

学 位 論 文 題 名

マウス頭頂骨内側面における骨吸収窩の加齢変化

— 走査電子顕微鏡と画像解析装置による定性的ならびに定量的研究

学位論文内容の要旨

【目 的】

頭蓋骨は脳の容量が増えるに依じて成長し、内側面で骨吸収、外側面で骨形成が活発に行なわれ、改変されていく。このような成長期にある頭蓋の頭頂骨の内側面を観察すると、破骨細胞の骨吸収による骨吸収窩が多数みられる。骨吸収窩の形や数は、破骨細胞の機能を反映すると考えられるので、破骨細胞の機能活性の高い幼若期、それより機能活性の低い成熟期、さらに低いことが予想される老齢期では、異なるはずである。目的は、マウスを用いて頭頂骨内側面の骨吸収窩の加齢変化を定性的に観察するとともに、定量的に解析し、破骨細胞の機能活性の違いを評価することにある。骨吸収窩の立体像は走査電子顕微鏡により明瞭に観察できる。しかし、走査電子顕微鏡は対象を立体的にみせるとはいえ、写真上では二次元画像として解析せざるを得ない。そこで、走査電子顕微鏡ステレオデジタル画像を解析することで骨吸収窩の深さを計測した。深さは断面像にあらわれるので、マウス頭頂骨の断面における骨吸収窩の深さを二次元的に計測して画像解析法の妥当性も検討した。

【材料と方法】

実験動物には、生後1週、14週、100週の雌性ddマウスを用いた。頭頂骨を摘出して内側面の骨膜を剥離後、軟部組織を溶解・除去して骨の表面を露出した。脱水、自然乾燥後、金属コーティングし、走査電子顕微鏡を用いて頭頂骨内側表面にみられる骨吸収窩を観察した。さらに、骨吸収窩の形・大きさを長径・短径・面積の要素にわけて自動計測した。骨吸収窩の深さの解析には走査電子顕微鏡によるステレオペア像を用いた。解析で得られた三次元情報画像の骨吸収窩像に長軸方向で最深部を通る線を引いて断面図をつくり、深さを計測した。一部の標本は二次元的に骨吸収窩の深さを計測するため、頭頂骨を切断した小骨片を側面から観察する方法を用いた。

【結 果】

定性的観察結果：1週では個々の骨吸収窩は、円形あるいは楕円形を呈していた。骨吸収窩の底には膠原線維が認められ、多くはその走行は不規則であった。一方、一部の骨吸収窩には膠原線維の走行が不明瞭で陥凹部全体が滑らかで暗くみえるものもあった。吸収窩のあるものは辺縁の一部あるいは全周が二重の線を示す骨吸収窩もみられた。14週では骨吸収窩の辺縁は低く、1週にくらべると不明瞭で、それが途切れてみえるものも観察できた。骨吸収窩の凹部の膠原線維は一般に並行に配列していた。骨吸収面の境界は1週でみられた平坦な面で囲まれていたが、低い隆起で囲まれる部分もみられた。100週では骨吸収窩は紡錘状にみえる骨吸収窩が多かった。1週、14週にくらべさらに不明瞭なものが多かった。

。陥凹部の膠原線維は14週と同じく並行に配列したが、一本一本の線維は細かった。骨吸収面の境界は土手状に盛り上がり、この部の斜面にそって所々に石灰顆粒が敷きつめられていた。

定量的計測結果：長径は1週では幅広い分布を示した。とくに20 μm 以上が半数をこえていた。14週ではピークは15 μm であり、小さいものが主体となっていた。100週では幅の狭い分布を示した。短径は1週では幅広い分布を示し、ピークは約13 μm であった。14週と100週とではほぼ同様の分布を示し、ピークは約10 μm であり、15 μm 以上のものはまれであった。長径と短径との比は値が1に近いほど円形を呈することを示す。1週では1から2の範囲で分布し、円形、類円形の骨吸収窩が多いことを示した。14週では広く分布し、この比が2以上のものが多かった。100週も分布が14週と類似し、細長い骨吸収窩が多いことを示した。面積は1週では分布範囲は広く、小さいものから大きいものまでほぼ均等にあることを示した。とくに150 から300 μm^2 の骨吸収窩が半数以上であった。14週では150 μm^2 以下の小さな骨吸収窩が多かった。100週の分布は14週と類似したが、さらに小さいものが多かった。

以上のように骨吸収窩の計測結果は、生後1週では骨吸収面は円形、ないし類円形の大小の骨吸収窩が集合していることを示す。とくに生後14週や100週にくらべて大きな骨吸収窩が多い。一方、14週では骨吸収窩は全体として小さく、細長いことが示されている。また、100週ではさらに小さくなっている。

三次元画像解析による骨吸収窩の深さは、1週では1 μm よりも浅いものが約半数と多かったが、それより深いものが多く、深さ1から5 μm に約40 %が均一に分布し、5から9 μm ほどのものも約10 %みられた。14週では3分の2は深さ1 μm 以下であった。100週では14週にくらべさらに浅い骨吸収窩が多く、大部分は1 μm より浅いもので占められていた。二次元的計測では深さが1 μm 以下の骨吸収窩は、骨吸収窩の陥凹としては識別が困難であった。計測できた骨吸収窩の深さの分布は、各週齢で比較すると、三次元画像解析による深さの結果と同様の傾向を示した。

【考 察】

機能活性の異なる破骨細胞のつくる骨吸収窩の形態の特徴を定性ならびに定量的に明らかにし、さらに加齢による破骨細胞の骨吸収機能が異なっていくことを証明した。破骨細胞機能の加齢変化では、数値は、骨吸収窩が、生後1週マウスでは大きく、円あるいは類円形で、深いことを示し、生後14週と100週では小さく、細長く、浅いことを示した。とくに、今回は、骨吸収窩の深さが加齢によって大きく異なることを示した。深さは、深いもので比較すると、幼若マウスでは、老齢マウスのものより2から5倍深い。これは骨吸収活性の程度の差異を示唆する。

成熟期と老齢期の骨吸収窩の形と深さの違いは、その上にある破骨細胞の形態と機能の差を反映するであろう。この時期では、各骨吸収窩の境界は不鮮明で、破骨細胞は突起を伸しながらゆっくりと骨吸収しているとみなされる。そのため骨吸収窩は浅く、境界不明瞭で細長いのであろう。幼若マウスにみられるような、破骨細胞の2種の機能相を示唆する所見もない。骨吸収面の境界の所見は破骨細胞の機能と骨芽細胞の機能とのカップリングが加齢により異なっていることを示している。

計量形態による破骨細胞の機能活性の評価法、およびこれを用いて明かとなった加齢にともなう破骨細胞の骨吸収能の違いは、骨の超微細構造の研究に広く応用できると考える。

【結 論】

- 1) 活性の高い破骨細胞は類円形で大きく、深い骨吸収窩をつくるが、活性が低い破骨細胞は細長で小さく、深さは浅い骨吸収窩をつくることを明らかにした.
- 2) 破骨細胞の脱灰によるアパタイト吸収と膠原線維の溶解の二つの機能相を形態でとらえ、この機能相差が加齢とともに不明瞭になることを示した.
- 3) 骨吸収と骨形成とのカップリングが形態にあらわれる骨吸収面の境界では、幼若期は平坦であるが、加齢とともに陵状に隆起して、とくに老齢期はこの表面に石灰顆粒が沈着し、カップリングの不均衡を示した.
- 4) 走査電子顕微鏡ステレオ画像解析による骨吸収窩の深さの定量法の妥当性を検証して、これを本研究ではじめて実用化し、破骨細胞の機能活性を具現化した.

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 安 田 和 則

学 位 論 文 題 名

マウス頭頂骨内側面における骨吸収窩の加齢変化

—走査電子顕微鏡と画像解析装置による定性的ならびに定量的研究

破骨細胞の機能活性は骨表面の骨吸収窩の形態にあらわれると考えられる。頭蓋骨は、成長期には脳が発育するにしたがい、内側面では骨吸収、外側面では骨形成が活発におこなわれ、大きくなっていく。一方、成熟期、老齢期には骨形成・骨吸収活性は幼若期に比べて低下し、骨の大きさは変化しない。そこで本研究は、加齢にともなう破骨細胞の機能活性の違いを明らかにするために、幼若期、成熟期、老齢期での頭頂骨内側面の骨吸収窩の形態を走査電子顕微鏡を用いて定性的ならびに定量的に検討した。

実験動物には生後1週、14週、100週の雌性ddマウスを用いた。頭頂骨を摘出して硬膜を剥離、5%の次亜塩素酸ナトリウムで軟部組織を溶解・除去して骨表面を露出し、アセトン脱水、自然乾燥後、金属コーティングして頭頂骨内側表面にみられる骨吸収窩を走査電子顕微鏡を用いて観察した。さらに、画像解析装置を用いて、骨吸収窩の形と長径、短径、面積を計測した。骨吸収窩の深さは、走査電子顕微鏡によるステレオペア像を用いた三次元画像解析により計測した。これらの画像解析にはIBASソフト（コントロールーツアイズ社製）を用いた。

走査電子顕微鏡で観察した頭頂骨内側面の骨吸収窩の形態は加齢にともなう変化していた。骨吸収窩は、生後1週では長径/短径が1に近いものが多く、主として円形のものであり、生後14週、100週では長径/短径がほぼ3で、細長いものが多かった。長径は1週では幅広い分布を示した。とくに $20\mu\text{m}$ 以上が半数をこえていた。14週ではピークは $15\mu\text{m}$ であり、小さいものが主体となっていた。100週ではピークは $15\mu\text{m}$ で、幅の狭い分布を示した。短径は1週では幅広い分布を示し、ピークは約 $13\mu\text{m}$ であった。14週と100週とではほぼ同様の分布を示し、ピークは約 $10\mu\text{m}$ であり、 $15\mu\text{m}$ 以上のものはまれであった。長径と短径との比は値が1に近いほど円形を呈することを示す。

骨吸収窩は1週では大多数が円形，14週と100週では，細長い骨吸収窩が多いことを示した．面積は1週では分布範囲は広く，小さいものから大きいものまでほぼ均等にあることを示した．とくに150から300 μm^2 の骨吸収窩が半数以上であった．14週では150 μm^2 以下の小さな骨吸収窩が多かった．100週の分布は14週と類似したが，さらに小さいものが多かった．この研究で大きな成果は，頭頂骨のステレオペア像を画像解析装置に取り込んで，骨吸収窩の深さを計測できたことにある．骨吸収窩の深さは，三次元情報画像で各骨吸収窩の断面像を描き，各辺縁を結ぶ線から底までの長さを深さとして測定した．その結果，1週では10 μm まで，14週では4 μm まで，100週では2 μm までのものがみられた．また，いずれの週齢でも深さ1 μm ほどのものも多くみられた．

以上をまとめると，

(1) 骨吸収窩の深さは，幼若期は成熟期，老齢期に比べ，より深い骨吸収窩が多くみられた．

(2) 幼若期では成熟期，老齢期に比べ円形に近い，より大きな骨吸収窩が多くみられ，成熟期，老齢期では細長いものが多かった．

(3) 結果は，破骨細胞は幼若期で成熟期，老齢期に比べ，より活性の高いものが多いことを示唆する．

以上の発表に対して，生体医工学講座安田和則教授から，骨吸収窩の深さの測定方法，深さと破骨細胞の移動との関係について，生体機能構造学講座阿部和厚教授から画像解析の具体的方法，および骨吸収と骨粗鬆症との関連について，主査の金田清志教授から破骨細胞の活性と骨吸収窩の深さの加齢変化について，他の出席者から椎骨や四肢骨の骨吸収窩はどうかについて質問がなされ，申請者は自らの研究結果や過去の研究結果を引用してほぼ妥当に解答した．

本研究は，破骨細胞の機能活性の指標となりうる骨吸収窩の深さをはじめて計測でき，加齢にともなう破骨細胞の機能活性とくに加齢変化，および老齢に多い骨粗鬆症を考えるうえで重要な所見であり，博士（医学）の学位を授与するに値する．