主論文

骨髄移植に伴うヒト骨髄の形態学的変化
—電子顕微鏡による観察

新潟大学第三解剖学教室（主任：藤田恒夫教授）
八木澤久美子

Morphological Changes of the Human Bone Marrow before and after Bone Marrow Transplantation — An electron microscopic study

Kumiko YAGISAWA

Department of Anatomy, Niigata University School of Medicine
(Directer:Prof.Tsuneo FUJITA)

Reprint request to:Kumiko YAGISAWA
Department of Anatomy,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City,
951,JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通り1番町
新潟大学医学部第三解剖学教室
八木澤久美子

Bone marrow transplantation(BMT) has been long carried out for many patients with hematological malignancy. However, few reports have been available concerning the ultrastructural changes of marrow stromal cells (non-hematopoietic cells) before and after BMT. In the present study, the bone marrow from six patients was examined under an electron microscope on the day of BMT and at following stages. The findings on the day of BMT were supplemented by observation of the bone marrow from irradiated rats.

In the bone marrow after irradiation and administration of cytotoxic drugs, there were surviving stromal cells consisting of reticular cells, endothelial cells, macrophages and fat cells. This finding supports a generally accepted idea that the stromal cells are important for homing and proliferation of transplanted hematopoietic stem cells. However, network of reticular cells and vascular arrangement of endothelial cells were severely damaged by chemo-radiotherapy before BMT. It is doutful that such stromal cells maintain the hematopoietic microenvironment for homing of transplanted cells. Enlargement of lipid droplets in fat cells was commonly found in humans and rats. Ultrastructure of the bone marrow at recovering stages after BMT differed among patients. In cases with hematologically sound recovery, the bone marrow revealed ultrastructure similar to that in normal marrow. In contrast, in cases with hematologically poor recovery, reconstruction of the stromal cells was incomplete even more than 28 days after BMT. This finding suggests that reconstruction of the stromal cells is intimately related to the hematological recovery of the bone marrow.

Key word: bone marrow transplantation, ultrastructure, stromal cell, reticular cell, endothelial cell, fat cell
骨髄移植、微細構造、骨髄支持細胞、細網細胞、洞内皮細胞、脂肪細胞

【はじめに】

骨髄組織は、大きく分けて造血細胞hematopoietic cellsと非造血細胞non-hematopoitic cellsからなる。後者には、細網細胞、洞内皮細胞、マクロファージ、脂肪細胞がある。最も広範囲に存在する細網細胞は、骨髄組織の骨組みを成すばかりでなく、造血細胞の分化増殖に深く関与し、造血微小環境をつくる主要な細胞とされている[1-5]。

骨髄移植が治療法として施行されるようになって久しい。移植の際、特に細網細胞と内皮細胞は、移植された幹細胞の生着 homingやその後の造血になくてはならない細胞と考えられている[1,2,6-8]。しかし骨髄移植時における非造血細胞の形態に関しては、未だ不明の点が多い。一般には、移植された幹細胞は、まず洞内皮細胞に接着し血管壁を通りぬけて、造血部位hematopoietic compartmentに入り、細網細胞とレクチン－グリコ－ゲンからなる糖鎖結合により接着し、造血を開始

すると考えられている[1,9]。

今回、著者は骨髄中の非造血細胞の変化に注目し、移植成功症例6例の移植当日および移植後（2週間から6週間後、1例は移植後のみ）における骨髄の微細構造の観察を行ったので報告する。ヒトでの所見を補足する意味で、ラットを用い、X線照射による骨髄支持細胞の観察をも行なった。

【材料と方法】

1．骨髄移植症例（表1）

症例1　R.H.31才、男性。原疾患は急性リンパ性白血病。移植前処置として、9日前よりブスルファン120mg/day（2mg/kg/day）を4日間、5日前よりサイクロフォスファマイド1,650mg/day（30mg/kg/day）を2日間投与し、さらに2日前より全身照射（総量1,200cGy）を行ない、同胞よりの骨髄を移植した。この症例の移植当日と移植後42日目の骨髄穿刺液を採取した。

症例2　Y.S.35才、女性。原疾患は慢性骨髄性白血病。移植前処置として、7日前よりブスルファン190mg/day（4mg/kg/day）を4日間、2日前よりサイクロフォスファマイド2,800mg/day(60mg/kg/day）を2日間投与し、移植当日に全身照射（300cGy）を行い、同胞よりの骨髄を移植した。この症例の移植当日と移植後20日目の骨髄穿刺液を採取した。

症例3　Y.T.38才、男性。原疾患は急性リ

ンパ性白血病。移植前処置として、4日前よりサイクロフォスファマイド3,800mg/day（60mg/kg/day）を2日間投与し、2日前より全身照射（総量1,200cGy）を行い、同胞よりの骨髄を移植した。この症例の移植28日後の骨髄穿刺液を採取した。

症例4　K.T.47才、男性。原疾患は慢性骨髄性白血病。移植前処置として、7日前よりブスルファン200mg/day（4mg/kg/day）を4日間、3日前よりサイクロフォスファマイド3,000mg/day（60mg/kg/day）を2日間投与し、移植当日に全身照射（総量300cGy）を行い、同胞よりの骨髄を移植した。この症例の移植当日と移植後14日目の骨髄を採取した。

症例5　Y.T.41才、男性。原疾患は急性リンパ性白血病。移植前処置として、7日前よりブスルファン252mg/day（3.5mg/kg/day）を4日間、3日前よりシトシンアラビノシド 11,200mg/day（16mg/kg/day）を2日間、同じく3日前よりエトポシド15,000mg/day

（20mg/kg/day）を2日間投与し、同胞よりの骨髄を移植した。この症例の移植当日と移植14日目の骨髄を採取した。

症例6　Y.A.20才、男性。原疾患は急性リンパ性白血病。移植前処置として、5日前よりシトシンアラビノシド9,400mg/day（18mg/kg/day）を2日間、同じく5日前よりエトポシド12,000mg/day（24mg/kg/day）を2日間投与し、3日前より全身照射（総量1,320cGy）を行い、同胞よりの骨髄を移植した。この症例の移植当日、移植後14日目、移植後28日目の骨髄を採取した。

採取したそれぞれの骨髄穿刺液を2.5%グルターールアルデヒド液中に入れ、2時間固定後、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.3)で洗浄した。1%酸化オスミウム液で1時間45分後固定した後、脱水し、アラルダイト樹脂に包埋した。超薄切片をウラン、鉛染色液にて電子染色し、透過型電子顕微鏡(日立H7000)で観察した。

２．Ｘ線照射ラット

ウイスター系の雄ラット（体重200g）5匹を用いた。致死量に相当する1,500ラッドのＸ線を全身照射し、10日後に材料を採取した。ネンブタール深麻酔下で生食を、ついで 2.5%グルタールアルデヒド液を大動脈から潅流した。大腿骨骨髄を慎重に採取、1mm角の大きさに切り、2.5%グルタールアルデヒド液に1時間30分浸漬した。以後は、移植症例の材料と同様に処理し、透過型電子顕微鏡で観察した。

【結果】

1．骨髄移植症例

1）移植当日の骨髄

移植直前に採取された骨髄組織には、造血細胞の著明な減少が認められた。症例1、5および6では、成熟赤血球を除くと造血細胞はほとんど認められなかったが（図1）、症例2と4では、成熟顆粒球が比較的多く残存していた（図2）。前者の場合、骨髄組織中に残存する細胞は、細網細胞、内皮細胞、マクロファージ、および脂肪細胞だけであった。

細網細胞はその突起が短縮したり消失しているが、核が明るく、大きな核小体を持つこと、細胞質が比較的狭いことなどから識別できた（図3,4）。正常な骨髄において細網細胞が造る細網性網工reticular networkは、もはや観察されず、単独で存在するか、細網細胞同志がしばしば3~4個集合していた（図3,4）。マクロファージの形態は、正常時とほぼ同様であった（図2）。脂肪細胞は正常時のもの

に比べ、かなり巨大になっていた（図1）。大型化した脂肪細胞では、細胞の中央を占める脂肪球の直径が正常のものに比べると1.5～2倍程度大きくなっていた。このような細胞では、脂肪球に近接する細胞質に小型の脂肪滴が多数存在し、脂肪がたえず付加していくようにみえた（図1）。

洞（または洞様毛細血管）の血管壁は開裂しているものが多数認められた（図5,6）。管腔構造を維持していても、血球の大きさ以上の穴が開いていた。連続的な血管壁を持たない不完全な洞は、全体の洞の6~7割を占めていた。内皮細胞は孤立して存在する場合もあり、このような細胞は膜状の細胞質突起を両方向に伸ばしてはいるが、通常、収縮していびつになっていた（図7）。症例2と4では、縮んで襞状になった細胞質突起内に濃染する顆粒がしばしば認められ、内皮細胞の同定に役立った（図5,6）。

２）移植後の骨髄

移植後の骨髄の微細構造は、症例により大きな違いが認められた。症例２（移植後28日後）、症例３（移植後28日後）および症例５（移植後14日後）は、血球回復が速やかであり、骨髄の微細構造にも共通点が多かった。すなわち、骨髄組織には、造血細胞の著明な増加を認め、基本的には、正常骨髄とほぼ同様の構造であった（図８）。脂肪細胞の脂肪球は小さくなり、正常骨髄にみられる脂肪細胞のものと同じ大きさになっていた。造血細胞と造血細胞との間隙は、マクロファージが占め（図９）、マクロファージが赤芽球系幼弱細胞を抱え込む赤芽球島も認められた。洞の管腔構造は随所に認められ、そこでは連続的な内皮壁が構築されていた（図８）。また、新生血管も認められた（図１０）。以上の骨髄の形態学所見は、血球回復が速やかな臨床所見と合致していた。

一方、症例１（移植後42日後）、症例４（

移植後14日後）および症例6（移植後14日後）では、血球回復が不良であった。骨髄組織では造血細胞が認められたが、正常骨髄と比較すると、細胞数はかなり少なかった。脂肪細胞の脂肪球は正常骨髄のそれと比べると、軽度に小型化していたに過ぎない。移植当日認められた明るい核を持つ細網細胞は不明であった。

症例1、4、6では、正常骨髄でみられる洞や細網細胞による細網性網工は、はっきりとしたものはなかった。これらの症例では、血球回復が不良でそれを裏付ける組織像であった。

2．X線照射ラット

X線照射10日後のラット骨髄では、造血細胞の著明な減少を認めた。成熟した血液細胞を除くと、残存する細胞は、細網細胞、肥満細胞、マクロファージ、脂肪細胞が主であった（図11）。細網細胞は正常時に比べて突起が短縮していた。ヒトの移植症例ではみられな

かったが、ラットでは肥満細胞の割合が高く（図11）、マクロファージの割合は高くなかった。脂肪細胞は、やはり巨大化しており、ヒトの症例と同様に、細胞の中央部を占める脂肪球の辺縁には、小さい脂肪滴が多数分布していた（図12）。

洞の壁は、壊れて途切れているものが多く認められたが、移植症例ほど激しい変化はなく、血管内皮が断裂している洞は全体の4~5割ほどであった。壊れた洞では、短縮した突起を持つ内皮細胞が散在していた（図12）。

【考察】

これまでにイヌやマウスを用いてX線照射後や化学療法後の骨髄の形態変化の観察した報告はあるが[2,10-13]、ヒト移植症例における骨髄の形態変化を観察した報告はない。今回著者は、骨髄移植6症例の移植当日と移植後の骨髄の微細構造を非造血細胞に注目して観察した。また、X線照射をしたラット大腿骨骨髄を電顕により観察し、ヒトの移植当日のものと、ほぼ同様の所見を得た。

放射線照射と多量の化学療法剤にも耐え、生き残った細胞は、細網細胞、内皮細胞、脂肪細胞およびマクロファージであった。この所見は、非造血細胞、特に洞内皮細胞と細網細胞が移植細胞の生着、ならびにその後の増殖の鍵を握るというこれまでの考え[6-8]に矛盾しない。しかし、生着に最も重要とされる内皮細胞と細網細胞[1]は、X線照射と薬剤による影響で、形態学的にはかなり変化しており、はたして正常状態におけると同様に造血

微小環境を形成しているか疑問であった。なお、6症例のすべてにおいて、またラットの場合においても、同様の形態変化が認められたため、資料作成時の人工産物の可能性は否定できる。

残存する細胞の中で形態変化が最も大きかったのは、内皮細胞であった。ヒト、ラットとも、移植直前(Day0)の骨髄組織において、破壊された洞(洞様毛細血管)が多く認められ、骨髄の血管系が維持されているとは思われなかった。Shirotaら[10]は、サイクロフォスファマイド投与後のマウス骨髄において、洞内皮が基底膜を消失したり、内皮細胞の表面形態が変化することを観察した。彼らは、骨髄血液関門 marrow-blood barrierの機能がサイクロファスファマイドにより破壊された後に、幹細胞が物理的に骨髄微小環境に入り込む、massive transportの期間があることを提唱した[10]。今回の所見は、この可能性を支持するが、Shirotaらの観察よりもさ

らに激しい形態変化があることを示した。一方、Yamazakiら[11]は、マウスに500~700ラッドのX線を照射、2日後に走査型電子顕微鏡で骨髄を観察したところ、造血細胞はきれいに除去されるものの、洞の血管内皮細胞と細網細胞は破壊が少なかったと報告している。照射量が少ないか、あるいは、照射後2日しか経っていないことより、著者の観察結果とは違ったのではないかと考えられる。

本所見は、洞内皮細胞や細網細胞の形態、機能とも温存されていることが移植の前提条件とするTavassoriらの考え[1]と矛盾している。移植細胞の造血部位 hematopoietic compartmentへの侵入は、壊れた内皮細胞の隙間を通して物理的に可能かと思わせる所見であった。さらに著者は、移植2週間後の骨髄組織中に多数の新生血管を認めている。これは、既存の血管系が破壊されることを意味するものと考える。

細網細胞は正常時には、細長い突起をのば

しそれぞれ連絡しあって立体的な網工を造る[1-4]。これらは、骨髄の支持ばかりでなく、造血細胞の分化増殖を制御調節する機能を担っていると考えられている[1-8]。今回の観察では、細網細胞は突起を縮めたり、突起そのものが消失しており、正常時の形態とはかなり異なっていた。しかし細胞自体は核、ミトコンドリア、小胞体、核膜、細胞膜とも保たれており、変性の兆候はなかった。移植後の細網細胞は宿主由来とする報告が多いが[14-16]、それを裏づける所見と思われた。

脂肪細胞は、移植症例全症例で、またラットの骨髄においても、巨大化していた。Rozman[17]はヒトの骨髄で、低形成性骨髄aplastic marrow、過形成性骨髄hyperplastic marrow、異形成性骨髄 dysplastic marrowの 脂肪細胞の大きさと数を観察し、低形成性骨髄では他の骨髄と比べて平均直径で1.2倍ほど大きくなると報告しており[17]、本所見もこの報告に合致するが、脂肪細胞の

巨大化の程度はさらに大きかった。Rozmanらの報告の中では、脂肪細胞が巨大化するメカニズムは明らかにされていない。今回の観察で、細胞中央を占める大きな脂肪球の辺縁では、細かい脂肪滴が集まり脂肪球に附加していくように見えた。脂肪細胞の巨大化は、脂肪細胞の融合よりも脂肪滴の附加によっておこる可能性が考えられる。

移植後の形態変化は、症例によりさまざまであった。今回観察した症例は移植成功例であり、いずれの場合でも造血細胞の増加を認めた。このうち血球回復の速やかな症例では、移植28日でほぼ正常に近い骨髄の組織像を示した。すなわち、造血細胞の増加、正常な洞の存在、細網細胞の網工の完成、豊かな胞体を持つマクロファージの存在などが認められた。これに対し血球回復の遅い症例では、造血細胞は増加するものの、その後、洞や、細網性網工の再構築がなされないために、造血細胞増殖の遅れを招いたと思われる。

今回観察した骨髄移植症例の数は十分ではなかったが、骨髄の微細構造について、さらに詳細な経時的変化を観察してゆくことによって、移植の形態学的変化－幹細胞がどの細胞に接着し、どのように造血が始まるか。細網細胞、マクロファージ、脂肪細胞がどのように造血に関与していくのか－が解明されていくものと思われる。しかし、移植患者は移植後に発熱、感染、拒絶反応、薬剤性肝、腎障害などさまざまな合併症を伴っていることがあり、頻回の骨髄穿刺検査は不可能である。このため動物や培養細胞を用いて実験、観察をも平行して進めていく必要があると考えられた。

参考文献

1) Tavassoli, M., Hardy, C. : Molecular Basis of Homing of Intravenously Transplanted Stem Cells to the Marrow, Blood vol 76, No6 (Sep15), 1059-1070, 1990.

2) Watanabe, Y. : Fine Structure of Bone Marrow Stroma, Acta hema tol. Jpn. 48 1688-1700, 1985.

3) Peace, D. C. : Marrow cells seen with the electron microscope after ultrathin sectionning. Rev. Hematol. 10 300-313, 1955.

4) Peace, D. C. : An electron microscopic study of red bone marrow. Blood 11, 501-526, 1956.

5) Weiss, L. : The structure of bone marrow . Functional interrelationships of vascular and hematopoietic compartments in experimental hemolytic anemia: An electron microscopic study. J. Morph. 117, 467-538, 1965.

6) Trentin, J. J. : Influence of hematopoietic organ stroma on stem cell differentiation. in Regulation of Hematopoiesis Vol 1, ed. Gordon AS. Appleton-century-crofts, New York 161-186, 1970.

7) Dexter, T. M., Allen, T. D., and La,jtha, L. G. : Conditioning controlling the proliferation of heamatopoietic stem cells in vitro. J. Cell physiol. 91, 335-344, 1977.

8) Weiss, L. : The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: An ultrastructural Study of the stroma in rats. Anat. Rec. 186, 161-184, 1976.

9) Kataoka, M., Tavassoli, M. : Identification of lectin-like substances recognizing galactosyl residues of glycoconjugates on the plasma membrane of marrow sinus endothlium. Blood 65, 1163-1171, 1985.

10) Shirota, T., Tavassoli, M. : Cyclophisphamide-induced alterations of bone marrow endothelium: Implications in homing of marrow cells after transplantation. Exp. Hematol. 19: 369-373, 1991.
11) Yamazaki, K., Allen, T. D. : Ultrastructural and Morphometric Alteration in Bone Marrow Stromal Tissue After 7Gy Irradiation. Blood cells 17: 527-549, 1991.
12) Knospe, W. H., Blom, J., Crosby, W. H. : Radiation of locally irradiated bone marrow. Blood, Vol. 28, No. 3 (Sep), 398-415 1966.
13) Umezawa, A., Harigaya, K., Abe, H., Watanabe, Y. : Gap-junctional communication of bone marrow stromal cells is resistant to irradiation in vitro. Exp. Hematol. 18: 1002-1007, 1990.
14) Rskind, W. H., Singer, J. W., Morgan, C. A., Fialkow, P. J. : Host origin of marrow stromal cells obtained from marrow transplant recipients and transformed in vitro by simian virus-40. Exp. Hematol. 16 (10): 827-830, 1988 Nov.
15) Bentley, S. A., Knutsen, T., Whang-Peng, J. : The origin of the hematopoietic microenvironment in continuous bone marrow cuture. Exp. Hematol. 10, 367-372, 1982.
16) Simmons, P. J., Przepiorka, D., Thomas, E. D., Torok-Storb, B. : Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation: Nature 328, 429-432, 1987.
17) Rozman, C., Reverter, J., Feliu, E., Berga, L., Rozman, M., Climent, C. : Variation of Fat Tissue Fraction in Abnormal Human Bone Marrow Depend Both on Size and Number of Adipocytes: A Stereologic Study, Blood vol76, No5 (Sep1), 892-895, 1990.

図の説明

図1

症例1の移植直前の骨髄。造血細胞はほとんど認められず、残存する細胞は、細網細胞（R）と脂肪細胞（F）である。脂肪細胞は巨大化し、中央の脂肪球のまわりに小型の脂肪滴が多数みられる。　　X2,300

図2

症例2の移植直前の骨髄。成熟顆粒球（G）が、多く残存している。マクロファージ（Mp）は正常時とほぼ同様の形態を示す。孤立して存在する内皮細胞（E）には、いびつになった細胞質突起がみられる。　　X4,500

図3

症例1の移植直前の骨髄。細網細胞（R）には長くのびる突起はみられない。核が明るく、細胞質が狭いことで細網細胞と同定できる。　　X4,400

図 4

症例１の移植直前の骨髄。細網細胞は、細網性網工を形成せず、細胞同志3~4個集合して存在する像がしばしば認められる。

X7,800

図 5

症例２の移植直前の骨髄。洞（S）の血管壁には、血球が自由に通れるだけの穴（▲印）が開いている。内皮壁には、電子密度の高い顆粒（↑印）がみられる。

E：内皮細胞　F：脂肪細胞　X3,300

図 6

症例１の移植直前の骨髄。洞（S）の血管が開裂し、血球が自由に通れる大きさの穴が開いている（▲印）。　X2,700

図 7

症例２の移植直前の骨髄。孤立して存在する内皮細胞（E）の細胞質は、縮んで皺状に

なり、濃染する顆粒が認められる（↑印）。
X3,300

図8

血球回復の速やかな症例3の移植後28日目の骨髄。造血細胞の著しい増加が認められる。洞（S）の管腔構造もほぼ完璧に構築されている。　　X3,500

図9

血球回復の速やかな症例3の移植後28日目の骨髄。造血細胞の間隙には、マクロファージ（Mp）がみられる。　　X3,400

図10

症例3の移植後28日目の骨髄。造血細胞の間には、新生血管が認められる。
E：内皮細胞　　X5,200

図 11

X線照射後のラットの骨髄。残存する細胞は、細網細胞（R）、肥満細胞（Ma）、脂肪細胞である。　　S：洞　　X2,300

図 12

X線照射後のラット骨髄。壊れた洞の内皮細胞と思われる細胞（E）が散在している。X2,600

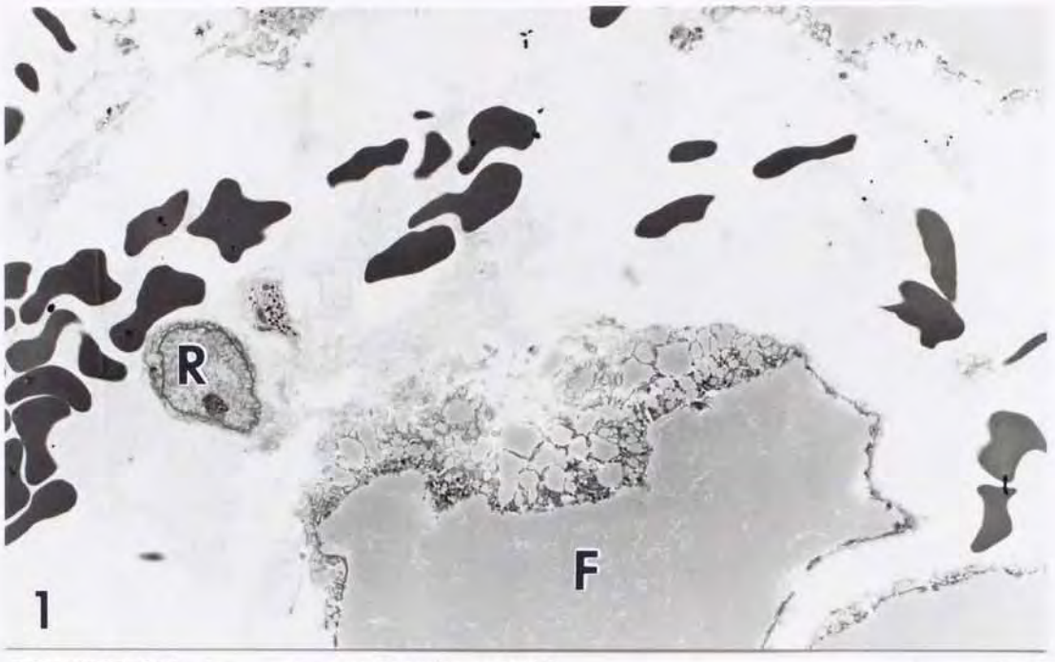
図 13

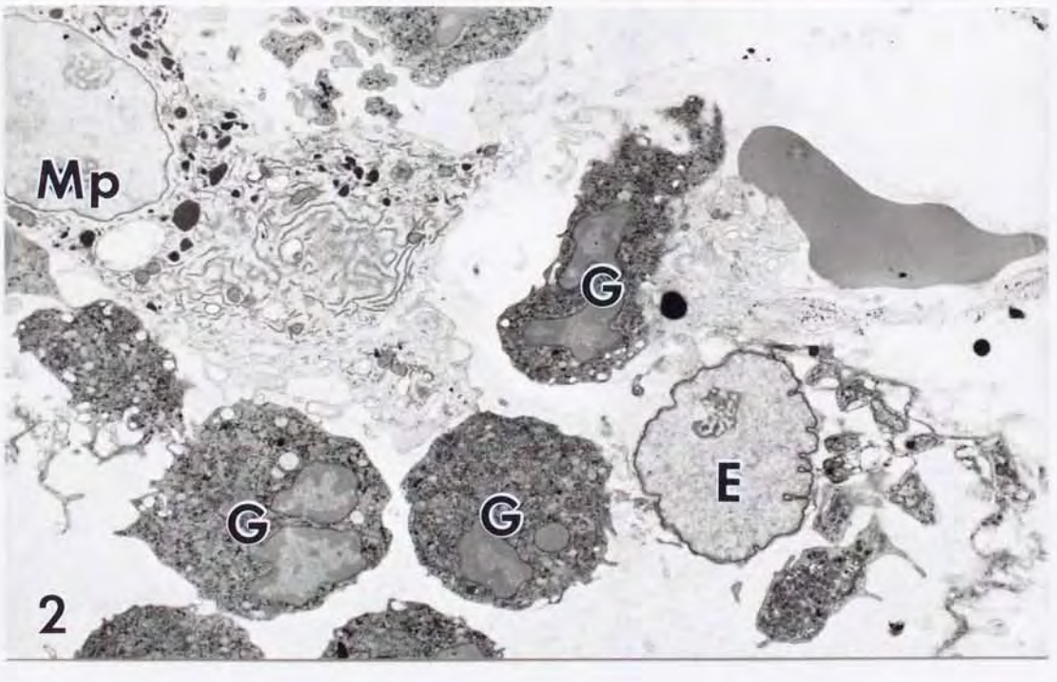
X線照射後のラットの骨髄。開裂した洞(S)の壁は薄くなっており、血球が通り抜けられるほどの大きな穴が開いている（▲印）。巨大になった脂肪細胞（F）も認められる。X1,700

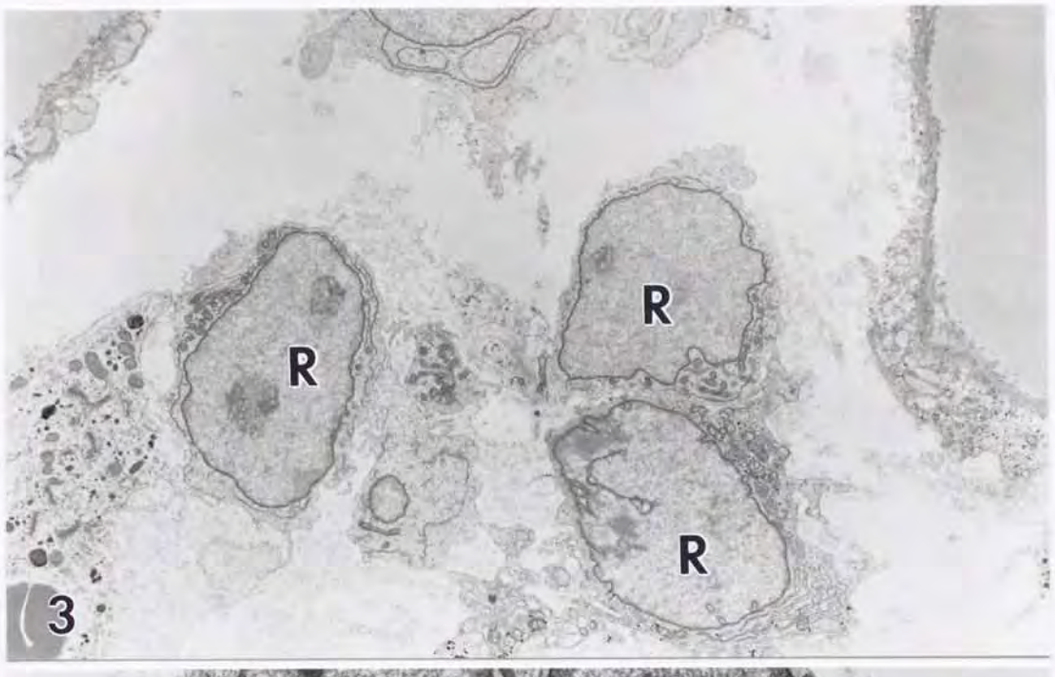
表 1
症例のまとめ

	年令	性別	疾患	前処置	WBC (/μl)	生着の有無
1	31才	男	ALL 1stCR	Bus,Cy,TBI	3000	有
2	35才	女	CML CP	Bus,Cy,TBI	3000	有
3	38才	男	ALL 1stCR	Cy,TBI	900	有
4	47才	男	CML CP	Bus,Cy,TBI	1300	有
5	41才	男	ALL 2ndCR	Bus,AraC,VP16	300	有
6	20才	男	ALL 1stCR	AraC,VP16,TBI	1200	有

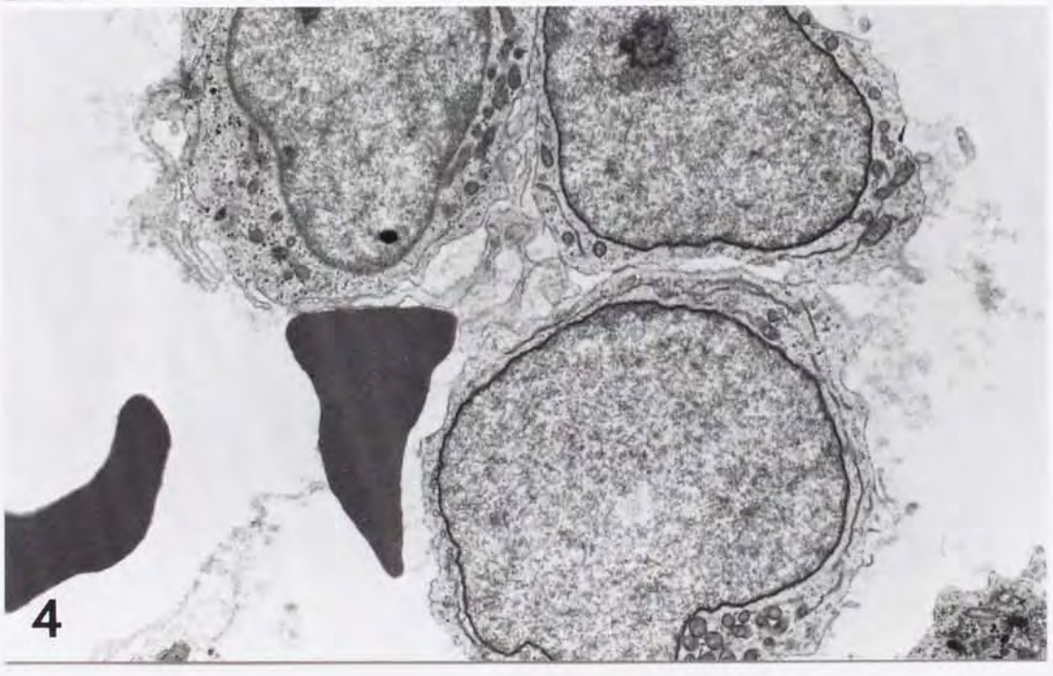
ALL;急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia)
CML;慢性骨髄性白血病(chronic myelogenous leukemia)
CR ;完全寛解(complete remission)
CP ;慢性期(chronic phase)
Bus;ブスルファン
Cy ;サイクロフォスファマイド
TBI;X線全身照射
AraC;シトシンアラビノシド
VP16;エトポシド
WBC;移植当日の末梢血白血球数


R
F
1

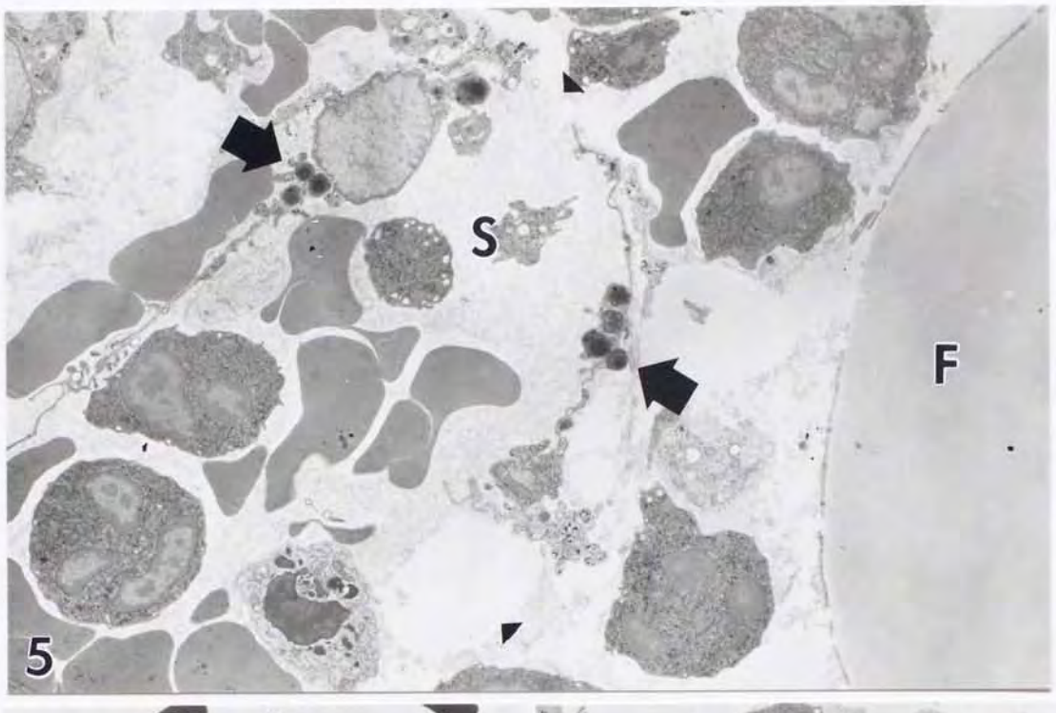

Mp
G
G
G
E
2

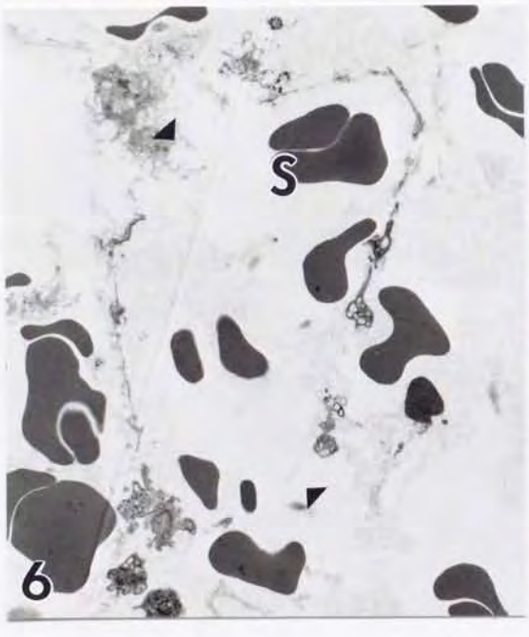


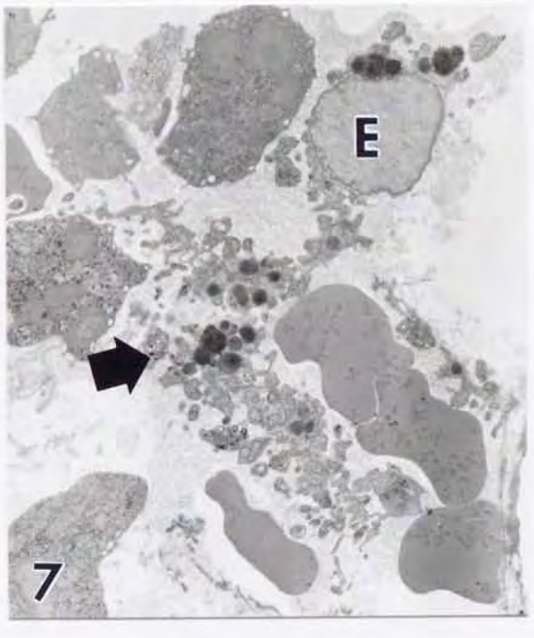
3

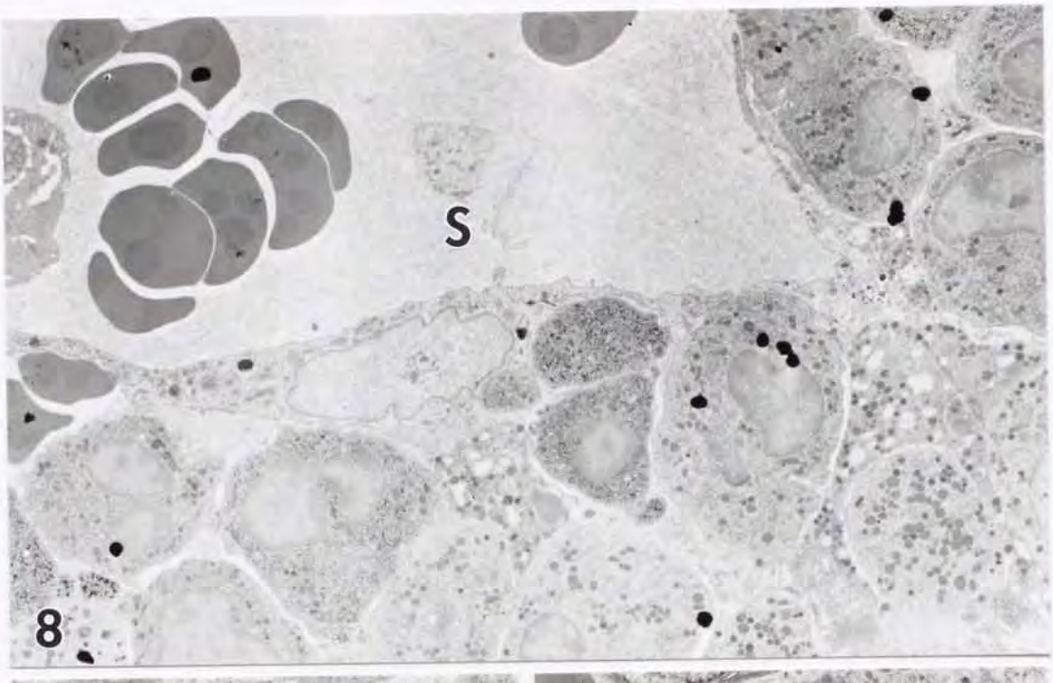


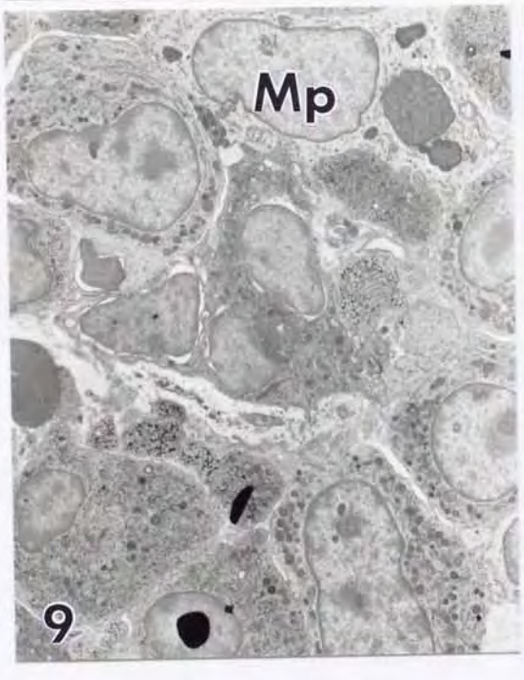
4

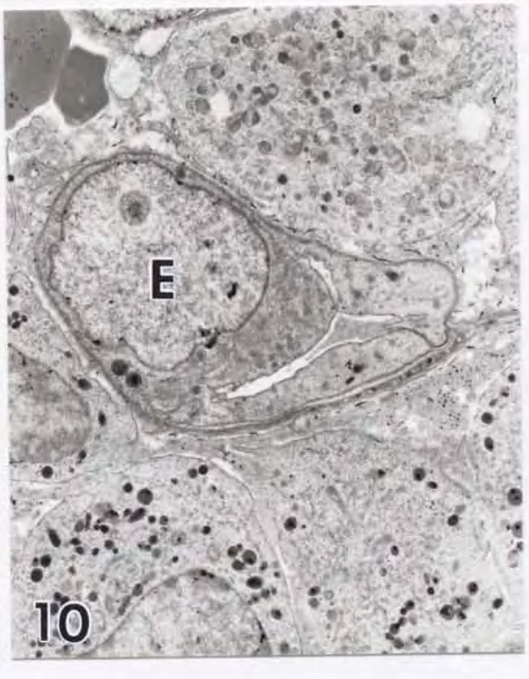

S
F
5

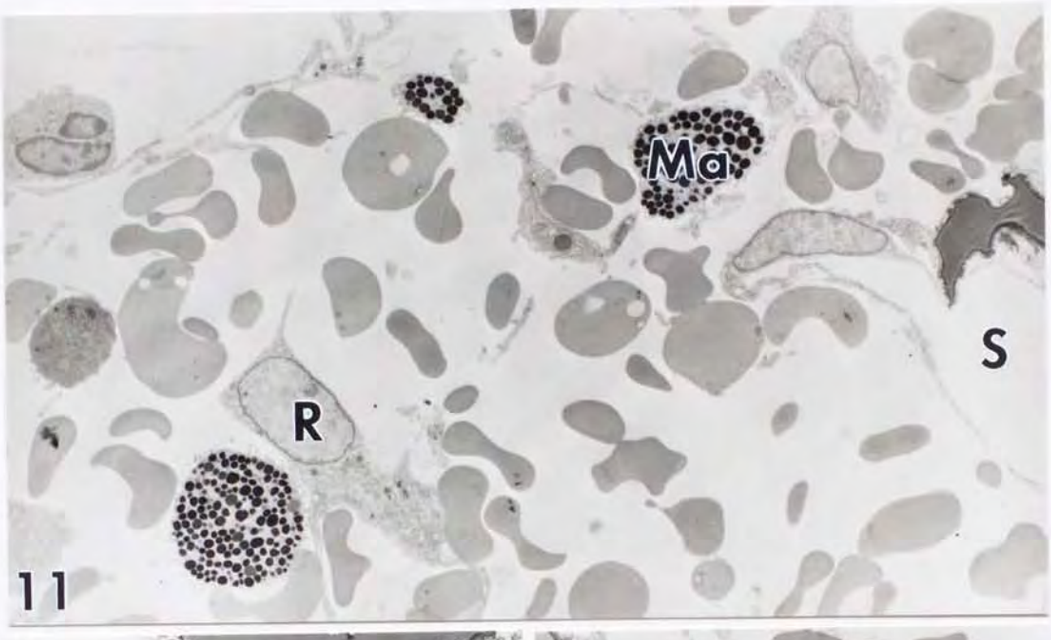

S
6


E
7

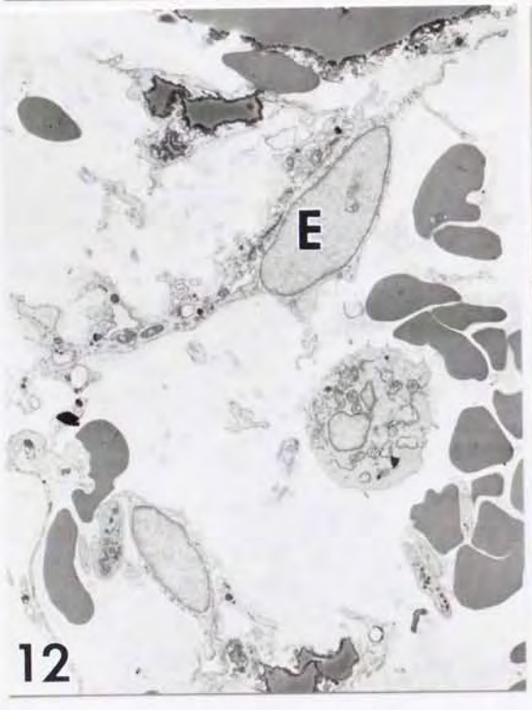

S
8


Mp
9

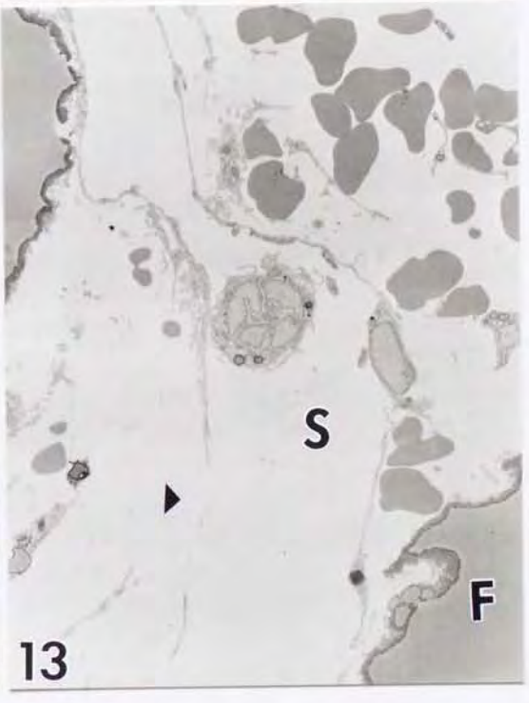

E
10



11



12



13