坐骨神経の凍結麻痺により一過性に不活動としたラット脛骨骨梁構造の変化

田 巻 弘 之 與 谷 謙 吾
幸 篤 武 竹 倉 宏 明

ALTERATION OF TRABECULAR BONE ARCHITECTURE FOLLOWING SCIATIC DENERVATION IN RAT PROXIMAL TIBIAE

HIROYUKI TAMAKI, KENGO YOTANI, AYUMU YUKI and HIROAKI TAKEKURA

Abstract

Disused rat hindlimb caused by sciatic denervation is characterized by osteopenia accompanying alterations in trabecular bone architecture. We studied the effects of short-term denervation followed by reinnervation on the 2-dimensional architecture of trabecular bone using a unilateral sciatic nerve freezing model rat of temporary disuse. Male Fischer-344 rats aged 11-weeks underwent unilateral hind-limb denervation by either sciatic neurectomy (SN) or nerve freezing (NF) by contact with a stainless steel rod cooled in liquid nitrogen, while control rats were sham-operated. Right and left tibiae of denervated and control rats were obtained at 0, 1, 2, 3, 4 and 5 weeks after surgery. Histomorphometric analyses were performed on longitudinal sections of proximal tibial metaphyseal secondary spongiosa. Sciatic denervation by SN or NF resulted in a marked loss of trabecular bone, mostly within first 2 weeks after denervation. Trabecular bone area decreased and gradually recovered with the breaking point at 3 weeks, returning to approximately 55% of basal-control levels (at 0 weeks) by 5 weeks after NF. Both the thickness and length of trabecular bone were significantly decreased after denervation. Trabecular thickness at 5 weeks after NF was significantly greater compared to that at 3 weeks after NF and at 5 weeks after SN, while decreased trabecular length after NF did not during the experimental period. These findings suggest that 1) sciatic nerve freezing results in marked loss of trabecular bone, mostly within the first 2 weeks after surgery; 2) temporary denervation and subsequent reinnervation reversibly affects trabecular bone architecture, particularly trabecular thickness.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2008, 57 : 189~196)

key word : denervation, trabecular bone, histomorphometry, osteoid, osteopenia

I . 緒 言

骨組織は重力や運動など力学的負荷に対してその量や構造を適応させている。除神経による体肢の不活動は骨格筋の萎縮を生じさせると同時に骨量を大きく低下させ、骨梁構造も変化する^{1~4)}。骨強度は骨の量、質、構造の3つの要因に規定されており、骨梁構造はそれに影響する一要因でもある^{5,6)}。不活動とした骨は骨形成の低下と骨吸収の増加による骨量低下を示すことが報告されている^{3,7,8)}。不活動による力学的因子の低下及び卵巣摘出などによる内分泌性因子の減少にともなう海綿骨における骨量低下過程は、骨梁の狭小化や断片化を呈する所見が

観察されている⁹⁾。骨梁の断片化は力学的に有効な縦横構造を乱し、力学的刺激の伝達が低下した部分では骨梁の消失が顕著であるともいわれる⁹⁾。力学的負荷の低下や骨代謝にかかわる液性因子の減少によって一旦骨量が低下しても、薬剤や運動刺激によって骨形成能を促進もしくは骨吸収能を抑制させた場合、皮質骨や骨梁幅の増大による骨量増加並びに石灰化は改善する^{10,11)}。しかしながら、一旦断片化した骨梁間の再連結は起こりにくいとの推察もなされており^{12,13)}、一過性の廃用性骨萎縮からの骨量回復後にも、骨梁構造において完全な回復が期待できるか定かではなく、一過性の廃用性骨萎縮からの回復において、骨梁の長さや幅などの形態的回復

様相が異なることも仮説として考えられる。またこれまで不活動による骨梁幅や骨梁数の減少など各種骨組織形態計測からの報告がみられるが^{1~4)}, 狭小化と断片化の進行程度や回復過程における構造的変化については明らかではなく検討するに値する。

長期間もしくは永続的な不活動による対象組織の形態や機能の変化を研究する場合, 実験的傷害モデル動物を人為的に作成することが必要となる。神経や腱の切除手術は, 恒久的な運動器の機能不全による不活動モデルを作成する。これに対して神経凍結法では, 一定期間神経機能を麻痺せしめ, 支配筋を一時的に不活動にすることが可能であり, 一過性の不活動モデルとして, 萎縮後の回復過程も観察することができる。

本研究では, 坐骨神経を切除並びに凍結麻痺することにより下肢を一過性に不活動とし, 脛骨骨梁の形態的变化の特徴について経時的に観察し, さらに骨萎縮からの回復過程における量的構造的変化について検討した。

II. 実験方法

実験動物は, 室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 照明を12時間の明暗サイクルで制御した環境下にて飼育した11週齢の Fischer 344 系雄性ラット84匹を用い, 術前の平均体重は神経切除群(SN) $219 \pm 7\text{ g}$, 神経凍結群(NF) $219 \pm 6\text{ g}$, 偽手術対象群(Cont) $216 \pm 3\text{ g}$ であった。ペントバルビタール(50 mg/kg)麻酔下において, SN 群(33匹, 平均体重 $241 \pm 16\text{ g}$)に対しては, 左大腿骨大転子後部を切開し, ピンセットを用いて坐骨神経を露出し, $4 \sim 5\text{ mm}$ 切除した。また NF 群(33匹, 平均体重 $247 \pm 19\text{ g}$)に対しては, 同様に露出した坐骨神経に -180°C の液体窒素にて冷却したステンレス製のロッド(幅 3 mm)を5秒間押し当てて凍結麻痺せしめた^{14, 15)}。その後縫合糸で切開部を縫合し, 通常飼育にもどした¹⁶⁾。

術前及び術後1, 2, 3, 4, 5週間後に脛骨を採取し, Cont 群(18匹, 平均体重 $248 \pm 22\text{ g}$)及び各群の basal control については両脚より採取しサンプルとして分析に供した。採取した脛骨は組織化学的分析の前に計測最小単位 0.01 mm のノギスにて長軸骨長を3回計測し, その中央値もしくは2回重複値をデータとした^{17, 18)}。また, 本実験は日本生理学会により規定された「生理学領域における動物

実験に関する基本指針」および「鹿屋体育大学動物実験指針」を遵守して行った。

実験動物は麻酔下で腹混合固定液(1%グルタルアルデヒド, 1%パラフォルムアルデヒド及び0.05%塩化カルシウムを 0.1 mol/L リン酸緩衝液に溶解し, $\text{pH } 7.2 \pm 0.01$ 内に調整)を大動脈より注入し, 灌流固定を室温にて約30分間行った。採取した脛骨近位部を正中断してさらに約90分間同固定液中に浸漬した¹⁰⁾。脱灰標本の作製に供したサンプルは $0.1\text{ mol/L} \cdot \text{EDTA}$ (エチレンジアミン四酢酸を 0.1 M カコジル酸ナトリウム溶液に溶解し $\text{pH } 7.2 \pm 0.01$ 内に調整, 4°C)にて4~6週間脱灰した。その後エタノール(70, 80, 90, 95, 100%)で脱水してキシレンを介してパラフィンにて包埋した。滑走ミクロトームを用いてブロック状にした包埋試料から $5\text{ }\mu\text{m}$ の縦断薄切切片を作成し, 脱パラフィンの後にヘマトキシリン-エオシン(H-E)染色, アザン染色もしくはトルイジンブルー染色を施した。各サンプルにつき90枚以上の切片を作成し組織染色及び分析に供した。脱灰標本において類骨を染色するために, Goland-吉木法^{19, 20)}を用いて H-E 染色を行った。まず上昇エタノールで脱水した骨組織を脱灰前に塩化シアヌル液(メタノールに0.5%塩化シアヌル, 1%N-メチルモルホリン緩衝液を混合)で2日間室温にて固定した。下降エタノールで加水後, 中性 EDTA で室温にて脱灰し, 薄切後ヘマトキシリン及びエオシンBにて染色した。また非脱灰標本の作製に供したサンプルは, Kawamoto & Shimizu が報告した粘着フィルム法²¹⁾に準じて, まず液体窒素中にて一旦凍結した。次に4%カルボキシメチルセルロースゲル(CMC)に浸漬して包埋し, 再度速やかに液体窒素中にて凍結した。凍結 CMC ブロックにはトリミング後, 薄切面に粘着フィルム(polyvinylidene chloride film X Cryogluce, Fintec, Japan)を貼り付け, クライオスタット(CM3050S, Leica, Germany)にて -20°C に冷却したタングステンガーバイド刃を用いて $5\text{ }\mu\text{m}$ の縦断薄切切片を作成した。

脛骨近位端の縦断面を光学顕微鏡(BX60, Olympus, Japan)及びデジタル顕微鏡(Coolscope, Nikon, Japan)にて観察した。同時に顕微鏡に設置したCCDカメラ(PDMC II/OL, Polaroid, Japan)を介してパーソナルコンピュータに画像を取り込み, 画像解析ソ

Figure 1. Micrograph showing section of proximal tibial metaphysis with a 4.32 mm^2 ($1.8 \times 2.4\text{ mm}$) area (grayish rectangle) of central metaphysis.

フト(ImagePro Plus ver. 5, Media Cybernetics, Japan)にて脛骨近位端の骨梁断面の微細構造解析を行った^{22,23}). 骨梁の形態計測を行う対象領域は一次海綿骨を除外するため、成長板から1 mm 遠位側に離れた $1.8 \times 2.4\text{ mm}$ の領域を計測範囲とした^{24,25}(図1). 骨梁面積率の計測は対象領域の全面積に対する骨梁の占める割合として算出した. また、骨梁の幅及び長さ(連続性)の経時変化を検討するために、Mellish *et al.*²²)の結節・支柱解析をもとにして、各骨梁断面について平均骨梁幅並びにその長軸方向の平均長を計測した. 3個以上の骨梁板(strut)の結合点(結節 node)を持つ骨梁断面については、各結節間の距離および結節から自由端終末(terminus)までの距離の長軸方向の和(すなわち結節を介した終末間; terminus-node-terminus 間)を計測した²⁶). また、この計測領域の四方端にかかる骨梁板は計測から除外した.

各データは平均値±標準偏差で表示した. 骨形態計測のデータは二元配置分散分析(日数×処置による3群; SN, NF, Cont)を行い各群の経日的变化の影響について検定した. またポストホックテストとして Tukey-kramer 法を用いて統計処理を行った. 有意水準は危険率5%未満とした.

Ⅲ. 実験結果

神経切除(SN)及び神経凍結(NF)を行った場合、ラットは股関節を屈曲することは可能であるが、移

動する場合は下腿を引きずるように(dragging)していた. 尾部を持ち上げて宙吊りにした場合にも下腿は全く動かさず、SNでは実験を通して同様であった. NFでは1週目には尾部懸垂を行った場合下腿も用いて air stepping する様子が見られ始めた. 随意的に足背屈を伴う移動及び支持は3週目までには可能となっており、それ以後は麻痺の所見もなくゲージ内を移動できた.

脛骨骨長は0～5週目までの実験期間において伸長停滞することはなく(NF: 31.2 ± 0.6 から $38.9 \pm 0.8\text{ mm}$, SN: 31.7 ± 0.8 から $39.4 \pm 1.0\text{ mm}$, Cont: 31.5 ± 0.4 から $39.0 \pm 1.2\text{ mm}$), 両群とも各週において、また Cont と比較して有意な差は見られなかった.

分散分析の結果、SN 及び NF により二次海綿骨骨梁の形態的变化に対して影響があることが示され($p < 0.05$), 術後1週目から骨梁面積率は有意に($p < 0.05$)減少し、骨梁の消失過程が観察された(図2). SN の場合と比較して NF では、術後初期の骨梁面積率の低下程度は緩やかな傾向を示し、2週目においては両群に有意な差($p < 0.05$)が見られた. 3週目には SN も NF も共に同レベルの骨梁面積率まで低下し、SN は3週目以降変化はなかったが、NF では4週目から値が高くなり、5週目には術前の55%レベルまで回復し、NF の3週目及び SN の5週目の値と比較して有意に($p < 0.05$)高

Figure 2. Time course of the trabecular bone area (%) in the proximal tibial metaphysis of control, sciatic nerve freezing and neurectomized legs. ○Cont; sham control, ●NF, nerve freezing; △SN, sciatic neurectomy. * $p < 0.05$ vs. basal controls. § $p < 0.05$ vs. Cont. # $p < 0.05$ vs. SN. Values represent mean ± SD. $n=6$, in each group at each time point.

Figure 3. Time course of trabecular thickness(A) and trabecular length(B) in the proximal tibial metaphysis of control, sciatic nerve freezing and neurectomized legs. ○Cont, sham control; ●NF, nerve freezing; △SN, sciatic neurectomy. * $p < 0.05$ vs. basal controls. $S_p < 0.05$ vs. Cont; # $p < 0.05$ vs. SN. Values represent mean $\pm$ SD. $n=6$, in each group at each time point.

かった。

また骨梁構造解析の結果, Cont に対してNFでは, 骨梁の長さ及び幅が1週目から有意に($p < 0.05$)低下した(図3)。骨梁幅は3週目まで減少し, その後4週目から値が高くなり, 5週目には Cont の値と有意な差が見られなくなるまで回復した(図3A)。一方, 骨梁の長さは2週目以降 Cont より有意に($p < 0.05$)低値を示し, その後5週目まで変化が見られなかった(図3B)。SN では骨梁幅, 長さ共に術後5週目まで低値を示し, 回復することはなかった。

術後5週目の脛骨近位骨幹端の二次海綿骨領域における骨梁と断片化部位の顕微鏡写真を図4に示した。H-E染色(吉木法)により, 類骨すなわち末石灰化コラーゲン基質のみが強く紅染し, 石灰化部の淡紅色と明瞭に識別される。同一直線上に並ぶ2つの離れた骨梁板を検索し, 類骨並びに骨芽細胞の局在

について観察したところ, NFにおいて, 強く紅染した類骨は骨梁板の長辺に平均幅 $9.7 \pm 3.2 \mu\text{m}$ で縦走し, その外側に骨芽細胞が接して並んでいた(図4E)。また分離した骨梁先端間においては骨芽細胞が存在する所見が見られず, その部位においては類骨層も観察されなかった(図4F)。SNでは類骨幅はNFよりも狭く $5.7 \pm 1.3 \mu\text{m}$ で, 骨梁先端間には骨芽細胞並びに類骨層も観察されなかった(図4C, D)。一方, Contでは類骨幅はNFやSNよりも広く $10.5 \pm 2.8 \mu\text{m}$ で, 骨梁先端間にも骨芽細胞が密集し, 類骨形成の所見も観察された(図4A, B)。

IV. 考 察

本研究では坐骨神経の切除(SN)及び凍結麻痺法(NF)により下肢を不活動にしたときの脛骨の萎縮過程並びにその構造的変化について検討した。

第一に, SNとNFの手技上の効果の違いについて検討すると, SNを行った場合, 長期間もしくは永続的な不活動状態を設定しうる一方, NFでは一定期間末梢神経機能を麻痺せしめ, 支配筋を不活動な状態にすることが可能であり, 一過性の不活動モデルを作成し, 萎縮後の回復過程も観察しうる。坐骨神経凍結後の神経-筋機能の回復過程を観察した報告によると¹⁵⁾, 神経への間接電気刺激によるヒラメ筋及び長趾伸筋の単収縮張力は術後3日目まで完全になく, 1週目以降から緩やかに回復して3週目に術前のレベル及び筋への直接刺激時のレベルに回復する。また本研究でも, 下肢の動作についても, 術後約1週目で下腿部の屈伸が観察され, 3週目前後で移動運動時に術側の下肢で支持する動作が観察される。SNを行った場合, これらの所見は観察されない。NFでは一過性の機能的除神経と続く再神経支配による一連の萎縮と回復過程を観察することができる手法であると考えられる。

実際, NFとSNの骨梁面積率の経時的変化は不活動レベルを反映する傾向を示しており, 第二点目として骨萎縮過程の差異について検討した。術後3週目までの骨萎縮過程において, SNに比較してNFでは骨梁面積率はより緩徐な低下を示しており, 術後初期の骨梁面積率減少程度は, NFの場合, SNと比較して反応性は低いものと思われる。萎縮過程におけるNFとSNの下肢の動きの違いによ

Figure 4. Light micrography shows distinct eosinophilia of the osteoid matrix at the trabecular bone stained with hematoxylin and eosin. The osteoid matrix is lined with osteoblasts. Bar, 50 μ m. A-B, sham control ; C-D, sciatic neurectomy ; E-F, nerve freezing.

り、力学的ストレスの程度が異なり、その反応性に影響することも一要因と思われた。

第三に、NF における骨梁面積率回復過程について骨梁構造の変化に着目して検討すると、術後 3 週目以降、骨梁面積率は増加し、5 週目には最低値を示した 3 週目よりも有意に増加し、術前の約 50% レベルまで回復した。筋の単収縮張力からみた神経-筋機能の回復では、術前の 50% レベルに至る時期は術後約 2 週目であり¹⁵⁾、筋と骨組織との 1/2 回復過程において約 3 週間の時間的ずれが存在することが示唆された。また、NF において再神経支配による回復過程の骨梁構造の観察では、骨梁面積率の回復の経過時間と一致して骨梁幅が増大し、特に術後 5 週目には Cont と有意な差がなくなるに至った。一方、骨梁の長さには有意な増加が見られず、4 週目以降の骨梁面積率回復に骨梁の長さよりも幅の増大が貢献していることが理解された。NF による一過性の不活動からの術後 5 週目までの回復過程において、骨梁幅については構造的変化が存在すること

が示唆された。

SN による骨萎縮進行過程において、骨梁の長さは多段階的に低下しており、骨梁が分断される可能性が報告されている²⁶⁾。また、一旦断片化した骨梁間の再連結は起こりにくいものとも推察されている^{12,13)}。本研究において、骨梁面積率及び骨梁幅が回復する NF 後 5 週目の骨梁を観察すると、直列する 2 つの離れた骨梁板が観察される部位において、類骨形成並びに骨芽細胞は骨梁板の長辺に存在し、分断した骨梁先端間の間隙には類骨層並びに骨芽細胞が観察されなかった(図 4 D, F)。このことは、骨梁幅が増大することに比べ、分断している骨梁を連結するように長軸に類骨形成することが困難であることを示唆するものであろう。一過性の不活動による廃用性骨萎縮からの回復において、術後 5 週目までは完全な骨梁の構造的回復に至らないことが組織形態学的に示唆された。

本研究では、組織学に基づいた長い歴史を有するゴールドスタンダードで骨の形態計測を実施した。

この技法は二次元の組織像から三次元の構造を推定することにも応用されてきている²⁷⁾。骨における内外部の組織形態は、各細胞の活動状態に基づく組織の形成、吸収を反映する。従って、骨芽細胞や破骨細胞の計測、非石灰化領域を示す類骨や石灰化領域を観察しうる組織学的手法は、形態の裏づけを示す方法として広く普及している。また、形態計測において重要な空間分解能も高く、一般的な光学顕微鏡でも、開口数や使用光源波長にもよるが概ね $0.3\ \mu\text{m}$ 程度の分解能を有している。しかしながら、三次元の構造を理解する上では二次元の切片では推定であり、また精度を高めるために数多くの切片を作成して多大な労力と時間を必要とする。1990年ごろから高解像度の μCT が研究レベルで用いられるようになり、空間分解能も $10\ \mu\text{m}$ 程度有しており骨形態計測を進める上で重要な助けとなってきた²⁸⁾。これは高価な設備であり、広く容易に導入可能とはいえないが、非侵襲的に三次元のデータを得るばかりでなく、計測も極めて早い。今後容易に普及する条件が整備されれば、高解像度の μCT を用いた形態計測を容易に素早く進めるとともに、その根拠となる組織や細胞の動態について検討する手法が展開でき、さらなる骨研究の進展に寄与するものと思われる。

V. 総 括

本研究では、坐骨神経を切除並びに凍結麻痺することにより下肢を一過性に不活動とした脛骨骨梁の形態的变化の特徴について経時的に観察し、さらに骨萎縮からの回復過程における構造的変化について検討した。神経切除及び神経凍結による二次海綿骨骨梁の形態的变化は、術後 1～2 週目までに始まり、骨梁面積率は 3 週目まで減少したが、その減少程度は神経凍結の場合の方が低く、骨萎縮過程における骨吸収の反応性は神経切除と比較して低いものと推察された。

また神経凍結の場合、再神経支配による術後 5 週目までの骨梁面積率回復過程の観察では、術前の約 1/2 レベルの値まで回復増加した。この傾向と一致して骨梁幅が術前と有意な差がないレベルまで増大したが、骨梁の長さが回復しなかったことから、4 週目以降の骨梁面積率の回復には骨梁幅の増大が貢献していることが示唆された。一過性の不活動か

らの回復過程において、骨梁幅においては構造的な回復が認められた。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(A)(課題番号:18200041)、基盤研究(C)(課題番号:18500512)並びに鹿屋体育大学教育改善推進費(研究プロジェクト経費)によって行われた。記して謝意を表します。

(受理日 平成19年12月19日)

文 献

- 1) Turner R. T., & Bell N. H. The effects of immobilization on bone histomorphometry in rats. *J. Bone Miner. Res.*, (1986) **1**, 399-407.
- 2) Wronski T. J., & Morey E. R. Inhibition of cortical and trabecular bone formation in the long bones of immobilized monkeys. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, (1983) **181**, 269-276.
- 3) Wakley G. K., Baum B. L., Hannon K. S., & Turner R. T. The effects of tamoxifen on the osteopenia induced by sciatic neurotomy in the rat: A histomorphometric study. *Calcif. tissue Int.*, (1988) **43**, 383-388.
- 4) Young D. R., Niklowitz W. J., Brown R. J., & Jee W. S. S. Immobilization-associated osteoporosis in primates. *Bone*, (1986) **7**, 109-117.
- 5) Jensen K. S., Monseki L., & Monseki L. A model of vertebrae bone architecture and its mechanical properties. *Bone*, (1990) **11**, 417-423.
- 6) Ito M., Ohki M., Hayashi K., Yamada M., Uetani M., & Nakamura T. Relationship of spinal fracture to bone density, textural, and anthropometric parameters. *Calcif. Tissue Int.*, (1997) **60**, 240-243.
- 7) Weinreb M., Rodan G. A., & Thompson D. D. Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation. *Bone*, (1989) **10**, 189-194.
- 8) Zeng, Q. Q., Jee, W. S. S., Bigornia, A. E., King Jr. J. G., D'Souza S. M., Li X. J., Ma Y. F., & Wechter W. J. Time responses of cancellous and cortical bones to sciatic neurectomy in growing rats. *Bone*, (1996) **19**, 13-21.
- 9) Yoshida S., Yamamuro T., Okumura H., & Takahashi H. Microstructural changes of osteopenic trabeculae in the rat. *Bone*, (1991) **12**, 185-194.
- 10) Tamaki H., Akamine T., Goshi N., Kurata H., & Sakou T. Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. *Bone*, (1998) **23**, 147-153.
- 11) Kannus P., Sievanen H., Jarvinen T. L., Jarvinen M., Kvist, M., Oja, P., Vuori, I., & Jozsa, L. Effects of free mobilization and low- to high-intensity treadmill run-

- ning on the immobilization-induced bone loss in rats. *J Bone Miner Res.*(1994) **9**, 1613-1619.
- 12) Bourrin S., Palle S., Genty C., & Alexandrine C. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. *J. Bone Miner. Res.*,(1995) **10**, 820-828.
 - 13) 中村利孝, 鶴上 浩, 不動化とホルモン動態 . *THE BONE*,(1993) **7**, 87-91.
 - 14) Sakakima H., Kawamata S., Kai S., Ozawa J., & Matsuura N. Effects of short-term denervation and subsequent reinnervation on motor endplates and the soleus muscle in the rat. *Arch Histol Cytol.*(2000) **63**, 495-506.
 - 15) Takekura H., Tamaki H., Nishizawa T., & Kasuga N. Plasticity of the transverse tubules following denervation and subsequent reinnervation in rat slow and fast muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.*,(2003) **24**, 439-451.
 - 16) Takekura H., Kasuga N., Kitada K., Yoshioka T. Morphological changes in the triads and sarcoplasmic reticulum of rat slow and fast muscle fibres following denervation and immobilization. *J. Muscle Res. Cell Motil.*,(1996) **17**, 391-400.
 - 17) 松井清明, 七川歆次, ラットの脛骨皮質計測による骨定量法—実験骨定量の新しい試み—. *日本骨代謝学会雑誌*, (1983), **1**, 96-104 .
Matsui K., & Shichikawa K. Cortical thickness measurement and bone indices of rat tibia. *Jpn J. Bone Meabol.*,(1983) **1**, 96-104.(in Japanese)
 - 18) 七五三木 聡, 勝田 茂, 天貝 均, 大野敦也, 成長期の運動が引き起こす骨肥大 . *体力科学*, (1990), **39**, 181-188 .
Shimegi S., Katsuta S., Amagai H., & Ohno A. Exercise-induced bone hypertrophy in growing rats. *Jpn. J. Phys. Fitness Spots Med.*,(1990) **39**, 181-188.(in Japanese)
 - 19) Yoshiki S. A simple histological method for identification of osteoid matrix in decalcified bone. *Stain Technol.*,(1973) **48**, 233-238.
 - 20) Yoshiki S. Further considerations on a simple histological method for identification of osteoid matrix. *Stain Technol.*,(1974) **49**, 367-373.
 - 21) Kawamoto T., & Shimizu M. A method for preparing 2- to 50-micron-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem Cell Biol.*(2000) **113**, 331-339.
 - 22) Mellish R. W. E., Ferguson-Pell M. W., Cochran G. V. B., Lindsay R., & Dempster D. W. A new manual method for assessing two-dimensional cancellous bone structure: comparison between iliac crest and lumbar vertebra. *J. Bone Miner. Res.*,(1991) **6**, 689-696.
 - 23) Parfitt A.M., Mathews C. H. E., Villanueva A. R., & Kleerekoper M. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. *J. Clin. Invest.*,(1983) **72**, 1396-1409.
 - 24) Sibonga J. D., Zhang M., Evans G. L., Westerlind K. C., Cavolina J. M., Morey-Holton E., & Turner R. T. Effects of spaceflight and simulated weightlessness on longitudinal bone growth. *Bone*,(2000) **27**, 535-540.
 - 25) Stenström A., Hansson L. I., & Thorngren K-G. Effect of ovariectomy on longitudinal bone growth in the rat. *Anat. Embryol.*,(1982) **164**, 9-18.
 - 26) 田巻弘之, 我妻 玲, 春日規克, 竹倉宏明, 坐骨神経切除によるラット脛骨骨幹端の骨梁構造変化並びに骨格筋の萎縮 . *体力科学*, (2004), **53**, 403-410 .
Tamaki H., Wagatsuma A., Kasuga N., & Takekura H. Alterations of trabecular bone architecture in the proximal tibia and muscle atrophy after sciatic denervation in rats. *Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med.*,(2004) **53**, 403-410.(in Japanese)
 - 27) Waarsing J. H., Day J. S., Weinans H. Longitudinal micro-CT scans to evaluate bone architecture. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*,(2005) **5**, 310-312.
 - 28) Kuhn J. L., Goldstein S. A., Feldkamp L. A., Goulet R. W., Jesion G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J. Orthop. Res.*,(1990) **8**, 833-842.