

博士（医学）横関和

学位論文題名

Acellular Calcified Columns in the Normal
Growth Plate of Mouse Vertebrae

（マウス椎体成長軟骨内の石灰化柱）

学位論文内容の要旨

【目的】

発育期の脊椎では二次骨化核からできた骨端板と椎体の間に成長軟骨が存在し、脊椎の頭尾方向の成長をつかさどっている。マウスの脊椎の石灰化した骨端板および椎体が成長軟骨に向かう面を走査型電子顕微鏡を用いて観察し、どちらの面にも円形あるいは不整形の突起が数多く存在することを知った。突起の分布は骨端板側と椎体側で鏡像関係を呈しており、両者の突起が成長軟骨の内部で連結して柱を形成していることを示唆する。骨の成長軟骨内に、このような石灰化した柱が存在することについては、これまで全く知られていない。そこで本研究は、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用い、これらの柱の微細構造や成長に伴う変化を検討し、これらの柱の成因、性格、および成長軟骨の閉鎖の過程を理解することを目的とする。

【材料および方法】

生後3週から20週の雄のdd-Mausの腰椎を用いた。取り出した腰椎を、以下に示す方法で標本作製した。

1. 光学顕微鏡標本

1) 脱灰標本：腰椎を、10%ホルマリンにて2日間固定、25%蟻酸-8%クエン酸ナトリウム溶液で1週間脱灰、パラフィン包埋し、椎体の矢状断方向に切片を作製して、ヘマトキシリーン-エオジン染色を施した。一部の標本は、エポン包埋後、切片とし、トルイジンブルー染色した。

2) 非脱灰標本：腰椎を10%ホルマリンで2日間固定後、メチルメタクリレート包埋した。この標本を研磨して、割断面を出した後、アリザリンレッドとライトグリーンで染色した。

2. 走査型電子顕微鏡標本

腰椎を、5%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸して、軟組織および軟骨を溶解し、成長軟骨の層で骨端板と椎体とを分離した。この標本を骨端板の成長軟骨に向かう面および椎体の成長軟骨に向かう面を上にして、アルミニウム試料台にのせ、白金パラジウムコーティングした。

【結果】

1. 光学顕微鏡的観察

1) ヘマトキシリーン-エオジン染色標本：成長軟骨を拡大すると、軟骨細胞柱が密在する成長軟骨の所々に、細胞柱を欠く軟骨基質の柱が存在していた。その全長は骨端石灰化板側から、成長軟骨を越え、椎体の骨梁にまで連続していた。

2) トルイジンブルー染色標本：成長軟骨は全体が異染性を呈し、上記の軟骨基質の柱はさらに濃染して明瞭に識別された。この軟骨基質の柱の内部は層構造を呈し、少数の変性した細胞や核の破片を含んでいた。

3) 硬組織研磨石灰染色標本：軟骨基質の柱はアリザリンレッドで赤く染まり、この柱が石灰化していることを示した。石灰化部は明らかな層構造を呈していた。

2. 走査型電子顕微鏡的観察

走査型電子顕微鏡的観察

1. 骨端板と椎体骨幹端部の相対する面

骨端板が成長軟骨に向かう面と椎体骨幹端部が成長軟骨に向かう面とは、同じ形を呈しどちらの側にも、軟骨小腔が多数存在していた。これらの面上には軟骨小腔を塞ぐようにして、多くの突起が分布していた。両者の面の対応する部分を拡大し比較すると、骨端板側と骨幹端部側の突起は形も分布も鏡像関係にあった。これらの事実は、相対する突起が、成長軟骨の内部で接合していることを示した。すなわち、これらの突起は骨端板と椎体骨幹端部を分離して標本を作製する際に、石灰化柱がふたつに分かれたものと判定できた。

石灰化柱は一般に円形ないし楕円形で、大きさは長径 $40\mu\text{m}$ ~ $80\mu\text{m}$ であった。また、週齢の進んだマウスでは、さらに大きな不整形のものも出現した。一方、最も小さな石灰化柱は軟骨小腔に一致し、その周辺部とともに石灰化していた。

2. 矢状断面

成長軟骨は骨端板と椎体骨幹端部にはさまれた隙間として観察できた。隙間のところどころに骨端板と椎体骨幹端を連結する柱が存在していた。石灰化していない軟骨組織は全て消失しているのでこれは前述の石灰化柱であると判定できた。拡大すると、この柱は椎体の長軸方向に軸を持ち、骨幹端の骨梁基部を土台にして鍾乳石のように立っていた。柱は表面が粒子状で不規則な層板の重なりであった。

1) 週齢による石灰化柱の変化：石灰化柱は生後3週頃出現し、その後、総数、大きさともに増大した。その総数は、4週以降急速に増加、7~8週で最大となった。全体の面積に占める石灰化柱の面積の割合は、8週以降もさらに増大した。

【考察】 われわれは、マウスにおいて、軟組織を溶解除去した椎骨の成長軟骨の石灰化部分全体を走査型電子顕微鏡を用いて観察し、成長軟骨の内部に骨端板と骨幹端部を連結する石灰化した軟骨基質の柱、すなわち石灰化柱が存在することを発見した。

成長軟骨については、これまで光学顕微鏡により詳細に観察されてきたにもかかわらず、このような構造についての報告は皆無である。これは、ヘマトキシリンーエオジン染色の切片で観る限り、石灰化柱は通常の軟骨基質と大差なく見えること、また、成長期早期では石灰化柱の数自体も限られていることなどの理由で、切片の観察では見過ごされてきたためであろう。

石灰化柱の形成過程について

最小の石灰化柱、とくに、出現早期にみられる小さな柱は、骨幹端側でみると、大きさ、位置が軟骨小腔と一致している。またトルイジンブルー染色切片標本の観察では、軟骨細胞柱の細胞が変性し、これを中心にその周囲の基質を含めて石灰化していることが明らかである。すなわち、石灰化柱は軟骨細胞柱を中心に最小径として形成されている。一方、多くの石灰化柱は、このような単位がいくつか癒合した像を示す。つまり、大きな石灰化柱はより小さな石灰化柱が融合して形成される。

では、なぜ成長軟骨内で軟骨細胞柱を単位とする柱ができるのかが問題となる。

この問題について考える際、軟骨細胞柱がどのようにして栄養されているのかを検討する必要があろう。軟骨細胞柱は骨髓側からみると、細胞をいれる管状の形態を示している。また、石灰化層、骨化層では、細胞は消失し、その空隙には骨髓側からループ状の毛細血管が侵入していることが知られている。この血管により細胞柱が栄養されているとすると、骨化の進行に伴い、軟骨細胞が消失してできた管が、新生骨により閉鎖されることで、栄養血管が途絶され、軟骨細胞柱単位で細胞が変性に陥ると考えることができる。細胞の変性の後に、柱は基質に置換され、軟骨基質の柱が生成することができる。これが石灰化し石灰化柱となるのであろう。この仮説によれば、石灰化柱の基部が必ず骨稜と連続している事実も、合理的に説明できる。

加齢に伴う石灰化柱の変化

先に述べたように石灰化柱は軟骨細胞の柱が消失してできる。つまり石灰化柱の面積の増大は軟骨細胞の減少とともに起こるといえる。一方、骨の成長という点では、成長軟骨の軟骨細胞の減少は、成長の速度の低下につながるはずである。また、石灰化柱の存在自体も、多かれ少なかれ成長を妨げる方向に働くであろう。したがって石灰化柱の占める面積が増大するにつれ、成長の速度は低下し、いずれ成長が停止すると考えうる。つまり、石灰化柱の増大は成長軟骨の閉鎖に深くかかわっているといえる。

今回の研究結果は、正常な成長軟骨の内部に石灰化柱が存在することを初めて明らかにし、これが成長軟骨の閉鎖に関与している可能性を示唆した。石灰化柱の働きをさらに理解するためには、既にわかっている何らかの因子を用い成長を制御し、この際起こる形態の変化を観察する必要がある。

学位論文審査の要旨

主査教授 井上 芳郎

副査教授 金田 清志

副査教授 阿部 和厚

学位論文題名

Acellular Calcified Columns in the Normal Growth Plate of Mouse Vertebrae

(マウス椎体成長軟骨内の石灰化柱)

走査型電子顕微鏡(SEM)を用いてマウスの椎体の成長軟骨を観察し、成長軟骨内に石灰化した軟骨基質の柱、すなわち石灰化柱が存在することを発見した。石灰化柱の微細構造や成長に伴う変化を明らかにするために、生後3週齢から20週の雄の dd マウスを用いて標本を作成し、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡で観察した。ヘマトキシリン-エオジン染色標本では、石灰化柱は内部に細胞を含まない軟骨基質としてみえた。また、その基部は椎体の骨稜と連続していた。樹脂包埋硬組織研磨石灰染色標本では、軟骨基質の柱はアリザリンレッドで赤く染まり、この柱は石灰化していることが明かとなった。トルイジンブルー染色では、この軟骨基質の内部は層状構造を呈し、少数の変性した細胞や核の破片を含んでいた。SEMにて、骨端部と骨幹端部の成長軟骨に接する面を観察すると、成長軟骨内に突出する数多くの突起が存在していた。両者の面の突起は、形、大きさ、分布が鏡像関係を呈しており、成長軟骨内の石灰化柱が骨端部と骨幹端部に分かれたものであった。この突起を観察することにより、成長軟骨全体の中での石灰化柱の分布や、形、大きさ、数を観察することが可能であった。石灰化柱の形は円形乃至はだ円形のものが多かったが、中には複雑な形をした大きなものも存在した。最小の石灰化柱は、成長軟骨の石灰化層の軟骨小腔に一致して存在していた。また、より大きな石灰化柱は、小さな石灰化柱が融合してできていることを示す像も観察できた。石灰化柱は、中央部に少なく、周辺部に多く分布していた。石灰化柱が成長軟骨の面全体に占める面積は、生後3週、8週、20週と週令が進むにつれ増大する事が明らかとなった。観察結果から、成長軟骨の基部に存在する血管のループがその周囲に形成される椎体の二次骨稜で閉塞されることをきっかけに、成長軟骨の軟骨細胞が変性し、軟骨細胞の柱と置換するようにして石灰化柱が形成されるという仮説が成り立つ。また、石灰化柱の増大は成長軟骨の閉鎖の過程に関与している可能性がある。成長軟骨については、これまで光学顕微鏡に

より詳細に観察してきたにもかかわらず、このような構造についての報告は皆無である。これは、ヘマトキシリニーエオジン染色の切片で観る限り、石灰化柱は通常の軟骨基質と大差なく見えること、また、成長期早期では石灰化柱の数自体も限られていることなどの理由で、切片の観察では見過ごされてきたためであろう。

公開発表において、副査 金田清志教授から、なぜ今まで石灰化柱という構造が発見されなかつたのか、また、椎体だけではなく、他の四肢骨にも存在するのか、さらに、成長軟骨の栄養路との関連についての質問があった。

次いで、副査 阿部和厚教授から、ヒトなどのマウス以外の種にも石灰化柱が存在するのか、また、石灰化柱の成長軟骨内での分布と成長軟骨にかかる荷重との関連についての質問があった。

次いで、主査 井上芳郎教授から、石灰化柱の表面の層状構造の意味、石灰化柱の形成と細胞のアポトーシスとの関連についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は、その他の標本の観察の結果や、関連する文献を引用し豊富な知識に基づいて明解に解答した。

以上、本研究は光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いて成長軟骨を詳細に観察し、成長軟骨の中にこれまで知られていない石灰化柱という構造を発見した独創的な研究であり、成長軟骨の閉鎖の課程を形態学的に明らかにした点で骨の成長に関する研究に大きく寄与した。さらに既にわかっている何らかの因子を用い成長を制御し、この際起こる石灰化柱の形態の変化を観察することにより、成長軟骨の機能をさらに解明することができると期待される。

審査員一同は、これらの成長軟骨内の石灰化柱に関する研究成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。