成長期骨基質形成におけるメカニカルストレスの影響

— 電子顕微鏡学的検索 —

江 口 明 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8年12月25日受理

The Influence of Different Mechanical Stress on the Metaphysis of Tibia in Rats at the Growth Stage — An Electron Microscope Study —

Akihiro Eguchi

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

The influence of different mechanical stress on the growth of metaphysis of tibia was investigated experimentally by electron microscopy. Wister strain rats were subjected to treadmill running 1h/day, 5days/wk for 4wk with a different speed: 10m/min, 30m/min, 40m/min.

The results are summarized as follows:

1. Scanning electron microscope findings

Among control group and different exercises groups, increase in formation of bone matrix was found in the ascending order of control group, 10m/min speed group 30m/min speed group. In trabeculae, width, bone mass and form of arrangement remarkably increased in the ascending order of control group, 10m/min speed group, 30m/min speed group. As compared with the control group, 40 m / min speed group showed wide chondrocyte layers. But trabeculae continuing from subchondral bone formation zone showed active resorption findings and were formed thin, and formation of bone matrix was restrained.

2. Transmission electron microscope findings

Among control group and different exercises groups, increase in active type osteoblasts showing active bone formation and osteocytes were seen in the ascending order of the control group, 10m/min speed group, 30m/min speed group. 40m/min speed group in comparison with the control group, active type osteoblasts were showed a decreasing tendency and fibroblast-like osteoblasts in dormancy increased. Osteoid osteocytes and young osteocytes were seen to increase in the ascending order of control group, 10m/min speed group, 30m/min speed group. But, in the case of 40m/min speed group, the number of osteocytes were decreased. Osteoclasts showed various morphology and activation in the ascending order of the control group, 10m/min speed group, and 30m/min speed group. Differentiation and

activation of osteoclasts in 40m/min speed group as compared with the control group were restrained

On the basis of the foregoing finding, moderate exercise below the threshold level at the growth stage induces activation for various cells and is closely involved in bone matrix formation in the metaphysis of the tibia.

Key words: Moderate exercise / Growth / Metaphysis of tibia / Bone formation

緒 言

骨は絶えず、モデリング、リモデリングという2つの過程によって代謝回転している。モデリングは、原則的に成長期の骨が正常な骨構造に発達していく際に働き、吸収と形成は別の部位で行われる¹⁾。リモデリングは、成人における主な過程で吸収と形成が同じ部位で行われ、骨の外形は変化しない²⁾。両者とも、古い骨を新しい骨に置き換えることによって、骨の機械的な健全性を維持し、代謝回転によって骨をCaの貯蔵庫にする役割を果たしていることは同じである³⁾。

骨のモデリング、リモデリングに影響を及ぼす要因としては遺伝的、および後天的環境要因が挙げられる^{4,5)}。物理的な要因としては重力、電氣的刺激、機械的刺激などで、中でもとくに重力による影響については、最近の宇宙開発、宇宙空間における実験などにより検討されている⁶⁾。また骨の成長は重力、負荷重によって促進的効果があるが、低下すると抑制的に働くことが確認された⁷⁾。

近年、骨粗鬆症の患者は急増し、成長期に骨量を増加させることにより、最大骨量を高いレベルで獲得することが課題となっている⁸⁾。現代の子供達は運動量⁹⁻¹³⁾、Ca摂取量が¹⁴⁻¹⁸⁾、不足していることが注目されている。一方、成長期における過度な運動が、骨変形、易骨折性などを引き起こす要因であるという報告もあり¹⁹⁾、小児の成人病や骨の虚弱化が、社会問題の一つとして深刻化している²⁰⁾。当教室の森本(1994)²¹⁾、今村(1995)²²⁾は、運動負荷がbone cellsの活性化に大きく関与していると報告している。

このような流れの中で、長管骨における運動負荷との関連性を検索することは、非常に意義がある。そこで著者は森本²¹⁾の研究を基礎として、成長期のラットを用い、種々の運動負荷を与えることにより、骨幹端部のような影響が現われるか電子顕微鏡学的立場から検索を行い、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)40匹を用い、無作為に以下の4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10m/min運動群: 対照群と同様の飼料を用いて、飼育した。学習期間の後、1時間/日、10m/minにて、5日/週、走行運動を課した。

標準食30m/min運動群: 対照群と同様の飼料を用いて、飼育した。学習期間の後、1時間/日、30m/minにて、5日/週、走行運動を課した。

標準食40m/min運動群: 対照群と同様の飼料を用いて、飼育した。学習期間の後、1時間/日、40m/minにて、5日/週、走行運動を課した。

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)を用いた。これは走行面のベルト後端部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。学習期間としての第1週の運動負荷は走行時間走行強度をTable 2-1,

Table 1-1 Composition of experimental diets (%)

Ingredients	Normal diet
β -Corn starch	38.0
α -Potato starch	10.0
Vitamin-free casein	25.0
Cellulose powder	8.0
Soy bean oil	6.0
Mineral mixture [★]	6.0
Granurate sugar	5.0
Vitamin mixture [▲]	2.0

Table 1-2 Composition of Mineral mixture and Vitamin mixture

Mineral mixture★ (per 100g)		Vitamin mixture▲ (per 100g)	
NaCl	4.66 g	Vitamin A. acetate	50,000 IU
MgSO ₄	7.17 g	Vitamin D ₃	10,000 IU
Na ₂ HPO ₄	9.35 g	Vitamin E. acetate	500 mg
KH ₂ PO ₄	25.72 g	Vitamin K ₃	520 mg
Fe-citrate	3.18 g	Vitamin B ₁ . HCl	120 mg
KI	0.01 g	Vitamin B ₂	400 mg
ZnCO ₃	0.11 g	Vitamin B ₁₂	0.05 mg
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	14.56 g	Vitamin B ₆ . HCl	80 mg
Ca-lactate	35.09 g	Vitamin C	3,000 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.05 g	D-biton	2 mg
MnSO ₄ ·4-5H ₂ O	0.12 g	Folic acid	20 mg
		Calcium pantothenate	500 mg
		Nicotinic acid	600 mg
		p-aminobenzonic acid	500 mg
		Inositol	600 mg
		Choline chloride	20,000 mg
		Cellulose	rest

Table 2-1 Learning process on treadmill-10m/min group

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

Table 2-2 Learning process on treadmill-30m/min group

Date (day)	Speed (m/min)	Time (min)
1	5	10
2	7	20
3	15	30
4	20	40
5	25	50
6	30	60

Table 2-3 Learning process on treadmill-40m/min group

Date (day)	Speed (m/min)	Time (min)
1	10	10
2	17	20
3	24	30
4	30	40
5	35	50
6	40	60

2-2, 2-3 に示すとおり, 日ごとに, 段階的に増加させた. 続いて第2~4個の実験期間では上記のように各群 10m/min, 30m/min, 40m/min にて, 1時間の運動を行わせた.

I. 走査型電顕試料

試料は, まず, 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を行って付着物を洗浄, 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。固定後、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ム（LKB-4800 型、LKB）を用いた。2～3μm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、0.1μm以下の超薄切片を作製した。次に、Watson 法による酢酸ウラニルにて染色した後、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（SEM）

脛骨近位骨幹端部断面を成長板の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下方の骨梁部では、骨形成と骨吸収所見が散見し、更に下方には小骨髓腔も認められた（Fig. 1）。

軟骨層では、増殖帯直下の肥大帯に多数の軟骨小腔を認め、この長径は約20～25μmで、類円形、卵円形、楕円形、不正円形など様々な形態で、明瞭に区画されていた。小腔壁には、不規則な走行のコラーゲン原線維によって、比較的密なコラーゲン原線維網が形成されていた。肥大帯下部の軟骨小腔壁には、長径約1～3μm前後の石灰化小球が多数存在し、石灰化球の表層部はコラーゲン原線維網で形成され、小球の間隙にも疎なコラーゲン原線維網が認められた（Fig. 2）。連続する侵

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

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

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。

骨梁部では、広範囲にわたり骨形成面と骨吸収面が複雑に混在していた。骨形成面では、長径15～30μm大の類円形や不定形を呈した浅い骨小腔が散在し、その骨小腔壁には、走行の不規則なコラーゲン原線維による密なコラーゲン原線維網と一定方向に走行する密なコラーゲン原線維が形成されており多数の骨細管が開口していた。小腔周囲基質は、隣接するコラーゲン原線維が交叉吻合している密なコラーゲン原線維網で形成されており、そのコラーゲン原線維には直径約0.3μmの超微細顆粒物が多数集合し活発な骨基質形成しているところも存在していた。骨吸収面では大小の吸収窩が集合し境界の不明瞭な凹凸面を呈していた。その高底は比較的浅

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

Fig. 6 A higher magnification of Fig. 5. (SEM)

Fig. 4 A higher magnification of Fig. 1. (SEM)

Fig. 7 A higher magnification of Fig. 5. (SEM)

Fig. 5 Metaphysis of tibia in the 8th week in the normal diet group and 1 hour exercise of speed: 10 m/min (SEM)

Fig. 8 A higher magnification of Fig. 5. (SEM)

Fig. 9 Metaphysis of tibia in the 8th week in the normal diet group and 1 hour exercise of speed: 30 m/min (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)

く、吸収により露出した骨小腔が認められた (Fig. 3, 4).

標準食 10m/min 運動群

対照群と比べ、各軟骨細胞層に大きな変化はないが、軟骨下骨形成帯では骨基質形成が比較的活発になっていた。それに連続する骨梁は、太さ、走行の規則性、骨量とも増加していた (Fig. 5).

軟骨層の拡大像では、対照群と同様に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、小腔壁面の石灰化小球が対照群に比べて比較的癒合した状態で満たされており、小球間のコラーゲン原線維網も密な状態になっていた (Fig. 6).

骨梁部では、骨吸収面周囲の骨形成面が比較的多く存

在するようになっていた。骨形成面と骨吸収により露出した吸収高には多数の骨小腔が存在し小腔内部では、骨細管が開口していた。その周囲の骨基質は比較的スムーズな面を呈し、密なコラーゲン原線維により緻密な骨基質を形成していた (Fig. 7, 8).

標準食 30m/min 運動群

対照群、標準食 10m/min 運動群に比べ各軟骨細胞層が幅広く形成され区画にも比較的明瞭であった。軟骨下骨形成帯では骨基質形成が非常に活発で、それに連続する骨梁は、対照群、標準食 10m/min 運動群に比べさらに太くなり、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、肥大帯上部、中部の軟骨小腔の

Fig. 13 Metaphysis of tibia in the 8th week in the normal diet group and 1 hour exercise of speed: 40 m/min (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)

サイズが対照群, 標準食 10m/min 運動群に比べて大きい傾向が認められ, 肥大帯下部の小腔壁面, 小腔底面に集合している長径約 $1-3\mu\text{m}$ 大の多数の石灰化小球は更に癒合が進み小球間隙は不明瞭となっていた (Fig. 10).

骨梁部では, 密なコラーゲン原線維にて構成された骨形成面が多数存在し, 対照群, 標準食 10m/min 運動群に比べて, 更に骨基質形成が促進していた. 骨形成面には無数の骨細管が開口した骨小腔が多数存在し, 周囲のスムーズな面は所々に窩底が浅く皿上に窪んだ骨吸収窩が存在し, 常に骨構築が旺盛であることが認められた (Fig. 11, 12).

標準食 40m/min 運動群

各軟骨細胞層は, 標準食 30m/min 運動群と同様に, 幅広く形成され, この傾向は特に肥大帯下部で著明であったが, 各区画には不明瞭な部分も多く認められた. 軟骨下形成帯に連続した骨梁は, 標準食 30m/min 運動群と比較して, 細長く, 走行も比較的不規則となり, 数も減少傾向であった (Fig. 13).

軟骨層の拡大像では, 標準食 30m/min 運動群に比べ, 各層の区分には不明瞭なところが認められ, 肥大帯上部, 中部の軟骨小腔は, 標準食 30m/min 運動群と同程度の大きさであったが, 小腔壁面は断裂し, 不完全で, 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. 肥大帯下部の軟骨小腔は, 石灰化小球が乏しく, 小球が全く存

Fig.17 Osteoblast in metaphysis of tibia in the 8th week. (TEM×6,000)

Control group

Ob: osteoblast

在しないところも存在し、小球で満たされている小腔でも小腔壁は不完全で、小腔底部にわずかに確認できる程度であった (Fig. 14).

骨梁部では、対照群と同じ程度に骨形成面と骨吸収面が存在していたが、骨形成面の骨小腔の数は減少傾向にあり、吸収によって露出した不完全な骨小腔も多数認められた。又、骨小腔壁に近い骨基質は、比較的コラーゲン原線維が密に分布しているのに対して、小腔から離れた基質では、疎な状態を呈していた (Fig. 15, 16).

II. 透過型電顕所見 (TEM)

対照群

骨芽細胞は、単核で、大きさ、形態は多様であった。骨基質形成の盛んな活性型骨芽細胞は、立方形、円錐形を呈し、単層配列、あるいはモザイク状に一塊をなして、一層の未石灰化骨基質である類骨層を介在させて、石灰化骨基質と接していた (Fig. 17)。また類骨層には、骨芽細胞から多数の細胞突起を伸長させ、活発に有機基質を分泌しているのが認められた。骨芽細胞間では、細胞膜が部分的に密に接した斑状の desmosome 様結合が認められた。核は辺縁クロマチンに富み、核小体も明瞭であり、細胞内の一側に偏在していた。細胞質に

は、核に近接したゴルジ装置や、規則的に層状配列した粗面小胞体が存在し、その周囲には遊離リボソームと分散したミトコンドリアが認められた。これに対して bone lining cell である休止期の骨芽細胞は、扁平化し、骨基質と長軸を平行に並べて、類骨層を介さないで直接石灰化骨基質に接して存在するものと、僅かな未石灰化骨基質を介して骨基質に接しているものが存在した (Fig. 18)。活性型骨芽細胞に比べて、核・細胞質比率は大きく、粗面小胞体やミトコンドリアは減少し、ライソゾーム様構造物も認められ、細胞質内の小器官は未発達であった。

骨芽細胞群に近接した新生骨基質中には、細胞外形が、骨芽細胞と類似した幼若な骨細胞が認められ、大きさは骨芽細胞に比べて小型で、骨芽細胞と同様に、発達した粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、ライソゾーム様構造物を有し、核は辺縁クロマチンに富み、核小体は明瞭であった (Fig. 19)。また、骨細胞周囲が電子密度の高い lamina limitans によって囲まれ、外側は石灰化骨基質、内側は未石灰化な類骨組織が認められるものも存在し、骨細胞は多方向に多数の細胞質突起を骨基質中に伸長していた。骨細胞間には、細胞質突起に

Fig. 18 Osteoblast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×5,000)
Control group
Ob: osteoblast

Fig. 19 osteocyte in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×6,000)
Control group
Oc: osteocyte N: nunclear

Fig. 20 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8th week. (TEM×5,000)

Control group

Oc: osteocyte N: nucleus

よるギャップ結合が認められ、骨基質中に細胞性の網目構造を作っていた。骨基質の深部に行くに従い、骨細胞は更に小さくなり、細胞質の縮小傾向が著明で、核細胞質比率は大きくなった (Fig. 20)。細胞内小器官の発達は悪くなり、ミトコンドリア、粗面小胞体、ゴルジ装置は減少していたが、ライソゾウム様構造物は増加傾向であり、lamina limitans 内側の類骨組織は減少傾向であった。

破骨細胞は、多核を有する不整形な巨細胞で、石灰化骨基質と接しているものと、骨基質面から遊離しているものが存在した。核は不整形なものが多く、辺縁クロマチンに富み、その周囲には多数のミトコンドリアと、発達したゴルジ装置が認められたが、粗面小胞体は乏しく細胞質中に広く分散した状態であった (Fig. 21, 22)。石灰化骨基質面に接している破骨細胞は、microvilli 状の良く発達した ruffled border が認められ、それに連続する細胞質中には、大小多数の空胞や、それを取り囲むように存在するライソゾウム様構造物が、認められた。ruffled border に隣接している clear zone は、偽足様の幅広い突起状を示し、均一な無構造であった。それに連続する細胞質中には、ミトコンドリア、粗面小胞

体、などは認められなかった。骨基質から遊離している破細胞は、前骨芽細胞様細胞と接しているものも存在した。

標準食 10m/min 運動群

骨芽細胞は、対照群に比べて立方形、円錐形の細胞が増加傾向を示し、単核で、粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアが多数認められた (Fig. 23)。その分布状態は単層配列よりも、モザイク状に一塊をなしている細胞群が多く認められた。その細胞群を取り囲む様に存在している類骨層も、対照群に比べて幅広く、骨芽細胞から盛んに有機基質を分泌しているのが認められた (Fig. 24)。

骨細胞も対照群と比べて、幼若なものから成熟なものまで、増加傾向にあることが認められ、細胞内小器官も、対照群に比べて良く発達していた (Fig. 25, 26)。

破骨細胞に関しては、対照群に比べて増加傾向は認められなかったものの、骨基質と接している破骨細胞が多く認められた。その周囲の骨基質中には、多数の幼若な骨細胞が存在しており、骨構築が活発に行われていた (Fig. 27, 28)。細胞は、対照群同様に不整形を呈し、多核であり、その周囲には発達したミトコンドリア、ゴ

Fig. 21 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×7,500)

Control group

RB: ruffled border M: mitochondria

Fig. 22 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×7,500)

Control group

CZ: clear zone M: mitochondria

Fig. 23 Osteoblast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM $\times$ 6,000)

10m/min group

Ob: osteoblast rER: rough-surfaced endoplasmic reticulum

Fig. 24 Osteoblast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM $\times$ 5,000)

10m/min group

Ob: osteoblast

Fig. 25 Osteocyte and osteoblast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×5,000)
10m/min group
Oc: osteocyte Ob: osteoblast

Fig. 26 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×6,000)
10m/min group
Oc: osteocyte Tr: trabecula

Fig. 27 Osteoclast and osteocyte in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM $\times$ 7,500)
10m/min group
Ocl: osteoclast Oc: osteocyte

Fig. 28 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM $\times$ 7,500)
10m/min group
RB: ruffled border CZ: clear zone

Fig. 29 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×5,000)

10m/min group

↓ : ruffled border Ocl : osteoclast

Fig. 30 Osteoblast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×5,000)

30m/min group

Ob : osteoblast

Fig. 31 Osteoblast and osteoclast in metaphysis of tibia in the 8th week. (TEM×4,000)
30m/min group

Ob: osteoblast Ocl: osteoclast RB: ruffled border

ルジ装置が存在していた。また、ruffled border は、microvilli 状の突起状構造物が、良く発達しており、連続する細胞質中には、大小多数の空胞や、ライソゾーム様構造物が存在していた (Fig. 29)。

標準食 30m/min 運動群

骨芽細胞は、対照群、標準食 10m/min 運動群に比べ、立方形、円錐形の活発に骨基質形成を行う細胞が増加傾向を示していた (Fig. 30)。細胞群の付近には、破骨細胞、前破骨細胞の存在も確認され、類骨層の幅も、対照群、標準食 10m/min 運動群に比べ、更に増加しており活発な骨改造が行われていた (Fig. 31)。

骨細胞は、骨芽細胞群付近の類骨組織中に、細胞内小器官に富み、核細胞質比率の小さい幼若な骨細胞が、対照群、標準食 10m/min 運動群に比べ、多数認められた (Fig. 32, 33)。骨基質深部でも、対照群に比べて、多数の成熟した骨細胞が認められ、互いに細胞質突起を伸長して、ギャップ結合による網目構造を活発に取っていた (Fig. 34)。

破骨細胞に関しては、標準食 10m/min 運動群と比べ、骨基質面から離れた所で、破骨細胞系細胞の遊走が多くみられ、骨芽細胞、骨芽細胞系細胞と近接、あるいは

は接触して、情報交換しながら、分化、活性しているのが認められた (Fig. 35)。骨基質面に接している破骨細胞は、標準食 10m/min 運動群と同様に、多数の発達したミトコンドリア、ゴルジ装置が認められ、ruffled border は、細長く伸長し、非常に密な状態を呈していた (Fig. 36)。

標準食 40m/min 運動群

骨芽細胞は、標準食 30m/min 運動群、10m/min 運動群に比べ、立方形、円錐形の活性型骨芽細胞が、減少傾向であり、骨基質に接している線維芽細胞様の休止期骨芽細胞が、多数認められた。また、標準食 30m/min 運動群にみられた様な、前骨芽細胞様細胞と前破骨細胞が接触している所も、減少していた (Fig. 37)。

骨細胞は、対照群と比べて、幼若な骨細胞が同等に存在していたが、成熟している骨細胞は、標準食 30m/min 運動群、10m/min 運動群に比べて、減少傾向であった。細胞内小器官は、幼若な骨細胞で、標準食 30m/min 運動群、10m/min 運動群に比べて発達が悪く、核が不整形になっている骨細胞も認められた。対照群に比べて、差異は認められなかったが、lamina limitans による石灰化骨基質と未石灰化骨基質との境界が不明瞭

Fig. 32 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×6,000)
30m/min group
Oc: osteocyte Tr: trabecula

Fig. 33 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×6,000)
30m/min group
Oc: osteocyte M: mitochondria

Fig.34 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM $\times$ 10,000)
Normal diet group and 1 hour exercise of speed at 30m/min
Oc: osteocyte ↓ : gap junction

Fig.35 Osteoblast and osteoclast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM $\times$ 6,000)
Normal diet group and 1 hour exercise of speed at 30m/min
Ob: osteoblast ↓ : osteoclast N: nuclear M: mitochondria

Fig. 36 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8th week. (TEM×6,000)
Normal diet group and 1 hour exercise of speed at 30m/min
RB: ruffled border CZ: clear zone M: mitochondria V: vacuole

Fig. 37 Osteoblast in metaphysis of tibia in the 8th week. (TEM×5,000)
Normal diet group and 1 hour exercise of speed at 40m/min
Ob: osteoblast M: mitochondria

Fig.38 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×5,000)

Normal diet group and 1 hour exercise of speed at 40m/min

Oc: osteocyte Tr: trabecula N: nuclear LL: lamina limitans

Fig. 39 Osteocyte in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×5,000)

Normal diet group and 1 hour exercise of speed at 40m/min

Oc: osteocyte Tr: trabecula N: nuclear M: mitochondria

Fig. 40 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×12,000)
Normal diet group and 1 hour exercise of speed at 40m/min
CZ: clear zone M: mitochondria V: vacuole

Fig. 41 Osteoclast in metaphysis of tibia in the 8 th week. (TEM×12,000)
Normal diet group and 1 hour exercise of speed at 40m/min
RB: ruffled border M: mitochondria V: vacuole

になっている所も認められた (Fig. 38, 39).

破骨細胞に関しては、対照群と同等の吸収所見が認められたが、一部に発達の悪い ruffled border が認められ、microvilli 状の突起状構造物は、扁平化しており、ヒダ状を呈している所も存在した (Fig. 40, 41).

考 察

骨の成長は、膜性骨化と軟骨内骨化に分類され²³⁾、それらが、互いにバランスを保ちながら骨構築を行う。著者は、成長期ラットの運動による盛んな骨変化が期待され²⁴⁾、細胞機能の活発な脛骨の近位骨幹端部を用いて²⁵⁾、種々の運動負荷に対する骨基質形成の影響を検索した。

I. 条件設定

実験動物は、Wister 系雄ラットを使用した²⁶⁾。飼育期間は、骨組織に運動の影響が出現してくると思われる、ヒトの歩行可能な時期の1歳6ヶ月～2歳から、ヒトの思春期の16歳～18歳に相当する、4週齢から8週齢までとした²⁷⁾。

運動負荷の強度について、山岡ら (1963)²⁸⁾ は、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波など機能面で、短時間の過激な運動よりも、比較的軽度の運動を長時間にわたって負荷する方が、発育に効果的であることを推察している。Boothら (1975)²⁹⁾ は、骨の成長面で、低強度の運動負荷は、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、高強度の運動負荷は、逆にそれを抑制すると仮定している。また、勝田ら (1991)²⁵⁾ は、運動強度 (走行速度) の違いは、骨長軸成長に対して異なる影響を引き起こし、臨界強度以下では、運動強度依存的な促進効果を、またそれ以上では無効果、あるいは成長の抑制を生じる可能性があるとし唆している。このことより、骨形成の運動負荷による効果を得る為には、単位時間当たりの自由運動量を上回り、臨界強度以下の設定を行わなければならない^{25, 30)}。雄ラットの自由運動量は、7週齢で約1 km/day であり、10～11週齢ではピークの7～8 km/day を示し、以後段階的に減少傾向となる³¹⁾。臨界強度は、7～9週齢の場合、40m/min, 50m/min の間で、運動負荷による効果出現の臨界点が存在するとされている²⁵⁾。1日の運動負荷時間は、七五三木ら (1988)³²⁾ は、トレーニング効果は、30min/day の運動時間以上では、運動時間に依存しないと報告している。本実験では、低強度の運動負荷として10m/min、中強度の運動負荷として30m/min、高強度の運動負荷として40m/min の速度で、運動負荷時間は、1日1時

間と設定した。この運動量は、これらのことを総合して考えると、成長期の骨形成に有効であると考えられる。

また、運動負荷の効果が、骨の成長に抑制的に働くという結果^{33, 34)}も報告されている。この原因として、運動の生理的負担度が高い場合に、成長の抑制が引き起こされると指摘されている³²⁾。運動負荷による成長抑制に係する内分泌因子として副腎皮質より分泌されるグルココルチコイドが考えられている³⁵⁾。グルココルチコイドは、下垂体由来の成長ホルモン (GH) 分泌の抑制や、GH により刺激され分泌されるソマトメジン (Sm) の作用を抑制する働きがあることが知られている³⁶⁾。つまり、運動の生理的負担度が低い場合、視床下部、下垂体、GH、Sm、のいずれかに影響を及ぼし、骨の成長に促進的に働くが、生理的負担度が高い場合、グルココルチコイドの血中濃度が増加すると考えられている³⁷⁾。Bunck ら (1971)³⁸⁾、Frenkl ら (1962)³⁹⁾ は、短時間の急激な運動はグルココルチコ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と報告している。一方、勝田ら²⁵⁾は、成長期ラットに運動負荷を与えた際、副腎湿重量及び体重あたりの副腎湿重量は、運動群において有意に高値を示したが、副腎肥大より推察されるグルココルチコイドの過分泌は、骨の成長抑制を引き起こすレベルには至らなかったと報告している。また、樋口ら (1882)³¹⁾ は、自由運動によるラットの血中カテコールアミン濃度は、運動量が多い時期に上昇し、少ない時期に低下していることを確認している。本研究の場合、運動強度は上限を臨界強度付近に設定し、運動時間も運動負荷効果の現れる範囲内であり、生理的負担度を越えない程度であるので、グルココルチコイドによる成長抑制はほとんどないと思われる。しかし、本研究でも副腎の重量、大きさ、カテコールアミン濃度に関しては、変化している可能性が充分考えられるので、今後更なる検討が必要である。

II. 電子顕微鏡的所見

1. 走査型電子顕微鏡 (SEM)

対照群の軟骨層から骨梁全体の像の観察では、軟骨層の明瞭な区分と骨梁の活発な基質形成が認められ、江川ら (1980)⁴⁰⁾ がラットを用いた下顎頭の軟骨内骨化について報告している走査型電子顕微鏡所見と一致していた。これらの所見は、当教室においても同様な報告がされており^{21, 22)}、本実験の飼育方法が同一条件であったことの裏付けとなった。

軟骨層では、藤本 (1982)⁴¹⁾ が、肥大層下部の軟骨小

腔壁に、その表層を密なコラーゲン原線維網で形成された多数の石灰化小球で満たされており、骨化層との境界付近では、表層まで石灰化が及んでいる石灰化小球が軟骨小腔壁に癒合していると述べている。この石灰化小球は、2層構造を示すとされており^{42,43)}、Scherft (1968)⁴³⁾ は、内層は疎なコラーゲン原線維網とコラーゲン原線維に付着する顆粒からなり、外層は最表層の密な微細線維網と顆粒で形成されていると述べている。さらに石灰化小球は、X線分析によると、Ca, P, の比からハイドロキシアパタイトの結晶で形成されていることが認められ^{44,45)}、軟骨内骨化における初期石灰化との密接な関係があると論じられている⁴²⁾。本研究では、対照群に、同様の所見が認められたが、運動群では低強度運動群、中強度運動群の順に、軟骨小腔内で石灰化小球間の癒合が活発になっていくのが認められ、運動強度依存的に長軸成長が促進されたと思われる。このことは、勝田 (1991)²⁵⁾ の報告と一致している。しかし高強度運動群では、石灰化小球の減少傾向、不明瞭化が認められた。Kohlrausch (1924)⁴⁶⁾ は、運動時に骨端軟骨へ加わる力学的な圧力により、軟骨細胞の損傷をまねくと推察している。高強度運動群でも、同様な結果が認められ、力学的刺激により軟骨基質の形成が抑制されたと思われる。

骨梁部でも、運動強度依存的に、活発な骨基質形成の際に出現する類円形、不正円形の骨小腔や^{47,48)}、緻密なコラーゲン原線維が増加していた。また、高強度運動群は、骨梁部でも長軸成長に抑制傾向がみられたが、軟骨層ほどの著明な変化ではなかった。骨の長軸成長は成長板に内在する軟骨細胞の増殖、成熟、分化という一連のプロセスによりなる⁴⁹⁾。本実験では、低強度運動、中強度運動群間に、運動強度依存的な骨基質形成促進効果が認められたが、高強度運動群の軟骨層と骨梁部で、運動負荷効果の違いがでたのは、初期石灰化の段階である軟骨層が最初に刺激を受けて、その影響で骨形成が促進されるので、骨梁部では軟骨細胞が受けた力学的刺激の影響が少なかったものと思われる。

2. 透過型電顕所見 (TEM)

TEM 像では、SEM 像の所見を裏付けるような所見が多く認められた。骨芽細胞は、年齢、代謝活性および、ホルモンなどの影響が大きく、骨形成に関与するとともに破骨細胞の分化、活性にも重要な役割を果たしている^{50,51)}。また、骨細胞と共同して骨組織を維持し、ミネラルのホメオスタシスにおける血液骨関門として骨の特徴的な内部環境を保証している⁵²⁾。骨基質形成の盛

んな骨芽細胞は、活性型骨芽細胞と呼ばれ、粗面小胞体、ゴルジ装置の発達と、分泌顆粒で特徴づけられ、細胞と石灰化した骨基質の間には一層の未石灰化骨基質である類骨層の介在がある⁵³⁾。骨基質形成期の骨芽細胞の一部は、自ら形成した骨基質中に埋め込まれ骨細胞となるが、骨基質形成を行っていない骨芽細胞は、休止期骨芽細胞 (Bone Lining Cells) と呼ばれ、細胞質に乏しく、各細胞内小器官は未発達で、類骨層の介在がなく骨の表面で一種の膜系を形成している^{54,55)}。また、Ozawa ら (1990)⁵⁶⁾ によって、*in vitro* での圧縮などの力学的刺激に対して、骨芽細胞の変化が確認されている。Maki (1985)⁵⁷⁾ は電気刺激による軟骨内骨化の変化を検索し、コラーゲン原線維の増生に伴い骨化の著明な促進、骨芽細胞の増加、電顕的には、細胞内小器官とくに粗面小胞体の発達を確認している。Rodan ら (1978)⁵⁸⁾ は、電磁場の変動により膜構造が変化して、細胞内の Na, Ca 流量の変化がおき、DNA 合成の引き金になると推察している。Watson ら (1975)⁵⁹⁾ は、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ている。Pilla (1974)⁶⁰⁾ は電気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おき、未分化間葉系細胞の活性化が生じると述べている。保田ら (1954)⁶¹⁾ も、運動における力学的刺激の一部が電気エネルギーとして、細胞に作用すると述べている。これらの報告から、骨芽細胞にメカノレセプターが存在することが推察され、注目が集まっている。本研究では、対照群に比べて、低強度運動群、中強度運動群に活性型骨芽細胞の増加傾向が認められ、力学的刺激により、前骨芽細胞、骨芽細胞の分化、活性化が促進したものと思われる。これは、Ozawa⁵⁶⁾、Maki⁵⁷⁾、Rodan ら⁵⁸⁾、Watson ら⁵⁹⁾、Pilla⁶⁰⁾ の報告に一致していた。低強度運動群、中強度運動群間でも骨芽細胞の増加傾向が認められた。これは、運動強度依存的な効果が、力学的刺激として骨芽細胞に作用して、細胞の分化、活性化が促進したと思われる。本実験の骨梁部の SEM 像においても、Maki⁵⁷⁾ の観察と同様に、運動強度依存的にコラーゲン原線維の増生や、骨梁の増加が認められた。TEM 像でも同様に、骨芽細胞の細胞内小器官、とくに粗面小胞体の発達が、運動強度依存的に促進しているのが認められた。一方、高強度運動群は、低強度運動群、中強度運動群に比べて、活性型の骨芽細胞が減少傾向であった。これは、同群の SEM 像の所見を裏付けるものである。軟骨細胞が運動負荷による力学的圧力で損傷を受け、それに連続して骨芽細胞の分化、活

性化が抑制されたものと思われる。

骨細胞は骨細胞間で、または骨芽細胞と、細長い細胞質突起で連結し、細胞性ネットワークを作っている⁶²⁾。このネットワークは、細胞の情報伝達、刺激の伝導の役割があると従来考えられてきたが⁶²⁾、小澤ら (1994)⁶³⁾ は、この他に、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レセプターとしての働きがあると推察している。本研究では、対照群に比べて低強度運動群、中強度運動群の順に運動強度依存的に増加傾向が認められた。これは、骨細胞の増加も、運動負荷による物理的な力が、細胞性ネットワークを介して作用した結果と思われる。高強度運動群で、低強度運動群、中強度運動群と比べ、骨細胞が減少傾向であったのは、同群の骨芽細胞が、町田ら (1990)⁶⁴⁾ が述べているメカニカルストレスの影響で減少傾向となり、それに呼応して生じた結果であると思われる。

破骨細胞は、clear zoneにより閉鎖系の微小環境を形成して、ruffled borderと呼ばれる特殊な細胞膜の一部で骨吸収を行う^{65, 66)}。この骨吸収の調節は、骨芽細胞が行っていると考えられており⁵¹⁾、Udagawaら (1989)⁶⁷⁾、Takahashi (1988)⁶⁸⁾、Burger (1984)⁶⁹⁾ が、in vitroにおいて、破骨細胞の分化には、骨芽細胞が必要であると報告している。Rodanら (1981)⁷⁰⁾ は、骨芽細胞の形態変化によって、露出された骨表面に各種の化学走化性物質が溶出しており、そこへ前破骨細胞が誘導され破骨細胞へ分化する可能性のあることを報告しており、実際、電顕的にも破骨細胞、前破骨細胞が、骨芽細胞、前骨芽細胞と接触している所見を確認している。また、破骨細胞の分化、活性化を直接抑制する Calcitonin のレセプターは、破骨細胞、前破骨細胞に存在することが確認されているが、骨芽細胞には見いだされていない⁷¹⁾。Itoら (1987)⁷²⁾、Farleyら (1988)⁷³⁾ は、ある種の骨芽細胞培養細胞が、Calcitoninにより骨形成能を活性化する可能性を示唆している。また、Farleyら (1989)⁷⁴⁾ は、in vivoにおいても、骨量増加を認める結果を報告している。本実験では、低強度運動群、中強度運動群では共に破骨細胞の分化活性が著明であり、とくにその傾向は、中強度運動群に著明で破骨細胞と骨芽細胞の接触という形で認められ、骨芽細胞と破骨細胞の間に相互作用が営まれ、運動負荷効果により骨芽細胞は分化、活性化し、破骨細胞は古い骨質を吸収することによって骨代謝が活発になった為と思われる。これはIto⁷²⁾、Farley⁷³⁾の報告と一致している。高強度

運動群では、中強度運動群に見られたような、骨芽細胞と破骨細胞間の活発な相互作用の所見は認められなくなり、一部に破骨細胞の活性が低下している所見も認められた。これは、同群の骨芽細胞の減少傾向、活性低下により、骨基質形成能が低下したので、相乗的に起こった結果と思われる。

Ⅲ. 総括的考察

本研究の運動負荷効果として、直接骨に作用される力学的刺激と、全身的因子に作用される間接的影響が考えられる⁷⁵⁾。力学的刺激による骨基質形成への影響として、Shillingら (1992)⁷⁾ は、負荷重の程度により骨形成が規定されると述べている。Kohlrusch (1924)⁴⁶⁾ は、長軸成長の刺激因子として、運動時に骨端軟骨へ加わる力学的な圧力を仮説している。勝田ら (1991)²⁵⁾、七五三木ら (1988)³²⁾ は、臨界強度以下の運動負荷を加えた場合、骨長軸成長は運動強度依存的に促進するが、それ以上では無効果あるいは成長は抑制されると述べている。また、藤巻 (1993)¹⁹⁾、Jamesら (1986)⁷⁶⁾ は、強い運動は長管骨の成長を抑制し、内部構造の虚弱化が生じると述べている。本研究でも低強度運動群、中強度運動群には、運動強度依存的な骨基質形成促進効果があったが、高強度運動群には、骨基質形成の抑制が認められた。本研究では、勝田ら²⁵⁾の報告を基に、臨界強度を設定したが、著者の飼育した環境、飼育期間との相違より、高強度運動群に加えた運動負荷は、臨界点を越えていたと思われる。また、Everittら (1984)⁷⁷⁾、Savilleら (1969)⁷⁸⁾ は、運動による筋肉の肥大、増加は、骨量を増加させ、Ca含有量も増加させると述べており、本研究でも、間接的に骨基質形成を促進させたと思われる。

一方、全身的因子に作用される骨基質形成への影響として、運動によるホルモンの影響がある。Kelly (1990)⁷⁹⁾、Davee (1988)⁸⁰⁾ は、運動負荷の増加により、血液中の、骨密度を増加させる因子であるIGF-Iのレベルが増加すると述べている。Borderら (1986)⁸¹⁾ は、運動負荷を加えることにより、成長ホルモンが増加することを述べている。IGF-Iは骨芽細胞の分化、活性と、また成長ホルモンは骨端軟骨の生成率促進と密接な関係があり、本研究においても、骨基質形成促進に関与したことが考えられる。また、カルシウム調節ホルモンの影響も考えられ、Rubenら (1981)⁸²⁾ は、Calcitoninレベルを上昇させ、PTHを減少させることは、強度の運動によりカルシウムイオンの活性増加による高カルシウム血症を抑制し、過度の骨吸収を防ぐと考

えている。John ら (1985)⁸³⁾ は、運動により Calcitonin の分泌が増加し、PTH の抑制がおけると述べている。本研究では、運動時の血清カルシウムイオン濃度、Calcitonin、PTH の検索は行っていないが、運動負荷によるカルシウム調節ホルモンの変化は、骨基質形成に密接に関係していると思われる、今後さらに検討が必要である。

結 論

成長発育期の骨基質形成に対する運動負荷の効果を探索するために、生後4週齢の Wistar 系雄ラットに3種類の走行負荷を加え、脛骨骨幹端部の軟骨内骨化を電子顕微鏡学的に観察した。

I. 走査型電顕所見

対照群では、成長板から連続した静止帯、増殖帯、肥大帯、侵食帯、軟骨下形成帯の各軟骨層は明瞭に区分でき、さらに下方の骨梁部では、骨形成と骨吸収所見が散在していた。

これに対して運動群では、対照群<低強度運動群<中強度運動群の順で、軟骨小腔中の石灰化小球に増加傾向が認められ、小球間の癒合も進んでいた。高強度運動群では、他の運動群に比べて、軟骨小腔は不明瞭になり、石灰化小球も減少傾向であった。軟骨下形成帯に連続した骨梁部では、対照群<低強度運動群<中強度運動群の順に、骨基質形成が促進され、幅広い走行の規則的な骨梁が認められた。高強度運動群では、他の運動群に比べて、骨梁は細く、走行は不規則で骨基質形成は抑制的であった。

II. 透過型電顕所見

対照群では、骨基質形成の盛んな活性型骨芽細胞は、一層の類骨層を介在させて単層配列あるいは、モザイク状に一塊をなして骨と接していた。骨基質形成を行っていない休止期骨芽細胞は、直接骨基質に接しているものと、僅かな類骨層を介在させて骨基質に接しているものが存在した。骨芽細胞群付近の幼若な骨細胞は、細胞内小器官に富み、骨芽細胞と類似していたが、深部にいくに従い、成熟した骨細胞は小型になり、細胞内小器官が乏しく、核細胞質比率は増加していた。細胞間は細胞質突起によるギャップ結合が認められ、細胞性の網目構造を作っていた。破骨細胞は、clear zone により微小環境を形成し、ruffled border により骨吸収を行っていた。

運動群では、対象群<低強度運動群<中強度運動群の順に活性型骨芽細胞の増加傾向が認められた。高強度運

動群では、他の運動群と比べて、活性型骨芽細胞は減少傾向であり、線維芽細胞様の休止期骨芽細胞が多数認められた。骨細胞も骨芽細胞同様、対照群<低強度運動群<中強度運動群の順に増加傾向であり、活発にギャップ結合による細胞間ネットワークを形成していた。一方、骨細胞は高強度運動群では、他の運動群と比べて減少傾向がみられた。破骨細胞に関しては、対照群<低強度運動群<中強度運動群の順に分化、活性化が著明になり、活発に骨のモデリングが行われた。高強度運動群では、一部に ruffled border の指状突起が扁平化したものも存在しており、他の運動群と比べて破骨細胞の分化、活性化は抑制的であった。

以上のことから、成長期に、ある閾値以下の運動を行うことは、各細胞群の活性化を引き起こし、脛骨骨幹端部の軟骨内骨化による骨基質形成に大きく寄与してい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、歯科放射線学講座の森本泰宏先生に心から感謝致します。

引用文献

- 1) Gowen, M. Cytokines: celler interactions in control of bone remodelling. In Heershe, J. N. M and Kanis, J. A. (eds) Bone and Mineral Research. (Amsterdam, London, New York). Elsevier: 77-114, 1994.
- 2) Mundy, G. R. Martin, T. J. (eds): Cytokine to bone. Physiology and Pharmacology of Bone. Handbook of Experimental Pharmacology vol. 107. (Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag): 47-215, 1993.
- 3) Bushinsky, D. A, Krieger, N. S. Integration of calcium metabolism in the adult. In Coe, F. L. and Favus, M. J. (eds). Disorder of Bone and Mineral Metabolism. (New York: Rave Press): 32-417, 1992.
- 4) Sissons, H. A.: The growth of bone. The biochemistry and physiology of bone. Academic Press, New York, San Francisco and London, 1972, 145-180.
- 5) Limburgh, V.: A new view on the control of the morphogenesis of the skull. Acta Morphol. Neerl. Scand. 8: 143-160, 1970.
- 6) 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: R310-R314, 1983.
- 7) 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): S429-S432, 1992.
- 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) Wohner, H. W., Dun, W. L., Riggs, B. L.: Noninvasive bone mineral content measurement. *Semin Nucl Med* 13: 282-288, 1983.
 - 11) Drinkwater, B. L., Nilson, K., Chesnut, C. H., et al: Bone mineral content of amenorrheic and eumenorrheic athletes. *N. Engl. J. Med* 311: 277-281, 1984.
 - 12) Mac Dougall, J. D., Weber C. E., Martin, J. et al: Relationship among running milage, bone density, and serum testosterone in male runner. *J. Appl. Physiol.* 73: 1165-1170, 1992.
 - 13) Bonen, A., Ling, W. Y., Mac Intyre, et al: Effects of exercise on serum concentrations of FSH, LH, progesterone and estradiol. *Eur. J. Appl. Physiol* 42: 15-23, 1979.
 - 14) 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.
 - 15) 七田恵子: 加齢に伴う骨塩減少に影響する因子, *日老医誌* 24: 544-553, 1987.
 - 16) 江澤邦子, 荒井富佐子: 発育期ラットの運動負荷によるカルシウム利用効果. *家政誌* 33: 614-618, 1982.
 - 17) Nordin B. E. C: International patterns of osteoporosis. *Clin. Orthop Related Research* 45: 17-30, 1966.
 - 18) Matkovi, V., Kostial, K., Simonovic, I., et al: Bone status and fracture in two regions of Yugoslavia. *Am. J. Clin. Nutr* 32: 540-549, 1979.
 - 19) 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.
 - 20) 浦山明俊: もろくも折れる子供達の骨. *UTAN「驚異の科学シリーズ」10 地球環境白書 今子供達が危ない*, 学習研究社: 48-55, 1992.
 - 21) 森本泰宏: 成長期ラットの運動負荷による脛骨骨幹端部への影響. *九州歯会誌* 48: 687-715, 1994.
 - 22) 今村隆子: 成長期ラットの運動負荷による顎骨への影響. *九州歯会誌* 49: 495-527, 1995.
 - 23) John, A. O.: Chondro-osseous development and growth. *Fundamental and clinical bone physiology*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia and Toronto, 1980, 108-171.
 - 24) 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.
 - 25) 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.
 - 26) Moyers, R. E.: *Handbook of orthodontics*. 3rd ed. Year Book Med. Pub. Inc., Chicago, 1972, 51-117.
 - 27) 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.
 - 28) 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. *京都学芸大学紀要 B* 23: 57-65, 1963.
 - 29) Booth, F. W. and Gould, E. W.: Effect of traing and disuse on connective tissue. *Exer. Sports Sci. Rev.* 3: 88-112, 1975.
 - 30) 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.
 - 31) 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.
 - 32) 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.
 - 33) Matuda, J. J., R. F. Zernicke, A. C. Valis, V. A. Pedrini, and A. Penrini-mille: Structural and mechanical adaptation of immature bone to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.*, 60: 2028-2034, 1986.
 - 34) Mille, A. P., J. A. Maynard, V. A. Pedrini, A. C. Vanilas and F. Ohlerking: Effect of strenuous exercise on bone and physes of growing animals. *Orthop. Res. Soc.*, 10: 369-370, 1986.
 - 35) 井村裕夫 編: 内分泌・代謝病学 第2版. 医学書院, 東京, 1986, 15-66.
 - 36) 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.
 - 37) Tharp, G. D.: The role of glucocorticoids in exercise. *Med. Sci. Sports Exer.* 7: 6-11, 1975.
 - 38) Bunck, R. J. and Tharp, G. D.: Effect of chronic exercise on adrenocorical function and structure in the rat. *J. Appl. Physiol.* 31: 880-883, 1971.
 - 39) Frenkl, R. and Csalay, L.: Effect of regular activity on adrenocotical function in rats. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 2: 207-211, 1962.
 - 40) 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.
 - 41) 藤本 誠: 下顎頭軟骨基質の石灰化についての走査電子顕微鏡的観察. *歯基礎誌* 24: 62-71, 1982.
 - 42) Bonncci, E: Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrast. Res.* 20: 33-50, 1967.
 - 43) Scherft, J. P: The ultrastructure of the organic matrix of calcified cartilage and bone in embryonic mouse raddi. *J. Ultrast. Res.* 23: 333-343, 1968.
 - 44) 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.
 - 45) 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.
 - 46) Kohlrausch, W.: Ueber den einfluss funktioneller beanspruchung auf das langenwachstum von knochen. *Munchen. Med. Wochenschr.* 71: 513-514, 1924.
 - 47) 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.

- 48) Sasaki, T. and Ueno-Matsuda, E.: Cystein-proteinase localization in osteoclast. *Cell. Tissue. Res.* 271: 177-179, 1993.
- 49) Sasaki, T.: Recent advance in the ultrastructural assessment of osteoclastic resorptive functions. *Microsc. Res. Techn.* 33: 182-191, 1996.
- 50) Aarden, E. M., Burger, E. H. and Nijweide, P. J.: Function of osteocytes in bone. *J. Cell. Biochem.*, 55: 99-287, 1994.
- 51) 小澤英浩: 骨改造現象における細胞連鎖機構に関する細胞生物学的知見-総説-. *新潟学会誌* 20: 1-17, 1990.
- 52) Wendelaar, Bonga, S. E. and Pang, P. K. T.: Control of calcium regulation hormones in the vertebrates, parathyroid hormone, calcitonin, prolactin, and stanniocalcin. *Int. Rev. Cytol.*, 128: 139-213, 1991.
- 53) Eriksen, E. F., Vesterby, A., Kassem, M., Melsen, F. and Mosekilde, L.: Bone remodeling and Bone structure. In Mundy, G. R. and Martin, T. J. (eds). *Physiology and pharmacology of bone. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 107, 67-109. (Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag), 1993.
- 54) Luk, S. C., Nopajaroonsri, C. and Simon, G. T.: The ultrastructure of endosteum: a topographic study in young adult rabbits. *J. Ultrastr. Res.* 46: 165-183, 1974.
- 55) Miller, S. C and W, S. S. Jee: The bone lining cell: a distinct phenotype?. *Calcif. Tissue. Int.*, 41: 1-5, 1987.
- 56) 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-E1) in vitro. *J. Cell. Physiol.* 142: 177-185, 1990.
- 57) Maki, S.: Histological studies of electrically induced intramedullary callus. *J. Jpn. Orthop. Ass.* 59: 999-1013, 1985.
- 58) 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.
- 59) 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.
- 60) Pilla, A. A.: Electrochemical information transfer at living cell membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 238: 149-170, 1974.
- 61) 保田岩夫, 野口和彦, 佐多徹郎: 力学的仮骨と電氣的仮骨. *日整会誌* 28: 267-269, 1954.
- 62) 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.
- 63) 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.
- 64) 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.
- 65) 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.
- 66) Kallio, D. M., Garant, P. R. and Minkin, C.: Evidence of coated membranes in the ruffled border of the osteoclast. *J. Ultrastr. Res.* 37: 169-177, 1971.
- 67) 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 MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinol.* 125: 1805-1813, 1989.
- 68) Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Rooman, 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.
- 69) 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.
- 70) Rodan, C. A. and Martin, T. J.: Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-A hypothesis. *Calcif. Tissue. Int.*, 33: 349-351, 1981.
- 71) Nicholson, G. C., M. A. Horton., P. M. Sexton., C. S. D, Santos., J. M. Mosley., B. E. Kemp., J. A. S. Pringle and Martin, T. J.: Calcitonin receptors of human osteoclastoma. *Horm. metabol. Res.*, 19: 585-589, 1987.
- 72) Ito, N., Yamazaki, H., Nakazaki, M., Miyahara, T., Kozuka, H. and Suda, H.: Response of osteoblastic clonal cell line (MT3TE1) to [Aus, 7] eel calcitonin at a specific cell density or differentiation stage. *Calcif. Tissue. Int.*, 40: 200-205, 1987.
- 73) Farley, J. R., Tarbauz, N. M., Hall, S. L.: Linkhart, T. A., and Baylink, D. J.: The antihypertensive agent calcitonin also acts in vitro to directly increase bone formation and bone cell proliferation. *Endocrinol.* 123: 159-167, 1988.
- 74) Farley, J. R., Hall, S. L. and Tarbauz, N. M.: Calcitonin (but not calcitonin gene-related peptide) increase mouse bone cell proliferation in a dose-dependent manner, and increase mouse bone formation, alone and in combination with fluoride. *Calcif. Tissue Int.*, 45: 214-221, 1989.
- 75) Smith, E. L. and Raab, D. M.: Osteoporosis and phys-

- ical activity. *Acta Med. Scand. Suppl.* 711: 149-156, 1984.
- 76) 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.
- 77) 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: S129-S138, 1984.
- 78) 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.
- 79) Kelly, P. J.: Somatomedin-C, Physical fitness and bone density. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 70: 718-723, 1990.
- 80) Davee, A. M.: Exercise patterns and trabecular bone density in college women. *J. Bone Mineral Res.* 5: 245-250, 1988.
- 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.
- 82) Ruben, J. A. and Bennett, A. F.: Intense exercise, bone structure and blood calcium levels in vertebrates. *Nature* 291: 411-413, 1981.
- 83) 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.