

氏 名 (本籍) くす はら せい じ
楠 原 征 治 (福岡県)

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 108 号

学位授与年月日 昭和49年10月11日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

最終学歴 昭和43年3月
東北大学大学院農学研究科
修士課程修了

学位論文題目 胃の改築現象 (Remodeling) 時の
石灰化および脱灰化に関する形態学
的研究

(主 査)
論文審査委員 教授 玉手英夫 教授 竹内三郎
教授 津田恒之
助教授 星野忠彦

論文内容要旨

骨は支持組織としての役割をもつ一方、生理的には無機物の貯蔵器官として生体の無機物代謝に直接関与している。血中のカルシウムの恒常性は骨の吸収、形成による改築時に起る脱灰・石灰化によって大きく影響されている。従って、骨の改築現象の本質を明らかにすることは、生体のミネラルとくにカルシウムの代謝現象の理解に欠くことが出来ない。

骨の改築 (Remodeling) はオステオン (osteon、骨単位) で生ずるが、それは破骨細胞による骨基質の破壊と、造骨細胞による骨基質の形成という一連の変化を通じて行なわれることが定説となっていた。しかし、骨の改築現象はこのような単純なものではなく、たとえば骨細胞も骨吸収に関与することなどが最近注目され、この定説の再検討が必要となってきた。(図1、図2)

骨のミネラル代謝の形態学的研究には、従来 Alizarin 色素による生体染色法や ^{45}Ca による Autoradiography などが使用されている。しかし、これらはいずれも未脱灰骨の研磨標本を用いるため、切片作製が困難なうえに、得られる組織像が不鮮明で詳細な形態学的研究には適してはいない。この点最近歯の研究に導入された岡田・三村の鉛塩による硬組織の生体染色法は、脱灰切片を用いるため上記の欠点がない。そこで本研究では、この岡田・三村の方法を骨に利用することにより、骨の改築現象の再検討をこゝろみたものである。材料は山羊の各種骨格で、酵素組織化学をも含めた光顕組織学的方法によって骨の改築現象時の脱灰、石灰化様式と機構とを明らかにしようとしたものである(第1章)。

1 岡田・三村の鉛生体染色法の吟味 (第2章)

上記の鉛生体染色法は形態観察にはすぐれた方法であるが、硫化水素飽和塩酸液での脱灰過程で一度沈着した鉛が溶出、移動する恐れがある。未脱灰薄片でも硫化アンモン液に浸漬することで鉛沈着を観察することができるので、これを利用して脱灰切片での鉛沈着部位と比較した。その結果、脱灰切片および未脱灰薄片とも鉛沈着像に差が認められなかった。従って、岡田・三村法における脱灰切片での沈着鉛の局在性は詳細な研究に充分耐えうるものと思われる。そこで以下の研究では、おもに脱灰切片を利用した。

2 全身骨格系の鉛沈着度 (第3章)

成長した山羊で鉛注射後20～30日で鉛沈着が増加する骨系は全身骨格のうち胴骨のすべて、下顎骨、第一指(趾)骨を除く肢骨であった。これらの骨系は石灰化、脱灰の速かなものと考えられる。鉛注射後75～120日で漸次鉛沈着が増加する骨系は前頭骨、第一指(趾)骨であった。これらの骨は石灰化、脱灰の遅いものと考えられる。鉛の沈着速度とは別に、下顎骨および後肢骨は比較的鉛沈着量が多く、とくに下顎骨で高い値を示した。胴骨は全般に鉛沈着量が低かった(図3、図4)。鉛沈着速度には骨系の海綿質の発達差が関係し、鉛沈着量には骨系の運動差によるものと考えられる。

3 鉛塩 1 回および多回注射時のオステオンの鉛沈着 (第 4、5 章)

最も鉛沈着の活発な顎骨を用いて、鉛 1 回注射後オステオンの鉛沈着を経時的に調べると、骨の形成時に出現する骨形成、完成オステオン (図 2) の鉛沈着は、鉛注射後 10~20 日でハバアース管側の骨質にみられ、経時的に周辺部に移行して注射後 50~75 日でオステオン外側の接合線で検出された。また、接合線の鉛沈着は注射後 120 日ですでに減少していた。接合線とホルクマン管の鉛沈着の移行像も注射後 120 日で多く観察された (図 5)。さらに、鉛多回 (7 日間隔 4 回、10 日間隔 13 回) 注射時の鉛沈着の形態から、オステオン内の鉛沈着 (石灰化)、脱鉛 (脱灰) の様式を詳細に知ることができた (図 6)。すなわち、鉛はハバアース管側より骨細管を伝って骨基質の層板内に沈着し、さらに骨細管をとって接合線へ取込まれ、ついでホルクマン管へ排出されるものと思われる。従って、従来定説であった吸収窩の破骨細胞による脱灰様式のみならず、ホルクマン管に排出される第 2 の脱灰様式があると推察される。またオステオン周辺部の鉛沈着は散在し、骨小梁の拡張を伴うことから、周辺部の骨細胞も脱灰に直接関与していると考えられた。

骨吸収オステオンでは、鉛沈着像でみると、破骨細胞による骨吸収、脱灰だけでなく、吸収窩周囲基質の骨細胞が骨細管を通じて周囲基質を脱灰していることが、とくに多回注射例で認められた (図 7)。従って、吸収窩への脱灰にも骨細胞が強く関与していることが認められた。

次に骨の細胞形態と鉛沈着の関係についてみると、鉛沈着のあるオステオンの造骨細胞と骨細胞は肥大し、核は大きい。また破骨細胞も肥大し、核数が多く機能充進像を示していた。これに反して鉛沈着のないオステオンの造骨細胞、骨細胞は萎縮し、核は小さい。また破骨細胞も萎縮し、核数が少なく機能低下を来していた。以上から鉛沈着の有無によってオステオンを活動型オステオンと休止型オステオンに区別した。

4 オステオンの立体構造と鉛沈着 (第 6 章)

切片によるオステオンの横断面観察では、骨形成、完成および骨吸収像は個々のオステオンとしてしか認められない。しかし、縦断切片、連続切片を利用した立体的観察では、これらの像は同一オステオン内に連続してみられる。とくに骨吸収像はオステオンの先端にみられるものと中間にみられるものが存在した。前者は骨吸収が先行し、その後血管が吸収窩に侵入したもので、後者は血管が主体となって骨吸収が生じたものである (図 8 a)。次にオステオン立体構造と鉛沈着の関係をみると、鉛はつねにオステオンの一部のみを観察された。これは活動型オステオンでもミネラル代謝の活発な部位と不活発な部位が共存することを示している。ホルクマン管と基質の境界部には沈着した鉛によるヘマトキシリン好染帯が観察されたが、これは接合線と連続していた。これは前章で推定した鉛の接合線を介するホルクマン管への移行をさらに裏付けるものである (図 8 b)。

5 オステオンの血管分布と鉛沈着 (第7章)

オステオンにおける血管分布はほとんど研究されていないので、最近各種臓器で用いられている Neoprene Latex 注入法を用いて観察したところ、Neoprene Latex はハバアース管、ホルクマン管では一般に毛細小動脈に検出され、毛細血管までは入らなかった。また、骨形成、骨吸収オステオンのようなハバアース管、吸収窩の拡大が顕著なものでは、血管の拡張が明らかに示された。これは石灰化、脱灰が活発になったことと相関する現象と思われる。完成オステオンのようにハバアース管腔が狭いものでは血管も縮小するが、鉛沈着は注入 Neoprene Latex の有無にかかわらず差はみられなかった。これは毛細小動脈以外に毛細血管も鉛沈着に関与することを示すものであろう。Neoprene Latex の出現に関係なく鉛沈着のないオステオンは完全に石灰化されたオステオンと思われる。

6 Contact microradiography によるオステオンの Ca 沈着の観察 (第8章)

Ca 沈着、すなわち、石灰化の度合を知るために Contact microradiography を応用して観察したところ、骨形成オステオンは一般に石灰化が不完全であるが、完成オステオンでは石灰化が完全なものと不完全なものとが区別された(表1)。次にオステオン内部の石灰化度合をみるとオステオン外層、とくに周辺部が内層よりも Ca 沈着が少なく、骨小窩の拡張をともなっている。このことはオステオン周辺部はつねに脱灰が行なわれている部分で、この部分の骨細胞は骨質の吸収、脱灰に関与すると云う、さきの所見を支持している。一方、骨吸収オステオンの吸収窩周囲基質は Ca 沈着が少なく、骨小窩は甚しく拡張していた。従って、吸収窩周囲の骨細胞も吸収、脱灰に積極的に関与していることを再び確認することができた。

7 オステオンの酵素組織化学的観察 (第9章)

酵素組織化学的に観察すると、Alkaline phosphatase は骨形成オステオンの造骨細胞、オステオイド、その近縁の骨細胞に活性がみられ、その領域は骨形成、石灰化が活発である。Acid phosphatase の活性は骨吸収オステオンの破骨細胞、吸収窩周囲の骨細胞および基質にみられ、またオステオン外層の骨細胞、基質にも検出された(表2)。Acid phosphatase は吸収、脱灰に関与する Lysosomal enzyme として破骨細胞に存在することはすでによく知られているので、骨細胞における本酵素の活性の存在は、この領域の骨細胞が脱灰にも関与していることを裏付けるものである。すなわち、これらの細胞は脱リン酸によって骨塩を破壊、溶解した後、骨基質の物質をとりこみ脱灰を行うことに関与すると考えられる。

Glyceraldehyde-3-phosphate, Lactate, Succinate および Isocitrate (NAD、NADP 依存性) の各 dehydrogenase 活性は、破骨細胞、造骨細胞に強い。し

かし、骨組織にみられるすべての骨細胞は Glyceraldehyde-3-phosphate および Lactate dehydrogenase 活性をもつが Succinate および Isocitrate dehydrogenase 活性は検出できなかった(表2)。このことは骨細胞が他の細胞種とことなり、血管から離れて位置し、基質に埋没していることと考え合せて、嫌氣的解糖によって乳酸を生成していることを示すものと考えられる。

8 骨軟症骨における鉛沈着 (第10章)

さきに健康骨で明らかにした石灰化・脱灰様式を再確認するために、実験的に山羊で骨軟症を作製して発生させた甚しい骨形成、骨吸収時の石灰化・脱灰様式を観察した。骨軟症骨においても正常骨と同様に鉛は骨細管を介して骨基質の層板内に沈着した後、さらに骨細管を介して骨吸収窩か接合線に移行することが確認された。さらに、骨軟症骨では、ホルクマン管を中心とする骨吸収、脱灰が活発である。すなわち、ホルクマン管の破壊によって大吸収窩が生じ、層板内、接合線に沈着した鉛はこの破壊により生じたホルクマン管断端部に移行する(図9 a、b)。一方、骨軟症骨の骨形成、完成像は大吸収窩の修復像と思われる連鎖状を呈していた。これらに沈着した鉛は接合線からホルクマン管へ移行するもの他に、骨基質から直接ホルクマン管へ入るものが存在するようである。骨軟症では骨から多量にCaが動員されるため激しい脱灰化が生じる。従って、骨基質から接合線を介するホルクマン管への新しい脱灰様式以外に、骨基質から直接ホルクマン管へ脱灰する近道の脱灰様式が骨軟症骨では存在するものと考えられる(図9 c、d、e)。

次にContact microradiographyによる石灰化度を調べたところ、健康骨よりも全般に低石灰化におちいていた。骨小窩の拡大は甚しく、とくに骨吸収窩、ホルクマン管周囲、オステオン外層における拡大がみられた。また、これらの部位の骨細胞とその周囲基質にはAcid phosphatase 活性が強く、骨細胞が骨吸収、脱灰に対して大きな役割を果していることが明らかに示された。

本研究は歯組織について考案された岡田・三村の鉛生体染色法を再検討のうえ利用することによって、山羊の全身骨格系の中で、最もミネラル代謝の盛んな下顎骨を見出し、これについて石灰化・脱灰の様式を形態学的に調べたものである。また連続切片によるオステオンの立体構造、Latex注入法によるオステオンの血管分布、Contact microradiographyによる石灰化度、酵素組織化学的方法によるphosphatase および各種dehydrogenase の観察も併せ行なった。その結果、ミネラルはハバース管から骨細管を伝って骨基質に沈着し、さらに骨細管を伝って接合線へとりこまれ、ホルクマン管へ排出されることが明らかになった。すなわち、従来定説であった造骨細胞による骨形成時の石灰化、破骨細胞による骨吸収時の脱灰化(図10 a、b)以外に、骨細管、接合

線、ホルクマン管を介する新しい石灰化、脱灰経路が存在することを知り得た。この脱灰経路には骨細胞が重要な役割を果している。すなわち、骨細胞は嫌氣的解糖を営み acid phosphatase を多量に含む。骨細胞を埋める骨小窩は拡張し、周囲基質のCa沈着は少ない。さらに吸収、脱灰作用は骨吸収窩周囲の骨細胞にも認めることができる。このことは従来、骨吸収窩における吸収、脱灰は破骨細胞のみによるとされていたが、骨細胞も強く関与していることを示している。

以上の推定は実験的に骨軟症を作製することによってさらに明瞭に確認することができた。この接合線・ホルクマン管への直接脱灰方式の存在は著者の発見によるもので、現在ひろく支持されるようになっており、従来の定説での破骨細胞をとる骨吸収・脱灰方式よりも血中Caの恒常性にたいして直接的であると考えられる点でCa代謝の生理的研究あるいは骨の疾病・病理の研究などにとくに重要な示唆を与えるものであると思われる。

図1 オステオンの構造

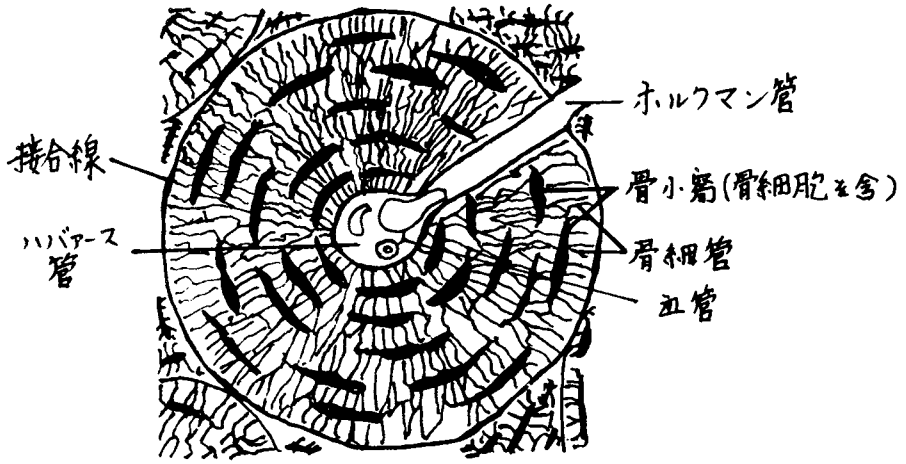


図2 骨の改築時に出現するオステオンの形態

骨吸収オステオン

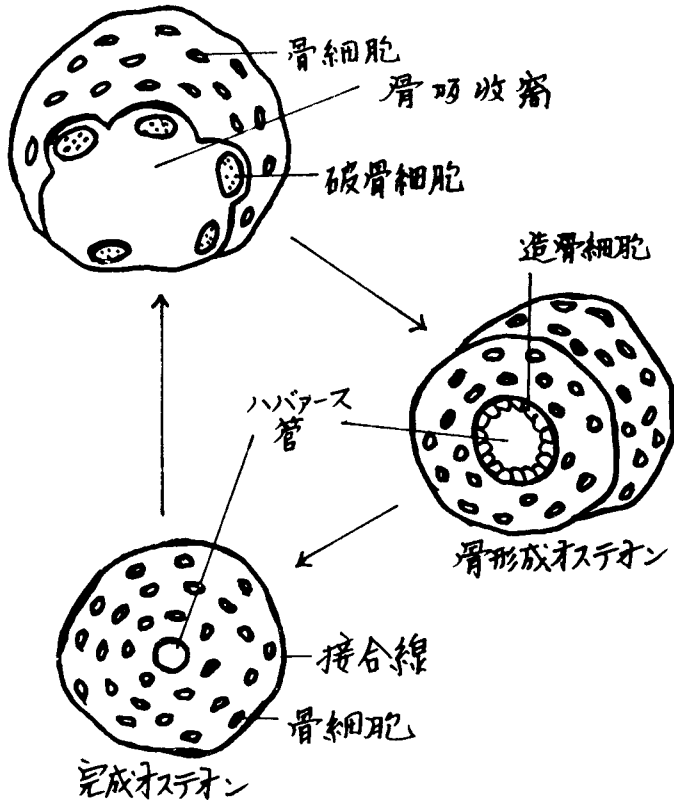
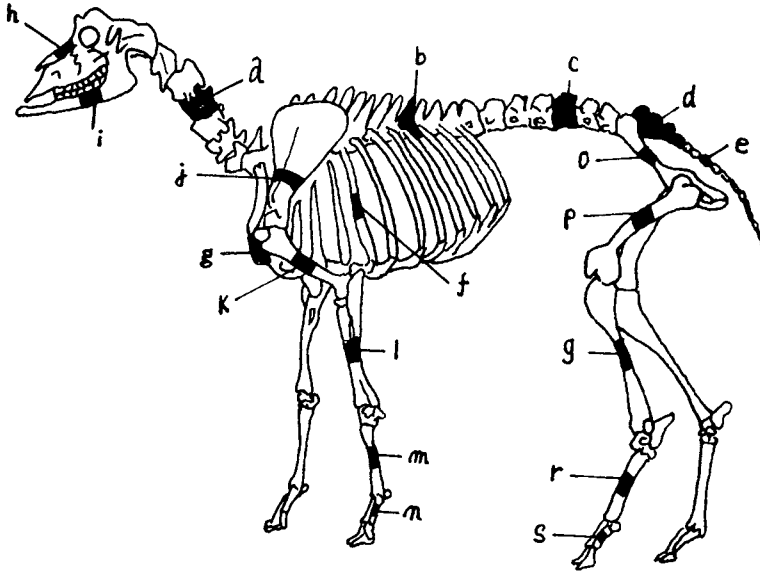


图3 材料採取部位



a 才3頸椎, b 才10胸椎, c 才5腰椎, d 仙椎, e 才3尾椎
 f 肋骨, g 胸骨, h 前頭骨, i 下顎骨, j 肩甲骨
 k 上腕骨, l 橈骨, m 中手骨, n 才1指骨, o 實骨
 p 大腿骨, q 脛骨, r 中足骨, s 才1趾骨

図4 全身骨格系の鉛沈着オステオンの出現頻度

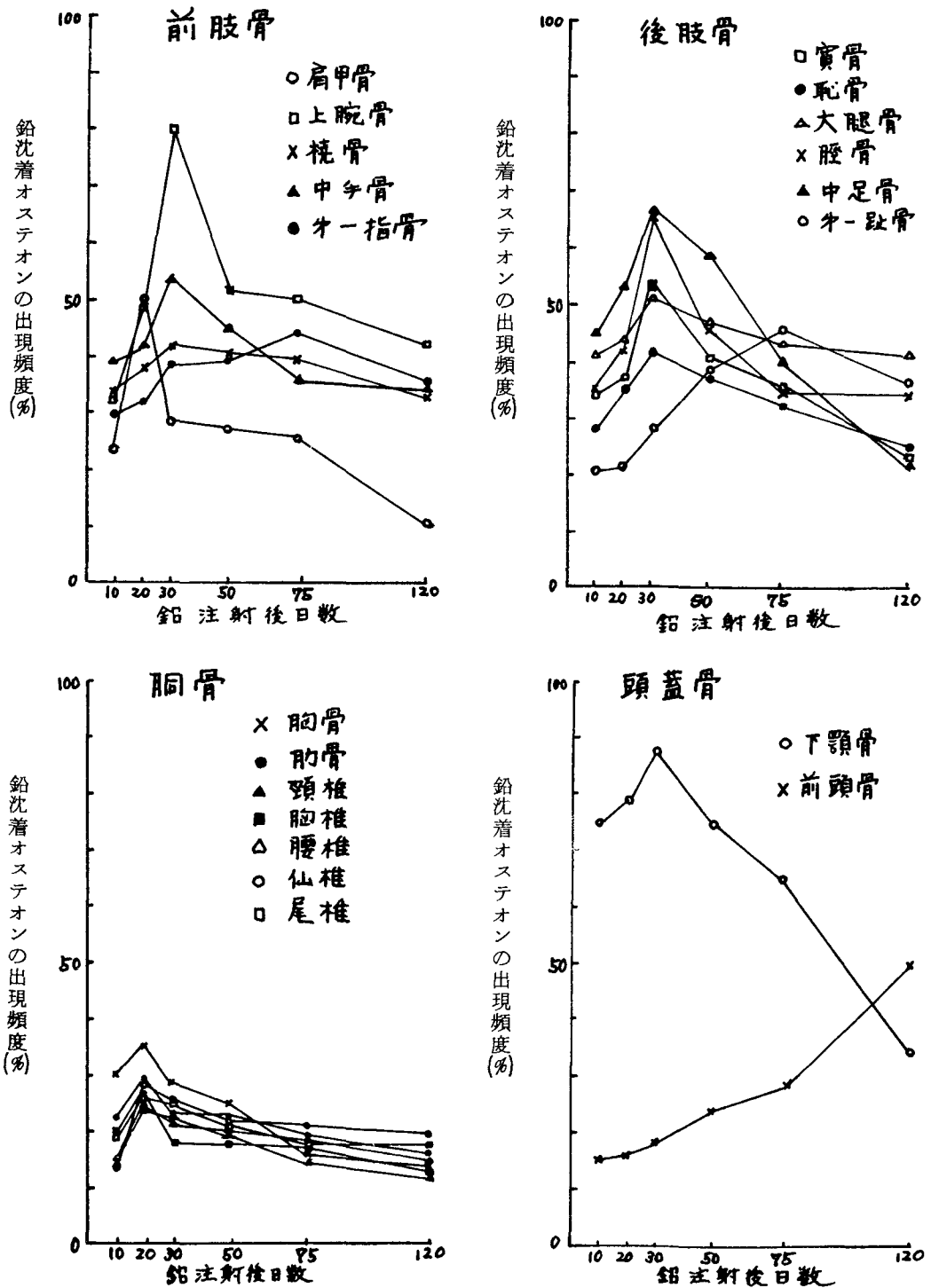


図5 完成および骨形成オステオンにおける鉛沈着の経時的な変化

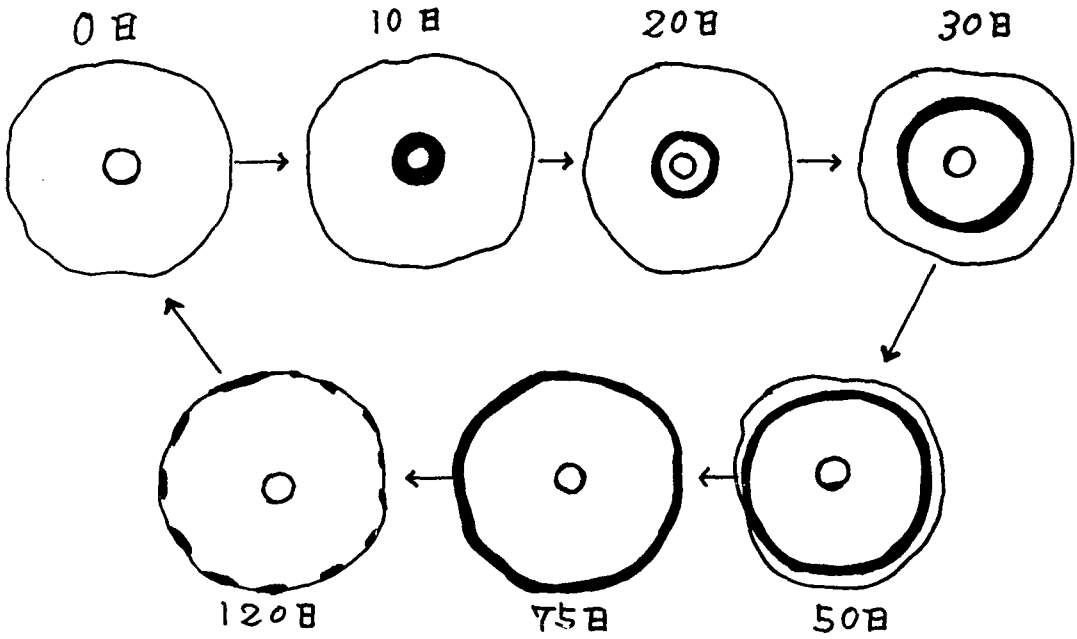


図6 鉛多回注射時の完成および骨形成オステオンにおける鉛沈着

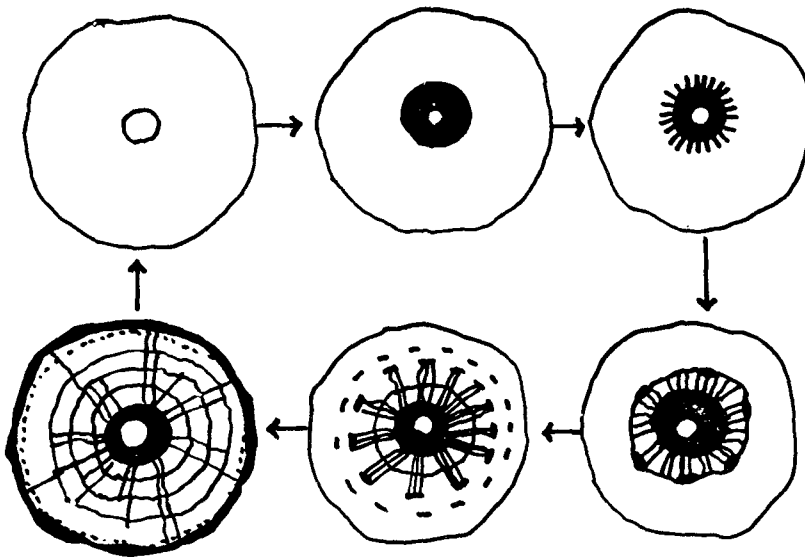


図 7 鉛多回注射の骨吸収オステオンにおける鉛沈着の形態

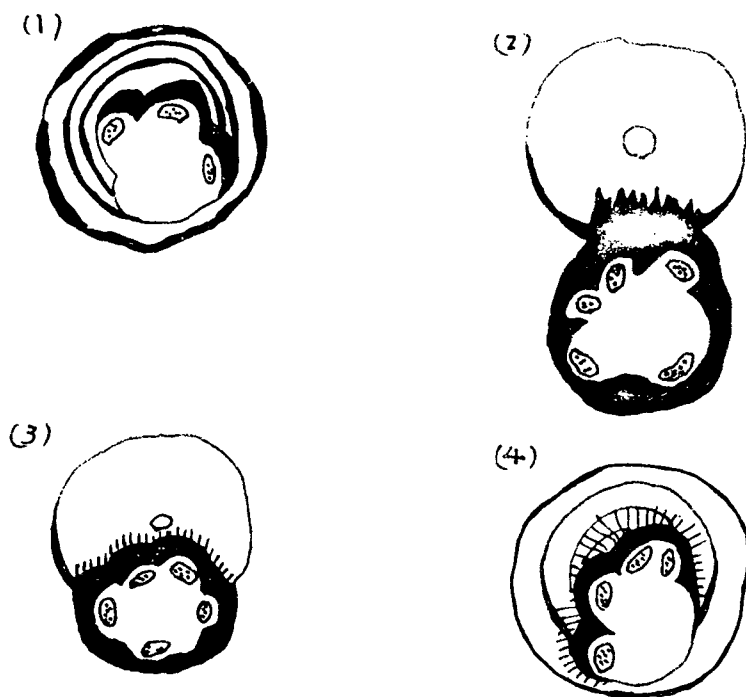


図 8 a オステオン改築の立体構造

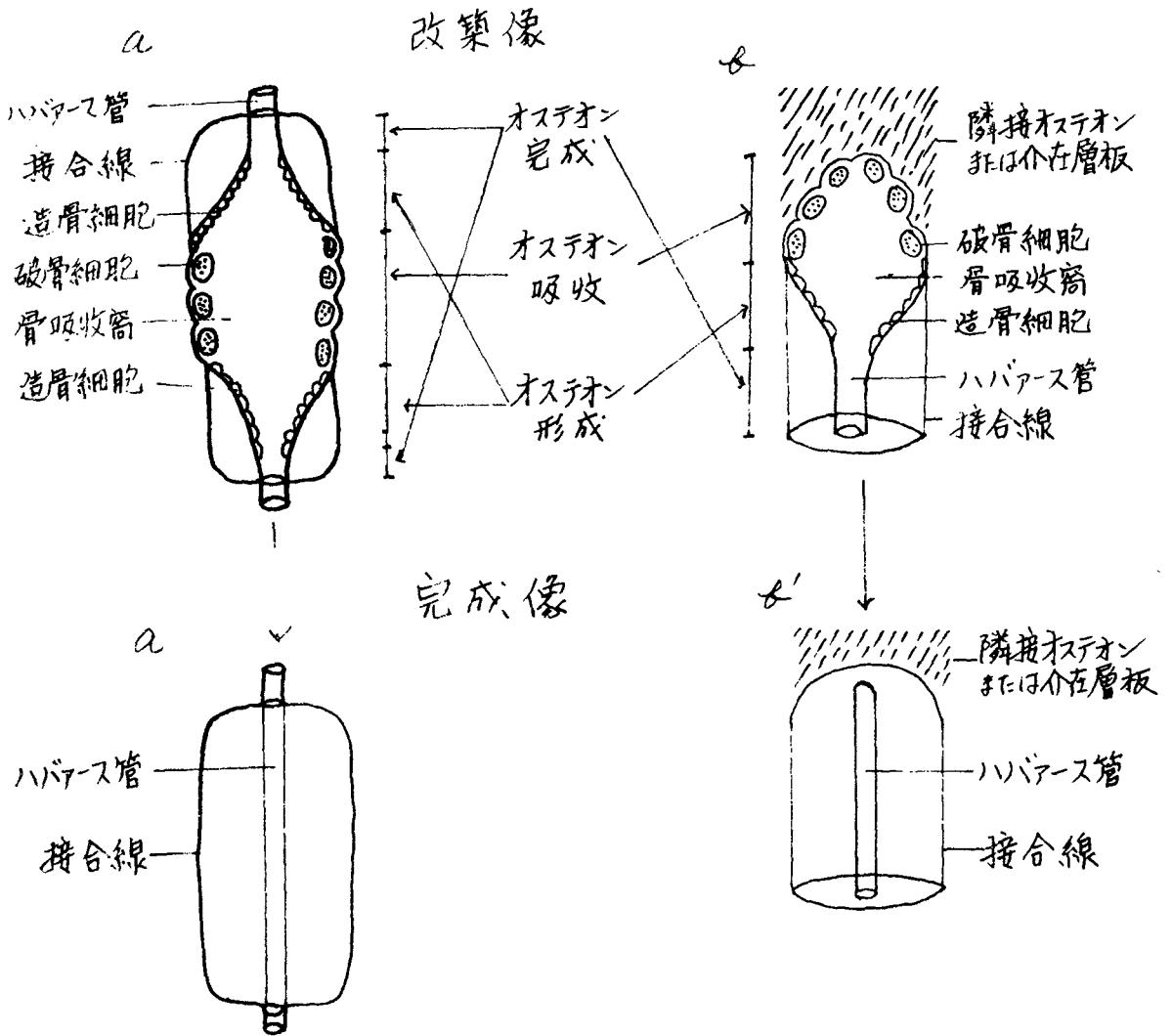


図 8 b 接合線およびホルクマン管におけるヘマトキシリン好染帯と鉛沈着

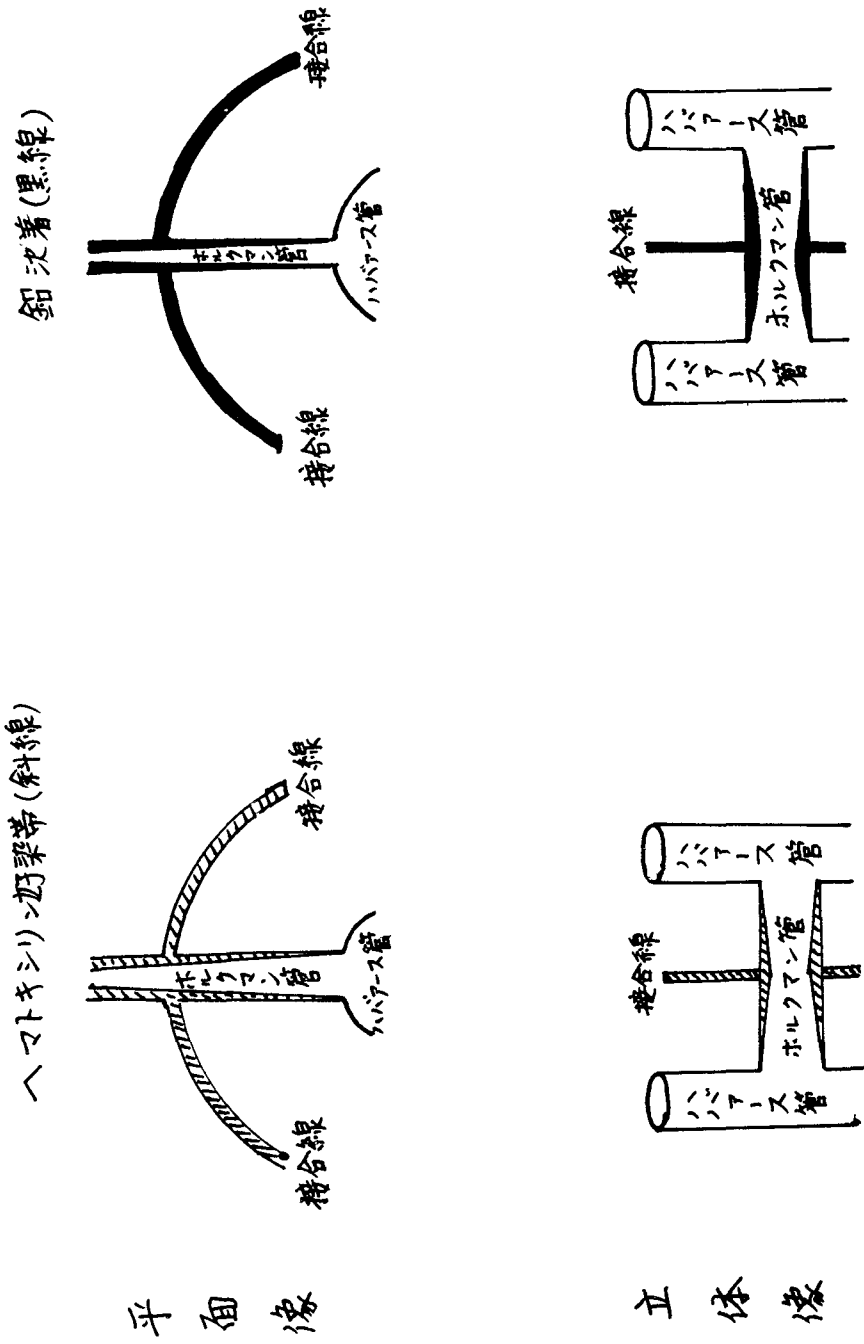


表1 オステオン基質のX線吸収度

オステオン			X線吸収度
完成オステオン			卅 ~ 卅
骨形成オステオン	ハバアース管の拡張	大きい	卅
		中等度	卅 ~ 卅
		小さい	卅
骨吸収オステオン			卅
一部破壊オステオン			卅

注： - なし + きわめて低い 卅 低い
 卅 高い 卅 きわめて高い

表2 オステオンにおける酵素活性

素		alkaline phos- phata se	acid phos- phata se	G3PDH	LDH	ICDH	SDH	
オステオン 各部位								
完成 オステオン	内 層	骨細胞	—	—	+	+	—	—
		基質	—	—	—	—	—	—
	外 層	骨細胞	—	+	+	+	—	—
		基質	—	+	—	—	—	—
	接合線		—	+	—	—	—	—
骨形成 オステオン	造骨細胞		卅	—	卅	卅	+	卅
	オステオイド		卅	—	—	—	—	—
	内 層	骨細胞	+	—	+	+	—	—
		基質	—	—	—	—	—	—
	外 層	骨細胞	—	+	+	+	—	—
		基質	—	+	—	—	—	—
	接合線		—	+	—	—	—	—
骨吸収 オステオン	破骨細胞		—	卅	卅	卅	卅	卅
	吸収 周囲	骨細胞	—	+	+	+	—	—
		基質	—	卅	—	—	—	—
ホルクマン管	周囲骨細胞		—	+	+	+	—	—
	周囲基質		—	+	—	—	—	—

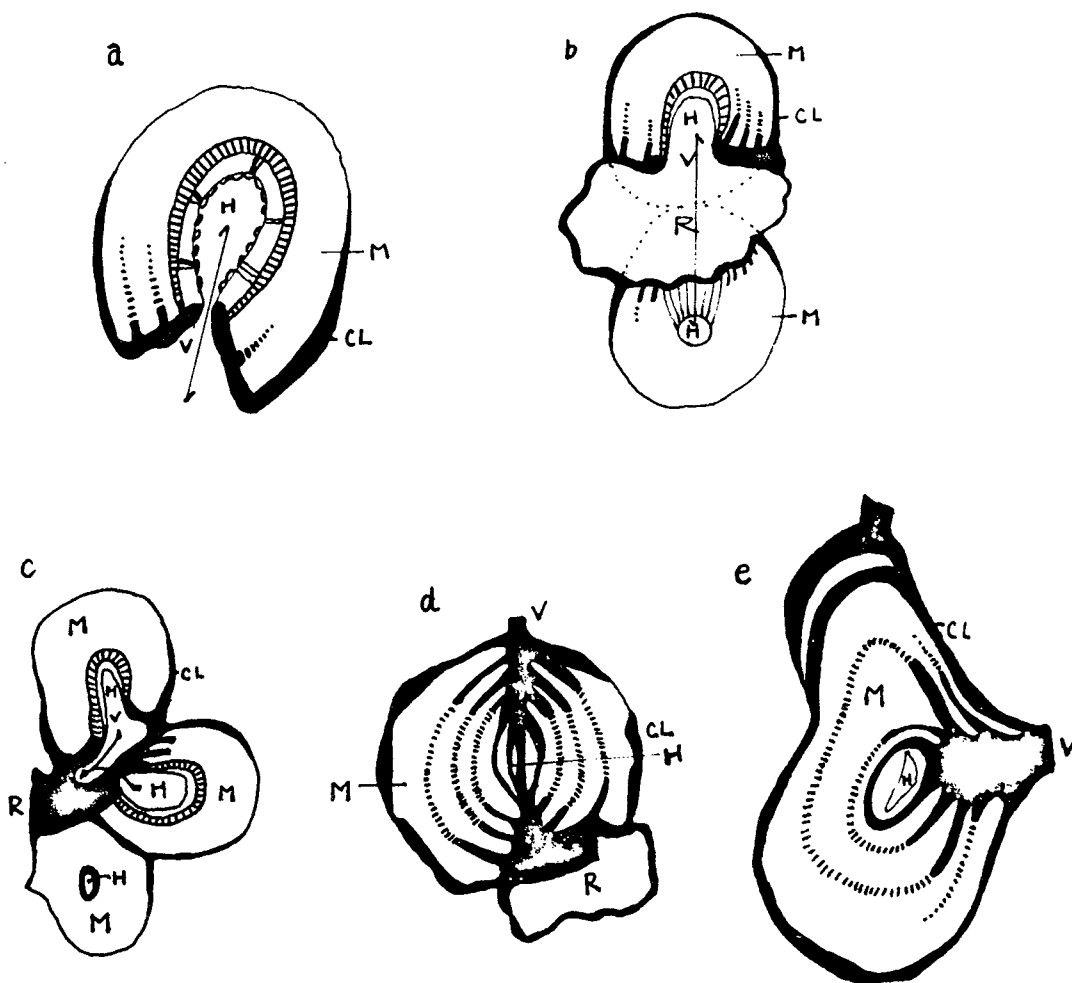
G3PDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

LDH:lactate dehydrogenase

ICDH:isocitrate dehydrogenase(NAD, NADP)

SDH:succinate dehydrogenase

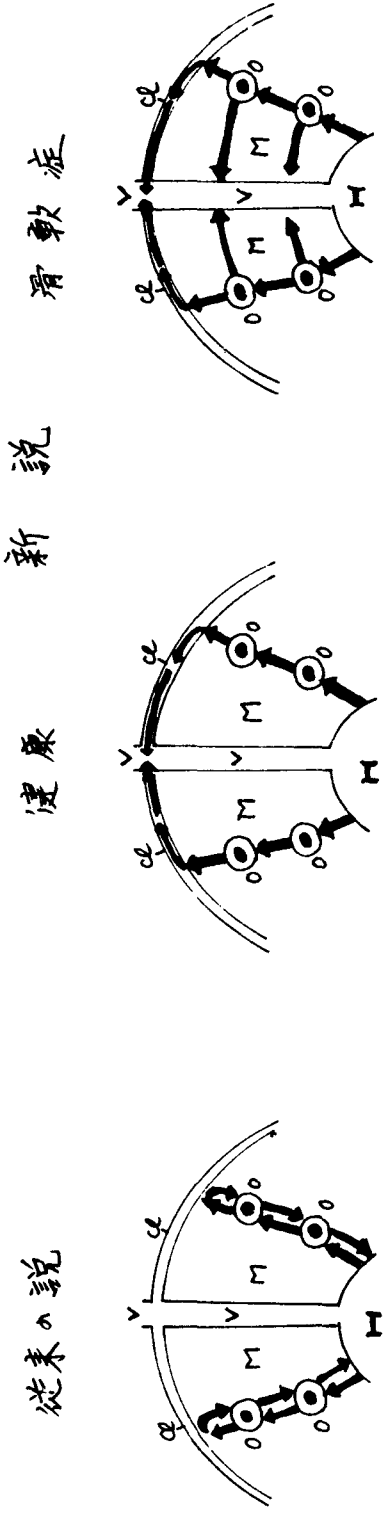
図9 ホルクマン管破壊時における鉛沈着像 (骨軟症骨)



H ハバース管 M 基質 R 骨吸収

CL 接合線 V ホルクマン管

図 10 a 骨形成および完成オステオンにおけるミネラルの移動



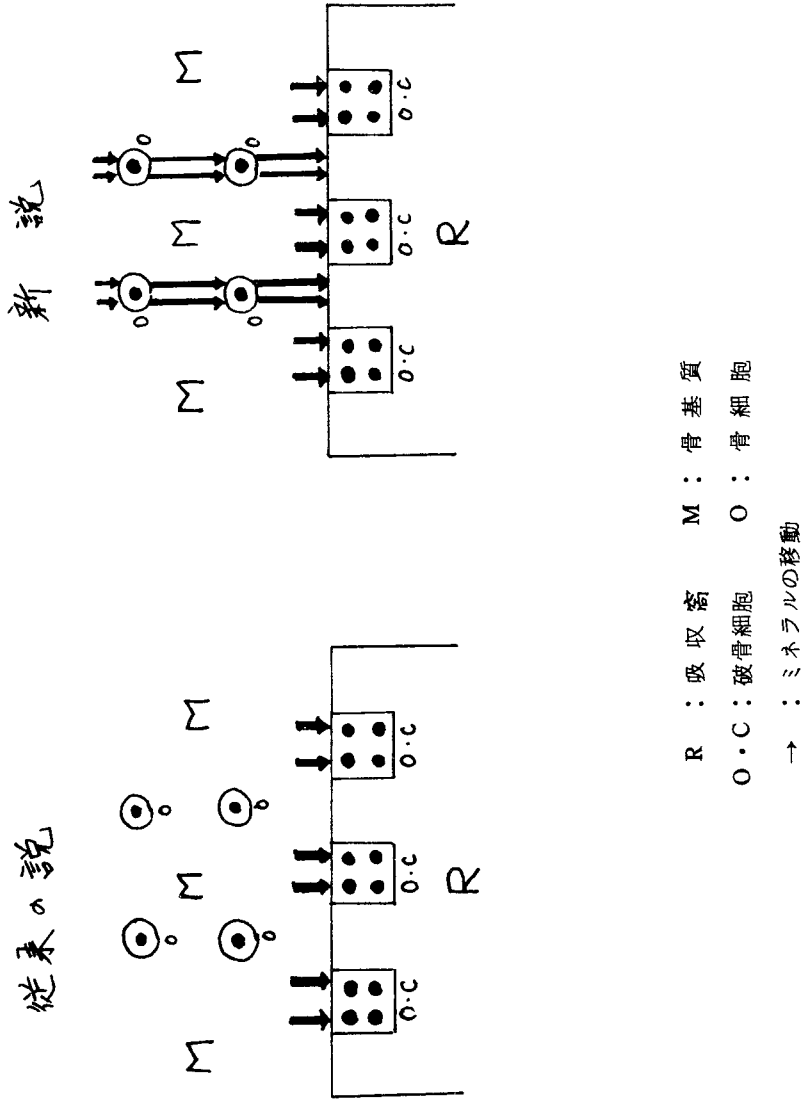
骨軟症

健康

従来の説

H: ハバファース管
 O: 骨細胞
 M: 骨基質
 CL: 接合線
 V: ホルクマン管
 →: ミネラルの移動

図10b 骨吸収時におけるミネラルの移動



審査結果の要旨

骨の支持組織としての役割をもつ一方、無機物の貯蔵器官として生体の無機物代謝に直接関与している。血中のカルシウムの恒常性はオステオン（骨単位）で生ずる骨の吸収、形成による改築（リモデリング）によって大きく影響される。著者は最近歯の研究に導入された岡田・三村の鉛塩生体染色法を検討した上で採用して、山羊の各種骨格を用いて、骨の改築時の脱灰、石灰化様式と機構の再検討を試みたものである。

成長した山羊の全身骨格で調べると、鉛沈着速度はその骨系の海綿質の発達度が、また鉛沈着量にはその骨系の運動量に関与するものと思われる。もっとも鉛沈着の活発な下顎骨で、鉛1回または多回注射後オステオンを経時的に調べると、鉛はハバース管側より骨細管を伝わって骨層板内に沈着し、ついで骨細管をとって接合線に取込まれ、ホルクマン管へと排出されることが判明した。また破骨細胞だけでなく、骨細胞も骨吸収に直接関与することが推定された。

以上の所見は連続切片を利用したヤステオンの立体構造と鉛沈着の観察でも確められ、ホルクマン管と基質の境界部には鋭沈着によるヘマトキシリン好染帯が認められた。またこのことは合成樹脂注入法を用いたオステオンの血管分布と鉛沈着の関係の観察および、コンタクトラジオグラフィーによるカルシウム沈着の観察によっても確められた。

酵素組織化学的観察では、とくに骨細胞が嫌氣的解糖により乳酸を形成し、また酸性ホスホターゼ活性がつよく、骨質の吸収作用をもつことが認められた。また実験的に作成した骨軟症骨での観察では、以上の諸所見がさらに確められ、とくにホルクマン管の脱灰経路としての重要性が再び確認された。

本研究では、従来の定説であった造骨細胞による骨形成時の石灰化、破骨細胞による骨吸収時の脱灰化以外に、骨細胞、骨細管、接合線、ホルクマン管を介する新しい石灰化、脱灰経路の存在を見出したもので、この説は現在関係学会でひろく支持されている。本研究はカルシウムの代謝の生理的研究あるいは家畜・人体での骨の疾病・病理研究などに、とくに重要な示唆を与えるものであることを認め、審査員一同農学博士の学位を授与するに値するものと判定した。