

破骨細胞に関する微細形態学的研究：

Xenopus laevis 破骨細胞の形態学的特徴とその核数の分布について

学位論文内容の要旨

骨や歯を吸収する破骨細胞は多核の巨細胞として知られているが、核数と吸収活性の関係については不明な点が多い。活性型ビタミン D₃ と副甲状腺ホルモンの共同作用による骨改造現象は進化の上では両生類からみられるため、哺乳類でみられる骨改造は系統発生的に両生類の時代に獲得した骨改造を引き継いでいると考えられる。破骨細胞は多生歯性である両生類の歯の交換時にも出現することが知られているが、その形態学的な報告は少なく、核数の分布を含めた形態学的特徴については殆ど明らかにされていない。本研究では両生類のアフリカツメガエル *Xenopus laevis* を用い、両生類の破骨細胞の形態学的特徴、特にその核数の分布を検索し、破骨細胞の核数と吸収活性との関係を明らかにすることを目的とする。

X. laevis の上顎骨を固定、脱灰後、パラフィン、テクノビット並びにエポン包埋した。パラフィン包埋試料は前頭断方向から厚さ 5 μm の連続切片を作成し、HE 染色を行い、光学顕微鏡で観察した。テクノビット包埋試料は前頭断方向から薄切しアゾ色素法を用いて TRAP 活性を検出し、核染色のためメチレンブルー染色を行い、光学顕微鏡で観察した。エポン包埋試料では厚さ 80nm の超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色後、透過型電子顕微鏡（TEM）で観察した。また、無作為抽出した 3 個の試料において前頭断方向から 0.5 μm 厚の連続準超薄切片を作製しトルイジンブルー染色後、光学顕微鏡で切片上の象牙質上に吸収窩を形成していた 181 個の細胞を破骨細胞と同定し、その細胞質中に含まれる核数を連続切片から計測した。

アフリカツメガエルの上顎骨パラフィン標本では光学顕微鏡により、多数の円錐状の歯が歯足骨を介して顎骨に骨性結合している像が観察された。それらの歯のいくつかには、歯髓腔の象牙質、歯足骨表面が破骨細胞により吸収を受けている像が観察された。破骨細胞は、吸収窩に面して刷子縁を持つ多核の巨細胞として観察された。テクノビット切片では TRAP 活性陽性を示し、超薄切片では TEM により波状縁と明帯

が認められた。核数の計測において、181 個の破骨細胞の核数の平均値は 24.1、中央値は 17、最大値は 120、10 個以下の核数を有する細胞の割合は全体の 30%であった。無作為に選んだ 3 個の試料における分布間には、クラスカル・ワールスの検定を用いた統計解析の結果、有為差は認められなかった。本研究における合計 181 個の細胞の核数の分布を、過去に報告されているヒト乳歯破歯細胞、マウス頸骨、頭蓋骨破骨細胞の核数の分布とそれぞれ Mann-Whitney の U 検定を用いた統計解析の結果、いずれにも有意差が認められた。また、連続準超薄切片上では破骨細胞の細胞質突起が、隣接する破骨細胞の細胞体や細胞質突起と連続している、細胞融合と思われる像がしばしば観察された。

本研究は両生類の *X. laevis* の破骨細胞の微細構造を初めて示したものである。本研究の結果は、過去に報告されている両生類の破骨細胞と同様であり、これらの所見は哺乳類の破骨細胞の微細構造と同じであった。それゆえ、本研究の結果は、*X. laevis* を含む両生類の破骨細胞は哺乳類の破骨細胞と同様の微細構造をもつことを示している。

TRAP 活性は哺乳類の破骨細胞の特異的な酵素活性であることが知られており、下等脊椎動物である硬骨魚類や爬虫類の破骨細胞においても同様に特異的に検出されることが報告されている。両生類の *Ambystoma mexicanum* では、破骨細胞において破骨細胞は変態中の個体のみ TRAP 活性陽性を示し、それ以外の個体では TRAP 活性陰性であることが報告されている。本研究では *X. laevis* の破骨細胞が TRAP 活性陽性であることを示した。この結果は両生類の破骨細胞において TRAP 活性が陽性であることを初めて示したものであり、*X. laevis* の破骨細胞は哺乳類や硬骨魚類、爬虫類における破骨細胞と同様の酵素活性をもつことを示唆している。

過去に本研究と同様の方法でヒトやマウスといった哺乳類の破骨細胞の核数が計測されており、その平均値と中央値は 3 から 5、最大値は 28 であり、破骨細胞の 90%以上が 10 個以下の核数を持つ細胞であることが報告されている。これらの結果を、本研究における結果と比較すると、*X. laevis* の破骨細胞の核数の平均値、中央値は大きく、10 個を越えるような核数を持つ細胞の割合が非常に高いことを示している。このことは、*X. laevis* ではヒトやマウスには殆どみられない大きな核数を持つ破骨細胞が多数存在していることを示している。本研究で得られた *X. laevis* の破骨細胞の核数分布をヒト乳歯破歯細胞とマウス破骨細胞における分布と比較した結果、これらとの間には統計学的に共に有意差を示した。これらの結果は、*X. laevis* の破骨細胞の核数が哺乳類のそれらより大きいことを示している。

本研究では *X. laevis* の破骨細胞は哺乳類のそれと同様の微細構造と TRAP 活性を有するが、核数の分布に関しては大きく異なっていることを示した。この理由につい

ては歯の交換様式の差異が考えられる。ヒトは二生歯性であり、第一生歯である乳歯の歯根は破歯細胞による吸収と休止を繰り返しながら吸収され脱落に至るまでに数年を経るが、*X. laevis* を含む両生類は多生歯性であり、脱落の際には機能歯の歯髓腔内面と歯足骨部分が破骨細胞により吸収され歯が脱落する。*X. laevis* では脱落する歯の吸収が開始してから脱落に至るまでの期間は約 48 時間と報告されており、それはヒト乳歯と比較して極端に短時間である。ヒト乳歯ではこのように吸収期間が長いことから、乳歯歯根吸収面においてはしばしばセメント質様硬組織による吸収面の修復像が観察されるが、*X. laevis* では象牙質、歯足骨吸収面に修復硬組織は観察されなかった。これらの結果は *X. laevis* の脱落歯において破骨細胞によって吸収された面は修復されることなく、歯が脱落するまでの短期間に高い吸収活性が休止することなく継続していることを示唆している。

破骨細胞は細胞分裂ではなく細胞融合によりその核数を増加させていくことが知られているが、このような細胞融合像はヒト乳歯歯根吸収面には稀にしか観察されないことが報告されている。本研究では、*X. laevis* の多くの破骨細胞において、細胞融合像と推測される所見が認められ、細胞融合が哺乳類と比較して高い頻度で生じていることが示唆された。本研究で観察した *X. laevis* の脱落歯の吸収部位では非常に短期間の間に活発な吸収状態が持続しており、このためヒト乳歯歯根吸収面に比べてより多くの破骨細胞が細胞融合し、その結果核数が増加したと考えられる。本研究の結果から、吸収活性と核数の関係について、高い吸収活性を維持する部位では多くの破骨細胞に細胞融合が生じ、核数が増加することが示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久
副 査 教 授 脇 田 稔
副 査 教 授 吉 田 重 光

学 位 論 文 題 名

破骨細胞に関する微細形態学的研究：

Xenopus laevis 破骨細胞の形態学的特徴とその核数の分布について

審査は吉田、脇田および小口審査委員それぞれ個別に実施し、学位申請者に対して提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

学位申請者は、両生類のアフリカツメガエル *Xenopus laevis* を用い、両生類の破骨細胞の形態学的特徴、特にその核数の分布の検索を行った。*X. laevis* の上顎骨を固定、脱灰後、テクノビット並びにエポンで包埋した。テクノビット包埋試料は前頭断方向から薄切し、アゾ色素法を用いて TRAP 活性を検出し、光学顕微鏡で観察した。エポン包埋試料では厚さ 80nm の超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。また、無作為抽出した 3 個の試料において前頭断方向から 0.5 μ m 厚の連続準超薄切片を作製しトルイジンブルー染色後、光学顕微鏡で切片上の象牙質上に吸収窩を形成していた 181 個の細胞を破骨細胞と同定し、その細胞質中に含まれる核数を連続切片から計測した。

以上の方法によって得られた結果は次のとおりである。TRAP 活性は陽性を示し、TEM により波状縁と明帯が認められた。これらの所見は、過去に報告されている両生類の破骨細胞と同様であり、それは哺乳類の破骨細胞の微細構造と同じであった。したがって、*X. laevis* を含む両生類の破骨細胞は哺乳類の破骨細胞と同様の微細構造および酵素活性をもつことが示唆された。

核数の計測において、181 個の破骨細胞の核数の平均値は 24.1、中央値は 17、最大値は 120、10 個以下の核数を有する細胞の割合は全体の 30% であった。過去に本研究と同様の方法で計測された、ヒト乳歯破歯細胞、マウス顎骨、頭蓋骨破骨細胞の核数の平均値と中央値と比較すると、*X. laevis* の破骨細胞の核数の平均値、中央値は大きく、10 個を越えるような核数を持つ細胞の割合が非常に高く、*X. laevis* ではヒト

やマウスには殆どみられない大きな核数を持つ破骨細胞が多数存在していることを示された。本研究で得られた *X. laevis* の破骨細胞の核数分布はヒト乳歯破骨細胞とマウス破骨細胞における分布との間に統計学的有意差があり、よって、*X. laevis* の破骨細胞の核数が哺乳類のそれらより大きいことが示された。

X. laevis の破骨細胞は哺乳類のそれと同様の微細構造と TRAP 活性を有するが、核数の分布に関して大きく異なっている理由については歯の交換様式の差異が考えられる。ヒトは二生歯性であり、第一生歯である乳歯の歯根は吸収され脱落に至るまでに数年を経るが、*X. laevis* は多生歯性であり、歯が吸収され、脱落するまでの期間は約 48 時間と報告されており、ヒト乳歯と比較して極端に短時間である。ヒト乳歯では歯根吸収面においてはしばしばセメント質様硬組織による吸収面の修復像が観察されるが、*X. laevis* では象牙質、歯足骨吸収面に修復硬組織は観察されなかった。この結果は *X. laevis* の脱落歯において、破骨細胞によって吸収された面は修復されることなく、高い吸収活性が休止することなく継続していることを示唆している。

また、連続準超薄切片上では破骨細胞の細胞質突起が、隣接する破骨細胞の細胞体や細胞質突起と連続している、細胞融合と思われる像がしばしば観察された。このような細胞融合像はヒト乳歯歯根吸収面には稀にしか観察されないことが報告されている。したがって、*X. laevis* の多くの破骨細胞において、細胞融合が哺乳類と比較して高い頻度で生じていることが示唆された。本研究で観察した *X. laevis* の脱落歯の吸収部位では非常に短期間の間に活発な吸収状態が持続しており、このためヒト乳歯歯根吸収面に比べてより多くの破骨細胞が細胞融合し、その結果核数が増加したと考えられる。本研究の結果から、吸収活性と核数の関係について、高い吸収活性を維持する部位では多くの破骨細胞に細胞融合が生じ、核数が増加することが示唆される、としている。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われた。主な質問の内容を以下に示す。

1. 両生類の破骨細胞の特徴と哺乳類との比較
2. 実験材料として *Xenopus laevis* を選択した理由とその特徴
3. 破骨細胞が多核であることの意味
4. 破骨細胞の TRAP に対する反応の系統発生的相違

これらの質問に対しそれぞれ適切な回答が得られ、下等脊椎動物である両生類 *X. laevis* の破骨細胞の形態学的特徴、特にその核数を初めて明らかにしたことについて評価された。さらに学位申請者は、他の下等脊椎動物における破骨細胞の形態学的検索などさらに詳細な解析の準備を進めており、将来の展望についても評価された。

したがって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に相応しい者と認められた。