

## 坐骨神経切除によるラット脛骨骨幹端の骨梁構造変化並びに骨格筋の萎縮

田 卷 弘 之<sup>1)</sup> 我 妻 玲<sup>1)</sup> 春 日 規 克<sup>2)</sup> 竹 倉 宏 明<sup>1)</sup>

## ALTERATIONS OF TRABECULAR BONE ARCHITECTURE IN THE PROXIMAL TIBIA AND MUSCLE ATROPHY AFTER SCIATIC DENERVATION IN RATS

HIROYUKI TAMAKI, AKIRA WAGATSUMA, NORIKATSU KASUGA and HIROAKI TAKEKURA

## Abstract

Disused rat hindlimb caused by sciatic neurectomy is characterized by skeletal muscle atrophy and bone loss accompanying alterations in trabecular bone architecture. We studied the time course responses of the two-dimensional architecture of trabecular bone and the relationships between bone loss and muscle atrophy using a unilateral sciatic nerve denervation model of disuse atrophy.

Fischer-344 male rats aged 11 weeks were denervated. The right and left tibiae, soleus and extensor digitorum longus muscle of denervated and control rats were obtained at 1, 3, 7, 10 days and 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 weeks after surgery. Histomorphometric analyses were performed on longitudinal sections of proximal tibial metaphyseal secondary spongiosa.

Marked trabecular bone loss and muscle weight loss were observed mainly at 7~10 days and 1~3 days after denervation, respectively. Time courses of the percent decrease in trabecular width and length from 0 day (i. e., thinning rate ; TR and fragmentation rate ; FR) were not matched at 7~10 days and 5~6 weeks after denervation. The scatterplot for TR : FR showed that the FR changed stepwise with the first threshold between 12~25% of TR.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2004, 53 : 403~410)

**key word** : trabecular bone, sciatic neurectomy, muscle atrophy, histomorphometry

## I. 目 的

除神経による体肢の不使用は骨格筋の萎縮を生じさせると同時に骨量を劇的に低下させ、骨梁構造の崩壊へと導く<sup>1~4)</sup>。骨強度は骨の量、質、構造の3つの要因に規定されており、骨梁構造はそれに影響する一要因である<sup>5,6)</sup>。不使用としたラット脛骨は骨形成の低下と骨吸収の増加による骨量低下を示すことが報告されている<sup>3,7,8)</sup>。不動化による力学的因子の低下及び卵巣摘出などによる内分泌性因子の減少にともなう海綿骨における骨量低下過程は、骨梁骨の狭小化や断片化を呈する所見が観察されている<sup>9)</sup>。骨梁骨の断片化は力学的に有効な縦横構造を乱し、力学的刺激の伝

達低下した部分では骨梁の消失が顕著であるともいわれる<sup>9)</sup>。薬剤や運動刺激によって骨形成機能を促進させた場合、皮質骨や骨梁骨幅の増大による骨量増加並びに石灰化は改善する。しかしながら、一旦断片化した骨梁間の再連結は起こりにくいものと推察されており<sup>10,11)</sup>、一過性の傷害などによる廃用性骨萎縮からの骨量回復後にも、完全な骨梁構造の回復は困難であると推察される。これまで不動化による骨梁骨幅や骨梁数の減少など各種骨組織形態計測からの報告がみられるが<sup>1~4)</sup>、狭小化と断片化の進行程度や両者の相関関係については明らかではない。

また、筋の収縮は骨格運動を可能にし、身体運動を介して骨に適度な力学的負荷を与え、骨量の

<sup>1)</sup> 鹿屋体育大学・スポーツパフォーマンス系 *National Institute of Fitness and Sports*

〒891-2393 鹿児島県鹿屋市白水町1番地

<sup>2)</sup> 愛知教育大学・保健体育講座*Aichi University of Education*

〒448-8542 愛知県刈谷市井ヶ谷町広沢1

保持増大に正の影響を及ぼす。また一方で、不活動な状態にすると骨量も筋重量も同様に低下する<sup>8)</sup>。骨とそれに付着する骨格筋とは力学的負荷を介して機能的に密接な関係にある。さらに、組織間においても廃用性萎縮や活動性肥大の進行程度に時間的ずれが存在すると、筋収縮力と骨の機械的強度とは平行に変化せず、その比も経時的に異なってくる。このずれはギプス固定などの一過性の不活動状態からの回復過程などにおいても、考慮されるに値するものと考えられる。

そこで本研究では、坐骨神経を切除したラット脛骨について量的構造的に分析を行い、1) 身体運動により骨に力学的刺激を与える因子である骨格筋との萎縮進行程度について、経時的变化を観察し、2) 骨梁構造の崩壊過程において、骨梁骨の狭小化と断片化の進行程度に量的時間的ずれが存在するかを検討した。

## II. 実験方法

実験動物には、4週齢より室温 $23 \pm 2$ ℃、湿度 $55 \pm 5$ %、照明を12時間の明暗サイクルで制御した環境下にて飼育したFischer 344系雄性ラット(体重210~270g)54匹を用いた。11週齢時にペントバルビタール(50mg/kg)麻酔下において、左大腿骨大転子後部を切開し、坐骨神経を4~5mm切断した。その後縫合糸で切開部を縫合し、通常飼育にもどした<sup>12)</sup>。除神経後1, 3, 7, 10日後、および2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10週目に除神経側(DN)及びその対側肢(CL)ならびに偽処置群(SC)の脛骨を採取して分析に供し、経時的变化を検討した。採取した脛骨は組織化学的分析の前に計測最小単位0.01mmのノギスにて長軸骨長を3回計測し、その中央値もしくは2回重複値をデータとした<sup>13,14)</sup>。また同時にヒラメ筋(SOL)並びに長趾伸筋(EDL)を採取して、筋湿重量を計測した。

本実験は日本生理学会により規定された「生理学領域における動物実験に関する基本指針」および「鹿屋体育大学動物実験指針」を遵守して行った。

実験動物は麻酔下で腹大動脈より固定液(1%

グルタルアルデヒド, 1%パラフォルムアルデヒド及び0.05%塩化カルシウムを0.1mol/Lリン酸緩衝液に溶解し、pH7.4に調整)を注入し、灌流固定を室温にて約30分間行った。次に、採取した脛骨の近位部を正中断してさらに約90分間同固定液中に浸漬した<sup>15)</sup>。その後各サンプルは0.1mol/L・EDTA(エチレンジアミン四酢酸を0.1Mカコジル酸ナトリウム溶液に溶解しpH7.4に調整, 4℃)にて6~8週間脱灰した後、エタノール(70, 80, 90, 95, 100%)で脱水しパラフィン包埋を行った。包埋試料は滑走ミクロームを用い5μmに縦断薄切し、脱パラフィンの後にヘマトキシリン-エオシン(H-E)染色、アザン染色を施した。破骨細胞を観察するため、切片は酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)にて、37℃で60分間インキュベーションした。基質液は、0.1M酢酸ナトリウムとバルビタールナトリウムを含むミハエリス緩衝液に0.4%ナフトールAS-BIリン酸塩並びにパラローズアニリン塩酸塩を混和して作製した。使用前にはこれを濾過してpH5.0に調整した。これに50mM L-酒石酸を加えたものを染色液とした<sup>16)</sup>。各サンプルとも90枚以上の切片を作成してそれらを分析対象とした。

染色像は光学顕微鏡(BX60, OLYMPUS)観察と同時に写真撮影を行い、また顕微鏡に設置したCCDカメラ(PDMC II/OL, Polaroid, Japan)を介してパーソナルコンピュータに画像を取り込み、画像解析ソフト(Image Pro Plus ver.4.0, Media Cybernetics)にて脛骨近位端の骨梁骨断面の微細構造解析を行った<sup>17,18)</sup>。骨量の指標として、骨梁骨面積は計測した全面積に対する骨梁骨の占める割合として算出した。また、骨梁の幅及び長さ(連続性)の経時的变化を検討するために、Mellish et al.<sup>17)</sup>の結節・支柱解析をもとにして、各骨梁断面について平均骨梁幅並びにその長軸方向の平均長を計測した。3個以上の骨梁板(strut)の結合点(結節)を持つ骨梁断面については、各結節間の距離および結節から自由端終末までの距離の長軸方向の和を計測した。なお、一次海綿骨を除外するため、成長板から1mm遠位側に離れた

1.8×2.4 mm の領域を計測範囲とした<sup>19,20</sup>。この計測領域の四方端にかかる骨梁板は計測から除外した。また、除神経後10週目までの筋湿重量と骨梁骨面積の減少率は、除神経前の値から最も減少した時点の値を100%として各々相対値で算出し、両者の変化の相関関係の検討に供した。

各データは平均値±標準偏差により表示し、平均値の差の検定においてはノンパラメトリックテストを採用した。各群の経日的変化の差(vs. basal control)を検定するために Mann-Whitny U test を行った。また2群間の差(vs. age-matched control)を検定するために Wilcoxon single-rank test を行った<sup>8</sup>。有意水準は危険率5%未満とした。

### Ⅲ. 実験結果

坐骨神経切除により EDL, SOL の筋重量は除神経後1～3日目以後から有意に( $p < 0.05$ )低下した(図1)。除神経前(basal control)に比較して、除神経後4～5週目までに SOL は75.9%, EDL は59.8%の低下を示した。その後7～10週目までは顕著な変化は観察されなかったが、最大低下率は SOL で85.2%, EDL で71.7%であった。また、

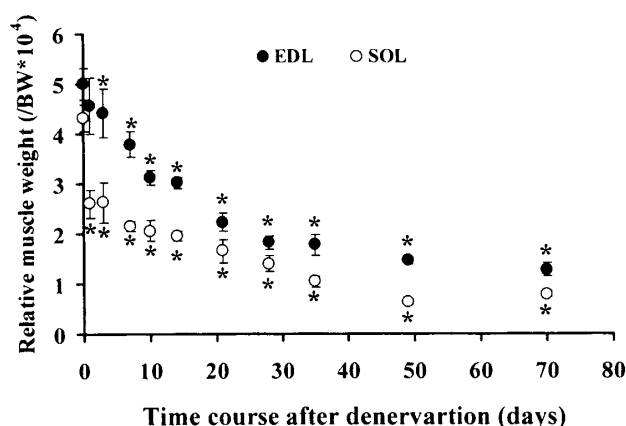


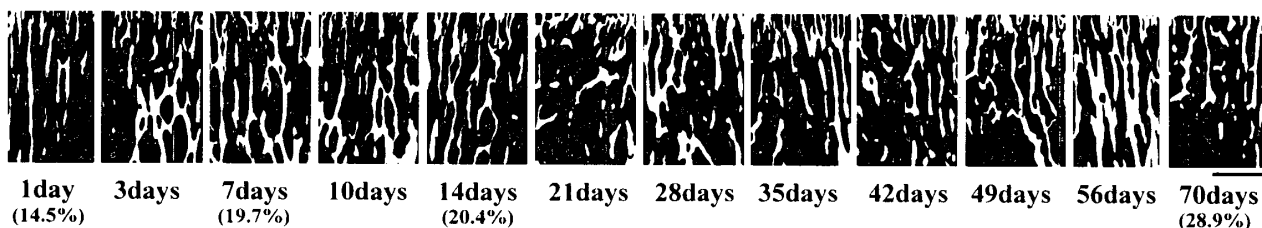
Figure 1. Time course of the relative weight (muscle weight/body weight × 10<sup>4</sup>) of SOL (open circle) and EDL (closed circle) muscles following sciatic denervation.

\*  $p < 0.05$  vs basal controls. Values are means ± SD.

脛骨骨長は DN, CL ともに実験期間(11～21週齢)に平均 33.2 mm から 40.9 mm まで増加したが、両者に有意な差は見られなかった。

脛骨近位骨幹端の二次海綿骨骨梁構造の経時的変化を図2に示した。CL 側に対し DN 側では骨梁骨が7日目以降消失し始め、長軸方向の連続性も疎となり、断片化し始める所見が観察された。また、成長板軟骨に接する近位骨幹端一次海綿骨

### Contralateral side



### Denervation side

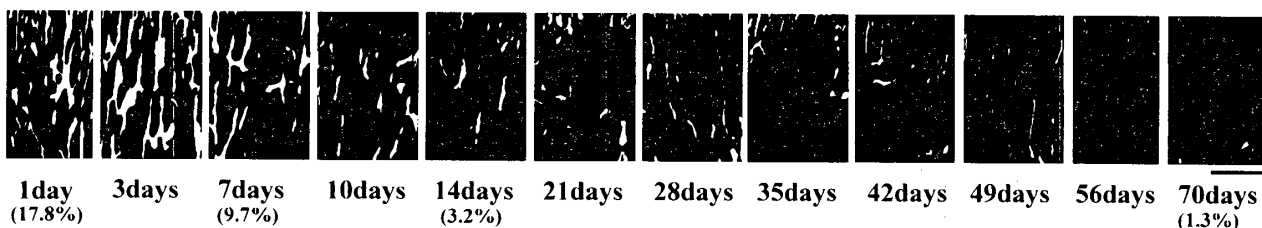


Figure 2. Lightmicrographs of proximal tibial metaphysis in the analysis area from the denervated and contralateral side. Specimens stained with Azocarmine G and Aniline blue-orange G (Azan). Black and white area showed bone marrow and trabecular bone area, respectively. Bar=1 mm.

の骨梁構造については各群とも保持されていた。

二次海綿骨骨梁骨面積は, 除神経前及び SC, CL 側と比較して, DN 側は除神経後 3 日目までは有意な変化は見られなかったが, 7 日目には有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した(図 3 A)。そして 10~14 日目までに急激に減少し, その後漸減を呈する骨

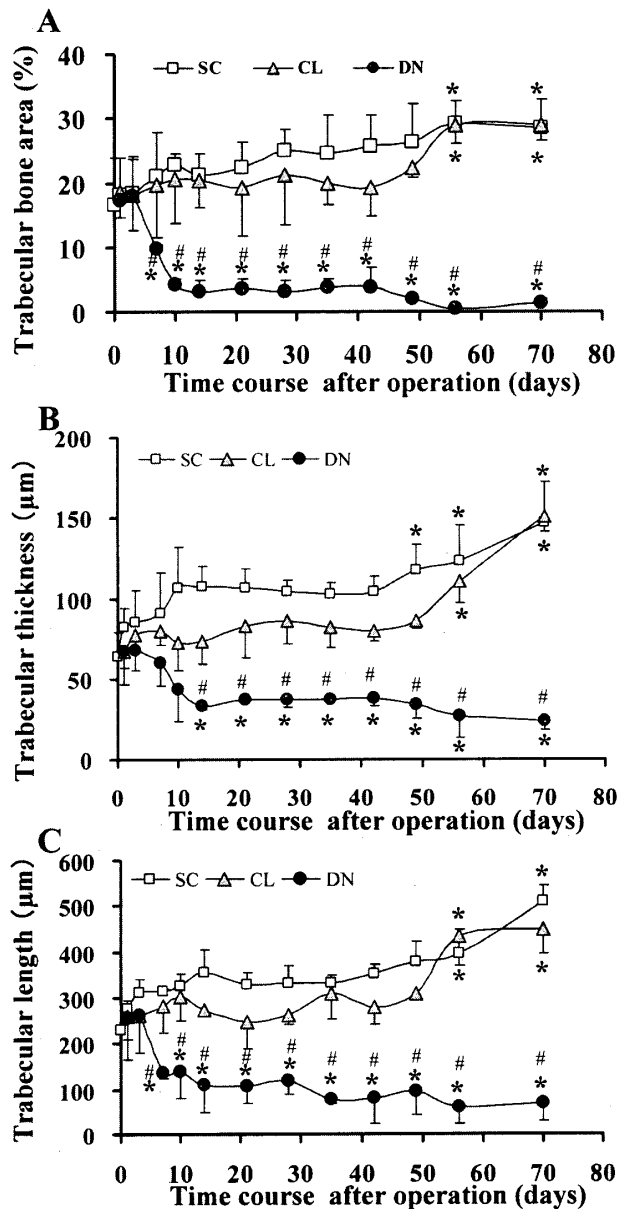


Figure 3. Time course of the trabecular bone area (%) (A), trabecular thickness (B) and trabecular length (C) in the proximal tibial metaphysis of the sham, contralateral and denervated legs. □ SC; Sham control, CL; Contralateral, ● DN; Denervation. \*  $p < 0.05$  vs basal controls. #  $p < 0.05$  vs contralateral control. Values are means  $\pm$  SD.

梁骨の消失過程が観察された。一方 SC 群は実験期間中に 57% の増加を示した。

次に除神経による骨梁骨の形態的变化の特徴について, 骨梁骨の平均幅及び長さを経時的に観察した。CL 側では除神経前と比較して除神経後 7 週目まで有意な変化は見られず, 8 週目以後増大した。一方 DN 側においては, 骨梁幅は除神経後 14 日目から, 骨梁の長さは 7 日目から有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した(図 3 B, C)。

骨梁骨の低下率及び筋重量の低下率について除神経後の日数をマッチさせて各平均値を図 4 に 2 次元プロットしたところ, 両者間にはアイデンティティラインに合致せず, 必ずしも相対的に同様な減少程度を示さなかった。骨梁骨の消失が生じる前に筋重量の減少が優位に起こり, その後傾向が逆転し, 骨梁骨の方が減少程度が優位となる段階的な変化様相を呈した。

骨梁骨の幅と長さの相対的な減少程度を経時的

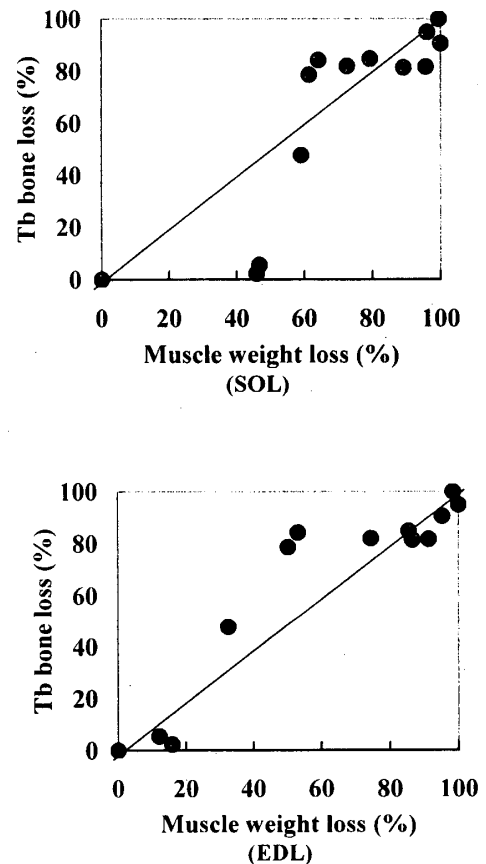


Figure 4. Relationships between trabecular bone loss (%) and muscle weight loss (%) following sciatic nerve denervation.

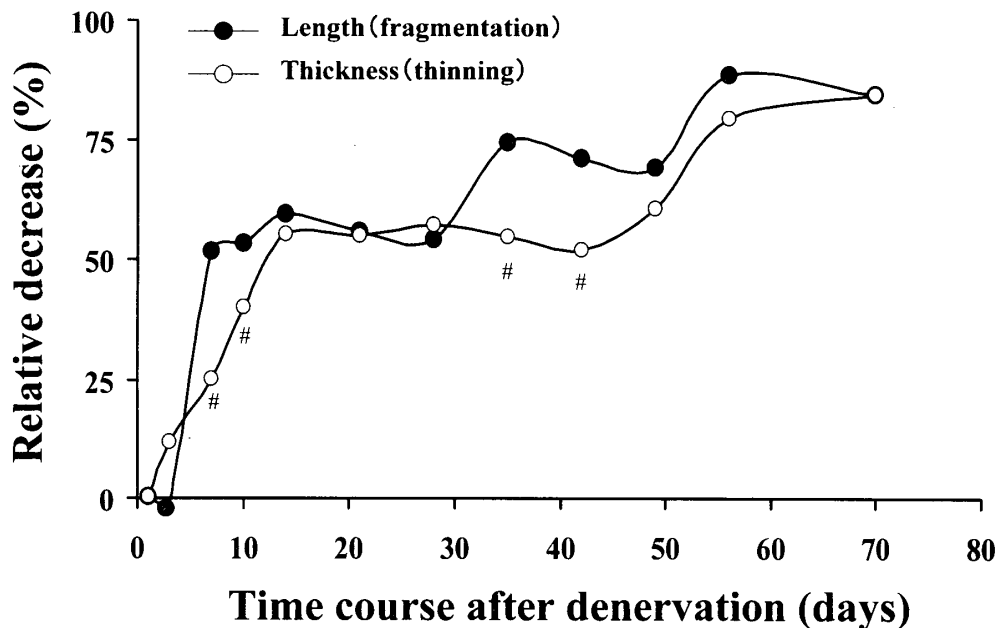


Figure 5. Time course of relative decrease in trabecular thickness (open circle) and length (closed circle) following sciatic nerve denervation. #  $p < 0.05$  vs contralateral control.

に比較検討するために、除神経前からの低下率を算出した(図5)。両者は共に除神経後の経過日数に従い段階的に減少率を増し、それらの曲線は一致せず、除神経後7、10、35及び42日目において長さにおける低下率が有意に( $p < 0.05$ )大きかった。また、骨梁骨の幅が12%減少した時点までは長さの変化はなく、幅が25%減少した時点で急激に長さが50%減少し、その後4週目まで長さは変化しなかった。

#### IV. 考 察

##### IV-A. 筋重量と脛骨骨量及び骨長の変化

除神経にともないEDL及びSOLの筋重量は最終的には70%以上減少し顕著な低下を示した。坐骨神経は主に下腿部を支配しており、筋の顕著な萎縮は、本研究で実施された坐骨神経切除による不動化が適切に行われていたことを示唆するものであった。骨量(広義)を反映する骨梁骨面積については、SCでは実験期間中に57%増加したが、DNでは90%低下した。除神経による不動化は、加齢、発育による正常な骨量の獲得を妨げるだけでなく、さらなる骨量の低下を招くことが判明した。また、本研究では除神経後1、3、7、10、

14、21、28日目と4週目まででも7点の観察時点を設定して骨量低下の経時的変化を観察した結果、除神経後7~10日に有意な低下が観察され始め、二次海綿骨に対して除神経による影響が量的に現れる時間的ずれが1~2週目の間にあることが示唆された。

脛骨骨長に関して、除神経も対照群も実験期間中に差がなく増加し、またDNの脛骨近位端一次海綿骨の骨梁骨もCL、SCと同等に保持されていることから、坐骨神経切除による不動化は、成長期ラットの脛骨の長軸方向の正常な成長を妨げないことが示唆される。脛骨長軸方向の成長率についても同様に不活動による影響はなく<sup>8)</sup>、また、ギプス固定や後肢懸垂、宇宙飛行による非加重においても長骨長軸成長率に影響がないことが報告されており<sup>21)</sup>、脛骨の長育に影響しないことが示された。力学的刺激のシグナル伝達機構のなかで、骨の長軸成長に関与する成長板軟骨細胞と、骨基質の代謝に関与する細胞すなわち骨芽細胞や破骨細胞の力学的刺激に対する反応性が異なるものと考えられる。一方、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏時には、長骨長軸成長、成長板軟骨の幅や軟骨細胞数並びに一次海綿骨骨梁骨が影響

されることも報告されている<sup>15,22)</sup>。成長期ラットの成長板軟骨細胞並びに骨長軸の伸長に対して、内分泌性因子と力学的因子の影響は異なるものと推察される。

#### IV-B. 骨-骨格筋間の萎縮進行過程

DNにおける筋重量の有意な減少は、SOLでは手術後1日目から、EDLでは3日目から観察されその反応は早かったが、骨梁骨においてはDNの影響が量的に観察されるまで1週間以上を要した。骨格筋細胞内のタンパク分解を担うライソゾーム酵素活性は除神経後24~72時間で約2倍に増加すると報告されている<sup>23)</sup>。また、Weinreb et al.<sup>17)</sup>は除神経後30~72時間後にTRAP活性が

認められる破骨細胞数の増加や破骨細胞表面の増大を報告しており、ライソゾーム酵素の反応は筋細胞と大きな差はないようである。しかしながら除神経による不活動では、骨吸収パラメータは1週目ごろから上昇し始めることが報告されており<sup>7,24)</sup>、骨においては不活動に対する細胞の反応が生じてから組織に影響を及ぼすまで時間を要すると考えられた。これらのことから、骨-骨格筋間における不活動に対する量的時間的反應性の時間的ずれが生じることが考えられた。

#### IV-C. 骨量および骨梁骨微細構造の経時的变化

本研究では図6に示した通り、除神経初期にお

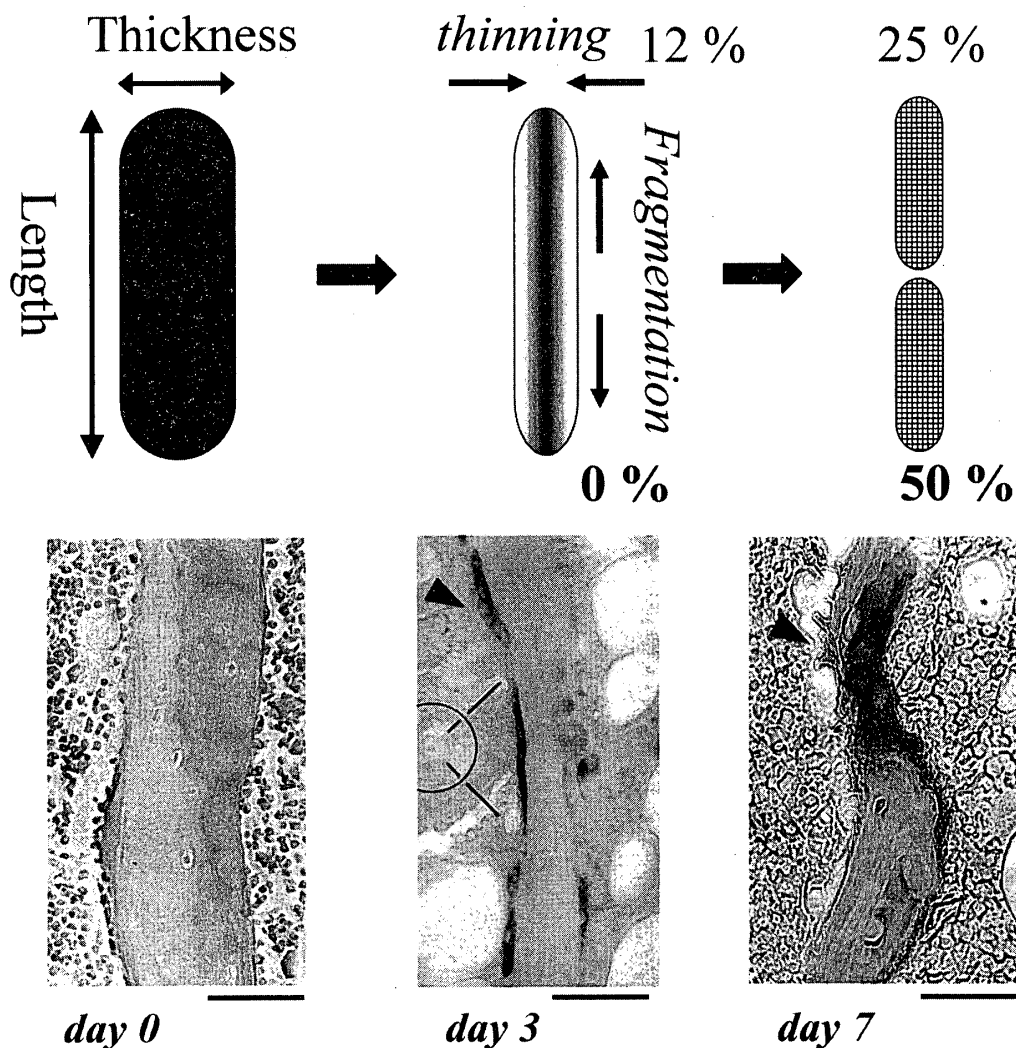


Figure 6. Schematics of trabecular architecture alterations after sciatic nerve denervation. Lightmicrographs showed the osteoclastic bone resorption process stained with TRAP. Dark area indicated the TRAP positive location (arrow head). Bar = 50  $\mu$ m.

いては骨梁骨の断片化は進行せず、狭小化の方が先行することが特徴的であった。卵巣摘除ラット初期の骨梁構造の変化を検討した研究では<sup>25)</sup>、骨梁幅よりも骨梁数の減少が顕著であり、骨梁の連続性の低下の進行程度が大きいことが報告されており、除神経の場合とは異なる。骨吸収細胞の反応性が、エストロゲン欠乏と力学的負荷低下の場合とでは異なることが予測される。卵巣摘除ラットと除神経ラットの骨梁構造を比較した報告では、卵巣摘除では骨梁骨の消失や狭小化が主にその中央部に生じるのに対し、DNでは全体に均一に生じ始めることが報告されている<sup>9)</sup>。また、正常な破骨細胞では50 $\mu$ m程度の深さで海綿骨をポケット状に吸収するが、エストロゲン欠乏初期では、200 $\mu$ m前後の骨梁幅でも断裂させることが可能であると報告されている<sup>26)</sup>。本研究で観察された除神経初期の骨梁骨に位置する破骨細胞は、全体的に瀰漫性に存在し(図6)、一領域を集中的に吸収するようなものではなかった。したがって、卵巣摘除初期では破骨細胞の著しい骨吸収の増大が骨梁骨中央部で生じることで断片化が主として進行するが、本研究で実施したような除神経初期においては骨梁骨全体を均一に吸収していき、骨梁幅がある程度減少したところで断片化が進行するのではないかと考えられた(図4, 6)。本研究では骨梁狭小化が12%進行した時点までは断片化は0%のままであり、25%狭小化が進行したときに急激に断片化が50%に達した。狭小化が12~25%の間において断片化が進行する時間的ずれが存在することが推察された。

## V. 総 括

本研究では坐骨神経の切除によって引き起こされる不活動が、脛骨骨梁骨の微細構造並びに下腿骨格筋重量に及ぼす影響を経時的に観察し、萎縮進行程度の量的時間的ずれについて検討した。坐骨神経切除(不動化)による組織レベルでの形態的变化は7~10日目頃から始まり、それ以降、骨強度にも負の影響を及ぼしているものと推察された。また、骨梁骨の吸収過程において狭小化と断片化の進行程度は段階的に進行し、縦断横断構造

の変化過程にも時間的ずれが生じるものと考えられた。さらに、骨と骨格筋の萎縮進行程度は量的時間的に一致せず、両組織間に量的時間的ずれが存在することが示唆された。

## 謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(A)(課題番号:14208005)、基盤研究(C)(課題番号:13480010)並びに鹿屋体育大学教育改善推進費(研究プロジェクト経費)によって行われた。記して謝意を表します。

(受理日 平成16年6月17日)

## 文 献

- 1) Turner R. T., & Bell N. H. The effects of immobilization on bone histomorphometry in rats. *J. Bone Miner. Res.*, (1986), **1**, 399-407.
- 2) Wronski T. J., & Morey E. R. Inhibition of cortical and trabecular bone formation in the long bones of immobilized monkeys. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, (1983), **181**, 269-276.
- 3) Wakley G. K., Baum B. L., Hannon K. S., & Turner R. T. The effects of tamoxifen on the osteopenia induced by sciatic neurotomy in the rat: A histomorphometric study. *Calcif. tissue Int.*, (1988), **43**, 383-388.
- 4) Young D. R., Niklowitz W. J., Brown R. J., & Jee W. S. Immobilization-associated osteoporosis in primates. *Bone*, (1986), **7**, 109-117.
- 5) Jensen K.S., Monsekilde L., & Monsekilde L. A model of vertebral bone architecture and its mechanical properties. *Bone*, (1990), **11**, 417-423.
- 6) Ito M., Ohki M., Hayashi K., Yamada M., Uetani M., & Nakamura T. Relationship of spinal fracture to bone density, textural, and anthropometric parameters. *Calcif. Tissue Int.*, (1997), **60**, 240-243.
- 7) Weinreb M., Rodan G. A., & Thompson D. D. Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation. *Bone*, (1989), **10**, 189-194.
- 8) Zeng, Q. Q., Jee, W. S. S., Bigornia, A. E., King Jr. J. G., D'Souza S. M., Li X. J., Ma Y. F., & Wechter W. J. Time responses of cancellous and cortical bones to sciatic neurectomy in growing rats. *Bone*, (1996), **19**, 13-21.
- 9) Yoshida S., Yamamuro T., Okumura H., & Takahashi H. Microstructural changes of osteopenic trabeculae in the rat. *Bone*, (1991), **12**, 185-194.
- 10) Bourrin S., Palle S., Genty C., & Alexandrine C. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. *J.*

- Bone Miner. Res., (1995), **10**, 820-828.
- 11) 中村利孝, 鶴上 浩, 不動化とホルモン動態. THE BONE, (1993), **7**, 87-91.
  - 12) Takekura H., Kasuga N., Kitada K., & Yoshioka T. Morphological changes in the triads and sarcoplasmic reticulum of rat slow and fast muscle fibres following denervation and immobilization. J. Muscle Res. Cell Motil., (1996), **17**, 391-400.
  - 13) 松井清明, 七川 敏次, ラットの脛骨皮質計測による骨定量法—実験骨定量の新しい試み—. 日本骨代謝学会雑誌, (1983), **1**, 96-104.  
Matsui K., & Shichikawa K. Cortical thickness measurement and bone indices of rat tibia. Jpn J. Bone Meabol., (1983), **1**, 96-104 (in Japanese)
  - 14) 七五三木 聡, 勝田 茂, 天貝 均, 大野敦也, 成長期の運動が引き起こす骨肥大. 体力科学, (1990), **39**, 181-188.  
Shimegi S., Katsuta S., Amagai H., & Ohno A. Exercise-induced bone hypertrophy in growing rats. Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med., (1990), **39**, 181-188. (in Japanese)
  - 15) Tamaki H., Akamine T., Goshi N., Kurata H., & Sakou T. Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. Bone, (1998), **23**, 147-153.
  - 16) Tanaka T., Morioka T., Ayasaka N., & Sakano A. Tartrate-resistant acid phosphatase in osteoclasts and preosteoclasts by low temperature embedding in lowicryl K4M. Acta Histochem. Cytochem., (1987), **20**, 693-697.
  - 17) Mellish R. W. E., Ferguson-Pell M. W., Cochran G. V. B., Lindsay R., & Dempster D. W. A new manual method for assessing two-dimensional cancellous bone structure: comparison between iliac crest and lumbar vertebra. J. Bone Miner. Res., (1991), **6**, 689-696.
  - 18) Parfitt A. M., Mathews C. H. E., Villanueva A. R., & Kleerekoper M. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. J. Clin. Invest., (1983), **72**, 1396-1409.
  - 19) Wronski, T. J., Schenck, P. A., Cintron, M., & Walsh, C. C. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. Calcif. Tiss Int., (1987), **40**, 155-159.
  - 20) Ke, Z. K., Jee, W. S. S., Mori, S., Li, X. J., & Kimmel, D. B. Effects of longterm daily administration of prostagrandin-E2 on maintaining elevated proximal tibial metaphyseal cancellous bone mass in male rats. Calcif. Tissue Int., (1992), **50**, 245-252.
  - 21) Sibonga J. D., Zhang M., Evans G. L., Westerlind K. C., Cavolina J. M., & Morey-Holton E., Turner R.T. Effects of spaceflight and simulated weightlessness on longitudinal bone growth. Bone, (2000), **27**, 535-540.
  - 22) Stenstrom A., Hansson L. I., & Thorngren K-G. Effect of ovariectomy on longitudinal bone growth in the rat. Anat. Embryol., (1982), **164**, 9-18.
  - 23) Furuno K., Goodman M. N., & Goldberg A. L. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. J. Biol. Chem., (1990), **265**, 8550-8557.
  - 24) Murakami H., Nakamura T., Tsurukami H., Abe M., Barbier A., & Suzuki K. Effects of tiludronate on bone mass, structure, and turnover at the epiphyseal, primary, and secondary spongiosa in the proximal tibia of growing rats after sciatic neurectomy. J. Bone Miner. Res., (1994), **9**, 1355-1364.
  - 25) Yamamura M., Nakamura T., Tsurukami H., Hijioka A., Narusawa K., Ohnishi H., Ohta T., & Hosoda K. Local bone turnover in the metaphysic of the proximal tibia and the lumbar vertebra during the early periods after ovariectomy in the rats. Calcif. tissue Int., (1996), **58**, 52-59.
  - 26) Parfitt, A. M. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone : cellular mechanisms and biomechanical consequences. Calcif. Tissue Int., (1984), **36**, S123-128.