

鶏脛骨軟骨異形成症に関する組織化学的研究

池田 祥

新潟大学大学院自然科学研究科
博士後期課程 生命・食料科学専攻

目次

	頁
第 1 章 序論・・・・・・・・・・・・・・・・	1
第 2 章 鶏脛骨軟骨異形成症へのメカニカルストレスの影響 響・・・・・・・・・・・・・・・・	6
第 3 章 成長板における免疫組織化学的観察・・・・・・・・	15
第 4 章 TD 病変における軟骨内骨化の初期石灰化	
第 1 節 TD 病変の軟骨細胞の細胞死について・・・・・・・・	25
第 2 節 軟骨基質の石灰化と破骨細胞・・・・・・・・	34
第 5 章 総括・・・・・・・・・・・・・・・・	41
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・	49

第 1 章 序論

ニワトリの深刻な疾病のひとつとして、脚弱（Leg Weakness）が知られている。脚弱は、主に脛骨近位端の脆弱化により、脛骨の骨折を引き起こし、起立困難となる疾病であり、肉用鶏（ブロイラー）の約 5% で発症する（図 1）（Cook, 2000）。脚弱を発症したニワトリは、餌の摂取が困難となり、成長が著しく遅延する。その結果、脚弱のニワトリは廃用淘汰の対象となり、養鶏産業に多大な経済的損失をもたらしている（Poulos et al., 1978; Knowles et al., 2008）。その損失額は、日本国内では年間 50 億円、米国で 140 億円にまで達している（Cook, 2000）。

脚弱の原因として、ビタミン D 欠乏、ウィルスの関節への感染などが示唆されているが、脛骨近位端の軟骨内骨化不全による脛骨軟骨異形成 (Tibial Dyschondroplasia: TD) が主たる原因であることが明らかにされている（Farquhason et al., 1992）。TD は、脛骨近位端の成長板に軟骨塊が蓄積して石灰化が阻害された結果、骨強度の低下をもたらし、脚弱に至る。この疾病は、幼雛期において急速な成長を示すブロイラーで頻発し、七面鳥やアヒルなどにも発症することが知られている（Hargest et al., 1985a; Orth and Cook, 1994）。TD の病理学的特長は、前述したものに加え、成長板において血管侵入がみられないなど、いわゆる成長期における軟骨内骨化に異常をきたしたものと考えられる。

一般に骨形成には、膜性骨化と軟骨内骨化の二つの様式のあることが知られている（Ortega et al., 2004）。膜性骨化は血管がよく発達した間葉組織において生じ、未分化間葉系細胞が直接骨

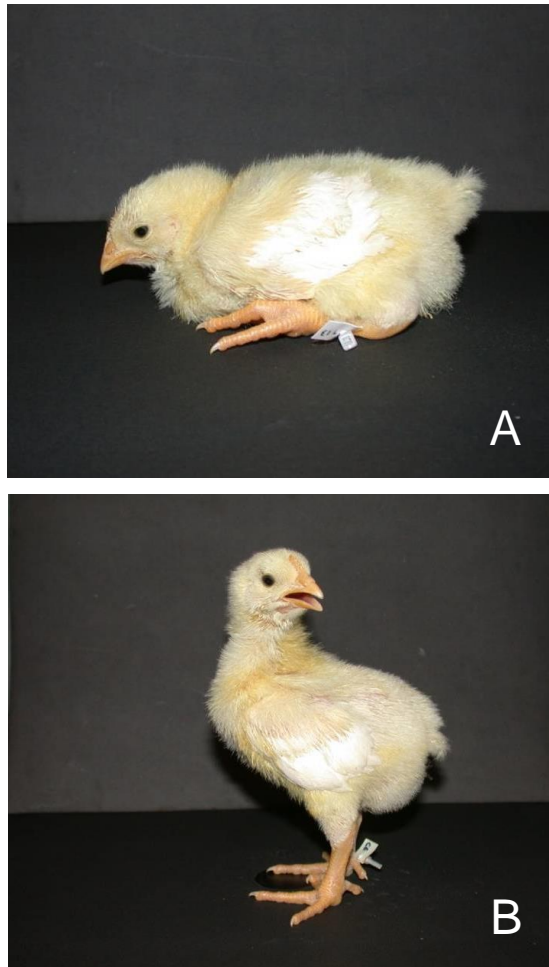


図 1.脚弱の雛と正常な雛.

脚弱の雛（A）は、起立することが極端に困難で、突っ伏した状態となり、動くことがない。

正常な雛（B）は、起立し自由に動き回る。

芽細胞へと分化して、骨基質を形成し、その後、石灰化が生じることで骨組織を形成する。膜性骨化による骨形成は、主に頭蓋冠などの扁平骨の形成においてみられる。一方、長管骨を始めとした椎骨、骨盤などの骨格の大部分では、未分化間葉系細胞が軟骨細胞に分化した後、骨へと置き換わる軟骨内骨化によって形成される。軟骨内骨化は長管骨の縦への伸長を司っており、この不全は動物における矮性、ヒトにおける低身長症を引き起こす。成長期の長管骨骨端には成長板が存在しており、ここで軟骨内骨化が起こることにより、骨は長軸方向に伸長する。骨端は、それぞれ特徴的な形態像を示す静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞から構成され、長軸方向に順次規則正しく配列している(図 2)。静止軟骨細胞層より増殖した軟骨細胞は徐々に肥大し、肥大軟骨細胞層を形成する。これらの肥大した軟骨細胞はアポトーシスによる細胞死を起こし、周囲の軟骨基質の石灰化が開始する。その後、石灰化した軟骨基質は骨端からの血管を介して運搬された破骨細胞により吸収され、骨芽細胞によって石灰化した骨が形成され、骨組織に置換される (Howlett, 1980; Wang et al., 2003)。一般に増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層を総称して、成長板と呼んでいる (Erlebacher et al., 1995)。

鳥類における長管骨骨端も、関節軟骨 (静止軟骨細胞層)・増殖軟骨細胞層・肥大軟骨細胞層・肥大軟骨細胞石灰化層に分類され、各層での軟骨の分化・成熟は上述した様式で進行していく (Praul et al., 2000)。この一連の軟骨細胞の分化には、軟骨の主成分であるコラーゲンやその分解酵素である基質分解酵素 (Matrix Metalloproteinase : MMP) が関与している。コラーゲ

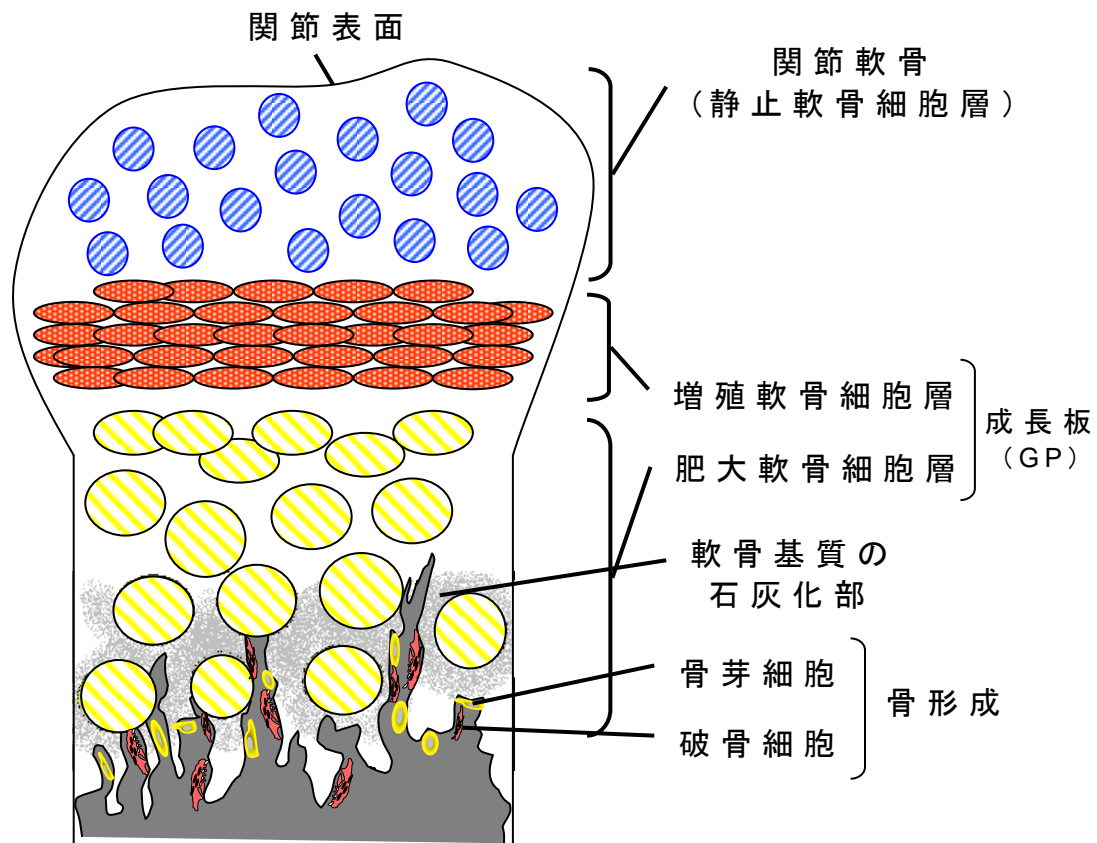


図 2. 骨端における軟骨細胞の構成.

関節表面から静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞が規則正しく骨幹に向かって整列している。軟骨内骨化においては、長軸方向に規則正しく配列した軟骨細胞が順次、関節軟骨から増殖して増殖軟骨細胞層を形成し、その軟骨細胞は徐々に肥大し、肥大軟骨細胞層を形成する。肥大した軟骨細胞はアポトーシスによる細胞死を起こし、周囲の軟骨基質の石灰化が開始される。その後、石灰化した軟骨基質は血管を介して運搬された破骨細胞により吸収され、骨芽細胞によって石灰化した骨が形成され、骨組織に置換される。

ンは骨にかかる物理的な圧力や張力、ねじれに対する耐久性を骨に付与している (Kirsch and Wuthier, 1994)。一般に骨や軟骨などの硬組織に存在するコラーゲンは、主に 7 種類で構成されている (Eyre, 2001)。I 型および III 型コラーゲンは肥大軟骨細胞層の石灰化領域に、II 型コラーゲンは増殖軟骨細胞層にそれぞれ存在し、IX・XI 型コラーゲンもそれらに伴って存在する。IX 型コラーゲンは II 型コラーゲン細線維と基質にあるプロテオグリカンとの相互作用を、XI 型コラーゲンは II 型コラーゲンの大きさの調節を行なっている。さらに、VI 型コラーゲンは、細胞周辺の基質に存在し、軟骨細胞を基質につなぎ留める働きをする (Poole, 1997)。X 型コラーゲンは肥大軟骨細胞層にあることが知られており、軟骨内骨化における軟骨細胞周囲の石灰化および血管新生に関与している (Bashey et al., 1989; Eyre, 2001)。これらのコラーゲンの特異的な局在性から、II 型コラーゲンは増殖軟骨細胞層、X 型コラーゲンは肥大軟骨細胞層のマーカーとして研究に用いられている (Reginato et al., 1998; Webster et al., 2003)。また、プロテオグリカンはコアタンパク質とグリコサミノグリカンが共有結合した構造を有している糖タンパク質であり、骨や軟骨における細胞の分化や石灰化を調整している。グリコサミノグリカンはコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンおよびヒアルロン酸に分類される。軟骨における主要なグリコサミノグリカンはケラタン硫酸やコンドロイチン硫酸であり、これらのグリコサミノグリカンを構成要素にもつプロテオグリカンが豊富に含まれている (Funderburgh, 2000; Nakamura et al., 2001; Lamoureux et al., 2007)。

MMP は、細胞外基質のタンパク質分解を行なっている酵素であり、その基質特異性に応じてコラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメライシン、および膜型 MMP (MT-MMP) の 4 つに分類される (Lindy et al., 1997)。とりわけ、軟骨内骨化において重要な役割を担っているのは、MMP-2,-3,-9,-13 とされており、血管新生や軟骨の増殖、アポトーシス、さらに基質を融解させて軟骨細胞の形成に関与している (Raffetto and Khalil, 2008; Hasky-Negev et al., 2008; Vu et al., 1998)。人為的に MMP-9 や MMP-13 を欠損させたマウスにおいて、肥大軟骨細胞層が肥大して TD と類似した組織像を示すことが報告されている (Neuhold et al., 2001; Lindy et al., 1997; Stickens et al., 2004)。また、実際に TD においては、MMP-9、-13 の mRNA 発現が成長板において低下していることが示されている (Hasky-Negev et al., 2008)。さらに、TD では、成長板における血管侵入が欠如しており、これが TD 発症に関与しているとする報告もある (Wyers et al., 1991; Raffetto and Khalil, 2008)。しかしながら、軟骨内骨化における軟骨細胞の分化とその調節メカニズムは未だ不明な点が多く、ニワトリにおける TD の発症機序にも明らかにされていないのが現状である。

TD は、ブロイラーの約 5% に発症するに過ぎず、TD 発症機序解明のために恒常的に TD 病変を得ることは困難であった。しかしながら、低カルシウムや銅欠乏の飼料 (Farquharson et al., 1995)、フサリウム真菌類のマイコトキシン (Wu et al., 1993)、およびジチオカルバメート系 (Vargas et al., 1983; Rath et al., 1995) を添加した飼料でブロイラーを飼育することにより、TD

が誘発されることが示された。中でも、ジチオカルバメート系のひとつである Tetramethylthiuram disulfide(Thiram)の飼料添加は、短時間、かつ効率的に TD を誘発し、その TD 病変は自然発症したものと病理学的特徴が一致していることが明らかにされている (Orth and Cook, 1994; Rath et al., 2004; 2007a)。現在では、ブロイラーの飼料に Thiram を添加することによって人為的に TD を誘発し、TD 発症機構の解明が行なわれている (Simsa et al., 2007a)。

本研究では、ブロイラーにおける TD 発症機序の解明を目的として、以下の実験を行った。まず初めにブロイラーの特徴である急激な体重増加に着目し、メカニカルストレスが TD 発症に及ぼす影響について検討するため、体重増加の緩慢な産卵鶏ならびに制限給餌によって体重増加を緩和したブロイラーに Thiram を添加した飼料を給与して、TD を人為的に誘発し、その発症の違いについて検討を行った。その後、TD 病変の組織化学的特徴を明らかにした。

第 2 章 鶏脛骨軟骨異形成症へのメカニカルストレスの影響

緒言

第 1 章で述べたようにニワトリの疾病のひとつである脚弱は脛骨近位端の軟骨内骨化不全による TD であることが示されている (Farquharson., 1992; Cook, 2000)。TD は急速な成長を示すブロイラーの幼雛期で頻発し、七面鳥やアヒルなどにも発症することが知られている (Orth and Cook, 1994)。また、幼雛期における急速な体重増加が骨端への血管供給の妨げとなっていることや (Riddell, 1976) 体重増加に見合った骨の成長がみられず、軟骨内骨化の不均衡によって脛骨近位端の成長板に軟骨塊が蓄積し、血管侵入が生じずに石灰化が阻害された結果、発症すると考えられている (Stickens et al., 2004; 可知ら., 2007; Raffetto and Khalil, 2008)。幼雛期のブロイラーは 7 日齢以降に急速に体重が増加し、35 日齢まで急速な割合で増加していく。TD の自然発症は 2 週齢の幼雛期にみられ、急速に体重増加する期間と同じことから体重増加によるメカニカルストレスが何らかの影響を及ぼしていることが考えられている (Riddell, 1975)。一方で人為的にブロイラーに体重負荷を調節することで、成長板における石灰化と血管新生が促進されるという報告もある (Reich et al., 2005)。そこで本研究では誘発の要因として急激な体重増加に着目し、体重増加が緩慢な産卵鶏と制限給与によって体重増加を制限したブロイラーに対し、Thiram を用いて人為的に TD を誘発させ、メカニカルストレスが TD 発症に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

(1) 供試動物

実験 1

供試動物として、ブロイラー雄と産卵鶏雄の 0 日齢をそれぞれ 20 羽用いた。Rath らの方法 (2007b) に従って、TD の誘発を試みた。すなわち、生後 0 日齢より 7 日齢まで通常飼料 (肥育前期飼料; 日本配合飼料) で飼育した後、8 日齢より 2 日間 Thiram (Sigma) を 100ppm (100mg/kg) 添加した飼料を給与した。その後、再び通常飼料で 25 日齢まで飼育し脛骨近位端を採取した。対照区では、通常飼料のみで 0 日齢から 25 日齢まで飼育した。産卵鶏における通常飼料は、ニュー幼雛 (兼松) を用いた。

実験 2

供試動物として、0 日齢のブロイラーの雄の雛を平飼いの育雛器にて 7 日齢まで飼育した後、20 羽に対しては、実験 1 と同様の方法を用いて TD の誘発を行った。その後、10 日齢になった雛を 10 羽ずつ制限給与区と通常の自由摂取区に分けた。制限給与区では、1 羽ずつケージに入れて、通常飼料摂取量の 30% の飼料で 20 日齢まで飼育した。なお、生後 0 日齢から 20 日齢まで通常飼料を用いて、自由摂取区と制限給与を施した雛を対照区とした。

(2) 試料採取 材料採取および組織切片作製

・試料採取

脛骨の採取は 11、15、20 および 25 日齢に供試動物を放血屠殺し、左右の脛骨近位端を採取した。採取した左右の脛骨はデジタルノギスを用いて脛骨全長を測定した。右の脛骨近位端は、デンタルカッ

ターにて縦断し、TD 病変の有無の確認および重度 (TD index) を Rath らの方法 (2004) に従い調べた。すなわち、TD index の判定は TD index 0 は正常な成長板、TD index 1 は軽度から中程度のもので軟骨塊がみられ、成長板の厚さが正常の 2 倍程度に肥厚しているものとし、TD index 2 は重度のもので成長板の厚さが正常の 2 倍以上の大きさに肥厚しているものとした (図 3)。

また、実験 1 では脛骨の採取日の日齢および 0、7 日齢に個体ごとの生体重の測定し、実験 2 では 0、7、10 日齢と 10 日齢後は 2 日毎に体重測定を行なった。

・組織切片作製

採取した脛骨近位端(縦断)は、10%ホルマリン緩衝液 (pH7.0) にて室温で約 4 日間浸漬固定した。その後、10% EDTA 溶液 (pH7.4) を用いて約 10 日間の脱灰を行なった。脱灰後、アルコール上昇系列にて脱水し、パラフィン (パラプラストプラス;Sigma) に包埋した。パラフィン切片は、ミクロトーム (Leica, Wetzlar) を用いて 5 μ m に作製した。

(3) 染色法

脛骨近位端の成長板を組織学的に観察するために、作製したパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし、以下に示した染色法を施し、光学顕微鏡 (Nikon) を用いて組織学的観察を行なった。染色法としては、アルシアンブルーによる酸性ムコ多糖類からなるプロテオグリカンの染色、サフラニン O による核染色と酸性ムコ物質の染色、ならびにヘマトキシリン (マイヤー) -エオジン (H-E) による核の染色と基質の染色を施した。

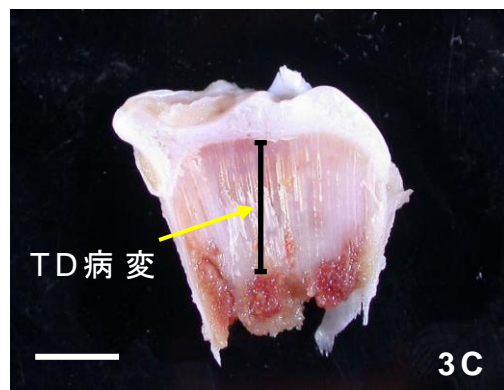
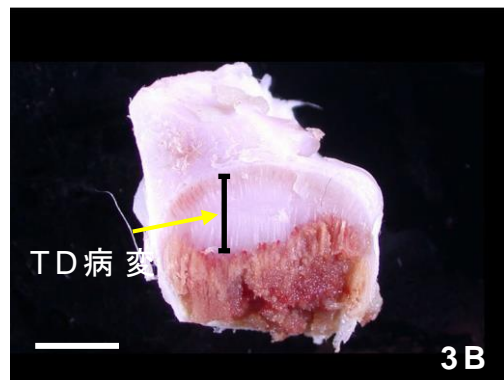
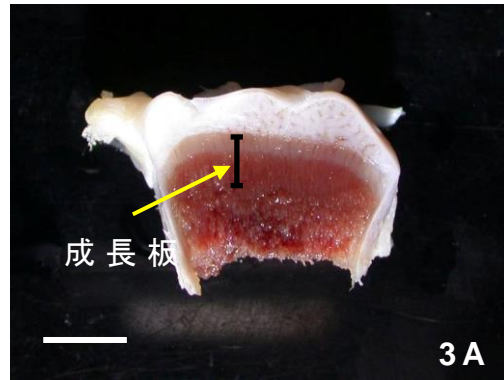


図.3 脛骨の縦断面の TD index 判定

3A.TD index0.

ガラス状の増殖軟骨細胞層と血管が侵入して赤色を呈した肥大軟骨細胞層がみられる正常な成長板で病変がない.

3B.TD index1.

成長板内に白色の軟骨塊がみられ,成長板の厚さが正常なものと比較して2倍以内に肥厚している.

3C.TD index2.

成長板内に白色の軟骨塊がみられ,成長板の厚さが正常なものと比較して2倍以上に肥厚し,海綿骨が非常に少なくなっている.

Bar=0.5mm.

(4) 統計処理

統計処理としては JMP9 (SAS Institute Japan) を用いて統計解析を行い、 $P<0.05$ 値を示すものを有意な差があるものと判定した。

結果

(1) 生体重、骨長および肉眼的観察

産卵鶏とブロイラーにおける TD 誘発の実験において、産卵鶏では実験期間を通して生体重は、緩やかな増加を示し Thiram 給与区と対照区で差がみられなかった。また、ブロイラーは、11 日齢以降において産卵鶏と比較して急激に体重の増加がみられた。一方、Thiram 給与区のブロイラーでは 11 日齢以降、対照区のブロイラーと比較して、急激な生体重の増加が緩和する傾向がみられた (図 4)。

脛骨にかかるメカニカルストレスを検討するため、生体重を脛骨の骨長で割り、脛骨骨長 1mm 当りにかかる体重負荷を計算した結果、ブロイラーは産卵鶏に対して 15 日齢で 1.67 倍、20 日齢で 2.18 倍、25 日齢で 2.51 倍のメカニカルストレスが脛骨にかかっていた (図 5)。

肉眼的観察において、産卵鶏では日齢に関係なく Thiram 給与区および対照区とも脛骨近位端に TD 病変を示す軟骨塊はみられず、TD index は 0 であった。一方、ブロイラーでは対照区においては産卵鶏と同様に、正常な成長板が観察され、TD 病変を示す不透明な白色の軟骨塊はみられなかったが、Thiram 給与区において成長板下部に不透明な白色の軟骨塊が存在し、TD の発症

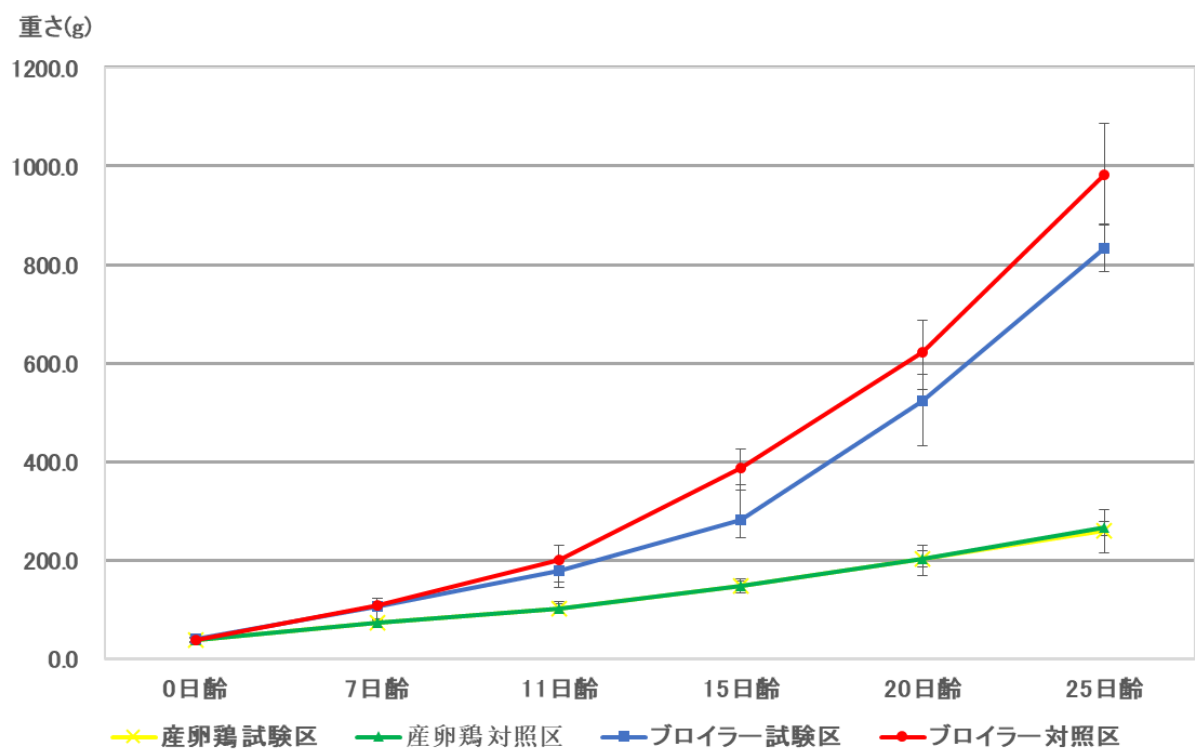


図.4 体重増加の変化. 平均±S.E.

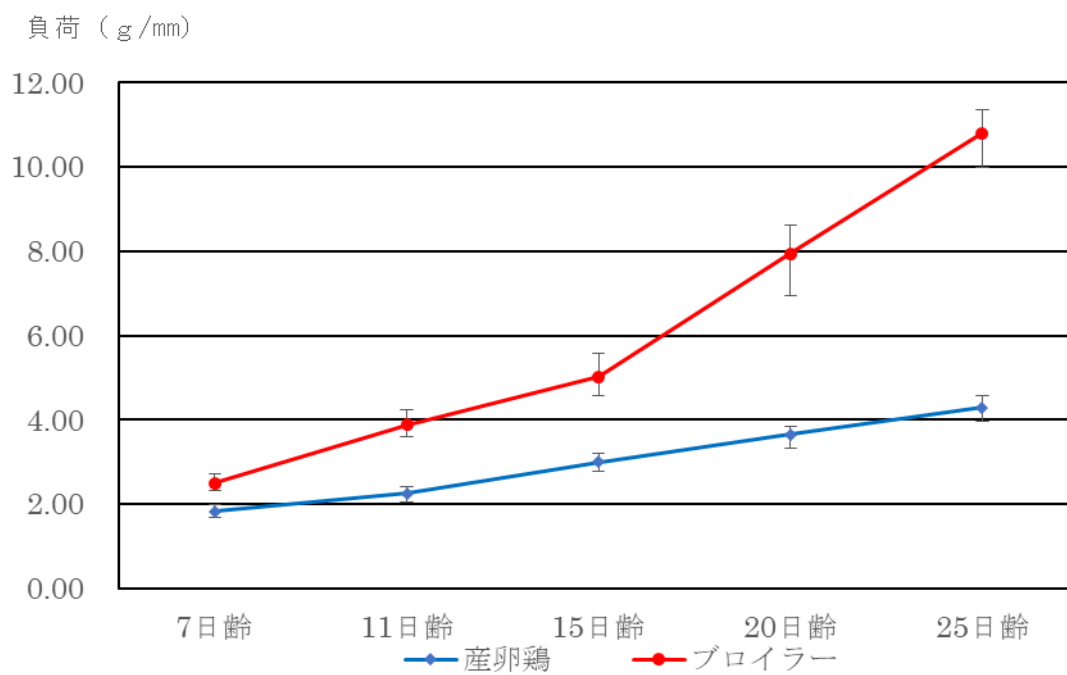


図 5. 脛骨に対する体重負荷. 平均±S.E.

がみられた。このことは、これまでに報告（Rath et al., 2004 ; 2007a ; 2007b）されているように、Thiram はブロイラーにおいて TD を効率的に誘発することが示された。

また、TD index に関しては TD が 100%発症した 20 日齢において最も高く 2 を示し、大きな軟骨塊が成長板内に残留していた。15 日齢においては、TD 発症は 100%であったが、TD index は 1.8 となった。25 日齢では、TD 発症率が 80%となり、TD 病変はみられるが TD index は 1.2 を示し、発症率ならびに病変の程度が減少していた（図 6）。

制限給餌における TD 誘発の実験において、生体重を測定した結果、Thiram 給与の制限区は自由摂取したものと比較して 20 日齢の体重増加が 75%まで抑えられていた（図 7）。また、Thiram 給与をした際の制限給餌区と自由摂取区の比較においては 10 日齢以降の体重増加に差はみられず、両方の区で体重増加が抑制された。

肉眼的観察に関して、対照区の脛骨近位端では TD 病変を示す軟骨塊は見られず、関節軟骨下に乳白色の増殖軟骨細胞層と血管が侵入して赤色を呈した成長板がみられた。一方、Thiram 給与後に制限給餌した脛骨近位端においては、肥大軟骨細胞層において白色の軟骨塊が残存し TD が発症していた。しかしながら、その TD 病変は関節軟骨下に部分的にみられ病変の程度は小さくなっており、一部の肥大軟骨細胞層においては血管侵入が観察された。Thiram 給与後に自由摂取とした脛骨近位端では重度の TD 病変がみられ、不透明で白色の軟骨塊が脛骨近位端全体に観察された。TD index は、Thiram 給与後に制限給餌したものにおいて 1.21

TD index

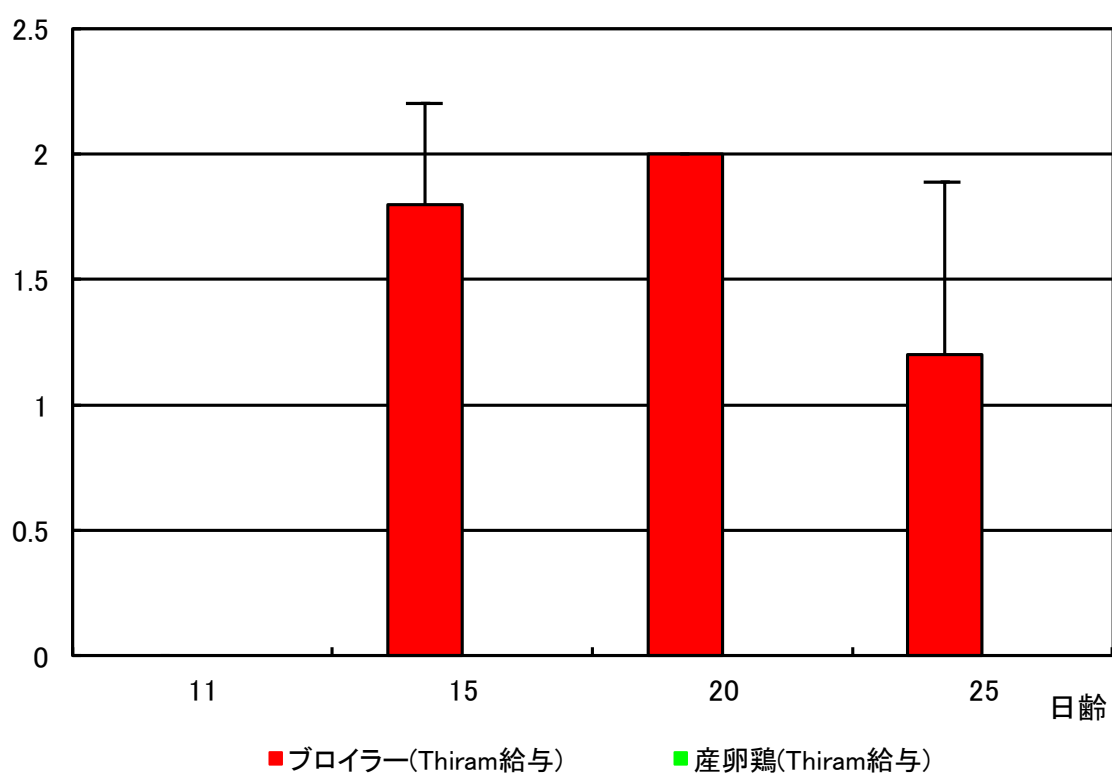


図 6. TD 発症率と TD index.

産卵鶏においては，日齢に関係なく TD の発症はみられなかった．一方，ブローラーでは，15 日齢で TD は 100% 発症し，TD index は 1.8 となり，20 日齢では TD index 2 が 100% 発症した．しかし，25 日齢になると発症は 80% となり，TD index は 1.2 となり発症率ならびに病変の程度が減少していた．

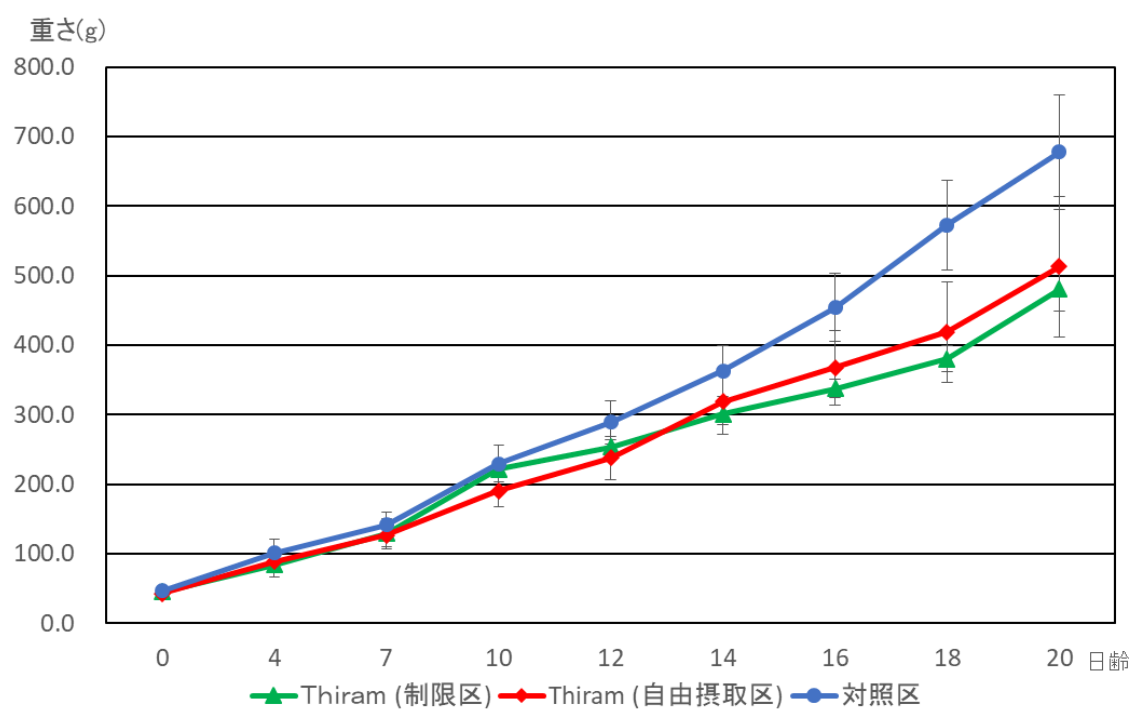


図 7. 生体重.

と低い数値を示した。しかしながら、Thiram 給与後に自由摂取させたものでは、TD index は高く 1.62 を示したが、両者の間に有意な差はみられなかった（図 8）。

（２）組織学的観察

Thiram を飼料に添加した結果、20 日齢のブロイラーにおいて TD index の値が高く、重度の TD 発症が観察された。したがって、組織学的観察は 20 日齢の産卵鶏ならびにブロイラーのサンプルを用いて組織学的観察を実施した。その結果、産卵鶏では Thiram 給与に関係なく、TD 病変の特徴である肥大軟骨細胞層における軟骨塊の残存はみられず、増殖軟骨細胞層ならびに肥大軟骨細胞層が観察され、各層が長軸方向に順次規則正しく配列し、肥大軟骨細胞層に血管の侵入もみられた。これらの組織像は、対照区ならびに Thiram 給与区で類似していた（図 9）。

ブロイラーにおいては、対照区では産卵鶏の脛骨近位端と同様に、TD 病変の特徴である肥大軟骨細胞層における軟骨塊の残存はみられず、増殖軟骨細胞層ならびに肥大軟骨細胞層が観察され、肥大軟骨細胞層に血管の侵入もみられ各層が長軸方向に順次規則正しく配列していた。しかしながら、Thiram 給与区では、軟骨塊の残存が肥大軟骨細胞層で観察され、成長板が対照区と比較して著しく肥厚し各層が不規則となっていた。更にその TD 病変に対しては、血管の侵入も観察されなかった（図 10）。

また、制限給餌での実験においては作製した切片にアルシアンブルー染色を施して成長板の酸性ムコ多糖類を青く染色し、染色された成長板の長さを計測した。その結果、TD を発症した制限給

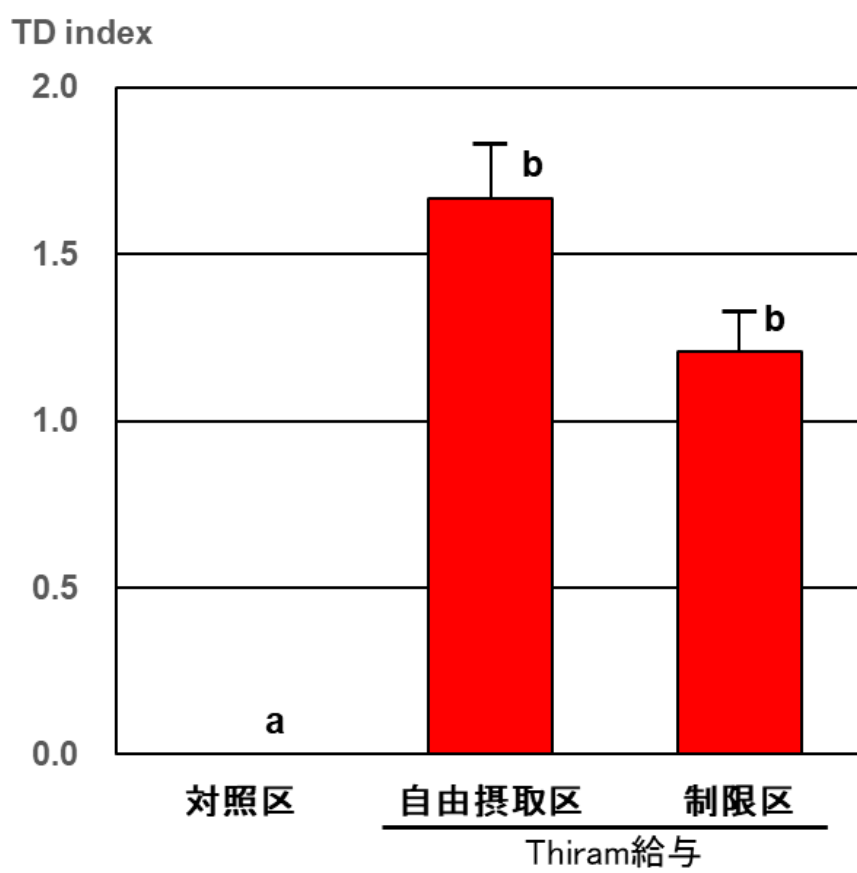


図.8 TD index.

異符号間に, p 値が<.001 で有意差あり. 平均±S.E.

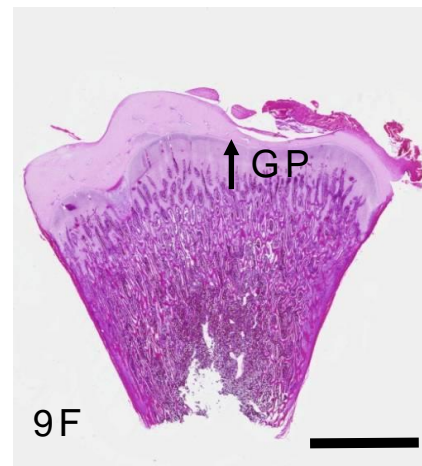
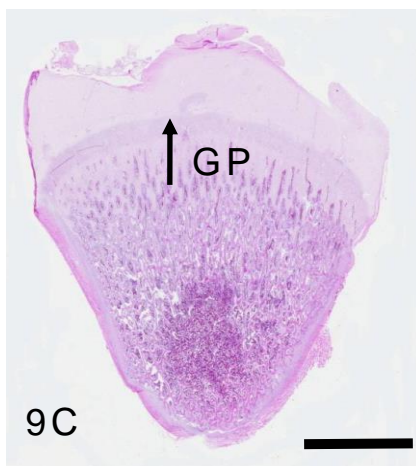
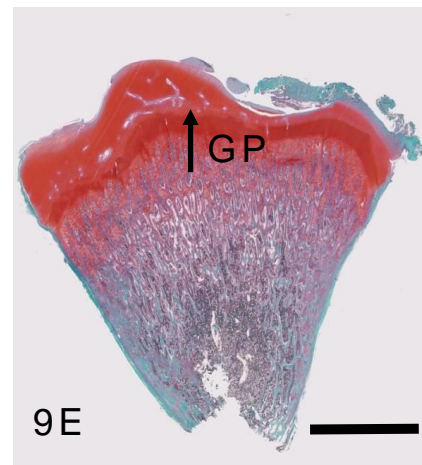
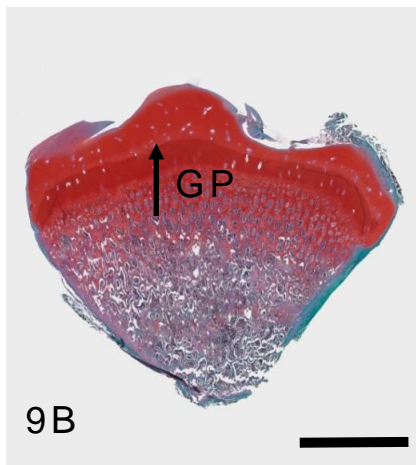
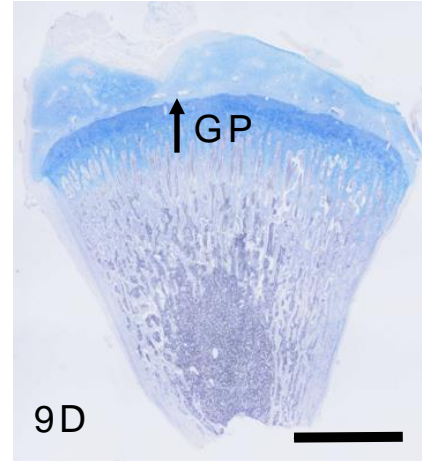
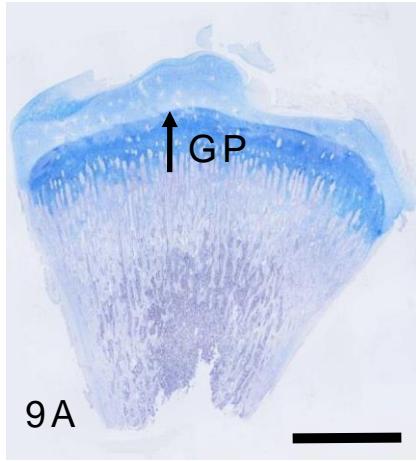


図 9. 産卵鶏 20 日齢の脛骨近位端.

Thiram 給与区と対照区ともに関節軟骨下に正常な厚さの成長板が観察された. また, 骨幹方向に移行するに従って扁平な増殖軟骨細胞が密に配列し, 肥大した軟骨細胞が存在していた. また, 成長板の深部まで血管が侵入していた.

9A. 対照区 アルシアンブルー染色.

9B. 対照区 サフラニン O 染色.

9C. 対照区 H-E 染色.

9D. Thiram 給与区 アルシアンブルー染色.

9E. Thiram 給与区 サフラニン O 染色.

9F. Thiram 給与区 H-E 染色.

GP: 成長板. Bar=5mm.

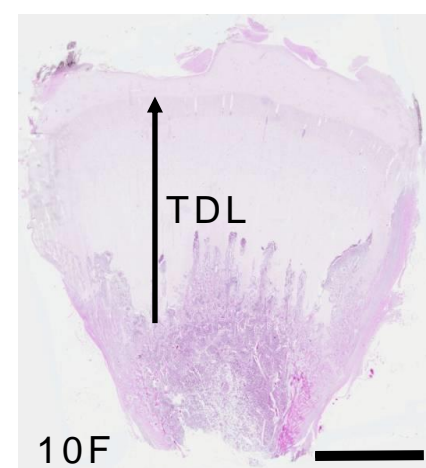
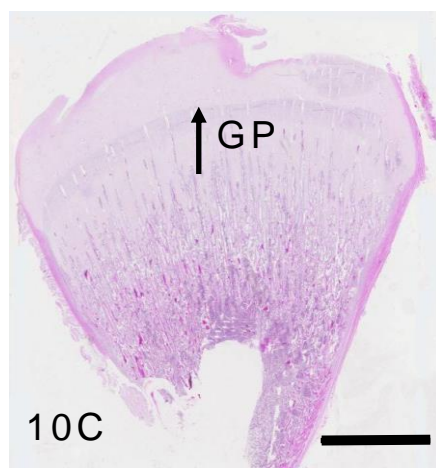
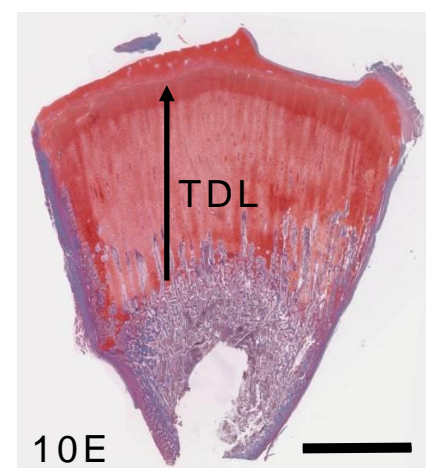
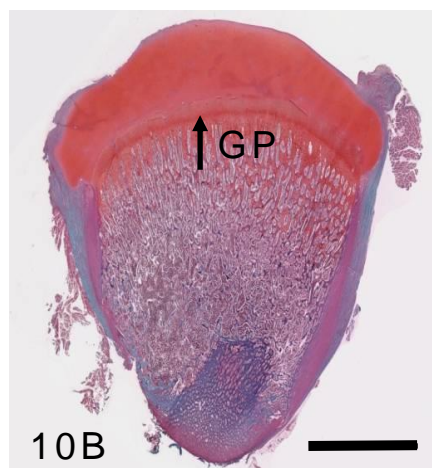
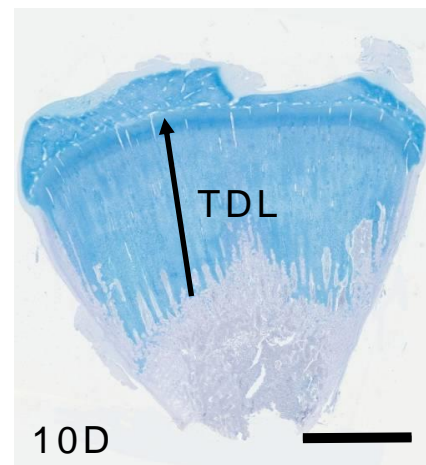
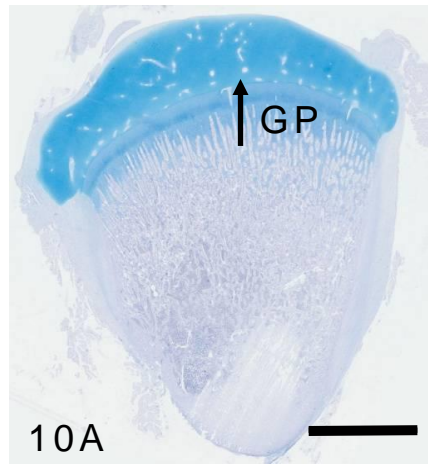


図 10. ブロイラーの脛骨近位端.

対照区では関節軟骨下に正常な厚さの成長板が観察された. また, 骨幹方向に移行するに従って扁平な増殖軟骨細胞が密に配列し, 肥大した軟骨細胞が存在していた. また, 成長板の深部まで血管が侵入していた. 一方, Thiram 給与区では関節軟骨下に扁平な増殖軟骨細胞が密に配列しているが, 肥大軟骨細胞層において広範囲に軟骨塊がみられ, 成長板が肥厚していた.

10A. 対照区 アルシアンブルー染色.

10B. 対照区 サフラニン O 染色.

10C. 対照区 H-E 染色.

10D. Thiram 給与区 アルシアンブルー染色.

10E. Thiram 給与区 サフラニン O 染色.

10F. Thiram 給与区 H-E 染色.

GP: 成長板. Bar=3mm.

餌区と自由摂取区の成長板は染色された範囲が、対照区と比較して有意に拡大していた。さらに制限給餌区と自由摂取区との比較においても有意な差がみられた（図 11）。

考 察

以上の結果から、TD 発症の要因の一つとして幼雛期における急激な体重増加であるメカニカルストレスが関与していることが示唆された。これまでの報告において、Thiram を飼料に添加してことにより、ブロイラーや七面鳥で TD が発症することが報告されている（Rath et al., 2004; Simsa et al., 2007a）。これらの鳥類は Thiram に依存することなく、自然に TD が発症することが報告されている（Orth and Cook, 1994）。しかしながら、若齢の産卵鶏において自然に TD が発症する報告はこれまでなく、これら TD 発症の違いは、成長速度や急速な体重増加によるものと推測されているが明らかではない。

産卵鶏とブロイラーに Thiram 給与をした実験において、ブロイラーではこれまでの報告と同様に重度の TD の発症が観察されたが、産卵鶏では、Thiram を給与したにもかかわらず、TD の発症は観察されなかった。このことは、産卵鶏と比較して急速に体重増加するブロイラーでは脛骨に対してメカニカルストレスが強くかかっていたことが、TD 発症の一つの重要な要因として考えられる。ニワトリや七面鳥において、骨にかかるメカニカルストレスを軽減し、脛骨近位端の軟骨内骨化を観察した結果において軟骨内骨化は阻害されることなく、正常に脛骨は成長すると報告がされている（Hurwitz et al., 1992; Rawlinson et al., 2009）。

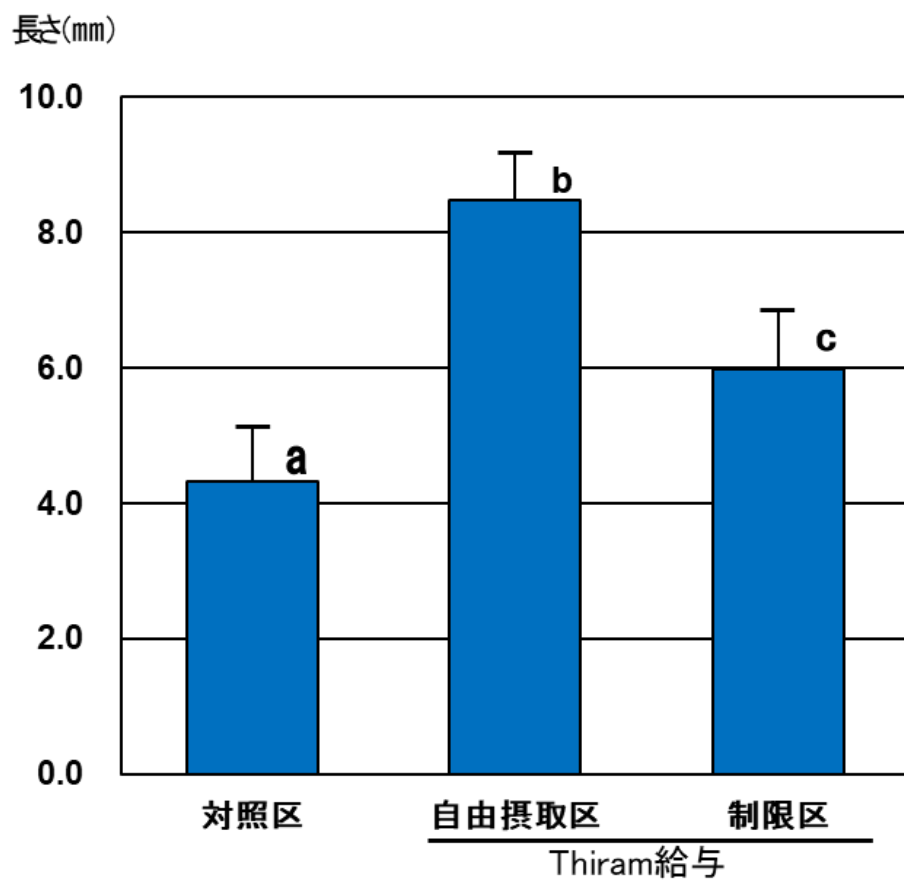


図 .11 制限給与実施における成長板の長さ .

異符号間に p 値が < .001 で有意差あり .平均 ± S.E.

しかしながら、本実験において制限給餌によるメカニカルストレスを軽減させたブロイラーの脛骨近位端では、TD index の値は低下する傾向を示し、軟骨塊の残存による成長板の肥厚も抑えられたものの、TD の発症が観察された。この相違は、Thiram による何らかの細胞機能の変化が TD を誘発したものと推測される。なお、前述した報告 (Hurwitz et al., 1992; Rawlinson et al., 2009) においては、Thiram を給与していなかったため、TD が発症しなかったものと推測される。

また、組織学的な観察において TD 病変では脛骨骨端に軟骨塊の残存が観察され、成長板の各層には不規則に軟骨細胞が配列しており、血管の侵入が観察されず、軟骨内骨化に異常が認められた。一方、Thiram を給与しなかった対照区および、メカニカルストレスが緩慢な産卵鶏において、脛骨近位端では血管の侵入は阻害されることなく、骨端の増殖層まで血管の侵入が観察され、正常な軟骨内骨化が行なわれていた。すなわち、メカニカルストレスと Thiram 給与による軟骨内骨化における何らかの異常や影響によって TD が発症していることが推測される。

要約

前章において述べたようにブロイラーは幼雛期における急速な体重増加に見合った骨成長がみられず、軟骨内骨化の不均衡によって脛骨近位端の成長板に軟骨塊が蓄積し、TD を発症する。しかしながら、その発症機構は明らかではない。そこで、本研究では TD 発症に及ぼす体重増加の影響に着目し、体重増加が緩慢な産卵鶏と制限給与によって体重増加を抑制したブロイラーに

対し、Thiram を用いて人為的に TD を誘発されるか検討した。

Thiram の給与を行い TD の誘発を試みた結果、ブロイラーにおいては 15 日齢以降で TD 病変がみられ、20 日齢において最も重症である TD index が 2 を示した。しかしながら産卵鶏においては、いずれの日齢においても TD の発症はみられなかった。また、制限給餌してメカニカルストレスを軽減した結果、20 日齢において自由摂取させて対照区と比較して体重増加を 75% に抑えられた。これによりメカニカルストレスが軽減され、TD index の値は低くなる傾向を示し、軟骨塊の残存は縮小した。更に、産卵鶏とブロイラーについて組織化学的観察な観察を行った結果、全ての産卵鶏および対照区のブロイラーでは脛骨近位端の成長板の肥厚は観察されなかった。しかしながら、Thiram を給与したブロイラーではこれまでの報告通り TD の発症がみられ、肥厚した成長板が観察された。脛骨骨長を生体重で割り、脛骨にかかる体重負荷を計算したところ、20 日齢において産卵鶏と比べて 2 倍の負荷がブロイラーの脛骨にはかかっていることが示された。

以上のことから、TD の発症には幼雛期における急速な体重増加によるメカニカルストレスが一つの原因となっていることが示唆された。

第 3 章 成長板における免疫組織化学的観察

緒言

第 1 章で述べたように、TD 病変の特徴は成長板に軟骨塊が残存することであり (Hargest et al., 1985a; 1985b)、主たる原因として、軟骨内骨化の不均衡によって血管侵入が生じずに石灰化が阻害され、脛骨近位端の成長板に軟骨塊が蓄積し、発症すると考えられている (Stickens et al., 2004; Raffetto and Khalil, 2008)。成長板は、関節軟骨 (静止軟骨細胞層) 下の増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層ならびに肥大軟骨細胞石灰化層の 3 つの層に分類され、各層の軟骨細胞は様々なホルモンやサイトカインの作用を受けて増殖・分化する (Stevens and Williams, 1999)。軟骨基質の大部分は水分からなり、その水分含量は約 75% に達する。残りは、主としてコラーゲンからなるタンパク質が 15%、プロテオグリカンが約 10% を占める。コラーゲンの大半は II 型コラーゲンであり、加えて X 型コラーゲン、I 型コラーゲン、IX 型コラーゲンおよび XI 型コラーゲンが少量存在する (Wardale and Duance, 1996)。これらのコラーゲンは骨端軟骨の成長板において特異的な局在を示し、軟骨内骨化における軟骨細胞の分化と石灰化に深く関与しており、II 型コラーゲンは関節軟骨と増殖軟骨細胞層に局在し、X 型コラーゲンは肥大軟骨細胞層に局在する (Phornphitkul and Gruppuso, 2009)。また、コアタンパク質とグリコサミノグリカンが結合して形成されたプロテオグリカンは、骨や軟骨における細胞の分化や石灰化を調整している。軟骨においては、ケラタン硫酸やコンドロイチン硫酸といったグリコサミノグリカンを構成要素にもつプロテオグリカンが豊富

に含まれている (Funderburgh, 2000; Nakamura et al., 2001; Lamoureux et al., 2007)。TD 病変は、成長板において軟骨塊が残存するとともに、肥大軟骨細胞層において石灰化が起こらないことが特徴である (Whitehead, 1995)。したがって、TD 発症には、コラーゲンやプロテオグリカンの局在に変化が生じることによって軟骨内骨化に影響を及ぼしていることが考えられる。

そこで、本研究では TD 病変部におけるコラーゲンならびにグリコサミノグリカンの局在について免疫組織化学的に観察し、正常なものと比較した。

材料と方法

(1) 供試動物とパラフィン切片作製

供試動物として、20羽の0日齢のブロイラー雄を用いた。その内、10羽は TD 病変を観察するため、第2章の実験1と同様に Rath らの方法 (2007b) に従って TD を誘発した。また、採取した脛骨についても同様の方法にて組織を包埋しパラフィン切片を作製した。

(2) Azan 染色、コラーゲンとグリコサミノグリカンの免疫組織化学的観察

組織学的に脛骨近位端の成長板を観察するために、作製したパラフィン切片を Azan 染色 (Heidenhain, 1915) によるコラーゲン線維の染色を施した。また、免疫組織化学法については、パラフィン切片を 0.01M リン酸緩衝液 (PBS) にて洗浄し、コラーゲンの検出に用いるパラフィン切片については目的とする抗原タンパク質を露出させるため、ヒアルロニダーゼを含む PBS (68 mg/ml) を用いて、

37℃ 恒温下にて 30 分間の酵素処理を施した。その後、PBS にて洗浄し、非特異的反応を阻止するため、1% ヤギ正常血清を含む PBS（ブロッキング溶液）にて、室温で 30 分間反応させた。続いて、II 型および X 型コラーゲン、グリコサミノグリカンのケラタン硫酸ならびにコンドロイチン-6-硫酸に対する一次抗体をブロッキング溶液にて、それぞれ適切な濃度に希釈し、パラフィン切片に 4℃で一晩反応させた（表 1）。PBS で洗浄後、ブロッキング溶液にて 200 倍希釈したビオチン化ヤギ抗マウス IgG 抗体（Vector Laboratories, Inc, CA）またはビオチン化ヤギ抗マウス IgM 抗体（Vector Laboratories, Inc.）を二次抗体として用いて、室温で 30 分間反応させた。最後に、PBS で洗浄後、パラフィン切片にアルカリフォスファターゼ標識アビジン・ビオチン複合体（Vector Laboratories, Inc.）を室温で 30 分間反応させ、PBS にて洗浄後、Fast Red TR/Naphthol AS-MX（Sigma-Aldrich）により目的とするコラーゲンおよびグリコサミノグリカンの局在を赤く発色させた。水溶性封入剤で封入し、光学顕微鏡にて組織像を観察した。なお、免疫組織化学的観察の陰性対照として一次抗体もしくは正常血清を用いた。また、各組織化学的観察における成長板の長さを画像解析ソフトウェア NIS-Elements（Nikon）にて計測した。計測値は、平均±標準誤差で示した。

（4）統計処理

成長板の長さは統計解析ソフト JMP9（SAS Institute Japan）を用いて統計解析を行い、 $p < 0.05$ 値を示すものを有意な差があるものと判定した。

表1. 一次抗体および希釈濃度

一次抗体	会社名	希釈濃度
Mouse monoclonal to collagen type II	Acris antibodies GmbH	250倍
Mouse monoclonal to collagen tyoe X	Santa cruz biotechnology	500倍
Mouse monoclonal to chondroitin-6-sulfate	生化学工業	200倍
Mouse monoclonal to keratan sulfate	生化学工業	200倍

結果

(1) 臨床症状

Thiram 給与区では、15 日齢で起立および歩行が困難のものが観察され、20 日齢で全てのブロイラーが跛行を呈し脚弱に陥っていた。一方、対照区では、試験期間を通じて起立ならびに歩行困難を示すものはみられなかった。

(2) Azan 染色による組織化学的観察

Azan 染色を施した結果、対照区の正常な成長板においては、増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層にわたる領域で淡青色にコラーゲン線維が染まり、血管と近接した肥大軟骨細胞層石灰化部は濃く青色に染まっていた。また、橙色を呈した細胞が成長板の肥大軟骨細胞層に点在していた(図 12A)。Thiram 給与区では、軟骨塊を含む成長板において広範囲にわたってコラーゲン線維が淡く染まっており、肥大軟骨細胞層において橙色を呈した細胞はほとんど観察されなかった(図 12B)。また、対照区の肥大軟骨細胞層および病変部を拡大して観察した結果、対照区では、全ての軟骨小腔に軟骨細胞が存在しており、軟骨細胞が肥大し、軟骨小腔が拡張していた(図 13A)。一方、病変部においても軟骨小腔の拡張がみられたが、軟骨細胞の萎縮や消失が多数みられた(図 13B)。

(3) コラーゲンの免疫組織化学的観察

コラーゲンの局在は、アビジン・ビオチン複合体に標識したアルカリフォスファターゼによって形成された赤色のアゾ色素産物として観察された。Ⅱ型コラーゲンは、対照区の脛骨近位端の成長板において、増殖軟骨細胞層の軟骨基質に観察された(図 14A)。一方、

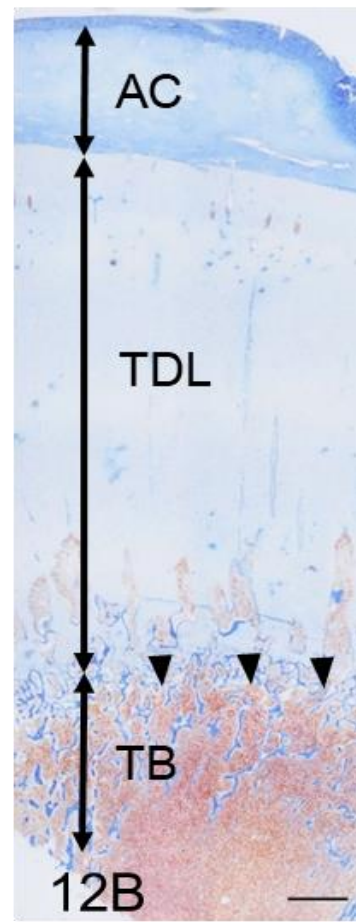
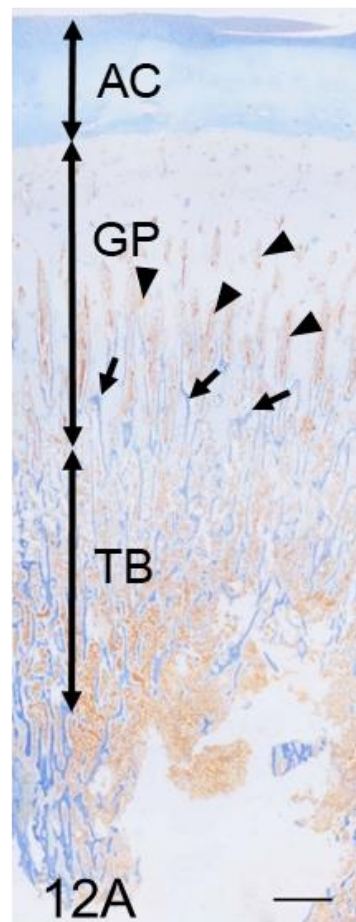


図.12 ブロイラーの脛骨近位端. Azan 染色.

12A. 対照区.

成長板のコラーゲン線維が淡青色に染色され,血管に近接している肥大軟骨細胞層石灰化部位は濃い青色に染色された(矢印). また, 橙色を呈した細胞を含む血管が成長板の深部にまで侵入していた(矢頭).

12B. Thiram 給与区.

病変により成長板が肥厚しており, 広範囲においてコラーゲン線維が淡い青色に染色されていた.成長板への血管侵入はほとんどみられず, 橙色を呈した細胞を含む血管は海綿骨周辺においてのみ染色がみられ(矢頭), 濃い青色に染色される肥大軟骨細胞層石灰化部は少なかった.

GP:成長板. TDL:TD 病変. CB:海綿骨.

Bar=1mm.

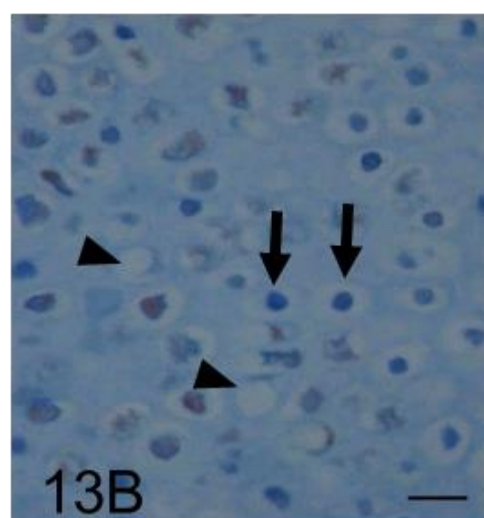
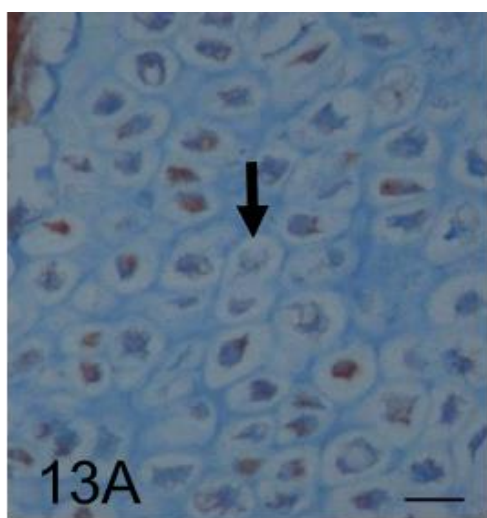


図 13. 肥大軟骨細胞層 .Azan 染色 .

13A. 対照区 .

正常な肥大軟骨細胞層 .全ての軟骨小腔に軟骨細胞が存在し , 軟骨細胞が肥大し軟骨小腔が拡大していた (矢印) .

13B. Thiram 給与区 .

TD 病変部における肥大軟骨細胞層 .対照区の肥大軟骨細胞層と同様に軟骨小腔の拡張がみられた .しかしながら , 軟骨細胞の萎縮 (矢印) や消失 (矢頭) が多数みられた .

Bar=20 μ m .

Thiram 給与区では、増殖軟骨細胞層に加え、軟骨塊を有する肥大軟骨細胞層にも観察され（図 14B）、対照区（ 1.23 ± 0.07 mm）と比較してⅡ型コラーゲンの局在は有意に拡大していた（ 9.38 ± 0.30 mm）（図 15）。また、X型コラーゲンは、正常な脛骨近位端の成長板において、肥大軟骨細胞層の軟骨基質で局在を示す赤色の免疫反応が観察された（図 16A）。Thiram 給与区の成長板では、対照区の成長板と同様に肥大軟骨細胞層で免疫反応を示す赤色が観察され（図 16B）、対照区（ 5.27 ± 0.20 mm）と比較してX型コラーゲンの局在は有意に拡大していた（ 8.68 ± 0.33 mm）（図 17）。

（４）グリコサミノグリカンの免疫組織化学的観察

ケラタン硫酸とコンドロイチン-6-硫酸の局在は、アビジン・ビオチン複合体に標識したアルカリフォスファターゼによって形成された赤色のアゾ色素産物として観察された。ケラタン硫酸は、対照区の脛骨近位端の成長板において、肥大軟骨細胞層の軟骨基質に観察された（図 18A）。Thiram 給与区では、病変部である軟骨塊を含む広範囲の肥大軟骨細胞層で観察され（図 18B）、対照区と比較してケラタン硫酸の局在は拡大していた。また、正常な脛骨近位端の成長板におけるコンドロイチン-6-硫酸の局在は、ケラタン硫酸同様に肥大軟骨細胞層の軟骨基質で局在を示す赤色の免疫反応が観察された（図 19A）。一方、Thiram 給与区の脛骨近位端の成長板では、病変部である肥大軟骨細胞層上部において観察されず、肥大軟骨細胞層下部においてわずかに局在が免疫反応を示す赤色が観察され（図 19B）、対照区と比較してコンドロイチン-6-硫酸の局在は広範囲で減少していた。



図 14. ブロイラー脛骨近位端におけるⅡ型コラーゲンの局在.

14A. 対照区.

Ⅱ型コラーゲンは, 増殖軟骨細胞層 (PZ) および関節軟骨 (AC) に局在していた.

14B. Thiram 給与区.

TD 病変部を含む成長板で広範囲に渡りⅡ型コラーゲンの局在が観察された.

AC: 関節軟骨. PZ: 増殖軟骨細胞層. TDL: TD 病変.

Bar=1mm.

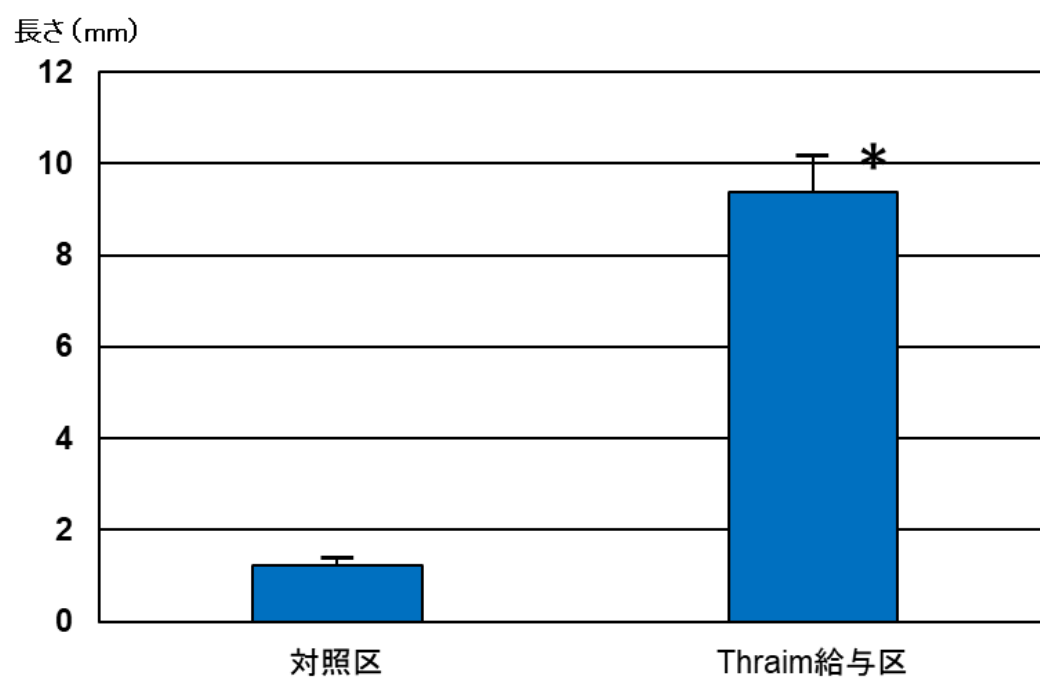


図.15 II型コラーゲンの長軸方向の長さ.

*は対照区に対し,p 値が<.001 で有意差あり. 平均±S.E.

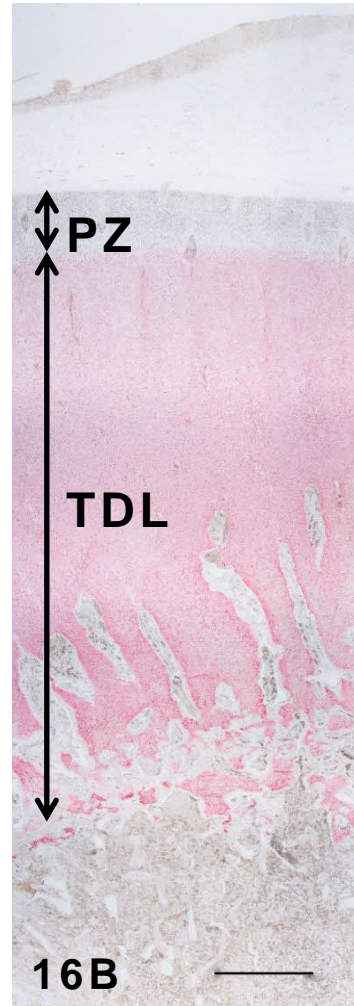
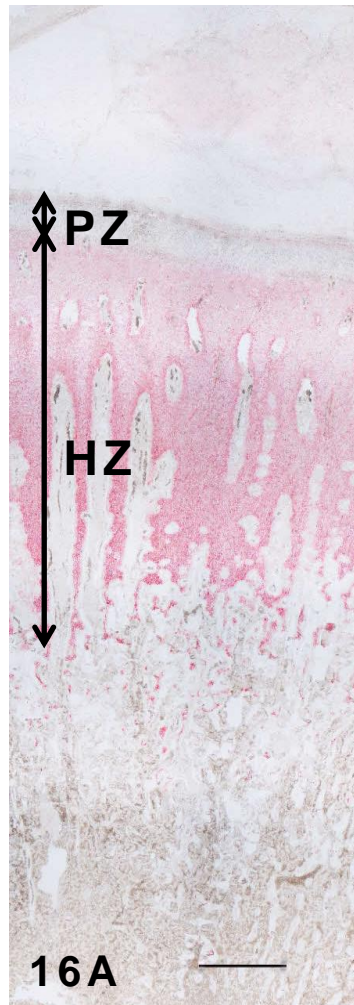


図 16. ブロイラー脛骨近位端における X 型コラーゲンの局在.

16A. 対照区.

X 型コラーゲンの局在は，肥大軟骨細胞層のみで観察された．

16B. Thiram 給与区．

増殖軟骨細胞層より下の，TD 病変部を含む肥大軟骨細胞層で
広範囲に渡り X 型コラーゲンの局在が観察された．

PZ: 増殖軟骨細胞層． HZ: 肥大軟骨細胞層． TDL: TD 病変．

Bar=1mm.

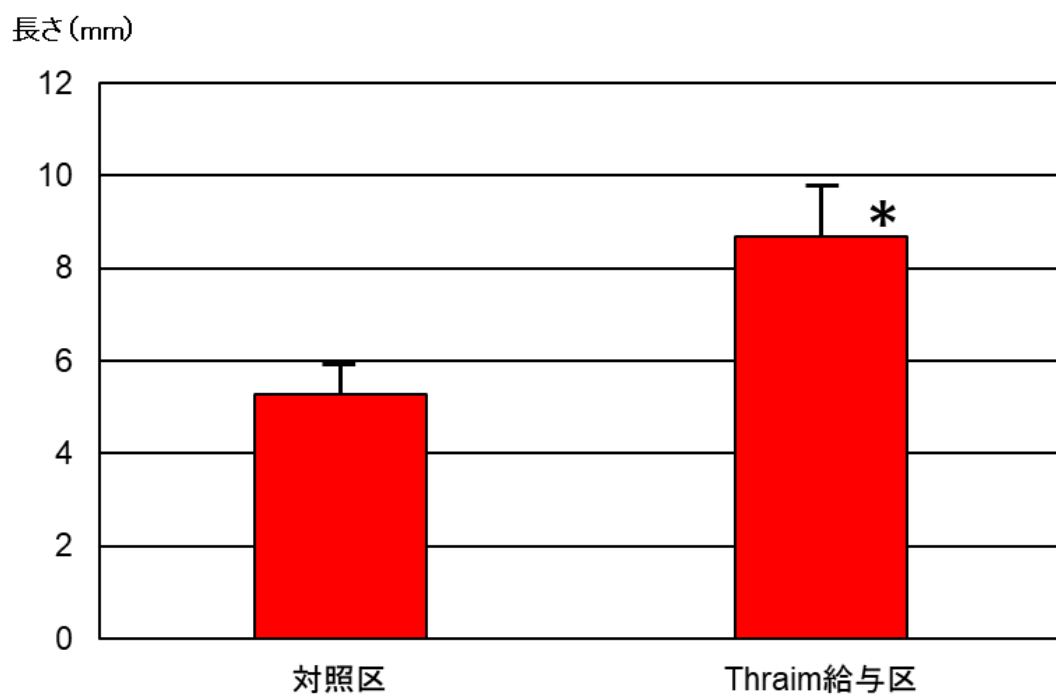


図.17 X 型コラーゲンの長軸方向の長さ.

*は対照区に対し,p 値が<.001 で有意差あり. 平均±S.E.

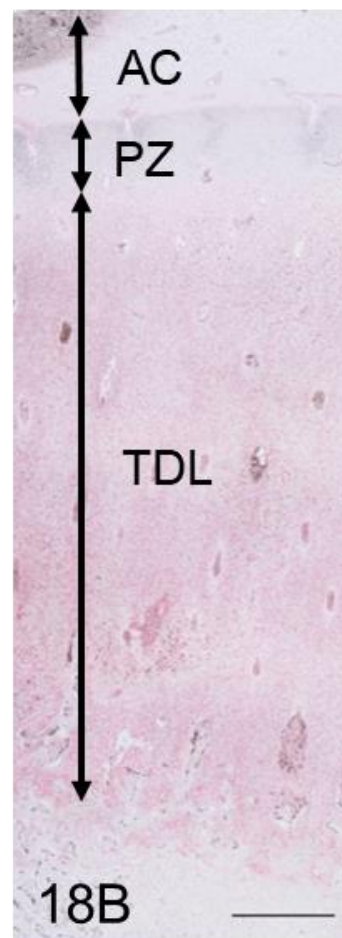
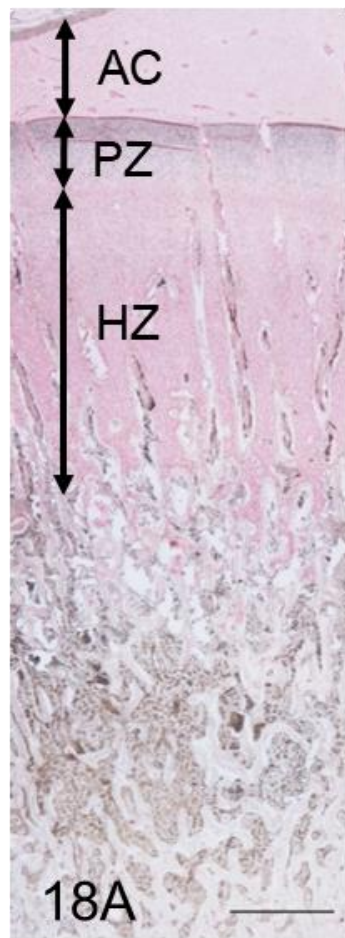


図 18. ブロイラー脛骨近位端におけるケラタン硫酸の局在.

18A. 対照区.

ケラタン硫酸の局在は, 肥大軟骨細胞層で観察された.

18B. Thiram 給与区.

増殖軟骨細胞層下部の TD 病変部を含む広範囲の肥大軟骨細胞層にケラタン硫酸の局在が観察された.

AC:関節軟骨. PZ:増殖軟骨細胞層. HZ:肥大軟骨細胞層. TDL:TD 病変. Bar=1mm.

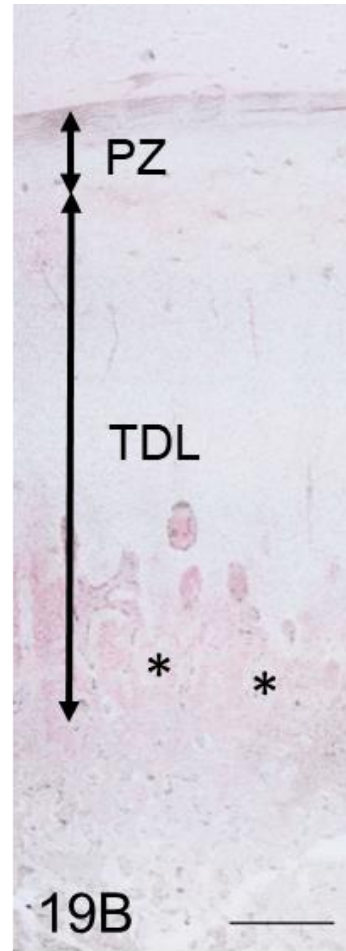
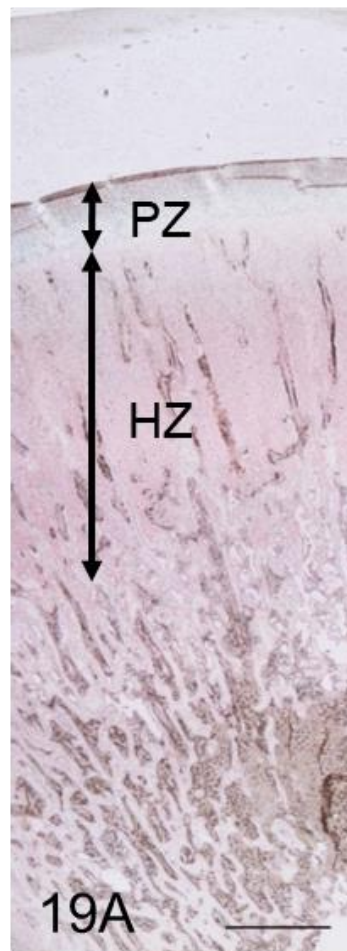


図 19. ブロイラー脛骨近位端におけるケラタン硫酸の局在.

19A. 対照区.

コンドロイチン-6-硫酸の局在は, ケラタン硫酸同様に肥大軟骨細胞層において観察された.

19B. Thiram 給与区.

TD 病変部を含む肥大軟骨細胞層上部においてその局在は観察されず, 肥大軟骨細胞層下部でコンドロイチン-6-硫酸の局在 (＊) がわずかに観察された.

PZ: 増殖軟骨細胞層. HZ: 肥大軟骨細胞層. TDL: TD 病変.

Bar=1mm.

考 察

Azan 染色による組織化学的観察では、肥大軟骨細胞層は淡青色に染色され、肥大軟骨細胞層の石灰化部ならびに成長板下の海綿骨は濃青色に染色された。この染色性の違いは、軟骨基質の線維構造が異なっていることを示している。すなわち、肥大軟骨細胞層は細線維構造を示さずに散在した X 型コラーゲンからなり、肥大軟骨細胞層石灰化部および海綿骨は軟骨から石灰化した骨に置換され、密な細線維構造を呈する I 型コラーゲンからなっている。しかしながら、Thiram 給与区において淡青色に染色された部分が広範囲にみられたことから、X 型コラーゲンを主とする肥大軟骨細胞層が拡大していることが考えられる。また、この領域において橙色を呈した細胞はみられなかったことから、血管の侵入はほとんどないものと考えられる。さらに対照区の肥大軟骨細胞層軟骨細胞の拡大と Thiram 給与区の病変部の拡大を比較したところ、ともに軟骨小腔の拡張がみられたが、Thiram 給与区の TD 病変では軟骨細胞の萎縮と消失が多数みられ、すでに細胞死に陥っているものと推測される。

TD 病変におけるコラーゲンの局在について免疫組織化学的に観察した結果、正常な成長板ではこれまでの報告通り、II 型コラーゲンは増殖軟骨細胞層に局在し、X 型コラーゲンは肥大軟骨細胞層に局在していた (Kirsch and Wuthier, 1994; Knopov et al., 1997; Pines et al., 1998)。しかしながら、TD においては、II 型コラーゲンは増殖軟骨細胞層だけに留まらず、病変部の肥大軟骨細胞層においても局在していた。また、X 型コラーゲンは肥大軟骨細胞層に局在していたが、TD の発症によりその局在は拡大していた。このことは、TD 病変においては肥大軟骨細胞層において II 型コラーゲン

とⅡ型コラーゲンが同時に存在していることを示しており、増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層への軟骨基質の成熟が不十分であることが示唆される。同様の結果として、自然発症した TD およびビタミン D 欠乏によるくる病のニワトリでも *in situ hybridization* 法によりⅡ型コラーゲンの mRNA の局在を観察した結果、TD 病変部の周囲の肥大軟骨細胞層においても発現がみられたという (Chen et al., 1993; Pines et al., 1998; Ben-Bassat et al., 1999)。一方で、TD について同様にⅡ型コラーゲンの mRNA の発現を検討したところ、正常と変わらず増殖軟骨細胞に発現していたとの報告もある (Hasky-Negev et al., 2008)。

Ⅱ型コラーゲンは、肥大軟骨細胞層において MMP-13 の分解作用を受け消失する (Sakakura, 2010)。したがって、TD 病変では肥大軟骨細胞層における MMP-13 の発現が抑制されているものと推測された。実際、ゼラチンザイモグラフィを用いた MMP-13 の検出や RT-PCR を用いた MMP-13 の mRNA の発現において TD 病変では MMP-13 が減少していることが示唆されている (Rath et al., 1997; Velada et al., 2011)。哺乳類でも、MMP-13 ノックアウトマウスでは肥大軟骨細胞層が拡大し、TD と類似した組織像を示すことが明らかにされている (Inada et al., 2004; Stickens et al., 2004)。Ⅱ型コラーゲンの分解産物は、軟骨細胞の増殖を抑制して、その後の分化を引き起こすことが知られている (Tchetina et al., 2007)。これらのことから、TD は増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への移行が行なわれたのにもかかわらず、Ⅱ型コラーゲンの分解が起こらず、軟骨細胞の正常な肥大軟骨細胞への分化が阻害された結果生じたものと推測される。

軟骨基質の主要なグリコサミノグリカンであるケラタン硫酸およびコンドロイチン硫酸は、コアタンパク質と結合しアグリカンを形成する (Kiani et al., 2002)。アグリカンは、軟骨基質の主たるプロテオグリカンであり、軟骨の 80%を占める水分を保有し、ゲル化して体重負荷に対する耐性を付与している。加えて、無血管組織である軟骨において水分は軟骨細胞への唯一の血管からの栄養分や軟骨細胞分化調節因子の補給方法である (Sophia Fox et al., 2009)。このアグリカンの機能にとって、コンドロイチン硫酸の存在はとりわけ重要であり、ヒトの軟骨ではコンドロイチン硫酸の減少に伴って軟骨の水分含量は減少し、変形性関節症を引き起こすことが示唆されている (Dudhia, 2005)。また、コンドロイチン硫酸は軟骨細胞のコラーゲン生成を促進し、軟骨細胞の肥大化を引き起こすことが示されており、コンドロイチン硫酸が軟骨細胞の分化を調節する (Stocum DL et al., 1979)。本研究において、Thiram 給与の骨端軟骨病変部上部の肥大軟骨細胞層において、コンドロイチン硫酸の局在が欠如していた。このことは、TD ではアグリカンが正常に機能せず、軟骨細胞が直接体重付加の影響を受けるとともに、栄養分や分化調節因子の不足により細胞死に至っているものと推測される。これらのことからグリコサミノグリカンの局在が変化することにより軟骨細胞の分化に影響を及ぼし、成長板における軟骨の各細胞層の構成に変化を生じさせたと考えられる。すなわち、TD 病変においては正常にグリコサミノグリカンの分布やその濃度が保たれないことによって、軟骨細胞が正常に分化せず、あるいは軟骨細胞の細胞死を誘導して軟骨内骨化の異常が生じていると推測される。

以上の結果から、TD を発症したブロイラーの脛骨近位端では、

正常なものとは異なり、肥大軟骨細胞層においてⅡ型コラーゲンならびにⅩ型コラーゲンが混在しており、更にプロテオグリカンの主要な構成要素であるコンドロイチン硫酸の局在に異常が生じることにより、軟骨細胞の分化・成熟に影響を及ぼし、正常な軟骨内骨化が阻害され TD が発症するものと推測される（図 20）。

要約

ブローラーにおける脚弱の原因の一つである TD では、成長板に軟骨塊が残存することが知られているが、その発症機構については明らかとなっていない。成長板は 3 つの層に分類されるが、各層における軟骨細胞はそれぞれ特徴的な形態像を示しており、各層の軟骨細胞は様々なホルモンやサイトカインの作用を受けて増殖・分化する。更に軟骨基質を構成するコラーゲンは成長板の各層において特異的な局在を示し、Ⅱ型コラーゲンは関節軟骨と増殖軟骨細胞層に局在し、Ⅹ型コラーゲンは肥大軟骨細胞層に局在する。また、コアタンパク質とグリコサミノグリカンが結合して形成されたプロテオグリカンは、骨や軟骨における細胞の分化や石灰化を調整している。そこで TD 病変におけるコラーゲンとグリコサミノグリカンの局在について免疫組織化学的に観察し、脛骨近位端の成長板の変化を検討した。

Ⅱ型、Ⅹ型コラーゲンの局在について免疫組織化学的に観察した結果、対照区では、これまで報告されているように増殖軟骨細胞層にⅡ型コラーゲン、肥大軟骨細胞層でⅩ型コラーゲンが観察され、局在が明確に区別された。一方、TD 病変ではⅩ型コラー

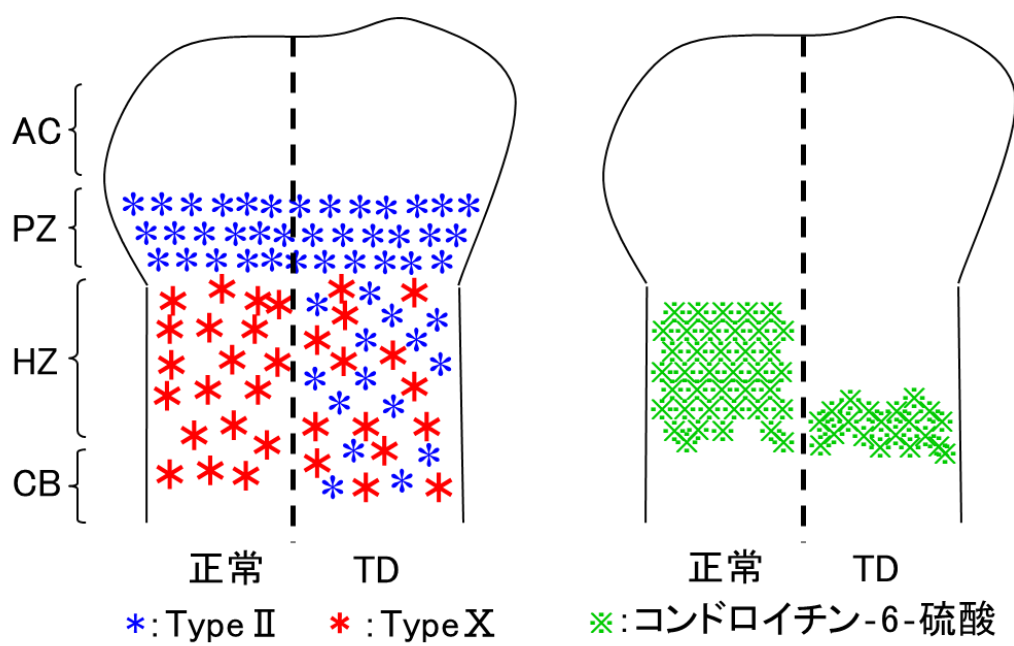


図 20. コラーゲンとグリコサミノグリカンの局在の模式図.

ゲン是对照区と同様に肥大軟骨細胞層で観察されたが、Ⅱ型コラーゲンは増殖軟骨細胞層に加え、病変部を含む肥大軟骨細胞層でも観察された。また、ケラタン硫酸、コンドロイチン-6-硫酸の免疫組織化学観察では、対照区においてケラタン硫酸およびコンドロイチン-6-硫酸は肥大軟骨細胞層に局在が観察された。一方、TD病変ではケラタン硫酸は病変部を含む広範囲の肥大軟骨細胞層で局在が観察されたが、コンドロイチン-6-硫酸は病変部では観察されず、肥大軟骨細胞層下部においてわずかに観察された。

以上のことから TD は成長板のコラーゲンならびにグリコサミノグリカンの分布の異常により、軟骨内骨化における軟骨細胞の分化と石灰化が抑制され発症するものと考えられる。

第 4 章 TD 病変における軟骨内骨化の初期石灰化

第 1 節 TD 病変の軟骨細胞の細胞死について

緒言

第 3 章にて述べたように TD 病変においては成長板におけるコラーゲンならびにグリコサミノグリカンの局在に異常をきたしたことにより、軟骨細胞の分化・成熟に影響を及ぼし、正常な軟骨内骨化が阻害されるものと推測される。軟骨内骨化では、静止軟骨細胞が増殖した後、肥大して肥大軟骨細胞へと分化する。その後、肥大軟骨細胞のアポトーシスによる細胞死が起こると同時に、軟骨小腔周辺の石灰化が始まる。石灰化した軟骨基質は破骨細胞により吸収された後、骨芽細胞によって骨形成が起こり、海綿骨に置換される (Jacques et al., 1999; Kronenberg, 2003)。この肥大軟骨細胞のアポトーシスは、軟骨内骨化における初期石灰化には不可欠と考えられている (Zenmyo et al., 1996)。アポトーシスは細胞死の様式の一つであり、他の様式としてネクローシスがあげられる。この両者は、その生理的ならびに形態学的特徴から分類される。ネクローシスは壊死とも呼ばれ、炎症や外傷などの刺激により細胞の膨化、細胞膜の破壊といった特徴を示す。一方、アポトーシスは、プログラム死と呼ばれているように、遺伝子レベルで制御された生理的機構であり、核の凝縮、DNA の断片化、アポトーシス小体の形成といった特徴があげられる。これまでにアポトーシスを誘発する因子として、Fas、腫瘍壊死因子 (tumour necrosis factor : TNF- α) などのサイトカインが知ら

れており、これらのリガンドが受容体を介してアポトーシスを引き起こす (Gerber and Ferrara, 2000)。TNF- α は、TNF 受容体を介してカスパーゼを活性化させることで、細胞内のタンパク質を分解しアポトーシスを誘発する (Nakayama et al., 2003; Hehlhans and Pfeffer, 2005; MacRae et al., 2006; Kayal et al., 2010)。

軟骨細胞が骨へと置換されるためには、正常な軟骨細胞の成熟およびアポトーシスが必須であると考えられている (Zenmyo et al., 1996)。軟骨内骨化の調節には、インディアンヘッジホッグ (Ihh)、副甲状腺関連タンパク質 (PTHrP)、血管内皮増殖因子 (VEGF) が複雑に絡み合っている (Wallis, 1996; Vortkamp et al., 1996; Ohyama et al., 1997; Weizmanmn et al., 2005)。TD においても、これらの関与が調べられているが、いずれも TD 発症に無関係であることが示されている (Ben-Bassat et al., 1999; Webster et al., 2003; Gay et al., 2007)。また、TD においては、肥大軟骨細胞が細胞死していることがすでに示されている (Rath et al., 2005; 2007c)。先述したように、TD を発症したブロイラーの脛骨近位端の成長板では、肥大軟骨細胞層において II 型コラーゲンならびに X 型コラーゲンが混在しており、正常な軟骨細胞の分化・成熟が阻害され軟骨細胞は細胞死を起こしていることが示唆された。しかしながら、その細胞死はネクロシスによるものかアポトーシスによるものか明らかにされていないのが現状である (Hargest et al., 1985a; Rath et al., 1997; Praul et al., 1997)。

したがって、本研究では、Thiram によって誘発した TD におけ

る軟骨細胞の細胞死について、アポトーシスの情報伝達系において必須であるカスパーゼについて免疫組織化学的に観察した。また、TUNEL法を用いてDNA断片化を観察し、アポトーシスを検討した。

材料および方法

(1) 供試動物およびパラフィン切片作製

第2章と同様の方法でTDを誘発させたブロイラーの脛骨骨端を用いた。前節と同様の方法で組織を包埋しパラフィン切片を作製した。

(2) 免疫組織化学法

作製したパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし、0.01Mリン酸緩衝液(PBS)にて洗浄した。脱パラフィンした切片に対して、目的とする抗原タンパク質を賦活化するため、0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)に浸し、オートクレーブにて121℃、1分間の加圧加熱処理を施した。その後、PBSにて洗浄し、内因性ペルオキシダーゼを除去するため、0.3% H_2O_2 を含むメタノール溶液にて室温で30分間反応させた。PBSで洗浄後、さらに、非特異的反応を阻止するため、1%ヤギ正常血清を含むPBS(ブロッキング溶液)にて、室温で30分間反応させた。続いて、カスパーゼに対する一次抗体としてAnti-active Caspase 3 antibody(abcam)をブロッキング溶液にて適切な濃度に希釈し、パラフィン切片を4℃で一晩反応させた。PBSで洗浄後、二次抗体であるビオチン化ラビットIgG抗体(Vector Laboratories, Inc.)をブ

ロッキング溶液にて 200 倍希釈し、室温で 30 分間反応させた。最後に、PBS 洗浄後のパラフィン切片にペルオキシダーゼ標識アビジン・ビオチン複合体 (Vector Laboratories, Inc.) を室温で 30 分間反応させ、PBS にて洗浄後、ImmPACTTMDAB (Vector Laboratories, Inc.) により発色させた。次いで、アルシアンブルーによる酸性ムコ多糖類染色を施した後、光学顕微鏡 (Nikon) にて観察した。また、免疫組織化学的観察の陰性対照として一次抗体を除去したものをを用いた。

(3) TUNEL 法

アポトーシス細胞の特徴である DNA 断片化の検出には TUNEL 法 (Gibson et al., 1995; Hirota et al., 2006) に基づく、In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche) を用いた。すなわち、作製したパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし、0.01M PBS にて洗浄した。洗浄後、プロテナーゼ K (20 μ g/ml, Tris/HCl 10mM, pH7.4-8.0) (Dako) で、37℃で 15 分間反応させ、核内タンパク質の分解を行ない、DNA を露出した。PBS で洗浄後、0.3% H₂O₂ を含むメタノール溶液にて室温で 30 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを除去した。その後、PBS にて洗浄し、リコンビナントターミナルトランスフェラーゼ (rTdT) にて 37℃で 60 分間反応させ、DNA の切断部分に標識物であるフルオレセインを取り込ませた後、VECTASHIELD Hard SetTM Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Inc.) で封入した。その後、落射蛍光顕微鏡装置 (Nikon) を用いて観察した。また、rTdT の代わりにヌクレオチド混合液 (標識溶液) を

反応させた切片を陰性対照として用いた。更に肥大軟骨細胞層および病変部を上部・中部・下部の 3 つに分け、それぞれの部分で無作為に 3 ヶ所を選択し、その視野における DAPI 染色された総細胞数に対する TUNEL 標識された細胞数を求め、全軟骨細胞における DNA 断片化を示す軟骨細胞の割合を求めた。

(4) 統計処理

JMP9 (SAS) を用いて統計解析を行い、 $p < 0.05$ 値を示すものを有意な差があるものと判定した。

結果

(1) カスパーゼ局在の免疫組織化学的観察

活性化することで DNA 断片化や核凝縮を引き起こすタンパク質分解酵素であるカスパーゼの局在は茶褐色の反応物として観察された。対照区においてカスパーゼの局在は、増殖軟骨細胞層ならびに肥大軟骨細胞層の軟骨細胞においてみられた (図 21A-C)。増殖軟骨細胞層における局在は僅かであったが、増殖層から肥大層に移行する領域の軟骨細胞においてカスパーゼの局在は顕著であった (図 21A)。とりわけ、肥大軟骨細胞層石灰化部および血管周辺の軟骨細胞において強い反応が示された (図 21C)。一方、Thiram 給与した TD におけるカスパーゼの局在は、増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層へ移行する領域、および病変部下部から肥大軟骨細胞層石灰化部の軟骨細胞にみられた (図 22A-D)。また、この領域における軟骨細胞でのカスパーゼ局在は、対照区と比較して特に強い反

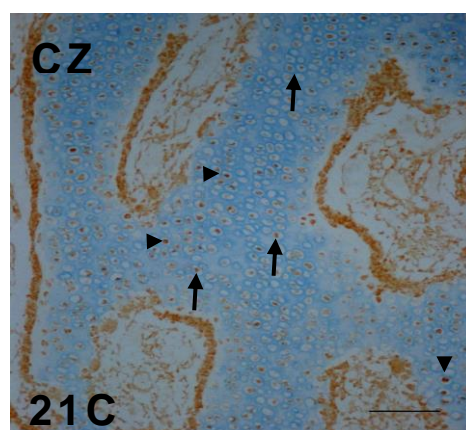
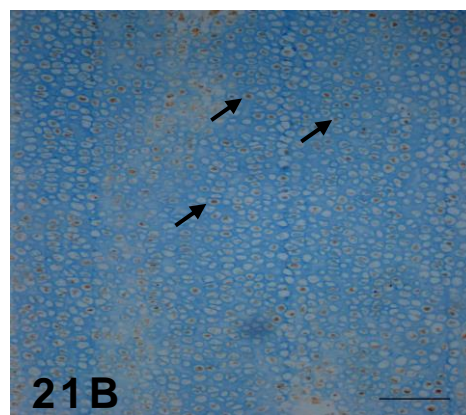
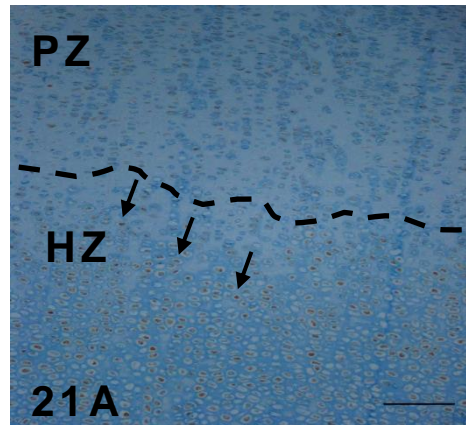


図 21.対照区におけるカスパーゼの局在.

アルシアンブルー染色.

21A.増殖軟骨細胞層.

増殖軟骨細胞層において,カスパーゼの局在がわずかに軟骨細胞にみられた.また,増殖層から肥大層に移行する領域の軟骨細胞においてカスパーゼの局在がみられた(矢印).

21B.肥大軟骨細胞層.

カスパーゼの局在を示す茶褐色の軟骨細胞(矢印)が散在して僅かにみられた.

21C.肥大軟骨細胞層石灰化部.

カスパーゼの局在を示す軟骨細胞がみられた(矢印).また,その局在を示す反応は強かった(矢頭).

PZ:増殖軟骨細胞層. HZ:肥大軟骨細胞層. CZ:肥大軟骨細胞層石灰化部.

Bar=100 μ m.

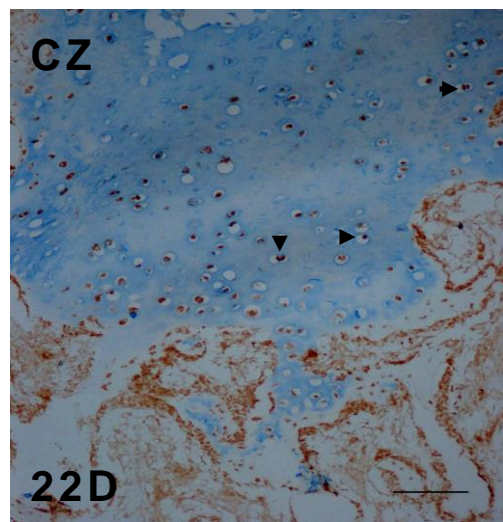
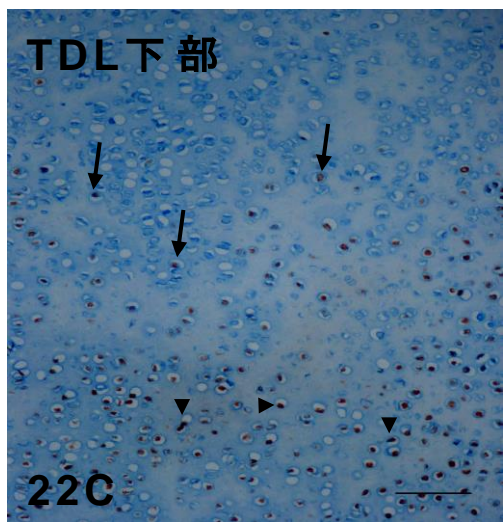
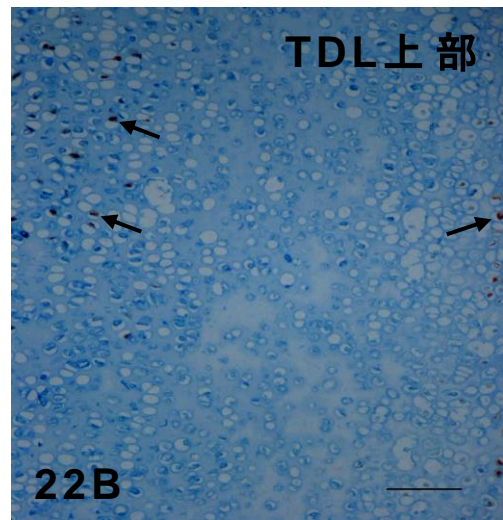
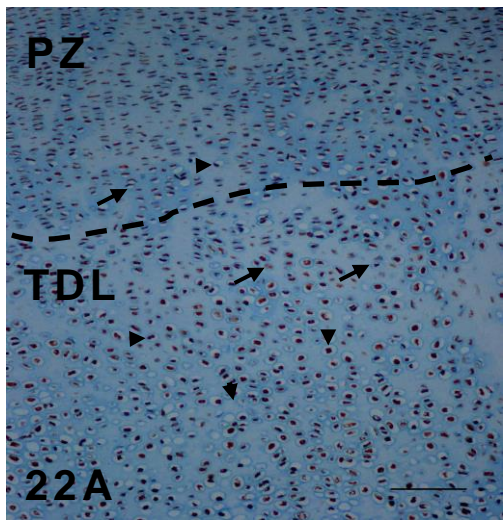


図 22.Thiram 給与区におけるカスパーゼの局在.

アルシアンブルー染色.

22A. 増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層へ移行する領域.

増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層へ移行する領域の軟骨細胞において,カスパーゼの局在がみられた(矢印).また,対照区および病変中央部と比較して非常に強い反応が数多く示された(矢頭).

22B.TD 病変上部.

病変部上部の軟骨細胞においてカスパーゼの局在が示された.しかしながら,病変中央部においてのカスパーゼの局在はみられなかった.

22C.TD 病変下部

病変中央部から肥大軟骨石灰化層に近い領域の軟骨細胞においてカスパーゼの局在がみられた(矢印).また,下方に近づくにつれ強い反応がみられた(矢頭).

22D.肥大軟骨細胞層石灰化部.

石灰化領域の軟骨細胞においてカスパーゼの局在を示す強い反応がみられた(矢頭).

PZ:増殖軟骨細胞層. HZ:肥大軟骨細胞層. TDL:TD 病変.

CZ:肥大軟骨細胞層石灰化部.

Bar=100 μ m.

応が示された（図 22A,C,D）。しかしながら、病変中央部の軟骨細胞に局在はみられなかった（図 22B）。

（２）TUNEL 法による DNA 断片化の観察

アポトーシスによる DNA 断片化を TUNEL 法により観察した結果、細胞核において緑色の蛍光を発した DNA 断片化が観察された。対照区では、増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層の軟骨細胞において蛍光の発色は示さず、肥大軟骨細胞層石灰化部の血管周辺の軟骨細胞で僅かに蛍光の発色が観察された（図 23）。一方、Thiram を給与して TD を誘発した病変部において、増殖軟骨細胞層の軟骨細胞では対照区と同様に蛍光の発色は観察されなかったものの（図 24A）、肥大軟骨細胞層を含む病変部の上部から下部にかけて、軟骨細胞における DNA 断片化が多数観察された（図 24B,C）。また、肥大軟骨細胞層石灰化部ならびにその血管周辺の軟骨細胞での DNA 断片化は僅かな局在を示しただけであった（図 24D）。

肥大軟骨細胞層および病変部を 3 つに分け、DAPI 染色により肥大軟骨細胞層の軟骨細胞の全細胞数を計測するとともに、同一視野における DNA 断片化した細胞数を計測し、軟骨細胞における DNA 断片化の割合を求めたところ、対照区においては、肥大軟骨細胞層のわずか 1%以下にしか DNA 断片化は観察されなかった。しかしながら、TD 病変では、上部で約 10%に DNA 断片化が観察され、その出現は病変部の下部になるにつれて有意に増加し、88.7%にまで達した（図 25）。

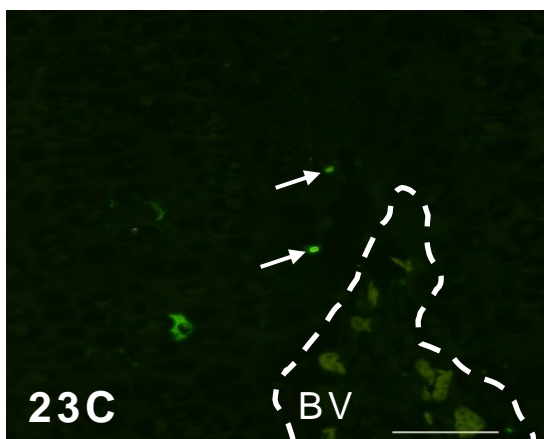
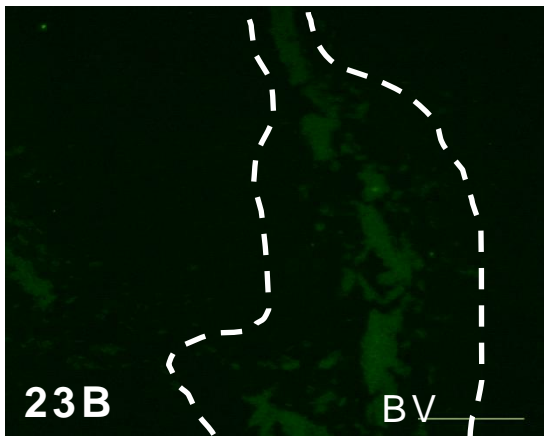
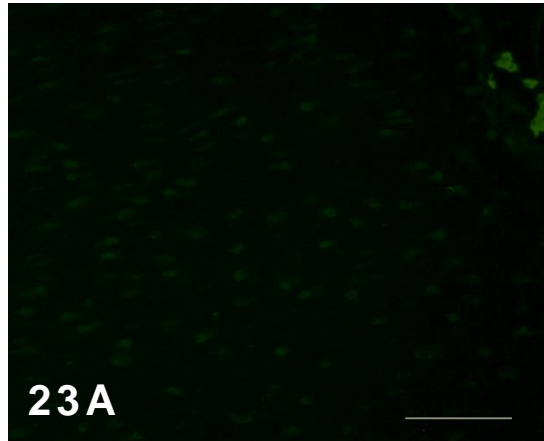


図 23.対照区における DNA 断片化.

23A.増殖軟骨細胞層.

DNA 断片化によるアポトーシス細胞を示す蛍光の発色はみられなかった.

23B.肥大軟骨細胞層.

DNA 断片化によるアポトーシス細胞を示す蛍光の発色はみられなかった.

23C.肥大軟骨細胞層石灰化部.

血管周辺において僅かであるが, DNA 断片化によるアポトーシスを示す蛍光の発色が軟骨細胞にみられた (矢印).

BV:血管. Bar=100 μ m.

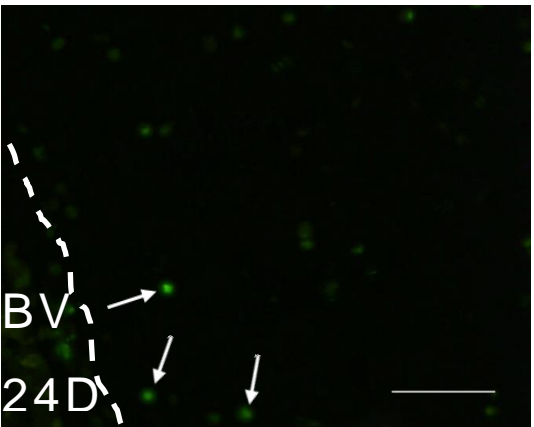
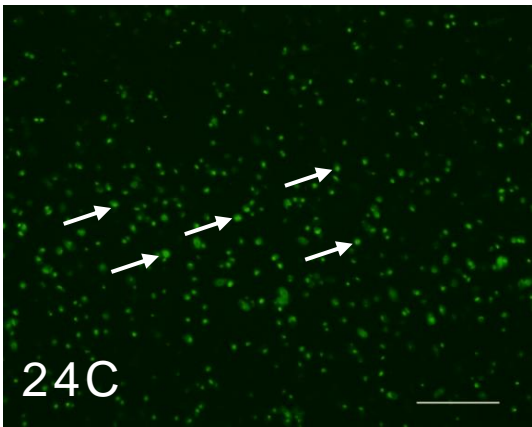
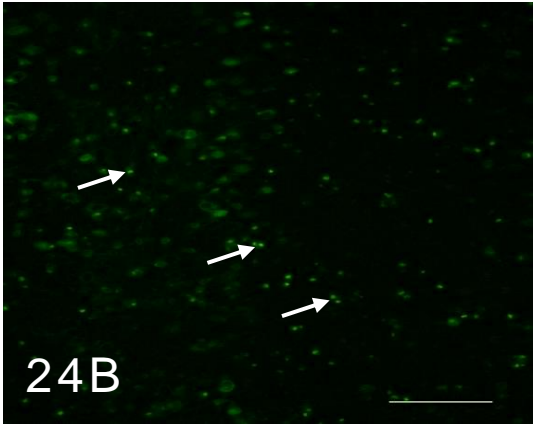
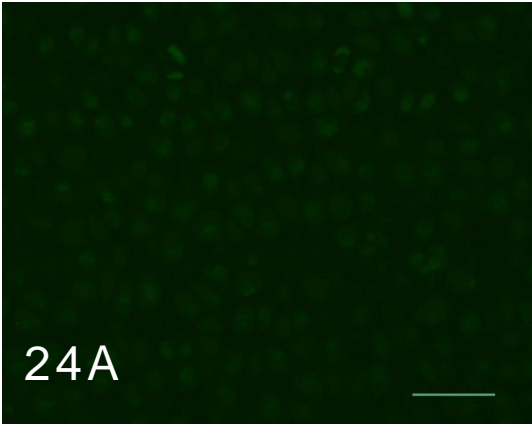


図 24. Thiram 給与区における DNA 断片化.

24A.増殖軟骨細胞層.

DNA 断片化によるアポトーシス細胞は,対照区と同様にみられなかった.

24B.TD 病変部上部.

DNA 断片化によるアポトーシス細胞を示す蛍光の発色(矢印)が多数みられた.

24C.TD 病変部下部.

上部より多くの軟骨細胞でアポトーシスを示す蛍光の発色(矢印)がみられた.

24D.肥大軟骨細胞層石灰化部.

石灰化部の血管周辺で,僅かにアポトーシスを示す蛍光の発色(矢印)がみられた.

BV:血管. Bar=100 μ m.

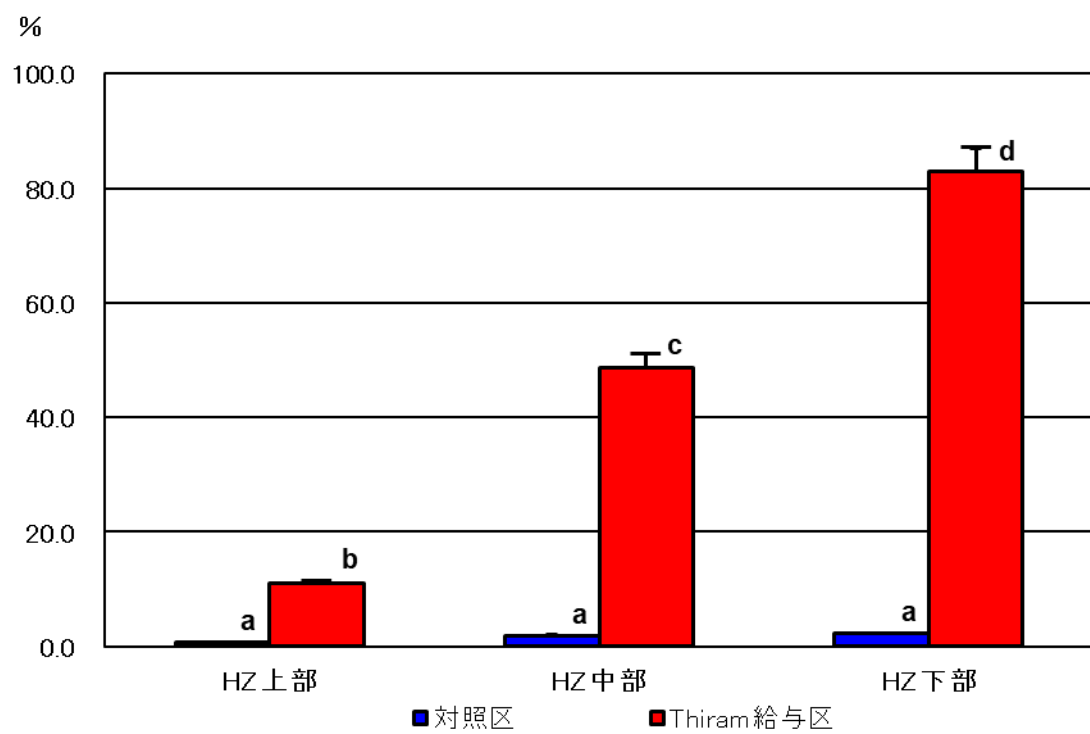


図 .25 DAPI 標識 に対する TUNEL 標識細胞の割合 .

異符号間は p 値が < .001 で有意差あり .

考 察

本研究において、免疫組織化学的方法および TUNEL 法を用いて脛骨近位端を観察した結果、正常な脛骨での DNA 断片化によるアポトーシス細胞は、これまでに知られているように肥大軟骨細胞層石灰化部および血管周辺で僅かに観察された (Rath et al., 2005)。TD 病変におけるアポトーシスは、病変中央部における軟骨細胞で多数観察され、肥大軟骨細胞層石灰化部および石灰化部の血管周辺においては対照区と同様、僅かに観察されるのみであった。したがって、TD では成長板上部の肥大軟骨細胞はアポトーシスによる細胞死を引き起こしており、その後の軟骨内骨化が阻害され、TD 特有の組織学的特徴を示すものと考えられる。アポトーシスの情報伝達系において必須であるカスパーゼを免疫組織化学的に観察した結果、対照区においてカスパーゼの局在は、増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層でみられた。とりわけ、肥大軟骨細胞層石灰化部、およびその血管周辺では、局在を示す反応が強く、カスパーゼの活性化によりアポトーシスを引き起こしているものと考えられ、これまでの報告と一致する (Zenmyo et al., 1996)。TD におけるカスパーゼの局在は、対照区と同様に肥大軟骨細胞層石灰化部、およびその血管周辺で局在がみられた。更にカスパーゼの局在を示す強い反応が増殖軟骨細胞層から病変部上部でみられたことから、この領域においてカスパーゼの活性化が高まり、アポトーシスが引き起こされていることが推測された。そのことからアポトーシスによりすでに細胞死を起こしている病変中央部では、カスパーゼの局在はみられなかった。このことは TUNEL 法によりアポトーシス細胞が病変中央部で多数みられたことに

より、この領域の軟骨細胞は、すでに細胞死を起こしているため、カスパーゼの局在がみられなかったことが示唆される。

以上のことより、TD においては増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層に移行する領域においてカスパーゼが活性化されアポトーシスを引き起こし、軟骨内骨化の初期段階で過剰な細胞死が生じてしまうことが考えられる。また、この軟骨細胞の過剰な細胞死が正常な肥大軟骨細胞の分化、成熟とその後の石灰化を阻害し、その結果、未石灰化の軟骨基質が蓄積し軟骨塊が形成されるものと考えられる（図 26）。

要約

TD を発症したブロイラーの脛骨近位端では、正常なものとは異なり、肥大軟骨細胞層においてⅡ型・X型コラーゲンが混在しており、軟骨内骨化の異常が考えられる。このことから、TD 病変では軟骨細胞の分化・成熟が阻害され軟骨細胞は細胞死を起こしていることが示唆される。しかしながら、その細胞死はネクローシスによるものかアポトーシスによるものか明らかにされていない。したがって、本研究では、TD 病変の細胞死についてアポトーシスの情報伝達系であるカスパーゼについて免疫組織化学的に観察し、TUNEL 法を用いて DNA 断片化を観察し、アポトーシスか検討した。

活性化することで DNA 断片化や核凝縮を引き起こすタンパク質分解酵素であるカスパーゼの局在を免疫組織化学によって観察した結果、対照区においては肥大軟骨細胞層石灰化部および石灰化部の血管周辺では強い反応がみられた。一方、Thiram 給与

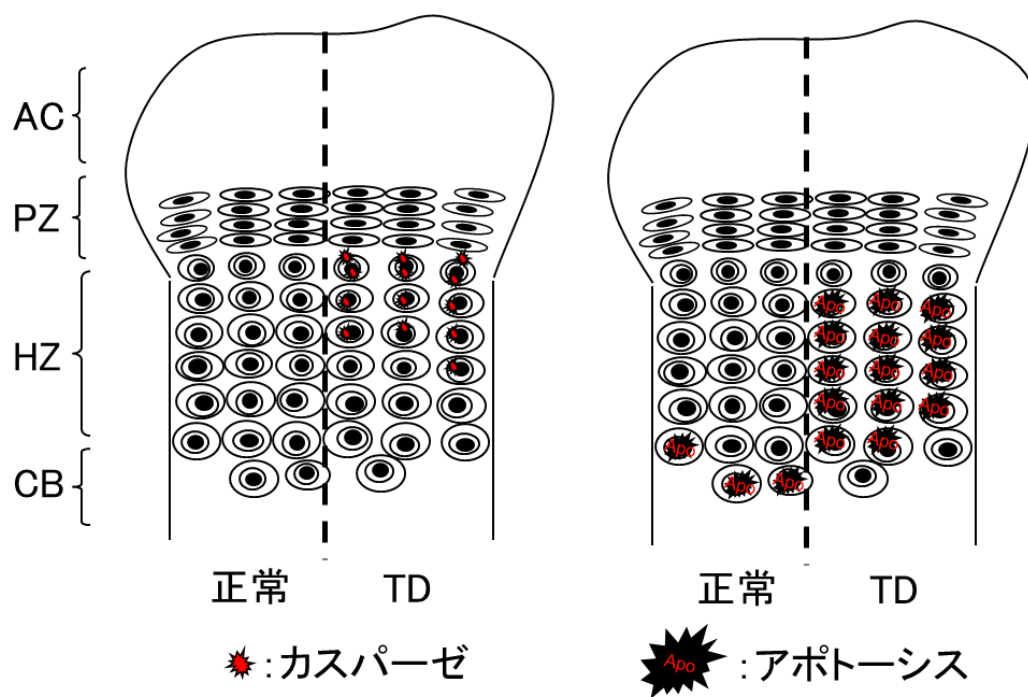


図 26.カスパーゼの活性とアポトーシス細胞の局在の模式図.

区では増殖層から肥大層に移行する領域において強い反応が観察され、病変中央部では観察されなかった。すなわち、TD では、軟骨内骨化の初期段階において過剰なアポトーシスの誘導が起きていることが考えられる。また、TUNEL 法によりアポトーシス細胞を観察した結果、対照区では、肥大軟骨細胞層石灰化部ならびにその血管周辺で僅かに観察された。しかし、Thiram 給与区では、アポトーシス細胞の局在は対照区と同様にみられた以外に、TD 病変中央部において多数観察された。

以上のことから、TD では軟骨内骨化初期にカスパーゼが活性化して過剰なアポトーシスによる細胞死が生じることによって軟骨内骨化が阻害され、成長板内に軟骨塊が残存することによって TD が発症するものと考えられる。

第 2 節 軟骨基質の石灰化と破骨細胞

緒言

前節で述べたように骨の形成には、軟骨細胞が成熟し肥大することならびに、アポトーシスによる細胞死によって周囲の軟骨基質の石灰化の開始が関与している。軟骨細胞の成熟に伴ってプロテオグリカンやヒアルロン酸等が増加し、これらは石灰化開始時に最大となる。一方、細胞外基質におけるコラーゲン濃度は、増殖および成熟期には増加するが、肥大層において減少する (Alini et al., 1992)。軟骨の石灰化は肥大軟骨細胞の軟骨小腔周囲の細胞外基質にカルシウムが沈着して起きる (初期石灰化)。その後、破骨細胞による石灰化した軟骨基質の吸収が行なわれるとともに、その吸収された軟骨基質にかわって、骨芽細胞による骨形成が行なわれ、最終的に海綿骨に置換されることで骨化が進行する (楠原ら., 1992)。

軟骨基質の初期石灰化が不十分な場合には、破骨細胞による骨基質の吸収も不活発となり、その後の骨化に影響を及ぼし、肥大軟骨細胞層が厚くなり軟骨塊として肥大軟骨細胞層に残存する (Reiland et al., 1978; Prasad et al., 1972)。破骨細胞の形成は血管侵入と一致して起こることから、血管の形成は軟骨内骨化において必須である。また、血管侵入は、軟骨細胞周囲の初期石灰化においても必須であるとも考えられている。血管の形成は、VEGF により誘導され、肥大軟骨細胞石灰化部などの無酸素状態で軟骨細胞に発現する (Nakagawa et al., 2000)。マウスにおいて水溶性 VEGF 受容体を骨端に注射すると、VEGF の機能が阻害さ

れ、TD と類似した肥大軟骨細胞層の拡大がみられる（Gerber et al., 1999; Praul et al., 2000）。

したがって、本研究では TD 病変における肥大軟骨細胞層石灰化部における軟骨基質のカルシウム沈着ならびに破骨細胞の活性の違いについて組織化学的に観察し、初期石灰化や骨置換への影響について検討した。

材料および方法

（１）供試動物およびパラフィン切片作製

これまでと同様の方法で TD を誘発させ、脛骨近位端を採取し、組織を包埋しパラフィン切片を作製した。また、未脱灰切片を作製するために、採取した組織を 10%ホルマリン緩衝液（pH7.0）にて約 4 日間浸漬固定した。10% EDTA 溶液（pH7.4）を用いた脱灰を行わずに、組織をアルコール上昇系列にて脱水し、パラフィンに包埋した。その後、ミクロトーム（Leica）を用いて 5 μ m の厚さのパラフィン切片を作製した。パラフィン切片は、卵白グリセリンコーティングスライドグラスに貼付した。

（２）von kossa 染色

未脱灰組織のパラフィン切片はキシレンにより脱パラフィンし、イオン交換水で洗浄後、von kossa 硝酸銀法（Dan et al., 2009）を用いて、石灰化した領域を染色した。その後、イオン交換水で洗浄後、アルシアンブルー染色を施した。作製した切片は、光学顕微鏡（Nikon）を用いて観察した。

(3) 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ活性 (TRAP) の検出

作製した脱灰組織のパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし、イオン交換水で洗浄後、破骨細胞マーカーとして知られる、TRAP を Burston 法 (Barka, 1960) により検出した。その後、イオン交換水で洗浄した後、アルシアンブルー染色によって酸性ムコ多糖類を染色した。

結果

(1) von kossa 染色による石灰化の観察

von kossa 染色を施した結果、脛骨近位端においてカルシウムの沈着が軟骨基質内に黒色を示して観察された (図 27)。対照区の成長板では、肥大軟骨細胞層上部の軟骨小腔周囲の基質に点状にカルシウムが沈着しているのが観察された (図 27A, 28A)。とりわけ、血管周囲でカルシウムの沈着は多く、肥大軟骨細胞層上部から肥大軟骨細胞石灰化部にかけて、次第にカルシウムの沈着は増加した。肥大軟骨細胞層石灰化部では、全ての軟骨細胞周囲は黒色に強く染色され、石灰化していた (図 27A, 28AB)。一方、Thiram を給与したブロイラーの TD 病変の肥大軟骨細胞層においては、一部の軟骨細胞周囲にわずかに石灰化が観察されるのみであった (図 27B, 28C)。しかしながら、肥大軟骨層石灰化部の最下部において、軟骨基質の石灰化が見られた (図 27B, 28D)。

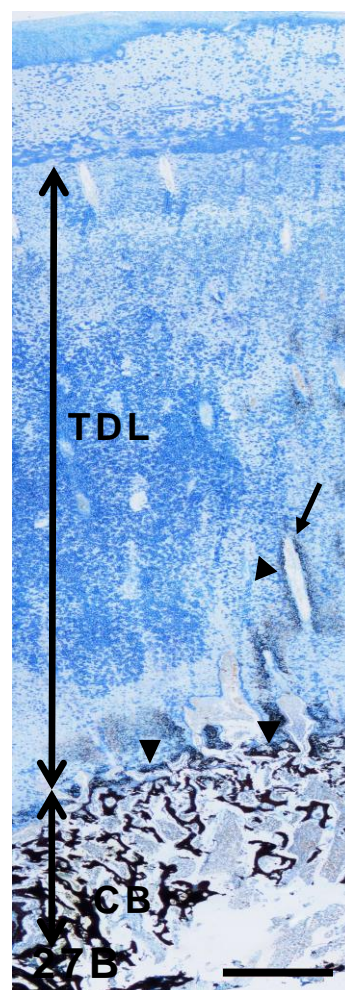
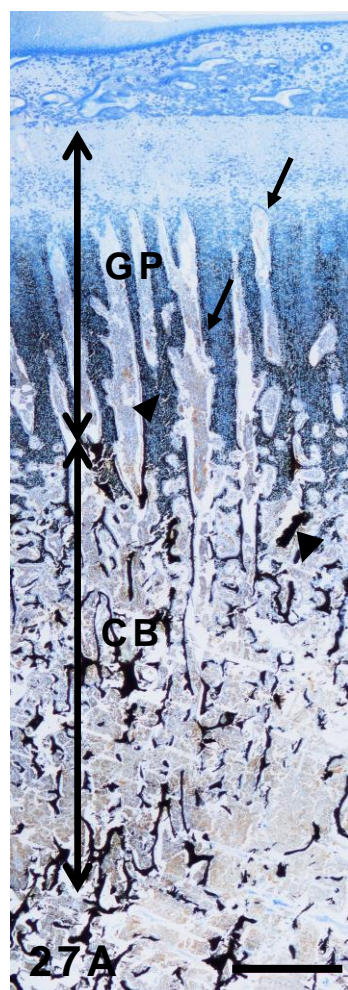


図 27. ブロイラーの脛骨近位端. Von kossa 染色.

27A. 対照区.

成長板のコラーゲン線維がアルシアンブルー染色により薄青色に染まり,血管が成長板の深部にまで侵入していた(矢印).また,血管周辺において石灰化領域が黒く染色されており,海綿骨においては濃い黒色を呈しているのがみられた(矢頭).

27B. Thiram 給与区.

肥大した成長板においてコラーゲン繊維がアルシアンブルー染色により淡い青色に染色されていた.また,成長板および肥大軟骨細胞石灰化部への血管侵入はほとんどみられず(矢印),成長板と海綿骨の境界のみで石灰化領域が黒く染色されており,海綿骨においては対照区と同様に濃い黒色を呈しているのがみられた(矢頭).

GP:成長板. TDL:TD 病変. CB:海綿骨.

Bar=1mm.

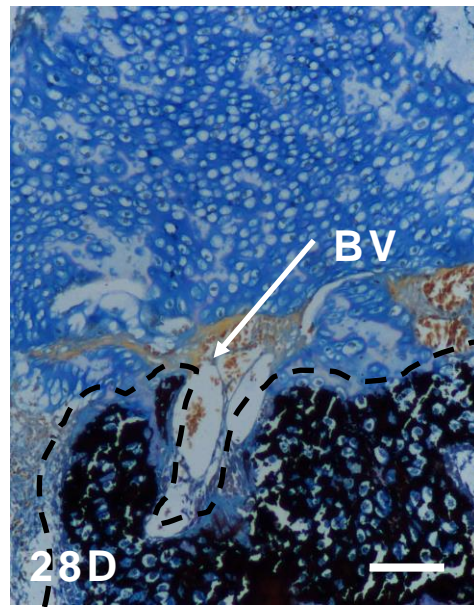
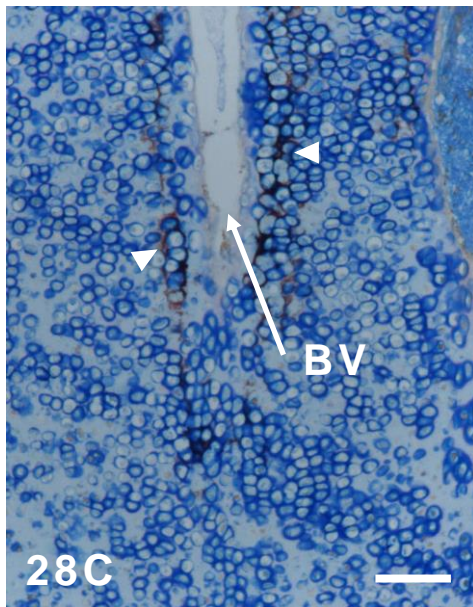
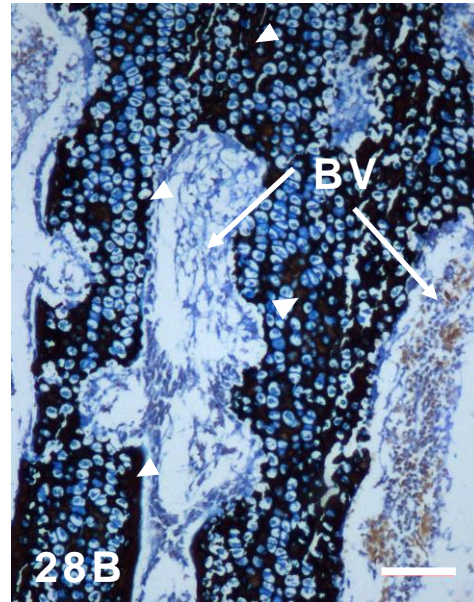
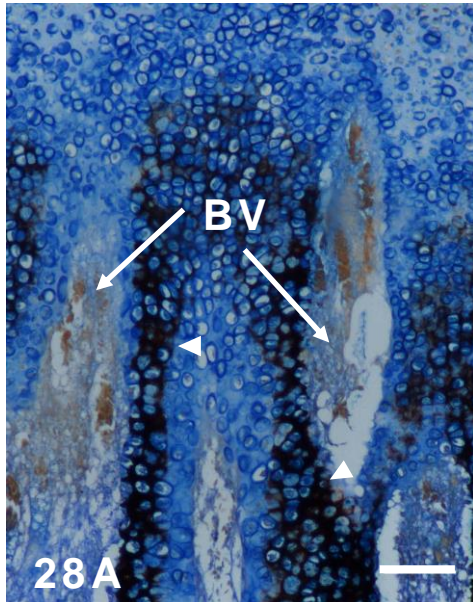


図 28. 血管周辺部. Von kossa 染色.

28A. 対照区.肥大軟骨細胞層上部.

軟骨小腔周囲の基質に点状にカルシウムが沈着していた（矢頭）.とりわけ,血管周辺においてカルシウムの沈着は多く,軟骨基質の石灰化が徐々に進行しているのが観察された.

28B. 対照区.肥大軟骨細胞層石灰化部.

ほとんどの軟骨基質が石灰化しており,この領域の全ての軟骨細胞周囲が Von kossa により強く黒色に染色されていた（矢頭）.

28C. TD 病変部上部.

血管周辺の軟骨基質において,僅かに石灰化が観察された（矢頭）.

28D. TD 病変部下部.

肥大軟骨細胞層の最下部において,軟骨基質の石灰化がみられた.しかし,対照区とは異なり,石灰化と非石灰化の領域が明確に区分けされていた（点線部）.

BV:血管.

Bar=100 μ m.

(2) TRAP 活性の観察

TRAP 染色を施した結果、TRAP 活性は赤紫色のアゾ色素産物として観察された (図 29)。対照区では、肥大軟骨細胞層にみられる血管周辺の軟骨基質表面に、多核巨細胞の破骨細胞が観察された (図 29A, 30A)。また、肥大軟骨細胞層石灰化部の軟骨基質表面においても TRAP 陽性の破骨細胞が多数観察された (図 29A, 30B)。一方、TD 病変では、肥大軟骨細胞石灰化部にのみ TRAP 陽性の破骨細胞が観察された (図 29B, 30C)。また、この部位における血管内では、TRAP 陽性の単核の破骨細胞前駆細胞がみられるのみであり、多核の破骨細胞はみられなかった。加えて、肥大軟骨細胞層石灰化部の軟骨基質において著しい TRAP の蓄積が観察された (図 29B, 30D)。

考察

本研究の第 3 章において II 型コラーゲンの分布が、第 4 節第 1 節において肥大軟骨細胞のアポトーシスが TD 発症の要因であることを示した。しかしながら、一方で、肥大軟骨細胞層への血管侵入阻害や肥大軟骨細胞層石灰化部での破骨細胞による骨吸収能の低下が TD 発症の原因とする報告もある (Gay et al., 1985; Lawler et al., 1988)。本研究において、von kossa 染色により軟骨基質の石灰化を観察したところ、対照区では肥大軟骨細胞層上部から肥大軟骨細胞石灰化部にかけて、徐々に軟骨基質の石灰化が進行していることが観察された。一方、TD 病変では、軟骨基

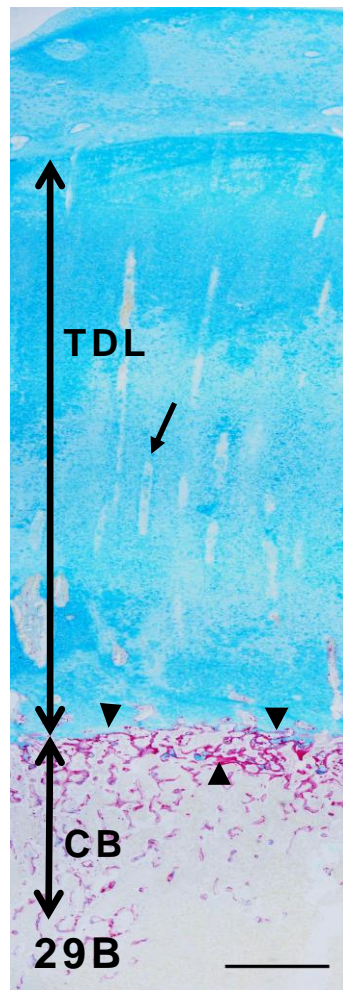
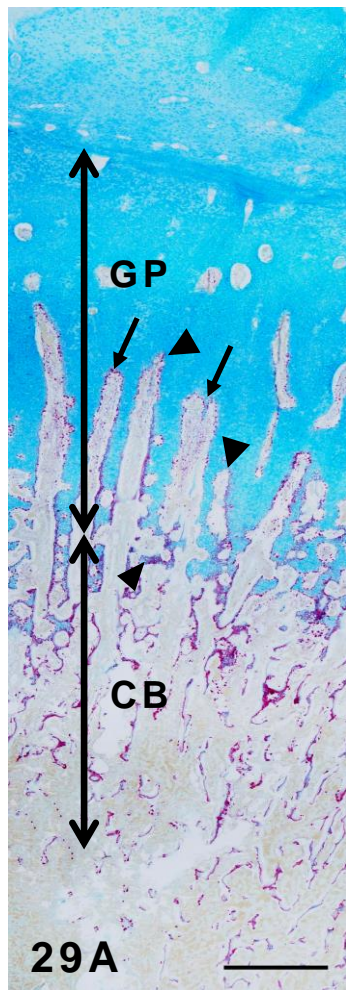


図.29 ブロイラーの脛骨近位端. TRAP 染色.

29A. 対照区.

成長板のコラーゲン線維がアルシアンブルー染色により青色に染まり,血管が成長板の深部にまで侵入していた(矢印).また,血管周辺において赤色を呈した TRAP 活性を有する破骨細胞がみられた(矢頭).

29B. Thiram 給与区.

肥厚した成長板においてコラーゲン繊維がアルシアンブルー染色により青色に染色されていた.また,成長板および肥大軟骨細胞石灰化部への血管侵入はみられず,成長板と海綿骨の境界のみで赤色を呈した破骨細胞がみられた(矢頭).

GP:成長板. TDL:TD 病変. CB:海綿骨.

Bar=1mm.

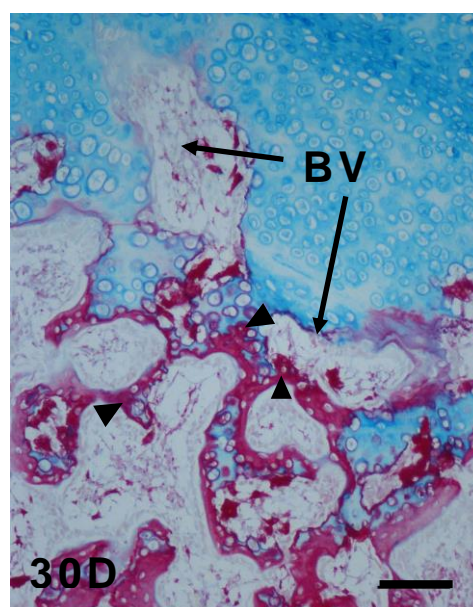
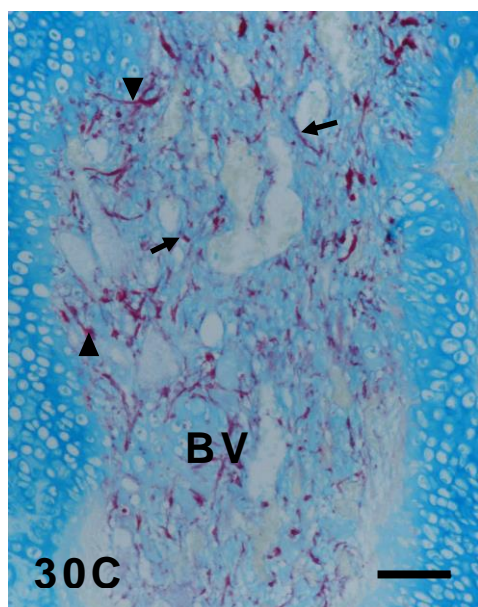
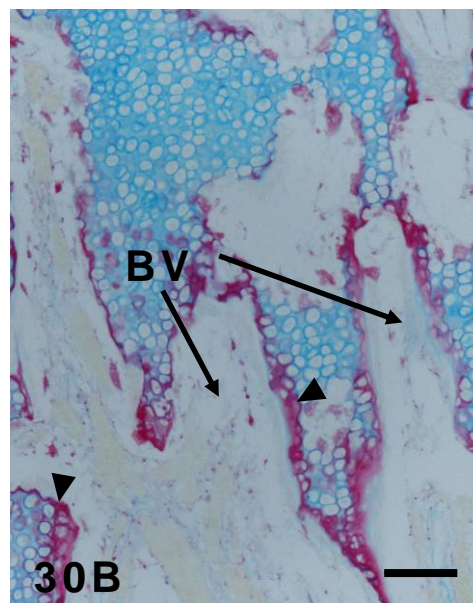
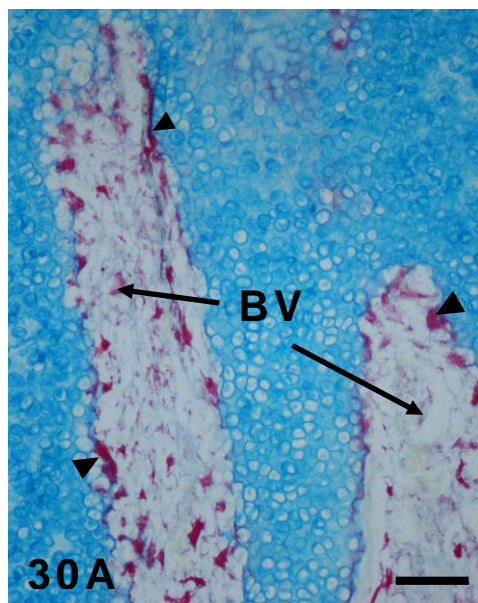


図 30. 肥大軟骨細胞層 .TRAP 染色 .

30A. 対照区 .肥大軟骨細胞層上部 .

血管形成が規則正しく生じ ,血管周辺の軟骨基質表面に破骨細胞 (矢頭) が観察された .

30B. 対照区 .肥大軟骨細胞層石灰化部 .

多核巨細胞の破骨細胞 (矢頭) が血管周辺の軟骨基質表面に多数観察された .

30C. Thiram 給与区 .病変部上部 .

TRAP 陽性を示す赤色を呈した破骨細胞は ,血管内においてわずかに観察された (矢頭) .また ,この部位では単核の破骨細胞前駆細胞 (矢印) が TRAP 陽性の細胞として観察された .

30D. Thiram 給与区 .病変部下部 .

血管形成が不規則で破骨細胞はわずかに観察された .しかし ,肥大軟骨細胞層石灰化部の軟骨基質においては著しい TRAP 活性の蓄積が観察された (矢頭) .

BV: 血管 . Bar=100 μ m .

質の石灰化はほとんど観察されなかった。肥大軟骨細胞の軟骨基質が石灰化するためには、血管の侵入が必須であると考えられている (Vu et al., 1998; Gerber et al., 1999)。軟骨では血管内皮誘導因子である VEGF により血管が侵入すると考えられており、TD 発症には VEGF が関与すると推測されるが、TD 発症への VEGF の関与は否定されている (Gay et al., 2007)。なお、TD 病変には血管が観察されず、血管侵入が欠如していることが報告されている (Pines et al., 2005)。したがって、TD 病変では肥大軟骨細胞層に血管の侵入が何らかの原因で阻害されているものと推測される。

肥大軟骨細胞層における破骨細胞の減少と TRAP 活性の低下により、軟骨細胞基質の吸収が阻害された結果、肥大軟骨細胞層が肥厚することがラットで示されている (Sanchez et al., 2000)。この肥大軟骨細胞層の肥厚は、TD 病変と類似しており、TD 発症の要因として破骨細胞による軟骨基質吸収の低下が推測される (Lawler et al., 1988)。本研究では、TD 病変部において血管侵入がみられず、その結果、TRAP 陽性の破骨細胞もみられなかった。破骨細胞の活性化にはリン酸カルシウム、すなわち石灰化した基質が必須である。したがって、TD の発症は、単なる破骨細胞による軟骨基質吸収の低下ではなく、むしろ、肥大軟骨細胞層石灰化部下方より上方の肥大軟骨細胞層で骨基質の石灰化が起こらなかったため、破骨細胞の分化ならびに軟骨基質吸収が起こらなかったことによるものと推測される。実際 TD 病変下部では血管内に単核の破骨細胞前駆体が未分化の状態で多数観察された。また、一方で、肥大軟骨細胞層石灰化部の狭い範囲において、

著しい TRAP の蓄積が観察された。破骨細胞は、TRAP を含む酸性ホスファターゼを細胞外に分泌し、その活性によって石灰化した軟骨基質を溶解する。このことから考えると、TD の肥大軟骨細胞層石灰化部においては、上部の肥大軟骨細胞層における骨吸収の阻害を補償するように、破骨細胞による著しい軟骨基質の吸収が行なわれているものと推測される。これらがどのような因子で促進されるかは現在のところ明らかとされていないが、TD 病変における一つの組織化学的特徴と考えられる。

以上の結果から、TD では肥大軟骨細胞層への血管侵入が阻害され、肥大軟骨細胞層における軟骨基質の石灰化が起こらず、その結果、破骨細胞は形成されずに軟骨基質の吸収が遅延して、TD が発症するものと推測される（図 31）。

要約

TD の組織学的特徴として、未石灰化の軟骨塊の残存ならびに血管侵入の欠如がある。軟骨基質の初期石灰化が不十分な場合には、破骨細胞による吸収も不活発となり、その後の骨化に影響を及ぼすことが知られている。また、破骨細胞の形成は血管侵入の時期と一致していることや、軟骨内骨化には血管の形成が必須であることが知られている。したがって、本研究では TD 病変における軟骨基質の石灰化ならびに破骨細胞について組織化学的に観察し、正常なものと比較した。

von kossa 染色の結果、対照区では、肥大軟骨細胞層上部から肥大軟骨細胞層石灰化部にかけて徐々に石灰化が進行しており、血管周辺においてカルシウムの沈着がみられた。また、血管侵入は成長

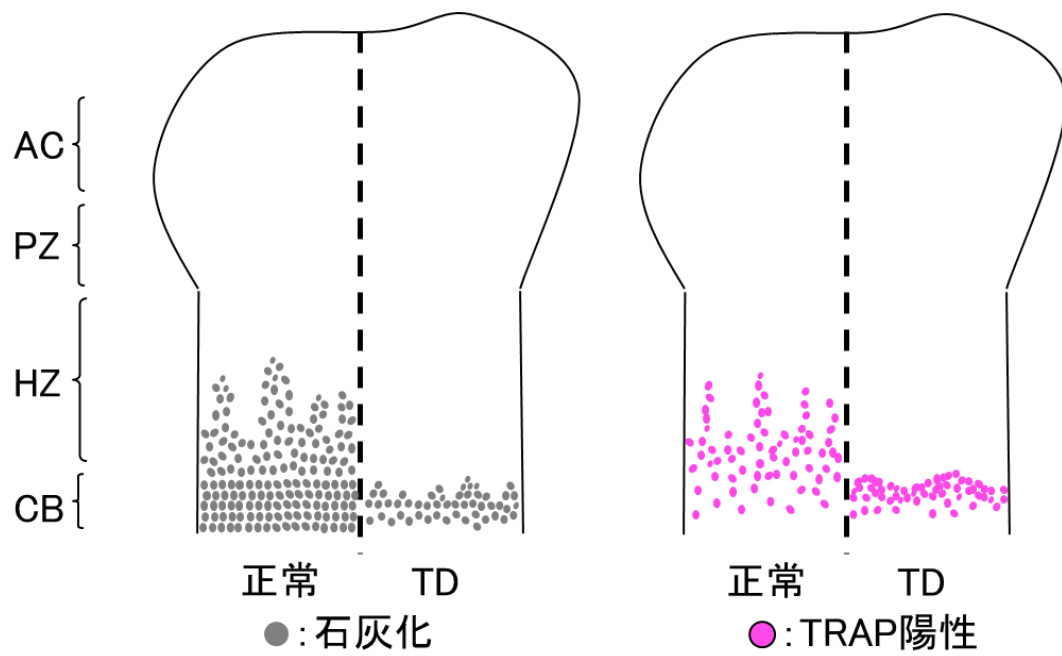


図 31.石灰化領域と TRAP 陽性の破骨細胞の模式図.

板深部まで達しており、その血管周辺の軟骨基質表面に多核巨細胞の破骨細胞が観察され、骨吸収が行なわれていた。一方、**Thiram** 給与区においては、肥大軟骨細胞層では石灰化がほとんどみられず、肥大軟骨細胞層下部と海綿骨との境界において軟骨基質周囲に石灰化が観察された。さらに、血管侵入が肥大軟骨細胞層に観察されず、肥大軟骨細胞層下部の血管内では単核の破骨細胞前駆細胞がみられ、**TRAP** 活性が軟骨基質において著しく蓄積していた。

以上のことから、**TD** 病変においては肥大軟骨細胞層への血管侵入が阻害され、肥大軟骨細胞層における軟骨基質の石灰化がみられなかった。その結果、破骨細胞の分化が抑制され、軟骨基質の吸収が阻害され、**TD** が発症するもの推測される。

第 5 章 総括

ニワトリの深刻な疾病の一つとして、脚弱（Leg Weakness）が知られている。脚弱は脛骨の脆弱化による骨折を引き起こし、起立困難となる。脚弱を発症したニワトリは廃用淘汰の対象となり、養鶏産業に多大な経済的損失をもたらしている。脚弱の原因として、ビタミン D 欠乏、ウィルスの関節への感染などが示唆されているが、脚弱の主たる原因として脛骨軟骨異形成症（Tibial Dsychondroplasia:TD）が示されている（Farquhason et al., 1992）。TD では、脛骨近位端の成長板に軟骨塊が蓄積して石灰化が阻害されること、成長板において血管侵入がみられないなど、成長期における軟骨内骨化に異常をきたし、骨強度の低下が引き起こされる。この疾病は、幼雛期において急速な成長を示すブロイラーで頻発し、七面鳥やアヒルなどにも発症することが知られている（Hargest et al., 1985a; Orth and Cook, 1994）。近年、低カルシウムや銅欠乏の飼料（Farquharson et al., 1995）、フサリウム真菌類のマイコトキシン（Wu et al., 1993）、およびジチオカルバメート系（Vargas et al., 1983; Rath et al., 1995）を添加した飼料で、ブロイラーの TD が誘発されることが示されている。とりわけ、ジチオカルバメート系のひとつである Tetramethylthiuram disulfide(Thiram)は短時間、かつ効率的に TD を誘発し、その TD 病変は自然発症したものと病理学的特徴が一致していることが明らかにされている（Orth and Cook, 1994; Rath et al., 2004）。一般に脛骨などの長管骨では未分化間葉系細胞が軟骨細胞に分化した後、骨へと置き換わる軟骨内骨化によっ

て形成され、骨は長軸方向に伸長する。骨端の成長板は、それぞれ特徴的な形態像を示す静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞から構成され、長軸方向に順次規則正しく配列している。軟骨内骨化は静止軟骨細胞層より増殖した軟骨細胞が徐々に肥大し、肥大軟骨細胞層を形成する。これらの肥大した軟骨細胞はアポトーシスを起こし、周囲の軟骨基質の石灰化が開始する。その後、石灰化した軟骨基質は血管を介して運搬された破骨細胞により吸収され、骨芽細胞によって骨組織へと置換される（Howlett, 1980; Wang et al., 2003）。この一連の軟骨細胞の分化には軟骨の主成分であるコラーゲンやその分解酵素である MMP が関与している。コラーゲンは骨にかかる物理的な圧力や張力、ねじれに対する耐久性を骨に付与している（Kirsch and Wuthier., 1994）。一般に骨や軟骨などの硬組織に存在するコラーゲンは主に、7 種類で構成されている（Eyre, 2001）。その中でも、I・II・III・X 型コラーゲンが骨端において特異的に分布し、石灰化に関与している（Phornphitkul and Gruppuso, 2009）。コラーゲンは成長板において特異的な局在性を示し、II 型コラーゲンは増殖軟骨細胞層、X 型コラーゲンは肥大軟骨細胞層のマーカーとして研究に用いられている（Reginato et al., 1998; Webster et al., 2003）また、プロテオグリカンのコアタンパク質とグリコサミノグリカンが共有結合した糖タンパク質であり、骨や軟骨における細胞の分布や石灰化を調整している。軟骨においては、ケラタン硫酸やコンドロイチン硫酸といったグリコサミノグリカンを構成要素にもつプロテオグリカンが豊富に含まれている（Funderburgh, 2000; Nakamura et al., 2001; Lamoureux et al., 2007）。

本研究では、TD 発症機構を解明するために人為的誘発モデルを用いて、急速な体重増加であるメカニカルストレスが TD 発症におよぼす影響、ならびに TD の特徴である軟骨塊の残存をもたらす軟骨内骨化への影響について検討した。とりわけ、骨成長を調整する軟骨内骨化の観察においては、軟骨の主成分であるコラーゲンやグリコサミノグリカンの局在についての免疫組織化学的観察を行った。さらに軟骨細胞の細胞死について、アポトーシスの際に活性化し DNA 断片化や核凝縮を引き起こすカスパーゼの局在ならびにアポトーシス細胞の局在、その後の石灰化について組織化学的観察を行った。

これまで、人為的に骨に対する負荷の増加、および軽減を行ない骨成長への影響を調べた結果、適度な負荷は骨成長を促進させ、軽減は運動力の向上をもたらすという報告がなされている (Hurwitz et al., 1992; Rutten et al., 2002; Rawlinson et al., 2009)。しかしながら、負荷であるメカニカルストレスと TD 発症との関連についての報告はなされていない。そこで、TD 発症の要因として、ブロイラー幼雛期における急速な体重増加の影響に着目し、体重増加の緩慢な産卵鶏での Thiram 給与による TD 誘発、および制限給餌により急速な体重増加を緩和した際の、Thiram 給与による TD 発症の有無を調べた。Thiram 添加飼料を給与した産卵鶏から採取した脛骨近位端では、何れの日齢においても TD の発症は観察されず、正常な脛骨近位端成長板がみられた。一方、Thiram 添加飼料を給与したブロイラーの脛骨近位端においては、これまでの報告通り TD が誘発された (Rath et al., 2004; 2007a)。さらに、その病変は 20 日齢において採取したす

べてで TD が発症しており、重度の指標である TD index は最大の 2 を示した。その後、25 日齢においても TD は観察されたが TD index の値は小さくなり、TD が回復していることが示された。また、急速に体重増加を示す 10 日齢以降のブロイラーにおいて、制限給餌を施して体重増加を抑制した結果、20 日齢における TD index の値は小さくなり、自由摂取と比較して残存している軟骨塊が小さくなっていた。これらのことから、急速な体重増加、すなわちメカニカルストレスが TD 発症、および TD 病変の重症度に及ぼしていることが示唆された。また、採取した脛骨近位端を常法にしたがってパラフィン切片を作製し、一般染色および免疫組織化学を施して顕微鏡観察を行なった。一般染色により TD 病変を組織化学的に観察したところ、軟骨細胞の萎縮および消失がみられた。免疫組織化学法でコラーゲンの局在を観察した結果、対照区では、これまでの報告通り、増殖軟骨細胞層にⅡ型コラーゲン、肥大軟骨細胞層にⅠ型コラーゲンが局在していた。一方、TD においてⅠ型コラーゲンは対照区と同様の局在であったが、TD 発症によりその局在は拡大していた。また、Ⅱ型コラーゲンは増殖軟骨細胞層に加え、病変部を含む肥大軟骨細胞層にも観察され、対照区と比較して有意にその局在は拡大していた。このことから TD 病変では増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層に移行する軟骨基質の成熟が不十分であることが示唆される。また、軟骨基質の主要なグリコサミノグリカンであるケラタン硫酸およびコンドロイチン-6-硫酸の局在を免疫組織化学法で観察した結果、対照区においてケラタン硫酸およびコンドロイチン-6-硫酸は肥大軟骨細胞層に局在が観察された。一方、TD 病変ではケラタン

硫酸は病変部を含む広範囲の肥大軟骨細胞層で観察され、コンドロイチン-6-硫酸は病変部では観察されず、肥大軟骨細胞層下部においてわずかに観察された。コンドロイチン硫酸の局在が欠如したことは、コンドロイチン硫酸を構成要素とするアグリカンの軟骨における水分保有、ゲル化して体重負荷に対する耐性付与、更には無血管組織である軟骨における栄養分や軟骨細胞分化調節因子の補給が正常に機能していないことを示唆している (Sophia Fox et al., 2009)。これにより TD では軟骨細胞が直接体重付加の影響を受けるとともに、栄養分や分化調節因子の不足により細胞死に至っているものと推測される。すなわち、TD 病変においては、正常にコラーゲンやグリコサミノグリカンの分布やその濃度が保たれないことによって、軟骨細胞が正常に分化せず、あるいは軟骨細胞の細胞死を誘導して軟骨内骨化の異常が生じていると推測される。

軟骨内骨化では軟骨細胞のアポトーシスは、肥大軟骨細胞石灰化において重要である (Zenmyo et al., 1996)。アポトーシスを起こした軟骨細胞は軟骨小腔周辺に石灰化が始まり、石灰化した軟骨基質は血管により運搬されてきた破骨細胞によって吸収され、骨芽細胞によって骨へと置換される (Gerber and Ferrara, 2000)。そのため、アポトーシスによる細胞死は主に肥大軟骨細胞石灰化部および石灰化部の血管周辺にみられる。アポトーシスには Fas、TNF- α を始めとするサイトカインが関与し、カスパーゼを活性化させることにより細胞内のタンパク質が分解されアポトーシスが誘発される (Nagata et al., 1997)。TD では肥大軟骨細胞層において II 型コラーゲンと X 型コラーゲンの混在やコンドロイチ

ン硫酸の局在が欠如していたことから軟骨細胞の分化異常や細胞死が推測された。そこで、アポトーシスの特徴である DNA 断片化や核凝縮を引き起こすタンパク質分解酵素のカスパーゼの局在を免疫組織化学法により観察するとともに、TUNEL 法によって DNA 断片化したアポトーシス細胞の局在を観察した。その結果、対照区におけるカスパーゼの局在は、増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層において観察され、とりわけ肥大軟骨細胞層石灰化部において強い反応が観察された。また、アポトーシス細胞は肥大軟骨細胞石灰化部およびその血管周辺において僅かに観察された。一方、TD 病変におけるカスパーゼの局在は、増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層に移行する領域において強い反応がみられたが、TD 病変中央部におけるカスパーゼの局在はみられなかった。DNA 断片化によるアポトーシス細胞の局在は、病変中央部における軟骨細胞で多数観察され、肥大軟骨細胞層石灰下部およびその血管周辺においては対照区と同様、僅かに観察された。これらのことから、増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層に移行する領域においてカスパーゼが活性化し、軟骨内骨化の初期に過剰なアポトーシスが引き起こされていることが示唆された。その結果、TD 病変中央部における軟骨細胞はすでに細胞死を起こし、正常な肥大軟骨細胞の成熟を阻害しているものと推測される。軟骨内骨化における骨形成は、血管を介して運搬された破骨細胞による石灰化軟骨基質の吸収と骨芽細胞による骨への置換とされており、血管侵入に必須な VEGF や MMP などの発現が必要とされている (Gerber and Ferrara, 2000)。TD 病変においては、これらの発現が低下していることが示されている (Simsa et al.,

2007b; Velada et al., 2011)。また、軟骨基質の初期石灰化の遅延は、破骨細胞による吸収が不活発となり、その後の骨化に影響を及ぼすことが知られている。軟骨基質の石灰化ならびに破骨細胞について組織化学的観察を行なった結果、対照区における石灰化は肥大軟骨細胞層上部から肥大軟骨細胞層石灰化部にかけて徐々に軟骨基質の石灰化が進行していた。また、血管侵入は成長板の深部にまで達しており、破骨細胞は血管周辺の軟骨基質表面に多核巨細胞として観察され、正常に軟骨内骨化が進行していた。一方、TD 病変では血管侵入が成長板内に観察されず、肥大軟骨細胞層ではほとんど石灰化はみられず、肥大軟骨細胞層下部と海綿骨との境界において軟骨基質周辺に石灰化が観察された。さらに破骨細胞は肥大軟骨細胞層下部の血管内において単核の破骨細胞前駆細胞がみられ、TRAP 活性が軟骨基質において著しく蓄積していた。これらのことから、TD 病変では、肥大軟骨細胞層への血管侵入が阻害された結果、肥大軟骨細胞層における軟骨基質の石灰化不全および破骨細胞の分化が抑制され、軟骨基質に異常をきたし軟骨塊が残存するものと考えられる。

本研究の結果から、TD は幼雛期における急速な体重増加であるメカニカルストレスによって増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層への移行領域においてカスパーゼが活性化し、多くの軟骨細胞のアポトーシスを過剰に誘発することが考えられる。これにより、その後の軟骨細胞の分化・成熟に異常をきたし、肥大軟骨細胞層においてⅡ型コラーゲンとⅩ型コラーゲンが混在とコンドロイチン硫酸の消失するものと推測される。その結果、血管侵入が欠如し、石灰化不全および破骨細胞の分化が抑制されて骨吸収

が遅延することとなり、成長板内に軟骨塊が残存した TD が発症するものと推測される。

引用文献

- Alini, M., Matsui, Y., Dodge, G.R., and Poole, A.R. (1992). The extracellular matrix of cartilage in the growth plate before and during calcification: Changes in composition and degradation of type II collagen. *Calcified Tissue International* 50, 327-335.
- Barka, T. (1960). A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. *Nature* 187, 248-249.
- Bashey, R.I., Leach, R.M., Gay, C.V., and Jimenez, S.A. (1989). Type X collagen in avian tibial dyschondroplasia. *Laboratory Investigation*; 60, 106-112.
- Ben-Bassat, S., Genina, O., Lavelin, I., Leach, R.M., and Pines, M. (1999). Parathyroid receptor gene expression by epiphyseal growth plates in rickets and tibial dyschondroplasia. *Molecular and Cellular Endocrinology* 149, 185-195.
- Chen, Q., Gibney, E.P., Leach, R.M., and Linsenmayer, T.F. (1993). Chicken tibial dyschondroplasia: a limb mutant with two growth plates and possible defects of collagen crosslinking. *Developmental Dynamics* 196, 54-61.
- Cook, M.E. (2000). Skeletal deformities and their causes: introduction. *Poultry Science* 79, 982-984.
- Dan, H., Simsa-Maziel, S., Hisdai, A., Sela-Donenfeld, D., and

- Monsonego Ornan, E. (2009). Expression of matrix metalloproteinases during impairment and recovery of the avian growth plate. *Journal of Animal Science* *87*, 3544-3555.
- Dudhia J. (2005). AggreCAN, aging and assembly in articular cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences* *62*, 2241-2256.
- Erlebacher, A., Filvaroff, E.H., Gitelman, S.E., and Derynck, R. (1995). Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* *80*, 371-378.
- Eyre, D. (2001). Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research & Therapy* *4*, 30-35.
- Farquharson, C., Whitehead, C., Rennie, S., Thorp, B., and Loveridge, N. (1992). Cell proliferation and enzyme activities associated with the development of avian tibial dyschondroplasia: an in situ biochemical study. *Bone* *13*, 59-67.
- Farquharson, C., Berry, J.L., Mawer, E.B., Seawright, E., and Whitehead, C.C. (1995). Regulators of chondrocyte differentiation in tibial dyschondroplasia: an in vivo and in vitro study. *Bone* *17*, 279-286.
- Funderburgh J.L. (2000). Keratan sulfate: Structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* *10*, 951-958.
- Gay, C.V., Anderson, R.E., and Leach, R.M. (1985). Activities

- and distribution of alkaline phosphatase and carbonic anhydrase in the tibial dyschondroplastic lesion and associated growth plate of chicks. *Avian Diseases* *29*, 812-821.
- Gay, C.V., Gilman, V.R., and Leach, R.M., Jr. (2007). Immunolocalization of vascularization factors in normal, tibial dyschondroplasia and rachitic cartilage. *Avian Pathology* *36*, 445-451.
- Gerber, H.P., and Ferrara, N. (2000). Angiogenesis and bone growth. *Trends in Cardiovascular Medicine* *10*, 223-228.
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., and Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine* *5*, 623-628.
- Gibson, G.J., Kohler, W.J., and Schaffler, M.B. (1995). Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Developmental Dynamics* *203*, 468-476.
- Hargest, T.E., Leach, R.M., and Gay, C.V. (1985a). Avian tibial dyschondroplasia. I. Ultrastructure. *American Journal of Pathology* *119*, 175-190.
- Hargest, T.E., Gay, C.V., and Leach, R.M. (1985b). Avian tibial dyschondroplasia. III. Electron probe analysis. *American Journal of Pathology* *119*, 199-209.

- Hasky-Negev, M., Simsa, S., Tong, A., Genina, O., and Monsonego Ornan, E. (2008). Expression of matrix metalloproteinases during vascularization and ossification of normal and impaired avian growth plate. *Journal of Animal Science* 86, 1306-1315.
- Heidenhain, M. (1915). Uber die mallorysche bindegewebsfärbung mit karmin und azokarmin als vorfarben. *Z. wiss. Mikr* 32, 361.
- Hehlgans, T., and Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.
- Hirota, Y., Habu, M., Tominaga, K., Sukedai, M., Matsukawa, A., Nishihara, T., and Fukuda, J. (2006). Relationship between TNF- α and TUNEL-positive chondrocytes in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 35, 91-98.
- Howlett, C.R. (1980). The fine structure of the proximal growth plate and metaphysis of the avian tibia: endochondral osteogenesis. *Journal of Anatomy* 130, 745-768.
- Hurwitz, S., Livne, E., Plavnik, I., Pines, M., and Silberman, M. (1992). Tibia development in turkeys and chickens as affected by early-age feed restriction. *Growth*,

- Development, and Aging *56*, 191-203.
- Inada, M., Wang, Y., Byrne, M.H., Rahman, M.U., Miyaura, C., Lopez-Otin, C., and Krane, M.(2004). Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 17192-17197.
- Jacques, T.S., Skepper, J.N., and Navaratnam, V. (1999). Fibroblast growth factor-1 improves the survival and regeneration of rat vagal preganglionic neurones following axon injury. *Neuroscience Letters* *276*, 197-200.
- 可知 真奈美・杉山 稔恵・楠原 征治. (2007). ブロイラーにおける脛骨軟骨異形成症(Tibial Dyschondroplasia:TD)誘発病変の形態学的観察. *家畜衛生学雑誌*, 33: 3.
- Kayal, R.A., Siqueira, M., Alblowi, J., McLean, J., Krothapalli, N., Faibish, D., Einhorn, T.A., Gerstenfeld, L.C., and Graves, D.T. (2010). TNF- α mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis through FOXO1. *Journal of Bone and Mineral Research* *25*, 1604-1615.
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y.J., Yee, A.J., and Yang, B.B.(2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Research* *12*, 19-32.

- Kirsch, T., and Wuthier, R.E. (1994). Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. *Journal of Biological Chemistry* *269*, 11462-11469.
- Knopov, V., Hadash, D., Hurwitz, S., Leach, R.M., and Pines, M. (1997). Gene expression during cartilage differentiation in turkey tibial dyschondroplasia, evaluated by in situ hybridization. *Avian Diseases* *41*, 62-72.
- Knowles, T.G., Kestin, S.C., Haslam, S.M., Brown, S.N., Green, L.E., Butterworth, A., Pope, S.J., Pfeiffer, D., and Nicol, C.J. (2008). Leg disorders in broiler chickens: Prevalence, risk factors and prevention. *PLoS ONE* *3*, e1545.
- Kronenberg, H.M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* *423*, 332-336.
- 楠原 征治・堀 悦郎・渡部 英一・斉藤 安弘.(1992). カゼインホスホペプチドによるブロイラー骨端軟骨の石灰化. *日本家禽学会誌*, *29*: 254-261.
- Lamoureux, F., Baud'huin, M., Duplomb, L., Heymann, D., and Redini, F. (2007). Proteoglycans: Key partners in bone cell biology. *BioEssays* *29*, 758-771.
- Lawler, E.M., Shivers, J.L., and Walser, M.M. (1988). Acid phosphatase activity of chondroclasts from *Fusarium*-induced tibial dyschondroplastic cartilage.

Avian Diseases *32*, 240-245.

Lindy, O., Konttinen, Y.T., Sorsa, T., Ding, Y., Santavirta, S., Ceponis, A., and Lopez-Otin, C. (1997). Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis and Rheumatism* *40*, 1391-1399.

MacRae, V.E., Wong, S.C., Farquharson, C., and Ahmed, S.F. (2006). Cytokine actions in growth disorders associated with pediatric chronic inflammatory diseases (review). *International Journal of Molecular medicine* *18*, 1011-1018.

Nakagawa, K., Chen, Y.X., Ishibashi, H., Yonemitsu, Y., Murata, T., Hata, Y., Nakashima, Y., and Sueishi, K. (2000). Angiogenesis and its regulation: Roles of vascular endothelial cell growth factor. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* *26*, 61-66.

Nakamura, H., Hirata, A., Tsuji, T., and Yamamoto, T. (2001) Immunolocalization of keratan sulfate proteoglycan in rat calvaria. *Archives of Histology and Cytology* *64*, 109-118.

Nakayama, M., Manabe, N., Inoue, N., Matsui, T., and Miyamoto, H. (2003). Changes in the expression of tumor necrosis factor (TNF) alpha, TNFalpha receptor (TNFR) 2, and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *Biology of*

Reproduction *68*, 530-535.

Neuhold, L.A., Killar, L., Zhao, W., Sung, M.L., Warner, L., Kulik, J., Turner, J., Wu, W., Billingham, C., Meijers, T., Robin, A., Poole, P., Babij, P and DeGennaro, L.J (2001). Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *Journal of Clinical Investigation* *107*, 35-44.

Ohyama, K., Farquharson, C., Whitehead, C.C., and Shapiro, I.M. (1997). Further observations on programmed cell death in the epiphyseal growth plate: Comparison of normal and dyschondroplastic epiphyses. *Journal of Bone and Mineral Research* *12*, 1647-1656.

Ortega, N., Behonick, D.J., and Werb, Z. (2004). Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in Cell Biology* *14*, 86-93.

Orth, M.W., and Cook, M.E. (1994). Avian tibial dyschondroplasia: A morphological and biochemical review of the growth plate lesion and its causes. *Veterinary Pathology* *31*, 403-404.

Phornphutkul, C., and Gruppuso, P.A. (2009). Disorders of the growth plate. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* *16*, 430-434.

Pines, M., Hasdai, A., and Monsonego-Ornan, E. (2005). Tibial dyschondroplasia - tools, new insight and future

- prospects. *World's Poultry Science Journal* *16*, 285-297.
- Pines, M., Knopov, V., Genina, O., Hurwitz, S., Faerman, A., Gerstenfeld, L.C., and Leach, R.M. (1998). Development of avian tibial dyschondroplasia: gene expression and protein synthesis. *Calcified Tissue International* *63*, 521-527.
- Poole, C.A (1997). Review. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of Anatomy* *191*, 1-13
- Poulos, P.W., Jr. (1978). Tibial dyschondroplasia (osteochondrosis) in the turkey. A morphologic investigation. *Acta Radiologica. Supplementum* *358*, 197-227.
- Prasad, S., Hairr, W.T., and Dallas, J.T. (1972). Observations of abnormal cartilage formation associated with leg weakness in commercial broilers. *Avian Diseases* *16*, 457-461.
- Praul, C.A., Ford, B.C., Gay, C.V., Pines, M., and Leach, R.M. (2000). Gene expression and tibial dyschondroplasia. *Poultry Science* *79*, 1009-1013.
- Praul, C.A., Gay, C.V., and Leach, R.M., Jr. (1997). Chondrocytes of the tibial dyschondroplastic lesion are apoptotic. *International Journal of Developmental Biology* *41*, 621-626.
- Raffetto, J.D., and Khalil, R.A. (2008). Matrix

- metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology* *75*, 346-359.
- Rath, N.C., Huff, W.E., Bayyari, G.R., and Balog, J.M. (1995). Effect of thiram on chick chondrocytes in culture. *J Toxicol Environ Health* *44*, 369-376.
- Rath, N.C., Huff, W.E., Balog, J.M., Bayyari, G.R., and Reddy, R.P. (1997). Matrix metalloproteinase activities in avian tibial dyschondroplasia. *Poultry Science* *76*, 501-505.
- Rath, N.C., Huff, W.E., Balog, J.M., and Huff, G.R. (2004). Comparative efficacy of different dithiocarbamates to induce tibial dyschondroplasia in poultry. *Poultry Science* *83*, 266-274.
- Rath, N.C., Richards, M.P., Huff, W.E., Huff, G.R., and Balog, J.M. (2005). Changes in the tibial growth plates of chickens with thiram-induced dyschondroplasia. *Journal of Comparative Pathology* *133*, 41-52.
- Rath, N.C., Huff, W.E., Huff, G.R., and Kannan, L. (2007a). Induction of tibial dyschondroplasia by carbamate and thiocarbamate pesticides. *Avian Diseases* *51*, 590-593.
- Rath, N.C., Kannan, L., Pillai, P.B., Huff, W.E., Huff, G.R., Horst, R.L., and Emmert, J.L. (2007b). Evaluation of the efficacy of vitamin D3 or its metabolites on

- thiram-induced tibial dyschondroplasia in chickens. *Research in Veterinary Science* 83, 244-250.
- Rath, N.C., Huff, W.E., and Huff, G.R. (2007c). Thiram-Induced Changes in the Expression of Genes Relating to Vascularization and Tibial Dyschondroplasia. *Poultry Science* 86, 2390-2395.
- Rawlinson, S.C., Murray, D.H., Mosley, J.R., Wright, C.D., Bredl, J.C., Saxon, L.K., Loveridge, N., Leterrier, C., Constantin, P., Farquharson, C and Pitsillides, A.A. (2009). Genetic selection for fast growth generates bone architecture characterised by enhanced periosteal expansion and limited consolidation of the cortices but a diminution in the early responses to mechanical loading. *Bone* 45, 357-366.
- Reginato, A.M., Bashey, R.I., Rosselot, G., Leach, R.M., Gay, C.V., and Jimenez, S.A. (1998). Type X collagen biosynthesis and expression in avian tibial dyschondroplasia. *Osteoarthritis and Cartilage* 6, 125-136.
- Reich, A., Jaffe, N., Tong, A., Lavelin, I., Genina, O., Pines, M., Sklan, D., Nussinovitch, A., and Monsonego-Ornan, E. (2005). Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization. *Journal of Applied Physiology* 98, 2381-2389.

- Reiland, S., Olsson, S.E., Poulos, P.W., Jr., and Elwinger, K. (1978). Normal and pathologic skeletal development in broiler and leghorn chickens. A comparative investigation. *Acta Radiologica. Supplementum 358*, 277-298.
- Riddell, C. (1975). Studies on the pathogenesis of tibial dyschondroplasia in chickens. III. Effect of body weight. *Avian Diseases 19*, 497-505.
- Riddell, C. (1976). Studies on the pathogenesis of tibial dyschondroplasia in chickens IV. Some features of the vascular supply to the growth plates of tibiotarsus. *Avian Diseases 21*, 9-15.
- Rutten, M., Leterrier, C., Constantin, P., Reiter, K., Bessei, W. (2002). Bone development and activity in chickens in response to reduced weight-load on legs. *Animal Research 51*, 327-336.
- Sakakura, Y. (2010). Role of matrix metalloproteinases in extracellular matrix disintegration of Meckel's cartilage in mice. *Journal of Oral Biosciences. 52*, 143-149.
- Sanchez, C.P., Kuizon, B.D., Abdella, P.A., Juppner, H., Salusky, I.B., and Goodman, W.G. (2000). Impaired growth, delayed ossification, and reduced osteoclastic activity in the growth plate of calcium-supplemented rats with renal failure. *Endocrinology 141*,

1536-1544.

Simsa, S., Hasdai, A., Dan, H., and Ornan, E.M. (2007a).

Induction of tibial dyschondroplasia in Turkeys by tetramethylthiuram disulfide (Thiram). *Poultry Science* *86*, 1766-1771.

Simsa, S., Hasdai, A., Dan, H., and Monsonego Ornan, E.

(2007b). Differential regulation of MMPs and matrix assembly in chicken and turkey growth-plate chondrocytes. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *292*, R2216-R2224.

Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, SA. (2009). The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health* *1*, 461-468.

Stevens, D.A., and Williams, G.R. (1999). Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation. *Molecular and Cellular Endocrinology* *151*, 195-204.

Stickens, D., Behonick, D.J., Ortega, N., Heyer, B., Hartenstein, B., Yu, Y., Fosang, A.J., Schorpp-Kistner, M., Angel, P., and Werb, Z. (2004). Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* *131*, 5883-5895.

Stocum, DL., Davis, RM., Leger, M., and Conrad, H.E. (1979).

Development of the tibiotarsus in the chick embryo:
Biosynthetic activities of histologically distinct
regions. *Embryology and Experimental Morphology* *54*,
155–170.

Tchetina, E.V., Kobayashi, M., Yasuda, T., Meijers, T., Pidoux, I., and Poole, A.R. (2007). Chondrocyte hypertrophy can be induced by a cryptic sequence of type II collagen and is accompanied by the induction of MMP-13 and collagenase activity: Implications for development and arthritis. *Matrix Biology* *26*, 247-258.

Vargas, M.I., Lamas, J.M., and Alvarenga, V. (1983). Tibial dyschondroplasia in growing chickens experimentally intoxicated with tetramethylthiuram disulfide. *Poult Science* *62*, 1195-1200.

Velada, I., Capela-Silva, F., Reis, F., Pires, E., Egas, C., Rodrigues-Santos, P., and Barros, M.T. (2011). Expression of genes encoding extracellular matrix macromolecules and metalloproteinases in avian tibial dyschondroplasia. *Journal of Comparative Pathology* *145*, 174-186.

Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., and Tabin, C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* *273*, 613-622.

- Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M., and Werb, Z. (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-422.
- Wallis, G.A. (1996). Bone growth: coordinating chondrocyte differentiation. *Current Biology* 6, 1577-1580.
- Wang, W., Xu, J., and Kirsch, T. (2003). Annexin-mediated Ca²⁺ influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 3762-3769.
- Wardale, R.J., and Duance, V.C. (1996). Collagen expression in chicken tibial dyschondroplasia. *Journal of Cell Science* 109 (Pt 5), 1119-1131.
- Webster, S.V., Farquharson, C., Jefferies, D., and Kwan, A.P. (2003). Expression of type X collagen, Indian hedgehog and parathyroid hormone related-protein in normal and tibial dyschondroplastic chick growth plates. *Avian Pathology* 32, 69-80.
- Wu, W., Cook, M.E., Chu, Q and Smalley, E.B.(1993). Tibial dyschondroplasia of chickens induced by fusarochromanone, a mycotoxin. *Avian Diseases* 37, 302-309
- Weizmann, S., Tong, A., Reich, A., Genina, O., Yayon, A., and Monsonego-Ornan, E. (2005). FGF upregulates

osteopontin in epiphyseal growth plate chondrocytes:
Implications for endochondral ossification. *Matrix
Biology* *24*, 520-529.

Whitehead, C.C. (1995). The role of vitamin D metabolites in
the prevention of tibial dyschondroplasia. *Animal
Feed Science and Technology* *53*, 205-210.

Wyers, M., Cherel, Y., and Plassiart, G. (1991). Late clinical
expression of lameness related to associated
osteomyelitis and tibial dyschondroplasia in male
breeding turkeys. *Avian Diseases* *35*, 408-414.

Zenmyo, M., Komiya, S., Kwabata, R., Sasaguri, Y., Inoue, A.,
and Norimatsu, M. (1996). Morphological and
biochemical evidence for apoptosis in the terminal
hypertrophic chondrocytes of the growth plate.
Journal of Pathology *180*, 430-433.