

加重低減に伴うラット脛骨の基質と骨膜の構造変化

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

神尾 強司

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

日下 翔太

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、発育後期のラットを用いて尾部懸垂によって加重低減を図り、それに伴う骨幹の近位部と中央部の骨基質の変化に骨膜の構造変化を関連づけて検討することを目的とした。

7週齢のウィスター系雄性ラット24匹を用い、実験群TSは2週間尾部懸垂し、対照群COは同期間通常飼育した。実験期間終了後、脛骨を摘出し、固定・包埋処置を行い、種々な標本作製し、組織学的および骨形態計測学的に観察した。

皮質骨の近位部では、TSの骨基質はCOに比べて全体的にトルイジンブルー染色でややメタクロマジーを起こし、皮質骨内面ではTSの血管腔が広がった。また、皮質骨中央部では、TSのいずれの面においても骨小腔付近の基質でメタクロマジーがみられたが、皮質骨の後面では骨内膜面付近の基質がトルイジンブルーに濃染した。骨膜の厚さは近位部・中央部ともにTSとCOとの間に有意な差は認められなかった。骨膜の染色性はTSの方が低く、このことからTSの骨膜はCOに比べ、線維密度が低下し、組織の幼若化を示しているものと考えられた。

以上のことから、加重低減によって発育期の骨には形成不全がみられ、また、骨膜の厚さには変化しないが、線維密度の減少による強度低下を引き起こす可能性が示唆された。

キーワード：骨構造、骨膜、尾部懸垂

1. はじめに

骨の脆弱化は、骨強度の低下によるもので、これには骨量と骨質という骨の量的および質的な要因が関わり、その病的な状態のひとつに骨粗鬆症が挙げられる。骨は加齢¹⁻²⁾や、「寝たきり」のような身体的に不活動な生活³⁾によって脆弱化する。また、骨折手術後のように長期固定によって患部の免荷や身体的不活動が強いられる場合でも、骨の脆弱化が進む⁴⁻⁹⁾。これらのいずれの状況においても身体的な不活動は、骨に対して力学的な負荷軽減となり、その結果、骨形成能の低下と骨吸収の増加が引き起こされ、骨量の低下を生じる¹⁻³⁾。

骨膜は外層および内層に区分され、外層は骨表面を覆って骨の強度維持に寄与し¹⁰⁾、線維層と呼ばれる。一方、内層は骨形成層と呼ばれ、骨表面に接して骨芽細胞が密に存在して、それらは骨の横径成長に関わる。さらに、外層－内層の境界部には未分化な細胞が存在する。その境界部の細胞から内・外両層に細胞が供給され、外層に向かうものは線維芽細胞に分化し、線維層の線維を合成する。それに対して、内層に向かうものは骨を形成する骨芽細胞に分化すると考えられている¹⁰⁾。このような骨膜の構造を骨基質の構造に関連づけて検討した報告は少ない¹¹⁻¹²⁾。また、それらに及ぼす加重増減の影響に関する研究もほとんどない⁶⁾。

本研究では、ラット脛骨を用いて、加重低減による骨膜と骨基質の構造変化を相互に関連付けて検討することを目的とした。

2. 材料と方法

材料として7週齢のウィスター系雄性ラット24匹を用い、それらを実験群（TS）と対照群（CO）に分類した。TSは2週間尾部懸垂し、COは同期間通常飼育した。実験期間終了後、各群から脛骨を摘出し、水平、前額または矢状方向に切断し、以下に示す種々な標本を作製して、組織学的および骨形態計測学的に観察した。

尾部懸垂実験

尾部懸垂実験では、通常のケージよりも天井を高くし、そこからTSのラットの尾部をヒモで吊した。そのヒモを装着する際、ラットに過剰に不安を与えないようにペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル）を腹腔注射し（40mg/kg体重）麻酔をかけた。ラットの尾部を吊すヒモが外れないようにヒモを尾部に巻き付け、さらにその表面をガムテープで覆った。このようにして後肢に加重がかからない尾部懸垂モデルを作製したが、摂食飲水で困難をきたし、過度なストレスや健康障害を招かぬように、えさ箱はケージの床に設置し、給水瓶の吸水口も床面近くになるように設定した。

標本の摘出および固定

標本摘出に先立ち、ラットを炭酸ガス吸引にて深く麻酔し、安楽死させた。心拍停止確認後、後肢の皮膚と筋を含めた軟組織を除去し、脛骨を摘出したが、その際、骨膜を傷つけないようにするために、筋を骨表面にわずかに残した。右脚の脛骨をノギスにより計測し、歯科用ハンドモーターを使用して骨幹の近位1/3部および中央1/2部（これ以降、それぞれ近位および中央部とする）の高さで横断し、両部位から厚さ約2～3mmの横断標本を摘出した。その後、5%グルタルアルデヒドと4%パラフォルムアルデヒドを含むカルノブスキー液に速やかに浸漬し、一晚、4℃にて固定した。固定の後、それらの標本は組織学的標本の作製に移るまで、0.2Mサッカロースを含む0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液（4℃）内に入れて保存した。これらを近位部横断標本と中央部横断標本とした。左脚については、近位部から中央部までの長さ約7mmの標本を摘出し、それを前額および矢状割断した。その後、速やかに4%パラフォルムアルデヒド溶液（4℃）にて固定処置を行った。

非脱灰樹脂研磨標本作製

カルノブスキー液で固定した右脚横断標本は、以下のような手順でリゴラック樹脂包埋研磨標本作製した。

まず、脱灰せずに水洗の後、真空デシケーター内にて70、95および100%エタノールからなるアルコール系列によって脱水した。その後、同様に真空デシケーター内にてアセトンに浸漬し（20分×2回）、透徹を行った。さらに、アセトンとリゴラック樹脂の混合溶液（1:1、1:3、1:7＝各3～6時間）およびリゴラック樹脂原液に浸漬し（各1日ずつ2回）、樹脂に包埋して加温重合した（37、45、55、60℃：各1日）。重合が完了したブロックをバンドソーにて小さくトリミングし、砥石および3段階の研磨用フィルムにて丁寧に研磨して、最終的に厚さ約100 μ mの非脱灰横断樹脂包埋研磨標本作製した。研磨面に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。

パラフィン切片標本作製

4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定した左脚標本を、Morse溶液または8%EDTA溶液（pH7.2～7.4、4℃）に浸漬して脱灰した（それぞれ10～21日または21～35日程度）。

Morse溶液にて脱灰した標本は、水洗した後、真空デシケーターの中で70、90および100%エタノールに各20～30分間ずつ浸漬し、脱水を行った。さらに、真空デシケーター内にて、安息香酸メチル（1時間×3回）、ベンゼン（30分×2回）にて透徹を行った後、加温器内のパラフィン（60℃、12～24時間×3回）に浸漬して、標本に対して十分にパラフィンを浸透させた。その後、それらをパラフィンに包埋し、ブロックをトリミングして木製台に取り付けトリミングした後、ミクロトームにて薄切し、厚さ約4～5 μ mの切片を作製した。

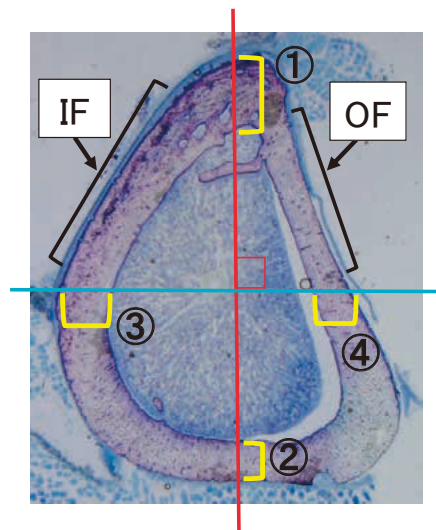


図 1. 形態計測の方法
 (前後径=①+②、内外径=③+④)
 IF:内面、OF:外面

8%EDTA溶液にて脱灰した標本も、通法に従い脱水、透徹の後、パラフィンに包埋し、薄切を行った。それらの切片にTRAP染色を施し、光学顕微鏡により観察した。

骨形態計測

作製した非脱灰樹脂包埋研磨標本に染色を施した後に撮影し、イメージングソフト (cellSens、オリンパス) を使用してデジタルデータ化した。カラー画像解析ソフト (WinROOF、三谷商事) を用いて、それぞれの部位における骨基質および骨膜の厚さを計測した。

前後径の厚さは、骨の断面の長径が通る「前方の皮質骨の厚さ」と「後方の皮質骨の厚さ」の和とした。また、長径の1/2部を通る垂線を引き、それが通る「皮質骨内面 (IF) の厚さ」と「皮質骨外面 (OF) の厚さ」の和を内外径の厚さとした。(図1)

データの比較においては、平均値の差の有意差を、エクセルによる t-検定により求めた。

3. 結 果

非脱灰樹脂包埋研磨標本にトルイジンブルー染色を施し弱拡大で観察すると、脛骨近位部の断面は脛骨前縁を頂点とする前後に長い三角形をなすが、中央部の断面はほぼ円形に近い形をなした。近位、中央のいずれの部位においても、COとTSにおける脛骨断面の形状には違いは認められなかった。(図2) 両群の皮質骨の厚さを比較すると、いずれの部位においてもTSの皮質骨はCOより有意に低い値を示した。(図3)

近位部の皮質骨を、内面、外面および後面に分けて拡大し観察すると、COでは外面と後

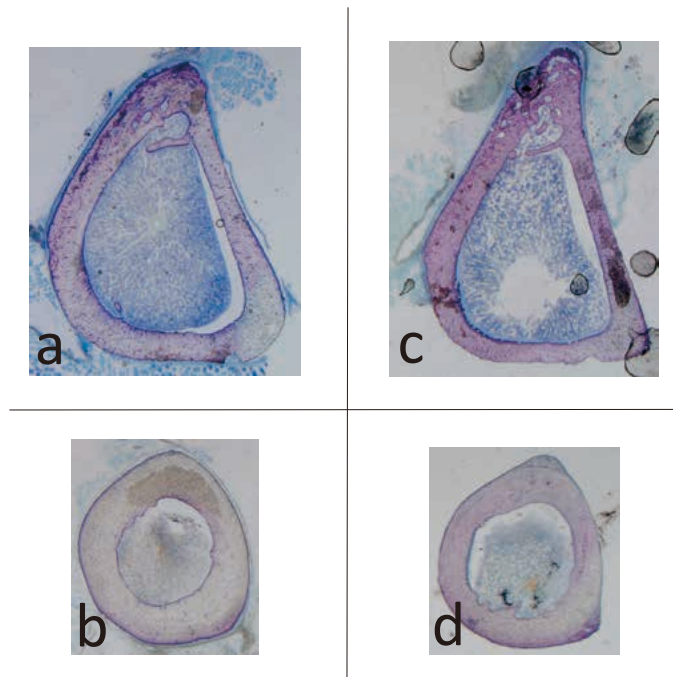


図 2. 両群の近位および中央部における横断面の弱拡大像

a: CO群 近位部、b: CO群 中央部、
c: TS群 近位部、d: TS群 中央部

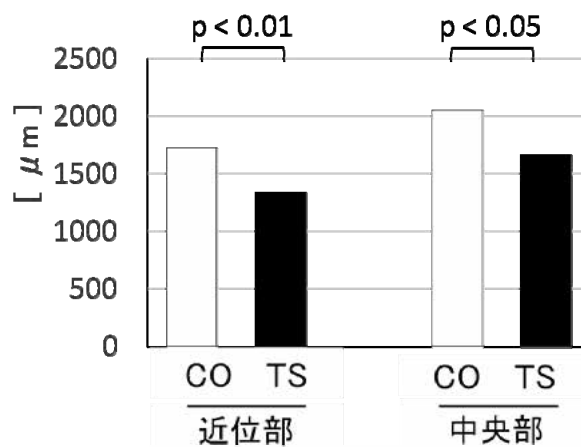


図 3. 両群の皮質骨の厚さの比較

面の染色性が低い、双方を比較すると外面の染色性がやや高く、皮質骨全体に斑状に強くメタクロマジーを起こす部位が認められた。TSの骨基質はCOに比べて全体的にトルイジンブルー染色でやや強くメタクロマジーを起こしていた。そのような状態は特に皮質骨後面の骨内膜面側で顕著にみられ、その部位の皮質骨は薄く、その骨髓腔側に淡い青色に染まる領域が広がっていた。また、COと同様に、TSの外面では皮質骨全体に斑状に骨小腔周囲の基質がメタクロマジーを強く起こしていたが、その範囲はCOより広がった。さらに、COの皮質骨内には小さな血管腔の断面が見られるが、その断面積はTSの方が大きく、そのような状態は特に内面において顕著であった。(図4)

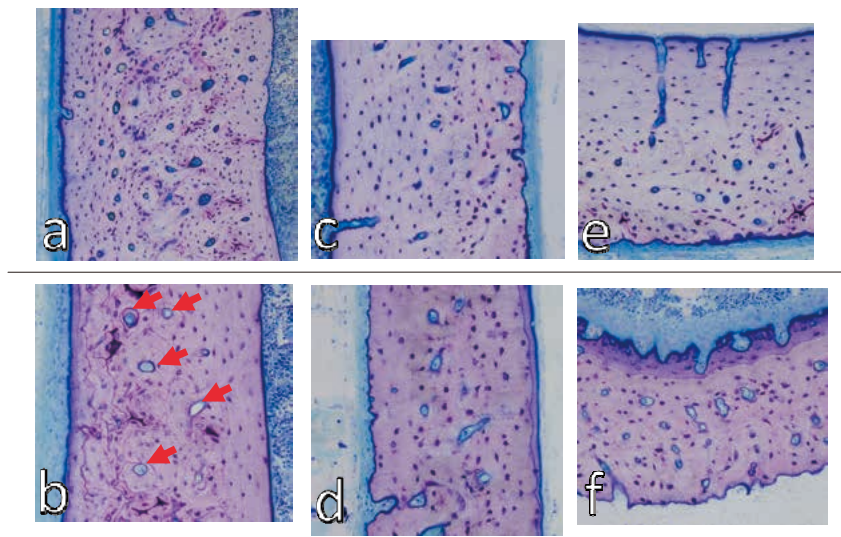


図 4. 両群の近位部における皮質骨各面の拡大像
a, c, e : CO群、b, d, f : TS群、a-b : 内面、c-d : 外面、e-f : 後面
矢印は血管を示す。

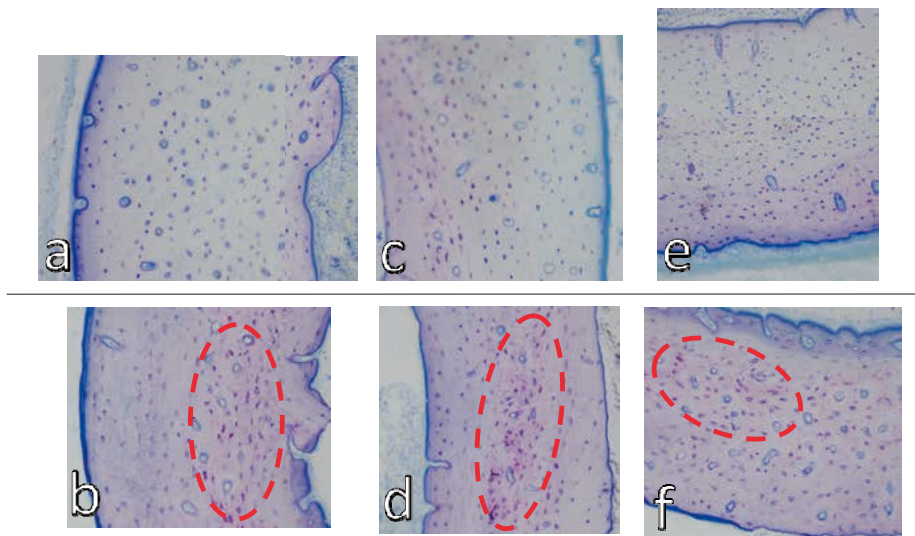
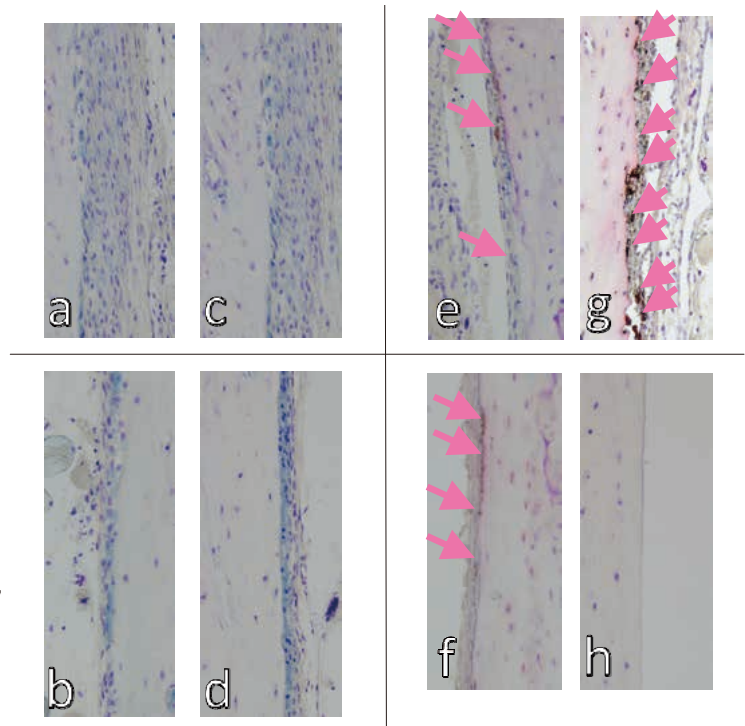


図 5. 両群の中央部における皮質骨各面の拡大像
a, c, e : CO群、b, d, f : TS群、a-b : 内面、c-d : 外面、e-f : 後面
点線サークル内は骨基質がメタクロマジーを生じている部位。

近位部と同様に中央部の皮質骨を、内面、外面および後面に分けて拡大し観察すると、中央部は近位部に比べて染色性が低かった。また、中央部のCOではそれぞれの面の染色性にほとんど違いはみられないが、内面と特に外面では骨内膜面側の骨基質に、また、後面では骨膜面側で骨基質にやや強いメタクロマジーを示す領域が認められた。TSの骨基質はCOに

図 6. 両群の各部位における表面のTRAP染色の結果
 a-d : CO群、e-h : TS群、a, c, e, g : 近位部、b, d, f, h : 中央部、a, b, e, f : 内面、c, d, g, h : 外面
 矢印はTRAP染色陽性の細胞または基質を表す。



比べて全体的にややメタクロマジーが強く起こしていた。また、TSの皮質骨内にはどの面においてもメタクロマジーを強く起こす領域が存在し、そこでは骨小腔が密に存在した。(図5)

脛骨骨幹の前額断脱灰パラフィン切片にTRAP染色を施して観察すると、COの近位および中央のいずれの部位の、皮質骨内面、外面においても骨膜側にTRAP反応陽性細胞は認められなかった。しかし、TSでは近位部の皮質骨内面および外面の骨膜面、さらに中央部の皮質骨内面の骨膜面にも陽性細胞が多数存在した。(図6)

脛骨近位および中央部で横断した非脱灰樹脂包埋研磨標本で骨膜を拡大して観察すると、COとTSの間に厚さの差は認められなかった。しかし、COの近位部では骨膜の表面側に染色性の高い領域が幅広く存在していたが、TSでは骨膜表面側にそのような染色性の高い領域は観察されなかった。中央部は、CO、TSともに近位部より著しく薄くなっており、また、いずれの群も染色性は近位部より高いが、このような構造に関しては群間に差はみられなかった。(図7、8)

4. 考 察

本研究は、尾部懸垂ラット脛骨における骨基質と骨膜を観察することにより、加重減に伴う骨基質の構造変化に骨膜を関連づけて検討した。

皮質骨は発育初期には多孔性であるが、発育に伴って緻密化し¹³⁾、強度が高まる。しかし、高齢者では加齢によって再び皮質骨が多孔性となり骨密度が低下し²⁾、生活習慣病によって

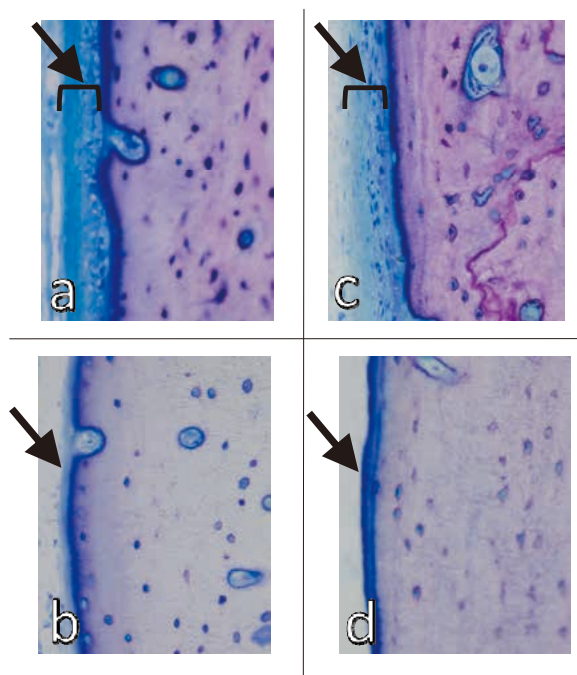


図 7. 近位および中央部における皮質骨内面の骨膜の拡大像
a, b: CO群、c, d: TS群、a, c: 近位部、b, d: 中央部
矢印は骨膜を示す。

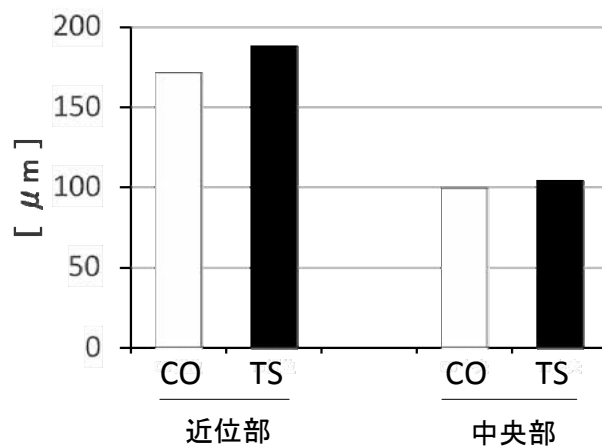


図 8. 両群各部位における骨膜の厚さ(全体)の比較

二次的に骨粗鬆症が引き起こされることが示されている³⁾。皮質骨は正常な発育や加齢によりこのような変化を遂げるが、加重低減によって厚さの減少や多孔化が進むことも報告されている^{4,7,8,13)}。Uhthoff⁴⁾はビーグル犬の前肢に2週から40週間の不動処置を施し、中足骨、橈骨、尺骨および上腕骨にみられる構造変化について検討した。その結果、それらの骨の中でも近位の骨より遠位の骨で骨量の減少が顕著にみられることを認めている。本研究においては、脛骨のみを用いて観察しているが、TSの皮質骨の厚さは近位部、中央部のいずれにお

いてもCOより有意に低い値を示した。本研究で用いた尾部懸垂と、四肢の不動化^{4,7,8)}とでは、骨への加重条件は厳密には異なるが、いずれの実験においても同様の結果が得られており、このことは皮質骨の厚さや緻密な構造を維持するには適切な加重が必要であることを意味していると思われる。

トルイジンブルー染色された非脱灰樹脂包埋研磨標本の染色性と走査電子顕微鏡による所見により、染色性と石灰化度の関連性が示唆されている¹³⁻¹⁵⁾。それらによると、同一の標本の中でも、トルイジンブルーの染色性が低い部位と高い部位があり、前者は石灰化度が高く、後者は石灰化度が低いとされている^{13,14)}。本研究では、TSの近位部の皮質骨はCOに比べて染色性が高く、このことを染色性と石灰化度との関連性について示した報告に当てはめると、近位部は全体的に尾部懸垂によって石灰化度が低下していたように思われる^{13,14)}。

中央部に関しては、皮質骨の中でも骨小腔の密集する部位に相当して、骨基質がメタクロマジーを強く起こす部位が認められた。皮質骨の中で骨小腔が密集する部位は、石灰化軟骨基質の周囲であり、正常状態であればその部位は基質線維が乏しく、他の部位に比べて高度に石灰化し、皮質骨の中で硬さをもたらす芯のような役割を担うとされている^{12,13)}。本研究ではその部位にもメタクロマジーがみられるのは、そこが十分に石灰化していないことを意味するものであり、皮質骨の中で硬い芯となるべき部位の石灰化度も加重低減によって低下していたであろうことが推測される⁹⁾。

ラットの大腿骨は発育に伴って骨内膜側から吸収され、骨膜側に骨が形成されることにより、同心円状に太さを増す¹²⁾。しかし、脛骨では外前方に移動するような発育を示し、皮質骨後面では骨膜側から吸収され、骨内膜側に骨が添加される¹³⁾。本研究においては、TSの骨基質はCOに比べて全体的にトルイジンブルー染色でやや強くメタクロマジーを起こしていた。そのような状態は特に皮質骨後面の骨内膜面側で顕著にみられ、その部位の皮質骨は薄く、その骨髓腔側に淡い青色に染まる領域が広がっていた。これらのことは、脛骨皮質骨の後面では本来発育に伴って骨内膜側に骨が添加されていくべきところに、加重低減によって石灰化や基質合成に支障がみられたことを意味すると思われる。

TSでは近位部の皮質骨内面および外面、さらに中央部の皮質骨内面の骨膜面にTRAP反応陽性細胞が多数存在した。さらに、COの皮質骨内には小さな血管腔の断面が見られるが、その断面積はTSの方が大きく、特に内面において顕著であった。このことも加重低減が皮質骨の厚さの増大や緻密化の阻害を示すものであり、これらのことから加重低減は骨に対して発育不全をもたらすものと思われる¹⁻⁴⁾。

骨膜は、骨幹に比較して骨幹端の方が厚く、細胞数も多いとされている¹⁶⁾。本研究においても、TSおよびCOのいずれも骨幹端の方が厚く、先行研究に一致するものであった。骨膜の外層・内層の境界部には未分化な細胞が存在し、そこから内層に向かうものは骨を形成する骨芽細胞に分化する^{10,17)}。本研究で用いた7週齢のラットは発育後期に相当するもので、未

だ成長を続けている段階にあり、近位部では骨膜性の骨化が進められているために未分化な細胞や骨芽細胞のような細胞成分が多く存在しており、そのことが近位部の骨膜を厚くさせていたと考えられる。

また、骨膜は加齢に伴って厚さが減少するが¹⁸⁾、逆に、骨粗鬆症モデルでは厚さが増すことが報告されている¹⁶⁾。しかし、COとTSとでは骨膜の厚さに違いが認められなかった。本研究の観察部位は骨幹の近位1/3部であり、骨幹端に近いがやはり骨幹としての特徴がここに現れていた可能性があると思われる。

一般に、結合組織の場合、トルイジンブルー染色で高い染色性を示す部位には線維が密に存在する¹³⁾。本研究では、COの骨膜の外層が濃く染まっており、その染色性からCOでは線維密度の高い外層が明瞭に存在している。しかし、TSの骨膜は全体的に明調で、外層の存在が不明瞭となっており、胎児骨や骨折の早期治癒過程で出現する幼若な骨の骨膜に類似しており、このようなことにも加重低減の影響が現れていると思われる。本研究では、中央部の骨膜は薄く、染色性が高かった。骨膜は側方からの力に対して、骨に柔軟性をもたらし、そのことが骨強度の上昇に寄与するということが報告されている¹²⁾。しかし、骨幹中央部の骨膜にはこのような骨強度に大きな影響をもたらすものであり、本研究のような少なくとも2週間の尾部懸垂実験では影響がみられなかったと考えられる。

以上のことから、尾部懸垂に伴う加重低減によって骨には形成不全を引き起こすとともに、骨膜には線維成分の減少をもたらし、これらによって骨強度の低下がもたらされる可能性があることが示唆された。

5. 結 論

加重低減は発育期の骨の形成不全と同時に、骨膜の線維密度低下を引き起こし、これらによって骨の強度が低下する可能性が示唆された。

謝 辞

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

本研究の実験は東洋大学動物実験委員会ならびにライフデザイン学部研究等倫理委員会において承認された。

なお、本研究の要旨は第70回日本体力医学会大会（於・和歌山市）において発表した。

参考文献

- 1) 竹内靖博：3. 骨の老化メカニズムとその制御. 日老医誌 41:622-624,2004.

- 2) 太田博明：ライフサイクルにおける骨の発育と老化. 編集 日本骨代謝学会：骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典. 羊土社, pp252-253,2015.
- 3) Sato S., et al.: Bidirectional relationship between lifestyle-related diseases and bone metabolism. CLINICAL CALCIUM. 24:1591-1598, 2014.
- 4) Uhthoff HK., et al.: Bone loss in response to long-term immobilisation. J. Bone Joint Surg. Br. 60-B:420-429,1978.
- 5) Bourrin S., et al.: Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. J. Bone Miner. Res. 10:820-828,1995.
- 6) 小玉嘉昭：尾部懸垂ラットモデルによる骨組織の反応. 臨床整形外科 33:951-956,1998.
- 7) 大迫正文ら：成熟ラットの骨構造に及ぼす不動の影響. 東洋大学紀要 教養課程篇 9:87-94,1999.
- 8) 大迫正文ら：発育期ラット脛骨の構造に及ぼす不動の影響. スポーツ健康科学紀要 1:95-102,2001.
- 9) 岡本武志ら：不活動に伴う骨量減少のメカニズム解明の為の動物モデルの検討. 東海大学短期大学紀要 46:1-6,2012.
- 10) Chang H., et al.: Concise review: the periosteum: tapping into a reservoir of clinically useful progenitor cells. Stem Cells Transl. Med. 1:480-491,2012.
- 11) 朝村真一：培養骨膜細胞とフィブリン複合体を用いた骨のティッシュ エンジニアリング. 近畿大学医学雑誌 25:183-198,2000.
- 12) 中井真悟ら：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 51:203-217,2015.
- 13) Ohsako M., et al.: Characteristics of bone structural changes by growth and mechanical stress in growing rats. J. Phys. Fitness Sports Med. 3:327-333,2014.
- 14) 井上 知ら：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 49:305-320,2013.
- 15) Inoue S., et al.: Study on changes of structure and strength of tibial cortical bone in growing rat. 東洋大学大学院紀要 50:253-276,2014.
- 16) Fan W., et al.: Structural and cellular features in metaphyseal and diaphyseal periosteum of osteoporotic rats. J. Mol. Histol. 41:51-60,2010.
- 17) Malizos K.N., et al.: The healing potential of the periosteum molecular aspects. Injury. 36:13-19,2005.
- 18) Fan W., et al.: Structural and cellular differences between metaphyseal and diaphyseal periosteum in different aged rats. Bone. 42:81-89,2008.

Structural changes in bone matrix and periosteum of rat's tibiae accompanied with decrease in mechanical stress

KANO, Tsuyoshi
KUSAKA, Shota
OHSAKO, Masafumi

Summary

This study aimed to investigate structural changes in a bone matrix and periosteum at the proximal and central portions of tibial diaphyses, accompanied with decrease in a mechanical stress by tail-suspension in rats of late growing period.

Twenty four male rats (wistar strain seven-week-old) were used as materials, and they were divided into two groups (tail-suspended group: TS and control group: CO). Tails were suspended from roofs of cages in TS for two weeks. Tibias were extracted from both groups after the experimental period, and they were immersed in fixation fluids. Those samples were analyzed histologically and bone morphometrically.

The bone matrixes of the proximal portion in TS showed metachromasy strongly by toluidine blue staining method and blood vessel cavities were wide, compared to CO. The bone matrixes near osteocytic lacunas showed metachromasy and the matrixes near an endosteum of the posterior face of the cortical bone were stained in dark blue by toluidine blue dye, at the central portion in TS. Little difference in thickness of the periosteum was found between CO and TS, but that of proximal portion was thicker than the central portion. A stain ability of the periosteum was lower than CO, at the proximal portion in TS. It was thought that a decline of the stainability meant a decrease in density of fiber component of the periosteum.

From these facts, it was suggested that a decline of the mechanical stress caused atrophy of bone and lower of strength of the periosteum.

Keywords: Bone structure, Periosteum, Tail-suspension