

学 位 論 文 題 名

神経切断後骨量減少における骨微細構築の変化

— マウス大腿骨の走査電子顕微鏡による観察 —

学位論文内容の要旨

【目的】

寝たきり、麻痺、ギプス固定、非荷重などにより骨の量は減少することが知られており、これは廃用による骨量減少と理解されている。このような廃用による骨量減少は古くから注目されてきたが、骨量減少の際の骨微細構築の経時的变化の詳細は未だに不明である。骨量減少の過程では骨表面の微小局所において骨吸収と骨形成が複雑に繰り返され、それにとともに骨の微細構築は多彩に変化することが予測される。しかし、骨量を変化させる条件に関する研究は、一般に、条件設定から一定期間後の結果を観察することで行われ、その結果がどのような過程でつくられたかの観察はきわめて少ない。これらの経時変化を詳細に観察することは、廃用時の骨量減少の動態を解明する手がかりになると考える。そこで、この研究では、走査電子顕微鏡により、骨量が減少する際の骨微細構築の経時的变化を観察し、形態学の面から骨量減少の骨代謝動態を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

実験動物には雌の dd マウスを用い、生後 3 週で片側後肢の大腿神経、閉鎖神経、坐骨神経を切断して骨萎縮を惹起させた。手術後 3, 5, 7, 10 日目、および 2, 3, 4, 11 週で、左右の大腿骨を取りだし、矢状面で縦割し、次亜塩素酸ナトリウム処理によって軟部組織を除去後、遠位骨幹端を中心にして走査電子顕微鏡で観察した。また、走査電子顕微鏡写真をもとにして、大腿骨幅、一次海綿骨長、二次海綿骨長、骨形成指標、外側骨表面の骨吸収面と骨形成面の割合を計測し、骨微細構築の変化と骨形成—骨吸収バランスを検討した。

【結果】

神経切断後 3 日から、遠位骨幹端皮質骨外側表面では骨吸収面がひろがり、骨形成面が減少しはじめた。神経切断後 5 日から 7 日にかけて、二次海綿骨の急激な減少が観察された。一方、神経切断後 7 日では、内側の皮質骨表面にスポンジ状の骨形成面が出現した。この骨形成面の多くは幼若な線維骨 (woven bone) であり、活発な骨形成の形態を示した。神経切断後 10 日では、二次海綿骨の減少が進んだが、同時にスポンジ状の骨形成面は骨幹端から骨幹へ広がっていた。神経切断後 2 週から 3 週にかけて、二次海綿骨は減少したままであった。この時期、スポンジ状の骨形成面は骨幹部まで広がり、シート状の骨へと変化した。神経切断後 4 週では二次海綿骨が再び増加し、以降は骨形成—骨吸収バランスは安定化して、大きな変化は見られなかった。大腿骨長の成長は神経切断後も健側と同様であったのに対し、

大腿骨幅の成長は著しく妨げられた。一次海綿骨の長さはほとんど対照側と同様であった。二次海綿骨長は神経切断後7日から10日にかけて急速に減少し、これは3週まで減少したままであったが、4週では再び増加した。骨形成指標としての皮質骨内面の小孔の数は神経切断後7日から増加が認められ、10日に最高となり、その後は急速に減少していった。遠位骨幹端における外側骨表面の骨吸収面と骨形成面の割合は、神経切断後3日から10日までに急激に骨吸収面が増加し、これは3週まで続いた。逆に、骨形成面は3日から10日にかけて減少し、その後、3週までなだらかに減少が続いた。

【考察】

大腿骨の形態変化

神経切断は、長さの成長にはあまり影響を与えていないのに対し、太さの成長を著しく阻害し、個体によっては、むしろ細くなった。一般に成長期大腿骨の骨幹端外側では骨形成が盛んで、骨幹端からおおよそ大腿骨遠位1/4にかけては大腿骨は太くなっている。この部分から近位には骨吸収帯があり、大腿骨が長軸方向へ成長するにしたがって遠位の骨形成面を削っていく。神経切断側では、術後3日から14日にかけて、骨幹端から前述の骨吸収帯の外側の骨吸収が亢進し、外周から骨が削られ、逆に骨幹端の髓腔内側ではほぼ同時期に活発な骨形成面が出現して、内腔へ新たに骨が付加されるよう形成された。結果として、大腿骨は内腔側へ細くなるような変化を示した。廃用により骨が痩せる現象を微細形態の観察によって明らかにしたのは本研究がはじめてである。廃用とは逆に、運動負荷や重力負荷を増やすことによって骨量は増加することも確認されており、力学的な環境の変化で骨の形態が変化する事実は、興味深い。また、二次海綿骨は神経切断によって術後7日から急激な減少をきたし、術後3週までにはほとんど消失してしまった。しかし、術後4週では逆に海綿骨は増加した。この時、二次海綿骨は増加するものの、骨梁の数は少なく、幅は狭い。不動の期間によって海綿骨の形態は大きく異なり、これも本研究で得られたより新たな知見である。

骨形成と骨吸収の変化

今回の観察では、骨吸収亢進は大腿骨骨幹端の皮質骨外側と海綿骨とで認められた。大腿骨骨幹端の皮質骨外側は成長にともなう骨吸収が著しい部位であり、不動化による骨吸収亢進以外に骨形成低下にともなう相対的な骨吸収亢進がおこっていることも推察される。海綿骨の減少は、骨吸収亢進を敏感に反映するが、結果は、骨吸収が術後7～14日に最も亢進し、この亢進が術後4週になるとおさまることを示唆する。不動化による骨量減少は、総じて骨吸収－骨形成のバランスが骨吸収に傾くことによるとされている。多くの研究が骨吸収の亢進を示しているが、最近では骨形成低下に注目した研究も多く、不動化や非荷重による力学的刺激の減少は骨形成の低下を招くことが示されている。しかし、本研究では骨吸収が亢進している時期に、皮質骨髓腔側面で活発な骨形成面が出現することが確認され、これは骨の微小局所では逆に骨形成が亢進することを示している。

骨粗鬆症の基礎研究と関連して

近年、骨粗鬆症は社会的な問題となっており、臨床のみならず基礎の分野でも研究の進歩はめざましい。これまでの研究の多くは、ある一定期間をおいた断片的な観察により骨量変化を評価してきた。しかし、本研究で明らかにされたように、骨の多彩な変化を正確に捉えるためには経時的観察が必要である。また、本研究は、同じ骨のなかでも骨形成が盛んな部位や、逆に骨吸収が盛んな部位が存在し、骨全体的な観察と同時に微小局所の観察が必要であることを示している。骨の代謝を知る方法は様々あるが、骨の変化は部位により大きく異なるので、骨全体的計測では不十分であり、逆に微小局所の観察のみでは、選択部位によって結果が大きく異なる。走査電子顕微鏡による観察法は、広く面レベルで解析できることに

利点がある。変化が組織表面で起きる骨組織の観察においては特に威力を発揮する。他の様々な研究方法とともに骨粗鬆症の基礎研究において有用な手法であると考える。

【結語】

1. 神経切断後骨萎縮の際生じる骨微細構築の変化を走査電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。
2. 神経切断側大腿骨では、長さの成長は対照側と同様であったが、太さの成長は妨げられた。
3. 骨萎縮の早期では骨吸収が亢進し、同時に骨形成反応も生じた。
4. 骨萎縮にともなう骨吸収、骨形成の変化は骨の部位による特性を示した。
5. 骨吸収・骨形成バランスは、やがて安定化した。
6. 骨萎縮に至る骨動態において、骨吸収と骨形成の両者が活性化されることを形態学的に証明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 田 清 志

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 宮 坂 和 男

学 位 論 文 題 名

神経切断後骨量減少における骨微細構築の変化

— マウス大腿骨の走査電子顕微鏡による観察 —

寝たきり、麻痺、ギプス固定など廃用による骨量減少は古くから注目されてきたが、骨量減少の際の骨微細構築の経時的变化の詳細は未だに不明である。そこで、この研究では、走査電子顕微鏡により、骨量減少する際の骨微細構築の経時的变化を観察し、形態学の面から骨量減少の骨代謝動態を明らかにすることを目的とした。

実験動物には雌の dd-マウスを用い、生後3週で片側後肢の大腿神経、閉鎖神経、坐骨神経を切断して骨萎縮を惹起させた。手術後3、5、7、10日目、および2、3、4、11週で、左右の大腿骨を取りだし、矢状面で縦割し、次亜塩素酸ナトリウム処理によって軟部組織を除去後、遠位骨幹端を中心にして走査電子顕微鏡で観察した。また、走査電子顕微鏡写真をもとにして、大腿骨幅、一次海綿骨長、二次海綿骨長、骨形成指標、外側骨表面の骨吸収面と骨形成面の割合を計測し、骨微細構築の変化と骨形成—骨吸収バランスを検討した。

神経切断後3日から、遠位骨幹端皮質骨外側表面では骨吸収面がひろがり、骨形成面が減少しはじめた。神経切断後5日から7日にかけて、二次海綿骨の急激な減少が観察された。一方、神経切断後7日では、内側の皮質骨表面にスポンジ状の骨形成面が出現した。この骨形成面の多くは幼若な線維骨 (woven bone) であり、活発な骨形成の形態を示した。神経切断後10日では、二次海綿骨の減少が進んだが、同時にスポンジ状の骨形成面は骨幹端から骨幹へ広がっていた。神経切断後2週から3週にかけて、二次海綿骨は減少したままであった。この時期、スポンジ状の骨形成面はシート状の骨へと変化した。神経切断後4週では二次海綿骨が再び増加し、以降は骨形成—骨吸収バランスは安定化した。計測結果では、大腿骨長の成長は神経切断後も健側と同様であったのに対し、大腿骨幅の成長は妨げられた。二次海綿骨長は神経切断後7日から10日にかけて急速に減少し、これは3週まで減少したままであったが、4週では再び増加した。骨形成指標としての皮質骨内面の小孔の数は神経切断後7日から増加が認められ、10日に最高となり、その後は急速に減少していった。遠位骨幹端における外側骨表面の骨吸収面と骨形成面の割合は、神経切断後3日から10日までに急激に骨吸収面が増加し、これは3週まで続いた。逆に、骨形成面は3日から10日にかけて減少し、その後、3週までなだらかに減少が続いた。

以上をまとめると、神経切断側では、術後早期に外側の骨吸収が亢進して外周から骨が削られ、逆に骨幹端の髓腔内側では活発な骨形成面が出現して、内腔へ新たに骨が付加される

よう形成されるため、大腿骨は内腔側へ細くなるような変化することが明らかとなった。廃用により骨が痩せる現象を微細形態の観察によって明らかにしたのは本研究がはじめてである。廃用とは逆に、荷重を増やすことによって皮質骨が厚くなることも知られており、力学的な環境の変化で骨の形態が変化する事実は興味深い。また、二次海綿骨は神経切断によって術後早期に急激な減少をきたしたが、術後4週では逆に増加した。この時、骨梁の数は少なく、幅は狭い。不動の期間によって海綿骨の形態は大きく異なり、これも本研究で得られたより新たな知見である。不動化による骨量減少は、総じて骨吸収－骨形成のバランスが骨吸収に傾くことによると考えられる。これまでの研究によれば、このバランスの変化は骨吸収の亢進と骨形成低下により説明されてきた。しかし、本研究では骨吸収が亢進している時期に、皮質骨髓腔側面で活発な骨形成面が出現することが確認され、この事実は、骨の微小局所では骨吸収のみならず骨形成も亢進することを示している。骨の微細局所では時間の経過とともに複雑な骨代謝動態をすることが推察される。

公開発表において、副査宮坂和男教授から下肢骨と荷重の関係、週齢と骨の反応の違い、麻痺の程度と骨の反応の違い、および神経と骨代謝の関係について、次いで副査阿部和厚教授から神経と骨の細胞との関係、荷重変化感知のメカニズム、本研究における骨形成亢進の解釈、および他の研究との比較についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は、自らの研究結果や過去の研究報告を引用し、論理的な考察と豊富な知識に基づいて明解に解答した。

以上、本研究は走査電子顕微鏡を用いて神経切断後骨量減少の際の骨微細形態を観察した独創的な研究であり、骨の複雑な微細構築変化と骨代謝動態を明らかにした点で骨代謝研究に大きく寄与した。さらに、この形態学的研究法を用いることにより不動性骨粗鬆症の病態や運動と骨代謝動態の関係をさらに解明することができると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。