109-121, 2013.
- 8) Michael R.M., et al. : Denosumab in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density. The New England journal of medicine 345 : 821-831, 2006.
- 9) GA Rodan., et al. : Bisphosphonates: Mechanisms of Action. The

Journal of Clinical Investigation 97 : 2692-2696, 1996.

- 10) 藤田拓男, 他 : 骨粗鬆症に伴う疼痛に対するサケカルシトニン (合成) の効果. JBMM 3 : 93-109, 1985.
- 11) Michael R.M., et al. : Opposite Bone Remodeling Effects of Teriparatide and Alendronate in Increasing Bone Mass. 165 : 1762-1768, 2005.
- 12) Saito M., et al. : Intensity-related differences in collagen post-translational modification in MC3T3-E1 osteoblasts after exposure to low and high intensity pulsed ultrasound. Bone 35 : 644-655, 2003.
- 13) McClung MR., et al. : Bone loss study group, Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. The New England journal of medicine 354 : 821-831, 2006.
- 14) Brown JP., et al. : Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. J Bone Miner Res 24 : 153-161, 2009.
- 15) Abdesslem K., et al. : Can docetaxel concomitant administration with bisphosphonates be considered as a risk factor for osteonecrosis of the jaw in metastatic breast cancer patients? A preliminary study. American Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2 : 1-6, 2015.

- 16) Durie BG., et al. : Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates.  
The New England journal of medicine 353 : 99-102, 2005.
- 17) Kuehn BM : Reports of adverse events from bone drugs prompt caution. JAMA 295 : 2833-2836, 2006.
- 18) Saito M., et al. : Changes in the contents of enzymatic immature, mature, and non enzymatic senescent cross links of collagen after once-weekly treatment with human parathyroid hormone (1-34) for 18 months contribute to improvement of bone strength in ovariectomized monkeys. Osteoporosis Int 22 : 2373-2383, 2011.
- 19) 吉村典子 : 運動, 身体活動改善による骨折・骨粗鬆症予防のエビデンス. 日本衛生学雑誌 58 : 328-337, 2003.
- 20) Saag KG., et al. : Teriparatide or alendronate in glucocorticoid induced osteoporosis. The New England journal of medicine 357 : 2028-39, 2007.
- 21) Orwoll ES., et al. : The effect of teriparatide (human parathyroid hormone (1-39)) therapy on bone density in men with osteoporosis. J Bone Miner Res 18 : 9-17, 2003.
- 22) Kaufman JM., et al. : Teriparatide effects on vertebral fractures and bone mineral density in men with osteoporosis. Osteoporosis Int 16 : 510-516, 2005.
- 23) 松村秋芳, 他 : 大腿骨の横断面形状にみる運動適応 : ラットを用いた

- 実験的アプローチ. 人類誌 107 : 51-60, 1999.
- 24) LE Lanyon : Control of bone architecture by functional load bearing. *Journal of Bone and Mineral Research* 7 : 369-375, 1992.
- 25) 七五三木聡, 他 : 成長期の運動が引き起こす骨肥大. 体力科学 39 : 181-188, 1990.
- 26) Bassett CA., et al. : Generation of electric potentials dry bone in response to mechanical stress. *Science* 131 : 1063-1064., 1962.
- 27) Bassett CA : Biological significance of piezoelectricity. *Calcif Tissue Res* 1 : 252-272, 1967.
- 28) Wronski TJ., et al. : Effect of spaceflight on periosteal bone formation in rats. *Am J Physiol* 244 : 305-309, 1983.
- 29) Gillespie JA : The nature of the bone changes associated with nerve injuries and disuse. *J. Bone Joint Surg* 36 : 464-473, 1954.
- 30) Geiser M., et al. : Muscle action bone rarefaction and bone formation. *J. Bone Joint Surg* 40 : 282-311, 1958.
- 31) 川島博行 : メカニカルストレスにより誘導される骨芽細胞の分化と骨形成. 新潟歯学会誌 30 : 173-182, 2000.
- 32) Frost HM : Bone mass and the mechanostat a proposal. *Anat Rec* 219 : 1-9, 1987.
- 33) Booth FW., et al. : Effects of training and disuse on connective tissue.



Exercise Sports Sci. Rev 3 : 88-112, 1975.

- 34) 福林徹, 他 : スポーツ鍼灸の実際 最新の理論と実践. 医道の日本社 44-50, 2008.
- 35) 鶴浩幸, 他 : 家兔前脛骨筋の血流に及ぼす鍼刺激の影響. 全日本鍼灸学会雑誌 49 : 6-14, 1999.
- 36) Deveci D, et al. : Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. American Journal of Physiology 281 : 241-252, 2001.
- 37) 池宗佐知子, 他 : 後肢懸垂により引き起こされる筋萎縮の回復過程における鍼通電の効果. 全日本鍼灸学会雑誌 60 : 707-715, 2010.
- 38) 中島美和, 他 : ラット脛骨骨折モデルの骨癒合能の及ぼす鍼通電刺激の効果. 全日本鍼灸学会雑誌 59 : 477-485, 2009.
- 39) Brighton CT., et al. : Treatment of non-union with constant direct current. Clin Orthop 124 : 106-123, 1977.
- 40) 井上四郎 : 偽関節の治療・創外固定. 整外 MOOK 22 : 64-94, 1982.
- 41) Friedenber ZB., et al. : Bone reaction to varying amounts of direct current. Surg Gynecol Obstet 131 : 894-899, 1970.
- 42) Friedenber ZB., et al. : The response of non-traumatized bone to direct current. J. Bone Joint Surg 56 : 1023-1030, 1974.
- 43) 杉山智香, 他 : 生体組織への電気刺激に関する研究: 骨髄への通電.

- 獣麻酔外科誌 25 : 37-41, 1994.
- 44) 元文芳和 : 家兔成長軟骨板およびその周囲に及ぼす直流電気刺激の影響. 日医大誌 58 : 391-398, 1991.
- 45) Brighton CT., et al. : In vivo growth plate stimulation in various capacitively coupled electrical fields. J. Orthop Res 1 : 42-49, 1983.
- 46) 片山直行, 他 : 培養関筋軟骨に対するパルス磁場の影響. 日整会誌 62 : 337, 1988.
- 47) 藤沢毅 : 微小電気刺激が骨再生の初期過程に及ぼす影響. 日本補綴歯科学会雑誌 37 : 1139-1151, 1993.
- 48) 田中久敏, 他 : 圧電性高分子シートによる骨形成の実験的研究 -微小電気刺激の電流値-. 日本補綴歯科学会雑誌 36 : 387-395, 1992.
- 49) 高橋元 : 微小電気刺激による骨再生促進効果の機序に関する研究 -血管構築の動態-. 日本補綴歯科学会雑誌 42 : 497-509, 1998.
- 50) 中尾祥子, 他 : 骨折治癒過程における仮骨形成と微小血管構築の再生について. 日整会誌 66 : 742-752, 1992.
- 51) 松永俊二, 他 : 電気刺激による骨形成の機序について. 臨床整形外科 27 : 1394-1355, 1992.
- 52) 深田栄一 : 骨の成長に及ぼす応力及び電磁場の影響. 日本バイオレオロジー学会誌 7 : 55-61, 1993.
- 53) 深田栄一 : バイオレオロジーの電気現象. 医用工学と生体工学 19 :

- 475-479, 1981.
- 54) 深田栄一：電気刺激と仮骨. 応用物理 48 : 381-386, 1979.
- 55) E Fukada., et al. : On the piezoelectric effect of bone. Journal of the Physical Society of Japan 12 : 1158-1162, 1957.
- 56) 五十嵐高：骨の変形における流動電位の発生機構. 高分子論文集 48 : 751-758, 1991.
- 57) 西原克成：アパタイト人工歯根の周囲組織における応力分布の有限要素解析. 生体材料 10 : 182-192, 1992.
- 58) 西原克成：骨の生体力学特性と生体電流および遺伝子発現. BME 9 : 2-11, 1995.
- 59) 西原克成：骨格系器官の進化と代替生体材料の医学応用-系統発生学に学ぶ形態学的機能適応システム-. 生体材料 11 : 31-40, 1993.
- 60) 西原克成, 他：実験進化学手法による力学対応進化学の検証. 日本口腔診断学会雑誌 9 : 232-249, 1996.
- 61) Friedenber ZB., et al. : Bioelectric potentials in bone. J Bone Joint Surg 48 : 915-923, 1996.
- 62) Report of a WHO study group : Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series 843 : 50-56,1994.
- 63) Saito. M., et al. : Role of collagen enzymatic and glycation induced

cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporosis International* 17 : 1514-1523, 2006.

- 64) 中井真悟, 他 : ラット大腿骨における基質と骨膜の構造の部位差に関する研究. *東洋大学大学院紀要* 51 : 203-217, 2014.
- 65) 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. *口腔病学会雑誌* 60 : 47-96, 1995.
- 66) Huysseune A : Late skeletal development at the articulation between upper pharyngeal jaws and neurocranial base in fish, *Astatotilapia elegans*, with the participation of Chondroid form of bone. *Am J Anat* 177 : 119-137, 1986.
- 67) Huysseune A., et al. : Chondroid bone on the upper pharyngeal jaws and neurocranial base in the adult fish *Astatotilapia elegans*. *Am J Anat* 177 : 527-535, 1986.
- 68) 秋元あずさ, 他 : 骨, 軟骨と軟骨様骨の形態的相違 光学顕微鏡的および電子顕微鏡的研究. *昭和歯学会雑誌* 10 : 450-456, 1990.
- 69) 井上知, 他 : ラット脛骨皮質骨における構造と強度の部位差に関する研究. *東洋大学大学院紀要* 49 : 305-320, 2012.
- 70) Inoue S., et al. : Study on changes of structure and strength of tibial cortical bone in growing rats. *Bulletin of Graduate School, Toyo Univ.* 50:253-276, 2014.
- 71) 井上知, 他 : 発育期ラット脛骨における骨の機械的特性および構造の

- 部位差. 日本柔道整復整骨医学会雑誌 23 : 105-111, 2015.
- 72) 江川薫 : 増齡に伴う骨基質形成の変化について. 歯科基礎医学会雑誌 23 : 147-153, 1981.
- 73) Bradney M., et al. : Moderate exercise during growth in prepubertal boys: changes in bone mass, size, volumetric density, and bone strength: a controlled prospective study. J Bone Miner Res 13 : 1814-1821, 1998.
- 74) 小澤英浩 : 骨の石灰化の微細形態学的アプローチ. 細胞工学 13 : 1062-1071, 1994.
- 75) 立石哲也, 他 : ち密骨の粘弾性と強度. 日本機械学会論文集 46:97-106, 1980.
- 76) P Zioupos., et al. : Changes in the Stiffness, Strength, and Toughness of Human Cortical Bone With Age. Bone 22 : 57-66, 1998.
- 77) Turner CH, et al. : Basic biomechanical measurements of bone : a tutorial. Bone 14 : 595-608, 1993.
- 78) 岩久文彦, 他 : 第一報鋳型標本からみた長骨骨幹骨膜の立体血管網工の形態. 新潟歯学会誌 15 : 11-18, 1985.
- 79) 鳥巢岳彦, 他 : 標準整形外科学 第 9 版. 医学書院 29-34, 140-153, 2005.
- 80) 玉井和哉, 他 : 上腕骨近位端骨折の分類と治療 -JSS データベースの検討- 第 1 部. 肩関節 32 : 581-585, 2008.

- 81) 中島友紀 : RANKL の多彩な作用. 実験医学 32 : 1017-1026, 2014.
- 82) EA Zimmermann., et al. : Age-related changes in the plasticity and toughness of human cortical bone at multiple length scales. Proceedings of the National Academy of Sciences. 108 : 14416-14421, 2011.
- 83) 岸本英彰 : 骨・関節疾患と骨質-Mechanostat theory(Frost)から. 関節外科学会雑誌 14 : 373-379, 2005.
- 84) Kawasaki H, et al. : On the Fracture of Upper End of the Humerus -Preliminary Report-. Orthopedics & Traumatology 27 : 591-594, 1978.
- 85) 加納康行, 他 : 小児にみられた下顎頭縦骨折の一例. 小児口腔外科 3 : 113-116, 1993.
- 86) 渡邊晶規, 他 : 関節拘縮における関節構成体の病理組織学的変化-ラット膝関節長期固定モデルを用いた検討. 理学療法科学 22 : 67-75, 2007.
- 87) 杉原敦, 他 : 長期の尾部懸垂による減負荷およびその後の再荷重が膝の腱および靭帯に与える影響. 膝 30 : 1-5, 2005.
- 88) 鈴木健太, 他 : ラット関節軟骨および関節包の構造に及ぼす後肢不動化と尾部懸垂の影響の比較. 東洋大学ライフデザイン学研究 10 : 237-249, 2014.
- 89) 中井真悟, 他 : ラット大腿骨における不動中の鍼通電刺激の影響. 東洋大学大学院紀要 52 : 255-271, 2015.

- 90) A.G. Schwartz., et al. : Muscle loading is necessary for the formation of a functional tendon enthesis. *Bone* 55 : 44-51, 2013.
- 91) Kondo H., et al. : Unloading Induces Osteoblastic Cell Suppression and Osteoclastic Cell Activation to Lead to Bone Loss via Sympathetic Nervous System. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 280 : 30192-30200, 2005.
- 92) 北村昌三 : 幼若骨の骨細胞と骨小腔壁の立体超微形態学的研究. 昭和歯学会雑誌 7 : 87-103, 1987.
- 93) 飯村忠浩 : 骨細胞の形態と機能ダイナミズムの可視化・定量化. 実験医学 32 : 1067-1073, 2014.
- 94) 渡辺緯津子 : ヒト下顎歯槽骨における休止線ならびに接合線の構造上の特徴に関する観察. 口腔病学会雑誌 52 : 397-437, 1985.
- 95) Turner CH., et al. : Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14 : 595-608,1993.
- 96) 安達泰治, 他 : 骨細胞ネットワークの形態モデリングと骨梁再構築シミュレーション. 第 55 回理論応用力学講演会 講演論文集, 2006.
- 97) Deborah McK., et al. : The Role of Electrical Stimulation in Bone Repair. *Foot and Ankle Clinics* 10 : 579-593, 2008.
- 98) 大野康亮 : テトラサイクリンによる形成期硬組織のラベリング像に及ぼす諸条件について. 歯科基礎医学会雑誌 20 252-269,1978.
- 99) 林泰史 : 高齢者の転倒防止. 日本老年医学会雑誌 44 : 591-594,2007.

- 100) Hoyan Lam., et al. : The Effects of Frequency-Dependent Dynamic Muscle Stimulation on Inhibition of Trabecular Bone Loss in a Disuse Model. *Bone* 43 : 1093-1100, 2008.
- 101) 杉原敦, 他 : 長期の尾部懸垂による減負荷およびその後の再荷重が膝の腱および靭帯に与える影響. *膝* 30 : 1-5, 2005.
- 102) 津山建, 他 : 骨膜の骨形成能に関する研究. *日本口腔外科学会雑誌* 38 : 1785-1790, 1992.



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました主指導教員の大迫正文先生、副指導教員の杉田記代子先生、齊藤恭平先生に深く感謝いたします。そして、博士前期課程より論文をはじめ多くのご指摘、ご指導を頂きました山下靖雄先生、鈴木哲郎先生に深く御礼を申し上げます。さらに、寺島達夫先生には博士後期課程において、研究に対する真摯な態度や基礎的知識についてご指導いただきました。さらに、専門学校 학생時代からご指導いただいていた本澤光則先生、宇南山伸先生、星野虎之助先生には、柔道整復師・鍼灸師・あん摩マッサージ指圧師としての態度をご教授いただきました。そして、大学院生活の苦楽を共に過ごした研究室の皆様には感謝しております。このように多くの方に支えられて博士論文を執筆させていただきましたことを心より、感謝申し上げます。

最後に、大学院進学を快諾してくれた亡き父、大学院の研究生活を応援してくれた祖母、母、妹に心より感謝申し上げます。