

## 原著

# マウスにおける形成期下顎角部の組織学的並びに免疫組織化学的観察

清水麻理子

松本歯科大学歯学部歯学科、〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原 1780

## Histological and Immunohistochemical Observations of Developing Mandibular Angle in Mice

Mariko Shimizu

*Matsumoto Dental University School of Dentistry, Shiojiri, 399-0781 Japan*

Summary: Mouse mandibular angle development started as a coagulation of mesenchymal cells on the 15<sup>th</sup> fetal day. On the 16<sup>th</sup> fetal day, cells of the central portion of the cell coagulation showed metachromasia to toluidine blue, and type 2 collagen positive chondrocytes were immunohistochemically detected. After the 17<sup>th</sup> fetal day, cartilaginous osteogenesis occurred with invasion of capillaries. At the same stage, membranous (perichondral) ossification occurred in the periphery of the chondrocyte mass. These proliferating chondrocytes showed positive reactions to type 2 collagen, type 1 collagen and osteopontin. These results suggest that the characteristics of mandibular angular cartilage are slightly different from those of normal physiological articular cartilage.

キーワード：下顎角部、下顎角軟骨、type II collagen type I collagen osteopontin

### 緒言

下顎骨の形態形成についての研究は数多く為されているが<sup>1)</sup>、その多くは下顎関節頭に関するものである<sup>2,3)</sup>。下顎関節頭を構成する軟骨は、一次軟骨とは異なり、下顎骨の形態形成と無関係に遅れて分化・発育する二次軟骨である。また、顎関節を構成するため臨床的に興味深いことも研究対象となる一因だろう。しかし、同じ下顎骨において同様に二次軟骨によって形成される下顎角部の軟骨についての研究は、ほとんど行われていない。そこで本研究では、実験材料としてマウスを用い、形成期の下顎角部について組織学および免疫組織化学的に観察した。

### 材料と方法

#### 1. 実験動物ならびに実験材料

実験動物には、交配確認された ddY 系妊娠マウス（日本エスエルシー株式会社）より得られた幼若なマウス胎子を用いた。親マウスは 23 ± 2 に設定された飼育室にて、ソフトチップを敷き詰めたプラスチック製のケージ内で飼育し、固形食のサンフレックと十分な水道水を与えた。胎生 14、15、16、17、18 日齢まで、および出生直後（胎生 19 日齢相当）の胎子を検索材料として毎日採取した。胎生期の試料採取には、親マウスをジエチルエーテルにて麻酔し、

清水麻理子：〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原 1780 松本歯科大学 大学院 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織疾患病態解析学 川上敏行、電話：0263 - 51 - 2035 (Fax 兼用)  
E-mail : kawakami@po.mdu.ac.jp

開腹後胎子から頭部を直ちに切り出した。また出生直後のマウスの頭部も同様に切り出した。これら試料は 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝固定液 (pH 7.4) を用い、7 日間浸漬固定を行った。

#### 2. 組織学的ならびに組織化学的検索

浸漬固定した材料の頭部組織を、10% EDTA 溶液にて室温で 2 週間脱灰した。以後通法に従ってパラフィンに包埋後、顎下面より厚さ 4mm の水平断連続切片を作製した。得られた切片に染色として hematoxylin-eosin (HE) と 0.1% toluidine blue (TB) 染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。

#### 3. 免疫組織化学的検索

一次抗体には、anti type I collagen antibody (LB-1102, LSL, Japan), anti type II collagen antibody (LB-1297, LSL, Japan), および anti osteopontin antibody (MPIIB10, DSHB, University of Iowa, USA) を使用した。なお、これらの抗体は、ダコ ChemMate 抗体希釈液にて anti type I collagen antibody, anti type II collagen antibody は 800 倍、anti osteopontin antibody は 50 倍に希釈して使用した。

切片を脱パラフィンした後、下降アルコール系列から蒸留水を通し、0.13% ペプシン処理を 37 にて 1 時間した後、0.03% 過酸化水素水によって内因性ペルオキシターゼ活性の除去（室温、30 分）を行った。その後、0.02M リン酸緩衝 0.15%M 塩化ナトリウム水溶液 pH 7.0 (PBS) で洗

浄した。次いで各種一次抗体を4℃で一晩反応させ、PBSで洗浄した。以後、ダコEnVision™+Kit-K5006(DAB)によって染色した。核染にはhematoxylinを用いた。なお、陰性コントロールには一次抗体の代わりにPBSを使用した。

## 結果

### 1. 組織学的ならびに組織化学的所見

#### 1) 胎生14日

下顎骨形成領域には未分化間葉細胞の凝集があり、メッケル軟骨の頰側には、凝集した紡錘形の間葉細胞間にeosinに好染する骨基質、すなわち線維性骨が随所に小塊状に形成されていた。

#### 2) 胎生15日

下顎骨基質の連続性は増し、内部に封入細胞を容れる部もみられた。形成された下顎骨の頰側、および後方には間葉細胞の増殖があり、その間隙には多くの毛細血管があった。なお、この時期までにメッケル軟骨を除き、これらの部はTBにmetachromasiaを示さなかった。

#### 3) 胎生16日

下顎骨の遠心端には、核の大きなhematoxylinに濃染する未分化間葉細胞の大きな凝集塊が確認され、その中心には比較的核膜が明瞭、細胞質が淡明で、円形または楕円形の細胞の集塊が存在した(図1 a, b)。これら細胞の細胞質はTBで弱いながらもmetachromasiaを示した(図1 c)。

#### 4) 胎生17日

下顎骨の遠心端に半島状に形成された間葉細胞の凝集塊は、細胞体が明るく核膜の明瞭な円形、ないし楕円形の軟骨細胞から成っていた(図2 a, b)。これらの細胞はTBでmetachromasiaを起こしていた(図2 c)。また軟骨細胞は、遠心端では核が大きく細胞質の乏しい細胞で、近心になるのに従い核の染色性が弱まると共に、細胞質が大きくかつ淡明化としていた。下顎骨遠心端に接する所では、いわゆる肥大軟骨細胞の形態を呈し、同所には血管が侵入して軟骨内骨化が開始していた。さらに、下顎角部に形成されたこれら軟骨集塊の周りには、とくにその前方1/2において骨芽細胞の増殖により直接骨形成が為されていた(図2 b)。

#### 5) 胎生18日および出生直後(胎生19日相当)

下顎角部領域を形成する半島状の軟骨集塊の下顎骨体側には、多くの血管の侵入が確認され、軟骨内骨化が進行し(図3 a, b)軟骨細胞の集塊の割合はだんだん小さくなっていった(図3 c)。これらの周囲には、最後方の細胞増殖の著しい部を除くほぼ全域において鞘状に直接骨形成が為されていた(図3 b)。出生直後の組織像はほぼ18日のものと同であった(図4 a~c)。すなわち、軟骨内骨化がかなり進み下顎骨体に連続する骨梁が形成されていた。

### 2. 免疫組織化学的所見

#### 1) Type II collagen

胎生14日および15日の標本において、下顎角部形成領域にtype II collagenの陽性反応は認められなかった。胎

生16日において下顎骨体遠心側に増殖した間葉細胞の細胞質には陽性反応を有する細胞がかなりあり、かつその中心部に凝集している胞体の比較的大きな細胞の全ての細胞質が陽性であった。(図5 a)。17日以降においては同部に増殖する軟骨細胞のほとんど全てが強い陽性反応を示した(図6 a, 7 a, 8 a)。

#### 2) Type I collagen

Type I collagenの陽性所見は、胎生14日から下顎骨形成に関与する骨芽細胞(骨細胞)の細胞質に強く発現していた。胎生16日にみられた下顎角部形成領域に増殖した間葉細胞の細胞質に、弱い陽性反応があった(図5 b)。さらにその中心部にある比較的胞体の大きな細胞の集塊にも、強い陽性反応が得られた(図5 b)。この陽性所見は胎生17日(図6 b)、18日(図7 b)、および出生直後(図8 b)といずれの時期にもあった。

#### 3) Osteopontin

胎生16日の標本において、胞体の大きな細胞の集塊(軟骨細胞)の細胞質に弱いosteopontin陽性反応が認められた(図5 c)。この陽性反応は、胎生17日(図6 c)、18日(図7 c)、および出生直後(図8 c)にも発現していた。これらの陽性反応は、とくに18日以降ではその分布は偏っていた。18日(図7 c)では細胞集塊の辺縁の細胞が強く陽性を呈していた。

## 考察

口腔領域における骨や軟骨の研究は極めて多いが、その主体は下顎骨体に関するもの<sup>1)</sup>と下顎関節頭軟骨に関するものである<sup>2,3)</sup>。これは緒言にも記したことであるが、臨床的にも、また組織発生的にも興味深いからであろう。しかし同じ二次軟骨でありながら臨床的興味がない部位のためか、下顎角部を形成する軟骨についての研究はほとんど為されていない。天願<sup>2)</sup>による下顎頭軟骨の組織発生に関する論文の中で、下顎角部の所見が併記されているのみである。

下顎角部の組織発生に関して天願<sup>2)</sup>は、C57BL/6N系マウスにおいて、胎生14.5日の下顎骨体原基遠心部領域に初めて角部の原基が認められるようになり、胎生16日ではかなり大きくなると記載している。今回のddY系マウスでの観察では、TBにmetachromasiaを起こし、免疫組織化学的にtype II collagen陽性を示し明らかに軟骨細胞への分化を示したのは胎生16日であった。しかし、胎生15日ではTBにmetachromasiaを起こさず、免疫組織化学的にもtype II collagen陽性所見は検出されなかったものの、下顎骨体部遠心側には未分化間葉細胞の凝集があった。したがってこれは下顎角部形成の原基であると考えられた。またこれらの間葉細胞の凝集は胎生14日では認められなかったが、胎生15日ではかなり大きなものであったので、今回の研究に用いたddY系マウスにおいても胎生14.5日くらいから下顎角部の原基が出現するものと思われた。なお、今回の免疫組織化学的観察において、胎生16日の標本でtype II collagenの陽性反応は、軟骨細胞の集団の周囲にある未分

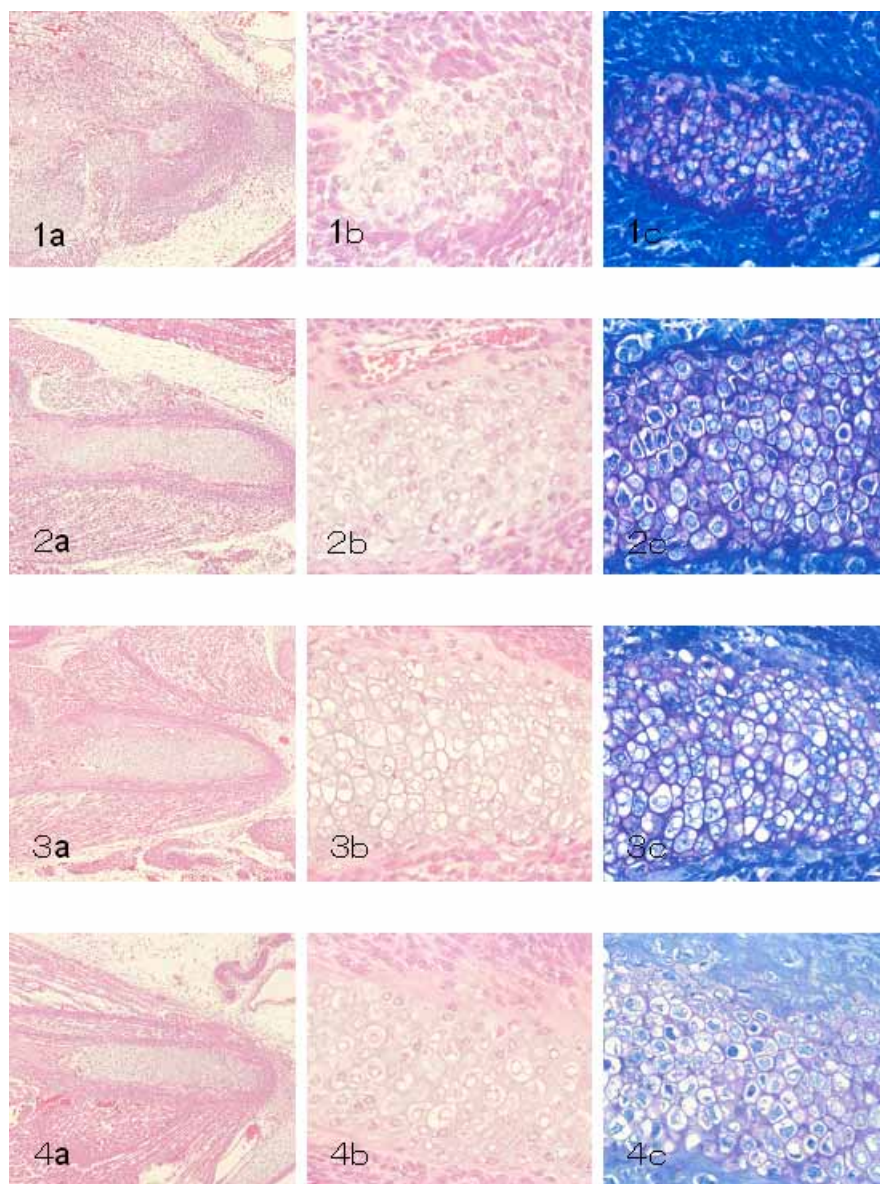


図1：胎生16日、間葉細胞の凝集の中心に比較的胞体の大きな細胞の集塊があり、TBに弱い metachromasiaを示す（a：HE，×20；b：HE，×100；c：TB，×100）。

図2：胎生17日、下顎角部に形成された軟骨集塊の周囲、とくにその前方1/2には直接骨形成がある（a：HE，×20；b：HE，×100；c：TB，×100）。

図3：胎生18日、角部を形成する軟骨の下顎骨側には血管侵入があり、軟骨内骨化が始まっている（a：HE，×20；b：HE，×100；c：TB，×40）。

図4：出生直後、角部の軟骨集塊は軟骨内骨化の進行により減少し、骨梁が増加している（a：HE，×20；b：HE，×100；c：TB，×100）。

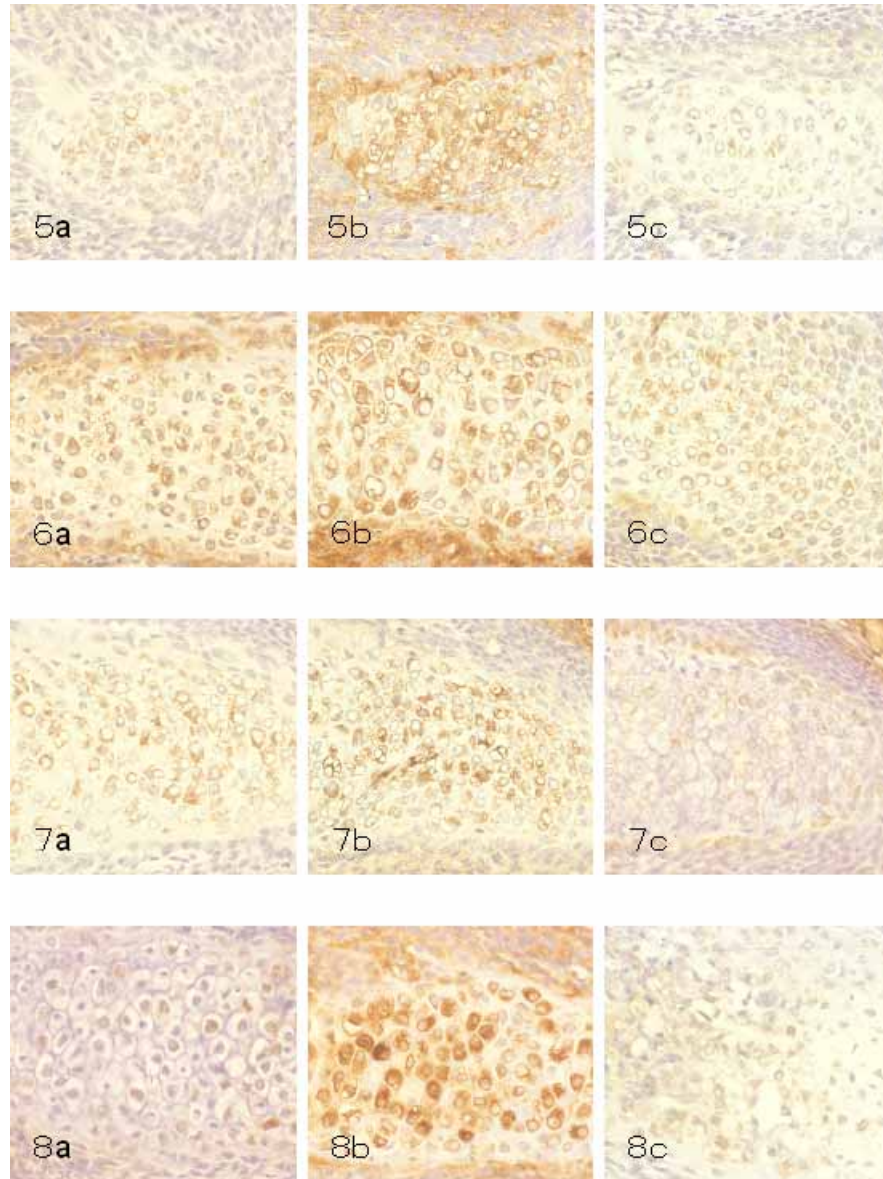


図5：胎生16日、胞体の大きな細胞に type II collagen 陽性反応があり、周囲の細胞にも弱い反応がある。type I collagen と osteopontin も陽性である (a: type II collagen,  $\times 100$ ; b: type I collagen,  $\times 100$ ; c: osteopontin,  $\times 100$ )。

図6：胎生17日、ほとんど全ての軟骨細胞に type II、type I collagen と osteopontin の陽性反応がある (a: type II collagen,  $\times 100$ ; b: type I collagen,  $\times 100$ ; c: osteopontin:  $\times 100$ )。

図7：胎生18日、type II、type I collagen は増殖軟骨の中心部で強く陽性、osteopontinは周辺部の細胞で強く陽性を示す(a: type II collagen,  $\times 100$ ; b: type I collagen,  $\times 100$ ; c: osteopontin,  $\times 100$ )。

図8：出生直後、type II、type I collagen と osteopontin の陽性反応には偏りがみられる (a: type II collagen,  $\times 100$ ; b: type I collagen,  $\times 100$ ; c: osteopontin,  $\times 100$ )。

化間葉細胞にも多くあった。この事実は上記推論を裏付けるものであろう。

下顎関節頭軟骨においては、type I collagen および type II collagen の発現を免疫組織化学的に検索し、軟骨細胞における両者の同時産生が確認されている<sup>4)</sup>。さらに石割ら<sup>5)</sup> は両者遺伝子の同時発現も明らかにしている。これらの研究結果より、下顎関節頭軟骨では一般的な関節軟骨における軟骨内骨化の様相とは異なる知見が集積されつつある。そこで、今回の下顎骨角部を形成する軟骨について type I collagen と osteopontin の免疫組織化学的検索を行った。まず type I collagen についてであるが、これは一般的には骨基質を特徴付ける代表的なタンパクである。下顎角領域に増殖し、組織学的に軟骨細胞の形態を示した細胞は TB に metachromasia を示し、かつ免疫組織化学的に type II collagen が発現していた。これは軟骨細胞としての基本的性格を表現しているものである。しかし、今回の検索において、同じ細胞に type I collagen の発現が免疫化学的に確認されたのである。石割ら<sup>5)</sup> はマウスの下顎頭軟骨における遺伝組織化学的検索により、関節層、増殖細胞層、成熟細胞層の軟骨にあると報告している。すなわち、同じ軟骨細胞が軟骨基質を特徴付ける type II collagen と、骨基質を特徴付ける type I collagen が、遺伝子レベルで同時発現しているのである。したがって今回の免疫組織化学的結果、すなわち下顎角部を形成する軟骨細胞は type II collagen とともに同時に type I collagen をも発現しており、軟骨細胞でありながらも骨芽細胞の性格をも持ち合わせていることとなる。このことは、同じ二次軟骨として発現する下顎関節頭軟骨と同様であり、一般の関節軟骨における軟骨細胞の性格とは若干異なっていることを示すものである。しかしながら、今回の研究においては免疫組織化学的追究のみであり、遺伝子レベルでの検索を行っていない。これらについては重ねて追究する必要がある。

次いで osteopontin の免疫組織化学的染色結果について、これは骨基質タンパクとして発見されたが、現在では骨基質以外にも広く分布していることが知られている。一般に関節軟骨においてはその肥大軟骨層、とくに石灰化層に局限して発現しているとされている<sup>6)</sup>。しかし、二次軟骨の1つである下顎関節頭軟骨における免疫組織化学的検索により、Shimizuら<sup>7)</sup> はほぼ全層にわたり発現していることを見出した。これは今回の下顎角軟骨における結果とほぼ同一である。

### 結論

マウスの下顎角部の形成は、胎生15日に間葉細胞の凝集から始まり、胎生16日ではTBに異染性を示していた。免疫組織化学的に collagen type II の発現する軟骨細胞に分化

していた。胎生17日以降では、下顎骨遠心端に接する部では、いわゆる肥大軟骨細胞の形態を呈し、同所には血管が侵入し軟骨内骨化が開始していた。さらに、軟骨集塊の周りに骨芽細胞の増殖による直接骨形成(軟骨外骨化)があった。増殖した軟骨細胞には免疫組織化学的に collagen type II の他、type I と osteopontin が発現していた。以上、下顎角部を形成する軟骨細胞の性格は、一般の関節軟骨のものと異なることが示唆された。

### 謝辞

本研究の遂行に終止ご懇意なるご指導とご校閲を戴いた松本歯科大学 大学院 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織疾患病態解析学 川上敏行教授に厚く御礼申し上げます。また、同歯学部 口腔解剖学第2講座 松浦幸子講師には適切なご助言等を頂きました。さらに、終始ご援助を戴いた同総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御再建学部門 硬組織疾患病態解析学 清水貴子助手に対し感謝致します。

なお、本稿の要旨は International Symposium of Maxillofacial & Oral Regenerative Biology in OKAYAMA 2005 (口腔顔面頭蓋再生研究国際シンポジウム; 2005年9月17日、岡山) において発表した。

### 文献

- 1) 木村晃大：マウス下顎骨形成期の骨形成細胞における基質タンパクの産生とその遺伝子発現。歯科学報。103：335 - 345, 2003。
- 2) 天願俊泉：マウス下顎頭軟骨の組織発生ならびにその立体観察。口病誌。57：32 - 57, 1990。
- 3) 石井昌子：マウス胎仔下顎頭軟骨における  $\alpha$  型コラーゲンに関する免疫組織学的研究。口病誌。62：16 - 28, 1995。
- 4) 溝口 到：下顎骨の成長現象と下顎頭軟骨における生物学的特徴。東北大歯誌。18：1 - 21, 1999。
- 5) 石割裕三, 長塚 仁, 井上正久, 永井教之：幼弱マウス下顎頭軟骨における  $\alpha$  型,  $\beta$  型, X型コラーゲン遺伝子の発現 In Situ Hybridization 法による検討。岡山歯誌。73：688 - 698, 1999。
- 6) 小谷野康彦：成長軟骨。藤井克之, 井上一編 骨と軟骨のバイオロジー, 基礎から臨床への展開：168 - 177, 金原出版, 東京, 2002。
- 7) Shimizu T, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Okafuji N, Kurihara S, Nagai N and Kawakami Expression of Notch1 and Math1 in Mandibular Condyle Cartilage in Neonatal Mice Angle Orthodont 75：787 - 789, 2005。