

ラット膝関節と椎間円板の軟骨における膠原線維の発達

安孫子幸子¹⁾， 松浦奈津江²⁾， 川真田聖一²⁾

キーワード (Key words) : 1. 関節軟骨 (articular cartilage) 2. 椎間円板 (intervertebral disc)
3. 膠原線維 (collagen)

胎生18日から生後25週までの雌雄ラットを用い、膝関節の脛骨関節軟骨と胸部脊柱の椎間円板で、成長につれて膠原線維の量と分布がどのように変化するかを、光学顕微鏡(光顕)と電子顕微鏡(電顕)で調べた。

胎生18日には、脛骨の近位骨端は軟骨で構成され、マッソン・ゴールドナー染色で膠原線維はほとんど認められなかった。生後0日には、膠原線維は関節軟骨の最も表層で弱く染まっただけだったが、成長とともに増加した。生後2,3週には、関節軟骨の表層の膠原線維が濃く染まり、骨端中心部の石灰化領域に近づくにつれて染色が薄くなった。生後9週には、関節軟骨全体が濃く染まった。このように、関節軟骨では、骨端の表面から中心部に向けて膠原線維が増加した。成長板は、生後2週で出現し、関節軟骨と対照的に膠原線維の増加はわずかだった。椎間円板では、胎生18日に最も周辺部の線維輪に膠原線維が認められた。膠原線維の増加は、成長とともに、周辺部の線維輪から椎間円板の中心部に、中心部では髄核に近い部位から椎体に向かって進行し、生後2週には椎間円板の膠原線維は均一に濃く染色された。生後9週以降は、椎間円板の所々に骨化が観察された。光顕で観察された線維は、電顕で膠原線維に特有な縞模様が観察されたので、膠原線維と同定した。また、光顕での染色の濃度と電顕での線維の増加とはよく相関した。このような膠原線維の増え方には、関節の運動、荷重や栄養の供給経路が関係しているものと推測される。本研究で、胎仔期の軟骨や成長板では膠原線維が乏しいことが示された。これらの軟骨は活発に増殖することが知られている。対照的に、関節軟骨や線維輪では膠原線維が豊富で、軟骨細胞はまれにしか分裂増殖しない。膠原線維の増加と軟骨細胞の増殖減少とは、関連があるのかもしれない。

緒 言

軟骨は、胎生期に骨が形成されるときに鋳型となり、長骨が成長する部位である。また、骨と骨を連結し、運動を円滑にしたり荷重を支持するなど運動器の要素としても重要な役割を果たしている。軟骨の機能的特性は細胞間物質によって決まるといわれ、軟骨細胞間の有機成分のうち、膠原線維は最も量が多く重要である。成長するにつれて、関節軟骨の膠原線維タイプやそれぞれの分布が変化したり¹⁾、線維の配列が変わる²⁾ことが知られているが、膠原線維全体の量や分布がどのように変化するかを調べた報告は少ない。本研究では、硝子軟骨である関節軟骨、成長板(骨端軟骨)、および線維軟骨である椎間円板で、膠原線維の発達について検討した。

材料と方法

1) 光学顕微鏡用試料

胎生18日(妊娠期間は通常21日)、生後0,3,6,9日,2,3,9,25週のWistar系雌雄ラットを各群4匹ずつ用いた。ラットあるいはその母獣に、プロモデオキシウリジン(BrdU)のラベル液を注射し(BrdU:30mg/kg体重)、6時間後にエーテル深麻酔で屠殺した。今回は膠原線維の観察結果についてだけ報告し、BrdUによる増殖細胞の解析については、別の機会に譲る。両側の膝関節と胸部脊柱を採取し、0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液(pH7.4)で1晩浸漬固定して、Plank-Rychlo液³⁾で脱灰後、脱水してパラフィン包埋した。胎生18日の試料は脱灰を省いた。矢状方向に薄切した5μmの切片を、アルデヒドフクシン・マッソンゴールドナー染色³⁾で、膠原線維を緑色に染めた。

・ Development of collagen fibers in the rat knee joint and intervertebral disc.
・ 所属: 1) 広島大学大学院医学系研究科保健学専攻 2) 広島大学医学部保健学科理学療法学専攻
・ 広島大学保健学ジャーナル Vol. 2(1): 34~40, 2002

2) 成長板の厚さの計測

生後2, 3, 9, 25週ラットの膝関節の切片をカラー撮影し、脛骨成長板の厚さを計測した。生後2週よりも若いラットでは、成長板の骨端側を特定することが困難だったため、計測の対象から除外した。成長板の最大横径を4等分し、その1/4, 2/4, 3/4にあたる3点で垂線を引き、垂線上に位置する成長板の厚さを測定した。3つの計測値の平均を各動物ごとに算出した後、各週齢ごとに4匹ずつの平均値を計算した。

3) 電子顕微鏡用試料

胎生18日、生後0, 3, 6, 9日、2, 3週のラットを各群3匹以上用いた。エーテル深麻酔でラットを屠殺して胸部脊柱と膝関節を採取し、0.1 Mリン酸緩衝3%グルタルアルデヒド液 (pH 7.4) で1晩4℃で浸漬固定し、5%エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (EDTA) と7%シヨ糖を含む溶液 (pH 7.4) で完全に脱灰し、0.1 Mリン酸緩衝1%四酸化オスミウム (pH 7.4) で4時間4℃で後固定して、脱水後にエポキシ樹脂に包埋し

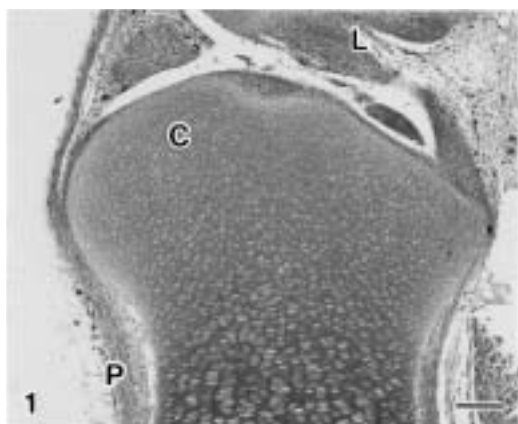


図1 胎生18日ラット膝関節の光顕像
骨膜 (P) や靭帯 (L) の膠原線維が染まっている。関節軟骨 (C) には膠原線維はほとんど認められない。
スケールバー = 200 μm .



図2 生後0日のラット膝関節
脛骨関節軟骨の最表面や靭帯の付着部で膠原線維が染まっている。スケールバー = 400 μm .

た。胎生18日から生後3日までの試料は、脱灰を省略した。一部の試料は、後固定し、10%シヨ糖液で3回、各10分以上洗浄後に3%酢酸ウラニル水溶液で1時間室温でブロック染色を行い、脱水、包埋した。関節軟骨の関節腔に面する部分を矢状断に超薄切した切片 (厚さ0.1 μm) を0.5%ウーロン茶抽出物質⁴⁾で膠原線維が染まるように前処理し、酢酸ウラニル・クエン鉛で二重染色後に日本電子JEM - 1200EX透過型電顕で観察した。

結 果

本研究の観察項目については、ラットの性別による差は認められなかったので、雌雄のデータをまとめて述べる。

・膝関節

1) 膝関節の光顕観察

胎生18日には、膝関節の関節腔、十字靭帯や関節半月が形成されていて、脛骨の骨端は全体が軟骨でできていた。関節包、関節半月、骨膜や靭帯とその付着部には、緑色に染色された膠原線維が少量混じっていたが、関節面や骨端の軟骨には認められなかった (図1)。生後0日には、脛骨の骨端は大きさを増し、関節軟骨の表面から、細胞2, 3層ないし数層分の深さまで、膠原線維によって緑に染まっていた。十字靭帯とその付着部、関節包、骨膜や骨質は、胎生18日より膠原線維が濃く染まった (図2)。生後3, 6日には軟骨の膠原線維が染まる範囲がやや拡大し、生後9日には、関節軟骨の表面は膠原線維で染色が濃く、深部では急激に染色が薄くなったが、かなり深い部分まで染まった。骨端の中心には結合組織が侵入し、骨幹端には、将来成長板 (骨端軟骨) になる部分に、軟骨柱が整然と配列していた (図3)。生後2週には、骨端が、関節軟骨、中心部の二次骨化領域と骨幹端の成長板に分かれた。関節軟骨は、表面の数

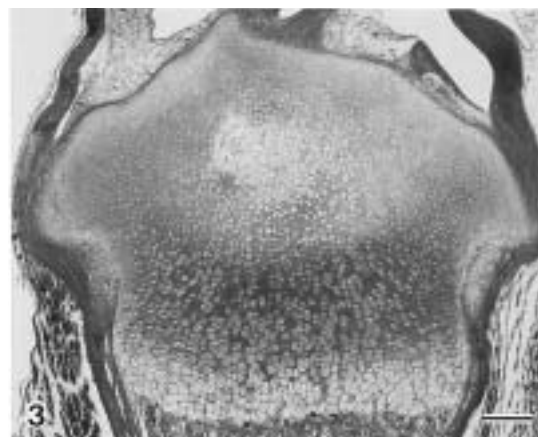


図3 生後9日のラット膝関節
脛骨関節軟骨の表面は膠原線維で染まっているが、深部は染色されていない。骨端の中心に侵入した結合組織が見られる。
スケールバー = 400 μm .

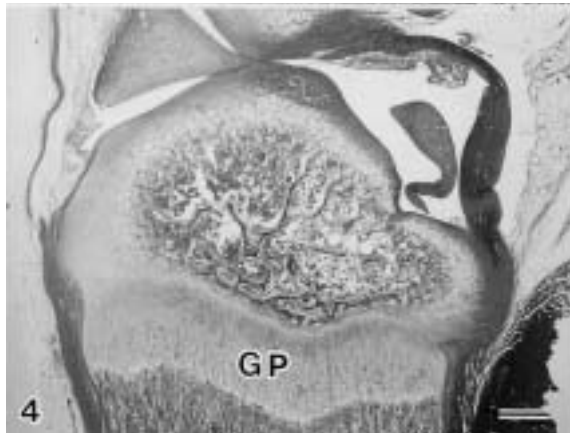


図4 生後3週のラット膝関節

関節軟骨，二次骨化領域と成長板が区別できる．深部の染色は薄い，関節軟骨全体が膠原線維で染まっている．しかし，成長板（GP）には，膠原線維はほとんど認められない．スケールバー = 800 μm ．

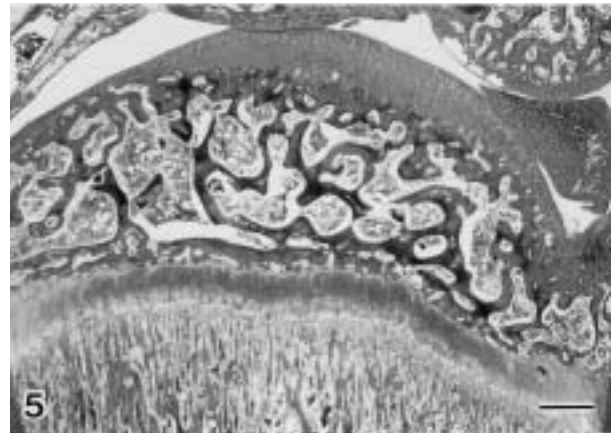


図5 生後9週のラット膝関節

関節軟骨全体が膠原線維で均等に染まっている．成長板の厚さは生後3週より薄く，膠原線維はわずかに染まっている．スケールバー = 800 μm ．

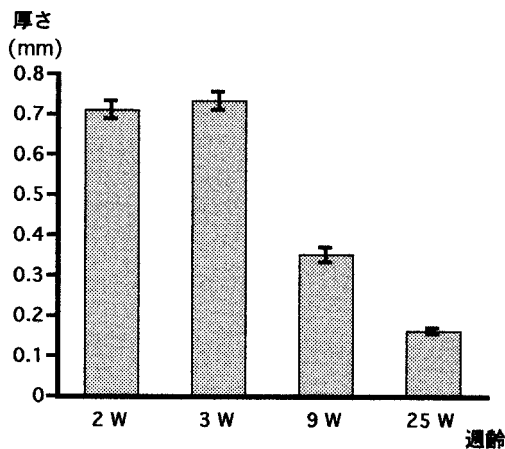


図6 脛骨成長板の厚さの変化

生後2週から3週にかけて，成長板は厚さを増し，生後9週，25週と厚さが減少した．エラーバーは標準誤差を示す．

層は扁平ないし類円形の細胞が表面に平行に配列し，深部では軟骨が肥大して中心部の骨化領域に続いていた．関節軟骨の膠原線維は，表層では濃く染色されたが，深層になるにつれて薄くなり，関節軟骨層のうち，表面から1/2ないし2/3程度まで染まった．成長板は層が厚く，骨幹側に行くにつれて軟骨細胞は肥大変性していた．生後3週には，関節軟骨の全層で膠原線維が染色されたが，表面に比べ深部の染色は薄かった．一方，成長板では膠原線維はほとんど染まらなかった．成長板の厚さは生後2週の時よりもやや増加した（図4）．生後9週には，関節軟骨の殆どすべてが膠原線維で均等に濃く染色された．成長板は薄く，膠原線維は非常に少量だった（図5）．生後25週には，生後9週と比べて関節軟骨は同様だったが，成長板は更に薄くなり，軟骨細胞の柱状配列がしばしば乱れ，膠原線維は少量だったが，生後9週よりわずかに増加していた．

成長板の厚さの変化を図6に示す．

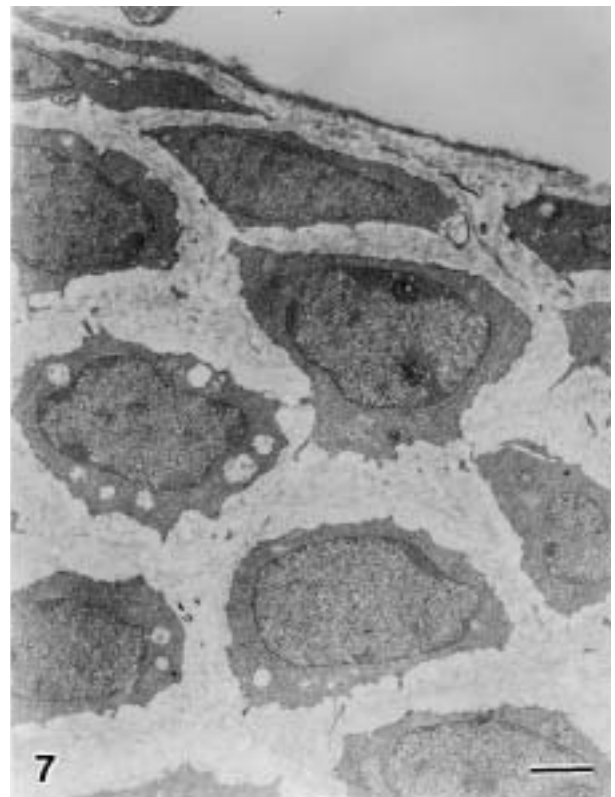


図7 胎生18日のラット脛骨関節軟骨表面の電顕像 比較的密に配列した細胞間に，細い線維が少数観察される．写真右上に関節腔が見られる．スケールバー = 2 μm ．

2) 関節軟骨の線維の電子顕微鏡所見

関節腔に面する部分を観察すると，胎生18日には，軟骨細胞間の線維は細く疎だった（図7）．生後0，3日には，線維がやや密になり，太い線維も一部見られた．成長とともに，線維数と線維の太さは増加した．生後2，3週には，線維は一層密になり太くなって部位によっては層を形成し，線維の走行する向きが層によって異なっていた（図8）．また，高倍率で膠原線維に特有な縞模

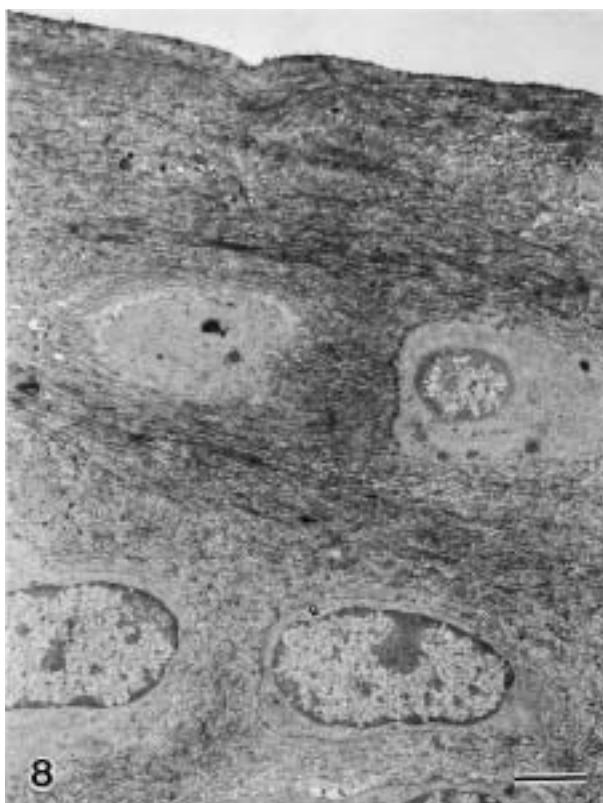


図8 生後3週のラット脛骨関節軟骨表面の電顕像
軟骨細胞間に,多数の線維が見られる.スケールバー=2 μm.

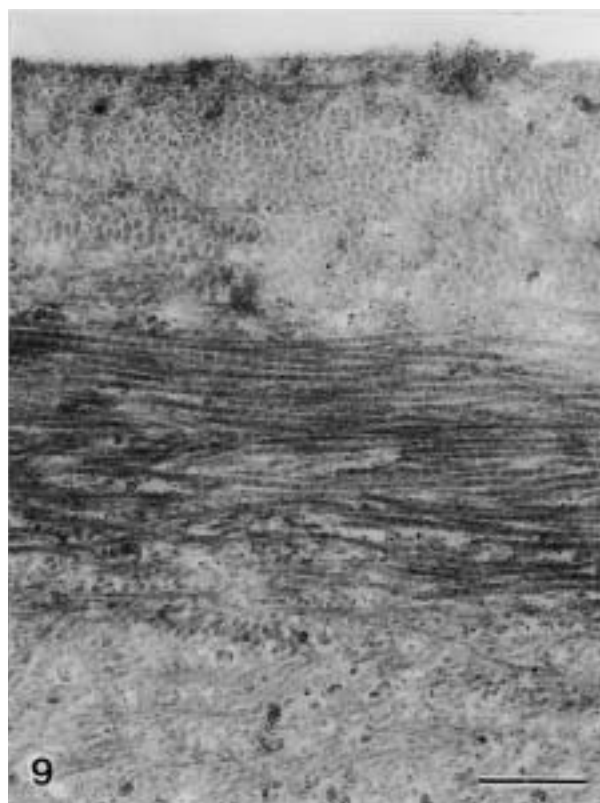


図9 生後3週のラット脛骨関節軟骨表面の電顕高倍像
膠原線維が密に存在し,関節面に沿って層状に走行している.
視野の中央では,膠原線維に特有の縞模様も観察される.
スケールバー=500 nm.

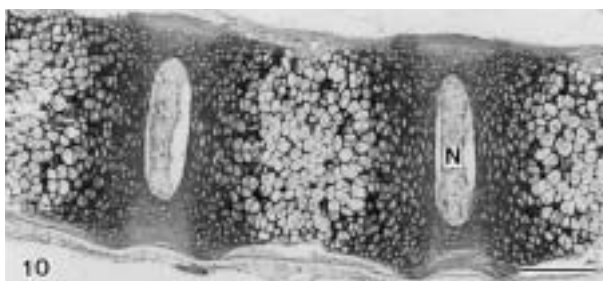


図10 胎生18日のラット胸部脊柱の光顕像
前・後縦靱帯と周囲の線維輪に少量の膠原線維が認められる.
髄核(N).スケールバー=200 μm.

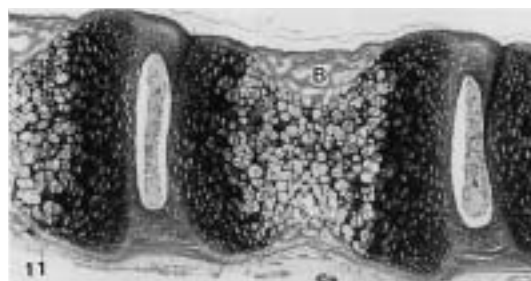


図11 生後0日のラット胸部脊柱
周辺より少し中心側の線維輪や椎体周辺の骨化部(B)に膠原線維が出現している.スケールバー=200 μm.

様も観察され,線維が膠原線維であることが確認できた(図9).電顕で観察される線維の密度と光顕の膠原線維の染色濃度とは良く相関した.

・胸部脊柱

1) 脊柱と膠原線維の発達

胎生18日には,椎骨は軟骨で形成され,椎体と髄核が区別できた.髄核は空胞状の細胞が集まり,髄核の側方に線維輪が見分けられたが,椎間円板と椎体の境界は明確ではなかった.膠原線維は,前・後縦靱帯と最も周辺部の線維輪が薄く染まった(図10).生後0日には,椎体の周辺部から中心部に向けて骨化が観察された.線維輪は髄核を取り囲むように横向きのU字型に走行してい

た.膠原線維は,前・後縦靱帯と周辺部の線維輪数層が比較的濃く染まり,髄核に近づくにつれて染色は薄くなった(図11).生後3,6日には,膠原線維は線維輪の周辺部で濃く,中心部へ向かうにつれやや薄くなったが,線維輪全体が明らかに染色された(図12).生後9日には,線維輪の膠原線維が濃く染まる部分が拡大した.線維輪の軟骨細胞は楕円形で,髄核の上下では7,8層が,髄核の側面では十数層が,髄核を取り囲んで楕円状に配列していた.生後2,3週には,椎体の上下に軟骨柱が規則正しく配列し線維輪全体が膠原線維で濃染したが,線維輪と椎体の軟骨の境界は不明瞭だった(図13).生後9週には,椎体は長さを増し,形も腹側が短くて背側

椎間円板に圧力が加わったとき、髄核にかかる力は線維輪に向かって側方へ分散されるので、周辺部の線維輪から膠原線維が増加するのは、圧力に対抗するには都合がよい。このような膠原線維の増え方は、ヒト¹⁶⁾ やラット¹⁵⁾ で、周辺の線維輪に膠原線維が多く中心側ほど少ないことや、加齢によって周辺の線維輪の膠原線維が増加する¹⁶⁾ ことと関係があるのかもしれない。生後9週以降の椎間円板は、Scott et al.¹⁷⁾ がウサギで観察したように、腹側が厚く背側が薄かった。彼らは、ウサギはヒトと異なって四足なので、椎間円板にかかる力によってそのようになるとは考えにくいと述べた。Rufai et al.¹⁵⁾ は、線維輪の背側は成長が遅れると述べており、腹側と背側で軟骨の成長速度が違うため差が生じると推測される。

生後9週以降に線維輪の一部で骨化が観察されたが、ヒト¹⁶⁾、ラットの腰椎¹⁵⁾、マウスの腰椎¹⁴⁾、ウサギ、マーモセットでも骨化が起こることが知られている。Higuchi et al.¹⁴⁾ は、骨化することによって髄核への栄養や水分が拡散しにくくなると考えた。しかし、軟骨には血管がなく、骨化によりハバース管などを介して血管が侵入するので、椎間円板の血行はむしろ良くなる可能性がある。

3) 成長板の変化について

成長板は、長骨が成長する部位としてよく知られ、生後も軟骨細胞の分裂増殖が持続する。成長板の骨端に近い部位で増殖した軟骨細胞は、順次骨幹の方に送られて柱状に配列し、骨幹側に行くにつれて次第に成熟、肥大、変性し、石灰化という過程を経て最終的には骨に置き換えられる。本研究では、ラットの成長につれて、生後2週に成長板が形成され、3週には厚くなり、その後は薄くなって軟骨柱の配列も乱れた。ラットは、生後3週で離乳し、生後約10週で成熟する。成長が速い成長板は増殖細胞帯が長い¹⁸⁾ といわれるので、このような成長板の厚さの変化は、骨の成長速度を反映すると考えられる。

軟骨は、細胞間物質によって硝子軟骨、線維軟骨と弾性軟骨の3種類に分けられる。関節軟骨と成長板は同じ硝子軟骨に分類される場合もあるが^{19), 20)}、膠原線維量は著しく異なっていた。成長板は膠原線維が乏しく、幼若な時期の軟骨の性質を保ったままであった。しかし、脛骨の関節軟骨と脊柱の椎間円板では、膠原線維の量は成長とともに増加した。Walker and Kember²¹⁾ は、生後7日から1年のラット脛骨では成長板の軟骨の増殖細胞は成長とともにその割合が減少するが、生後1年まで増殖細胞が観察されると報告した。一方、関節軟骨では生後、増殖細胞は少なく¹⁾、成熟動物の関節軟骨細胞は増殖能力がほとんどないとされている⁶⁾。脊柱では、椎体の上下の成長板に似た軟骨層で軟骨細胞が分裂増殖し椎体が長くなると推測されているが、生後は増殖が急激に低下

する²²⁾。このように軟骨細胞の増殖が、膠原線維の乏しい成長板では生後も持続し、膠原線維の多い関節軟骨や線維輪では非常に少ないことから、膠原線維の増加が軟骨細胞の増殖に影響している可能性が考えられるが、その検証にはさらに研究が必要である。

文 献

1. Bland, Y.S. and Ashhurst, D.E.: Development and ageing of the articular cartilage of the rabbit knee joint: distribution of the fibrillar collagens. *Anat. Embryol.*, 194: 607-619, 1996
2. Hayes, A.J., MacPherson, S., Morrison, H., Dowthwaite, G. and Archer, C.W.: The development of articular cartilage: evidence for an appositional growth mechanism. *Anat. Embryol.*, 203: 469-479, 2001
3. 佐野 豊: 組織学研究法 第6版 p. 201, 275, 318-319, 南山堂, 東京, 1981
4. 松並平晋, 佐藤 茂: ウーロン茶抽出物質 (OTE) を用いた結合組織線維電子染色. *病理と臨床*, 12: 991-994, 1994
5. Brower, T.D. and Hsu, W.-Y.: Normal articular cartilage. *Clin. Orthop.*, 64: 9-17, 1969
6. 久保俊一, 高橋謙治: 関節軟骨の構造と生化学. *理学療法*, 16: 58-61, 1999
7. 豊島良太: 関節の構造と生化学. 標準整形外科学 第6版 (寺山和雄, 広畑和志監修), p. 28-39, 医学書院, 東京, 1996
8. Soames, R.W.: Structure of cartilage. *Gray's Anatomy* 38th ed. (Bannister, L.H., Berry, M.M., Collins, P., Dyson, M., Dussek, J.E. and Ferguson, M.W.J. eds.), p. 443-452, Churchill Livingstone, New York, 1995
9. Wirth, C.J. and Rudert, M.: Techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literature. *Arthroscopy*, 12: 300-308, 1996
10. Morrison, E.G., Ferguson, M.W.J., Bayliss, M.T. and Archer, C.W.: The development of articular cartilage: I. The spatial and temporal patterns of collagen types. *J. Anat.*, 189: 9-22, 1996
11. Sasano, Y., Furusawa, M., Ohtani, H., Mizoguchi, I., Takahashi, I. and Kagayama, M.: Chondrocytes synthesize type I collagen and accumulate the protein in the matrix during development of rat tibial articular cartilage. *Anat. Embryol.*, 194: 247-252, 1996
12. Hashizume, H.: Three-dimensional architecture and development of lumbar intervertebral discs. *Acta Med. Okayama*, 34: 301-314, 1980
13. 樋口政法: 椎体軟骨板の組織発生 - 光学ならびに電子顕微鏡的研究 - . *日本整形外科学会雑誌*, 55: 589-600, 1981
14. Higuchi, M., Kaneda, K. and Abe, K.: Postnatal histogenesis of the cartilage plate of the spinal column: electron

- microscopic observations. Spine, 7: 89-96, 1982
- 15 . Rufai, A., Benjamin, M. and Ralphs, J.R.: The development of fibrocartilage in the rat intervertebral disc. Anat. Embryol., 192: 53-62, 1995
 - 16 . Humzah, M.D. and Soames, R.W.: Human intervertebral disc: structure and function. Anat., Rec., 220: 337-356, 1988
 - 17 . Scott, N.A., Harris, P.F. and Bagnall, K.M.: A morphological and histological study of the postnatal development of intervertebral discs in the lumbar spine of the rabbit. J. Anat., 130: 75-81, 1980
 - 18 . 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
 - 19 . Kelly, D.E., Wood, R.L. and Enders, A.C.: The connective tissues: cartilage and bone. Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy 18th ed., p. 194-231, Williams & Wilkins, Baltimore, 1984
 - 20 . 牛木辰男：結合組織と支持組織．カラーアトラス機能組織学（藤本豊士，牛木辰男監訳），p. 63，南江堂，東京，2001
 - 21 . Walker, K.V.R. and Kember, N.F.: Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. II. measurements during ageing. Cell Tissue Kinet., 5: 409-419, 1972
 - 22 . Dixon, B.: Cartilage cell proliferation in the tail-vertebrae of new-born rats. Cell Tissue Kinet., 4: 21-30, 1971

Development of collagen fibers in the rat knee joint and intervertebral disc

Sachiko Abiko¹⁾, Natsue Matsuura²⁾ and Seiichi Kawamata²⁾

1) Health Sciences, Graduate School of Medical Sciences, Hiroshima University

2) Division of Physical Therapy, Institute of Health Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University

Key words : 1 . articular cartilage 2 . intervertebral disc 3 . collagen

Changes in the amount and distribution of collagen fibers in the developing tibial articular cartilage of the knee joint and the thoracic intervertebral disc in the rat (ranging from 18 gestational days to postnatal 25 weeks) were studied by light and electron microscopy. At 18 gestational days, the proximal epiphysis of the tibia, as revealed by Masson-Goldner staining, was composed of cartilage with few collagen fibers. On day 0, collagen fibers were weakly stained in the most marginal layer but increased in amount with time. At 2 and 3 weeks, the staining of collagen fibers was pronounced in the superficial zone, but decreased in intensity toward the deeper ossified region. At 9 weeks, uniform and intense staining was found throughout the articular cartilage. In contrast, the collagen fibers in the growth plate, which appeared at 2 weeks, increased only a little. In the intervertebral disc, collagen fibers were recognized at the most peripheral annulus fibrosus at 18 gestational days. The increase of collagen fibers proceeded from the peripheral annulus fibrosus toward the center of disc, and at the center, from places near the nucleus pulposus toward the vertebral bodies in a vertical direction. At 2 weeks, the intervertebral discs were intensely and homogeneously stained for collagen fibers. From 9 weeks onwards, ossified regions were occasionally found in the intervertebral discs.

Electron microscopy demonstrated characteristic periodic striations for collagen in fibers observed by light microscopy. In addition, the intensities of staining in light microscopic specimens correlated well with the amount of collagen fiber at the electron microscopic level. The progression pattern of collagen fiber accumulation is possibly correlated with the joint movement, weight loading and route of nutrient supply. The fetal cartilage and the growth plate were shown to contain only a small amount of collagen fiber in the present study. It is known that the chondrocytes in these cartilages actively proliferate. In contrast, the articular cartilage and intervertebral disc contained a great deal of collagen fiber and chondrocytes with rare cell division. Some correlation may exist between an increase in collagen fibers and a reciprocal decrease in the proliferative activity of chondrocytes.