

骨腫瘍における走査電子顕微鏡的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8707

骨腫瘍における走査電子顕微鏡的研究

金沢大学医学部整形外科学教室 (主任: 野村 進教授)

伊 藤 元 弥

(昭和53年2月 日受付)

本論文の要旨は、第50回日本整形外科学会にて発表した。

悪性腫瘍細胞の生物学的、病理学的に大きな特性は浸潤性増殖と転移性増殖である。これらの特性は細胞の表面構造と密接な関係があり、それ故、かかる細胞の表面構造を立体構築学的に明らかにする事は悪性腫瘍細胞の生物学的特性を解明する上に重要な事である。

近年、細胞表面構造を観察するに大変有利な手段として走査型電子顕微鏡 (以下、走査電顕と略す) が開発されて来た。分解能の良さ、試料作製の容易さ、細胞の立体的観察が可能である、などの利点と相俟って、走査電顕が次第に医学面での研究に利用されるようになり、現在までに生体の各組織や細胞、特に *in vitro* の細胞の表面構造が次第に明らかにされて来たが、骨腫瘍細胞の *in vivo* に於けるかかる研究は極めて少い。

そこで今回、(1)骨腫瘍細胞の表面形態学的特徴、(2)骨腫瘍細胞とその肺転移巣細胞の表面形態学上の相違点、(3)良性細胞と悪性細胞の表面形態学上の比較、を検討する為に以下の如き実験材料を用いて走査電顕的観察を行った。

実験材料 (表1)

1. 臨床骨腫瘍材料. 金沢大学医学部整形外科及び関連病院を訪れた骨腫瘍症例から採取した骨腫瘍組織を観察した。

2. P³² 誘発ラット実験骨肉腫. 生後3~4週のWistar系ラット雌(体重20~30gr)20匹を用い、P³² (H₃P³²O₄ in 0.08NHCL solution)を体重1gr当り、1μCi あて、2週間に1回、26週間、計13回、1匹あたり総量2425μCiを腹腔内に注射し、大腿骨、脛骨、上腕骨に発生した骨肉腫とその肺転移組織を走査電顕的観察に供した。

3. マウス骨折後の類骨組織. 生後3~4週のddN雄マウス大腿骨を徒手にて皮下骨折を起さしめ、2週間後に骨折部の類骨組織を採取し走査電顕にて観察した。

4. Sr⁸⁹ 誘発マウス実験骨肉腫. 真鍋¹²⁾は幼弱 ddN雄マウスに Sr⁸⁹ を投与し、継代移植可能な実験的骨肉腫を発生せしめた。これは現在164代に移植されている。著者はこの160代目の継代移植骨肉腫を実験材料とし同様に観察した。なお、この肉腫には図1の如く、腫瘍性類骨は現在認められていない。

実験方法

実験材料1. に関しては次の如き操作により観察した。即ち材料を2×2×3mm大にピンセットで細片にし、2.5% glutaraldehyde (25% glutaraldehyde : P. B. S. = 1 : 9) で4°C.3時間半の前固定をし、P. B. S. で洗浄した後、1% OsO₄ (2% OsO₄ : P.B.S. = 1 : 1) で4°C.40分の後固定をし再びP.B.S. で洗浄した。次いで上昇 acetone 系列で脱水し、99% isoamylacetate に20分浸して acetone を置換し、直ちにHCP-1型臨界点乾燥装置に入れ、液体CO₂による臨界点乾燥を行った後、材料を銀ペースト又はセメダインホワイトで試料台に固定し、カーボンと金パラジウムにより回転蒸着、或いは日立電動ジ

表 1

実験材料

1 臨床骨腫瘍材料		
A	人骨肉腫	8
B	内軟骨腫	5
C	軟骨肉腫	3
D	骨巨細胞腫	5
E	ペーজেット肉腫	1
		計22例
2 P ³² 誘発ラット実験骨肉腫		
3 マウス骨折後の類骨組織		
4 Sr ⁸⁹ 誘発マウス実験骨肉腫		

Scanning Electron Microscopic Studies on Bone Tumors. Motoya Itoh, Department of Orthopaedic Surgery, Kanazawa University Medical School (Director: Prof. Dr. Susumu Nomura).

表 2
実験方法

試料	
前固定	2.5% glutaraldehyde, 3.5時間 4°C
後固定	P.B.S. で洗浄 1% OsO ₄ , 40分, 4°C P.B.S. で洗浄
脱水	50%, 70%, 90%, 95%, 100% acetone (×1)(×1)(×2)(×2)(×3) 各20分
置換	99% isoamylacetate, 20分
臨界点乾燥	液体 CO ₂
蒸着	回転蒸着 (C, Au) イオンスパッタリング (Au)
観察	HFS-2形, 20 Kv S-550, 20 Kv

バル機構付蒸着装置 HUS-5GB にて金パラジウムのスパッタ蒸着を行った。このようにして得られた試料を日立電界放射型電子顕微鏡 (HFS-2), 或いは、日立走査電子顕微鏡 (S-550) で加速電圧 20KV, 試料台傾斜角 0~45° にて観察し、写真撮影を行った (表 2)。

実験材料 2.3.4. に関しては次の如き操作を行った後観察した。即ち材料を 2×2×3mm 大にピンセットで細片にした後、

- ヒアルロニダーゼで 37°C, 2 時間作用させる,
- 0.14M NaCl で 0°C, 2 時間作用させる,
- 0.28M NaCl で 0°C, 2 時間作用させる,
- 0.5M NaCl で 0°C, 2 時間作用させる,
- 1.0M NaCl で 0°C, 2 時間作用させる,
- コントロール群: ヒアルロニダーゼ, NaCl で作用させない,

以上の 6 群に分けて各群の試料を 2.5% glutaraldehyde で 4°C, 3 時間半の前固定を行った後、表 2 に示す如く、実験材料 1. の場合と同様に試料を作製し、ヒアルロニダーゼ、或いは NaCl を作用させた面を観察した。

尚、以上の試料の観察面が目的とする部分を正確に把握していたか否かを確認する為、走査電顕にて観察した後試料台より剥がした試料を double embedding technique¹⁾ を用いて包埋し、5μm の切片をつくり H-E 染色を行い光顕で観察した。

実験結果

1. 臨床骨腫瘍材料

A. 人骨肉腫

観察された人骨肉腫細胞は細胞成分のまばらな部では球形及び卵円形を呈するものが多く、一方細胞の密に存在する部では大型の紡錘形あるいは卵円形細胞が多く見られた。細胞表面は、顆粒状物質に覆われているもの (図 2)、表面構造物が粗なもの (図 3)、が認められたが microvilli, blebs, filopodia, lamellipodia は見られず、細胞の相接する部でも intercellular bridges は認められなかった。細胞成分のまばらな部では図 2 の如く、細胞表面及び細胞間に顆粒状物質が認められ、あるいは図 4 の如く細胞表面及び細胞間の顆粒状物質が線維様配列を示している部もあった。細胞の密に存在する部では、その表面が顆粒状物質に覆われている細胞もあり (図 5)、又、図 3 の如く表面構造物が粗で顆粒状物質が少量附着する細胞も認められた。かかる部では細胞間の顆粒状物質はあまり認められなかった。

試料の作成に際して、2.5% glutaraldehyde による前固定の前に 1.0M NaCl で十分に洗浄した骨肉腫組織を見ると (図 6)、顆粒状物質と線維に覆われている細胞が認められ (図 7)、細胞表面の顆粒状物質と線維が互いに絡り合って細胞間の線維網と連絡しており、これら基質の各線維は互に集合して太い線維束を形成していた (図 8)。ここで見られた線維には、しばしば顆粒状物質が附着していた。

B. 内軟骨腫

内軟骨腫細胞はほぼ一定の大きさを示し、その形はほぼ球形、時に卵円形を呈した。細胞表面は網目状構造をとる極めて微細な顆粒状物質に覆われており (図 9)、microvilli, blebs 等は認められず、又、細胞が

相接している部でも intercellular bridges は認められなかった。基質を見るに図9の如く細胞表面から連続性に微細な顆粒状物質が網目状構造を呈して認められた。

人骨肉腫の場合と同様に、試料の作製に際して、2.5% glutaraldehyde の前固定の前で 1.0M NaCl で充分洗浄したのについて観察すると、細胞表面には微細顆粒状物質と線維が認められ、かかる線維表面には微細顆粒状物質が多量に付着していた。基質には線維網が見られ、これら線維にも微細顆粒状物質が少量付着しており、細胞表面の線維あるいは微細顆粒状物質と連絡していた(図10)。細胞が lacunae 内にある場合は図11の如く、細胞表面から線維が放射状に伸びて基質の線維網と連絡し、かつ、基質の線維網は一定の配列を示さず、その太さは $0.04\mu\text{m}$ で極めて細かった。

C. 軟骨肉腫

認められた腫瘍細胞は種々の大きさであり、細胞表面は、微細顆粒状物質に覆われているもの(図12)、表面構造物が粗なもの(図13)、が認められたが microvilli, blebs 等は認められず、又、細胞が相接する部でも intercellular bridges は認められなかった。基質では微細な顆粒状物質が密に結合して線維様配列を示していた(図14)。

1.0M NaCl で充分洗浄した後、2.5% glutaraldehyde で前固定して同様に作製した試料を観察すると、細胞表面には微細顆粒状物質による網目状構造が見られ(図15)、(図16)、一方、基質においては細線維が明瞭に観察され、かつ、その線維の走行には一定性は認められなかった(図17)。これら基質の線維は細胞表面の顆粒状物質と連絡していた。

D. 骨巨細胞腫

(i) 第I度骨巨細胞腫

基質細胞の大きさは略々一定で直径約 $6\mu\text{m}$ の球形及び卵円形を呈した。細胞表面は微細隆起を呈しているものが主として見られ(図18)、稀に microvilli に覆われているもの(図19)が認められた。かかる microvilli の太さはその根部から先端までほぼ一定で約 $0.1\mu\text{m}$ 、長さ約 $0.7\mu\text{m}$ でその多くはまっすぐに伸びていたが、時に分岐を示しているものもあった。filopodia, lamellipodia 等は認められず、細胞の相接する部でも intercellular bridges は認められなかった。

巨細胞はこれら基質細胞間に混在して認められ(図20)、長径 $30\sim 60\mu\text{m}$ まで種々の大きさを示し、その形も球形、卵円形、紡錘形を呈した。巨細胞表面は基質細胞と同様に微細隆起を呈し、filopodia,

lamellipodia, intercellular bridges は認められなかった。各細胞は互にかさなるように存在し、これら細胞間には顆粒状物質は少なかった。

(ii) 第II度骨巨細胞腫

基質細胞は大小不同で、長径 $8\sim 15\mu\text{m}$ であり、その形態は球形、卵円形、紡錘形を示し図21の如く、その表面突起構造物は極めて粗であった。blebs, intercellular bridges 等は認められず、又、細胞間には線維の形成は少なかった。

巨細胞は長径 $30\sim 40\mu\text{m}$ で紡錘形のもが主として見られ、その表面突起構造物は極めて少なかった(図22)。これらの細胞間には顆粒状物質や線維は少なかった。

E. ページェット肉腫

観察された細胞の大きさは大小不同で、その形も球形、卵円形、紡錘形といろいろな形態を示した。細胞表面は、顆粒状物質に覆われているもの(図23)、表面構造物の粗なもの(図24)、が認められたが microvilli, blebs 等は認められなかった。顆粒状物質を表面に有する細胞の存在する部の基質には顆粒状物質が見られ、細胞表面に同様に存在する顆粒状物質と連絡していた。

試料の作製に際して 1.0M NaCl で充分洗浄した試料を観察すると、腫瘍細胞表面は不規則な分布を示す microvilli に覆われており、顆粒状物質も僅かに認められた(図25)。基質の顆粒状物質は少く、線維の形態が明瞭に認められた(図26)。図27に示す如く、細胞表面の一部に残存せる顆粒状物質は互に結合し、線維と連絡しているのが認められた。これらの顆粒状物質は microvilli と密着して存在し、かかる microvilli は長さ $0.1\sim 2\mu\text{m}$ 、太さは根部から先端まで一定せず根部において扁平に拡大しており、途中で彎曲や分岐を呈すものも認められた。基質の線維は細胞から離れた部で図28の如く太い線維束を形成していた。

2. P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫

20匹のラットに P^{32} を注射し、8~12ヶ月の後、大腿骨、脛骨、上腕骨に骨肉腫が発生し、その発生率は20匹中15匹、即ち、75%を示した。これら骨肉腫は人骨肉腫に類似した osteoblastic な線像を示し、組織学的にも腫瘍性類骨形成が著明で(図29)、骨形成性肉腫であった。これら骨肉腫発生ラット15匹中6匹に肺転移果を認める事が出来た(図30)。

以上の骨肉腫の走査電顕の所見は次の如くであった。

(i) コントロール群(ヒアルロニダーゼ, NaCl 非作

用群)

ここで見られた腫瘍細胞の大きさは、大小不同で、卵円形あるいは球形を呈し、時に紡錘形のものも認められた。骨肉腫細胞表面には豊富な顆粒状物質が認められたが(図31)、microvilli, blebs等は認められなかった。細胞間にも多量の顆粒状物質が見られ、細胞表面のそれと密に連絡していた。これら細胞間の顆粒状物質が互に結合して線維様配列を示している部もわずかに認められた。

(ii) ヒアルロニダーゼ消化群

ヒアルロニダーゼで消化した後に観察しても腫瘍細胞表面及び細胞間の顆粒状物質に何ら変化を認めなかった。

(iii) 0.14M NaCl 作用群

0.14M NaClを作用させた後観察すると、細胞間を充填していた豊富な顆粒状物質が消失し、各細胞間には線維とそれに付着せる顆粒状物質が残存した。又、細胞表面の顆粒状物質は0.14M NaClによる影響を受けていない様に認められた。顆粒状物質の付着せる線維は細胞表面の顆粒状物質と連続している如くに認められた(図32)。

(iv) 0.28M NaCl 作用群

0.28M NaClを作用させると、細胞表面並びに細胞間に存在する線維表面の顆粒状物質は0.14M NaCl作用群に比し減少した。部位により細胞表面に線維が比較的明瞭に観察されたが、これらの線維になお顆粒状物質の付着が認められた(図33)。

(v) 0.5M NaCl 作用群

0.5M NaClを作用させると、各細胞間に存在せる線維表面の顆粒状物質は0.28M NaCl作用群に比し減少していた。細胞表面の顆粒状物質も減少し、0.28M NaCl作用群に比し細胞表面に線維の形態がやや明瞭に認められたが、なおこれらの線維に顆粒状物質が付着しており、かかる細胞表面の線維は細胞間の線維と連絡していた。細胞表面においては、なお、顆粒状物質の網目状構造を呈する部も存在した(図34)。

(vi) 1.0M NaCl 作用群

1.0M NaClを作用させた後観察すると、細胞間の線維はその形態を明瞭に表わしていたが、細胞の近くの線維にはなお、微細なる顆粒状物質が残存しており、かかる線維は細胞表面の顆粒状物質の付着せる線維網と、あるいは、細胞表面の網目状構造を呈する顆粒状物質と連絡していた。細胞表面にはなお、これら線維網と連絡せる顆粒状物質が残存していた(図35)。更に興味ある所見は、太さ約0.25 μ m、長さ0.3~2 μ mで長短不整、かつ、不規則な分布を示すmicrovilliに覆

われた細胞がその表面形態を明瞭に示していた事であり、かかるmicrovilliには、その根部で太さを増し比較的扁平になっているもの、あるいは、先端が球状に膨隆しているもの、も認められた(図36)。

(vii) 肺転移巣の所見

肺転移巣は球形、卵円形の腫瘍細胞からなっており、それらの大きさは大小不同であった。腫瘍細胞の多くは、表面構造物、殊に顆粒状物質の粗なものであり(図37)、かつ、顆粒状物質が細胞表面に存在しているものでも、それら物質は原発巣の細胞に比し、かなり少なかった(図38)。細胞間の顆粒状物質も一般に少なかったが、部位により、それらがかなり豊富に認められる部もあった(図39)。しばしば、細胞表面の一部に太さ約0.1 μ m、長さ0.2~0.8 μ mで長短不整のmicrovilliのある細胞が認められ(図40)、かかるmicrovilliは原発巣の1.0M NaCl作用により明瞭にされ得たmicrovilliの如き、根部が扁平化している像は見られず、これらmicrovilliのある細胞の周囲には、顆粒状物質はほとんど認められなかった。

3. マウス骨折後の類骨組織

(i) コントロール群(ヒアルロニダーゼ、NaCl非作用群)

ここで見られた骨芽細胞は略々一定の大きさで、その形は卵円形あるいは紡錘形を示した。細胞表面は豊富な顆粒状物質に覆われておりmicrovilli, blebsなどは認められなかった。細胞間には豊富な顆粒状物質が認められた(図41)。

(ii) ヒアルロニダーゼ消化群

ヒアルロニダーゼで消化した後に観察しても細胞表面構造に何ら変化を認めず、コントロール群と同様の所見を示した。細胞間物質も同様にヒアルロニダーゼの影響を受けなかった。

(iii) 0.14M NaCl 作用群

0.14M NaClで作用した後観察すると、細胞表面、細胞間の多くの顆粒状物質は消失し、細胞表面になお残存せる顆粒状物質と連絡して、細胞間に線維が見られ、かかる線維には顆粒状物質が付着していた(図42)。又、細胞間に顆粒状物質の線維様配列を呈する部も認められた。

(iv) 0.28M NaCl 作用群

0.28M NaClを作用させると細胞表面の顆粒状物質は0.14M NaCl作用群に比し減少していたが、細胞間では0.14M NaCl作用群とほぼ同様に線維の形態が比較的明瞭に見られる部と、なお顆粒状物質の線維様配列を呈する部(図43)が存在した。前者では、なお顆粒状物質の線維への少量の付着があった。

(v) 0.5M NaCl 作用群

0.5M NaCl を作用させると、細胞表面には顆粒状物質は少く、表面突起物が粗で ruffling の見られるもの(図44)、太さ約 $0.1\mu\text{m}$ 、長さ $0.1\sim 1\mu\text{m}$ で長短不整、不規則な分布を示す microvilli の明瞭に見られるもの、線維の network に覆われているもの(図45)、等が認められた。細胞間の線維は明瞭に認められ、各線維には顆粒状物質の付着はほとんど見られなかったが、これらの線維は細胞表面に少量残存せる顆粒状物質と連続しているもの、あるいは、細胞表面に形成されている線維の network と連続しているもの、が存在した。尚、ここで見られた microvilli はその根部が扁平かつ堤防状を呈しており、途中で彎曲や分岐を示すものも存在した。

(vi) 1.0M NaCl 作用群

この場合は 0.5M NaCl 作用後の所見と同様で、細胞表面は microvilli に覆われているもの、表面突起物が粗で ruffling を示すもの、線維に覆われているもの、等が認められた。cellular な部から離れて細胞が少く基質が密に存在する部では、線維の形態が明瞭で、かつ、走行に統一性が認められない、目の極めて密な network を形成していた。この部の細胞には、表面に microvilli とわずかの顆粒状物質が見られ、かかる顆粒状物質は基質の線維と連絡していた。これらの細胞の有する microvilli は扁平に拡大し、大小様々の舌状の形態を示し、しばしば、その先端が棒状となつていをもものもあり、これら microvilli が細胞表面に不規則な分布を示していた(図46)。

4. Sr⁸⁹ 誘発マウス実験骨肉腫

(i) コントロール群(ヒアルロニダーゼ、NaCl 非作用群)

観察された腫瘍細胞は大小不同で、その形も球形、卵円形、紡錘形といろいろな形態を示した。細胞表面は、表面構造物が粗なもの(図47)、microvilli に覆われているもの(図48)が認められたが、blebs, filopodia, lamellipodia, intercellular bridges 等は認められなかった。これら細胞間には顆粒状物質はほとんど認められなかった。ここで見られた microvilli の長さは $0.2\sim 2\mu\text{m}$ まで種々あり、太さは根部から先端までほぼ一定で約 $0.15\mu\text{m}$ で、かつ、不規則な分布を示し、細胞表面より各種方向にほぼまっすぐに伸びていた。

(ii) ヒアルロニダーゼ消化群、NaCl 作用群

ヒアルロニダーゼ消化及び NaCl 作用後に観察しても腫瘍細胞の表面構造はコントロール群と同様の所見を呈した。

考 察

走査電顕の発達に伴い悪性腫瘍細胞の表面微細構造の研究が急速に進歩して来た。即ち、1970年 Hodges⁶⁾ はマウス由来の transformed cell (CBM17, CBM18N) を用いて cellular contact と細胞表面形態との関係を報告し、次いで 1972年 Boyde²⁾ は試料作製の方法論的見地 (Air drying, Freeze drying, Critical point drying) から LW/13/K2A cells, LW13/RSK4 cells, PyY cells, S180 cells, 等の表面形態を観察した。Porter¹⁴⁾⁻¹⁷⁾ らは 1973年、1974年に同調培養せる Chinese Hamster Ovary cells (CHO cells), transformed CHO cells, HeLa cells と人正常子宮頸部上皮細胞, hepatoma 129, neuroblastoma CH1300, などの表面形態を走査電顕で観察し、悪性化した細胞表面には microvilli, blebs, lamellipodia, ruffles などの突起構造物がその発生母細胞に比して著明となる事、悪性化した細胞には接触抑制機構が低下、又は、喪失している事、悪性細胞の表面構造は cell cycle の時期及び環境によって異なる事などを指摘した。Vessely¹⁹⁾ らもほぼ同様の観察を行い、又、Malick¹¹⁾ らも 1976年 C₃H/10T_{1/2}CL8 cells を in vitro にて DMBA 及び MCA で悪性化した後 (DMBA-TCL₁, MCA-TCL_{15'}) 走査電顕で観察し、これら細胞は発生母細胞に比し microvilli, blebs, ruffles を多く有すると報告した。一方、in vivo のものについてのこの方面の研究では Jordan⁷⁾ らの子宮頸部癌の観察、Clark³⁾ の膀胱癌の観察、Fenoglio⁴⁵⁾ による ovarian mucinous cystadenoma 及び colon adenoma の研究、等が報告された。骨腫瘍細胞の走査電顕的観察に関しては、真鍋¹³⁾ ら、富田¹⁹⁾ のヒト骨肉腫培養細胞の表面構造及びこの細胞を ATS-treated ddN mouse (conditioned ddN mouse) に異種移植して出来た腫瘍の細胞表面構造についての詳細な報告がある。即ち、真鍋ら、富田はこの細胞の in vitro で colony formation と in vivo で tumor formation の主役をなすものは各細胞間に認められる intercellular bridges であると述べ、更に、blebs, filopodia, lamellipodia, intercellular bridges などの細胞表面突起構造物は細胞の増殖と環境によって microvilli から発達し形態変化を行った結果生じたものと結論し、これら細胞表面構造物は細胞の代謝、分裂、分泌機能によって互に変化するものであろうと推論した。

さて、本研究に於ては、人骨肉腫、内軟骨腫、骨巨細胞腫、ページット肉腫、P³² 誘発ラット実験骨肉腫、マウス骨折後の類骨組織及び Sr⁸⁹ 誘発マウス実験

骨肉腫（継代移植腫瘍）の *in vivo* での細胞表面、細胞間の形態を観察した。これら各細胞の表面構造及び細胞間構造の特徴をまとめると次の如くなる。

人骨肉腫では、基質形成のほとんど認められない cellular な部を観察すると、細胞表面は顆粒状物質に覆われているものが主として見られたが、一部に表面構造物が粗で顆粒状物質が僅かに存在するものがあつた。基質形成のある部に於ては、細胞表面は顆粒状物質に覆われているものが認められ、かかる顆粒状物質が互に結合して線維様配列を示し、基質へその形態を保持したまま移行している部が認められた。試料の作製に際して 1.0M NaCl で充分洗浄した後に観察すると、細胞表面では顆粒状物質と線維が見られ、これらは互に絡り合いながら基質の線維網と連絡しており、ページェット肉腫においても、これと類似した所見が得られた。

以上の事から、顆粒状物質は骨形成の腫瘍細胞及びまわりの線維に付着しているものであり、かつ基質の線維形成に関連して存在するものであろうと推測されよう。

次に顆粒状物質が細胞突起構造にいかなる変化を及ぼすかが問題となる。ページェット肉腫において見られた如く、顆粒状物質が microvilli と密着して存在する場合は、microvilli の根部が顆粒状物質の存在により扁平に拡大させられたり、途中で彎曲させられたりするものも認められ、即ち、microvilli はその上に存在する豊富な顆粒状物質により圧迫を受け、変形するものと推測された。

内軟骨腫の細胞は微細な顆粒状物質によって覆われた細胞から成るに反し、軟骨肉腫では、かかる細胞のほかに表面のやや平滑な細胞が見られた。この2つの腫瘍に見られた微細顆粒状物質を有する細胞においては、これら顆粒状物質が互に結合して網目状構造を呈し基質の微細顆粒状物質と連絡していた。人骨肉腫の場合と同様に試料の作製に際して、1.0M NaCl で充分洗浄した後に観察すると、細胞表面に線維が見られ、これは基質の線維網と連絡している事が判明した。この事より、類骨形成腫瘍に於ても、類軟骨形成腫瘍に於ても、かかる顆粒状物質は線維が細胞外で形成されるに際して何らかの役割を果しているように思われたが、骨肉腫の場合に比し内軟骨腫及び軟骨肉腫の細胞では、顆粒状物質がより微細であり、より密に network を形成していた事が判明した。

骨巨細胞腫では、人骨肉腫、ページェット肉腫、内軟骨腫および軟骨肉腫に見られたような顆粒状物質はこれら細胞表面及び細胞間に認め難く、この点、類骨、

類軟骨形成のない骨巨細胞腫は、表面構築学的に上記骨腫瘍とまったく異った態度を示していると言えよう。骨巨細胞腫において、細胞表面に認められた microvilli は前述のページェット肉腫のそれと異り、密生せる microvilli が compact にまっすぐ伸び、その形も一様に棒状で根部の扁平化、大きな彎曲などは認められず、このことは、この腫瘍細胞の表面に顆粒状物質などによる圧迫がないことに由来すると考えられる。

臨床骨腫瘍材料の観察では以上の如き特徴が見られ、殊に人骨肉腫、内軟骨腫、軟骨肉腫、ページェット肉腫などの細胞表面及び細胞間に見られた顆粒状物質は、NaCl によってかなり変化する事が判明したので、 P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫、マウス骨折後の類骨組織及び Sr^{89} 誘発マウス実験骨肉腫にヒアルロニダーゼおよび各種濃度の NaCl を作用させ、細胞表面、細胞間の顆粒状物質の変化を検討した。

まず、 P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫の原発巣の細胞についてヒアルロニダーゼ、各種濃度の NaCl を作用させて以下の3点を明らかにし得た。

1. ヒアルロニダーゼ消化後に観察しても細胞表面あるいは細胞間の顆粒状物質に何らの変化も認められなかった。即ち、顆粒状物質にヒアルロン酸の関与を明らかにし得なかった。

2. NaCl を作用させて、その影響を受けたものは細胞表面及び細胞間の顆粒状物質であった。先ず、0.14M NaCl を作用させると細胞間の顆粒状物質はほとんど消失し、次いで 0.28M NaCl を作用させると、細胞表面及び細胞間の線維に付着する顆粒状物質が減少し、0.5M NaCl 作用の場合は更に、細胞表面、細胞間の顆粒状物質はより減少し、細胞表面の線維の形態がやや明瞭に認められ、これら線維は細胞間の線維と連絡しているのが見られた。1.0M NaCl を作用させると細胞間の線維はその形態を明瞭に表し、細胞表面の線維網あるいは残存せる顆粒状物質と連絡していた。

3. 細胞表面の顆粒状物質が NaCl 作用により消失すると、細胞表面に microvilli が存在する場合は、その形態が明瞭にされ得た。即ち、細胞表面突起構造物は顆粒状物質によりマスクされていると言える。

以上の3点を明らかにし得たが、マウス骨折後の類骨組織に同様の実験を行い、

1. ヒアルロニダーゼ消化により、細胞表面及び細胞間の顆粒状物質は変化を受けない事、

2. NaCl 作用により、顆粒状物質が消失すると microvilli に覆われている細胞では、その細胞表面形態が明らかにされ得る事、

以上の2点は P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫の場合と同様であった。しかし各種濃度NaClに対する顆粒状物質の溶解消失の態度が異なる。即ち、0.5M NaCl作用で細胞表面及び細胞間の顆粒状物質はほぼ完全に消失し、細胞表面形態及び細胞間線維を明瞭に認める事ができた。

以上の事から、類骨、類軟骨、等を形成する細胞及び細胞間に認められた顆粒状物質はNaClに可溶性の物質であり、かつ、類骨形成の全く認められない Sr^{89} 誘発マウス実験骨肉腫では、このような物質は認められ難かった事から、この顆粒状物質は基質形成に重要な役割を果す物質と考えられる。梶川⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾は線維芽細胞表面に微細フィラメントと H^3 -prolineの集積を示す等質性物質を含む無定形物質を観察したが、この物質と著者の観察した顆粒状物質が類似したものであろうと推定されるが、今後この点に関しての研究が望まれる。

次に P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫の肺転移巣の細胞の所見から次の2点が言える。

1. 肺転移巣には、細胞表面に顆粒状物質の粗な細胞が存在していた事が判明した。

2. 細胞表面及び細胞間に顆粒状物質が認められる部があり、当然の事ながら原発巣の細胞のもつ表面形態学的性格を保持したまま転移する細胞がある事を示している。しかし、肺転移初期の細胞がいかなる表面形態を有していたか、又、いかなる過程を経て顆粒状物質の粗な細胞が増殖するに至ったかについては、不明であると言ねばならない。

次に P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫、マウス骨折後の類骨組織及び Sr^{89} 誘発マウス実験骨肉腫で見られたmicrovilliを比較すると、次の如き2点が指摘され得る。

1. P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫及びマウス骨折後の類骨組織では、顆粒状物質がNaClで溶解消失した後に細胞表面に見られたmicrovilliは途中で彎曲したり、あるいは、根部が扁平、かつ堤防状を呈していた。この事実はページェット肉腫の場合と同様、その上に存在した顆粒状物質による影響の為、生じたものと解せられた。

2. Sr^{89} 誘発マウス実験骨肉腫ではmicrovilliは細胞表面より各種方向にほぼまっすぐに伸びており、その太さは根部より先端までほぼ一定であった。基質形成の認められない骨巨細胞腫でも同様の形態を示すmicrovilliが認められた事より、かかるmicrovilliは顆粒状物質などの影響を受けていなかったものと考えられた。

以上の如く、細胞表面における突起構造物は環境によって異り、それに接する顆粒状物質により形態の変化が生じていると考えられた。

最後に、腫瘍性類骨形成のない Sr^{89} 誘発マウス実験骨肉腫では顆粒状物質は認め難く、又、同じ骨肉腫でも類骨形成のある P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫では、かかる顆粒状物質が存在した。又、類骨形成にあずかる骨芽細胞にも同様にこの物質が認められたので、これらの事実から、骨芽細胞と骨肉腫細胞の表面形態の相異は、とりもなおさず、細胞の類骨形成能の有無に何らかの関連があると思われた。

結 語

走査電顕を用いて、人骨肉腫、内軟骨腫、軟骨肉腫、骨巨細胞腫、ページェット肉腫及び P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫、マウス骨折後の類骨組織、 Sr^{89} 誘発マウス実験骨肉腫を観察し次の結論を得た。

1. 類骨形成腫瘍及び類軟骨形成腫瘍において、細胞表面、細胞間に認められた顆粒状物質はNaCl可溶性物質であり、かつ、線維の細胞外形成過程で何らかの役割を果しているものと考えられた。

2. 類軟骨形成腫瘍の細胞表面及び細胞間に見られた顆粒状物質は、類骨形成腫瘍で認められたものに比し微細であり、又、かかる物質が付着している基質の線維も細かった。

3. P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫及びマウス骨折後の類骨組織に0.14M、0.28M、0.5M、1.0M NaClを作用させると、細胞表面及び細胞間の顆粒状物質は、NaClの濃度の上昇につれて順次消失して、細胞及び線維の形態が明瞭になった。

4. 骨芽細胞と骨肉腫細胞の細胞表面及び細胞間で認められた顆粒状物質はヒアルロニダーゼで消化されなかった。

5. P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫の肺転移巣には、主として顆粒状物質の粗な細胞が見られたが、原発巣と同様に、細胞表面に顆粒状物質を有する細胞が一部で認められた。これら2種の細胞が如何なる理由で同時に認め得たかは、本実験では明らかにし得なかった。

6. ページェット肉腫、 P^{32} 誘発ラット実験骨肉腫、マウス骨折後の類骨組織で見られたmicrovilliは、その上に存在する顆粒状物質により圧迫を受け、形態変化を起しており、一方、骨巨細胞腫、 Sr^{89} 誘発マウス実験骨肉腫など基質形成の認められない腫瘍で見られるmicrovilliは顆粒状物質の影響を受けていない如く存在した。即ち、細胞表面における突起構造物は環境によって異り、それに接する顆粒状物質により形

態の変化が生じていると考えられた。

7. 骨芽細胞と骨肉腫細胞の表面形態の相違は類骨形成能の有無に関連してくるらしく、良性細胞としての骨芽細胞と、悪性細胞としての骨肉腫細胞との間には、表面構造上の相違点を特に論及出来なかった。

稿を終るに臨み、始終御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜りました恩師野村進教授に衷心より謝意を捧げます。また終始御指導いただきました当教室真鍋昌平講師に深謝します。又御協力下さいました富田勝郎講師はじめ宗広忠平先生、野村忠雄先生ならびに安田俊久文部技官、日製産業電顕技師諸氏に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Ayres, A., Allen, J. M. & Williams, A. E. : J. Microsc., 93, 247 (1971).
- 2) Boyde, A., Weiss, R. A. & Vessely, P. : Exptl. cell Res., 71, 313 (1972).
- 3) Clark, M. A., O'Connell, K. J. : Microscopy, II T Res. Inst., Chicago, 581 (1973).
- 4) Fenoglio, C. M., Ferenzy, A. & Richart, R. M. : Cancer Res., 36, 1709 (1975).
- 5) Fenoglio, C. M., Richart, R. M., Kaye, G. I. : Gastroenterology., 69, 101 (1975).
- 6) Hodges, G. M. : Eur. J. cancer., 6, 235 (1970).
- 7) Jordan, J. A., Williams, A. E. : J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm., 78, 940 (1971).
- 8) 梶川欽一郎 : 実験形態学誌, 20, 1 (1966).
- 9) 梶川欽一郎 : 結合組織, 宇宙堂八木書店, 東京, 128 (1968).
- 10) 梶川欽一郎 : コラーゲン, 南江堂, 東京, 137 (1975).
- 11) Malick, L. E., Langenbach, R. : J. Cell. Biol., 68, 654 (1976).
- 12) 真鍋昌平 : 十全医会誌, 69, 93 (1963).
- 13) 真鍋昌平 : 中部整災誌, 19, 1 (1976).
- 14) Porter, K. R. & Fonte, V. G. : Scanning Electron Microscopy, II T Res. Inst., Chicago, 683 (1973).
- 15) Porter, K. R., Prescott, D. & Frye, J. : J. cell Biol., 57, 815 (1973).
- 16) Porter, K. R., Puck, T. T., Hsie, A. W. & Kelly, D. : Cell., 2, 145 (1974).
- 17) Porter, K. R., Fonte, V. & Weiss, G. : Cancer Res., 34, 1385 (1974).
- 18) 富田勝郎 : 十全医会誌, 85, 93 (1976).
- 19) Vessely, P. & Boyde, A. : Scanning Electron Microscopy II T Res. Inst., Chicago, 689 (1973).

図 説 明

- 図1. Sr⁸⁹ 誘発実験骨肉腫の組織像
H・E染色 ×200
- 図2. 細胞成分のまばらな部を示す。細胞表面および細胞間に豊富な顆粒状物質が見られた。(人骨肉腫)
- 図3. 表面構造物が粗な細胞が見られた(人骨肉腫)
- 図4. 顆粒状物質に覆われている細胞を示す。細胞表面及び細胞間の顆粒状物質が線維様配列(↑)を示している部もあった。(人骨肉腫)
- 図5. cellular な部を示す。顆粒状物質に覆われている細胞が見られたが、細胞間には顆粒状物質はあまり認められなかった。(人骨肉腫)
- 図6. 顆粒状物質と線維の見られる細胞を示す。(人骨肉腫)
- 図7. 図6の強拡大像を示す。各顆粒状物質間に線維が認められた。(人骨肉腫)
- 図8. 基質の線維束を示す。(人骨肉腫)
- 図9. 微細顆粒状物質に覆われている細胞を示す。細胞表面の微細顆粒状物質が網目状構造をとり基質へ移行していた。(内軟骨腫)
- 図10. 微細顆粒状物質と線維に覆われている細胞を示す。基質では線維網が認められた。(内軟骨腫)
- 図11. lacunae 内にある細胞を示す。細胞表面から線維が放射状に伸びて基質の線維網と連絡していた。(内軟骨腫)
- 図12. 微細顆粒状物質に覆われている細胞を示す。(軟骨肉腫)
- 図13. 表面構造物が粗な細胞を示す。(軟骨肉腫)
- 図14. 基質では微細な顆粒状物質が密に結合して線維様配列を示していた。(軟骨肉腫)
- 図15. 細胞表面の微細顆粒状物質による網目状構造を示す。基質では線維網が明瞭に認められた。(軟骨肉腫)
- 図16. 図15の強拡大像を示す。(軟骨肉腫)
- 図17. 基質の線維の network を示す。(軟骨肉腫)
- 図18. 基質細胞
細胞表面は微細隆起を呈していた。(第1度骨巨細胞腫)
- 図19. 基質細胞
microvilli に覆われている細胞を示す。microvilli の多くはまっすぐに伸び、分岐を示すものも認められた。(第1度骨巨細胞腫)
- 第20. 巨細胞(↑)
細胞表面は微細隆起を呈した。(第1度骨巨細胞腫)

第21. 基質細胞

基質細胞は大小不同で表面突起構造物は粗であった。(第II度骨巨細胞腫)

図22. 巨細胞

細胞表面突起構造物は粗であった。(第II度骨巨細胞腫)

第23. 顆粒状物質に覆われた細胞(↑)を示す。(ページェット肉腫)

図24. 表面構造物の粗な細胞を示す。(ページェット肉腫)

図25. microvilli に覆われた細胞を示す。(ページェット肉腫)

図26. 図25の弱拡大像を示す。基質の線維の形態は明瞭に認められた。(ページェット肉腫)

図27. 細胞表面に microvilli と顆粒状物質が密着して存在した。(ページェット肉腫)

図28. 基質の太い線維束を示す。(ページェット肉腫)

図29. P³² 誘発ラット実験骨肉腫

H・E染色 ×100
腫瘍性類骨形成が著明に認められた。

図30. P³² 誘発ラット実験骨肉腫

肺転移巣 H・E染色 ×100

図31. コントロール群

細胞表面, 細胞間に豊富な顆粒状物質が認められた。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図32. 0.14M NaCl 作用群

細胞間の豊富な顆粒状物質が消失し各細胞間に線維とそれに付着せる顆粒状物質が残存した。細胞表面にはなお顆粒状物質が見られた。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図33. 0.28M NaCl 作用群

細胞表面では部位により線維が比較的明瞭に観察された。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図34. 0.5M NaCl 作用群

細胞表面, 細胞間の顆粒状物質は減少し細胞表面の線維の形態がやや明瞭に認められた。顆粒状物質の付着せる細胞表面の線維は細胞間の線維と連絡していた。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図35. 1.0M NaCl 作用群

細胞間の線維はその形態を明瞭に表し細胞表面の線維網あるいは、なお残存せる顆粒状物質と連絡していた。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図36. 1.0M NaCl 作用群

microvilli に覆われた細胞を示す。長短不整かつ不規則な分布を示す microvilli には根部で扁平に拡大したり, あるいは, 先端が球状に膨隆するものが

認められた。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図37. 肺転移巣

表面構造物の粗な細胞を示す。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図38. 肺転移巣

顆粒状物質の見られる細胞を示す。原発巣の細胞に比し顆粒状物質はかなり少なかった。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図39. 肺転移巣

細胞間に顆粒状物質が認められる部を示す。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図40. 肺転移巣

microvilli の見られる細胞を示す。(P³² 誘発ラット実験骨肉腫)

図41. コントロール群

細胞表面及び細胞間に豊富な顆粒状物質が見られた。(マウス骨折後の類骨組織)

図42. 0.14M NaCl 作用群

細胞表面, 細胞間の多くの顆粒状物質は消失し細胞表面に残存せる顆粒状物質と連絡して細胞間に線維が見られた。これらの線維には, なお顆粒状物質の付着が見られた。(マウス骨折後の類骨組織)

図43. 0.28M NaCl 作用群

細胞表面の顆粒状物質は 0.14M NaCl 作用群に比し減少していた。細胞間に見られる線維には, なお顆粒状物質の付着が認められた。(マウス骨折後の類骨組織)

図44. 0.5M NaCl 作用群

表面突起物が粗で ruffling の見られる細胞(↑), microvilli の見られる細胞(↑)を示す。細胞間には, 或いは基質に線維が明瞭に認められ, 顆粒状物質の付着はほとんど見られなかった。(マウス骨折後の類骨組織)

図45. 0.5M NaCl 作用群

線維の network に覆われている細胞(↑), microvilli の見られる細胞(↑)を示す。細胞表面を覆っている線維の network より線維が細胞間, 基質に伸びており, 部位により, これらの線維が集合して線維束を形成しているのが認められた。(マウス骨折後の類骨組織)

図46. 1.0M NaCl 作用群

基質の線維が密に存在する部を示す。線維は形態が明瞭で, 走行に統一性が認められず, 目の極めて密な network を形成していた。かかる部の細胞には, 大小様々の舌状の形態を示す microvilli が見られた。(マウス骨折後の類骨組織)

図47. 表面構造物の粗な細胞を示す。(Sr⁸⁹ 誘発マウス
実験骨肉腫)

整の microvilli は細胞表面よりほぼまっすぐに伸
びていた。(Sr⁸⁹ 誘発マウス実験骨肉腫)

図48. microvilli に覆われている細胞を示す。長短不

A b s t r a c t

Surface morphological observations of benign and malignant bone tumors were made by the use of scanning electron microscopy.

Tumor materials were obtained directly from patients of osteogenic sarcomas, chondrosarcomas, enchondromas, giant cell tumors and Paget's sarcoma. To compare with these human tumors, the following experimental materials were also observed : P³²-induced rat osteogenic sarcomas with their pulmonary metastatic lesions, Sr⁸⁹-induced transplantable mouse osteogenic sarcomas and osteoid tissues arising after artificial fractures in mice.

One of the most outstanding findings was a lot of granular substances seen on cell surfaces and their intercellular spaces in osteoid or chondroid forming tissues. These substances were considered to do some parts in collaborating extracellular matrix formation. Protrusions on cell surface, such as microvilli were more or less fashioned by these granular substances.

Additional experiments revealed these substances to be soluble in sodium chloride solution.

Benign osteoid forming cells, such as osteoblasts and osteoblastic osteosarcoma cells had granular substances on their surfaces and their intercellular spaces. On the other hand, undifferentiated transplantable osteosarcoma which formed no osteoid or chondroid matrix had none of these granular substances. Consequently, the difference of surface morphology between osteosarcoma cells and osteoblasts was yet to be especially concluded.

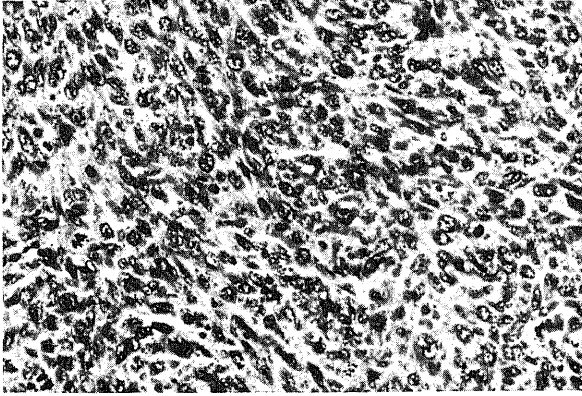


図 1

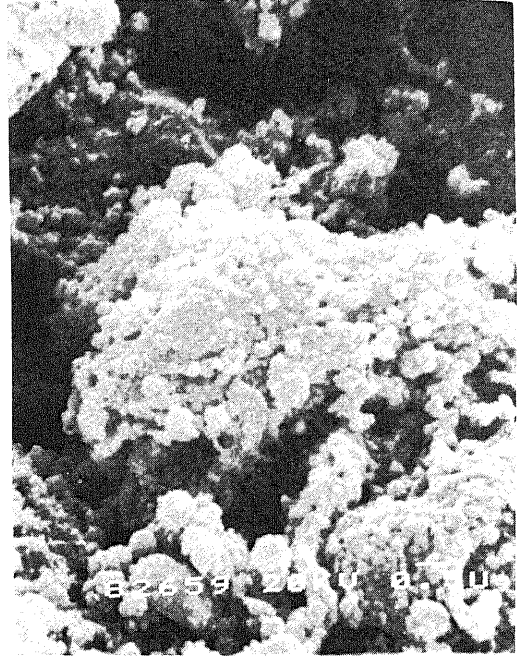


図 2

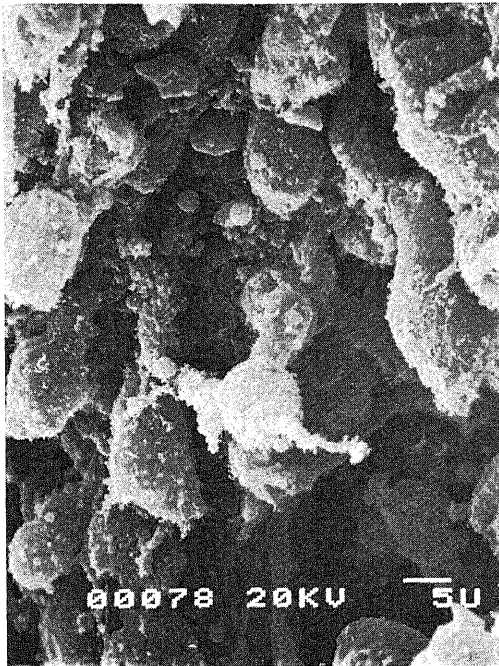


図 3

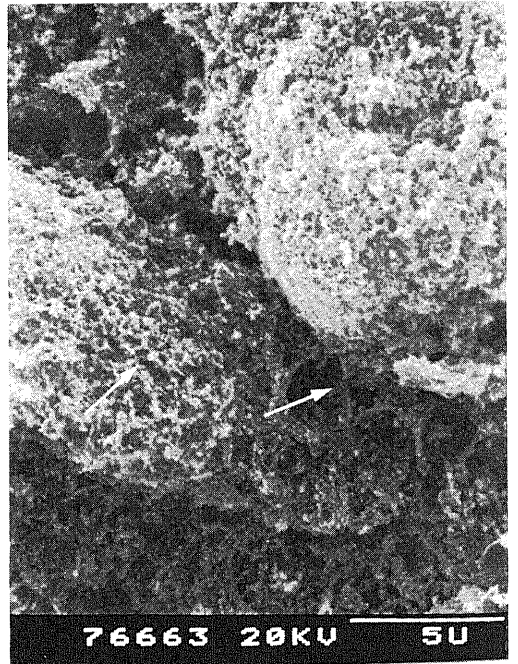


図 4

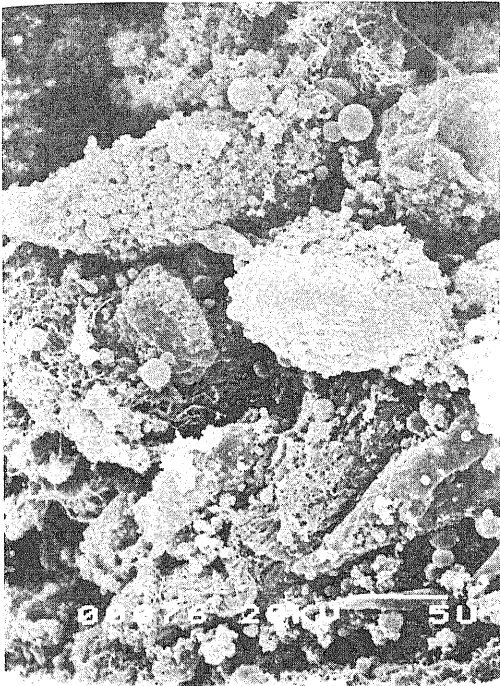


図 5

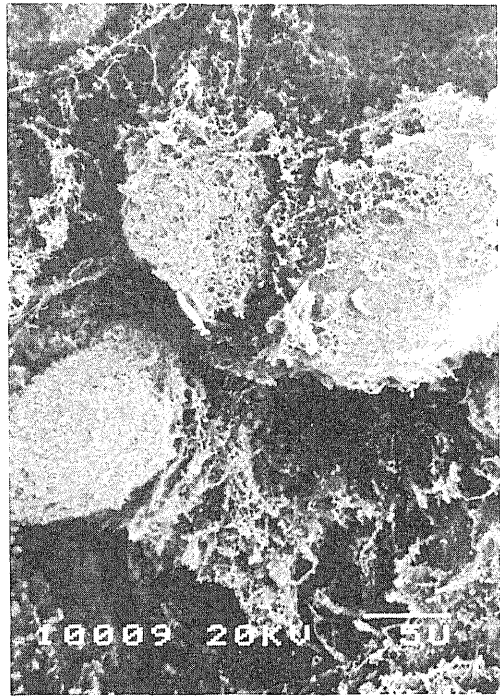


図 6

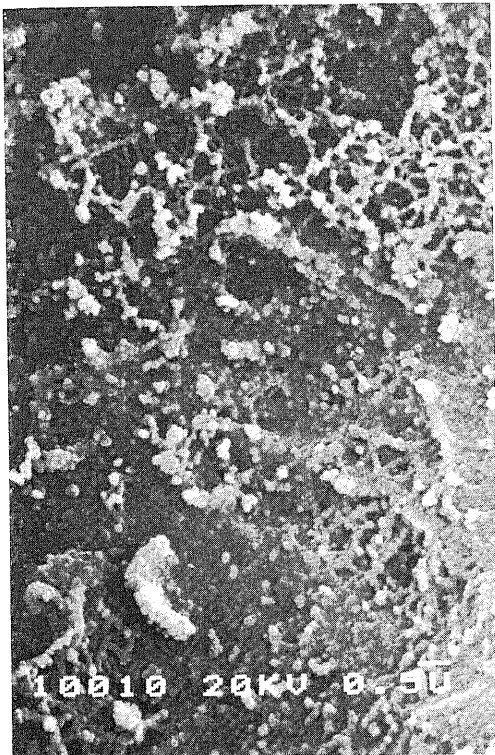


図 7

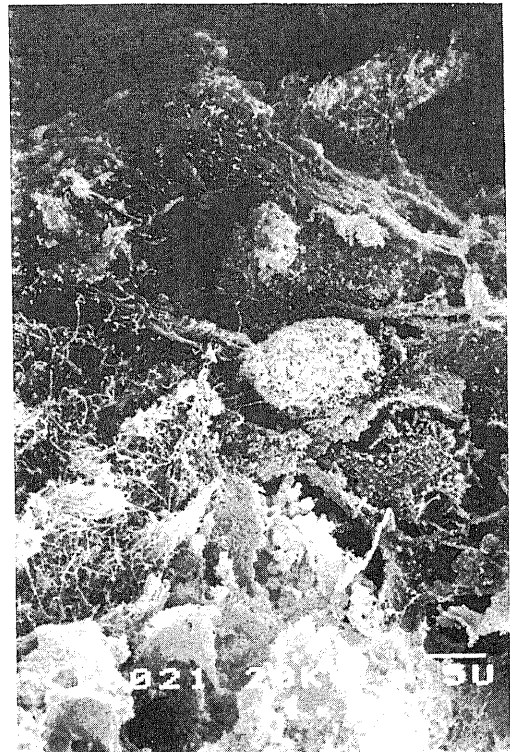


図 8

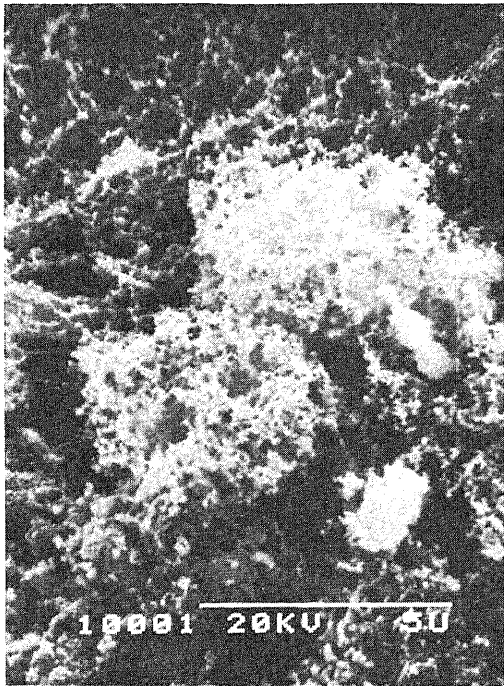


图 9

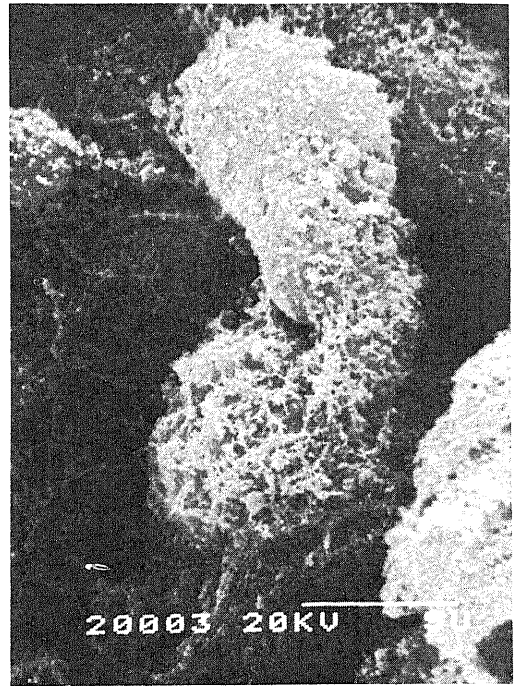


图 10

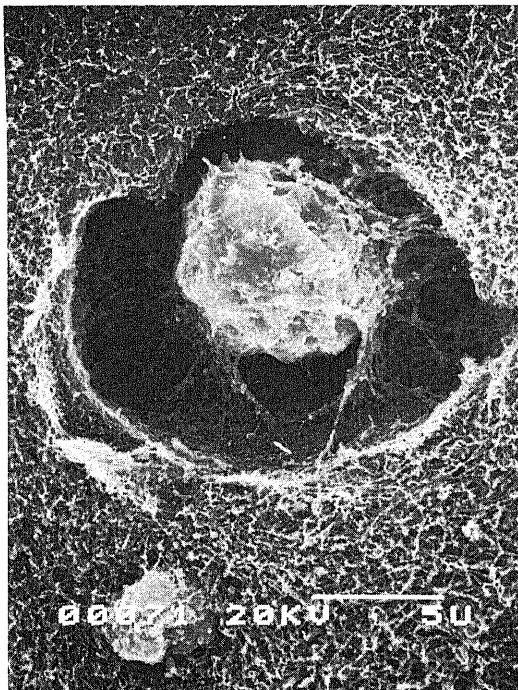


图 11

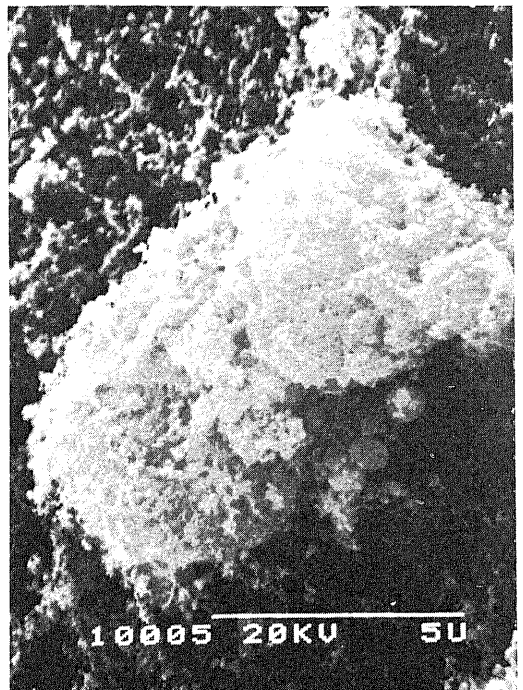


图 12

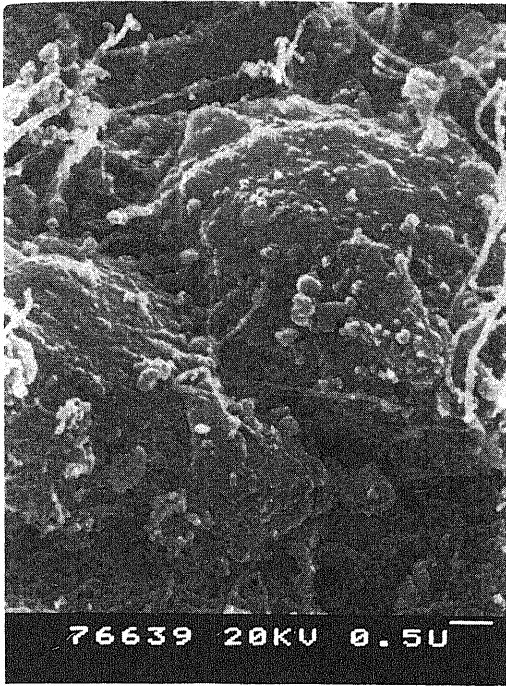


図 13

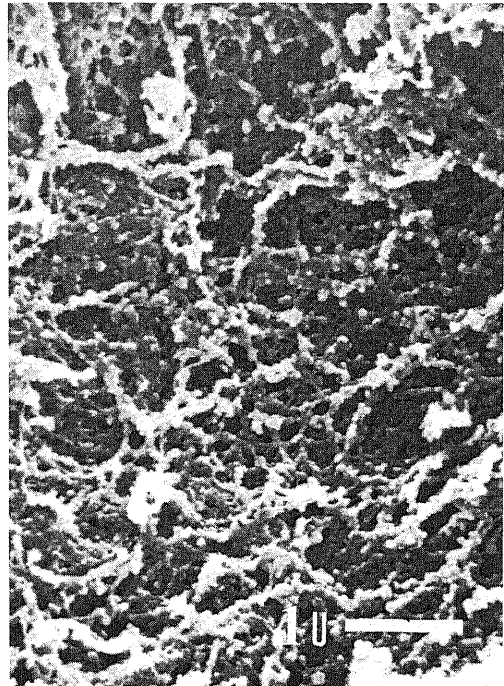


図 14

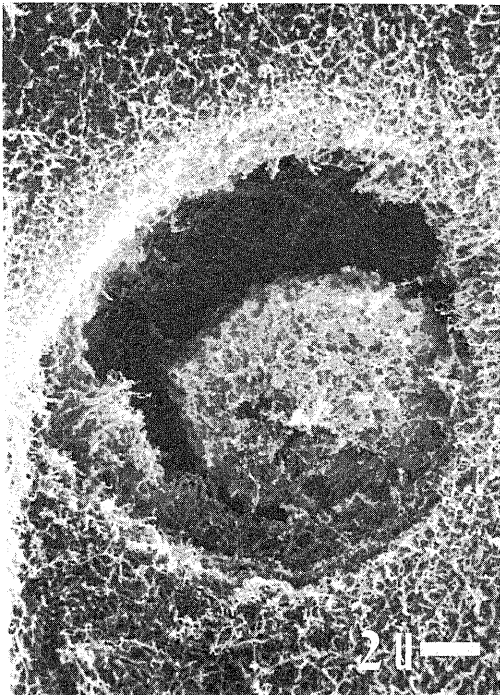


図 15

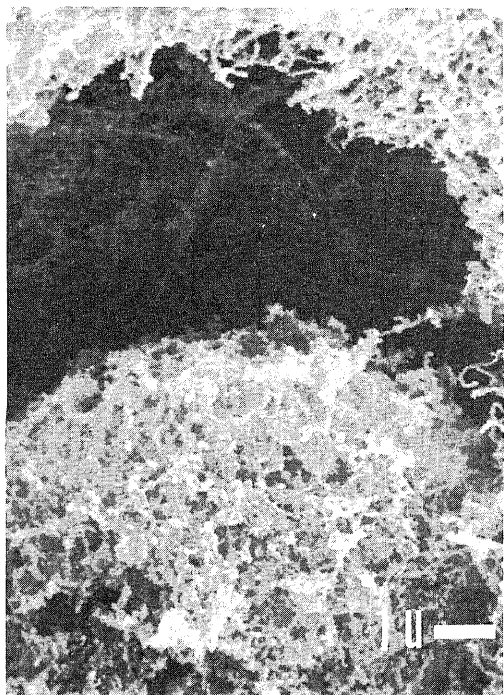


図 16

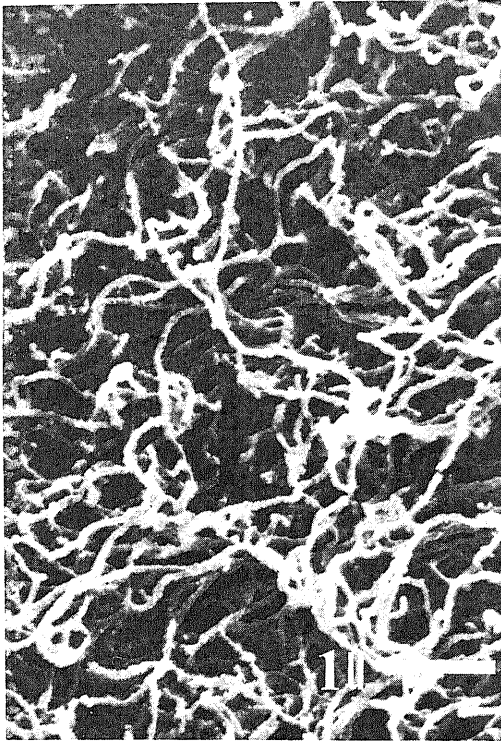


图 17

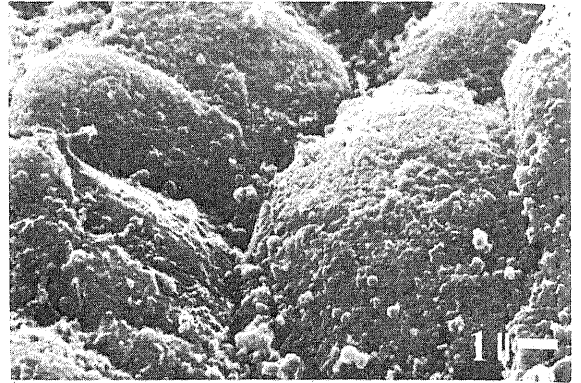


图 18

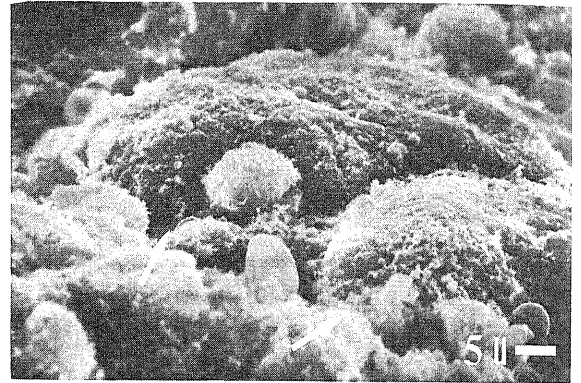


图 20



图 19

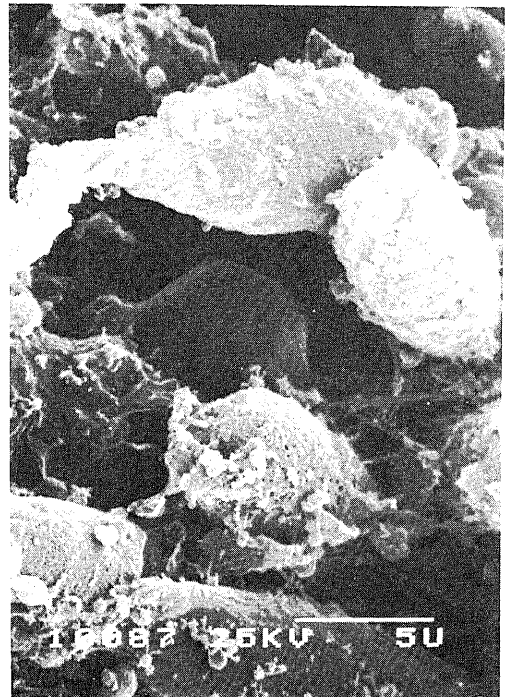


图 21



図 22

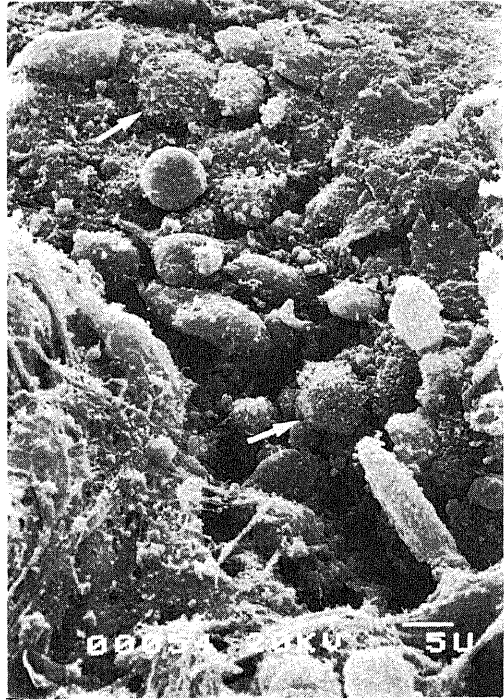


図 23

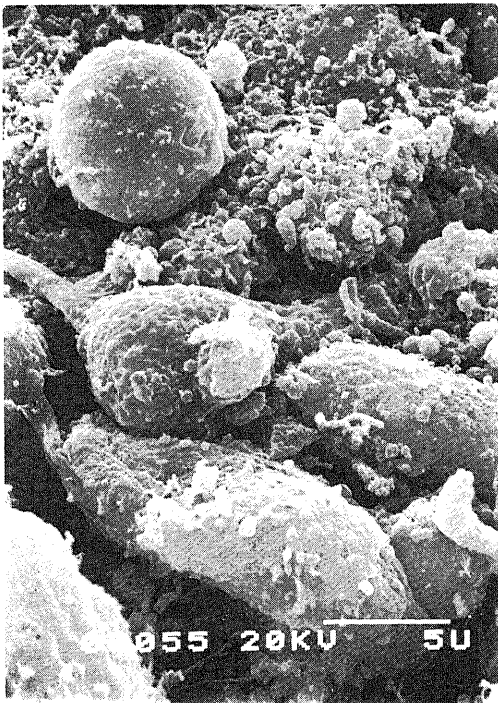


図 24

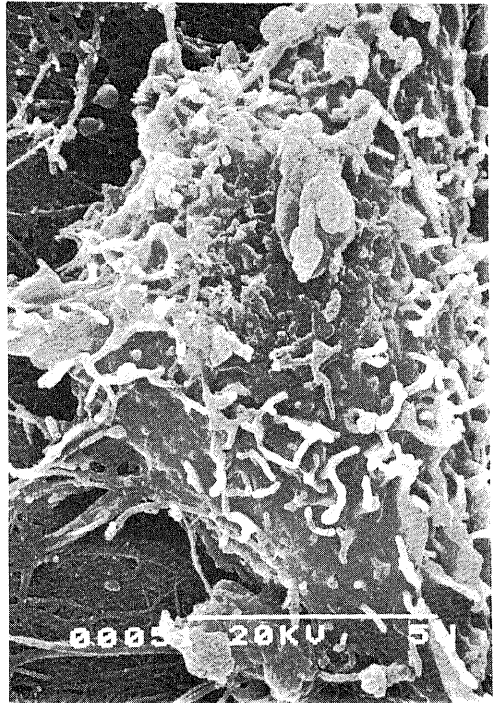


図 25

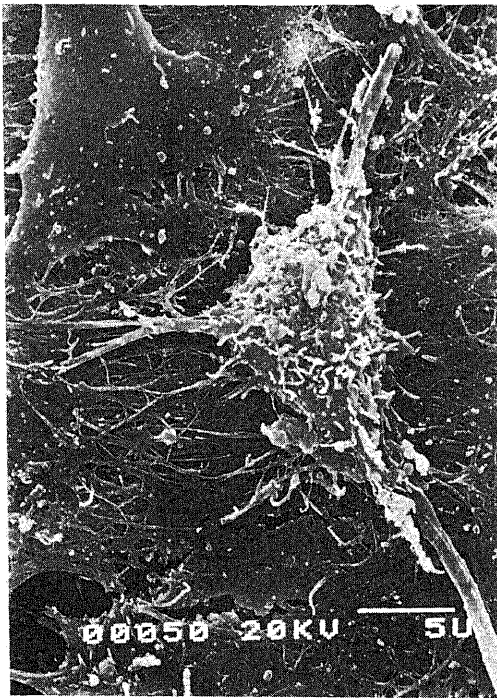


图 26

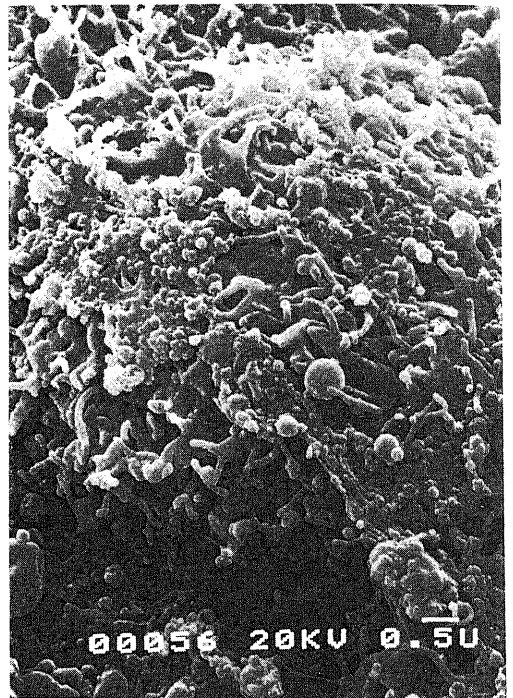


图 27



图 28

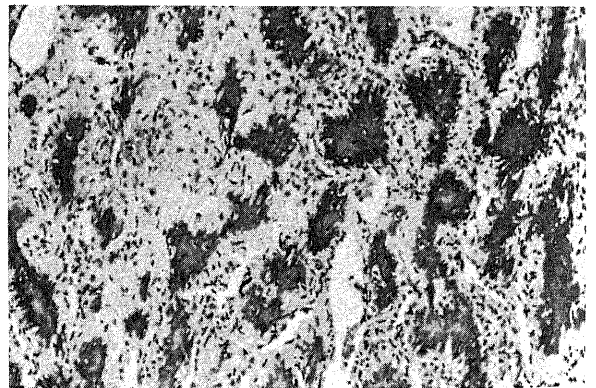


图 29

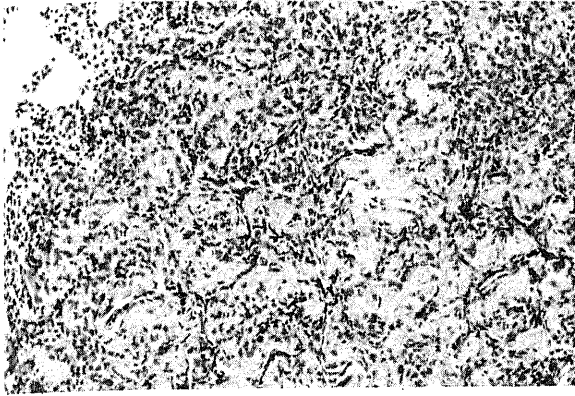


図 30

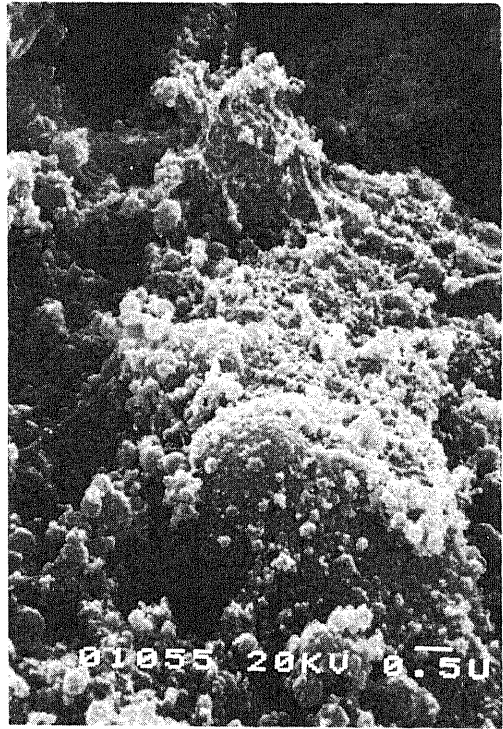


図 31

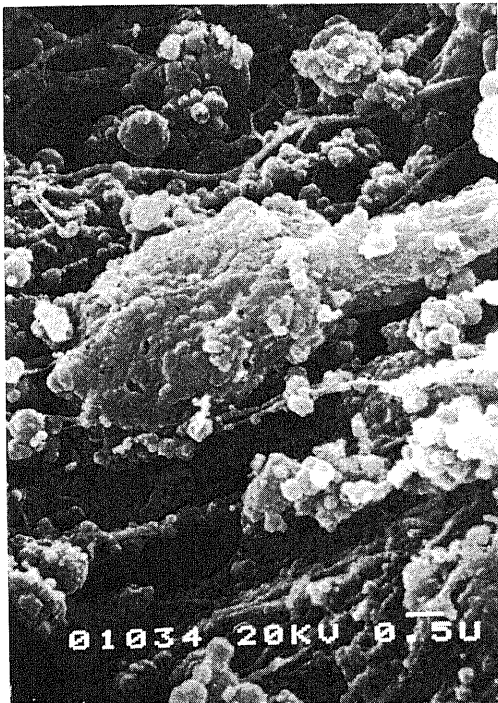


図 32

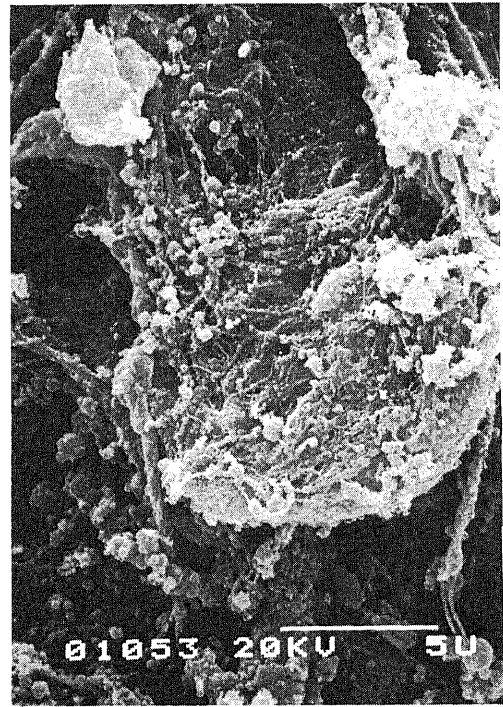


図 33

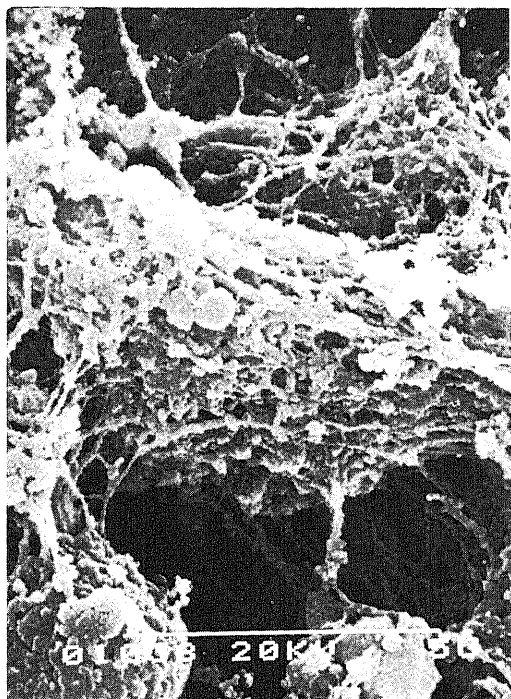


図 34



図 35

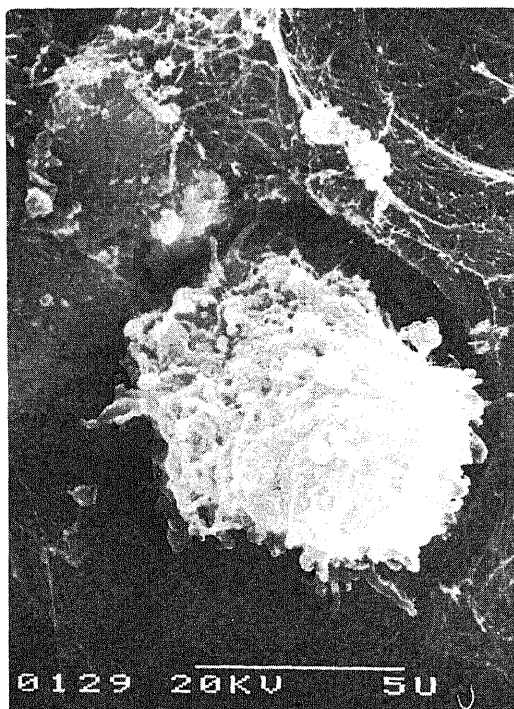


図 36

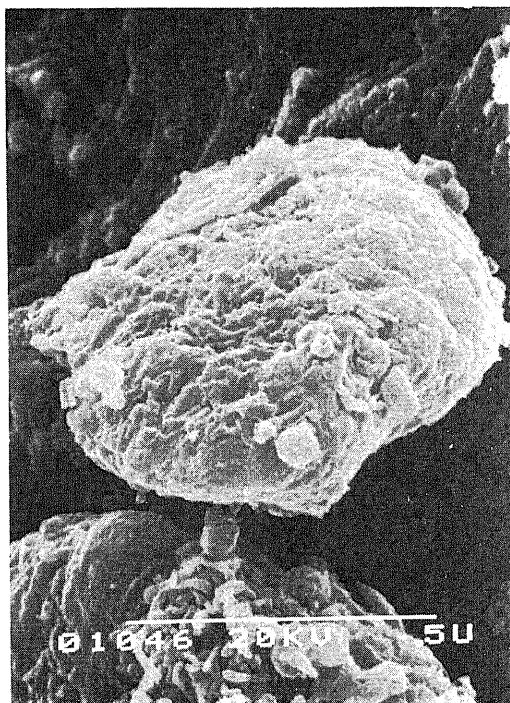


図 37

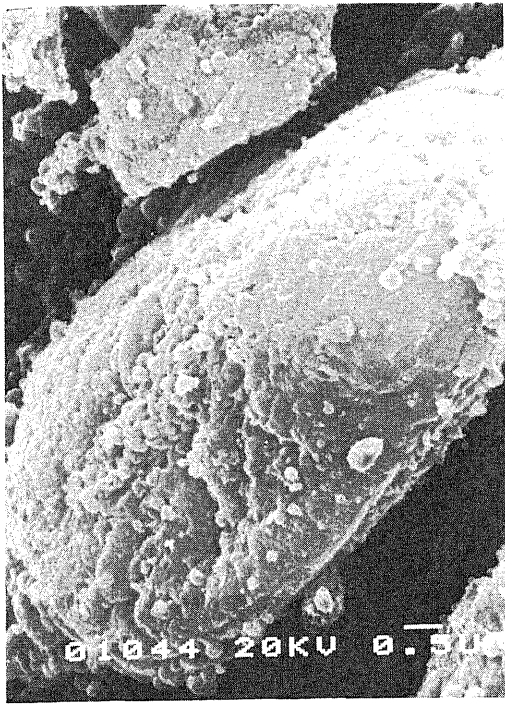


図 38

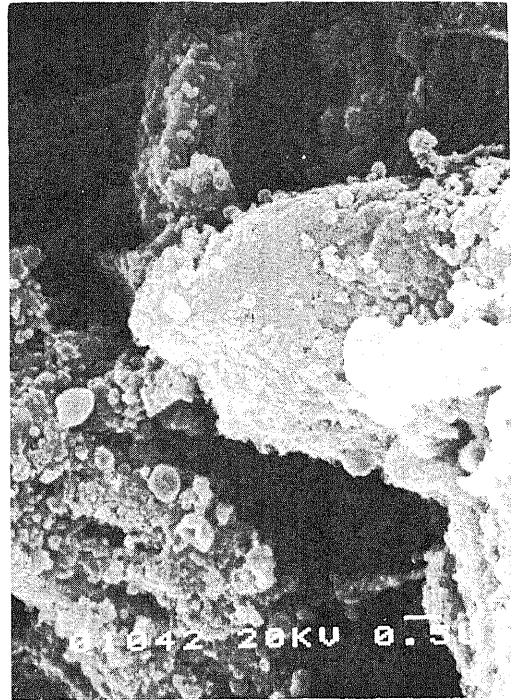


図 39

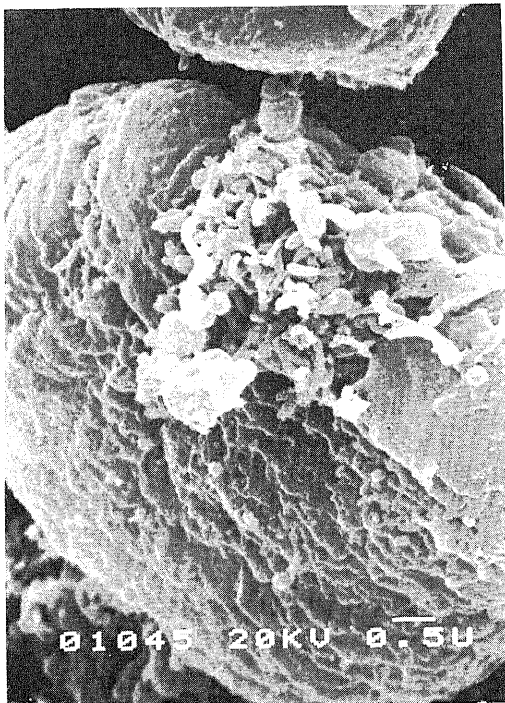


図 40

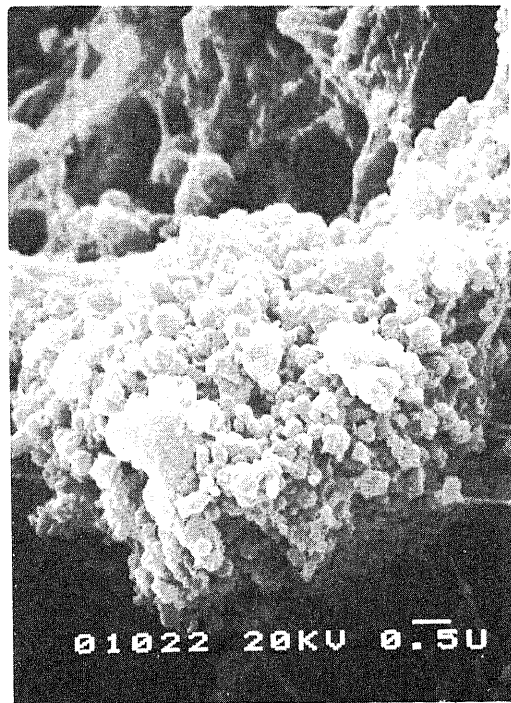


図 41

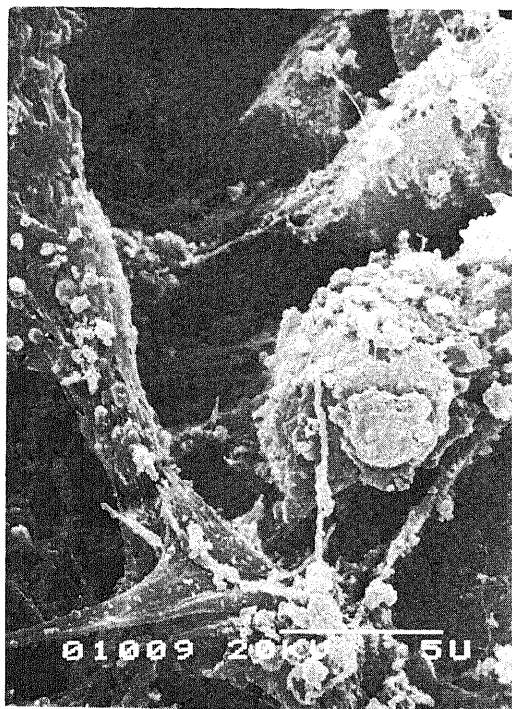


图 42

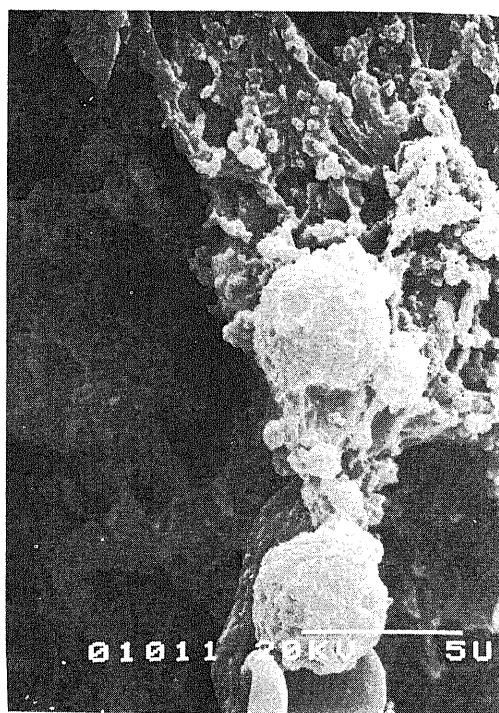


图 43

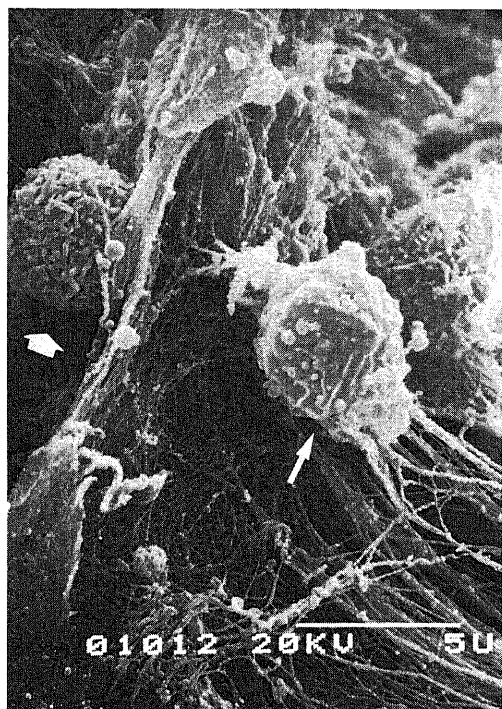


图 44

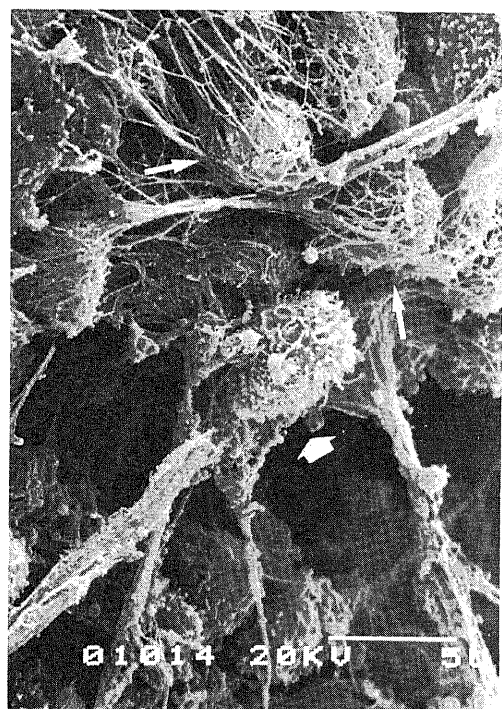


图 45

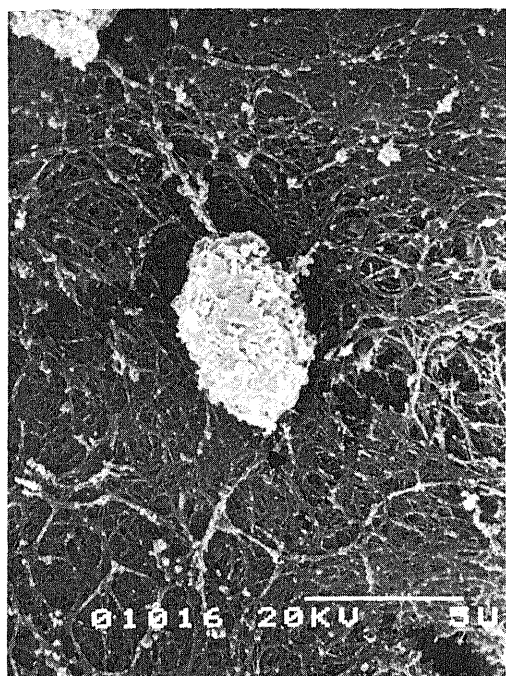


図 46

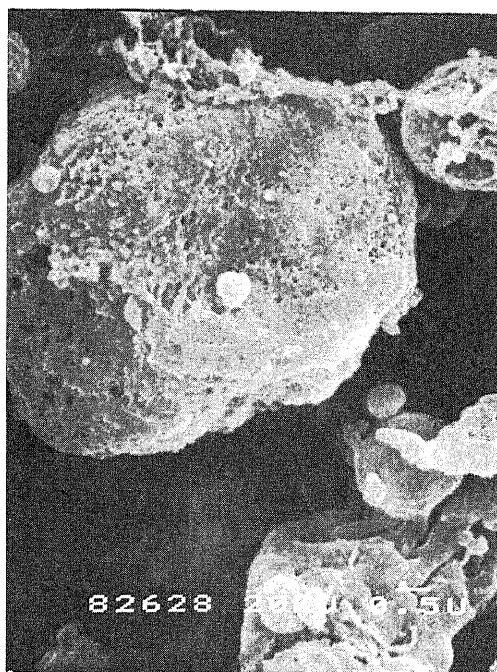


図 47



図 48