成長期下顎骨における高タンパク食の影響に関する X 線的, 光顕的および超微形態的研究 — 骨基質形成 —

高 江 洲   旭

九州歯科大学小児歯科学講座 (指導: 木村光孝教授)

平成 7 年 12 月 25 日受理

A Radiological, Light Microscopic and Ultramicromorphological Study of Effect of Hyperprotein Meal on the Mandible at the Growth Stage — Formation of Bone Matrix —

Noboru Takaesu

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

It has been made clear that amounts of intake of calcium and protein greatly affect internal structure of the jaw at the growth stage. However, there are differences in the views made in the reports on bone construction related to the amount of calcium intake and the level of protein intake. Therefore, an investigation was made on the effect of hyperprotein meal on the mandible.

The results were as follows:

I. Roentgenographic and bone density findings

In the control group, the alveolar bone showed even thickness at the surface of incisors, and trabeculae were densely arranged. In the hyperprotein meal group as compared with the control group, decrease in trabeculae and reduction in thickness of the whole alveolar bone were seen. In bone density findings, no significant differences were found between the two.

II. Analytical findings of Ca and P on the X-ray microanalyzer

In characteristic roentgenograms, Ca showed higher concentration than P within the same trabecula. Furthermore, hardly any difference was found between the relative specific of calcium quantity and relative specific of protein quantity of the control and hyperprotein meal groups.

III. Hematologic findings

No changes at all were found in electrolyte in serum and in biochemistry examination.

IV. Histopathological findings

In the hyperprotein meal group as compared with the control group, woven bone and spongy bone decreased extensively and bone marrow expanded markedly. In the median

alveolar bone and buccal alveolar bone, the periodontal membrane showed extensively irregular arrangements.

V. Scanning electron microscope findings

In the hyperprotein meal group as compared with the control group, many amorphous bone lacunae were seen, and the borders with the surrounding matrices were unclear, and collagen fibrils were distributed sparsely.

On the basis of the foregoing findings, it is suggested that the formation of bone matrix decreases by maintaining intake of hyperprotein meal for an extended time for the mandible at the growth stage.

Key words: Growth stage/Mandible/Hyperprotein meal/Bone matrix

緒 言

骨においては骨吸収と骨形成が絶えず繰り返されているが、通常の状態ではこの両者がバランスを保ち骨量を一定に保っている。しかし、何らかの原因でこの両者のバランスが崩れ、骨吸収が骨形成を上回るようになると骨量の減少がoccurし、骨粗鬆症を来す¹⁾。

栄養素の中で、骨に影響を及ぼすものとして、カルシウム、タンパク質、リンがあげられる²⁾。中でも特に、カルシウムの摂取不足が骨構築に大きな影響を及ぼすことは、これまでのさまざまな報告により明かである³⁻⁶⁾。

従来、高タンパク食は腸管でのカルシウムの吸収を高め、カルシウム摂取に有益であるとされてきた⁷⁾。しかしその一方で、高タンパク食摂取による骨構築に対する影響に関する報告は、さまざまである⁸⁻¹³⁾。

当教室でも、高タンパク食が骨構築にどのような影響を及ぼすかを検索してきた。福島(1993)¹⁴⁾は、カルシウム欠乏下の食餌における過剰なタンパク質摂取は、前骨芽細胞が増加し、活性の高い骨芽細胞が減少することにより骨形成を抑制すると述べている。高橋(1993)¹⁵⁾は、食餌中にカルシウムが存在した状態でも、欠乏した状態でも、骨形成を抑制すると報告している。さらに骨基質形成にとって松田(1995)¹⁶⁾は、高タンパク食の投与は、破骨細胞による吸収細胞の助長が認められていると述べている。

このような流れの中で、著者は、カルシウム、タンパク質、骨構築の3つの関係について実験的観察を行った結果、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3週齢のWistar系雄ラットで、体重が実験開始時40g前後のものを対照群20匹、実験群20匹で計40匹用いた。

対照群：ラット標準粉末飼料（オリエンタル酵母工業）と水道水で6週間飼育した。

高タンパク食群：A食変型高タンパク飼料（オリエンタル酵母工業）と水道水で6週間飼育した。

なお、用いた飼料は当教室用に配合したもので、その成分表はTable 1-1, 1-2に示している。

飼育完了後に全てのラットをpentobarbital sodium（ネンブタール、大日本製薬）の腹腔内注射による、深麻酔下で屠殺した。直ちに頭部を採取し、10%中性ホルマリン液にて浸漬固定した。固定後の下顎骨をSoftex typeのCSM（ESM-2、ソフテックス）を用いて管電圧25 kVp、管電流5 mA、撮影時間40秒および焦点・皮膚間距離40 cmの条件下で撮影を行った。X線フィルム（Fuji softex film FG、富士写真フィルム）にアルミニウムスロープを貼って撮影した。

X線学的観察は、肉眼的観察以外にマイクロフォトメーター（PDS-15、コニカ）を用いて光学的観察を行った。骨密度の測定には光速スリット幅 $10 \times 500 \mu\text{m}$ で行い、測定方向は下顎下縁より歯槽骨へ走査し、scanning patternを描出した。

次にエネルギー分散型X線マイクロアナライザー（SED 880、セイコー EG & G）を用いて、CaおよびPについて、同一骨量内の緻密骨にA, B, Cの三点、すなわち面分析による特性X線像、点分析による定量分析を行い、それらの分布状態を観察した。

さらに、試料は5%硝酸脱灰し、セロイジン包埋後、下顎骨を前額断で $15 \mu\text{m}$ の連続脱灰切片標本作製し、

Table 1-1 Composition of experimental diets

Ingredients	Control group	High protein diet group
β -corn starch	38.0	13.0
α -potato starch	10.0	10.0
Vitamin-free casein	25.0	50.0
Cellulose powder	8.0	8.0
Soybean oil	6.0	6.0
Mineral mixture	★ 6.0	★ 6.0
Granulated sugar	5.0	5.0
Vitamin mixture	※ 2.0	※ 2.0
	100%	100%

Table 1-2 Composition of experimental diets

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

ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し鏡検した。

一方、下顎骨の歯槽骨断面を超微形態学的に観察するために、走査電顕試料を作製した。まず、下顎骨をphosphate buffer (pH 7.2) に浸し、超音波洗浄器にて付着物を除去し、洗浄した。次いで、試料は2.5% glutaraldehyde で1時間浸漬固定した後、phosphate buffer にて洗浄し、後固定として1% osmic acid (phosphate buffer, pH 7.2) で約2時間浸漬した。

固定後の試料は上昇 ethanol 系列にて脱水し、2-methy-2-propanol で置換後、凍結乾燥機 (ID-2 型, エイコーエンジニアリング) を用いて乾燥した。試料表面にイオンスパッタ (JFC-1100, 日本電子) を用いて Au coating を行い、走査電子顕微鏡 (JSM T-300, 日本電子) にて観察した。

血液学的所見は血清中の電解質、生化学および内分泌機能検査を行った。

結 果

I. X線学的形態ならびに骨密度所見

対照群

歯槽骨は切歯の表面を均一な厚さを保って、X線透過像として認められた。骨梁は緻密に配列していた (Fig. 1)。

高タンパク食群

対照群と比べ歯槽骨は大きさ、形など形態的に何ら変化は認められなかった。全体的に骨梁の減少が認められ歯槽骨の厚さも対照群と比べて減少していた (Fig. 2)。

さらに、X線骨密度を観察すると対照群の平均値 1.85 mm, 高タンパク食群 1.80 mmで両者間の検定結果に有意差は認められなかった (Table 2)。

Fig. 1 Radiogram of the 6th week.
Control group

Fig. 2 Radiogram of the 6th week.
High protein diet group

Table 2 Density of alveolar bone in the equivalent of aluminum

Exp. group	(mm)	
	Mean	S. D.
Control group	1.85	0.15
High protein diet group	1.80	0.13

II. X線マイクロアナライザーによる Ca, P の濃度および点分析による定量分析所見

対照群と高タンパク食群における Ca, P の特性 X 線像を観察した。同一骨梁の範囲内では Ca が P に比べ常に高い濃度を示した (Fig. 3 a, b-4 a, b)。

次に Ca, P の点分析による定量分析を行った。対照群、高タンパク食群ともに同一骨梁内で A, B, C の 3 点を求め、A, B, C それぞれ 3 回点分析による定量分析を行った。さらに A, B, C を同一グループとみなし、その平均値を求めた (Table 3)。

対照群における Ca, P は A, B, C についての有意差は認められなかった (Table 4, 5)。

高タンパク食群における Ca は A と B の間には有意差は認められなかったが、A と C および B と C の間にはそれぞれ 1 % と 5 % の危険率で有意差がみられ、高タンパク食群 C が高値を示した (Table 6)。P についてみると、A と B 間には有意差は認められなかった。A と C 間には 1 % の危険率で有意差がみられ、A が高値を示した。さらに B と C 間では 5 % の危険率で有意差がみられ、B が高値を示した (Table 7)。

対照群 A, B, C と高タンパク食群 A, B, C の Ca の検定結果についてみると、対照群 A と高タンパク食群 C の間および対照群 C と高タンパク食群 C の間にはそれぞれ 5 % の危険率で有意差がみられ、高タンパク食群 C が高値を示した (Table 8)。次に P についてみると、対照群 A と高タンパク食群 C との間には 5 % の危険率で有意差がみられ、対照群 A が高値を示した。対照群 C と高タンパク食群 C との間には 5 % の危険率で有意差がみられ対照群 C が高値を示した (Table 9)。

さらに対照群と高タンパク食群の相対 Ca 量比および相対 P 量比の分析ではほとんど差は認められなかった (Table 10)。

III. 血液学的所見

血清中の電解質、生化学検査には何ら変化は見られな

Fig. 3 a Ca characteristic X-ray images of alveolar bone.
Control group

Fig. 4 a Ca characteristic X-ray images of alveolar bone.
High protein diet group

Fig. 3 b P characteristic X-ray images of alveolar bone.
Control group

Fig. 4 b P characteristic X-ray images of alveolar bone.
High protein diet group

Table 3 Analysis of the Ca and P of alveolar bone by X-ray microanalyzer.

Exp. group	(%)			
	Ca		P	
	Mean	S. D.	Mean	S. D.
Control group-A	70.16	0.40	29.84	0.40
Control group-B	70.59	0.30	29.41	0.30
Control group-C	70.41	0.25	29.59	0.25
Control group-ABC	70.39	0.37	29.61	0.37
High protein diet group-A	70.50	0.09	29.50	0.09
High protein diet group-B	70.66	0.17	29.34	0.17
High protein diet group-C	71.22	0.18	28.78	0.18
High protein diet group-ABC	70.79	0.34	29.21	0.34

Table 4 Analysis of the Ca of alveolar bone by X-ray microanalyzer.
Control group

	Control group-A	Control group-B	Control group-C
Control group-A		—	—
Control group-B	n		—
Control group-C	n	n	

n : p > 0.05

Table 5 Analysis of the P of alveolar bone by X-ray microanalyzer.
Control group

	Control group-A	Control group-B	Control group-C
Control group-A		—	—
Control group-B	n		—
Control group-C	n	n	

n : p > 0.05

Table 6 Analysis of the Ca of alveolar bone by X-ray microanalyzer.
High proteinup diet group

	High protein diet group-A	High protein diet group-B	High protein diet group-C
High protein diet group-A		—	—
High protein diet group-B	n		—
High protein diet group-C	* *	*	

* * : p < 0.01, * : p < 0.05, n : p > 0.05

かったが、内分泌機能検査のとくに C-PTH では対照群と高タンパク食群の間には 5 % の危険率で有意差がみられ、高タンパク食群が低値を示した (Table 11-13).

IV. 病理組織学的所見

対照群

観察は歯根膜線維によって切歯と結ばれている舌側歯槽骨とエナメル質が存在しエナメル芽細胞を主体とする小血管を含有した疎性結合組織に対応している歯槽骨であった。前者は構造を異にする 2 種類の骨組織からなっていた。すなわち 1 つは、歯根膜に接する部分では

シャープピー線維束で柵状に貫ぬかれている束状骨が認められた。この束状骨にはハバース管は少なく、骨小腔が歯槽面に整然と並んで認められた。他の 1 つは、束状骨と連続した海綿骨で、大小の骨髄を囲む骨層でハバース管を中心とした骨小腔が同心性に配列し層状を呈し、いわゆるハバース系が認められた。骨基質は骨吸収から骨形成が活発に行われている改造線によって明らかな緻密骨部と海綿骨部を明らかに 2 分していた。さらに緻密骨として最表層の基質面には、ハバース管はほとんどなく骨小腔が整然と配列して認められる。海綿骨部は疎な部

Table 7 Analysis of the P of alveolar bone by X-ray microanalyzer.
High protein diet group

	High protein diet group-A	High protein diet group-B	High protein diet group-C
High protein diet group-A		—	—
High protein diet group-B	n		—
High protein diet group-C	* *	*	

* * : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$, n : $p > 0.05$

Table 8 Analysis of the Ca of alveolar bone by X-ray microanalyzer.
Control group

	Control group-A	Control group-B	Control group-C
High protein diet group-A	n	n	n
High protein diet group-B	n	n	n
High protein diet group-C	*	n	*

* : $p < 0.05$, n : $p > 0.05$

Table 9 Analysis of the P of alveolar bone by X-ray microanalyzer.
Control group

	Control group-A	Control group-B	Control group-C
High protein diet group-A	n	n	n
High protein diet group-B	n	n	n
High protein diet group-C	*	n	*

* : $p < 0.05$, n : $p > 0.05$

分もみられたが、緻密骨と組織癒合が行われていた (Fig. 5-7).

一般に歯槽骨に接した歯根膜部には血管が豊富で、歯根膜線維束も歯槽骨と強く結合している。また歯牙に接する部でも密に配列していた。

次にエナメル質側をみると、頰側の歯槽骨で細長い骨小腔が分布し骨の改造所見がみられた (Fig. 8)。しかし反対側の歯槽骨では大小の鋸歯状の骨吸収像が連続して著明に認められた (Fig. 9)。

歯槽骨は中央部で厚いが表面に骨芽細胞がほぼ規則的に配列していた。骨層には骨小腔が認められたが、歯根膜側の骨層内の骨小腔に比べ減少して認められた。頰側

の歯槽骨では骨層表面に破骨細胞による骨吸収像がしばしば認められる。全般にエナメル質側の中央部の骨層は厚く形成されていたが、骨表面には全体にわたって破骨細胞による小さな骨吸収窩が連続して認められた。またその部の歯槽骨は、骨小腔が大幅に減少し、疎で骨の吸収、形成の改造所見が活発に認められた (Fig. 10, 11)。歯槽骨としての骨層全体では薄く形成されていた。

高タンパク食群

対照群と比べ束状骨、海綿骨は大幅に骨量は減少し、骨小腔の減少がみられた。それに伴って骨髓の拡大も顕著で骨基質形成の低下がみられた (Fig. 12-14)。しかし骨基質には骨改造所見もみられた。海綿骨と組織癒合

Table 10 Relative percentages of Ca and P in alveolar bone by quantitative x-ray microanalysis and comparison with those of the control group (Ca/[Ca]c and P/[P]c)

Exp. group	Ca/[Ca]c	P/[P]c
Control group-ABC	1	1
High protein diet group-A	1.01	0.99
High protein diet group-B	1.00	1.00
High protein diet group-C	1.01	0.97
High protein diet group-ABC	1.01	0.99

Table 11 Laboratory values of electrolytes

	Control group		High protein diet group	
	Mean	S. D.	Mean	S. D.
Ca	10.07	0.17	9.73	0.31
P	8.10	0.54	8.63	0.65
Ca/P	1.27	0.12	1.17	0.09
Na	143.33	0.47	143.00	1.41
K	5.93	0.34	5.97	0.33
Cl	104.00	1.63	103.67	1.70

Table 12 Laboratory values of blood chemistry

	Control group		High protein diet group	
	Mean	S. D.	Mean	S. D.
GOT	154.33	7.13	149.67	3.30
GPT	53.00	6.38	70.33	10.21
LDH	1562.00	134.12	1228.00	178.82
CPK	1841.67	210.81	2391.00	336.82
ALP	191.00	28.86	222.00	58.42

が行われている緻密骨部に量的には疎な部分も認められた。舌側の歯槽骨と頬側歯槽骨に面する歯根膜部では大幅に歯根膜線維の不規則な配列像を呈していた (Fig. 15, 16)。エナメル質側の唇側の歯根膜線維の歯槽骨では歯の萌出に関連して連続性に吸収窩が認められた

(Fig. 17, 18)。

V. 走査型電顕所見

対照群

下顎骨全像をみると骨質の表層部は海綿骨から緻密骨に連続して平滑でスムーズな面として認められた。その

Table 13 Laboratory values of endocrine functional test

	Control group		High protein diet group	
	Mean	S. D.	Mean	S. D.
C-PTH	0.80	0.00	0.67*	0.05
N-PTH	0.03	0.00	0.03	0.00
Calcitonine	213.33	12.47	235.00	4.08
1.25(OH) ₂ D ₃	107.00	16.30	132.00	14.45

*: $p < 0.05$ Fig. 5 Alveolar bone of the 6th week.
Control group H·E stain ($\times 20$) Fig. 6 A higher magnification of Fig. 5.
H·E stain ($\times 100$)

中でも舌側歯槽骨は最も厚く形成され、中央側歯槽骨と頬側歯槽骨と歯の間にはともに発達した歯根膜線維が認められた。さらにエナメル器側の歯槽骨の部では歯根膜線維が欠如しており、シャープー線維として歯根膜線が進入している側の歯槽骨の線維骨の部では表層部は平滑な面として認められ、骨小腔が多数分布していた (Fig. 19, 20)。

歯根膜側の歯槽骨の部では歯根膜線維束、歯根膜線維ならびに歯根膜線維網が交錯、吻合していた (Fig. 21)。窩底の浅い骨吸収部ではそれを取り囲むように周囲では骨形成部が観察された (Fig. 22)。また石灰化した骨基質形成部には骨小腔が多数みられ周囲未石灰化基

質と境界を明瞭にしていた。

高タンパク食群

対照群と比べ下顎骨全体像は形態的には何ら変化は認められなかった。しかし舌側歯槽骨の部では対照群と比べ海綿骨に相当する部にみられた吸収部では骨髓腔の拡大が認められた (Fig. 23)。また骨基質形成部に於ては対照群と比べ不定形を呈した骨小腔も膠原線維束間に多数みられ顆粒状沈着物や微細なコラーゲン原線維もみられた。骨小腔の部では周囲基質との境界が不明瞭で、疎なコラーゲン原線維が分布し、微細な顆粒状沈着物が多数存在している所見がみられた (Fig. 24)。

Fig. 7 A higher magnification of Fig. 5.
H·E stain (×100)

Fig. 9 A higher magnification of Fig. 5.
H·E stain (×100)

Fig. 8 A higher magnification of Fig. 5.
H·E stain (×100)

Fig. 10 Alveolar bone of the 6th week.
Control group H·E stain (×20)

Fig. 11 A higher magnification of Fig. 10.
H·E stain (× 100)

Fig. 13 A higher magnification of Fig. 12.
H·E stain (× 100)

Fig. 12 Alveolar bone of the 6th week.
High protein diet group H·E stain (× 20)

Fig. 14 A higher magnification of Fig. 12.
H·E stain (× 100)

Fig. 15 A higher magnification of Fig. 12.
H·E stain (×100)

Fig. 17 Alveolar bone of the 6th week.
High protein diet group H·E stain (×20)

Fig. 16 A higher magnification of Fig. 12.
H·E stain (×100)

Fig. 18 A higher magnification of Fig. 17.
H·E stain (×100)

Fig. 19 Alveolar bone of the 6th week. (SEM)
Control group

Fig. 20 A higher magnification of Fig. 19. (SEM)

Fig. 21 A higher magnification of Fig. 19. (SEM)

Fig. 22 A higher magnification of Fig. 19. (SEM)

Fig.23 Alveolar bone of the 6th week. (SEM)
High protein diet group

Fig.24 A higher magnification of Fig.23. (SEM)

Fig.25 A higher magnification of Fig.23. (SEM)

考 察

骨組織は、運動によるストレス、地球の重力、食事の内容、神経およびホルモンの影響を直接的あるいは間接的に受けている¹⁷⁾。当教室では、その中の食事の内容、とくにカルシウムに注目し、実験的研究を重ねてきた。成長期にカルシウム不足に陥ると、骨構築に大きな影響を及ぼし、骨虚弱状態を惹起する^{18, 19)}。成長骨が一旦虚弱状態に陥入ると、食事療法あるいは生理活性物質との併用療法を行っても回復が困難であることが明らかになっている^{4, 20-23)}。

高タンパク食は、従来、腸管でのカルシウムの吸収を高めるとされてきた⁷⁾。Nordin (1966)⁹⁾ は骨粗鬆症の一因としてタンパク質の摂取不足を挙げている。しかし、Wachman ら (1968)²⁴⁾ によると、比較的長期にわたる高タンパク食摂取は、骨からのカルシウム動員を引き起こし、骨粗鬆症を増大させると報告している。Whiting ら (1981)¹⁰⁾、Marsh ら (1980)²⁵⁾、Weiss ら (1981)¹³⁾、Funaba ら (1990)¹²⁾ らも、高タンパク食は骨構築に対して負の影響を与えると報告している。またその一方で、高タンパク食摂取による骨からのカルシウム動員はなく、骨恒常性維持に関して影響は認められなかったとの報告もある^{8, 10, 11, 26)}。このように、高タンパク食摂取とカルシウムの利用性については統一した見解

がえられていない。そこで、今回、著者は、ヒトの離乳期に相当する生後3週齢のWistar系雄ラットを用いて、高タンパク食摂取による成長期下顎骨の骨構築に及ぼす影響について検索を行ったので考察する。

I. X線学的にみた骨密度の比較

骨密度の測定方法には種々の方法があるが、簡単で再現性の高いものが望まれる。今回、著者が行った方法は、牧ら (1993)²⁷⁾ の実験により再現性の高さが明らかとなっている。高橋 (1993)¹⁵⁾ は、成長期ラットに高タンパク食を与え、下顎骨の骨密度を検索した結果、カルシウムの存在下では、高タンパク食の骨構築に対する影響はほとんどみられないが、カルシウム欠乏下では、高タンパク食は、骨構築を阻害すると述べている。また、加来 (1994)²⁸⁾、松田 (1995)¹⁶⁾ らも同様に成長期ラットに高タンパク食を与えた実験を行っており、その結果、カルシウム存在下では、高タンパク食は下顎頭の骨構築に負の影響を及ぼすと報告している。

本実験においても、対照群と比べ高タンパク食群は、下顎骨の骨密度に有意差は認められなかったが、X線学的には、全体的に骨梁の減少が認められ、歯槽骨の厚さも減少していた。すなわち、高タンパク食は骨構築に負の影響を及ぼすことが再確認された。

II. X線マイクロアナライザーによるCa, Pの分析所見

陳 (1989)²⁹⁾ は、同一骨梁の範囲内では、Ca の特性 X 線像は、P に比べ濃度が高いと報告している。中園 (1991)³⁰⁾、首藤 (1992)³¹⁾、坂本 (1994)³²⁾ らも同様の所見を認め、小野 (1995)³³⁾ も骨虚弱状態やその回復過程でも Ca と P の組成は変化しないと述べている。本実験も、高タンパク食群で骨構築に減少があっても、同一骨梁の範囲内では Ca が P に比べ常に高い値を示した。本研究では歯槽骨における同一骨梁内の異なった部位での緻密骨の三点 A, B, C を点分析による定量分析で行った。その結果、先にも述べた通り部分的にはそれぞれ異なった有意差がみられたが、基本的には A, B, C の平均値は、対照群および高タンパク食群においても相対 Ca 量比、相対 P 量比に大きな差はみられなかった。

梅津 (1991)²¹⁾ は、虚弱骨を惹起させた成長期ラットに高カルシウム食を投与すると標準食よりカルシウムの蓄積傾向がみられ、活発な骨形成が行われると述べている。渡辺 (1990)³⁴⁾ は骨虚弱状態を惹起させたラットに標準食とイワシパウダーとの混合食を与えたところ、標準食より混合食を与えた群の方が相対 Ca 量比および相対 P 量比が高値を示したと報告している。

しかし本実験で下顎骨においては、高タンパク食群にしても相対 Ca 量比、相対 P 量比ともに大きな差が認められず、骨形成の活発化の度合いとして高タンパク食は顕著な効果はないと考えられる。

Ⅲ. 血液学的所見

本実験では血清中の電解質、生化学検査および内分泌検査からほとんど特別な変化はみられないものの、過去の研究者の報告にもみられるように一般的に血液は、身体内をくまなく灌流し、組織細胞内の液状成分との間で盛んに物質交換を行っており、生命維持に重要な役割を果たしている³⁵⁾。よって血液所見は、生体内の代謝状態を知り、診断・治療を行う上で重要である。

成長期にカルシウムが欠乏すると、血清 Ca 値は生体の変動により低下するとされているが^{19, 21, 36)}、しかし骨粗鬆症では変化がみられないと報告されている^{37, 38)}。

本実験では、高タンパク食群では血清 Ca 値に変動は認められなかった。血清 Na, 血清 K, 血清 Cl についてみると、Na は細胞外液の主要陽イオンであり、体液量および浸透圧の調節に重要な役割を果たしている。K は細胞内の主要な陽イオンでありとくに心筋、酸塩基平衡、栄養素代謝などに重要な役割を果たしている。Cl は細胞外液の主要な陰イオンで、主に血漿中、組織間液、結合組成に存在している⁴⁰⁾。高タンパク食群におい

てずれの値においても変動は認められなかった。

また LDH についてみると、主に臓器組織の障害に関連する酵素である⁴⁰⁾が、高タンパク食を与えてもとくに変化は認められなかった。

CT は骨吸収を抑制する生理活性物質で、そのレセプターが破骨細胞に存在することから明かにされている⁴⁰⁾、高タンパク食を与えても CT 値は異常を示さなかったことから破骨細胞の活性化には影響を及ぼさなかったと思われる。

PTH は、血中 Ca 濃度を高めるホルモンとして認識されている。骨に直接作用しては骨形成を抑制し、腎の近位尿細管にも直接作用して P の再吸収を抑制し、Ca の再吸収促進を行っては血清 Ca 濃度を調節している⁴⁰⁾。本実験では、C-PTH のみが高タンパク食にすると 5% の危険率で低値を示した。一般に C-PTH は血清 Ca 濃度と同じ動向を示すものであるが⁴⁰⁾本実験の血清 Ca は並行しなかったことから、C-PTH 値の低下が下顎骨の質量的変化について、どんな影響を与えたかはさらに追及が必要と思われる。

Ⅳ. 病理組織ならびに走査電顕所見

高橋 (1993)¹⁵⁾ は、成長期ラットに高タンパク食を投与すると、骨基質の減少並びにそれに伴う骨小腔の減少を認めている。海綿骨では、類骨組織が多いことを認めている。加来 (1994)²⁸⁾、松田 (1995)¹⁶⁾ らも高タンパク食をラットの、脛骨や下顎頭への影響を検索した結果、骨小腔並びにハバース系の減少、肥大帯軟骨細胞の増加、石灰化基質の減少、軟骨性骨化の減少を認めており、骨梁に低石灰化を認めている。

本実験では、高タンパク食は歯槽骨の束状骨、海綿骨には大幅な骨量の減少、骨小腔の減少がみられ、それに伴って骨髓腔の拡大が顕著であった。すなわち高タンパク食は、骨構築に負の影響を及ぼしたと考えられる。この理由について Johnson ら (1970)⁴¹⁾ は、タンパク質摂取量が増加すると、腸管からのカルシウム吸収量も増加するが、その増加により血中カルシウムが利用され、また尿からのカルシウムが大量に排泄されるため、骨からのカルシウムの動員が惹起されると考察している。さらに Chu ら (1975)⁴²⁾ や Schuette ら (1980)⁴³⁾ らは、高タンパク食による尿中カルシウム量の増加の原因として、小腸におけるカルシウム吸収の増加と腎糸球体での濾過率の亢進、さらに尿細管でのカルシウム再吸収の抑制が考えられると報告している。さらに Zemel ら (1981)⁴⁴⁾ は、高タンパク食に含まれる含硫アミノ酸が高カルシウム尿の一因であるとしている。Yuen ら

(1984)⁴⁵⁾ は、尿中カルシウムは、タンパク質の種類によって異なると報告している。

当教室では、成長期ラットに一旦虚弱状態に陥入らせさまざまな方法で骨構築の回復法を試みてきた。住本 (1986)⁴⁾ は、生後 3 週齢のラットに 3 週間カルシウム欠乏食を与え、その後標準食で飼育した実験において、歯槽骨の厚さは増加し、骨梁の数は増えてより緻密に配列し、観察期間中には元通りの回復には至らなかったが、虚弱骨の改善がみられたと述べている。木村ら (1987)⁴⁶⁾ は、標準食と高カルシウム食であるイワシパウダーの混合食を与えたところ、投与 8 週目にして骨梁の増加を認めている。鯨坂 (1988)⁴⁷⁾ は、ECT を投与したところ、いささかの効果があったことを述べている。小野 (1995)³³⁾ は、カルシウム欠乏食や低カルシウム食を与えて実験的に作製した虚弱歯槽骨に高カルシウム食と ECT を併用すると骨の石灰化や骨構築に関し改善がみられ有効であると報告している。しかしながらいずれの報告においても、観察期間内では骨は完全に回復していない。

本研究においては、高タンパク食がカルシウムの利用性に関係するかについて検索したが、成長期ラットにカルシウム欠乏食を与えた後、高タンパク食を与えた高橋 (1993)¹⁵⁾ は、骨小腔の減少、低石灰化層および無構造を呈した部分の増加がみられたと述べている。同様な実験を行った松田 (1995)¹⁶⁾ は、ラットの下顎頭でも軟骨性骨化は減少し、骨梁は細く低石灰化層が増加していたと報告している。一方、加来 (1994)²⁸⁾ は、脛骨を観察したところ、高タンパク食はカルシウム欠乏時には、逆に骨構築を促進すると述べている。福島 (1993)¹⁴⁾ は、ラットに高タンパク食を与え、下顎頭を走査型電顕で観察した結果、軟骨層から骨梁に至るまで形態的に著変は認められなかったと報告している。Bell ら (1975)⁸⁾ は、⁴⁵Ca で深部標識した成熟雄ラットに高タンパク食を与えた結果、骨からのカルシウムの動員は認められなかったと述べている。Allen ら (1978)²⁶⁾ は高タンパク食の投与では、骨中カルシウム代謝の割合は変化を認めていないと報告しており、Whiting ら (1981)¹⁰⁾、Calvo ら (1982)¹¹⁾ らは、成熟雄ラットを用いて、高タンパク食摂取による大腿骨や下顎骨への影響を検索した結果、骨の吸収所見を認めなかったと述べている。また、阿左美ら (1989, 1990)^{48, 49)} も、4 週齢雌ラットや経産ラットを用いた研究において、高タンパク食摂取で骨形成障害および形成された骨からの過剰なミネラルの動員は起こらなかったと報告している。

一方、高橋 (1993)¹⁵⁾ は、成長期ラットに高タンパク食を与え、下顎骨を観察したところ、石灰化骨基質形成部にはコラーゲン原線維が豊富であったが、対照群とほぼ同程度であったと報告している。そして、病理組織学的所見では、骨基質は明かに減少しており、走査電顕像におけるコラーゲン原線維が豊富であったということは、石灰化が十分でなかったことを意味すると考察している。加来 (1994)²⁸⁾ も同様の実験を行い、脛骨を観察したところ、高タンパク食は、吸収面が多く骨髄の拡大が認められ、さらにコラーゲン原線維が豊富な所見を呈していたと報告している。松田 (1995)¹⁶⁾ は、高タンパク食を与えると下顎頭は軟骨層がやや厚く、骨梁も細く、さらには不十分な石灰化に加え小腔内のコラーゲン原線維が豊富にみられた所からやはり過剰なタンパク摂取は骨構築に負の因子を与えると考察している。

本実験においても、高タンパク食は、下顎骨の外形には何ら変化は認められなかったが、舌側歯槽骨では、海綿骨に相当する部からの吸収部に骨髄の拡大が認められた。骨基質形成部には対照群と比べ不定形を呈した骨小腔も多数みられ、顆粒状沈着物や微細なコラーゲン線維も認められ負の因子を与えているように思われた。

高タンパク食が引き起こす負の骨構築の原因として、Weiss ら (1981)¹³⁾ は、間葉系細胞の増殖から軟骨形成を始めた骨が石灰化する段階で、カルシウムの利用性が低下すると考察している。

木村ら (1993)¹⁷⁾ は、ラットの下顎頭を透過型電顕で観察した結果、高タンパク食は扁平化した休止期様の細胞として骨芽細胞が散見され、細胞内小器官の発達の悪さがみられたと述べ、高タンパク食は骨構築に骨芽細胞の活性化が低下しているのではないかと報告している。

Yuen ら (1984)⁴⁵⁾、Hegsted ら (1981)⁵⁰⁾、Block ら (1980)⁵¹⁾ らによると、カルシウムの利用性はタンパク質の種類、リン量、含硫アミノ酸量など様々な要因が関与しているが、本実験の高タンパク食が何故骨芽細胞の活性化を落とさせたのかその成因については究明できなかった。今後の重要な課題の一つとしたい。いずれにしても本実験の結果は、過剰なタンパク摂取は骨構築に負の影響を与えた事が示された。

結 論

成長期において、カルシウムとタンパク質の摂取量は顎骨の内部構造に大きな影響を及ぼすことが明かにされている。しかし、カルシウムの摂取量とタンパク質の摂取レベルによる骨構築に関する報告は見解を異にしてい

る。そこで、今回成長期下顎骨に対する高タンパク食摂取による骨基質形成について検索し、以下の結論を得た。

I. X線学のおよび骨密度所見

対照群では、歯槽骨は切歯の表面を均一な厚さを保って、骨梁は緻密に配列していた。高タンパク食群は対照群と比べ骨梁の減少と歯槽骨全体の厚さが低下していた。

骨密度所見は、両者に有意差は認められなかった。

II. X線マイクロアナライザーによるCa, Pの分析所見

Ca, Pの特性X線像では、同一骨梁内の範囲では、CaがPに比べ高い濃度を示した。さらに対照群と高タンパク食群の相対Ca量比および相対P量比の差はほとんど認められなかった。

III. 血液学所見

血清中の電解質、生化学検査には何ら変化はみられなかった。

IV. 病理組織学所見

対照群と比べ高タンパク食群は、線維骨、海綿骨は大幅な骨量ならびに骨小腔の減少が認められ、骨髄の拡大が顕著であった。中央側歯槽骨と頬側歯槽骨の部では歯根膜は大幅に不規則な配列を呈していた。

V. 走査型電顕所見

対照群と比べ高タンパク食群は骨基質形成部には不定形の骨小腔が多数みられ、周囲基質との境界は不明瞭で疎なコラーゲン原線維が分布していた。

以上のことから、成長期の下顎骨に対する高タンパク食の摂取は長期間持続することにより、骨基質形成の低下を来すことが示唆された。その成因については、次なる研究の重要な課題としたい。

稿を終るにあたり、終始御懇切なるご指導、ご鞭撻ならびにご校閲の労を賜った恩師木村光孝教授に深甚なる敬意と感謝の意を捧げます。また実験にご協力頂いた九州歯科大学小児歯科学教室の各位に感謝致します。

本論文の要旨は、第32回日本小児歯科学会大会および総会（1994年5月21日、長崎）において発表した。

参考文献

- 1) 中村哲夫, 折茂 肇: 骨粗鬆症とカルシウム代謝. 臨床科学 24: 1268-1275,
- 2) 阿部淳子: 高タンパク低カルシウム食によるラット下顎骨

- 臼歯部歯槽骨および血管構築の経時的変化. 明海歯学誌 19: 43-62, 1990.
- 3) 江澤郁子, 岡田玲子, 野崎幸久, 尾形悦郎: 発育期ラット大腿骨の破断特性および灰分量におよび低カルシウム食の影響. 栄養と食糧 32: 329-335, 1979.
- 4) 住本和隆: 実験的骨粗鬆症に対する食餌の影響に関する研究—とくに歯槽骨の変化—. 九州歯会誌 40: 1245-1268, 1986.
- 5) 篠崎英一: 実験的骨粗鬆症に対する食餌の影響に対するカルシウムの影響に関する研究—とくに下顎頭の変化—. 九州歯会誌 41: 102-121, 1987.
- 6) 木村光孝: 成長発育期の顎骨に及ぼすカルシウムの影響—とくに歯槽骨と下顎頭の変化—. 福岡県歯科医師会誌 40: 1-11, 1987.
- 7) McCance, R. A., Widdowson, E. M. and Lehmann, H.: The effect of protein intake on the absorption of calcium and magnesium. Biochem. J. 36: 686-691, 1942.
- 8) Bell, R. R., Engelman, D. T., Sie, T.-L. and Draper, H. H.: Effect of a high protein intake on calcium metabolism in the rat. J. Nutr. 105: 475-483, 1975.
- 9) Nordin, B. E. C.: International patterns of osteoporosis. Clin. Orthop. 45: 17-30, 1966.
- 10) Whiting, S. J. and Draper, H. H.: Effect of chronic high protein feeding on bone composition in the adult rat. J. Nutr. 111: 178-183, 1981.
- 11) Calvo, M. S., Bell, R. R. and Forbes, R. M.: Effect of protein-induced calciuria on calcium metabolism and bone status in adult rats. J. Nutr. 112: 1401-1413, 1982.
- 12) Funaba, M., Kawashima, T., Yano, H. and Kawashima, R.: Effect of a high protein diet on bone formation and calcium metabolism in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 36: 559-567, 1990.
- 13) Weiss, R. E., Gorn, A., Dux, S. and Nimni, M. E.: Influence of high protein diets on cartilage and bone formation in rats. J. Nutr. 111: 804-816, 1981.
- 14) 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.
- 15) 高橋宙丈: 成長期下顎骨に対する高タンパク質の影響に関する実験的研究—とくに骨基質形成—. 九州歯会誌 47: 459-479, 1993.
- 16) 松田容士子: 成長期下顎頭の骨基質形成に関するX線の、光顕的および超微形態的研究—高タンパク食の影響—. 九州歯会誌 49: 1-19, 1995.
- 17) 木村光孝, 葛 立宏, 西田郁子, 牧 憲司, 福島直樹, 高江洲 旭, 尾崎章寿, 村田真知子, 中島龍市: 下顎頭の骨構築に及ぼす高タンパク食の影響—電子顕微鏡学的検索—. 小児歯誌 31: 669-678, 1993.
- 18) 中尾利夫: 成長期顎骨における実験的骨粗鬆症に関する研究—とくに下顎頭の変化—. 九州歯会誌 41: 46-67, 1987.

- 19) 石井貴三男：成長期顎骨における実験的骨粗鬆症に関する実験的研究—とくに歯槽骨について—。九州歯会誌 40：530-554, 1986.
- 20) 西田郁子, 曾我富美雄, 松田容士子, 竹下尚利, 赤嶺秀紀, 高橋由丈, 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—下顎頭の変化—。小児歯誌 30：755-766, 1992.
- 21) 梅津哲夫：虚弱骨に対する高カルシウム食の影響に関するX線, 光顕的および走査電顕的研究—歯槽骨の変化—。九州歯会誌 45：629-652, 1991.
- 22) 若杉淳二郎：虚弱下顎骨に対する高カルシウム食, カルシトニンの併用療法に関する実験的研究—歯槽骨の変化—。九州歯会誌 48：350-369, 1994.
- 23) 牧 憲司, 葛 立宏, 吉永久秋, 龔 瑞泰, 竹下尚利, 松田容士子, 木村光孝：虚弱下顎頭に対する高カルシウム食療法—とくに牛骨粉について—。小児歯誌 32：552-565, 1994.
- 24) Wachman, A. and Bernstein, D. S. : Diet and osteoporosis. Lancet. 1 : 958-959, 1968.
- 25) Marsh, A. G., Sanchez, T. V., Mickelsen, O., Keiser, J. and Mayor, G. : Cortical bone density of adult lacto-ovo-vegetarian and omnivorous women. J. Am. Diet. Assoc. 76 : 148-151, 1980.
- 26) Allen, L. H. and Hall, T. E. : Calcium metabolism, intestinal calcium-binding protein and bone growth of rats fed high protein diets. J. Nutr. 108 : 967-972, 1978.
- 27) 牧 憲司, 葛 立宏, 木村京子, 荒牧利裕, 周 宏, 山野博文, 野沢典央, 木村光孝：小児期の下顎骨塩定量に関する臨床的研究。小児歯誌 31：404-411, 1993.
- 28) 加来昭典：脛骨の骨基質形成に関するX線, 光顕的および超微形態的研究—高タンパク食の影響—。九州歯会誌 48：554-574, 1994.
- 29) 陳 溢宮：成長期顎骨とカルシウム摂取に関する実験的研究—とくに下顎頭の変化—。九州歯会誌 43：710-745, 1989.
- 30) 中園志保：顎骨の成長に関するX線, 光顕的ならびに走査電顕的研究—食物の硬軟による下顎頭の変化—。九州歯会誌 45：1-23, 1991.
- 31) 首藤洋治：顎骨の成長に関するX線, 光顕的ならびに走査電顕的研究—食物の硬軟による歯槽骨の変化—。九州歯会誌 46：574-595, 1992.
- 32) 坂本淑子：虚弱下顎頭に対するカルシウム, カルシトニンの併用療法に関する光顕的ならびに超微形態的研究。九州歯会誌 48：6-28, 1994.
- 33) 小野清一郎：虚弱歯槽骨に対する高カルシウム食・カルシトニンの併用療法に関する実験的研究。九州歯会誌 49：70-90, 1995.
- 34) 渡辺尚海：成長期顎骨の実験的骨粗鬆症に対するカルシウムの影響に関する研究—とくに下顎頭の変化—。九州歯会誌 44：310-342, 1990.
- 35) 真島英信：生理学, 分光堂, 東京, 1956, 279-309.
- 36) 加来弘志：虚弱骨に対するカルシウム含有食, 活性型ビタミン D₃ の併用療法に関する実験的研究—とくに歯槽骨の変化—。九州歯会誌 46：462-481, 1992.
- 37) 武田和夫, 内山政二, 高橋栄明：骨粗鬆症の鑑別。リウマチ科 1：433-422, 1989.
- 38) Albright, F., Bloomberg, E. and Smith, P. H. : Postmenopausal osteoporosis. Trans. A. Amer. Phys. 55 : 298-305, 1940.
- 39) 真田孝三：骨粗鬆症の臨床像。慈恵医大誌 80：617-635, 1966.
- 40) 木村光孝, 西田郁子, 尾崎章寿, 今村隆子, 太田和子, 村田真知子：ラットにおける血液検査測定値に関する加齢的変動。小児歯誌 30：1037-1047, 1992.
- 41) Johnson, N. E., Alcantara, E. N. and Linkswiler, H. : Effect of level of protein intake on urinary and fecal calcium and calcium retention of young adult males. J. Nutr. 100 : 1425-1430, 1970.
- 42) Chu, J. Y., Margen, S. and Costa, F. M. : Studies in calcium metabolism. II. Effects of low calcium and variable protein intake on human calcium metabolism. Am. J. Clin. Nutr. 28 : 1028-1035, 1975.
- 43) Schuette, S. A., Zemel, M. B. and Linkswiler, H. M. : Studies on the mechanism of protein-induced hypercalciuria in older men and women. J. Nutr. 110 : 305-315, 1980.
- 44) Zemel, M. B., Schuette, S. A., Hegsted, M. and Linkswiler, H. M. : Role of the sulfur-containing amino acids in protein-induced hypercalciuria in men. J. Nutr. 111 : 545-552, 1981.
- 45) Yuen, D. E., Draper, H. H. and Trilok, G. : Effect of dietary protein on calcium metabolism in man. Nutr. Abst. Rev. 54 : 447-459, 1984.
- 46) 木村光孝, 内野公一, 佐藤秀輝, 竹中正史, 原田和己, 栗生 悟：カルシウムの成長期顎骨に及ぼす影響に関するX線学的検索。小児歯誌 25：521-530, 1987.
- 47) 鯨坂一郎：実験的骨粗鬆症に対するカルシトニンの効果に関する研究—とくに歯槽骨の変化—。九州歯会誌 42：523-558, 1988.
- 48) 阿左美章治, 平塚静子, 北野隆雄, 江指隆年：雌ラットのカルシウム, リンおよびマグネシウム出納に及ぼす飼料中カゼインまたは分離大豆たん白質レベルの影響。栄養学雑誌 47：103-112, 1989.
- 49) 阿左美章治, 平塚静子, 北野隆雄, 江指隆年：経産ラットのカルシウム, リンおよびマグネシウム出納に及ぼす飼料中カゼインまたは分離大豆タンパク質レベルの影響。日本栄養・食糧学会誌 43：427-435, 1990.
- 50) Hegsted, M. and Linkswiler, H. M. : Long-term effects of level of protein intake on calcium metabolism in young adult women. J. Nutr. 111 : 244-251, 1981.
- 51) Block, G. D., Wood, R. J. and Allen, L. H. : A comparison of the effects of feeding sulfur amino acids and protein on urine calcium in man. Am. J. Clin. Nutr. 33 : 2128-2136, 1980.