成長期ラットの運動負荷による脛骨骨幹端部への影響

— 電子顕微鏡学的検索 —

森 本 泰 宏

九州歯科大学大学院歯学研究科小児歯科学専攻 (指導: 木村光孝教授)

平成6年10月25日受理

The Effect of Physical Exercise on the Metaphysis of Tibia in Rats at the Growth Stage

— An Electron Microscope Study —

Yasuhiro Morimoto

Department of Pediatric Dentistry (Director: Prof. Mitsutaka Kimura)
Kyusyu Dental College, Kitakyushu, Japan

The effect of physical exercise on the growth of metaphysis of tibia with electron microscope experimentally and also the effect of calcium intake with normal diet and calcium deficient diet after running exercise were investigated.

The results were as follows :

I. Scanning electron microscope findings

Among normal diet group, bone formation remarkably increased in descending order of 2-exercise, 1-exercise and no exercise groups. In trabeculae, thickness, bone mass and form of arrangement remarkably increased in descending order of 2-exercise, 1-exercise and no exercise groups. The calcium deficient diet and no exercise groups as compared with the control showed thicker chondrocyte layers and increase in width of hypertrophic zone in particular. Trabeculae continuing from subchondral bone formation zone showed active resorption findings and were formed thin. Among calcium deficient diet groups, however all groups showed about the same findings.

II. Transmission electron microscope findings

Among normal diet group, the number of osteoblasts showing active bone formation and osteocytes remarkably increased in 2-exercise, 1-exercise and no exercise groups. In the calcium deficient diet and no exercise groups in comparison with the control, osteoblasts were fewer in number and presented fibroblast-like morphology. The cytoplasm showed marked swelling of mitochondria and a marked increase in cristae. Osteocytes on the whole decreased, but many findings of osteoid osteocytes and young osteocytes were seen. Osteoclasts presented various morphology and were seen to increase and bone resorption was active. Mitochondria showed a tendency toward swelling and rough surfaced endoplasmic reticulum tended to enlarge. But, among calcium deficient diet group, all groups showed about the

same findings.

On the basis of the foregoing finding, physical exercise promotes the formation of bone matrix in the metaphysis of the tibia. It is therefore essential to take sufficient calcium.

Key words : Physical exercise / Growth / Metaphysis of tibia / Electron microscope

緒 言

骨の成長は、一般に、膜性骨化および軟骨内骨化に分類されている¹⁾。これらがお互いにバランスを取りながら骨はモデリングを行い、一定の形を保ったまま長径や幅を大きくする²⁾。この成長には、遺伝、環境など多くの因子が関与しており³⁾、これら諸因子の障害は骨構築に欠陥をもたらす。従って、子供における内部構造の虚弱化も、こうした種々の因子に生じた複合的な障害といえる。この原因を探究するため、当教室では、これまで、環境的因子の一つカルシウム不足を中心にアプローチを重ねてきた⁴⁻⁷⁾。

一方、最近の目覚ましい宇宙開発は、宇宙空間における実験系を確立し、無重力下での骨成長に関する実験を可能とした⁸⁾。この結果、骨の成長は、重力や負荷重によって規定され⁹⁾、その減少は成長抑制につながる事が確認された⁸⁾。これにより、骨虚弱化の原因として、子供たちの運動不足に注目が集まっている¹⁰⁾。しかしながら、一方で、骨変形や易骨折性の要因に、成長期における過度の運動を挙げる報告¹¹⁾もあり、運動による骨成長への影響は統一した見解を得ていない。

このような流れの中で、骨の成長と全身運動およびカルシウム摂取の関連性を検索することは非常に意義がある。その際、成長期の骨は細胞機能が活発なため、器官全体をとらえるマクロ的検索よりも細胞レベルからの積極的なアプローチが必要である¹²⁾。また、脛骨では運動による活発な骨変化が観察され¹³⁾、特に、その骨幹端部では、細胞に基づく骨構築が活発である¹⁴⁾。

以上のことから、著者は成長期ラットを用い、運動負荷とカルシウム摂取の違いが、脛骨骨幹端部での骨梁形成にどのような影響を及ぼすかについて、電子顕微鏡学的観察を行い、いささかの知見を得たので報告する。

材料ならびに方法

生後4週齢のウイスター系雄ラット（体重75g前後）54匹を用い、無作為に以下の6群に分けた。

対照群（標準食非運動群）：ラット標準飼料（オリエ

ンタル酵母工業）と水道水にて4週間飼育した。小ゲージに入れたまま、運動負荷は加えなかった。

標準食1回運動群：対照群と同様の飼料を用いて、飼育した。ただし、学習期間の後、1時間/日、12 m/分にて、5日/週走行運動を行った。

標準食2回運動群：対照群と同様の飼料を用いて、飼育した。ただし、学習期間の後、2時間/日、12 m/分にて、5日/週走行運動を行った。

Ca 欠乏食非運動群：A 食変型カルシウム欠乏飼料（オリエンタル酵母工業）と蒸留水にて4週間飼育した。小ゲージに入れたまま、運動負荷は加えなかった。

Ca 欠乏食1回運動群：Ca 欠乏食非運動群と同様の飼料を用いて飼育した。ただし、学習期間の後、1時間/日、12 m/分にて、5日/週走行運動を行った。

Ca 欠乏食2回運動群：Ca 欠乏食非運動群と同様の飼料を用いて飼育した。ただし、学習期間の後、2時間/日、12 m/分にて、5日/週走行運動を行った。

飼料の構成成分については Table 1-1, 1-2 に示している。

走行運動負荷には、ラット専用トレッドミル SN-460（シナノ社製）を用いた。これはベルト後端に弱い刺激電流が流れることにより、ラットは絶えず休みなく運動する仕組みになっている。走行時間、走行距離は Table 1-3 に示すとおり、日ごとに、段階的に増加させていき最終的には12 m/分にて、1時間および2時間の運動を行った。また運動は5日/週とした。

I. 走査型電顕試料

試料は、最初、脛骨の近位骨幹端部を取り出して矢状面に切断し、リン酸緩衝液（PH 7.2）に浸したまま、超音波洗浄にて付着物を洗浄、除去した。その後、試料は2.5% グルタルアルデヒド液にて1時間浸漬固定を行い、リン酸緩衝液で洗浄、後固定として4℃の1% オスミック酸（リン酸緩衝液 PH 7.2）に約2時間浸漬した。固定後、試料は上昇エタノール系列にて脱水、2-メチル-2-プロパノールで置換し、凍結乾燥装置（ID-2型、エイコーエンジニアリング）を用いて乾燥した。次に、試料表面にイオンスパッタ（JFC-1100, 日本電

Table 1-1 Composition of experimental diets

Ingredients	Normal diet	Ca deficient diet
β -corn starch	38.0	38.0
α -potato starch	10.0	10.0
Vitamin-free casein	25.0	25.0
Cellulose powder	8.0	8.0
Soy bean oil	6.0	6.0
Mineral mixture	★6.0	☆6.0
Granulated sugar	5.0	5.0
Vitamin mixture	▲2.0	▲2.0
	100.0%	100.0%

★ : Mineral mixture(Normal diet)

☆ : Mineral mixture(Ca deficient diet)

▲ : Vitamin mixture

Table 1-2 Composition of experimental diets

▲ Vitamin mixture (per 100g)		★ Mineral mixture (per 100g)		☆ Mineral mixture (per 100g)	
Vitamin A • acetate	50000IU	NaCl	4.66g	NaCl	4.68g
Vitamin D ₃	10000IU	MgSO ₄	7.17g	MgSO ₄	7.19g
Vitamin E • acetate	500mg	Na ₂ HPO ₄	9.35g	Na ₂ HPO ₄	9.38g
Vitamin K ₃	520mg	KH ₂ PO ₄	25.72g	KH ₂ PO ₄	28.33g
Vitamin B ₁ • HCl	120mg	Fe-citrate	3.18g	K ₂ HPO ₄	9.55g
Vitamin B ₂	400mg	KI	0.01g	Fe-citrate	3.19g
Vitamin B ₁₂	0.05mg	ZnCO ₃	0.11g	KI	6.0mg
Vitamin B ₆ • HCl	80mg	CaHPO ₄ • 2H ₂ O	14.56g	ZnCl ₂	104.0mg
Vitamin C	3000mg	Ca-lactate	35.09g	CuSO ₄ • 5H ₂ O	33.0mg
D-biotin	2mg	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.03g	MuSO ₄ • 4-5H ₂ O	128.0mg
Folic acid	20mg	MnSO ₄ • 4-5H ₂ O	0.12g	Cellulose powder	rest
Calcium pantothenate	500mg				
Nicotinic acid	600mg				
p -aminobenzoic acid	500mg				
Inositol	600mg				
Choline chloride	20000mg				
Cellulose	rest				

子)を用いて金蒸着を行い、走査電子顕微鏡 (JSM T-300, 日本電子) にて観察した。

II. 透過型電顕試料

試料は、最初、脛骨の近位骨幹端部を取り出して細切り、4℃の1%パラホルムアルデヒド-3%グルタルアルデヒド混合液にて1週間浸漬固定を行った。その後、試料はカコジル酸緩衝液で洗浄、5% EDTA-2.5% グルタルアルデヒド 混合液にて約1か月間脱灰

の後、2% オスミック酸にて後固定を行った。脱灰後、試料は上昇エタノール系列にて脱水、プロピレンオキサイドにて置換し、ケトール 812 にて包埋した。超薄切片作製には、ダイヤモンドナイフを装着したウルトラミクロトーム (LKB-4800 型, LKB) を用いた。2~3 μ m の準薄切片に調整し、0.1% トルイジンブルー染色により、光顕的に観察部位を確認した後、0.1 μ m 以下の超薄切片を作製した。次に、Watson 法による酢酸ウラニ

Table 1-3 Learning method of treadmill

Date(day)	Speed(m/min)	Time(min)
1	3	10
2	5	20
3	7	30
4	9	40
5	12	50
6	12	60

ルにて染色した後、Reynolds 法による硝酸鉛重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (JEM- 1200 EX II, 日本電子) により観察した。

結 果

I. 走査型電顕所見

脛骨近位骨幹端部切断面の全体像を成長板における軟骨層から骨梁に到るまで超微形態学的に観察した。

対照群

成長板に連続した各軟骨細胞層は、静止帯、増殖帯、肥大帯、侵食帯、軟骨下骨形成帯として明瞭に区分できた。軟骨下骨形成帯から連続して深層に至る部分は、骨化が活発で、幅広く厚い骨梁を呈していた。さらに、下方には、小骨髄腔も認められた (Fig. 1)。

軟骨層の拡大像では、増殖帯直下の肥大帯に、長径約 $20 \sim 25 \mu\text{m}$ の軟骨小腔が明瞭に区画されており、類円形、卵円形、楕円形、不正円形など様々な形態を呈していた。小腔壁には、不規則な走行のコラーゲン原線維によって、極めて密なコラーゲン原線維網が形成されていた。肥大帯下部では、軟骨小腔壁に長径約 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ 前後の石灰化小球が多数存在していた。石灰化球の表層は極めて密なコラーゲン線維網が緊密に癒合しており小球間隙もみられなかった (Fig. 2)。連続する侵食帯の軟骨小腔は不規則に配列し、基質は狭窄され索状を呈していた。

骨梁の観察では、広範囲にわたり骨形成面が骨吸収面を取り囲むように複雑に混在していた (Fig. 3)。骨形成面は比較的平坦で、長径 $15 \sim 30 \mu\text{m}$ 大の類円形や不定形を呈した浅い骨小腔が数多く存在していた。骨小腔壁面は、多数の骨細管が開口し、走行の不規則なコラーゲン原線維と一定方向に走行する密なコラーゲン原線維網で形成されていた。骨基質部分は、密なコラーゲン原線維網で形成されており、隣接するコラーゲン原線維間で交叉、吻合していた。またコラーゲン原線維には、直

Fig. 1 Metaphysis of tibia in the 8th week in the control group. (SEM)

Fig. 2 A higher magnification of Fig. 1. (SEM)

Fig. 3 A higher magnification of Fig. 1. (SEM)

径約 $0.3\mu\text{m}$ の石灰化球と思われる微細顆粒物の集合が密にまた広範囲に存在し活発な骨基質形成が行われていた。一方、骨吸収面には不定形の大小の吸収窩が多数集合しており、その窩底は比較的浅く、境界は不明瞭で凹凸を呈していた。吸収窩窩底には、骨吸収によって露出した骨小腔が存在していた。

標準食 1 回運動群

対照群と比べ、軟骨細胞層に大きな変化はないものの、軟骨下骨形成帯では骨基質形成が活発で、それに連続する幅広く厚く形成された骨梁は、太さ、走行の規則性、骨量とも増加していた (Fig. 4)。

軟骨層の拡大像では、対照群と同様、5 層が明瞭に区別され、肥大帯下部の軟骨小腔では小腔底面を含めた全ての小腔壁面が、癒合した石灰化小球で満たされていた (Fig. 5)。

Fig. 6 A higher magnification of Fig. 4. (SEM)

Fig. 4 Metaphysis of tibia in the 8th week in the normal diet group and 1 hour exercise. (SEM)

Fig. 7 A higher magnification of Fig. 4. (SEM)

Fig. 5 A higher magnification of Fig. 4. (SEM)

Fig. 8 A higher magnification of Fig. 4. (SEM)

骨梁の観察では、骨吸収面を取り囲む、骨形成面が対照群にも増して顕著に促進していた (Fig. 6, 7). 骨形成面には長径約 $15 \sim 30 \mu\text{m}$ 大の多数の骨小腔が存在した. 骨小腔内部では骨細管が開口し、その周囲は緻密なコラーゲン原線維網で取り囲まれていた (Fig. 8). 表面は比較的スムーズで、密なコラーゲン原線維が緻密な基質を形成していた.

標準食 2 回運動群

対照群、標準食 1 回運動群と比べ軟骨細胞層に大きな変化はないものの、軟骨下骨形成帯では骨基質形成が非常に活発で、それに連続する幅広く厚く形成された骨梁は、さらに太くなり、走行の規則性、骨量も増加していた (Fig. 9).

軟骨層の拡大像では、肥大帯下部の小腔壁面ならびに小腔底部に、長径約 $1.5 \mu\text{m}$ 大の多数の石灰化小球が集

合し、癒合した小球により間隙は不明瞭となっていた (Fig. 10). その表層部は、多数のコラーゲン原線維で満たされていた.

骨梁の観察では、骨吸収面を取り囲む、骨形成が標準食 1 回運動群よりさらに顕著に促進していた (Fig. 11). 骨形成面には長径約 $15 \sim 30 \mu\text{m}$ 大の多数の骨小腔が存在し、その内部には無数の骨細管が開口していた. 周囲骨基質は密なコラーゲン原線維にて構成されており、表面は比較的スムーズであった. 所々に、窩底が浅く、皿状に窪んだ骨吸収窩が存在し、その中には不整形の骨小腔が露出していた (Fig. 12).

Ca 欠乏食非運動群

対照群と比べ、軟骨層が幅広く形成され、各軟骨細胞層の区画は不明瞭な部分も多く認められた. 軟骨下骨形成帯に連続した骨梁は、細長く数も減少傾向にあり、走

Fig. 9 Metaphysis of tibia in the 8th week in the normal diet group and 2 hour exercise. (SEM)

Fig. 11 A higher magnification of Fig. 9. (SEM)

Fig. 10 A higher magnification of Fig. 9. (SEM)

Fig. 12 A higher magnification of Fig. 9. (SEM)

行も不規則であった (Fig. 13).

軟骨層の拡大像では, 上部の増殖帯や肥大帯に, 長径約 $20 \sim 25 \mu\text{m}$ で, 類円形, 不正円形の軟骨小腔が存在するものの, 小腔壁面は断裂し, 境界は不明瞭であった. その壁面の大部分は, 不規則に断裂したコラーゲン原線維の集合であった. 肥大帯下方の軟骨小腔では, 疎なコラーゲン原線維に石灰化小球が散在していた (Fig. 14).

骨梁の観察では, 対照群に比べ, 骨吸収が大幅に促進されており, 全域にわたり増加した大小の吸収窩が連続していた (Fig. 15). また, ほとんどの部分で, 対照群にみられるようなスムーズな部分は減少し, 境界不明瞭な骨小腔が骨吸収により露出していた (Fig. 16). 骨小腔壁面には骨細管が開口し, これを形成するコラーゲン原線維は疎で, 走行も不規則であり, 輪郭は不明瞭で

あった. また, 骨小腔に近い部分の基質は, 比較的コラーゲン原線維が密に分布しているのに対し小腔壁面から離れた部分では, 疎な状態を呈していた.

Ca 欠乏食 1 回運動群

Ca 欠乏食非運動群と同様, 軟骨層が幅広く形成され, この傾向は特に肥大帯で顕著であった. 軟骨下骨形成帯に連続した骨梁は, 吸収所見が旺盛で, 下方に至るまで全体的に細く形成されていた (Fig. 17).

軟骨層の拡大像では, 上部の増殖帯や肥大帯に, 小腔壁面が不完全で, 境界が不明瞭な軟骨小腔が数多く存在していた. 肥大帯下方の石灰化小球で満たされている小腔では, 小球表面のコラーゲン原線維が癒合しているものの, その程度は低く, 間隙が広く分断された部分も存在していた (Fig. 18).

骨梁の観察では, 骨吸収面が増加しており, 吸収に

Fig. 13 Metaphysis of tibia in the 8th week in the Ca deficient diet group and no exercise. (SEM)

Fig. 15 A higher magnification of Fig. 13. (SEM)

Fig. 14 A higher magnification of Fig. 13 (SEM)

Fig. 16 A higher magnification of Fig. 13 (SEM)

Fig. 17 Metaphysis of tibia in the 8th week in the Ca deficient diet group and 1 hour exercise. (SEM)

Fig. 19 A higher magnification of Fig. 17. (SEM)

Fig. 18 A higher magnification of Fig. 17. (SEM)

Fig. 20 A higher magnification of Fig. 17. (SEM)

よって露出した不完全な骨小腔が多数存在していた (Fig. 19). 小腔壁面では無数の骨細管が開口しているが、コラーゲン原線維の走行は不規則で、不完全な部分も存在していた。骨小腔周囲の骨形成面は全体的にコラーゲン原線維が豊富であるが、周囲から離れた部位では疎で、不完全なものも認められた (Fig. 20).

Ca 欠乏食 2 回運動群

Ca 欠乏食非運動群, Ca 欠乏食 1 回運動群と同様, 軟骨層は厚く, 特に肥大帯の幅が増加していた。軟骨下骨形成帯に連続した骨梁は, 吸収所見が顕著で, 下方に至るまで全体的に細く, 骨量も減少傾向にあった (Fig. 21).

軟骨層の拡大像では, 上部の増殖帯や肥大帯に, 軟骨小腔の壁面が不完全で, 境界の不明瞭なものが数多く存

在していた。肥大帯下層の軟骨小腔では, 石灰化小球が乏しいため, 小球間の間隙が広く, 分断された部分が数多く認められた。また, 軟骨小腔を通過し, 壁面を交錯, 癒合するコラーゲン原線維もみられ, その部には石灰化小球が全く存在しないところも存在していた。

骨梁の観察では, 活発な骨吸収により多数の骨小腔が露出していた (Fig. 22). 吸収面の範囲は広く, 大小さまざまな吸収窩が多数存在していた (Fig. 23).

II. 透過型電顕所見

対照群

骨芽細胞は単核の細胞で, 大きさ, 形態は様々な様相を呈し, 骨基質と少し距離を置いた状態, あるいは直接接した状態で, 一列に配列していた。骨基質形成を盛んに行っていると思われる活性の高い骨芽細胞は, 立方形, 円錐形を呈し, コラーゲン原線維に満ちた類骨層を

Fig. 21 Metaphysis of tibia in the 8th week in the Ca deficient diet group and 2 hour exercise. (SEM)

Fig. 22 A higher magnification of Fig. 21. (SEM)

Fig. 23 A higher magnification of Fig. 21. (SEM)

介して直接骨と接していた (Fig. 24). その中には、辺縁クロマチンに富み、核小体も明瞭な核が、細胞内の一侧に遍在していた。核周囲の細胞質中には発達したゴルジ装置や粗面小胞体が存在し、その周囲には遊離リボゾームと分散したミトコンドリアが認められた。粗面小胞体は規則的に層状配列しているものや一部鐘洞状を呈するものがあり、その中には直接核に接しているものも存在した。骨芽細胞間では、細胞膜が部分的に密に接した斑状のデスモゾーム様結合によりお互い癒合していた。これに対して、休止期の骨芽細胞は細胞外形が扁平化しており、長軸を骨面と平行に並べ存在していた。また、僅かな類骨層を介して骨面に接し、骨表面を薄く覆っていた。この細胞は活動期のものと比べて、核・細胞質比率は大きく、細胞内小器官も未発達であった。粗面小胞体やミトコンドリアは減少し、時にライソゾームも認められた。骨芽細胞は、石灰化した骨基質との間に介在し、細いコラーゲン原線維で占められた類骨層に細胞突起を伸長させていた。

細胞集団と隣接した新生骨基質中には、骨芽細胞と類似した幼若な骨細胞が多数認められた (Fig. 25). 大きさは骨芽細胞に比べて、小型で周囲をコラーゲン原線維によって取り込まれていた。核・細胞質比率は小さく、骨芽細胞同様、発達した粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアを有し、ライソゾームも認められた。骨の深部にいくに従い、存在する骨細胞は小型になり、細胞質の縮小傾向が著しかった。細胞内小器官の発達は低下し、ミトコンドリア、粗面小胞体及びゴルジ装置は減少していたが、ライソゾームは増加傾向にあった。また、周囲は電子密度の高い境界板によって囲まれ、その内側には類骨組織が僅かに存在していた (Fig. 26). これらの骨細胞は多方向にわたり多数の細胞質突起を骨内に伸長していた。突起間ではギャップ結合が認められ、骨質内で細胞性の網目構造を作っていた (Fig. 27).

破骨細胞は多核な不整形の巨細胞で、石灰化骨面に接したり、または骨表面から遊離した状態で存在していた。核は不整形を呈し、辺縁クロマチンに富んでいた。細胞質には核をとりまくように発達したゴルジ装置や多数のミトコンドリアが認められたが、粗面小胞体は乏しく細胞質中に分散していた。骨吸収面に存在している破骨細胞は、microvilli 状のよく発達した ruffled border を持ち、石灰化した骨組織に接していた。ruffled border に続く細胞質中には、大小多数の空泡やライソゾームが存在していた (Fig. 28). ruffled border に連続する clear zone は偽足様の幅広い突起構造を示して

Fig.24 Osteoblasts in metaphysis of tibia in the 8th week.
Control group (TEM× 5,000)
Ob : osteoblast Pob : preosteoblast

Fig.25 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Control group (TEM× 7,500)
N : nuclear M : mitochondria
rER : rough-surfaced endoplasmic reticulum

Fig. 26 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Control group (TEM $\times 5,000$)
Oc : osteocyte

Fig. 27 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Control group (TEM $\times 20,000$)
Oc : osteocyte ↓ : gap junction

いた。clear zone に続く細胞質中にはミトコンドリアや粗面小胞体などは認められなかった。一方、骨細胞の細胞質突起が破骨細胞に伸長し、両者が活発に接触していた (Fig. 29)。

標準食 1 回運動群

対照群に比べ、立方形や円錐形の骨芽細胞は増加傾向を示し、それらはモザイク状に一塊をなしていた (Fig. 30)。その細胞質中には対照群と同様、細胞外形と類似した核が存在し、核に直接接した粗面小胞体や近接したゴルジ装置、および周囲にはミトコンドリアが分散していた。

骨細胞も対照群と比べ幼若なものから成熟したものまで増加傾向を示していた。幼若なものは対照群と同様、核・細胞質比率が小さく、発達した細胞内小器官で満たされていた (Fig. 31)。骨深部にいくほど骨細胞は成熟し、細胞内小器官も乏しくなっていた (Fig. 32)。

破骨細胞も対照群同様、骨細胞と直接接している像が数多く認められ、活発な骨構築を行っていた (Fig. 33)。細胞は不整形を呈し、核周囲には発達したゴルジ装置、多数のミトコンドリアや空胞が認められ、数多くの粗面小胞体が核に直接または近接し、存在していた。また、ruffled border に続く細胞質中には、大小多数の空胞やライソゾームが存在していた。

標準食 2 回運動群

対照群、標準食 1 回運動群より円錐形、立方形の骨芽細胞が顕著に増加するとともに、破骨細胞の貪食も見られ骨改造が活発に行われていた (Fig. 34)。

類骨組織中には、細胞内小器官に富み、核・細胞質比率の小さい、幼若骨細胞が存在していた (Fig. 35)。また、幼若なもの、成熟したものを問わず骨細胞は、増加傾向を示していた。これらの細胞はギャップ結合やデスモゾーム様結合でお互い癒合していた (Fig. 36)。

破骨細胞は対照群、標準食 1 回運動群と同様、不整形をなし、細胞質中には発達したゴルジ装置、粗面小胞体やミトコンドリアが存在していた。また、前破骨細胞の周辺には前骨芽細胞や未分化間葉細胞など数多くの細胞が群をなし活発に骨構築を行っていた (Fig. 37)。

Ca 欠乏食非運動群

対照群に比べ、立方形及び円錐形を呈す骨芽細胞は減少傾向を示していた。細胞質中には、細胞外形と類似した核と、著しく膨張し、配列の乱れた粗面小胞体を有していた。ミトコンドリアは膨化傾向を示すものが多く、ゴルジ装置も未発達であった。これに対して、骨基質と

接する骨芽細胞の多くは、扁平化しており、骨面と長軸を平行にして単層に配列していた。また細胞内小器官の未発達な類円形の前骨芽細胞を数多く認め、それらは層状に配列していた (Fig. 38)。さらに、一部のものにはライソゾームも認められた。

骨細胞は、対照群と比べ、全体的に減少傾向を示したが、粗面小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官に富む類骨内骨細胞は増加していた (Fig. 39)。これらの中には、ライソゾームも存在していた。

破骨細胞は対照群と比べ、大型のものから小型のものまで多様化し、増加していた。核は不整形で辺縁クロマチンに富み、その周囲にはゴルジ装置が存在していた。ミトコンドリアは膨化傾向を示し、クリステの増加に伴って数も増加していた。破骨細胞の一部には ruffled border の指状突起が疎で、clear zone の形態に類似しているものもあったが、多くのものは発達したひだ状の ruffled border を有し、それに続く clear zone を介して石灰化骨面に接していた。ruffled border に続く細胞質中には、針状結晶を含んだ大小多数の空胞やライソゾームが存在していた (Fig. 40)。

Ca 欠乏食 1 回運動群

骨芽細胞は円錐形や立方形を示すものが減少し、休止期骨芽細胞が増加していた。ミトコンドリアは非運動群と同様、膨化傾向を示していた。

骨細胞も減少傾向を示したが、細胞内小器官に富んだ類骨内骨細胞は増加していた (Fig. 41, 42)。

破骨細胞に関しては、Ca 欠乏食非運動群同様、対照群に対し、増加傾向を示し、形態も多様化していた。核は不整形をなし、数が増加していた (Fig. 43)。

Ca 欠乏食 2 回運動群

骨芽細胞は円錐形や立方形を示すものが減少し、休止期骨芽細胞が増加していた。

骨細胞も全体的に減少傾向を示したが、不完全な石灰化を伴う部分の増加により、類骨内骨細胞は増加していた。また、ライソゾームの発達や境界板の部分的消失を伴い、pericellular sheath に無数の羊毛状構造を認める骨細胞が存在していた (Fig. 44)。

破骨細胞も増加し、多核で不整形をなしていた。ruffled border は発達したひだ状を呈し、それに連続した clear zone を介して石灰化骨表面に接していた。ruffled border に続く細胞質中には、ミトコンドリア、ゴルジ装置ならびに、大小多数の空胞とライソゾームが存在していた (Fig. 45)。

Fig. 28 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8th week.
Control group (TEM× 5,000)
Ocl : osteoclast CZ : clear zone
RB : ruffled border

Fig. 29 Osteocyte and osteoclast in metaphysis of tibia in the 8th week.
Control group (TEM× 5,000)
Ocl : osteoclast Oc : osteocyte

Fig. 30 Osteoblasts in metaphysis of tibia in the 8th week.
Normal diet and 1 hour exercise group

(TEM× 5,000)

Ob : osteoblast

Fig. 31 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Normal diet and 1 hour exercise group

(TEM× 6,000)

Oc : osteocyte

Fig. 32 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Normal diet and 1 hour exercise group

(TEM× 7,500)

Oc : osteocyte

Fig. 33 Osteoclast and osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Normal diet and 1 hour exercise group

(TEM× 4,000)

Ocl : osteoclast Oc : osteocyte

Fig.34 Osteoblast and osteoclast in metaphysis of tibia in the 8th week.
Normal diet and 2 hour exercise group

(TEM× 3,000)

Ocl : osteoclast Ob : osteoblast
Tr : trabecula

Fig.35 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Normal diet and 2 hour exercise group

(TEM× 7,500)

Oc : osteocyte

Fig.36 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Normal diet and 2 hour exercise group

(TEM× 4,000)

Oc : osteocyte

Fig.37 Preosteoblast and preosteoclast in metaphysis of tibia in the 8th week.
Normal diet and 2 hour exercise group

(TEM× 4,000)

UMC : undifferentiated mesenchymal cell
Pob : preosteoblast Pocl : preosteoclast

Fig. 38 Osteocyte, osteoblast and undifferentiated mesenchymal cell in metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca deficient diet and no exercise group.

(TEM $\times 5,000$)

Pob : Preosteoblast N : nuclear
UMC : undifferentiated mesenchymal cell
Ob : osteoblast Oc : osteocyte

Fig. 39 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca deficient diet and no exercise group.

(TEM $\times 4,000$)

Oc : osteocyte

Fig.40 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca deficient diet and no exercise group.

(TEM× 6,000)

RB : ruffled border CZ : clear zone
M : mitochondria

Fig.41 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca deficient diet and 1 hour exercise group.

(TEM× 7,500)

N : nuclear M : mitochondria
rER : rough-surfaced endoplasmic reticulum

Fig.42 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca deficient diet and 1 hour exercise group.

(TEM× 5,000)

N : nuclear M : mitochondria

rER : rough-surfaced endoplasmic reticulum

Fig.43 Osteoclast and osteoblast in metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca deficient diet and 1 hour exercise group.

(TEM× 4,000)

N : nuclear M : mitochondria

Ob : osteoblast

Fig.45 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca deficient diet and 2 hour exercise group.

(TEM× 7,500)

N : nuclear M : mitochondria
RB : ruffled border V : vacuole

考 察

近年、骨粗鬆症の患者の激増から、いかにして成長期に骨量を増加させ最大骨量を高いレベルで獲得するかが大きな課題となっている¹⁵⁾。若年期における骨量を増すための大きな要因は、運動と栄養である¹⁰⁾。しかし、現代の子供達の生活はCa摂取量¹⁶⁾、運動量¹⁰⁾ともに大きく不足していると考えられる。特に、運動に関しては、運動不足だけでなく、過度の運動も骨の虚弱化を引き起こす¹¹⁾と考えられ、未解決な問題が多く残されている。そこで、今回、著者は、成長期ラットに運動負荷を加え、同時にカルシウム摂取量の異なる飼料にて飼育した際、脛骨近位骨幹端部の骨梁形成にどのような影響を及ぼすかについて検索した。

I. 条件設定

実験動物の選定にあたっては、成熟期に達する期間や飼育の容易さおよび遺伝的影響¹⁷⁾を考慮しウイスター系雄ラットを使用した。この動物は、純系が得やすく個体間の変動が他の実験動物に比べて少ないため遺伝の影響を受けにくい¹⁸⁾。飼育開始の時期は、ヒトの歩行学習および走行可能な時期である約1歳6か月と2歳¹⁹⁾に相当する、4週齢のものをを使用した。

飼料および飼育方法に関しては、当教室がこれまでにやってきた成長発育に関する実験^{4,5,18)}と同一条件にした。

運動量については、運動負荷の効果を得るために、単位時間あたりに自由運動量を上回る設定を行わねばならない²⁰⁾。雄ラットの自由運動量は、8週齢で1～2 km/日、10～11週齢では7～8 km/日とピークに達し、以後段階的に減少し16週齢では5 km/日となる²¹⁾。この報告より、5～7週齢の自由運動量は1～2 km/日以下と考えられる。今回の実験では1時間に720 mの運動負荷を加えており、単位時間当りの自由運動量を充分上回るものであった。一方、骨への影響は、運動の強度、頻度、時間の程度によっても大きく変化してくる^{12,22,23)}。山岡ら(1963)²⁴⁾はラットによる負荷運動の質と発育に関する研究を行った際、1 km/時にて80分間走行させたものは、安静状態のものと比較し、心筋・腓腹筋の重量、蛋白量、安静代謝量、心電図におけるT波/R波など機能面の成長が促進したと述べている。しかし、同時に、倍の速度で時間を半分にした群では発育が抑制されたと報告している。この結果、山岡ら(1963)²⁴⁾は短時間の過激な運動よりも、比較的軽度な運動を長時間にわたって負荷する方が機能の発育に効果的であることを推

察している。このことは、骨においても同様で、Boothら(1975)²⁵⁾は、低強度のトレーニングは成長期にある動物の骨の長軸成長や径の成長に促進効果をもたらし、高強度のトレーニングは逆にそれを抑制すると仮定している。このことより、本実験では低強度の運動を長時間行うことを選択し、速度は12 m/分、頻度、時間は1および2時間に設定した。また、予備実験の際、脛骨骨幹部の骨塩量測定や破砕強度試験などにより、本実験の運動量で骨の内部構造を強固にする^{26,27)}ことを確認している。これらの結果を総合して考えると今回の運動量は骨の成長に有効であると考えられる。

また、運動負荷を与える上で、ストレスとの関係を見視することはできない。運動負荷とストレスの関係は、過去の研究者²⁸⁻³¹⁾により、副腎の重量およびカテコールアミン濃度、グルコルチコステロイドの血中濃度などから検索が行われている。特に、グルコルチコステロイドは、運動による成長抑制に関係する内分泌因子と考えられ³²⁾、その関与の有無は、骨形成と運動を考える上で非常に重要である。Buuckら(1971)³³⁾は、ラットに走行負荷を加えコルチコステロイドレベルを検索した際、2～4週では、レベルの上昇を確認するものの、6週目以降減少し、8週目では正常レベルで安定したと述べている。また、Frenklら(1962)³⁴⁾も、ラットに水泳運動を負荷し、コルチコステロイドレベルを検索した際、最初の約3週間は増加を認めるものの、それ以後約6週目ではほぼ正常レベルか、それに近い状態で安定してくると報告している。つまり、短時間の急激な運動はコルチコステロイドの血中濃度を上昇させるものの、長期的に習慣化させることにより、その増加は、次第に減少し正常付近で安定化してくる。本実験では、運動期間が長期で運動量自体も強くないことより、コルチコステロイドによる成長の抑制はほとんどないと考えている。一方、Buuckら(1971)³³⁾は、長期の習慣的運動により副腎の大きさや重量が増加したと報告している。勝田ら(1991)¹²⁾も成長期のラットに運動負荷を与えた際、副腎の重量を測定し運動群が有意に大きかったと述べている。また、樋口ら(1982)²¹⁾は自由運動によるラットの血中カテコールアミン濃度を検索し、運動量が多い時期には濃度の上昇を、少ないときには低下を確認している。副腎の重量、大きさ、カテコールアミン濃度に関しては、本実験でも変化していることが充分考えられるため、今後さらに検討が必要である。

II. 電子顕微鏡的所見

標準食群のSEM像では、運動群、非運動群とも江川

ら (1980)³⁵⁾ の観察同様、軟骨層の明瞭な区分と骨梁での活発な基質形成が認められた。これらの所見は、当教室においても同様の報告が多数⁵⁻⁷⁾認められ、軟骨内骨化における一般的な組織像であると思われる。特に、軟骨層では、運動群、非運動群とも、Boyde (1972)³⁶⁾ が、脛骨骨幹端部にて観察している石灰化小球の集合を確認した。この石灰化小球は、ハイドロキシアパタイトとされ^{37,38)}、軟骨内骨化における初期石灰化との密接な関係³⁹⁾が論じられている。このため、今回、運動による骨梁形成に先立って、小球の大幅な増加が予想されたが、多少の沈着にとどまり、大きな変化は確認できなかった。一方、軟骨細胞の大きさに関しても、変化はほとんどなく、勝田ら (1991)¹²⁾ の報告する、運動依存的拡大は確認できなかった。これに対し、骨梁では、活発な骨基質形成の際に出現する類円形の骨小腔⁴⁰⁾や緻密なコラーゲン線維が運動依存的に増加し、運動負荷による骨改造現象の活性化が認められた。つまり、今回の実験では、運動効果が骨梁部にのみ限定され、軟骨層においてはほとんど認められなかった。この原因には、運動量の程度、飼育方法および期間などが挙げられるが、運動量の程度が最も大きく関与しているものと思われる。しかし、運動量に関しても、骨梁形成は促進しているため、初期石灰化の段階である軟骨層を刺激するに至らなかったものとは考えにくい。今回の場合、軟骨層での石灰化の速度が速すぎたため、結果としての骨梁形成しか観察されなかったのではないかとと思われるが、今後の検討が必要である。

一方、TEM 像では、SEM の所見を裏づけるように、活発な骨形成を示す円錐形、立方形の骨芽細胞が運動依存的に増加傾向を示した。骨芽細胞は、骨形成において、最も重要な細胞⁴¹⁾であり、年齢、代謝活性およびホルモンなどの影響によって、大きく変化する⁴¹⁾。また、*in vitro* においては圧縮などの力学的刺激に対しても骨芽細胞の変化が確認されている⁴²⁾。さらに、Rodan ら (1978)⁴³⁾ や Pilla (1974)⁴⁴⁾ は電磁場の変化により骨芽細胞の細胞膜構造が変化することも報告している。このような報告は、骨芽細胞におけるメカノレセプターの存在を示唆するものとして注目されている。本実験による骨芽細胞の増加も、Pilla (1974)⁴⁴⁾ の報告にあるように、刺激による膜構造の変化に伴って前骨芽細胞の活性化が増加した結果とも考えられる。つまり、運動負荷が、力学的刺激として作用した際、骨芽細胞の膜構造に変化を誘発し、これに伴って細胞の分化・増殖が活性化されたことが推定される。骨細胞に関しても、形成期、吸

収期、変性期のものまで⁴⁵⁾運動依存的に増加傾向を示していた。これにも、運動負荷による骨細胞への直接作用が考えられている⁴⁶⁾。しかし、骨細胞では、負荷に対する作用点として、骨芽細胞のような膜に存在するメカノレセプターとは異なり、骨細胞間での、一大細胞性ネットワークが重要な役割を果たすと考えられている⁴⁶⁾。つまり、このネットワークには、従来から考えられてきた細胞の情報伝達、刺激の伝導⁴⁷⁾以外に、小澤ら (1994)⁴⁶⁾ の提唱する力学的刺激に対するレセプターとしての働きが推察されている。これは、骨に対する物理的内部応力に対応してこのネットワークが歪むことにより力学的刺激を細胞に伝えるといった考え方である。本実験での骨細胞の増加も、運動による物理的な力が、細胞性ネットワークに作用した結果と考えることもできる。

破骨細胞に関しては、運動による大きな変化はなく、発達した ruffled border とそれに連続した clear zone をもつものが数多く存在していた。ruffled border の作用としては、骨吸収機能⁴⁸⁾が、clear zone では、微小環境の形成⁴⁹⁾が一般的に示唆されているため、今回の所見から、標準食群で、骨の食食が活発に行われていたことは明白である。従って、SEM 所見とも併せて考えると、標準食群においては、運動負荷により破骨細胞による骨吸収はほぼ変化せず、運動効果による骨芽細胞の増加が大幅な骨形成を引き起こしたことが示唆される。一方、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に関しては、Burger ら (1984)⁵⁰⁾、Takahashi (1988)⁵¹⁾、Udagawa ら (1989)⁵²⁾ が、*in vitro* において、破骨細胞の分化における骨芽細胞の必要性を報告して以来、破骨細胞が活性化の際、骨芽細胞からの直接作用および液性因子の分泌が考えられている。この作用は、電顕的にも骨芽細胞と破骨細胞の接触という形で確認され、本実験でも、2回運動群に同様の所見を観察している。しかし、この所見は、非運動群や一回運動群で確認することはできなかったため、運動効果として細胞間の作用の活性化が示唆される。

カルシウム欠乏食群では、SEM の所見から、対照群に比べ軟骨層の増加や骨基質形成の低下、および吸収像の増加をそれぞれ確認したが、運動による大きな変化はみられなかった。これに関して、町田ら (1990)⁵³⁾ は、ラットに低カルシウム状態で走行負荷を加え、組織学的に検索した結果、骨量の増加は認められなかったと報告している。一方、Layon ら (1986)⁵⁴⁾ も、低カルシウム状態で力学的刺激による骨変化を組織学的に検索した結果、骨量の増進はみられなかったとしている。しか

し、同時に、彼ら⁵⁴⁾は、低カルシウム下でも負荷重が生理的状态のものと不動化を惹起させたものとは、不動化を惹起させたものに骨吸収の顕著な増加が起こっていたとも述べている。このことは、一見矛盾しているように感じるが、本実験結果とも考えあわせると、カルシウムの欠乏下では、運動などの刺激により生理的范围を超える骨形成の促進は不可能で、一方、生理的状态でない不動化はさらに吸収の促進を伴い、骨の虚弱化が増悪することが示唆される。つまり、町田ら(1990)⁵³⁾が述べているように、適当なメカニカルストレスによって骨代謝回転を形成優位とするためには、全身的なカルシウム代謝が正常に機能する必要があるものと思われる。

一方、TEM像でも、運動群、非運動群に変化はなく、円錐形、立方形を示す骨芽細胞が減少し、扁平化した休止期骨芽細胞が増加していた。これらの所見は、当教室におけるラット下顎頭の観察でも、同様の報告が多数⁵⁻⁷⁾認められる。つまり、持続的カルシウム欠乏状態では、骨基質形成の低下が示唆される。これに関しては、SEM像でも、肥大層下部に、石灰化小球間の癒合不全を確認している。これも、木村ら(1991)⁵⁵⁾が述べているように、カルシウムの欠乏が、初期石灰化の段階で軟骨基質の形成を抑制し、連続するように骨基質の形成も抑制することを示唆するものと思われる。しかし、実験期間の極めて短い、Tompsonら(1974)⁵⁶⁾の報告では、ラットをカルシウム欠乏食で飼育した際、破骨細胞の数や核の増加とともに骨芽細胞数の増加を観察している。つまり、カルシウム欠乏も初期の段階では、破骨細胞の急速な増加に対し、抑制の形で骨芽細胞も急速に増加するが、持続的なカルシウム欠乏状態では、骨芽細胞の増加もおさまり、骨形成の低下が認められるようになる。しかも、この現象は、運動負荷によって抑制できないものであることが町田ら(1990)⁵³⁾の報告や本実験から示唆される。また、骨細胞に関しても、全体的な数の減少傾向を認めている。しかし、カルシウムの不足により、石灰化が不完全な類骨層が増加したため類骨内骨細胞は増加していた。さらに、2回運動群では、Baud(1968)⁵⁷⁾、Belanger(1969)⁵⁸⁾の報告する、骨細胞性骨溶解の可能性を示す所見も確認している。これらの所見も、カルシウムの持続的欠乏が骨基質の形成を妨げていることを表すとともに、運動負荷が無効であることを示している。

破骨細胞に関しては、福島(1993)⁵⁾の報告と同様、数の増加や形態の多様化が認められた。しかも、この所見は、運動群、非運動群ともに変化はなく、運動による

効果は認められなかった。この現象に関しては、先に述べたとおり、持続的なカルシウムの欠乏状態では、運動負荷による骨構築の優位性は起こり得ないことを示唆する。しかし、不動化などの非生理的状态では、カルシウムの不足はさらに骨吸収を増悪させ、骨構築を抑制する。一方、カルシウム欠乏状態での骨構築の抑制について、稲川(1992)⁶⁾や高野(1990)⁷⁾は、破骨細胞の活性低下が骨芽細胞の機能低下を引き起こし、骨のモデリングが減少している結果と考察している。しかし、本実験の結果からは、破骨細胞の多様化に伴う積極的な骨吸収と活性化した骨芽細胞の減少に伴う骨形成の低下が相乗的に起こっている結果と考えられる。この見解には、Weinrebら(1989)⁵⁹⁾にも同様の報告を認めるものの、異論も多いことから、今後更なる検討が必要である。

Ⅲ. 総括的考察

本実験での、運動効果については大きく分けて二つの作用が考えられている⁶⁰⁾。一つには、骨に直接作用する局所的な力学的刺激であり、もう一つは全身的因子に伴う間接的な影響である。このうちの一つ力学的刺激と骨との関係は、Wolff's law⁶¹⁾として古くから報告されており、bone cells⁶²⁾に基づく骨改造現象⁶³⁾としてとらえることができる。つまり、加えられた力学的刺激がbone cells⁶²⁾に作用し、吸収と形成のバランスを制御するため、器官レベルにおける骨の形状と構造が変化する。その際、力学的刺激による骨形成の機序として、Kohlrusch(1924)⁶⁴⁾は、運動時に骨端軟骨へ加わる力学的な圧力を推察している。また、Shillingら(1992)⁹⁾は、局所的な荷重負荷の程度により骨形成が規定されていると述べている。一方、Everettら(1984)⁶⁵⁾は、運動に伴う筋肉の増強が骨量を維持、増加させると報告している。Savilleら(1969)⁶⁶⁾も、運動による筋肉の肥大は、骨を変化させ、同時にCa含有量も増加させると述べている。本実験でも、運動負荷が力学的刺激として直接的あるいは筋肉組織を増強することにより間接的に作用し、骨梁形成を促進したことが想定される。しかし、Jamesら(1986)⁶⁷⁾は、今回の結果とは異なり、強い運動は長管骨の成長を妨げ、結果として柔軟な骨が形成されると述べている。この報告は、成長期における運動効果の抑制作用を意味している。この現象について、七五三木ら(1988)²³⁾や勝田ら(1991)¹²⁾は運動が骨量増加の誘因となるにはある閾値以上の運動時間および量が必要であるが、逆にその程度が過度になると効果はむしろ低下すると述べている。同じく、スポーツ医学の分野でも、過度の運動を行った際、骨の変形や内

部構造の虚弱化が生じることが確認されている¹¹⁾。James ら (1986)⁶⁷⁾ の報告による内部構造の柔軟化はこれらのことが大きな原因であると思われる。

一方、Maki (1985)⁶⁸⁾ は電流刺激による長管骨の変化を検索し、電氣的刺激群では、骨梁表面の骨芽細胞の数が増加するとともに、電頭的にも細胞内小器官、とくに豊富な粗面小胞体を持つものが確認されたと述べている。また、軟骨内骨化に関しても、電氣刺激群ではコラーゲン原線維の増生に伴い骨化の顕著な促進を確認している。Watson ら (1975)⁶⁹⁾ も、電磁場刺激の作用で、鳥における骨の添加性および縦方向の成長が促進されることを確認し、電氣刺激による骨の成長促進を報告している。本実験の SEM 像でも、骨梁部でコラーゲン原線維の増生や骨量の増加が、運動依存的に促進していた。一方、TEM 像でも Maki (1985)⁶⁸⁾ の観察同様、豊富な粗面小胞体を持つ骨芽細胞の運動依存的な増加を確認している。さらに、2 回運動群では活発に骨形成を行っている骨芽細胞に混じって破骨細胞も確認されており、bone cells⁶²⁾ に基づく骨改造現象が活発に行われていることを示唆していた。これらのことから、本実験においても、保田ら (1954)⁷⁰⁾ が述べているように、運動における力学的刺激の一部が電氣的エネルギーとして働き、bone cells⁶²⁾ の分化、増殖を促進した可能性が考えられる。

また、これらの作用に伴って bone cells⁶²⁾ 自体が細胞膜構造を変化させることも確認されている。Rodan ら (1978)⁴³⁾ は、電磁場の変動により、細胞内で Na や Ca 流量の変化がおき、DNA 合成の引き金となると推察している。Pilla (1974)⁴⁴⁾ も電氣刺激を与えることにより細胞膜のイオン透過性に変化が起き、骨形成に関与している未分化間葉系細胞の活性化が生じると述べている。先に述べたとおり、本実験においても、運動負荷が、力学的および電氣的刺激として作用した際、bone cells⁶²⁾ の膜構造の変化を誘発し、骨芽細胞の数や形態が変化したことが考えられる。

一方、運動負荷による骨変化を力学的刺激以外の全身的变化からとらえた報告として、鈴木ら (1990)⁷¹⁾ は、運動低下に伴う骨萎縮時に、血流量の減少を報告している。また、松永ら (1992)⁷²⁾ も、アルカリフォスファターゼ活性陽性の骨髄細胞の分化、促進の際、血流量の増加を確認している。これらのことから、骨形成の一要因として血流量の関与が考えられる。今回の運動により血流量の増加⁷³⁾ が生じることが明白で、これに伴う栄養量、酸素量の増加が、bone cells⁶²⁾ の新陳代謝を促進し

た可能性が示唆される。

また、運動によるホルモン動態の変化に伴って⁷⁴⁾、カルシウム調節ホルモンも変化するため、骨に対する影響が考えられる。Burkhart ら (1967)⁷⁵⁾ や Lindgren (1976)⁷⁶⁾ は、不動性骨萎縮時の骨量減少が、副甲状腺の摘出により抑制されたことを確認し、不動化骨に対する副甲状腺ホルモンの関与を示唆している。また、John ら (1985)⁷⁷⁾ は、運動負荷によりカルシトニンの分泌が増加すると報告し、考察の中で、強度の運動によりカルシウムイオンの活性が増加し、カルシトニン分泌の刺激と PTH 抑制が起こると述べている。Ruben ら (1981)⁷⁸⁾ は、運動による骨量増加は血清カルシウムレベルの増加によるものであり、PTH を減少させ血清カルシトニンレベルを上昇させることは運動による高カルシウム血症を抑制し、骨からの過度の骨吸収を防ぐ作用があると考えている。本実験においては、運動時のカルシウム濃度やカルシトニン、副甲状腺ホルモン濃度の検索は行っていないが、運動負荷に基づくカルシウム調節ホルモンの変化が、骨構築に大きく関与した可能性は極めて強い。

一方、ホルモン動態の変化は、カルシウム調節ホルモンに限ったことではない。Davee (1988)⁷⁹⁾ は、運動や荷重の増加により、血液中の IGF-I レベルが増加すると述べている。Kelly (1990)⁸⁰⁾ も、運動による骨密度を増加させる因子として IGF-I の作用を考えている。IGF-I は骨芽細胞の機能と直接関係すると考えられており、今回、運動群において、活性化した骨芽細胞の増加傾向を示したことは、この作用が一つの要因とも考えられる。一方、Border ら (1986)⁸¹⁾ は、運動により成長ホルモンの増加を認めている。このホルモンの骨に対する主な効果は骨端軟骨の成長促進であり、本実験において、骨梁形成が促進的に働いたことはこの作用の関与も考えられる。

結 論

骨の成長に対する運動負荷およびカルシウム摂取の関連性を検索するために、生後 4 週齢のウイスター系雄ラットに走行負荷を加え、同時にカルシウム含有量の異なる飼料で飼育し、脛骨骨幹端部の骨梁における基質形成を電子顕微鏡にて観察した。

I. 走査型電顕所見

対照群では、成長板に連続した各軟骨細胞層は、静止帯、増殖帯、肥大帯、侵食帯、軟骨下骨形成帯として明瞭に区分できた。さらに、軟骨下骨形成帯から連続して

深層に至る部分は、骨化が活発で幅広く厚い骨梁を呈していた。

標準食群間の比較では、対照群（非運動群）＜1回運動群＜2回運動群の順で、軟骨下骨形成帯での骨基質形成が活発であった。また、それに連続する幅広く厚く形成された骨梁も、太さ、走行の規則性、骨量に関して対照群（非運動群）＜1回運動群＜2回運動群の順で増加傾向を示していた。

Ca 欠乏食非運動群では、対照群と比べ、軟骨層が幅広く形成され、この傾向は特に肥大帯で著しかった。同時に、各軟骨細胞層の区画は不明瞭な部分も多く認められた。軟骨下骨形成帯に連続した骨梁は、大幅な骨吸収により、細長く、走行も不規則で、骨量も減少していた。

Ca 欠乏食群間の比較では非運動群、1回運動群、2回運動群で大きな変化はなく、ほぼ同様の所見を呈していた。

II. 透過型電顕所見

対照群では、活性の高い骨芽細胞がコラーゲン原線維に満ちた類骨層を介して骨と接していた。細胞集団と隣接した新生骨基質中には、骨芽細胞と類似し、細胞内小器官に富んだ幼若な骨細胞が多数認められた。骨の深部にいくに従い、成熟した骨細胞は小型になり、核・細胞質比率は増加し、細胞質の縮小化が著しかった。これらの骨細胞は多方向にわたり多数の細胞質突起を骨内に伸長していた。突起間ではギャップ結合が認められ、骨質内で細胞性の網目構造を作っていた。破骨細胞は、不整形を呈しミトコンドリアが豊富で、石灰化骨面とは ruffled border により接していた。

標準食1回運動群では、対照群に比べ、立方形や円錐形の骨芽細胞の数が増加傾向を示していた。骨細胞も対照群と比べ幼若なものから成熟したものまで増加傾向を示していた。

標準食2回運動群では、対照群、標準食1回運動群より円錐形、立方形の骨芽細胞の数が増加し、さらには破骨細胞の貪食も見られ骨改造現象が活発に行われていた。骨細胞の数も幼若なもの、成熟したものを問わず増加していた。また、これらの細胞がギャップ結合やデスメゾーム様結合でお互い癒合していた。

Ca 欠乏食非運動群では、対照群に比べ立方形、円錐形の骨芽細胞の数は減少傾向にあり、細長く、扁平化した骨芽細胞が増加していた。また、細胞内小器官が未発達で類円形の前骨芽細胞が層状をなしていた。ミトコンドリアは膨化傾向を示すものが多く、ゴルジ装置も未発

達であった。骨細胞は、対照群と比べ、全体的に減少傾向にあるが、粗面小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官に富む類骨内骨細胞は増加していた。破骨細胞は対照群と比べ多様化し、比較的大型のものから小型のものまで認められ、数が増加していた。破骨細胞の一部には ruffled border の指状突起が扁平化したものも存在していたが、多くのものはひだ状を呈し、それに続く clear zone を介して石灰化骨面と接していた。

Ca 欠乏食群間では非運動群、1回運動群、2回運動群で大きな変化はなく、ほぼ同様の所見を呈していた。

以上のことから、成長期に運動を行うことは、bone cells の活性化に基づいて、脛骨骨幹端部骨梁の基質形成に大きく寄与し、その際、カルシウム充足が不可欠な要因であることが示唆された。

稿を終わるにあたり、終始ご懇切なる御指導と御校閲を賜った恩師木村光孝教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また、実験にご協力いただいた九州歯科大学小児歯科学講座の各位、中央研究室の荒井秋晴先生、口腔解剖学第一講座の井手口正先生に心から感謝致します。

本論文の要旨は、平成6年5月23日、第32回日本小児歯科学会総会、平成6年6月11日、第54回九州歯科学会総会において発表した。

なお、本論文の一部は、平成6年度九州歯科大学後援会研究補助金および平成6年度財団法人富徳会研究者助成金の援助により行った。

引用文献

- 1) John, A. O.: Chondro-osseous development and growth. Fundamental and clinical bone physiology. J. B. Lippincott Co., Philadelphia and Toronto, 1980, 108-109.
- 2) Sissons, H. A.: The growth of bone. The biochemistry and physiology of bone. Academic Press, New York, San Francisco and London, 1972, 145-180.
- 3) Limburgh, V.: A new view on the control of the morphogenesis of the skull. Acta Morphol. Neerl. Scand. 8: 143-160, 1970.
- 4) 西田郁子, 曾我富美雄, 松田容士子, 竹下尚利, 赤嶺秀紀, 高橋宙丈, 木村光孝: 虚弱骨に対する高カルシウム療法の効果に関する実験的研究. 小児歯誌 30(4): 755-766, 1992.
- 5) 福島直樹: 成長期下顎頭の骨基質形成に関する電子顕微鏡学的研究—高タンパク質の影響—. 九州歯会誌 47: 75-

- 98, 1993.
- 6) 稲川祐成: 虚弱骨に対するカルシトニン, 活性型ビタミン D₃ の併用療法に関する光顕的ならびに電顕的研究—下顎頭の変化—. 九州歯会誌 46: 140-175, 1992.
 - 7) 高野 治: 虚弱骨に対する生理活性物質の影響に関する X 線の, 光顕的ならびに電顕的研究—とくに下顎頭の変化—. 九州歯会誌 44: 890-919, 1990.
 - 8) Jee, W. S. S., Wronski, T. J., Morey, E. R. and Kimmel, D. B.: Effects of spaceflight on trabecular bone in rats. *Am. J. Physiol.* 244: R 310-R 314, 1983.
 - 9) Shilling, T., Mueller, M., Minne, H. W. and Ziegler, R.: Mineral apposition rate in rat cortical bone: Physiologic differences in different sites of the same tibia. *J. Bone Mineral Res.* 7 (S-2): S 429-S 432, 1992.
 - 10) 清野佳紀, 田中弘之, 西山宗六, 広田孝子: 最大骨量に及ぼす諸因子 (座談会). *The Bone* 8: 16-34, 1994.
 - 11) 藤巻悦夫: 疲労骨折の発生とバイオメカニクス—特集下肢の疲労骨折—. *臨床スポーツ医学* 10 (8): 873-881, 1993.
 - 12) 勝田 茂, 七五三木聡, 池田 賢, 天貝 均, 大野敦也: 運動強度の違いがラットの骨成長に及ぼす影響. *体育学研究* 36: 39-51, 1991.
 - 13) King, D. W. and Pengelly, R. G.: Effect of running on the density of rat tibias (abstract). *Med. and Sci. in Sports* 5: 68-69, 1973.
 - 14) John, A. O.: Chondro-osseous development and growth. *Fundamental and clinical bone physiology*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia and Toronto, 1980, 119-124.
 - 15) 折茂 肇: 成因, リスクファクターと予防法 (特集骨粗鬆症). *日本臨床* 52 (9): 47-52, 1994.
 - 16) 竹内敦子, 小林 正: 成長期のカルシウムおよびビタミン D 摂取の現状. *The Bone* 8: 71-79, 1994.
 - 17) Moyers, R. E.: *Handbook of orthodontics*. 3rd ed. Year Book Med. Pub. Inc., Chicago, 1972, 51-117.
 - 18) 高橋 忠: 下顎骨に対する食物の硬軟の影響. 九州歯会誌 48: 188-209, 1994.
 - 19) 黒須一夫 編: 現代小児歯科学—基礎と臨床—. 医歯薬出版, 東京, 1988, 3-46.
 - 20) 坂本裕一郎: 実験的骨粗鬆症における運動負荷の影響. *日整会誌* 61: 703-716, 1987.
 - 21) 樋口 満, 橋本 勲, 山川喜久江: ラットの自由運動のトレーニング効果に関する研究. *体力科学* 31: 205-210, 1982.
 - 22) Kiiskinen, A.: Physical training and connective tissues in young mice: Physical properties of achilles tendons and long bones. *Growth* 41: 123-127, 1977.
 - 23) 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* 39: 181-188, 1988.
 - 24) 山岡誠一, 蜂須賀弘久, 細野吉治, 森脇泰子, 能勢令子: ラットに対する負荷運動の質と発育に関する研究. *京都大学芸学紀要 B* 23: 57-65, 1963.
 - 25) Booth, F. W. and Gould, E. W.: Effect of training and disuse on connective tissue. *Exer. Sports Sci. Rev.* 3: 88-112, 1975.
 - 26) 森本泰宏, 太田和子, 鶴田 靖, 木村光孝: 成長発育期ラットの運動負荷による脛骨への影響. *小児歯誌* 32 (2): 298, 1994.
 - 27) 森本泰宏, 木村光孝: 成長発育期ラットの運動負荷による脛骨への影響 (第一報). 九州歯会誌 48 (4): 509-510, 1994.
 - 28) James, A. S., Ronald, D. F., Jerry, G. V. and David, R. G.: Adrenocortical function in aging exercise-trained rats. *J. Appl. Physiol.* 43: 839-843, 1977.
 - 29) Tharp, G. D.: The role of glucocorticoids in exercise. *Med. Sci. Sports Exer.* 7: 6-11, 1975.
 - 30) Ostman, I., Sjostrand, N. O. and Swedin, G.: Cardiac noradrenaline turnover and urinary catecholamine excretion in trained and untrained rats during rest and exercise. *Acta Physiol. Scand.* 86: 299-308, 1972.
 - 31) Song, M. K., Ianuzzo, C. D., Saubert IV, C. W. and Gollnick, P. D.: The mode of adrenal gland enlargement in the rat in response to exercise training. *Pflugers Arch.* 339: 59-68, 1973.
 - 32) 井村裕夫 編: 内分泌・代謝病学 第2版. 医学書院, 東京, 1986, 15-66.
 - 33) Buuck, R. J. and Tharp, G. D.: Effect of chronic exercise on adrenocortical function and structure in the rat. *J. Appl. Physiol.* 31: 880-883, 1971.
 - 34) Frenkl, R. and Csaly, L.: Effect of regular activity on adrenocortical function in rats. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 2: 207-211, 1962.
 - 35) 江川 薫, 新村明達, 滝口励司: 下顎頭の軟骨内骨化についての走査電子顕微鏡的研究. *歯基礎誌* 22: 661-665, 1980.
 - 36) Boyde, A.: Scanning electron microscope studies of bone. In: *The biochemistry and physiology of bone* (ed. by Bourne, G. H.). 2nd ed. Academic Press, New York and London, 1972, 293-297.
 - 37) 藤本 誠, 谷内良弘, 滝口励司: 下顎頭軟骨のエネルギー分散 X 線分析. *歯基礎誌* 22: 412-417, 1980.
 - 38) 新村明達, 江川 薫: 軟骨内骨化による骨基質形成層の立体超微形態学的研究. *昭歯誌* 5: 118-126, 1985.
 - 39) Bonucci, E.: Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrast. Res.* 20: 33-50, 1967.
 - 40) 谷内良弘: 形成期の骨表面の超微形態学的研究. *歯科医学* 44: 125-137, 1981.
 - 41) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明著: 第4章 骨の細胞 骨の科学. 医歯薬出版, 東京, 1985, 41-64.
 - 42) Ozawa, H., Imamura, K., Abe, E., Takahashi, N., Hiraide, T., Shibasaki, Y., Fukuhara, T. and Suda, T.: Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E 1) in vitro. *J. Cell. Physiol.* 142: 177-185, 1990.
 - 43) Rodan, G. A., Bourret, L. A. and Norton, L. A.: DNA

- synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. *Science* 199 (10) : 690-692, 1978.
- 44) Pilla, A. A. : Electrochemical information transfer at living cell membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 238 : 149-170, 1974.
 - 45) Luk, S. C., Nopajaroonsri, C. and Simon, G. T. : The ultrastructure of endosteum : a topographic study in young adult rabbits. *J. Ultrast. Res.* 46 : 165-183, 1974.
 - 46) 小澤英浩 : Bone cells の構造と機能 (特集骨粗鬆症). *日本臨床* 52 (9) : 12-20, 1994.
 - 47) 松本俊夫編 : 第1章 概論 2. 骨の微細構造. 小澤英浩. 骨・カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症. 羊土社, 東京, 1994, 25-40.
 - 48) Kallio, D. M., Garant, P. R. and Minkin, C. : Evidence of coated membranes in the ruffled border of the osteoclast. *J. Ultrast. Res.* 37 : 169-177, 1971.
 - 49) King, G. J., Holtrop, M. E. and Raisz, L. G. : The relation of ultrastructural changes in osteoclasts to resorption in bone cultures stimulated with parathyroid hormone. *Metab. Bone Dis. & Rel. Res.* 1 : 67-74, 1978.
 - 50) Burger, E. H., Jos, W. M., Meer, V. D. and Nijweide, P. J. : Osteoclast formation from mononuclear phagocytes : Role of bone-forming cells. *J. Cell Biol.* 99 : 1901-1906, 1984.
 - 51) Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G. D., Mundy, G. R., Jones, S. J., Bogde, A. and Suda, T. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinol.* 122 : 1373-1382, 1988.
 - 52) Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Kodama, H., Martin, T. J. and Suda, T. : The bone marrow-derived stromal cell lines MC 3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinol.* 125 : 1805-1813, 1989.
 - 53) 町田 晃, 井上哲郎, 串田一博, 望月邦憲, 和田充弘 : 骨組織に対する荷重および運動の影響 (実験的研究をもとに). *日骨代謝誌* 8 : 146-150, 1990.
 - 54) Layon, L. E., Rubin, C. T. and Baust, G. : Modulation of bone loss during calcium insufficiency by controlled dynamic loading. *Calcif. Tissue Int.* 38 : 209-216, 1986.
 - 55) 木村光孝, 木村京子, 太田和子, 今村隆子, 高江洲 旭, 秀島 治, Raymond L. Braham : 虚弱骨に対する高カルシウム食, 生理活性物質の併用療法に関する走査電顕的研究—とくに下顎頭の変化—. *小児歯誌* 29 : 582-593, 1991.
 - 56) Tompson, E. R., Baylink, D. J. and Wergedal, J. E. : Increases in number and size of osteoclasts in response to calcium or phosphorus deficiency in the rat. *Endocrinology* 97 : 283-289, 1974.
 - 57) Baud, C. A. : Submicroscopic structure and functional aspects of the osteocyte. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 56 : 227-236, 1968.
 - 58) Belanger, L. F. : Osteocytic osteolysis. *Calcif. Tissue Res.* 4 : 1-12, 1969.
 - 59) Weinreb, M., Roban, G. A. and Thompson, D. D. : Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decrease bone formation. *Bone* 10 : 187-194, 1989.
 - 60) Smith, E. L. and Raab, D. M. : Osteoporosis and physical activity. *Acta Med. Scand. Suppl.* 711 : 149-156, 1984.
 - 61) Wolff, J. : *Das gesetz der transformation der knochen.* Verlag von August Hirschwald, Berlin, 1892.
 - 62) 小沢英浩 : 骨の細胞の形態と機能. *臨床科学* 25 : 99-121, 1989.
 - 63) Parfitt, A. M. : The actions of parathyroid hormone on bone : relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis and metabolic bone disease. Part 1 : Mechanisms of calcium transfer between blood and bone and their cellular basis : morphological and kinetic approaches to bone turnover. *Metabolism.* 25 : 809-844, 1976.
 - 64) Kohlrausch, W. : Ueber den einfluss funktioneller beanspruchung auf das langengewachstum von knochen. *Munchen. Med. Wochenschr.* 71 : 513-514, 1924.
 - 65) Everett, L. S., Jr., Patricia, E. S., Cynthia, J. E., and Marianne, M. S. : Bone involution decrease in exercising middle-aged women. *Calcif Tissue Int.* 36 : S 129-S 138, 1984.
 - 66) Saville, P. D. and Whyte, M. P. : Muscle and bone hypertrophy—positive effect of running exercise in the rat—. *Clin. Orthop. Res.* 65 : 81-88, 1969.
 - 67) James, J. M., Ronald, F. Z., Arthur, C. V., Vittorio, A. P., Angiora, P. M. and Jerry, A. M. : Structural and mechanical adaptation of immature bone to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.* 60 (6) : 2028-2034, 1986.
 - 68) Maki, S. : Histological studies of electrically induced intramedullary callus. *J. Jpn. Orthop. Ass.* 59 : 999-1013, 1985.
 - 69) Watson, J., Haas, W. G. and Hauser, S. S. : Effect of electric fields on growth rate of embryonic chick tibiae in vitro. *Nature* 254 : 331-332, 1975.
 - 70) 保田岩夫, 野口和彦, 佐多徹郎 : 力学的仮骨と電気的仮骨. *日整会誌* 28 : 267-269, 1954.
 - 71) 鈴木はる江, 中井正継, 神田健郎, 佐藤優子, 林 泰史, 佐藤昭夫 : 骨の老化—運動低下による骨萎縮における大腿骨局所血流量の変化—放射性マイクロスフェア法による測定—. *東京都老人総合研究所*, 東京, 1990, 54-58.
 - 72) 松永俊二, 井尻幸成, 酒匂 崇, 吉国長利 : 電気刺激による骨形成の機序について. *臨整外* 27 : 1349-1355, 1992.

- 73) 中野昭一編：第3章 運動と心臓循環機能. 図説・運動の仕組みと応用. 医歯薬出版, 東京, 1982, 35-57.
- 74) 中野昭一編：第5章 運動と内分泌. 図説・運動の仕組みと応用. 医歯薬出版, 東京, 1982, 75-86.
- 75) Burkhart, J. M. and Jowsey, J.: Parathyroid and thyroid hormones in the development of immobilization osteoporosis. *Endocrinology* 81: 1053-1062, 1967.
- 76) Lindgren, U.: The effect of thyroparathyroidectomy development of disuse osteoporosis in adult rats. *Clin. Orthop.* 118: 251-256, 1976.
- 77) John, F. A., Philip, R., Leonard, J. D., Ashok, V. and James, K. Y.: Exercise-induced hypercalcemia and the calciotropic hormones. *J. Lab. Med.* 106: 229-232, 1985.
- 78) Ruben, J. A. and Bennett, A. F.: Intense exercise, bone structure and blood calcium levels in vertebrates. *Nature* 291: 411-413, 1981.
- 79) Davee, A. M.: Exercise patterns and trabecular bone density in college women. *J. Bone Mineral Res.* 5: 245-250, 1988.
- 80) Kelly, P. J.: Somatomedin-C, Physical fitness and bone density. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 70: 718-723, 1990.
- 81) Border, K. T., Nicoski, D. R. and Owens, V.: Alteration of pulsatile growth hormone secretion by growth-inducing exercise: Involvement of endogenous opiates and somatostatin. *Endocrinology* 118: 844-850, 1986.