Thesis

咀嚼筋腱腱膜過形成症の病態に関する組織学的検討ならびに元素組成分析

臨床医学研究系 口腔外科学 堀 直子

【目的】咀嚼筋腱腱膜過形成症は、咬筋および側頭筋における腱および腱膜の過形成による筋の伸展障害により生じる疾患であるが、腱および腱膜の病態については未だ不明である.本研究では、組織学的検討および元素分析により、この病態の解明を行うことを目的とした.

【対象と方法】対象は、疾患群として側頭筋腱腱膜部分切除術を行った咀嚼筋腱腱膜過形成症患者6名(女性6名)、対照群として開口制限がない顎変形症患者6名(男性2名,女性4名)とした.対象の側頭筋腱組織を組織学的に観察し、腱分化に関与するとされるGDF5、Smad8、Tenomodulinの発現を免疫組織化学的に観察した.また、電子顕微鏡による筋組織および腱組織の構造観察を行い、エネルギー分散型X線分析装置を用いて腱組織の元素組成について分析を行った.

【結果】本疾患患者の側頭筋において、組織学的観察および卓上電子顕微鏡による観察では、腱組織に微小石灰化とみられる粒子様物質が散在していた.透過型電子顕微鏡における観察では、筋線維横断面の変性および血管内腔の狭小化がみられた.元素組成分析の結果では、腱組織に散在していた粒子様物質および粒子様物質周囲の腱組織からカルシウム、リンに加え、ケイ素が検出された.

【結語】ケイ素を含む粒子様物質の散在および、粒子様物質周囲の腱組織におけるケイ素の集積が、本疾患の病態形成に影響している可能性が否定できないものと考えた.

緒 言

咀嚼筋腱腱膜過形成症は,開口制限を呈する新しい 概念の疾患である.

開口制限の原因には外傷性変化や感染症など種々存在するが、近年咀嚼筋や咀嚼筋腱および腱膜の変化が注目されるようになり、2000年に井上ら¹⁾が咬筋腱膜の過形成による開口障害が主因として考えられる開口制限の1症例について報告した。その後、同様の原因と考えられる開口制限の症例報告が散見されるようになり、2008年の第21回日本顎関節学会総会・学術大会では、本疾患の疾患名称の妥当性、診断基準や標準治療法などを検証するシンポジウムが開催され、詳細な検討がなされた²⁾. 国際学会誌上では2009年に、本邦のYodaら³⁾が本疾患について報告しているが、本邦以外からの報告はみられない。

本疾患における開口制限は、腱および腱膜の過形成による咬筋、側頭筋の伸展障害により生じる。一部の患者では、特徴的なSquare Mandible 様顔貌を呈することもある。MR画像において咬筋、側頭筋における腱および腱膜の過形成が観察され、診断の有効な手段となっている¹⁻⁵.治療方法としては、咬筋や側頭筋の医学博士 甲第1194号 平成24年2月24日(埼玉医科大学)

腱および腱膜の切除術を行い、術後の適切な開口訓練を行うことによって良好な長期治療成績を得ている³. 本疾患は両側性に発症し、小児期に症状を自覚するもの²もあり、先天的な要因を考慮する必要がある. また、ブラキシズムなどの習癖が関与するという報告⁴もあり、後天的な要因も否定できない.

本疾患について病理組織学的に検索したものは, 千場⁶による報告のみである. 千場は咬筋腱膜部分切 除標本を組織学的に観察した結果、腱および腱膜に ついては緻密結合組織としての基本的構造が保持され ていることから、本疾患は正常な腱組織の過形成を示 しているものと考えた. また, 筋束組織においては脂 肪組織の浸潤が認められ、40~50歳代の患者では腱 内に砕石様の微小石灰化が観察されたが, これらの変 化は長期にわたる開口制限に伴う、咀嚼筋の廃用性萎 縮の結果であるものと推測している. しかし, 臨床的 には腱腱膜切除手術中において剪刃で腱を切離する 際. 音がするほど腱組織が硬固である³⁾ため、腱腱膜 組織内に何らかの病理学的変化が生じている可能性が 否定できない. これらのことから、本疾患の腱や腱膜 の病態は、現時点では未だ十分に解明されていないも のと考える.

そこで、本疾患患者および対照患者の側頭筋腱組織

T10 堀 直子

に対して、各種組織学的観察および免疫組織化学的観 察、透過型電子顕微鏡を用いた筋組織の微細構造の観 察ならびに卓上型電子顕微鏡における腱組織表面構造 の観察, さらに腱組織の元素組成分析により, 腱およ び腱膜の過形成や組織学的な変性の有無について観察 し、本疾患の病態について検討を行ったので報告する.

材料および方法

対象

疾患群は本疾患患者のうち、側頭筋腱膜部分切除術 を行った6名(女性6名;平均年齢44.7歳,術前最大 開口域 20 ~ 32 mm) である. 対照群は外科矯正手術を 行った, 開口制限のない顎変形症患者6名(男性2名, 女性4名;平均年齢26.3歳)とした. 両群ともに, 他の 内科的基礎疾患、関節疾患、代謝性疾患を有さないも のとした. 組織検体としては、筋突起周辺の側頭筋腱 組織を採取した.

なお,本学倫理委員会の承認(埼玉医科大学医学部 倫理委員会承認番号 No.595) を得た上で、当該患者に 対して本研究に関する十分な説明を行い、研究実施に 対する同意を得た.

組織学的、免疫組織化学的観察および元素組成分 析は、全検体に対して行った.透過型電子顕微鏡を 用いた構造観察と卓上電子顕微鏡を用いた表面構造観 察は、対照群1検体(対照群2)、疾患群側頭筋腱検体2 検体(疾患群1・疾患群6)に対してのみ行った(表1).

組織学的観察

筋を含む腱組織を10%中性緩衝ホルマリンにて48 時間固定し、エタノール系列にて脱水後、パラフィン 包埋とした. 滑走式ミクロトームで厚さ2.5 μmに薄 切した組織に対し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色, Toluidine blue染色, Von kossa染色, Azan染色を行い, 光学顕微鏡にて観察した.

表 1. 対象

11 12

患者 検体 性別 手術時年齢(歳)術前最大開口域(mm) 対照群1 19 1 男 対照群2 2 29 対照群3 女 3 19 対照群4 女 29 4 女 対照群5 5 29 対照群6 女 6 33 疾患群1 7 女 32 30 疾患群2 8 女 35 25 疾患群3 女 39 28 9 10 疾患群4 女 49 27

56

59

対照群・疾患群ともに全て側頭筋を対象とした.

女

疾患群5

疾患群6

免疫組織化学的観察

組織学的観察と同じパラフィン包埋標本を使用し, 滑走式ミクロトームで厚さ2.5 µmに薄切した組織を使 用した. 腱分化に関与するとされる因子のマーカーと して, 抗 GDF5 抗体, 抗 Smad8 抗体, 抗 Tenomodulin 抗体(いずれもSanta Cruz Biotechnology社製)を 用いた. ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(G) (ニチレイ・バイオサイエンス社製) による免疫 組織化学染色を行い, 光学顕微鏡にて観察した.

なお、陰性対象 (Negative control) には、一次抗体 として使用した各抗体の代替に、PBSを使用し、同様 の手順で染色を行った.

透過型電子顕微鏡による観察

筋組織を2.5%グルタールアルデヒド(0.1Mリン酸 緩衝液) および1%四酸化オスミウム (0.1Mリン酸緩衝 液)にて固定し、エタノール系列にて脱水後、エポン 樹脂包埋した. 組織超薄切片を作成し, 酢酸ウラン飽 和液ならびにクエン酸鉛液にて電子染色を施した後、 透過型電子顕微鏡 JEM-1010型 (日本電子) にて,筋線 維ならびに脈管周囲組織を中心に観察を行った.

卓上電子顕微鏡による観察

腱組織を10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、エ タノールで脱水後、組織表層にオスミウム蒸着処理を 行い、卓上電子顕微鏡 Miniscope® TM-1000S (日立製 作所)にて腱表面構造の観察を行った.

元素組成分析

腱組織の元素組成分析には、組織学的、免疫組織化 学的観察と同じパラフィン包埋標本を使用した. 滑走 式ミクロトームで厚さ2.5 µmに薄切した組織を、脱パ ラフィン処理した. あらかじめ行ったH-E染色, Von kossa染色の結果から元素組成分析を行う部位を決定 した. この観察試料を、走査型電子顕微鏡用のアルミ ニウム製試料台上に、カーボンテープを用いて固定し、

26

20

エネルギー分散型 X 線分析装置 SwiftED3000® (日立製作所)を用いて、加速電圧 15 kVの設定にて電子線を照射した.電子線を受けた試料から分光された X 線強度を定性的に分析し、元素情報を得るEDSスペクトル測定により構成元素の分析を行った。また、この測定により得られた各元素の出力を、元素マッピングとしてカラーイメージ表示した。なお、EDSスペクトルのキャリブレーション用試料として、本装置付属の標準試料である銅メッシュを用い、スペクトルのピーク位置を補正したものを使用した。

結 果

組織学的観察所見

H-E 染色像では、全例で筋および腱組織の構造的な異常は認めなかった。またToluidine blue 染色、Azan 染色では、硝子軟骨や膠原線維、筋線維において疾患群と対照群との相違はみられなかった。しかしVon kossa 染色では、疾患群の腱組織全例において、長径 $1\sim 10~\mu m$ 程度の石灰化物と考えられる粒子様物質がみられた(図1).

免疫組織化学的観察所見

抗GDF5 抗体, 抗Smad8 抗体, 抗Tenomodulin 抗体 を用いた免疫組織化学染色では, 筋腱接合部における 強染色部が認められたが、疾患群のいずれにおいて も、対照群と比較してGDF5、Smad8、Tenomodulinに ついて明らかな発現の差異はみられなかった(図2).

透過型電子顕微鏡による観察所見

疾患群の筋線維横断面において,対照群にはみられない変性した紋様がみられ(図3A),周囲血管内腔の狭小化や血管内皮細胞の変性がみられた(図3B).

卓上電子顕微鏡による観察所見

疾患群において、腱表面における粒子様物質の散在 がみられた(図4).

元素組成分析の結果

元素組成分析におけるEDSスペクトル測定の結果, 全例で炭素原子の検出ピークがみられ,アルミニウム 原子の検出ピークも散見された.疾患群の腱組織にみられた粒子様物質に対して行った測定では,全例でカルシウムおよびリンが検出された.また疾患群6例中4例(疾患群1,2,4,6)の粒子様物質に対して行った測定では,カルシウムおよびリンに加えケイ素が検出され,元素マッピングにおいて,粒子様物質周辺の腱組織および粒子様物質に集積するケイ素がみられた(図5-bB,図5-c).疾患群の粒子様物質周辺以外の腱組織および対照群の腱組織では,ケイ素の集積はみられなかった(図5-a,図5-bC).

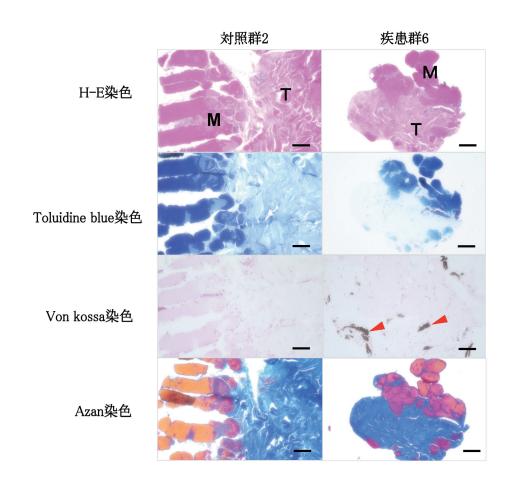


図 1. 組織学的観察画像. 矢頭: 石灰化部. M: 筋組織. T: 腱. スケールバー: 100 µm.

T12 堀 直子

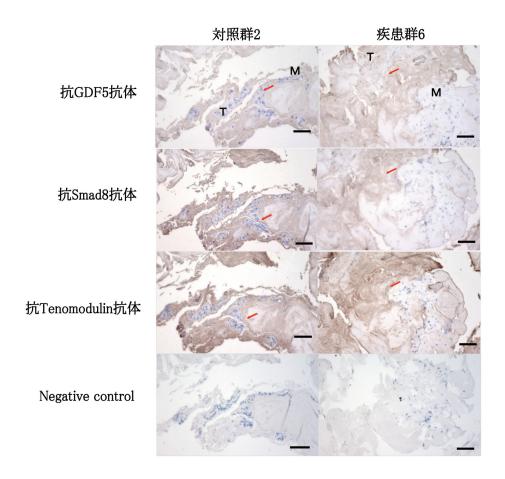


図 2. 免疫組織化学的観察画像. 矢印:筋腱接合部における強染色部. M:筋組織. T:腱. スケールバー: $100\,\mu m$.

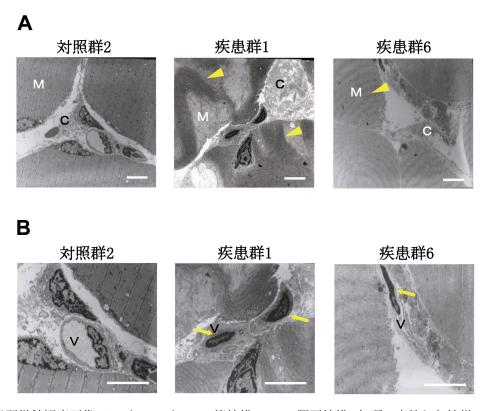


図3. 透過型電子顕微鏡観察画像. $A:(\times 2500)$ M:筋線維. C: 膠原線維. 矢頭:変性した紋様. $B:(\times 5000)$ V:血管内腔. 矢印:内腔の狭小化した血管壁. スケールバー: $10~\mu m$.

考察

免疫組織化学的観察において選択したGDF5、Smad8、Tenomodulinは、腱組織の分化や形成に関与するとされる因子である。GDF5はTGF β スーパーファミリーに属するBMP類縁分子で、その機能欠失変異によって四肢骨が短縮すること、軟骨細胞で発現が高いことが知られている 7 . さらに腱・靭帯の治癒促進や異所性誘導に作用することが動物実験のレベルで明らかにされている 8,9 . SmadはTGF β スーパーファミリーに属する細胞内伝達因子であり、なかでもSmad8

は未分化間葉系細胞からの腱分化の誘導に重要なシグナル因子であることが近年報告された¹⁰. また、Tenomodulinは腱細胞増殖を調節し、膠原線維の成熟化に関与する因子である¹¹⁾. 組織学的観察のToluidine blue染色では、本疾患患者の腱組織において軟骨基質の存在を認めず、筋組織や腱組織での骨軟骨化を呈するような異常所見はみられなかった. また、腱分化に関与する因子の免疫組織化学染色では、対照組織と比較し、機能的に作用するタンパク質レベルでの明らかな発現の差異は認めなかった. しかしながらGDF5、Smad8、Tenomodulinが本疾患の病態に関与する可能

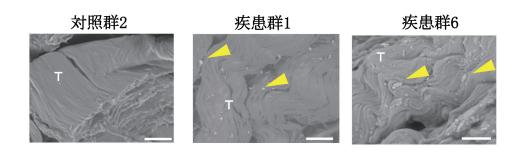


図 4. 卓上電子顕微鏡観察画像. (×1000) T: 腱. 矢頭: 粒子様物質. スケールバー: 300 μm.

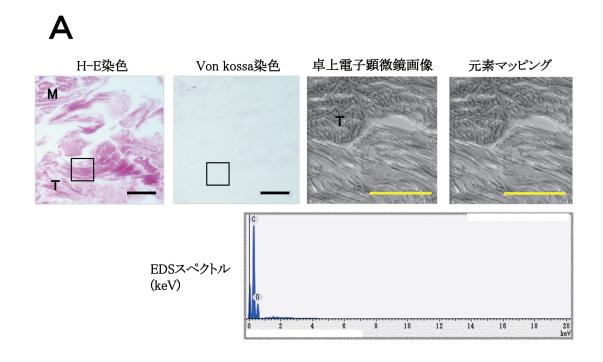


図 **5-a.** 元素組成分析結果. A:対照群4. M:筋組織. T:腱. スケールバー (黒):100 μm. スケールバー (黄):40 μm. □: Miniscope®における拡大観察部位.

T14 堀 直子

性については、組織学的検討のみならず、分子生物学 的手法などを加えてより詳細に検証を行っていく必要 があるものと考えた.

透過型電子顕微鏡による観察において、筋線維の横 断面にみられた紋様は、Contraction bands 様のもので ある可能性が考えられた。Contraction bands は組織が 受けた圧迫変性により生じ得るものであり、必ずしも その発現の全てが病的状態を示すものではないとされている¹²⁾. また,筋線維に近接する血管内腔の狭小化像がみられたことにより,血管内皮細胞には虚血性の変化が生じているものと考えた.したがって,これらの変化が本疾患の病態に結びつくものを示す可能性よりも,本疾患により長期にわたる開口制限を受けたことに伴う,二次的な組織変性を示す変化である可能性

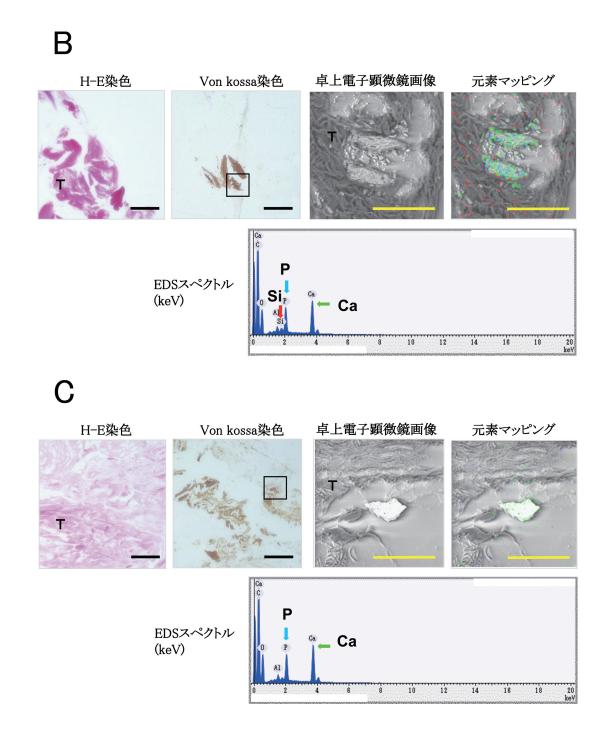


図 5-b. 元素組成分析結果. B:疾患群 2. C:疾患群 3. M:筋組織. T:腱. スケールバー (黒):100 μm. スケールバー (黄):40 μm. □: Miniscope[®]における拡大観察部位. EDSスペクトル:矢頭印は, Ca・P・Siの検出ピーク部分. 元素マッピング: Ca(黄緑)・P(水色)・Si(赤)の存在領域分布図.

の方が高いものと考える.

Von kossa 染色,卓上電子顕微鏡による腱組織の観察により,本疾患患者の側頭筋腱組織全例に,石灰化を示しているものと考えられる粒子様物質が認められた.千場⁶は40~50歳代の患者咬筋組織において,腱内に砕石様の微小石灰化が観察されたことを報告しており,硬性開口制限に抵抗して開口を行う

ことに伴う、腱組織への長期にわたる負担の結果を 否定できないとしている。本研究で使用した組織検 体は全て、EDTAなどを用いた脱灰処理を行わず、 滑走式ミクロトームを使用した薄切が可能であった。 したがって、腱組織内に骨様の組織は形成されてい ないものと考える。しかし、腱腱膜切除手術中におい て剪刃で腱を切離する際、音がするほど腱組織が硬

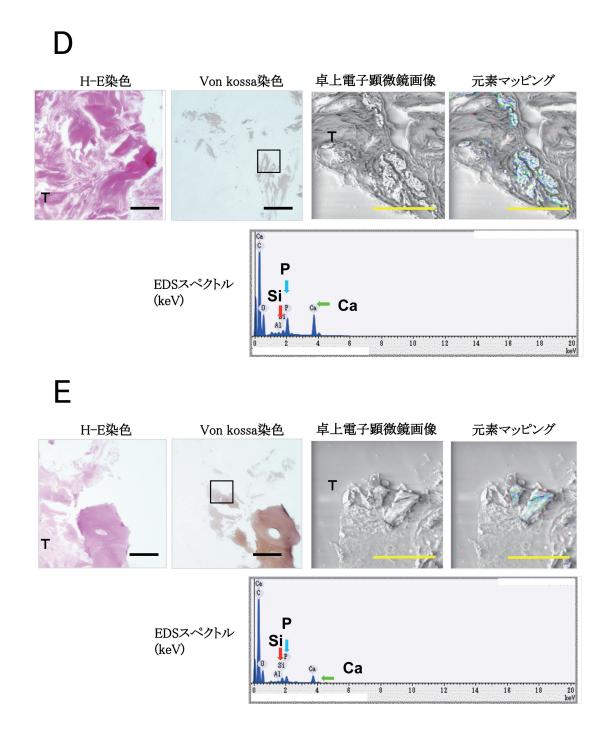


図 5-c. 元素組成分析結果. D:疾患群 4. E:疾患群 6. M:筋組織. T:腱. スケールバー (黒):100 μm. スケールバー (黄):40 μm. □: Miniscope[®]における拡大観察部位. EDSスペクトル:矢頭印は, Ca・P・Siの検出ピーク部分. 元素マッピング:Ca(黄緑)・P(水色)・Si(赤)の存在領域分布図.

T16 堀 直子

固である³⁾ため、腱腱膜組織内に何らかの組織変性が生じていることは想像に難くなく、粒子様物質の沈着がこの組織変性に関与している可能性があるものと考える.

腱組織に対して行った元素組成分析結果の考察にあたり、全てのEDSスペクトルに散見された炭素原子の検出ピークについては、試料固定に用いたカーボンテープの成分によるもの、アルミニウム原子の検出ピークについては、試料台の成分であるアルミニウムの検出による可能性が高いものと考えた。また、カルシウム原子のうち、炭素の検出ピークと検出ピークが重なったものについては、カルシウム原子のもつ殻内の電子配置において、炭素原子のもつ電子配置と近接している部分があるために重複して生じたものとみられた。

患者側頭筋腱組織に対して行った元素組成分析のEDSスペクトルでは、カルシウムおよびリンが検出されたことから、患者腱組織内部に散在した粒子様物質が、カルシウムイオンとリン酸基から構成されたリン酸カルシウムである可能性がある。軟部組織内にカルシウムが沈着する状態は、石灰化もしくは病的石灰沈着とも呼ばれ、石灰化上皮腫などの疾患がある。ピロリン酸カルシウム結晶の沈着には、結晶誘発性関節炎のひとつであるといわれる偽痛風¹³⁾の存在もある。本研究では粒子様物質の結晶構造を確認していないために可能性は非常に低いものの、もしこの粒子様物質がピロリン酸カルシウムであるとするならば、偽痛風の発症素因と本疾患の発症素因が近似し、内分泌異常の関与の可能性も否定できない。

本疾患患者6例中4例の側頭筋腱組織にみられた粒 子様物質からは、カルシウム、リンに加えケイ素が検 出された. ケイ素は骨以外にも,皮膚,爪,毛髪,気 管,腱などの結合組織に多く分布している元素である が、結合組織内のグリコサミノグリカンに結合するこ とにより、高い集積を示す14). ケイ素は、軟骨細胞と 細胞外マトリックスに存在するオステオネクチンな どの高分子物質とを架橋し、軟骨構成や軟骨の石灰化 に関与するとされている¹⁵⁾. すでに1970年代の動物実 験において、ケイ素が結合組織での架橋構造に関与 することは指摘されており、 げっ歯類における実験で は、実験動物をケイ素の欠乏した食餌環境におくこと により、結合組織および骨欠損を誘発し、動物が劣成 長に陥ることが報告されている^{16,17)}. 人体においても, ケイ素の過剰摂取により疫学的に強皮症の発症率が上 昇するという報告¹⁸⁾や、食事中に含まれるケイ素摂取 と骨密度との強い関連性が報告されている¹⁹. さらに 近年ではin vitroでのヒト骨芽細胞系細胞を用いた実 験系において、生理的濃度のケイ素が [型コラーゲン の合成に関与し、骨芽細胞分化を増強していることも

報告された²⁰. 本疾患患者の腱腱膜切除手術では,骨膜と骨の結合が強く,下顎骨から骨膜を剥離する際にバリバリとした音を立てる³. この所見から,骨膜などの結合組織に対して,粒子様物質周辺に確認されているケイ素の過剰な集積が組織変性に関与している可能性が示唆される.

前述のように、腱腱膜切除手術中において剪刃で 腱を切離する際、腱組織が硬固である理由として、本 研究の結果ではケイ素が元素組成分析における元素 マッピングにおいて検出可能な元素濃度レベルでは なかったものの、粒子様物質のみならず周辺の腱組織 において、通常よりも高値に集積していることが関与 している可能性も否定できない。しかし、ここでケイ 素の存在が本疾患の発症に影響するものと仮定して も、腱腱膜過形成が全身に及ばず、咀嚼筋部位にのみ 特異的に発現することに対する説明が、現時点では困 難である。

今後,本物質の出現要因を探索することにより,本疾患のさらなる病態解明につながり得るものと考える.

結 語

咀嚼筋腱腱膜過形成症患者の側頭筋腱組織に粒子様物質の散在を認め、元素組成分析の結果、粒子様物質および周辺の腱組織にカルシウム、リンおよびケイ素が含まれていた。この粒子様物質の散在および、周辺の腱組織におけるケイ素の集積が、本疾患の病態形成に影響している可能性が否定できないものと考えた。

謝辞

大学院における研究活動において、代表指導教員として終始ご指導ご鞭撻をいただきました、埼玉医科大学病院歯科・口腔外科 依田哲也教授に深謝申し上げます.

本研究における研究手法をご指導いただきました, 埼玉医科大学病院歯科・口腔外科(現:東京大学医 学部附属病院顎口腔外科・歯科矯正歯科 特任講師) 安部貴大先生,埼玉医科大学病院歯科・口腔外科 佐藤毅講師に深謝申し上げます.

また、各種電子顕微鏡による観察ならびに元素組成分析の研究手法をご指導いただきました、埼玉医科大学中央研究施設形態部門 穐田真澄教授および形態部門スタッフの皆様方に謹んで深謝申し上げます.

引用文献

- 1) 井上農夫男,山口泰彦,佐藤淳,佐藤千春, 箕輪和行,飯塚正. 咬筋腱膜の過形成により開口障 害をきたした1例.日口外誌 2000;46:307-9.
- 2) 覚道健治, 依田哲也. Square mandibleを伴う新概 念の開口障害: 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の病態と

- 治療. 日顎誌 2009;21(1):28-30.
- 3) Yoda T, Sato T, Abe T, Sakamoto I, Tomaru Y, Omura K, et al. Long-term results of surgical therapy for masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia accompanied by limited mouth opening. Int J. Oral Maxillofac Surg 2009;38(11):1143-7.
- 4) 有家巧, 覚道健治. 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の臨床所見. 日顎誌 2009;21(1):31-4.
- 5) 中本紀道, 佐藤毅, 榎木祐一郎, 中本文, 堀直子, 福島洋介, 他. 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の1例―手術後の咬筋腱膜と側頭筋腱の変化について―. 日 顎誌 2010;22(3):158-61.
- 6) 千場良治. 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の病理組織学的検索. 日顎誌 2009;21(1):51-4.
- 7) Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF β -superfamily. Nature 1994;368:639-43.
- 8) Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF- β gene family. J Clin Invest 1997;100:321-30.
- 9) Mikic B. Multiple effects of GDF-5 deficiency on skeletal tissues: Implications for therapeutic bioengineering. Annals Biomedical Enginnering 2004;32:466-76.
- 10) Hoffmann A, Pelled G, Turgeman G, Eberle P, Zilberman A, Shinar H, et al. Neotendon formation induced by manipulation of the smad8 signalling pathway in messenchymal stem cells. J Clin Invest 2006;116(4):940-52.
- 11) Docheva D, Hunziker EB, Fässler R, Brandau O.

- Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. Mol Cell Biol 2005;25:699-705.
- 12) Ghadially FN. Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix, 4th edition, Boston: Butterworth-Heinemann; 1997. p. 904-5.
- 13) Resnick D, Ninagawa G. Calcium Pyrophosphate Dehydrate (CPPD) Crystal Deposition Disease; in Bone and Joint Imaging (Resnick D, ed), W.B. Saunders, Philadelphia, 1989. p. 477-96.
- 14) Nielsen FH. Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel, and arsenic: current knowledge and speculation. The FASEB Journal 1991;5:2661-7
- 15) Carlisle EM. Silicon as an essential trace element in animal nutrition. In: Evered, D.; O'Connor, M., editors. Silicon Biochemistry Ciba Foundation Symposium 121. John Wiley and Sons Ltd.; Chichester: 1986. p. 123-39.
- 16) Schwarz K. A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1973;70:1608-12.
- 17) Schwarz K, Milne DB. Growth promoting effects of silicon in rats. Nature 1972;239:333-4.
- 18) Mayes MD. Epidemiologic studies of environmental agents and systemic autoimmune diseases. Environ Health Perspect 1999;107 (Suppl 5):743-8.
- 19) Jugdaohsingh R. Silicon and bone health. J Nurr Health Aging 2007;11(2):99-110.
- 20) Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. Bone 2003;32:127-35.