成年期の虚弱脛骨骨幹皮質骨におけるカルシウム含有食, 1α -OH- D_3 の併用療法に関する実験的研究

—骨基質形成—

菅 彬

九州歯科大学口腔外科学第二講座 (指導: 梶山 稔教授)

九州歯科大学小児歯科学講座 (指導: 木村光孝教授)

平成 10 年 10 月 26 日受理

The Experimental Study on the Effect of Calcium-containing Dietary and 1α -OH- D_3 on Bone Loss of Cortex of Tibial Diaphysis in Adulthood: on Formation of Bone Matrix

Akira Kan

Department of Second Oral Surgery (Director: Prof. Minoru Kajiyama)

Department of Pediatric Dentistry (Director: Prof. Mitsutaka Kimura)

Kyushu Dental College, Kitakyushu Japan

Nine-week-old male Wistar-strain rats were used, corresponding to adulthood in human beings. Calcium deficiency and low calcium diet were fed for 3 weeks, followed by activated Vitamin D_3 for 1 week, and standard diet for another 3 weeks. The effect on formation of bone matrix was investigated, and results were as follows.

1. Body weight

No significant differences were revealed among the three groups after 7 weeks of study.

2. Radiographic findings and bone density

Calcium deficiency group showed thinner width of interosseous and medial cortice than control group. Bone density showed no significant differences among the three groups.

3. Histopathological findings

Bone matrix of diaphyseal cortex was shown densely distributed in control group, inner and outer circumferential lamellae thick, and Haversian system well-formed. Calcium deficiency group showed such findings of bone loss as decreased width of outer circumferential lamellae, decreased Haversian system number, and cavitated osteocytic lacunea. Formation of bone matrix in low calcium group was shown almost the same as in control group.

4. SEM findings

Many osteocytic lacunae were seen on superficial layer of interosseous and medial cortice in control group, collagen fibers and deposition of calcifying vesicles were present. Calcium

deficiency group showed no significant differences morphologically compared with control group, but the bone contour showed small. Osteocytic lacunae showed indistinct borders with the from surrounding matrix, and irregular-shaped resorptive lacunae were seen. In low calcium group, no changes were found in interosseous and medial cortice compared with control group. The regular-arranged collagen fibers were seen in bone formative layer, the collagen fibric network got dense in superficial area.

5. Hematologic findings

Electrolytic, biochemical, and endocrinological examinations showed no significant differences among the three groups.

From the aforementioned results, combined treatment with calcium-containing dietary and activated Vitamin D₃ helps with the improvement of bone structure in bone loss resulting from calcium deficiency, as long as bone formation is normal until the adulthood with standard diet feeding. With low calcium diet, bone metabolism was shown to function well, and resulting bone matrix formation almost the same as control group.

Key words: Adulthood / Cortex of tibial diaphysis / 1α -OH-D₃ / Bone matrix / Rat

緒 言

骨は幼児期、思春期に急激な成長発育を示すが、とくに最も骨成長率の高い時期は思春期で、成年期に至ると一般的には安定した時期となる。このことは骨の内部構造を定量的に評価、把握する方法として客観的には骨塩量の測定によって明らかで、成長期、いわゆる18歳～20歳頃に最大骨量を示す。しかしながら成年期における骨成長率と栄養成分であるカルシウムと骨量との関連性についてのデータは皆無である。一方、この時期は血中のカルシウム、リンの濃度の恒常性のための内分泌ホルモンである活性型ビタミンD₃が骨の石灰化とリモデリングに関与するなど重要な役割を果たしている。

近年、リンの過剰摂取による食餌バランスの崩れによるカルシウム不足により骨粗鬆症を惹起することが知られている。カルシウムとリンのバランスが崩れ活性型ビタミンD₃が腸管からのカルシウム吸収を促進することにより、補正を行うことから、骨粗鬆症の治療薬として注目を集めている。

著者は種々の刺激に耐えて体を支持する長管骨が成年期におけるカルシウム不足によって虚弱骨を惹起した場合、活性型ビタミンD₃を投与することにより、骨基質形成促進作用を明らかにするため本実験を行った。

材料ならびに方法

生後9週齢（体重276g前後）のWistar系雄ラット30匹を使用した。

対照群：生後9週齢のラットを標準飼料（オリエンタル酵母）と水道水で6週間飼育し、1週間に3回0.2 ml/100 gのオリーブ油を経口投与した。

カルシウム欠乏食群：生後9週齢のラットをA食変型カルシウム欠乏食飼料（オリエンタル酵母）と蒸留水で3週間飼育後、オリーブ油に溶いた 1α -OH-D₃（アルファロール，中外製薬）を0.1 μ g/kg，1週間に3回経口投与した後，標準飼料と水道水に切り換え3週間飼育した。

低カルシウム食群：生後9週齢のラットをA食変型低カルシウム（30%）食飼料と水道水で3週間飼育後，オリーブ油に溶いた 1α -OH-D₃（アルファロール，中外製薬）を0.1 μ g/kg，1週間に3回経口投与した後，標準飼料と水道水に切り換え3週間飼育した。

なお，飼料の成分は本研究用に配合されたもので，その構成成分はTable 1に示す通りである。

飼育期間中は毎日体重測定を行った。

全ての実験群は6週間飼育後，pentobarbital sodium（ネンブタール，大日本製薬）を腹腔内に注射後，深麻酔下にて屠殺した。直ちに脛骨を横断して採取し，10%中性ホルマリン液で固定した。固定後の脛骨は

Table 1 The origin of the element content from the mineral mixture (mg/100 g)

	Control group	Ca-deficient diet group	Ca-low deficient (30 %) diet group
Ca	480	0.01	144
P	650	612	612
Mg	87	87	87
Na	220	293	293
K	440	746	746
Fe	32	32	32
Cu	0.46	0.5	0.5
Zn	3.4	3.0	3.0
Mn	1.6	2.6	2.6
I	0.46	0.3	0.3
Cl	170	174	174

左右に分けて Softex type の CSM (ESM-2, ソフテックス) を用いて管電圧 35 kVp, 管電流 5 mA, 撮影時間 60 秒, 焦点・フィルム間距離 70 cm の条件下で, 軟 X 線撮影を行った. 軟 X 線撮影にあたっては軟 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 線の読影と平行して光学的観察を行うにあたっては骨塩量 (骨密度) を測定するためにマイクロフォトメーター (デンシトメーター PDS-15, コニカ) を用いて光速スリット幅 $10 \times 500 \mu\text{m}$ で, 脛骨の腓骨側より骨間縁皮質骨から内側縁皮質骨への scanning pattern を描出した.

光顕用標本を作製するために, 脛骨は軟組織を十分除去した. 次に固定した試料は 5% 硝酸脱灰し, セロイジン包埋を行い, $15 \mu\text{m}$ の横断連続切片標本を作製した. 標本はヘマトキシリン・エオジン重染色を施し鏡見した.

走査電子顕微鏡試料の作製は, 摘出した脛骨骨幹皮質骨を phosphate buffer (pH 7.2) に浸し, 超音波洗浄した後, 1% osmic acids (phosphate buffer pH 7.2) に浸漬した. つぎに試料は皮質骨表面を露出させ, 上昇 ethanol 系列にて脱水を行い, 2-methyl-2-propanol で置換後, 凍結乾燥装置 (ID-2 型, エイコーエンジニアリング) を用いて凍結乾燥を行った. 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.

血液検査は血液中の Ca, P, Ca/P, Na, K, Cl などの電解質, CPK, LDH, ALP, GOT, GPT などの生化学

検査および内分泌機能検査を行った. なお, 内分泌機能検査項目および検査方法には, 1) PTH (副甲状腺ホルモン) -N 末端 $\Rightarrow$ RIA PEG 法 2) PTH (副甲状腺ホルモン) -C 末端 $\Rightarrow$ RIA 2 抗体法 3) Calcitonine (CT) $\Rightarrow$ RIA 2 抗体法 4) $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 \Rightarrow$ RRA 法を用いた.

結 果

I. 体重

実験開始時の平均体重は対照群 277.27 g, カルシウム欠乏食群 276.23 g, 低カルシウム食群 275.63 g であった. 6 週間飼育後の体重は 3 群ともに増加傾向にあったが, 3 群の間には差は認められなかった (Table 2-1, 2-2).

II. X 線学的所見ならびに骨密度 (骨塩量)

対照群

細長く皮質骨の薄い腓骨として明瞭にみられ, さらに骨幹皮質骨である骨間縁皮質骨, 骨髄, 内側縁皮質骨の順に著明に認められた. 骨間縁皮質骨は厚さを一定に保って緻密な X 線不透過像として顕著にみられた. それに接して幅広い骨髄が X 線不透過性の弱い像としてみられた. それに接するかのようには内側縁皮質骨は一部を除いて厚さを均一に保って明瞭に認められた (Fig. 1).

カルシウム欠乏食群

対照群と比べ形態的には何ら変化は認められなかった. 骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨の骨幹皮質骨は対照群と比べ薄い部分もみられた. 骨髄の幅は対照群と比べやや幅広くみられた (Fig. 2).

低カルシウム食群

Fig. 1 Radiogram of the 6th week.
Control group
Arrow: Tibia

Fig. 2 Radiogram of the 6th week.
Ca-deficient diet group
Arrow: Tibia

Table 2-1 Body weight of the control and the experimental groups (age of 9-week) (g)

	Control group	Ca-deficient diet group	Ca-low deficient diet group
Pre-ex	277.27 ± 1.30	276.23 ± 4.83	275.63 ± 3.55
6 W	517.27 ± 19.20	499.26 ± 22.85	495.99 ± 13.90

Mean ± S. D.

Table 2-2 Difference of body weight between the control and the experimental group (age of 9-week)

	1 ⇔ 2	1 ⇔ 3	2 ⇔ 3
6 W	—	—	—

—: Not significant

- 1: Control group
2: Ca-deficient diet group
3: Ca-low deficient diet group

カルシウム欠乏食群と比べ骨幹皮質骨は厚さを増し、骨髄は幅広く認められた (Fig. 3).

骨間縁皮質骨および内側縁皮質骨それぞれについて、対照群とカルシウム欠乏食群間、対照群と低カルシウム食群間、カルシウム欠乏食群と低カルシウム欠乏食群間には差が認められなかった (Table 3-1, 3-2). さらに骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨それぞれの群についてみると、カルシウム欠乏食群間では有意差が認められた ($p < 0.05$) (Table 3-3).

Ⅲ. 病理組織学的所見

対照群

脛骨横断組織像において、骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨がみられ、その間に骨髄が介在していた。内外骨幹皮質骨はともに厚く緻密な骨質よりなっていた (Fig. 4). 骨間縁皮質骨には外側と内側に脛骨の円周に沿って配列されている骨小腔がみられ、緻密な外基礎層板と内基礎層板が存在していた。内外基礎層板の間に、骨小腔がハバース管を中心に同心性に配列し、ハバース系が多数存在しているハバース層板がみられた。ハバース系とハバース系との間には介在層板がみられ、また、ハバース

Fig. 3 Radiogram of the 6th week.
Ca-low deficient diet group
Arrow: Tibia

Fig. 4 Alveolar bone of the 6th week.
Control group
H·E stain (×20)
IC: Interosseous cortex
MC: Medial cortex

Table 3-1 Density of tibia in the equivalent of aluminum (age of 9-week) (mm)

	Control group	Ca-deficient diet group	Ca-low deficient diet group
Interosseous cortex	2.99 ± 0.30	2.75 ± 0.18	2.99 ± 0.22
Medial cortex	2.71 ± 0.44	2.38 ± 0.27	2.52 ± 0.49

Table 3-2 Difference of density of tibia in the aluminum equivalency between the control and the experimental groups (age of 9-week)

	1 $\Leftrightarrow$ 2	1 $\Leftrightarrow$ 3	2 $\Leftrightarrow$ 3
Interosseous cortex	—	—	—
Medial cortex	—	—	—

—: Not significant

- 1: Control group
2: Ca-deficient diet group
3: Ca-low deficient diet group

Table 3-3 Difference of density of tibia in the aluminum equivalency between interosseous and medial cortex (age of 9-week)

	1 $\Leftrightarrow$ 1	2 $\Leftrightarrow$ 2	3 $\Leftrightarrow$ 3
Interosseous cortex × Medial cortex	—	*	—

*: $p < 0.05$

- 1: Control group
2: Ca-deficient diet group
3: Ca-low deficient diet group

Fig. 5 A higher magnification of Fig. 4.
H·E stain (×100)

OCL: Outer circumferential lamellae
ICL: Inner circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae
HS: Haversian system
IL: Interstitial lamellae

Fig. 6 A higher magnification of Fig. 4.
H·E stain (×100)

OCL: Outer circumferential lamellae
ICL: Inner circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae
HS: Haversian system
IL: Interstitial lamellae

Fig. 7 Alveolar bone of the 6th week.
Ca-deficient diet group
H·E stain (×20)
IC: Interosseous cortex

Fig. 8 Alveolar bone of the 6th week.
Ca-deficient diet group
H·E stain (×20)
MC: Medial cortex

層板と外基礎層板の間にはヘマトキシリンに濃染されている骨再構築層も確認された。内側縁皮質骨における外基礎層板と内基礎層板も顕著にみられ、骨小腔も脛骨の円周に平行に配列していた。内外基礎層板の間に骨小腔がハバース管を中心に同心性に配列しているハバース系が存在するハバース層板が存在していた。ハバース系とハバース系との間に介在層板がみられた (Fig. 5, 6)。

カルシウム欠乏食群

対照群と比べ、形態的には何ら変化はみられなかった。脛骨骨組織内には多くの骨髄が出現していた (Fig. 7, 8)。骨間縁皮質骨における外基礎層板は細く、骨小腔は多くなって、脛骨の円周に沿って配列していた。内基礎層板は明瞭にみられ、骨小腔の形態は円形を

呈しているが、空洞化したものが増加していた。内外基礎層板の間にあるハバース層板のハバース系は減少し、ハバース管の形態も変化していた。空洞化した骨小腔は増加し、不規則に配列していた。内側縁皮質骨における外基礎層板は細く、骨小腔は脛骨の円周に沿って平行に配列していた。内基礎層板は顕著にみられ、骨小腔が円形になって脛骨の円周に沿って配列しているが、空洞化した所見がみられた。ハバース層板におけるハバース系も減少し、ハバース管も大小不同を呈していた。空洞化した骨小腔も増加し不規則に配列していた (Fig. 9, 10).

低カルシウム食群

カルシウム欠乏食群に比べ、骨組織には結合組織および血管が存在する骨髓がみられた。骨間縁皮質骨における外基礎層板の骨小腔は対照群と同様、脛骨の円周に沿って配列しているが骨小腔の形態が細くなっていた。内基礎層板は骨髓が吸収されたところもみられた。内外基礎層板の間にみられるハバース層板のハバース系は明瞭で、ハバース管の形態は大小あるが、骨小腔がハバース管を中心に同心性に配列しているハバース系がみられた。骨小腔も規則性を増しているが、一部空洞化している骨小腔も散見された。ハバース系の間にみられる介在層板の骨小腔も配列していた。カルシウム欠乏食群に比べ不定形になっている骨再構築層は増加していた。内側縁皮質骨における外基礎層板の骨小腔は明瞭で脛骨の円周に沿って配列していた。骨小腔の形態は対照群とほぼ同様な所見を呈していた。内基礎層板には吸収所見も散見された。内外基礎層板の間にみられるハバース層板のハバース系は増加し、ハバース管の形態はほぼ同様であり、ハバース管の周りの骨小腔は規則的に配列していた。骨小腔の形態も大小不同を呈しているが、カルシウム欠乏食群に比べると、大幅な骨再構築層もみられた (Fig. 11, 12).

IV. 走査型電顕所見

対照群

脛骨の骨間縁皮質骨の骨体中央部で横断し観察した。骨間縁皮質骨、内側縁皮質骨にみられる骨幹皮質骨横断面の骨表層部は中心には骨髓が存在し皮質骨はスムーズな平滑面として厚く認められた。骨幹皮質骨の切断面は、骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨ともに表面は骨小腔が多数認められた。表層部はコラーゲン原線維束が交錯する骨小腔が多数認められ、小腔壁面はコラーゲン原線維網が密に集合していた。一定方向に走向するコラーゲン原線維束の休止面では不定形でしかも不完全な骨小腔が

Fig. 9 A higher magnification of Fig. 7.
H·E stain (×100)

OCL: Outer circumferential lamellae
ICL: Inner circumferential lamellae
OL: Osteocytic lacunae
HS: Haversian system
BM: Bone marrow

Fig. 10 A higher magnification of Fig. 8.
H·E stain (×100)

OCL: Outer circumferential lamellae
ICL: Inner circumferential lamellae
HL: Haversian lamellae
HS: Haversian system
OL: Osteocytic lacunae
BM: Bone marrow

Fig. 11 Alveolar bone of the 6th week.
Ca-low deficient diet group
H·E stain (×20)
OCL: Outer circumferential lamellae
HC : Haversian canal
OL : Osteocytic lacunae
RL : Remodeling layer

Fig. 12 A higher magnification of Fig. 11.
H·E stain (×100)
OCL: Outer circumferential lamellae
OL : Osteocytic lacunae
HC : Haversian canal
HS : Haversian system
HL : Haversian lamellae
IL : Interstitial lamellae
RL : Remodeling layer

散在していた。顆粒状構造を呈した沈着物は症例によって密なコラーゲン原線維束の表面に認められた。コラーゲン原線維の間にはすべての症例において多数の骨細管の開口部が認められた。また、交錯しているコラーゲン原線維束の間隙には骨細管の開口部が卵円形を呈して認められた。骨小腔を横断するコラーゲン原線維束も認められた (Fig. 13)。

カルシウム欠乏食群

対照群と比べ骨体部全体は小型であるが形態的には変化はみられなかった。骨表層部は骨幹皮質骨が全体的にスムーズな平滑面として認められた。断面は吸収面が休止面に比べ幅広く比較的浅い不定形を呈した吸収窩が集積し、露出した不完全な骨小腔が周囲基質と境界不明瞭に認められた。骨表面には大小の顆粒状構造を呈した沈着物が散在していた (Fig. 14)。

低カルシウム食群

対照群と同様に骨幹皮質骨の全体像は形態には何ら変化は認められなかった。対照群と同様に吸収面と比べ、隣接して休止面が多数占めていた。骨吸収面は骨基質との境界は不明瞭で不定形を呈し吸収窩は窩底が浅く広範囲にみられた。露出した骨小腔と骨細管は吸収面に散在して認められた。骨形成面は対照群と同様に一定方向に走向するコラーゲン原線維束に富んでいた。その最表層部には密なコラーゲン原線維網が交錯、吻合している所見も認められた (Fig. 15)。

Fig. 13 Alveolar bone of the 6th week. (SEM)
Control group

Fig.14 Alveolar bone of the 6th week. (SEM)
Ca-deficient diet group

Fig.15 Alveolar bone of the 6th week. (SEM)
Ca-low deficient diet group

Table 4-1 Laboratory values of electrolytes (age of 9-week)

	Control group	Ca-deficient diet group	Ca-low deficient diet group
Ca (mg/dl)	9.64 ± 0.08	9.63 ± 0.15	9.60 ± 0.07
P (mg/dl)	7.10 ± 0.14	7.07 ± 0.88	7.20 ± 0.43
Ca/P	1.33 ± 0.04	1.39 ± 0.15	1.34 ± 0.07
Na (mEq/l)	142.00 ± 2.35	141.32 ± 1.62	141.00 ± 0.71
K (mEq/l)	4.82 ± 0.31	4.90 ± 0.34	4.85 ± 0.26
Cl (mEq/l)	100.00 ± 0.71	100.51 ± 1.31	100.57 ± 1.34

Mean $\pm$ S. D.

Table 4-2 Difference of laboratory values of electrolytes between the control and the experimental groups (age of 9-week)

	1 $\leftrightarrow$ 2	1 $\leftrightarrow$ 3	2 $\leftrightarrow$ 3
Ca	—	—	—
P	—	—	—
Ca/P	—	—	—
Na	—	—	—
K	—	—	—
Cl	—	—	—

—: Not significant

1: Control group

2: Ca-deficient diet group

3: Ca-low deficient diet group

Table 5-1 Laboratory values of blood chemistry (age of 9-week)

	Control group	Ca-deficient diet group	Ca-low deficient diet group
GOT (IU/L)	150.00± 11.36	147.26± 13.04	149.00± 12.14
GPT (IU/L)	29.00± 1.32	28.31± 3.74	30.00± 13.21
LDH (IU/L)	1735.00± 144.65	1821.21±142.78	1690.00±124.02
CPK (IU/L)	2182.61±1064.82	1652.68±163.69	2071.00±305.36
ALP (IU/L)	132.23± 22.31	120.00± 8.31	114.00± 5.39

Mean±S. D.

Table 5-2 Difference of laboratory values of electrolytes between the control and the experimental groups (age of 9-week)

	1 ⇔ 2	1 ⇔ 3	2 ⇔ 3
GOT	—	—	—
GPT	—	—	—
LDH	—	—	—
CPK	—	—	—
ALP	—	—	—

—: Not significant

1: Control group

2: Ca-deficient diet group

3: Ca-low deficient diet group

Table 6-2 Difference of laboratory values of endocrine functional test between the control and the experimental group (age of 9-week)

	Control group	Ca-deficient diet group	Ca-low deficient diet group
C-PTH (ng/ml)	201.00± 0.15	200.00± 0.02	202.00± 0.00
N-PTH (ng/ml)	0.65± 0.03	0.66± 0.03	0.64± 0.05
CT (ng/ml)	0.03± 0.00	0.03± 0.00	0.03± 0.00
1,25(OH) ₂ D ₃ (ng/ml)	165.00±31.00	164.00±32.00	165.00±33.00

Mean±S. D.

V. 血液検査

血清中の Ca, P, Ca/P, Na, K, Cl などの電解質検査について、対照群、カルシウム欠乏食群、低カルシウム食群それぞれの間には差がみられなかった (Table 4-

1, 4-2).

血清中の GOT, GPT, LDH, CPK, ALP などの生化学検査では対照群、カルシウム欠乏食群、低カルシウム食群それぞれの間には差はみられなかった (Table 5-

Table 6-2 Difference of laboratory values of endocrine functional test between the control and the experimental group (age of 9-week)

	1 $\leftrightarrow$ 2	1 $\leftrightarrow$ 3	2 $\leftrightarrow$ 3
C-PTH	—	—	—
N-PTH	—	—	—
CT	—	—	—
$1,25(OH)_2D_3$	—	—	—

—: Not significant

1: Control group

2: Ca-deficient diet group

3: Ca-low deficient diet group

1, 5-2).

血清中の C-PTH, N-PTH, $1,25(OH)_2D_3$ などの内分泌機能検査においても, 対照群, カルシウム欠乏食群, 低カルシウム食群の間には差がみられなかった (Table 6-1, 6-2).

考 察

骨粗鬆症の治療法は, 国によっても異なるが, わが国ではカルシウム摂取不足やそれに起因する症状を呈する患者が多いために, 活性型ビタミン D_3 が頻用されている. 活性型ビタミン D_3 は, カルシウムの腸管からの吸収を促進し飛躍的に高めることが報告されている¹⁾. 活性型ビタミン D_3 は副甲状腺ホルモンの分泌の低下や骨芽細胞に直接作用してコラーゲンの合成の低下をもたらす. さらにオステオカルシンやオステオポンチンなどの細胞外基質の産生を促す作用も有し²⁾, *in vitro* の実験により活性型ビタミン D_3 が, 前駆細胞から破骨細胞への分化機能を有することが報告されている³⁾. これらの作用を総合して, 生体での骨のモデリングあるいはリモデリングに活性型ビタミン D_3 が大きく関与している.

離乳期から幼児期までのカルシウム不足が骨構築に大きく影響することが考えられる. この時期でのカルシウム不足は, その後の食餌療法や生理活性物質との併用療法でも回復が困難であることも明らかにされている⁴⁻⁶⁾. 一方最大骨量の獲得の重要性は骨粗鬆症の予防を考える意味で極めて高い. 本研究においては, ヒト成年期に相当する 9 週齢のウイスター系雄ラットを使用し, カルシウム欠乏食と低カルシウム食によって虚弱骨を惹起させた後, カルシウムを含有した食餌と活性型ビタミン D_3 の併用療法を行い, 骨基質形成にどのような影響を与え

るかを検索したので考察する.

I. 体重

Scammon (1930)⁷⁾ の発育曲線では, 体重は身長とともに一般型の発育曲線を示す. しかしながら一般的にヒトの場合, 成人以降体重や身長の著しい変化は見られないが, ラットでは成人以降も体重や体長が増加する. Salomon (1972)⁸⁾ は, 体重の増減は骨組織の増減により誘発されると述べている. 体重の増減が骨組織の構築の度合にのみ影響されるか否かは不明であるが, 離乳期から幼時期でのカルシウム欠乏食がその後の体重の増加に大きな影響を与えることは過去の報告からも明らかである⁹⁻¹¹⁾. 即ち骨形成の旺盛な成長期でのカルシウム欠乏状態は, 骨虚弱状態を惹起し, その後の食餌療法や生理活性物質などとの併用療法での改善は困難なことが明らかにされている. また活性型ビタミン D_3 作用障害によりあわられる病態が骨石灰化の障害によるクル病や骨軟化症であることも明らかのように, その生理的役割の中で最も重要な点は骨形成の促進である. 本実験では, 成人期で骨量も相当量獲得しており, 一旦カルシウム摂取不足状態に陥ったとしてもその後の活性型ビタミン D_3 と食餌療法の併用療法により生体の恒常性が維持され, 十分に骨代謝機構が保たれ, 体重の維持ができたものと考えられる.

II. X 線学的所見ならびに骨塩量

骨構築状態を判断する上で重要な材料となるものに X 線フィルムを用い, 骨の状態を客観的に把握するために数値化を用いる骨塩定量法がある. 骨塩定量法には種々の方法があり, 骨粗鬆症や代謝性骨疾患の病態の把握, 診断, 経過観察などに使用される. 本実験で用いた MD 法は, アルミニウムステップの濃度と測定部の X 線

フィルム濃度を比較して評価し、アルミニウム当量に換算する方法である。この手法は簡便で再現性も高いため骨塩量測定のスクリーニングに使用される。牧ら(1993)¹²⁾は、この手法を学童期小児の顎骨へ応用し、増齢とともに顎骨骨塩量も増加していることを報告している。

離乳期から学童期におけるカルシウム欠乏状態の骨組織への影響の大きさは過去のX線学的所見の報告からも明らかである^{13,14)}。これらの報告のX線学的所見の特徴は、骨量の減少と配列の乱れ、骨の石灰化度の低下を反映したものと考えられる。著者の実験では、X線学的所見はカルシウム欠乏食群で骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨は対照群と比べ薄い部分がみられた以外、3群間に顕著な差異は認められなかった。また骨塩量に関しても3群間に差は認められなかった。Orimoら(1987)¹⁵⁾、Hayashiら(1992)¹⁶⁾は活性型ビタミンD₃単独あるいは、カルシウム併用により骨密度の増加あるいは減少抑制に効果があるとし、また年間の骨折発症率にも有意な減少を認めたと報告している。活性型ビタミンD₃が腸管からのカルシウム吸収を促進し、骨塩量を高めることは、これらの報告からも明らかである。骨塩量の測定値のみで骨構築状態を判断するのは危険ではあるが、この結果から推測すると成人期までに正常食で、十分量の骨量を得ることによりその後、一旦カルシウム欠乏食や低カルシウム食により骨虚弱状態に陥っても、その後の活性型ビタミンD₃や食餌療法により本研究では対照群と同様な骨基質形成に回復することが示唆された。

III. 病理組織学的所見

対照群における標準食で飼育されたラットの脛骨の骨幹皮質骨の横断面を観察すると内外骨幹皮質骨の骨基質は緻密であり、内外基礎層板の緻密質は広く、ハバース系の発達も十分である。当教室のカルシウム欠乏食投与後のラットの骨組織に関する病理組織学的所見を総合すると、骨梁の吸収、走行の不規則化、低石灰化、骨小腔の減少化や骨髓腔の拡大などがあげられる。本実験でもカルシウム欠乏食群では骨虚弱状態を示すような所見がみられた。すなわち、外基礎層板が薄く形成され、ハバース系も減少し、骨小腔の空洞化も増加していた。しかしながら小児期にカルシウム欠乏により骨虚弱状態に陥った過去の報告⁹⁻¹¹⁾と比較すると軽度のものであった。このことは、成年期にいたるまでに標準食により十分骨形成が行われているために、その後の一時的なカルシウム欠乏状態は活性型ビタミンD₃や食餌療法により骨へのダメージをかなり抑制できていることが考えられた。

その要因として特に活性型ビタミンD₃がカルシウム欠乏食状態では、小腸のカルシウム吸収を高めるとともに腎におけるCa再吸収を促進し、副甲状腺ホルモン分泌を抑制し、骨量減少を抑制していることが考えられる。また低度でもカルシウムを摂取しておれば骨代謝機構の維持が十分に行われ、骨形成が行われることが明らかとなった。

IV. 走査型電子顕微鏡所見

骨組織は、生涯を通じて骨吸収と骨形成が絶えず行われている器官である。この両者の関係はいわゆるカップリング現象により年齢に応じてバランスのとれた骨構築機構を保っている。本研究では、成人のラットを使用し、一定期間カルシウム欠乏食や低カルシウム食投与後、活性型ビタミンD₃や標準食投与による骨構築状態を走査電顕的に観察したものである。

対照群の骨形成部では、骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨の表面に骨小腔が多数認められた。また表層部にはコラーゲン原線維と顆粒球状構造を示した石灰化小球の沈着物が多数認められた。石灰化機構とコラーゲンとの関連に関しては*in vivo*や*in vitro*の実験を通しての報告がみられ¹⁷⁻¹⁹⁾、本研究からもその可能性が示唆された。また初期石灰化の重要な役割を担うと言われている基質小胞と初期石灰化が密接に関連しているとの報告もあり²⁰⁾、今後生化学的手法や免疫組織化学的手法を組み込みながらこの研究へのアプローチを行う必要がある。

カルシウム欠乏食群では対照群に比べ形態的な差異は認められないが骨全体は小型化していた。当教室では、カルシウム欠乏食を投与した後の虚弱骨は、その後の食餌療法や活性型ビタミンD₃、カルチトニンなどの生理活性物質を投与しても回復が困難であることを報告している²¹⁻²³⁾。しかしながら本実験に使用したラットは、成人期までに標準食投与により骨組織に十分量のカルシウムを貯蔵しており、対照群なみの完全な骨構築の回復は困難であるが、従来報告されているような骨構築への極端なダメージはなかった。活性型ビタミンD₃がカルシウム欠乏状態では、小腸のカルシウム吸収を高めるとともに腎におけるCa再吸収を促進し、副甲状腺ホルモン分泌を抑制し、骨量減少を抑制していることが考えられる。低カルシウム食群では、対照群に比べ、骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨の形態を比較すると吸収窩が浅く、広範囲であった点を除くと、ほとんど差異は認められなかった。これは、骨代謝性ホルモンを中心とした生体の恒常性維持機構が低度ながらもカルシウムを補給しておれば十分働いて、骨構築のバランスが保たれているものと考え

察された。

V. 血液学的所見

A. 電解質検査

血液学的所見は、成長発育期から老年期に至るまで生体の代謝状態を知るうえで重要である。著者らの実験では、いずれの観察項目でも 3 群間に有意差は認められなかった。骨粗鬆症の電解質検査に関する報告は、Albright ら (1940)²⁴⁾ の報告にみられるように血清 Ca や血清 P, 血清 ALP などの電解質の値は骨粗鬆症では正常値であるとの考えが一般的である。しかしながら石井 (1986)⁴⁾ の骨粗鬆症の実験では、血清 Ca, 血清 Ca/P, 血清 Cl が高値を示したと述べている。この様に骨粗鬆症の電解質検査の所見は統一していない。著者の実験では、成年期まで十分なカルシウムを骨内に含有しており、一時的にカルシウム不足に陥ってもその後の食餌療法で生体の恒常性を維持できているものと考えられる。

B. 生化学検査

本検査のうち、ALP は有機モノリン酸エステル加水分解酵素であり骨芽細胞のマーカー酵素として一般に使用されている。著者の実験では 3 群間に有意差はなく、骨形成と骨吸収のバランスが保たれていることが示唆された。LDH は、乳酸のピルビン酸の酸化を触媒し、5 種類のアイソエンザイムを持つ。近年、初期石灰化に重要な役割を担うと言われている基質小胞内に LDH が、膜性化骨部位²⁵⁾、軟骨内化骨部位²⁶⁾、象牙質²⁷⁾などの硬組織内に発見され石灰化との関連が論議されている。またカルシウム欠乏状態で血中 LDH の値が上昇するとの報告があり²⁸⁾、今後骨粗鬆症との関連が詳細に検討される必要がある。また GOT や GPT などの肝機能、CPK などの骨格筋や脳などと関連する酵素間にも有意差は認められなかった。これらの酵素と骨構築との関係は明らかにされておらず、今後さらに検索を要する。

C. 内分泌機能検査

木村ら (1992)²⁹⁾ はラットの血液機能検査測定値の加齢的変動を報告している。それによると N-PTH は乳児期で高く、C-PTH は思春期、老年期で上昇していると述べている。骨粗鬆症患者では血清 PTH は一般に正常範囲のことが多いが、やや上昇することもある。また $1,25(OH)_2D_3$ は、軽度や中等度の骨粗鬆症では正常範囲内にあり、高度の骨粗鬆症で減少する。著者の実験では 3 群間に差は認められなかった。以上のことから成人期までに標準食によりバランスのとれた食餌を摂取することにより、その後一時的にカルシウム摂取不足に陥っても生理活性物質や食餌療法により内分泌機能にはなんら

変化を示さないことが明らかとなった。

結 論

ヒト成年期に相当する 9 週齢のウイスター系雄ラットを使用し、カルシウム欠乏食と低カルシウム食で 3 週間飼育後に、オリーブ油に溶いた 1α -OH- D_3 を $0.1 \mu/kg$ 、1 週間に 3 回経口投与した後、標準食に切り換え 3 週間飼育し、骨基質形成にどのような影響を与えるかを検索し、以下の結果を得た。

I. 体重

6 週間後の体重には、3 群間に差は認められなかった。

II. X 線学的所見ならびに骨塩量

X 線学的所見はカルシウム欠乏食群で骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨は対照群と比べ薄い部分がみられた以外、骨塩量は 3 群間に顕著な差異は認められなかった。

III. 病理組織学的所見

対照群胫骨の骨幹皮質骨の横断面を観察すると内外骨幹皮質骨の骨基質は緻密であり、内外基礎層板の緻密質は厚く、ハバース系の発達も十分であった。カルシウム欠乏食群では骨虚弱状態を示すような所見がみられた。すなわち、外基礎層板が薄く形成され、ハバース系も減少し、骨小腔の空洞化も増加していた。低カルシウム食群では、対照群と同様な骨基質形成の回復所見がみられた。

IV. 走査型電子顕微鏡所見

対照群の骨形成部では、骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨の表面に骨小腔が多数認められた。また表層部にはコラーゲン原線維と顆粒球状構造を示した石灰化小球の沈着物が多数認められた。カルシウム欠乏食群では対照群に比べ形態的な差異は認められないが骨全体は小型化していた。骨小腔と周囲基質との境界は不明瞭で、不定形の吸収窩が集積していた。しかし骨構築への極端な低下はみられなかった。低カルシウム食群では、対照群に比べ、骨間縁皮質骨と内側縁皮質骨の形態をは何ら変化はなかった。また、骨形成面は一定方向に走行するコラーゲン原線維束に富み、最表層部には密なコラーゲン原線維網が認められた。

V. 血液学的所見

電解質検査、生化学的検査、内分泌機能検査を行ったが 3 群間に有意差は認められなかった。

以上のことから、成年期に至るまでに標準食により十分骨形成が行われていれば、その後一時的にカルシウム欠乏状態に陥っても食餌療法と活性型ビタミン D_3 の併用療法を行うことにより、骨構築状態が改善でき、また

低度でもカルシウムを長期間摂取することにより、骨代謝機構が十分に行われ、対照群と同様な骨基質形成が行われることが明らかとなった。

稿を終るにあたり、懇篤なるご指導、ご鞭撻ならびにご校閲の労を賜った恩師の梶山 稔教授、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。

引用文献

- 1) 西井易穂, 高梨 茂, 高垣善男, 新藤 稔, 須田立男: 薬物としての活性型ビタミン D₃ 1 α -OH-D. “新しいホルモン” 活性型 D, 一基礎と臨床— (藤田拓男・須田立男編), 新宿書房, 東京, 1979, 107-130.
- 2) Pike, J. W.: Vitamin D₃ receptors, structure and function in transcription. *Ann. Rev. Nutl.* 11: 186-216, 1991.
- 3) Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Murakami, H. and Soda, T.: Macrophage colonystimulating factor (M-CSF) is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J. Clin. Invest.* 91: 257-263, 1993.
- 4) 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研究—とくに歯槽骨について—. 九州歯会誌 40: 530-554, 1986.
- 5) 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.
- 6) 大倉秀一郎: ビタミン D の成長期下顎頭に及ぼす影響に関する実験的研究. 九州歯会誌 44: 1-38, 1990.
- 7) Scammon, R. E.: The measurement of the body in childhood. In: *The measurement of man* (eds by Harris, J. A. et al.). University of Minnesota Press, Minneapolis, 1930.
- 8) Salomon, C. D.: Osteoporosis following calcium deficiency in rats. *Calcif. Tissue Res.* 8: 320-323, 1972.
- 9) 中河原哲朗: 虚弱下顎頭に対するカルシウム療法に関する病理組織学的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.
- 10) 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.
- 11) 矢野目鎮照: 虚弱骨に対するカルシウム食療法に関する X 線の, 光顕的および超微形態的研究—下顎頭の変化—. 九州歯会誌 48: 668-686, 1994.
- 12) 牧 憲司, 葛 立宏, 木村京子, 荒牧利裕, 周 適宏, 山野博文, 野沢典央, 木村光孝: 小児期の下顎骨骨塩量に関する臨床的研究. 小児歯誌 31: 404-411, 1993.
- 13) 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.
- 14) 門司靖廣: 成長期虚弱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—下顎頭の変化—. 九州歯会誌 45: 678-694, 1991.
- 15) Orimo, H., Shiraki, M., Hayashi, T. and nakamura, T.: Reduced occurrence of vertebral crush fractures in senile osteoporosis treated with 1 α (OH)-vitamin D₃. *Bone and Mineral.* 3: 47-52, 1987.
- 16) Hayashi, Y., Fujita, T. and Inoue, T.: Decrease of vertebral fracture osteoporotics by administration of 1 α -hydroxy-Vitamin D₃. *J. Bone. Miner. Metab.* 10: 184-188, 1992.
- 17) Glincher, M., Hodge, A. J. and Schmitt, F. O.: Macromolecular aggregation stage in relation to mineralization the collagen-hydroxyapatite systems studied in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43: 860-867, 1957.
- 18) 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.
- 19) 佐々木哲: 骨基質の生化学. *THE BONE* 1: 37-42, 1987.
- 20) Bonucci, E.: Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* 20: 33-50, 1967.
- 21) 稲川祐成: 虚弱骨に対するカルシトニン, 活性型ビタミン D₃ の併用療法に関する光顕的ならびに電顕的研究—下顎頭の変化—. 九州歯会誌 46: 140-175, 1992.
- 22) 内野公一: 虚弱骨に対する生理活性物質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 45: 425-445, 1991.
- 23) 金城 敬: 虚弱骨に対するカルシウム, 生理活性物質の併用療法に関する X 線の, 光顕的および電顕的研究—とくに下顎頭の変化—. 九州歯会誌 45: 143-174, 1991.
- 24) Albright, F., Bloomberg, E. and Smith, P. H.: Postmenopausal osteoporosis. *Trans. A. Amer. Phys.* 55: 298-305, 1940.
- 25) Naito, T., Yokota, M. and Noguchi, T.: Presence of lactate dehydrogenase-containing vesicles in an intramembranous ossifying tissue: new born mouse calvaria. *Calcif. Tissue Int.* 53: 65-68, 1993.
- 26) Hosokawa, R. Uchida, Y., Fujiwara, S. and Noguchi, T.: Lactate dehydrogenase isoenzymes are present in matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 263: 10045-10047, 1988.
- 27) Kitamura, C., Terashita, M. and Noguchi, T.: Presence of vesicles containing lactate dehydrogenase in the dentin of bovine tooth germs. *J. Dent. Res.* 70: 1444-1446, 1991.
- 28) 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 線の, 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.
- 29) 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に関する加齢的変動. 小児歯誌 30: 1037-1047, 1992.