ラットの成長期脛骨におけるカルシウムの 吸収に及ぼす高タンパク食の影響

— とくに骨基質形成 —

周 適 宏

九州歯科大学小児歯科学講座 (指導: 木村光孝教授)

平成8年4月25日受理

Effect of High Protein Diet on Calcium Absorption
in the Tibia at the Rat Growth Stage
— Especially Formation of Bone Matrix in Membranate Ossification —

Tekiko Syu

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

Three-week-old rats corresponding to the human wean period were used and the relation between high protein diet intake and calcium absorption in membranate ossification in the tibia was investigated for those given high protein diet for three weeks (6 weeks old) [I] and those given high protein diet for six weeks (9 weeks old) [II].

The results were as follows:

1. Radiological bone density findings

No significant differences were found between control group I and high protein diet group I. Between control group II and high protein diet group II, significant differences were found in interosseous cortex at 1% significance level and in medial cortex at 5% significance level. control group II showed higher values.

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

In the quantitative analysis of Ca, significant differences were found at 5% significance level between control group II and high protein diet group II, and control group II showed higher values.

3. Histopathological findings

In high protein diet group I as compared with control group I, location of Haversian lamellae in the whole osseous layer in medial cortex was found to be wide. In interosseous cortex as compared with that in control group I, outer circumferential lamellae and inner circumferential lamellae were wide and seen clearly. Osteoblasts were arranged regularly on their surfaces.

In control group II as compared with control group I, osseous tissue was formed thick on

the whole and increase in haversian systems especially was marked. Medial cortex and interosseous cortex both showed increase in thickness, and inner circumferential lamellae in interosseous cortex showed increase in thickness in particular.

High protein diet group II as compared with control group II showed no changes in the morphology of osseous tissue, but decrease in Haversian systems was found in the whole osseous layer. Also in medial cortex, decrease in bone lacunae was found.

4. Scanning electron microscope findings

In the bone formation surface in control group I, many circle-like and oval shaped bone lacunae were found but a number of them were imperfect and had indistinct borders with the surrounding matrices. Bone resorption surface was found extensively adjacent to bone formation surface, and the cavity bottom was shallow.

High protein diet group I like control group I showed many bone lacunae in the bone formation surface and both distinct and indistinct borders with the surrounding matrices were found.

High protein diet group II as compared with control group II showed no changes in morphology, but bone lacunae in the bone formation surface were irregular in shape and the borders with the surrounding lacunae were indistinct. Bone resorption surface adjacent to bone formation surface increased as compared with that in control group II.

5. Hematologic findings

No changes at all were found in any group in electrolytes in serum or in chemical examinations.

Key words: Tabia / Calcium / High protein / Bone matrix / Rat

緒 言

近年、子供たちの間には、食生活の洋風化に伴い、社会問題の一つである小児の成人病や骨の虚弱化が深刻化している¹⁾。このため、それらの病因としてタンパク質の過剰摂取が考えられている。

一方、タンパク質と骨との関係については、タンパク質の摂取量がカルシウムの利用性に大きく関与しているという、Funabaら (1990)²⁾ および Weissら (1981)³⁾ の報告にみられるように、高タンパク食の摂取が、骨形成の遅延や形成量の減少を引き起こし、骨形成の低下を招くことが報告されている。しかしながら、Whiting (1981)⁴⁾ や Calvoら (1982)⁵⁾ らは、高タンパク食摂取による骨への影響はないと述べ、統一した見解は認められていない。

そこでタンパク質そのもののカルシウム吸収に及ぼす影響については、腸管吸収の立場から、タンパク質自体

よりも腸管内分解産物であるアミノ酸について考える方が意義がある⁶⁾。

この原因には、カルシウムの腸管吸収に関与する因子に種々のものがあり、タンパク質を構成するアミノ酸の中でヒスチジン、グリシン、アルギニンを多量に含有するものなどは吸収を促進し、塩基性のアミノ酸はカルシウムの吸収を促進する。一方、スレオニン、グルタミン酸などはカルシウムの吸収を抑制し、酸性のものは抑制的であることが考えられている⁷⁻⁹⁾。さらに、タンパク質の種類、タンパク質の摂取量、投与期間、被験者または実験動物の性、年齢および個体の状態などの影響も考えられ、問題をさらに複雑にしている。

このような流れの中で、著者は、カルシウムの利用効果を高めると考えられているカゼインを用い、骨の虚弱化や易骨折性が頻繁に認められる長管骨¹⁾の、とくに脛骨について、カルシウムとタンパク質の摂取が、骨基質形成にどのような影響を及ぼすかを実験的に検索し、い

Table 1-1 Composition of experimental diets

(%)

Ingredients	Control group (I)	High protein diet group (I)	Control group (II)	High protein diet group (II)
β -Corn starch	38.0	13.0	38.0	13.0
α -Potato starch	10.0	10.0	10.0	10.0
Vitamin-free casein	25.0	50.0	25.0	50.0
Cellulose powder	8.0	8.0	8.0	8.0
Soy bean oil	6.0	6.0	6.0	6.0
Mineral mixture	6.0★	6.0★	6.0☆	6.0☆
Granulated sugar	5.0	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture*	2.0	2.0	2.0	2.0

Table 1-2 Composition of experimental diets

(per 100 g)

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

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 系雄ラットを用い、体重 40g 前後のものを 40 匹使用した。

対照群 (I): ラット標準飼料 (オリエンタル酵母工業) と水道水で 3 週間飼育した。

高タンパク食群 (I): 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 3 週間飼育した。

対照群 (II): ラット標準飼料 (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 (II): 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、飼料は本研究用に配合されたもので、その成分表を Table 1-1, 1-2 に示している。

各実験群とも 3 週間、6 週間飼育後のラットに pentobarbital sodium (ネンブタール, 大日本製薬) を腹腔内注射して、深麻酔下で屠殺した。直ちに脛骨を採取し、10% 中性ホルマリン液で固定した。固定後の脛骨を左右別々に Softex type の CSM (ESM-2, ソフテック

ス)を用いて管電圧 35kVp, 管電流 5mA, 撮影時間 60秒および焦点・皮膚間距離 70cmの条件下で軟 X 線撮影を行った。軟 X 線フィルム (Fuji Softex film FG) にアルミニウムステップを貼って撮影した。

X 線学的観察に続いて、さらに光学的観察を行うため骨塩量 (骨密度) 測定は、マイクロフォトメーター (PDS-15) を用いて光速スリット幅 $10 \times 500 \mu\text{m}$ で、脛骨の骨間縁皮質骨より内側縁皮質骨へ走査し、Scanning pattern を描出した。

骨の石灰化度ならびに骨構築の判定材料としてエネルギー分散型 X 線マイクロアナライザー (SED880, セイコー EG&G) を用いて、脛骨における Ca, P の分布状態を面分析によって特性 X 線像による同一骨梁内の濃度を調べるとともに、点分析による定量分析についても調べた。

脛骨は損傷のないように注意して剥離し、周囲の軟組織を十分除去した。

次に脛骨をエタノール系列で脱水、アセトンで置換した後にリゴラック樹脂で包埋した。さらに脛骨を横断し $60 \sim 80 \mu\text{m}$ 非脱灰切片標本を作製した。切片標本は Softex type の CSM を用い、管電圧 20kVp, 管電流 5mA, 撮影時間 16 分, 焦点・フィルム間距離 30cm の条件下で撮影し、contact microradiogram を作製した。

他の固定試料は 5% 硝酸脱灰し、セロイジン包埋後、

$15 \mu\text{m}$ の横断連続切片標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を施した。脛骨を超微形態学的に観察するために、露出あるいは切断し、走査電顕試料を作製した。phosphate buffer (pH7.2) に浸し、超音波洗浄器で洗浄した。試料は 2.5% glutaraldehyde で 1 時間浸漬固定した後、phosphate buffer で洗浄を行い、後固定として 1% osmic acid (phosphate buffer pH 7.2) に 4°C で約 2 時間浸漬した。固定後の試料は脛骨表面および切断面を露出させ、脱水は上昇 ethanol 系列にて行い、isoamyl acetate 置換を経て臨界点乾燥を行った。試料表面には、イオンスパッタ (JFC-1100, 日本電子) を用いて Au coating を行い、走査型電子顕微鏡 (JSM T-300, 日本電子) で観察を行った。

結 果

I. X 線学的および X 線骨密度所見

対照群 (I)

細長い薄い腓骨は脛骨に支えられているように存在していた。脛骨にみられる骨間縁皮質骨は厚さを均一に保って緻密な X 線不透過像として明瞭に認められた。それに隣接して骨髄は不透過性の像を弱くして認められ、さらに内側縁皮質骨に連続して認められた。内側縁皮質骨は骨間縁皮質骨と同様に厚さを均一に保っているものの一部皮質骨が薄い部分も認められた (Fig. 1)。

Fig. 1 Radiogram of the 3rd week.
Control group (I)
Arrow: Tibia

Fig. 2 Radiogram of the 3rd week.
High protein diet group (I)
Arrow: Tibia

Fig. 3 Radiogram of the 6th week.
Control group (II)
Arrow: Tibia

Fig. 4 Radiogram of the 6th week.
High protein diet group (II)
Arrow: Tibia

Table 2-1 Density of tibia in the equivalent of aluminum. (mm)

Group	Scanning region	Mean
Control group (I)	interosseous cortex	1.75
High protein diet group (I)	interosseous cortex	1.74
Control group (II)	interosseous cortex	2.15
High protein diet group (II)	interosseous cortex	1.97**

n=12 **; $p < 0.01$

Table 2-2 Density of tibia in the equivalent of aluminum. (mm)

Group	Scanning region	Mean
Control group (I)	medial cortex	1.32
High protein diet group (I)	medial cortex	1.25
Control group (II)	medial cortex	1.75
High protein diet group (II)	medial cortex	1.60*

n=12 *; $p < 0.05$

高タンパク食群 (I)

対照群 (I) と比べ X 線写真上で肉眼的には骨間縁皮質骨, 骨髄および内側縁皮質骨はほぼ同様な所見として認められた (Fig. 2).

対照群 (II)

対照群 (I) と比べ腓骨並びに脛骨全体は著しく伸長していた。さらに骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨は緻密で強度な X 線不透過像として厚さを増加していた (Fig.

Table 2-3 Density of tibia in the equivalent of aluminum. (mm)

Group	Scanning region	Mean
Control group (I)	interosseous cortex	1.75
	medial cortex	1.32**
High protein diet group (I)	interosseous cortex	1.74
	medial cortex	1.25**

n=12 **; p<0.01

Table 2-4 Density of tibia in the equivalent of aluminum. (mm)

Group	Scanning region	Mean
Control group (II)	interosseous cortex	2.15
	medial cortex	1.75**
High protein diet group (II)	interosseous cortex	1.97
	medial cortex	1.60**

n=12 **; p<0.01

3).

高タンパク食群 (II)

対照群 (II) と同様に腓骨並びに脛骨全体は伸長し、皮質骨に関してもほぼ同様な所見としてみられ、骨髄も順次ゆるやかに縮小する傾向にあった。また X 線写真上でみた濃度は全体的に対照群 (II) とほとんど同様な所見を示していた (Fig. 4)。

X 線写真上でみた肉眼的所見を参考にして、さらに脛骨の骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨の骨密度を AI 当量で換算し、骨の厚さの平均値を求めた (Table 2-1 ~ 2-4)。

対照群 (I)

骨間縁皮質骨は 1.75mm、内側縁皮質骨は 1.32mm であった。両者の間には有意差 ($p<0.01$) が認められ、内側縁皮質骨が低値を示した。

高タンパク食群 (I)

骨間縁皮質骨は 1.74mm、内側縁皮質骨は 1.25mm であった。両者の間には有意差 ($p<0.01$) がみられ、内側縁皮質骨が低値を示した。さらに骨間縁皮質骨および内側縁皮質骨についてみると、対照群 (I) と高タンパク食群 (I) の間には有意差はみられなかった。

対照群 (II)

骨間縁皮質骨は 2.15mm、内側縁皮質骨は 1.75mm で

あった。両者の間には有意差 ($p<0.01$) が認められ、内側縁皮質骨が低値を示した。

高タンパク食群 (II)

骨間縁皮質骨は 1.97mm、内側縁皮質骨は 1.60mm であった。両者の間には有意差 ($p<0.01$) がみられ、内側縁皮質骨が低値を示した。骨間縁皮質骨では対照群 (II) と高タンパク食群 (II) の間には有意差 ($p<0.01$) がみられ、対照群 (II) が高値を示した。内側縁皮質骨では対照群 (II) と高タンパク食群 (II) の間には有意差 ($p<0.05$) がみられ対照群が高値を示した。

II. Ca, P の分析所見

脛骨の断面における Ca, P の特性 X 線像について調べた。同一骨梁内では Ca が P と比べ全ての群において濃度が高かった (Fig. 5~Fig. 8)。

次に点分析による定量分析についてみると、Ca の占める割合は対照群 (I) では平均 10.15%、高タンパク食群 (I) では 9.81% で、両者には有意差はみられなかった。対照群 (II) の Ca の占める割合は平均 17.81%、高タンパク食群 (II) では平均 15.41% で、両者の間に有意差がみられ、対照群 (II) が高値を示した ($p<0.05$)。P の占める割合は対照群 (I) と高タンパク食群ならびに対照群 (II) と高タンパク食群 (II) の間に有意差はみられなかった (Table 3-1)。さらに

Fig. 5 Characteristic x-ray images of tibia.
Control group (I)

Fig. 7 Characteristic x-ray images of tibia.
Control group (II)

Fig. 6 Characteristic x-ray images of tibia.
High protein diet group (I)

Fig. 8 Characteristic x-ray images of tibia.
High protein diet group (II)

Table 3-1 Analysis of the Ca and P of tibia

(%)

Group	Control group (I)	High protein diet group (I)	Control group (II)	High protein diet group (II)
Ca	10.15±0.98	9.81±0.92	17.81±0.93	15.41*±0.51
P	9.01±0.82	9.12±0.43	11.12±0.81	11.32 ±1.52

Mean ± S. D. *; p<0.05

Table 3-2 Relative content of Ca and P in tibia and comparison with those of the control group (Ca/[Ca]c and P/[P]c)

Group	Ca / (Ca+P) (%)	P / (Ca+P) (%)	Ca / [Ca]c	P / [P]c
Control group (I)	52.97	47.03	1.00	1.00
High protein diet group (I)	51.82	48.18	0.97	1.01
Control group (II)	61.56	38.44	1.75	1.23
High protein diet group (II)	57.65	42.35	1.52	1.26

Fig. 9 Contact microradiogram of tibia of the 3rd week. ($\times 20$)
Control group (I)

Fig. 10 Contact microradiogram of tibia of the 3rd week. ($\times 20$)
High protein diet group (I)

Fig. 11 Contact microradiogram of tibia of the 6th week. ($\times 20$)
Control group (II)

Fig. 12 Contact microradiogram of tibia of the 6th week. ($\times 20$)
Control group (II)

Fig. 13 Contact microradiogram of tibia of the 6th week. ($\times 20$)
High protein diet group (II)

Fig. 14 Contact microradiogram of tibia of the 6th week. ($\times 20$)
High protein diet group (II)

Fig. 15 Mandibular condyle of the 3rd week.
H·E stain (×20)
Control group (I)
BM: Bone marrow IC: Interosseous cortex
MC: Medial cortex
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae

Fig. 17 A higher magnification of Fig. 15.
H·E stain (×100)
L: Lacunae of bone VC: Volkman's canals
HC: Haversian canals
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae

Fig. 16 A higher magnification of Fig. 15.
H·E stain (×100)
BM: Bone marrow OB: Osteoblast
L: Lacunae of bone VC: Volkman's canals
HC: Haversian canals
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae

Ca, P の対照群と比較した相対 Ca 量比および相対 P 量比を求めた。相対 Ca 量比および相対 P 量比は対照群 (I), 高タンパク食群 (I) に比べ対照群 (II), 高タンパク食群 (II) が高値を示した (Table 3-2)。

Ⅲ. 病理組織学的所見

A. Contact microradiogram (CMR) 所見 対照群 (I)

骨層の中心部に骨髓が存在し、骨髓を囲み均一でよく石灰化された骨組織がみられる。内基礎層板、外基礎層板は明瞭にみられ、その部にはハバース管を中心とした骨小腔が分布している。層板骨はそれぞれ、骨改造所見、外基礎層板、内基礎層板および介在層板によって石灰化度が異なるために X 線不透過像も異なった所見を呈している。また骨間縁皮質骨と比べ内側縁皮質骨が薄い。骨層全体にわたって石灰化度による骨化度が高いことから X 線不透過像は低くなっていた (Fig. 9)。

高タンパク食群 (I)

骨層全体は対照群とほぼ同様の所見を呈しており、均一でよく石灰化された骨化度がみられる。内側縁皮質骨、骨間縁皮質骨ともに幅広く認められ、骨小腔も多数みられ、対照群と同様な所見を呈していた (Fig. 10)。

Fig. 18 Mandibular condyle of the 3rd week.
H·E stain (×20)
High protein diet group (I)
BM: Bone marrow IC: Interosseous cortex
MC: Medial cortex
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae

Fig. 20 A higher magnification of Fig. 18.
H·E stain (×100)
OB: Osteoblast L: Lacunae of bone
VC: Volkman's canals HC: Haversian canals
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae

Fig. 19 A higher magnification of Fig. 18.
H·E stain (×100)
BM: Bone marrow L: Lacunae of bone
VC: Volkman's canals HC: Haversian canals
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae

対照群 (II)

対照群 (I) と比べ骨層全体は急速に厚さを増し、均一で石灰化度の高い所見として認められた。内側縁皮質骨、骨間縁皮質骨とともに対照群 (I) と比べ幅広く形成されていた。骨質は緻密で骨小腔も広範囲にわたって多数分布していた。骨髄を中心とした内基礎層板、外基礎層板にみられる辺縁は比較的スムーズに形成されていた。骨の再構築と思われる骨の増加が部分的に認められた (Fig. 11, 12)。

高タンパク食群 (II)

対照群 (I) と比べ骨層全体は厚く形成されていた。皮質骨は緻密であるが、骨間縁皮質骨と比べ内側縁皮質骨は薄く、さらに外基礎層板と比べ内基礎層板は薄い。対照群 (II) と比べ高タンパク食群は均一な石灰化度として認められるが、骨層全体は薄く形成されていた (Fig. 13, 14)。

B. 光顕的所見

対照群 (I)

脛骨の横断組織像である。骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨は厚く緻密な骨質より形成されていた。内側縁皮質骨と比べ骨間縁皮質骨が厚さを増しているのが明瞭であっ

Fig. 21 Mandibular condyle of the 6th week.
H·E stain ($\times 20$)
Control group (II)
BM: Bone marrow IC: Interosseous cortex
MC: Medial cortex
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae

Fig. 23 A higher magnification of Fig. 21.
H·E stain ($\times 100$)
L: Lacunae of bone VC: Volkmann's canals
HC: Haversian canals
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae

Fig. 22 A higher magnification of Fig. 21.
H·E stain ($\times 100$)
BM: Bone marrow L: Lacunae of bone
HC: Haversian canals
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae

た。内側縁皮質骨と骨間縁皮質骨の中心には幅広い骨髄が認められた。さらに皮質骨の外側には外基礎層板がみられ、骨髄に面している部には内基礎層板がみられた (Fig. 15)。さらに脛骨の内側縁皮質骨を中心とした部では、内側縁皮質骨の緻密質には、無数のハバース管とフォルクマン管が認められる。前者は動静脈を通し、結合組織で満たされている。後者は骨表面の骨膜から血管を導入しており、またハバース管や髄腔へも連絡している管で、これらが著明に認められる。さらに多数のハバース管を中心に同心性に配列している。内外基礎層板は骨膜性骨成長が著明である。内側縁皮質骨の外基礎層板と内基礎層板の部には小さな核を中心として細胞質の広い類円形、紡錘形を呈した骨小腔が円周に沿って配列していた。この部にはハバース管はみられなかった。ハバース層板の部にはハバース管が多く認められ、骨小腔がハバース管を中心にほぼ同心性に配列しているのが認められた。一部にはフォルクマン管の存在もみられた (Fig. 16)。

次に骨間縁皮質骨を中心とした部分を観察すると、外基礎層板と内基礎層板の骨層は薄くみられるが、その中間に位置する部のハバース層板は厚く認められた。ハ

Fig. 24 Mandibular condyle of the 6th week.
H·E stain (×20)
High protein diet group (Ⅱ)
BM: Bone marrow IC: Interosseous cortex
MC: Medial cortex
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae

Fig. 26 A higher magnification of Fig. 24.
H·E stain (×100)
OB: Osteoblast L: Lacunae of bone
VC: Volkmann's canals HC: Haversian canals
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae

Fig. 25 A higher magnification of Fig. 24.
H·E stain (×100)
BM: Bone marrow L: Lacunae of bone
HC: Haversian canals
ICL: Inner circumferential lamellae
OCL: Outer circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae

バース系がみられる部では、ハバース層板に位置する部ではハバース管が多数認められ、その周囲には大、中、小の骨小腔がほぼ同心性に配列していた (Fig. 17).

高タンパク食群 (Ⅰ)

対照群 (Ⅰ) と比べ骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨の骨組織の形態には何ら変化は認められなかった。さらに両皮質骨は緻密な骨質を呈していた。とくに内基礎層板の区画は明瞭に認められた (Fig. 18)。内側縁皮質骨の一部は、外基礎層板の骨層は明瞭で、その部に存在している骨小腔も多数骨表面に平行に分布していた。対照群 (Ⅰ) と比べ骨層全体におけるハバース層板の位置する部は広く、不完全なハバース系が多数認められ、骨小腔は不規則に配列していた (Fig. 19)。

骨間縁皮質骨は対照群 (Ⅰ) と比べ外基礎層板と内基礎層板は幅広く明瞭に認めれ、その表面には骨芽細胞が規則正しく配列していた。ハバース層板においても骨層は幅広くハバース系も対照群 (Ⅰ) と同様な所見を呈し、骨小腔も多数認められた (Fig. 20)。

対照群 (Ⅱ)

対照群 (Ⅰ) と比べ骨組織は全体的に厚く形成され、とくにハバース系の増加が顕著であった。内側縁皮質骨、骨間縁皮質骨はともに厚さを増し、骨間縁皮質骨の

Fig. 27 Tibia of the 3rd week. (SEM)
Control group (I)

内基礎層板はとくに厚さの増加がみられた (Fig. 21).

内側縁皮質骨は、大きな骨髄を中心に緻密質は内外基礎層板が明瞭にみられ、その部には骨小腔は多数認められるが、ハバース系を欠いているのが特徴的である。ハバース層板の部分には介在層板が存在し、この部には骨の吸収があり、層板構造を呈した断片がハバース系の間に介在しているのが明らかである。骨髄に面した内基礎層板の部には外基礎層板にみられる骨小腔と比べ比較的小型の骨小腔が多数認められる。対照群 (I) と比べ、ハバース系の増加と骨小腔が全体的に増加し、規則的に配列していた。外基礎層板と内基礎層板はその区画を明瞭にし、骨小腔の大きさもほぼ一定で緻密に規則正しい配列を示していた (Fig. 22)。

骨間縁皮質骨についてみると、対照群 (I) と比べ外基礎層板と内基礎層板の占める位置は増加し、より明瞭であった。ハバース層板におけるハバース系も増加し、骨吸収から骨形成部の骨再構築層を示す骨改造所見が明瞭であった。骨層全体にわたり骨小腔が増加し緻密に配列していた (Fig. 23)。

高タンパク食群 (II)

対照群 (II) と比べ骨組織の形態には何ら変化はみられなかった。また骨層全体にわたってハバース層板は広

いが皮質骨は減少しているのが特徴的な所見であった (Fig. 24)。

内側縁皮質骨を観察すると、対照群 (II) と比べ、高タンパク食群 (II) は不完全なハバース層板が広範囲にみられるとともに骨吸収像が顕著で緻密質の減少が特徴的な所見として認められる。内基礎層板と外基礎層板の骨小腔は全体的に減少し疎になって配列していた (Fig. 25)。

骨間縁皮質骨についてみると、対照群 (II) と比べ全体的にハバース系の減少が認められた。

内基礎層板と外基礎層板は明瞭に認められるものの、骨小腔の分布状態はほぼ同様な所見を呈していた (Fig. 26)。

IV. 走査型電子顕微鏡学的所見

対照群 (I)

成長過程にある 6 週齢の骨基質形成面には大、中、小の長径 $15\sim 20\mu\text{m}$ 大の類円形、楕円形や不定形を呈した骨小腔が多数散在していた。骨基質面は一定方向に走行するコラーゲン原線維は密に形成され、この部には石灰化球は認められなかった。また一定方向に走行しているコラーゲン原線維には多数の側枝がみられ、さらに分枝が吻合している所見もみられた。

Fig. 28 Tibia of the 3rd week. (SEM)
Control group (I)

Fig. 29 Tibia of the 3rd week. (SEM)
High protein diet group (I)

Fig. 30 Tibia of the 3rd week. (SEM)
High protein diet group (I)

Fig. 31 Tibia of the 6th week. (SEM)
Control group (II)

Fig. 32 A magnification of Fig. 31.

Fig. 33 Tibia of the 6th week. (SEM)
High protein diet group (II)

Fig. 34 A magnification of Fig. 33.

Fig. 35 A magnification of Fig. 33.

骨小腔は不完全なものも多く窩底は浅く多数の骨細管の開口部が認められるが、コラーゲン原線維が横断し、石灰化構造物が沈着している部も多数認められた。骨小腔と周囲基質との境界が不明瞭な所見も多くみられた。不規則なコラーゲン原線維が散在している部では密なコラーゲン原線維網が形成されていた。不完全な骨小腔壁はコラーゲン原線維は疎な状態を呈していた。全体的に骨基質形成面は多数の骨小腔を中心として密なコラーゲン原線維、疎なコラーゲン原線維、一定方向に走行するコラーゲン原線維、不規則な走行をするコラーゲン原線維、密なコラーゲン原線維網、微細な石灰化構造物や、大、中、小の石灰化球など様々な所見がみられ、安定した骨基質面を呈していなかった (Fig. 27)。

一方、骨基質形成面と隣接した部では幅広く広範囲にわたって骨吸収面が存在していた。骨吸収面は全体にわたって窩底は浅く、周囲基質を含めて露出したコラーゲン原線維は離断され、微細な線維と顆粒状を呈した石灰化球が混在してみられ、骨吸収と骨形成が活発に行われ

ていた (Fig. 28)。

高タンパク食群 (I)

対照群 (I) と同様に骨基質形成面には多数の骨小腔が認められ、周囲基質との境界を明瞭にしている部と不明瞭な部がみられた。それに伴って骨細管の開口部がみられた (Fig. 29)。さらに基質面にはコラーゲン原線維が一定方向に走行している部とコラーゲン原線維が不規則な走行をしているため密なコラーゲン原線維網も認められた。基質面の石灰化球がみられる部では、コラーゲン原線維の間隙とコラーゲン原線維網の表層部に集中して認められた。石灰化球は直径 $0.5\mu\text{m}$ 前後のものが多くみられた。石灰化球の最表層部は密なコラーゲン原線維網で形成されていた。石灰化球の内部構造はコラーゲン原線維の石灰化で形成されている。さらに、対照群 (I) と同様に骨形成面に隣接して骨吸収面が広範囲に認められた。骨吸収面の窩底は比較的浅い所見が多くみられるが、深い所も散見された。骨吸収面にはコラーゲン原線維が顆粒状を呈した部分や微細な顆粒状石灰化構

Table 4-1 Laboratory values of electrolytes

	Control group (I)	High protein diet group (I)	Control group (II)	High protein diet group (II)
Na	142.10 ± 1.01	145.21 ± 1.11	150.10 ± 1.13	145.12 ± 1.22
Cl	104.25 ± 1.20	100.21 ± 1.45	110.50 ± 1.28	115.49 ± 1.09
K	5.21 ± 0.49	5.01 ± 0.38	4.82 ± 0.54	5.00 ± 0.45
Ca	10.10 ± 0.48	9.90 ± 0.56	10.20 ± 0.15	10.10 ± 0.93
F	9.01 ± 0.80	10.01 ± 0.45	8.10 ± 0.18	9.90 ± 1.12
Ca/P	1.05 ± 0.06	1.04 ± 0.05	1.54 ± 0.13	1.55 ± 0.19

Mean $\pm$ S. D.

Table 4-2 Laboratory values of blood chemistry

	Control group (I)	High protein diet group (I)	Control group (II)	High protein diet group (II)
GOT	140.15 ± 11.25	138.12 ± 12.11	137.15 ± 12.15	140.01 ± 11.11
GPT	40.50 ± 6.21	42.11 ± 5.91	42.19 ± 5.29	43.21 ± 4.91
LDH	620.51 ± 182.15	650.12 ± 178.91	630.55 ± 192.12	652.31 ± 168.99
CPK	650.21 ± 191.10	710.22 ± 180.91	639.22 ± 182.05	700.21 ± 179.01
ALP	250.10 ± 54.12	249.02 ± 55.32	251.01 ± 52.30	250.05 ± 54.31

Mean $\pm$ S. D.

造物も混在して認められた。また骨吸収面の基質には浅い部分と深い部分に段差がみられた。骨吸収面のコラーゲン原線維網は交錯、吻合している部分と離断され、疎な状態を呈した部分が混在して認められた (Fig. 30)。

対照群 (Ⅱ)

9 週齢の骨層全体像を観察すると、骨間縁皮質骨、内側縁皮質骨の表層部はスムーズな平滑面として骨髓を中心として皮質骨は幅広く厚く形成されていた。骨髓に隣接する骨基質の部には連続した小さな吸収像が認められた (Fig. 31)。

骨基質形成面は長径 $15\mu\text{m}$ から $20\mu\text{m}$ 大の骨小腔が多数認められ、対照群 (Ⅰ) と比べ骨小腔は周囲基質との境界を明瞭にしていた。一定方向に走行する密なコラーゲン原線維が認められた。骨小腔壁には多数の骨細管の開口部がみられた。骨基質を形成している一定方向に走行する密なコラーゲン原線維の表層部には癒合したコラーゲン原線維網が認められた。骨形成面に隣接して骨吸収面も活発にみられ高底は浅く、境界は不明瞭で交叉、吻合する微細なコラーゲン原線維網が疎な部分や顆粒状沈着物が多数認められた (Fig. 32)。

高タンパク食群 (Ⅱ)

対照群 (Ⅱ) と比べ形態的には何ら変化はなく、骨髓を中心とした骨層全体像は幅広く厚く形成されほぼ同様な所見を呈していた (Fig. 33)。

対照群 (Ⅱ) と比べ骨基質面には多数の骨小腔が認められるものの、大、中、小の不定形のものが多く、骨小腔と周囲基質の境界が不明瞭であるのが特徴的な所見であった。不定形の骨小腔の周囲基質は一定方向に走行するコラーゲン原線維も認められるが、比較的疎で不規則なコラーゲン原線維が多数認められた。また疎なコラーゲン原線維網と微細な顆粒状沈着物が認められた (Fig. 34)。骨吸収面に関しては対照群 (Ⅱ) とほぼ同様な所見を呈していた。骨吸収面は比較的広範囲で不規則な骨小腔が露出している部分も認められた。骨吸収面のコラーゲン原線維は微細な顆粒状を呈した集合体として認められた (Fig. 35)。

V. 血液学的所見

血清中の電解質および生化学検査において、すべての群で何ら変化はみられなかった (Table 4-1, 4-2)。

考 察

成長期の骨基質形成は軟骨内骨化と膜性骨化が活発にバランスをとりながら一定の大きさになるまで成長していく。日常の食生活の中でバランスのとれたカルシウム

とタンパク質を摂取することは骨構築にとって重要な構成成分であることは明らかである。

骨を形成するカルシウムの体内での吸収性はタンパク質の摂取量の程度によって大きな影響を及ぼすことが考えられる。今回報告する骨に対するカルシウムの吸収に及ぼす高タンパク食の影響は過去の研究者によって未だ見解を異にしている。そこで著者は骨に対するカルシウムの利用性にとって高タンパク食がいかなる影響を及ぼすかについて、脛骨を用いた膜性骨化について考察する。

Mccance ら (1942)¹⁰⁾ が高タンパク食はカルシウム吸収能を高め骨構築にとって有効であると報告して以来、Nordin (1966)¹¹⁾ はタンパク質が摂取不足になると骨粗鬆症の発症に関与すると報告している。また、Bell ら (1975)¹²⁾、Allen ら (1978)¹³⁾、Whiting ら (1981)⁴⁾、Calvo ら (1982)⁵⁾ も、高タンパク食摂取は骨の石灰化や骨の成分に対しては正に働いていると報告し、阿左美ら (1989)¹⁴⁾、(1990)¹⁵⁾ はラットを用いた実験で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いと述べている。また、加来 (1994)¹⁶⁾ は、高タンパク食摂取に関して脛骨の骨基質形成を観察している。それによると、高タンパク食群はカルシウム欠乏時には、骨構築を促進する作用があることを報告している。

しかし、一方では Wachman ら (1968)¹⁷⁾ は高タンパク食を摂取することによって骨からのカルシウム動員を引き起こし骨粗鬆症を増加させると述べ、Johnson ら (1970)¹⁸⁾ は、タンパク食摂取量が増加すると吸収カルシウム量も増加するが、その増加量より排出中のカルシウム量が上回るため、骨からのカルシウムの動員が考えられると報告している。Walker ら (1972)¹⁹⁾、Anand ら (1974)²⁰⁾ らも高タンパク食によってカルシウム出納は負であるとし、Chu ら (1975)²¹⁾ は高タンパク食による尿中カルシウム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、尿細管でのカルシウム再吸収の抑制が考えられると述べている。Zemel ら (1981)²²⁾ は含硫アミノ酸がタンパク質が引き起こす高カルシウム尿の一部の原因であると報告している。Hegsted ら (1981)²³⁾ は高タンパク質摂取により尿中カルシウム量は、リン摂取量によっても左右されると述べている。Margen ら (1974)²⁴⁾、Linkswiler ら (1974)²⁵⁾ らはタンパク質摂取量と尿中カルシウム量は深い関係があると述べ、Schuette ら (1980)²⁶⁾ はタンパク質摂取の増加によりカルシウム尿細管における再吸収量の減少を

報告している。Weissら (1981)²⁷⁾、Funabaら (1990)²⁾ はラットを用いた実験で、高タンパク質を摂取することは骨形成が遅延すると報告している。Marshら (1989)²⁸⁾ は高タンパク質を摂取しているものについて骨密度を観察すると菜食主義者と比べ低下していると述べている。

高橋 (1993)²⁹⁾ は成長期の骨形成の内部構造は物理的刺激や化学的刺激などの後天的環境要因が大きく関与していると述べ、生後3週齢のラットを用いてカルシウムの吸収と高タンパク質について下顎骨の骨基質形成を明らかにしている。すなわち、成長期下顎骨の骨構築において過剰なタンパク質摂取は、カルシウムが存在した状態においても、カルシウム欠乏状態においても骨形成は抑制されると述べている。

さらに下顎頭における軟骨内骨化の骨基質形成について、カルシウムとタンパク質による作用機序との関連を透過型電子顕微鏡を用いた細胞レベルでの検索した報告では福島 (1993)³⁰⁾、木村ら (1993)³¹⁾ の報告がみられる。福島は3週齢のラットを標準飼料と高タンパク食で3週間飼育したもの、つまり6週齢を観察し、さらにカルシウム欠乏食群およびカルシウム欠乏食・高タンパク食群とを3週間飼育し、同じ6週齢について観察している。それによると高タンパク食群は対照群と比べ、細胞形態ならびに細胞内小器官に特別な変化を認めていない。しかし、カルシウム欠乏食群と比べカルシウム欠乏食・高タンパク食群では、前骨芽細胞が増加し、活性の高い骨芽細胞の減少が認められ、骨基質形成は抑制されていると述べている。木村ら³¹⁾ の報告によると、福島³⁰⁾ と同様にラットを用いた高タンパク食摂取実験において、長期間にわたる9週齢に至るまで観察を行っている。それによると、骨芽細胞の細胞内小器官の発達は悪く、類骨層を介して石灰化面と接している所見を認めている。骨細胞、破骨細胞に関しては特別な変化は認められなかったと述べている。

以上のように細胞レベルでみた観察によると、高タンパク食を長期間継続して摂取することは石灰化の段階で骨基質形成に関してはカルシウム利用性の低下を示唆している。

このような一連の研究を基礎として本研究では高タンパク食摂取による脛骨の膜性骨化の骨基質形成について観察を行った。3週齢のラットを用いて、対照群（標準食群）と高タンパク食群を3週間飼育した6週齢（ヒトでは学童期の時期に相当する）のラットと、さらに標準食群と高タンパク食群を6週間飼育した9週齢（ヒトでは成人の時期に相当する）のラットに分けた。

3週齢から6週齢に至るまでバランスのとれた栄養素の構成成分の中でタンパク質のみ100g中50gのカゼインによる動物性の高タンパク食を継続して摂取した結果、骨基質形成に関しては対照群（標準食群）と比較して何ら特別な変化は認められなかった。しかし9週齢に至るまで長期に至る実験の結果についてみると、X線骨密度、X線マイクロアナライザーによるCa、Pの定量分析、さらに病理組織ならびに走査電顕などによる観察項目について対照群と比べ高タンパク食群において骨基質形成に明らかな差が認められ、骨構築の低下がみられた。このことはバランスのとれた食餌療法であればタンパク質の摂取も骨形成にスムーズに関与しているが、過剰な高タンパク食の摂取を長期間継続して与えることは腸管での吸収、尿細管での再吸収の抑制、排泄するカルシウム量の増加に関しては、含硫アミノ酸などの因子によりカルシウム吸収機構に何らかの障害が惹起することが示唆される。しかし、血液所見に関しては木村ら (1992)³²⁾ による血液検査測定値による加齢的変動による血清中の電解質、生化学検査の正常値を参考にして本研究結果を検討したが、X線写真上でみる限り、25%以上の骨量の減少、いわゆる骨粗鬆症の病態は惹起していないことが観察される。

X線骨密度所見についてみると、高橋²⁹⁾ はラットを用いて成長期下顎骨に対する高タンパク質の影響を観察している。それによると、対照群と高タンパク質群の間には有意差はみられなかったと述べている。加来¹⁶⁾ は同じ脛骨を用いた実験において骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨の骨密度を求めたところ対照群と高タンパク食群との間に有意差がみられ対照群が高値を示している ($p < 0.05$)。

高橋²⁹⁾、加来¹⁶⁾ の報告はともに高タンパク食はカゼインを用い100g中50gのカゼインが含有されている同じ成分であるが、高橋²⁹⁾ は下顎骨を用い、加来¹⁶⁾ は脛骨を用いている。両者とも観察部位は膜性骨化の骨基質形成を観察している。さらに松田 (1995)³³⁾ は下顎頭、いわゆる軟骨内骨化の骨基質形成について同様な実験を行っている。それによると、対照群と高タンパク食群との有意差を認めていない。さらにCa、Pの増減については対照群と比較した相対Ca量比および相対P量比においては、対照群、高タンパク食群の順に高値であったと述べている。このような流れの中で著者の研究では過去の研究者と同じような方法で成長期ラットの脛骨の膜性骨化における骨基質形成を観察したが、6週齢ラットでは対照群と高タンパク食群の間には有意差はみられなかつ

たが、9週齢ラットに至ると対照群と高タンパク食群との間には有意差がみられ、骨間縁皮質骨および内側縁皮質骨ともに対照群が高値を示している。このことは二次成長期から成人に至る旺盛な時期に過剰な高タンパク食を長期間継続して用いることは腸管での吸収、カルシウム尿の多量の排出その他複合的な因子が絡み合って骨密度にとって必ずしもよい結果が得られないことを示唆している。

このことはカルシウム療法についても同じことが考えられる。中河原 (1992)³⁴⁾ はラットを用いて対照群と高カルシウム食群を5週間飼育した結果、対照群が良好な成績を認めている。このことは過剰なタンパク質の摂取やカルシウムの摂取は症例に応じた投与方法を考えなければならない。また春岡 (1992)³⁵⁾ はカルシウムとビタミンDの関連性について脛骨を用いた実験において、カルシウムが欠乏することによりビタミンDの欠乏に対する骨基質形成の変化は増大すると述べている。

打和 (1992)³⁶⁾ はラットの歯槽骨を用いた実験においてビタミンDが欠乏しても対照群と比べ骨基質形成には大きな影響を及ぼさないことを明らかにしている。このことはカルシウム摂取の重要性を示唆している。

X線マイクロアナライザーによるCa, Pの定量分析についてみると、高橋²⁹⁾の下顎骨の実験によると、対照群と高タンパク食群は比較的近似値を示し、加来¹⁶⁾は脛骨の実験において、対照群と高タンパク食群との間には有意差がみられ、対照群が高値を示したと述べている ($p < 0.05$)。

松田³³⁾は下顎頭を用いた実験で、軟骨内骨化の骨基質形成について、Ca, Pの定量分析の結果、対照群と高タンパク食群との間には有意差は認められなかったと述べている。著者の実験では脛骨の同一骨梁内でのCa, Pの特製X線像はCaがPと比べ常に濃度が高いことが明らかである。さらに定量分析ではCaは6週齢では対照群と高タンパク食群では有意差はみられなかった。しかし、9週齢に至ると、高タンパク食群と対照群の間には有意差があり、対照群が高値を示した ($p < 0.05$)。Pについてみると6週齢、9週齢ともに有意差はみられなかった。骨の石灰化度の判定材料として骨基質形成にとってX線マイクロアナライザーによるCa, Pの分析所見や骨密度所見では対照群が有効に働いていることから、中河原³⁴⁾のカルシウム療法の報告にもあるように、たとえ骨量の減少が認められても長期的な治療法としては標準食を持続して長期間カルシウムやタンパク質を用いることが骨構築にとっては有効に作用することが考え

られ、高タンパク質、高カルシウムの長期間の持続的摂取は骨の石灰化に関しては必ずしもよい結果が得られないことが示唆される。

病理組織所見から観察すると、高橋²⁹⁾は対照群と比べ高タンパク食群は骨量の減少とそれにともない骨小腔の減少を認めている。また海綿骨には、部分的に類骨組織も認めている。加来¹⁶⁾は脛骨の膜性骨化の骨基質形成について、対照群は高タンパク食と比べ一部骨小腔の減少が認められたと述べている。松田³³⁾は下顎頭による軟骨内骨化による骨基質形成について、対照群と比べ高タンパク食は肥大帯軟骨細胞の増加、石灰化基質の減少、軟骨性骨化の減少がみられ骨梁には部分的に低石灰化層も認められたと述べている。著者の実験では、対照群と高タンパク食群について、6週齢の所見では骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨の骨基質形成の差はほとんど認められない。しかし、9週齢の所見についてみると、対照群と高タンパク食群とを比較すると特徴的所見としては高タンパク食群において骨層全体にわたってハバース系の減少が認められる。

さらに電顕的観察によると対照群と比べ高タンパク食群では骨小腔は大、中、小の不定形のものも多く、骨小腔と周囲基質の境界が不明瞭な所見も多く認められたのが特徴的である。

以上のことから、著者の実験から、骨基質に關与する重要なタンパク質はバランスよく摂取することが必要である。骨構築にとって高タンパク食による長期間の摂取は、腸管でのカルシウム吸収、カルシウム尿の排泄、骨の石灰化の段階でのカルシウム利用の低下、骨からのカルシウムの動員、体内保留カルシウムの減少、尿細管でのカルシウムの再吸収の抑制など骨基質形成の低下につながるさまざまな因子が考えられることを考慮しなければならない。

結 論

近年、食生活の洋風化に伴う小児の成人病や骨の虚弱化が深刻化しており、その一因としてタンパク質の過剰摂取が考えられている。しかし、高タンパク食の骨構築に及ぼす影響については様々な報告があり統一した見解が得られていない。そこで今回、ヒトの離乳期に相当する生後3週齢のラットを用いて、3週間(6週齢)高タンパク食を与えた実験群(I)と6週間(9週齢)高タンパク食を与えた実験群(II)について脛骨の膜性骨化における高タンパク食摂取とカルシウム吸収の関連について検索し、以下の結論を得た。

I. X線学的およびX線骨密度所見

対照群（Ⅰ）の脛骨にみられる骨間縁皮質骨は厚さを均一に保ち緻密なX線不透過像として明瞭に認められた。また内側縁皮質骨は骨間縁皮質骨と同様に厚さを均一に保っているものの一部皮質骨が薄い部分も認められた。高タンパク食群（Ⅰ）は対照群（Ⅰ）と同様の所見を呈していた。対照群（Ⅱ）は、対照群（Ⅰ）と比較して、腓骨並びに脛骨全体は著しく伸長し、骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨は緻密で強いX線不透過像として厚さを増していた。高タンパク食群（Ⅱ）は対照群（Ⅰ）と同様の所見を呈していた。

骨密度については、対照群（Ⅰ）と高タンパク食群（Ⅰ）との間に有意差は認められなかった。対照群（Ⅱ）と高タンパク食群（Ⅱ）の間には、骨間縁皮質骨では1%の危険率で、内側縁皮質骨では5%の危険率で有意差がみられ、対照群（Ⅱ）が高値を示した。

II. X線マイクロアナライザーによるCa, Pの分析所見

Caの定量分析では、対照群（Ⅱ）と高タンパク食群（Ⅱ）との間に5%の危険率で有意差がみられ、対照群（Ⅱ）が高値を示した。相対Ca量比および相対P量比では、対照群（Ⅰ）、高タンパク食群（Ⅰ）と比べ対照群（Ⅱ）、高タンパク食群（Ⅱ）が高値を示した。

III. 病理組織学的所見

A. Contact microradiogram 所見

対照群（Ⅰ）では、内基礎層板および外基礎層板は明瞭で、ハバース層板を中心に骨小腔がみられ、骨化度の高い所見が認められた。

高タンパク食群（Ⅰ）では、対照群（Ⅰ）とほぼ同様の所見を呈しており、均一でよく石灰化された骨化度がみられた。

対照群（Ⅱ）では、対照群（Ⅰ）と比較して、骨層全体は厚さを増し、石灰化度も高く認められた。内側縁皮質骨、骨間縁皮質骨は、幅広く形成されていた。

高タンパク食群（Ⅱ）では、対照群（Ⅰ）および対照群（Ⅱ）と比較して骨層全体は薄く形成されていた。

B. 光顕的所見

対照群（Ⅰ）では、内側縁皮質骨と骨間縁皮質骨は、厚く緻密な骨質により形成されていた。内側縁皮質骨の外基礎層板と内基礎層板の部には、類円形、紡錘形を呈した骨小腔が存在していた。ハバース層板の部には、ハバース管が多く認められ、骨小腔、フォルクマン管もみられた。骨間縁皮質骨では、外基礎層板と内基礎層板の骨層は薄い、ハバース層板は厚く、多数のハバース管

と骨小腔が認められた。

高タンパク食群（Ⅰ）では、対照群（Ⅰ）と比較して、内側縁皮質骨の骨層全体におけるハバース層板の位置する部は広くハバース系が不規則に分布しているのが認められた。また、骨間縁皮質骨では対照群（Ⅰ）と比較して外基礎層板と内基礎層板は幅広く明瞭に認められ、その表面には骨芽細胞が規則正しく配列していた。

対照群（Ⅱ）では、対照群（Ⅰ）と比較して、骨組織は全体的に厚く形成され、とくにハバース系の増加が顕著である。内側縁皮質骨、骨間縁皮質骨はともに厚さを増し、骨間縁皮質骨の内基礎層板はとくに厚さの増加が認められた。

高タンパク食群（Ⅱ）では、対照群（Ⅱ）と比較して骨組織の形態には何ら変化はみられないが、骨層全体にわたってハバース系が減少していた。また、内側縁皮質骨では、骨小腔の減少がみられた。

IV. 走査型電子顕微鏡的所見

対照群（Ⅰ）の骨形成面では、類円形、楕円形など多数の骨小腔が存在していたが、不完全なものや、周囲基質との境界が不明瞭なものも多く認められた。また骨形成面に隣接して骨吸収面が広範囲に認められ、その窩底は浅かった。

高タンパク食群（Ⅰ）は対照群（Ⅰ）と同様、骨形成面では多数の骨小腔が認められ、周囲基質の境界は明瞭な部と不明瞭な部とが存在していた。また、骨形成面に隣接する骨吸収面は対照群（Ⅰ）同様広く、窩底は比較的浅いものが多く認められるが深いものも散見された。

対照群（Ⅱ）では、対照群（Ⅰ）と比較して、骨形成面の骨小腔の周囲基質との境界は明瞭に認められた。また、骨形成面に隣接する骨吸収面の窩底は浅かった。

高タンパク食群（Ⅱ）では、対照群（Ⅱ）と比較して形態的には何ら変化は認められなかったが、骨形成面の骨小腔は不定形で周囲基質との境界が不明瞭であった。骨形成面に隣接する骨吸収面は対照群（Ⅱ）と比べ増加していた。

V. 血液学的所見

血清中の電解質および生化学検査では、すべての群において何ら変化は認められなかった。

以上のことから、長期にわたる過剰なタンパク食摂取は、成長期ラット脛骨の膜性骨化による骨構築に負の影響を与えることが示唆された。

稿を終わるにあたり、終始ご懇切なるご指導とご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に感謝致します。

引用文献

- 1) 浦山明俊: もろくも折れる子供たちの骨. UTAN「驚異の科学シリーズ」10 地球環境白書今子供が危ない, 学習研究社, 1992, 48-55.
- 2) Funaba, M., Kawashima, T., Yano, H. and Kawashima, R.: Effects of a high protein diet on bone formation and calcium metabolism in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 36: 559-567, 1990.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 津野健太郎: カルシウムの腸管吸収に関する実験的研究, 第3編 カルシウムの小腸吸収に及ぼす各種アミノ酸添加の影響. *日本小児科学会雑誌* 65: 521-523, 1961.
- 7) 五島孜郎: カルシウムの腸管吸収とその影響因子. *栄養と食糧* 32: 1-11, 1979.
- 8) 黒田正清: *生化学*, 27: 99, 1955.
- 9) 森 昭胤: *生化学*, 26: 625, 1955.
- 10) 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.
- 11) Nordin, B. E. C.: International patterns of osteoporosis. *Clin. Orthop.* 45: 17-30, 1966.
- 12) Bell, R. R., Engelmann, 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 加来昭典: 脛骨の骨基質形成に関する X 線的, 光顕的および超微形態的研究. *九州歯会誌* 48: 554-574, 1994.
- 17) Wachman, A. and Bernstein, D. S.: Diet and osteoporosis. *Lancet* 1: 958-959, 1968.
- 18) Jonson, 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.
- 19) Walker, R. M. and Linkswiler, H. N.: Calcium retention in the adult human male as affected by protein intake. *J. Nutr.* 102: 1297-1302, 1972.
- 20) Anand, C. R. and Linkswiler, H. M.: Effect of protein intake on calcium balance of young men given 500 mg calcium daily. *J. Nutr.* 104: 695-700, 1974.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Margen, S., Chu, J. Y., Kaufman, N. A. and Callo-way, D. H.: Studies in calcium metabolism. 1. The calciuretic effect of dietary protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 584-589, 1974.
- 25) Linkswiler, H. M., Joyce, C. L. and Anand, C. R.: Calcium retention of young adult males as affected by level of protein and of calcium intake. *N. Y. Acad. Sci.* 36: 333-340, 1974.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 高橋雨丈: 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 松田容士子：成長期下顎頭の骨基質形成に関する X 線的, 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.
- 34) 中河原哲朗：虚弱下顎骨に対するカルシウム療法に関する病理組織学および超微形態学的研究—とくに骨基質形成—. 九州歯会誌 46：764-781, 1992.
- 35) 春岡龍男：ビタミン D 欠乏が脛骨に及ぼす影響に関する X 線的, 光顕的および走査電顕的研究—骨基質形成の変化—. 九州歯会誌 46：725-738, 1992.
- 36) 打和智子：ビタミン D 欠乏による歯槽骨の変化に関する X 線的, 光顕的および走査電顕的研究。九州歯会誌 46：67-88, 1992.