Osaka University Knowledge Archive

Title	Rapid decalcification using microwaves for in situ hybridization in skeletal tissues
Author(s)	金子, 元春
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41854
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【106】

氏　　名	金　子　元　春（かね　こ　もと　はる）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15311　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	Rapid decalcification using microwaves for in situ hybridization in skeletal tissues. （マイクロウェーブ照射による迅速脱灰システムを利用した骨組織 in situ hybridization 法）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　吉川　秀樹 （副査） 教　授　越智　隆弘　　教　授　内山　安男

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

慢性関節リウマチ（RA）の臨床上の大きな問題点の1つは慢性に進行する関節破壊であるが、その機序は不明な点が多い。特に、骨組織は、滑膜などの軟部組織と異なり、脱灰操作を必要とし、体系だった組織学的検索を行うことは困難である。病態を解明する組織学的手法としては、免疫組織化学や in situ hybridization（ISH）法が挙げられるが、硬組織の場合、脱灰操作に伴う試料処理期間の長期化や長期脱灰過程でのシグナルの減弱といった問題があり、特に高度に石灰化したヒトの骨組織を扱う際には脱灰期間がかなり長期化することが多く、迅速でかつシグナル検出感度の維持される脱灰システムが必要とされる。

近年免疫組織化学やISH 法における固定の迅速化や抗原性の賦活化にマイクロウェーブ（MW）照射が有効であるとする報告がいくつかなされているが、MW 照射を利用した脱灰操作についての報告はみられない。本研究の目的は、ISH 法における脱灰操作にこの MW 照射を利用することにより「①脱灰期間の短縮」や「②脱灰操作に伴うシグナルの検出感度の低下を防止すること」が可能か否か検証し、また、同方法を用いて RA 罹患関節より採取した関節組織を脱灰処理し、RA の関節破壊の機序を組織学的に検討することである。我々は特に、RA における骨破壊機序を解明するために、破骨細胞の酸性の吸収窩において活性をもつカテプシンに注目しその局在を組織学的に検討した。同時に、滑膜においてはカテプシンなどの組織破壊酵素の産生を亢進することで直接関節破壊に関与しているとされる腫瘍壊死因子（TNF）αについても、RA 罹患関節骨髄側での遺伝子発現を組織学的に検討した。

【対象と方法】

対象として、①5週令 ICR マウスに作成した脛骨閉鎖性骨折（骨折後10日目）の骨折部組織8例と②ICR マウスの胎児（妊娠後17日目）12匹を用いた。これらの試料を4％ PFA にて固定の後20％ EDTA にて脱灰し、パラフィン包埋の上薄切切片を作成した。各群での脱灰操作は、次のようなプロトコールに沿って行った。①G1－A：4℃にて脱灰（n＝4）。G1－B：50℃、3時間の MW 照射を2日間連続で行い、照射時間以外は4℃にて脱灰（n＝4）。②G2－A：非脱灰（n＝4）。G2－B：50℃、3時間の MW 照射による脱灰を2日間連続で行い、照射時間以外は4℃にて脱灰（n＝4）。G2－C：4℃にて1月の脱灰（n＝4）。以上で作成した切片を用い、DIG ラベル（非放射性）したマウスⅠ型コラーゲンの cRNA プローブを用い ISH 法を行った。

さらに、RA 患者10例（全例女性、平均64歳）より、人工膝関節置換術施行時に骨を含む関節破壊部組織を採取し、

4％パラフォルムアルデヒドにて固定後、MW 処理を併用して20％ EDTA 溶液を用いて脱灰後パラフィンに包埋し、HE 染色にて病理学的検討を行った。越智の病型分類では1例が小関節破壊型、9例が多関節破壊型であった。さらに抗カテプシンB、L、K抗体を用いた免疫組織学的検討及び、カテプシンK、TNFαの cRNA プローブを用いた ISH 法を行った。発現細胞の同定にはマクロファージのマーカーとして抗 CD68抗体を用いた免疫二重染色を行った。対照として変形性膝関節症（OA）患者5例（全例女性、平均69歳）より、同様に組織を採取し組織学的検討をおこなった。

【結果】

①脱灰に要した日数はG1－Aでは平均10日、G1－Bでは平均3日とG1－Bで有意な脱灰期間の短縮を認めた。また、両群とも良好なシグナルを認めその強度はほぼ同等であった。②G2－A、G2－B群ともに良好なシグナルを認め、その強度はほぼ同等であった。ただし、長期の脱灰期間を設定したG2－C群ではシグナルの減弱を認めた。

更に同脱灰法を用いて、RA 罹患関節の組織学的検討をおこなった。HE 染色にて病理組織学的に検討したところ、RA にて OA と比較して特徴的に骨髄腔に炎症性肉芽組織を認めた。そこでこの骨髄腔の炎症性肉芽組織に注目して免疫組織化学的検討を加えた。破骨細胞と思われる多核の細胞はカテプシンB、Lよりカテプシン K を強く発現していた。単核細胞の多くはカテプシンB、Lを発現しており、CD68陽性マクロファージと考えられた。ISH 法の結果、カテプシン K の遺伝子発現は、免疫組織化学の結果と同様に、多核破骨細胞様細胞及び、小数の単核細胞にも認められた。更に、炎症性サイトカインである TNFα についても ISH 法にて検討したところ骨髄腔に浸潤している単核細胞、及び、骨芽細胞様細胞にその遺伝子発現を強く認めた。

【考察】

今回の実験の結果、以下の点があきらかとなった。①長期間の脱灰操作によりシグナルは減弱した。②MW 照射の利用により脱灰期間が短縮された。③MW 照射を行ってもシグナル検出感度は維持された。これらのことから ISH 法を行う際の MW 照射による脱灰操作は、シグナルの検出に不利となる脱灰期間を短縮することが可能で、しかも MW 照射下でもシグナルが維持されることから、迅速性と陽性シグナルの検出感度の維持といった点で有効と考えられた。特に脱灰期間が長期にわたることの多いヒトの骨組織において、有用であり、RA 罹患関節における ISH 法を含んだ組織学的検討を容易にした。

RA における骨軟骨破壊は従来より指摘されるようにパンヌスによる浸潤によりおこるとされており、TNFα 等の炎症性サイトカインは、マクロファージや、滑膜細胞からの蛋白分解酵素の産生分泌を亢進し、関節破壊に直接関与するとされていたが、RA 罹患関節を用いた組織学的検討の結果、軟骨下骨には、炎症性の細胞浸潤が認められ、同部に、カテプシン、TNFα の発現が認められた。これらのことから RA における関節破壊はパンヌスの浸潤のみならず、軟骨下骨骨髄側からも直接関節破壊が進行する可能性が示唆された。また、滑膜における場合と同様に、炎症性サイトカインが、骨髄においても関節破壊に直接関与する可能性が示唆された。

【結論】

骨組織での ISH 法において MW 照射を利用した脱灰システムは脱灰期間の大幅な短縮とシグナルの維持が可能であり、長期間の脱灰とそれに伴うシグナルの減弱という問題点を解消しうる方法と考えられ、ISH 法を用いたヒト骨組織における組織学的検索に有用であった。また、同脱灰法を用いたRA罹患関節軟骨下骨組織の組織学的検討により、RA 罹患関節骨髄においてカテプシンB、K、Lの蛋白レベルでの発現、及びカテプシン K、TNFα の遺伝子発現がみられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、硬組織の in situ hybridization（ISH）法にマイクロウェーブ（MW）処理を用いた脱灰を応用した初めての報告であり、その結果、1．長期間の脱灰操作によりシグナルは減弱し、2．MW 照射の利用により脱灰期間が短縮され、3．MW 照射を行ってもシグナル検出感度が維持されることが明らかとなった。これらのことから ISH 法を行う際の MW 照射による脱灰操作は、迅速性と陽性シグナルの維持に有効であり、特に脱灰期間が長期に

わたるヒトの骨組織に有効であると考えられた。更に同脱灰法を用いて慢性関節リウマチ（RA）の骨髄での病態の組織学的検討を行い、RA 軟骨下骨には炎症性細胞の浸潤を認め、RA 軟骨下骨の骨破壊部におけるカテプシン B、K、L および TNF α の発現を同一の試料を用いて初めて同時に観察し、RA における関節破壊が従来指摘されるようにパンヌスの浸潤によるものだけでなく、軟骨下骨側からも骨軟骨破壊が進行する可能性が示唆された。以上のように、本論文は骨・骨髄を含む硬組織の組織学的検索を容易にする迅速脱灰法を初めて確立し、慢性関節リウマチの骨髄側からの関節破壊へのカテプシンの関与の解明に多大な貢献をし、学位に値するものと認める。