破骨細胞に関する微細形態学的研究： 培養破骨細胞の立体的構造について

土 門 卓 文

北海道大学歯学部口腔解剖学第二講座（指導：脇田 稔教授）

〔受付：平成元年8月31日〕

Ultrastructural study of osteoclasts: Reference to the three-dimensional structure of cultured osteoclasts

Takanori Domon

*Department of Oral Anatomy II, School of Dentistry, Hokkaido
University, Kita-13, Nishi-7, Kitaku, Sapporo 060, Japan*
(Director: Prof. M. Wakita)

〔Accepted for publication: August 31, 1989〕

Key Words: Osteoclast / three-dimensional structure / ruffled border / locomotion / membranous gatherings

Summary: The present study aims to understand the three-dimensional structure of the osteoclast during locomotion. The osteoclasts were gained from the bone marrow cells of new born ddY mouse. These osteoclasts were seeded onto dentine slices and then cultured for 48 hrs. The cells were examined using transmission electron microscopy. The osteoclast seen in this study had an irregular outline and had shifted from previously formed lacunae. This cellular extension was seemed to be lamellipodia. According to these results, the osteoclasts seen in present study were determined to have been during locomotion.

The ruffled border of the osteoclast was composed of both finger-like processes and plate-like ones. The plate-like processes were observed in the almost newly formed lacuna.

The complicated interwoven membranous gatherings were observed at two extensive areas of the cell body situated in the previously formed lacuna. It is posutulated that these structures are related to the incoming and outgoing of the cell membranes of the ruffled border in accordance with cell locomotion.

結 言

骨の吸収に直接関係する細胞である破骨細胞は、Kölliker (1873)¹⁾により初めて記載された。この細胞は、光学顕微鏡下で骨吸収部位に特殊な構造を示す領域を有し、これは刷子縁 Bürstensaum (brush border) と名付けられている²⁾。その後、この部位は電子顕微鏡的には Scott and Pease (1956) により波状縁 ruffled border と呼ば

れた。その後、多くの研究者が波状縁を観察し、その形態はさまざまに表現されている^{3,5,6,8-11)}。また Jones and Boyde (1979) は、走査型電子顕微鏡を用いてその形態を立体的に報告している¹²⁾。このように破骨細胞の波状縁を構成する細胞質突起の形態に関する報告は多様であり、その正確な形態については現在までも種々に論じられる点が多い。近年、著者らは破骨細胞の波状縁の三次元的な観察結果からこれら是指状と板状の突起から構成され、これらの突起は細胞体に連続する幹突

起から分枝することを報告した^{13,14)}。しかし、これらの報告は一つの細胞を二方向から観察したり、波状縁を構成する多くの突起の一部を立体的に復構したもので、このような結果からこれらの突起の波状縁の中での三次元的な分布や破骨細胞と吸収部位との正確な三次元的位置関係を理解することは困難である。

近年、破骨細胞を分離、培養する方法が Chambers and Mugnus (1982)¹⁵⁾ によって報告された。この方法を用いて破骨細胞の硬組織吸収能を研究するために、これらの細胞を直接硬組織研磨片上に培養する方法が1984年に報告され、その後このような実験系を用いて破骨細胞の骨吸収能の研究が数多くなされた^{16,19,24,25,33)}。しかしながら、これらの研究のほとんどは光学顕微鏡、並びに走査型電子顕微鏡を用いて破骨細胞と吸収窩を観察しているだけで透過型電子顕微鏡による観察を行っていない欠点がある。このため吸収の種々の段階での破骨細胞の微細形態、特に硬組織吸収部位に見られる波状縁、並びに明帯の形態については未だ不明な点が多く残されている。

硬組織の吸収においては、吸収は無機質の脱灰、有機質の脱却という二相性であること^{5,16,19,24,33,41,44,52-55)}、また移動してゆく破骨細胞による吸収の結果出現する吸収窩は連続的なものではなく、ある大きさの円形もしくは楕円形の輪郭を持つ吸収窩が少しずつ重なっているという特徴^{16,19,33,41,44,51)}を有している。これら二つの特徴のうち、前者からは二つの吸収相に一致した波状縁の特徴ある形態と吸収相の変化に伴うその形態の変化が期待され、後者は破骨細胞の移動と破骨細胞の吸収活性には一定の周期的変動が存在することを疑わせる。この様な点から波状縁の形態は吸収活性の変化と共に変動することが推測されるが、現在まで活発に吸収窩を形成している破骨細胞の波状縁を観察した報告^{7,11,53,56-59)}においても破骨細胞の吸収相を明確に特定した報告はない。

また、硬組織を吸収する多核巨細胞の名称には明確な定義がされておらず、細胞が吸収対象とする硬組織によってその名称が与えられている。すなわち、吸収対象が歯の場合には破歯細胞、骨の場合には破骨細胞と呼ばれて区別されている。し

かし、破歯細胞と破骨細胞とは形態学的並びに機能的には同一のものと報告されている⁵⁴⁾。従って、破骨細胞の形態と機能を研究する上で破骨細胞に歯の硬組織、特に象牙質を吸収させることに特に問題はないと思われる。事実、同じ実験系で多くの硬組織吸収細胞の機能と形態に関する知見^{33,41,51)}が得られている。

本研究は、マウス長骨より得た破骨細胞をクジラ象牙質研磨片上に培養し、これらの象牙質研磨片上の破骨細胞を透過型電子顕微鏡を用いてその微細形態を観察し、破骨細胞の活動周期におけるその時期の決定と、その時期における波状縁の形態を詳細に検討することを目的とする。

材料と方法

1) 破骨細胞の採取

生後3～10日齢の ddY マウスの脛骨、大腿骨を無菌的に摘出し、筋と骨膜を除去した。これらの長骨の骨端を切除し、骨幹を HEPES 緩衝液 (pH 7.4) に入れ、尖刀で細切した。この細胞と骨片を含む液はさらに試験管中でピペットによって吸入、吐出を繰り返すことにより機械的に細胞を骨より分離させた。これを30秒間静置し、大きな骨片が試験管の底部へ沈んだ後、骨片を除く細胞浮遊部分をピペットで採取した。この液を破骨細胞を含む骨髓腔浮遊液とした。

2) 象牙質研磨片の準備

本研究においては破骨細胞が *in vitro* で吸収する硬組織として、Jones et al (1984)³³⁾ の方法に従ってクジラ象牙質片を用いた。マッコウクジラ *Physeter catodon* の歯より200 μ m の厚みの象牙質片を硬組織カッター (マルトー製 MC-501D) で作製し、予め顕微鏡下で歯髓腔がなく象牙細管が閉鎖していることを確認してある部分を10mm×10mmに切りだした。これらの切片は中砥、仕上げ砥の順で表面を研磨した。厚みはほぼ50 μ mである。研磨した象牙質片はその後、滅菌蒸留水で洗浄後、さらに数回、新しい滅菌蒸留水中で超音波洗浄した。その後、室温で無菌状態を保ちつつ乾燥し-80°Cで保存した。象牙質研磨は使用直前に室温に戻し、 α -MEM 培地中で保存した。

3) 培地条件

培養法は主に Chambers and Mugnus (1982)¹⁵⁾の方法に従った。まず、象牙質研磨片を培養皿(Falcon, 20mm dish)に入れ、骨髓細胞浮遊液を1~2滴適加後、 α -MEM 培地(GIBCO)中で、37°C、5% CO₂の条件下で、48時間培養した。培養液には、10%牛胎児血清(Flow)、100U/ml ペニシリンG(万有)、100 μ g/ml 硫酸ストレプトマイシン(明治)を加えた。培養液は24時間毎に交換した。

4) 固定

予定の時間培養した後、試料は培養皿中でHEPES 緩衝液で簡単に洗浄し、直ちに2.5%グルタルアルデヒド(0.1M カコジル 酸緩衝, pH 7.4, 37°C)で30分間固定した。固定後、試料を0.22M ショ糖を含む同緩衝液中で保存した。これらの試料の一部は無染色のまま、オリンパス倒立型顕微鏡(OLYMPUS IMT-2)で観察した。

5) 走査型電子顕微鏡による観察

固定された試料をさらに1% OsO₄で、室温で3時間後固定の後、上昇エタノール系で脱水し、酢酸イソアミルによる置換後、臨界点乾燥を行った。その後、試料は金-パラジウムによるスパッタコーティングを行い、走査型電子顕微鏡(JEOL JEM-35M 加速電圧 15kV)で観察した。

6) 透過型電子顕微鏡による観察

グルタルアルデヒドで固定した試料は5% EDTA (pH 7.4)で室温にて12時間脱灰後、1% OsO₄で3時間、室温で後固定を行い、次に4% 酢酸ウランによるブロック染色を30分間行った。その後試料は上昇エタノール系列で脱水し、通法に従い Epon 812に包埋した。その後、試料は象牙質面に対して垂直の方向から Porter-Blum MT-2 B 型ウルトラミクロトームを用いて破骨細胞の端から端までをガラスナイフとダイヤモンドナイフを使用して、準超薄切片と超薄切片を交互に作製した。超薄切はその後、ウラン、鉛の二重染色(Reynolds, 1963)⁶⁰⁾を行い、透過型電子顕微鏡(HITACHI H-7000 加速電圧 75 kV)で観察した。準超薄切片は、メチレンブルー、アズールII 染色を行い、写真撮影後、写真を数 μ おきにトレ

ースし象牙質面を基準として破骨細胞の立体模型を作製した。

結 果

1) 光学顕微鏡による観察(図1)

培養した象牙質研磨片は固定後無染色のまま観察すると、吸収窩は周囲の象牙質面より明るい領域として観察され、この領域は周辺にのみ明るい輪郭によってしばしば取り囲まれていた(Fig. 1)。吸収窩に比べて象牙質上の細胞、特に破骨細胞はきわめて見にくいのであるが、この場合には吸収窩に隣接している破骨細胞の細胞外形が不明瞭ながらも観察することができた(Fig. 1)。この

Fig. 1 中に示した線に平行にこの破骨細胞の端から端までの準超薄切片を交互に作製した。

Fig. 1 Micrograph showing the cultured dentine slice. The osteoclast (Ocl) is observed near the lacuna (*). The alternation of semithin and ultrathin section was made in the direction of the line from the edge of the osteoclast to the end of it. Magnification: $\times 390$

2) 走査型電子顕微鏡による観察(Fig. 2, 3)

培養した象牙質研磨片の表面を走査型電子顕微鏡で観察すると、研磨片上には多数の線維芽細胞、骨芽細胞、および種々の発達途上にあると思われる骨髓系の細胞など様々な形態の細胞が観察された(Fig. 2)。これらの細胞と共に連続した吸収窩に隣接して、又はこの一部を覆うようにして破骨

Fig. 2 Scanning electron micrograph showing the cultured dentine slice. Many fibroblasts (Fb), osteoblasts (Ob), and bone marrow cells (BC) are seen on the dentine slice. The osteoclast (Ocl) that has the round contours is observed near the lacuna (*). The lacuna (*) is shown as a round outline, and piles up partially each other.

Magnification: $\times 1800$

細胞が見られた。このような破骨細胞の外形は一般にほぼ円形を示しており、中央部がやや盛り上がっていた (Fig. 2)。この細胞の表面には多数の微絨毛が存在し、またその周辺からは多数の細い細胞突起の放射状の伸びだしが見られた (Fig. 3)。吸収窩はほぼ円形で破骨細胞の外形と一致したひとまわり小さい外形をもち、隣接する吸収窩と重なりあって連続して配列していた。この重なり方には、一定の規則性があり、細胞に近い吸収窩は細胞から遠い吸収窩の端の部分の一部覆って重なり合い、最も細胞に近い吸収窩は他の吸収窩に覆われることなく破骨細胞自身によって一部を覆われていた (Fig. 2)。この破骨細胞に隣接する吸収窩の表面は、吸収されていない象牙質の表面とは明らかに異なっていた。すなわち、これらの浅い吸収窩の中には、象牙質を構成していた基質線維束と思われる構造が露出されており、象牙質面に対して平行に配列した線維束と垂直に配列した線維束の区別ができた (Fig. 3)。これらの構造は吸収窩の中だけに限って見られ、吸収を受けていない象牙質面では観察されなかった。しばしば

Fig. 3 Electron micrograph showing a higher magnification of figure 2. The osteoclast (Ocl) possesses many fine cytoplasmic processes and filopodia (Fi) in the peripheral regions of it. Collagen bundles (Co) that compose the dentine are seen in the lacuna.

Magnification: $\times 5500$

Fig. 4 Figure showing the reconstructed model based on the semithin sections of the osteoclast on the dentine (D). The osteoclast (Ocl) has irregular cellular contours, and a part of its cell body remains in the previously formed lacuna (*). The osteoclast extends its cytoplasm to the opposite site of the lacuna, and a portion of its cytoplasm is shown as the lamellipodia (double arrows). Five arrows in this figure indicate the sites sectioned in figures 5, 7, 9, 12, 14.

Magnification : $\times 1200$

これらの線維束のうち、より太い線維束は吸収されずにこれら吸収窩中に突出している像も観察された。これらの吸収窩の中には通常他の細胞を見ることはないのであるが、破骨細胞から離れた吸収窩の中には線維芽細胞と思われる細長い細胞が進入している像も観察された。しかし、このような細胞並びに破骨細胞以外の形態をもつ細胞によってこれらの吸収窩が作られていることを示唆する所見は得られなかった。

3) 立体模型による観察 (Fig. 4)

図1に示した象牙質研磨片上に培養した吸収窩に隣接する破骨細胞を光学顕微鏡観察の後、エポキシ樹脂包埋し、これを象牙質研磨片表面と直角に準超薄切片と超薄切片交互の連続薄切を行った。得られた準超薄切片を数 μ おきにトレースし、象牙質研磨片表面を基準として立体模型 (Fig. 4) を作製した。この復構模型からすでに形成された吸収窩とこれを一部覆うようにして重なっている破骨細胞が立体的に示され、破骨細胞自体は走査

型電子顕微鏡で通常観察される円形もしくは楕円形の外形ではなく不規則な外形をもつことが理解される。すなわち、すでに形成された吸収窩の中にその細胞体の一部を残しており、またこの吸収窩と反対側に扁平な膜様の突起としてその細胞体を伸ばしていることがわかった。このような立体的な吸収窩と破骨細胞の関係を考慮に入れて、この模型に見られる5カ所の矢印の位置 (Fig. 16の矢印参照)、すなわち、1) 膜様足 lamellipodia の見られる部分、2) 1) の位置から $5\mu\text{m}$ 先のやや細胞の高さが高くなった部分、3) 2) の位置から $10\mu\text{m}$ 先の最も細胞の高さが高い部分、4) 3) の位置から $15\mu\text{m}$ の細胞の高さは小さくなっているが、幅は大きくなっている部分、5) 4) の位置から $10\mu\text{m}$ 先の細胞の高さはより小さくなっているが、幅が最も大きくなっている部分での、合計5カ所における超薄切片について観察した。

4) 透過型電子顕微鏡による観察

1 : 矢印1の部分 (Fig. 5, 6)

Fig. 5 Electron micrograph showing the site of the osteoclast sectioned at arrow 1. The osteoclast has a low cellular length, and extends the thin lamellipodia (double arrows) to the opposite site of the lacuna (*). The clear zone (CZ) is seen on the dentine (D).
Magnification: $\times 2400$

Fig. 6 Electron micrograph showing a higher magnification of figure 5. The clear zone (CZ) has irregular contours on the dentine.
Magnification: $\times 9600$

この位置では左側の象牙質表面に明瞭な吸収窩が観察された。しかし、象牙質上の破骨細胞は吸収窩の中に入り込んでおらず、むしろ吸収窩から右側の象牙質表面に広く伸びだしていた。この破骨細胞は高さが小さく、吸収窩と反対側の細胞体

は細胞小器官に乏しい薄い膜様足として伸びだしていた (Fig. 5)。また吸収窩と反対側で細胞体表面から上方に大きく伸び出す細胞質突起も見られた。この位置での細胞断面には、複数の核が細胞質中に散在し、これらの核に密接していくつかの

Fig. 7 Electron micrograph showing the site of the osteoclast sectioned at arrow 2. The osteoclast has a high cellular length on the side of lacuna (*), but has a short one on the opposite side, and thin cytoplasmic process (double arrows) can also be seen on the right of this figure. The ruffled border (RB) clear zone (CZ) are seen on the dentine (D). Many microvilli (double arrow heads) are observed on the cellular surface in the site of the lacuna (*).

Magnification: $\times 2400$

Fig. 8 a, 8 b Electron micrographs showing a higher magnification of figure 7. The ruffled border (RB) and clear zone (CZ) are seen on the dentine. The plate-like processes (P) are observed in the ruffled border, and are arranged perpendicularly to the dentine surface. The finger-like processes (F) and the plate-like processes (P) are interwoven among the ruffled border (RB). The complicated interwoven membranous gatherings (arrow heads) are narrowly accumulated in the cytoplasm of the site of the lacuna. Magnification: $\times 9600$

ゴルジ装置がそれぞれの核を取り囲んでいた。ミトコンドリア、粗面小胞体は主として核をはさんで象牙質と反対側の細胞質中に観察された。この位置におけるこれらの小器官の発達は同じ細胞の他の部位と比較するとその程度は低かった。象牙質に接している部分には明帯 clear zone が観察され、明帯の象牙質に接している細胞膜はその象牙質表面の形態に一致した不規則な凹凸を示していた (Fig. 6)。この明帯に連続する細胞質中には大小さまざまな空胞が見られた。しかしながら、明瞭な波状縁 ruffled border は観察されなかった。

2 : 矢印2の部分 (Fig. 7, 8a, 8b)

この位置では左側の吸収窩の上にある細胞部分の高さは大きいですが、吸収窩と反対側に向かうに従ってその高さは小さくなり、最も離れた部分では薄い細胞質突起の伸びだしが観察された (Fig. 7)。吸収窩側の細胞表面には多数の微絨毛の集合している像が見られた。複数の核は不規則な外形を示し明瞭な辺縁クロマチンが特徴であった。これらの核の周囲には発達したゴルジ装置が観察された。核をはさんで吸収面と反対側の細胞質中には、管状のクリステの発達した多数のミトコンドリアと粗面小胞体が見られるが、吸収窩側の細胞質中にはこれらの小器官はほとんど見られなかった。吸収されていない象牙質に接している部分では波状縁とその両側に明帯が観察される (Fig. 8a, 8b)。明帯の象牙質に面する細胞膜は象牙質表面の構造に従い凹凸を示していた。これら明帯、波状縁上部の細胞質中には大小さまざまな空胞が見られ、これらの空胞の一部には波状縁の細胞膜と連続している像も観察された。波状縁を構成している細胞質突起のうち左側の吸収窩から離れた位置のものは縦断もしくは斜断像を示す板状の形態のものが多く、これらの板状の突起は幹突起 stem process から枝分かれした後、象牙質面に対してほぼ垂直に配列していた (Fig. 8b)。円形もしくは楕円形の横断像を示す指状の突起や中間型の突起は波状縁中で左側の吸収窩側の部位で観察された (Fig. 8b)。これらの突起の大きさは板状の突起では、厚みが30~50nm、幅が2~4 μm 、高さは6~8 μm であり、また指状の突起は長さが1~4 μm 、直径は30~50nm 程であった。

また、この吸収窩側の明帯は象牙質に接して不規則な外形を示しており、この明帯の分布は広く吸収窩側の細胞端近くでもわずかながら観察された (Fig. 8a)。この吸収窩側の細胞質中には、複雑に入り組んだ細胞膜と思われる膜系の小さな集合が観察され、これは形態的に波状縁とよく似ていた (Fig. 8a)。

3 : 矢印3の部分 (Fig. 9, 10a, 10b)

この位置は細胞の高さは最も大きくなっている部位であり、吸収窩と反対側の細胞端からの薄い細胞膜の突出は短くなっていた (Fig. 9)。吸収窩側の細胞表面に見られる微絨毛はその数が減少しており、また核は吸収窩と反対側の細胞質中に1個観察され、核周囲のゴルジ装置は比較的発達していた。ミトコンドリアは細胞質中に散在していたが、粗面小胞体をはさんで吸収部位と反対側の細胞質中に比較的多く観察された。また、波状縁明帯上部の細胞質中には空胞が見られ、これらの空胞の一部は波状縁を構成している突起の細胞膜と連続していた。さらに、細胞表面付近の細胞質中にも食食像を示すと思われる内容物を有する空胞様構造物が見られた。吸収部位以外の細胞表面付近に見られる空胞様構造物は、食食像を示す点やその大きさが吸収部位で見られるものより大きいことなどから吸収部位付近で見られる空胞とは異なると思われた (Fig. 9)。象牙質に接する部分では中央に波状縁、その両側には明帯が見られた。波状縁は板状の突起と指状の突起が複雑にかつ不規則に入り組んで構成されており、おのおの分布には規則性がみられなかった。とくに縦断もしくは斜断像を示す板状の突起は複雑に枝分かれをしており、象牙質面に対して概ね垂直に配列していた (Fig. 10b)。明帯の領域の象牙質に接する細胞膜の形態は吸収窩側の部位と反対側の部位とではその形態が異なっていた。すなわち、吸収窩に面する部分には象牙質に接して電子密度の一定しない複雑で不規則な外形を示す幅の広い明帯が見られ、反対側では電子密度と明帯の幅が一定であり、また複雑な外形を示さなかった (Fig. 10b)。また、吸収窩側の象牙質から離れた位置の細胞質中に複雑に入り組んだ細胞膜と思われる膜系が広く集合している像が観察され、一見波状

Fig. 9 Electron micrograph showing the site of the osteoclast sectioned at arrow 3. The osteoclast has the highest cellular length in this site. The thin cytoplasmic process (double arrows) is observed as a short one on the side of this figure. The ruffled border (RB) and clear zone (CZ) are observed on the dentine surface (D). A few microvilli (double arrow heads) are observed on the cellular surface in the site of the lacuna (*)
Magnification: $\times 2400$

Fig. 10 a, 10 b Electron micrographs showing a higher magnification of figure 9. The ruffled border (RB) and clear zone (CZ) are observed on the dentine. The plate-like processes (P) composed of the ruffled border are arranged perpendicularly to the dentine surface. The finger-like processes (F) are seen among them. The membranous gatherings (arrow heads) are extensively accumulated in the cytoplasm of the site of the lacuna.
Magnification: $\times 9600$

縁の構造に類似していた (Fig. 10a)。この膜系は他の細胞質部分、並びに波状縁と比較すると電子密度が低く、また波状縁のような枝分かれした像

は観察されなかった。また、この位置より数 μ 先の部分には (Fig. 11)。5組の中心小体がゴルジ領域と思われる部位に観察された。

Fig. 11 Electron micrograph showing five parts of centrioles (arrow heads) seen in the area of Golgi apparatus (Go).
Magnification: $\times 19000$

4 : 矢印4の部分 (Fig. 12, 13a, 12b)

この位置では、細胞はその高さは前の位置より小さくなっている一方、幅は大きくなっていた。破骨細胞は吸収窩の中にその細胞体を一部入れているが、大部分は吸収されていない象牙質の上にあることから、細胞が左側の吸収窩と反対側にその細胞体を大きく伸ばしているものと考えられた (Fig. 12)。細胞表面の微絨毛は全体的にその数は減少していた。核は5個観察され、個々の核は発達したゴルジ装置に囲まれていた。ミトコンドリアはその形態と分布から二種類が区別された。ひとつはクリステの発達した比較的大型のミトコンドリアで、左側の吸収窩側の細胞質中に多く見られ、他のものは小型のミトコンドリアでクリステは比較的少なく細胞質中に散在して観察された。粗面小胞体は核をはさんで吸収部位と反対側の細胞質中に比較的多く観察された。破骨細胞の象牙質に接している部分では中央付近に波状縁、その両側に明帯が観察された (Fig. 12)。波状縁ならびに明帯に隣接する細胞質中には多数の空胞が観察された。これらの一部は波状縁を構成している細胞膜と連続していた。この部位では左側の既に形成された吸収窩に連続して新たに吸収窩が形成されているのが観察された。明帯は新しい吸収窩

側では幅の広い電子密度の一定した規則的な形態を示しているが (Fig. 13b)、左側の吸収窩側ではこのような形態は見られず不規則な外形を示していた (Fig. 13a)。この明帯にはさまれた波状縁を構成する細胞質突起は新しい吸収窩に一致した部位ではほとんどが縦断もしくは斜断像を示す板状の突起によって構成されていた。これら板状の突起は一般的に象牙質面に対してほぼ垂直に配列する傾向を示していた (Fig. 13b)。一方、左側の吸収窩側に向かうにつれて波状縁を構成する突起の形態は板状から不規則な形態のものへと変化していた (Fig. 13a)。また、これらの突起の間には円形もしくは楕円形の横断像を示す指状の突起が見られた (Fig. 13a)。さらに、この領域でも左側の吸収窩中に残っている細胞質中には複雑に入り組んだ細胞膜と思われる膜系が集合している像が観察された (Fig. 13a)。

5 : 矢印5の部分 (Fig. 14, 15a, 15b)

この位置では、細胞は扁平で矢印4の位置に比べてその高さはより小さくなり、また今回観察した部位の中で幅は最も大きかった。この部位では破骨細胞は古い吸収窩の中にその細胞体を大部分残しており、吸収窩と反対側に向かってその細胞体を一部薄い細胞質突起として伸ばしているのが観察された (Fig. 14)。核は2個見られるが核周囲のゴルジ装置は他の断面と比べてあまり発達していなかった。多数のミトコンドリアは比較的大きく、吸収窩と核をはさんで反対側の細胞質中に散在しており、粗面小胞体もミトコンドリアの分布とほぼ一致して観察されるがその数は少なかった。破骨細胞の象牙質側では象牙質に接して不規則な外形を示す明帯が見られたが、明瞭な波状縁は観察されなかった (Fig. 15b)。この明帯上部の細胞質中には大小さまざまな空胞が観察され、一部の空胞の細胞膜が明帯の細胞膜と連結している像も見られた。古い吸収窩側の細胞体中には、複雑に入り組んだ細胞膜と思われる膜系が細胞体上部にまで広く散在しているのが観察された (Fig. 15a)。

5) 破骨細胞と象牙質との三次元的関係の二次元的投影図 (Fig. 16)

Fig. 16 は上記のような超薄切片と準超薄切片

Fig. 12 Electron micrograph showing the site of osteoclast sectioned at arrow 4. The osteoclast has a low cellular length, but its width is extensive. The cell body extends to the opposite site of the previously formed lacuna (*). The narrow newly formed lacuna(**) is observed near it. The ruffled border (RB) and clear zone (CZ) are seen on the dentine (D) in accordance with the narrow lacuna (*).

Magnification : $\times 2400$

Fig. 13 a, 13 b Electron micrographs showing a higher magnification of figure 12. The ruffled border (RB) and clear zone (CZ) are seen on the dentine. The wide clear zone is seen on the newly formed lacuna (**), but the clear zone in the previously formed lacuna (*) has irregular contours. The ruffled border is mainly composed of the plate-like processes (P) in accordance with the newly formed lacuna (**). These processes are arranged perpendicularly to the dentine surface. The finger-like processes (F) are seen among them. The membranous gatherings (arrow heads) are accumulated in the cytoplasm of the site of the previously formed lacuna (*).

Magnification : $\times 8400$

Fig. 14 Electron micrograph showing the site of the osteoclast sectioned at arrow 5. The osteoclast has a low cellular length, but has the widest cell body in this site. The most part of its cell body remains in the lacuna (*). The thin cell body extends to the opposite site of the lacuna. The clear zone (CZ) is seen on the dentine (D).
Magnification: $\times 2400$

Fig. 15 a, 15 b Electron micrographs showing a higher magnification of figure 14. The irregular contours of the clear zone (CZ) are observed on the dentine. The membranous gatherings (arrow heads) are extensively seen in the cell body of the site of the lacuna.
Magnification: $\times 8400$

交互の連続切片の観察より得た細胞の構造とその下で吸収されている象牙質との関係を二次元的に投影作図したものである。吸収窩に隣接する破骨細胞は外形が不規則で、この細胞と部分的に重な

っている古い吸収窩の輪郭とは全く異なっており、さらに古い吸収窩の中心と破骨細胞の中心とがずれていた。破骨細胞は古い吸収窩の中にその細胞体の一部を残しており、一方吸収窩と反対側

Fig. 16 Schematic drawing the relationship between the osteoclast and the lacuna. The osteoclast has irregular contours near the lacuna. The cell body partially remains in the lacuna, but most of it is extended to the opposite site of the lacuna. Some of these extensions are seen as the lamellipodia. Sixteen nuclei are scattered in the cytoplasm. The clear zone is observed on the surface of the dentine, and the ruffled border is encircled by it. The plate-like processes are seen in the two regions of the ruffled border. The membranous gatherings are seen in two extensive regions of the cytoplasm situated in the lacuna. Arrows 1, 2, 3, 4, 5 show the sites of the osteoclast in figures 5, 7, 9, 12, 14.

にその細胞体を大きく伸ばしていた。この細胞体の伸びだしは厚みが小さく、これらのうちの一部は極めて扁平で細胞内小器官に乏しい膜様足であった (Fig. 5)。16個の核は細胞質中で何カ所かに集合することなく分散しており、これらの分布には明確な規則性はみられなかった。古い吸収窩の外縁に部分的に重複する環状の明帯が示されている。明帯の輪郭は細胞外形と無関係のようにみえ、むしろ古い吸収窩との関連性が強いように思われる。この明帯に囲まれて波状緑の領域が示されている。この波状緑の中で、特に明瞭な板状の突起の発達している二カ所の領域が観察された。また、古い吸収窩側の細胞質中に見られた波状緑

様の膜系集合体の特に発達していた部分が示されており、この構造物は細胞内の二カ所の広い部位に存在することが理解される。矢印1～5の部位は上記の透過型電子顕微鏡像で示した五カ所の位置に相当する部位を示している。

考 察

Chambers and Mugnus (1982)¹⁵⁾ によって破骨細胞を分離・培養する方法が報告されて以来、多くの動物なら破骨細胞を採取し培養することが行われている。これらの破骨細胞の採取は大きく、哺乳類 (特にゲッ歯類)¹⁵⁻³⁹⁾ と鳥類^{18, 40-49)} の長骨から行われている。鳥類より得られた破骨細胞は、一度に採取できる細胞数が多い点と、長期間生存させることができる点に最大の利点があり種々の研究に用いられてきた。しかしながら、最近これらの破骨細胞はカルシトニンに反応しないという欠点のあることが示唆されている¹⁸⁾。一方、哺乳類の破骨細胞は多くの研究に用いられており、正常状態における細胞形態並びに細胞骨格、カルシトニンやプロスタグランジンなどの各種薬物による形態変化、細胞の応答性についても詳しく報告されている^{15, 20-23, 28-32, 35-39, 50)}。

また、破骨細胞の硬組織吸収能を研究するために、破骨細胞を硬組織研磨片上で培養する方法が1984年に報告された^{16, 19, 24, 25, 33)}。これ以後、多くの研究者らは破骨細胞と吸収窩との関係^{16, 19, 33, 41, 44, 51)}、破骨細胞と骨芽細胞との関係^{16, 19, 24-27, 33, 35-38, 41, 51)}、また破骨細胞に対する各種ホルモン、薬物等の影響^{15, 17, 18, 20-23, 28-32, 35-39, 50)} が明らかにされてきた。この培養破骨細胞を硬組織片上で観察する方法の最大の利点は、平面上にある破骨細胞を観察するために細胞と吸収部位との位置的関係の把握が容易となることである。しかしながら、これらの研究は細胞の立体的形態並びに細胞と吸収窩との関係についてはほとんど光学顕微鏡^{15, 20, 21, 23, 30-32, 43, 46-48)}、並びに走査型電子顕微鏡^{16, 19, 24, 25, 33, 41, 51)} を用いて報告しており、透過型電子顕微鏡による微細形態を観察していないという欠点がある。前述の走査型電子顕微鏡による観察は細胞の外形と表面形状、並びに吸収窩の形態が知られるのみで、細胞内構造及び細胞に覆われている硬

組織表面、そして細胞の吸収部位との関係は全く知ることはできないのである。Jones et al^{39,41,51)}は象牙質研磨片から破骨細胞を除去し、破骨細胞に覆われていた吸収面も観察しているが、微細な構造については報告がない。そこで本研究ではマウス長骨より得た培養破骨細胞の連続超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡で観察し、さらに立体複構模型を作製することにより吸収される硬組織と破骨細胞との関係を立体的に明かにしようと試みた。

従来まで破骨細胞の形態は、多数の核をもつ不規則な外形を示す巨細胞として記載され、微細形態的には多数のミトコンドリア、骨吸収部位に見られる波状縁とこれに隣接する明帯、並びに吸収窩の存在がその特徴であるとされている^{3-10,52-54,61,62)}。また、破骨細胞を硬組織研磨片上で培養し走査型電子顕微鏡で観察することにより、様々な細胞活性状態での細胞形態が報告されている^{16,19,24,25,33,41,51)}。これらの報告によると、通常観察される円形もしくは楕円形の外形をもつ破骨細胞は吸収中であり、その明帯の外形は吸収窩の外形とほぼ一致し、また移動中の破骨細胞は吸収窩からずれた位置に存在し、不規則な外形をもつと言われている。今回観察した破骨細胞は、古い吸収窩とずれた位置にあり、その細胞外形は不規則であった。さらに、古い吸収窩の中に破骨細胞の細胞体の一部を残しており、また古い吸収窩と反対側にはその細胞体を大きく伸ばしており、かつ移動中の細胞に見られる膜様足⁶³⁻⁶⁶⁾が観察された。この形態的特徴は前述の移動中の破骨細胞の形態^{24,51)}と非常に類似していることから、今回観察した破骨細胞は次の吸収部位へ移動中の段階のものではないかと推測される。

この破骨細胞に見られる16個の核は細胞質中に散在しておりその分布には規則性は見られなかった。核周囲を取り囲むゴルジ装置は部位によって発達の程度が異なっていた。すなわち、波状縁が発達している部分ではゴルジ装置はその範囲の広さ、ゴルジ層板の長さなど点でよく発達しており、波状縁から離れた領域ではこれらの構造の発達が悪かった。粗面小胞体は著者ら過去の報告^{13,14)}によれば吸収部位と反対側の細胞質中に比

較的多く観察されており、今回の観察でも同様の分布がみられた。しかし、発達の程度の点では波状縁との関係は明確ではなかった。ミトコンドリアは従来細胞質中に散在すると報告されているが^{3-10,52,53,61)}、今回の観察では、粗面小胞体の細胞内での分布とほぼ一致し、さらに波状縁が発達している部位ではそのクリステが多くかつ大きさの大きいミトコンドリアが観察された。これらの小器官、特にミトコンドリアは能動輸送に大きく関与していると言われており^{4,6,7)}、今回の観察で吸収窩の存在する位置で、すなわち吸収を盛んに行っている部位ではより発達した傾向を持っていることから吸収に際して重要な役割を持っているものと推測される^{3-11,52-54,61,62,67,68)}。以上の過去の結果はミトコンドリアの分布などの点で今回の結果と一致しない点もあるが、このことは今回観察した破骨細胞が移動中であり、また新たに形成を始めた吸収窩が十分に大きくないこと、すなわち完全な吸収期の破骨細胞でないことと関係すると思われた。

ゴルジ領域には5組の中心小体が観察された。このような細胞内に集合する中心小体は *in vivo* 並びに *in vitro* における破骨細胞で観察されている^{5,69,70)}。また副甲状腺ホルモンで処理された破骨細胞では中心小体の観察される頻度が多く、さらに異物多核巨細胞においても同様な中心小体が観察されている⁷⁰⁻⁷²⁾。中心小体の存在は破骨細胞の多核化が骨原性細胞の融合^{73,74)}によるもの、また血液原性細胞である単球の融合によるという報告^{42,43,45,56,57,68,75-81)}にとってこれらの融合論を支持する根拠の一つとして挙げられている。すなわち、このような多数の中心小体が観察されることは、単核の細胞、すなわち単球、あるいは前破骨細胞⁸²⁾が融合して多核の破骨細胞が形成された結果と考えられるからである。しかし、破骨細胞の多核化については更に検討が必要と考えられる。

波状縁と明帯の上部細胞質中には多数の空胞が観察された。このような空胞は *in vivo* でも通常観察される構造物である。この空胞に関しては吸収された無機質の分解を行っているとする報告が一般的である^{52,79,83)}。すなわち、これらの報告では未脱灰切片において空胞中にアパタイトの結晶

の存在を観察している。今回の培養した破骨細胞の観察では未脱灰切片による観察を行っていないので過去に報告されているような空胞中に見られるアパタイトの結晶は観察されていないが、これらの空胞は波状縁、明帯の細胞膜と連結しているものもあり、吸収による取り込みが空胞によって行われているという考えを間接的に支持する所見と考えられる。

今回観察した破骨細胞は、細胞と吸収窩との関係、細胞外形の不規則性^{16,24,25,33,41,51}、さらに膜様足の存在⁶³⁻⁶⁶などから移動中の細胞であると考えられるが、破骨細胞の移動に伴う透過型電子顕微鏡による微細形態、特に波状縁の構造について記載している報告はない。しかしながら、他の細胞の移動に伴う膜の変化については種々の報告が出されている。特に線維芽細胞の移動の際には細胞体の伸長と収縮が起こるとされている^{63-66,84-86}。今回観察した破骨細胞は既に形成された吸収窩側にその細胞体を一部残しており、かつこの吸収窩と反対側にその細胞体を大きく伸ばしていた。さらに、この吸収窩側の細胞体中には主として2カ所の広い領域に細胞膜と思われる複雑に入り組んだ集合体が観察され(図8a, 10a, 13a, 15a)、本研究ではこれを膜系集合体(membranous gatherings)と名付けた。この膜系は非常に波状縁と類似しているが相違点も存在する。まず、硬組織と接する部位には存在しないこと、また波状縁のように複雑に枝分かれしていないこと、そして電子密度が他の細胞質部分と比べてやや低いことなどである。また、これらの膜系が見られる古い吸収窩の細胞表面には多数の微絨毛が集合していたことから、仮にこの破骨細胞が移動中であるとすると、このような膜系は細胞の移動に伴う細胞膜の収支に関連した現象ではないかと推測される。しかしながら、なおいくつかの疑問点が存在する。まず、このような膜系は仮に細胞内に取り込まれたとするとどのようにして細胞体の中に取り込まれるのか、そして細胞体中でどのように処理されるのかである。線維芽細胞においては細胞の後端でエンドサイトーシスによって細胞膜の細胞内への取り込みが行われ、前方端ではエキソサイトーシスによって膜の放出がなされると

考えられており、これらの現象を伴って細胞は細胞体の伸長と収縮によって移動すると報告されているが^{63-66,84-89}、本研究においてはこのような考えを支持する所見は得られなかった。また線維芽細胞の移動様式が破骨細胞と同様のものであるかという問題点も残っている。すなわち破骨細胞は、明帯、波状縁という硬組織に接しかつ吸収を行う部位を持つという点から、細胞全周にわたって均一な形態を示す線維芽細胞と同様の機構で破骨細胞が移動を行っているとは考えがたい。しかしながら、このような膜系の存在は不要になった膜の急速な回収を行うために行われている破骨細胞に特有な細胞内代謝を示すものの一つなのかもしれない。また、本研究においては象牙質研磨片上に培養した破骨細胞を連続超薄切片において観察しているので、上記の膜系が機能的な波状縁と無関係であることは明確な事実であり、in vivoにおける破骨細胞の一断面での所見からのみでは波状縁の一部と見誤る可能性は十分にあると考えられる。これが今までこの構造に関する報告がない理由の一つと考えられる。

破骨細胞における移動に関する膜の収支の問題点を明かにするためには、一つの吸収終了期から次の吸収終了期に移る活動周期のさまざまな段階を精密に観察し、十分に検討を重ねる必要がある。

電子顕微鏡的に Scott and Pease (1956)³⁾ によって破骨細胞の波状縁と呼ばれる構造については多くの報告があり、現在まで波状縁は膜の陥入もしくは突出であるとの報告がなされている³⁻⁸⁾。また、その形態は指状、微絨毛様、葉状等と多様に報告されている^{3,5,6,8,11)}。また、走査型電子顕微鏡を用いた観察では Jones and Boyde (1979)¹²⁾ は、その形態を microvillious projections, microfolds, pits and cleft と報告しており、その正確な形態は不明な点が多いままであった。近年、Domon and Wakita (1986)¹³⁾ は in vivo の破骨細胞の波状縁の3次元的な形態として、波状縁は指状と板状の突起から構成されており、これらの突起から構成されており、これらの突起は幹突起 stem process から分枝することを報告した。さらに、Domon and Wakita (1989)¹⁴⁾ は器官培養し

たラット頭蓋冠に見られる破骨細胞の波状縁の連続超薄切片を作製し、コンピューターを用いてこの細胞の波状縁を構成している突起の三次元立体復構を行った。彼らは、幹突起は細胞膜の太い伸びだしであり、この突起は順次平行に分枝してさらにいくつかの二次突起となり、これらの突起から指状と板状の突起が分枝すると報告している。さらに、これらの中で板状の突起は幹突起より分枝した後、互いに平行するいくつかの突起となり、その一部はより複雑な形態としてベルト状の形態をとるものもあって、これらの突起は骨面と細胞体の間で様々にその方向を変えると報告している。一方、指状の突起はこれら板状の突起の間に見られ、通常板状の突起のように複雑に枝分かれをしていないという特徴があると報告している。本研究の結果では、波状縁中には指状と板状の突起が混在し、これらの突起は幹突起より分枝したのち複雑に枝分かれしていた。これらの結果は、*in vitro* における破骨細胞の波状縁を構成している突起は *in vivo*¹³⁾ におけるものと同じ形態をとっていることを示している。すなわち、破骨細胞の波状縁はその環境条件が適切であるならば同一の形態を示すことが示唆された。

従来まで波状縁の突起が骨面に対してどのように配列しているかについてはほとんど報告が成されていない。これは、*in vivo* においては破骨細胞と吸収される骨表面との三次元的な位置関係は多様であり、二次元の切片の観察のみでは波状縁と吸収部位との位置的関係の把握が困難なためであると考えられる。Domon and Wakita (1986, 1989)^{13,14)} は波状縁の突起の配列について、板状の突起は骨面に対して垂直に配列し、また指状の突起には板状の突起のような配列はみられないことを報告している。今回の研究でも板状の突起は象牙質に対して垂直に配列しているのが観察され、彼らの報告を裏付けた。しかしながら、指状の突起については板状の突起に見られるような傾向は認められなかった。このような突起の形態と分布は、突起の表面積が他の形態の突起に比べて大きいために、指状の突起は吸収能が大きく、これらの突起の間にコラーゲンもしくは無機質の結晶がみられるという過去の報告^{3,4,6,67,68,90)} とは相

反するものである。これは板状の突起が複雑に折りたたまれた構造であるということを理解していなかったために、板状の突起は表面積が小さく吸収能が弱いと考えたものと思われる。また、縦断された板状の突起の一部を、縦断された指状の突起とみなしていたという可能性もある。これらのことを考えるとこのような三次元的に複雑に入り組んだ板状の突起の配列は、硬組織の吸収機構についてなんらかの特別な役割をもつ可能性が推測される。

従来まで波状縁を構成している突起には指状と葉状の2種類の形態があり、これらの突起の形態の差は突起の発達段階を示すと報告されている^{7,11,53,56-59)}。すなわち、吸収が盛んな場合には指状の突起が、吸収が弱い場合には葉状の突起が観察されると言われている。この考えに従うと指状の突起は発達した突起を、また葉状の突起は未発達の突起を意味している。近年、Domon and Wakita (1986, 1989)^{13,14)} は、波状縁は指状と板状との突起から構成されており、これらの突起は波状縁の中で混在しており、その分布に明確な規則性がないと報告している。また、従来まで破骨細胞の波状縁を構成する細胞質突起の形態は直接骨吸収能を反映するとされ、吸収が盛んな場合には長い細胞質突起により構成された厚みのある well-developed ruffled border が、そして吸収が盛んでない場合には短い細胞質突起により構成される厚みの小さい poorly-developed ruffled border が存在すると報告された^{11,56,58,62,77,78,91,92)}。これらの波状縁は副甲状腺ホルモンもしくはカルシトニン投与の際にもそれぞれ観察され^{32,61)}、突起の形態と破骨細胞の吸収活性との関係が論じられている。本研究並びに著者らのこれまでの研究^{13,14)}を基本にすると従来切片上で二次元的に見られていた well developed ruffled border は指状の突起に相当し、また poorly developed ruffled border は板状の突起に相当することになる。また、Jones et al (1985)⁵¹⁾ は波状縁は吸収窩の中央部で発達しており、周辺部ではその発達が弱いために吸収窩は球面状になるのであると報告している。これらの考えに従えば、波状縁の中央部に発達した突起が、そして周辺部には未発達の突

起が存在することになる。すなわち、波状縁の中央部には指状の突起が、そして周辺部には板状の突起が存在するという分布がなければならない。しかしながら、このような規則的な分布は本研究においては観察されず、また過去においてもさまざまな形態の突起の分布は不規則であると報告されている^{4,6,13,14)}。本研究での象牙質研磨片上の破骨細胞は、新しく象牙質上に吸収窩の形成を始めており、これに対応する波状縁は板状の突起によって構成されていた。この結果は、従来までの吸収が盛んな部位に指状の突起が存在するという過去の報告と矛盾している。なぜならば、新しく吸収窩が形成され始める部位では細胞の吸収活性が高いと考えられるからである。このような矛盾は突起の形態の差を発達段階の差と考えているために生じたものであり、突起の形態の差は他の理由によるものと考えるべきであると思われる。また、板状の突起からなる波状縁の集合が細胞の進行方向に多いことは、この波状縁の下に小さな吸収窩が形成されていることから新しい吸収窩の形成の開始点と考えられる。

今日まで、破骨細胞の波状縁は明帯で閉鎖された空間^{53,93-95)}に酵素を分泌し^{55,83,91)}、特に ACPase, carbonic anhydrase isozyme 等が骨吸収に関係すると報告されている⁹⁶⁻¹⁰⁰⁾。また、ACPase では特に酒石酸耐性 ACPase が破骨細胞の特定標識 marker となることが報告されている^{97,98,101)}。近年、ruffled border を構成している細胞膜中に100KD のタンパク質をもつことが報告され⁹⁸⁾、このことから Na^+ , K^+ -ATPase が波状縁中に存在することが示唆された^{75,98,102-104)}。また、低 pH 条件下では破骨細胞による硬組織の吸収が促進されると言われている^{17,40)}。Marks et al (1988)⁸⁰⁾ は carbonic anhydrase isozyme によって H_2O と CO_2 から作られた水素イオンが、明帯で閉鎖された骨と波状縁の間の空間で Na^+ , K^+ -ATPase の作用により分泌され、これによって作られた低い pH 物質が硬組織を脱灰し、同時に分泌される水解酵素によって有機質が脱却されるために硬組織の無機質と有機質の両方が吸収され、この際に波状縁の突起が有効に作用すると推測している。彼らの考えに従うと、破骨細胞の波

状縁は直接無機質の両方を同時に分解、吸収することになり、過去にもそのような報告はすでになされている^{5,9,10,16,19,24,25,33,41,52-55)}。このような考えに基づくと波状縁に見られる突起の形態の差は重要な意味をもつと思われる。最近、Domon and Wakita (1986, 1989)^{13,14)} はこの突起の形態の差は、機能的な差を示すという考えを示した。すなわち、硬組織を構成している無機質と有機質に対応して、指状と板状の突起がそれぞれ何等かの機能的な役割分担を行っているのではないかという考えを提示している。このことは波状縁と吸収される基質との空間が幾つかの微小領域に分けられて、その領域における吸収の状態、もしくは相に一致した形態を突起が示しており、吸収のある相が進んで次の相に移る際に突起の形態も自在にその形態を変えているとの推測を可能にする。事実、吸収窩に平行に切られた切片では指状の突起がいくつかの小部分に分散し、これらの突起群の間に板状の突起が境界線を引くように介在している像が得られている。このように考えると指状にも板状にも分類されない中間型の突起の存在についても両者の移行型として説明ができる。しかしながら、突起の形態と吸収機能の関係をより正確に論ずるためには今後より多くの研究が必要である。

移動中の破骨細胞は、本研究で示したように細胞全体にわたって同じ形態分化を示していなかった。このことは Marks (1983) の報告⁷⁹⁾ を支持するものである。すなわち、今回観察した破骨細胞は矢印1, 5の部分では明帯のみが観察され、ゴルジ装置、ミトコンドリア、粗面小胞体の発達はあまりよくないが、矢印2, 3, 4の部分では波状縁をもちゴルジ装置、ミトコンドリア、粗面小胞体の発達は良い像を示していた。このように破骨細胞はその観察される部位によって超微形態が異なっており、当然細胞活性も同じでは有り得ない。従って、一部分のみの観察で破骨細胞の活性を評価するのは難しく、かえって細胞全体としての機能の判断を誤る可能性すらある。以上のことから、破骨細胞全体の細胞活性を論ずるためには、特に移動中と思われる細胞の場合には慎重な吟味、検討が必要であり、可能な限り予め細胞全体像を理解することが必要であると思われる。

結 論

本研究は硬組織吸収細胞である破骨細胞の移動に伴う微細形態の変化を三次元的に理解することを目的として行った。

マウス骨髄より得た破骨細胞をクジラ象牙質研磨片上に培養し、この細胞が吸収窩を形成していることを確認した後、準超薄切片と超薄切片による連続薄切を行った。破骨細胞の微細形態を透過型電子顕微鏡を用いて観察した後、立体複構模型を用いて破骨細胞と吸収窩との関係を三次元的に検討した。破骨細胞の活動周期における移動の時期を確認し、その時期における波状縁の形態を詳細に検討した。

本研究で観察した破骨細胞は外形が不規則で、既に形成された吸収窩とずれた位置にあり、この吸収窩の中には破骨細胞の細胞体の一部が観察された。一方、細胞は既に形成された吸収窩と反対側にはその細胞体を大きく伸ばしており、一部は細胞内小器官を殆ど含まない膜様足であった。以上の点から、今回観察した破骨細胞は移動中のものと判断した。

既に形成された吸収窩側の細胞質中には二カ所

の広い領域に細胞膜と思われる複雑に入り組んだ膜系集合体が観察された。これは、破骨細胞の吸収活性の周期的変動の結果として生じる移動に伴う波状縁の細胞膜の収支に関連する構造と考えられる。

波状縁は主に指状と板状の突起から構成されており、板状の突起は象牙質面に対してほぼ垂直に配列していたが、指状の突起にはこのような傾向は認められなかった。三次元的には、明帯に囲まれた波状縁は既に形成された吸収窩と重複することなく象牙質研磨片上に見られた。波状縁に接する象牙質の一部には、新たに形成された吸収窩が見られ、これに対応する波状縁は発達した板状の突起によって構成されていた。

謝辞：稿を終るにのぞみ、終始御指導御校閲いただきました本学口腔解剖学第二講座脇田稔教授に深く感謝の意を表しますとともに実験進行にあたって多大の御援助を頂きました本学歯科薬理学講座松本章教授並びに久田洋助手に深く御礼申し上げます。本研究にあたり、御協力下さった口腔解剖学教室員諸兄に心からお礼申し上げます。

本研究の一部は第30回歯科基礎医学会総会（1988年10月）において発表した。

抄録：本研究は硬組織吸収細胞である破骨細胞とその吸収窩との位置的関係を正確に把握し、並びに破骨細胞の移動に伴う微細形態の変化を三次元的に明らかにするために行ったものである。実験では、マウス骨髄より得た破骨細胞をクジラ象牙質研磨片上に培養し、これらの細胞を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、破骨細胞は不規則な外形を示し、既に形成された吸収窩とずれた位置にあり、また伸びだしている細胞体の一部には膜様足が観察された。これらのことから、この破骨細胞は移動時期のものと判断した。既に形成された吸収窩側の細胞体中には、複雑に入り組んだ膜系集合体が観察され、この膜系は移動に伴う波状縁の細胞膜の収支に関連する構造と考えられた。移動時期における波状縁は指状と板状の突起から構成されていた。また、新たに形成された吸収窩に一致して発達した板状の突起が観察された。

文 献

- 1) Kölliker, A.: Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenformen. F. C. W. Vogel, Leipzig, pp. 86, 1873.
- 2) Kölliker, A.: Handbuch der Gewebelehre des Menschen. W. Engelmann, Leipzig, pp. 409, 1889.
- 3) Scott, B. L. and D. C. Pease: Electron microscopy of the epiphyseal apparatus. A nat. Rec. 126: 465-495, 1956.
- 4) Dudley, H. R. and D. Spiro: The fine structure of bone cells. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11: 627-649, 1961.
- 5) Fetter, A. W. and C. C. Capen: The fine structure of bone in the nasal turbinates of young pigs. Anat. Rec. 171: 329-346, 1971.
- 6) Gonzales, F. and M. J. Karnovsky: Electron microscopy of osteoclasts in healing fractures of young pigs. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 299-316, 1961.
- 7) Kallio, D. M., P. R. Garant and C. Minkin: Ultrastructural effects of calcitonin

- on osteoclasts in tissue culture. *J. Ultrastruct. Res.* **39**: 205-216, 1972.
- 8) Luk, S. C., C. Nopajaroonsri and G. T. Simon: The ultrastructure of endosteum: A topographic study in young adult rabbits. *J. Ultrastruct. Res.* **46**: 165-183, 1974.
 - 9) 雨宮 璋, 進藤正信: 破骨細胞性骨吸収について: 北海道歯誌, **7**: 53-54, 1986.
 - 10) 進藤正信: Osteolathyrisms ラットの抜歯創の破骨細胞性骨吸収に関する形態学的研究: 齒基礎誌 **24**: 668-705, 1982.
 - 11) Miller, S. C., B. M. Bowan and R. L. Myers: Morphological and ultrastructural aspects of the activation of avian medullary bone osteoclasts by PTH. *Anat. Rec.* **208**: 223-231, 1984.
 - 12) Jones, S. J. and A. Boyde: Some morphological observation on osteoclasts. *Cell Tissue Res.* **185**: 387-397, 1979.
 - 13) Domon, T. and M. Wakita: Electron microscopic study of osteoclasts with special reference to the three-dimensional structure of the ruffled border. *Arch. Histol. Jpn.* **49**: 593-602, 1986.
 - 14) Domon, T. and M. Wakita: Three dimensional reconstruction of the ruffled border of osteoclasts. *Arch. Histol. Cytol.* **52**: 1-13, 1989.
 - 15) Chambers, T. J. and C. J. Magnus: Calcitonin alters behaviours of isolated osteoclasts. *J. Pathol.* **136**: 27-39, 1982.
 - 16) Ali, N. N., A. Boyde and S. J. Jones: Motility and resorption: Osteoclastic activity in vitro. *Anat. Embryol.* **170**: 51-56, 1984.
 - 17) Arnett, T. R. and D. W. Dempster: Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology* **119**: 119-124, 1986.
 - 18) Arnett, T. R. and D. W. Dempster: A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro; effects of calcitonin and prostaglandins. *Endocrinology* **120**: 602-608, 1987.
 - 19) Boyde, A., N. N. Ali and S. J. Jones: Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br. Dent. J.* **156**: 216-220, 1984.
 - 20) Chambers, T. J. and C. J. Dunn: The effects of parathyroid hormone, 1, 25-dihydroxycholecalciferol and prostaglandins on the cytoplasmic activity of isolated osteoclasts. *J. Pathol.* **137**: 193-203, 1982.
 - 21) Chambers, T. J. and N. N. Ali: inhibition of osteoclastic motility by prostaglandins 12, E1, E2 and 6-oxo-E1. *J. Pathol.* **139**: 383-397, 1983.
 - 22) Chambers, T. J. and C. J. Dunn: Pharmacological control of osteoclastic motility. *Calcif. Tissue Int.* **35**: 566-570, 1983.
 - 23) Chambers, T. J. and A. Moore: The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**: 819-824, 1983.
 - 24) Chambers, T. J., P. A. Revell, K. Fuller and N. A. Athanasou: Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J. Cell Sci.* **66**: 383-399, 1984.
 - 25) Chambers, T. J., B. M. Thomson and K. Fuller: Effect of substrate composition on bone resorption by rabbit osteoclasts. *J. Cell Sci.* **70**: 61-71, 1984.
 - 26) Chambers, T. J. and K. Fuller: Bone cells predispose bone surface to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J. Cell Sci.* **76**: 155-165, 1985.
 - 27) Chambers, T. J., J. A. Darby and K. Fuller: Mammalian collagenase predispose bone surface to osteoclastic resorption. *Cell Tissue Res.* **241**: 671-675, 1985.
 - 28) Chambers, T. J., P. M. J. Mcsheehy, B. M. Thomson and K. Fuller: The effects of calcium regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinology* **116**: 234-239, 1985.
 - 29) Chambers, T. J.: The pathobiology of the osteoclast. *J. Clin. Pathol.* **38**: 241-252, 1985.
 - 30) Chambers, T. J., J. C. Chambers, J. Symonds and J. A. Darby: The effects of human calcitonin on the cytoplasmic spreading of rat osteoclasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **63**: 1080-1085, 1986.
 - 31) Fuller, K. and T. J. Chambers.: Generation of osteoclasts in cultures of rabbit bone marrow and spleen cells. *J. Cell. Physiol.* **132**: 441-452, 1987.
 - 32) Hefley, T. J. and P. H. Stern.: Isolation of osteoclasts from fetal rat long bones. *Calcif. Tissue Int.* **34**: 480-487, 1982.
 - 33) Jones, S. J., A. Boyde and N. N. Ali: The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts. *Anat. Embryol.* **170**: 274-256, 1984.
 - 34) Marshall, M. J., N. W. Nisbet and P. M. Green: Evidence for osteoclast production in mixed bone cell culture. *Calcif. Tissue Int.* **38**: 268-274, 1986.
 - 35) Mcsheehy, P. M. and T. J. Chambers: Osteoblastic cell mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* **118**: 824828, 1986.

- 36) Mcsheehy, P. M. and T. J. Chambers: Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulated osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* **119**: 1654-1659, 1986.
- 37) Thomson, B. M., J. Saklatvala and T. J. Chambers: Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J. Exp. Med.* **164**: 104-112, 1986.
- 38) Thomson, B. M., G. R. Mundy and T. J. Chambers: Tumor necrosis factors α and β induced osteoblastic cells to stimulative bone resorption. *J. Immunol.* **138**: 775-779, 1987.
- 39) Zaidi, M., K. Fuller, P. J. R. Bevis, R. E. GainesDas, T. J. Chambers and I. MacIntyre: Calcitonin gene-related peptide inhibits osteoclastic resorption: a comparative study. *Calcif. Tissue Int.* **40**: 149-154, 1987.
- 40) Blair, H., A. J. Kahn, E. C. Crouch, J. J. Jeffrey and S. L. Teitelbaum: Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J. Cell Biol.* **102**: 1164-1172, 1986.
- 41) Jones, S. J., N. N. Ali and A. Boyde: Survival and resorption activity of chick osteoclasts in culture. *Anat. Embryol.* **174**: 265-275, 1986.
- 42) Nijweide, P. J., T. Vrijheid-Lammers., R. J. P. Mulder and J. Blok: Cell surface antigens on the osteoclasts and related cells in the quail studied with monoclonal antibodies. *Histochemistry* **83**: 315-324, 1985.
- 43) Ousler, M. J., L. V. Bell, B. Clevinger and P. Osoby: Identification of osteoclast-specific monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* **100**: 1592-1600, 1985.
- 44) Reid, S. T.: Effect of mineral content on human bone on in vitro resorption. *Anat. Embryol.* **174**: 225-234, 1986.
- 45) Teti, A., G. Volleth, A. Carano and A. Z. Zallone: The effects of parathyroid hormone or 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on monocyte-osteoclast fusion. *Calcif. Tissue Int.* **42**: 302-308, 1988.
- 46) Zallone, A. Z. and A. Teti: The osteoclasts of hen medullary bone under hypercalcaemic conditions. *Anat. Embryol.* **162**: 379-393, 1981.
- 47) Zallone, A. Z., A. Teti and M. V. Primavera: Isolated osteoclasts in primary culture; First observations on structure and survival in culture media. *Anat. Embryol.* **165**: 405-413, 1982.
- 48) Zallone, A. Z., A. Teti, M. V. Primavera, veness to parathyroid hormone. *Endocrinol.* L. Naldini and P. C. Marchsio: Osteoclasts and monocytes have similar cytoskeletal structures and adhesion in vitro. *J. Anat.* **137**: 57-70, 1983.
- 49) Zallone, A. Z., A. Teti and M. V. Primavera: Resorption of vital or devitalized bone by isolated osteoclast in vitro: the role of lining cell. *Cell Tissue Res.* **235**: 561-564, 1984.
- 50) Gowen, M. and G. R. Mundy: Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon- γ on bone resorption in vitro. *J. Immunol.* **136**: 2478-2482, 1986.
- 51) Jones, S. J., A. Boyde, N. N. Ali and E. Maconnachie: A review of bone cell and substratum interaction: an illustration of the role scanning electron microscopy. *Scanning* **7**: 5-27, 1985.
- 52) Bonucci, E.: The organic-inorganic relationships in bone matrix undergoing osteoclastic resorption. *Calcif. Tissue Res.* **16**: 13-36, 1974.
- 53) Schenk, R. K., D. Spiro and J. Wiener: Cartilage resorption in the tibial epiphyseal plate of growing rats. *J. Cell Biol.* **34**: 275-291, 1967.
- 54) 鈴木駿介: ヒトの乳歯象牙質吸収に関する電子顕微鏡的研究. *歯基礎誌* **16**: 186-244, 1974.
- 55) Vase, G.: On the mechanism of bone resorption: the action of parathyroid hormone on the excretion and synthesis of lysosomal enzymes and on the extracellular release of acid by bone cells. *J. Cell Biol.* **39**: 676-697, 1968.
- 56) Holtrop, M. E., G. J. King, K. A. Cox and B. Reit: Time-related changes in the ultrastructure of osteoclasts after injection of PTH in young rats. *Calcif. Tissue Int.* **27**: 129-135, 1979.
- 57) Ko, J. S. and G. W. Bernard: Osteoclast formation in vitro from marrow mononuclear cells in osteoclast-free bone. *Am. J. Anat.* **161**: 415-425, 1981.
- 58) Miller, S. C.: The rapid appearance of acid phosphatase activity at the developing ruffled border of parathyroid hormone activated medullary bone osteoclasts. *Calcif. Tissue Int.* **37**: 526-529, 1985.
- 59) Wezeman, F. H., K. E. Kuttner and J. E. Horton: Morphology of osteoclasts in resorbing fetal rat bone explants: effects of PTH and AIF in vitro. *Anat. Rec.* **194**: 311-324, 1979.
- 60) Reynolds, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in elec-

- tron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17** : 208-312, 1963.
- 61) Kallio, D. M., P. R. Garant and C. Minkin : Evidence of coated membranes in the ruffled border of the osteoclast. *J. Ultrastruct. Res.* **37** : 169-177, 1971.
 - 62) Lucht, U. : Osteoclasts and their relationship to bone as studied by electron microscopy. *Z. Zellforsch.* **135** : 211-228, 1972.
 - 63) Abercrombie, M., J. E. Heaysman and S. M. Pegrum : The locomotion of fibroblasts in culture : movements of the leading edge. *Exp. Cell. Res.* **59** : 393-398, 1970.
 - 64) Abercrombie, M., J. E. Heaysman and S. M. Pegrum : The locomotion of fibroblasts in culture : ruffling. *Exp. Cell Res.* **60** : 437-444, 1970.
 - 65) Abercrombie, M., J. E. Heaysman and S. M. Pegrum : The locomotion of fibroblasts in culture : movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. *Exp. Cell Res.* **62** : 389-398, 1970.
 - 66) Abercrombie, M., J. E. Heaysman and S. M. Pegrum : The locomotion of fibroblasts in culture : electron microscopy of leading lamella. *Exp. Cell Res.* **67** : 359-367, 1971.
 - 67) Schofield, B. H., L. S. Levin and S. B. Doty : Ultrastructure and lysosomal histochemistry of ia rat osteoclasts. *Calcif. Tissue.* **14** : 153-160, 1974.
 - 68) Scott, B. L. : The occurrence of specific cytoplasmic granules in the osteoclast. *J. Ultrastruct. Res.* **19** : 417-431, 1967.
 - 69) Chain, H., Kraus, B., Osborn, M. and K. Weber : Centrioles, microtubules and microfilaments in activated mononuclear and multinucleated macrophages from rat immunofluorescence microscopic studies. *J. Pathol.* **133** : 301-328, 1981.
 - 70) 桜岡俊樹 : 破骨細胞の微小管の分布に関する電子顕微鏡的研究, 齒基礎誌 **26** : 1245-1277, 1984.
 - 71) Matthews, J. L., Martin, J. H. and G. J. Race : Giant-cell centrioles. *Science* **155** : 1423-1424, 1967.
 - 72) Sapp, J. P. : An ultrastructural study of nuclear and centriolar configuration in multinucleated giant cells. *Lab. Invest.* **34** : 109-114, 1976.
 - 73) Kember, N. F. : Cell division in endochondral ossification. *J. Bone Joint Surg.* **42** : 824-839, 1960.
 - 74) Young, R. W. : Cell proliferation and specialization during endochondral osteogenesis in young rats. *J. Cell Biol.* **14** : 357-370, 1962.
 - 75) Baron, R., P. T. Van., J. R. Nefussi and A. Vignery : Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am. J. Pathol.* **122** : 368-378, 1986.
 - 76) Feldman, R. S., Hrieger, N. S. and Tashjian, A. H. Jr : Effects of parathyroid hormone and calcitonin on osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* **107** : 1137-1143, 1980.
 - 77) Marks, S. C. : Studies of the mechanism of spleen cell for osteopetrosis in ia rats. *Am. J. Anat.* **151** : 119-130, 1978.
 - 78) Marks, S. C. and D. G. Walker : The hematogenous origin of osteoclasts : Experimental evidence from osteopetrotic (microphthalmic) mice treated with spleen cells from beige mouse donors. *Am. J. Anat.* **161** : 1-10, 1981.
 - 79) Marks, S. C. : The origin of osteoclasts : evidence, clinical implications and investigative challenges of an extraskeletal source. *J. Pathol.* **12** : 226-256, 1983.
 - 80) Marks, S. C. and S. T. Popoff : Bone cell biology ; the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am. J. Anat.* **183** : 1-44, 1988.
 - 81) Thompson, E. R., Baylink, D. J. and J. E. Wergedal : Increase in number and size of osteoclasts in response to calcium or phosphorus deficiency in the rat. *Endocrinology* **97** : 283-289, 1975.
 - 82) Ejiri, S. and H. Ozawa : Identification and characterization of preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast : ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. In : *Endocrine Control of Bone and Calcium Metabolism*. D. V. Cohn, T. Fujita, J. T. Potts, Jr., and R. V. Talmagr, eds. Elsevier, Amsterdam. pp. 90-94, 1984.
 - 83) Lucht, U. : Cytoplasmic vacuoles and bodies of the osteoclast ; an electron microscopic study. *Z. Zellforsch.* **135** : 229-244, 1972.
 - 84) Abercrombie, M. and G. A. Dunn : Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp. Cell Res.* **92** : 57-62, 1975.
 - 85) Harris, A. K. : Behavior of cultured cells on substrate of variable adhesiveness. *Exp. Cell Res.* **77** : 285-297, 1973.
 - 86) Trinkaus, J. P., T. Betchaku and L. S. Krulikowski : Local inhibition of ruffling during contact inhibition of cell movement. *Exp. Cell Res.* **64** : 291-300, 1971.

- 87) Chen, W. T.: Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J. Cell Biol.* **90** : 187-200, 1981.
- 88) Erickson, C. A. and J. P. Trinkaus: Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading. *Exp. Cell Res.* **99** : 375-384, 1976.
- 89) Follet, E. A. C. and R. D. Goldman: The occurrence of microvilli during spreading and growth of BHK21/C13 fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **59** : 124-136, 1970.
- 90) Hancox, N. M. and B. Boothroyd: Motion picture and electron microscope studies on the embryonic avian osteoclast. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11** : 651-661, 1961.
- 91) Lucht, U. and J. O. Norgaard: Export of protein from the osteoclast as studied by electron microscopic autoradiography. *Cell Tissue Res.* **168** : 89-99, 1976.
- 92) Miller, S. C.: Rapid activation of the medullary bone osteoclast cell surface by parathyroid hormone. *J. Cell Biol.* **76** : 615-618, 1978.
- 93) Holtrop, M. E., L. G. Rouse and H. A. Simmons: The effects of parathyroid hormone, colchicine and the activity of osteoclasts in organ culture. *J. Cell Biol.* **60** : 346-355, 1974.
- 94) King, J. G. and M. E. Holtrop: Actin-like filaments in bone cells of cultured mouse calvaria as demonstrated by heavy meromyosin. *J. Cell Biol.* **66** : 445-451, 1975.
- 95) Malkani, K., M. M. Luxemburger and A. Rebel: Cytoplasmic modifications at the contact zone of osteoclasts and calcified tissue in the diaphyseal growing plate of foetal guinea-pig tibia. *Calcif. Tissue Res.* **11** : 258-264, 1973.
- 96) Anderson, G., B. Ek-Rylander and L. Hammarstrom: Purification and characterization of a vanadate-sensitive nucleotide tri- and diphosphatase with acid pH optimum from rat bone. *Arch. Biochem. Biophys.* **228** : 431-438, 1984.
- 97) Anderson, G., B. Ek-Rylander, L. E. Hammarström, S. Lindskog and S. U. Toverud: Immunocytochemical localization of a tartrate-resistant and vanadate-sensitive acid nucleotide tri- and diphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **34** : 293-298, 1986.
- 98) Baron, R., L. Neff, D. Louvard and P. J. Courtoy: Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption; evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-KD lysosomal protein at the osteoclast ruffled border. *J. Cell Biol.* **101** : 2210-2222, 1985.
- 99) Marie, P. J. and M. Hott: Histomorphometric identification of carbonic anhydrase in fetal rat bone embedded in glycolmethacrylate. *J. Histochem. Cytochem.* **35** : 245-250, 1987.
- 100) Väänänen, H. K. and E. K. Parvinen: High active isoenzyme of carbonic anhydrase in rat calvaria osteoclasts. *Histochemistry* **78** : 481-485, 1983.
- 101) Minkin, C.: Bone acid phosphatase; tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclasts function. *Calcif. Tissue Int.* **34** : 285-290, 1982.
- 102) Akisaka, T. and C. V. Gay: An ultracytochemical investigation of ouabain-sensitive p-nitrophenylphosphatase in chick osteoclasts. *Cell Tissue Res.* **244** : 57-62, 1986.
- 103) Akisaka, T. and C. V. Gay: Ultracytochemical evidence for a proton-pump adenosin tri-phosphatase in chick osteoclasts. *Cell Tissue Res.* **245** : 507-512, 1986.
- 104) Baron, R., L. Neff, C. Roy, A. Boisvert and M. Caplan: Evidence for a high and specific concentration of (Na⁺, K⁺) ATPase in the plasma membrane of the osteoclast. *Cell* **46** : 311-320, 1986.