思春期ラットの虚弱骨における食餌療法に関する 酵素組織化学的および組織形態計測学的研究 —骨基質形成—

永 山 雅 大

九州歯科大学小児歯科学講座（指導：木村光孝教授）

平成 11 年 12 月 27 日受理

Enzyme Histochemical and Tissue Histomorphometry Study on Dietary Treatment
of Bone Debility in Pubescent Rats: On Formation of Bone Matrix

Masahiro Nagayama

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

The influence of diet therapy on bone matrix formation was examined in the tibial metaphysis by endochondral ossification. Eight-week-old male Wistar rats corresponding to humans during adolescence were fed a calcium-deficient diet (0.01 mg/100 mg) or a low-calcium diet (144 mg/100 g) for 6 weeks, or the same diet for 3 weeks to induce a fragile state, followed by a standard diet for 3 weeks as a diet regimen. The following results were obtained.

1. Histopathologic findings showed a wider chondrocyte layer, decreased calcified matrix, and reduced erosion of the calcified matrix in the thickened zone chondrocytes and columnar gaps, particularly in the group fed a calcium-deficient diet compared with those in the control group. In the group fed low-calcium and standard diets, the width of the chondrocyte layer was reduced, and the calcified matrix and erosion of the calcified matrix in the columnar gaps were increased, which were findings similar to those in the control group, indicating facilitation of bone matrix formation by endochondral ossification.

2. In enzymohistochemical findings, ALP-positive cells indicating osteoblasts on the surface of the osseous beam continuing from the new osseous beam toward the lower part in the group fed low-calcium and standard diets were similar to those in the control group. TRAP-positive cells indicating osteoclast-like cells in the group fed low-calcium and standard diets were similar to those in the control group.

3. Histomorphometric findings demonstrated that the number of osteoclasts per unit area of the secondary cancellous bone was significantly increased in the order of the group fed a low-calcium diet < the group fed calcium-deficient and standard diets < the group fed a calcium-deficient diet, compared with that in the control group. However, there was no

significant difference between the group fed low-calcium and standard diets and the control group.

This study performed histopathologic examination, enzymohistochemical examination, and measured the number of osteoclast-like cells concerning bone resorption of bone metastasis as histomorphometry for quantification, to concretely examine the effects of diet therapy by administering calcium for bone in a fragile state on bone matrix formation. Consequently, bone that had been in a fragile state during adolescence, particularly in the group fed low-calcium and standard diets, showed almost the same findings as those in the control group after balanced diet therapy with calcium, demonstrating recovery of bone matrix formation by endochondral ossification.

Key words: Bone debility / Alkaline phosphatase / Tartrate resistant acid phosphatase / Tissue histomorphometry / Metaphysis of tibia

緒 言

骨は常に活発な代謝活動を営み、単に支持組織として重要であるだけでなく血中のミネラルの恒常性や造血部位の保持など生命現象の維持にとっても必要不可欠な組織である。また、骨代謝の基本的現象であるリモデリングは、間葉系の骨原生細胞由来の前骨芽細胞、骨芽細胞、骨細胞および造血幹細胞由来の破骨細胞によって行われ、ホルモン、神経、物理的刺激が関与し、局所におけるサイトカインあるいは骨基質中に含まれている増殖因子の作用により調節されている。さらに近年、破骨細胞の単離法の確立、分子生物学的な方法、トランスジェニックマウスから得られた知見^{1,2)}などにより、骨芽細胞系細胞は骨形成のみならず、破骨細胞の分化、活性化にも重要な役割を果たしていること、破骨細胞は骨吸収後の骨形成を誘導するリモデリングの中心的な役割を果たすことが明らかにされつつある。このリモデリング現象によって維持されている骨の動的平衡が破綻し、骨量（骨塩量+骨基質量）の減少とそれに伴う微細な骨構造の破壊が特徴的にみられる状態が骨粗鬆症である。成人の骨粗鬆症の発症原因として成長期に獲得されるべき骨量の減少が一因となっていることが示唆されており、成長期の中でも特に思春期において骨量が急速に増加することが明らかにされている³⁻⁵⁾。このことから、骨粗鬆症の予防においては、いかにして思春期に骨量を増加させ、最大骨量（peak bone mass）を高いレベルで獲得するかが大きな課題となっている⁶⁾。

当教室では一連の研究の中で、虚弱状態に陥った骨に

対してカルシウム含有量の改善による食餌療法を試み骨構築の回復所見を明らかにしている^{7,8)}。金澤（1998）⁹⁾は改善された骨組織に対して酵素組織化学的に検索しているが、骨組織における酵素活性の分布の違いを組織形態計測学的に検索した報告はほとんど見られない。そこで本研究は、脛骨骨幹端部2次海綿骨の骨基質形成について、骨芽細胞のマーカー酵素であるアルカリフォスファターゼ、破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸耐性酸フォスファターゼにより、酵素組織化学的および組織形態計測学的に検索した。

材料ならびに方法

ヒトの思春期にあたる生後8週齢のWistar系雄ラット20匹を使用し、無作為に次の5群に分けた。

対照群（標準食群）：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。

カルシウム欠乏食群：カルシウム無添加飼料（オリエンタル酵母工業）と蒸留水で6週間飼育した。

低カルシウム食群：A食変型カルシウム30%含有飼料（オリエンタル酵母工業）と水道水で6週間飼育した。

カルシウム欠乏食群・標準食群：カルシウム無添加飼料と蒸留水で3週間飼育した後、ラット標準飼料と水道水に切り替え3週間飼育した。

低カルシウム食群・標準食群：A食変型カルシウム30%含有飼料と水道水で3週間飼育した後、ラット標準飼料と水道水に切り替え3週間飼育した。

ミネラルの構成成分は当教室の研究用に配合したもので、Table 1に示す通りである。全てのラットは、恒温

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

	Control group	Ca-deficient diet group	Low-Ca diet group
Ca	430	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

($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 恒湿 ($50 \pm 5\%$), 照明時間 (8~20 時) の飼育条件で飼育した。

1. 病理組織観察

飼育終了後, 全てのラットに pentobarbital sodium (ネンブタール, 大日本製薬) を腹腔内に注射し, 深麻酔下にて安楽死させた後, 直ちに脛骨の近位骨幹端部を摘出し 10 % 中性ホルマリン液にて浸漬固定した。さらに 5 % 硝酸で脱灰し, パラフィン包埋後, 矢状断で $7\mu\text{m}$ 連続切片標本を作成し, ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し鏡見した。

2. 酵素組織化学

飼育終了後, 病理組織観察と同様の手法で脛骨の近位骨幹端部を摘出し, 矢状面で割断した後, 酵素活性の減衰を防ぐため 4°C の環境下で浸漬固定を行った。固定液として 4 % カコジル酸緩衝パラホルムアルデヒド (pH 7.4) を使用した。さらに脱灰液として 10 % EDTA (pH 7.4) を用いて 2 週間脱灰を行い, パラフィン包埋後, 矢状断で $7\mu\text{m}$ 連続切片標本を作成した。その後, 骨形成のマーカー酵素であるアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase; 以下 ALP) と骨吸収のマーカー酵素である酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase; 以下 TRAP) を用い, アゾ色素法によって検出した。ALP の反応基質は naphthol AS-BI phosphate (Sigma Chemical Co.), ジアゾニウム塩は, Fast blue BB salt (Sigma) を用い, 切片に反応液をのせ室温で 30 分間染色を行った。TRAP の反応基質は naphthol AS-BI phosphate (Sigma), ジアゾニウム塩は, Fast garnet GBC salt (Sigma) を用い, 切片に反応液をのせ室温で 15 分間染

色を行った。また, 脱灰操作などで低下した酵素の活性を再現するために, ALP は 10 mM の MgCl_2 を含む緩衝液 (pH 7.4) に 24 時間予備浸漬することにより賦活化させた。

3. 組織形態計測

組織形態計測は, 骨吸収のパラメーターである単位面積あたりの破骨細胞数 (Osteoclast number; Osteoclast number / Bone Area, N/mm^2) を計測した。計測は, リモデリングの場である 2 次海綿骨領域 (secondary spongiosa) に限定し, 成長の影響を極力除外するために骨端線から $500\mu\text{m}$ 遠位部位を計測部位とした^{10, 11)}。

計測方法としては, 顕微鏡の対眼レンズにグリッドを設置し stage micrometer を用いてグリッドの 1 片の長さを計測し, それに基いて骨端線から $500\mu\text{m}$ 遠位部位まで数視野スキップし, リモデリングの起こらない皮質骨の内膜面から骨髓側に 1 視野スキップした後, 順次顕微鏡のステージを平行移動させ, 対側の皮質骨内膜面の 1 視野手前まで計測し, その後 1 視野遠位にステージを移動させ視野を変更していく方法で破骨細胞数 (Osteoclast number) を計測した。計測倍率は 400 倍で行った (Fig. 1)。また, 2 次海綿骨面積 (Bone Area) は, 同領域を光学顕微鏡 (OLIMPUS BH2) にパーソナルコンピュータ (PC9801BA2) を連動させ, 画像解析装置 (SPICCA: Nippon Avionics Co.) を用い, 半自動的に行った (Fig. 2)。

以上の操作を TRAP 染色を施した 20 枚の連続切片を用いて計測した後, 各群の平均値を比較し, Student の t 検定を行った。

Fig. 1 Bone histomorphometry method of osteoclast number counting.

Measurement of secondary spongiosa were performed where is 0.5 mm below the lowest point of growth plate-metaphyseal junctions, as well as 0.5 mm from endocortical surfaces.

A grid was moved one by one in the domain.

Fig. 2 Area of secondary spongiosa by image processor (SPICCA).

なお、以上の動物実験は「九州歯科大学における動物実験に関する指針」に従って行った。

結 果

1. 病理組織所見

対照群においては、骨端直下にある骨幹端の矢状断組織像を観察した。骨幹端は5層の軟骨細胞層と骨組織からなっていた。軟骨細胞は柱状に配列し、各細胞層間の区画ははっきりとしておりその構成は、扁平あるいは楕円形を呈した軟骨細胞の長軸が関節面に平行に配列している静止帯軟骨細胞層、その直下に位置し長方形や丸型の大小不同の軟骨細胞からなっている増殖帯軟骨細胞

層、石灰化基質が柱状間隙に見られ微小な細胞間質で囲まれている肥大型軟骨細胞が存在している肥大帯軟骨細胞層、その直下あるいは下縁に位置し石灰化基質を侵食する軟骨吸収細胞が見られる侵食帯軟骨細胞層、軟骨性骨化部分の新生骨中に骨細胞を封入している軟骨下骨形成帯およびその下方に軟骨細胞層と垂直に走行している連続した骨梁からなっていた。各軟骨細胞層を観察すると、増殖帯は細胞成分に富み各層を通じて最も細胞密度が大きかった。また、肥大型軟骨細胞における核および細胞質は明調に染色されているのが観察され、その細胞間基質には石灰化が見られ深層に移行するに伴い、石灰化は細胞間基質中でさらに進行していた (Fig. 3~5)。

カルシウム欠乏食群においては、対照群と比べ、軟骨層全体の幅は増加しており骨梁の数は減少していた。軟骨細胞の配列は不規則で、増殖帯軟骨細胞は、大きな丸型や扁平な形状を呈しており、増殖帯と肥大帯の境界は不明瞭で、肥大帯の柱状間隙における石灰化基質、侵食帯の石灰化基質を侵食する所見は減少し、それに伴って軟骨性骨化も減少していた (Fig. 6~8)。

低カルシウム食群では、対照群と比べ軟骨層全体の幅は増加しており、増殖帯軟骨細胞や肥大帯軟骨細胞層の配列は緻密となっていた。また、カルシウム欠乏食群に比べ肥大帯軟骨細胞を取り囲む細胞間質は増加し、侵食帯の石灰化基質を侵食する所見も旺盛であった。下方の骨梁の減少はあまり認められず、配列にもほぼ変化は認められなかった (Fig. 9~11)。

カルシウム欠乏食・標準食群は、対照群に比べ軟骨細胞層全体の幅はやや増加し、配列は不規則であった。カルシウム欠乏食群に比べると、増殖帯軟骨細胞層の幅の増加、肥大帯軟骨細胞層の幅は減少し、肥大帯軟骨細胞層を取り囲む石灰化基質の増加がみられ、侵食帯における軟骨吸収細胞による侵食所見も増加傾向にあり、骨梁は形態的にも細く一部に低石灰化層の所見も見られたが、その数は増加していた (Fig. 12~14)。

低カルシウム食・標準食群は、カルシウム欠乏食・標準食群に比べ、軟骨細胞層全体の幅は減少しており、配列も緻密になっていた。また、肥大帯軟骨細胞層の減少が著明に見られ、さらに肥大帯軟骨細胞層を取り囲む石灰化基質および侵食帯における軟骨吸収細胞による侵食所見の増加が見られた。骨梁は、広範囲にわたり対照群とほぼ同様な所見を呈していた (Fig. 15~17)。

2. 酵素組織化学所見

A. ALP 所見

対照群において、骨芽細胞の細胞膜ないしその周囲が

Fig. 3 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Control group
H·E stain (×20)

Fig. 6 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet group
H·E stain (×20)

Fig. 4 A higher magnification of Fig. 3.
H·E stain (×100)

Fig. 7 A higher magnification of Fig. 6.
H·E stain (×100)

Fig. 5 A higher magnification of Fig. 3.
H·E stain (×100)

Fig. 8 A higher magnification of Fig. 6.
H·E stain (×100)

Fig. 9 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet group
H·E stain (×20)

Fig.12 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet · normal diet group
H·E stain (×20)

Fig.10 A higher magnification of Fig.9.
H·E stain (×100)

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

Fig.11 A higher magnification of Fig.9.
H·E stain (×100)

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

深青色に染め出される ALP 陽性の細胞は、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部から下方に続く骨梁表面のほぼ全域および類骨のない骨梁表面で観察された (Fig. 18~20).

カルシウム欠乏食群は対照群と比較して、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部から下方に続く骨梁表面における ALP 陽性の細胞は減少していた (Fig. 21~23).

低カルシウム食群は対照群と比較して、ほぼ同様に骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部から下方に続く骨梁表面のほぼ全域および類骨のない骨梁表面で ALP 陽性の細胞が観察された (Fig. 24~26).

カルシウム欠乏食・標準食群は対照群と比較して、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部から下方に続く骨梁表面における ALP 陽性の細胞は減少していたが、カルシウム欠乏食群と比較すると増加していた (Fig. 27~29).

低カルシウム食・標準食群においては、対照群と比較して、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部から下方に続く骨梁表面のほぼ全域および類骨のない骨梁表面で ALP 陽性の細胞がほぼ同様に観察され、カルシウム欠乏食・標準食群と比較すると増加していた (Fig. 30~32).

B. TRAP 所見

対照群においては、TRAP 陽性細胞は、数個の核が観察される多核の破骨細胞および大型の単核の細胞において、破骨細胞の細胞質内全体、破骨細胞直下の骨基質表層および連続する吸収窩表層において瀰漫性に赤紫色に染め出され、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部から下方に続く骨梁表面において観察された。また、骨梁部においては、骨梁の表面で皿状に陥没した吸収窩に納まる形や骨梁の末端部を包み込むような形で存在した (Fig. 33~35).

カルシウム欠乏食群は対照群と比較して、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部における TRAP 陽性細胞は増加していた。また、2次海綿骨領域における骨梁部においても TRAP 陽性細胞は増加しているのが観察された (Fig. 36~38).

低カルシウム食群は対照群と比較して、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部および2次海綿骨領域における骨梁表面における TRAP 陽性細胞は増加していたが、カルシウム欠乏食と比較すると減少していた (Fig. 39~41).

カルシウム欠乏食・標準食群はカルシウム欠乏食と比

Fig. 15 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet · normal diet group
H · E stain (×20)

Fig. 16 A higher magnification of Fig. 15.
H · E stain (×100)

Fig. 17 A higher magnification of Fig. 15.
H · E stain (×100)

Fig.18 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Control group
ALP stain (×100)

Fig.21 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet group
ALP stain (×100)

Fig.19 A higher magnification of Fig.18.
ALP stain (×200)

Fig.22 A higher magnification of Fig.21.
ALP stain (×200)

Fig.20 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Control group
ALP stain (×100)

Fig.23 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet group
ALP stain (×100)

Fig. 24 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet group
ALP stain (×100)

Fig. 27 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet · normal diet group
ALP stain (×100)

Fig. 25 A higher magnification of Fig. 24.
ALP stain (×200)

Fig. 28 A higher magnification of Fig. 27.
ALP stain (×200)

Fig. 26 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet group
ALP stain (×100)

Fig. 29 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet · normal diet group
ALP stain (×100)

Fig.30 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet · normal diet group
ALP stain (×100)

Fig.33 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Control group
TRAP stain (×100)

Fig.31 A higher magnification of Fig.30.
ALP stain (×200)

Fig.34 A higher magnification of Fig.33.
TRAP stain (×200)

Fig.32 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet · normal diet group
ALP stain (×100)

Fig.35 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Control group
TRAP stain (×100)

Fig. 36 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet group
TRAP stain (×100)

Fig. 39 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet group
TRAP stain (×100)

Fig. 37 A higher magnification of Fig. 36.
TRAP stain (×200)

Fig. 40 A higher magnification of Fig. 39
TRAP stain (×200)

Fig. 38 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet group
TRAP stain (×100)

Fig. 41 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet group
TRAP stain (×100)

Fig.42 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet · normal diet group
TRAP stain (×100)

Fig.45 Metaphysis of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet · normal diet group
TRAP stain (×100)

Fig.43 A higher magnification of Fig.42.
TRAP stain (×200)

Fig.46 A higher magnification of Fig.45.
TRAP stain (×200)

Fig.44 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Ca-deficient diet · normal diet group
TRAP stain (×100)

Fig.47 Secondary spongiosa of tibia in the 8th week.
Low-Ca diet · normal diet group
TRAP stain (×100)

Table 2 Result of metaphyseal tissue histomorphometry

	A	B	C	D	E
Osteoclasts number (N)	55±3	92±3	76±2	79±3	57±3
Area of secondary spongiosa (mm ²)	2.035±0.076	1.826±0.345	1.965±0.053	1.912±0.021	2.013±0.023
Osteoclast number /unit area (N/mm ²)	26.827±1.45	50.094±1.295	38.634±0.999	41.263±1.106	28.313±0.749

Mean±S. D.

A : Control group

B : Ca-deficient diet group

C : Low-Ca diet group

D : Ca-deficient diet · normal diet group

E : Low-Ca diet · normal diet group

Table 3 Differences of metaphyseal tissue histomorphometry

	A⇔B	A⇔C	A⇔D	A⇔E	B⇔C	B⇔D	B⇔E	C⇔D	C⇔E	D⇔E
Osteoclasts number	**	**	**	—	**	**	**	**	**	**
Area of secondary spongiosa	**	**	**	—	**	**	**	**	**	**
Osteoclast number /unit area	**	**	**	—	**	**	**	**	**	**

** : p<0.01

A : Control group

B : Ca-deficient diet group

C : Low-Ca diet group

D : Ca-deficient diet · normal diet group

E : Low-Ca diet · normal diet group

較して、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部および2次海綿骨領域における骨梁表面におけるTRAP陽性細胞は減少していたが、対照群と比較すると増加していた (Fig. 42~44).

低カルシウム食・標準食群においては、カルシウム欠乏食・標準食群と比較して、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部および2次海綿骨領域における骨梁表面におけるTRAP陽性細胞は減少しており、対照群と比較するとほぼ同程度であった (Fig. 45~47).

3. 組織形態計測

破骨細胞の数は、対照群と低カルシウム食・標準食群では有意差がみられなかったが、これらの群とカルシウ

ム欠乏食群、カルシウム欠乏食・標準食群、低カルシウム食群を比較すると有意に多くなっていた (p<0.01) (Table 2, 3).

一方、骨梁面積は、対照群、低カルシウム食群、カルシウム欠乏食・標準食群、カルシウム欠乏食群の順で有意に小さくなっていたが、対照群と低カルシウム食・標準食群では有意差はみられなかった (Table 2, 3).

これらのことより単位面積あたりの破骨細胞数は、対照群、低カルシウム食・標準食群、低カルシウム食群、カルシウム欠乏食・標準食群、カルシウム欠乏食群の順で有意に多くなっていたが、対照群と低カルシウム食・標準食群では有意差はみられなかった (Table 2, 3).

考 察

骨は、頭蓋や顔面を形成する頭蓋顔面骨、椎骨や肋骨など体軸を構成する中軸骨、手足の骨格を構成する四肢骨に分類することができる。頭蓋顔面骨の一部や鎖骨は、間葉系細胞から直接骨が形成される膜性骨化の機序をとるが、中軸骨や四肢骨は骨形成予定域にまず軟骨が形成され、その軟骨が骨に置換される軟骨内骨化の機序により形成される。この軟骨内骨化における軟骨細胞は、頭蓋顔面領域では神経堤、中軸骨では椎板、付属肢では側板由来の間葉系細胞から分化する。機序としては、まず、骨形成予定域に出現する前駆軟骨細胞は細胞凝集領域の形成を経て軟骨細胞に分化する。この初期分化により生じた軟骨細胞は、Ⅱ型コラーゲンやアグリカンのような細胞外基質を産生しながら旺盛に分裂する。やがて、細胞は増殖を停止し、Ⅹ型コラーゲンに代表される細胞外基質成分を産生すると共に肥大化し、最終的に石灰化する。その後、骨原基を囲む骨膜から石灰化軟骨に血管が侵入して、軟骨は骨に置換される。長管骨である脛骨は、このような過程を経て成長していく¹²⁾。

また、成長した骨は生体の支持組織として重力に抗した姿勢の保持や運動機能の維持に必須の役割を果たしていると同時に、生体のカルシウムの99%以上を含有する膨大なカルシウムの貯蔵庫として細胞外液中の Ca^{2+} 濃度の維持にも不可欠であり、筋肉の収縮、消化酵素やホルモンの分泌、血液凝固などの生命の維持機構を担っている¹³⁾。しかし、このように生体内の様々な機能に関与しているカルシウムは無機物であり、生体内で合成することのできない物質であることから、骨の成長発育を考える上で、カルシウムの摂取ということが非常に重要な問題となってくる。

近年、成長期におけるカルシウム欠乏に起因した虚弱状態の骨組織に対して、食餌の改善による治療、いわゆる食餌療法が行われている¹⁴⁾。また、骨の無機成分の主体であるカルシウムが成長期に不足すると、骨量や骨構築に大きな影響を及ぼし、骨は虚弱状態に陥ることが当教室の一連の研究^{7-9, 15-19)}より明らかにされており、一旦虚弱状態に陥った骨は、食餌療法によっても生理活性物質との併用療法によっても完全な回復は困難であることも示唆されている²⁰⁻²²⁾。このような流れの中で本研究では、ヒトの思春期に相当する生後8週齢のWistar雄ラットにカルシウム摂取不足による虚弱骨を惹起させ、その後標準食に切り替えた食餌療法による脛骨骨幹端部における軟骨内骨化による骨基質形成を病理組織、酵素

組織化学、組織形態計測について検索した。

1. 病理組織所見

長管骨である脛骨は、軟骨内骨化と呼ばれる過程で骨と置換される。まず、未分化間葉細胞から分化した軟骨細胞は多量の細胞外基質を蓄積しながら旺盛に増殖し、その後肥大化する。肥大化した軟骨細胞は、細胞外基質を改変して石灰化を開始し、1次骨化中心を形成し、そこに血管の侵入を受け破軟骨細胞により吸収された後骨芽細胞の働きにより骨へと置換される。

本研究では、まずヒトの小児期に相当する思春期(8週齢)のラットにカルシウム欠乏食および低カルシウム食を与えることにより虚弱骨を惹起させ、その後カルシウムを含有した標準食を与える食餌療法による単独療法を行い、それぞれの群について脛骨骨幹端部の骨の内部構造の変化を病理組織学的に検索した。

松本(1989)²³⁾はカルシウムによる骨への影響を下顎頭軟骨細胞で観察しており、肥大帯でその幅が増大し軟骨基質の石灰化が抑制されたと報告している。これは軟骨基質の石灰化が抑制されその吸収が減少したため骨への転化が抑制され、その結果肥大軟骨細胞が蓄積をきたしたのではないかと推測している。また、当教室のカルシウム欠乏食投与後の骨梁形態を総合すると、虚弱骨においては骨梁の吸収、狭小化、走行の不規則化、低石灰化が観察されたと報告している⁸⁾。本研究においてもカルシウム欠乏食群は対照群と比較して、増殖帯、肥大帯の増加、石灰化基質の減少、骨梁の減少、走行の不規則化が認められ、軟骨細胞層から骨への転化が減少していることが観察された。これらのことより本研究におけるカルシウム欠乏食群は松本(1989)²³⁾の結果と同様に骨が虚弱骨に移行していることが示唆された。

渡辺(1995)²⁴⁾は思春期ラット歯槽骨の30%含有低カルシウム食飼育において、骨の吸収所見はほとんど認められず対照群とほぼ同様な所見を呈していたと述べている。また、尾崎(1997)⁸⁾も脛骨骨幹縁皮質骨において骨間縁皮質骨、内側縁皮質骨ともに対照群とほぼ同様な所見を呈していたと述べている。一方で、金澤(1998)⁹⁾は脛骨骨幹端の観察において肥大帯の増加、石灰化基質の減少が認められ骨への転化が減少しており、骨が虚弱状態に移行していたと報告している。本研究の低カルシウム食群においても、対照群と比較して増殖帯、肥大帯の増加、石灰化基質の減少が認められ骨への転化が減少している所見を呈しており、カルシウム欠乏食群と比較すると軽度ではあるが、骨が虚弱骨に移行していることが観察された。本研究の結果は渡辺(1995)²⁴⁾、尾崎

(1997)⁸⁾らの膜性骨化部位での所見と異なっているが、カルシウムによるラットの骨への影響は骨幹端において最も激しく骨形成障害がおこり、その中でも軟骨細胞層の増加、特に肥大帯の増加が最も顕著な所見であったという中尾 (1987)²⁵⁾の報告から、歯槽骨や骨幹縁皮質骨における膜性骨化部位においてあまり認められなかった30%含有低カルシウム食による骨への影響が、軟骨内骨化部位である脛骨骨幹端において認められたものと推測される。

篠崎 (1987)²⁶⁾はカルシウム欠乏食により虚弱状態を惹起させた骨に標準食を与えると、肥大帯の減少により軟骨細胞層が減少し、肥大帯軟骨細胞を囲む石灰化基質、軟骨吸収細胞さらに骨梁の数と幅の増加が見られたと報告している。高野 (1990)¹⁵⁾はカルシウム欠乏食に変えて標準食を投与した群においては軟骨細胞層の配列はいまだ不規則であるとし、さらに肥大帯の減少、侵食帯の拡大を観察している。本研究においてもカルシウム欠乏食に変えて標準食を投与した群においては、カルシウム欠乏食群と比較して肥大帯の減少、石灰化基質および石灰化基質の侵食所見も増加しており、軟骨内骨化過程において回復所見は見られたが、対照群と比較すると十分な回復には至っていなかった。また、低カルシウム食・標準食群においては対照群と同様な所見が認められた。これは、カルシウム欠乏食と低カルシウム食とはカルシウム含有量の違いから軟骨層における基質の石灰化に与えるダメージに差があり、カルシウム欠乏食では石灰化機構の恒常性のバランスが大きく崩れていると推測されるため回復力に影響が出たものと思われる。

以上のことから思春期虚弱骨におけるカルシウム投与は、軟骨内骨化による骨基質形成の促進効果に大きく働くことが示唆された。

2. 酵素組織化学所見

骨代謝における骨改造現象は、地球の重力や筋肉等の運動に伴う物理的な力をはじめとして、全身性ホルモン、サイトカインなどの局所因子あるいは神経等によっても直接、間接的に調節されている。これらの刺激を受けて骨改造を営む主役は Bone cells である。その一つは間葉系の骨原性細胞に由来する骨芽細胞とそれらの前駆細胞 (前骨芽細胞) ならびに骨細胞、他は造血幹細胞に由来する破骨細胞とその前駆細胞である。この骨改造現象の骨形成に関与する骨芽細胞ならびにその前駆細胞は、破骨細胞の分化・活性化にも重要な役割を果たしさらに骨細胞と共同して骨組織の維持、ミネラルのホメオステシスにおける関門としての機能を果たしている。

一方、破骨細胞は骨基質を吸収するばかりでなくそこに新たな骨形成を誘導する骨改造の中心的な役割を果たしている。これらの Bone cells の機能は互いに関連し依存しあっていることが骨組織の大きな特徴であり、組織学的にも細胞学的にも骨の吸収と形成の間には常に動的平衡が維持されていることが示されている²⁷⁾。

また、Baron ら (1983)²⁸⁾は、骨改造現象におけるこれら一連の細胞連鎖機構の過程を細胞学的に捉え、①休止期、②破骨細胞の活性期、③破骨細胞による骨吸収期、④逆転期、⑤骨芽細胞による骨形成期、の5期の分けて考えており、このような代謝回転によって骨の形態、骨量を維持しているとしている。よって、破骨細胞による骨吸収量と骨芽細胞による骨形成量との機能的バランスが崩れ骨吸収量のほうが優位になり骨量が減少した結果、骨が虚弱状態に陥ることになる。

骨組織における酵素活性の染色は1960年代に行われるようになり、1969年には Wergedal ら²⁹⁾がアゾ色素法を用いて幼弱ラット脛骨におけるアルカリ性フォスファターゼと酸性フォスファターゼの活性分布を染色により報告している。ALP は骨芽細胞のマーカー酵素であることが知られているが、ALP の遺伝子には臓器非特異型 (骨・腎・肝型)、小腸型、胎盤型などの複数の型が存在しており、その意味では骨の ALP は骨特有のものではない。しかし骨組織に限っては ALP は骨芽細胞に特有の酵素であると思われる。また、その活性は骨芽細胞の細胞膜に強く認めることができ、未熟な前骨芽細胞においてもその活性が認めることができるが、骨芽細胞の成熟度が増すにつれ活性が強くなることが知られている³⁰⁾。一方、破骨細胞には TRAP 活性が特異的に存在するといわれており、破骨細胞のマーカー酵素として利用されている^{31, 32)}。しかし、Modderman ら (1991)³³⁾は様々な組織由来のマクロファージが TRAP 陽性になるため、TRAP 活性単独では破骨細胞のマーカーにはなり得ないと報告しており、また Nakamura ら (1991)³⁴⁾は脱灰の前に塩化シアヌル処理を行えば TRAP 活性を破骨細胞と巨細胞に選択的に検出することが可能だと報告しており、その特異性についての見解は一致していない。そこで本研究においては、標本の割面の状態により多核の破骨細胞が単核細胞として観察される可能性があることや、その単核細胞が破骨細胞の前駆細胞とも考えられることから、TRAP 陽性の多核細胞のみならず大型の単核細胞も骨吸収に関連する細胞として破骨細胞系細胞と判断した。

本研究では、虚弱骨を惹起させた骨に対する食餌療法

における骨構築への影響について、ALP 活性および TRAP 活性を酵素組織化学的に検索し、その分布を観察、検討を行った。

本研究においてカルシウム欠乏食群と対照群とを比較すると、骨端軟骨細胞層と新生骨梁部との境界部、新生骨梁部から下方に続く骨梁表面で観察された ALP 陽性細胞は減少しており、TRAP 陽性細胞は増加していた。この結果に対する考察として、卵巣摘出による実験的骨粗鬆症ラットにおいては海綿骨部における破骨細胞による骨吸収の促進によって骨量減少が起こると言う報告³⁵⁾や正常なリモデリング過程においては破骨細胞が増加しても骨吸収があるレベルに達すると破骨細胞の機能が停止し骨芽細胞が出現して骨形成へと転じると言う報告³⁶⁾などから、本研究においてはカルシウム欠乏食を与え続けることにより破骨細胞が増加し、骨吸収があるレベルに達しても破骨細胞は機能を停止せず機能的なバランスが崩れ骨吸収が骨形成へと転じることなく骨形成機能を上回った結果、骨が虚弱状態へと移行したものと思われる。また、金澤 (1998)⁹⁾ は、ALP 陽性細胞の減少は骨芽細胞の減少と共に活動性の低い休止期の骨芽細胞の割合の増加を示唆しているものであり、TRAP 陽性細胞の増加は骨吸収量の増加のみならず細胞連鎖における吸収期、逆転期の延長も示唆していると推測している。本研究においても吸収期、逆転期の延長および休止期の骨芽細胞の割合の増加によって骨の代謝回転における骨吸収と骨形成のバランスが破綻し、骨が虚弱状態へ移行したと思われる。

低カルシウム食群は対照群と比較して、ALP 陽性細胞はほぼ同程度であり TRAP 陽性細胞は増加していた。このことから低カルシウム食群は対照群と比較して骨が虚弱状態に移行していることが示唆された。しかし、カルシウム欠乏食群と比較すると ALP 陽性細胞は増加しており TRAP 陽性細胞は減少していたことから、骨の虚弱状態は軽度であったと思われる。

カルシウム欠乏食・標準食群はカルシウム欠乏食群と比較すると ALP 陽性細胞は増加しており TRAP 陽性細胞は減少していた。これは、細胞連鎖における骨の吸収期、逆転期が短縮し活動性の高い骨芽細胞の割合が増加することによって、カルシウム欠乏食によってもたらされた骨吸収と骨形成のバランスの破綻が改善され、骨基質形成が促進している事を示唆しているものと思われる。一方、対照群と比較すると ALP 陽性細胞は減少しており TRAP 陽性細胞は増加していたことから、回復はいまだ不十分であることが示唆された。

低カルシウム食・標準食群はカルシウム欠乏食・標準食群と比較すると、低カルシウム食群の骨がカルシウム欠乏食群と比べ脆弱骨が軽度であったことや、TRAP 陽性細胞が減少していることなどから骨構築が促進していることが推測できる。また、対照群と比較して ALP 陽性細胞および TRAP 陽性細胞がほぼ同様であったことから、骨基質形成は対照群とほぼ同程度まで回復していると思われる。

以上のことから、思春期の虚弱状態の骨にカルシウム含有食の単独療法でも骨の回復所見がみられることが認められた。

3. 組織形態計測所見

骨の *in vivo* における実験系の評価手段として、骨の組織形態計測はきわめて重要である。脛骨は、その近位骨幹端部に代謝回転が高くいろいろな薬剤に対する反応が sensitive である海綿骨が計測に十分な領域あり、その形状も計測に適しているため頻用されている³⁷⁾。一方で、ラットはリモデリングを行う動物であるために、用いた動物の週齢と実験期間の長さによっては、リモデリングの場合である 2 次海綿骨領域に成長の様式である軟骨性骨化によって形成された骨が侵入してくる。すなわち、リモデリングの部位にモデリングによって形成された骨が混在してくる。このことは、リモデリングを純粹に評価する場合には不適當な状況と考えられる。そこで本研究においては骨の成長の影響を避けるため、成長軟骨の遠位端と皮質骨から 500 μm 離れた部位を 2 次海綿骨領域と定義し、測定領域とした³⁸⁾。また、前述したように骨梁表面の TRAP 陽性細胞のなかには、多核の破骨細胞の他に単核の TRAP 陽性細胞もみられる。これらは、破骨細胞の前駆体である前破骨細胞、標本の断面の具合で偶然多核が単核に見えたもの、のいずれかと考えられるため骨梁表面の TRAP 陽性細胞を骨吸収に関わる破骨細胞系の細胞として判断した。しかし、これらの細胞の認識は計測者の判断に頼らなければならない部分が大きいため、予備実験として、TRAP 染色の標本を無作為に 10 枚選び破骨細胞数の変異係数を求めた。変異係数とは、標準偏差を標準化するため、それを平均値で割って百分率で表した値のことである。その結果、変異係数の値が 2.28 % と低かったため測定値の信頼性を得ることができた。

本研究では、虚弱状態に陥った骨に対するカルシウム投与による食餌療法において、骨代謝の骨吸収に関する破骨細胞系細胞の数を計測し、定量化を行うことにより具体的に骨基質形成への影響について検討を行った。

梶本ら（1993）^{39）}は、骨粗鬆症患者の腸骨骨梁表面の TRAP 活性の分布と強弱を組織形態計測学的に検討しており、TRAP 活性を有する多核の破骨細胞の占拠する割合が対照群に比較して骨粗鬆症群では増加していたと報告している。また、石垣（1995）^{40）}は、実験的骨粗鬆症モデルラットを作製し破骨細胞、前破骨細胞の変化を組織形態計測学的に検討し、破骨細胞数は対照群に比べ増加していたと報告している。本研究においても、対照群と比較して、低カルシウム食群、カルシウム欠乏食群、の順に単位面積あたりの破骨細胞系細胞数が増加しており、カルシウム欠乏食群、低カルシウム食群の順に骨吸収が促進していることが推測できる。一方、重久（1997）^{41）}は、低カルシウム食群は対照群と比較してほぼ同様であり形態的な差は認められなかったと報告しているが、骨リモデリングにおける細胞連鎖は成人ではその周期が約3ヶ月であり、破骨細胞が作動する期間はわずか3日～1週間に過ぎないとの報告がある^{42）}。したがって、骨梁表面の形態と細胞活性とが必ずしも一致するとは限らないと思われる。また、吸収期に破骨細胞が骨基質の非コラーゲン要素を吸収し、逆転期に TRAP 陽性の単核食細胞によって残りのコラーゲンが吸収されるという仮説^{39）}や TRAP 活性が吸収期に限らず逆転期においても陽性になるという報告^{43）}もあることから、本研究においてカルシウム欠乏食群はもちろんのこと低カルシウム食群においても骨吸収量が増加するのみならず細胞連鎖における吸収期、逆転期が起き骨組織が虚弱状態に移行している可能性があることが示唆された。

カルシウム欠乏食・標準食群の単位面積あたりの破骨細胞系細胞数はカルシウム欠乏食群と比較すると減少していたことから、骨吸収期、逆転期が短縮し、骨吸収が減少し骨構築が促進していることが推測できる。しかし、対照群と比較すると増加しており依然十分安定した状態には至っていない。

また、低カルシウム食・標準食群においては対照群とほぼ同程度であったが、これは低カルシウム食群とカルシウム欠乏食群とを比較すると単位面積あたりの破骨細胞系細胞数が少ないことから、骨組織の虚弱状態は軽度であったために回復所見に差が出たものと思われる。

骨粗鬆症の治療薬として、本邦ではビタミン D₃ 製剤、カルシウム製剤、カルシトニン製剤などが用いられているが、近年、ヒト上皮小体ホルモンの間欠投与に骨量増加作用があると報告や初期の作用の1つであった石灰化抑制作用が低減され骨吸収抑制作用を特に高めた新世代のビスフォスフォネートの報告などがみられ、現在いろ

いろな手法を用いてこれらの薬剤について検討がなされている^{44）}。その中でも、鶴木（1995）^{45）}は骨粗鬆症モデルラットにヒト上皮小体ホルモンの間欠投与をおこなったものを骨形成と骨吸収の観点から組織形態計測学的に検討しており、その有用性を報告している。また、玄（1995）^{46）}も甲状腺上皮小体摘出術を施した骨吸収モデルラットにビスフォスフォネートを投与したものを組織形態計測学的に検討しており、骨吸収抑制剤としての作用を確認している。このように、組織形態計測は種々の骨代謝疾患の動物モデルでの検討において非常に有効な手段であることが示唆されている。本研究は骨吸収系の面からのアプローチであり、骨代謝の状態を把握するためには骨形成の観点や生化学的な観点からの検討が必要と思われる。

以上のことから、思春期にとくに低カルシウム食による虚弱状態に陥った骨に対して、カルシウム含有のバランスのとれた食餌療法を行うことによって骨基質形成において骨吸収系細胞の動態の改善が認められることが組織形態学的に示唆された。

結 論

ヒトの思春期に相当する生後8週齢の Wistar 系雄ラットにカルシウム欠乏食（100 mg 中 0.01 mg）および低カルシウム食（100 g 中 144 mg）を6週間与えたものと、3週間与え虚弱状態を惹起させた後に3週間標準食を与える食餌療法で、脛骨骨幹端部の軟骨性骨化による骨基質形成に及ぼす影響について検索し、次のような結果を得た。

1. 病理組織所見

対照群と比べとくにカルシウム欠乏食群では、軟骨細胞層が広く、肥大帯軟骨細胞および柱状間隙における石灰化基質および石灰化基質を侵食する所見は減少していた。また、低カルシウム食・標準食群では、軟骨細胞層の幅が減少し柱状間隙における石灰化基質および石灰化基質を侵食する所見が増加し、対照群とほぼ同様な所見を呈し、軟骨内骨化による骨基質形成の促進がみられた。

2. 酵素組織化学所見

新生骨梁部から下方へと続く骨梁表面の骨芽細胞をあらわす ALP 陽性細胞は、対照群と比較してカルシウム欠乏食・標準食群、カルシウム欠乏食群、低カルシウム食群の順に減少していたが、低カルシウム食・標準食群は対照群とほぼ同様な所見を呈していた。また、破骨細胞系細胞をあらわす TRAP 陽性細胞は、対照群と比較してカルシウム欠乏食群、カルシウム欠乏食・標準食群、

低カルシウム食群では増加しており、低カルシウム食・標準食群では対照群とほぼ同様な所見を呈していた。

3. 組織形態計測所見

2次海綿骨における単位面積あたりの破骨細胞数は、対照群と比較して低カルシウム食群、カルシウム欠乏食・標準食群、カルシウム欠乏食群の順で増加しており、低カルシウム食・標準食群は対照群とほぼ同様な所見を呈していた。

以上のことから、第2次性徴期までに最大骨量を獲得することにより、一時的に虚弱骨を惹起しても、低カルシウム食から標準食に切り換えた群に示すように、カルシウム含有のバランスのとれた食餌療法を行うことによって軟骨内骨化による骨基質形成の回復所見が認められた。

稿を終わるにあたり、懇篤なる御指導、御鞭撻ならびに御校閲の労を賜った恩師木村光孝教授に深甚なる敬意と感謝の意を捧げます。また実験に御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。

なお、本研究の一部は平成10年度九州歯科大学後援会大学院生研究援助費によって行われた。

引用文献

- 1) 手塚健一, 久米川正好: 破骨細胞の単離法と破骨細胞特異的遺伝子の単離と解析. 実験医学 13: 425-429, 1995.
- 2) 松本俊夫, 福本誠二: 骨シグナルと骨粗鬆症. 羊土社, 東京, 1997, 12-25.
- 3) Chesney, R. W. and Shore, R. M.: The noninvasive determination of bone mineral content by photo absorptiometry. Am. J. Dis. Child. 136: 578-580, 1982.
- 4) Gilsanz, V., Douglas, T. G., Thoman, F. R., Michael, C., Melvin, O. S., Cesar, R. L. and Christopher, C. C.: Vertebral bone density in children.; Effect of puberty. Radiology 166: 847-850, 1988.
- 5) 清野佳紀, 田中弘之, 西山宗六, 広田孝子: 最大骨量に及ぼす緒因子. The Bone 8: 16-34, 1994.
- 6) 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: 47-52, 1994.
- 7) 木村京子: 成長期ラットの虚弱骨における食餌療法に関するX線学的骨塩量および病理組織学的研究—脛骨骨幹皮質骨について—. 九州歯会誌 51: 41-72, 1997.
- 8) 尾崎章寿: 若年期虚弱骨における食餌療法に関する実験的研究—脛骨骨幹皮質骨について—. 九州歯会誌 51: 441-461, 1997.
- 9) 金澤憲孝: 成長期ラットの虚弱骨における食餌療法に関する超微形態学的及び酵素組織化学的研究—骨基質形成—. 九州歯会誌 52: 63-79, 1998.
- 10) Kimmel, D. B.: Quantitative histologic changes in the proximal tibial growth cartilage of aged female rats. Cells and Materials Suppl 1: 11-18, 1991.
- 11) Shen, V., Denpster, D. W., Mellish, R. W. E., Birchman, R., Horbert, W. and Rindsay, R.: Effects of combined and separate intermittent administration of lowdose human parathyroid hormone fragment (1-34) and 17 β -estradiol on bone; histomorphometry in ovariectomized rats with established osteopenia. Calcif. Tissue Int. 50: 214-220, 1992.
- 12) 森井浩世, 矢崎義雄編: Clinical calcium. 医業ジャーナル社 9: 16-21, 1999.
- 13) 松本俊夫編: 骨・カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症. 羊土社, 東京, 12-24, 1994.
- 14) 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—歯槽骨の変化—. 九州歯会誌 40: 1245-1268, 1986.
- 15) 高野 治: 虚弱骨に対する生理活性物質の影響に関するX線の, 光顕的および電顕的研究—とくに下顎頭の変化—. 九州歯会誌 44: 890-919, 1990.
- 16) 木村光孝, 牧 憲司, 木村京子, 太田和子, 今村隆子, 高江州旭, 秀島 治, Braham, R. L.: 虚弱骨に対する高カルシウム食, 生理活性物質の併用療法に関する走査電顕的研究—とくに下顎頭の変化—. 小児歯誌 29: 582-593, 1991.
- 17) 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.
- 18) 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, 光顕的および電顕的研究—歯槽骨の変化—. 九州歯会誌 45: 629-652, 1991.
- 19) 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および電顕的研究—下顎頭の変化—. 九州歯会誌 46: 140-175, 1992.
- 20) 加来弘志: 虚弱骨に対するカルシウム含有, 活性型ビタミンD₃の併用療法に関する実験的研究. 九州歯会誌 46: 462-481, 1992.
- 21) 中河原哲郎: 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.
- 22) 西田郁子, 曾我富美雄, 松田容士子, 竹下尚利, 赤嶺秀紀, 高橋市丈, 木村光孝: 虚弱骨に対する高カルシウム療法の効果に関する実験的研究. 小児歯誌 30: 764-781, 1992.
- 23) 松本文博: 低カルシウム食飼育ラットにおける下顎頭軟骨の組織学的研究. 四国歯誌 3: 161-177, 1989.
- 24) 渡邊美和: 成長期顎骨における若年性虚弱骨に関する実験的研究—歯槽骨について—. 九州歯会誌 49: 20-40, 1995.
- 25) 中尾利夫: 成長期顎骨における実験的骨粗鬆症に関する研究—とくに下顎頭の変化—. 九州歯会誌 41: 46-67, 1987.
- 26) 篠崎英一: 実験的骨粗鬆症に対する食餌の影響に関する研究—とくに下顎頭の変化—. 九州歯会誌 41: 102-121, 1987.
- 27) 小澤英浩, 網塚憲生: Bone cellsの構造と機能. 日本臨床

- 9: 2246-2253, 1994.
- 28) Baron, R., Vignery, A. and Horowitz, M.: Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling. In: Bone and Mineral Research, Annual 2, (ed. W. A. Peck), New York, Elsevier Science Pub.: 175-243, 1983.
- 29) Wergedal, J. E. and Baylink, D. J.: Distribution of acid and alkaline phosphatase activity in undemineralized sections of the rat tibial diaphysis. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 799-806, 1969.
- 30) 横瀬敏志, 池田 通, 吉木周作, 山口 朗: 特集 骨形成—骨芽細胞—. *細胞* 25: 129-133, 1993.
- 31) Minkin, C.: Bone acid phosphatase: Tartrate — Resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif. Tissue Int.* 34: 285-290, 1982.
- 32) Hammarstrom, L. E., Anderson, T. R., Marks, S. C. Jr. and Toverud, S. U.: Inhibition by dithionite and reactivation by iron of the tartrate-resistant acid phosphatase in bone of osteopetrotic (ia) rats. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 1167-1174, 1983.
- 33) Modderman, W. E., Tuinenburg-Bol Raap, A. C. and Nijweide, P. J.: Tartrateresistant acid phosphatase is not an exclusive marker for mouse osteoclasts in cell culture. *Bone* 12: 81-87, 1991.
- 34) Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, T. and Yoshiki, S.: Acid phosphatase activity is detected preferentially in the osteoclastic lineage by pretreatment with cyanuric chloride. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 1415-1420, 1991.
- 35) 青柳真紀: 卵巣摘出ラットにおける骨量減少機序の解明とその抑制に関する実験形態学的研究. *歯基礎誌* 36: 598-610, 1994.
- 36) 中村利孝: 閉経後骨粗鬆症の病態モデルとしての卵巣摘出動物. *日骨形態誌* 4: 1-5, 1994.
- 37) 谷澤龍彦: ラット脛骨, 椎骨の組織形態計測. *日骨形態誌* 4: 13-16, 1994.
- 38) Tada, k., Yamamoto, T., Okumura, H., Kasai, R. and Takahashi, H.: Restriction of axial and appendicular bone volumes by h-PTH (1-34) in parathyroidectomized and osteopenic rats. *Bone* 11: 163-169, 1990.
- 39) 梶本 修, 笹島功一, 小竹英義, 桜井 実: 骨梁表面の酵素活性分布から見た骨粗鬆症, 腸骨の酵素組織学的検討. *日骨形態誌* 3: 119-126, 1993.
- 40) 石垣 智: 実験的骨量減少ラットにおける骨と骨髓組織のヒト合成上皮小体ホルモン間欠投与による変化. *日整会誌* 69: 992-1003, 1995.
- 41) 重久 偉: 成長期の虚弱骨に関する X 線の, 光顕的および超微形態学的研究—脛骨骨幹皮質骨について—. *九州歯会誌* 51: 543-579, 1997.
- 42) 乗松尋道: 骨の老化とカルシウム. *Clinical Calcium* 2: 44-50, 1992.
- 43) Heersche, J. N. M.: Mechanism of osteoclastic bone resorption: A new hypothesis. *Calcif. Tissue Res.* 26: 81-84, 1978.
- 44) 松本俊夫: 分子医学の骨代謝学への応用と骨粗鬆症. *分子骨代謝学と骨粗鬆症*. メディカルレビュー社, 東京, 1996, 3-7.
- 45) 鶴木栄樹: ステロイド性骨減少症に対する h-PTH の増骨効果—ラット脛骨脱灰および非脱灰標本による骨形態計測学的検討—. *日整会誌* 69: 1064-1075, 1995.
- 46) 玄 東林: 甲状腺上皮小体摘出ラットにビタミン A を投与し作製した実験的骨吸収モデルにおけるビスフォスフォネートの骨吸収抑制効果について. *日整会誌* 69: 1193-1207, 1995.