下顎頭軟骨のエネルギー分散X線分析

藤 本 誠 谷 内 良 弘 滝 口 励 司

昭和大学歯学部 第1口腔解剖学教室*

〔受付：昭和55年4月14日〕

抄録：下顎頭の成長および老化に伴う軟骨層の微細構造上の変化についての走査電子顕微鏡的研究と、軟骨基質の構成元素の分析の研究の一環として、今回は、エネルギー分散型X線分析器に、定量システムを取りつけたものを使用して、下顎頭の成長軟骨層の各層におけるCaとPの濃度変化を定量分析し、次のような結果を得た。下顎頭軟骨の中間層には、SとCaが微量に存在するが、Pは検出されない。肥大層上部ではSの濃度が減少し、CaとPの濃度が急激に上昇する。この層には、アパタイト結晶と考えられる顆粒状構造物が出現することから、石灰化開始部位であることが推察される。肥大層中部から下部にかけては、CaとPの濃度はさらに上昇し、顆粒状構造物からなる成熟した石灰化球との関連性が明らかになった。骨化層では、CaとPの濃度は、肥大層下部よりも、わずかな増加を示した。

結 言

成長期の下顎頭軟骨は、その機能に応じて、表層の関節軟骨と、深層の成長軟骨とに分けられる。下顎頭の成長に関与する成長軟骨は、軟骨細胞の成長に伴って、中間層と肥大層とに分けることができる。肥大層では、軟骨細胞は徐々に膨化するので、縦走基質は索状になり、この索状基質は骨化に先がけて石灰化する。さらに、成長軟骨層では、基質の石灰化の進行に伴って、その微細構造に変化がみられる。すなわち、肥大層は基質が不規則に走向している密な膠原線維網より形成されている上部と、その膠原線維網の間隙に、微小な石灰化球が出現し始める中部と、さらに、成熟した多数の石灰化球が、互いに密に癒合している下部との3部に分けることができる¹⁻³⁾。

著者らは、これまでに下顎頭の成長軟骨層の基質の石灰化の過程を、電界放射型走査電子顕微鏡で、その微細構造を観察し¹⁻³⁾、また、それに対応して、走査電子顕微鏡に取りつけたエネルギー分散型X線分析器による定性分析法で、下顎頭の

石灰化軟骨基質の主要構成元素であるCa, P, Sの各元素の各層における消長を検索³⁾し、両者を比較検討してきた。その結果、成長軟骨層の中間層では、SとCaのきわめて低いピークが検出された。肥大層の上部から下部にかけては、Sのピークの減少と、著しいCaとPのピークの増加が認められ、中部から下部への軟骨小腔壁および縦走基質への石灰化球の出現との関連性が示唆された¹⁻³⁾。

これらの成長軟骨各層の基質の石灰化に関連した一連の研究に加えて、今回は、さらに、エネルギー分散型X線分析器に、定量システムを取りつけたものによって、下顎頭の成長軟骨の各層の縦走基質に分析点を求めて、各層の分析点のCaとPの消長を定量的に検索し、合わせて、電界放射型走査電子顕微鏡によって、各層の縦走基質の微細構造を観察し、両者の結果を比較検討し、若干の知見を得たので、ここにその結果を報告する。

試料および方法

研究試料としては、平均体重150gの5匹の雄の

Energy Dispersive X-ray Analysis on Cartilage of the Mandibular Condyle

Makoto FUJIMOTO, Yoshihiro TANIUCHI and Reiji TAKIGUCHI (The First Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Showa University, Tokyo)

* 東京都品川区旗の台 1-5-8 (〒142)

Jap. J. oral Biol., 22 : 412-417, 1980.

SD 系ラットの下顎頭を使用した。ラットをエーテルで屠殺後、下顎頭部をすみやかに摘出し、これを2.5%グルタルアルデヒド（磷酸緩衝液 pH 7.4）で固定し、アルコール系列により脱水し、樹脂に包埋後、下顎頭中央部をダイヤモンドディスクによって、約100 μ の厚さに、前額方向に薄切し、さらに、これをアルミナの研磨紙で、30 μ 前後に研磨し、まず、この研磨標本のコンタクトマイクロラジオグラムを撮影した。その後、標本をエポキシ系接着剤で、カーボンの試料台に接着し、さらに、アルミナを用いたバフ研磨で、約10 μ の厚さに片面研磨した試料に、カーボン蒸着をほどこし、分析試料とした。分析装置としては、走査電子顕微鏡（S-550）に、エネルギー分散型X線分析器（Kevex-7000）と、定量システムを取りつけたものを用いた。分析条件としては、加速電圧15 KV、入射角90°、取り出し角38°、試料照射電流 1×10^{-10} A で、200秒間電子線を照射した。分析は、成長軟骨の中間層(A)、肥大層上部(B)、肥大層中部(C)、肥大層下部(D)および骨化層(E)の各層の縦走基質について行なった(図1)。分析方法は、走査電子顕微鏡（S-550）に付属している光学顕微鏡で、各層の縦走基質の分析部位を確認し、次に同部位の2次電子像と、コンタクトマイクロ

図1 下顎頭の成長軟骨各層の基質と各縦走基質の分析点(A~E)

A : 中間層, B : 肥大層上部, C : 肥大層中部,
D : 肥大層下部, E : 骨化層

ラジオグラムとを比較検討し、 $1 \times 1 \mu$ の範囲を分析した。これを、1試料ごとに各4列の縦走基質について行ない、合計10試料について、40列の分析を行なった。定量分析の際に用いた標準試料は、CaとPに対しては、天然フッ化アパタイトを用い、定量補正は、ZAF補正法を使用した。また、2次電子像の観察には、固定、脱水後、アルコール凍結切断し、さらに、1%トリプシンによって、割断面に残存している細胞を消化させ、臨界点乾燥を行ない、観察面に白金のイオンスパッタコーティングをほどこした試料を用いて、電界放射型走査電子顕微鏡（S-700）で観察した。

所 見

下顎頭の成長軟骨層の軟骨小腔は、卵円形または不正円形を呈しており、柱状配列を示しており肥大層では軟骨小腔は肥大し、縦走基質は狭窄され、索状をなしている(図1)。

下顎頭軟骨の中間層の縦走基質は、不規則に走向している密な膠原線維網で形成されている(図2)。中間層の縦走基質の定性分析では、SとCaのわずかなピークが検出された³⁾。定量分析では、SとCaとの濃度はきわめて微量である(表2)。

肥大層上部の縦走基質は、中間層の縦走基質と、ほぼ同様な微細構造を呈しており、密な膠原線維網で形成されているが、膠原線維の所々には、直径500Å前後の顆粒状構造物が認められる(図3)。肥大層上部の縦走基質の定性分析では、比較的高いCaとPのピークと、中間層とほぼ同程度のSのピークが検出された³⁾。定量分析では、Sは中間層の分析結果とほぼ同程度か、わずかに減少しているが、この部位での石灰化の進行は著しく、CaとPの濃度は急激に増加している(表2)。肥大層上部のCaP比は、ハイドロキシアパタイトの理論値よりも低い値を示している。CaとPの濃度が増加するにしたがってCaP比は、ハイドロキシアパタイトの理論値に近づく(表1)。

肥大層中部では、軟骨小腔壁に多数の輪郭の不明瞭な石灰化球が、密な膠原線維網の間に形成されている。この石灰化球は、多数の顆粒状構造物が密集して形成されている¹⁻³⁾。縦走基質は、密な膠原線維網で形成されているが、所々に直径

図 2 密な膠原線維網で形成されている中間層の縦走基質

図 4 石灰化球が散在していて、密な膠原線維網で形成されている肥大層中部の縦走基質

図 3 密な膠原線維網で形成されている肥大層上部の縦走基質

図 5 著しく石灰化しており、基質線維が不明瞭な肥大層下部の縦走基質

0.3 μ 前後の球状構造物が認められるが、これは、石灰化球に相当するものと考えられる(図 4)。肥大層中部の縦走基質の定性分析では、Ca と P のピークの著明な上昇と、S のわずかなピークが検出された³⁾。定量分析では、Ca と P の濃度は肥大層上部と比較すると、著しく増加しており、基質の石灰化がさらに進行していることを示している。S の濃度は肥大層上部と比較して減少しているか、または消失している(表 1, 2)。

肥大層下部の軟骨小腔壁は、直径 1 ~ 2 μ の石

灰化球と、各石灰化球間を連絡している膠原線維網とで形成されている。石灰化球は顆粒状構造物が密集して形成されているが、石灰化が著しく進行しているために、その表面構造は不明瞭である¹⁻³⁾。縦走基質は肥大層中部と比較すると、石灰化がさらに進行しており、その微細構造は不明瞭である(図 5)。肥大層下部の縦走基質の定性分析では、Ca と P のピークは、中部と比較してさらに上昇しているが、S のピークは消失している³⁾。定量分析では、Ca と P の濃度は中部と比

図 6 完全に石灰化している骨化層の基質

表 1 各成長軟骨層の分析点の定量分析値と CaP 比

	total CaP(weight %)	Ca/P
中間層	/	/
肥大層上部	10.14±1.86	1.904
肥大層中部	25.66±2.28	2.000
肥大層下部	34.19±1.19	2.030
骨化層	35.77±0.97	2.093

表 2 縦走基質の連続した 1 分析例

	total CaP (weight %)	S (weight %)
中間層	0.5	0.47
肥大層上部	5.41	0.45
	14.66	0.36
肥大層中部	23.80	/
	24.70	
肥大層下部	32.85	/
	36.02	
骨化層	37.10	/

較して上昇しており、基質の石灰化が進行していることを示している(表 1, 2)。

肥大層下部の軟骨小腔壁には骨芽細胞が出現し、骨基質を形成する。この骨化層の壁面には多数の骨小腔が散在しており、骨小腔の周囲は、不規則な走向の膠原線維網で形成されている^{1,3)}。骨

化層の縦走基質は、石灰化がきわめてよく基質線維の微細構造は不明瞭である(図 6)。骨化層の縦走基質の定性分析の結果は、肥大層下部とほぼ同様で、Ca と P の著しいピークが検出されるが、S のピークは検出されない³⁾。定量分析では Ca と P の濃度はともに、肥大層下部と比較して若干上昇している。CaP 比は肥大層中部から骨化層までは、ほぼ一定の値を示した(表 1, 2)。

考 察

下顎頭軟骨の成長および老化に伴う微細構造上の変化についての走査電子顕微鏡的研究と、軟骨基質の主要構成元素の分析についての研究との一環として、著者らは、これまでに幼若および老齡ラットの下顎頭を用いて、軟骨小腔壁と縦走基質の微細構造¹⁻³⁾を観察し、さらに、縦走基質の元素分析³⁾を行ない、これらについて報告している。そこで、今回はエネルギー分散型 X 線分析器に、定量システムを取りつけた装置によって、幼若なラットの下顎頭の石灰化軟骨基質の定量分析を試み、合わせて、軟骨基質の微細構造を検索したので、その結果を考察する。

著者ら¹⁻³⁾は、成長軟骨各層を、軟骨小腔壁と縦走基質との微細構造上の差異により、中間層と肥大層とにわけている。さらに、肥大層については、基質の微細構造の差異により、3 部に分類した。すなわち、軟骨小腔壁が、不規則に走向している密な膠原線維網よりなる上部と、その膠原線維網の間に、多数の顆粒状構造物で形成されている石灰化球の出現している中部と、成熟していて、互いに癒合している石灰化球で、密な基質を形成している下部とよりなっている。肥大層の下部は、軟骨細胞は死滅しており、その軟骨小腔壁の表面に骨芽細胞が出現し、そこに骨基質を形成している骨化層が存在する。

TAKATA⁶⁾は幼若犬の骨端軟骨を、樹脂切断法によって切断した試料を、走査電子顕微鏡で観察し、増殖層の基質線維の間に、直径 500~800Å の granules を認めている。この granules は、著者ら¹⁻³⁾が肥大層上部から中部にかけての軟骨小腔壁に認めた顆粒状構造物に相当するものと考えられる。さらに、TAKATA⁶⁾は、泡状層の縦走

基質に直径 $0.8 \sim 1 \mu$ の apatite clusters を認めているが、この apatite clusters は、著者ら¹⁻³⁾が肥大層中部から下部にかけての軟骨小腔壁に認めている、石灰化球に相当するものと考えられる。

著者ら³⁾は、さらに下顎頭の成長軟骨各層の縦走基質に分析点をさだめて、主要構成元素の定性分析を行なった。その結果、中間層ではSのピークとCaのピークが検出され、肥大層上部ではSのピークが減少し、CaとPのピークの著明な増加が認められた。肥大層中部ではさらに、著明なCaとPのピークと、わずかなSのピークが検出された。肥大層下部は中部と同様な分析結果であるが、Sのピークはまったく検出されない。高田ら⁷⁾はエネルギー分散型X線分析器により、イヌの骨端軟骨各層の元素分析を行っており、その静止層ではSのピークのみ認めているが、CaとPのピークは検出されなかったと報告している。この層は、著者らが分析した中間層に相当すると考えられるが、著者らの分析結果では、Sのピークと共に、Caのわずかなピークが認められた。霜⁸⁾もまた、波長分散型X線分析器で、幼若ラットの骨端軟骨の線分析と、面分析を行っており、その静止層には、Caはまったく検出されなかったと報告している。

成長軟骨層の各縦走基質の定性分析の結果から、中間層から肥大層にむかうに従って、CaとPが増加し、Sが減少することが推察された³⁾が、定性分析のみでは、各層の主要構成元素の差は判然としない。そこで以上のような、成長軟骨層の微細構造上の変化と、定性分析の結果をふまえて、肥大層の縦走基質の主要構成元素であるCaとPの定量分析を行なった。

成長軟骨層の中間層から肥大層上部と、中部とにかけてのCaとPの濃度を、段階的に定量したのが、表2であるが、肥大層上部からCaとPの両元素ともに、急激な濃度変化を示した。CaP比はCaとPの濃度の低い肥大層上部よりでは、低い値を示しており、中部に近づくにつれて増加し、肥大層中部より下層ではほぼ安定し、ハイドロキシアパタイトのCaP比に近づいている。CaP比が安定しはじめる層と、その基質に顆粒状構造物が出現する層とは、ほぼ一致しており、このこと

から、顆粒状構造物はアパタイト結晶で構成されていることが考えられる。また、顆粒状構造物は、肥大層中部より下層に観察される石灰化球の前段階の構造物であるところから、この顆粒状構造物が出現しはじめる肥大層上部が、基質の石灰化開始点であると考えられる。ANDERSON⁹⁾は、予備石灰化層の膠原原線維網に、アパタイト結晶が出現するのを認めており、この部分を石灰化開始点としている。また、高田ら⁷⁾は、CaとPのピークが上昇する層と、アパタイト結晶の出現する層とは一致しないと報告しているが、著者らの結果では、アパタイト結晶と考えられる顆粒状構造物の出現する層と、CaとPの濃度の急上昇点は一致している。さらに、CaP比の安定性からみても、CaとPの濃度の上昇点とアパタイト結晶の出現とは、同時点であると考えられる。

肥大層中部から下部にかけての定性分析³⁾では、CaとPの変化は明確ではないが、定量分析により、その濃度差を比較すると、石灰化がさらに進行していることが認められる。肥大層下部の軟骨小腔壁には、中部で出現している石灰化球が成熟し、深部では互いに癒合しており、密な石灰化軟骨基質を形成している¹⁻³⁾。石灰化球の成熟にともないCaとPの濃度は、さらに増加しているので、石灰化球を構成している顆粒状構造物が、基質の石灰化の主な役割をしていることが推察された。

肥大層下部では、軟骨細胞は死滅し、空虚になった軟骨小腔壁には骨芽細胞が出現し、骨基質を形成しはじめる。肥大層下部から骨化層にかけてのCaとPの濃度は、わずかな変化を示した。

生物試料を、エネルギー分散型X線分析器で、定量分析をする際には、分析上、種々の問題点が生じ、その解決方法も確立されているとはいいがたい。そのために、分析結果として示された定量値は、現段階では生物試料に関する限り、信頼性にとぼしい点もある。しかしながら、今回の研究のような、成長軟骨層の縦走基質にそった、段階的な石灰化を検索するために、半定量的に用いるのならば、この方法はきわめて有効であるといえることができる。

結 論

ラットの下顎頭の各成長軟骨層の縦走基質を、エネルギー分散型X線分析器で定量分析し、分析を行なった縦走基質の微細構造を、電界放射型走査電子顕微鏡で観察した結果、次のような結論を得た。

1. 中間層では、SとCaが微量に検出されたが、Pは認められなかった。肥大層上部では、Sの濃度が減少し、CaとPの濃度が急激に上昇した。肥大層中部から下部にかけては、CaとPの濃度はさらに上昇した。骨化層では、CaとPの濃度は、肥大層下部と比較して、わずかな増加を示した。

2. 中間層、肥大層上部および中部の縦走基質は、不規則に走向している密な膠原原線維網で形成されているが、肥大層中部には、直径 0.3μ 前後の石灰化球が散在している。

3. 肥大層下部の縦走基質は、石灰化が進行しており、基質を構成している膠原原線維網は不明瞭である。

4. 骨化層の基質は、完全に石灰化している。

文 献

- 1) 藤本 誠, 江川 薫, 滝口励司: 下顎頭の石灰化軟骨基質の走査電子顕微鏡的研究. 歯基礎誌, 21(補冊): 190, 1979.
- 2) FUJIMOTO, M., EGAWA, K., IDE, Y. and TAKIGUCHI, R.: Scanning electron microscopy of calcifying cartilage matrix in the mandibular condyle. *Bull. Tokyo dent. Coll.*, 21: 41-47, 1980.
- 3) 藤本 誠, 江川 薫, 滝口励司: 下顎頭の石灰化軟骨基質の走査電顕所見および元素分析. 第60回日本解剖学会関東地方会発表, 1979.
- 4) 滝口励司, 藤本 誠: ラットの下顎頭の発育に伴う改造についての走査電子顕微鏡的研究. 口科誌, 28: 137-140, 1979.
- 5) TAKIGUCHI, R.: Scanning electron microscopic study on mandibular condyles of aged rats. *Bull. Tokyo dent. Coll.*, 19: 149-158, 1978.
- 6) TAKATA, K.: Scanning electron microscopic studies on rat epiphyseal growth plates by resin cracking method. *Arch. histol. jap.*, 36: 281-290, 1974.
- 7) 高田晃平, 山本吉蔵: 正常ならびに実験的クル病骨端成長軟骨の走査電子顕微鏡的観察およびエネルギー分散型X線分析計による元素分析. 骨代謝, 8: 79-87, 1974.
- 8) 霜礼次郎: 骨, 軟骨および異所性石灰化組織のX線マイクロアナリシスに関する研究(骨皮質ならびに骨端軟骨の電子像と元素分析. 東京慈恵会医誌, 87: 820-841, 1972).
- 9) ANDERSON, H. C.: Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J. Cell Biol.*, 35: 81-101, 1967.

- 1) 藤本 誠, 江川 薫, 滝口励司: 下顎頭の石灰化軟骨基質の走査電子顕微鏡的研究. 歯基礎誌,