ラット下顎頭関節軟骨線維層の微細構造と細胞分裂能に関する実験的研究

水野 有功・佐分利紀彰・田口 望
金田敏郎・星野 洸*

The experimental study of the fine structure and cell-mitotic activity of the fibrous zone of articular cartilage in the rat mandibular condyle

Isao MIZUNO・Noriaki SABURI・Nozomu TAGUCHI
Toshio KANEDA・Takeshi HOSHINO*

Abstract: Three week-old and 6 week-old rats were given intraperitoneal injections of colchicine in a 0.05 percent saline solution, the dosage was 1 mg/kg body-weight. Accumulation of arrested metaphases in the fibrous zone of the mandibular condyle could be observed. Light microscope study of the plastic-embedded semithin sections of mandibular condyle identified two layers (F_1 layer and F_2 layer) in the fibrous zone. In these two layers age related changes of the tissue structure were observed.

It is shown that the fibroblast-like cells in F_1 and F_2 layers have mitotic division ability as old as 6 weeks of age, and that the F_1 layer tended to disappear before 6 weeks, while the F_2 layer became thicker because of a conspicuous formation of thick bundles of collagen fibers in the matrix.

Key words: fibrous zone of mandibular condyle, mitotic activity, colchicine

緒 言

下顎頭関節軟骨表層は、長管骨の関節とは異なり、強靱な膠原線維束と線維芽細胞様細胞からなる線維性結合組織、すなわち、線維層によって覆われている。この線維層は顎運動の活発化につれて、その厚みを増すといわれている^{1,2)}。さらに、線維層基質の強靱な膠原線維束が内部の軟骨を被覆し、下顎に加わる力の緩衝部位として、関節円板とともに重要な役目があるとされている³⁾。

る³⁾。

ラット下顎頭の構造については、すでに解剖学的、組織学的な検索が数多く行われている²⁻⁷⁾。しかし、線維層の微細構造に関する詳細な報告は少なく⁸⁻¹⁰⁾、線維層の線維芽細胞様細胞の動態¹¹⁾に関して、不明な点も多い。今回、われわれは、3週齢と6週齢のラットに、コルヒチン投与を行うことによって、これまで、分裂能はないとみなされていた²⁾線維層の線維芽細胞様細胞に、分裂像を見い出した。さらに、線維層を形態学的に二層(F_1 層、 F_2 層)に区分し、加齢による線維層(F_1 層、 F_2 層)の分裂能の推移ならびに組織変化について検討を行った。

実験方法

生後3週齢と6週齢のウイスター系雄性ラットのおの10匹を使用し、実験群と対照群に分けた。実験群には、0.05%コルヒチン溶液を1 mg/kgの割合で10時、13時、16時の時刻に計3回腹腔内投与した。18時に実験群および対照群ラットをエーテル麻酔後、耳前切開、皮

名古屋大学医学部口腔外科学講座

(主任：金田敏郎教授)

* 名古屋大学医学部解剖学講座

(主任：星野 洸教授)

Department of Oral Surgery, School of Medicine, Nagoya University (Chief: Prof. Toshio Kaneda)

* Department of Anatomy, School of Medicine, Nagoya University (Chief: Prof. Takeshi Hoshino)

受付日：昭和63年5月25日

下組織、関節の剥離、下顎頭露出、下顎頭頸部切開により下顎頭を採取し、観察材料とした。採取後、ただちに2.5%グルタルアルデヒドと2%パラホルムアルデヒド混合固定液(リン酸緩衝液 pH 7.4)中で、下顎枝長軸に平行に、厚さ約1 mmの前頭断切片を作製し、浸漬固定した。その後0.5 MのEDTA-4 Na溶液(pH 7.4)にて脱灰し、通法に従いエタノール系列にて脱水後、ケトル812に包埋した。そして、超ミクロトーム(ポーター、ブラム MT 1 型)にて、ガラスナイフを用い、約2 μ mの連続切片を作製し、1%トルイジンブルーで加温染色後、光学顕微鏡で観察した。

細胞分裂像に関しては、作製した各下顎頭の連続切片から、約50 μ m間隔毎に切片5枚を取り出し、線維層および増殖細胞層の分裂像の観察を行った。細胞分裂像は分裂中期にあるものを対象とし、1,000倍の光学顕微鏡下で直接算定した。分裂像算定部位の線維層および増殖細胞層の総細胞数は、100倍の光学顕微鏡下で写真撮影し、360倍の写真上で算出した。

実験結果

1. 線維層の層区分について

3週齢ラットの約2 μ mのsemithin切片を詳細に観察したところ、線維層を2層に区分できる所見を得た。すなわち、第1層(F₁層)は関節腔に面する最表層で、2~3層の類円~楕円形の細胞が、関節腔に平行に、比較的密に配列し、下顎頭頸部付近では次第に滑膜細胞層へと移行していく層である(写真1, 2)。F₁層の細胞は、核の占める割合が大きく、細胞突起をあまりもたない(写真3)。第2層(F₂層)は、F₁層と増殖細胞層との間にあり、扁平で、樹枝状の形態をもつ細胞4~5層

からなる細胞層である。この層は、F₁層に比べ、細胞密度が低く、下顎頭頸部付近では、次第に、下顎枝骨膜外層へと連続していく層である(写真1, 2)。F₂層の細胞は、核の占める割合が小さく、細胞突起を、主に、関節腔に平行に長く延ばしている。また、基質はこの層を特徴づける所見で、F₁層に比べ、太く強靱な膠原線維束が関節腔に平行に配列し、細胞はこれらの膠原線維束間に散在している(写真3)。これらの所見により、線維層を形態学的にF₁層およびF₂層の二層に明確に区別できる(表1)。

2. 加齢による線維層の組織変化について

6週齢になると、F₁層の厚みは減少し、最表層に細胞は存在しなくなり、F₁層を層区分するのが困難になっていた。ところが、F₂層は、膠原線維束が著明に増加しているため、著しく厚くなっていた。したがって、F₁層が衰退しているにもかかわらず、線維層全体としての厚さは3週齢より増加していた。また、F₂層の細胞形態は、比較的類円形をとるようになり、その細胞密度は3週齢に比べ、減少していた(写真4 a, b)。

3. 線維層および増殖細胞層の細胞分裂について

3週齢の対照群では、線維層(F₁層、F₂層)の線維芽細胞様細胞に、細胞分裂像を観察した。細胞分裂像は、下顎頭前頭断切片における頭頂部から滑膜移行部にいたる範囲内で観察され、特定の部位に局在していなかった(写真5 a, b)。6週齢の対照群では線維層のF₁、F₂両層ともに細胞分裂像は観察されなかった。しかし、実験群では、3週齢のみならず6週齢にも細胞分裂像を観察した。

各週齢の対照群および実験群の細胞分裂数を算定した結果、3週齢では、実験群のF₁層、F₂層および増殖細胞層は、対照群に比し、分裂の割合は有意に増加して

図1 コルヒチン投与による細胞分裂数の変化

表 1 線維層層区分

		細胞密度	細胞形態	細胞突起	核／細胞質	基 質	層移行部
線 維 層	F ₁ 層	比較的密	楕円形 類円形	短い	大きい	疎で細い膠原 線維束	滑膜
	F ₂ 層	疎	扁平で 樹枝状	著しく 長い	比較的 小さい	密で太い膠原 線維束	下顎枝 骨膜

表 2 各層の細胞分裂率

個／1000個・1時間

	3 週 齢	6 週 齢	有意差
F ₁ 層	0.43±0.15	0.07±0.05	P<0.01
F ₂ 層	0.27±0.04	0.10±0.09	P<0.01
増殖細胞層	3.26±1.00	2.59±1.82	N.S.

(Mean±S.D.)

いた。しかし、6 週齢になると、実験群の増殖細胞層には、3 週齢と同程度の分裂像の増加が認められ、対照群に比し有意差が認められたが、F₁ 層および F₂ 層の実験群と、対照群間には有意差は認められなかった（図 1）。

また、対照群と実験群の細胞分裂数の差をコルヒチンの作用時間で除することにより、F₁ 層、F₂ 層および増殖細胞層の細胞分裂率（1 時間当たり細胞 1000 個当たり）を算出した（表 2）。この結果、F₁ 層および F₂ 層は 6 週齢になると分裂能は 3 週齢より減少しているが、増殖細胞層の分裂能は 3 週齢と 6 週齢間に有意差は認められなかった。

考 察

1. コルヒチン投与量および投与時間について

今まで、多くの研究者により、上皮、腫瘍細胞等の細胞分裂率に関する実験に、コルヒチンが使用されてきた^{12,13)}。組織や動物によりコルヒチンの感受性が異なるためコルヒチン投与量は、研究者によりさまざまであった。コルヒチン投与量に関し、Viljamaa^{14~16)}ら（1976, 1981）は、ラット頭蓋顔面軟骨の分裂能の実験を、コルヒチンの腹腔内投与により行った結果、1 mg/kg では、5~10 日齢の幼弱ラットには毒性が強すぎ、数時間しか生きられず、細胞変性が著しいとし、20 日齢のラットの至適量を、0.25 mg/kg としている。また、40 日齢ラットでは、4 mg/kg のコルヒチンを投与したところ、分裂像が一番多く観察できたとしている。細胞分裂の日内変動について、組織により若干の差異があるものの、11

~14 時位に分裂能の高い時刻があると報告されている^{12,14)}。また、コルヒチンは、腹腔内投与により、投与後約 45 分で細胞分裂を阻止し始める。その有効血中濃度は投与後 2~3 時間維持され、その時間内では、分裂像が直線的に増加すると報告されている^{13,15)}。また、頭蓋顔面軟骨細胞では、コルヒチン投与後約 6 時間後に分裂像の最高値が得られたとされている¹⁵⁾。本実験では、線維層の線維芽細胞様細胞と増殖細胞層の軟骨芽細胞の分裂像を、最も効率よくとらえるために、細胞分裂の日内変動を考慮し、10 時に 1 mg/kg のコルヒチンの腹腔内投与を開始した。その後、血中濃度を維持するために、3 時間ごとに計 3 回投与し、初回投与から 8 時間経過後に下顎頭を摘出した。実験群の分裂像には、コルヒチン投与不足にみられる分裂後期、終期にある分裂像はなく、過量投与にみられる細胞変性像も認められなかった。よって、本実験のコルヒチン投与量および投与法は、分裂期にある細胞の紡錘糸の重合を阻害し、線維層、増殖細胞層の分裂を止めるのに適当であったと思われる。

2. 線維層の層区分および線維層細胞の動態について

下顎頭関節軟骨層の表層から一次骨梁にいたるまでの細胞の形態的变化は、今まで Bloom⁴⁾（1975）、Durkin⁵⁾（1973）、Beresford⁶⁾（1975）、田口³⁾（1980）らなど多くの研究者により下顎頭を各層に区分した報告がされている。区分各層の名称は研究者によって異なるが、本質的には同一の層区分と考えられる場合が多かった。しかし、いずれの層区分も、線維層を一層としていて、本研究のように線維層を二層に区分した報告はほとんどみられなかった。Silva⁸⁾（1967）らは、guinea pig の下顎頭を I~IV の 4 層に区分し、線維層に相当する層を zone I と Zone II の 2 層に区分している。また、形態学的に Zone I、II の細胞は、増殖細胞層に相当する Zone III の一部の細胞から由来していると示唆している。ところが、本実験において、われわれは、線維層を形態学的に F₁ 層と F₂ 層に区分したが、F₁ 層と F₂ 層の線維芽細胞様細胞は 6 週齢頃までは分裂能を示すことがわかった。F₁ 層では、3 週齢以後 6 週齢までに分裂率は急速に低下し、層は退縮する。一方、F₂ 層では増殖細胞層と比べて低いながらも分裂能を示し、さらに 6 週齢までに線維性基質を大量に増加させている。つまり、成長期の線維層の発育は、内部の細胞増殖と線維性基質の生産によ

ってすめられるとみなされる。線維層の下方にある増殖細胞層では、6週齢になっても3週齢とほぼ同じ程度に活発に分裂している。この層は、主に下顎頭軟骨へ細胞を供給しており、上方の線維層へも細胞を供給するか否かはなお不明である。

3. 線維層の加齢による組織変化について

Appleton⁹⁾ (1975) はラット下顎頭表層の超微細構造を観察し、20日齢では、関節腔表層からおおよそ 25 μm までは、膠原線維束は比較的少なく、線維芽細胞様細胞が多数存在し、関節腔に面する細胞は、細胞突起を関節腔に延ばし、滑液の分泌もしくは栄養を滑液より取り込んでいると推察している。また、80日齢では、関節腔表層では細胞密度は減少し、線維芽細胞様細胞が存在しなく、基質が直接関節腔に面している部分があり、その基質には、太い膠原線維束と比較的未熟な弾性線維が存在するのを観察している。これらの組織変化は咬合および顎機能と関節内の潤滑に重要な役割をしているとしている。本実験において、第一臼歯咬合開始期である3週齢ラットでは、滑膜細胞と連続している F_1 層は、分裂能をもち、細胞層として明確に区分できることから、恐らく滑膜細胞様の役割をし、関節腔形成もしくは滑液産生に寄与していると思われる。顎関節を除く他関節では、関節軟骨表層の滑膜は、胎生後期にすでに存在しないといわれている¹⁷⁾が、顎関節では滑膜細胞層と思われる F_1 層が、3週齢になっても下顎頭表層全体を覆っており、咬合期の6週齢になると、 F_1 層は細胞分裂をしなくなり、この時期になってはじめて衰退傾向を示すようになると思われた。また、下顎枝骨膜の外膜と連続している F_2 層は、3週齢では下顎頭の成長に呼応して分裂していたと思われる未分化な線維芽細胞様細胞が、6週齢になり、咬合が完成し、咀嚼運動が活発になるにつれ、さまざまな細胞環境の影響を受けて、著明に膠原線維を合成する線維芽細胞に分化していったと思われた。

結 語

3週齢および6週齢ラットにコルヒチンを腹腔内投与し、下顎頭線維層および増殖細胞層の細胞分裂と組織変化に関し、検索を行い、以下の結果を得た。

1. 3週齢ラット下顎頭の線維層を形態学的に二層(F_1 層, F_2 層)に区分することができた。

2. 線維層の線維芽細胞様細胞は分裂能を有し、およそ6週齢で分裂しなくなるが、増殖細胞層は、6週齢でも活発に分裂をしていた。このことから、線維層の細胞の増加はおおよそ6週齢までは、線維層内部の細胞の増殖によることが示唆された。

3. 加齢により、最表層の F_1 層は6週齢位で衰退していくが、 F_2 層は線維芽細胞へと分化し、咀嚼運動に呼応して、膠原線維を著明に形成していくと思われた。

したがって、線維層の微細構造に関する検索を行う場合には、最表層の F_1 層を区分する必要がある。

本論文の要旨は、第41回日本口腔科学会総会(1987年4月、東京)および第32回日本口腔外科学会総会(1987年11月、東京)において発表した。

引 用 文 献

- 1) Campos, M.N.M. and Cruz, A.R.: Morphometric study of mandibular condyle of the rat during postnatal development. *Acta anat* 123: 189-194 1985.
- 2) 森田修一: ラット下顎頭軟骨の生後発育に関する微細構造学的細胞化学的研究. *日矯歯誌* 41: 171-201 1982.
- 3) 田口 望: 顎関節関節軟骨および関節円板の微細構造に関する研究, *日口外誌* 26: 929-944 1980.
- 4) Bloom, W. and Fawcett, D.W.: A textbook of histology, 10th Ed., W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1975, p 271-273.
- 5) Durkin, J.F., Heeley, J.D., et al.: The cartilage of the mandibular condyle. *Oral Science Reviews* 2: 29-99 1973.
- 6) Beresford, W. A.: Schemes of zonation in the mandibular condyle. *Am J Orthod* 68: 189-194 1975.
- 7) 塩田 覚, 南 英治, 他: ラットの下顎頭軟骨に関する電子顕微鏡的研究. *日口外誌* 26: 628-636 1980.
- 8) Silva, D.G. and Hart, J.A.: Ultrastructural Observations on the mandibular condyle of the guinea pig. *J Ultrastruct Res* 20: 227-243 1967.
- 9) Appleton, J.: The ultrastructure of the articular tissue of the mandibular condyle in the rat. *Archs oral Biol* 20: 823-826 1975.
- 10) Wilson, N.H.F. and Gardner, D.L.: The microscopic structure of fibrous articular surfaces. *Anat Rec* 209: 143-152 1984.
- 11) Kantomaa, T.: New aspects of the histology of the mandibular condyle in the rat. *Acta anat* 126: 218-222 1986.
- 12) Karring, T. and Loe, H.: The use of colchicine for the assessment of mitotic activity in rat oral epithelium. *Scand J dent Res* 80: 474-485 1972.
- 13) Tannock, I.F.: A comparison of the relative efficiencies of various metaphase arrest agents. *Exp Cell Res* 47: 345-356 1965.
- 14) Viljamaa, P. and Koski, K.: Mitotic activity in the craniofacial cartilages. I. A comparison of the metaphase arresting efficiency of diffe-

- rent colchicine dosages in the cranial base cartilages of 20-day-old rats. Proc Finn Dent Soc 72: 139-142 1976.
- 15) Viljamaa, P. and Koski, K.. Mitotic activity in the craniofacial cartilages. 2. Accumulation of arrested metaphases following colchicine injection in 20-day-old rats. Proc Finn Dent Soc 72: 187-190 1976.
- 16) Viljamaa, P.: Mitotic activity in the craniofacial cartilages. 3. A comparison of the metaphase arresting efficiency of different colchicine dosages in the cranial base cartilages of 40-day-old rats. Proc Finn Dent Soc 77: 179-181 1981.
- 17) 岡田保典：マウス滑液膜の発育と超微構造. 金大十全誌 87: 70-89 1978.

写真の説明

F₁: F₁層, F₂: F₂層, P: 増殖細胞層, C: 軟骨細胞層, S: 滑膜細胞層

写真 1 3週齢ラット下顎頭頂部 (T.B. 染色, ×150) 細胞密度の差により弱拡大でも F₁層, F₂層の二層に区分できる.

写真 2 3週齢ラット下顎頭辺縁部 (T.B. 染色, ×200) F₁層は滑膜細胞層へ, F₂層は下顎枝骨膜外層へ連続している.

写真 3 3週齢ラット線維層 (T.B. 染色, ×500) 細胞形態は F₁層では類円形, F₂層では扁平である. F₂層の基質は著明な膠原線維束がみられる.

写真 4 a: 3週齢ラット線維層, b: 6週齢ラット線維層 (T.B. 染色, ×400) 6週齢になると F₁層は衰退するが, F₂層は著明に膠原線維束が増加している.

写真 5 a: 3週齢ラット頭頂部 F₁層核分裂像. b: 3週齢ラット辺縁部 F₁層核分裂像 (T.B. 染色, ×450, インセット部 ×1,000) 矢印: 核分裂像