

メンヨウにおける骨吸収 *in vivo* モデルとしての 骨粉による類破骨細胞誘導の利用

松井 徹*・春本 直*

The use of bone powder induced osteoclastic cells as a
short-term *in vivo* model of bone resorption in sheep
Tohru MATSUI and Tadashi HARUMOTO

This study is conducted to investigate the use of induced osteoclastic cells by the intramuscular implantation of bone powder as a short term *in vivo* model of bone resorption in sheep. The number of multinucleated cells and tartrate resistant acid phosphatase activity were gradually increased until 12 days after the implantation. Then the activity of enzyme did not significantly change. These results suggest that 12 day interval is enough to induce osteoclastic cells. Although the implantation of polyethylene also induced multinucleated cells, these cells seemed to possess slight activity of tartrate resistant acid phosphatase, which suggest that the enzyme activity can be used as a marker of osteoclastic cell activity in this model of bone resorption. The number of induced osteoclastic cells and the enzyme activity were not different between the first graft and the second one which was implanted 6 days later than the first implantation. It seems that overlapped and repeated implantations do not affect the induction and the activity of osteoclastic cells. The active vitamin_D₃ stimulated the induction and the activity of osteoclastic cells, which showed that the differentiation of the osteoclastic cells responded to the endocrine factor. From these results, it is clear that the induction of osteoclastic cells is useful as a model of bone resorption in sheep.

緒 言

骨中の Ca は常に回転しており、骨組織には種々の分化段階にあるいくつかの細胞種が存在している。またそれら細胞間では、複雑な相互作用がある。さらに骨組織は、他の組織と比較し構造が堅固で変化を受けにくい¹⁾ため、*in vivo* で骨代謝を検討することは多くの困難がある。

ラットにおいて骨粉を筋肉内に埋め込むと、その場²⁾で多核の細胞が誘導されることが明らかにされている。こ

の細胞は、通常破骨細胞の活性の指標として用いられている、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性を有しており、また破骨細胞に特有の微細構造である、刷子縁³⁾を持つことから、類破骨細胞であると考えられている。したがって、骨粉の筋肉内移植による多核細胞の誘導及び酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性を検討することにより、骨代謝の *in vivo* モデルとして利用できる可能性がある。

ポリエチレン等の異物を皮下に埋め込むと、やはり多核の細胞が誘導されるが、この細胞は、刷子縁や酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性を持たないことから、

* 応用生物機能学講座

多核マクロファージであると考えられている³⁾。一方マウスの骨髄を培養すると、骨粉により誘導されると同様の酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性を有する多核細胞が生じるが、この多核細胞は、マクロファージ特有の抗原性を持つ、すなわち多核マクロファージであると考えられる。そのため必ずしも、多核であることと、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性を有することのみでは、その細胞が類破骨細胞であると断定はできないとされている⁴⁾。

そこで本試験は、骨粉による類破骨細胞の誘導を、反芻動物の骨代謝研究に利用するための基礎的な検討を行った。すなわち、メンヨウにおいて、(1) 骨粉移植後に生じる細胞分化の経時的変化、(2) 骨粉およびポリエチレン粒子により誘導される多核細胞の比較、(3) 骨粉移植により生じる可能性のある全身的变化が類破骨細胞の分化に及ぼす影響について検討した。さらに骨吸収を促進することが知られている活性型ビタミン D₃ を投与した場合の類破骨細胞誘導性の変化も合わせて検討した。

材料および方法

1) 移植物の作成

移植用骨粉の作成は、Sinha らの方法¹⁾に準じて行った。すなわち、新鮮なメンヨウの大腿骨骨幹から、骨髄および周囲に付着している結合組織を取り除いた。2時間水洗をした後に、エチルアルコールで1時間、エチルエーテルで30分間洗うことにより、脱脂した。次いで、骨を粉碎し、ふるいにかけて、70から420 μm の骨粉を作成した。

ポリエチレン粒子の作成には、直径約 100 μm のポリエチレン糸を用い、切断後に骨粉と同様にふるいにかけて、70から420 μm の粒子とした。

2) 移植方法

メンヨウをケタミン塩酸 (ケタラル 50, Parker-Davis) およびキシラジン塩酸 (セラクター、バイエルジャパン) 麻酔下で、外腹斜筋の筋膜下まで 10mm 程度切開し、ゼラチンカプセル (直径 5 mm, 長さ 10 mm) に入れた約 100 mg の移植物を挿入した。挿入は互いに 80 mm 以上離れた場所に行った。

3) 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性および可溶性タンパク質濃度の測定

採取した移植物は周囲の結合組織を取り除き、4 $^{\circ}\text{C}$ に冷却した 0.15 M 酢酸ナトリウム液 (pH 5) 中で、ウルトラディスペーサーによりホモジナイズした。ホモジエネイトを30分間、4500 Xg で遠心分離の後に上澄み液中の酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性および可溶性タンパク質濃度を測定した。

酵素活性はフェニルリン酸から放出される、フェノールの量で測定した⁵⁾。この分析には基質として 4.25mM のフェニルリン酸を用い、緩衝液には、20 mM の酒石酸ナトリウムを含んだ 100 mM クエン酸ナトリウム液 (pH 4.9) を用いた。酵素活性 1 単位は、37 $^{\circ}\text{C}$ 1 時間で産出されるフェノール 1 μg と定義した⁶⁾。

可溶性タンパク質の測定には、Lowry らの方法を用いた。

4) 組織学的検討

採取した移植物を、ブアン液により固定し、パラフィン包埋をした後に、1つの移植物につき約 1 mm 間隔で5枚の切片 (厚さ 3 μm) を作成した。これらの切片にヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、組織像の変化および移植した粒子に付着している多核細胞数を計測した。

5) 試験計画

第1試験：移植後の経時的変化

乾草およびふすま主体の飼料で飼育している雌メンヨウ 6 頭を用い、それぞれの外腹斜筋の筋膜下 12カ所に骨粉を埋め込んだ。埋め込み後 6, 9, 12, 15日目に移植物を各メンヨウからそれぞれ3個ずつ採取した。そして各々2個の移植物を、酵素活性測定のために -40 $^{\circ}\text{C}$ で保存し、他の1個を組織像の観察のためにブアン液中で固定した。

第2試験：骨粉とポリエチレン粒子の移植により誘導される多核細胞の比較

第1試験同様に、乾草およびふすま主体の飼料で飼育している2頭の雌メンヨウの外腹斜筋の筋膜下6カ所に3カ所ずつ骨粉およびポリエチレン粒子を移植し、12日後に全ての移植物を採取した。採取した移植物は、第1試験と同様に保存した。

第3試験：骨粉の移植が、他の骨粉移植による類破骨細胞分化に及ぼす影響

第1試験同様に、乾草およびふすま主体の飼料で飼育している2頭の雌メンヨウの外腹斜筋の筋膜下3カ所に骨粉を6日間隔で移植した。そしてそれぞれ移植12日後に移植物を採取し、第1試験と同様に保存した。

第4試験：活性型ビタミン D₃ 投与が骨粉による類破骨細胞の分化に及ぼす影響

濃厚飼料主体で飼育している6頭の去勢雄メンヨウを用い、ビタミン D₃ 投与区と対照区に3頭ずつ割り当て反転した。外腹斜筋の筋膜下に3ヶ所骨粉を埋め込み、12日後に移植物を採取した。そして採取した移植物を、第1試験と同様に保存した。

ビタミン D₃ 投与区には移植5日目から7日間体重

1 kg 当り 0.05 μ g の活性型ビタミン D₃ (1 α , 25-dihydroxycholecalciferol, 日本ロシュ) を 2 ml のプロピレングリコールに溶かし, 毎日筋注投与した。

結果および考察

図-1 に示したように, 埋め込み 6 日目以降には, 移植物は筋肉上で, 結合組織に包まれ, 直径約 15 mm の薄い円形の塊になっていた。



図-1 骨粉埋め込み 6 日後の移植物の形態
移植物は結合組織に被われ, 直径 2~15mm の薄い円盤状の塊になっていた。そして, 多数の毛細血管が移植物に侵入していた。

第 1 試験：移植後の経時的变化

図-2 に示したように, 骨粉埋め込み 6 日後では多核細胞は認められなかったが, その後移植骨粉に接した多核細胞が現れ, 経時的にその数は増加した。

酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性は, 組織像の変化と関連して変化しており, 埋め込み 12 日後までは直線的に増加したが, 12 日後と 15 日後の間には明らかな差が生じなかった (図-3)。この酵素活性の変化は, ラットにおける骨粉埋め込みにより, 誘導される酸性フォスファターゼ活性の経時的变化に類似していた。¹⁾

これらの結果から, 埋め込み後に酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性を有する多核細胞が誘導されるまでには 9 日を要し, また 12 日間でこの細胞の誘導は, ほぼ完了することが示唆された。したがって, 骨代謝のモデルとしてこの誘導を用いるには, 埋め込み後少なくとも 12 日間を要すると考えられた。

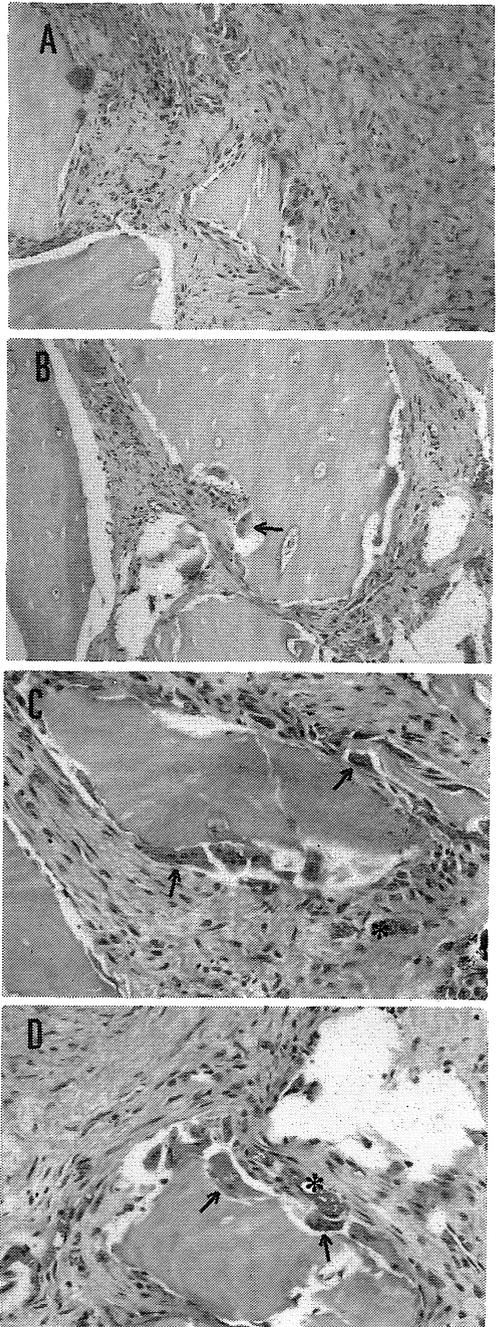


図-2 骨粉埋め込み後の移植物組織像の経時的变化

- | | |
|----------------|---|
| (A) 埋め込み 6 日後 | 骨粉に接する多核細胞は認められなかった。 |
| (B) 埋め込み 9 日後 | 骨粉に接した多核細胞が若干認められた (矢印)。 |
| (C) 埋め込み 12 日後 | 多くの多核細胞が骨粉に接していた (矢印), また毛細血管の侵入 (*) が著しかった。 |
| (D) 埋め込み 15 日後 | 12 日後と同様に, 多くの多核細胞が骨粉に接しており (矢印), また毛細血管の侵入 (*) が著しかった。 |

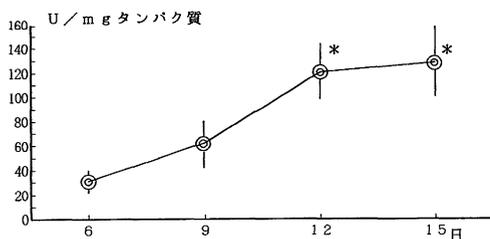


図-3 骨粉移植後の酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性の経時的変化
平均±標準誤差
* ; 移植6日後の値と比較し有意差 (P < 0.05) あり

第2試験：骨粉とポリエチレン粒子の移植により誘導される多核細胞の比較

表-1に示したように、ポリエチレン粒子により誘導された移植物中の酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性は、29.1 U/mg タンパク質であり、これは骨粉により誘導された移植物中の本酵素活性 136.8 U/mg タンパク質と比較して、非常に低い値であった。一方ポリエチレン誘導性の多核細胞と、骨粉誘導性の多核細胞の組織像に明らかな差は認められず、また細胞数にも差が認められなかった。その結果、1細胞当りの酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性はポリエチレン粒子により生じる移植物中では、著しく低く、骨粉移植により分化促進される多核細胞は、主に類破骨細胞であることが明らかとなった。

表-1 骨粉とポリエチレン粒子の移植により誘導される多核細胞数および酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性

	骨粉	ポリエチレン
多核細胞数(個/mm ²)	1.89±0.52	1.79±0.44
酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性(単位/mg タンパク質)	136.8±36.7	29.1±7.2**
酵素活性/多核細胞数	72.4±2.0	16.3±1.2**

平均±標準誤差
** ; P < 0.01

第3試験：骨粉の移植が、他の骨粉移植による類破骨細胞分化に及ぼす影響

表-2に示したように、初めの骨粉埋め込みにより生じる移植物中の酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性および多核細胞数と、6日遅れで行われた移植により誘導される酵素活性、細胞数との間に差は認められなかった。この結果から、骨粉の移植により生じる可能性のあ

る全身的な変化、すなわち、免疫系の鼓舞(破骨細胞前駆細胞の増殖)は、類破骨細胞の誘導には影響を及ぼさないものと推察された。

以上の結果から、ラットの場合と同様に、メンヨウにおいても骨粉移植により類破骨細胞が誘導され、この誘導は、繰り返し重複して骨吸収のモデルとして用いることが可能であると考えられた。

表-2 骨粉の移植が、重複する次の骨粉移植による類破骨細胞分化に及ぼす影響

	1回目	2回目
多核細胞数(個/mm ²)	1.69±0.77	2.23±0.24
酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性(単位/mg タンパク質)	136.1±29.5	143.2±15.3

平均±標準誤差

1回目と2回目の移植は6日間隔で行った。

表-3 活性型ビタミン D₃ 投与が骨粉による類破骨細胞の分化に及ぼす影響

	対照期	ビタミン D ₃ 投与期
多核細胞数(個/mm ²)	1.91±0.35	4.08±0.56*
酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性(単位/mg タンパク質)	146.9±18.3	406.7±62.2**

平均±標準誤差

* ; P < 0.05, ** ; P < 0.01

第4試験：活性型ビタミン D₃ 投与が骨粉による類破骨細胞の分化に及ぼす影響

活性型ビタミン D₃ 投与により、骨粉に接した多核細胞数は著しく増加し約2倍となり、また酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性は2.8倍になった(表-3)。活性型ビタミン D₃ が骨吸収を促進することはよく知られているが、その作用機序は⁷⁾いまだ明らかになっていない。Holtrop と Raisz は、骨の器官培養を用い、活性型ビタミン D₃ は破骨細胞の活性を高めるが、その分化には影響を及ぼさないと報告している。一方 Yoshiki⁸⁾らはビタミンD欠乏ラットに対する、ビタミンD投与が、in vivo で破骨細胞数を増加させることを示しており、また、マウスの骨髄細胞培養系に活性型ビタミン D₃ を投与すると、骨吸収能を有する類破骨細胞が分化することが報告されている。⁹⁾ 本試験の結果は、活性型ビタミン D₃ による破骨細胞の分化促進作用を支持するものであった。

以上の結果から得られた、骨粉による類破骨細胞の誘導に基づく骨吸収モデルは、(1) 骨組織と比較し反応性

が高い。(2) 比較的短期間で結果が得られる。(3) 繰り返しの動物を利用できるので、使用する動物の数を減らすことができる。(4) *in vitro* と異なり、栄養水準の違いや、ある処理により生じる二次的な作用を含む変化等の全身的な作用を検討できる、といった特徴がある。このモデルは、反芻動物における骨代謝の研究に大きく貢献すると考えられた。

摘 要

骨粉による類破骨細胞の誘導を、反芻家畜における骨代謝研究に用いるための基礎的な検討を行うために、(1) 骨粉移植後に生じる細胞分化の経時的変化、(2) 骨粉およびポリエチレン粒子により誘導される多核細胞の比較、(3) 骨粉移植により生じる可能性のある全身的变化、が類破骨細胞の分化に及ぼす影響を検討した。さらに骨吸収を促進することが知られている活性型ビタミンD₃を投与した場合の類破骨細胞誘導性の変化も合わせて検討した。骨粉移植9日後に、移植体周囲に多核細胞の誘導が認められ、その数は、その後著しく増加した。また破骨細胞のマーカーとして用いられている酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性は、12日後まで直線的に増加し、その後大きくは変化しなかった。この結果から、骨粉による多核細胞の誘導は12日後でほぼ完了すると考えられた。ポリエチレン粒子の移植により、やはり多核細胞が誘導されるが、この細胞の酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性は、骨粉誘導性の細胞と比較すると著しく低いので、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性は、骨粉により生じる類破骨細胞活性のマーカーになることが示された。骨粉移植の期間が重複しても、誘導される多核細胞数および酒石酸抵抗性酸性フォスファター

ゼ活性に差が認められなかったので、骨粉埋め込み自体は他の移植による類破骨細胞の分化に影響を及ぼさないと考えられた。また活性型ビタミンD₃投与時に、多核細胞数、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性ともに増加が認められ、骨粉による類破骨細胞の誘導は、ホルモン等に鋭敏に反応することが示された。

引用文献

- 1) SINHA, R., SMITH, J. C., Jr. and SOARES, J. H., Jr.: *J. Nutr.* **118**: 99-106, 1988.
- 2) REDDI, A. H. and HUGGINS, C. B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140**: 807-810, 1972.
- 3) GLOWACKI, J., JASTY, M. and GOLDRING, S.: *J. Bone Miner. Res.* **1**: 327-331, 1986.
- 4) HATTERSLEY, G., and CHAMBERS, T. J.: *Endocrinology* **124**: 1689-1696, 1989.
- 5) KING, E. J. and ARMSTRONG, A. R.: *Can. Med. Assoc. J.* **31**: 376-381, 1934.
- 6) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.* **198**: 265-275, 1951.
- 7) HOLTROP, M. and RAISZ, L.: *Calcif. Tissue Int.* **29**: 201-205, 1979.
- 8) YOSHIKI, S., YANAGISAWA, T., SUDA, T. and SASAKI, S.: *Calcif. Tissue Res.* **15**: 295-302, 1974.
- 9) TAKAHASHI, N., YAMANA, H., YOSHIKI, S., ROODMAN, G. D., MUNDY G. R., JONES, S. J., BOYDE, A. and SUDA, T.: *Endocrinology* **122**: 1373-1382, 1988.