

CKD-MBD

ハンドブック

2nd Edition

Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder

編著 深川 雅史



日本メディカルセンター

d 骨生検

POINT

- 骨生検は代謝性骨疾患の病態を理解するうえで重要な検査法であり、腎性骨異栄養症を診断するうえで唯一の検査法である。
- 骨生検からの診断は、標識剤投与、骨生検、標本作製、骨形態計測の順番に行われる。
- 骨形態計測により種々のパラメーターを評価し、それぞれの症例の骨代謝について評価を行う。

はじめに

骨生検、骨形態計測は骨の組織学的変化を顕微鏡下で観察し、さまざまな指標を計測することにより、骨粗鬆症、悪性腫瘍の骨転移、骨パジェット病、骨軟化症、くる病など代謝性骨疾患の病因、病態生理、治療法を検討するうえでの重要な検査法として行われてきた。

CKDにおいても多彩な骨組織像が認められる。骨生検は、腎性骨異栄養症 (ROD) を診断する唯一の方法であり、患者の骨代謝の状態を判断する重要な検査方法である。

しかし、骨生検は侵襲的な検査であることから、骨生検で得られる情報のメリットを考慮して、適応を慎重に判断する必要がある。

本邦のCKD-MBDガイドライン2012においては、骨痛、繰り返す病的骨折、骨折治療の遷延など治療介入を要する骨症状を有し、その原因をほかの手段によって解明することが困難な場合には骨生検の適用を考慮するとしている。

本稿では骨生検の方法、実際の骨標本について述べる。

I. 骨生検の流れ

骨生検を行い、診断する際には、①骨標識剤の投与、②骨生検、③標本作製、④骨形態計測の順に進める。それぞれ以下の記述のとおりである。

1. 骨標識剤の投与

骨組織の評価を行う際には、生検前にテトラサイクリンによる骨標識を行い、その二重標識パターンを検討することにより、石灰化速度、骨形成速度など多くの動的パラメーターを得ることができる。テトラサイクリンは新しく石灰化しつつある部分のヒドロキシアパタイトとキレート結合する。標本作製後、これに紫外線、または短波長光の励起光を当てるとテトラサイクリンが光エネルギーを吸収し、基底状態から励起状態となる。テトラサイクリンが再度基底状態となるときに発する光が蛍光であり¹⁾、これが骨における石灰化部分の標識として観察される。

ヒト骨標識剤の投与では、おもに3種類のテトラサイクリン系抗菌薬が使用される。アクロマイシンV®の場合、成人では750 mg/day、分3、レダマイシン®の場合450~600 mg/day、分2~4、ビブラマイシン®の場合

200 mg, 分1~2として2日間経口投与する。その後10~14日の休薬期間をおいた後、再度2日間経口投与し、さらに10~14日の後に骨生検を行う。経口投与2日、休薬10日、再度経口投与2日、その10日後に生検を行った場合の標識スケジュールを02-10-02-10として表す。標識スケジュールは一般的には上記のとおりの日数で行うが、インタクト副甲状腺ホルモン (iPTH) が低く臨床的に無形成骨症が疑われる場合や、臨床的に骨軟化症型が疑われる場合には休薬期間を14日程度としたほうがよい。石灰化速度が遅い場合、第一休薬期間が短いと、1回目と2回目の標識が重なって一重標識となってしまう、石灰化速度が正確に評価できないためである。逆に線維性骨炎など骨回転が高い場合には休薬期間は7日程度でも二重標識として観察される。テトラサイクリン内服の際には少なくとも内服前後2時間程度は牛乳、乳製品の摂取は避ける。乳製品中のカルシウムとテトラサイクリンがキレート結合し、吸収率が低下し標識に影響する場合がある。カルシウム製剤、鉄剤の内服中においても同様の理由で注意を要する。

2. 骨生検

骨生検は、Meunier²⁾のいう zone 3 (腸骨の前上腸骨棘から後方2 cm, 腸骨稜下1.2~1.8 cmの部位) からの水平法が標準的である。欧米では直視下で止血を行える前上腸骨棘からの垂直法が好まれるが、骨組織を評価するうえでは内外両側の皮質骨が採取される水平法が優れている。局所麻酔下に腸骨の外板から内板に向かって trephine (内径6~8 mm) を用いる方法がもっとも一般的であるが、重度の骨粗鬆症のように骨がもろく trephine での採取が困難な場合には、腰椎麻酔下に腸骨稜を含めて骨盤で採取すること

もある。標本採取の際に破損があると、その後の形態計測の際に計測視野が少なくなる可能性があるため、破損なく採取されることが、正しい評価を得る重要なポイントである。

3. 標本作製

骨形態計測に必要な標本の条件としては、前述のテトラサイクリンによる骨標識が観察できることと、類骨と石灰化骨が判別できる非脱灰標本であることが挙げられる。

生検により採取された検体は70% EtOHにより固定する。標本の染色には Villanueva bone stain や toluidine blue O, goldner stain などが挙げられるが、Villanueva bone stain では普通光、蛍光、偏光により標本の同一部位でさまざまな指標を測定することができる利点があり、広く普及している。

固定後、prestainとして Villanueva bone stain を行い、methyl-methacrylate (MMA) に包埋する。ブロックを作製した後、ミクロトームで5 μ mの厚さに薄切標本を作製する。

4. 骨形態計測

骨形態計測結果を理解するうえで、骨代謝回転を理解することは重要である。骨組織においては皮質骨でも海綿骨でも、古い部分が吸収され、そこに新たに骨が形成される代謝回転が行われている。この一連の吸収形成機構をリモデリングと呼び、「休止」状態にある骨面から「活性化」が起こり、破骨細胞が分化し「吸収」が行われ、吸収が終了した後には破骨細胞が移動し、「逆転」が起こる。骨芽細胞が分化し「形成」が行われ、類骨が形成される。最後に骨面は扁平な bone lining cell に覆われ再び「休止」となる。形成された類骨は数日の時間的ずれ (timelag)

の後に石灰化前線の数日のうちに一次的な石灰化が起こり、その後 ゆっくりと石灰化が進行する。なお、リモデリングにおける吸収から形成への転換をカップリングという。

骨形態計測は1960年代に始まり、1988年米国骨代謝学会でParfittら³⁾によって標準化された。評価されるパラメーターとしては表2-7-5, 6のようなものが挙げられる。

パラメーターには一次パラメーターと二次パラメーターがあり、一次パラメーターは標本の面積、長さ、幅を直接測定することにより得られるものである。二次パラメーターは一次パラメーターを基に、計算式により算出されるものであり、単位面積や時間当りの値で表される。二次パラメーターはさらに静的パラメーターと動的パラメーターに分けることができる。静的パラメーターはおもに形態を、動的パラメーターは時間の因子を基に石灰化速度や骨形成速度などを表したものであ

る。

RODは以前、線維性骨炎、混在型、軽度変化、骨軟化症、無形成骨としてSherrardらの分類が用いられることが多かったが⁴⁾、その他の分類とともに診断の基準が明確でない場合があることや、それぞれの報告でパラメーターの表記方法も異なっていることなどから2006年にKDIGOによって統一された骨病変の分類としてTMV分類が提唱された。その内容は骨病変をT: turnover (骨代謝回転)、M: mineralization (石灰化速度)、V: volume (骨量)の組み合わせで表すもので、より正確な評価と分類を目的とするものである。

1) Turnover (骨代謝回転) (表2-7-6)

骨代謝回転は高回転、正常、低回転に分けられ、骨形成速度 (bone formation rate: BFR) を用いて表される。BFRは骨石灰化速度 (mineral apposition rate: MAR) と骨

表2-7-5 一次パラメーター

パラメーター 英語	パラメーター 日本語	略 語	単 位
Bone Volume	骨量	BV	μm^2
Osteoid Volume	類骨量	OV	μm^2
Tissue Volume	組織量	TV	μm^2
Fibrosis Volume	線維量	Fb.V	μm^2
Trabecular Thickness	骨梁幅	Tb.Th	μm
Trabecular Separation	骨梁間隙	Tb.Sp	μm
Wall Thickness	骨梁単位幅	W.Th	μm
Osteoid Thickness	類骨幅	O.Th	μm
Double Labelled Width	二重標識幅	dLW	μm
Bone Surface	骨面	BS	μm
Osteoid Surface	類骨面	OS	μm
Eroded Surface	吸収面	ES	μm
Quiescent Surface	静止面	QS	μm
Double Labelled Surface	二重標識面	dLS	μm
Single Labelled Surface	一重標識面	sLS	μm
Osteoclast Surface	破骨細胞面	Oc.S	μm
Osteoblast Surface	骨芽細胞面	Ob.S	μm
Osteoclast Number	破骨細胞数	Oc.N	N
Osteoblast Number	骨芽細胞数	Ob.N	N

表2-7-6 二次パラメーター

パラメーター 英語	パラメーター 日本語	略語	単位	計算式
Bone Volume	骨量	BV/TV	%	.
Trabecular Number	骨梁数	Tb.N	/mm	(BV/TV)/Tb.Th
Trabecular Separation	骨梁間隙	Tb.Sp	μm	(1/Tb.N) - Tb.Th
Fibrosis Volume	線維量	Fb.V/TV	%	
Eroded Surface	吸収面	ES/BS	%	
Osteoclast Surface	破骨細胞面	Oc.S/BS	%	
Osteoclast Number	破骨細胞数	N.Oc/BS	/mm	
Osteoid Volume	類骨量 (組織量)	OV/TV	%	
Osteoid Volume	類骨量 (骨量)	OV/BV	%	
Osteoid Surface	類骨面	OS/BS	%	
Osteoid Thickness	類骨幅	O.Th	μm	
Osteoblast Surface	骨芽細胞面	Ob.S/BS	%	
Osteoblast Number	骨芽細胞数	N.Ob/BS	/mm	
Mineralizing Surface	骨石灰化面	MS/BS	%	(dLS + sLS/2)/BS
Mineral Apposition Rate	骨石灰化速度	MAR	μm/day	dLW/dLt
Ajusted Apposition Rate	補正石灰化速度	Aj.AR	μm/day	MAR (MS/BS)
Mineralization lag time	骨石灰化遅延時間	Mlt	day	O.Th/Aj.AR
Osteoid maturation time	類骨成熟時間	Omt	day	O.Th/MAR
Double Labelled Surface	二重標識面	dLS/BS	%	
Single Labelled Surface	一重標識面	sLS/BS	%	
Bone Formation Rate	骨形成速度 (骨梁表面)	BFR	mm ³ /mm ² /year	MAR(MS/BS)
Bone Formation Rate	骨形成速度 (骨量)	BFR	%/year	(BFR/BS) (BS/BV)
Bone Formation Rate	骨形成速度 (組織量)	BFR	%/year	(BFR/BS) (BS/TV)
Activation Frequency	骨単位活性化率	Ac.f	/year	(BFR/BS)/W.Th
Formation Period	形成期間	FP	day	W.Th/Aj.AR
Resorption Period	吸収期間	Rs.P	day	FP(Oc.S/OS)
Reversal Period	逆転期間	Rv.P	day	FP(ES - Oc.S)/OS
Remodeling Period	リモデリング期間	Rm.P	day	FP(ES + OS)/OS

石灰化面 (MS/BS) の積で求められる。BFR には指標として、骨石灰化面を基準とした BFR/BS、骨量を基準とした BFR/BV、全組織量を基準とした BFR/TV の三つが存在するが、KDIGO による骨組織検討委員会では評価指標として BFR/BS の基準値を 1.80 ~ 3.80 mm³/mm²/year としている⁵⁾。そのほか、破骨面 (eroded surfaces)、破骨細胞数、線維組織量、線維状骨なども骨代謝回転を判断するうえでの参考指標となる。

2) Mineralization (石灰化速度)

石灰化速度は正常、異常に分類される。

石灰化速度は類骨成熟時間 (osteoid maturation time ; Omt)、骨石灰化遅延時間 (mineralization lag time ; Mlt)、類骨幅 (osteoid thickness ; O.Th) などが指標となる。骨石灰化遅延時間 (Mlt) とは基質の産生が始まってからミネラル化されるまでの時間的なずれをいい、O.Th/MAR×MS/BS で表される。Malluche らは Mlt > 50/day、O.Th > 20 μm のときに石灰化異常と診断している⁶⁾。

3) Volume (骨量)

骨量は減少、正常、増加に分類され、BV/

TVで表される。蓄積された骨吸収と骨形成のバランスの指標として、これまでの診断基準に加えてTMV分類で新たに加えられた指標である。年齢により骨量の正常値は異なる。今野らは110例の骨代謝正常例の報告を行っている⁷⁾。

このように新たにTMV分類が提唱され、さらなるデータの蓄積が待たれるところではあるが、現時点では、その運用方法が確立されておらず、有用性も未検証であるとして、本邦のCKD-MBDガイドライン2012ではTMV分類の導入は積極的には薦められていない。

II. 骨組織標本の実際 (表2-7-6)

以前の分類で混合型と骨軟化症の実際の標本を示す(図2-7-3, 4)。

表2-7-7 骨形態計測結果(症例1)

BV/TV 35.1%	N.Oc/BS 3.8/mm
Tb.Th 98.4 μm	Fb.V/TV 48.1%
W.Th : NMμm	MAR 0.92 μm/day
OV/TV 5.3%	dLS/BS 5.1%
OV/BV 15.1%	sLS/BS 40%
OS/BS 59.6%	BFR/BS 0.084 mm ³ /mm ² /year
O.Th 12.3 μm	BFR/BV 171.2%/year
ES/BS 34.7%	

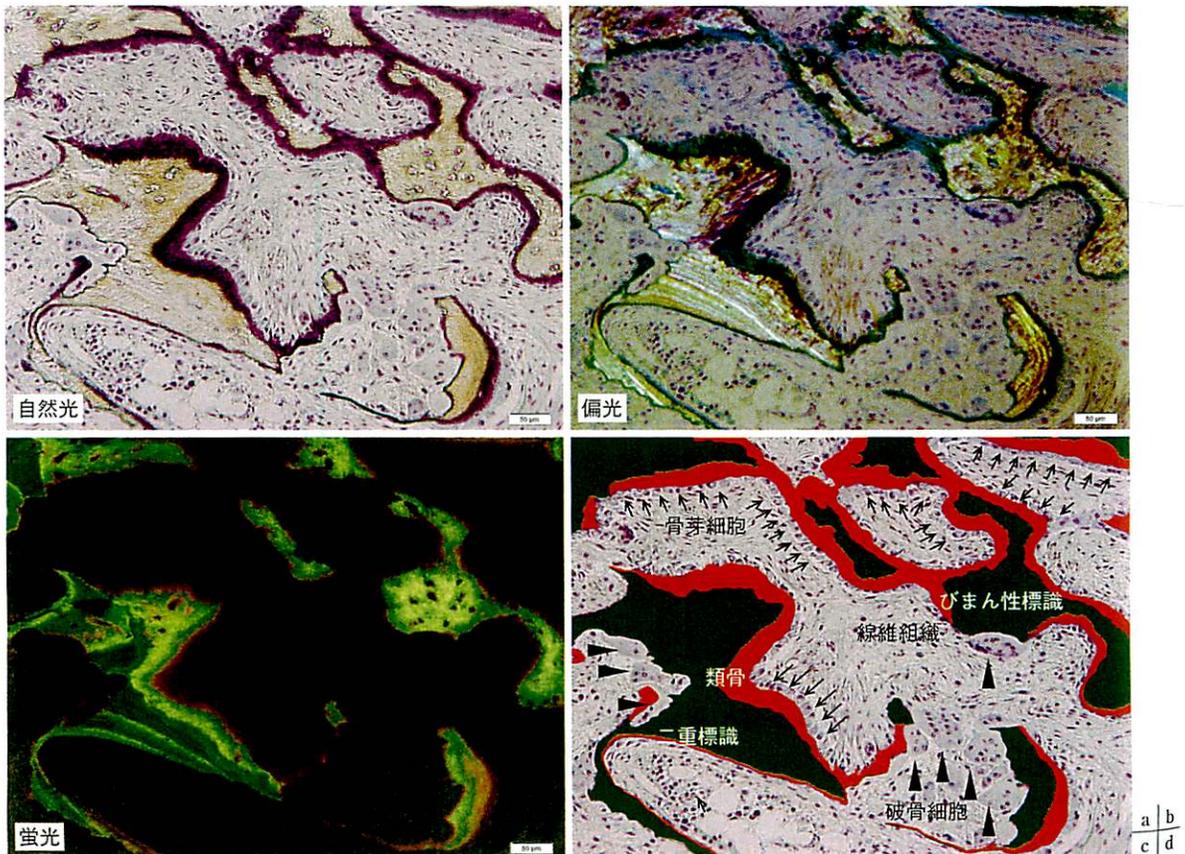


図2-7-3 症例1

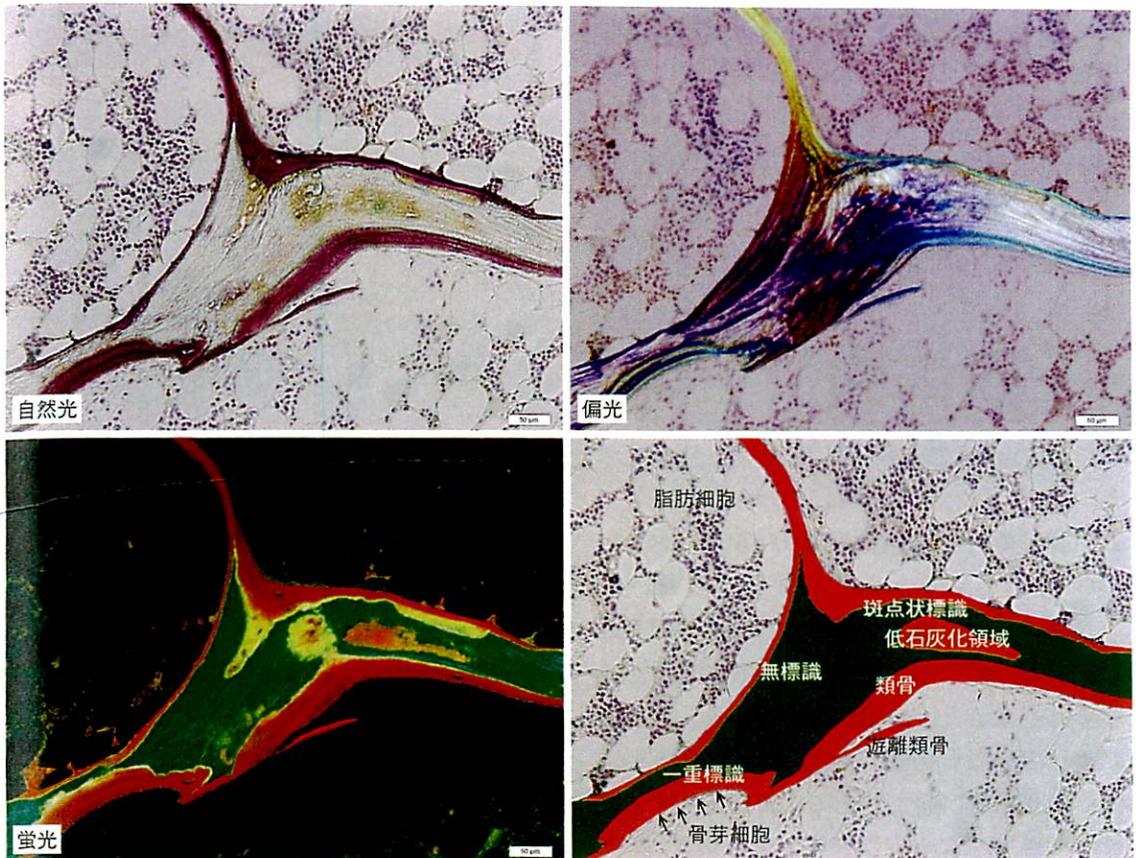


図2-7-4 症例2

a	b
c	d

【症例1】

38歳の女性で透析導入3日前に骨生検が施行された。標識スケジュールは03-14-03-07である。骨形態計測結果は表2-7-7のとおりであった。

図2-7-3dの4時方向と9時方向に多核の破骨細胞を認め、深いscallopを形成している(矢頭)。破骨細胞の活動性が高いことを示す。図2-7-3dの中央から上部にかけてはcuboidalな骨芽細胞がレンガ状に並んでいる(矢印)。活動性の高い骨芽細胞が盛んに類骨を形成している所見で、活発な破骨細胞からのカップリングが起こったことを示す。蛍光(図2-7-3c)では8時方向に二重標識を認める(図2-7-3d)。これは、骨生検する27(3+14+3+7)日前と、10日前(3

+7)に石灰化したことを表す。しかしこの二重標識は左方向で途絶しており、自然光(図2-7-3a)からもその部分は破骨細胞による吸収が起こっていることがわかる。つまり27日前と10日前に石灰化したばかりの新しい骨が骨生検時にはすでに吸収されたことを示しており、上記のパラメーターと併せても骨回転が非常に高いことを示している。また図2-7-3d中央から2時方向にかけてはびまん性の標識が認められ、偏光(図2-7-3b)と併せて見るとこの部分が線維状骨(woven bone)であることがわかる。線維状骨の形成により、骨量は見かけ上増加するが、線維状骨は負荷に対して弱く容易に骨折する。また骨髓組織中には著明に線維組織が増加している。

表2-7-8 骨形態計測結果(症例2)

BV/TV 17.3%	N.Oc/BS 0.1/mm
Tb.Th 11.7 μ m	Fb.V/TV 0%
W.Th 24.9 μ m	MAR NC μ m/day
OV/TV 4.8%	dLS/BS 0%
OV/BV 27.9%	sLS/BS 7.0%
OS/BS 88.4%	BFR/BS 0 mm ³ /mm ² /year
O.Th 16.0 μ m	BFR/BV 0%/year
ES/BS 6.2%	

【症例2】

41歳の男性で透析導入時に骨生検を行った。標識スケジュール02-06-02-02である。骨形態計測結果は表2-7-8のとおりであった。

骨面は一様に類骨で覆われ、その表面にはごく少数の扁平な骨芽細胞が観察されるのみで骨髓腔域はほぼ脂肪細胞に覆われ、類骨面に接している(図2-7-4)。これは類骨形成がかなり以前に起こりそのまま石灰化することなく残存していることを示す。蛍光(図2-7-4c)において石灰化を示す二重標識を認めず、幅狭一重標識(narrow single label)、斑点状標識(patchy label)、無標識を認めることから、上記パラメーターを併せて石灰化障害が起きていることがわかる。自然光(図2-7-4a)における骨梁内部の褐色の部分、蛍光(図2-7-4c)における橙色の部分は低石灰化領域を示す。12時方向の類骨、中心付近の遊離した類骨は、以前に破骨細胞による骨吸収が起こったが、破骨細胞は類骨を吸収しないため、類骨を残して石灰化骨だけを吸収したことを示している(図2-7-4d)。この所見は過去における骨吸収の亢進の後、アンカップリングが生じた骨軟化症においてよく見られる。石灰化骨は偏光(図2-7-4b)では層板構造が認められ、過去に形成された骨が層板骨(lamellar bone)であることがわかる。

おわりに

骨生検、骨形態計測による骨病変の評価は、病態を理解し、治療を選択するうえで非常に重要である。しかし現実的にはすべてのCKD患者全員がその適応になるわけではない。その他の臨床検査と併せて一つの重要な手段として考え、活用されることが望まれる。

文献

- 1) 羽場輝夫, 高橋栄明, 吉田佳久: 多色蛍骨標識剤と蛍光装置. 乗松尋道編: 骨形態計測6. 骨の定量的分析法. 1986, 195-202. 西村書店, 東京
- 2) Meunier P: Iliac trabecular bone volume in 136 control. Representativeness of iliac samples. Jaworski ZFG (ed): Proc. of the First Workshop on Bone Morphometry. 1976, 100-105. University of Ottawa Press, Ottawa
- 3) Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res 1987; 2: 595-610
- 4) Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, et al: The spectrum of bone disease in end-stage renal failure: an evolving disorder. Kidney Int 1993; 43: 436-442 RCT以外の観察研究
- 5) KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). Kidney Int 2009; Suppl (113): S1-S130
- 6) Malluche HH, Mawad HW, Monier-Faugere MC: Renal osteodystrophy in the first decade of the new millenium: analysis of 630 bone biopsies in black and white patients. J Bone Miner Res 2011; 26: 1368-1376
- 7) 今野俊幸, 高橋栄明, 田島達也: 人腸骨の組織形態計測学的研究. 日本整形外科学会雑誌 1987; 61: 1081-1091

(松尾浩司, 風間順一郎, 伊藤明美)

CKD-MBD ハンドブック 2nd Edition

P325

2009年6月15日 第1版1刷発行
2013年6月20日 第2版1刷発行

編 著	深川 雅史
発行者	増永 和也
発行所	株式会社 日本メディカルセンター 東京都千代田区神田神保町1-64(神保町協和ビル) 〒101-0051 TEL 03 (3291) 3901(代)
印刷所	シナノ印刷株式会社

ISBN978-4-88875-257-2

© 2013 乱丁・落丁は、お取り替えいたします。

本書に掲載された著作物の複写・転載およびデータベースへの取り込みに関する許諾権は日本メディカルセンターが保有しています。

JCOPY (財)出版者著作権管理機構 委託出版物)
本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつと事前に、(財)出版者著作権管理機構 (電話 03-3513-6969, FAX03-3513-6979, e-mail: info@jcopy.or.jp) の許諾を得てください。