

## 短肢症マウスにおける蝶形後頭軟骨結合の 骨化に関する組織学的研究

藤 森 修<sup>1</sup>, 平 林 義 章<sup>2</sup>

### 要 旨

短肢症マウスは、成長軟骨の低硫酸化により骨端軟骨の形成が障害され、短頭、短軀、短肢や咬合不全などの身体的特徴を有するマウスである。頭蓋は軟骨内骨化により成長する頭蓋底と膜内骨化により成長する頭蓋冠で構成され、頭蓋底の蝶形後頭軟骨結合は軟骨内骨化を起こす部位として知られている。本研究では自然発症不正咬合の発症過程を解明するための基礎的知見を得ることを目的として、正常マウスと短肢症マウスで同部位の組織学的検索を行い、正常マウスと短肢症マウスの間に見られる頭蓋底の形成過程について組織学的に比較検討した。その結果、短肢症マウスでは軟骨形成の障害により、十分な軟骨の形成が起こらないまま骨化が進行するために、通常より早い6週齢において蝶形後頭軟骨結合が骨化して、頭蓋底の成長が停止すると考えられた。

**キーワード：**短肢症マウス、咬合不全、頭蓋底、軟骨形成障害、組織学

### はじめに

短肢症マウスは軟骨形成障害により異常に短縮した四肢、尾およびドーム状の体幹をもつ小人症を自然発症するマウスである[2, 7, 8, 13, 20-22]。この短肢症は、単一の常染色体劣性遺伝子であるbm遺伝子によって引き起こされる。bm遺伝子ホモ接合体の短肢症マウスでは、ATP sulfurylase と adenosine-phosphosulfate kinaseの2つの作用をもつ硫酸基転移酵素がポイントミューテーションを起こし、硫酸基供与

体の低形成を介して種々の組織、特に軟骨基質の低硫酸化を引き起こす。軟骨基質の低硫酸化は骨形成、とりわけ置換骨の形成を障害するため、長骨や頭蓋骨底の形成障害を起こす[2, 7, 13, 20-22]。

本研究に用いた短肢症マウス：BALB/c-bm/bm マウスは、短肢症を自然発症するB57BL系bm/bm マウスと正常BALB/c マウスを自然交配することによりbm遺伝子をBALB/c マウスに導入したものである[4]。この短肢症を自然発症するBALB/c-bm/bm マウスのうち、約3-

1 名古屋学院大学リハビリテーション学部理学療法学科、解剖学・組織化学研究室

2 名古屋文理大学健康生活学部健康栄養学科

Correspondence to: Osamu Fujimori

E-mail: fujimori@ngu.ac.jp

Received 30 October, 2011

Accepted 30 May, 2012

5%の個体が不正咬合（切歯の左右交差咬合）を自然発症することが報告されている[5, 6]。不正咬合はその発症過程において、先天的要因と後天的要因が複雑に作用する多因子疾患と考えられているが、その発症機序については確定されておらず不明な点が多い。また、短肢症マウスに関する報告は、四肢や体幹の骨形成に関するものが大部分で、頭蓋骨に関するものは少ない[2, 13, 22]。先に著者らは、骨計測によりこの不正咬合が下顎の変位ではなく、頭蓋骨の変形により生じることを報告し、短肢症マウスにおいては頭蓋骨の長径（前後長）が著しく障害されることを明らかにした[1]。

今回、不正咬合自然発症の発症過程を解明するための基礎的研究を目的として、正常マウスおよび短肢症マウスにおける頭蓋底の形成過程を組織学的に検索した。頭蓋の形成は、軟骨内骨化により成長する頭蓋底と膜内骨化により成長する頭蓋冠によって行われる。短肢症マウスでは、成長軟骨の低硫酸化により骨端軟骨の形成が障害されることが報告されている[13, 19, 21]ので、本研究では頭蓋底において軟骨内骨化を生じる蝶形後頭軟骨結合に着目し、同部位の組織学的検索を行って正常マウスと短肢症マウスで比較検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

雄性正常マウス（BALB/c-/-）6週齢（正常マウス6週齢群）と雄性短肢症マウス（BALB/c-bm/bm）6週齢（短肢症マウス6週齢群）を各5匹ずつ用いた。これらのマウスは、著者らが名古屋市立大学医学研究科動物実験施設にて飼育管理し、系統を維持している。なお、本研究は名古屋市立大学ならびに名古屋学院大学の

規定に則り、名古屋市立大学大学院医学研究科動物実験委員会による承認（承認番号H20-04）ならびに名古屋学院大学動物実験委員会による承認（承認番号2010-013）を得て行った。

## 2. 実験方法

### 1) 組織調製法

ネブタール麻酔下でマウスを開胸、左心室よりリンゲル液を注入して脱血し、40%パラフォルムアルデヒド7.5%シュークロース0.05Mリン酸塩緩衝液（pH7.4）にて還流固定を行った。還流固定後、頭部を摘出し、同固定液に4°Cで1週間浸漬固定した。固定後、0.9%塩化ナトリウム含有0.01Mリン酸塩緩衝液（PBS）（pH7.4）にて洗浄し、2.5%エチレンジアミン4酢酸（EDTA）脱灰液[12]を用いて4°Cにて約1カ月脱灰した。EDTA脱灰液は2日に1回交換した。

脱灰した頭部組織塊をPBSで洗浄した後、鼻部を前頭断し、眼窩の内側縁の位置で矢状断した。トリミングした組織塊を50%、70%、80%、90%、100%の上昇エタノール列に6～12時間浸漬して脱水し、キシレンによる透徹の後、定法にしたがってパラフィン包埋（融点58-60°C）した。

滑走型マイクロームを用いて、パラフィン包埋した頭部組織ブロックから、厚さ約4 $\mu$ mの矢状断連続切片を作製し、シラン処理したスライドガラスに添付して、37°Cのオーブンで一晩乾燥した。

### 2) 染色法

#### i) ヘマトキシリン・エオジン染色

パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、下降エタノール列を通して水になじませた後、流水水洗した。マイヤーのヘマトキシリ

ン液に室温で5分間浸漬し、流水水洗した後、0.5%エオジン水溶液に室温で15～20分間浸漬した[16]。次いで上昇エタノール列にて脱水し、キシレンで透徹した後、HSR液(シスメック, 神戸)を用いてカバーガラスで封入した。

## ii) 高鉄ジアミン染色

キシレン・アルコール系列で脱パラフィンした切片を新調した高鉄ジアミン液(N, N'-dimethyl-p-phenylenediamine/HCl 20mgとN, N'-dimethyl-m-phenylenesiamine 120mgを蒸留水50mlに溶解し、40%塩化第二鉄溶液1.4mlを加えた溶液)に入れ、室温で一晩浸漬した[10, 18]。染色した切片は水洗せず100%エタノールにて脱水し、キシレンで透徹した後HSR液を用いてカバーガラスで封入した。

## 3) 写真撮影法

染色した切片は写真撮影装置(DP25, オリパス)を装着した光学顕微鏡(BH-2, オリパス)で撮影し、比較検討した。

## 結 果

### 1. ヘマトキシリン・エオジン(hematoxyline-eosine: HE)染色

蝶形後頭軟骨結合は下垂体の腹側、咽頭の背側に位置していた(図1)。正常マウスの蝶形後頭軟骨結合の中央部には軟骨の静止細胞層があり、そこから吻側および尾側の両側に向かって軟骨を形成する層状構造が形成されていた(図1, 2)。蝶形後頭軟骨結合の外側面は線維結合性の膜(軟骨膜)に被われ、同膜は骨化部位では骨膜に移行していた。髓腔に散在する骨梁は完全には骨化しておらず、部分的に軟骨が残っていた。髓腔は造血組織を構成する細胞群

と血管によって満たされていた。咽頭の背側には純粘液腺である口蓋腺が分布していた。また、蝶形後頭軟骨結合の腹側には咽頭を形成する筋群(横紋骨格筋)が付着していた(図1, 2)。

正常マウスの蝶形後頭軟骨結合の強拡大像を観察すると、蝶形後頭軟骨結合の中央から両側に向かって静止細胞層、増殖細胞層、肥大細胞層、石灰化層の4層を区別することができた(図3)。静止細胞層には、軟骨小腔の中に入った中等度の大きさの卵円形または球形の軟骨細胞が散在していた。増殖細胞層では、扁平な軟骨細胞が吻尾側方向に重なって柱状配列をなし、軟骨小柱を形成していた。肥大細胞層では、軟骨小腔内に膨大化した核をもつ大型の軟骨細胞が存在し、一部では破骨細胞の侵食によって新たな髓腔が形成され、さらに骨芽細胞によって骨新生が行われる、いわゆる軟骨内骨化の様相を呈していた(図2, 3)。

短肢症マウスの蝶形後頭軟骨結合は、正常マウスと同様に下垂体の腹側、咽頭の背側に位置していたが、その形状はまったく異なっていた(図4)。短肢症マウスの蝶形後頭軟骨結合は、腹側に肥大し、一部に静止軟骨細胞と増殖軟骨細胞が混在している様相を示す軟骨塊が少量存在したが、軟骨組織は全体的に骨化が進んでいた。蝶形後頭軟骨結合を被う結合組織性の被膜下も骨化が進み、蝶形骨と後頭骨が骨性の連結をしていた(図5)。また、一部では蝶形骨の髓腔と後頭骨の髓腔が蝶形軟骨結合を貫いて連結していた。

短肢症マウスの蝶形後頭軟骨結合の強拡大像を観察すると、正常マウスの同軟骨結合で観察された層状構造は全く見られず、大部分の軟骨基質では小型の軟骨細胞散在していただけであった(図6)。軟骨組織塊の中には、破骨細胞の侵食による髓腔がいたるところに形成さ

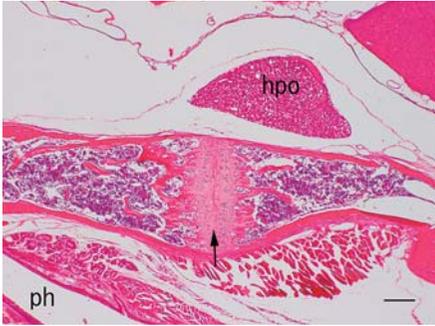


図1 正常マウス (BALB/c-bm/+), HE 染色  
( $\times 10$ : Bar = 200 $\mu\text{m}$ )  
hpo:下垂体hypophysis, ph:咽頭pharynx, 矢印:  
蝶形後頭軟骨結合

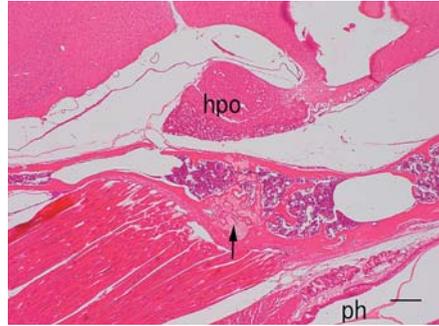


図4 短肢症マウス (BALB/c-bm/bm), HE 染色  
( $\times 10$ : Bar = 200 $\mu\text{m}$ )  
hpo:下垂体hypophysis, ph:咽頭pharynx, 矢印:  
蝶形後頭軟骨結合



図2 正常マウス (BALB/c-bm/+), HE 染色  
( $\times 25$ : Bar = 100 $\mu\text{m}$ )  
\*: 蝶形後頭結合の中央部 (静止細胞層)

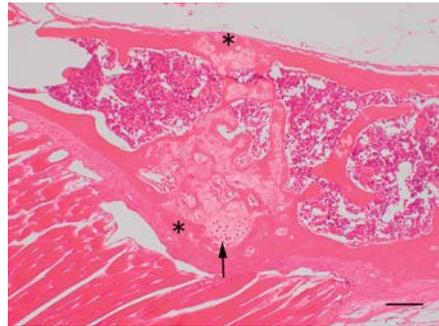


図5 短肢症マウス (BALB/c-bm/bm), HE 染色  
( $\times 25$ : Bar = 100 $\mu\text{m}$ )  
矢印: 軟骨細胞塊 (静止細胞+増殖細胞), \*: 骨化部位

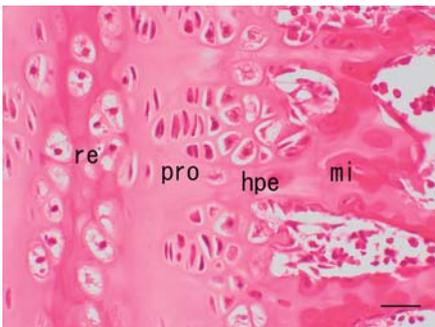


図3 正常マウス (BALB/c-bm/+), HE 染色  
( $\times 100$ : Bar = 20 $\mu\text{m}$ )  
re: 静止細胞層resting cell layer, pro: 増殖細胞層proliferating cell layer, hpe: 過形成細胞層hypertrophic cell layer, mi: 石灰化層mineralization layer

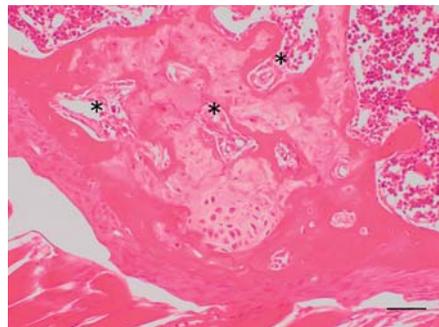


図6 短肢症マウス (BALB/c-bm/bm), HE 染色  
( $\times 50$ : Bar = 50 $\mu\text{m}$ )  
\*: 軟骨に侵入した血管。破骨細胞と骨芽細胞が存在する。

れ、髄腔の表面を骨芽細胞が被っていた。

## 2. 高鉄ジアミン (high iron diamine: HID) 染色

正常マウスでは、蝶形後頭軟骨結合の軟骨基質がHID染色により種々の程度の染色性を示して黒紫色に染まった。また、骨梁中に散在する骨化していない軟骨基質も、同様に陽性反応を示した (図7)。さらに咽頭粘膜の固有層、粘膜下層および筋層中に散在する肥満細胞の細胞質が強陽性に、また口蓋腺の一部の分泌物が弱ないし強陽性の黒紫色の反応を示した。

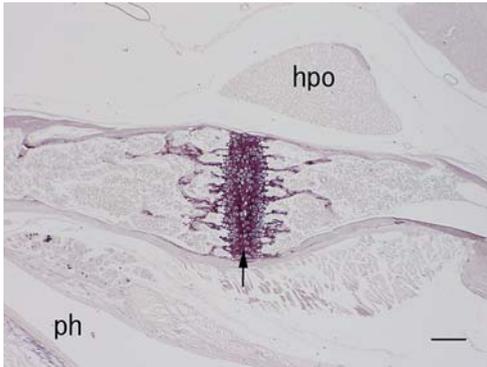


図7 正常マウス (BALB/c-bm/+), HID 染色 (×10 : Bar = 200 $\mu$ m)  
hpo:下垂体 hypophysis, ph:咽頭 pharynx, 矢印:蝶形後頭軟骨結合

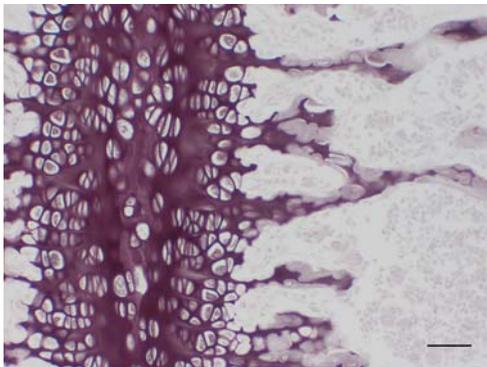


図8 正常マウス (BALB/c-bm/+), HID 染色 (×50 : Bar = 50 $\mu$ m)

蝶形後頭軟骨結合の強拡大像を観察すると、軟骨の領域間基質が中等度の陽性反応を示し、軟骨細胞周辺基質が強陽性反応を示していた (図8)。

HID染色した短肢症マウスの蝶形後頭軟骨結合を観察すると、骨化途中の蝶形後頭軟骨結合部の軟骨基質が黒紫色の中等度ないし強陽性反応を示した。咽頭粘膜の固有層、粘膜下層および筋層中に散在する肥満細胞の細胞質は中等度ないし強陽性に、また口蓋腺の一部の分泌物は弱ないし強陽性の黒紫色の反応を示した (図9, 10)。

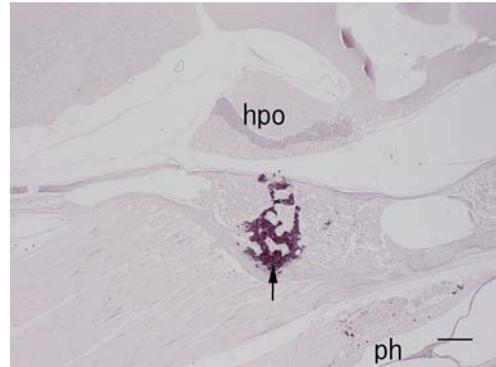


図9 短肢症マウス (BALB/c-bm/bm), HID 染色 (×10 : Bar = 200 $\mu$ m)  
hpo:下垂体 hypophysis, ph:咽頭 pharynx, 矢印:蝶形後頭軟骨結合

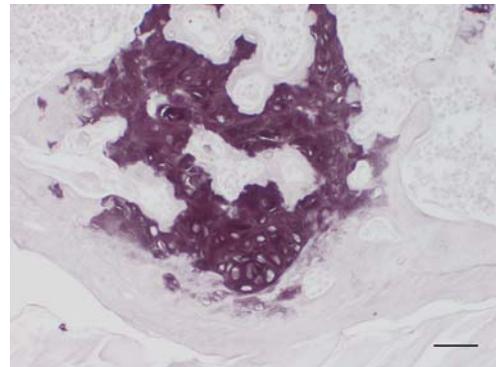


図10 短肢症マウス (BALB/c-bm/bm), HID 染色 (×50 : Bar = 50 $\mu$ m)

## 考 察

蝶形後頭軟骨結合は頭蓋底の発育に非常に重要な部位である[23]。蝶形後頭軟骨結合は頭蓋底における成長部位の一つであり、中心部から吻側および尾側の両方に向かって2組の成長軟骨が存在し、この部位の軟骨の増殖とそれに続く軟骨内骨化によって頭蓋底の長軸方向の成長が促される。

一般に成長軟骨は、静止細胞層、増殖細胞層、肥大細胞層および石灰化層の4層を区別する[13, 19, 21]。軟骨膜に存在する扁平な未分化間葉細胞が軟骨細胞に分化して軟骨基質に埋没すると静止軟骨細胞となる。静止軟骨細胞は増殖軟骨細胞となると、やや扁平となり長軸方向に柱状に配列し、軟骨性カラムを形成する。増殖軟骨細胞はしだいに増大・肥大化し肥大軟骨細胞となる。肥大軟骨細胞は、石灰化に先立ちマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-1やMMP-3)の分泌を行い、軟骨基質の分解にも関与する。さらに肥大軟骨細胞は、血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)を分泌して内皮細胞を誘導する。この誘導によって血管内皮細胞と周囲細胞が軟骨内に侵入し、周囲の未分化間葉細胞が骨芽細胞に分化して、石灰化した軟骨基質上に骨基質が形成され、一次骨梁ができる[9, 14, 15]。

正常マウスでは、蝶形後頭軟骨結合は中心部の静止細胞層から両側に向かって、増殖細胞層、肥大細胞層、石灰化層、一次骨梁の順に層状構造を形成していたが、bm遺伝子ホモ接合体による短肢症マウスでは、これらの層構造は全く見られなかった。また、短肢症マウスの蝶形後頭軟骨結合には多数の血管が侵入し、いたるところですでに骨化が始まっていた。

短肢症マウスの四肢の成長軟骨に関するこれ

までの研究によれば[19, 21]、短肢症マウスでは増殖細胞層が薄く、増殖細胞層から肥大細胞層への移行部(成熟軟骨細胞層)が欠損し、肥大細胞層や石灰化層も薄層化して正常マウスよりも厚さが約20%減少していること、増殖細胞層の軟骨細胞の細胞周期も正常マウスの約半分のものであることなどが報告されている。短肢症マウスの蝶形後頭軟骨結合においても、同様の現象が生じていると考えられ、骨化の速度よりも軟骨の形成の速度が遅いため、6週齢ですでに蝶形後頭軟骨結合が骨化して頭蓋底の成長が停止したものと考えられた。

高鉄ジアミン(HID)染色の結果によれば、正常マウスと比較して短肢症マウスの軟骨基質のHID染色性がわずかに減弱していた。軟骨基質を構成するプロテオグリカンやコラーゲン線維の異常は軟骨形成不全の原因となりうるが[3, 11, 17]、本研究ではHID染色による硫酸基の検出を行っているのみで[10, 18]、正常ならびに短肢症マウス間の蝶形後頭軟骨結合の軟骨基質の組成、特にプロテオグリカンの質的量的差違について詳細な検討は行っていない。本研究における正常ならびに短肢症マウスの蝶形後頭軟骨結合を構成する軟骨基質の性状を解明するためには、プロテオグリカンを構成するコアプロテインやグリコサミノグリカン分子種のさらなる同定が必要となると考える。

本研究の結果から、bm遺伝子ホモ接合体による短肢症マウスの頭蓋の長径(前後長)の短縮は、蝶形後頭軟骨結合における成長軟骨の低形成による早期の骨化による軟骨閉鎖が原因であると解された。

なお、本研究は2009年度名古屋学院大学研究奨励金の成果の一部である。

文 献

- [1] 藤森修, 赤木充宏, 平林義章 (2011) 切歯交差咬合を発症する短肢症マウス頭蓋骨の骨計測に関する研究. 名古屋学院大学論集 (人文・自然科学編) 47: 31-45
- [2] Greene RM, Brown KS, Pratt RM (1978) Autoradiographic analysis of altered glycosaminoglycan synthesis in the epiphyseal cartilage of neonatal brachymorphic mice. *Anat Rec* 191: 19-30
- [3] Hagiwara H, Aoki T, Yoshimi T (1995) Immunoelectron microscopic analysis of chondroitin sulfates during calcification in the rat growth plate cartilage. *Histochemistry* 103: 213-220
- [4] Hirabayashi Y, Fujimori O, Shimizu S (2003) Bruch's membrane of the brachymorphic mouse. *Med Electron Microsc* 36: 139-146
- [5] Kajii TS, Sugawara Y, Hirabayashi Y, Fujimori O, Sato Y, Iida J (2004) Brachymorphic mice induced by the bm gene exhibit crossbites. *Dentistry in Japan* 40: 76-79
- [6] Kajii TS, Hirabayashi Y, Fujimori O, Tsukamoto Y, Oonshi Y, Sugawara Y, Iida J (2006) Histological and biochemical evaluation of temporomandibular joints of BALBC/c-bm/bm mouse that spontaneously induces anterior transverse crossbite. *Dentistry in Japan* 42: 187-190
- [7] Kurima K, Warman ML, Krishnan S, Komowicz M, Krueger-JR RC, Deyrup AD, Schwartz NB (1998) A member of a family of sulfate-activating enzymes causes murine brachymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8681-8685
- [8] Lane P, Dickie M (1968) Three recessive mutations producing disproportionate dwarfing in mice. *J Hered* 59: 300-308
- [9] Lei WY, Wong RW, Rabie AB (2008) Factors regulating endochondral ossification in the spheno-occipital synchondrosis. *Angle Orthod* 78: 215-220
- [10] Lev R, Spicer SS (1965) A histochemical comparison of human epithelial mucins in normal and in hypersecretory states including pancreatic cystic fibrosis. *Am J Pathol* 46: 23-47
- [11] Mizoguchi I, Nakamura M, Takahashi I, Kagayama M, Mitani H (1990) An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. *Histochemistry* 93: 593-599
- [12] 永井教之, 赤木巧 (1991) 第二章 動物実験材料 (石灰化組織, 骨, 歯牙) の電顕標本作製法. 永井教之編. 骨・歯牙組織の病理検査法と研究技術の実際. 学際企画, 東京, pp. 29-52
- [13] Orkin RW, Williams BR, Cranley RE, Poppke DC, Brown KS (1977) Defects in the cartilaginous growth plate of brachymorphic mice. *J Cell Biol* 73: 287-299
- [14] 小沢英浩, 中村浩彰 (2007) 第2章 硬組織の構造. 須田立雄, 小沢英浩, 高橋榮明, 田中栄, 中村浩彰, 森録史編著. 新骨の科学. 医歯薬出版, 東京, pp. 27-38
- [15] 小沢英浩, 中村浩彰 (2007) 基質小胞学説. 第6章 石灰化の機構. 須田立雄, 小沢英浩, 高橋榮明, 田中栄, 中村浩彰, 森録史編著. 新骨の科学. 医歯薬出版, 東京, pp. 165-174
- [16] 佐野豊 (2003) 第6章 一般染色法. 組織学研究法. 南山堂, 東京, pp. 177-246
- [17] Schwartz NB, Domowicz M (2002) Chondrodysplasias due to proteoglycan defects. *Glycobiology* 12: 57R-66R
- [18] Spicer SS (1965) Diamine methods for differentiating muco-substance histochemically. *J Histochem Cytochem* 13: 211-234
- [19] Vanky P, Brochstedt U, Nurminen M,

- Wikstrom B, Huerpe A (2000) Growth parameters in the epiphyseal cartilage of brachymorphic (bm/bm) mice. *Calcif Tissue Int* 66: 355-362
- [20] Wezeman FH, Bollnow MR (1997) Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-2 in normal and brachymorphic mouse tibial growth plate and articular cartilage. *Histochem J* 29: 505-514
- [21] Wikstrom B, Gay R, Gay S, Hjerpe A, Mengarelli S, Reinholt FP, Engfeldt B (1984) Morphological studies of the epiphyseal growth zone in the brachymorphic (bm/bm) mouse. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 47: 167-176
- [22] Yamada K, Shimizu S, Brown KS, Kimata K (1984) The histochemistry of complex carbohydrates in certain organs of homozygous brachymorphic (bm/bm) mice. *Histochem J* 16: 587-599
- [23] Young B, Minugh-Purvis N, ShimoT, St-Jacques B, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E, Pacifici M (2006) Indian and sonic hedgehogs regulates synchondrosis growth plate and cranial base development and function. *Dev Biol* 299: 272-282

# Histological Studies on the Ossification in Spheno-Occipital Synchrondrosis in the Brachymorphic Mice

Osamu Fujimori<sup>1</sup>, Yoshifuji Hirabayashi<sup>2</sup>

## Summary

Brachymorphic mice are characterized by disproportionally short limbs and trunks, and short and thick tail. It has been known that this disorder is induced by the erssive autozomal gene, *bm* gene. In the homozygote of *bm* gene, the point mutation of the sulfate groups convert enzymes in the sulfation pass way is induced. Therefore, *bm* gene sets up the undersulfation in many tissues, resulting chondrodystrophia in cartilage tissues especially. The mice in approximately 3–5% of this strain are spontaneously with anterior transverse malocclusion. In the previous study, it has been reported that the total length of craniofacial complex is shortened in the brachymorphic mice with malocclusion. For the basic data to clarify the developmental process of the malocclusion, attempts have been made to investigates hisitologically the formation of spheno-occipital synchrondrosis. In the spheno-occipital synchrondrosis of the normal mice, chondrocytes were regularly arranged in a parallel to long axis of basis crania. Whereas, the spheno-occipital synchrondrosis in brachymorphic mice was ossified partially, and the regular arrangement of chondrocytes were not observed. This finding indicated that the growth of basis crania in brachymorphic mice was obstructed by the chondrodystrophia in spheno-occipital synchrondrosis and the growth of craniofacial complex was already stopped in the age of 6 weeks.

Keywords : brachymorphic mouse, malocclusion, basis crania, chondrodystrophia, histology

- 
- 1 Nagoya Gakuin University, Faculty of Rehabilitation Science, Laboratory of Anatomy and Histochemistry
  - 2 Nagoya Bunri University, Faculty of Health and Human Life, Department of Health and Nutrition