

博士(医学) 橋都 浩哉

学位論文題名

破骨細胞波状縁の立体形態および加齢変化
—マウス頭頂骨における走査電子顕微鏡的観察

学位論文内容の要旨

【はじめに】近年骨粗鬆症をめぐり、骨組織の微小動態の研究が活発となっている。骨の量は、骨形成と骨吸収のバランスにより保たれる。このうち骨吸収は破骨細胞によって行なわれる。破骨細胞が骨に接して骨吸収を行なう部位は細胞膜が複雑に入り組んだ構造をしており、波状縁 (ruffled border) と呼ばれる。波状縁の形態は破骨細胞の機能状態に応じて変化すると考えられているが、波状縁を立体的、定量的に観察する方法はこれまでなかった。私どもはごく最近、破骨細胞の骨に接する面を骨基質側から走査電子顕微鏡で立体観察する新しい方法を考案した。本研究ではこの方法を用い、生後1, 4, 13, 100週のマウスにおいて破骨細胞の骨接触面を観察し、週齢による波状縁の立体形態の変化を観察した。

【方法】頭頂骨を硬膜と骨膜をつけたまま摘出し、2%グルタルアルデヒドー0.1Mカコジル酸緩衝液に2日間浸して固定した。さらに4%EDTAで1週間かけて脱灰し、5N-KOHで60℃、8分間処理して骨基質と周囲の結合組織を除いた。臨界点乾燥後に頭頂骨の内側面を覆う細胞層を剥離し、剥離した面を上にしてアルミニウムの試料台にのせ、走査電子顕微鏡で観察した。この方法で合計149個の破骨細胞を観察した。さらに、破骨細胞の骨接触面をそれぞれ写真撮影し、破骨細胞の骨接触面全体の面積、それに含まれる波状縁の面積を算出した。

【結果および考察】破骨細胞の波状縁は、一般に指状あるいは板状の微小突起の集団で、各突起は複雑に分岐していることが多かった。また、波状縁は、突起が疎で平坦な辺縁帯で囲まれていた。幼若齢の1週では破骨細胞骨接触面（波状縁と辺縁帯からなる）は広く、波状縁も広く発達していた。この時期の波状縁は、主に指状の突起からなり、その配列は不整であった。波状縁は全体として骨基質に向って膨隆していた。成熟齢の13週、老齢の100週では破骨細胞骨接触面は小さく、波状縁の面積も小さくなっていた。この時期の波状縁の突起は、指状の中に板状のものが混在しており、各突起の長軸は一定方向を向いていた。また、波状縁の膨隆は小さくなっている、100週では波状縁の中央が陥凹し、突起のあまり発達していない波状縁も観察された。

マウス頭頂骨では、頭頂骨が発育する幼若期の生後1週で破骨細胞の骨吸収活性が高く、成熟期の13週、老齢の100週になると破骨細胞活性は低下することが知られている。

今回観察した波状縁の形態変化は、週齢により変化する破骨細胞の骨吸収活性を反映していると考えられる。すなわち幼弱齢では、破骨細胞は波状縁を大きく膨隆させて活発に骨吸収を行ない、深い骨吸収窩をつくる。一方、成熟期、老齢期では波状縁はあまり膨隆せずに浅い骨吸収窩をつくり、突起を一定の方向に配列させていると考えられる。このように、破骨細胞はその様々な機能状態により、波状縁の広さ、波状縁を構成する突起の形、方向性が変化していることがわかる。したがって、この新しい観察法により、生体内における破骨細胞の機能状態を、より詳しく定量的に評価できると考える。

【結論】 1)破骨細胞の波状縁は、細胞の骨接触面において、指状突起、板状突起の集合を形成し、これらの突起のあまりない辺縁帯に囲まれる。2)波状縁は破骨細胞の機能状態に応じて形態を変化させる。3)骨吸収機能活性の高い破骨細胞は、骨に接する面積が広く、大きな波状縁を有する。波状縁は大きく隆起し骨吸収窩を形成する。波状縁の突起は指状で不整に配列する。中央部で各突起は疎で、突起の周囲に間隙を示す。4)骨吸収機能活性の低い破骨細胞は、骨接触面は小さく、波状縁の面積も狭い。波状縁は骨側にあまり膨隆せず、指状あるいは板状の突起が密集して同一方向を向いて配列する。

学位論文審査の要旨

主査 教授 金田清志

副査 教授 松田英彦

副査 教授 藤本征一郎

学位論文題名

破骨細胞波状縁の立体形態および加齢変化 —マウス頭頂骨における走査電子顕微鏡的観察

研究目的

近年骨粗鬆症をめぐり、骨組織の微小動態の研究が活発となっている。骨の量は骨形成と骨吸収のバランスにより保たれ、このうち骨吸収は破骨細胞によって行なわれる。破骨細胞が骨に接して骨吸収を行なう部位は、細胞膜が複雑に入り組んだ構造をしており、波状縁 (ruffled border) と呼ばれている。その形態は破骨細胞の骨吸収機能に応じて変化すると考えられるが、これまでの超薄切片の観察では波状縁の立体形態を正確に把握することは困難である。そこで本研究は次のような目的で行なった。1) 破骨細胞波状縁の立体形態を走査電子顕微鏡で観察する方法を開発する。2) 波状縁の立体形態の詳細を解析する。3) 週齢による波状縁の形態変化を明らかにする。4) 破骨細胞の骨吸収機能と波状縁の立体形態の関連を変化する骨吸収機能と関連して解析する。

材料および方法

幼若な生後1、4週、成熟期の13週、老齢の100週の雌マウスを用い、頭頂骨を摘出して2%グルタルアルデヒドで2日間固定し、4%EDTAで4~5日脱灰した。次いで5N-KOHで60°C、8分間処理して膠原線維を溶解除去した。標本は導電染色をほどこし、臨界点乾燥後、骨表面の細胞層を実体顕微鏡下に剥離し、その骨に接する

面を走査電子顕微鏡で観察した。

結 果

- 1) 今回開発した方法により骨の基質が除かれて、骨表面の細胞層を骨側から観察できるようになり、多数の波状縁の立体形態をはじめて観察できた。ここでは総計149個の破骨細胞を観察した。この観察により、破骨細胞骨接觸面における波状縁の大きさ、形、位置、さらに波状縁を構成する突起の詳細な形状と配列など多くの新しい情報が得られた。
- 2) 波状縁は、直徑が $10\sim50\mu\text{m}$ で、幅 $0.1\sim0.3\mu\text{m}$ の微小突起の集団だった。突起は、指状あるいは板状を呈し、各突起は複雑に分岐していた。波状縁は突起の形状、配列、全体の膨隆の状態によりⅠ型に分類できた。Ⅰ型は突起が方向性を示さず、やや疎に乱立し、全体として膨隆していた。Ⅱ型の波状縁は板状と指状の突起が混在して、一定の指向性を示して密に配列し、あまり膨隆せず、平坦な面で囲まれていた。
- 3) 生後1週では、波状縁はすべてⅠ型であった。成熟期の13週、老齢の100週では、主としてⅡ型であった。Ⅱ型の割合は13週より100週で高かった。
- 4) 各週齢ごとに破骨細胞骨接觸面と波状縁の面積を計測すると、1週の破骨細胞の骨接觸面の面積と波状縁の面積はともに、13週、100週に比べて広かった。側定値は1週では大きなばらつきを示した。13週、100週では、個体差は小さかった。

考 察

走査電子顕微鏡による観察では、観察したい細胞を試料表面に露出させる必要がある。ここでは破骨細胞の波状縁を露出させる新しい方法を開発し、多数の破骨細胞の波状縁の立体構造を、生体内にあるがままの構造を保って観察することに成功した。

マウス頭頂骨における骨吸収の程度は、加齢に伴う頭頂骨の成長率に関連す

る。頭蓋は、脳の発育と関連して生後早期に急速に成長し、生後4週で停止する。すなわち頭蓋の成長は、脳の発育と関連して、ここでは生後1週で最も活発であり、破骨細胞も、この時期で最も活発であるとみなされる。したがって、1週にみられるⅠ型は骨吸収機能が活発な像であり、これに比べⅡ型はⅠ型より機能活性が低い像であるとみなされる。1週でⅠ型の膨隆する波状縁は、活発な骨吸収により形成される深い骨吸収窩に陥入し、Ⅱ型の平坦な波状縁は、浅い骨吸収窩上に存在する像と解釈される。

破骨細胞骨接觸面と波状縁は、今回的方法では全体が観察されるため、形態像を種々の指標で定量化できる。今回の計測結果は、定量成績が骨吸収活性の程度を表現することを示唆している。

以上の様に、本研究では、波状縁の立体形態を破骨細胞の機能状態と関連して示した。今後、破骨細胞の様々な機能状態における波状縁の形態を分析することにより、生体内における破骨細胞の機能状態を詳しく評価できると考える。

以上、本研究は、これまで超薄切片で推測されていたにすぎない破骨細胞波状縁を、走査電子顕微鏡で立体的実像としてはじめて観察できるようにし、その機能を形態像から解釈できることを示唆したものであり、博士（医学）の学位を授与するに値するものと認定される。