

学 位 論 文 題 名

骨吸収窩の 2 型 - 走査電子顕微鏡的研究を中心として

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収によって形作られる。骨吸収過程については次のように考えられている。破骨細胞は明調帯で骨に密着し、プロトンを分泌し、リン酸カルシウムなどの骨に含まれる無機成分を溶かす。さらに破骨細胞は酸性フォスファターゼやカテプシンなどの酵素を分泌して、膠原線維などの有機成分を分解あるいは消化する。骨吸収がある程度すすむと破骨細胞は明調帯を解き、吸収活動を休止してその場から移動する。骨吸収過程がこの通りに進むならば、破骨細胞の下にある骨吸収窩の底部は骨吸収過程の進み方に応じて変化し、いろいろな形態を示すはずである。しかし、このような視点から骨吸収窩の性状を詳しく調べた研究はない。そこで、本研究では骨吸収過程を骨吸収窩の三次元構造から理解するために、幼若期マウスの頭頂骨を材料とし、骨に対する作用が異なる次の 2 方法で骨を処理し、頭頂骨内面にみられる骨吸収窩を走査電子顕微鏡および反射電子顕微鏡で観察した。

最初に、あるがままの骨吸収窩の底部の膠原線維の状況を知るために、骨表面の細胞をすべて除去し、膠原線維の収縮差を除くために EDTA で脱灰して走査電子顕微鏡で観察した。次に、石灰化している膠原線維、骨基質の状態を観察するために骨を次亜塩素酸ソーダで処理して走査電子顕微鏡で観察した。膠原線維のうち石灰化していないものはこれにより消失する。したがって、両者の比較により前記で観察された像の石灰化の状態を知ることができる。さらに、膠原線維の石灰化の様子を知るために反射電子顕微鏡で観察した。

次に骨吸収窩の示す三次元的多様性と破骨細胞との関係を調べるために、酸性フォスファターゼ染色あるいはカテプシン B 蛍光抗体法で破骨細胞を染めだし、その分布を調べた後、破骨細胞を取り除いてその下の骨吸収窩を走査電子顕微鏡で観察し、写真重ね合わせ法で両者の関係を検討した。

【材料と方法】

生後 1 週の dd-マウス 24 匹を用いた。

マウスは吸入麻酔により屠殺し、頭頂骨を摘出し、超音波洗浄法と次亜塩素酸処理

法を用いて、標本作製し、走査電子顕微鏡で観察した。超音波洗浄法では、頭頂骨を2%グルタルアルデヒドで固定し、硬膜と骨膜をピンセットで剥がして、超音波洗浄した。その後4%EDTAに浸し、1%タンニン酸と1%オスミウム酸で導電染色し、アルコール脱水し、酢酸イソアミルに置換後、臨界点乾燥し、ついでオスミウム蒸着した。次亜塩素酸処理法では頭頂骨を5%次亜塩素酸ソーダに入れ、細胞と膠原線維を溶かし、蒸留水で洗浄した。アセトンで脱水し、自然乾燥し、これをオスミウム蒸着した。

一部は、頭頂骨の表面の硬膜と骨膜を剥がし、水ジェットで洗浄し、臨界点乾燥した後、カーボン蒸着して、反射電子顕微鏡を用いて加速電圧5kVで観察した。このほか5%次亜塩素酸ソーダで処理処理した標本を反射電子顕微鏡で観察した。

次に頭頂骨内面の破骨細胞の分布を調べるために酸フォスファターゼ染色とカテプシンBの蛍光抗体法の標本は写真撮影後、水ジェットにより破骨細胞を剥がし、上述したの超音波洗浄法と同様にして、先に撮影した破骨細胞の分布をしらべた場面と同じ場面を探して走査電子顕微鏡で撮影した。

【結果】

頭頂骨内面には骨吸収面と骨形成面がみられた。骨吸収面は骨吸収窩の集まりからなり、個々の骨吸収窩は楕円形、多角形あるいは不整形を呈し、稜状の境界をもっていた。骨吸収窩の大きさは10~20 μ mのものが多かった。骨吸収窩は底部の性状により2種類が区別された(I型とII型)。I型骨吸収窩では、底部の膠原線維間には隙間があって、浮き上ってみえた。II型骨吸収窩では、底部のほとんどに膠原線維がみられず、平滑であった。I型骨吸収窩の性状は標本作製法により多少異なってみえたので、以下に別々に記載する。

I型骨吸収窩は、超音波洗浄では、膠原線維は、太さが30~45nmあり、表面が平滑であった。底部の膠原線維は末梢にむかって徐々に細くなって途切れていた。一方、次亜塩素酸ソーダ処理標本では、膠原線維の太さは60~75nmあり、線維の表面はざらざらしていた。また、底部の膠原線維は、先端で丸まって終わっていた。

I型とII型骨吸収窩の比率は、超音波洗浄標本ではI型が77%、II型が23%であったが、次亜塩素酸ソーダ処理標本では、I型が51%、II型が49%であった。

反射電子顕微鏡による観察では、I型骨吸収窩には明るいものと、暗いものがあった。次亜塩素酸ソーダ処理したものでは明るい骨吸収窩のみからなっていた。

次に酸性フォスファターゼ染色あるいはカテプシンB蛍光抗体法で染色した標本の写真と走査電子顕微鏡写真とを重ね合わせると、酸性フォスファターゼ染色で濃染あるいはカテプシンB蛍光抗体法で染まる部分はI型骨吸収窩に重なり、酸性フォスファターゼ染色で淡染あるいはカテプシンB蛍光抗体法で不染部分はII骨吸収窩に重なった。

【考察】

本研究では、幼若期マウスの頭頂骨の骨吸収窩を観察し、ここにみられる骨吸収窩を底部に膠原線維が立体的にみえる I 型と平らな底部を示す II 型の 2 型に分けて、2 種類の方法を用いて、I 型骨吸収窩には石灰化線維の上に非石灰化線維が種々の程度にみられるものがあることを初めて証明した。

超音波洗浄標本の I 型骨吸収窩の底部には先端が尖がっている膠原線維がみられたが、次亜塩素酸ソーダ処理標本では、このような膠原線維はみられなかった。これは、超音波洗浄標本で観察された膠原線維の尖った先端部分が次亜塩素酸ソーダ処理によって溶けたことを示す。

超音波洗浄標本と次亜塩素酸ソーダ処理標本では I 型骨吸収窩の比率に差がみられたが、この差は非石灰化膠原線維だけで底をつくっている I 型骨吸収窩があることを示している。このような I 型は次亜塩素酸ソーダ処理によって非石灰化膠原線維が溶かされて II 型になる。I 型骨吸収窩には非石灰化膠原線維が表層にあり、深部には石灰化膠原線維があるもの (Ia 型) と、骨吸収窩の底に非石灰化膠原線維からのみなるもの (Ib 型) の 2 種類があることが形態学的に証明された。Ia, Ib, II 型の順番に骨吸収過程は進むとみなされる。

反射電子像では明るくみえる I 型骨吸収窩と暗くみえる I 型骨吸収窩があることを確かめた。暗くみえる骨吸収窩は非石灰化線維層が厚いものからなり、明るくみえる I 型骨吸収窩は非石灰化線維の層が薄いものであるといえよう。

本研究では酸性フォスファターゼ染色で濃染する部分あるいはカテプシン B 蛍光抗体法で染まる部分の下には走査電子顕微鏡でみると I 型骨吸収窩があった。両酵素で染まる部分は骨吸収中の破骨細胞がいることがわかっている。II 型骨吸収窩の上はいずれの染色によっても染まらないので、破骨細胞がいないことを示している。以上のことから、I 型骨吸収窩は破骨細胞が骨吸収中のものであり、II 型骨吸収窩は破骨細胞による骨吸収が終わったものであるといえる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 井 上 芳 郎
副 査 教 授 寺 沢 浩 一

学位論文題名

骨吸収窩の 2 型 - 走査電子顕微鏡的研究を中心として

骨は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収によって形づくられる。骨吸収過程は次のように考えられている。破骨細胞は明調帯で骨に密着し、プロトンを分泌し、カルシウムを溶かす。さらに酸性フォスファターゼなどの酵素を分泌して、膠原線維を分解する。骨吸収がある程度すすむと破骨細胞は吸収活動を休止してその場から移動する。骨吸収過程がこの通りに進むならば、破骨細胞の下にある骨吸収窩は骨吸収過程の進み方に応じて変化し、いろいろな形態を示すはずである。しかし、このような視点から骨吸収窩の性状を詳しく調べた研究はない。そこで、本研究では骨吸収過程を骨吸収窩の三次元構造から理解するために、幼若期(生後 1 週)マウスの頭頂骨を材料とし、骨表面の細胞を除去し、超音波洗浄した後、EDTA で脱灰して走査電子顕微鏡で観察した。次に、石灰化している膠原線維、骨基質の状態を観察するために骨を次亜塩素酸ソーダで処理し、細胞と膠原線維を溶かして走査電子顕微鏡で観察した。膠原線維のうち石灰化していないものは次亜塩素酸ソーダ処理により消失する。したがって、これら 2 方法で得られた結果から膠原線維の石灰化の様子を知ることができる。

頭頂骨内面には骨吸収面と骨形成面がみられた。骨吸収面は骨吸収窩の集まりからなり、骨吸収窩は楕円形、多角形あるいは不整形を呈していた。大きさは 10~20 μm のものが多かった。いずれの方法においても骨吸収窩は底部の性状により 2 種類が区別された (I 型と II 型)。I 型骨吸収窩は、底部の膠原線維間に隙間があって、線維が浮き上ってみえた。II 型骨吸収窩は、底部のほとんどの膠原線維がみられず、平滑であった。I 型骨吸収窩の膠原線維の性状は標本作製法により多少異なってみえた。

I 型骨吸収窩にみられる膠原線維は、超音波洗浄標本では、太さが 30~45 nm あり、表面が平滑であった。また、膠原線維は末梢にむかって徐々に細くなって途切れていた。

一方、次亜塩素酸ソーダ処理標本では、膠原線維の太さは 60~75 nm あり、線維の表面はざらざらしていた。また、膠原線維の先端は丸まって終わっていた。このことは、超音波洗浄標本でみえた尖った先端部分にはカルシウムがついていないので次亜塩素酸ソーダ処理によって溶けたことを示す。また、深部の膠原線維にはカルシウムがついていることを示す。

I 型と II 型骨吸収窩の比率は、超音波洗浄標本では I 型が 77%、II 型が 23% であったが、次亜塩素酸ソーダ処理標本では、I 型が 51%、II 型が 49% であった。2 方法で I 型骨吸収窩の比率に差がみられたことは、非石灰化膠原線維だけで底をつくっている I 型骨吸収窩があることを示している。このような I 型は次亜塩素酸ソーダ処理によって非石灰化膠原線維が溶かされて II 型になる。このことから I 型骨吸収窩には、非石灰化膠原線維が表層にあり、深部には石灰化膠原線維があるもの (Ia 型) の他に、骨吸収窩の底に非石灰化膠原線維だけがあるもの (Ib 型) があることがわかる。このさい、骨吸収過程は Ia, Ib, II 型の順番に進むとみなされる。

つぎに骨表面のカルシウム沈着の状況を知るために、骨表面を露出して、加速電圧 5 kV で反射電子顕微鏡で観察した。I 型骨吸収窩には明るいものと、暗いものがあった。次亜塩素酸ソーダで非石灰化線維を溶かしてからみると、明るい骨吸収窩のみからなっていた。暗い I 型骨吸収窩は非石灰化線維層が厚いものであり、明るい I 型骨吸収窩は非石灰化線維の層が薄いものであるといえる。

次に骨吸収窩の示す三次元構造の多様性と破骨細胞との関係を調べるために、破骨細胞がもつ酸性フォスファターゼを酵素組織化学的あるいはカテプシン B を免疫組織化学的に染めだし、破骨細胞の分布を調べてから、破骨細胞を取り除いて、同じ部位の骨表面を走査電子顕微鏡で観察し、写真重ね合わせ法で破骨細胞と骨吸収窩との関係を検討した。結果は I 型骨吸収窩の上には破骨細胞がいて、II 型骨吸収窩の上には破骨細胞はいなかった。

以上のことから結論として、I 型骨吸収窩は骨吸収中のものであり、II 型骨吸収窩は骨吸収が終わったものであるといえる。

本論文は、成長期にあるマウス頭頂骨を骨に対する作用の異なる 2 方法、超音波洗浄と次亜塩素酸ソーダで処理し、走査電子顕微鏡で骨吸収窩の形態を観察することにより、骨吸収過程でおこる脱灰と膠原線維の分解を形態学的に明らかにした。また、酸性フォスファターゼを酵素組織化学的あるいはカテプシン B を免疫組織化学的に染めた写真と、細胞を剥がしたあとの骨表面の走査電子顕微鏡写真との重ね合わせ法によって、破骨細胞と骨吸収窩との関係も示した。

学位発表に際し、主査からの経過説明と紹介の後、申請者はスライドを用いながら約13分にわたって学位論文内容の発表を行った。その後、副査の寺沢教授からは膠原線維の石灰化の仕方について、副査の井上教授からは骨組織にみられる膠原線維の由来について、骨吸収後の骨形成について、大腿骨でも同じ結果が予想されるかどうかについて、また、主査の渡辺教授からは、光学顕微鏡写真と走査電子顕微鏡写真の重ね合わせ法についての工夫点について、これまで考えられてきた骨吸収過程と本研究結果との一致性について、幼若期と成熟期・老齢期の骨吸収窩との違いについて質問がなされた。申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識を用いて、誠実にかつ、適切に回答した。

本論文は、形態学的方法を駆使して骨吸収過程を骨吸収窩の形態学から明らかにし、今後の骨吸収過程の研究に形態学的基礎を与えた点が、高く評価される。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、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。