

学 位 論 文 題 名

マウス大腿四頭筋腱－膝蓋骨接合部の形成過程
－光学顕微鏡および走査電子顕微鏡による考察－

学位論文内容の要旨

【目的】

腱や靱帯の骨接合部では、腱・靱帯はシャープリー線維として骨組織に侵入し、骨と強固に結合する。同部位は、骨格系の中で力学的ストレスが集中し、外傷および変性疾患が好発するため臨床的にも重要である。このうち、線維軟骨を介して骨に急峻な角度で刺さり込む接合では、腱・靱帯から骨組織に向かって、1) 腱・靱帯層、2) 線維軟骨層、3) 石灰化した線維軟骨層そして4) 骨層が並ぶ。このとき腱・靱帯と骨の境界に骨芽細胞は認められず、この部の骨形成過程はなお不明な点が多い。また、これまでは本構造が完成した後に観察した報告が多く、発生学的形成過程を詳細に観察した研究はきわめて少ない。そこで本研究では腱・骨接合過程の解明のため、腱-骨接合部の形成過程と微細構造を経時的に光学顕微鏡および走査電子顕微鏡で観察した。

【材料および方法】

総計30匹の雄のdd-マウスを用い、生後1週、2週、3週、4週、8週、15週の各週でエーテル麻酔屠殺後、膝蓋骨を大腿四頭筋腱とともに採取し、以下の方法で観察した。

1. 光学顕微鏡的観察

大腿四頭筋腱-膝蓋骨をブアン（Bouin）液で6～24時間固定、蟻酸-クエン酸ナトリウム脱灰で1週間脱灰。これをエタノール系列で脱水、パラフィン包埋後厚さ5 μ mの矢状断切片とした。切片は、ヘマトキシリン-エオジン（HE）で二重染色、あるいはヘマトキシリン-エオジン-トルイジンブルーで三重染色し、光学顕微鏡で観察した。

2. 走査電子顕微鏡的観察

大腿四頭筋腱-膝蓋骨をそのままあるいは矢状断として、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸して細胞および軟部組織を除去し、水洗後アセトンで脱水、乾燥した。これらの標本を膝蓋-大腿関節面を下にしてあるいは矢状断面を上にしてアルミ試料台に載せ、白金パラジウムを蒸着し、走査電子顕微鏡で観察した。

【結果】

1. 光学顕微鏡的観察

生後1、2週では、膝蓋骨は軟骨性で、大腿四頭筋腱は線維が刺さり込むように接合していた。生後3週では、大腿四頭筋腱は腱細胞が膝蓋骨近接部では軟骨細胞様となり、異染性を示す線維軟骨を形成していた。膝蓋骨内部では、軟骨細胞が空胞化して骨髓腔があらわれ、この腔が軟骨基質に侵入した腱の線維を遮断していた。生後4週では、膝蓋骨内部の骨髓腔が腱の線維軟骨の線維を切断しながら不規則に拡大し、ここに出現した骨芽細胞が骨化を進行させていた。生後8週では、膝蓋骨上端に接する大腿四頭筋腱で異染性を示す領域は生後4週時より拡大したが、この異染性は弱くなって、線維軟骨の石灰化が進行していた。膝蓋骨は全体が骨組織となって、その骨層板は腱の線維を途絶していた。生後15週では、大腿四頭筋腱の線維軟骨部の異染性を示す部分では、辺縁を除き異染性がさらに弱くなり、石灰化が

進行していた。

2. 走査電子顕微鏡的観察

1) 膝蓋骨表面の観察

細胞・軟組織を溶解した膝蓋骨上端の大腿四頭筋腱付着部には、比較的大きさの揃ったややいびつな円型の陥凹が多数存在した。膝蓋骨上端後面側の陥凹周囲は、膝蓋骨の長軸方向に連なる石灰顆粒から成り、陥凹の内側壁は直径0.5~2 μ mの球状石灰顆粒が密在してできていた。陥凹と陥凹の間は、これより小さく不均一な(直径0.4~0.8 μ m)球状石灰顆粒で埋められていた。陥凹間には密在する小顆粒塊が不規則に配列して突出し、その周りはやや大きな顆粒が疎在していた。加齢につれ、陥凹は小さく深くなった。陥凹周囲の数珠状に配列する石灰顆粒はより密となり、陥凹と陥凹の間は石灰顆粒の塊となっていった。また陥凹を取り囲む顆粒塊は腱の軸方向に隆起するようになった。

2) 膝蓋骨矢状断面の観察

生後8週：膝蓋骨内部の骨髓腔を取り囲むように骨層板が形成されていた。大腿四頭筋腱の骨への移行部では、陥凹、すなわち細胞を入れる小腔の列と列の間に膝蓋骨の長軸方向に走る石灰化した腱の線維が存在した。膝蓋骨表面近くでは、楕円形の陥凹が連続する長さ40 μ mの腔の内壁を、直径0.5~2 μ mの球状石灰顆粒が隙間なく埋めていた。楕円形の陥凹が連続する細長い腔と腔の間には、腱の線維方向にそった紡錘状の石灰顆粒が互いに連なり、腱の方向に伸びていた。また、この連続する石灰顆粒は、膝蓋骨表面近近くでは、しだいに小さく密になり、膝蓋骨表面に開口する陥凹を囲んでいた。これらの腔と腔の間を走る石灰化大腿四頭筋腱の線維群は、骨中心方向にたどると、一定の部位で腱の線維の方向とは異なる方向に線維が走る骨層板により途絶していた。腱は紡錘状顆粒が融合して連なる線維を示したが、骨の線維では石灰化顆粒はみられなかった。

【考察】

これまでの研究では、腱・靱帯の膠原線維は骨基質に直接侵入せず、石灰化した線維軟骨を介して結合していることが明らかとなっている。これらに加えて、今回はマウス大腿四頭筋腱-膝蓋骨接合部を材料に、石灰化線維軟骨の石灰顆粒の形態、線維軟骨の線維と石灰顆粒の位置関係の変化を追求し、1) シャーピー線維の形成過程、2) 線維が石灰化していく過程、3) 骨と腱・靱帯の線維とが接合する過程、4) この接合に関わる骨形成過程を明らかにした。

本研究では、HE染色にトルイジンブルー染色を加えた新しい三重染色を開発し、軟骨基質と骨が明瞭に識別できるようにした。このため腱と骨組織の線維の走行は異なり、シャーピー線維とは、骨ではなく、石灰化した線維軟骨の線維であることが明瞭となった。

走査電子顕微鏡の所見は、加齢にともない線維軟骨の線維が密になっていくこと、そして石灰化が腱の線維の走行に沿って進行していくことを示す。線維軟骨では、基質の大部分は密在する膠原線維であるが、細胞周囲のみは通常の軟骨基質と同様の軟骨基質から成る。今回は、ここに比較的大きな球状の石灰化顆粒が出現することを認めた。骨の石灰顆粒が小さな紡錘状であるのにくらべ、軟骨基質に起こる石灰化は大きな球状の石灰顆粒を形成することを知った。すなわち、典型的な軟骨基質の石灰化と骨の石灰化は形態の上から明確に区別できる。線維軟骨の石灰化は、線維と軟骨基質で同時に進行し、石灰化線維軟骨が厚くなっても、内部に骨小腔とは異なる軟骨小腔が連なって残ることを知った。すなわちシャーピー線維は石灰化した軟骨の線維である。

本研究から、腱・靱帯と骨との界面での骨形成様式および腱の石灰化線維軟骨の微細形態および石灰化が進行する過程の知見が得られた。

【結語】

1. 大腿四頭筋腱の膠原線維は、骨基質に直接侵入することではなく、石灰化した線維軟骨を介して結合する。
2. シャーピー線維とは、石灰化した線維軟骨の線維が層板骨と接している構造である。
3. 加齢に伴い線維軟骨の線維は密となり、石灰化が腱の線維方向に進行していく。
4. 線維軟骨の石灰化は、骨側から順に線維に沿って紡錘状石灰顆粒が沈着していくことと、

細胞周囲の軟骨基質に比較的大きな球状の石灰顆粒が沈着することにより，線維と軟骨基質で同時に進行する．

5. 石灰化した線維軟骨を膝蓋骨の内部から骨髓腔が浸食し，内軟骨骨化により層板骨が形成され，骨と腱の界面を形成する．

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 田 清 志

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 井 上 芳 郎

学 位 論 文 題 名

マウス大腿四頭筋腱－膝蓋骨接合部の形成過程 －光学顕微鏡および走査電子顕微鏡による考察－

腱・靱帯はシャープな線維として骨組織と強固に結合する。このうち、線維軟骨を介して骨に急峻な角度で刺さる接合では、腱・靱帯から骨組織に向かい、1) 腱・靱帯層、2) 線維軟骨層、3) 石灰化した線維軟骨層、4) 骨層が並ぶ。しかし、これまでは本構造完成後の観察が多く、形成過程の詳細は不明である。本研究の目的は、腱-骨接合部の形成過程および微細構造をあきらかにすることである。

実験材料として総計 30 匹の雄の dd-マウスを用い、生後 1 週、2 週、3 週、4 週、8 週、15 週の各週で屠殺後、膝蓋骨を大腿四頭筋腱とともに採取した。大腿四頭筋腱-膝蓋骨接合部をブアン (Bouin) 液で 6~24 時間固定した。蟻酸-クエン酸ナトリウム溶液で 1 週間脱灰後、エタノール系列で脱水し、パラフィン包埋後厚さ 5 μ m の矢状断切片とした。ヘマトキシリン-エオジン (HE) で二重染色、あるいはヘマトキシリン-エオジン-トルイジンブルーで三重染色し、光学顕微鏡で観察した。さらに、採取した膝蓋骨に付着する腱および軟部組織を 5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液にて除去し、膝蓋骨表面の大腿四頭筋腱付着部を露出した。一部の標本は膝蓋骨中央部で矢状面に沿って割断したのち、同様に処理し、大腿四頭筋腱付着部の断面を露出した。両者とも水洗後アセトンにて脱水し、乾燥した標本をアルミ試料台に載せ、白金パラジウムを蒸着し、走査電子顕微鏡で観察した。

光学顕微鏡的観察：生後 3 週まで膝蓋骨は軟骨性であり、大腿四頭筋腱の線維は軟骨基質に侵入していた。生後 4 週では軟骨基質に侵入した腱線維を骨髓腔が遮断し、一部では層板骨を形成していた。腱は骨付着部では線維軟骨様だった。生後 8 週では腱の異染性陽性領域は生後 4 週時より拡大したが、異染性は減弱した。この時期には、膝蓋骨の大部分が骨化し

た。骨層板は腱の線維を途絶しており、隣接する腱の線維軟骨部は石灰化していた。生後 15 週では層板骨に隣接する腱の線維軟骨部はさらに明瞭な石灰化を示した。走査電子顕微鏡的観察：大腿四頭筋腱付着部には円形の陥凹が多数存在した。陥凹の内側壁は直径 $0.5\sim 2\ \mu\text{m}$ の球状石灰顆粒から成っていた。陥凹の辺縁は膝蓋骨の長軸方向に連なる石灰顆粒から成っていた。陥凹間をより小さく不均一な（直径 $0.4\sim 0.8\ \mu\text{m}$ ）球状石灰顆粒が埋めていた。加齢につれ、陥凹は小さく深くなり、数珠状に配列する石灰顆粒はより密となり、陥凹間は石灰顆粒の塊となっていった。またこの塊は腱の軸方向に隆起した。

本研究はマウス大腿四頭筋腱-膝蓋骨接合部を材料に、石灰化線維軟骨の石灰顆粒形態、線維軟骨の線維と石灰顆粒の位置関係の変化を追求し、シャープリー線維の形成過程、線維が石灰化していく過程、骨と腱・靱帯の線維が接合する過程およびこの接合にかかわる骨形成過程をあきらかにした。すなわち、1. 大腿四頭筋腱の膠原線維は、骨基質に直接侵入せず、石灰化線維軟骨を介して結合する。2. シャープリー線維とは、石灰化線維軟骨の線維が層板骨と接している構造である。3. 加齢に伴い線維軟骨の線維は密となり、石灰化が腱の線維方向に進行していく。4. 線維軟骨の石灰化は、線維と軟骨基質で同時に進行する。5. 石灰化した線維軟骨に向かい、膝蓋骨の内部から骨髓腔が拡大し、内軟骨骨化により層板骨が形成され、骨と腱の界面を形成する。

公開発表では、まず井上芳郎教授から、硝子軟骨に接する、腱の膠原線維間に線維軟骨が誘導されていく機序、石灰の沈着部位と石灰顆粒形態の関連、他部位での腱-骨接合様式に関し質問があった。阿部和厚教授は、軟骨基質の石灰化と線維に沿った石灰化の石灰顆粒形態差の解釈、骨端軟骨（硝子軟骨）の石灰化との比較、線維性骨化部における腱-骨の接合様式について質問した。金田清志教授は、シャープリー線維の微細構造が現在まで不明であった理由、膝蓋骨形成以前の腱-軟骨接合部の形成過程、腱-骨接合部でのリモデリング動態について質問した。いずれの質問に対しても、申請者はおおむね妥当な回答をした。

詳細な細胞、組織学的観察とともに、腱-骨接合部におけるシャープリー線維の微細構造および形成過程をはじめて明確にした本研究の成果は高く、審査員一同は協議の結果、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。