マウス頭蓋縫合部の組織学的観察

——前頭間縫合の癒着について——

祐 川 励 起 山 本 茂 久

東北歯科大学口腔解剖学第2講座（主任：山本茂久教授）

〔受付：昭和58年6月20日〕

Histological observations on the suture area of mouse cranium

——On the fusion of interfrontal suture——

Reiki Sukekawa and Shigehisa Yamamoto

*Second Department of Anatomy, Tohoku Dental University
Koriyama, Fukushima, 963*

(Chief: Prof. Shigehisa Yamamoto)

〔Accepted for publication: June 20, 1983〕

Key words: interfrontal suture / fusion / cranium / mouse

Abstract: There have been only few reports on the fusion process of the interfrontal suture. Using the mouse (C57-BL), the form and fusion process of the interfrontal suture were investigated with a stereoscopic, light, and electron microscope.

The following results were obtained. Interfrontal suture relates the cranial base with the falx cerebri and first fusion takes place at the rear area of the jugum limitans fossa olfactoria (j. l. f. o.). This fusion process was observed histologically. During postnatal 6-7 days, for ossification of the right and left frontal inner plates, the cells between them are pushed up and down. At postnatal 8-9 days, due to occurrence of chondrogenesis of the cells, the right and left inner plates are connected with a secondary cartilage. It was observed that the area was relatively avascular during the cartilage formation. This cartilage showed metachromasia by means of toluidine blue stain. All cells which composed the cartilage indicated degenerating figures of necrosis, hypertrophy, or vacuolation. Until postnatal 14 days, the cartilage was resorbed and replaced the bone marrow. Simultaneously, the right and left inner plates were connected with osseous tissue for progressive osteogenesis around the cartilage.

The factors of chondrogenesis of the cells between the right and left inner plates were discussed in these findings.

緒 言

頭蓋縫合部における骨の形成と吸収は、頭蓋の成長および形態変化と密接に関係しており、早期の craniostosis は頭蓋成長に著しい障害をもたらす¹⁾。一般に頭蓋の正常な成長過程において、縫合は癒着することなく可動性と骨形成の機能を果たす²⁻⁶⁾。しかし、前頭間縫合は正常な成長過程に

おいて出生後まもなく癒着するため、縫合の癒着過程を調べるには有用な材料である。これまで前頭間縫合の癒着については、解剖学的な癒着時期や前頭間縫合部の移植実験等から癒着をおこす外因的および内因的要因についての報告がなされている⁷⁻¹²⁾。しかし、前頭間縫合の癒着過程についての形態観察の報告は比較的少なく、これまで主にラットを用いた観察から、前頭間縫合は生後11日目頃に左右前頭骨内板が secondary cartilage を

介して癒着することが知られているが^{7,9,10)}, 前頭間縫合の最初の癒着部位, secondary cartilage の形成から消失にいたる過程, さらに軟骨細胞の微細構造等については不明な点が多い。

そこで今回, マウス (C57-BL) の前頭間縫合の形態と癒着過程を光顕と電顕, さらに実体顕微鏡下で観察したのでその結果を報告する。

実験材料と方法

1. 実験材料

実験には, 出生直後 (生後0日目) から生後14日目までの幼若マウス (C57-BL), 計126匹を使用した。

2. 実験方法

1) 解剖学的観察

生後4~10日目までの材料をクロロホルムで麻酔して断頭, ブアン液固定後, parasagittal に切断して, 実体顕微鏡下で前頭骨部の脈管系と falx cerebri の付着状態を調べた。材料の一部は, 99% アルコール固定後, 1% KOH 液で漂白, 1% アリザリンレッドS液で染色して, 実体顕微鏡下で前頭間縫合部の形態と癒着部位を調べた。

2) 光顕観察

生後0~14日目まで, 各時期6~8匹ずつの材料をクロロホルム麻酔して, 前頭間縫合部を切り取り, ブアン液固定を行ない, 生後6日目以後のものについてはギ酸にて脱灰後, 通法に従い脱水, パラフィン包埋し, 7 μ の前頭断連続切片を作製して, アザン染色を行ない光顕観察した。また, 生後8~9日目の試料の一部は10%ホルマリン固定後, ギ酸にて脱灰, 7 μ m の前頭断パラフィン切片を作製してトルイジン青 (0.2M 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液, pH 5.0) 染色を行なった。

3) 電顕観察

生後8~9日目の試料の一部は2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4) 混合固定液で浸漬固定後, 1%四酸化オスミウムで後固定, エポン812に包埋して超薄切片を作製し, ウラン・鉛の二重染色を行ない電顕観察をした。

結 果

1. 前頭間縫合部の形態と脈管

前頭骨は頭蓋冠前壁を構成しており, 前縁は鼻骨と前頭鼻骨縫合を, 後縁は頭頂骨と冠状縫合を形成し, 外側部は眼窩の構成にあずかる。前頭間縫合は左右前頭骨内縁により構成されるがその経過は長く成長に伴う形態変化も一様ではない。そこで, jugum limitans fossa olfactoria (以後 j. l. f. o. と略す) を境いに anterior と posterior に分ける¹²⁾。前頭骨下の脈管には前頭間縫合の下方を縦走する superior sagittal vein (以後 s. s. v. と略す) と j. l. f. o. の下方を横走する inferior cerebral vein (以後 i. c. v. と略す) がある (Fig. 1)。また, 前頭間縫合部は falx cerebri を介して頭蓋底と連結している。アリザリンレッドS染色標本の観察から, 前頭間縫合は比較的スムーズに経過し, 嵌入の程度は少なく, 最初の癒着は j. l. f. o. 後方, すなわち i. c. v. 後下方で起きることが分った。さらに成長が進むと前頭間縫合の posterior 前半部の数ヶ所で癒着が起きるが, anterior と posterior の後半部に癒着は見られない (Fig. 2)。

2. 成長に伴う前頭間縫合癒着部の組織学的変化

生後0~5日目では fibrous brain capsule 中を前頭骨の骨化が進み, capsule は上下2層に分かれる。この層はそれぞれ上層は periosteum に, 下層は dura mater に分化していく。前頭間縫合が形成される fibrous brain capsule の正中部では, capsule の中央を s. s. v. が縦走するために capsule は上下2層に分かれている。左右前頭骨外板は上層に形成されていくが, この時期の左右の外板間は bone territory と middle layer から成る。bone territory では類骨形成が盛んであり, middle layer は膠原線維と線維芽細胞で構成されるが, 縫合としての形態は見られない。一方, 左右前頭骨内板の形成は不十分なため, 縫合が形成される s. s. v. 下方の層は, 左右に走行する膠原線維とその間隙に線維芽細胞が散在する fibrous brain capsule の状態である (Fig. 3)。生後6~7日目の j. l. f. o. の後方, すなわち i. c. v. 後

下方では左右前頭骨内板の形成が進み、内板間の bone territory と middle layer の細胞が上下方向に押し上げられ全体として紡錘形となる。この細胞塊の上方は periosteum に、下方は dura mater に包まれる (Fig. 4)。内板の形成がさらに進むと、内板間は上下方向に圧扁された 1～2 層の細胞でしきられるようになり (Fig. 5)、一部では頰骨を介して直接左右の内板が連結することもある (Fig. 6)。このような内板により圧迫された部位に脈管はほとんど観察されない。なお、外板間の形態は前の時期とほぼ同様である。生後 8～9 日目になると内板先端部の細胞が基質の分泌とともに膨化して軟骨化が起きる。そのため内板先端に secondary cartilage の小塊がキャップ状に形成される。この secondary cartilage は周辺部にいくに従い徐々に扁平となる 5～6 層の細胞で包まれる (Fig. 7)。この軟骨小塊を包む細胞層は内層から外層に向かって軟骨化するため、左右の内板はキャップ状の軟骨小塊が結合した軟骨塊により連結することになる。このような軟骨化と同時に軟骨塊周辺では骨化が進行している (Fig. 8)。なお、トルイジン青染色で軟骨塊はメタクロマジーを示す (Fig. 8)。生後 10～11 日目では、左右前頭骨の骨髄が内板中を軟骨塊に向かって進行し、軟骨塊を左右から吸収し始める。同時に軟骨塊周辺の骨化が進み、やがて左右内板は骨性結合とな

る。生後 12～14 日目には軟骨塊の吸収が完了し、ここには骨髄が形成される (Fig. 9)。生後 10～14 日目の外板間は前の時期に比して、線維芽細胞数が減少し、膠原線維には左右外板を連結するような形態は見られない (Fig. 10)。

3. Secondary cartilage の電顕所見

Secondary cartilage の基質は不規則に走行する膠原線維から成り、基質中に軟骨細胞が散在する。軟骨塊周辺に位置する軟骨細胞では Golgi 装置と rER の発達はきわめて良好であるが、核は pycnosis を示し、mitochondria のクリスタは崩壊している。さらに細胞周辺では空胞化による細胞崩壊が起きていることから、細胞はすでに分泌機能を停止していると思われる (Fig. 11)。軟骨塊中央部では細胞が膨化を起こし細胞質中にわずかに rER, mitochondria, さらに Golgi 装置が散在する細胞 (Fig. 12) と necrosis を起こして rER が拡張し、細胞質全体を占めるような細胞が見られる (Fig. 13)。以上の所見から secondary cartilage を構成する細胞はいずれも退化的形態を示していることが分った。

考 察

1. 前頭間縫合の癒着部に生ずる軟骨様組織について

Moss, M. L. (1962)¹²⁾ はラットの前頭間縫合

Explanation of figures

2nd figure is stained with alizarin red S. 3rd-10th figures, except 8th figure with toluidine blue, are stained with Azan and all of these illustrations (3rd-10th) are mounted with the ectocranial side uppermost.

- Fr.: Frontal bone
- i. c. v.: inferior cerebral vein
- i. f. s.: interfrontal suture
- i. p.: inner plate
- i. l. f. o.: jugum limitans fossa olfactoria
- Na.: Nasal bone
- o. p.: outer plate
- Pa.: Parietal bone
- s. s. v.: superior sagittal vein

Fig. 1 Schematic drawing of the veins at frontal bone area

Fig. 2 Note the fusion areas of interfrontal suture (arrow). $\times 9$

Fig. 4 Postnatal 6 days. The cells between right and left inner plates are pushed up and down by the osteogenesis of inner plates. $\times 240$

Fig. 6 Postnatal 7 days. Note the connection of right and left inner plates with osteoid. $\times 240$

Fig. 3 Postnatal 4 days. Osteogenesis of outer and inner plates of right and left frontal bones is progressing in the fibrous brain capsule. $\times 120$

Fig. 5 Postnatal 6 days. Forming the inner plates, there are one or two flatted cells layers at the area between right and left inner plates. $\times 240$

Fig. 7 Postnatal 8 days. Note the chondrogenesis of the tips of right and left inner plates. $\times 220$

Fig. 8 Postnatal 9 days. Note the metachromasia of secondary cartilage by means of toluidin blue stain. $\times 220$

Fig. 9 Postnatal 14 days. Secondary cartilage is resorbed and replaced a bone marrow and right and left inner plates connect each other with osseous tissue. $\times 130$

Fig. 10 Postnatal 14 days. The area between right and left outer plates. Note a few cells and unstructural orientation of collagen fibers. $\times 240$

Fig. 11 Note the chondrocyte containing well developed rER and showing a vacuolation. $\times 4200$

Fig. 12 Note the hypertrophy of chondrocyte. $\times 3000$

Fig. 13 Note the necrosis of chondrocyte with crenated pycnotic nucleus. $\times 3600$

癒着部に生ずる基質の豊富な膨化した細胞集団を immature bone, secondary cartilage, もしくは intermediate tissue type のいずれかであろうと述べているが、今回の光顕と電顕による形態観察、トルイジン青染色でメタクロマジーを示すこと、さらに chondrocranium の primary cartilage と関連がなく生ずることから secondary cartilage と呼ぶのが適当と思われる。この secondary cartilage の消失過程には、直接骨化して骨組織になるタイプと軟骨内骨化により骨組織になるタイプがあるが¹²⁾、本軟骨は後者のタイプであった。

2. 前頭間縫合の癒着と secondary cartilage を形成する要因について

頭蓋の成長は頭蓋を構成する個々の骨の調和のとれた成長で成立する。個々の骨の成長は骨の外表面と内面よりも骨縁、すなわち縫合面での成長が著しい。それは成長過程にある骨の外表面と内面では骨芽細胞が一層なのに対し、縫合面では集塊をなすことや生体染色からも知られている⁷⁾。また、頭蓋の成長に伴い互いの骨の三次元的位置関係が変化するが、成長初期には fibrous brain capsule が、また縫合形成後は膠原線維束（シャーピー線維）がその可動性を可能にする。すなわち、縫合は頭蓋の成長過程において骨形成と可動性の2つの作用を有する。さらに縫合部の嵌入の程度と膠原線維束の走行は外因的作用に対応して決まる^{2-6, 16-19)}。頭蓋冠の縫合は以上の性質を有するが、左右前頭骨の内側縁から成る前頭間縫合は、嵌入の程度が弱いことと出生後まもなく癒着して可動性を失うことで他の縫合とは異なる。今回、マウス前頭間縫合の観察において、縫合の癒着は、頭蓋が成長過程にある8日目頃に起きることが分った。さらに縫合の最初の癒着は特定の部位で起きる。それは j. l. f. o. 後方、すなわち i. c. v. の後下方である。この部位は左右の眼窩にはさまれる前頭間縫合の anterior と嗅葉を包む posterior の境にあり、ここには falx cerebri も付着している。falx cerebri は頭蓋の成長過程において頭蓋底の形態変化を頭蓋冠へ伝える仲介をなすとされ、Moss, M. L. (1962)^{9, 12)} は falx cerebri の作用と前頭間縫合癒着の関連性を報告しているが、今回のマウス前頭間縫合癒着においても

falx cerebri が外因的要因の一つとして関与しているのかもしれない。

Audhof, H. A. J. and Markens, I. S. (1982)¹¹⁾ はラットの癒着前の前頭間縫合部を成体の矢状縫合切除部に移植して、移植された前頭間縫合部の癒着が4～5週後に起こり、その後、再び癒着した縫合部が開放して矢状縫合の一部になるという観察から、前頭間縫合の癒着は内因的に決められているが、その形質発現には外因的要因が必要であると考察している。しかし、彼らが観察したのは移植された前頭間縫合の外表面近くの部位が類骨を介して癒着するものである。今回マウスでも、類骨を介しての癒着は観察されたが、それは前頭間縫合癒着の一部であり、癒着の大部分は secondary cartilage を介して起きる。また、類骨を介しての癒着は人為的な hydrocephaly¹⁸⁾ や冠状縫合部を頭蓋冠の他の部位に移植することでも観察されている¹⁴⁾ ことから、前頭間縫合部の移植の結果生ずる類骨を介しての癒着には内因的要因よりも外因的要因の作用が大きいと思われる。

Moss, M. L. (1962)¹²⁾ は前頭間縫合癒着部の軟骨化する細胞は内板間の multipotential cell に由来するとしているが、今回の観察では、内板先端で最初の軟骨化が起こり、その軟骨小塊を包む細胞が次々に軟骨化することが分った。特に、secondary cartilage 形成前には内板の骨化により内板間の細胞が上下に押し上げられる。また、このような部位には脈管がほとんど観察されないことから、内板の骨化進行により内板間が循環障害に陥り、anoxia の状態になるのかもしれない。これまで頭蓋骨の骨折¹⁵⁾ や移植¹⁴⁾ で軟骨形成の起きることが知られており、anoxia は軟骨化の一つの要因である。また、電顕観察において、secondary cartilage を構成する細胞は全て退化的形態を示していた。以上の結果から、頭蓋の成長過程において前頭間縫合が secondary cartilage を介して癒着するのは、内板の骨化進行と falx cerebri の外因的作用により内板間が anoxia の状態となり、内板間の細胞が退化、消失する前段階として一時的に軟骨化するのではないかと思われる。

結 論

マウス (C57-BL) 頭蓋の前頭間縫合の形態と癒着過程を光顕と電顕、さらに実体顕微鏡下で調べ、次の結果を得た。

1. 前頭骨部の脈管には、前頭間縫合下方を縦走する superior sagittal vein (s. s. v.) と jugum limitans fossa olfactoria (j. l. f. o.) 下方を横走する inferior cerebral vein (i. c. v.) がある。また、前頭間縫合部は falx cerebri を介して頭蓋底と連結している。
2. 前頭間縫合の嵌入の程度は弱く、最初の癒着は j. l. f. o. の後方、すなわち i. c. v. の後下方で起きる。
3. 生後 0～9 日目：外板間は bone territory と middle layer から成る。生後 10～14 日目：外板間の細胞数は減少し、膠原線維の発達も悪い。
4. 生後 0～5 日目：内板間は fibrous brain

capsule の状態である。生後 6～7 日目：内板の骨化により内板間の細胞が上下に押し上げられ、一部では類骨を介して左右の内板が連結することもある。このような部位では脈管はほとんど観察されない。生後 8～9 日目：内板先端で軟骨化が起き、左右の内板は軟骨塊 (secondary cartilage) で連結する。生後 10～14 日目：軟骨塊が吸収されて骨髓に置き換わる。同時に軟骨塊周辺の骨化により左右の内板は骨性結合となる。

5. 軟骨塊はトルイジン青染色でメタクロマジーを示す。

6. 軟骨塊を構成する細胞は、いずれも空胞化、壊死、さらには膨化による退化的形態を示す。

7. 以上の結果から、内板の骨化、falx cerebri 等の外因的作用により内板間が anoxia の状態になり、内板間の細胞が退化、消失する前段階として一時的に軟骨化するものと思われる。

抄録：前頭間縫合の癒着に関する報告はきわめて少ない。そこで今回、マウス (C57-BL) の前頭間縫合の形態と癒着過程を光顕と電顕、さらには実体顕微鏡下で調べた。

その結果、前頭間縫合は falx cerebri を介して頭蓋底と連結しており、最初の癒着は j. l. f. o. 後方で起きる。その癒着過程を組織学的に観察すると、生後 6～7 日目では内板の骨化により内板間の細胞が上下に押し上げられる。このような部位に脈管はほとんど観察されない。生後 8～9 日目では内板先端の細胞が軟骨化を起こし、左右の内板は軟骨塊を介して連結するようになる。この軟骨塊はトルイジン青染色でメタクロマジーを示し、電顕観察において、軟骨塊を構成する細胞は、いずれも空胞化、壊死、さらには膨化の退化的形態を示す。生後 10～14 日目には軟骨塊は吸収されて骨髓に置き換わる。同時に軟骨塊周辺では骨化が進行していて、左右内板は骨性結合となる。

以上の結果から、前頭間縫合の癒着時に内板間の細胞が軟骨化を起こす要因について考察した。

文 献

- 1) Kokich, V. G., Moffett, B. G. and Cohen, M. M.: The cloverleaf skull anomaly: An anatomic and histologic study of two specimens. *Cleft palate J.* **19**: 89-99, 1982.
- 2) Giblin, N. and Alley, A.: Studies in skull growth. Coronal suture fixation. *Anat. Rec.* **88**: 143-153, 1944.
- 3) Moss, M. L.: Growth of the calvaria in the rat. The determination of osseous morphology. *Amer. J. Anat.* **94**: 333-361, 1954.
- 4) Girgis, F. G. and Pritchard, J. J.: Effects of skull damage on the development of sutural patterns in the rat. *J. Anat.* **92**: 39-51, 1958.
- 5) Herring, S. W.: Sutures-a tool in functional cranial analysis. *Acta Anat.* **83**: 222-247, 1972.
- 6) Herring, S. W.: A biometric study of suture fusion and skull growth in peccaries. *Anat. Embryol.* **146**: 167-180, 1974.
- 7) Massler, M. and Schour, I.: The growth pattern of the cranial vault in the albino rat as measured by vital staining with alizarine red S. *Anat. Rec.* **110**: 83-101, 1951.
- 8) Moss, M. L.: Premature synostosis of the frontal suture in the cleft palate skull. *plast. Reconstr. Surg.* **20**: 199-205, 1957.
- 9) Moss, M. L.: Inhibition and stimulation of sutural fusion in the rat calvaria. *Anat. Rec.*

- 136 : 457-467, 1960.
- 10) Markens, I. S. and Oudhof, H. A. J. : A study on the occurrence of alkaline phosphatase in the sutura interfrontalis of wistar rats. *Acta Anat.* **104** : 431-438, 1979.
 - 11) Oudhof, H. A. J. and Markens, I. S. : Transplantation of the interfrontal suture in the wistar rat. *Acta Anat.* **113** : 39-46, 1982.
 - 12) Moss, M. L. : Fusion of the frontal suture in the rat. *Am. J. Anat.* **102** : 141-165, 1962.
 - 14) Young, R. W. : The influence of cranial contents on postnatal growth of the skull in the rat. *Am. J. Anat.* **105** : 383-415, 1959.
 - 14) Markens, I. S. and Oudhof, H. A. J. : Morphological changes in the coronal suture after replantation. *Acta. Anat.* **107** : 289-296, 1980.
 - 15) Pritchard, J. J. : Repair of fractures of the parietal bone in rats. *J. Anat.* **80** : 55-60, 1946.
 - 16) Murray, J. MC G. and Cleall, J. F. : Early tissue response to rapid maxillary expansion in the midpalate suture of the Rhesus Monkey. *J. Dent. Res.* **50** : 1654-1971, 1971.
 - 17) Markens, I. S. : Transplantation of the future coronal suture on the dura mater of 3- to 4-month-old rats. *Acta Anat.* **93** : 29-44, 1975.
 - 18) Markens, I. S. : Embryonic development of the coronal suture in man and rat. *Acta Anat.* **93** : 257-273, 1975.
 - 19) Oudhof, H. A. J. : Sutural growth. *Acta Anat.* **112** : 58-68, 1982.