

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 ——Study on site differences in structures of femoral bone matrix and periosteum in rats.——

福祉社会デザイン研究科ヒューマンデザイン専攻博士前期課程1年

中井 真悟

福祉社会デザイン研究科ヒューマンデザイン専攻博士前期課程1年

高橋 将人

ライフデザイン学部健康スポーツ学科教授

大迫 正文

要 旨

本研究は、ラット大腿骨を用いて、骨幹中央部と遠位部の構造を組織学的に観察し、その所見に強度試験の結果を関連づけて検討することを目的とした。材料として13週齢の雄性ラットを用い、大腿骨を摘出して組織学的、形態計測学的に観察するとともに、破断試験により骨強度を測定した。

ラット大腿骨の中央および遠位部の皮質骨では、基質線維が疎で不規則な配列を示す分化度の低い骨が広く占めていた。その骨は時間経過に伴って高度に石灰化するために、中央部のStiffnessが高かった。また、その骨内膜面側の全周に環状層板様の骨が添加されていたが、中央部ではさらに骨膜面側でも環状層板様の構造が存在した。これらの構造が中央部における高いStrengthに関わっていたと思われる。骨膜は中央部では大腿骨の外表面が厚く、遠位部では内面が厚かった。Deformationは内方から破断した時が中央部も遠位部も高い値を示し、中央部ではかなり高いStrengthが得られた。骨膜の厚い部位では、骨膜の線維が骨内に埋入され、破断に際して骨膜がその防御に役立っていたと思われる。

以上のことから、ラット大腿骨の中央部では、分化度の低い骨における高度な石灰化と層板構造の形成によって遠位部より高い強度がもたらされるが、骨膜の存在する部位ではしなやかさを高めることによって強度が高められることが示唆された。

キーワード：骨形態計測、骨強度、組織構造

はじめに

発育期の長骨では、同一の骨の中でも骨幹端付近のように形成されてから間もない骨が存在する部位と、骨幹中央部のようにある程度時間が経過したものが混在する¹⁾。

均質無構造な試料を用いた場合、Strength（強度）は試料の断面積に比例し、Deformation（靱性：しなやかさ）は径（試料の大きさ）に比例する。また、Stiffness（剛性：硬さ）には物性が関わりとされている。ラット脛骨は近位骨幹端から骨幹中央部に向かってしなやかさが急激に細くなるが、骨の時刻描記法で骨幹部のリモデリングの過程についてみると、脛骨の骨幹部はあたかも前外方に移動するような状態で骨添加と骨吸収が行われることが示されている²⁾。また、骨のような生体試料ではその理論が当てはまらない場合も多くみられる。井上¹⁾は、発育期の脛骨の近位部と遠位部の構造と機能を比較し、骨幹近位部は多孔性で、疎な基質線維が不規則に配列するが、中央部では基質線維が密で層板構造を示し、このような構造が骨の力学的強度に深く関わりと報告している。一方、大腿骨は骨幹中央部から遠位1/3部（以下、中央部、遠位部とする）の間はほぼ円筒形であり、そのような部位におけるリモデリングの過程や、その結果造られた骨の構造および強度に部位差があるか否かについて詳細な報告がない。

一方、骨には多くの筋が付着し、腱線維はシャープな線維となって骨内に埋入されている。また、骨膜の線維も骨内に埋入されており、骨強度には骨質のみならず骨膜も関わりとあることが予想されるが、このような視点から発育期における骨の強度と、骨基質および骨膜の構造との関連性について検討した報告はほとんどない。

本研究では、ラット大腿骨を用いて、中央部と遠位部の構造を組織学的に観察し、その所見に強度試験の結果を関連づけて検討することを目的とした。

実験方法

実験動物

13週齢のwistar系雄性ラット42匹（ 382.5 ± 24.1 g）を用いた。

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、左脚を用いてノギスにて大転子尖から外側顆までの長さを計測することにより大腿骨長を求め、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

における中央部および遠位部とした。摘出した大腿骨はそのまま以下に述べる骨形態計測および破断試験に用いた。また、組織学的観察用の標本の作製については、ハンドモーターにて両部位とその上下2mmの位置を水平割断し、それぞれの部位における横断標本とした。その後、それらを速やかに固定液（4%パラホルムアルデヒド液またはカルノブスキー液）に浸漬した。

骨形態計測

後述する方法にて、大腿骨の中央および遠位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、モニターに投影し、画像解析ソフト（WinROOF V7.4）を用いて、中央および遠位部位における大腿骨断面の前後径および内外径を求めるとともに、皮質骨全体の断面積や大腿骨の内、外、前および後面における皮質骨の厚さを計測した。内外径は前額面に平行な線のうち最長のものとした。その内外径を求めた線上の midpoint で垂線を引き、それと交わる前方と後方の皮質骨の縁の間の距離を前後径とした。内外径および前後径を求めた線上の皮質骨の厚さを計測し、それぞれ内、外、前および後面における皮質骨厚を計測し、内面と外面のその和を内外方向の皮質骨厚とした。前・後方向における皮質骨厚も同様な方法で求めた。（図1）

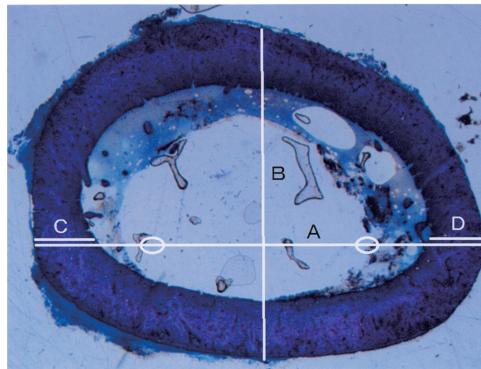


図1 骨形態計測
写真の上部が前方、下部が後方を示す。
A：内外径 最大長
B：前後径 内外径の midpoint に垂直に交わる線
C+D：皮質骨厚

破断試験法の条件設定

大腿骨の中央および遠位部にそれぞれマーキングし、破断試験器（TK-252C:室町機械）のクロスヘッドがそれらの部位に正確に当たるように大腿骨を機械にセットして、3点支持骨破断試験を行った。また、大腿骨の前方または内方から力を加えるために、前者のテストでは大腿骨の前面を上方に向け、また、後者のテストでは大腿骨の内面を上方に向けてセッ

トした。井上ら¹⁾の方法に従い支点間距離を10mm、クロスヘッド速度を10mm/minに設定し、骨が破断するまで荷重を加えた。いずれの部位の標本においてもこのような実験条件により測定を行い、骨にかかる荷重変化を記録し、骨の荷重変位曲線を求めた。本実験実施前に、骨破断試験機での測定の再現性を高めるために、予備実験においてこれらの一連の操作を繰り返し行った。(図2)

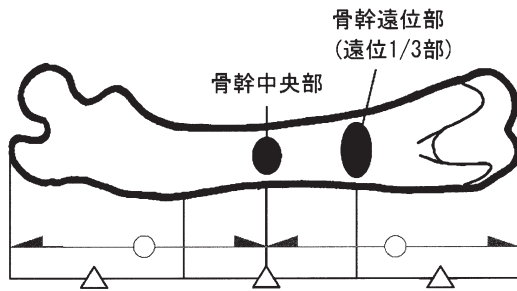


図 2-1 力学的実験条件

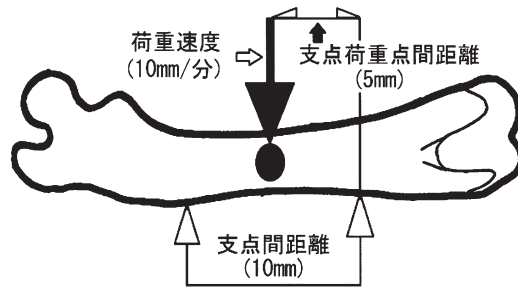


図 2-2 破断部位

大腿骨の機械的特性

井上ら¹⁾の報告に従い、骨にかかる荷重と骨の変位量との関係を示す直線の傾き θ° (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とした。

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、先に述べた通り、摘出後速やかに0.1Mカコジル酸ナトリウム (pH7.4) にて緩衝された4%パラホルムアルデヒドまたはカルノブスキー液に浸漬して固定した。前者の液で固定したものは、その後8%EDTA水溶液 (pH7.4) またはモース液 (pH7.4) にて脱灰した (約2週間)。それらを水洗後、アルコール系列 (70、90、100%) にて真空状態で脱水し、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。そのブロックをミクロトームにより、厚さ約4 μ mの連続切片を作製し、ポリクローム染色を施した。

また、後者の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包埋した。それを徐々に加温重合 (37、45、55および60 $^\circ$ C:各1日) した。砥石および3段階の研磨用フィルムにて厚さ約150 μ mの矢状および水平断標本を作製した。それらを1Nの塩酸に浸漬して、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。もう一方のカルノブスキー液で固定された標本を用いて、大腿

骨各部位における矢状および水平断標本を作製し、骨膜を剥離しないように丁寧に砥石および研磨用フィルムにて研磨した。それらを上記と同様な方法にてエッチング、水洗し、脱水した後、t-ブチル液に浸漬して真空凍結乾燥を施した。さらに、研磨面にカーボンとプラチナを真空蒸着して走査電子顕微鏡（以下SEMとする）により観察した。

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の平均値と標準偏差を求め、部位間の平均値にSPSSソフトを用いて対応のないMann-Whitney U testにより部位間の平均値の有意差検定を行った。危険率は5%水準以下を有意とした。

所 見

1) 骨形態計測

本実験で観察した中央および遠位部の前後径は、それぞれ 2.28 ± 0.18 および 2.39 ± 0.20 mmであり、中央部は遠位部の0.94倍で、両部位の内外径もそれぞれ 3.49 ± 0.31 および 3.55 ± 0.32 mmであり、中央部は遠位部の0.98倍ではほぼ同様であった。中央および遠位部の前後方向の皮質厚はそれぞれ 0.85 ± 0.08 および 0.77 ± 0.04 mmで、中央部は遠位部の1.11倍であり、部位差は認められなかった。各部位における内外方向の皮質骨厚はそれぞれ 1.25 ± 0.31 および 0.83 ± 0.11 mmであった。各部位における皮質骨の断面積はそれぞれ 3.39 ± 0.59 および 3.20 ± 0.28 mm²であり、これらの計測値には部位間の値に有意差が認められなかった。（表1）

表 1 皮質骨の骨形態計測データ

	中央部	遠位1/3部
前後径(mm)	2.28 ± 0.18	2.39 ± 0.20
内外径(mm)	3.49 ± 0.31	3.55 ± 0.32
皮質骨前後厚(mm)	0.85 ± 0.08	0.77 ± 0.04
皮質骨内外厚(mm)	1.25 ± 0.31	0.83 ± 0.11
皮質骨断面積(mm ²)	3.39 ± 0.59	3.20 ± 0.28

2) 骨破断試験

中央部（M）と遠位部（D）で、前後方向（AP）および内外方向（ML）より破断する試験を行った。中央部における前後方向（M-AP）および内外方向（M-ML）のStiffnessの平均値は、それぞれ 235.9 ± 31.3 および 56.9 ± 22.5 N/mmであり、前後方向は内外方向の4.1倍であった。遠位部における前後方向（D-AP）および内外方向（D-ML）は、それぞれ 180.9 ± 45.8 および 166.2 ± 34.7 N/mmであり中央部は遠位部の1.1倍であった。Strengthについては中

中央部でそれぞれ 142.6 ± 9.6 および 174.6 ± 15.6 mmで、遠位部は 118.1 ± 11.4 および 125.3 ± 10.1 mmとなり、中央部は遠位部の0.94倍であった。Deformationに関しては、中央部ではそれぞれ 1.36 ± 0.21 および 2.81 ± 0.47 mmで、遠位部は 1.77 ± 0.16 および 2.29 ± 0.45 mmであり、中央部は遠位部の0.77倍であった。(表2、図3)

表2 皮質骨の力学試験データ

	M-AP	D-AP	M-ML	D-ML
Stiffness(N/mm)	235.9 ± 31.3	180.9 ± 45.8	56.9 ± 22.5	166.2 ± 34.7
Strength(N)	142.6 ± 9.6	118.1 ± 11.4	174.6 ± 15.6	125.3 ± 10.1
Deformation(mm)	1.36 ± 0.21	1.77 ± 0.16	2.81 ± 0.47	2.29 ± 0.45
Strength/断面積(N/mm ²)	42.1	36.9	51.5	39.1
Deformation/破断径	0.60	0.80	0.74	0.65

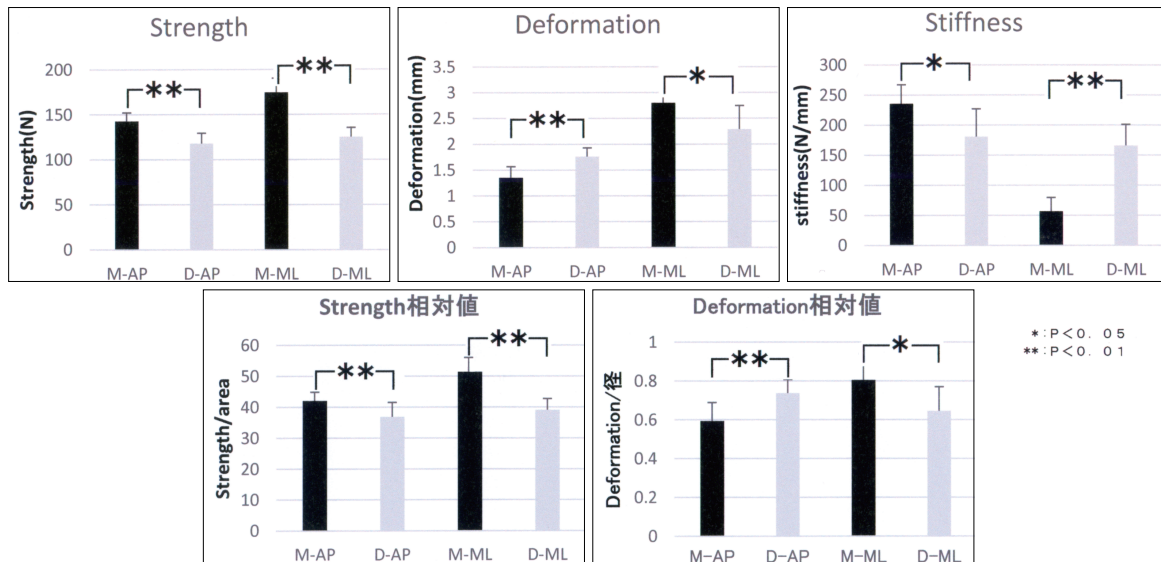


図3 破断試験による各パラメータの部位別比較

「実験方法の大腿骨の機械的特性」で述べた通り、Strengthは皮質骨断面積に比例し、また、Deformationには径が関わる。このことから、Strengthの値を断面積で除することにより単位面積当たりの値（Strengthの相対値とする）を求めた。中央部において前方（M-AP）および内方（M-ML）から破断した際のStrengthの相対値は、それぞれ 42.1 および 51.5 N/mm²であり、同様に遠位部において前方（D-AP）および内方（D-ML）から破断した際のStrengthの相対値は、それぞれ 36.9 および 39.1 N/mm²であった。また、Deformationを前後径または内外径で除して単位径当たりの値（Deformationの相対値とする）を求めた。中央部において前方（M-AP）および内方（M-ML）から破断した際のDeformationの相対値は、それぞれ 0.60 および 0.74 であり、遠位部において前後方向（D-AP）および内外方向（D-ML）

破断した際のDeformationの相対値は、それぞれ0.80および0.65であった。(表2、図3)

3) 組織構造

皮質骨

樹脂包埋された中央および遠位部の骨幹横断研磨標本を光学顕微鏡で観察すると、前後径・内外径ともに中央部より遠位部の方がやや大きく、そのような状態は前後径より内外径で顕著であった。中央部の骨膜面は第三転子の存在によりやや外方に突出しているが、骨内膜面は楕円状の形状を示した。一方、遠位部は骨膜面および骨内膜面ともに楕円状であった。(図4-1)

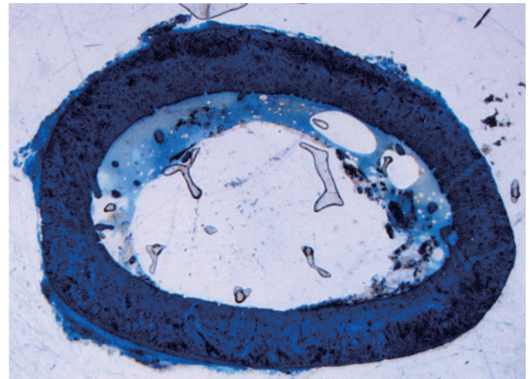
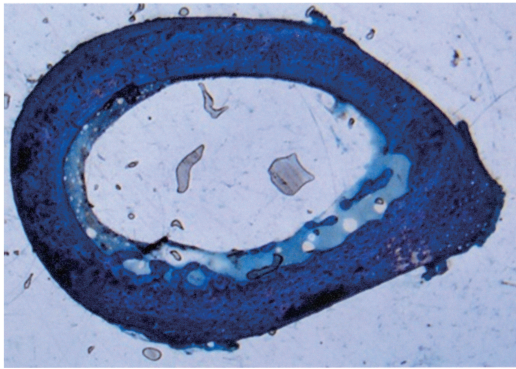


図4-1 大腿骨中央部および遠位部横断面の弱拡大像
(リゴラック樹脂包埋研磨標本 トルイジンブルー染色)
左:中央部 右:遠位部

脱灰パラフィン矢状断切片にポリクローム染色を施し、前面と後面の皮質骨を拡大して観察すると、骨は全体に淡いピンク色に染色された。中央および遠位部のいずれにおいても、皮質骨の骨内膜側には約1/4～1/3の範囲に環状層板様構造が形成されていた。しかし、それ以外の領域は染色性が低く、また、層板構造は観察されなかった。(図4-2)

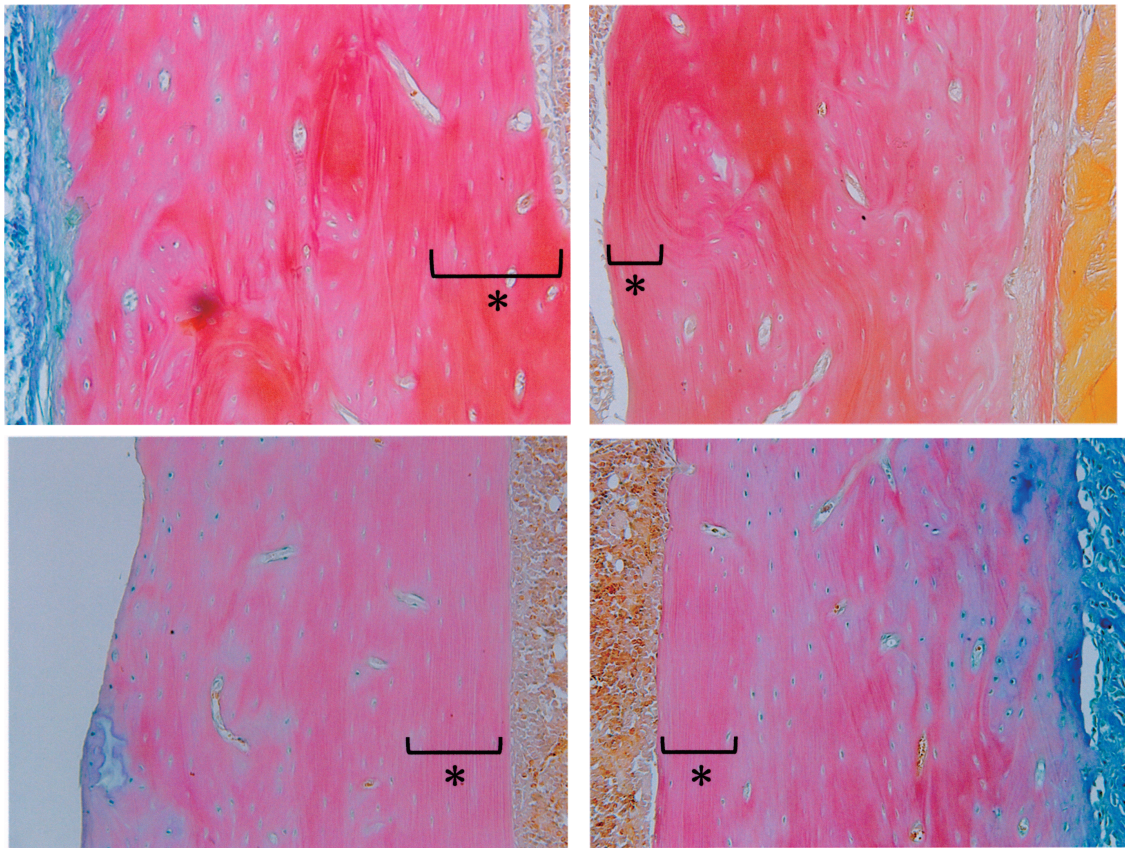


図4-2 中央および遠位部における皮質骨の構造

(脱灰パラフィン矢状断切片、ポリクローム染色)

- a : 中央部・前面皮質骨 b : 中央部・後面皮質骨
c : 遠位部・前面皮質骨 d : 遠位部・後面皮質骨
* : 層板構造が形成されている範囲

中央および遠位部の断面を拡大して観察し、皮質骨断面を「環状層板様構造のない領域」、「環状層板様の構造がみられる領域」および「骨膜」に区分すると、中央および遠位のいずれの部位においても、環状層板様構造のない領域は、皮質骨の深部で厚く形成されていた。環状層板様の構造は、いずれの部位においても骨内膜面側に厚く形成されていた。しかし、骨膜面側に関しては、中央部は遠位部より厚く、特に外面で厚くなっていた。骨膜は、中央および遠位部のいずれにおいても皮質骨骨膜面のほぼ全周を被っているが、中央部では外面がやや厚く、遠位部では内面で厚くなっていた。(図4-3)



図4-3 皮質骨断面のトレース
 左図：中央部 右図：遠位部
 上方：前方 下方：後方
 右側：外方 左側：内方
 赤：骨膜 黄：層板構造のない領域
 青：環状層板様の構造がある領域

骨膜の構造

大腿骨中央部の骨膜厚は、前面（A）が $32.2 \pm 3.2 \mu\text{m}$ 、後面（P）は $30.3 \pm 9.3 \mu\text{m}$ 、内面（M）は $19.3 \pm 4.0 \mu\text{m}$ 、外面（L）は $55.4 \pm 10.5 \mu\text{m}$ であった。遠位部はそれぞれ前面（A）が $23.8 \pm 7.3 \mu\text{m}$ 、後面（P）は $36.9 \pm 5.9 \mu\text{m}$ 、内面（M）は $61.6 \pm 22.7 \mu\text{m}$ 、外面（L）は $18.7 \pm 5.6 \mu\text{m}$ であった。このように、中央部では前面と特に外面が肥厚しており、遠位部では内面が有意に厚かった。骨膜の厚い部位の表面には筋が存在していた。（図5）

骨膜厚

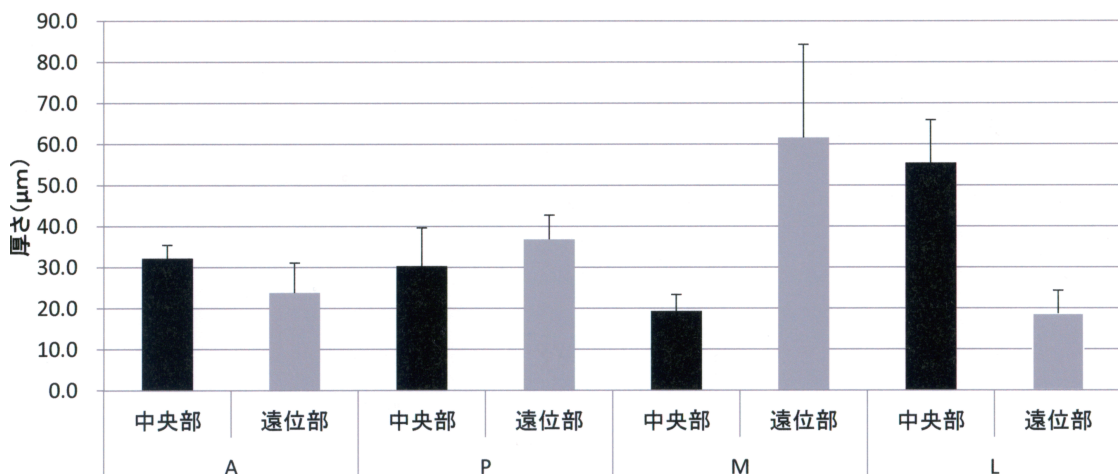


図5. 中央および遠位部における骨膜の厚さ
 A: 前面、P: 後面、M: 内面、L: 外面

矢状断された大腿骨の脱灰パラフィン切片にポリクローム染色を施して観察すると、骨は淡いピンク色に染まり、骨膜は水色に染まって観察された。骨膜の薄い部位では、骨膜が緩く骨表面に付着し、標本では骨表面から剥離している状態も認められた。一方、骨膜の厚い部位では、骨膜の表層が淡いピンク色に染まり、骨表面に接する深層が水色に染まっていた。骨と骨膜の境界部分を拡大すると、骨膜の線維が束を形成して、骨内に埋入されていた。(図6)

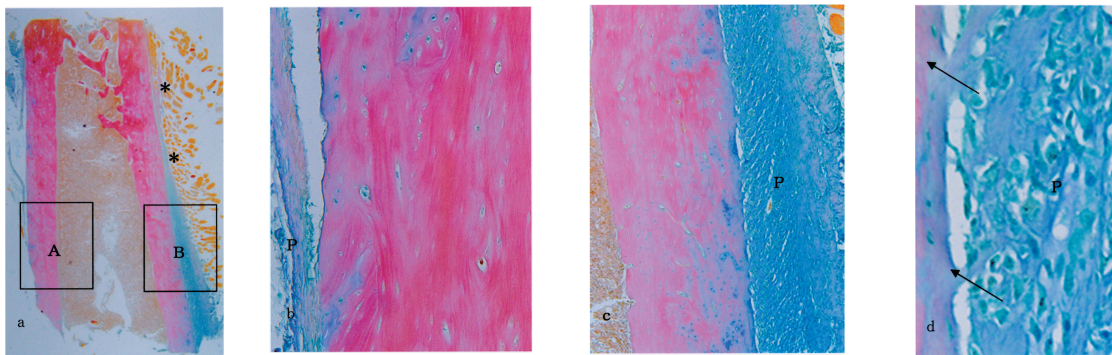


図6 骨膜の構造（大腿骨遠位部、矢状断脱灰切片、ポリクローム染色）

- a : A=前面の皮質骨 B=後面の皮質骨
b : 骨膜の薄い部位（前面の皮質骨（図aのA部分））の拡大
c : 骨膜の厚い部位（後面の皮質骨（図aのB部分））の拡大
d : 図cの□部分の拡大
P : 骨膜 * : 筋 矢印：骨基質内に埋入される骨膜線維

考 察

発育期の長骨では骨端板が存在し、骨の伸長が進められる。そのため、長骨では同一の骨の中でも骨幹端付近のように形成されてから間もない骨が存在する部位と、骨幹中央部のようにある程度時間が経過したものが混在する。井上¹⁾は発育期のラット脛骨を用いて、骨幹の近位部と中央部の構造を観察するとともに力学的強度を測定し、その関連性について報告している。それによると、骨幹の近位部には内腔の広い血管腔が多く存在し、また、この部位の基質線維は疎で配列も不規則であるが、中央部では血管腔がかなり狭く、環状層板様の構造が皮質骨の骨膜面および骨内膜面に形成されており、このことが力学的強度の部位差をもたらすとされている。長骨でなくても下顎骨関節突起でも同様な知見が得られており、下顎頭軟骨は長骨における関節軟骨と骨端板の両方の機能を担い、下顎頭軟骨の直下では分化度の低い幼若な骨が添加され、それより下顎枝よりの部位では分化度の高い成熟した骨が添加されることが示されている³⁾

そのような骨の成熟度は、骨の強度に密接に関係している¹⁾。骨強度は一般的に破断試験で測定されるが、そのデータは応力-ひずみ曲線で示すことができ⁴⁾、これは横軸のクロスヘ

ットが骨を押し曲げる距離 (mm) と、縦軸の骨にかかる荷重 (N) で表される。骨が一定速度で押し曲げられる際、骨にかかる弾性限度以下の荷重と骨変位量が初期段階において比例関係にあることから、骨はHookeの法則に従う弾性体であることが示されている⁵⁾。

本研究では、ラット大腿骨の中央および遠位部における骨強度を測定し、そこでは大腿骨の前方および内方の2方向から破断して試験を行った。その結果、Strengthはどちらの方向から破断しても中央部の方が有意に高い値を示した。Deformationは前方から破断した時には遠位部が高いが、内方から破断した時には中央部が高い値を示した。また、Stiffnessは前方から破断した時には中央部が高く、内方から破断した時には遠位部が高くなっており、このようにStiffnessはDeformationとは全く逆の傾向を示した。実際の骨の強度には、「硬さStiffness」のみならず「しなやかさDeformation」も関わる。このことから、骨の「硬さ」と、「しなやかさ」の相反する2つの要素が関わって、骨の強度が決定されていることが理解される。

Strengthには試料の断面積の大きさが関わり、Deformationには径が関わりとされている¹⁾。本研究で、ラット大腿骨の中央部と遠位部の前後および内外径を計測すると、どちらの部位においても前後径に比べてやや内外径が大きく、そのことに部位差は認められなかった。また、断面積にも部位差はなかったが、皮質厚に関しては前後および内外のいずれの方向においても中央部が厚かった。これらのことから、まず、ラット大腿骨の中央および遠位部の断面は、外形的にほぼ同様な大きさ楕円形を示すことが分かる。また、その断面積もほぼ同様であるが、皮質骨厚は中央部の方が厚いことから、中央部の骨髓腔は遠位部より狭いことが推測される。

このようなラット大腿骨の中央および遠位部における大腿骨の断面の形態に、破断試験の結果を合わせて考えると、両部位の断面積は同じであるがStrengthは異なる。このことから、本研究では中央および遠位部のStrengthをそれぞれの部位の皮質骨断面積で除した値を求め、また、Deformationはそれぞれの破断方向の径で除して、それらをStrengthおよびDeformationの相対値とした。このStrengthとDeformationの相対値を部位別で比較しても、先に述べた絶対値でみられた結果と同様に部位差が認められた。

骨の強度には石灰化度やコラーゲンの密度などが関与しており、石灰化度が高まると剛性 (Stiffness) は高値を示し、靱性 (Deformation) は低下する。古い骨単位ほど石灰化沈着が促進して強度が高まり、新生された骨単位ほど低い。コラーゲン架橋の増加が骨の強度を高め、脆い骨構造を形成すると考えられている⁶⁾。骨のような生体試料は、金属や樹脂のような均質な構造ではない。本研究でStrengthおよびDeformationの相対値に部位差がみられたのは、両部位の骨の形状の違いよりも構造上の違いがそれに反映されているためであると思われる。

ラット大腿骨では、遠位部の皮質骨の中でも骨内膜面側の1/4～1/3の領域にのみ環状層板

様の構造がみられるが、それ以外の領域にはほとんど層板様構造はみられなかった。中央部では骨内膜面側のほかに、骨膜面側にも環状層板様構造が認められた。ポリクローム染色された標本で皮質骨を観察すると、層板構造を示さない部位の骨は染色性が低く、複雑な構造を示した。マッソントリクローム染色のような物理染色の染色結果と、透過電子顕微鏡による観察所見の関連性について検討した報告³⁾に、本研究の結果を当てはめると、ポリクローム染色で淡く染色される部位は、層板構造を示す部位より、骨の基質線維が疎で、配列も不規則であると思われる。このような基質線維の密度および配列状態の違いから、基質線維が疎で配列の不規則な部位は、胎生期や未成熟な段階で形成された分化度が低い骨で、層板構造を示す部位は成熟に近づいてから形成される分化度の高い骨とされている³⁾。

ラット脛骨は近位骨幹端から骨幹中央部に向かうにしたがって、急激に細くなる。脛骨骨幹部のリモデリングの過程についてみた報告²⁾によると、脛骨の骨幹部はあたかも前外方に移動するような状態で骨添加と骨吸収が行われる。それに対してラット大腿骨では、遠位部から中央部まで、断面は楕円形であるが円筒状に近い形状をなしており、そのためにここでは骨添加はおよび骨吸収は同心円状にすすめられると思われる。事実、中央および遠位部の皮質骨で環状層板様の構造がある領域と、それが無い領域とを分けたトレースを見ると、確かに分化度の低い骨が幅広く存在し、その骨内膜面および骨膜面側のほぼ全周にわたって層板構造が形成されていた。

このことから、ラット大腿骨の場合、染色性の低い領域は骨幹端で形成された骨がリモデリングを受けずに、遠位部のみならず中央部にまで残存したものであると思われる。しかし、中央部では骨膜面側に環状層板様の構造が形成されていた。このことは、遠位部から中央部に向かうにしたがって、遠位部の皮質骨で広く存在していた分化度の低い骨の中で、骨膜面側のわずかな領域だけは層板様構造をもつ骨に置換されたと考えられる。

発育期における骨幹端の骨梁は、骨端板で形成された石灰化軟骨梁を芯として、その周囲に骨が添加されて形成される。軟骨は骨に比べて基質線維が疎であり、それに石灰化が生じると無機質の結晶沈着が進み、形成後時間が長く経過すると骨より石灰化度が高まる。骨梁はこのように石灰化度の異なる組織が組み合わされることによって強度が高められる。本研究で観察した大腿骨中央および遠位部における分化度の低い骨も基質線維が疎であることから、その骨は時間経過に伴って高度に石灰化する。この部分は遠位部で形成された後、ほとんどリモデリングを受けずに残存し、また、両部位の皮質骨の中でも2/3～3/4の範囲を占めている。遠位部で形成されたこの分化度の低い骨は発育に伴って順次中央部へと移行し、その間に石灰化度が高まるために、遠位部より中央部で高いStiffnessが示されたと思われる。

層板様構造を示す骨には基質線維が密に存在し、それらが隣り合う層板ごとに異なる方向に配列することによって、いわゆるベニヤ板状構造が形成される。この層板様構造は遠位部では骨内膜面において顕著にみられるが、中央部ではそれに加えて骨膜面でも観察された。

上述のように、遠位部に比べて中央部のStiffnessは高いが、さらに骨膜面側に環状層板様の構造が形成されることによって、硬さとしなやかさがもたらされ、このことが中央部のStrengthを高めていたであろうことが推測される。

津山ら⁷⁾は、骨膜の発育変化について検討している。それによると、幼若期の骨膜は2層からなり、骨組織に接する内層はきわめて豊富な細胞成分に富み、骨形成層に相当し、筋に接する外層は細胞成分に乏しい線維性の組織で構成されている。一方、成熟期の骨膜では明らかな2層構造は識別されず、細胞成分の豊富な骨形成層は認めないとされている。本研究の観察では、骨膜の厚い部位では骨膜の染色性が2層に別れ、また、骨膜の表面側には筋が存在していた。本研究では13週齢という発育後期のラットを用いており、骨膜の厚い部位の表面には筋が存在していたことから、その部位はラットが幼若なために肥厚が見られたのではなく、筋の付着との関係があるように思われる。

骨膜の厚さを計測すると、大腿骨中央部では前面と特に外面が厚く、遠位部では内面が厚くなっていた。このことを破断試験時の結果に照らし合わせると、中央部も遠位部も前方から破断した時より、内方から破断した方が高いDeformationが得られた。山崎ら⁸⁾は、鶏胚の足根中足骨を用いて、骨膜の形成過程について検討し、その結果、弾性線維は長骨の長軸に平行で輪状の走行を示さないことから、骨幹部を束ねる拘束的な力を発揮する線維にはなり得ないとしている。また、このことは弾性線維よりも遅れて骨膜外層で増生するcollagen fibrilについても同様で、この線維も輪層線維束は形成しなかったと述べている。

このように弾性線維および膠原線維は骨の長軸方向に配列するものが多く、骨膜が厚くそれらが豊富に存在する場合、骨膜は破断に対して抵抗すると思われる。また、破断試験では骨は破断方向がへこみ、反対方向に突出するように折れる。大腿骨中央部では外側部に厚い骨膜が存在しており、この部位では外方からの破断より内方からの破断の方が確かに高いDeformationを示した。その破断によるStiffnessは低値を示すが、Deformationがかなり高いために、結果的にStrengthはこの破断試験の結果の中で最高値を示した。

骨膜はシャープ線維で骨に強靱についており、成長や機械的負荷への抵抗に関わるとともに、骨形成や骨折治癒に大きく関与している⁹⁾。本研究で矢状断された大腿骨の脱灰パラフィン切片にポリクローム染色を施して観察すると、骨は淡いピンク色に染まり、骨膜は水色に染まって観察された。骨膜の薄い部位では、骨膜が緩く骨表面に付着し、骨表面から剥離している状態も認められた。一方、骨膜の厚い部位の骨と骨膜の境界部分を拡大すると、骨膜の線維が束を形成して、シャープ線維様に骨内に埋入されていた。これらのことから、厚い中央部外面と、特に遠位部内面ではDeformation、すなわち骨のしなやかさを高めることによって結果的に高い力学的強度をもたらしていることが理解される。

結 論

ラット大腿骨の中央部では、分化度の低い骨における高度な石灰化と層板構造の形成によって遠位部より高い強度がもたらされるが、骨膜の存在する部位ではしなやかさを高めることによって強度が高められることが示唆された。

倫理審査

本研究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た。

謝辞

稿を終わるに望み、多くのご協力をいただいた研究室の方々に深謝致します。

参考文献

- 1) 井上知、守田剛、大迫正文：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.
- 2) 藤原浩隆：骨構造に及ぼす加重増加の影響に関する観察. 第62回日本体力医学会大会抄録号 p135, 2007.
- 3) 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, 1993.
- 4) 田中正夫、安達泰治：残留応力を許容する骨の力学的再構築に関する初期研究. 日本機械学会論文集（A編）58:1022-1029, 1992.
- 5) 岩久文彦、小澤英浩：骨の微小血管構築：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.
- 6) 大崎弥枝子：Wolffの法則と有限要素法による骨梁の可視化：Bulletin of The Nippon Dental University. 135:25-28, 2006.
- 7) 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.
- 8) 山崎洋介、他：長管骨発生過程における骨膜弾性線維の出現と走行について. Nihon Univ. Dent. J. 84:19-26, 2010.
- 9) Fan W., Crawford R., Xiao Y. : Structural and cellular differences between metaphyseal and diaphyseal periosteum in different-aged Rats. Bone. 42:81-89, 2008.

Study on site differences in structures of femoral bone matrix and periosteum in rats

NAKAI, Shingo
TAKAHASHI, Masato
OHSAKO, Masafumi

SUMMARY

This study aimed to investigate characteristics of histological structures at middle and distal portions of femur in rat, associated with data of bone strength test. Thirteen weeks old male rats were used as materials. Their femurs were excised, and analyzed histologically. Furthermore, some parameters were measured bone morphometrically.

Relative values of Strength and Deformation were calculated, because Strength and Deformation were in relation to a cross-sectional area and a thickness of cortical bone, respectively, but site differences were also found in those relative values. Low-differentiated bones that were consisted of low-dense matrix fibers occupied wide extent in the cortical bone at both middle and distal portions of femurs. Higher Stiffness value was found at the middle portion, because the low-differentiated bones calcified highly with the time elapse. Circumferential lamellar bones were observed only in the endosteum side of the cortical bone at the distal portion, but they were recognized not only in the endosteum side but also to in the periosteum side, at the middle portion. The periosteum was thicker in the lateral face of femur at the middle portion, and in the medial face at distal portion. Higher value of Deformation and Strength was obtained at both middle and distal portion, when the bones were fractured from medial direction in bone fracture test. It was thought that many fibers of the periosteum were useful to protect against fracture, because those fibers were embedded into the bone as sherppey's fibers at the site that thick periosteum existed.

It was suggested that the middle portion of rat's femurs had higher bone strength than the distal portion, due to highly calcification of the low-differentiated bone, formation of lamellar bone and improvement of flexibility at the site that thick periosteum existed.

Keywords: bone morphometry, bone strength, histological structure