

# Radioactive Calcium に依る仮骨石灰代謝に関する実験的研究

京都大学医学部整形外科科学教室 (近藤鋭矢教授 指導)

吉峰泰夫・大石 宏・荻原一輝

〔原稿受付昭和29年6月10日〕

## THE EXPERIMENTAL STUDY OF FRACTUR HEALING USING RADIOISOTOPE $\text{Ca}^{45}$

by

YASUO YOSHIMINE・HIROSHI ŌISHI and KAZUTERU OGIHARA

From the Orthopedic Division, Kyoto University medical School

(Director: Prof. Dr. EISHI, KONDO)

Using radioactive calcium, the authors studied Ca-metabolism in fracture healing. The results obtained in our experiments were as follows ;

- 1) Ca-deposit in the callous tissues increased gradually, and was greater in amount than the calcium of decalcification.
- 2) Calcification in callous tissues began on the 3rd day after the fracture, starting at a distance from the fracture ends, and was completed on the 21st day, even in cases of rapid calcification.
- 3) Calcium-containing tissues were found to be stainable with eosin-solusion in decalcified specimens of bone therefore may be that certain changes in intercellular substances are closely related with the mechanism causing calcification.

### 目

### 次

- 第1章 緒 言
- 第2章 実験方法
- 第3章 実験成績

- 第4章 総括並びに考按
- 第5章 結 論

## 第1章 緒 言

骨折時に於ける仮骨の発生に関する研究は、de Heyde 以来枚挙に暇なく、その石灰化に関する検索も、又極めて多数ある。併し、今日尚骨機転の詳細に就いては幾多の疑義あることも否定し得ない。

この問題の解明が特に困難である理由は、

1) 仮骨、特に骨性仮骨は、薄片作製が困難なる為、顕微鏡的観察を行うに不便なる点の多かつたこと。

2) 従来の組織学的研究は専ら脱灰標本に就いて行われて居り、石灰塩の存在の下に、直接之を観察し得なかつたこと。

3) 石灰塩を対象とした生化学的研究では、多くは

静止状態に於ける量的把握を見るに止まり、組織化学的な動的追究が困難であつたこと。

等が挙げられる。

吾々は最近 Radioactive Calcium,  $\text{Ca}^{45}$  を追跡子とし、Geiger-Müller 管に依る  $\beta$  線の計測、並びに Radioautography を主軸として、仮骨石灰代謝の動的推移を追究し、聊か知見を得たので茲に報告する。

## 第2章 実験方法

体重2kg 前後の成熟家兎を用い、右第4中足骨、左第4中足骨、右第4中手骨、左第4中手骨に、夫々7日目毎に、徒手を以て皮下骨折を加え、直ちに整復、後無固定に放置し、1部は最終骨折後3日目に、他は7日目に屠殺した。

この間、7日目毎に、局所のレ線撮影を行い、転位及び仮骨の発生状態を追突した。

これを2群に分ち、第1群に於いては、屠殺24時間前に、 $\text{Ca}^{45}$  60 $\mu\text{c}$ . を注射し、第2群に於いては、 $\text{Ca}^{45}$  夫々 5, 10, 20 $\mu\text{c}$ . を、初回骨折直後より連日、何れも耳静脈内に注射した。

使用せる  $\text{Ca}^{45}$  は、米国原子力委員会の好意により輸入され、化学的には  $\text{CaCl}_2$  の無機塩であり、これを生理的食塩水にて適宜稀釈し、20 $\mu\text{c}$ . per cc. (使用時推定) の含有液とし、滅菌消毒して用いた。

供試動物は、心臓穿刺に依り瀉血死に至らしめ、骨折部を中心に仮骨を含めて中手又は中足骨を摘出し、これを骨膜刀を以て、矢状面に一致して縦断半切し、その半分を10%中性ホルマリン固定、他部は秤量後、湿式灰化法により灰化、修酸カルシウムとなし Geiger-Müller 管にて $\beta$ 線計測を行つた (管と試料の距離 25mm, マイカ 2.9mg/cm<sup>2</sup> 最適動作電圧 1250~1210kv)。

ホルマリン固定せる組織は、著者等の改良せる Contact method により Radioautography を行うため、脱灰せず、脱水後、パラフィン包埋、片面研磨、富士レントゲンフィルムに40時間露出、富士レンドール 20°C にて4分間現像、定着は酸性ハイポにて行つた。

この試料は、更に、レントゲン単純撮影後パラフィン除去、一部は著者等の発表せる方法にて研磨薄片とし、エオジン単染色を施し、一部は Richman 氏電気脱灰法、5%硫酸ソーダ中和、型の如くフエロイジン包埋後、15~20 $\mu$ . の切片とし、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行つた。

### 第3章 実験成績

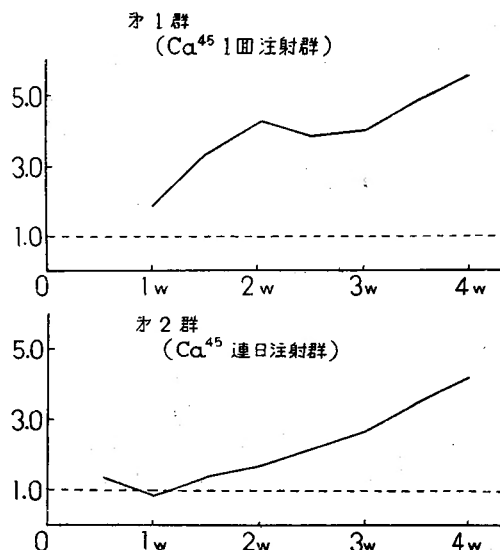
従来報告と重複する所は、すべて之れを省略し、吾々の目的である仮骨組織の石灰採取状況、及びその代謝に就いて、重点的に記載するに止める。

#### 1) Geiger-Müller 管による計測成績

試料の $\beta$ 線計測値の真価 (net counts) より Specific Activity を求め、これを夫々健側との比に於いて示した。第1表はその平均値の曲線である。

即ち、本実験の観察期間内では、第1群に見られる如く、骨折後、時を経るに従い、カルシウム摂取能力の漸増が見られた。一方、第2群に示す如く、沈着は脱出よりも著明で、正出納を示し、その値も漸次増加した。

第1表 Specific Activity の比 患/健



#### 2) Radioautographs による観察成績 (附図1)

3日目にして、骨折端よりやや隔つた外骨膜に沈着の著明なるを認める。7日目、及び10日目には、その所見は漸次著明となり、且つ内骨膜性の石灰沈着も認める。

14日目に至るも、尙両骨端間には石灰沈着せる組織による連絡なく、17日目に至り、沈着は進展し、仮骨両端間より外層を経て、両外骨膜を連絡するに至る。又、骨折端に近い骨髄部にも沈着の漸増を認める (内骨膜性仮骨の石灰沈着)。

転位度の小なる場合は、21日目に仮骨の略全般に石灰沈着を示すが、一般には未だ上記17日目の所見に似する。

24日以後、沈着は日を追つて著明となり、その進行は、一般に外骨膜より紡錘形に進み仮骨外層部より、或は骨折端間よりの骨梁新生による連絡が見られる。

転位度の大なる場合には、28日目に至るも、尙石灰沈着せる組織にて連絡されない。

#### 3) 脱灰標本に於けるヘマトキシリン・エオジン重染色、及び未脱灰標本に於けるエオジン単染色の所見 (附図2)

前述の如く石灰沈着に関する所見に止め、主として Radioautograph との比較に於いて記載する。

骨折後3日目に於ける脱灰標本に於いては、骨折端は略々仮骨によつて結合される。即ち骨折端間は主と

して軟骨性仮骨により、その外層には結合繊維性仮骨を認める。骨皮質は骨折端附近に於て壊死に陥り、細胞核も少なくなっているが、これよりやゝ隔つて健康皮質に移行する部の外骨膜には既に骨梁組織の発生を認め、この部には  $\text{Ca}^{45}$  の沈着は著明となる。又骨折端部附近の軟骨組織はその基質部の好エオチン性を認め、この部に内骨膜性石灰沈着が見られる。

一般に転位の大なる場合には、軟骨性仮骨の発生は極めて著明である。石灰沈着は前節に述べた如く、骨折端よりやゝ隔つた外骨膜より紡錘形に進むが、この部は組織学的にはすでに新生骨梁を形成し、骨梁間には原始骨髄の発生を認める。

新生骨梁に接する軟骨組織の基質は、エオジン嗜好性を示して淡紅色に見られ、漸次淡くなつて、通常の軟骨組織に移行している。斯くの如き基質に於けるエオジン嗜好性の変化は、この外、骨皮質、或いは仮骨外層の骨板に接し、又時にはこれらと全く離れて島嶼状に存在する。斯かる組織中の軟骨細胞は泡化し、核も漸次ヘマトキシリンに淡染している。この部分には又、骨形成細胞を周囲に伴つた血管の侵入が見られる。

この様な基質のエオジン嗜好性を主とした一連の変化を示す組織には、Radioautograph の所見と照合すると、その殆んどに石灰沈着を認める。

又、骨折端部の骨髄からも内骨膜性の骨梁形成を認め、時間の経過と共に、互に骨折端を連絡するに至るが、この部にも  $\text{Ca}^{45}$  の沈着は著明に現れている。

未脱灰標本に於いては仮骨全般にエオジンに濃染しているが、石灰沈着部は帯黄褐色に、然らざる部位は淡紅色を示し、その染色性に变化の傾向を認める。尚、骨皮質部は、殆んど染色されず、無色、やゝ光沢を帯びている。

#### 第4章 総括並びに考按

緒論に述べた如く、骨折時仮骨の発生、特にその石灰化に就いては、従来多数の報告があるに拘らず、今日尚、首肯するに足る定説がない。

従来の研究は主として脱灰標本に就いて行われたとは云え、組織内カルシウムを他の物質と置換して証明する方法が種々試みられて居り、(Duchamel, V. Kossa, 岡田 等) この間にあつて Radioisotope の利用による代謝の究明、或は、その分布状態に関する観察は、高く評価し得るものと思われる。

Radioisotope による骨折の研究、特にその代謝に関する生化学的研究は、既に当初より注目され、Bohr等(1950)を始め、本邦文献中にも散見する所であるが、Radioautography による組織化学的研究は、現在尙正常骨成長に関する数種の報告に接するに過ぎず、骨折その他の病的状態の研究に利用されて居るものは極めて少い。

吾々は斯かる観点から、第一に、骨折後の仮骨内石灰代謝の推移を追究し、更に、石灰塩摂取可能な組織分布に関して観察を行つた。

第1群に於いては、骨折後の各期に静注された  $\text{Ca}^{45}$  は如何なる組織に摂取されるかを観察したものであり、Geiger-Müller 管に依る成績が示す如く、経時的に摂取能の増加を見ることは、Radioautography の所見に於いて  $\text{Ca}^{45}$  摂取の組織は漸次拡大し仮骨全般に及ぶことを考えると、この摂取能の増加は、主としてこの  $\text{Ca}^{45}$  摂取可能な組織の拡大を示すものと考えられる。

第2群に於いては、 $\text{Ca}^{45}$  の連日注射により一旦沈着せる後の脱出を含めた動的代謝を観察したものであり、沈着は脱出よりも明らかに多く、正出納を示して漸増し、斯かる消長は骨折部に於ける石灰代謝の実相を、より明らかに示したものと考えられる。

仮骨内石灰沈着の開始に就いては従来諸家の報告があるが(岩 その他) 吾々も Radioautograph の所見より、少くも3日目に骨折端よりやゝ隔つた部位に、外骨膜性石灰沈着を認めた。

仮骨石灰化の完成に就いては、転位度の多少に依り、時期的に多少の変化を示す事は周知の如くであるが、転位の少い場合には21日目にしてそれを来たすことを認めた。

更に、組織学的追究により、石灰沈着せる軟骨性仮骨部には、基質の染色性の変化、及び之れに伴ふ軟骨細胞の変化、骨形成細胞と共に血管の侵入等の一連の組織像を認め、このことが脱灰標本に於けるエオジン嗜好性の変化と共に、未脱灰標本に於いても、その染色性の変化を見る事は興味深い事実である。石灰沈着部に於けるエオジン淡染性に就いては、従来文献にも記載を見るが、吾々はそれが基質に於ける変化であることに注目し、このことは仮骨石灰化の機転に何等かの関連性を有するものと考えらる。

#### 第5章 結 論

Radioautograph

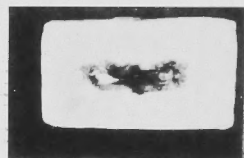
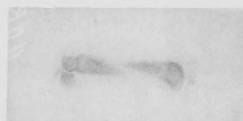
レ 線 像

普 通 寫 眞

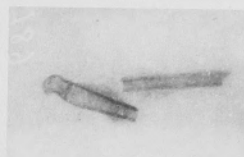
3日 目



10日 目



17日 目



21日 目



24日 目  
( 転 位 小 )



24日 目  
( 転 位 大 )



28日 目

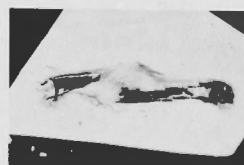




Fig. 1

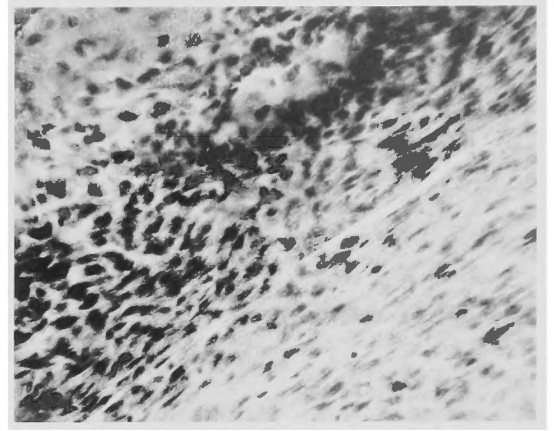


Fig. 2

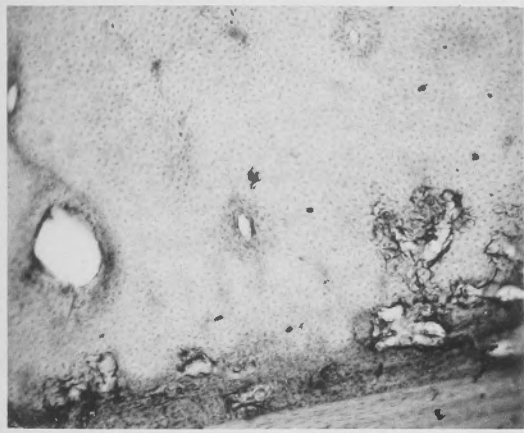


Fig. 3

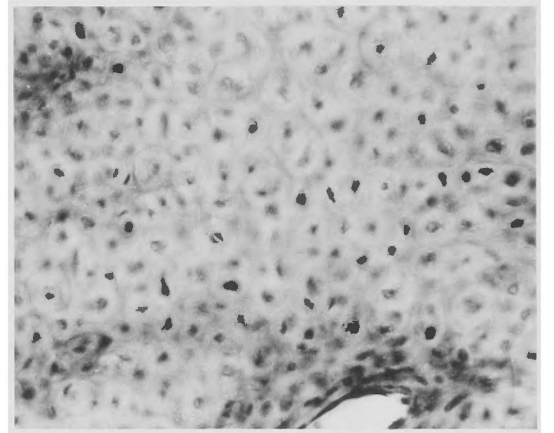


Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6

放射性カルシウムを追跡子として、仮骨石灰代謝の推移を実験的に追究し、次の結果を得た。

1) 静脈内に注射された  $\text{Ca}^{45}$  の仮骨に於ける代謝は、観察期間内に於いて、正出納を示し、且つ漸増の傾向が見られる。

2) 仮骨内石灰沈着は、3日目から、骨折端よりやや隔つた部位に開始され、早やければ21日にして略々全般に互つて石灰沈着を見る。

3) 石灰化せる組織は、脱灰及び未脱灰標本にて、基質のエオジン嗜好性の変化を認める。この事は、基質に於ける何らかの変化が、石灰沈着と関連性を有するものと考えられる。

稿を終るにあたり御指導並びに御校閲を賜つた恩師近藤鋭矢教授に深謝し、終始御教示下された山田憲吾助教授に厚く感謝致します。

尙本論文の要旨は昭和29年京都外科集談会 4 月例会、昭和29年 5 月第27回日本整形外科学会総会にて発表した。

#### 附 図 説 明

附図 1 (第 3 章第 2 節参照)

Contact method による Radioautographs (実物大)

附図 2 (第 3 章第 3 節参照)

**Fig. 1** 結合織性仮骨 (骨折後14日目、脱灰後ヘマトキシリン・エオジン重染色) 80×

**Fig. 2** 同 上 320×

**Fig. 3** 軟骨性仮骨 (骨折後24日目、脱灰後ヘマトキシリン・エオジン重染色) 80×

**Fig. 4** 同 上 320×

**Fig. 5** 未脱灰標本の仮骨 (骨折後10日目、エオジン単染色) 80×

**Fig. 6** 同 上 (骨折後24日目、エオジン単染色) 80×

#### 主 要 文 献

- 1) 加藤喜久男：日外誌，**30**, 998, 1930. 2) 堀内千刃：日外誌，**25**, 511, 1925. 3) 藤木廣：日外誌，**23**, 441, 1923. 4) 大野信一：日本外科室函，**6**, 1111, 1929. **7**, 329, 1930. **7** 附. 115, 1930. **7** 附. 147, 1930. 5) 慎正男：日外誌，**30**, 345, 1930. 6) 山根孝行：日整外誌，**6**, 387, 1932. 7) Meltzer, H. and E. Diffenbach., Arch. Klin. Chir.: **195**, 18, 1930. 8) Logan, Physiol. Rev.: **20**, 522, 1940. 9) Laude, p.p., James, R. G. and Boyd, J. D.: Anat. Rec., **104**, 11, 1949. 10) Reider, F., et al. Anat. Rec.: **104**, 319, 1949. 11) 米澤猛 他：京府醫大誌，**49**, 291, 1951. 12) Bohr, H. and Sorensen, A.H.: J. Bone and Joint Surg., **32**, 567, 1950. 13) 岩喬：日整外誌，**26**, 89, 1952. 14) 吉川春壽：整形外科，**3**, 53, 1953. 15) 玉井達二：整形外科，**3**, 103, 1953. 16) 吉峯泰夫：日本外科室函，**23**, 4, 360, 1954.