

学 位 論 文 題 名

成長期ラット頭頂骨骨組織における
機械的荷重に対する反応について

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨は生体において改造を繰り返し、生涯において新しく作りかえられている組織であり、骨の構造は骨に加えられた様々な機械的刺激に適応するように適宜改造されているという考えは一般的に受け入れられている。

骨に加わった機械的刺激を感知し骨改造現象を引き起こす機構として、骨中に埋入している骨細胞が重要な役割を果たしていると思われるが、機械的刺激による骨細胞密度の変化を観察した報告はない。本研究は、成長期にあるラット頭頂骨に機械的荷重を付与した際と、この荷重を撤去した際に生じる骨組織と骨細胞密度の変化を形態学的に明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

実験動物として生後4週齢のWistar系雄ラット16匹を用いた。実験群ではラット頭頂部の最大幅径線と顔面正中線との交点を中心とした頭部最大幅径の60%に相当する直径の円を想定した鉛円柱を作製後、頭部に接着し、この範囲直下の骨組織を観察部位とした。実験期間中、実験動物の体重と頭部最大幅径を4日毎に測定し機械的荷重が体重の1/25になるように鉛円柱を調節し接着した。実験群では、荷重を4週間付与し（以下、荷重＋期）、その後荷重を撤去し更に4週間経過させた（以下、荷重－期）。対照群では荷重を付与しなかった。また、荷重付与時と荷重撤去時を頭頂骨中にラベルするために、実験群、対照群とも実験開始時と実験終了時1日前にテトラサイクリンを、実験開始後4週経過時にカルセインを背部皮下に投与した。

頭頂骨は固定後、前頭縫合部にて正中矢状断で左右に二分し、左側はパラフィン切片用、右側は樹脂包埋した研磨標本用の試料とした。脛骨はパラフィン切片用として用いた。

パラフィン包埋用試料は、前頭断方向で厚さ $5\mu\text{m}$ の連続切片を作製後、光学顕微鏡下で、頭頂骨前頭縫合部から側頭骨側 1mm の部位を観察し、頭頂骨の厚さ、骨面積から骨髓腔面積を引いた値を骨面積で割ることで得られる骨形成率を測定した。また、頭頂骨の厚みの中央部を基準として頭皮側（以下、外側）と脳側（以下、内側）に分け、それらをさらに荷重+期と荷重-期の4区域に分け、単位面積当たりの骨細胞数（以下、骨細胞密度）を計測した。また、得られた結果はStudent's t-testにて有意差検定を行った。脛骨は長軸に対して平行に厚さ $5\mu\text{m}$ の縦断連続切片を作製し、頭頂骨と同様の方法で骨幹部の骨細胞数の計測を行った。

樹脂包埋用試料は厚さ約 $100\mu\text{m}$ の研磨標本を作製後、落射蛍光顕微鏡でテトラサイクリン線とカルセイン線を確認し、マイクロラジオグラフィー（CMR）上で骨の石灰化度を観察した。

【結果】

対照群の頭頂骨は実験開始時と比較すると骨膜の組織学的変化はみられなかったが、外側と内側にみられる皮質骨の厚さが増加していた。実験群では、対照群と比較して骨髓腔の範囲が狭くなっていた。頭頂骨の厚さは対照群と実験群間で統計学的な有意差は認められなかったが、骨形成率は、実験群が対照群より有意に大きい値を示した。

荷重+期外側領域間における骨細胞密度及び、荷重+期と荷重-期の骨細胞密度の差は実験群が対照群より有意に大きな値を示した。脛骨の骨細胞数は対照群、実験群の頭頂骨のすべての領域の骨細胞数より有意に大きな値を示した。

蛍光線所見では対照群頭頂骨外側で、荷重+期の骨の厚さは荷重-期の骨の厚さよりも大きい傾向が認められたが、内側ではほぼ同等であった。外側と内側において実験期間に形成された骨の厚さはほぼ同等であった。実験群頭頂骨外側では、荷重+期の骨の厚さが荷重-期の骨の厚さよりも小さい傾向が認められたが、内側では対照群と同様の結果が観察された。実験期間中に形成された骨の厚さは外側の方が内側よりも大きい傾向を示した。実験開始時にラベルされた2本のテトラサイクリン線の間隔は対照群よりも実験群で大きい傾向がみられた。

対照群、実験群ともにCMR像では荷重+期、-期の骨において明瞭にX線透過像が異なるような像は観察されなかった。

【考察】

成長期ラット頭頂骨は骨細胞を含む骨層板が常に古い骨上に形成される骨形成を明瞭に観察できる部位である。また、他の部位の骨と比較して比較的大きな範囲で扁平構造を呈していることから、外科的浸襲や複雑な操作を施すことなく荷重を加えることが可能であるため、本研究では成長期ラット頭頂部に荷重を加える方法を用いた。

体重の1/25の大きさの機械的荷重を頭頂骨に付与したことで、実験群では頭頂骨の厚さ、骨の石灰化度において対照群とほぼ同様であり、大きな変化は認められなかった。この結果は、本研究で用いた荷重が頭頂骨全体としての成長、骨質には大きな影響を与えていないことを示唆するものと思われる。しかしながら、実験群の頭頂骨では対照群のそれと比較して骨形成率の増加が示すように、骨髓腔の面積が小さくなっており、対照群で骨髓腔が観察される領域の大部分は実験群ではセメントラインがみられる骨に置換されており、実験開始時にラベルされた頭頂骨中央部の2本のテトラサイクリン線の間隔は対照群より実験群で大きい傾向を示していた。これらの結果は、機械的荷重が頭頂骨の骨髓腔部分を骨改造により新たに形成した骨に置換したことを示している。

また、本研究では対照群脛骨の骨細胞密度は対照群、実験群頭頂骨のそれより有意に大きな値を示した。この結果は運動による筋からの機械的刺激、体重の負荷による機械的荷重が骨細胞密度に大きく影響を与えていることを示唆している。これを踏まえ、荷重+期外側領域間における骨細胞密度及び、荷重+期と荷重-期の骨細胞密度の差は実験群が対照群より有意に大きな値を示したことは、脛骨と類似した機械的荷重が実験群に付与され、機械的荷重がその期間に形成される骨中の骨細胞密度に影響を与えていることを示唆している。

【結論】

- 1、機械的荷重の変化が成長期ラット頭頂骨の骨細胞密度に影響を与え、荷重付与が骨細胞密度の増加を引き起こすことが示唆された。
- 2、機械的荷重の有無に関わらず、成長期ラット頭頂骨では形成される骨の石灰化度はほぼ一定であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎

副 査 教 授 脇 田 稔

副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

成長期ラット頭頂骨骨組織における 機械的荷重に対する反応について

審査は飯田、脇田、向後審査委員それぞれ個別に、口頭試問の形式によって行われた。まず論文の概要の説明を求めるとともに適宜解説を求め、次いでその内容および関連分野について試問した。

申請者から、まず以下のような説明がなされた。

本研究は骨の成長期に外部から荷重を加えた場合に、骨組織はどのように反応して成長するかを検索することを目的とした。そのために生後4週齢のWistar系雄ラットを実験動物として使用し、頭頂骨に機械的荷重を付与した際とこの荷重を撤去した際に生じる骨組織と骨細胞密度の変化を調べたものである。

【材料と方法】 実験群では荷重が体重の $1/25$ になるように調節した鉛円柱を頭部に接着した。実験期間中、実験動物の体重を4日毎に測定し重さと大きさを調整した。荷重は4週間付与し（以下、荷重＋期）、その後荷重を撤去し更に4週間経過させた（以下、荷重－期）。対照群では荷重を付与しなかった。また実験群、対照群とも実験開始時と実験終了時1日前にテトラサイクリンを、実験開始後4週経過時にカルセインを背部皮下に注射した。頭頂骨は固定後、前頭縫合部で左右に二分し、左側はパラフィン切片用、右側は樹脂包埋した研磨標本用の試料とし、脛骨をパラフィン切片用として用いた。

パラフィン包埋用試料は、前頭断方向で連続切片を作製後、光学顕微鏡下で、頭頂骨の厚さ、骨形成率を測定した。また頭頂骨中央部を基準として頭皮側（以下、外側）と脳側（以下、内側）に分け、それらをさらに荷重＋期と荷重－期の4区域に分け、単位面積当たりの骨細胞数（以下、骨細胞密度）を計測した。得られた結果は統計解析を行った。脛骨は頭頂骨と同様の方法で骨細胞数の計測を行った。また樹脂包埋用試料では研磨標本作製して落射蛍光顕微鏡で蛍光線を確認し、マイクロラジオグラフィー（CMR）上で骨の石灰化度を観察した。

【結果】 実験群の骨髓腔の範囲は対照群と比較して狭かった。頭頂骨の厚さは対照群と実験群間で統計学的な有意差は認められなかったが、骨形成率は、実験群が対照群より有

意に大きい値を示した。荷重+期外側領域間における骨細胞密度及び、荷重+期と荷重-期の骨細胞密度の差は実験群が対照群より有意に大きな値を示した。脛骨の骨細胞数は対照群、実験群のそれより有意に大きな値を示した。

蛍光線所見では対照群頭頂骨外側で、荷重+期の骨の厚さは荷重-期よりも大きい傾向が認められたが、内側ではほぼ同等であった。実験群頭頂骨外側では、荷重+期の骨の厚さが荷重-期よりも小さい傾向が認められたが、内側では対照群と同様の結果が観察された。実験開始時に描記された2本のテトラサイクリン線の間隔は対照群よりも実験群で大きい傾向がみられた。対照群、実験群ともにCMR像では荷重+期、-期の骨において明瞭にX線透過像が異なるような像は観察されなかった。

【考察】頭頂骨の厚さ、骨の石灰化度は対照群と実験群でほぼ同様であり、大きな変化は認められなかった。この結果は、本研究で用いた荷重が頭頂骨全体としての成長、骨質には大きな影響を与えていないことを示唆するものと思われる。しかしながら、実験群の頭頂骨では対照群のそれと比較して骨形成率の増加、すなわち骨髓腔の面積が小さくなっており、さらに実験開始時にラベルされた頭頂骨中央部の2本のテトラサイクリン線の間隔は対照群より実験群で大きい傾向を示していた。この結果は、機械的荷重が刺激となって、頭頂骨の骨髓腔部分が骨改造により新たな骨に置換されたことを示している。

また、脛骨の骨細胞密度は、対照群、実験群の頭頂骨より有意に大きな値を示した。また頭頂骨における荷重+期外側領域間における骨細胞密度及び、荷重+期と荷重-期の骨細胞密度の差は実験群が対照群より有意に大きな値を示した。この結果は、筋の機能あるいは荷重などの骨に対する機械的刺激が、形成される骨中の骨細胞密度に影響を与えていることを示唆している。

以上の論述に引き続き以下の項目を中心に口頭試問を行った。

1. 骨密度、骨細胞密度を検索する意義
2. 機械的刺激と骨形成に関する研究の歴史的背景
3. 蛍光顕微鏡像で検索する意義と、得られた結果の解釈
4. 頭蓋冠の発達と本研究で見られた現象の差の理論的説明
5. この研究の将来展望

これらの試問に対して申請者は明快な回答、説明を行った

本研究は、機械的荷重の変化が成長期ラット頭頂骨の骨細胞密度に影響を与え、荷重付与が骨細胞密度の増加を引き起こすことを初めて明らかにしたものである。得られた結果の価値は、解剖学的観点から高く評価されるとともに、機械的刺激を加えて骨の改造現象を起こしている歯科矯正治療という臨床歯科医学的観点からも、重要な情報を与えたものと高く評価できる。更に、試問の内容から、学位申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められた。また今後は更に詳細な解析の準備を進めており、将来の展望についても評価された。

よって審査担当者全員は、申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。