脊柱靱帯細胞の微細構造

山口大学整形外科

木戸 健 司・河 合 伸 也
小 田 裕 胤・土 井 一 輝
田 中 浩・石 田 洋一郎
峯 孝 友

Microscopic Structure of Cultured Human Ligament Cells

by

Kenji Kido, Shinya Kawai, Hirotugu Oda,
Kazuteru Doi, Hiroshi Tanaka, Yoichiro Ishida and Takatomo Mine

Department of Orthopedic Surgery,
Yamaguchi University School of Medicine, Yamaguchi, Japan

The cause of the ossification of human spinal ligament is still not clear. The purpose of this paper is to report morphological features of cultured cells of the human spinal ligaments by means of scanning and transmission electron microscopy.

In light microscopic studies, spindle shaped cells (fibroblast-like cell) formed some colonies in dish after 7-10 days cultivation.

In electron microscopic studies, cultured cells have relatively smooth cell surface (S.E. M.), well developed rough E.R., and a nucleus of low electrical density (T.E.M.).

These cultured cells resemble to fibroblast in electron microscopic studies.

緒 言

脊柱靱帯骨化の発生機序については、様々な方面からの研究がなされているが、その詳細については、今なお不明な点が多い。

当大学では、一つのアプローチとして、脊柱靱帯を構成する細胞に対し、細胞培養を行っており、骨化例、非骨化例の培養細胞の形態的・生化学的性質の間に、若干の差異が認められることを報告してきた^{1),2)}。

今回は非骨化例の培養細胞に対し、細胞培養の過程で、靱帯の細胞成分の中で、いかなる細胞が培養されてくるかを同定することを目的として、走査型及び透過型電子顕微鏡による観察を行なったので報告する。

方 法

ヒト脊柱靱帯の細胞培養の方法は、石田等の方法に行ない、電子顕微鏡による観察は、第1回継代培養の際、carbon coating を施した、cover glass の上

に培養し、細胞増殖後、in situ に固定、脱水を行ない、TEM は一旦、cover glass の上で Epon にて包埋後、液体窒素にて急速冷却し、細胞を cover glass より剥離した後、再包埋、薄切した。SEM は、cover glass 上で臨界点乾燥法にて乾燥後、金パラジウム蒸着を施した。

結 果

脊柱靱帯培養細胞は、細胞播種後約3～7日目に plating を開始し、播種後10日目には dish 上に3ないし4個の colony を形成し、更に増殖した。培養細胞はいずれも紡錘形の胞体と、その中心部に核を持ち、各種脊柱靱帯を通して、その形態に明らかな差異は認めなかった。colony 形成後も、この形態に明らかな変化は認めなかったが、それぞれの細胞間の関係は colony の各部位により、若干の差異が認められた。

colony の周辺部では、紡錘形の細胞が散在し、細胞間に連絡は認められないが、colony の中間部では、

図 1 cultured lig. cells

colony の各部位において、細胞の基本的形態に差異は無いが、細胞間の関係には若干の相違を認める。

(E.M.)

図 2 Cultured lig. cells

SEM では細胞の表面は比較的平滑で、TEM では良く発達した細胞内小器官を認める。

数個の細胞が集まり、管腔状の形態をとったり、一定の方向に走行するようになる。colony の中心部では、細胞の一部は重層化し、細胞突起の長さは減少し、多角形に近い細胞も認めるようになる。(図1)

SEM) 培養細胞は、扁平で紡錘形の胞体を有することは、位相差顕微鏡での観察と同一であるが、細胞の表面は比較的平滑で、一部には2つの細胞が、細い細胞突起によって、連結されている像も認められる。

TEM) 培養細胞は電子密度の低い淡明な核と、豊富な粗面小胞体を有する細胞質を持ち、粗面小胞体の中には一部内腔が嚢状に拡大しているものも認められ、活発な細胞分泌能を示している。(図2)

考 察

脊柱靱帯骨化の成因については、これまでに行なわれた各種の研究により、全身的骨化素因としての内分泌、ホルモン異常、遺伝的素因、又局所因子としての脊柱靱帯に加わる力学的負荷の関与の可能性が示唆されてきている³⁾。これに対する脊柱靱帯の構造的変化としては、主としてその細胞外成分である膠原線維、弾性線維等の線維成分に対し観察がなされ、その走行の乱れ、線維の断裂等が示されてきた。しかし最近では、骨形成能の関点から細胞成分の研究もすすみ、骨化に先立つ未分化間葉系細胞の増殖による靱帯の肥厚、骨化部先端での軟骨様細胞の増殖に伴う、軟骨性基質の分泌等の報告がみられる。

細胞培養による研究は、これら靱帯内細胞成分の、生化学的特徴を明らかにするうえで、有用な方法であると考えられるが、培養の過程で、細胞の周囲基質との関係が失われる点や、形態にも若干の変化がみられる点より、培養細胞が細胞成分の中のいかなる細胞から主として構成されているかを知ることは重要なことと考えられる。

今回得られた培養細胞は、光学顕微鏡的には、紡錘形の胞体と密接な細胞間の関係を持ち、SEM による観察では、比較的平滑な細胞表面を有していた。TEM による観察では、電子密度の低い淡明な核を持ち、細胞質は良く発達した粗面小胞体に富んでいた。これらの像からは、明らかな線維成分の分泌等是不明だが、培養細胞は細胞活性に富み、正常靱帯の細胞成分の主なものである線維芽細胞によく類似した細胞であると考えられた。

結 論

1. ヒト脊柱靱帯に対して細胞培養を行ない、走査型、透過型電子顕微鏡による観察を行なった。

2. 靱帯培養細胞は3～4日でplatingを開始し、播種10日後にはplate内に数個のcolonyを形成した。colonyの各部位において、細胞間の関係に若干の差異が認められた。

3. 靱帯培養細胞は、SEMによる観察では、比較的平滑な細胞表面を持ち、TEMでは電子密度の低い核と、小胞体等の細胞内小器官に富む細胞質を有しており、線維芽細胞に類似した細胞と思われた。

参 考 文 献

- 1) 石田洋一郎他：後縦靱帯骨化の細胞培養における検討，厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班昭和62年度研究報告書，42-44.
- 2) 石田洋一郎他：ヒト脊柱靱帯より得られた培養細胞に関する基礎的研究。日本整形外科学会雑誌，62：S. 145, 1987.
- 3) 斉鹿稔：脊柱後縦靱帯骨化の形態からみた成因および進展に関する検討。日本整形外科学会雑誌，61：P. 1059-1072, 1987.

発 言

琉球大学 乗松 尋道

靱帯骨化を起こすには細胞の変化以外に微細環境の変化がなければならないと考えます。特に骨誘導回の作用が重要ではないかと考えます。今後御検討下さい。

質 問

九州大学 馬渡 正明

- ①あえてin vitroで研究する理由。
- ②先生の示された細胞はfibroblastだと思いますが、他の部位のfibroblastとの形態上の差異があるのか。

解 答

山口大学 木戸 健司

- ①各種の負荷実験（ホルモン等）が可能である為。
- ②本実験のみでfibroblastと同定することは困難である。

質 問

久留米大学 小宮 節郎

ALP染色で培養細胞を検索されておられますか。

解 答

山口大学 木戸 健司

まだ行っておりません。