

異所的骨形成に及ぼす Anabolic Steroids の 影響に関する組織化学的研究

京都大学医学部整形外科科学教室 (指導: 近藤鋭矢教授)

大 上 治 彦

〔原稿受付 昭和38年2月1日〕

HISTOCHEMICAL STUDIES ON THE EFFECTS OF ANABOLIC STEROIDS FOR ECTOPIC BONE FORMATION

By

HARUHIKO OUE

From the Department of Orthopaedic Surgery, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. EISHI KONDO.)

Greater attention has recently been paid to the clinical applications of ANABOLIC STEROIDS upon the regeneration of bone. In order to solve some of the fundamental problems concerning their effects, the mechanism of the effect of DURABOLIN, ANADROL, and APETON DEPOT on osteogenesis following the implantation of fresh bone marrow and fresh cancellous bone into autogenous muscles was investigated histologically, histochemically, and radiologically. In addition the rate of increase of body weight and the incidence of new bone formation were analysed.

EXPERIMENTAL METHODS

Pubescent male rabbits weighing approximately 1.7 kg were divided into two groups, one castrated and one not. A piece of bone marrow and a piece of cancellous bone weighing 0.1 g each were implanted into the autogenous muscles of each experimental rabbit.

A) Castrated group

DURABOLIN3, 5, 10mg/kg, qw, I. M.

ANADROL3, 5, 10mg/kg, qd, I. M.

APETON DEPOT5, 10, 20mg/kg, qw, I. M.

B) Non-castrated group

APETON DEPOT5, 10mg/kg, qw, I. M.

qwonce a week

qdonce a day

The first dose was given upon completing the implantation.

RESULTS

1) Metaplasia of undifferentiated mesenchymal cells originating in the implanted bed was the most prominent feature of osteogenesis. The precursor of the osteoblast was observed to be the fibroblast. Osteogenesis following the implantation of bone marrow and

Bone trabecular formation was first noted one week after implantation and was reconstructed in ramified bone trabeculae one week later. In the fifth postoperative week, it became spheroidal bone in which hematopoietic bone marrow was observed, and it decreased in volume ten weeks postoperatively. The implanted cancellous bone trabeculae were almost completely absorbed by the fifth week.

The relationship between the degree of osteogenesis and the dosage of the applied drugs was as follows : (unit mg/body weight)

B) Non-castrated group, APETON DEPOT... 5mg $\geq$ Control > 10mg

3) The osteogenetic accelerating mechanism of the ANABOLIC STEROIDS is based upon acceleration of the increase and differentiation of mesenchymal cells. Therefore, the appearance of many active osteoblasts results in the excellent development of bone trabeculae and a marked increase in calcification. In some cases of the most active osteogenesis, the growth of cartilagenous tissue is also observed.

4) The ANABOLIC STEROIDS seem to have no influence upon either the onset of osteogenesis, or the period of bone trabecular reconstruction.

5) Based upon the fact that osteogenesis is completed in parallel with the increase of body weight, the osteogenetic accelerating mechanism may well be considered as a partial phenomenon of the pan-anabolic mechanism of the ANABOLIC STEROIDS.

6) The incidence of osteogenesis following cancellous bone implantation is found to be similar to that following bone marrow implantation. The following table shows the incidence of osteogenesis, which represents the osteogenetic accelerating mechanism of the ANABOLIC STEROIDS : (Mean value of the osteogenetic ratio after implantation of bone marrow and of cancellous bone)

B) Non-castrated group
Controls.....81%

Experimental cases85%

(APETON DEPOT 5mg/kg)

目 次

第1章 緒 言

第2章 実験方法

第1節 実験動物

第2節 手術方法

第3節 Anabolic Steroids とその投与方法

第4節 観察方法

第3章 実験成績

第1節 体重の変化

第2節 レ線学的所見

第1項 骨髓移植群

第2項 海綿骨移植群

第3節 組織学的並びに組織化学的所見

第1項 骨髓移植群

第2項 海綿骨移植群

第4節 骨形成率

第4章 総括並びに考按

第5章 結 語

第1章 緒 言

近年に於ける骨組織の研究から、その骨基質の蛋白代謝が益々重要視され、同時に目覚しい発達を遂げた Anabolic Steroids の臨床的応用がこの分野にも脚光を浴びて登場してきた。

抑々 Anabolic Steroids は Androgen の有する窒素蓄積作用を実証した Kochakian & Murlin (1935) の実験的研究に端緒を開いている。以来 Steroid 化学の進歩から数々の Testosterone 誘導体が出現したが、Eisenberg & Gordan (1950) の肛門挙筋法の提唱によつて Screening Test も充実して、Anabolic : Androgenic Ratio の高いものが求められ且つ水分蓄積作用等の忌まわしい副作用も吟味検討されて、遂に Androgen から独立した Anabolic Steroid と言う概念で今日臨床的応用に適するものとなつたのである。

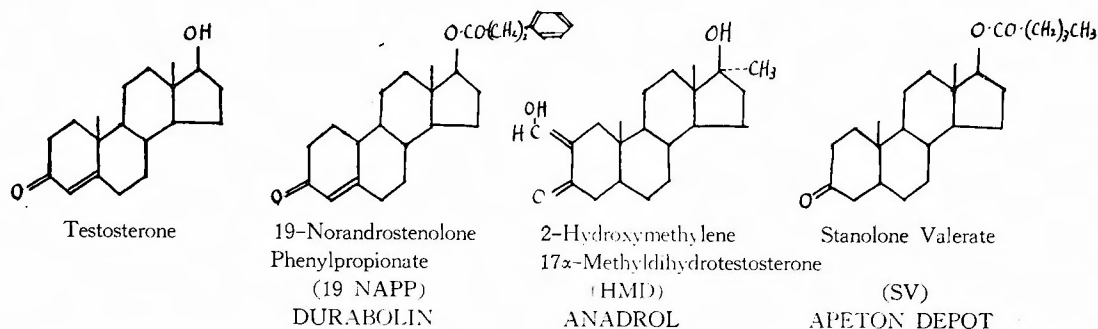
性ホルモンと骨の發育に就いては既に Aristoteles の昔から去勢脱落症状に於て観察されているところであるが、Androgen の蛋白同化作用が骨組織の新陳代謝に関与すると言う見解に到達したのはここ20数年来のことである。即ち骨基質の主要構成成分である蛋白質の代謝に着目したことに他ならない。然しながら現今に於ても尚蛋白質の生体内合成機転が不明であるか

ら、Anabolic Steroids の作用機序も明らかにすることは出来ないのである。従つてその骨組織に及ぼす影響にまで詳細に論及するには尚程遠い現状であるが、三宅等 (1962) が主張するように Anabolic Steroid の窒素蓄積作用は積極的に蛋白合成に参与した結果であるとする人が多く、生体の蛋白代謝を正平衡に維持するのであれば、骨基質の構成蛋白も当然増成するところとなろう。

骨軟骨組織の生成増殖に関する研究は、従来骨塩の問題に拘泥し過ぎた感があるが、近年に至り電子顕微鏡による骨組織の微細構造が漸次明らかにされ、生化学的分析、或は放射性同位元素を標識とする代謝機構の追跡等から骨基質の意義は一層重要視されるようになってきた。それを構成する Collagen 及び Mucopolysaccharide protein complex と骨塩結晶の有機的關聯性は、骨基質の代謝に対し骨塩沈着を更に從属的とする趨勢を示している。かくの如く Collagen 及び Mucopolysaccharide protein complex の意義が注目されるところとなれば、それを構成する蛋白アミノ酸の代謝が論じられて、ここに Anabolic Steroids の影響が介入することは当然の帰結であろうと考える。勿論骨軟骨組織の生成増殖がひとり蛋白代謝のみによつて左右される筈はないが、生命の中核は蛋白質であると言う大きな命題からすれば Anabolic Steroid の使命は大きく、骨組織の代謝の改善、發育促進等、整形外科領域に於ける応用分野も広い。事実今日骨折の一部や骨粗鬆症に Anabolic Steroids が用いられつつあることは周知の通りである。然しながらこの分野に於ては尚基礎的研究に乏しく、これに充分立脚した適当な臨床的応用にまで活用されていない。又或は過剰に評価して使用されているのではないかの疑問も生じてくるのである。

従つてかかる見地から著者はこの基礎的課題の一端に資せんとして実験を行つた。就中整形外科領域の再生的骨形成の問題は極めて重要であるが故に、これを追究するに最も便利と考えられる異所的骨形成実験を選び、これに対する Anabolic Steroids の影響を検索した次第であつて、著者は組織学的及び組織化学的研究を中心としてここに報告する。

表 1 使用せし蛋白同化ステロイド

表 2 蛋白同化ステロイド投与方法
(術後直ちに投与開始)

去勢群	
19NAPP.....	3, 5, 10mg/kg/週
HMD	3, 5, 10mg/kg/日
SV	5, 10, 20mg/kg/週
非去勢群	
SV.....	5, 10mg/kg/週

第2章 実験方法

第1節 実験動物

生後3～4ヵ月で体重1.7kg前後の発育期雄性家兎を選んで使用した。飼育は何れも隔離して行ない1日200gの豆腐粕に50gのオリエンタル固型飼料を混合して与えた。青色草菜類は週2回100g宛として、飼育条件を統一した。

第2節 手術方法

去勢群と非去勢群の2群に分けた。去勢群の手術は去勢後3週で行った。

移植組織としては新鮮骨髓及び海綿骨の2種を使用し、これを自家大腿伸筋及び背筋の筋腹中央に1個宛埋没移植した。骨髓は脛骨粗面部の骨皮質を削除して骨髓腔を露出せしめ、内壁を搔爬することなく愛護的に採取した。海綿骨は反対側の腸骨翼より採取して、軟骨部及び皮質部を完全に除去したものである。その量は骨髓及び海綿骨ともに0.1gに規制した。

第3節 Anabolic Steroids とその投与方法

実験に供したものは、19 NAPP, HMD, SV の3種であり(表1)、夫々三共K. K. 塩野義K. K. 藤沢薬品K. K. より提供を受けたものである。その投与量は3

群に分け、投与間隔は19 NAPP 及び SV は週1回、HMDは毎日、夫々筋肉内に注射した(表2)。

去勢群並びに非去勢群ともにその対照群を作製して投与群との比較検討を行なった。

第4節 観察方法

術後5日より10週迄経時的に観察した。

1) 体重の変化

各群に於ける体重変化の経時的推移をその増加率で表わしてAnabolic Steroidsの影響を観察した。増加率は術前の体重を100として算出したものである。体重の測定は常に食餌投与前に行なった。

2) レ線学的観察

術後5日、1週、10日、2週、3週、5週、10週と逐次屠殺して標本を採取し、これを撮影してルーペで拡大観察した。

撮影条件は2次電圧50kV、電流50mA、時間1.5秒、管球とフィルム面との距離1mで増感紙を使用しなかつた。

3) 組織学的並びに組織化学的観察

レ線撮影を迅速に行つた後、直ちに氷冷無水アルコール・アセトン等量混合液に浸漬固定した。骨髓移植群の2週までのものは主として末脱灰のままで、他は5%EDTA中性溶液で脱灰して、夫々型の如くツエロイゲン包埋を行なった。

標本は全て15μ～20μの連続切片法にて作製し、10枚毎にMayer氏 Hämatosylin・Eosin 重染色(以下H.E.染色と略す)を行つて立体的な観察を加えた。更に適当な層にて以下の特殊染色を行ない組織化学的検索を試みた。

高松・赤星氏 Alkaliphosphatase 反応 (Al-P-ase 反応), Kossa 氏 Ca 染色 (Ca 染色), Heidenhein 氏 Azan 染色

(Azan染色), McManus 氏過沃素酸 Schiff 法 (PAS 反応), 大野氏 Metachromasy 反応 (Meta 反応) 等である。

4) 骨形成率

以上の連続切片法による組織学的検索から移植例数に対する骨形成例数の割合を算出して骨形成率とし、各実験群に於ける Anabolic Steroids の影響を比較検討した。

第3章 実験成績

第1節 体重の変化

術後の体重増加率の経時的推移は、去勢群に於ては Anabolic Steroids 投与により明らかな差異を示している。非去勢群では左程著明ではなかつた。各 Anabolic Steroids の投与量別順位は、去勢群では $19\text{NAPP} > \text{HMD} > \text{SV}$ となり、非去勢群では $\text{SV} > \text{HMD} > 19\text{NAPP}$ となり、非去勢群では SV にて体重 per kg $5\text{mg} > 10\text{mg}$ の順となつた。何れもその対照群より優れた体重増加を示したが、大量になると逆に抑制的になる傾向を示した。

各々の投与群中で最も体重増加の著しいもの、即ち去勢群に於ける 19NAPP 及び HMD の体重 per kg 5mg 投与群と SV の体重 per kg 10mg 投与群、非去勢群では SV の体重 per kg 5mg 投与群が夫々の投与量別間で組織学的にも最も旺盛な骨形成を示したので、これらをその薬剤投与群中の代表として以下経時的に論ずることとする(表3)。

1) 去勢群

対照群は術後10日を過ぎて漸く術前の値に復帰してくるが、投与群では何れも既に1週以内に復帰している。各 Anabolic Steroids 間の順位は $19\text{NAPP} > \text{SV} > \text{HMD}$ となつて、対照群より著明な増加率を示す。然しながらやがてその差は減じて両者は接近する傾向を示してきている。

2) 非去勢群

対照群、投与群ともに術後1週以内に術前値まで復帰しており、両者の間に著明な差はなく去勢投与群と殆ど同様な経過をとつている。

第2節 レ線学的所見

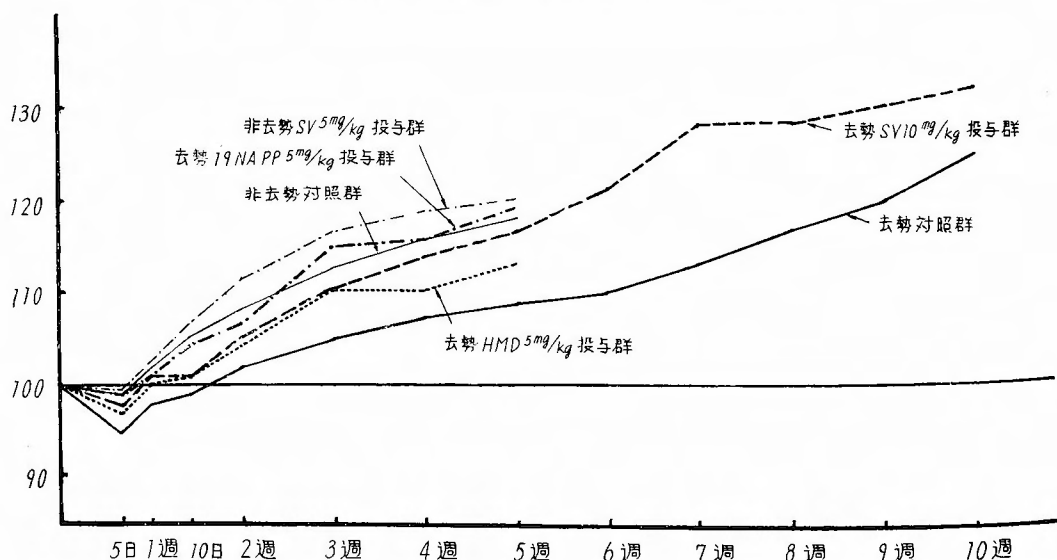
第1項 骨髄移植群

1) 去勢群

1週目迄の標本では何れの群も石灰沈着像を認めない。10日目になると投与群は略々一様に $1/2$ 米粒大の淡い陰影が出現してくる。対照群では2週目に於て漸く $1/3$ 米粒大の同様な所見を認めた。2週から3週にかけて影ははやや大きくなり、石灰沈着増加のために濃くなる。3週から5週になると、この影は円形化して輪を画くようになる。10週になるとその大きさを減じてくるが形は変わらない。対照群は何れの時期に於ても、骨影は投与群に劣り小さくて淡い。

投与群に於ける各投与量別間の差異は体重増加の所見と略々一致しているが、各 Anabolic Steroids 間の優劣は本質的に認め難い(図1)。

表3 体重増加率変化表 (平均値) 術前の体重を100とする



2) 非去勢群

その所見は去勢投与群と同様であつて、投与群と対照群との間に差は認め難い。

第2項 海綿骨移植群

1) 去勢群

5日目から1週になると、移植海綿骨の繊細な骨梁像が処々で吸収されて、濃い斑点状陰影の集団となる。投与群では10日目になるとこれらの陰影が更に濃厚となり、この間に淡い影像が出現して連続性を示してくる。対照群では2週目になつて漸くこの連続性が認められるが、部分的で且つ小範囲にとどまつている。2週から3週にかけて、移植海綿骨の骨梁像は硬化性を増しながら吸収されて減少する。寧ろ新生骨影像中に散在性に認められるようになってくる。対照群では新生骨影像が少なく硬化した移植骨梁像が投与群よりも長く残る傾向を示している。週が進んで5週から10週になると、移植骨梁像は消失して骨髓移植群の場合と同様に、円形化し輪を画く像となる。

投与群に於ける各投与量別間の差異、及び各 Anabolic Steroids 間の優劣は骨髓移植群で認めた所見と一致している。即ち19 NAPP及びHMD投与群では夫々体重 per kg 5 mg投与群、SV投与群では体重 per kg 10mg投与群が優れた所見を示した。併しこれ等3者の間には本質的に著明な差異は認め難い(図2)。

2) 非去勢群

骨髓移植群のところで述べた如く、去勢投与群と著明な差はなく、投与群と対照群の間にもレ線上優劣をつけ難い結果を得た。

第3節 組織学的並びに組織化学的所見

去勢群に於ては、各 Anabolic Steroids の投与量から決定される骨形成の促進は体重増加と略々一致して19NAPP、HMD投与群では体重per kg 5 mg投与群、SV投与群では体重per kg 10mg投与群が最も優れた成績を示した。

非去勢群では、SV投与群中で体重per kg 5 mg投与群が優れた所見を示したが、対照群に比してその差異は著明でなく、又去勢投与群とも優劣をつけ難い程度のものであつた。

従つて Anabolic Steroids の影響を論ずるにあたり、特に去勢群を採り上げることにする。又投与した Anabolic Steroids 間には本質的な差異は認められず、最も骨形成促進をもたらしたものをもつて投与群と一括綜称することにした。

第1項 骨髓移植群

1) 移植後5日目

何れの群も移植骨髓組織は、殆ど変性像を示している。核の濃縮、融解がそれである。周囲には白血球、組織球の浸潤を伴つた幼若結合組織細胞が出現し、毛細血管も多く含んでいる。併し骨梁形成の所見は何れの群にも未だ認められない。

投与群ではこの組織反応が旺盛であり、移植組織の全周を取巻いて発達している。既に移植組織中に向つて侵入した処もある。

対照群はこの幼若結合組織の出現が極めて貧弱である。

2) 移植後1週目

移植骨髓組織の変性は進み、核の崩壊、消失が多くなり、小空胞形成が出現する。この時期には血液細胞の正常な染色性は全く認められない。周囲の幼若結合組織の増生は益々盛んとなり、移植組織中に侵入した部分に於て初めて新骨形成をみる。この骨形成の過程は周囲より侵入した幼若結合組織細胞から移行分化し行なわれたものである。即ち境界不明瞭な紡錘形の線維芽細胞から、境界明瞭な円形乃至多角形の大型を示す骨芽細胞に移行し、この骨芽細胞が2列に配列して樹枝状の骨梁を形成したものである(図5)。この新生骨梁は發育して骨小腔に収まる幼若骨細胞を含むようになる。而もこの幼若骨細胞は未だ骨芽細胞に似た形態を示している(図6)。このことは骨芽細胞が基質を形成して、自らその中に閉じ込められ骨細胞となる所見を物語っている。即ち移植床より組織反応として出現した未熟間葉系細胞の化生による骨形成であり、一種の骨誘導現象とも考えられる。

投与群ではこの幼若結合組織の発達から樹枝状の骨梁形成が広範にして、且つ旺盛に認められる。分化過程を示す移行期細胞集団も豊富で、部分的ではあるが軟骨様細胞の出現もみられる(図4)。

対照群はこの組織反応が限局性であつて、且つ貧弱であり、骨梁形成所見も未熟である。従つて骨芽細胞の配列も未だ規則性に欠け、又移行期細胞集団も少ない。軟骨様細胞の分化発生は何処にも認め得ない(図3)。

然しながら新骨形成の時期的関係は、投与群と対照群の間に著明な本質的差異を示していない。

組織化学的にみると、以上の組織学的所見からも推察されるように、投与群と対照群の間に於ける骨形成の優劣の差は著しい。Al-P-ase反応は移行期細胞群から骨芽細胞、更に幼若骨細胞に陽性を示しているが、

何れも細胞内に認められて、骨芽細胞に最も強く反応している(図10)。投与群は対照群に比して、その陽性度の強い骨芽細胞を認め得るが、移行期細胞集団の豊富なること、及び骨梁の広範な発達からその分布密度は高い。Ca 染色でみると、投与群の方が骨梁の発達及び成熟度に伴って、旺盛な骨塩沈着像を如実に示している(図7, 8)。この骨塩沈着は骨小腔の周囲でCollagen 線維の方向に沿って認められるが(図9)、沈着が高度となると骨梁構造は全く被覆されてしまい骨芽細胞列と沈着層の間に僅かの未沈着層を残すのみとなる。この骨塩沈着の態度は骨梁の成熟と同時に急速なる進行を招来しているものである。Azan 染色では移植組織の周辺より侵入する幼若結合組織から新生骨梁中にCollagen 線維が美麗な青染で示されている。両者の移行部に於てはCollagen 線維は互に錯走している。

この所見は線維芽細胞から骨芽細胞に移行していることを示すものであつて、骨誘導現象の所見の一端ではないかと考えられる。併し骨梁の成熟に従つて、これを構成するCollagen 線維は結合組織中のものより太く遅くなつてくる。このCollagen 線維は骨小腔の間を縫うが如く網目状に発達しているが(図11)、骨塩沈着を伴うとその染色性に変化をきたしてくる。即ち美麗な青染を示さなくなり、橙色を帯びて線維構造が不明瞭になる(図12)。この所見はCa 染色と対比されるべきものであつて、骨梁の成熟性を或程度窺ふことの出来るものである。投与群に於てはこの所見から旺盛な骨梁形成を認め得る。PAS反応は周囲の幼若結合組織から移行期細胞集団、更に骨芽細胞から骨基質並びに幼若骨細胞に陽性を示している。骨塩沈着に先行して幼若骨基質に強陽性を示し(図13)、且つその近傍の骨芽細胞に強いAl-P-ase反応を認めることから、投与群は対照群に比較して旺盛な骨形成をきたす傾向を有するのではないかと推論し得る。

3) 移植後10日目

新生骨梁の発達は益々進み、骨塩の沈着も高度となつてくる。周囲の結合組織性被包化と移植組織の器質化も進み、移植組織中には小空胞の網目構造が増加してくる。この網目構造を構成する細胞は網状細胞に類似しているがこの細胞から新骨形成が行なわれたような分化過程は全く認められない。又この時期では何れの群にも破骨細胞の出現を認めない。

投与群では骨梁の発達は著しく、更にその増生は骨芽細胞に分化する過程の間葉系細胞の豊富な所見がこれを物語っている。骨梁の成熟性は骨塩沈着(Ca 染

色)、Collagen 線維の染色性(Azan染色)からも認められるところであるが、骨芽細胞の形態が円形から紡錘形になる過程によつても示される(図14)。

対照群は貧弱な骨梁形成にとどまり、周囲は結合組織によつて被包化され増大発展する傾向に乏しい。

4) 移植後2週目

何れの群にも新生骨梁に添加と吸収の改造機転Reconstructionが起つている。骨梁の窩状吸収部Howship窩に破骨細胞が認められる。2週に於て骨梁の成熟をかなり認めることは出来ても、骨細胞に層板状配列を未だ認めることは出来ない。骨梁間には網状組織が介在して骨髓細胞様細胞を散見するが、これは骨形成とは無関係である。この時期になると骨塩沈着高度のため、末脱灰標本では薄切困難となる。

投与群では対照群と同様に吸収現象をみるが、骨梁には尚添加現象が旺盛に認められて拡大発達する所見を示している。従つて骨梁の樹枝状発達も著しく、又骨梁の幅も広い(図16)。

対照群は発展傾向乏しく、整理改造のみの所見として観察される(図15)。

破骨細胞の出現率は、両者の間に有意の差を見出すことは出来ない。吸収現象は両者とも同程度に行なわれていることを認める。

Al-P-ase反応では骨芽細胞の陽性度と分化過程を示す移行期細胞群の陽性度から、Azan 染色では新添加骨梁の青染性からともに幼若骨梁の添加現象がよく示されて、投与群の骨形成は旺盛である。投与群中にみられる軟骨様組織はPAS反応強陽性で(図17)、2週に於てこの組織の發育は最も著明である。この組織中には明らかに成熟肥大した軟骨細胞も認められ、或は細胞が消失して空胞化したものも認められる。その基質は骨塩沈着に先行してPAS反応強陽性である(図18)。この部に於けるMeta 反応は著明な陽性度を示している(図19)。この組織は骨梁と連続性に移行しているが直接骨細胞に移行する化生像と、軟骨内骨化機転にみられる潜在性置換の所見を併存している。

5) 移植後3週目

新生骨梁の改造機転が最も旺盛な時期である。骨梁は整理改造されて球形化の傾向を示してくる。骨梁の成熟性も進行し骨細胞の配列も漸次規則性を帯びて層板状配列が窺われる。核の形態も円形から紡錘形、更に扁平化してくる。周囲を取巻く結合組織は密となり、外骨膜様の構造を呈してくる(図20)。

投与群では尚添加機転が旺盛であり骨梁の構成も充

実している(図22)。軟骨様組織、或は所謂類骨組織がこの時期では殆ど見られなくなっている。

対照群は骨梁構成の成熟が遅れ、骨梁の発達も弱い(図21)。

Al-P-ase反応でみると、骨梁の成熟性、添加現象の旺盛さをよく窺うことが出来て、投与群と対照群の差を示している(図23, 24)。

骨芽細胞と並んで破骨細胞も Al-P-ase 反応は陽性であるが、その陽性度は骨芽細胞に劣っている。

6) 移植後5週目

新生骨梁は整理されて、殻状に球形化している。内部の骨梁は吸収されて消失している。周囲の結合組織は全く外骨膜様となり、PAS反応強陽性を示す。骨梁表面の骨芽細胞は扁平化して活動性に乏しい像となる。骨梁中の骨細胞も層板状配列を示している。この時期は所謂小骨(Ossicle)の状態であつて、内部に造血性骨髄組織を有する骨球となつて一個の器官としての形態をとつてきている。

投与群はこの球形化した骨組織の発育が著しく旺盛であり、骨梁も層板構造を示して、Havers氏管の新生をみるものもある。更に内骨膜の形成をよく認め得るようになり、内蔵する造血性骨髄組織には大多核細胞や毛細血管の新生まで認められる(図26)。

対照群では骨球内部の骨髄組織は極めて貧弱で、骨髄細胞も少なく又結合性組織で置換される傾向を有する部分もあるが、一般には網状組織の部分が多い。勿論骨組織の成熟性も投与群と比較すれば明らかに遅延している(図25)。

7) 移植後10週目

5週で完成期に入つた球状造血性骨組織は、次第にその大きさを縮小してきている。対照群では吸収退化して痕跡の所見しか得られなかつたが、投与群では尚造血性骨髄を内蔵する器官としての形態を完全に具備している。

第2項 海綿骨移植群

海綿骨は骨梁と骨髄組織の混在したものであるが、前記骨髄移植群と同様な骨形成の結果に終るので、重複を避けて要点を中心に述べることにする。

1) 移植後5日目

移植海綿骨梁は殆ど変性像を示している。即ちその骨梁中の骨細胞は消失して、骨小腔は空虚となつてくる。同時に移植組織の周囲から幼若結合組織の侵入が始まり、移植骨梁方向に配列している。内骨膜の生存増殖像は認められない。

投与群ではこの侵入幼若結合組織の増生がより旺盛にみられ、移植骨梁に接した部では、既に骨芽細胞に向かうと思われる分化過程の細胞も出現している。

対照群ではこのような組織反応が極めて貧弱である。

2) 移植後1週目

移植骨梁に接して添加的乃至はそれから樹枝状の骨梁形成をみる。又独立的にも骨髄移植群の場合と同様に周囲からの侵入幼若結合組織中に新骨形成をみている。移植骨梁はエオジンに濃染して、骨細胞は全く消失し変性死滅した像を呈している。この時期に於ても移植骨梁の内骨膜が再生増殖して造骨組織に分化する所見は認められない(図29)。

投与群は対照群に比して著しく旺盛な骨形成の所見を呈している(図27, 28)。投与群では殆ど全ての移植骨梁の周辺にかかる骨形成像をみるが、対照群では部分的に僅少に過ぎない。併し新骨形成の時期的関係は両者略々一致している。

Al-P-ase反応は新生骨梁に関して陽性所見を呈している(図30)。Azan染色では新生骨梁は青染することから移植骨梁と明瞭に区別され、H.E.染色と同様に両者の境界に移行像は全く認められない。

3) 移植後10日目

新生骨梁の樹枝状発達は進み、移植骨梁の吸収縮小がみられる。

投与群の旺盛な骨梁の発育は、Azan染色の所見からもよく示されるところであるが、内骨膜からの骨形成像は認められず、移植床より発生した末熟間葉系組織よりの骨誘導現象から生じたものと考えられる(図31)。

4) 移植後2週目

骨髄移植群の場合と同様にこの時期から新生骨梁の改造機転が始まつている。移植骨梁の吸収は進行して、新生骨梁により寧ろ包まれたかたちとなつて連結されている(図32)。移植組織の周囲は結合性被包化を受け、移植組織中には網状組織が発生して一部に骨髄細胞様細胞の散見されるものもある。

投与群では対照群と改造機転の時期を同じくするものの、添加的骨形成がより旺盛であつて、Al-P-ase反応は骨芽細胞及び分化過程の移行期細胞群に強く示され、Azan染色は新生幼若骨梁を青染してこの状態をよく物語っている。軟骨様組織の発生は骨髄移植群の場合と同様に分化現象の旺盛な投与群にみられるが、骨髄移植群の場合に比して遙かに少ない。

破骨細胞は新生骨梁にのみみられるものであるが、投与群と対照群の間には分布密度の差を示し得ない。

5) 移植後3週目

新生骨梁の改造機転は最も旺盛で、整理されて球形化の傾向を示してくる。同時に骨梁中の骨細胞も扁平化し骨梁は成熟性を示して層板構造の光が見えてくる。投与群の方が対照群より遙かに旺盛な骨梁の発達を示しているが、逆に移植骨梁の残存性は器質化の低下によつてか対照群の方がより多く認められる傾向を示している。

6) 移植後5週目

造血機能を営む球形の小骨を形成してくることは、骨髓移植群の場合と全く同様である。対照群では骨梁の成熟性及び造血骨髓組織の構造等が著明に劣っている(図33, 34)。

7) 移植後10週目

全体的に縮小化の傾向を示す点等、全て骨髓移植群の場合と同様の所見がみられた。

第4節 骨形成率

以上の連続切片法に基づく組織学的並びに組織化学的検索から、各 Anabolic Steroids の投与量別骨形成率を算出して、各々の対照群と比較検討した(表4)。

骨形成率の算出法は、移植例数に対する骨形成例数の割合を百分率で表わしたものである。

去勢群

去勢群に於て骨髓移植群、海綿骨移植群ともにAnabolic Steroids を投与することにより70~80%の骨形成率をみたのに対し、その対照群は50%前後の低率を示して有意の差を認めることが出来た。即ち投与群を骨形成の最も旺盛な投与量群：19 NAPP 投与群、HMD 投与群は体重 per kg 5 mg, SV 投与群は体重 per kg 10mg 投与群で代表して、その対照群と比較すれば次の如くなる。

1) 骨髓移植群

対照群が46.8%(29/62)に対し、19 NAPP投与群は79.2%(19/24)で対照群の1.7倍、HMD投与群は71.4%(20/28)で対照群の1.5倍、SV投与群は78.6%(22/28)で対照群の1.7倍と優れた成績を示している。

2) 海綿骨移植群

対照群が53.2%(33/62)に対し、19 NAPP 投与群は79.2%(19/24)で対照群の1.5倍、HMD投与群は78.6%(22/28)で対照群の1.5倍、SV 投与群は82.1%(23/28)で対照群の1.5倍と優れた成績を示している。

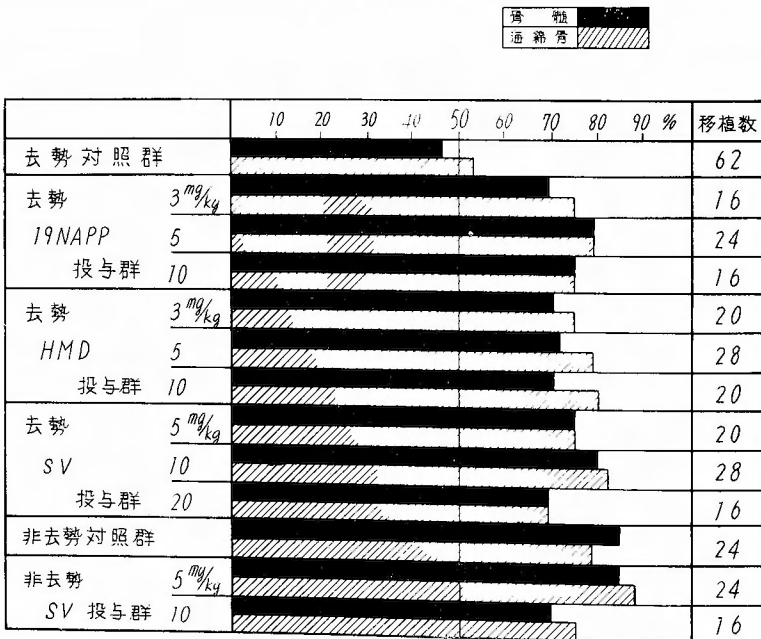
骨髓移植群、海綿骨移植群ともに各Anabolic Steroids 間の骨形成率は、移植例数を考慮に入れるとさして有意の差を認めることは出来ない。

非去勢群

非去勢群でこれを同様に検討してみると次の如くなる。投与群はSVの体重per kg 5 mg投与群である。

1) 骨髓移植群

表 4 骨形成率 形成数/移植数(%)



対照群が83.3%(20/24)に対し、SV 投与群も83.3%(20/24)と同様の成績であった。

2) 海綿骨移植群

対照群が79.2%(19/24)に対し、SV 投与群は87.5%(21/24)で対照群の1.1倍となった。

非去勢群では、投与群が対照群に比して何れも特に優れていると言う結果は得られなかった。

以上去勢群、非去勢群ともに、組織学的並びに組織化学的所見に基づく骨形成の成績と、この骨形成率の示す結果はともに至適投与量の存在を推定せしめて、大量になると逆に抑制的結果を招くことを物語っている。又骨髓移植と海綿骨移植の場合の骨形成率には有意と思われる差なく、殆ど同等の成績を収めた。

第4章 総括並びに考按

性ホルモンが生体の代謝機構に重要な役割を演じていることは周知の事実であるが、Androgenを骨折時の仮骨形成、或は骨粗鬆症の骨梁再建等に意味づけて、臨床上に応用してきたのはここ20数年來のことである。動物実験に於てもその効果は賛否両論に分かれて論議されてきたところであり、今日では一般に少量では骨形成を促進し、大量では逆にこれを抑制するものと考えられている。勿論ホルモンの実験であれば、投与量及び投与方法の問題はもとより、年令、性別、栄養摂取、他の内分泌器官との相互関係、更に動物実験では動物の種類まで関与するものであつて、常に一定した結果を得ることは困難である。況や窒素平衡が正にある動物に Anabolic Steroid を投与しても、その効果を加算出来ないと言う安藤(1957)の報告も当然のことであろう。骨折後の窒素平衡が負になることは土屋(1953)の述べるところであるが、生体の防禦修復の機転が速やかにこれを代償し得る場合は、この問題もさして考慮の必要を認めないものとなろう。著者の実験に於て、非去勢群で Anabolic Steroids の影響を明瞭に見出し得なかつた所以はここにあると思惟されるのである。逆に去勢群に於て著明な効果を収め得たことは、発育期の家兎を使用したことから、その脱落症状に大きく支配されているものと考えられるのである。

Androgen の有する窒素蓄積作用を指標として、これから脱皮し、独自の分野を開くに至つた Anabolic Steroid が生体を構成する蛋白質の蓄積或はその増成に関与するものであれば、当然体重の増加をもたらす筈である。

著者の使用した Anabolic Steroids は1935年 Ruzicka

及び Butenandt が夫々合成した Stanolone を valerate 化した SV、1956年 Organon 社で合成された19NAPP、及び1959年 Syntex 社で合成された HMD の3種であつて水分蓄積作用等は無視し得るものとされて今日臨床治療界で脚光を浴びているものである。

Anabolic Steroids の体重増加作用は血清蛋白の増加作用とともに一般に認められているものである。潜在性浮腫を考慮に入れたとしても、著者の実験は去勢群に於てその蛋白同化作用を明らかに認め得たと言える。それは術後の急激な蛋白代謝の負平衡の改善及びその後の発育促進で示されている。又この投与群に於て旺盛な骨形成を認め得たことは、全身の新陳代謝にも関聯するものとして興味あること、考えられる。

投与量の問題は極めて難しいことであり、著者は一応の基礎実験を試みて諸家の文献と対比したのであるが、その目的とするところは促進的效果の期待である。然しながら牟礼(1953)のMADの骨折実験、更には諸富等(1961)のHMD、SVの骨折実験にても指摘されているように、著者の実験でも至適投与量の存在を推測し得るものであつて、これを過ぎると逆に抑制的に傾くことを知つた。大量投与はその薬物毒の点よりも、寧ろ全身の内分泌器官に対してその平衡関係を乱すために、逆に抑制的結果をもたらすものとする方が妥当のように思われるのである。

近年骨組織の代謝は、その基質の主要構成成分である蛋白質に中核を求められているが、Anabolic Steroids の応用に関する基礎的研究は未だ乏しい現状にある。従つて著者はこの分野に知見を加えるべく異所的骨形成現象を選んで、再生的骨形成に及ぼす Anabolic Steroids の影響を探索したのである。然しながらこの異所的骨形成の問題自体にも尚未解決の問題が多い。それは移植組織の運命とその骨形成能、更には骨組織に分化する芽組織の起源とその分化過程、或は骨誘導をもたらす刺激の本態等の問題である。

再生的骨形成の組織学的観察は Duhamel (1741) の時代に始まり、今日まで 1) Specific Osteoblastic theory, 2) Metaplastic theory の2説に大別して論議されているが、後者の重要性が今日注目を浴びているとは言え、本現象には複雑な多くの問題を孕んでおり、結局未分化間葉系細胞の特性に鑑みてその特異的組織分化論で綜括されている。

移植骨髓組織の生存増殖とその骨形成能に関しては古く Ollier (1867)の実験以来賛否両論をもつて論じられてきたが、今日尚問題とされるのは骨髓組織中の細

網細胞の有意性である。Radova (1948) は組織培養の結果から、Pffeifer (1948) 及び Williams (1957) 等は骨髓組織移植実験からこれを重要視している。又海綿骨移植の場合は骨梁に附属する内骨膜と骨梁間に介在する骨髓組織が論争的となつて、Fell (1932) の組織培養以来内骨膜説を支持する人もかなりある。一方 Levander (1938) は骨誘導 Bone Induction を想定して、これらの生存増殖を否定し、Special chemical osteogenic organizer の存在を主張した。事実 Levander や Annersten (1940), 更に Lacroix (1945) 等は骨組織よりの抽出物をもつて骨形成に成功している。Lacroix はこの有効成分を Osteogenin と名付けたが、Hartley (1951) は更に骨に分化するための適当な Mesenchymal reaction さえ存在すれば骨形成は起り得ると言つて、その概念を拡張している。浦田 (1960) は著者と同様な移植実験から更に Annersten の方法を追試してこれを実証し、骨誘導説を強調している。又一方 Urist & McLean (1952) は細網細胞及び内骨膜の超生増殖による骨形成能と同時に骨誘導説の関与することを前眼房内移植によつて認めている。以来松原・野村 (1956) 及び服部 (1956), 松森 (1957) 等も同様のことを報告しているが、服部、松森等は前眼房内及び筋肉内に線維性仮骨を移植した場合、骨形成の主導的役割を果たすのは骨誘導現象に他ならないと主張している。そこでこれらの問題を信太 (1960) は各種移植母床をもつて検討しているが腎被膜下移植の場合、骨髓組織中の細網細胞は旺盛な生存増殖を続けると言つている。併しそれが骨髓組織の再生を導いていても骨形成は微々たるものであつたことを認めている。更に他の前眼房内及び筋肉内移植等では骨形成の主導的役割を一層骨誘導にありとしている。著者の実験では細網細胞によると思われる骨髓組織の再生は一部において推察出来る所見を得たが、少なくともそれが骨形成に参与した所見は全く認められなかつた。又移植海綿骨梁の内骨膜の生存増殖に基づく骨形成所見も認め得ないところである。移植海綿骨梁は

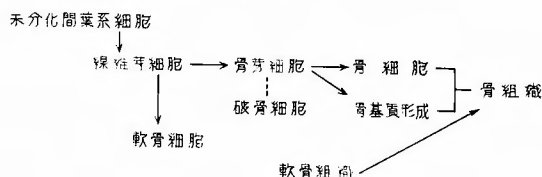
現今多くの人が認める遊離移植骨片死滅説を裏書きする如く、その骨細胞は変性消失している。著者の見解は、筋肉内移植の場合、移植組織が骨髓であつても、又海綿骨であつてもそれが生存増殖して積極的に骨形成を行なうとは考えられないと言ふことである。即ち換言すれば、移植母床より由來する未分化間葉系細胞の化生現象に骨形成の起源を求める結果を得たのである。而もその分化過程は、幼若結合織のかたちで線維芽細胞を経て骨芽細胞に移行しているものであつて一種の骨誘導現象と考えられる。然しながら移植組織中の或る化学物質に特異性を求めるべきものか、或はそれが単なる異物として作用したための組織反応とも解されるのか、この点に関して著者は詳細なる根拠を持たない。移植組織の超生増殖に関しても移植母床の生理的培養条件の具備如何が問題となつて Abbott (1947) や信太の指摘する如く複雑を極める。従つてこれらの移植実験を一律に論じて骨形成の過程を決めることは不可能であると推測されるのである。著者の実験に於て認めた骨形成機転に就いて分化の過程 (表5) を追いつながら Anabolic Steroids の影響を以下論じてゆくことにする。

先ず著者の実験に於て認められた Anabolic Steroids の影響は、移植母床より発生する未熟な間葉系組織の旺盛な發育である。Anabolic Steroids が間葉系組織の發育を促進することは、Tissue bildung の言葉で示されており、創傷治癒促進作用として認められるところである。山本 (1959) は MAD に於て骨関節結核病巣の結合織性治癒促進作用を実証している。著者の成績もこの効果に準ずるものと考えられるのである。

更に Anabolic Steroids はこの間葉系細胞の分化過程の方向を変えることなく促進していることは誠に興味深い所見である。この化生現象の促進は再生的骨形成に應用する為の重要な根拠となるものであろう。一方 Anabolic Steroids 投与群に於て部分的ではあるが、軟骨様組織の発生をみたことは、骨折時の仮骨に類似し

表 5

間葉系細胞の移行形式 (骨形成)



て興味深いものである。それは類骨組織の発達とともに分化現象の豊富で旺盛な事実から説明されるものであると推論したいが、Anabolic Steroids が未分化間葉系細胞の生物学的特性に如何に作用するかは著者は明らかにし得ない。又多くの対照実験から軟骨様組織を証明し得なかつた事実から軟骨誘導化学物質の偶発的存在によるとは一概に考えにくいのである。何れにしても分化過程の移行期細胞群が豊富に出現し、且つ活動性に富むのであれば当然骨芽細胞の増生が促進されるわけであり事実とよく一致している。

著者の実験では骨芽細胞は線維芽細胞より分化してきた所見を示しているが、Anabolic Steroids 投与群に於てこの増生が特に多く認められ、骨梁の発達も著しい。骨芽細胞は嘗て Leriche & Policard(1926)により骨形成能を否定されたが、今日では骨の有機性基質を産生する特殊細胞と考えられ、基質を産生して自らその中に閉じ込められて骨細胞に移行するものとされている。著者の標本に於て骨梁形成初期の幼若骨細胞と骨芽細胞の間に形態の類似性が認められた所見からこれを説明し得るものであり、Albright(1947)が言うように N-hormon が骨芽細胞の増生と骨基質の形成に関与して骨梁再建に働くと言う理論が本実験の結果からも認められるのである。

骨芽細胞から産生されると言う有機性基質は 1) Collagen 2) Mucopolysaccharide protein complex 3) Resistant protein から成つている。この有機性基質の形成が先行し、成熟するや否や骨塩の沈着を急速に招来するものであるから、Anabolic Steroid の影響をこの骨芽細胞の機能とこれら有機性基質の蛋白代謝にみる事が出来る。著者の実験に於て骨塩沈着初期の標本は、Azan 染色及び PAS 反応でこの骨基質形成の先行をよく示している。Geyer (1960) は Anabolic Steroid の作用は貯溜した窒素の一部が骨基質を形成することに意味があると述べているが、結局はこの骨基質の完成により骨塩沈着を招くのであるから、Anabolic Steroid の作用は骨形成促進に通ずるものであると言える。著者の成績は Anabolic Steroids 投与群に骨梁形成の促進、骨塩沈着の充実を著明に見出した。骨塩沈着の充実は又レ線学的追究に於ても骨影像の出現時期とその大きさ、濃さによつてある程度推察されるところである。又鬼束 (1961) は 19NAPP を使用して骨修復の促進を Collagen の増加によつて認めているが、Collagen が骨基質の重要成分であれば当然のことであろう。又石上(1958)は放射性同位元素 Ca^{45} 、

S^{35} を指標として Chondroitin 硫酸と Chondroitin Ca complex の代謝を骨折の修復過程で検討して、骨塩沈着と Chondroitin 硫酸の相関々係を論じているが、Mucopolysaccharide protein complex の意義も重要なものである。

骨組織の微細構造に関しては、Robinson 一派の電子顕微鏡学的研究があり、骨塩結晶と骨基質の關係が漸次明らかにされて骨基質の Collagen 線維と Mucopolysaccharide protein complex の重要性が一層強調されてきた。Robinson & Cameroun(1956)の研究によれば、骨塩は Hydroxy apatite の結晶構造を有し、長さや幅が $200 \sim 300 \text{ \AA}$ 、厚さは数単位胞に相当する $20 \sim 50 \text{ \AA}$ の薄い平板状として認められ、この結晶は Collagen 線維の長軸方向と平行に配列し、而も線維のもつ $640 \text{ \AA}$ の周期の帯の間に存在していると言う。即ち両者の間に Epitaxy の相関々係を推測し得るものであるとしている。Collagen は Hydroxy proline を含むことが特徴的であつて、その他 Glycine 等を含む硬蛋白として特有の結晶構造を呈していると言われる。Robinson (1960)は Collagen 線維と骨塩結晶との間の Epitaxy の關係を、更に ATP と Phosphatase の関与で分子化学的に説明を加えているが、果して Hydroxy proline や Glycine 等の ϵ アミノ基が Phosphatase で活性化されて骨塩結晶と化学的結合を生ずるものか否かは実証されていない。何れにしても Collagen 線維は成熟するとともにその太さを増して溶解性等の化学的性質が変化するとされているが、成熟と同時に忽然と骨塩の沈着を招来するものであれば、著者が Azan 染色で観察する Collagen 線維の染色性の変化もこれらの過程を示すものと推察されるのである。従つて骨塩の沈着を加味しながら Collagen 線維の成熟性のある程度観察出来るわけである。かかる根拠に基づいて Anabolic Steroids の影響をみると明らかに Collagen 線維の成熟性が認められ、且つ Ca 染色による骨塩沈着の所見と一致している。

一方 Mucopolysaccharide protein complex は Aspartic acid や Leucine 等を多量に含み、Chondroitin 硫酸や多糖類を有して変化を受けやすいものとされている。Collagen が static dynamic な代謝を示すのに較べれば対称的であつて、Collagen 線維の成長につれてその量を減少することから Collagen 線維の形成に関与すると言われている。又骨塩沈着の場としても重要な役目を果たしていることが Neuman(1952)の Chondroitin Ca complex の理論から窺われる。Sobel (1952)はこの結合

体を作る Chondroitin 硫酸自体の変化が骨塩沈着の準備状態であるとしているが、動物の具殻の研究や病的石灰沈着等に於て糖蛋白が重要な場を提供していることから、これ等の結合体が骨塩沈着の先決条件であろうと考えられるのである。従来から Chondroitin 硫酸を指標として組織化学的に Meta 反応が試みられ、PAS 反応と対比して研究されて来たが、このことは Mucopolysaccharide の意義を求め一端の方法と考えられる。著者が Anabolic Steroids 投与群に認めた軟骨組織或は類骨組織の部で石灰沈着との関連性に於て認めた Meta 反応と PAS 反応の所見は、これ等のことを物語るものであろう。又骨塩結晶の示す epitactic な沈着機転の相手が Collagen 線維よりも寧ろこの Mucopolysaccharide protein complex であるかも知れず、今後の問題点となろう。更に骨塩沈着の過程に酵素や ATP の作用が予想されるのであるが、何れにしても骨基質の意義は極めて重要であつて Wolbach (1946) の言を借りるまでもなく、骨基質の蛋白質、ひいてはアミノ酸の代謝が骨塩沈着を左右するものと考えられる。従つてこの有機性基質の産生を促進する Anabolic Steroids の影響は、著者の実験でも骨塩の沈着を充実にせしめた結果をもたらしていると言えるのである。

骨梁の改造機転に出現する破骨細胞の意義に就いては未だ定説をみないが、著者の実験に於て Anabolic Steroids を投与した場合でも、対照群に比してその分布密度は何等異つていなかった。骨塩の代謝に関与すると考えられているクエン酸は Krebs Cycle の重要な因子の一つであつて磷酸カルシウムとともに沈着しているとされ Neuman (1958) は副甲状腺ホルモンとの関係に立つて骨塩結晶に対するキレート剤的作用を営むものと論じている。このクエン酸が骨組織に 1% も含有されていて、如何なる作用を営むものであるかは未だ不明の点が多く、骨の吸収現象とともに興味深いところである。

骨形成の時期的関係と骨梁の改造機転の出現時期は Anabolic Steroids の投与によつて何等本質的な差異を認め得なかつた。この事実からしても Anabolic Steroids の骨形成に及ぼす影響は、主として量的に促進するものと著者は考えたのである。又骨梁改造機転に際しても Anabolic Steroids 投与群の方が添加現象を旺盛に示すことより造骨細胞の増生をもたらした量的問題を主張したいのである。

骨梁の發育と成熟に関しては、Azan 染色によつても Collagen 線維の染色性から窺われるのであるが、骨

細胞の形態と配列性に於て一層明瞭に認められるところである。Anabolic Steroids が層板構成の完成にも好影響を与えていることは、骨折の癒合を強固ならしめる所見に通ずるものとして興味深い。著者の実験で終末的完成として示される所謂小骨 Ossicle の組織学的構造は、これらの所見の集積として考えられるものであろう。

以上経過を追つて観察した Anabolic Steroids の影響は、骨形成率として数量的にも表現されるところであり、骨形成、骨發育、更に骨成熟にすべて促進的に作用している。これらは結局分化現象の促進と造骨機転に参与する細胞の蛋白代謝が改善された結果に基づく所産であると考えられる。

最後に骨形成に関与すると考えられる酵素系の一つとして Al-P-ase の問題を追究してみたい。一般に生体内の代謝を論ずる場合、酵素系を無視することは出来ないのであるが、Al-P-ase も又高分子蛋白の細胞内産生物であれば、Anabolic Steroids により蛋白代謝の一環として当然影響を受けるものと推測されるのである。従つて Anabolic Steroids が Al-P-ase の活性度に直接作用することよりも、寧ろ蛋白代謝の改善を通じて細胞機能が高められる結果、必然的に而も合目的に活性度の高い Al-P-ase が多量に産生されると考える方が妥当であらう。

Al-P-ase の意義に関しては古くより幾多先人の輝かしい業績がある。造骨機転に関与するものとして、Robison (1923) がその化学的特性より磷酸エステルの加水分解に基づく石灰塩沈着機轉の仮説を提唱して以来、Ca イオンと PO_4 イオンの溶解度積に及ぼす所謂押し上げ機轉が注目された。その後軟骨組織の石灰沈着機転に於ける解糖現象、即ち Glycogen の消失と同時に石灰沈着をきたす事実から、Gutman (1941) はこの過程で生ずる磷酸エステルを Al-P-ase の作用基質として、石灰沈着機轉の Al-P-ase 説を論じた。然るに in vitro の石灰沈着実験、更には種々の阻害実験からこの説は多くの批判を浴びて修正されたのである。一方石灰沈着機転に関しては、軟骨組織中の石灰沈着と Chondroitin 硫酸の相関々係より Logan (1935)、Hass (1943) 等が Chondroitin 硫酸の重要性を唱えて以来、Loewi (1953) は Chondroitin 硫酸の Depolymerisation 説で所謂 Chondroitin Ca complex 説等の説明を加えて、又 Sylven (1947) や Sobel (1952) 等の高重合粘液多糖類イオン交換説が注目せられて、Al-P-ase が直接石灰沈着に参与すると言う理論は次第に衰退の一途

を辿つたのである。一方 Wolbach (1946) が骨塩沈着の場を骨基質のアミノ酸と称えて以来、骨基質の重要性が認識され、Robinson 一派の電子顕微鏡による Collagen 線維と骨塩結晶の相関関係が述べられるに及び、骨基質の意義は益々検討を加えられて Al-P-ase の作用機転も骨基質形成の問題に向けられてきたのである。

骨組織に於て明らかとなつた dynamic systematic な骨塩沈着過程には当然酵素系の介入が考えられるのであるが、骨基質にかくの如き沈着条件を附与する酵素系が Phosphatase と想像されても、それが直ちに Al-P-ase であるとは断定出来ない。

著者の実験から明らかとなつたことは、骨芽細胞に Al-P-ase 反応が最も強く認められたことであり、骨基質が骨芽細胞によつて産生されるものであれば、Al-P-ase が骨基質形成に関与するものと考えられる。岩 (1952) や久木田 (1957) 等が Al-P-ase の作用機転を骨基質形成に関与するものとして述べていることに對し、著者はかかる見地からこれに支持を与えたい。

骨基質の Collagen 線維の形成機転に関しては Pritchard (1956) や Carneiro (1959) の説明がある。即ち骨芽細胞から線維蛋白質又はその前駆物質のかたちで分泌されたものが細胞外で重合することによつて形成されるというものである。これは線維芽細胞の Collagen 線維産生過程とその説明を一にするものである。事実骨芽細胞は線維芽細胞と電子顕微鏡学的に全く同一の構造を有すと言われ、しかも両者から分泌された Collagen 線維は化学的に等しいことが判明してきた。このことは単に間葉系と言う同一系統に属する細胞の特性を意味するだけでなしに、著者の実験に於て見られた線維芽細胞から骨芽細胞に分化していると言う所見の妥当性を示唆するものと言つて誤りなからうと思われる。即ち骨梁形成初期の Collagen 線維の染色像及び分化過程の細胞の形態的連続性をよく説明し得るものである。

然しながらこの Collagen の産生機転を Mucopolysaccharide protein complex の産生と関係づけて論ずるには未だ不明の点が極めて多い。従つて今日推測し得ることは、かゝる骨基質の産生が骨芽細胞の特性によつてなされるものであらうとする解釈であるに過ぎない。

生体の代謝機構、殊に蛋白代謝ではすべて磷酸エステル化の過程を経て代謝が営まれているものであるから、当然骨芽細胞内での Al-P-ase はこれらの有機性

基質の形成過程に関与するものと推論出来よう。然らば骨芽細胞中に最も高い陽性度を示している Al-P-ase を一つの指標として、骨基質を産生する骨芽細胞の機能を窺つても異論はなからうと考えられる。更に新陳代謝の旺盛な細胞内には Al-P-ase が豊富に存在すると言う一般的事実から、Al-P-ase 反応をもつて分化過程の細胞群を検討することが出来るであらう。

Al-P-ase をもつて細胞の新陳代謝、ひいてはその活動性を推察したい著者は、この反応により骨芽細胞とそれに分化する移行期細胞群の機能に就いて検討を加えてみた。

Anabolic Steroids に骨形成促進作用を認めた著者の実験成績では、この Al-P-ase 反応の所見がよく有意性を示した。それは新陳代謝の旺盛な骨形成の促進部位に於て、骨芽細胞並びに移行期細胞群に強く反応を示したことである。即ち形態学的特性の裏づけとして認め得たのである。Kroon (1952) の言うように、骨形成に際しては Chondroitin 硫酸、或は糖蛋白の問題よりも Al-P-ase 反応の出現が先行条件としてより重要であるから、この所見は重視すべきものである。赤星 (1957) は Al-P-ase の活性度をもつて骨関節結核の病巣周囲に於ける骨軟骨組織の反応性増殖を検討してその他の臓器結核と自ら異なる特異性を有することに就き報告しているが、著者も本実験に於て Al-P-ase 反応陽性度の変化からも、Anabolic Steroids の骨形成促進作用を実証し得たと考える。移行期細胞群から骨細胞まで示される陽性所見は、間葉系細胞の分化を物語る一連の反応であつて、これからも間葉系細胞の分化促進の程度を知ることが出来ると考えられる。立松 (1961) が骨芽細胞の活性度を Al-P-ase 反応に求めて、SV の効果を報告しているが、著者は更に分化の促進所見まで検討を加えて Anabolic Steroids の効果を論ずるものである。

以上異所的骨形成に及ぼす Anabolic Steroids の影響を検索した結果、骨形成に優れた促進的作用を認め得た。従つて整形外科領域に於ける再生的骨形成の問題に、Anabolic Steroids は適応条件さえ誤らねば大きく貢献するものと考えられる。特に Androgen の失調症状を呈してくるものには極めて有効であらうと推測される。かゝる見地から Anabolic Steroid の研究の発展とともにこの分野に於けるその応用は今後更に一層掘り下げて検討される必要があるであらうことを痛感するものである。

- siology of Bone. Academic Press, Inc., New York, 1956.
- 8) Carneiro, J. : Role of osteoblasts and odontoblasts in secreting the collagen of bone and dentin, as shown by Radioautography in mice given Tritium-labelled glycine. *Exp. Cell Research*, **18**, 291, 1959.
 - 9) Chase, S. M. et al. : The fate of autogenous and homogenous bone graft. A historical review. *J. Bone & Joint Surg.*, **37-A**, 809, 1955.
 - 10) Fell, H. B. : The osteogenetic capacity in vitro of periosteum and endosteum isolated from the limb skeleton of fowl embryos and young chicks. *J. Anat.*, **66**, 157, 1932.
 - 11) Geyer, V. G., et al. : Klinische und experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Methandrostenolone. *Helv. Med. Acta.*, **27**, 514, 1960.
 - 12) Gutman, A. B. & Gutman E. B. : A phosphorylase in calcifying cartilage. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **48**, 687, 1941.
 - 13) Hartley, J. & Tanz, S. S. : Experimental osteogenesis in rabbit muscle. *Arch. Surg.*, **62**, 845, 1951.
 - 14) 服部 颯, 他 : 骨形成に関する実験的研究. 日整会誌, **32**, 233, 1958.
 - 15) 藤本憲司 : 骨新生と吸収. 整形外科, **2**, 6, 1951.
 - 16) 石上英昭 : Isotope を用いた骨折治癒過程に於ける基質代謝の研究. 日整会誌, **32**, 393, 1958.
 - 17) 岩 喬 : 仮骨組織石灰化に関する研究. 日整会誌, **26**, 89, 1952.
 - 18) 近藤鋭矢, 他 : 整形外科領域に於ける Stanolone の使用経験. 整形外科, **12**, 475, 1960.
 - 19) Kroon, D. B. : Phosphatase and the formation of protein carbohydrate complexes. *Acta Anat.*, **15**, 317, 1952.
 - 20) 久木田光郎 : 骨萎縮の実験的研究. 日整会誌, **30**, 821, 1957.
 - 21) 久保久雄, 高松英雄 : 解 磷 酵 素 (Phosphatase) の組織化学的研究. 日病会誌, **40**, 1, 1951.
 - 22) Lacroix, P. : Recent investigation on the growth of bone. *Nature*, **156**, 576, 1945.
 - 23) Levander, G. : A study of bone regeneration. *Surg. Gynec. Obst.*, **67**, 705, 1938.
 - 24) Levander, G. : An experimental study of the role of the bone marrow regeneration. *Acta Chir. Scand.*, **83**, 545, 1940.
 - 25) Lison, L. 今泉 正訳 : 組織化学と細胞化学. 理論と方法. 1951, 白水社.
 - 26) Logan, M. A. : Recent advances in the chemistry of calcification. *Physiol. Rev.*, **20**, 522, 1940.
 - 27) 松原 翠, 野村哲郎 : 骨組織の誘導に関する研究. 日整会誌, **30**, 582, 1956.
 - 28) 松森 茂 : 骨形成に関する実験的研究. 四国医誌, **11**, 75, 1957.
 - 29) 美甘研一, 他 : 骨損傷修復に関する諸種抗生物質及びホルモンその他の影響. 日整会誌, **29**, 353, 1955.
 - 30) 三宅 儀, 他 : 生体内蛋白代謝に及ぼす蛋白同化ステロイドの作用機転. 最新医学, **17**, 1772, 1962.
 - 31) 水野昭平 : 発育期マウスの骨に対する性ホルモンの影響. 日整会誌, **35**, 143, 1961.
 - 32) 諸富武文, 他 : 整形外科領域に於ける蛋白同化ホルモン, アナンドロールに就て. 最新医学, **16**, 2937, 1961.
 - 33) 牟礼 剛 : MAD の骨折治癒機転に及ぼす影響. 最新医学, **8**, 115, 1953.
 - 34) Neuman, W. F. & Neuman, M. W. : Chemical Dynamics of Bone Mineral. 荒谷真平訳監修 : 骨の生化学. 1960, 医歯薬出版.
 - 35) 岡本健治, 他 : β -Androstanolone の体重増加作用について. 小児科臨床, **13**, 318, 1960.
 - 36) 鬼東卓弥 : 外傷に対する骨の反応(第1報), 骨組織に於けるコラーゲンの変動. 日整会誌, **35**, 295, 1961.
 - 37) 岡本耕造 : 顕微鏡的組織化学. 1955, 医学書院.
 - 38) Pfeiffer, C. A. : Development of bone from transplanted marrow in mice. *Anat. Record*, **102**, 225, 1948.
 - 39) Pritchard, J. J. : The Osteoblasts. The Biochem. & Physiol. of bone. New York, Acad. Press, Inc., 1956.
 - 40) Robinson, R. A. : Chemical Analysis and Electron Microscopy of Bone. Bone as a tissue. McGRAW-HILL Book co., 1960.
 - 41) Robison, R. : The possible significans of hexose phosphoric acid esters in ossification. *Biochem. J.*, **17**, 286, 1923.
 - 42) Rodahl, K., et al. : Bone as a tissue. McGRAW-HILL Book co., 1960.
 - 43) Rubin, P. S., et al. : Histochemical studies on the role of calcifiability and calcification. *J. Bone & Joint Surg.*, **34-B**, 646, 1952.
 - 44) 佐藤光永, 他 : 線維細胞, 軟骨細胞, 骨細胞, 破骨細胞, 骨髄細胞の相互関係. 日病会誌, **43**, 487, 1951.
 - 45) Schajowicz, F., et al. : Histochemical studies on glycogen in normal ossification and calcification. *J. B. J. S.*, **40-A**, 1081, 1958.
 - 46) 信太勇行 : 各種母床における骨髄並びに骨皮質移植の実験的研究. 日整会誌, **34**, 605, 1960.
 - 47) Siffert, R. S. : The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *J. Exp. Med.*, **93**, 415, 1951.
 - 48) Sobel, A. E. : Calcification investigation of the role of chondroitin sulfate in the calcifying

- mechanism. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 87, 7, 1954.
- 49) Stolkowski, J. 松岡, 八島訳: カルシウムと生命. 1959, 白水社.
- 50) Sylven, B.: Cartilage and chondroitin sulfate, and physiological ossification. J. Bone & Joint Surg., 29-A, 273, 1947.
- 51) 高松英雄, 赤星義彦: 硬組織に於けるアルカリフォスファターゼの組織化学的証明法. 日外宝, 26, 301, 1957.
- 52) 田坂定孝, 他: 蛋白同化ステロイドの臨床的応用の最近の動向. 最新医学, 16, 1533, 1961.
- 53) 立松昌隆: 幼若マウスの骨アルカリフォスファターゼに対する蛋白同化ホルモン (β -Androstanolone) の作用について. ホルモンと臨床, 9, 527, 1961.
- 54) 土屋弘吉: 骨折患者の窒素代謝に関する研究. 日整会誌, 26, 57, 1952.
- 55) 玉井達二: 骨折の化学. 整形外科, 3, 103, 1952.
- 56) 浦田固志: 異所的骨形成に関する組織化学的研究. 日外宝, 29, 1258, 1960.
- 57) Urist, M. R. & McLean, F. C.: Osteogenetic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. J. Bone & Joint Surg., 34-A, 443, 1952.
- 58) 山本忠治: 骨関節結核の治癒促進に関する実験的研究. 中部整災誌, 2, 295, 1959.
- 59) 吉川靖三: 骨とホルモン・整形外科, 10, 421, 1959.
- 60) 吉川春寿: 骨組織の石灰化. 整形外科, 3, 53, 1952.
- 61) 吉村義之: 仮骨分化の実験病理学的研究. 日病会誌, 40, 98, 1951.
- 62) 山本 清: ホルモン作用と酵素. 1957, 金原書店.
- 63) 若松英吉: 骨粗鬆症の臨床と病理. 整形外科, 10, 643, 1959.

図1 骨髄移植群のレ線像(去勢群)

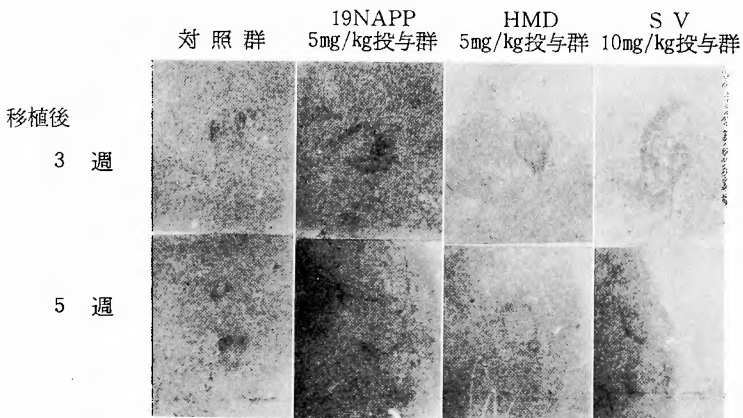


図2 海綿骨移植群のレ線像(去勢群)

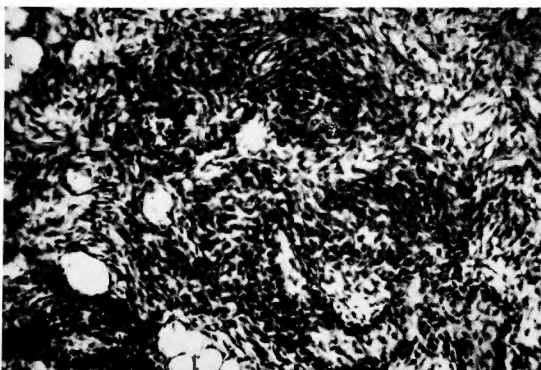
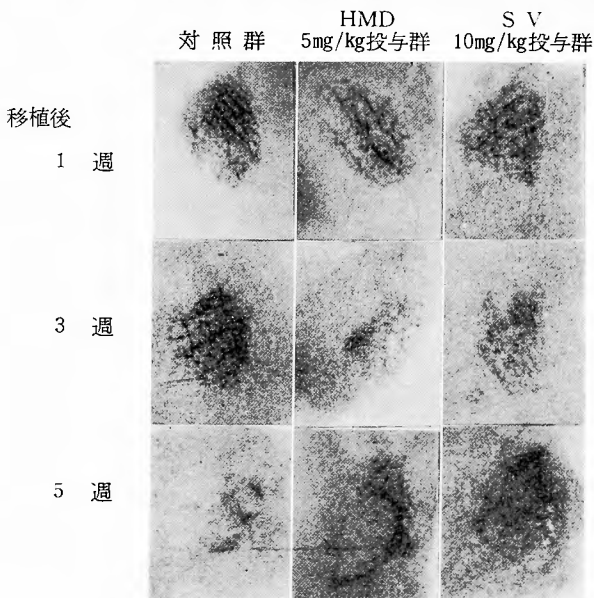


図3 骨髄移植1週, 去勢対照群, H.E. 染色, $\times 150$
骨梁形成は未熟で, 且つ貧弱である。

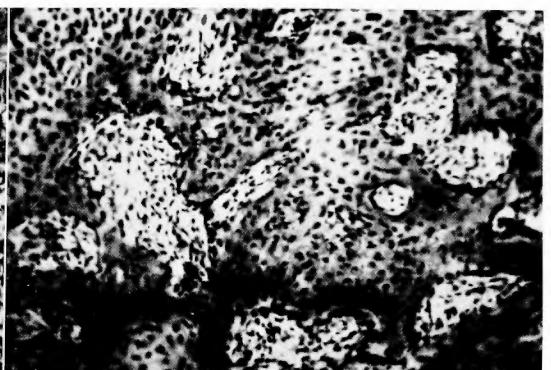


図4 骨髄移植1週, 去勢 SV 10mg/kg 投与群,
H.E. 染色, $\times 150$ 骨梁形成は旺盛で樹枝状に発
達し, 移行期細胞群も豊富に認められる。

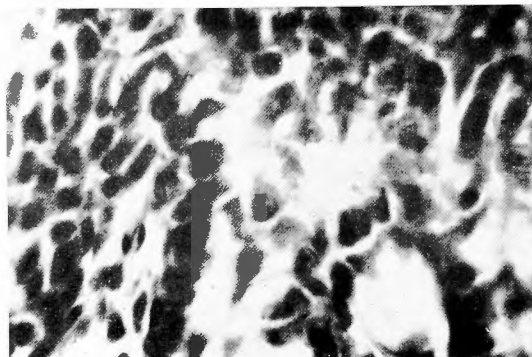


図5 骨髄移植1週，去勢 HMD 5mg/kg投与群，
H.E.染色，×600 骨梁形成初期の所見で，
線維芽細胞より骨芽細胞に移行している。

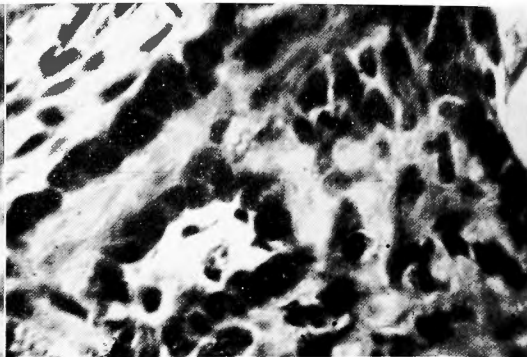


図6 骨髄移植1週，去勢 HMD 5mg/kg投与群，
H.E.染色，×600 骨梁が完成された初期で，
幼若骨細胞は未だ骨芽細胞に似た形態を示して
いる。

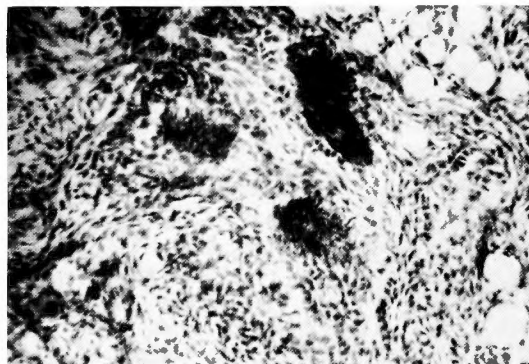


図7 骨髄移植1週，去勢対照群，Ca 染色，
×150
骨梁形成は貧弱で骨塩沈着も少ない。

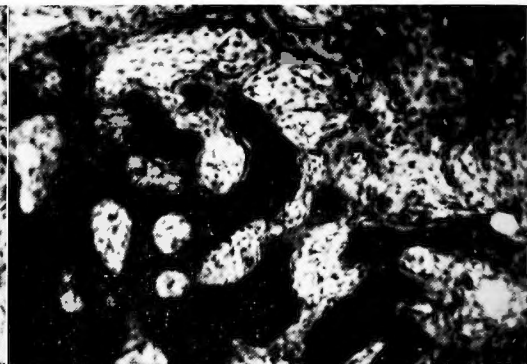


図8 骨髄移植1週，去勢 19NAPP 5mg/kg 投与
群，Ca 染色，×150
骨梁の発達に伴って骨塩沈着も旺盛である。

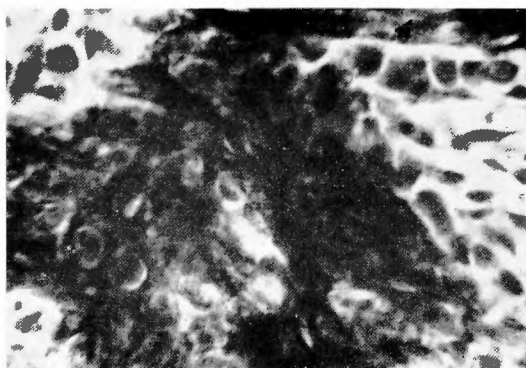


図9 骨髄移植1週，去勢 SV 10mg/kg 投与群，
Ca 染色，×600 骨塩沈着初期の像で，骨小
腔の周囲で Collagen 線維の方向に沿って認めら
れる。

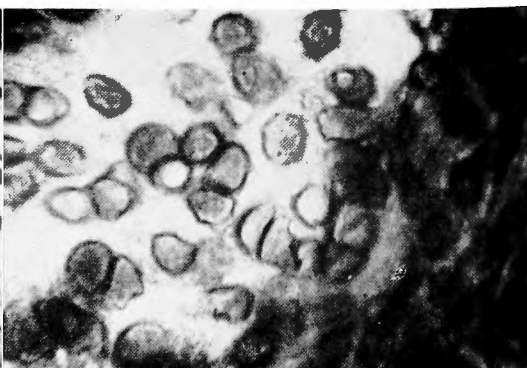


図10 骨髄移植1週，去勢 SV 10mg/kg 投与群，
Al-P-ase反応，×600 全て細胞内に認めら
れるが骨芽細胞が最も陽性度が強い。

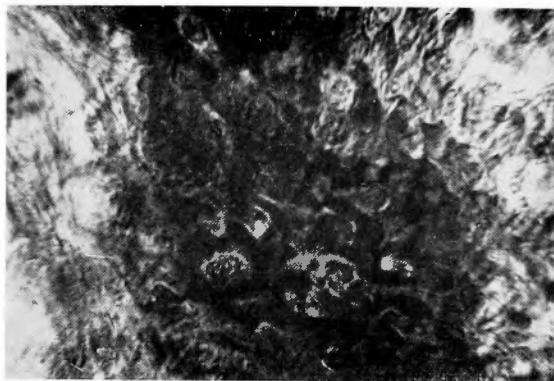


図11 骨髄移植 1 週, 去勢対照群, Azan 染色.
×600 Collagen 線維は骨小腔の間を網目状
に発達しているが未だ骨塩沈着微量であるため
青染してよく示される。

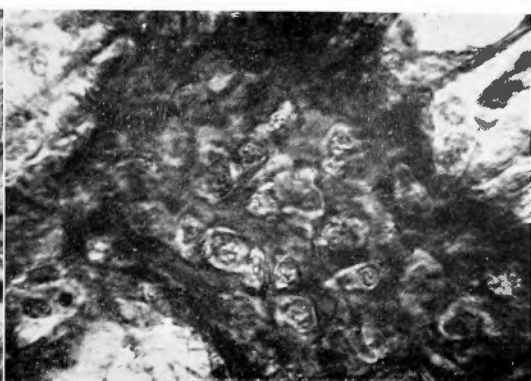


図12 骨髄移植 1 週, 去勢 SV 10mg/kg 投与群,
Azan 染色. ×600 骨塩沈着に伴って
Collagen 線維は橙色を帯び線維構造不明瞭とな
る。

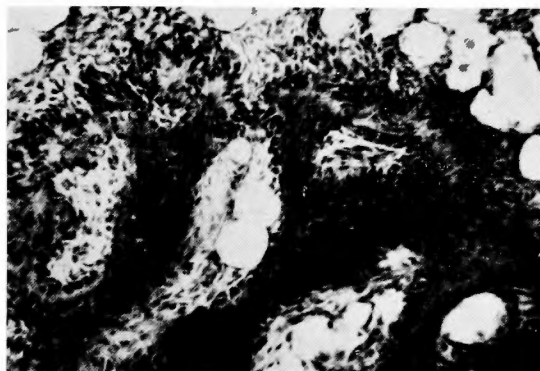


図13 骨髄移植 1 週, 去勢HMD 5mg/kg投与群,
PAS 反応. ×150 骨塩沈着に先行して基質
は陽性度を増している。

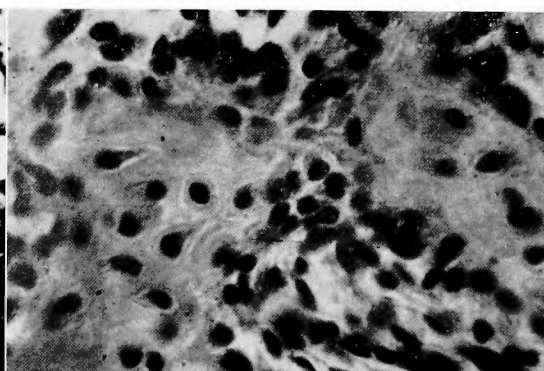


図14 骨髄移植10日, 去勢 19 NAPP 5mg/kg投与
群, H.E.染色. ×600
骨梁の成熟とともに骨細胞も円形から卵形とな
る。

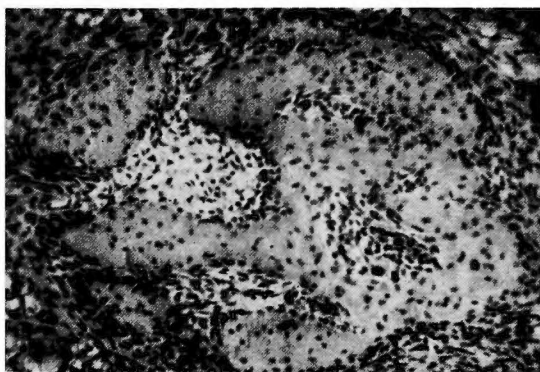


図15 骨髄移植 2 週, 去勢対照群, H.E. 染色.
×150 骨梁の改造機転が出現しているが,
発展傾向に乏しい。

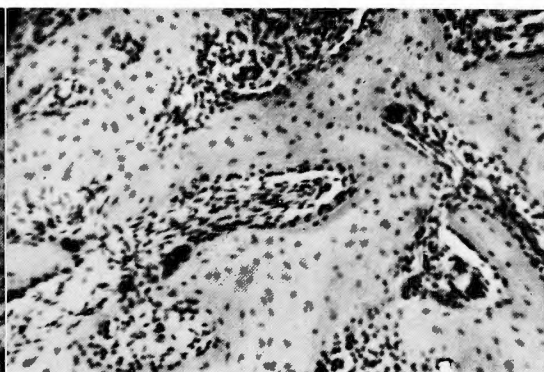


図16 骨髄移植 2 週, 去勢 SV 10mg/kg 投与群,
H.E.染色. ×150 旺盛な骨梁の発達を示し
ているが破骨細胞の分布密度には差がない。

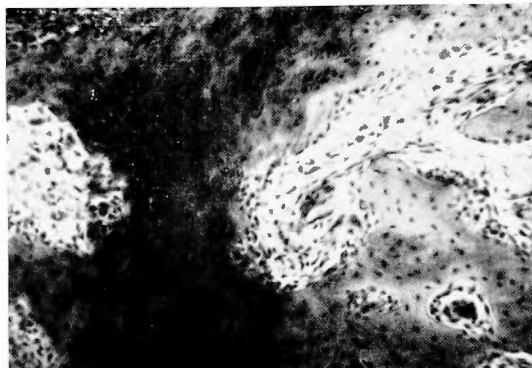


図17 骨髓移植2週，去勢 SV 10mg/kg, PAS 反応. ×150
骨梁に移行した軟骨様組織の出現をみる。

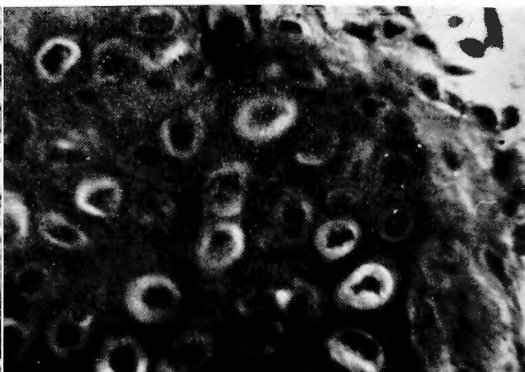


図18 骨髓移植2週，去勢 SV 10mg/kg 投与群，PAS 反応. ×600
部分的に軟骨細胞も認められる。



図19 骨髓移植2週，去勢 SV, 10mg/kg 投与群，Meta 反応. ×150
特に軟骨細胞部に Meta 反応は著明である。

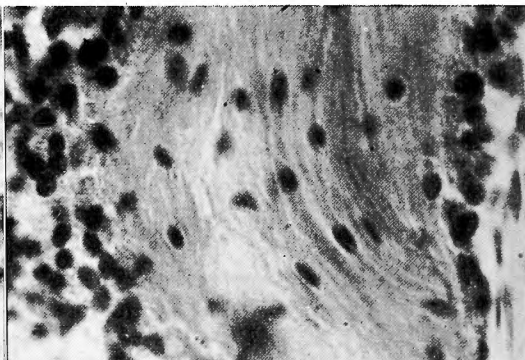


図20 骨髓移植3週，19 NAPP 5mg/kg 投与群，H.E.染色. ×600
骨梁の成熟性は増し骨細胞の扁平化と層板状配列の傾向を示す。

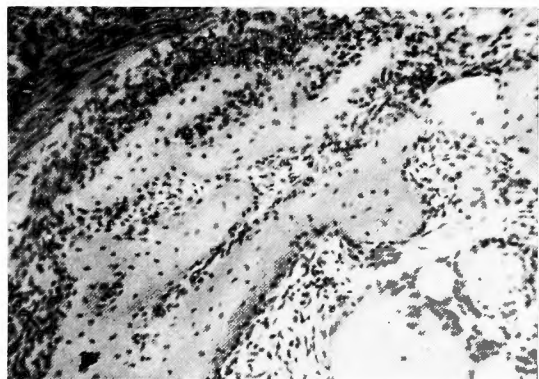


図21 骨髓移植3週，去勢対照群，H.E. 染色. ×150
骨梁の発達も弱々しくその構造も成熟性に欠けている。

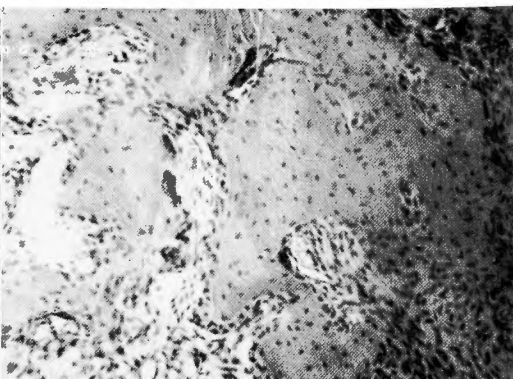


図22 骨髓移植3週，去勢HMD 5mg/kg投与群，H.E.染色. ×150
骨梁の成熟性は優れ周囲から尚添加現象旺盛である。

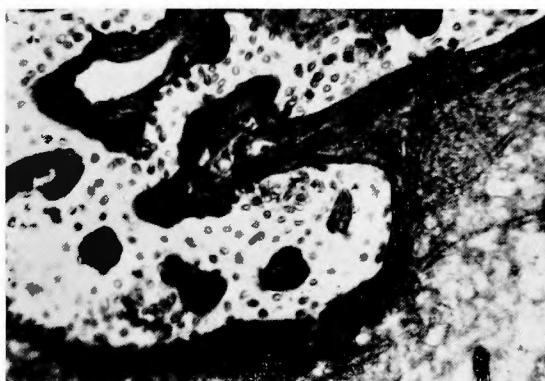


図23 骨髄移植3週，去勢対照群，Al-P-ase 反応。
×150 移行期細胞少なく添加現象も弱い。

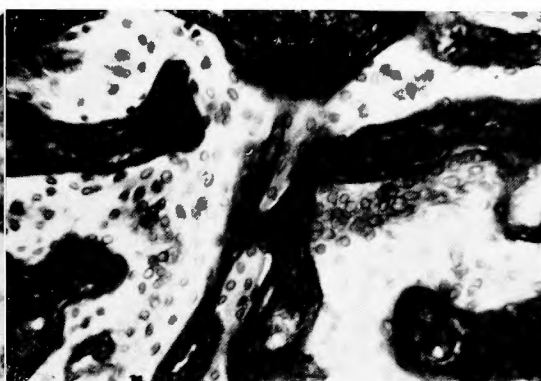


図24 骨髄移植3週，去勢 SV 10mg/kg 投与群，
Al-P-ase 反応。×150 骨芽細胞の陽性度強
く移行期細胞も豊富である。添加機転も尚旺盛
に認められる。

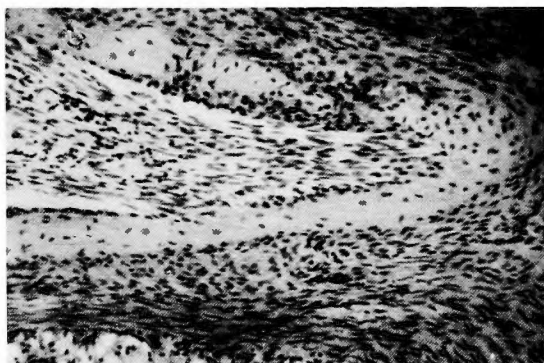


図25 骨髄移植5週，去勢対照群，H.E. 染色。
×150 骨組織の成熟性劣り，内蔵する骨髄
組織は退化する傾向を示している。

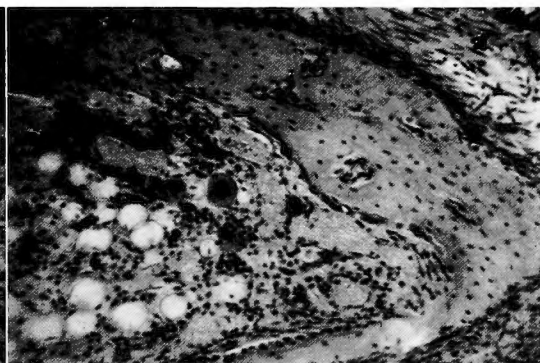


図26 骨髄移植5週，去勢 19 NAPP 5mg/kg 投与
群，H.E. 染色。×150 旺盛な骨組織の発達
と内蔵する骨髄組織の造血機能も著明に認めら
れる球状骨となる。

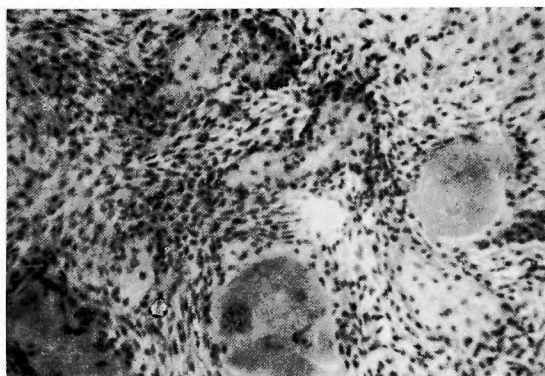


図27 海綿骨移植1週，去勢対照群，H.E. 染色。
×150 移植海綿骨梁の周囲に幼若結合組織が
侵入しているが骨梁形成は貧弱である。

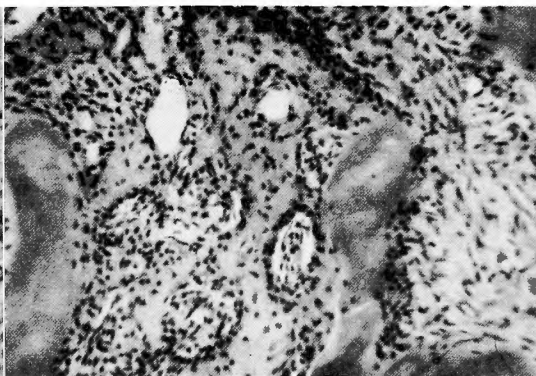


図28 海綿骨移植1週，去勢 HMD 5mg/kg 投与
群，H.E. 染色。×150 骨梁形成は旺盛で添
加的乃至樹枝状発達をなしている。

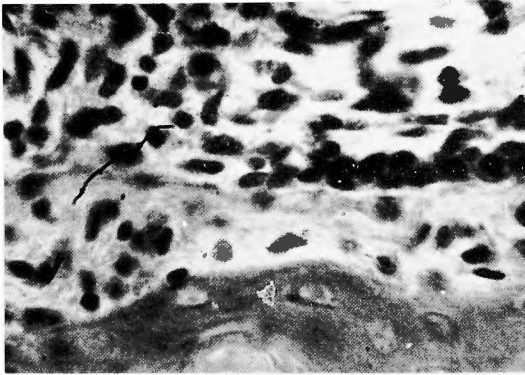


図29 海綿骨移植1週, 去勢 SV 10mg/kg, H.E. 染色. $\times 600$ 移植骨梁は死滅し新生骨梁が添加的に出来ている.

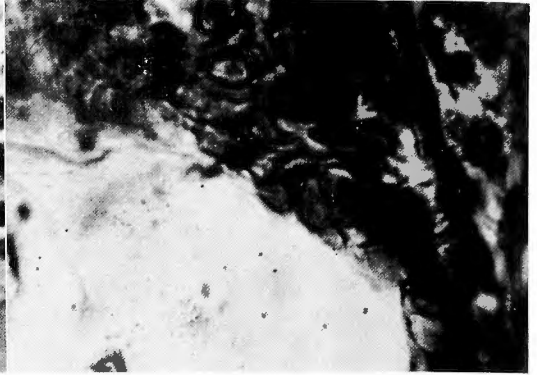


図30 海綿骨移植1週, 去勢HMD 5mg/kg 投与群, Al-P-ase 反応. $\times 600$ Al-P-ase 反応は移植骨梁には認められない.



図31 海綿骨移植10日, 去勢 19 NAPP 5mg/kg 投与群, Azan 染色. $\times 150$ 樹枝状に発達して移植骨梁を連結しているが移植床に近い処程新生骨梁はよく形成されている.

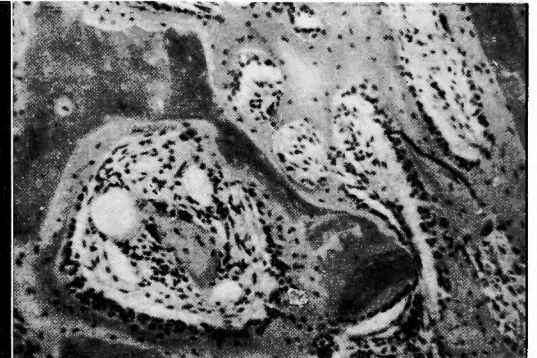


図32 海綿骨移植2週, 去勢HMD 5mg/kg 投与群, H.E. 染色. $\times 150$ 改造機転出現. 移植骨梁は旺盛な新生骨梁によつて置換されてくる.

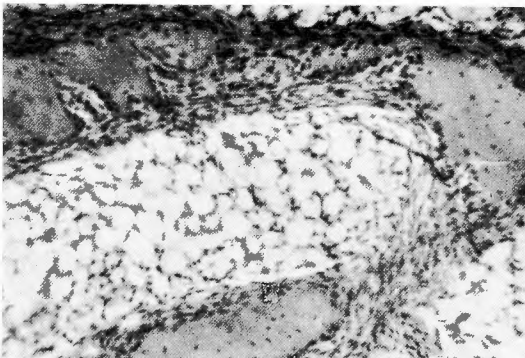


図33 海綿骨移植5週, 去勢対照群, H.E. 染色. $\times 150$ 骨梁は退化的で骨髓細胞は殆ど認められない.

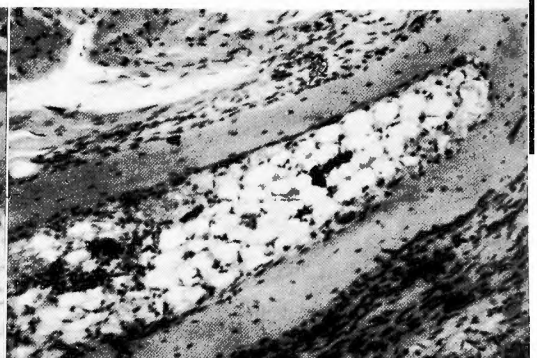
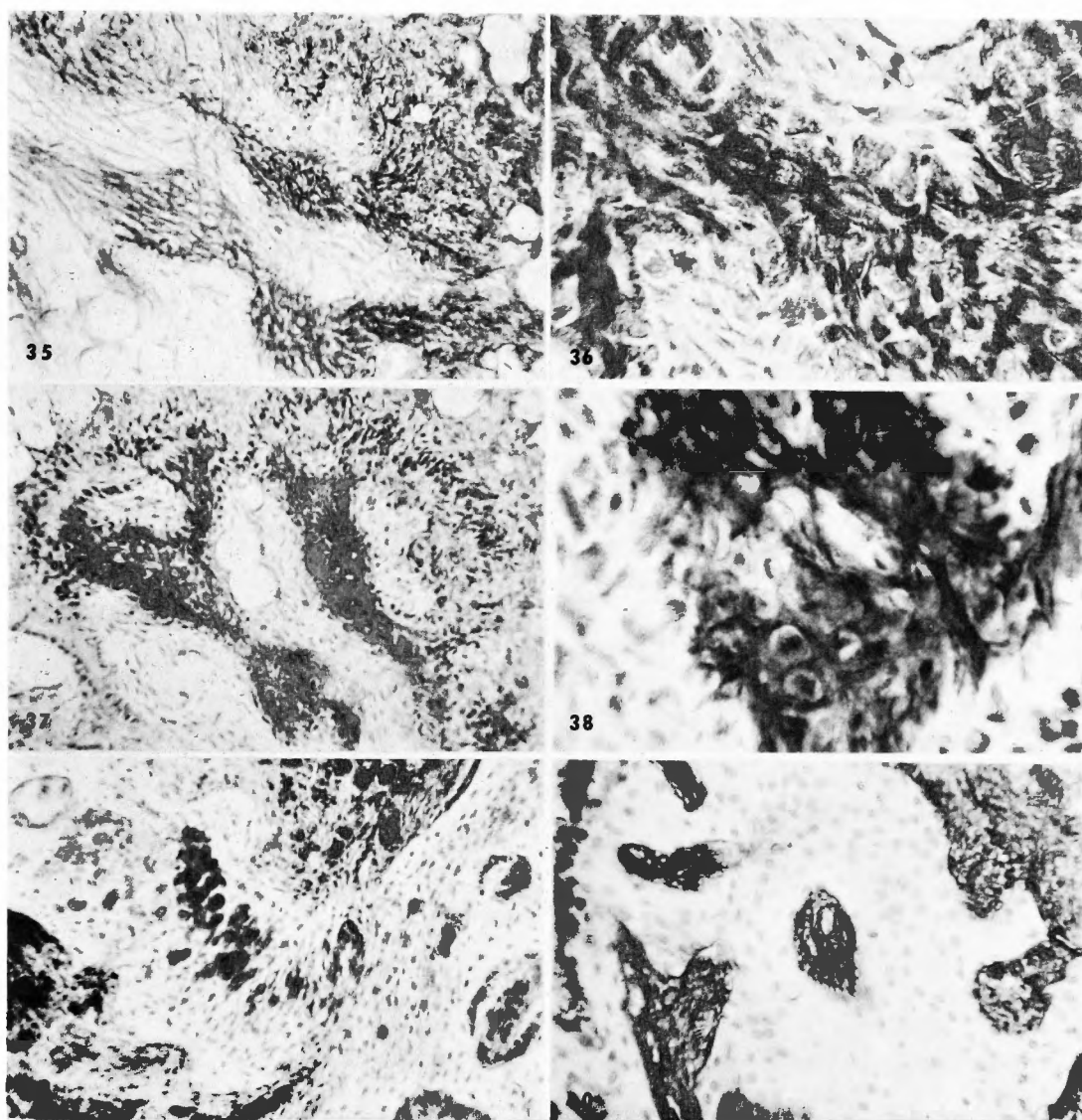


図34 海綿骨移植5週, 去勢 SV 10mg/kg 投与群, H.E. 染色. $\times 150$ 骨組織及び骨髓組織ともに発達した球状骨となる.



- 図35 骨髓移植 1 週, 去勢 HMD 5mg/kg投与群, Azan染色 ×150
- 図36 骨髓移植 1 週, 去勢 HMD 5mg/kg投与群, Azan染色 ×600
- 図37 骨髓移植 1 週, 去勢 HMD 5mg/kg投与群, PAS 反応 ×150
- 図38 骨髓移植 1 週, 去勢 SV 10mg/kg投与群, Ca染色 ×600
- 図39 骨髓移植 2 週, 去勢 SV 10mg/kg投与群, Meta反応 ×150
- 図40 骨髓移植 3 週, 去勢 SV 10mg/kg投与群, Al-P-ase反応 ×150