

形成期骨端軟骨基質の線維構造

矢 嶋 俊 彦 小 沢 英 浩 小 林 茂 夫

新潟大学歯学部口腔解剖学第2教室 (主任 小林茂夫教授)

(昭和47年5月8日受付)

Fibrous Structures seen in the Matrix of Developing Epiphyseal Cartilage

Toshihiko YAJIMA, Hidehiro OZAWA & Shigeo KOBAYASHI

*Department of 2nd Oral Anatomy, Niigata University School of Dentistry
(Director: Prof. Shigeo Kobayashi)*

緒 論

近年、電子顕微鏡による生物組織の研究過程で、電顕用に樹脂包埋した試料を 1μ 位の薄切片にし、通常 Toluidine blue による染色を施した後、あらかじめ光顕的に観察する方法が行なわれている。

著者らは、骨端軟骨における石灰化機構の解明に関連して、ムコ多糖類の染色性、消長等について光顕的・電顕的に観察してきたが¹⁾、その過程で、形成期骨端軟骨の Epon 樹脂包埋した 1μ 薄切片中に、従来報告のみられない線維構造が軟骨の細胞間の基質に出現することを認めた。

今回、その線維構造について組織化学的、並びに電顕的に観察して多少の新知見を得たので報告する。

研究材料および方法

本研究に使用した材料は、生後1~7日の rat 大腿骨骨端軟骨である。まず膝関節を分離した後、大腿骨下骨端軟骨を骨長軸方向に $1\sim 2\text{ mm}$ 厚に縦断し、2.5% glutaraldehyde (in 0.1 M phosphate buffer, pH7.4) で1.5~2時間、4°Cで単独固定、または1.5~2時間、4°Cで1% OsO_4 (in the same buffer) との二重固定した。その後通法に従い、ethanol 系列による脱

水、propylene oxide を経て Epon 812 で包埋した。なお一部は、glutaraldehyde- OsO_4 二重固定し、ethanol 脱水後、2% phosphotungstic acid (PTA) (in 100% ethanol) で1.5~2時間室温でblock stainingし、100% ethanol ですすいだ後、Epon 包埋した。

薄切片($1\sim 2\mu$)は Toluidine blue (TB) (pH 4.5, pH 7.0) 染色、Periodic acid methenamine silver (PAM) 染色²⁾³⁾、Methylene blue (MB) 染色、Bielschowsky-Gomori 細網線維渡銀法⁴⁾ (Epon 切片用にやや modified した) を施し、光顕で観察した。

また、光顕的に線維構造が観察された部位と連続した超薄切片を作り、鉛染色またはウラン-鉛染色をして、日立 HU-11DS の電子顕微鏡で観察した。

結 果

形成期骨端軟骨の Epon 切片を TB 染色して観察すると、pH 4.5 の TB では細胞はほとんど染色されず、pH 7.0 の TB では細胞は青色に染色される (図2)。一方、基質は両者で metachromasia を示し、hypertrophic zone で強い metachromasia が認められた¹⁾⁵⁾。この metachromasia を示す基質の中で、特に reserve cell zone の基質中に、青紫色に強染した線維構

造が観察された(図2)。

この線維構造は, reserve cell zone の中でも以下の三部位において特に顕著であった: すなわち図1に示すごとく, ①軟骨膜から軟骨芽細胞に分化した部位と, ②軟骨芽細胞の分裂・増殖の行なわれる部, それに, ③reserve cell zone から proliferative zone に移行する部位である。そして, この構造は, 軟骨芽細胞または軟骨細胞表面から放射状に発しているもの(図3, 4), 一定方向に他の細胞表面まで達しているもの(図2, 5)等, 部位によって異なる。

その走行は, 上記の①部位においては軟骨膜に対して垂直方向, ②の部位においては垂直並びに平行方向, ③の部位においては骨長軸方向であることが多かった。

この線維構造は, 生後7日位までは日数の経過とともにその数・分布を増し, 時には hypertro-

phic zone と calcified cartilage を除く形成期骨端軟骨全体に比較的規則的に観察された。生後7日を過ぎると軟骨内骨化が始まり, reserve cell zone の様相は変り, しばしば骨化点近くで青色に染色される線維が認められた。また, 生後2~3週間の epiphyseal plate (または disk) の hypertrophic zone でも, この青色に染色される線維は観察された。

PAM 染色では, 細胞内の glycogen や hypertrophic zone の変性・破壊されつつある細胞に強い反応があり, 基質における染色性は mature cell zone で弱く, hypertrophic zone になって再び強くなり, 石灰化した部分で最も強かった¹⁾。PAM 染色でも強く染め出される線維構造を, TB 染色と同様に reserve cell zone の三部位において, 基質中に認めた(図3)。

MB 染色では, 細胞はやや緑色に, 基質は青色に染色され, 線維構造は前述の同じ部位の基質中に紫青色に強染した(図4)。

Bielshowsky-Gomori 細網線維渡銀法をこの Epon 切片に試みた結果, TB 染色, PAM 染色, MB 染色で観察された線維構造は深黒色ないし灰黒色に渡銀された(図5)。

また Epon 切片の PAS 染色, Azan 染色では, この線維構造は染まらなかった。Epon 切片は, Alcian blue では染色されず, 脱 Epon した切片に Alcian blue 染色を施して, 線維構造は認められなかった。

次に, 光頭的に明らかに線維構造が観察された部位と連続した超薄切片を電顕で観察したところ, 光顕での線維構造の局在と一致する微細な線維束構造を認めた。この線維束構造は, 直径 60~200Å の一定方向に絡み合った細線維の束と, その細線維束に付着した 200~700Å 径の多糖類顆粒 (matrix granule) とからなり(図9), 軟骨芽細胞または軟骨細胞表面から発し, ほぼ放射状に時には他の細胞表面にまで達している(図6, 7, 8)。そして, これらの細線維構造は, 本質的にはその周囲の基質を構成する細線維と, matrix granules と同様な構成成分からなっている。なお, 時としてこの細線維束構造の中に 200Å ないし

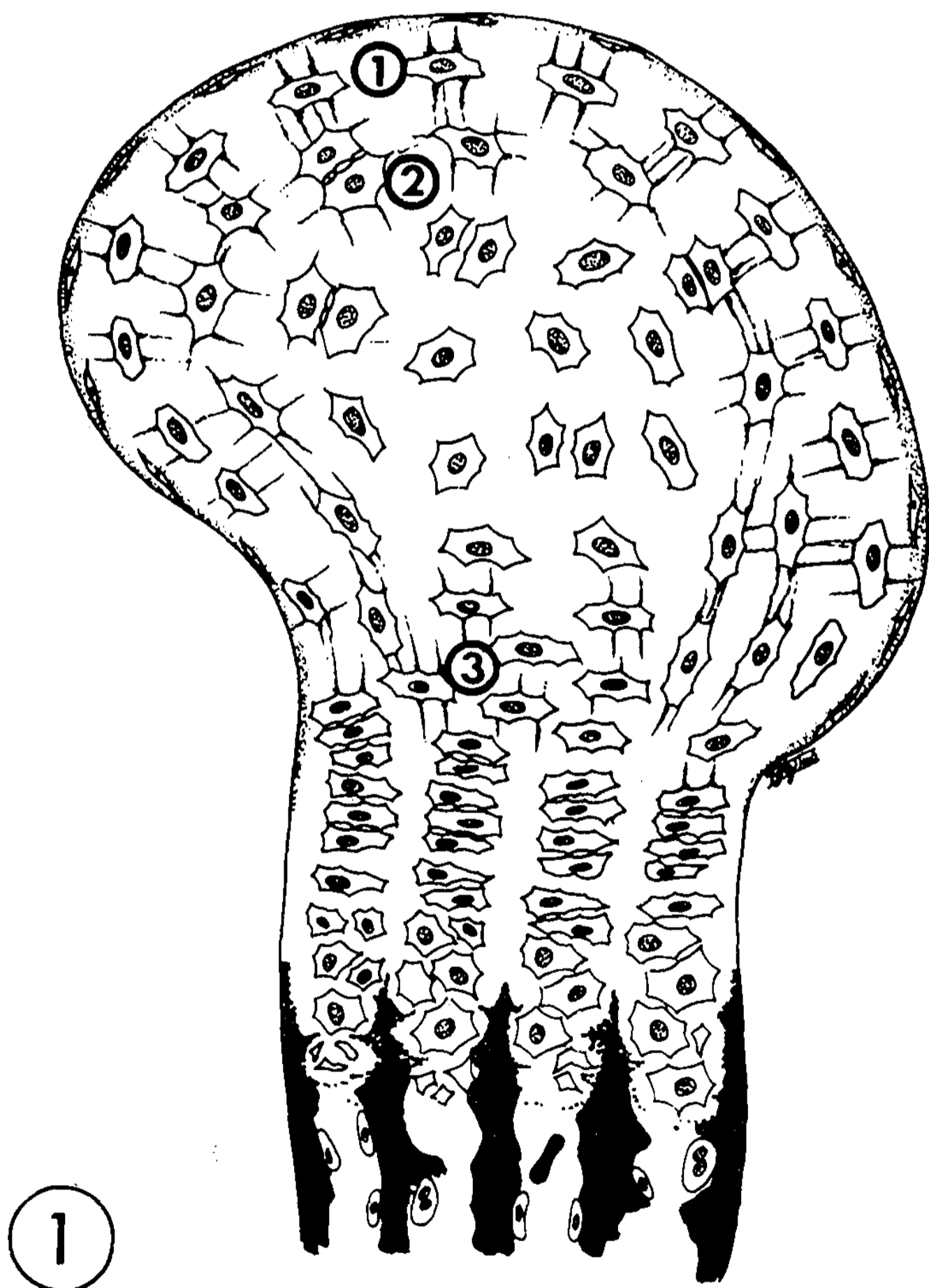


図1 形成期骨端軟骨における線維構造の分布と走行を示す模式図

線維構造は, 特に reserve cell zone の①, ②と③の三部位で顕著に認められた。

640A の banding を持った細線維も認められた。

光顕的に軟骨内骨化点や epiphyseal plate の hypertrophic zone で観察された TB で青色に強染される線維は、電顕的には 640A の banding を持った成熟した collagen fibril の束であった。

考 察

軟骨は古くからその発生や骨形成（石灰化）に関して多くのすぐれた研究がなされてきている。光顕的には Fell (1925)⁶⁾ の鶏胚脚軟骨を用いての詳細な研究等、数多くあるが、この形成期骨端軟骨基質の線維構造については記載がなく、また、組織学の代表的教科書である“A Textbook of Histology (Bloom and Fawcett)⁷⁾”, “Histology (Ham)⁸⁾” や “Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen (Bargmann)⁹⁾” の中においても記載がない。

電顕的にこれらの線維構造と関連する所見としては、Godman and Porter (1960)¹⁰⁾ が rat 胎児肢軟骨を用いて記載している、軟骨芽細胞の cytoplasmic filament から連続する “tassel of fibril”, または “sheaf of fibril” のみで、同様の構造は本研究においても部位によっては時として観察された。しかし、これは周囲に matrix granule をほとんど持たない一定方向に密に並んだ細線維束であり、今回報告する TB で青紫色に強染される、多数の matrix granules を持った細線維の絡み合った細線維束構造とは異なる。

著者らの観察した 1～7 日の rat 大腿骨骨端軟骨の Epon 包埋標本の中で、この線維構造は、その数・分布等において多少の差異はあっても、全く観察されなかったものはほとんどなかった。この構造は、大腿骨形成期骨端軟骨に限らず、他の骨の形成期骨端軟骨においても観察され、また、rat ばかりでなく mouse, ヒト胎児（3～7カ月）の形成期骨端軟骨においても認められた。

この線維構造は、電顕的所見により、軟骨芽細胞または軟骨細胞の突起や、人工産物でなく、多数の matrix granules と幼若な collagen

fibrils の集合した束状構造物であって、周囲のコンドロイチン硫酸等の酸性ムコ多糖類を含む matrix granules が TB で metachromasia や PAM 染色性を示し、幼若な collagen fibrils が TB で青色に（それ故、この線維構造は TB 染色で全体として青紫色に強染されてくる）、そして、MB 染色、Bielschowsky-Gomori 細網線維渡銀法で渡銀される。従って電顕的にも PTA で block staining されてくるものと考えられる。

また、この線維構造は生後の日数の経過とともにその数・分布を増すことから考えると、Fell⁶⁾ や Godman and Porter¹⁰⁾ 等の用いた材料が胚または胎児であり、この構造物が未だ形成されないか、あるいは、ごく限られた少部分にしか存在しないことも考えられ、今後検討しなければならない問題である。

これらの線維構造の成因・機能については明らかではないが、その走行は図 1 に示すように、reserve cell zone の①軟骨膜から軟骨芽細胞に分化した部分では軟骨膜に垂直方向、②軟骨芽細胞の分裂・増殖の行なわれる部分では軟骨膜に垂直並びに平行方向、それに③ reserve cell zone から proliferative zone に移行する部分では骨長軸方向であることから、軟骨芽細胞、または軟骨細胞の分裂・増殖による張力の結果ではないかと考えられる。このことに関して、大河原 (1960)¹¹⁾ は歯髓の Korff の線維の発生の観察で、外力（機械的な張・引力）が働かない環境にあっては線維束にならず、象牙芽細胞の伸長による張力の影響で、膠原原線維は細胞の縦軸に平行に集束成長して太くなり、Korff の線維になることを報告している。

しかし、Glücksman (1936)¹²⁾ は鶏胚脚軟骨の組織培養を行ない、外力（特に圧力と張力）の影響を Azan 染色、Hematoxylin-Eosin 染色によって組織学的に観察しているが、基質の線維構造については記載がない。

この線維構造が張力によっても他の結合組織や歯胚¹¹⁾ 等のような成熟した banding を持った collagen fiber になりにくいのは、一般に多糖

類量の多寡によるものであると云われており、ムコ多糖類が非常に多い形成期骨端軟骨においては、軟骨膜の部分を除いて collagen fibril は 640Å の banding を示さず、時にわずかに 200Å の banding が認められるだけである。軟骨内骨化点や、epiphyseal plate の hypertrophic zone でみられた TB で青色に染出される線維は、骨基質に将来埋め込まれてしまう 640Å の banding を持った成熟した collagen fiber であり、そしてそれは、石灰化の前段階として多糖類の脱却が行なわれたために、多糖類が少なくなり出現するものと考えられる。

今迄に、これらの線維構造が何故発見されなかったかについては、今回の研究が 1) Epon 包埋の 1~2μ の薄切片でなされたこと、2) glutaraldehyde 固定または、glutaraldehyde-OsO₄ 二重固定で多糖類の固定が非常に良かったこと等があげられる。

なお、この線維構造の発生、消長および機能については目下検索中である。

要 約

1) 形成期骨端軟骨基質に Toluidine blue 染色で青紫色に染出される線維構造を初めて認め、組織化学的・電顕的に観察した。

2) この線維構造は PAM 染色、Methylene blue 染色で染色され、Bielschowsky-Gomori 細網線維渡銀法で渡銀された。

3) 電顕的には、幼若の collagen fibrils とその周囲に多糖類顆粒が集合した束として、軟骨芽細胞または軟骨細胞表面から発し、時には他の細胞表面にまで達していた。

4) その成因は、細胞の分裂増殖の際の張力によるものではないかと考えられる。

本論文の要旨は、昭和47年度新潟歯学会第1回例会において発表した。

文 献

- 1) 矢嶋俊彦, 小林茂夫: 形成期骨端軟骨におけるムコ多糖類の組織化学的観察. 解剖誌, **47**: 62, 1972.
- 2) 中島興治, 金川卓郎, 森本佐喜子: Periodic Acid Methenamine silver 染色の電子顕微鏡法への応用. “電子顕微鏡試料作製法” 誠文堂新光社, 359-361, 1970.
- 3) 雨宮 璋: 半超薄切片法の硬組織の病理組織学研究への応用. “電子顕微鏡試料作製法” 誠文堂新光社, 386-387, 1970.
- 4) 佐野 豊: 組織学研究法. 第4版, 南山堂, 282-286, 1972.
- 5) 林 俊郎, 須田信之, 須賀昭一: 形成期軟骨における酸性粘液多糖体の Autoradiography と組織化学による比較観察. 歯学, **57**: 318-319, 1969.
- 6) Fell, H. B.: The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. J. Morphol. and Physiol, **40**: 417-459, 1925.
- 7) Bloom, W. and Fawcett, D. W.: A Textbook of Histology. 9th edit., W. B. Sanders company, 212-262, 1968.
- 8) Ham, A. W.: Histology. 6th edit., J. B. Lippincott company, 374-416, 1969.
- 9) Bargmann, W.: Histologie und mikroskopisch Anatomie des Menschen. 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, 124-256, 1967.
- 10) Godman, G. C. and Porter, K. R.: Chondrogenesis, studied with the electron microscope. J. Biophysic. and Biochem. Cytol., **8**: 719-760, 1960.
- 11) 大河原真城: 歯髓の結合組織線維の発生. 解剖誌, **35**: 64-74, 1960.
- 12) Glücksmann, A.: Studies on bone mechanics in vitro. II. The role of tension and pressure in chondrogenesis. Anat. Rec., **73**: 39-55, 1939.

付 図 説 明

図 2, 3, 4, 5 線維構造を示す Epon 薄切片の光顕写真

図 2 Toluidine blue (pH 7.0) 染色, ($\times 650$)

図 3 PAM 染色 ($\times 650$)

図 4 Methylene blue 染色 ($\times 1600$)

図 5 Bielschowsky-Gomori 細網線維渡銀法 ($\times 1600$)

図 6, 7, 8 細線維束構造を示す電顕写真

PTA block-staining, ウラン-鉛染色, 矢印は細線維束構造を示す

図 6 ($\times 2600$)

図 7 ($\times 3100$)

図 8 ($\times 5200$)

図 9 細線維束構造の高倍電顕写真

ウラン-鉛染色, 矢印間は細線維束構造を示す ($\times 51300$)

