

学 位 論 文 題 名

Growth and development of the cranial base of
BALB/*c-bm/bm* mouse
- Histological study -

(BALB/*c-bm/bm* マウスにおける頭蓋底の成長発育 - 組織学的検討 -)

学位論文内容の要旨

【目的】BALB/*c-bm/bm* マウスは、先天的に短肢症を生じる C57BL-*bm/bm* マウスと BALB/*c* 系マウスを自然交配して BALB/*c* 系マウスに *bm* (brachymorphism) 遺伝子を導入し、短肢症を生じさせたものである。この短肢症は軟骨のグリコサミノグリカンの低硫酸化に起因することが知られている。これまで、*bm* 遺伝子をもつマウスの成長発育に関する研究は C57BL 系マウスなどでは行われてきたが、BALB/*c-bm/bm* マウスにおける頭蓋の成長発育については報告されていない。我々は以前に同マウスの顎顔面所見を調査し、特に後頭蓋長径が短いことを生体計測およびオートガイ頭頂法 X 線写真計測により明らかにした。またこの BALB/*c-bm/bm* マウスのうち約 10% のものが不正咬合（前歯部の水平（左右）的交叉咬合）を自然発症することを見出した。しかしその不正咬合発症のメカニズムはおろか、BALB/*c-bm/bm* マウスの頭蓋顎顔面の成長が劣っている原因さえ未だ不明である。そこで本研究は、顎顔面頭蓋部の growth center である蝶後頭軟骨結合に着目し、まずは不正咬合を発症していない BALB/*c-bm/bm* マウスの蝶後頭軟骨結合部における成長発育を観察することを目的として組織形態学的研究を行った。

【資料及び方法】BALB/*c+/+* マウス（以下、対照マウス）、不正咬合を発症していない BALB/*c-bm/bm* マウス（以下、短肢症マウス）の 2 群において、各群 2、4、6、8 週齢（各 $n=5$ ）の頭蓋骨を固定脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、厚さ $5\mu\text{m}$ の矢状断連続切片を作製した。まず蝶後頭軟骨結合とその周囲組織での組織形態学的特徴を確認するために、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。光学顕微鏡下にて蝶後頭軟骨結合部の観察を行うとともに、後頭蓋底長径、すなわち蝶形骨底部前後径（蝶形骨間軟骨結合-蝶後頭軟骨結合間距離）および後頭骨底部前後径（蝶後頭軟骨結合-大後頭孔最前方点）の計測を行い、さらに蝶後頭軟骨結合部周囲に形成された骨形成率（一定の骨表面距離の骨領域に占める形成された骨の面積の割合（%））を NIH image を用いて蝶形骨の 3 か所にて計測した。前後径および骨面積の平均値の群間比較検定には、2 群での unpaired t-test を用いた。

次に、蝶後頭軟骨結合部の軟骨基質の硫酸化の程度を確認するために、成長期である 4 週齢のマウス（各群 $n=5$ ）を用い、通法に従いパラフィン包埋後、厚さ $5\mu\text{m}$ の矢状断連続切片を作成し、まずコンドロイチン硫酸の硫酸化の程度を確認するためにアルシアンブルー-臨界電解質濃度法染色を、さらにケラタン硫酸の硫酸化の程度を確認するためにウシ睾丸ヒアルロニダーゼ消化後および未消化の増感高鉄ジアミン染色を行った。

【結果】(1) 対照マウスの蝶後頭軟骨結合では、いずれの週齢においても、中央より両側性 resting zone, proliferative zone, hypertrophic zone, calcifying zone と順次移行する軟骨柱構造が認められ、活発な軟骨内骨化が営まれていた。また、週齢が増すにつれて、軟骨結合部の前後的な幅が小さくなっていた。一方、短肢症マウスの蝶後頭軟骨結合では、個々の軟骨細胞は大きさも配列も不規則であり、対照マウスで認められたような軟骨柱構造は認められなかった。また、対照マウスと比べ、calcifying zone および骨梁は乏しく、正常な軟骨内骨化は認められず、軟骨部分の外形及び厚みは不規則であるとともに、軟骨結合部の上下辺縁部は骨質で覆われていた。また週齢を増すにつれ、軟骨結合部が上下的に長くなっていた。(2) 対照マウスに比べ、短肢症マウスでは、すべての週齢において蝶形骨底部前後径および後頭骨底部前後径が有意に短く、蝶形骨での単位面積当たりの骨形成量が有意に少なかった。また、3つの部位間での骨形成量の差は対照マウス、短肢症マウスともに認められなかった。(3) 対照マウスに比べ、短肢症マウスでは、蝶後頭軟骨結合部のコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸の染色性は弱かった。

【考察】BALB/c-bm/bm マウスの蝶後頭軟骨結合では、軟骨基質が低硫酸化していたこと、軟骨の細胞の大きさや配列が乱れており、正常な軟骨内骨化が営まれていなかったことにより、軟骨結合での成長が正常に起こらず、頭蓋の前後的成长が劣っていたと考えられた。また、軟骨結合部の上下辺縁部が骨質で覆われていたことは、軟骨結合部での軟骨内骨化の方向が乱れていたために、前後方向だけでなく、軟骨結合部を中心としたあらゆる方向に向けて軟骨内骨化が起こったことを示唆する。また、結合部の上下辺縁部が骨質で覆われていたことが、頭蓋の前後的成长を二次的に抑制したと推測される。また、蝶後頭軟骨結合の周囲の骨形成率が有意に少なかったことより、頭蓋底の膜性骨化も正常に行われていない可能性も示唆された。

【結論】BALB/c-bm/bm マウスでは、蝶後頭軟骨結合部での軟骨基質の低硫酸化が認められた。これは、両極性の軟骨柱構造が失われ正常な軟骨内骨化が営まれないことに関連しており、その結果として頭蓋底の前後的成长が劣っているということが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

Growth and development of the cranial base of BALB/*c-bm/bm* mouse - Histological study -

(BALB/*c-bm/bm* マウスにおける頭蓋底の成長発育 -組織学的検討-)

審査は全審査担当者と申請者が一同に会して口頭試問の形式によって行われた。

まず論文の概要の説明を求めるとともに適宜解説を求め、次いでその内容および関連分野について試問した。

申請者から、まず以下のような説明がなされた。

BALB/*c-bm/bm* マウスは先天的に短肢症を生じ、軟骨のグリコサミノグリカンの低硫酸化に起因することが知られている。我々は以前に同マウスの顎顔面所見を調査し、特に後頭蓋長径が短いことを生体計測およびオートガイ頭頂法 X 線写真計測により明らかにした。しかし BALB/*c-bm/bm* マウスの頭蓋顎顔面の成長が劣っている原因は未だ不明である。

そこで本研究は、顎顔面頭蓋部の growth center である蝶後頭軟骨結合に着目し、同部における成長発育を観察することを目的として組織形態学的研究を行った。

BALB/*c-+/+*マウス（以下、対照マウス）、BALB/*c-bm/bm* マウス（以下、短肢症マウス）の2群において、各群2、4、6、8週齢（各 $n=5$ ）の頭蓋骨を固定脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、厚さ $5\mu\text{m}$ の矢状断連続切片を作製した。ヘマトキシリン-エオジン染色、アルシアンブルー-臨界電解質濃度法染色、ウシ辜丸ヒアルロニダーゼ消化後および未消化の増感高鉄ジアミン染色を行い、光学顕微鏡下にて蝶後頭軟骨結合部の観察と軟骨基質の硫酸化の程度の確認を行うとともに、後頭蓋底長径、すなわち蝶形骨底部前後径（蝶形骨間軟骨結合-蝶後頭軟骨結合間距離）および後頭骨底部前後径（蝶後頭軟骨結合-大後頭孔最前方点）の計測を行い、さらに蝶後頭軟骨結合部周囲に形成された骨形成率（一定の骨表面距離の骨領域に占める形成された骨の面積の割合（%））を NIH image を用いて蝶形骨の3か所にて計測した。そして以下の結果を得た。

(1) 対照マウスの蝶後頭軟骨結合では、いずれの週齢においても、中央より両側性に resting zone, proliferative zone, hypertrophic zone, calcifying zone と順次移行する軟骨柱構造が

認められ、活発な軟骨内骨化が営まれていた。また、週齢が増すにつれて、軟骨結合部の前後的な幅が小さくなっていた。一方、短肢症マウスの蝶後頭軟骨結合では、個々の軟骨細胞は大きさも配列も不規則であり、対照マウスで認められたような軟骨柱構造は認められなかった。また、対照マウスと比べ、*calcifying zone* および骨梁は乏しく、正常な軟骨内骨化は認められず、軟骨部分の外形及び厚みは不規則であるとともに、軟骨結合部の上下辺縁部は骨質で覆われていた。

(2) 対照マウスに比べ、短肢症マウスでは、すべての週齢において蝶形骨底部前後径および後頭骨底部前後径が有意に短く、蝶形骨での単位面積当たりの骨形成量が有意に少なかった。また、3つの部位間での骨形成量の差は対照マウス、短肢症マウスともに認められなかった。

(3) 対照マウスに比べ、短肢症マウスでは、蝶後頭軟骨結合部のコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸の染色性は弱かった。

以上から、BALB/c-*bm/bm* マウスでは、蝶後頭軟骨結合部での軟骨基質の低硫酸化が認められ、それが、両極性の軟骨柱構造が失われ正常な軟骨内骨化が営まれないことに関連しており、その結果として頭蓋底の前後的成長が劣っているということが示唆された。また、軟骨結合部の上下辺縁部が骨質で覆われていたことは、軟骨結合部での軟骨内骨化の方向が乱れていたために、前後方向だけでなく、軟骨結合部を中心としたあらゆる方向に向けて軟骨内骨化が起こったことを示唆する。また、結合部の上下辺縁部が骨質で覆われていたことが、頭蓋の前後的成長を二次的に抑制したと推測される。また、蝶後頭軟骨結合の周囲の骨形成率が有意に少なかったことより、頭蓋底の膜性骨化も正常に行われていない可能性も示唆された。

以上の論述に引き続き以下の項目を中心に口頭試問を行った。

1. 軟骨内骨化について
2. 本マウスに不正咬合が発生する理由について
3. 本マウスにおけるメッケル軟骨、下顎頭軟骨の形成について
4. 軟骨基質の低硫酸化が軟骨内骨化に及ぼす影響について
5. 今後の展開について

これらの試問に対して申請者は明快な回答、説明を行った。

本研究は不正咬合を自然発生することで注目される BALB/c-*bm/bm* マウスにおいて、頭蓋の前後的な劣成長が生じている原因について、組織学的、組織化学的に明らかにしたものである。本研究から得られた結果は、不正咬合の発生原因の解明に有用な実験動物の詳細を明らかにすることにより、今後の歯科矯正学の発展のために重要な情報を与えたものと高く評価できる。加えて、基礎歯科医学にも、軟骨内骨化に対して基質が硫酸化していることの重要性について、重要な情報を提供したものと高く評価できる。更に、試問の内容から、学位申請者は、本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野に幅広い学識を有していると認められた。また研究の将来展望に関しても、本研究を基にして今後益々発展して行く可能性が高いものと評価された。よって審査担当者全員は、申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。