

氏 名（本籍）	かし 檜	もと 本	おきむ 修
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）		
学 位 記 番 号	医 第 2 5 0 4 号		
学位授与年月日	平 成 5 年 2 月 24 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
最 終 学 歴	昭 和 58 年 3 月 25 日 東北大学医学部医学科卒業		
学 位 論 文 題 目	低温重合樹脂包埋法による骨粗鬆症の骨形成と吸収に 関与する酵素組織化学的研究 －海綿骨骨梁表面の酵素活性分布からみた骨粗鬆症の検討－		
	(主 査)		
論 文 審 査 委 員	教授 桜 井	実	教授 高 橋 徹
	教授 名 倉	宏	

# 論 文 内 容 要 旨

## 【目 的】

骨組織において酵素活性の染色をする場合、組織形態と酵素活性を同時に温存することは難しい。そこで、非脱灰骨組織を低温重合樹脂に包埋し研磨標本を作成することでこれらの問題点の解決をはかった。さらに、新しい視点として本方法を正常例と骨粗鬆症例の腸骨における骨組織形態計測法へ応用した。骨梁表面の骨形成のマーカー酵素であるアルカリ性フォスファターゼ (alkaline phosphatase : ALP) 活性と骨吸収のマーカー酵素である酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase : TRAP) 活性の分布と強弱という視点から骨粗鬆症の代謝を検討した。

## 【材 料 と 方 法】

新鮮骨組織を 4℃ の中性ホルマリンで固定し、アルコール脱水後、glycolmethacrylate (GMA) 系の低温重合樹脂 JB-4 による浸透を行い、4℃ の冷蔵庫内で重合させた。重合したブロックから観察面を切り出し、研磨後にアクリル板に貼りつけ、用手研磨法により約 20  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作成した。アゾ色素法による、ALP, TRAP 活性染色を行った。

家兎の大腿骨骨頭10コを用い ALP, TRAP の同時染色を行った。各骨頭骨端部を 4 領域に分け、計40領域において光学顕微鏡下に point counting 法で bone volume, ALP, TRAP の活性面の計測を行い各領域の染色性の再現性を検討した。

次いで、骨粗鬆症例（全例女性、平均年齢77.0歳）の29コと正常例（女性 6 例、平均年齢35.3歳、男性13例、平均年齢47.6歳）の19コの腸骨を用い、各症例 2 枚ずつの標本を作製し ALP, TRAP の染色を別々に行った。一標本15カ所において point counting 法により組織形態計測を行い、bone volume, 類骨面, 吸収面, ALP 活性面, TRAP 活性面を求めた。ALP 活性面を強弱で (++) と (+) の 2 段階に分け、類骨面も表面の ALP 活性の強弱で分類した。吸収面は TRAP 活性の有無で活性と非活性の吸収面を求めた。骨粗鬆症群のうち16例では tetracycline (TC) による石灰化前線のラベリングを行い、蛍光顕微鏡による観察を行った。

## 【結 果】

家兎大腿骨骨頭骨端部の40カ所の領域は bone volume がほぼ等しかった。この均等な bone volume の領域において、ALP, TRAP の活性面はどの領域でも、ほぼ同じ割合であり、有意差がみられなかった (Student-t-test)。すなわち、10枚の標本の40カ所の領域において、酵素活性

がむらなく染色され、染色性の再現性があることが確認できた。

ALP 活性面は骨粗鬆症群で $17.9 \pm 6.3\%$ であり、そのうち ALP (++) は $5.6 \pm 3.6\%$ 、ALP (+) は $12.3 \pm 4.4\%$ であった。正常群では $18.0 \pm 8.2\%$ の ALP 活性面を示し、内訳は ALP (++) が $9.9 \pm 4.7\%$ 、ALP (+) が $8.1 \pm 4.1\%$ であった。ALP 活性面全体を比較すると有意差がなかったが、ALP (++) は正常群に多く (Student-t-test,  $p < 0.01$ )、ALP (+) は骨粗鬆症群に多かった (Student-t-test,  $p < 0.01$ )。すなわち、骨粗鬆症群では正常群と比べて ALP の強い活性面の比率が小さく、ALP の弱い活性を示す面が多かった。すなわち、骨粗鬆症では活動性の弱い骨芽細胞が占める骨梁面が多いことが示唆された。また、骨粗鬆症では骨梁における類骨面が少ないだけでなく、ALP 活性の弱い類骨面、すなわち、骨形成が活発でない類骨面が多いことが判明した。TRAP 活性面は骨粗鬆症群が $13.1 \pm 6.8\%$ で、正常群が $11.3 \pm 3.2\%$ で骨粗鬆症群の方が多かったが統計学的に有意差はみられなかった。吸収面においては TRAP 活性陽性の活性吸収面が骨粗鬆症群に多かった ( $p < 0.01$ )。TC ラベリングと骨梁表面の酵素活性を組合せることで骨リモデリングにおける様々な過程が捉えられた。

## 【考 察】

酵素活性と骨組織形態を同時に温存することは難しいことであったが、非脱灰骨組織を低温重合樹脂に包埋し研磨標本を作成することで可能となった。しかも、人の腸骨などの大きな標本においても酵素活性の染色が可能で骨組織形態計測法への応用につながった。骨粗鬆症では ALP 活性の弱い類骨面が多いこと、吸収面においては TRAP 活性陽性の活性吸収面が多いことなど従来の骨組織形態計測法では捉えられない点から骨粗鬆症を評価できた。TRAP 活性面全体は骨リモデリングの細胞連鎖のうち吸収期と逆転期の両者を反映していると思われる。正常群では強い ALP 活性面と TRAP 活性面がほぼ等しいが、骨粗鬆症群における強い ALP 活性面と TRAP 活性面の不均衡は骨吸収から骨形成への逆転期の延長を反映していると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

骨組織は骨芽細胞によって形成され、破骨細胞によって一部破壊吸収されながら常に代謝を繰り返している。以前より海綿骨骨梁の表面の形態学的特徴から骨芽細胞に被覆されている骨形成部、扁平化した骨芽細胞によって覆われている不活性部分および破骨細胞によって陥没した形に吸収されている部分のそれぞれの面積の比率から、骨代謝の転換の速度などが類推されていた。著者はこの形態学的計測方法に加えて骨芽細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）および破骨細胞に含まれる酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（TRAP）の活性を組織化学的に染色し研究を進展させた。

即ち手技的に酵素活性の染色と組織形態の温存を兼ね備える組織標本の作成方法として新鮮骨組織材料を4℃の中性ホルマリンで固定した後、glycol methacrylate系の低温重合樹脂JB-4に浸透させ、空気に触れさせる事なく窒素ガスをその表面に送り約10日間をかけてゆっくり重合させる事により発熱による酵素の失活を防ぎ、かつ、この樹脂包埋ブロックから非脱灰標本を可能とした。先ず第一にこの様な新しい非脱灰硬組織標本による骨組織の形態学的計測に酵素組織化学を組み合わせた新しい手技の開発は極めて学問的に大きな貢献である。

著者は先ず、家兎の大腿骨骨頭の正常海綿骨骨梁についてALPが $67.6 \pm 7.7\%$ 、TRAPが $21.6 \pm 4.6\%$ といずれの場所においても同じ値で骨形成部と骨吸収部の一定の比率を示す再現性を確認した。尚、この場合の骨量の比率は全面積の $33.5 \pm 6.7\%$ であり、骨組織計測の基準となる。

ついで、骨粗鬆症の病態を明らかにするために大腿骨頸部骨折患者の腸骨、骨移植を必要とする患者で骨盤より骨組織を採取する際に得られた材料を対照群として比較検討した。その結果骨粗鬆症群、平均77.7歳の29例で骨量が $9.2 \pm 2.6\%$ であり、ALP活性を示す面積は $17.9 \pm 6.3\%$ 、TRAP活性部は $13.1 \pm 6.8\%$ である結果を得た。これは正常対照群合計19例の平均値である骨量面積 $15.7\% \pm 3.7\%$ に対し優位の差で骨量が減少し、厚生省班会議シルバーサイエンスの定義する確実な骨粗鬆症との間で有意な差を示したのみならず、ALPの活性を示す面が $18.0 \pm 8.2\%$ と正常群では明らかにその面積が大きく、しかも活性の強さにおいて $p < 0.01$ の有意差をもって骨粗鬆症の活性の低下している事が確認された。また、対象群のTRAPは $11.3 \pm 3.2\%$ であった。骨粗鬆症では骨吸収に関連する破骨細胞の他に単核細胞がTRAP活性を有し、骨吸収が極めて早い速度で進行しているという仮説の裏付けとして重要な知見も得ている。

総合的に骨粗鬆症においてはALPの活性に比しTRAP活性が大きく、骨構造改変の不均衡が生じていることなどを示唆する重要な情報を提供した点で十分学位論文に相当するものと思われる。