

尾部懸垂ラットモデルにおける骨髄内血流と 骨量の変化に関する実験的研究

中 増 正 寿

広島大学医学部整形外科学講座 (主任: 生田義和教授)

受付 平成 13 年 11 月 1 日

受理 平成 13 年 11 月 30 日

尾部懸垂ラットにおける, 下肢骨髄内血流の変化と, 骨塩量, および骨形態計測パラメーターの変化の関係を検討した。さらに, 骨粗鬆症治療薬の一つであるエルカトニンを投与し, 骨髄内血流の変化を観察した。

水素クリアランス法を用いて脛骨近位部の骨髄内血流を測定した後反対側の脛骨近位部を摘出し, 骨塩量濃度 (BMD), マイクロ CT 装置 (μ -CT), 組織学的骨形態計測を行った。さらにエルカトニン投与尾部懸垂ラットについても同様の検査を行った。これらによって, 以下の結論を得た。

- 1) 尾部懸垂ラットの脛骨近位部骨髄内血流量は, 懸垂 5 日群から有意に低下していた。
- 2) 尾部懸垂ラットでは, 早期の段階から特に骨吸収を示すパラメータの有意な上昇が見られたが, 統計学的に有意に骨髄内血流量と相関していたのは, μ -CT 検査における Mean Intercept Length (MIL) のみであった。
- 3) エルカトニン投与尾部懸垂ラットでは, 溶媒投与群と比べて有意に骨髄内血流量が上昇していた。
- 4) 尾部懸垂ラットにおいて, 骨髄内血流が骨吸収を抑制することによって骨リモデリングに影響している可能性があり, エルカトニン投与における骨髄内血流量増加が, 骨吸収を抑制することによって骨量低下を抑制している可能性が示唆された。

Key words : 骨髄内血流, 骨粗鬆症, 尾部懸垂ラット

骨組織は身体の支持組織であり, また, カルシウムおよびリンの貯蔵庫で, 骨組織が絶えず改変され, カルシウム/リンを吸収/放出しながら形成および吸収を繰り返すことによって, 細胞外液, および軟部組織でのこれらのイオン濃度を維持する上での重要な役割を演じている。このバランスが何らかの影響で吸収量が多い方向に崩れた場合に骨量が減少した状態が骨萎縮と定義される。

骨萎縮をきたす原因には様々なものがあるが, 組織学的には大きく 2 つに分けられる。すなわち, 高回転型骨萎縮と低回転型骨萎縮である。高回転型骨萎縮の代表は閉経後骨粗鬆症であり, これは, 閉経によってエストロゲンの分泌が減少し, このエストロゲン低値によって破骨細胞が活性化されるため, 骨吸収が骨形成に対して相対的に上昇するために, 骨萎縮をきたす。一方, 低回転型骨萎縮の代表としてあげられるのが, 老人性骨粗鬆症であり, 骨形成が低下することで骨萎

縮をきたす。

また, 力学的負荷が軽減することによって骨萎縮をきたすこともよく知られており, 宇宙飛行や, 老人の長期臥床状態後に生じる骨粗鬆症が近年問題にされている。宇宙飛行時の骨変化の報告もあるが, 地球上で一般的に用いられている力学的負荷の軽減モデルが, 尾部懸垂ラットである²³⁾。この尾部懸垂ラットに生じる骨量の減少についてはこれまで様々な報告がある^{6,10)}が, 尾部懸垂ラットの下肢の骨髄内の血流量の変化についての報告はきわめて少ない³⁰⁾。さらに, 力学的負荷が生じた際に, いかなるファクターが力学反応に応じたシグナルとして骨に働きかけているのかという問題は現在も明らかにされていない。力学的負荷による剪断応力, 静水圧, 液流, それにより生ずる電磁場などの可能性が報告されているが³⁾, われわれは内液流に注目した。骨は, 小管のネットワークを持っており, そこには, 充分な量の骨間の早い内液流 (interstitial

fluid flow: IFF) が認められている²²⁾。IFF は、骨髓腔の静脈洞から漏れ出して、皮質骨を、骨内血行と骨膜部のリンパ還流の圧較差によって、軸に沿って外側に向かって流出する²²⁾。IFF は、力学的歪みが無い場合には一定だが、曲げや圧迫力が圧較差を生じた場合には、内液が圧迫された部位から牽引された部位へと流出する²⁴⁾。

In vitro モデルにおいては、液流が骨芽細胞に影響を及ぼし²⁶⁻²⁸⁾、プロスタグランジン E₂ や NO の放出を増加させ¹⁴⁾、骨形成の促進、骨吸収の抑制に繋がると報告されている^{1,15)}。

さらには、*in vivo* モデルにおいて、静脈結紮およびそのための血液の鬱滞による骨折治癒促進²⁹⁾、骨リモデリングの誘導¹⁶⁾、尾部懸垂ラットにおける骨密度の増加⁴⁾が認められている。

尾部懸垂ラットは、上半身に対して下半身を挙上して下肢の免荷を図るモデルであるので、下肢に対しての循環量の変化が考えられる。そこで今回われわれは、尾部懸垂ラットの脛骨近位部の骨髓内血流量を測定し、同部位の骨形態計測パラメーターを用いた骨量の変化と経時的に比較検討し、骨髓内血流量が骨量の変化に及ぼす影響について実験的に研究し検討を加えた。

さらに、骨粗鬆症の治療薬として用いられている製剤のうち、エルカトニンに着目して、この薬剤の効果を検討した。エルカトニンは、ウナギカルシトニンの化学構造中のジスルフィド結合をエチレン結合に変え、物理化学的に安定化させた誘導体である。これは、ヒトやその他哺乳類のカルシトニンよりもその効力が強く、また持続的である²⁴⁾。

ヒトカルシトニンは、32個のアミノ酸からなるペプチドホルモンで、甲状腺 C 細胞から分泌される。カルシトニンの主要な作用は破骨細胞に対する骨吸収作用抑制作用³²⁾で、それに伴って骨から血中へのカルシウム動員が減少し、血中カルシウム濃度を低下させるように働く。また、腎における尿中カルシウム排泄増加⁸⁾およびリン再吸収抑制^{5,17)}、胃酸分泌抑制作用¹³⁾、鎮痛作用⁷⁾などが報告されている。

さらに、エルカトニンでは、腰部脊柱管狭窄症患者に対する投与時の馬尾神経併走血管拡張²¹⁾やイヌにおける脊柱起立筋の血流量増加²⁰⁾の報告がなされており、一方で、14日間尾部懸垂を行ったラットにおいて、単位骨量 (BV/TV) の低下を抑制したとの報告もある³¹⁾。そこで、エルカトニンの投与時においては、骨髓内血流も何らかの変化を生じ、それが骨量変化に影響している可能性があると考えて、尾部懸垂ラットの脛骨近位部の骨髓内血流量のエルカトニン投与によ

る変化を測定し、同部位の骨形態計測パラメーターを用いた骨量の変化との比較を行い、エルカトニンによる骨髓内血流量の変化が骨量変化に及ぼす影響も実験的に研究し検討を加えた。

対象と方法

実験動物

生後11週の Wistar 系雌ラットを1週間ケージ内で飼育した後、以下の研究を行った。

実験1：尾部懸垂日数による骨量変化と血流量変化の関係

尾部懸垂群のラットは、ジエチルエーテルによる吸入麻酔を施した上で、第2尾椎に直径 0.7 mm の Kirschner 鋼線を貫通させ、ケージの天井に通した鋼線に固定し、ケージの長軸方向に自由に移動できるように尾部を懸垂して、下肢の免荷を行った。対照群のラットは、0.7 mm の Kirschner 鋼線を尾部に刺入した後にそのままケージで2週間飼育した。尾部懸垂群は、その懸垂日数によって、5日群、7日群、10日群、14日群の4群とし、対照群を加えた5群間で以下の測定を行った。

a) 脛骨近位部骨髓内血流量測定

脛骨近位の骨髓内血流量の計測は、水素クリアランス法を用いた^{2,33)}。

すなわち、まずペントバルビタールナトリウム(ネンブタール, Abbott Laboratories, North Chicago, U.S.A.) 0.5 ml/kg, 50 mg/ml を腹腔内に投与し、右下肢の膝関節部に正中切開を加え、膝蓋靭帯から脛骨近位部を露出した。脛骨の膝蓋靭帯付着部に、直径 1.0 mm のドリルで後方に向けて作孔し、そこに直径 1.0 mm のプラチナ針電極を刺入した¹⁹⁾。大腿部の皮下に不感電極を置き、ラットに対して経口で水素を投与した状態で針電極と不感電極間の電位差を MHG-D1 (ユニークメディカル社製, 東京) で測定し、水素飽和状態からの電位差の減衰曲線によって骨髓内血流量を算出した。

b) 脛骨近位部骨塩量濃度測定

血流量測定後、ラットを安楽死させ、左下肢の脛骨を摘出した。脛骨の近位部(すなわち血流量測定を施行した同一部位)を用いて骨量の測定を行った。まず Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) を用いた骨塩量測定を行った。骨塩量測定器は DCS-600EX (アロカ社製, 東京) を用い、脛骨近位部を選択したエリアスキャンにて計測を行った。

c) μ -CT を用いた骨形態計測

摘出脛骨を MCT シリーズ (日立メディコ社製, 東

京)の試料テーブル上に固定し、脛骨の中枢部で、骨端線からやや末梢を起点とし、末梢へ向かって1 μ m毎に130枚のスライスを作成し、このうちの末梢部115枚を用いて3次元画像を作成し、その部位における海綿骨を抽出した上でその形態計測を行った。計測を行い、解析を加えたパラメーターは、単位骨量(BV/TV)、単位骨表面積(BS/TV)、骨梁幅(Tb.Th)、骨梁数(Tb.N)、骨梁間隙(Tb.Sp)、Mean Intercept Length(MIL)、Trabecular Bone Pattern factor(TBPF)である。BV/TVは単位体積当たりの骨量であり、値が増加すれば骨量が多いことを表す。BS/TVは単位体積当たりの骨表面面積である。Tb.Th、Tb.Nは、それぞれ海綿骨の骨梁の幅、および数であり、骨吸収が進むと減少する。これに対してTb.Spは吸収が進むと、値が増加する。MILは、骨梁の方向性を定量化したもので、異方性の増加により数値が低下する。これによって、骨量に依存しない骨梁方向による強度を見ることが出来るとされている⁹⁾。元来二次元での研究に適用されてきた方法であるが、三次元の研究にも応用が可能である。TBPFは、骨梁の表面の凹凸構造を反映し、骨梁の複雑性、連結性を表すパラメーターとして考案され¹²⁾、連結性が低下するほど、TBPFは高値となる。

d) 組織学的骨形態計測

摘出脛骨をエタノールおよびアセトンを用いて脱水、脱脂した後に、Villanueva染色液に7日間入れて

染色を行い、メチルメタクリレートモノマーを充分浸潤した上でポリマーに包埋し、その上で非脱灰薄切標本を作製し、組織学的骨形態計測を行った。冠状面で薄切した面で、皮質骨との境界から0.3mm内側で、成長板から1.2mm末梢部の二次海綿骨4.8mmの範囲を選択し、semiautomated system(Osteoplan II, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)を用いて形態計測を行った。計測を行ったパラメーターは、単位骨量(BV/TV)、石灰化骨量(Md.BV/TV)、骨梁幅(Tb.Th)、骨梁数(Tb.N)、骨梁間隙(Tb.Sp)、類骨厚(O.Th)、類骨面(OS/BS)、骨芽細胞面(Ob.S/BS)、吸収面(ES/BS)、破骨細胞数(N.Oc/B.Pm)、破骨細胞面(Oc.S/BS)である。BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Tb.Spについては μ -CTと同様である。Md.BV/TV、O.Th、OS/BS、Ob.S/BSは、骨形成を表すパラメーターである。これに対して、ES/BS、N.Oc/B.Pm、Oc.S/BSは骨吸収を示すパラメーターである。

以上の μ -CTおよび組織学的骨形態計測パラメーターおよびその示す意味を、Table 1にまとめた。

実験2：エルカトニン投与による骨量変化と血流量変化

ラットを高容量投与群、低容量投与群、対照群の3群に分けた。全群14日間尾部懸垂を施行した。高容量投与群にはエルカトニン(エルシトニン, 旭化成, 東京)を15 IU/kg, 週3回皮下注射投与した。低容量

Table 1. Micro-CT and histomorphological parameters and indexes which are pointed by each parameter.

	abbreviations	parameters	index of
micro-CT	BV/TV	Bone volume	
	BS/TV	Bone surface	
	Tb.Th	Trabecular thickness	} structure
	Tb.N	Trabecular number	
	Tb.Sp	Trabecular separation	
	MIL	Mean intercept length	anisotropy
	TBPF	Trabecular born pattern factor	connectivity
histo.	BV/TV	Bone volume	
	Md.BV/TV	Mineralized bone volume	bone formation
	Tb.Th	Trabecular thickness	} structure
	Tb.N	Trabecular number	
	Tb.Sp	Trabecular separation	
	O.Th	Osteoid thickness	bone formation
	OS/BS	Osteoid surface	bone formation
	Ob.S/BS	Osteoblast surface	bone formation
	ES/BS	Eroded surface	bone resorption
	N.Oc/B.Pm	Osteoclast number	bone resorption
Oc.S/BS	Osteoclast surface	bone resorption	

投与群には、エルカトニンを 3 IU/kg 週 3 回皮下注射投与した。このエルカトニンの量は、前出の尾部懸垂ラットでのエルカトニン投与実験の報告³⁾に従い決定している。対照群には、溶媒を週 3 回皮下投与した。

各群に対して、実験 1 と同様に、a) 脛骨近位部骨髓内血流量測定、b) 脛骨近位部骨塩量濃度測定、c) μ -CT を用いた骨形態計測、d) 組織学的骨形態計測の各項目について 3 群間における比較検討を行った。

統計学的検定には、Mann-Whitney の U 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定し、相関性の評価には Pearson の相関係数検定を用いた。

なお、この実験は広島大学動物実験倫理委員会により研究の承認を得た。

結 果

実験 1

a) 脛骨近位部骨髓内血流量測定

骨髓内血流量を計測したラットは、各群 13 匹、計 65 匹である。計測結果は、対照群 (以下 c 群) で 27.5 ± 9.0 (ml/min/100 g, 平均値 \pm 標準偏差, 以下同様)、懸垂 5 日群 (以下 d5 群) で 20.4 ± 6.7 , 懸垂 7 日群 (以下 d7 群) で 18.1 ± 6.0 , 懸垂 10 日群 (以下 d10 群) で 17.0 ± 8.7 , 懸垂 14 日群 (以下 d14 群) で

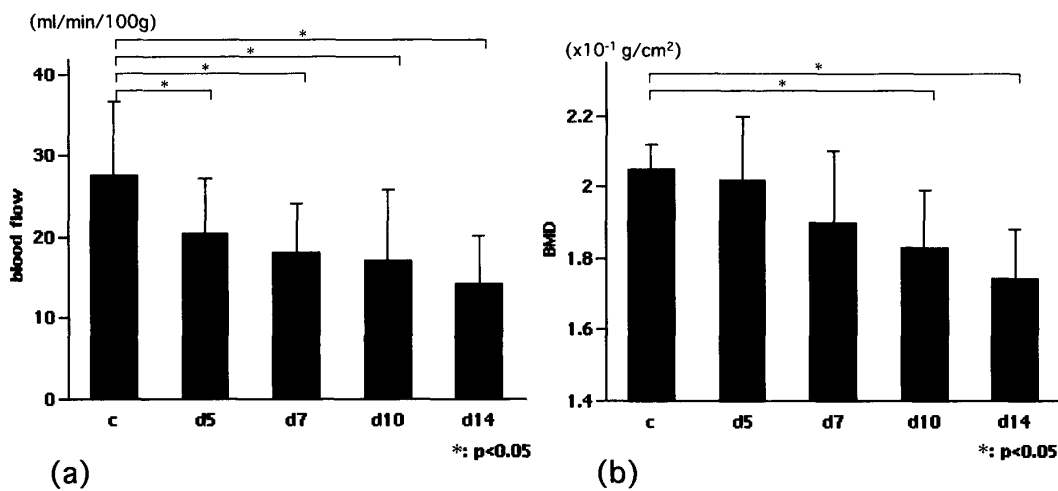
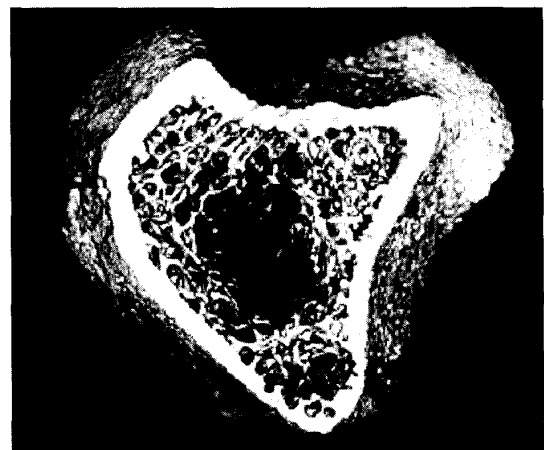


Fig. 1. Blood flow and bone mineral density measurement divided with the suspended period.

(a) Intraosseous blood flow. D5-group, d7-group, d10-group and d14-group was statistical different with control group ($p < 0.05$). (b) Bone mineral density. D10 and d14-group was significantly lower than the control ($p < 0.05$).



(a)



(b)

Fig. 2. 3D-micro-CT image of rat tibia bone.

(a) Control group. (b) 14-day tail-suspended rat. Trabecular bone was significantly lost.

14.2±6.0であり、d5 群、d7 群、d10 群、d14 群の全ての群でc 群に対して有意差を認めた (Fig. 1(a))。

b) 脛骨近位部骨塩量濃度測定

c 群で2.05±0.07 (×10⁻¹g/cm², 平均値±標準偏差, 以下同様), d5 群で2.02±0.18, d7 群で1.90±0.20, d10 群で1.83±0.16, d14 群で1.74±0.14 であり, d10 群および d14 群で c 群に対して有意差を認めた (Fig. 1(b))。

c) μ-CT による骨形態計測 (Fig. 2)

上記の65匹のうち, 各群 6 匹ずつ, 合計30匹に対して μ-CT を用いた骨形態計測を行った。

結果は, BV/TV は低下傾向はみられたが c 群に対する有意差は認められず, これに対して BS/TV では

d5 群, d7 群, d10 群, d14 群全てに c 群に対して有意差が認められた (Fig. 3)。Tb.N では c 群と他群との有意差は認められなかったが, Tb.Th で c 群に対して d10 群および d14 群に有意差を認めた (Fig. 4)。Tb.Sp においても c 群と他群間に有意差は認められなかった。MIL では, d7 群を除く各群に c 群に対する有意差が認められ, TBPf でも c 群に対して全ての群が有意差を認めた (Fig. 5)。各パラメーターの骨髄内血流量に対する相関関係を検討したところ, MIL のみに相関関係を認めた (p<0.05)。

d) 組織学的骨形態計測 (Fig. 6)

c 群, d5 群, d7 群, d10 群, d14 群の各群 6 匹ずつ, 計30匹に対して組織学的骨形態計測を行った。

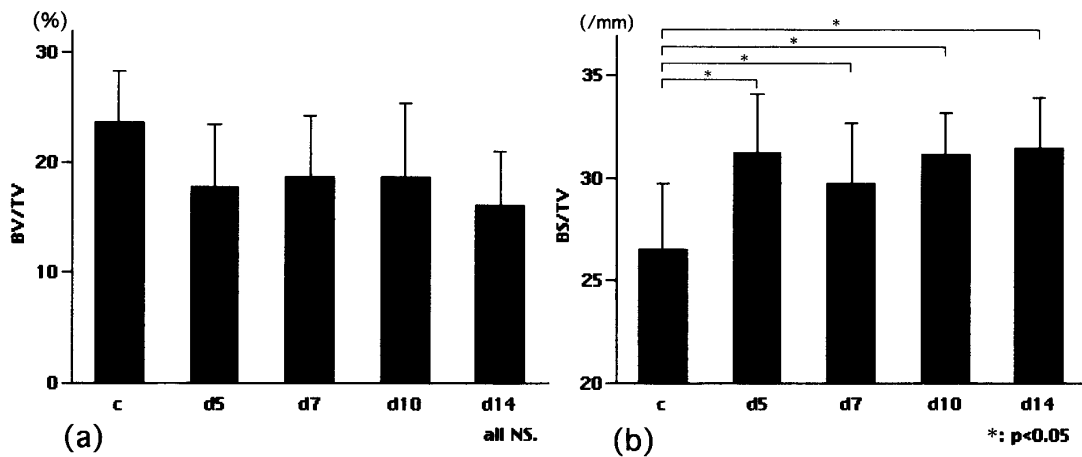


Fig. 3. BV/TV and BS/TV measurement with micro-CT divided with the suspended period.

(a) BV/TV. Not significant between the control group and the others. (b) BS/TV. Control group was significantly lower than the other groups (p<0.05).

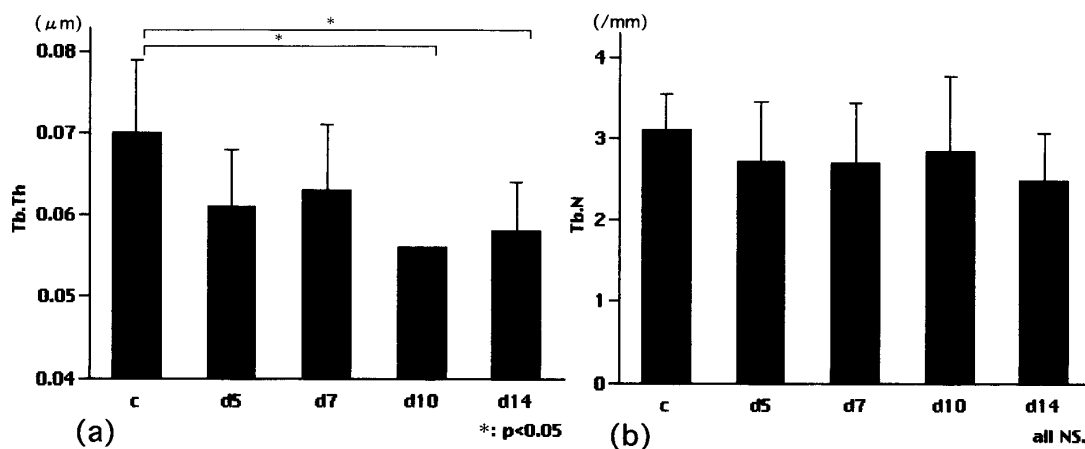


Fig. 4. Tb.Th, Tb.N measurement with micro-CT.

(a) Tb.Th. Significantly change was measured between control group and d10- and d14-group (p<0.05). In (b) Tb.N, there was no significant change between control and the others.

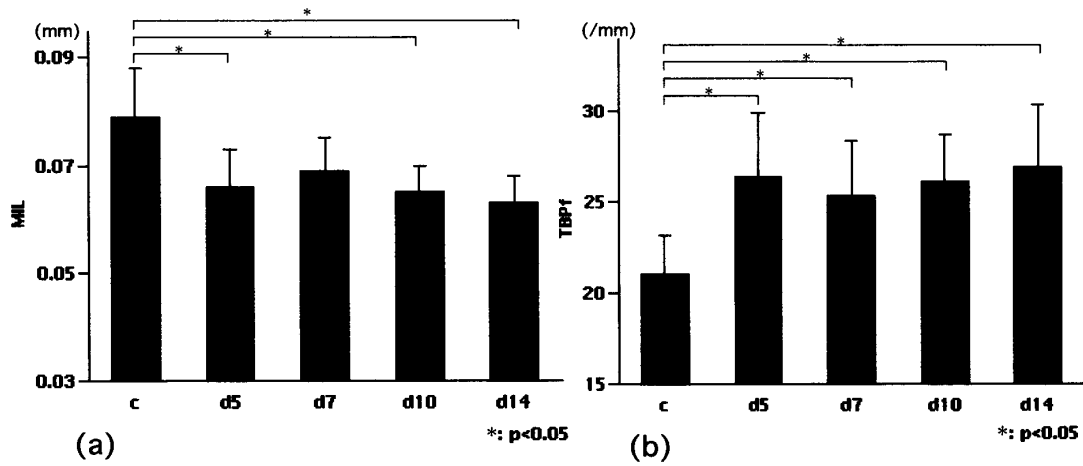


Fig. 5. MIL and TBPf measurement with micro-CT divided with the suspended period. (a) MIL. Control group was significantly lower than d5-, d10- and d14-group ($p < 0.05$). (b) TBPf. Between control group and the other groups there was statistical difference ($p < 0.05$).

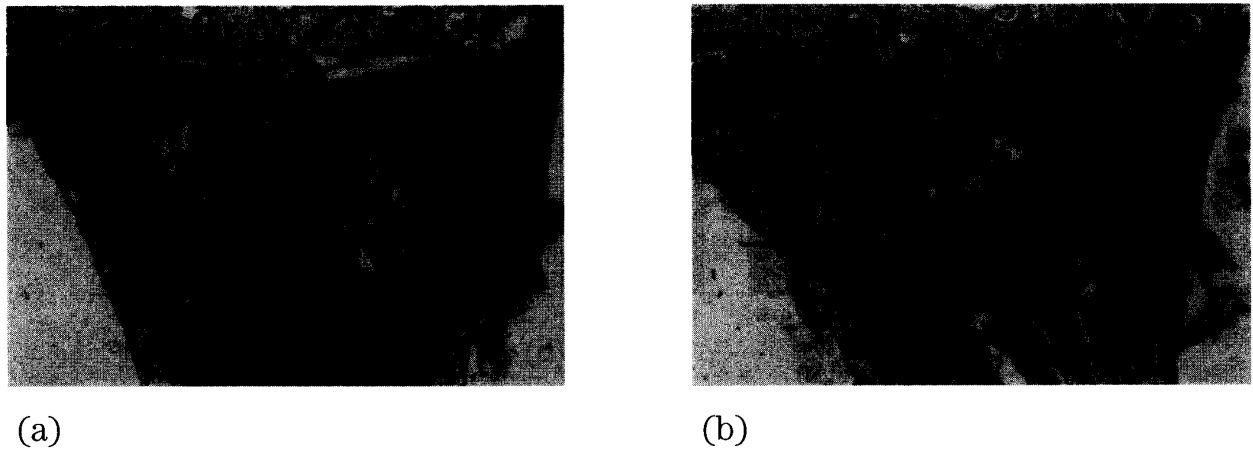


Fig. 6. Specimen of the rat tibia using for histomorphometric measurement. (a) control group rat. (b) 14-day tail-suspended rat. Significantly trabecular bone decreased.

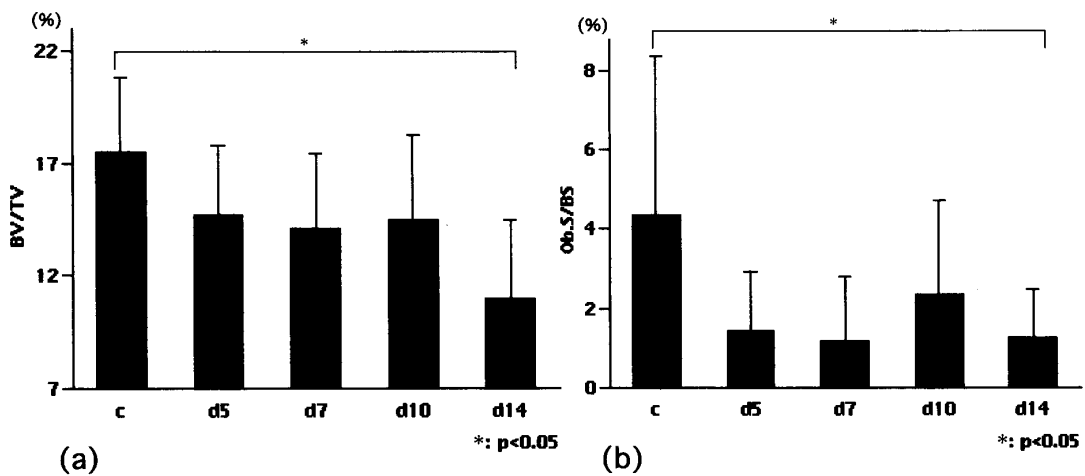


Fig. 7. Parameters measured with histomorphometric method. (a) BV/TV, (b) Ob.S/BS. Only between control group and d14-group there was statistical difference ($p < 0.05$).

BV/TV, Md.BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, Ob.S/BS, N.Oc/B.Pm では, d14 群のみが c 群に対しての有意差を認めていた。Fig. 7 には代表として BV/TV および Ob.S/BS を示した。O.Th は d5 群のみに c 群に対する有意差を認めた。他群でも低下傾向にはあったが, 有意差を認めるには至っておらず, OS/BS は, d5 群, d7 群, d14 群において c 群に対して低値を示していたが, 有意差を認めなかった。一方, ES/BS は, d10 群を除く各群に c 群に対する有意差を認め, さらに, Oc.S/BS は, d10 群, d14 群に c 群に対する有意差を見た (Fig. 8)。したがって, d14 群で

は, 骨量および骨構造, 骨形成および骨吸収の全パラメーターが低下 (吸収は上昇) していたが, それ以前の d5 群, d7 群, d10 群では骨吸収パラメーターの上昇のみが有意に認められた。各パラメーターの骨髄内血流量との相関関係は, 統計学的に有意差は認められなかった。

実験 2

実験 2 では, 各群5匹ずつ, 計15匹を用いて検討を加えた。

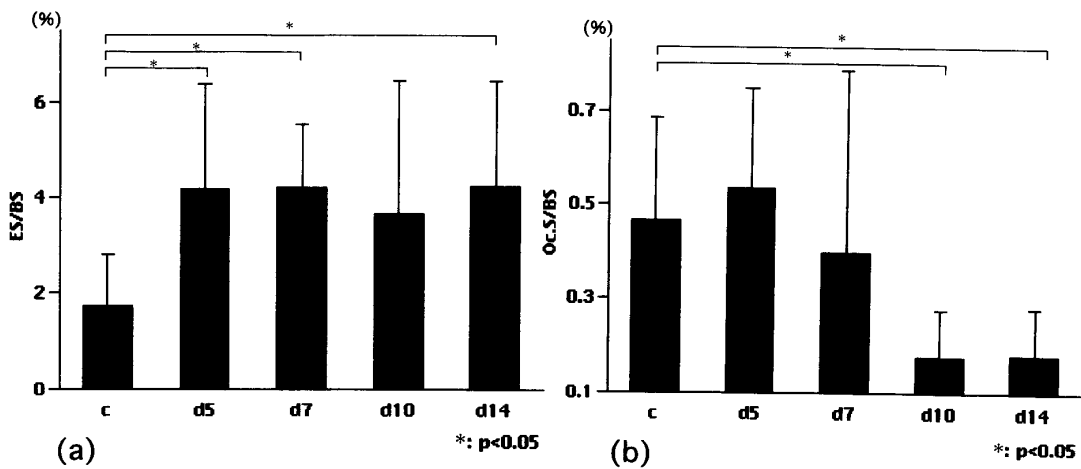


Fig. 8. ES/BS and Oc.S/BS measured with histomorphometric method.

(a) ES/BS. There was statistically difference between control group and d5-, d7- and d14-group ($p < 0.05$). (b) Oc.S/BS. Between control group and d10-, d14-group there was significantly difference ($p < 0.05$).

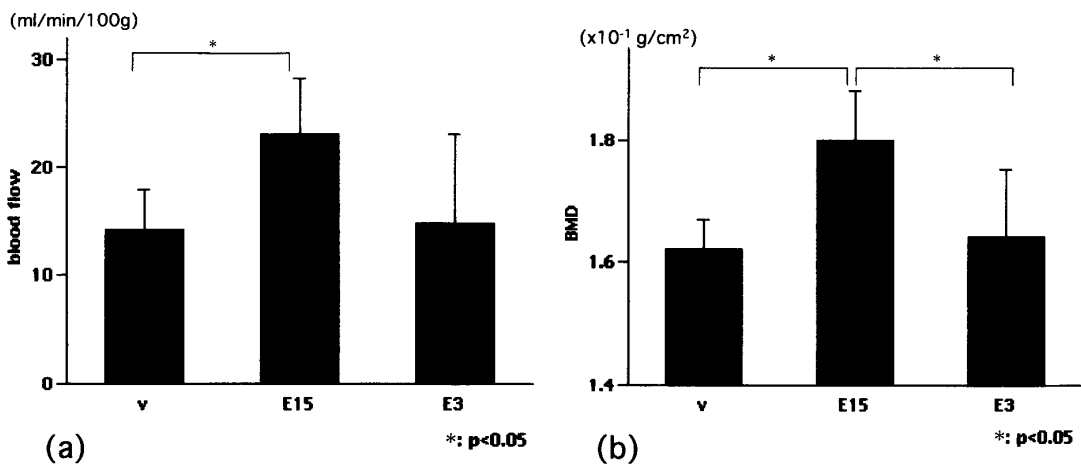


Fig. 9. Blood flow and bone mineral density measurement divided with the Elcatonin administration.

(a) Intraosseous blood flow. There was significantly difference between control group and high-dose administration group ($p < 0.05$). (b) BMD measurement. Significantly difference existed between control group and high-dose admin. group, and between high-dose and low-dose admin. group ($p < 0.05$).

a) 脛骨近位部骨髄内血流量測定

対照群 (以下 v 群) では 14.1 ± 3.8 (ml/min/100 g, 平均値 \pm 標準偏差, 以下同様), 高容量投与群 (以下 E15 群) 23.1 ± 5.1 , 低容量投与群 (以下 E3 群) 14.8 ± 8.2 で, v 群と E15 群との間に有意差を認めた (Fig. 9(a)). E3 群に対して E15 群で血流量の増大が認められたが, 有意差は認められなかった。

b) 脛骨近位部骨塩量濃度

v 群では 1.62 ± 0.05 ($\times 10^{-1}$ g/cm², 平均値 \pm 標準偏差, 以下同様), E15 群で 1.80 ± 0.08 , E3 群で

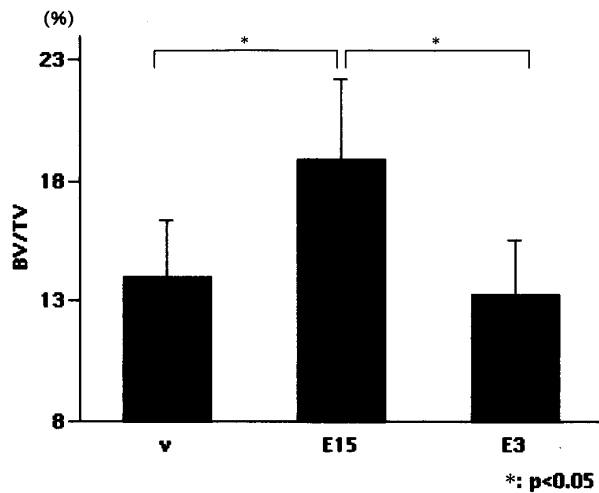


Fig. 10. BV/TV measurement used micro-CT. There was significantly difference between control and high-dose admin. group, high-dose and low-dose admin. group ($p < 0.05$).

1.64 ± 0.11 であり, v 群と E15 群, E3 群と E15 群との間に有意差を認めた (Fig. 9(b)).

c) μ -CTによる骨形態計測

v 群と E15 群, E3 群と E15 群間における BV/TV の

Table 2. Parameters that exist stastically difference between two or more groups.

Parameters		Groups significantly different	
Tail-suspension	blood flow	c-d5, d7, d10, d14	
	BMD	c-d10, d14	
	μ -CT	BS/TV	c-d5, d7, d10, d14
		Tb.Th	c-d10, d14
		MIL	c-d5, d10, d14
		TBPf	c-d5, d7, d10, d14
	histo.	BV/TV	c-d14
		Md.BV/TV	c-d14
		Tb.Th	c-d14
		Tb.N	c-d14
Tb.Sp		c-d14	
O.Th		c-d5	
Ob.S/BS		c-d14	
ES/BS		c-d5, d7, d14	
N.Oc/B.Pm		c-d14	
Oc.S/BS	c-d10, d14		
Elcatonin administration	blood flow	v-E15	
	BMD	v-E15, E3-E15	
	μ -CT	BV/TV	v-E15, E3-E15
		BV/TV	E3-E15
	histo.	ES/BS	v-E15, v-E3

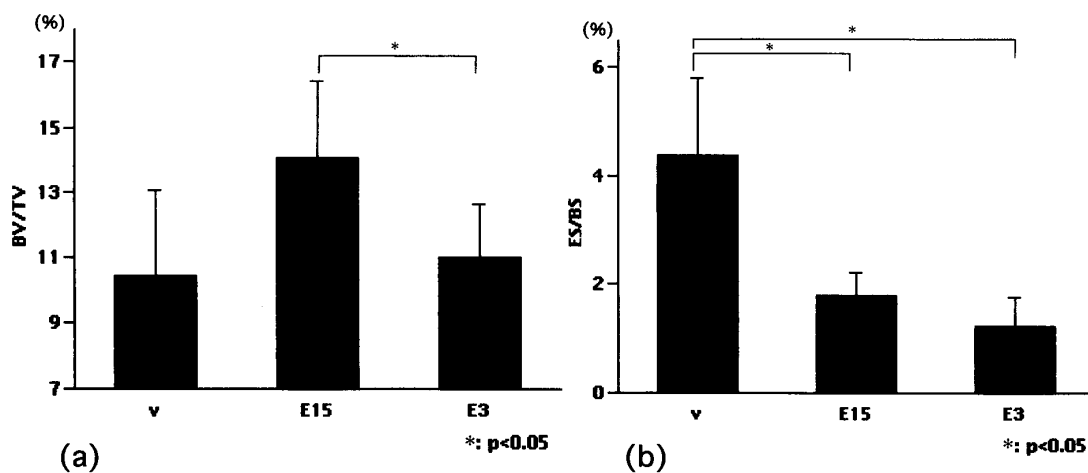


Fig. 11. BV/TV and ES/BS measurement with histomorphometric method. (a) BV/TV. There was significantly difference only between high-dose admin. and low-dose admin. group. (b) ES/BS. Significantly difference existed between control and high-dose admin. group, and control and low-dose admin. group ($p < 0.05$).

みに有意差を認めた (Fig. 10)。他の, BS/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, MIL, TBPf には有意差は認められず, 三次元上での骨量および骨形態の変化に明らかな差異を指摘することは出来なかった。

d) 組織学的骨形態計測

BV/TV では, E3 群と E15 群間にのみ有意差を認め, 骨量には E15 群において低下の防止が見られることを示した。v 群と E15 群間では, BV/TV 値の低下は見られたものの, 有意差は認めなかった。また, ES/BS において, v 群と E15 群間, そして v 群と E3 群との間にも有意差を認め, 骨吸収の増大が抑制されていると考えられた (Fig. 11)。その他のパラメーターにおいては, 各群間の有意差は認められなかった。

以上の結果をまとめたものを Table 2 に示した。

考 察

1. 尾部懸垂ラットにおける骨量の低下について

尾部懸垂ラットにおける骨量低下の報告は, その組織学的形態計測をも含め散見される^{10,11,18)}。尾部懸垂 1 週目には海綿骨部での骨吸収量が増大するが, 懸垂 2 週目には増加していた骨吸収反応は正常化し, 主に皮質骨において骨形成量が低下すると報告されている。われわれの結果では, 早期よりの骨吸収は認められたが, 尾部懸垂 2 週目でも正常化は認められなかった。これは, 従来の尾部懸垂ラットにおいては幼弱ラットが用いられていて, 我々の用いた成熟ラットでは骨吸収の回復過程が遅延しているのではないかと推察された。骨形成のパラメーターは, 懸垂 10 日, 14 日といった懸垂後期にのみ対照群との有意差が認められた。これは, 従来の報告と同様に, 海綿骨でも尾部懸垂 1 週を過ぎてから骨形成の低下反応が見られているということを示唆していると考えられた。

2. 骨リモデリングに際しての内液流 Interstitial Fluid Flow (IFF) の働きについて

緒言において述べたように, われわれは尾部懸垂ラットにおいて下肢の循環量に変化し, それが骨量低下に関与しているのではないかと考えて実験を行った。

その結果, 骨髄内血流量は, 懸垂 5 日目から低下しており, 14 日目まで継続して低下し続けていた。骨髄内血流量が低下すれば, 骨髄腔から皮質骨外への液流である IFF が低下すると推察される。したがって, 尾部懸垂ラットにおいては, 尾部懸垂による荷重の軽減が骨量の低下に一次的に作用しているのではなく, 骨髄内血流量低下が骨細胞に対する刺激となり, その結果骨量低下に影響を及ぼしている可能性が示唆され

た。

骨髄内血流量と同様に, 対照群に対して早期から有意な差が認められたパラメーター群は, 主に骨吸収関連のパラメーターであった。これに対して, 骨形成のパラメーターは主に懸垂開始後 1 週間以上を経てから増加を開始するため, 骨髄内血流との関連は認められないと考えられた。そこで, 骨髄内血流により生じる骨部でのシグナルは, 主に骨吸収メカニズムに対して信号が送られており, 骨形成に対する反応は二次的なものであることが考察される。

3. エルカトニン投与による骨髄内血流の変化およびその骨量に対する影響について

エルカトニンには, 緒言で述べたとおり一部の組織血流量を上げる効果の報告がある一方, 尾部懸垂ラットに対しての 2 週間後における骨量増加の報告もあり¹⁵⁾, 骨髄内血流が増加し, これによる骨量の増加の可能性も考えられたため, われわれはエルカトニン投与を行った尾部懸垂ラットの脛骨骨髄内血流を計測した。その結果, 下肢骨髄内血流は対照群に比して高容量投与群で有意に増加していた。エルカトニンの尾部懸垂ラットにおける骨量低下抑制の作用機序は破骨細胞への強力な直接関与による骨吸収抑制であるとされており, 我々の研究により示された, エルカトニンの尾部懸垂ラットにおける下肢骨髄内血流の低下抑制がその骨吸収抑制にどの程度関与しているかは明らかではない。しかし, この結果により, エルカトニンが尾部懸垂ラットの骨吸収抑制に対して「間接的」に幾ばくか効果を及ぼしている可能性が考えられ, 力学的負荷の減少による骨萎縮に有用である可能性が示唆された。

ま と め

尾部懸垂ラットにおいて, 脛骨近位部の骨髄内血流の懸垂期間に相関した低下が認められた。この変化は, 主に骨吸収を表すパラメーターの変化と時期的に一致して低下しており, 骨吸収に対する影響が示唆された。

また, エルカトニンを投与したラットでは, 尾部懸垂による血流量低下が防がれ, エルカトニン投与は, 力学的負荷減少による骨萎縮治療に有用である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 終始御指導, 御校閲を賜った恩師生田義和教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始御支援, 御指導下さいました望月由助手に深く感謝い

たします。さらにご協力いただきました整形外科教室の皆様へ深く感謝いたします。

なお、本論文の一部は第15回日本整形外科学会基礎学術集会、第20回日本骨形態計測学会、2nd International Workshop on Musculoskeletal Interactions において発表した。

参 考 文 献

1. **Akamine, T., Jee, W. S. S., Ke, H. Z., Li, X. J. and Lin, B. Y.** 1992. Prostaglandin E2 prevents bone loss and adds extra bone to immobilized distal femoral metaphysis in female rats. *Bone* 13 : 11-22.
2. **Aukland, K., Bower, B. F. and Berliner, R. W.** 1964. Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Cir. Res.* 14 : 164-187.
3. **Bassertt, C. A. L. and Becker, R. O.** 1962. Generation of electric potentials in bone in response to mechanical stress. *Science (Wash DC)* 137 : 1063-1064.
4. **Bergula, A. P., Huang, W. and Frangos, J. A.** 1999. Femoral vein ligation increases bone mass in the hindlimb suspended rat. *Bone* 24 : 171-177.
5. **Berndt, T. J. and Knox, F. G.** 1984. Proximal tubule site of inhibition of phosphate reabsorption by calcitonin. *Am. J. Physiol.* 246 : F927-F930.
6. **Bourrin, S., Palle, S., Genty, C. and Alexandre, C.** 1995. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. *J. Bone Miner. Res.* 10 : 820-828.
7. **Braga, P. C.** 1994. Calcitonin and its antinociceptive activity: animal and human investigations 1975-1992. *Agents Actions* 41 : 121-131.
8. **Carney, S. L.** 1995. Acute effect of endogenous calcitonin on rat renal function. *Miner. Electrolyte Metab.* 21 : 411-416.
9. **Feldkemp, L. A., Goldstein, S. A., Parfitt, A. M., Jesion, G. and Kleerekoper, M.** 1989. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vivo by computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 4 : 3-11.
10. **Globus, R. K., Bikle, D. D. and Morey-Holton, E.** 1986. The temporal response of bone to unloading. *Endocrinology* 118 : 733-742.
11. **Globus, R. K., Bikle, D. D. and Morey-Holton, E.** 1984. Effects of simulated weightlessness on bone mineral metabolism. *Endocrinology* 114 : 2264-2270.
12. **Hahn, M., Vogel, M., Pompesius-Kempa, M. and Dellling, G.** 1992. Trabecular Bone Pattern Factor-A New Parameter for Simple Quantification of Bone Microarchitecture. *Bone* 13 : 327-330.
13. **Hesch, R. D., Hüner, M., Hasenhager, B. and Creutzfeldt, W.** 1971. Inhibition of gastric secretion by calcitonin in man. *Horm. Metab. Res.* 3 : 140-141.
14. **Johnson, D. L., McAllister, T. N. and Frangos, J. A.** 1996. Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts. *Am. J. Physiol.* 271 : E205-E208.
15. **Kastern, T. P., Collin-Osdoby, P., Patel, N., Osdoby, P., Krukowski, M., Misko, T. P., Settle, S. L., Currie, M. G. and Nickols, G. A.** 1994. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 3569-3573.
16. **Kelly, P. J. and Bronk, J. T.** 1990. Venous pressure and bone formation. *Microvasc. Res.* 39 : 364-375.
17. **Kempson, S. A., Lotscher, M., Kaissling, B., Biber, J., Murer, H. and Levi, M.** 1996. Parathyroid hormone action on phosphate transport mRNA and protein in rat renal proximal tubules. *Am. J. Physiol.* 268 : F784-F791.
18. **Kodama, Y., Nakayama, K., Fuse, H., Fukumoto, S., Kawahara, H., Takahashi, T., Kurosawa, T., Sekiguchi, C., Nakamura, T. and Matsumoto, T.** 1997. Inhibition of Bone Resorption by Pamidronate Cannot Restore Normal Gain in Cortical Bone Mass and Strength in Tail-suspended Rapidly Growing Rats. *J. Bone Miner. Res.* 12 : 1058-1067.
19. **Kohbu, Y., Takemasa, S., Shimada, T., Ishikawa, H., Yamaguchi, M. and Kita, K.** 1993. Effects of Heat on Intraosseous Blood Flow. *Bulletin Allied Med. Sci. Kobe* 9 : 99-103.
20. 紺野慎一, 菊池臣一, 佐藤勝彦, 渡辺栄一. 1991. 脊柱起立筋の筋内圧と筋血流量に関する実験的研究. *日整会誌* 65 : S1393.
21. 三田富士雄, 佐藤悠吉, 須永 明, 深沢孝夫, 大井淑雄. 1988. 馬尾神経血行動態に関する薬理学的検討. *日整会誌* 62 : S1087.
22. **Montgomery, R. J., Sutker, B. D., Bronk, J. T., Smith, S. R. and Kelly, P. J.** 1988. Interstitial fluid flow in cortical bone. *Microvasc. Res.* 35 : 295-307.
23. **Morey, E. R. and Baylink, D. J.** 1978. Inhibition of bone formation during space flight. *Science* 201 : 1138-1141.
24. **Otani, M., Kitazawa, S., Yamauchi, H., Meguro, T. and Orimo, H.** 1978. Stability and the biological activity of eel calcitonin in rats. *Horm. Metab. Res.* 10 : 252-256.
25. **Piekarski, K. and Munro, M.** 1977. Transport mechanism operating between blood supply and

- osteocytes in long bones. *Nature* **269** : 80–82.
26. **Reich, K. M., Gay, C. V. and Frangos, J. A.** 1990. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J. Cell Physiol.* **143** : 100–104.
27. **Reich, K. M. and Frangos, J. A.** 1991. Effect of flow on prostaglandin E2 And inositol trisphosphate levels in osteoblasts. *Am. J. Physiol.* **261** : C428–C432.
28. **Reich, K. M. and Frangos, J. A.** 1993. Protein kinase C mediates flow-induced prostaglandin E2 production in osteoblasts. *Calcif. Tissue Int.* **52** : 62–66.
29. **Revell, W. J. and Brookes, M.** 1994. Haematodynamic changes in the rat femur and tibia following femoral vein ligation. *J. Anat.* **184** : 625–633.
30. 鈴木はる江, 神田健郎, 佐藤優子, 佐藤昭夫, 林泰史. 1994. 運動低下は大腿骨のカルシウム含有量, 血流量および後肢筋重量を低下させる. *自律神経* **31** : 698–704.
31. 鶴澤豊暢, 高尾亮子, 堀 正幸. 1998. 尾部懸垂ラットの骨に対するエルカトニンおよび hPTH (1-34) の効果. *日本骨代謝学会誌* **16** : 210.
32. **Warsawsky, H., Goltzman, D., Rouleau, M. F. and Bergeron, J. J.** 1980. Direct in vivo demonstration by radioautography of specific binding sites for calcitonin in skeletal and renal tissues of the rat. *J. Cell Biol.* **85** : 682–694.
33. **Whiteside, L. A., Lesker, P. A. and Simmons, D. J.** 1979. Measurement of regional bone blood flow in areas with differing osteoblastic activity in the rabbit tibia. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **124** : 267–270.

Experimental Study about Intraosseous Blood Flow and Bone Volume in Tail-suspended Rat Model

Masakazu NAKAMASU

Department of Orthopedic Surgery, Hiroshima University School of Medicine

(Director: Prof. Yoshikazu IKUTA)

We measured intraosseous blood flow of proximal tibia with the hydrogen washout technique, after that, we excised the opposite side tibia for measuring the BMD with DXA, and morphologic parameters with micro-CT, and histological morphologic parameters. And we measured the same way in the Elcatonin-administrated tail-suspended rats.

Our conclusions are:

- 1) The intraosseous blood flow in the tail-suspended rat was statistically lower than the control rat even the 5-day suspension group.
- 2) Increase of the absorption parameter was observed in the early phase of the tail-suspension, but there is no statistically relationships between the blood flow and the morphological parameters without MIL.
- 3) Elcatonin administration made intraosseous blood flow increase in the tail-suspended rat.
- 4) Intraosseous blood flow may give the influence bone remodeling by restraint of the bone absorption, and increase of the intraosseous blood flow when Elcatonin was administrated may reduce the lower-ness of the bone volume by restraint of the bone absorption.