

学 位 論 文 題 名

破骨細胞に関する微細形態学的研究：
マウスにおける核数の分布について

学位論文内容の要旨

硬組織の吸収に関する細胞は吸収する基質により様々な名称が与えられており、骨を吸収する細胞は破骨細胞、歯を吸収する細胞は破歯細胞と呼ばれ、これらは同一の細胞と考えられている。破骨細胞及び破歯細胞は多核の細胞として知られているが、その核数に関する教科書の記載は2個から20個、数十個から百個を越す、2個から数十個等、一定していない。近年マウス培養系において波状縁を有する単核の破骨細胞の存在、ならびにヒト乳歯において波状縁を有する単核の破歯細胞の存在がそれぞれ証明された。またヒト乳歯において単核の細胞を含む吸収能力を有する破歯細胞の核数の分布が明らかにされた。しかし破骨細胞については不明である。

本研究では、日齢と部位の異なるマウス骨組織について、単核の細胞を含む吸収能力を持つ破骨細胞の核数を検索し、破骨細胞の核数及び核数の分布を明らかにすることを目的とした。

試料として生後4日齢の雌雄を含む ddYマウス5頭の脛骨及び頭蓋骨、ならびに胎生17日齢の雌雄を含む ddYマウス10頭の脛骨及び第一～第五中足骨を用いた。試料は固定・脱灰後、通法に従って Epon 包埋し、それぞれの骨組織から3つの試料を無作為抽出した。得られた試料はウルトラミクロトームを用いてダイヤモンドナイフにより0.5 μ m厚の連続準超薄切片を作製した。作製した全ての切片を methylene blue- azure II で染色後、光学顕微鏡で観察した。破骨細胞の同定は250倍の倍率で撮影した写真上で刷子縁により骨上に吸収窩を形成している細胞とした。破骨細胞と同定した細胞の全域に渡る連続切片から細胞質中に含まれる核数の計測を行った。得られた破骨細胞の個数から各核数における相対度数及び累積度数、な

らびに核数の分布における平均値、中央値、及び最頻値を算出した。

生後4日齡脛骨に観察された207個の破骨細胞は1～12個の核を有していた。単核の破骨細胞の存在頻度は全体の4.8%、10個以下の核数を有する細胞は98.6%であった。核数の平均値は 3.68 ± 2.10 (SD)、中央値は3、最頻値は2であった。

生後4日齡頭蓋骨に観察された203個の破骨細胞は1～15個の核を有していた。単核の破骨細胞の存在頻度は全体の2.0%、10個以下の核数を有する細胞は97.5%であった。核数の平均値は 4.30 ± 2.31 (SD)、中央値は4、最頻値は3であった。

胎生17日齡脛骨に観察された221個の破骨細胞は1～11個の核を有していた。単核の破骨細胞の存在頻度は全体の5.0%、10個以下の核数を有する細胞は99.6%であった。核数の平均値は 2.93 ± 1.55 (SD)、中央値及び最頻値は2であった。

胎生17日齡中足骨では、骨化が開始していた第二・第三・第四中足骨に観察された164個の破骨細胞の核数は2～28個の核を有していた。10個以下の核数を有する破骨細胞は96.3%であったが、単核の破骨細胞は観察されなかった。核数の平均値は 4.45 ± 3.16 (SD)、中央値及び最頻値は3であった。

無作為抽出した3つの試料間における破骨細胞の核数の比較にクラスカル・ワリスの検定を用いたが、いずれの骨組織にも統計学的な有意差は認めなかった。また4つの骨組織における破骨細胞の核数の分布は互いに類似していたが、コルモゴロフ・スミルノフ検定により幾つかの骨組織間では統計学的な有意差が認められた。

本研究の結果、4つのいずれの骨組織においても単核を含む10個以下の核数を有する破骨細胞の存在頻度は90%以上であり、4つの骨組織における破骨細胞の核数の分布は互いに類似していることが示された。しかし幾つかの骨組織間ではその核数の分布に統計学的な有意差が認められた。本研究ではそれぞれの骨組織において無作為抽出した3つの試料間に統計学的な有意差を認めておらず、また各骨組織において100個以上の破骨細胞について核数の計測を行っている。このため試料の選択方法及び観察細胞数により、破骨細胞の核数の分布に違いが生じたのではないと考えられた。しかし4つの骨組織間には破骨細胞が吸収する骨形態に違いが観察された。また4つの骨組織間では、破骨細胞の吸収部位やその周囲で行われている骨芽細胞による骨形成量、及び破骨細胞の細胞融合の頻度にも違いがあると考えられ

た。このため、幾つかの骨組織間において破骨細胞の核数の分布に統計学的な有意差が生じた原因として、破骨細胞が吸収する骨形態の違い、破骨細胞の吸収部位やその周囲で行われている骨芽細胞による骨形成量の違い、及び破骨細胞の細胞融合の頻度の違い等が考えられた。

胎生17日齢の中足骨には、他の3つの骨組織に見られた単核の破骨細胞は観察されなかった。破骨細胞は当初単核の細胞であり、細胞分裂ではなく細胞融合によりその核数を増やすと考えられている。また破歯細胞におけるその多核化は、吸収中の破歯細胞に見られたと報告されている。本研究では破骨細胞の細胞融合像は観察できなかったが、胎生17日齢中足骨の栄養孔形成部位のような骨形成を伴わない短時間での一方向的な骨吸収を必要とする部位では、吸収中の破骨細胞の占める割合が高く、単核の破骨細胞のままで吸収を継続するよりも細胞融合により多核の細胞になることが優先されている可能性が示唆された。

破骨細胞の核数に関し、本研究の結果と教科書の記載との間には違いが認められた。その違いは教科書で単核の破骨細胞の存在を認めていない点、核数の大部分を数十個と記載している点、及び核数の多いものでは数百個に及ぶと記載している点である。まず単核の破骨細胞の存在については、この細胞は何等特殊な細胞ではないことがこれまでの研究から既に証明されており、本研究でも観察された。次に光学顕微鏡による観察で一般に用いられるパラフィンやセロイジン切片は準超薄切片の10倍以上も厚く、また連続切片によらない一枚の切片では細胞境界が不明瞭な場合が多い。そのため互いに近接する複数の細胞を一個の細胞と計測した可能性が考えられた。また塗沫標本では、細胞膜が破れ近接する複数の細胞を一個の細胞と観察した可能性も考えられた。それゆえ教科書に記載されている数十個から数百個に及ぶような破骨細胞の核数の存在の可能性は、非常に低いと考えられた。

結論として、樹脂包埋された連続準超薄切片の観察により、マウス破骨細胞の核数の分布は日齢や部位により全く同じではないが互いに類似しており、その核数の大部分は単核を含めて10個以下であることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 脇 田 稔

副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

破骨細胞に関する微細形態学的研究：

マウスにおける核数の分布について

審査は、提出論文とそれに関連した学科目について、申請者に対して各審査員が個別に口頭試問により行い、各審査員の報告を下に主査がその結果をまとめた。審査論文の概要は以下の通りである。

骨や歯の吸収に関与する破骨細胞や破歯細胞は多核の細胞として知られているが、その核数に関する教科書の記載は一定していない。近年、吸収能力を持つ単核の破骨細胞や破歯細胞の存在が証明され、また単核の細胞を含んだ破歯細胞の核数の分布が明らかにされたが、破骨細胞の核数の分布については不明である。本研究は、破骨細胞の核数とその分布を明らかにすることを目的として、日齢と部位の異なるマウス骨組織について、単核の細胞を含め吸収能力を持つ破骨細胞の核数を検索し、比較したものである。

試料として、生後4日齢の雌雄を含む ddYマウス 5 匹の脛骨及び頭蓋骨ならびに胎生17日齢の雌雄を含む ddYマウス10匹の脛骨及び第一から第五中足骨を用いた。試料は固定・脱灰後通法に従って Epon 包埋し、それぞれの骨組織から3つの試料を無作為抽出し、0.5 μ m 厚の連続準超薄切片を作製した。切片を methylene blue-azure II で染色後、光学顕微鏡で観察した。破骨細胞の同定は250倍の倍率で撮影した写真上で刷子縁により骨上に吸収窩を形成している細胞とした。破骨細胞と同定した細胞の全域にわたる連続切片から細胞質中に含まれる核数の計測を行った。得られた破骨細胞の個数から各核数における相対度数及び累積度数、並びに核数の分布における平均値、中央値、及び最頻値を算出した。

観察された破骨細胞数と核数、核数の平均値、10個以下の核数を持つ細胞の存在頻度、単核の破骨細胞の存在頻度、核数の中央値ならびに最頻度は、生後4日齢脛骨ではそれぞれ207個、1～12個、 3.68 ± 2.10 個、98.6%、4.8%、3個、2個、生後4日齢頭蓋骨では203個、1～15個、 4.30 ± 2.31 個、97.5%、2.0%、4個、最頻値は3個、胎生17日齢脛骨では221個、1～11個、 2.93 ± 1.55 個、99.6%、5.0%、2個、2個、胎生17日齢中足骨(骨化が開始していた第二・第三・第四中足骨)では164個、2～28個、 4.45 ± 3.16 個、96.3%、0%、3個、3個あった。このように、それぞれの骨組織における破骨細胞の核数の分布は非常に類似しており、またその核数の大部分は単核を含めて10個以下であった。

同一の骨組織から無作為に抽出した3つの試料間には、いずれも統計学的な有意差を認めなかった。一方、4つの骨組織における破骨細胞の核数の分布は互いに類似していたものの、幾つかの骨組織間では統計学的な有意差が認められた。この原

因として、破骨細胞が吸収する骨形態の違い、破骨細胞の吸収部位やその周囲で行われている骨芽細胞による骨形成量の違い、及び破骨細胞の細胞融合の頻度の違い等を考えている。また、胎生17日齢の中足骨において単核の破骨細胞が観察されなかった理由としては、胎生17日齢中足骨における栄養孔形成部位のように、骨形成を伴わずに短時間のうちに一方的に骨吸収が進む部位では、吸収中の破骨細胞の占める割合が高く、単核の破骨細胞のままで吸収を継続することよりも細胞融合により多核の細胞になることが優先されているものと考えしている。教科書に記載されている数十個から数百個に及ぶ核数を持つ破骨細胞の存在については、パラフィンやセロイジン切片は準超薄切片の10倍以上も厚く、細胞境界が不明瞭な場合が多いことから、互いに近接する複数の細胞を一個の細胞と見誤る可能性が高いことなどをあげ、その存在の可能性は極めて低いものと結論している。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、樹脂包埋した連続準超薄切片の観察により、これまで一定の見解がえられていなかった破骨細胞の核数ならびにその分布について、マウスでは破骨細胞の核数は大部分が単核を含めて10個以下であること、ならびに核数の分布は日齢や部位により全く同じではないものの互いに類似してことを明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科学の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。