

## マウス矢状縫合部直下に出現する 軟骨組織の消失に関する組織学的研究

齊藤 英朗

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座

(主任：名和 橙黄雄 教授)

(受付：1999年12月13日)

(受理：1999年12月21日)

**Abstract** : In the present study, the histogenesis and fate of the tectum cartilage appearing under the sagittal suture from day 16 of embryonic gestation to 15-day-old mice were examined histochemically and immunohistochemically. Cartilage tissues were persistent as alcian blue-positive cartilaginous aggregates under the posterior fontanel and sagittal suture from 17 days embryonic development until day 9 after birth. The size of these cartilage specimens reached a maximum at 6 days old and disappeared by 10 days old accompanying sutural ossification. Connective tissues, including the perichondrium of the tectum cartilages, and calvarial bone were immunopositive for type I collagen, whereas the cartilage matrix was a typical hyaline cartilage showing positive features for anti-type II collagen antibody during the degeneration of the cartilage. The tectum cartilage at 6 days old was comprised of hypertrophic chondrocytes showing immunoreactivity for type X collagen, and it was confirmed by BrdU-incorporation that these hypertrophic cells had no mitotic capacity. Apoptotic cells were not detected in the hypertrophic chondrocytes during the degenerating stage at 9 days old. TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) -positive cells and macrophages showing resorption of cartilage matrix and cellular debris were not observed in the degenerating tectum cartilage. Immunoreactivity for MMP-1 (matrix metalloproteinase), indicating the existence of collagenase, was visualized in the cartilage matrix.

These results suggested that tectum cartilage retained features of hyaline cartilage, and its disappearance may be induced by matrix degradation with collagenase.

**Key Words** : tectum cartilage, sagittal suture, immunohistochemistry, chondrocyte, MMP-1

### 緒 言

哺乳類の頭蓋は脳や感覚器を保護する神経頭蓋と、神経堤から分化し、顔面骨格の形成にあたる内臓頭蓋とによって構成され、神経頭蓋は膜性神経頭蓋と軟骨性神経頭蓋とに分けられ、それぞれ骨は二つの骨化様式を経て完成され

る。膜性神経頭蓋を構成する前頭骨、頭頂骨、側頭骨、後頭骨のような扁平骨によって代表される骨は、脳を覆う頭蓋冠として膜性骨化様式を経て形成されることが知られている<sup>1-4)</sup>。一方、軟骨性頭蓋を構成する後頭骨基底軟骨、側頭骨岩様部軟骨、眼窩軟骨、鼻軟骨などは最初に将来の骨の鋳型となる部分に間葉細胞が密

Histological studies of cartilage appearing under the sagittal suture.

Hideaki SAITO

(The Second Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University.

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate, 020-8505 Japan)

集して硝子軟骨が形成される。その後、軟骨組織内に侵入する血管と骨芽細胞の出現により軟骨基質が骨へと置換される軟骨性骨化によって形成される<sup>1~4)</sup>。両者は発生様式が明瞭に異なるため、ニワトリで報告されているような軟骨様骨 chondroid-bone<sup>5)</sup> 以外、両骨化様式が混在することはないとされている。ところが、Gaupp<sup>6)</sup> がカエルの頭蓋に軟骨組織が出現することを初めて見だし、その軟骨を synotic tectum と名付けた。de Beer<sup>7)</sup> は膜性骨化様式を経る後頭骨と頭頂骨の間の、いわゆるラムダ縫合部に側壁から頭頂に向かって伸びる細い帯状の軟骨組織を観察し、この軟骨と先の Gaupp によって命名された軟骨の両者を合わせて synotic tectum と呼んでいる。ヒトを含む哺乳類の膜性骨化領域に発生する軟骨組織には3つの synoticum tectum が知られており、前方端より tectum transversum, tectum synoticum anterior, tectum synoticum posterior と名付けられている。これらの軟骨性組織は哺乳類においては後頭骨と頭頂骨の間に一時的に発生するが、その後まもなく消失する極めて存在期間の短い軟骨組織とされている<sup>8)</sup>。

マウス頭蓋冠では、tectum synoticum anterior の正中部分が矢状縫合部方向に延びて比較的大きな軟骨塊である tectum cartilage (天蓋軟骨) を形成し、この軟骨組織がほぼ恒常的に出現する<sup>9)</sup>。新飯田<sup>9)</sup> はマウスの tectum synoticum posterior と tectum synoticum anterior はアルシアンブルー陽性の性質を有し、胎生17日から生後9日までの期間存在すると報告している。しかしながら、今までのところこの tectum cartilage の性質と、消失機構についての詳細な報告はみられない。最近、Harada and Ishizeki<sup>10)</sup> は顎骨の支持体として形成されるメッケル軟骨の消失過程について報告しているが、tectum cartilage についての報告は乏しく、その性質や運命についてはほとんど解明されていない。

そこで本研究では、矢状縫合部直下に出現する tectum cartilage の出現から消失までの一

連の組織発生過程を、組織学および免疫組織化学的に検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

生後8週齢の雌雄 ddY 系マウス (船橋農場・仙台) を購入後、岩手医科大学歯学部動物舎にて一定の環境下 (温度  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $55\% \pm 5\%$ ) で飼育、繁殖させた。飼育期間中、動物には繁殖用固形飼料 (オリエンタル酵母, 東京) と水を自由に摂取させた。繁殖には朝9時から正午まで3時間交配させ、膣栓の確認をもって妊娠0日とした。実験には胎生16日から生後15日齢のマウス頭蓋を使用した。

### 2. 透明標本

妊娠16日から19日までの胎仔マウスは頸椎脱臼にて屠殺し、生後0日から15日齢までの新生仔はエーテル麻醉下にて断頭した。軟組織と脳組織を除去した頭蓋冠は、0.01M 磷酸緩衝液 (PBS) で洗浄した後、alcian blue 8GX10mg, 酢酸20ml, 95%エタノール80mlより成る混合液で2日間軟骨染色を行った。染色後、アルコール系列でアルシアンブルーの分別と脱色を行い、0.1%水酸化カリウム溶液で余分な軟組織を除去した。その後、グリセリンに封入して透明標本観察に供した。

### 3. パラフィン標本

エーテル麻醉下にて妊娠16日から19日齢のマウスより摘出した胎仔頭蓋は、4%パラホルムアルデヒドあるいは酢酸エタノールにて7日間浸漬固定した。生後0日から15日齢のマウスはエーテル麻醉を施し、左心室よりPBSにて瀉血後、上記のいずれかの固定液を用いて灌流した。摘出した頭蓋冠は7日間それぞれの上記固定液にて浸漬固定を施した。固定終了後、各々の標本は10%EDTA溶液で7日から10日間脱灰後、通法に従ってパラフィン包埋した。前頭断切片 (6  $\mu\text{m}$ ) はシラン処理を施したスライドガラスに貼付し、一部の標本はヘマトキシリン染色にて光顕下で観察した。

### 4. 免疫組織化学

(1) タイプ I, II, X コラーゲンに対する免疫染色

パラフィン切片は通法に従い脱パラフィン後、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノール液で15分間処理して、内在性パーオキシダーゼの活性を阻止した。希釈正常ヤギ血清にて30分間処理した後、0.2% ウシ血清含有 PBS で希釈した一次抗体 (×100, 抗タイプ I コラーゲン抗体; ×200, 抗タイプ II コラーゲン抗体; ×100, 抗タイプ X コラーゲン抗体; LSL, 東京) で37°C 2時間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として HRP-抗ウサギ IgG にて37°C で60分間反応させた。PBS で洗浄後、0.03% diaminobenzidine (DAB) で発色させ、希釈ヘマトキシリン液で染色し、グリセリンに封入した。

(2) BrdU による細胞分裂活性の観察

生後 1 日, 8 日齢のマウスに Bromodeoxyuridine (BrdU) 50mg/kg を腹腔内に注射して、1 時間後と 12 時間後にそれぞれエーテル麻酔下にて酢酸エタノールで灌流固定を行い、通法に従いパラフィン包埋した。染色には Oncogene Research Products 社の BrdU Staining Kit (CARBIOCHEM, Cambridge, MA., U. S. A.) を用いた。標本は 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノール液にて 10 分間内在性パーオキシダーゼの活性を阻止した後、denaturing solution で 10 分、希釈正常ヤギ血清で 10 分間処理した。一次抗体としてビオチン化抗マウス BrdU 抗体を用いて室温で 60 分間反応し、PBS で洗浄後、streptavidin-peroxidase で 10 分間反応させた。その後、標本は DAB で発色させて、グリセリンで封入した。

(3) マクロファージの検索

生後 8 日ないし 9 日齢のマウスを用いてマクロファージによる変性期軟骨組織の分解について検索した。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノール液にて内在性パーオキシダーゼ活性を阻止した後、抗マクロファージ抗体 (×50, Inter-Cell Technologies, Hopewell, NJ., U. S. A.) を用いて 37°C で 90 分間反応させた。PBS で洗浄後、HRP-抗ウサギ IgG 抗体を用い、37°C で 1 時間

反応させた。標本は PBS で洗浄後、DAB 液で発色、希釈ヘマトキシリン液にて核染色を施しグリセリンに封入した。

(4) 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色

本軟骨が破骨細胞 (破軟骨細胞) によって吸収されるか否かを、生後 8 日と 9 日齢のマウスを用いて検索した。標本は 50mM 酒石酸を含む 0.1M 酢酸緩衝液で 10 分間処理した。その後 Wijngaert と Burger<sup>11)</sup> による反応液で 37°C, 30 分間反応させた。標本は蒸留水で洗浄して、グリセリンで封入後、光顕にて観察した。

(5) アポトーシスの検索

軟骨細胞の消失がアポトーシスによるものか否かを TUNEL 法<sup>12)</sup> によって検討した。生後 9 日と 10 日目の標本から得られた切片は、反応に先駆け 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノール液で 10 分間内在性パーオキシダーゼの活性を阻害した。標本は 0.1% Tween 20 (関東化学) を含む PBS (PBS-T) で洗浄後、TdT buffer で 100unit/ml TdT と 10 nmol/ml biotinylated 16-2'-dUTP から成る反応液で 37°C で 1 時間反応させた。その後、標本を PBS-T で洗浄して、streptavidin-peroxidase を用いて室温で 20 分反応させ、DAB 液にて呈色反応後、光顕で観察した。

(6) matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) に対する免疫染色

生後 8 日と 9 日齢のマウスを用いて、軟骨細胞におけるコラーゲナーゼの分泌を検討した。各々の切片は脱パラフィンした後、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノール液にて内在性パーオキシダーゼの阻止後、抗マウスポリクローナル MMP-1 抗体 (×20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U. S. A.) を用いて 37°C で 90 分間反応させた。その後、二次抗体に 200 倍希釈した HRP-抗ウサギ IgG 抗体を用いて、酵素抗体法を施した。標本は DAB 基質液で 10 分間発色後、希釈ヘマトキシリン液で核染色を施した。

## 実験結果

透明標本で観察すると、両側の側頭骨後縁か

ら後頭骨にかけてアルシアンブルーに染まる板状の軟骨組織が認められた。軟骨の一部はラムダ縫合に沿って小泉門部まで棒状に伸展し、生後2日になるとその一部は矢状縫合に沿って前方に伸展していたが大泉門に達することはなかった (Fig. 1)。その後、矢状縫合部軟骨は多少は増大したものの、生後6日頃になるとラムダ縫合部軟骨の消失に伴って矢状縫合部に孤立して認められた (Fig. 2)。

ヘマトキシリン・エオジン標本で観察すると、胎生17日頃には矢状縫合部に明瞭な平板状の軟骨組織が認められた。この時期にはまだ矢状縫合には骨組織の伸展は認められなかった (Fig. 3)。生後8日の標本では軟骨組織は肥大軟骨様組織となり、縫合部には骨組織の伸展が認められるようになったが、この時期にはまだ縫合部の骨癒合は完成していなかった (Fig. 4)。

出生直後の標本におけるタイプIコラーゲンに対する免疫染色では、軟骨組織は陰性で、軟骨膜が弱陽性であったが、結合組織には強い陽性反応が認められた (Fig. 5)。生後3日齢の板状の軟骨組織にはタイプIIコラーゲン抗体を用いた免疫染色で明瞭な陽性反応が認められた (Fig. 6)。骨組織に弱い反応が見られたが、周囲の結合組織には反応は見られず、軟骨組織の反応活性は消失まで維持されていた。タイプXコラーゲンによる免疫染色では、生後6日以降の軟骨基質に陽性反応が出現し、経日的に反応は基質辺縁部から中心部にまで進み生後8日以降になると軟骨基質全体に陽性反応が観察されるようになった (Fig. 7)。

BrdU投与により軟骨細胞のDNA合成能について検討した。生後1日齢マウスの場合には矢状縫合部直下の間葉細胞と形成中の頭頂骨辺縁部の細胞に陽性反応が認められたが (Fig. 8)、軟骨細胞とその辺縁部の細胞には全く反応が認められなかった。生後8日齢マウスにおいても同様の傾向が見られた。

マクロファージに対する免疫染色では、生後9日齢の軟骨膜や軟骨組織には陽性反応がな

く、周囲結合組織中に陽性反応を示す細胞が認められた。しかしながら、陽性反応を示す細胞の出現はわずかであり、その出現数は生後1日から生後9日までほとんど変動が認められなかった (Fig. 9)。

生後9日齢のTRAP染色による破骨細胞 (破軟骨細胞) の検索ではTRAP陽性細胞は伸展する頭頂骨の両端に多数出現した。また、頭頂骨の表層と裏層の両側にも少数ながら陽性細胞が認められたことから、頭頂骨の活発な骨改造が推測されたが、軟骨組織にはTRAP陽性細胞は全く認められなかった (Fig. 10)。

生後8日齢のTUNEL法によるアポトーシス細胞の検索では、矢状縫合部の間葉に陽性反応を示す細胞が多数みられたが、軟骨組織にはアポトーシス陽性細胞は認められなかった (Fig. 11)。

MMP-1に対する免疫染色では、生後9日の軟骨基質全体に強い陽性反応が示されたが、それ以外の組織には全く反応が認められなかった (Fig. 12)。

## 考 察

頭蓋冠は扁平骨によって構成され、それぞれの骨は骨辺縁部の拡張と骨表面の骨添加及び骨吸収の相互作用によって成長する<sup>13)</sup>。頭蓋の縫合部は頭蓋冠の形成の際に、頭蓋骨の拡大、成長を補助するという重要な役割を担っている<sup>14)</sup>。この縫合部が早期癒合を起こすと幼若骨による縫合部の閉鎖と、代償的に影響を受けていない縫合側が成長することにより、頭蓋顔面異形成症となる<sup>15)</sup>。このような縫合の形成の過程でマウスやラットの頭蓋縫合部の閉鎖は、左右前頭骨内板先端に二次軟骨が出現し、この二次軟骨が縫合部の連結を補強する形で存在しながら、軟骨内骨化によって閉鎖すると報告されている<sup>16)</sup>。矢状縫合部の形成過程では、左右頭頂骨間には前頭縫合に見られる軟骨組織は存在せず、最終的に矢状縫合は線維性の結合によって閉鎖する<sup>13, 17, 18)</sup>。本研究対象である tectum cartilage はこの矢状縫合部の直下に存在して

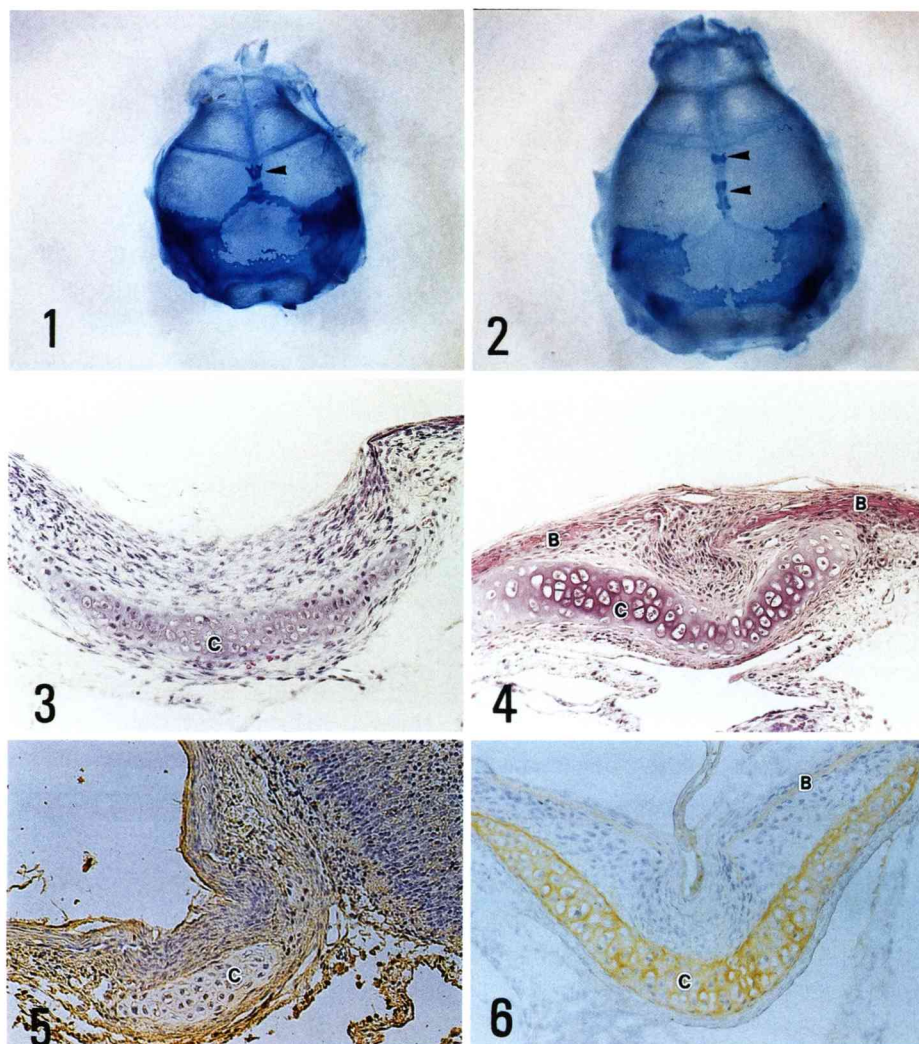


Fig. 1. Preparation stained with alcian blue at 2 days old. Arrowhead indicates the tectorial cartilage beneath the sagittal suture.

Fig. 2. Preparation stained with alcian blue at 6 days old. Arrowheads show the cartilage isolated from the continuation of the lambdoid suture.

Fig. 3. Hematoxylin and eosin stained frontal section at day 17 of embryonic gestation. The cartilage was deposited beneath the sagittal suture. The two sides of the parietal bone formation did not reach in the center of the sagittal suture at this stage.

Fig. 4. Hematoxylin and eosin stained frontal section at 8 days old. Formation of the right and left parietal bone was seen within the fibrous sagittal suture. V-shaped cartilage which developed at the hypertrophic stage was arranged beneath of the sagittal suture.

Fig. 5. Immunohistochemical localization for type I collagen in the neonate. Positive immunoreactivity was noted in the connective tissue surrounding the cartilage. There was immunoreactivity detected in the cartilage.

Fig. 6. Immunolocalization for type II collagen at 3 days old showing the cartilage matrix with intense staining.



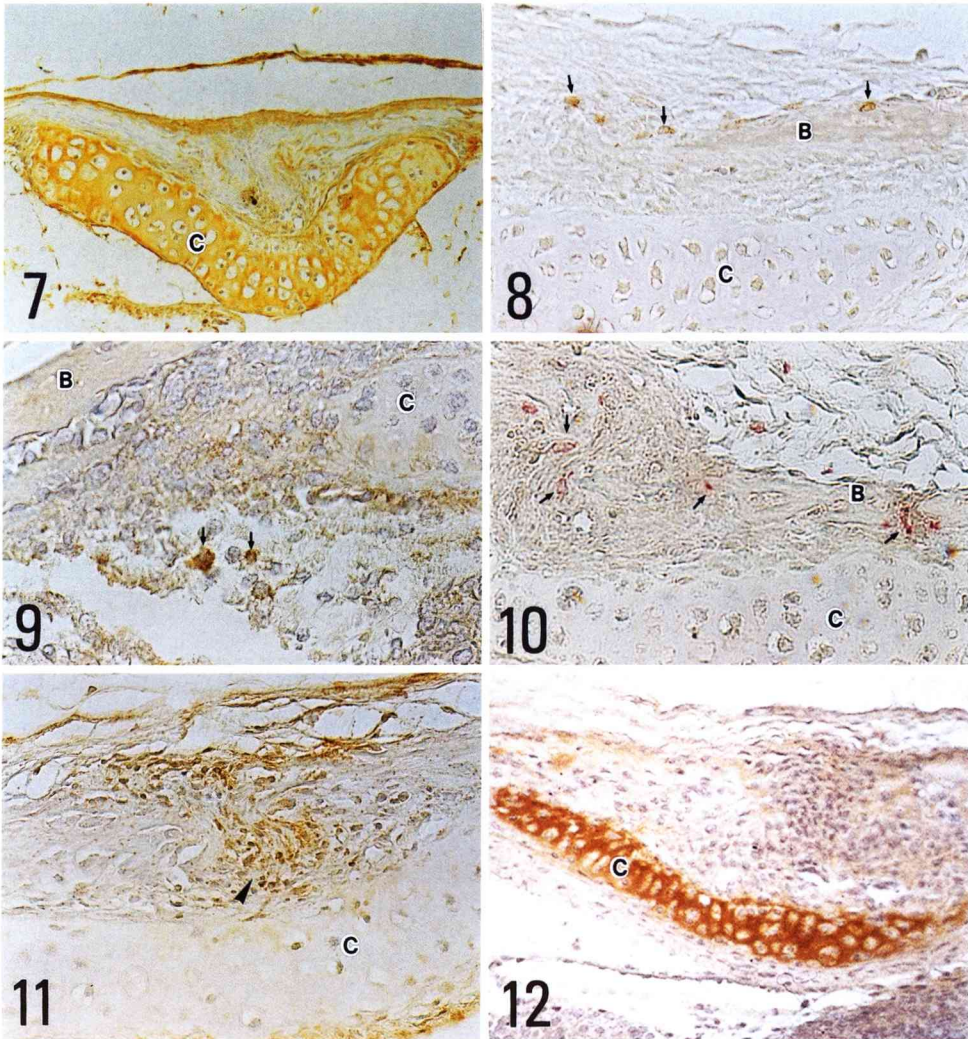


Fig. 7. Immunolocalization for type X collagen at 8 days old. The collagen matrix showed intense staining.

Fig. 8. DNA synthesis visualized by the BrdU method was seen in the same cells on the outer side of the parietal bone at 1 day old. Arrows show BrdU positive cells.

Fig. 9. Immunodetection for macrophage at 9 days old. A few cells that localized in connective tissue surrounding the cartilage showed positive reaction. Arrows indicate the macrophage positive cells.

Fig. 10. TRAP staining for osteoclasts at 9 days old. The positive osteoclasts for TRAP staining were localized in the sagittal suture portion and the surface of parietal bone. Arrows show TRAP positive cells.

Fig. 11. Apoptotic cells recognized by the TUNEL method at 8 days old. The apoptotic- positive reaction concentrated on the fibroblasts (arrowhead) at the center of sagittal suture.

Fig. 12. Immunolocalization for MMP-1 at 9 days old showing the cartilage matrix with intense staining.

All preparations were from frontal sections.

Abbreviation

B : parietal bone, C : tectorial cartilage

いた。このように前頭縫合の場合は、骨間に二次軟骨が出現して軟骨内骨化によって積極的に縫合結合に参加しているが、矢状縫合の場合はその直下に出現する tectum cartilage が縫合部閉鎖に直接関与するという報告はみられない。

この tectum cartilage は、胎生17日にラムダ状の tectum synoticum anterior から矢状縫合部への伸展部として認められるようになるが、この時期には側頭骨はまだ矢状縫合部には伸展していない<sup>19)</sup>。祐川ら<sup>18)</sup>は、tectum cartilage の肥大化と消失の時期に一致して、両側の頭頂骨が矢状縫合部に接近し、同時に矢状縫合部に膠原線維形成と間葉の凝集が起こり、この間葉の凝集が矢状縫合形成の原基となると報告している。この縫合部形成に tectum cartilage は直接参加することなく消失する運命にある。

この tectum cartilage の性質と消失過程を研究するために免疫組織化学的検索を試みた。

タイプ I コラーゲン<sup>20)</sup>に対する免疫染色では tectum cartilage は陰性で、軟骨膜と周囲の結合組織が陽性反応を示した。またタイプ II コラーゲン<sup>20)</sup>に対する免疫染色では tectum cartilage の基質のみに陽性反応を示したことから、本軟骨は一般的な硝子軟骨と同様の性質を保持していることが確認された。さらに肥大化した生後 8 日の tectum cartilage を抗タイプ X コラーゲン<sup>20)</sup>抗体で免疫染色したところ、軟骨基質全体に陽性反応が認められた。これらの結果から本硝子軟骨は肥大軟骨細胞にまで分化することが明らかになった。軟骨成熟の過程と軟骨内骨化の過程には軟骨の肥大化は重要であり、軟骨内骨化を誘導する肥大軟骨細胞はタイプ X コラーゲンを分泌し、タイプ X コラーゲンは骨化に重要な働きをしていると報告されている<sup>15, 21)</sup>。一般的に、軟骨内骨化であれば肥大軟骨形成後に石灰化基質を形成し、血管の侵入を経て骨が形成されるが、tectum cartilage は肥大軟骨以降にはそのような現象が見られず、生後13日目にかけて消失する運命にあった。

この消失過程を確かめるために以下の検討を

行った。はじめに、軟骨細胞の分裂活性をみるために、生後 1 日と 8 日齢のマウスで BrdU<sup>22)</sup> に対する免疫染色を行って観察した。いずれの場合も、軟骨細胞は陰性反応を示し、伸展する頭頂骨の骨芽細胞に若干の陽性反応が認められた。したがって、本軟骨組織は生後まもない段階ですでに細胞分裂活性を失っており、軟骨細胞はすでに成熟期に達していることを示していた。次にマクロファージに対する抗体を用いた観察では、軟骨周囲の間葉細胞に若干の陽性細胞がみられるのみで、軟骨組織に隣接する部位には陽性細胞の存在は確認できなかった。このことからマクロファージ陽性細胞が頭頂骨ないし本軟骨組織の軟骨基質の吸収・消失等には直接的に関与している可能性は極めて低いと考えられた。第三に、TRAP 染色<sup>11)</sup>により破骨細胞（破軟骨細胞）を検索した。生後 9 日齢のマウスでは骨改造に関与していると思われる陽性細胞は頭頂骨の辺縁に多数観察されたが、軟骨周囲の細胞には全く反応が認められなかった。この結果から TRAP 陽性細胞は頭頂骨の骨改造には積極的に関与しているが、軟骨基質の消失に直接関与しているという可能性は否定された。それではいかにして tectum cartilage の軟骨細胞が消失するのかをみるために生後 9 日目の標本でアポトーシス<sup>12)</sup>の検索も行った。その結果、軟骨組織内には陽性反応が認められず、矢状縫合部の間葉細胞、頭頂骨辺縁に多数の陽性細胞が観察された。祐川<sup>18)</sup>は左右頭頂骨の骨化伸展により骨間距離が減少するため骨間の細胞が上下に押し上げられて紡錘状に凝集すると報告している。生後 8 日目の標本で矢状縫合部に集中してみられたアポトーシス陽性反応は、祐川の報告による凝集した陽性細胞に集中して起こったと考えられる。tectum cartilage にはほとんどアポトーシスは認められなかった。Harada and Ishizeki<sup>10)</sup> もメッケル軟骨の消失過程でアポトーシスについて検討し、胎生期と生後におけるアポトーシスの出現には有意差がなく、メッケル軟骨の消失にアポトーシスは直接的には関与していないと報告している。次に MMP-

1の発現について検討を試みた。MMP-1 (Matrix metalloproteinase) は細胞外マトリックスの構成タンパク質を分解する酵素で、組織の発生、炎症、創傷治癒、悪性腫瘍の浸潤や転移などに重要な働きをすることが報告されている<sup>23)</sup>。また、MMP-1はI, II, III, Xコラーゲンを分解する基質型コラーゲナーゼで、腫瘍細胞、上皮細胞、線維芽細胞、軟骨細胞などから産生されるといわれている<sup>24)</sup>。抗MMP-1抗体を用いた観察では、生後9日の軟骨基質に強陽性反応が認められた。この結果は、退縮期にある本軟骨組織の基質がコラーゲナーゼにより分解されていくことを強く示唆するものである<sup>25)</sup>。

tectum synoticum は、頭蓋発生初期には軟骨頭蓋から延びた枝が膜性骨化領域である頭蓋冠扁平骨まで達したものである。tectum synoticum は後頭骨、側頭骨、頭頂骨部に出現し、それぞれの骨の骨化中心から離れて出現する。これらの tectum synoticum と呼ばれる軟骨は一部は頭蓋底の軟骨性骨化に組み込まれるが、大部分は短期間に消失する<sup>26,27)</sup>。頭蓋形成過程におけるこれらの軟骨の存在理由としては、発生初期の頭蓋形成の枠取りに関与し、特にラムダ縫合と本研究対象とした tectum cartilage は縫合部の位置誘導能の保持に働いているとも考えられるが、その詳細については不明である。これらの軟骨組織は脳の成長と頭蓋骨の形成に伴って急速に消失し、tectum cartilage のみが比較的遅くまで矢状縫合部に取り残されるものと考えられ、この軟骨が直接骨形成に関与している証拠は得られていない。Harada and Ishizeki<sup>10)</sup> はメッケル軟骨の消失過程について検討した結果、その消失は部位によって異なり、骨貫通部では軟骨組織内に血管が侵入し、TRAP陽性の多核細胞とマクロファージによって軟骨基質が処理されるが、軟組織貫通部では軟骨細胞自身の形質転換によって線維芽細胞様になると報告している。

本研究対象の矢状縫合部直下に出現する tectum cartilage には血管の侵入は認められ

ず、またその消失に TRAP 陽性細胞やマクロファージが関与している証拠は得られなかった。またメッケル軟骨と同様にアポトーシスは、その消失には直接的に関与していないと考えられた<sup>10)</sup>。tectum cartilage はメッケル軟骨と同様にタイプXコラーゲンを発現する肥大軟骨細胞まで分化したが、MMP-1抗体による強い反応が認められた後に消失したことから、最終的には軟骨細胞自身によって分泌されたコラーゲナーゼによって消失の運命をたどるものと結論づけることが出来る。したがって tectum cartilage は、蝶下顎靭帯に変わるメッケル軟骨とは異なった消失過程を経るものと思われる。本研究では tectum cartilage の存在理由を明確にすることは出来なかったが、MMP-1の産生は様々なサイトカインや成長因子などにより調節されており、これらとの関連を更に検討することにより、軟骨の存在理由と消失の運命がより明らかにされていくものと推察される。

## 結 論

マウス矢状縫合部直下に出現する軟骨組織について以下の結論を得た

- 1) tectum cartilage は胎生17日齢より矢状縫合部の直下に出現し、生後14日齢の頭蓋冠の完成と同時に消失していく運命にある。
- 2) tectum cartilage は tectum synoticum anterior から矢状縫合部に向けて伸展した軟骨で、頭蓋の成長に伴って取り残された軟骨組織である。
- 3) tectum cartilage の消失には MMP-1 による基質の分解が強く関与している可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なる指導と校閲を賜った恩師、岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授に深甚なる謝意を表します。また、同口腔解剖学第二講座立花民子助教授、石関清人講師に謹んで感謝の意を表します。さらに本研究に際し数々のご教示、ご助言



を戴いた同口腔解剖学第二講座藤原尚樹助手、  
亀谷琢也助手に厚く謝意を表します。

本論文の要旨は日本解剖学会第44回東北・北海道連合地方会（平成10年9月19日，札幌），同第45回東北・北海道連合地方会（平成11年10月2日，福島）において発表した。

## 文 献

- 1) 伊藤隆：組織学，第18版，南山堂，東京，88-98ページ，1987.
- 2) Slavkin, H. C.; 山田まりえ訳，小澤英浩監訳，頭蓋顎顔面の発生生物学，西村書店，新潟，214-222ページ，1992.
- 3) Ten Cate, A. R.; 平井五郎，矢嶋俊彦，中原皓，三好作一郎，滝口励司，戸田善久，脇田稔，名和橙，黄雄，山本茂久，小野瀬英夫，武田正子，川崎堅三，後藤仁敏訳 Ten Cate 口腔組織学，第3版，医歯薬出版，東京，33-45ページ，1992.
- 4) Sadler, T. W.; 沢野十蔵 訳，人体発生学，第6版，医歯薬出版，東京，130-135ページ，1991.
- 5) Lengél, B., Schowing J., and Dhem A.: Embryonic origin and fate of chondroid tissue and secondary cartilage in the avian skull. *Anat. Rec.* 246 : 377-393, 1996.
- 6) Gaupp, E.: Beitrage zur Morphologie des Shadels. I. Primordia-Cranium und Kieferbogen von *Rana fusca*. *Morph. Arb.* 2 : 275-481, 1951.
- 7) de Beer, G. R.: The development of the vertebrate skull; The roof of the chondrocranium. *University Chicago Press London* pp. 392-394, 1937.
- 8) Jarvik, E.: Basic structure and evolution of vertebrates Vol. 2; Dermal bones of the cranial roof. *Academic Press London* pp. 100-105, 1980.
- 9) 新飯田俊平：マウスの天蓋軟骨成分について，成長，30:105-110, 1991.
- 10) Harada, Y., and Ishizeki, K.: Evidence for transformation of chondrocytes and site-specific resorption during the degradation of Meckel's cartilage. *Anat. Embryol.* 197 : 439-450, 1998.
- 11) Wijngaert FP van de, and Burger, EH.: Demonstration of tartrate resistant acid phosphate in un-decalcified, glycolmethacrylate-embedded mouse bone: a possible marker for (pre) osteoclast identification. *J. Histochem. Cytochem.* 34 : 1317-1323, 1986.
- 12) Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, SA.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119 : 493-501, 1992.
- 13) 新飯田俊平：マウス頭蓋冠の形成過程に関する組織学的研究，歯基礎誌，29 : 228-243, 1987.
- 14) Opperman, L. A., Passarelli, R. W., Nolen, A. A., Gampper, T. J., Lin, K. Y. K., and Ogle, R. C.: Dura mater secretes soluble heparin-binding factors required for cranial suture morphogenesis. *In Vitro Cell Dynamic.* 32 : 627-632, 1996.
- 15) Chung, K. S., Jacenko, O., Boyle, P., Olsen, B. R., and Nishimura, I.: Craniofacial abnormalities in mice carrying a dominant Interference mutation in type X collagen. *Dev. Dynam.* 208 : 544-552, 1997.
- 16) 祐川励起，山本茂久：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—，歯基礎誌，25 : 763-770, 1983.
- 17) Zimmermann, B., Moegelin, A., de Souza, P., and Bier, P.: Morphology of the development of the sagittal suture of mice. *Anat. Embryol.* 197 : 155-165, 1998.
- 18) 祐川励起：マウス頭蓋矢状縫合の組織学的研究，歯基礎誌，26 : 435-453, 1984.
- 19) Niida, S., Yamasaki, A., and Kodama, H.: Interference with interparietal growth in the human skull by the tectum synoticum posterior. *J. Anat.* 180 : 197-200, 1992.
- 20) Shibata, S., Fukada, K., Suzuki, S., and Yamashita, Y.: Immunohistochemistry of collagen types II and X and enzyme-histochemistry of alkaline phosphatase in the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. *J. Anat.* 191 : 561-570, 1997.
- 21) Gibson, G. J., and Flint, M. H.: Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J. Cell Biol.* 101 : 277-284, 1985.
- 22) Farnum, C. E., and Wilsman, N. J.: Determination of proliferative characteristics of growth plate chondrocytes by labeling with bromodeoxyuridine. *Calcif. Tissue Int.* 52 : 110-119, 1993.
- 23) 下田眞理子，石崎正通，雑賀壽和，山中宣昭：筋線維芽細胞による matrix metalloproteinases および tissue inhibitor of metalloproteinase の発現—角膜創傷治癒過程における形態学的検討—，日眼会誌，101 : 371-379, 1997.
- 24) Birkedal-Hansen H., Moore, WG., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo, A., Engler, JA.: Matrix metalloproteinases; a review. [Review] [406 refs] *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 4 : 197-250, 1993.
- 25) 岡田保典，坂倉照好編，細胞外マトリックス，羊土社，東京，88-99ページ，1995.
- 26) Fawcett, E.: The primordial cranium of *Poecilophoca weddelli* (Weddell's seal), at the 27-mm C. R. length. *J. Anat.* 52 : 412-440, 1918.
- 27) Fawcett E.: Some observations on the roof of the primordial human cranium. *J. Anat.* 57 : 245-250, 1923.