



An electron microscopic study of the changes observed in osteocytes under ischemic conditions

臼井, 康雄

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-07-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1312

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001312>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	臼 井 康 雄 （兵 庫 県）
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博ろ第1089号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成元年7月12日
学 位 論 文 題 目	An Electron Microscopic Study of the Changes Observed in Osteocytes Under Ischemic Conditions (虚血における骨細胞変性壊死過程の電子顕微鏡学的研究)
審 査 委 員	主査 教授 廣 畑 和 志 教授 伊 東 宏 教授 山 鳥 崇

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

いままで虚血状態における骨細胞の形態的变化の研究は、硬組織の超薄切片作製の困難さから、主に光学顕微鏡により行なわれてきた。すなわち、血流途絶後には核の濃縮が生じ、それにひき続いて核が消失することが知られている。一方電顕的には、James らが骨の虚血における極く早期の変化を報告しているに過ぎない。

本研究は虚血によってどのように骨細胞が変化していくか、その過程を超微形態学的に観察したものである。次いでこれらの変化と、生理的に散見される変性した骨細胞、およびステロイド投与で影響を受けた骨細胞を形態的に比較検討した。

実験材料および方法

実験的に骨に虚血を起こす目的で、日本白色成熟家兎5羽を用いた。それぞれの家兎の一方の膝関節より観血的に3～4mm立方の骨軟骨片を採取し、これを直径6mm、長さ6mmの円筒形のプラスチック製容器に入れ、両端を直径0.45 μ m ポアサイズのマイクロフィルターで閉じ、反対側の膝関節内へ挿入した。これらの骨軟骨片を術後12時間, 2, 5, 8, 14日後に摘出して次の如く観察を行った。また対照には屠殺時に大腿骨頸部から採取した骨軟骨片を材料として用いた。

摘出した骨軟骨片は10%緩衝ホルマリン液で固定の後、10% EDTA 溶液で脱灰した。その後、約1mm立方に細切して2%オスミウム液で再固定後、脱水してエポン812に包埋した。摘出標本の各群の中から3つのエポンブロックを無作為に選び、ガラスナイフで厚さ0.5 μ m の切片を作製してトルイジンブルー染色を行い、まず光顕で観察した。つぎにこれらのブロックをダイヤモンドナイフで薄切して電顕で観察した。

光顕的には骨細胞の変化を正常骨細胞、核濃縮骨細胞、核淡染骨細胞、核消失骨細胞に分類して、一定視野内に観察された個々の骨細胞を数えそれらの比率を計算した。さらに電顕により詳しく、それぞれの骨細胞の超微構造を観察した。特に細胞内脂質の沈着の有無を検索するために、一部の骨標本の凍結切片を作製してズダンⅣ染色を追加した。

結 果

〈光顕的観察所見〉

対照群において正常骨細胞は全骨細胞の半数以上を占めていた。これらの細胞は円型または楕円型の核を有し、核の辺縁は平滑で中心部はクロマチンが淡く染色されていた。

血流途絶後12時間の標本では正常骨細胞の比率が減少し、核濃縮骨細胞が有意に増加していた。核濃縮骨細胞の核は円形で濃縮していた。

2日目の標本では正常骨細胞は著しく減少し、他方核濃縮骨細胞、核淡染骨細胞、核消失骨細胞の比率が増加していた。核淡染骨細胞の核質は淡くその辺縁は不整であった。

5日目の標本では核淡染骨細胞の比率が最大であったが14日目になると核消失骨細胞の比率が最高となっている。

〈電顕的観察所見〉

対照群における正常骨細胞は、細胞質に対して核の占める比率が比較的大きく、ミトコンドリアや粗面小胞体は散見されるのみである。また核膜や細胞膜は明瞭で膜の破綻像はみられない。核質クロマチン顆粒は核膜内側縁では濃く、中央部では疎に分布している。

血流の途絶後12時間になると骨細胞の細胞質の内部に膨化した空胞が現れる。明瞭な細胞膜は見られず、核膜の一部も破綻している。また核質クロマチン顆粒は正常骨細胞に比べて濃縮している。

血流途絶後2～5日の核濃縮骨細胞では、細胞膜も核膜もともに消失している。細胞質内の空胞化はさらに高度となり、電子密度の高い小片となった細胞内小器官が細胞外の骨小窩内に散在している。核はさらに縮小し、辺縁は不整となりクロマチン顆粒は著しく濃縮している。

血流途絶後8～14日の核淡染骨細胞は、変性した核と電子密度の高い細胞質の遺残物から成り、膜構造は失われている。核消失骨細胞では、骨小窩内に本来の核と細胞質の構造はみられない。

考 察

骨細胞における虚血性変化とは核濃縮とそれにひき続く核の染色性の低下、そして最終的には骨小窩内の細胞成分の消失である。本実験は細胞死から細胞消失に至る骨壊死の過程を電顕的に観察したものであるが、このような報告は現在までなされていない。

Tannaの報告では、骨細胞のlife spanにおいて骨形成性骨細胞が骨吸収性骨細胞へと生理的に変化し、最終的に変性骨細胞となって融解することになっている。この変性骨細胞の存在する骨小窩内では空胞化した細胞質、ミトコンドリア、ゴルジ体などが見られ、またこれらの細胞内

小器官と考えられる無構造の遺残物が散在している。この実験で観察された虚血による壊死過程の骨細胞も、生理的な変性骨細胞の像とよく一致していた。

Lukは生理的な骨における骨形成性骨細胞、骨吸収性骨細胞、変性骨細胞の分布を調べ、変性骨細胞は血管のあるハバース管から遠く離れた介在骨と骨単位の末梢部に多いと報告した。このことから変性骨細胞の分布は低酸素状態と関係があるとされている。生理的に見られる変性骨細胞と虚血による骨細胞の形態が似ていることから、本研究はLukの仮説を裏付けるものといえよう

一方、骨壊死の成因についての研究で、ステロイド投与により骨細胞内に脂質が沈着することが報告されている。すなわち、骨細胞内に脂質滴が徐々に蓄積して大きくなり、核を辺縁へ圧排し、核濃縮と核膜の破綻が生じて細胞死の状態となるとの報告がある。しかし本実験では脂質の沈着は全く証明されなかった。従ってこれらの2つのタイプの骨細胞の変性過程は明らかに異なるものと思われ、今回の研究から臨床的に骨壊死と定義されている中にも、少なくとも2つの骨細胞壊死の発生過程があるものと推測される。

結 語

1. 家兎を用いて虚血による骨細胞の壊死過程を超微形態学的に観察した。
2. 虚血による骨細胞の形態は生理的にみられる変性骨細胞と類似していた。
3. この壊死過程で細胞内の脂質の沈着はみられなかった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

大腿骨頭壊死の病因として古くから血管閉塞による虚血説が有力視されていた。ところが最近の疫学調査によると長期に及ぶアルコール嗜好者と副腎皮質ステロイド服用者に多く発症して肝障害と高脂血症を合併することが判明した。これらの患者から摂取した骨組織の観察では骨小窩と骨細胞内への多量の脂質顆粒の浸潤と蓄積が見られ、骨細胞壊死が発生していることが確認された。そこで研究者は従来より強調されている虚血による骨壊死の発生過程を知る目的で、実際に血流を途絶した場合に起こる骨細胞の形態学的変化の観察のできる動物実験を行なった。

実験材料と方法：体重2～3kgの日本白色成熟家兎5羽を用いて骨の完全な虚血状態を起こさせるために次の処置を行なった。それぞれの家兎の一侧の膝関節の大腿顆部から数個の3～4mm立方の骨軟骨片を切除して円筒形のプラスチック容器に入れ、両端を直径0.45μmの毛孔のあるフィルターで封入して反対側の膝関節の膝蓋上包内に挿入した。これにより滑膜からの血行の進入を遮断する一方、軟骨の関節液からの栄養は維持された。術後12時間、2,5,8,日後と2週間後に骨軟骨片をとり出すと共に、非切除側の大腿顆部から新に骨軟骨片を切除して対照とした。摘出した骨軟骨片は型の如く4%グルタルアルデヒド及び10%中性ホルマリン緩衝液で24時間固定し10%EDTA溶液中に浸漬し4℃氷室内で2週間脱灰して更に2%オスミウム酸で後固定を行なった。

その後は通常の方法で電顕標本作製し一部の切片は光顕用にトルイジンブルー染色をしてその他はすべてダイヤモンドナイフで薄切して電顕で観察した。光顕では正常骨細胞、核濃縮骨細胞、核淡染細胞、核消失細胞のヒストグラムから個々の細胞の出現率を計算し統計処理を行なった。電顕では骨細胞の微細構造の経時的变化と特に細胞内脂質顆粒の動向に注目して観察した。

結果と考察：円形内至卵円形で染色性の良い核からなる正常の骨細胞は全骨細胞の50%以上を占めていたが、12時間の虚血状態が続けば正常骨細胞は2日後に10%、2週間後には3%以下であった。これと逆に核濃縮骨細胞は2日後に25%以上、5日後20%、また核淡染骨細胞は2日後に30%、5日後に50%以上に増加している。核消失細胞は2日後に25%、5日後に30%以上となり、2週間後では45%に達している。このように虚血が2週間続けば正常骨細胞はほとんど見られなくなり、核消失細胞、核淡染骨細胞がこれに代って増加していることが0.01と0.001の誤差でもって明らかになった。これらのいずれの細胞内にも人の大腿骨頭壊死の骨組織に観察されたSudan IV陽性の脂質顆粒は存在しなかった。

次にこれら虚血に伴って現れる骨細胞の微細構造上の変化を把握するのに不可欠な電顕観察結果ではいくつかの特徴的所見が得られた。血流途絶後12時間経つと骨細胞の細胞質が疎となり、数個の円形内至は卵円形の空胞が現れるが限界膜のあることから糸粒体の変化したものと考えられ、核膜と核質の間に空隙が現れて次第に核質クロマチン顆粒がdenseとなる。虚血後光顕観察で2日目の核濃縮骨細胞に相当するものの細胞膜と核膜は消失し、細胞質は空胞化し、均質無構造となり、細胞小器官は骨小窩内へ小片となって散在している。血流途絶後8日～14日目の骨細胞は骨小窩内へ変性した僅かな核質とdenseな細胞質の一部を残すのみとなり、両者の膜構造も失われている。核消失細胞では骨小窩内に少量の無構造物質が残存し、いわゆる光顕所見でのempty lacunaのelectron lucentの部分が多くなっている。これらの骨細胞の虚血性変化の過程では人の大腿骨頭壊死や実験動物でしばしば遭遇する脂質顆粒は光顕所見と同じく骨小窩にも骨細胞質内にも観察されなかった。今回の実験で見られた骨細胞の変性から壊死に至る形態的变化はLukの報告した生理的に見られる低酸素状態の領域の変性骨細胞に類似している。これは前述した脂質の蓄積で起こる骨細胞の変性像とは明らかに異なることから骨細胞の壊死の発生には少なくとも2つの機序があるものと推測されるのである。今まで実験的に虚血状態で起こる骨細胞の経時的变化を観察したものはなく、骨壊死の発生の成因に関して重要な知見が得られたものとして価値ある集積といえる。よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。