

ラットにおける跳躍トレーニングと中止後の脛骨 骨端板の構造変化に関する研究

Study in structural changes on tibial growth plate during jumping training and
in recovery period following the exercise in rats

高橋 歩 未* 熊田 真由子* 大迫 正文*
TAKAHASHI Honomi, KUMADA Mayuko, OHSAKO Masafumi

要旨

本研究は、発育期のラットを用い高強度または低強度の跳躍運動と、その後の回復過程における脛骨近位骨端板の構造変化を比較、検討すること目的とした。

7週齢のウィスター系雄性ラット42匹を用いた。それらを運動群EXと対照群COに分類し、さらに運動群は高強度運動群EXHおよび低強度運動群EXLとした。また、それらの運動群の回復期間後のものを、それぞれEXHRおよびEXLRとした。実験開始後2および4週間後の対照群を、それぞれCO9およびCO11とした。EXHおよびEXHRは最大跳躍高の80%の高さで、また、EXLおよびEXLRはその50%の高さで、100回/日、5日/週、2週間実施した。それぞれの実験期間終了後、各群から脛骨を摘出し組織学的に観察した。

骨端版を弱拡大で見ると、EXLはCOよりかなり薄いEXHはCO9とほぼ同様であった。EXLRはEXLと同様にCOよりかなり薄かった。また、EXHRもCO11の厚さとほとんど変わらなかった。しかし、骨端版を拡大して未石灰化層と石灰化層に分けて観察すると、EXLの未石灰化層はかなり薄くなり、それに対して石灰化層が厚かった。EXLの未石灰化層と石灰化層を合わせると、骨端版全体の厚さはCOおよびEXHとほとんど変わらなかった。これに関連して、EXLではタイドマークが上昇した。細胞柱間の基質はEXLがもっとも広く、COがもっとも狭かった。これはEXLR、EXHRについても同様の結果が認められた。

低強度の跳躍運動は、高強度運動に比べ骨端板の石灰化を促進し、骨端板の中でも未石灰化層の厚さを減少し、逆に石灰化層の厚さを増加させることが理解された。

キーワード：骨端板 跳躍トレーニング 組織構造

*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

はじめに

骨端板は長骨の長軸方向の成長に関わることが知られているが、骨幹と骨幹端の間に位置して、骨端側からの加重を骨幹端に伝える役割も担っている。我々は、ラットに跳躍運動を課し、脛骨への加重増加によって、骨端板の軟骨細胞や基質に変化が生じることをすでに認めている¹⁾。しかし、一過性の運動後に運動を中止すると、骨端板の軟骨各細胞層や基質にどのような変化がみられるかについては報告がない。本研究はラットの脛骨を用い、短期間の運動ならびに運動中止後の骨端板の構造変化について検討することを目的とした。

実験方法

実験動物および実験群の分類

7週齢のウィスター系雄性ラット42匹を用い、それらを運動群EXと対照群COに分類した。また、運動群は高強度運動群EXHおよび低強度運動群EXLに分類し、さらに、各運動群で運動期間後に回復期間を設けたものを、それぞれEXHRおよびEXLRとした。対照群については、実験開始後2および4週間飼育したものを、それぞれCO9およびCO11とした。

運動負荷実験

EXH、EXHRおよびEXL、EXLRからなるEXは、すべて以下のような条件による2週間の跳躍運動を行った。跳躍運動は予備飼育期間に各ラットの最大跳躍高を求め、EXHおよびEXHRはその80%の高さで、また、EXLおよびEXLRは50%の高さで、100回/日、5日/週、2週間実施した。EXHRおよびEXLRはその2週間の運動期間の後、2週間ケージ内で正常飼育し、これを運動期間後の回復期間とした。

標本の摘出および固定

実験期間終了後に、各群のラットを炭酸ガス吸引により安楽死させた。死亡を確認後、各群から後肢の皮を剥離して脛骨を摘出し、歯科用ハンドモーターによって、脛骨の内外的中央部で矢状方向に切断した。さらに、脛骨近位1/4部を切断して、そこより近位部を組織学的観察用標本とした。これらの標本は摘出後速やかに4%パラフォルムアルデヒド液(PFA)、または4%パラフォルムアルデヒドおよび5%グルタルアルデヒドを含むカルノブスキー液(KAR)に浸漬し、固定処置を行った。いずれの固定液も0.1Mカコジル酸ナトリウム(pH7.4)バッファーで希釈した。

組織学的観察

PFAで固定した標本を8%EDTA液に浸漬して脱灰した。EDTA液にて脱灰した標本は、水洗した後、真空に保ったデシゲーターの中で70、90および100%エタノールに20分間ずつ浸漬し、脱水した。さらに、安息香酸メチルⅠ～Ⅲ(デシゲーターの中で2時間)、ベンゼンⅠ、Ⅱ(各30分)およびベンゼンパラフィン(60分)、パラフィンⅠ～Ⅲ(各15時間)に浸漬して透徹およびパラフィンの浸透

を行った。その後、それらをパラフィンに包埋し、そのブロックを木製台に取り付け、ミクロトームにて厚さ $4\mu\text{m}$ の連続切片を作製した。それらの切片にtype X collagen免疫染色を施し、光学顕微鏡（オリンパス社製、BX53-33-FL-2）により観察した。

また、非脱灰標本は、通法に従い脱水した後、アセトン I、II に30分ずつ浸漬し、透徹を行った。さらに、アセトンとリゴラック樹脂の混合液（1：1、1：3、1：7）およびリゴラック樹脂原液 I、II に浸漬（24時間）し、樹脂に包埋して加温重合した（37、45、55、60℃：各1日）。重合が完成したブロックを歯科用エンジンにてトリミングし、砥石および3段階のフィルムにて研磨して、最終的に厚さ約 $100\mu\text{m}$ の非脱灰研磨標本を作製した。それに0.1N塩酸によるエッチング処理を行い、トルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡により観察した。

結果

各群の非脱灰研磨標本にトルイジンブルー染色を施して観察すると、骨幹端には明るい紫色に染まる骨端板が存在した。まず、運動期間後における各群の骨端板の厚さを比較すると、EXはCO 9 より薄く、EXLとEXHの間ではEXLの方がかなり薄かった。また、回復期間後の骨端板の厚さはCO11が最も厚く、EXHR、EXLRの順で薄くなっていた。（図1）このような状態を形態計測学的に表すと、EXHの骨端板の厚さはCO 9 より有意に（ $P<0.01$ ）薄く、EXLはさらにEXHより有意に（ $P<0.01$ ）に薄かった。さらに、回復期間後の切片を用いて定量的に比較すると、ここにおいてもCO11が最も厚く、EXHRはそれより有意に（ $P<0.01$ ）薄く、EXLRではEXHRよりもさらに有意な（ $P<0.01$ ）

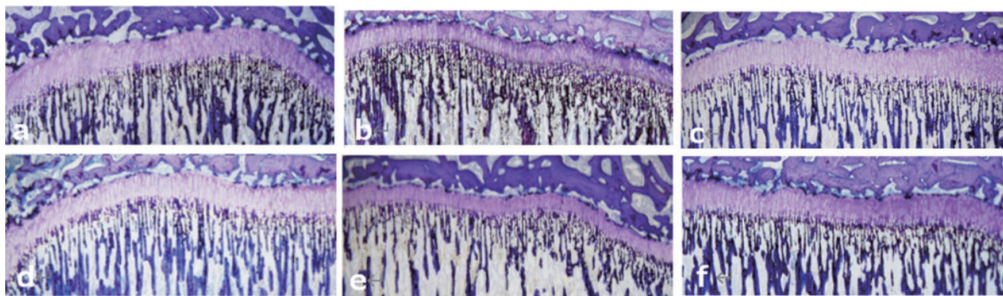


図1 各群の骨端板全体の厚さの比較
a：CO 9、b：EXL、c：EXH、d：CO11、e：EXLR、f：EXHR

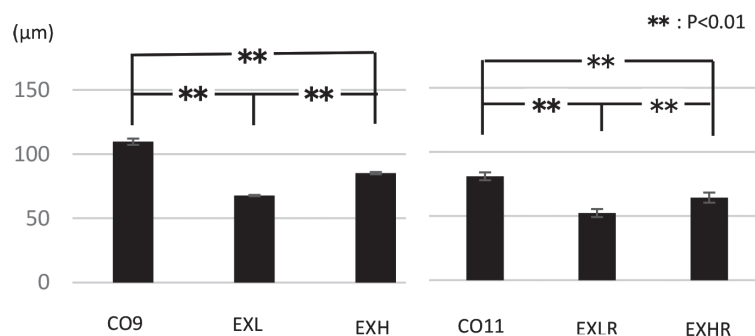


図2 各群の骨端板全体の厚さ

低下を示した。(図2)

各群の骨端板を拡大して観察すると、いずれの群も骨端板全体の厚さに大きな違いが認められなかった。しかし、骨端板各細胞層の厚さに関しては、次のような群間の違いが認められた。休止層についてはCOが最も厚く、EXはそれよりも薄いEXLとEXHとの間では大きな差は認められなかった。一方、肥大細胞層の厚さに関してはCOがやや厚くEXでは薄かった。また、EXLとEXH、EXLRとEXHRの間を比較すると、この両者には違いがほとんど認められなかった。また、予備石灰化帯の厚さに群間の差が見られ、9および11週齢のいずれにおいてもCOが最も薄く、EXH、EXLの順で厚さが増した。

骨端板の軟骨細胞の大きさおよび密度を群間で比較すると、COでは軟骨細胞柱間の間隙が狭く、軟骨細胞柱が密に存在し、さらに軟骨細胞柱内の軟骨細胞もかなり密に存在した。それに対して、EXでは軟骨細胞柱間の間隙がCOよりも広くなり、この状態は運動期間後よりも回復期間後の方が顕著に認められた。(図3、4)

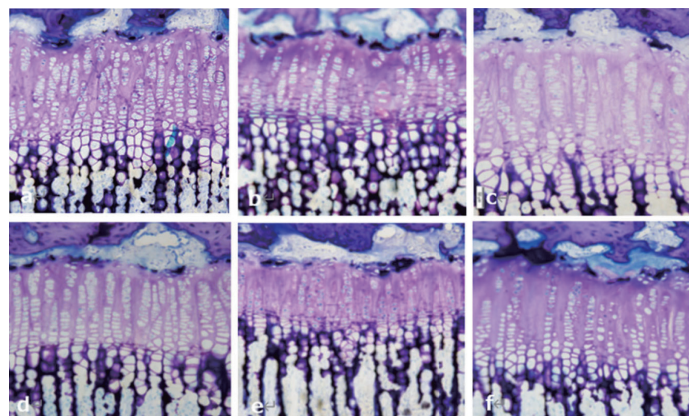


図3 骨端板の細胞密度および予備石灰化帯の変化(樹脂包埋研磨標本、トルイジンブルー染色)
a: CO9、b: EXL、c: EXH、d: CO11、e: EXLR、f: EXHR

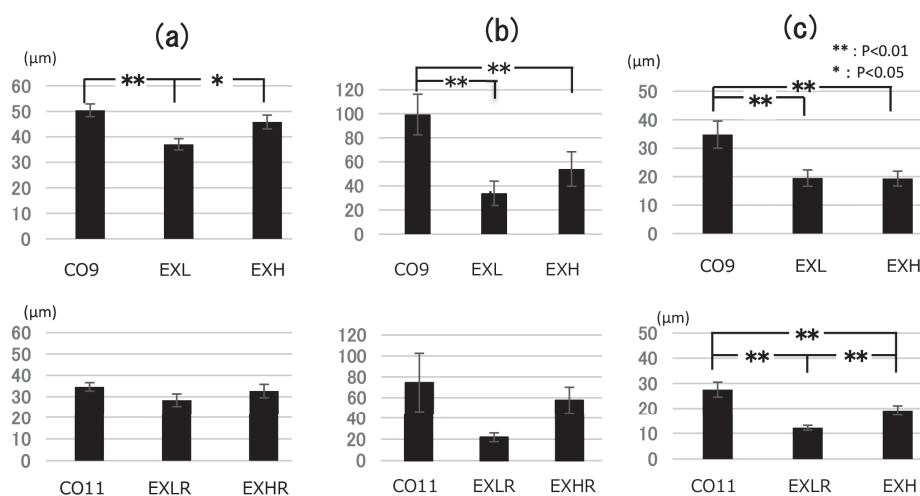


図4 各層の厚さの比較(左 (a): 増殖細胞層、中央 (b): 前肥大細胞層、右 (c): 肥大細胞層)

各群の骨端板の厚さを比較すると、運動群の増殖細胞層、前肥大細胞層および肥大細胞層はCOより薄くなり、この状態は肥大細胞層に関しては運動期後のみならず回復後においても認められた。(図4) 各細胞層に存在する細胞数を群間で比較すると、前肥大細胞層においてのみ運動群がCOより有意に ($P<0.01$) 減少した。このことについてはEXLとEXHとの間で違いはほとんどなく、いずれもほぼ同様な減少が認められた。(図5)

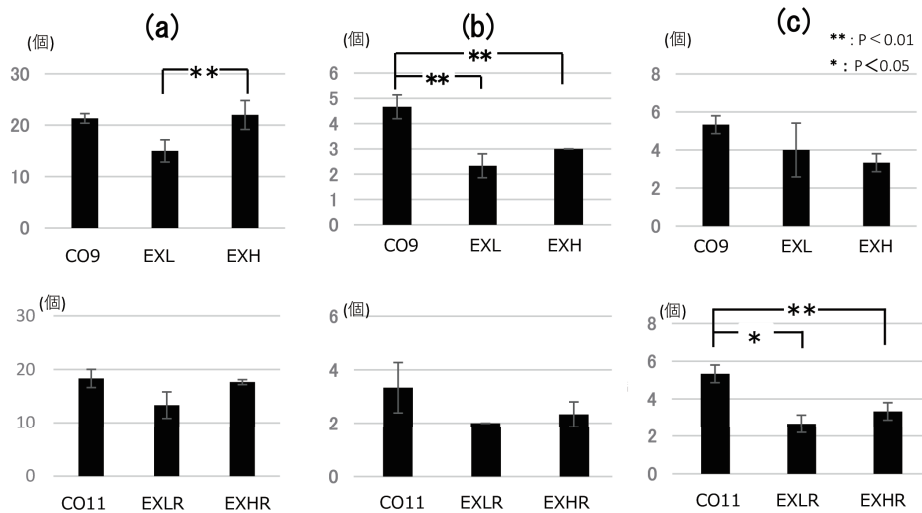


図5 各細胞層の細胞数の比較 (左 a: 増殖細胞層、中央 b: 前肥大細胞層、右 c: 肥大細胞層)

脱灰パラフィン切片にType X collagenの免疫染色を施して観察すると、9週においてCOよりも運動群の方がその免疫反応が顕著に認められた。(図6)

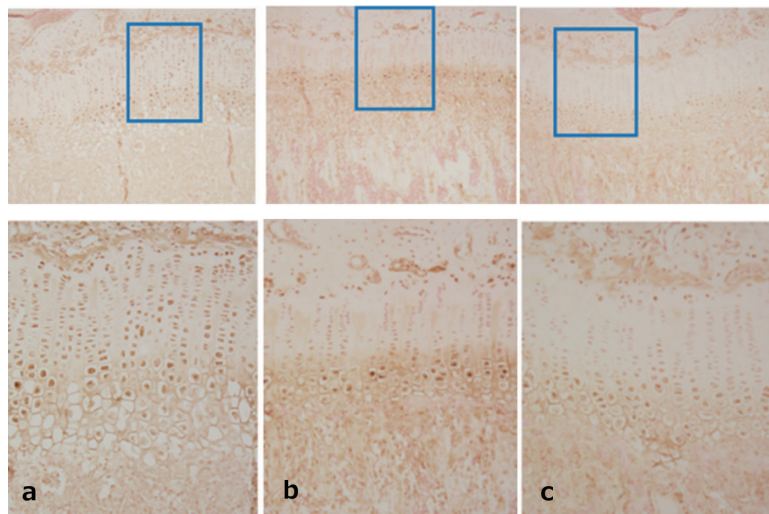


図6 Type X collagenの局在 (脱灰パラフィン切片、免疫染色)
下段の図は、上段の青四角部分の拡大像 a: CO9、b: EXL、c: EXH

考察

本研究は、ラットを用いて異なる強度の跳躍運動と、その後の回復期間における脛骨近位骨端板の構造変化を形態学的に観察した。以下、それによって得られた所見をもとに考察を進める。

関節軟骨では不動化や後肢懸垂によって石灰化層の厚さが増し、これは関節軟骨の未石灰化層と石灰化層の界面であるタイドマークの上昇として知られている²⁾。一方、運動した群では関節軟骨のなかでも石灰化層の厚さが減少する³⁾。軟骨の石灰化は硫酸基を持つ糖タンパク質（コンドロイチン硫酸）によって抑制される。不動化によって関節軟骨中間層および深層のコンドロイチン硫酸の減少がタイドマークの上昇を引き起こす²⁾。本研究で観察したものは骨端版であるが、予備石灰化帯の上昇は先行研究におけるタイドマークの上昇に類似するものであり、運動によって前肥大細胞層におけるコンドロイチン硫酸の減少が生じていると思われる。しかし、骨端版の場合予備石灰化帯で形成された石灰化軟骨梁が、その後の海綿骨における骨梁の芯となる。運動に伴う予備石灰化帯の厚さの増加は、石灰化軟骨梁の形成促進に関わるであろうことが推測される。このように、骨端版や関節軟骨の最深層では、運動によっていずれも石灰化が促進されるが、それぞれの機能的な役割は異なるように思われる。

骨端にもたらされた外力は、その部位のみで受け止めることなく骨端海綿骨の骨梁の配列に従って、周囲の皮質骨に分散、伝達される^{4, 5)}。前述のとおり骨端板直下の石灰化軟骨梁が一次および二次海綿骨の骨梁の芯をなし、そのため石灰化軟骨梁は骨端にもたらされた外力を、骨端板を介して海綿骨や周囲の皮質骨に伝える上で重要な役割をなす。本研究では運動期間後と、回復期間後のいずれの時期においても、COに比べて運動群は軟骨細胞柱間の間隙、すなわち骨端板の縦隔が広がった。縦隔は骨端板の下部で予備石灰化を受け、これがまさに石灰化軟骨梁になるものである。運動群では縦隔が広いことにより、骨端板下縁ではより太い石灰化軟骨梁が形成され、運動に伴う加重がこの太い石灰化軟骨梁および一次・二次海綿骨の骨梁に伝達される。このように運動群の骨端板における縦隔の広さの増大は、機械的刺激に対する応答として、外力に対する抵抗性の増大を意味するものと思われる。また、縦隔の軟骨基質は骨端板の増殖細胞層や前肥大細胞層における軟骨細胞が分泌したものであり、このことから運動に伴う機械的刺激の増加は骨端板の軟骨細胞の基質合成を促進していると考えられる。骨端板は一般に、長骨の長軸方向への成長に関わるものとして知られている。しかし、本研究の結果は骨端板が骨端からの加重増加に適応して、順次、力学的強度を高める構造変化を示唆していると考えられる。

骨の成長をもたらす骨端板では、分裂増殖能の高い細胞が密に存在する増殖細胞層が大きな意味を持つ。しかし、骨端板にはそのほかに前肥大細胞層および肥大細胞層も存在する。肥大細胞層は光学顕微鏡的に明調で、電子顕微鏡的には細胞小器官が乏しい。それに対して、前肥大細胞層の細胞は光学顕微鏡的に増殖細胞層ほどではないが、やや暗調で、電子顕微鏡的には多くの細胞小器官を持つとされている⁶⁾。そのことが関係して前肥大細胞層の細胞は基質を分泌すると同時に、骨端板内やその外に存在する細胞の機能を調節するための各種サイトカインも分泌することが示されている⁷⁾。運動強度の違いに関わらず、運動群の前肥大細胞層を含むすべての細胞層の厚さはCOと比較して薄かった。このことは、骨端板各細胞層の細胞間基質が減少したことを意味する。また、運動によって軟骨

細胞柱間の基質が減少したのは増殖細胞層、前肥大細胞層および肥大細胞層における軟骨細胞の基質合成能の低下によるものと思われる。本来、骨端板は長骨の長軸方向への成長をもたらす、それは発育に伴って厚さが減少することが知られている⁸⁾。

Type X collagenは石灰化に関与していることが知られている。関節軟骨における先行研究では、9週齢を超えるとType Xの反応がみられなくなり⁹⁾、一方、2、4、6または8週間のトレッドミル走後ではType X collagenの発現の増加が認められることが示されている¹⁰⁾。これらは関節軟骨についての報告であるが、運動負荷によって未石灰化層の石灰化が促進されていることを示唆していると思われる。本研究は骨端板であるが、運動群、特にEXLでType X collagenの反応が認められている。したがって、運動負荷は弱週齢の発育状態を一定期間維持する効果をもたらすのではないかと考えられる。しかし、運動強度によって生じた骨端板の未石灰化層の変化に、どのような関係があるのかは分からず、この点は今後の検討課題とする。

結論

低強度の跳躍運動は、高強度運動に比べ骨端板の石灰化を促進し、骨端板の中でも未石灰化層の厚さを減少し、逆に石灰化層の厚さを増加させることが理解された。

本研究の要旨は、第124回日本解剖学会学術大会（於・新潟）において発表した。

倫理審査

本研究は東洋大学動物実験委員会の審査により承認された。

謝辞

稿を終わるに臨み、多くのご協力をいただいた研究室の方々ならびに同窓生である荒木美智子氏に深謝致します。

参考文献

- 1) 荒木美智子, 吉良裕一郎, 大迫正文: 異なる強度の跳躍運動が発育期ラット脛骨の骨端板および一次海綿骨に及ぼす影響, 東洋大学大学院紀要 54: 239-265, 2017.
- 2) 荻原優ら: ラット後肢不動化に伴う脛骨関節軟骨の構造変化に関する観察 第65回日本体力医学会大会予稿集, P300, 2010.
- 3) 小澤淳也ら: 走行運動及び足関節筋力低下状態での走行運動が膝関節軟骨に及ぼす影響, 第48回日本理学療法学会学術大会 (名古屋)
- 4) 守田剛, 尾淵紀之, 大迫正文: 発育に伴うラット脛骨の形態変化ならびにリモデリングに関する研究, ライフデザイン学研究 6: 197-209, 2010.
- 5) 藤原浩隆: 骨構造に及ぼす加重増加の影響に関する観察, 東洋大学大学院修士論文 2007.
- 6) 秋元あずさら: 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.
- 7) 大野茂: 成長軟骨における軟骨細胞の立体超微形態学的研究, 昭和歯学会雑誌 9: 152-164, 1989.

- 8) 秋山和歌子, 飛田哲也, 大迫正文: 発育に伴うラット脛骨骨端板の構造変化に関する研究, ライフデザイン学研究 7: 39-50, 2011.
- 9) 日下翔太, 神尾強司, 大迫正文: 発育に伴うラット脛骨関節軟骨の構造変化に関する研究, 東洋大学大学院紀要 52: 227-240, 2015.
- 10) 橋本和彦, 赤木將男, 2012, 「強制走行負荷による非侵襲性マウス変形性膝関節症モデルの作成」, 『近畿大医誌』, 第37巻・1, 2号, 11-19.

Study in structural changes on tibial growth plate during jumping training and in recovery period following the exercise in rats

TAKAHASHI Honomi, KUMADA Mayuko, OHSAKO Masafumi

Abstract

In this study, it was aimed to compare and investigate the structural changes of the proximal growth plate of tibia during a low and high intensity jump training and after the subsequent recovery period, in growing rats. Forty-two male rats (7-week-old) were used as materials, and they were divided into six groups : EXL, EXH, EXLR, EXHR and CO9, CO11. Four groups, except CO9 and CO11, performed a jumping training for two weeks. EXLR and EXHR didn't the exercise in a two-week of recovery period after training. Tibiae were excised from each group and were analyzed histologically. As a result, it was understood that the low-intensity jump training, compared to the high-intensity jump training, promoted a calcification of the growth plate, and decreased in the thickness of the calcified layer of the growth plate, and conversely increased in the thickness of the calcifying layer.

Keywords : Growth plate, Jump training, Histological structures