

カ ジ サザッド ホセイン

氏 名 KAZI SAZZAD HOSSAIN
学 位 博 士 (歯学)
学 位 記 番 号 新大院博 (歯) 第 16 号
学位授与の日付 平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 3 条第 3 項該当
博 士 論 文 名 Histochemical Evidences on the Chronological Alterations of the Hypertrophic Zone of Mandibular Condylar Cartilage (下顎頭軟骨の肥大細胞層における成長変化に関する組織化学的研究)

論文審査委員 主査 教授 前田 健康
副査 教授 高木 律男
教授 織田 公光

博士論文の要旨

【緒言】

胎生期の骨端軟骨における軟骨細胞は分化に応じて規則正しく配列し、その形態と機能から静止層、増殖層、肥大細胞層に分けることができる。それに対して下顎頭軟骨の軟骨細胞の層構造については未だ定説がない。様々な分類がなされる中で、肥大細胞層は大型の軟骨細胞が特徴的であることから、多くの研究者が一致して認める唯一の層である。

細胞外基質の構成成分に関しては、骨端軟骨の関節表面はアルカリフォスファターゼを欠き、肥大細胞層においてはアルカリフォスファターゼ活性とオステオポンチンの合成が著明に認められる。骨端軟骨の関節表面は I 型コラーゲンが欠如するが、これに相当する下顎頭軟骨の層では豊富に存在する。I 型コラーゲンはまた、骨端軟骨と下顎頭軟骨の両方で、肥大細胞層の最も下層の最終分化した軟骨細胞に発現している。X 型コラーゲンも両者の肥大細胞層にともに認められる。これらのことから下顎頭軟骨の肥大細胞層では、その細胞外基質の構成成分は骨端軟骨と同じであるのかもしれない。しかしながら、下顎頭軟骨は成長過程で形態学的に変化し、細胞外基質の構成成分も変化する可能性も示唆されている。

近年、骨の発生や骨関節症などの疾患におけるアポトーシスの重要性が着目されている。下顎頭軟骨と骨端軟骨では、軟骨細胞のアポトーシスの存在や役割については未だ不明である。特に発育過程の下顎頭軟骨における形態学的変化を観察した研究は非常に少なく、様々な動物で下顎頭軟骨の胎生および生後の組織像が検索されてきたが、肥大細胞層については不明であった。

本研究では成長過程のマウス下顎頭軟骨肥大細胞層におけるアルカリフォスファターゼ、I 型コラーゲン、X 型コラーゲン、オステオポンチン、アポトーシスを組織化学的に検索することにより、肥大細胞層の生物学的意義を検討した。

【方法】

実験動物には生後 3、7、14、21 日齢の ICR マウスを用い、4%パラホルムアルデハイド液にて灌流固定後、顎関節を一塊として取り出し、同固定液にて一晚浸漬固定を行

った。10%EDTAにて脱灰の後、連続矢状断パラフィン切片を作成し、アルカリフォスファターゼ、I型コラーゲン、X型コラーゲン、オステオポンチン、PCNAの各々に対する抗体を用いて免疫染色を行った。また、Von Kossa染色を施した未脱灰切片にて石灰化軟骨基質を観察した。アポトーシスの検出にはTUNEL法を用いた。さらに、2.5%グルタルアルデヒド液にて灌流固定、5%EDTAにて脱灰した試料を樹脂包埋し、100nmの超薄切片を作成して、透過型電子顕微鏡観察に供した。

【結果および考察】

下顎頭軟骨の線維層は骨端軟骨のarticular zoneやarticular layer、resting zoneに相当し、この線維層と肥大細胞層はX型コラーゲンの免疫組織化学により明確に区別することができた。興味深いことに、下顎頭全体におけるX型コラーゲン陽性の肥大細胞層の割合は生後3日および7日の早期に高く、成長に伴って減少した。早期の肥大細胞層におけるいくつかの細胞は、小型で増殖細胞核抗原(PCNA)を有し、成長に伴いこれらの細胞は大型化し、典型的な肥大化軟骨細胞の形態を示すようになった。肥大軟骨細胞は細胞分裂しないことが知られているが、今回の結果から、早期においては細胞増殖能をもつことが示唆された。

また、TUNEL陽性細胞が生後3日目の肥大細胞層の上層と下層の両方で観察された。7日目では上層にわずかな反応が見られるのみとなり、これ以降には認められなかった。透過型電子顕微鏡観察により、生後3日目の肥大軟骨細胞には核濃縮や細胞質の空胞化などアポトーシスに特有の構造が確認された。

肥大細胞層の組織学的変化はアポトーシスのみでなく、軟骨基質にも見られた。軟骨の石灰化や軟骨細胞の分化に関与するアルカリフォスファターゼとオステオポンチン、およびI型コラーゲンの下顎頭軟骨肥大細胞層における分布は、早期にはほとんど認められず、後期では豊富に存在していた。軟骨基質には早期では島状の石灰化が散在したが、後期になるにつれてその量が増加し、連続的になった。後期の肥大細胞層において、アルカリフォスファターゼはオステオポンチンに先行して認められたことから、他の軟骨の報告と同様に、下顎頭軟骨においてもアルカリフォスファターゼが石灰化により関係しているのかもしれない。

以上から、早期の下顎頭軟骨肥大細胞層におけるアルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、I型コラーゲンの一時的な出現は、その成長変化を反映しており、アポトーシスとともに下顎頭軟骨の成長過程における生理学的現象であることが示唆された。

審査結果の要旨

顎関節は下顎骨と側頭骨の間に構成される両側性の滑膜性関節である。この関節は四肢の他の関節とはさまざまな点で異なっていることが知られている。通常、四肢の関節の骨端軟骨における軟骨細胞は分化に応じて規則正しく配列し、その形態と機能から静止層、増殖層、肥大細胞層に分けられる。しかしながら、下顎頭軟骨の軟骨細胞の層構造については定説がなく、さまざまな分類が発表されている。また、下顎頭軟骨は成長過程で形態学的に変化し、細胞外基質の構成成分も変化する可能性も示唆されている。さらに、近年、骨の発生や骨関節症などの疾患におけるアポトーシスの重要性が注目されているが、下顎頭軟骨と骨端軟骨では、軟骨細胞のアポトーシスの存在や役割については未だ不明である。特に発育過程の下顎頭軟骨における形態学的変化を観察した研究は非常に少ない。本研究では成長過程のマウス下顎頭軟骨肥大細胞層におけるアルカリフォスファターゼ、I型コラーゲン、X型コラーゲン、オステオポンチン、アポトーシスを組織化学的に検索することにより、下顎頭軟骨、特に肥大細胞層の生物学的意義を検討している。

実験動物として生後3、7、14、21日齢のICRマウスを用いている。通法に従い、連

続矢状断パラフィン切片を作成し、アルカリフォスファターゼ、I型コラーゲン、X型コラーゲン、オステオポンチン、増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫染色にて検出し、Von Kossa 染色により石灰化軟骨基質を観察し、TUNEL 法を用いてアポトーシスの検出を試みている。さらに、透過型電子顕微鏡観察も行っている。

下顎頭軟骨の線維層と肥大細胞層は X 型コラーゲンの免疫組織化学により明確に区別することができ、下顎頭全体における X 型コラーゲン陽性の肥大細胞層の割合は生後 3 日および 7 日に高かったが、成長に伴って減少していた。早期の肥大細胞層のいくつかの細胞は小型で PCNA 陽性を示し、成長に伴いそれらの細胞は大型化し、典型的な肥大化軟骨細胞の形態を示すようになった。今回の結果から、早期においては細胞増殖能をもつことが示唆された。また、TUNEL 陽性細胞が生後 3 日目の肥大細胞層の上層と下層の両方で観察されたが、7 日目では上層にわずかな反応が見られるのみとなり、これ以降には認められなかった。透過型電子顕微鏡観察では生後 3 日目の肥大軟骨細胞には核濃縮や細胞質の空胞化などアポトーシスに特有の構造が確認された。

さらに肥大細胞層の組織学的変化はアポトーシスのみでなく、軟骨基質にも見られた。軟骨の石灰化や軟骨細胞の分化に関与するアルカリフォスファターゼとオステオポンチンおよび I 型コラーゲンは早期の下顎頭軟骨肥大細胞層にはほとんど認められず、後期では豊富に存在するようになった。軟骨基質には早期では島状の石灰化が散在したが、後期になるにつれてその量が増加し、連続的になった。後期の肥大細胞層において、アルカリフォスファターゼはオステオポンチンに先行して認められたことから、下顎頭軟骨においてもアルカリフォスファターゼが石灰化に強く関係していることが示唆された。

以上のように、早期の下顎頭軟骨肥大細胞層におけるアルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、I 型コラーゲンの一過性の出現は肥大細胞層の成長変化を反映しており、アポトーシスとともに下顎頭軟骨の成長過程における生理学的現象であることが示した点に、本論文の価値を認める。