

1 α -OH-D₃の授乳期マウス下顎頭軟骨に及ぼす影響

菅原光孝

岩手医科大学歯学部第二口腔解剖学講座

(主任: 名和橙黄雄教授)

[受付: 1989年10月5日]

抄録: 咀嚼運動の完成していない授乳期マウス (ddY系生後3日目) を用いて, 1 α -OH-D₃ (アルファロール) 連続投与の下顎頭軟骨への影響を検討した。1 α -OH-D₃投与により血清Ca濃度の上昇, 軟骨細胞層の厚さの減少が見られた。1 α -OH-D₃投与群では対照群と比較して光顕的には増殖層と成熟層の区別が不明瞭となり, 電顕的には1 α -OH-D₃投与群の増殖層と成熟層に著しい形態的变化が認められた。

増殖層と成熟層の³H-thymidineの標識細胞数は対照群の1/3以下となり1 α -OH-D₃投与により軟骨細胞の増殖抑制が認められた。また, alcian blue染色とPAS反応からみて, 1 α -OH-D₃投与群ではglycosaminoglycanと糖質合成の抑制がみられた。

Key words : mandible, 1 α -OH-D₃, mouse, chondrocyte

はじめに

ビタミンDの生理作用として当初, 明らかにされたのは, 小腸におけるカルシウム吸収の促進, また骨組織から血中へ骨塩を動員させることによって, 血清カルシウム値を上昇させる作用であった¹⁾。その結果, ビタミンDが間接的にしろ, 最終的な効果として骨組織の石灰化を促進させることが知られていた。

その後, ビタミンDそのものには生理活性がほとんど認められず活性化するためには, まず, 肝臓で25位の炭素がヒドロキシル化され, 次いで腎臓で1 α 位がヒドロキシル化されて最も活性化の高い1 α -25(OH)₂D₃に代謝されることが明白になり, ビタミンというよりはホルモンと考えられるようになってきた^{2,3)}。さらに, 高濃度の1 α -25(OH)₂D₃は骨の吸収を促進し, 骨のコラーゲン合成を抑制することが報

告されるようになってきた^{4,5)}。一方, ビタミンDのメタボリズムの研究と並行して, 活性型ビタミンDの合成アナログとして注目されてきたのが1 α -OH-D₃である。1 α -25(OH)₂D₃のアナログとして合成された1 α -OH-D₃は1 α -25(OH)₂D₃とほぼ同様の生理活性を有することが示され, 1 α -OH-D₃は1 α -25(OH)₂D₃よりもはるかに簡単に合成されることからその有用性が示唆されてきた^{6,7)}。このように, ビタミンDは骨の形成と吸収に大きく関与しており, 本邦ではこの1 α -OH-D₃が広く臨床に応用されているのが現状である。

下顎頭はその発育過程において, 軟骨内骨化の形式をとり, 主として顎関節を機能させるに必要な成長を付与する場所である。下顎頭軟骨は下顎頭表面に存在する間葉細胞から分化する軟骨細胞より発生する。その成長期においては, 他の長管骨のような骨端軟骨を有せず, 組織

The effects of 1 α -OH-D₃ on the development of mandibular condyle in mice.

Mitsutaka SUGAWARA

(Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27(〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 14 : 211-223, 1989

学的にも軟骨柱を全く形成しない特異な場である。下顎頭軟骨細胞は増殖, 分化, 成熟後だいに变性し, やがてその部位に血管が侵入し骨に置換される。このような軟骨内骨化の過程と軟骨細胞に及ぼすビタミンDの作用については, いまだ不明の点が残されている。下顎頭は顎関節の一部を構成しており, 咀嚼運動という機械的, 機能的因子が大きく関与するため, 今回は授乳期新生仔マウスを使用し, 下顎頭軟骨細胞の形成過程に及ぼす 1α -OH-D₃の影響について検討を試みた。

材料と方法

生後3日目の雌雄同腹 ddY 系マウスを1群として使用した。 1α -OH-D₃ (中外製薬) をミリスチン酸エチルを溶媒として溶解し, 9日または15日間連日経口投与あるいは皮下注射し, それぞれ実験9日群, 実験15日群とした。実験系は, 未処置群 (血清Ca濃度の標準検体としてのみ使用), 対照群 (溶媒のみ), 50ng/kg (低濃度投与群), 500ng/kg (高濃度投与群) の4群とし, 各群5匹のマウスを使用した。最後の 1α -OH-D₃投与から24時間後にエーテル麻酔下で開胸し, 血清Ca値測定のため心臓部より直接テルモ毛細管にて採血し, 断頭後下顎骨を摘出した。下顎骨は0.05M カコジル酸緩衝液 (pH7.4) で緩衝した2.5%グルタルアルデヒドと2%パラフォルムアルデヒドの混合液 (4°C) で2時間浸漬固定した。固定後, 0.05M カコジル酸緩衝液にて洗浄後, 10% EDTA-2Na 液にて1~2週間脱灰した。脱灰後, 1% オスミウム酸で1時間後固定し, 洗浄, エタノール系列で脱水後, エボン812に包埋した。下顎頭を矢状断方向に2 μ mの連続切片を作成し, 0.1% toluidine blue, PAS, alcian blue (pH 2.5) 染色を行い光学顕微鏡で観察した。さらにPAS, alcian blue 染色で染まった物質を同定するために, PAS 染色用の切片はアミラーゼ消化法 (pH6.0, 37°C, 1時間), alcian blue 染色用の切片は睾丸ヒアルロニダーゼ消化法 (pH5.0, 37°C, 2時間) をそれぞれ行った。また,

微細構造観察のために超薄切片を作成しウランと酢酸鉛の二重染色, あるいは periodic acid methenamine silver (PAM) 染色をほどこし, 透過型電子顕微鏡で観察した。

(1) 血清Ca濃度について

マウス5匹の血液を集めてこれを1個体として計測した。7000回転, 5分間遠心分離を行い, 血清を採取した。カルシウムCテスト (OCPC法 Wako) で発色させ, 比色計で吸光度を測定し, 血清Ca濃度を求めた。各群それぞれ5個体 (計25匹) について計測し, 未処置群を標準検体として比較検討した。

(2) 軟骨層の厚さの測定

Fig. 1 に示すように下顎頭の軟骨は表層より線維層, 増殖層, 成熟層, 肥大層に分けられるが⁸⁾, 線維層には著明な変化が見られなかったため, 本実験では増殖層, 成熟層, 肥大層の厚さを計測して比較することにした。計測部位はほぼ下顎頭の中央を矢状断した切片を1匹につき5枚抽出し, 写真撮影後, 6.5倍に拡大した写真上で中央部とその両側2cmの3カ所について増殖層の最上部から肥大層の最下部まで計測した。一匹当たり計15個の測定値を平均し, 各群5匹について比較検討した。

(3) ³H-thymidineの取り込み

³H-thymidineの取り込みの実験では, 対照群, 低濃度投与群, 高濃度投与群の3群ともに

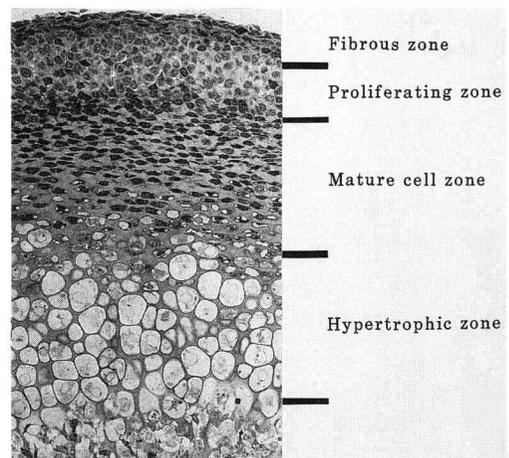


Fig.1 Four classifications of condylar cartilage layer.

1 α -OH-D₃皮下注射群を用いた。実験9日群は8日目に10 μ ci/gの³H-thymidineを腹腔内注射し、実験15日群は8日目と14日目に2回注射した。それぞれ最終の1 α -OH-D₃投与(³H-thymidine注射後)から24時間後にエーテル麻醉下で3群のマウスを屠殺し、上記と同様の方法で試料を作成し厚さ3 μ mの連続切片を作成した。Konica NR-M2乳剤を用いてdipping法によりラジオ・オートグラフィーを行った⁹⁾。4 $^{\circ}$ C、45日間露出を行い、D-72現像液で現像後、toluidine blue染色を施した。各軟骨層の細胞200個中の標識された細胞数を計測した。

(4) 統計学的処理

一元配置分析により、薬剤処置による血清Ca濃度、下顎頭軟骨の厚さの有意差P(0.01)を確認したあと、Newman-Keuls testにて各群間の有意性を検定した。

結 果

血清Ca濃度について：Fig. 2に示すように実験9日目、実験15日目ともに未処置群、対照群、

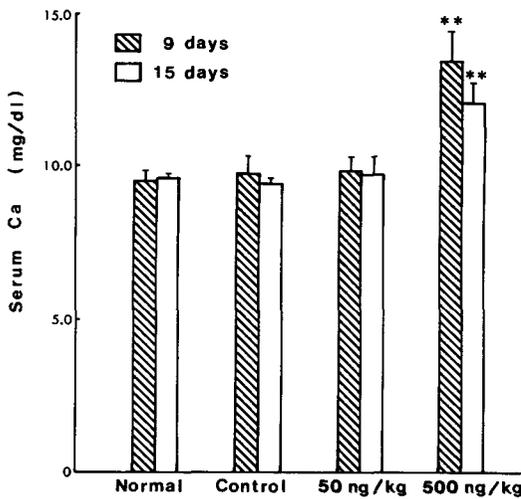


Fig.2 The effect of 1 α -OH-D₃ on the serum calcium levels at 9 days and 15 days after the administration. Serum calcium by the administration of 500 ng/kg body weight was significantly different as compared with other groups (** : P<0.01). Vertical bars are means \pm SD.

50ng/kg投与群の三群間には有意差は認められなかったが、500ng/kg投与群ではいずれの時期にも血清Ca値の有意の上昇が認められた(Table. 1)。

光顕所見：Fig. 3Aと3Bに示すよう実験9日目では、対照群、実験群ともに組織学的に著しい差異は認められなかった。Fig. 4は実験15日目の光顕写真であるが、9日目に比較して対照群、実験群ともに軟骨層全体の厚さが減少し、増殖層、成熟層の識別が不明瞭になってくるのが特徴的な所見である。対照群と高濃度投与群を比較すると、高濃度投与群では対照群に比較して全体に軟骨層の発達が悪く、特に増殖層と成熟層の減少が著明で、両者の識別が対照群に比較して著しく不明瞭となった。また、肥大層の細胞も対照群に比較して小型化し、層状配列の減少が認められる。実験9日目、15日目のそれぞれの軟骨細胞層の厚さをFig. 5, 6,

9 day serum calcium level (mg/dl)

	means	non	cont	50ng/kg	500ng/kg
		9.56	9.78	9.84	13.42
non	9.56				**
cont	9.78				**
50ng/kg	9.84				**
500ng/kg	13.42				

** : p<0.01

15 day serum calcium level (mg/dl)

	means	cont	non	50ng/kg	500ng/kg
		9.44	9.64	9.72	12.06
cont	9.44				**
non	9.64				**
50ng/kg	9.72				**
500ng/kg	12.06				

** : p<0.01

Table 1 The Newman-Keuls test of serum calcium levels with administration of 1 α -OH-D₃ for 9 days and 15 days. Note the significant difference in the treated group with 500ng/kg body weight.

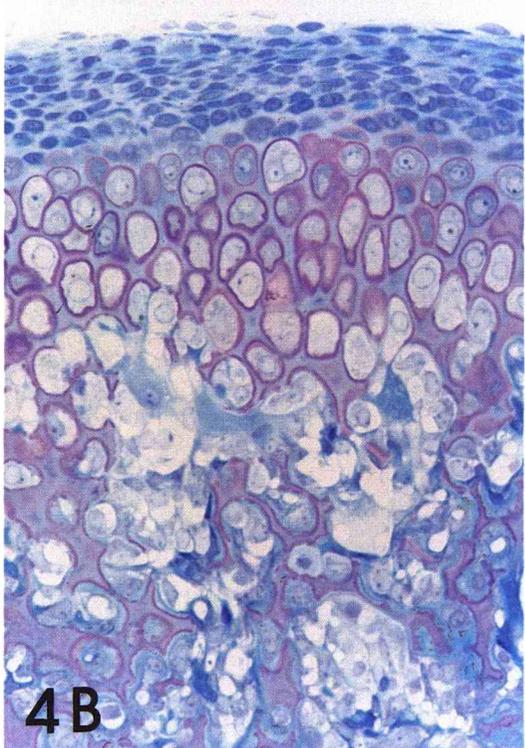
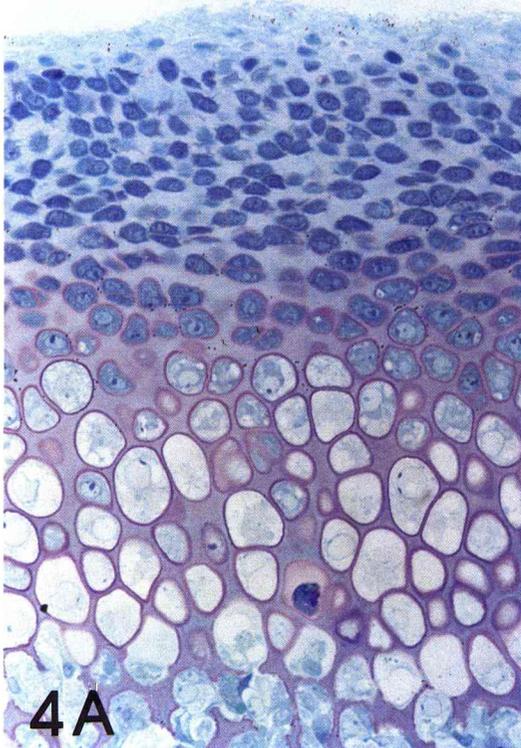


Fig.3 Light photomicrographs stained with toluidine blue at 9 days after the administration. There was no significant morphological changes between control specimen (Fig.3A) and 500ng/kg, 1 α -OH-D₃ administration specimen (Fig.3B). $\times 100$

Fig.4 Light photomicrographs stained with toluidine blue at 15 days after the administration. Note the decrease of cartilage layer, especially proliferating zone and mature cell zone in 500ng/kg, 1 α -OH-D₃ treated specimen (Fig. 4B) as compared with control specimen (Fig. 4A). $\times 200$

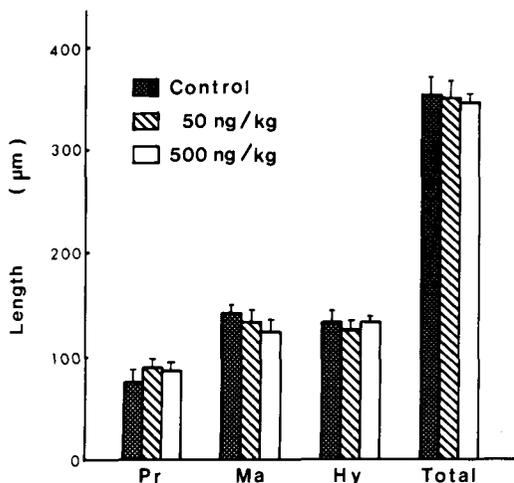


Fig.5 The effect of 1α -OH- D_3 on the length of condylar cartilage layer and its cell zones at 9 days after the administration. There was no significant difference among each group. Pr : Proliferating zone, Ma : Mature cell zone, Hy : Hypertrophic zone. Vertical bars are means \pm SD.

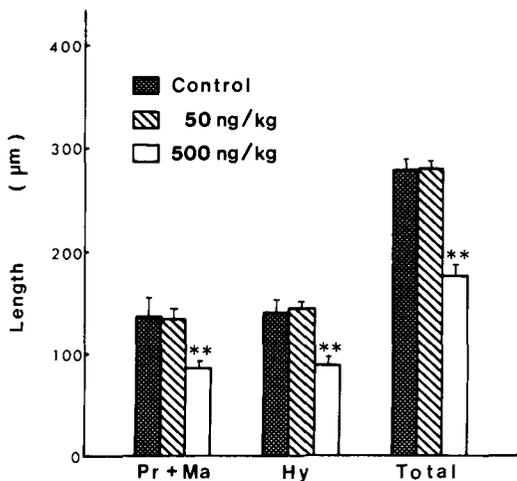


Fig.6 The effect of 1α -OH- D_3 on the length of condylar cartilage layer and its cell zones at 15 days after the administration. Note the decrease of 500 ng/kg and the significant difference in the 500ng/kg treated group. (** : $P < 0.01$). Pr+Ma : Proliferating zone + Mature cell zone, Hy : Hypertrophic zone. Vertical bars are means \pm SD.

Table. 2 に示す。Fig. 5 は、実験 9 日目の軟骨層と軟骨各層の対比を示すが、成熟層で投与量

Table 2

15 day length of condylar cartilage (micra)

Proliferating + Mature cell zone			
	500ng/kg	50ng/kg	cont.
means	85.9	134.2	136.5
500ng/kg	85.9	**	**
50ng/kg	134.2		
cont.	136.5		

** : $p < 0.01$

Hypertrophic zone			
	500ng/kg	cont.	50ng/kg
means	88.5	140.2	143.6
500ng/kg	88.5	**	**
cont.	140.2		
50ng/kg	143.6		

** : $p < 0.01$

Proliferating + Mature cell + Hypertrophic zone			
	500ng/kg	cont.	50ng/kg
means	174.4	277.0	277.8
500ng/kg	174.4	**	**
cont.	277.0		
50ng/kg	277.8		

** : $p < 0.01$

Table 2 The Newman-Keuls test of each condylar cartilage zone as shown in Fig.6. There was significant difference in the 500ng/kg treated group.

にとまなう減少傾向がみられるが、対照群と比較して低濃度投与群、高濃度投与群に有意の差はみられなかった。Fig. 6 は実験15日群であるが、実験9日目に比較して軟骨層全体の減少がみられたが、高濃度投与群での減少が著明であり、軟骨各層で高濃度投与群と対照群、低濃度投与群との間に有意の減少の差がみられた (Table. 2)。

電顕所見 : 1α -OH- D_3 投与9日目は、各群

の軟骨各層ともに形態的には大きな差異は認められなかった。また、15日目では低濃度投与群と対照群との間には大きな差異は認められなかった。したがって、形態的に差異の認められた15日の高濃度投与群と対照群について比較することにした。

線維層：対照群、高濃度投与群ともに、基質には密なコラーゲン線維が豊富に存在し、細胞は扁平な線維芽細胞様細胞からなり、この細胞は軟骨表面と平行に連なって配列していた。粗面小胞体以外の細胞内小器官の発達はあまりよくなく、両群間には大きな差異は認められなかった (Fig. 7A, a)。

増殖層：対照群の細胞は長楕円形を呈し、細胞突起を四方に出している。細胞内にはよく発達した粗面小胞体が見られるのが特徴的である。これに比べて高濃度投与群では核の変形が顕著で、著しい粗面小胞体の拡大が認められるのが特徴的である。このように、高濃度投与群では増殖層の細胞は外見的には破壊を思わせるような像を呈することから $1\alpha\text{-OH-D}_3$ は増殖層の細胞に最も影響を与えている可能性が示唆される (Fig. 7B, b)。

成熟層：対照群、高濃度投与群ともに、細胞は大きさを増し、粗面小胞体の発達もよいが、対照群では高濃度投与群に比べて粗面小胞体の拡大が顕著であり、脂肪滴様の大型空胞の増加のみられることが特徴的である。両群ともにクロマチンが乏しく顕著な核小体が見られる (Fig. 7C, c)。

肥大層：この層では対照群、高濃度投与群ともに大きな差異は認められない。細胞は一段と大型化し細胞内小器官は変性してくるのが特徴的である。核のクロマチンは消失傾向にあり核小体も認められなくなる。粗面小胞体は断裂的に配列し大型の空胞が出現してくる (Fig. 7D, d)。

Alcian blue 染色, PAS 染色について : Fig. 8, 9 は15日目の対照群と高濃度投与群における連続切片の, alcian blue 染色と PAS 染色である。Alcian blue (Fig. 8A, 8B) 染色では成

熟層下層から肥大層にかけての基質が弱陽性に反応し、一部細胞内に強陽性の染色性が認められる。細胞質内にみられる強陽性反応の出現は、高濃度投与群に比べて対照群に多い傾向がみられた。これに睾丸ヒアルロニダーゼ消化試験を行うと、両群ともに alcian blue の染色性が消失した。さらに、PAS 染色 (Fig. 9A, 9B) についてみると、対照群では alcian blue と同様の部位に反応が認められたが、高濃度投与群では反応は認められなかった。また、アミラーゼ消化試験を行うと、PAS の染色性が消失した。さらに PAS 陽性物質を電顕的に証明するために PAM 染色を施すと、Fig. 10 に示すように軟骨基質ならびに細胞質の空胞内、あるいはその周囲に銀粒子の沈着がみられた。多くの場合はほぼ均一に銀粒子の沈着がみられたが、時には空胞内に芯状に凝集する例もみられた (Fig. 10 a, b)。

$^3\text{H-thymidine}$ の取り込みについて : 電顕的には高濃度投与群の増殖層の細胞に最も大きな形態的变化が認められたので、この層の細胞の動態を解析するために $^3\text{H-thymidine}$ の取り込みについて検討を試みた。Fig. 11 と 12 に軟骨層の各層の細胞200個中の標識細胞数を示した。実験9日群では対照群、低濃度投与群、高濃度投与群の増殖層+成熟層の部位での標識細胞は200個当たりそれぞれ66.7, 59.7, 57.0個であった。 $1\alpha\text{-OH-D}_3$ 投与群で多少の減少傾向がみられるが有意の差は認められない。肥大層の標識細胞は対照群でわずかに見られた。実験15日群 (2回注射群) になると増殖層+成熟層部位における標識細胞数は対照群と比較して低濃度投与群と高濃度投与群ともに約 $\frac{1}{3}$ 以下であった。それと同時に、肥大層への導入は対照群のみで、 $1\alpha\text{-OH-D}_3$ 処理群ではいずれの群においても、成熟層から肥大層への導入は認められなかった。

考 察

下顎頭軟骨は顔面の他の軟骨と同様に頭蓋発生の holistic system には不可欠の要素と考えられているが、その役割は年齢とともに減少す

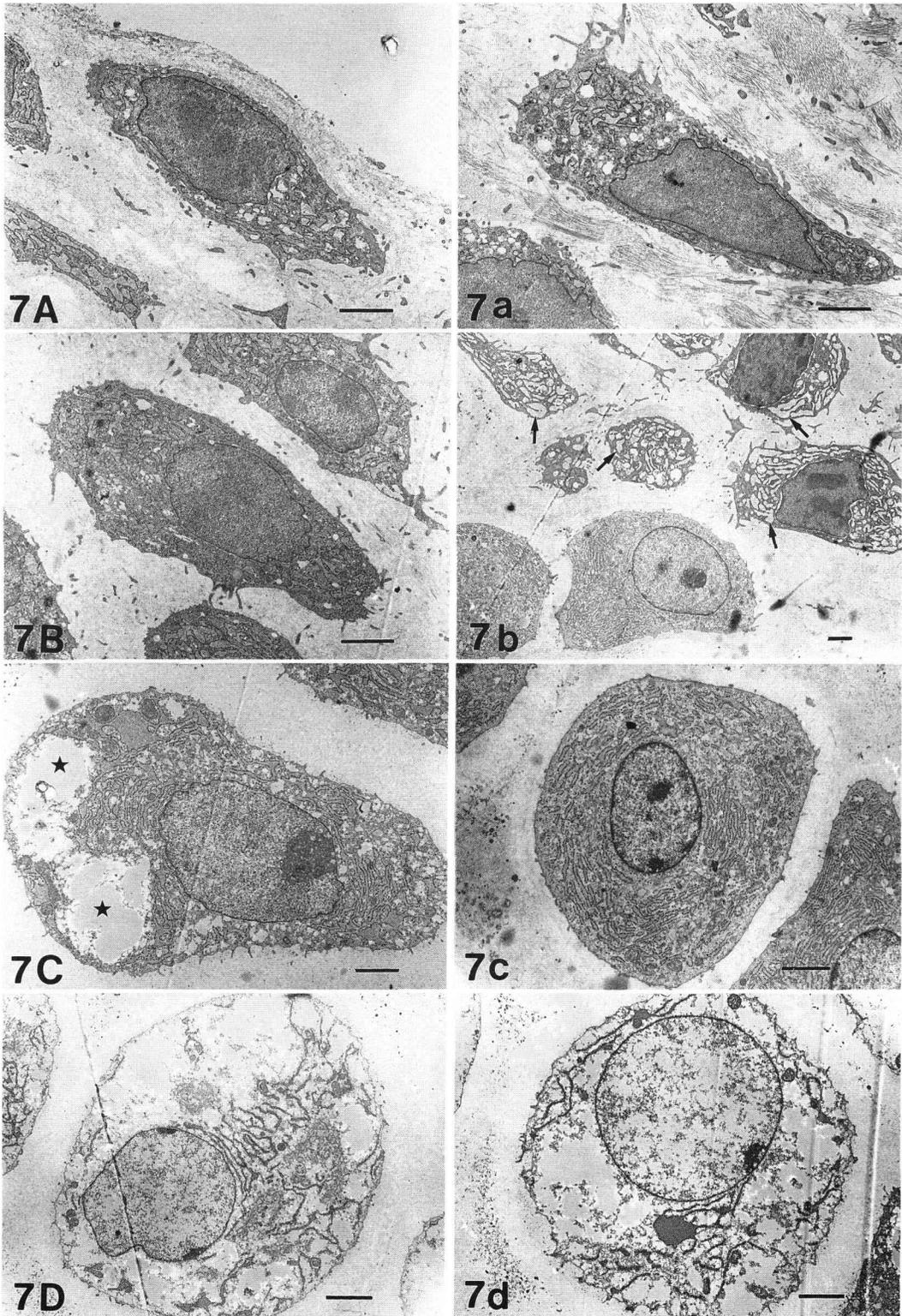


Fig.7 Electron photomicrographs of four zones of condylar cartilage at 15 days after the administration. Figures 7A-7D are control, and Figures 7a-7d are 500ng/kg, 1 α -OH-D₃ treated specimens. There were no radical morphological changes in both fibrous zone and hypertrophic zone. Note the expansion of rough endoplasmic reticulum of proliferating cells (Fig.7b, arrows) treated with 500ng/kg, 1 α -OH-D₃ and the vacuolization of maturing cells in control (Fig.7C, stars) which may contain glycosaminoglycan or PAM positive silver grains as shown in Fig.8A and Fig.9A. Bar=2 μ m

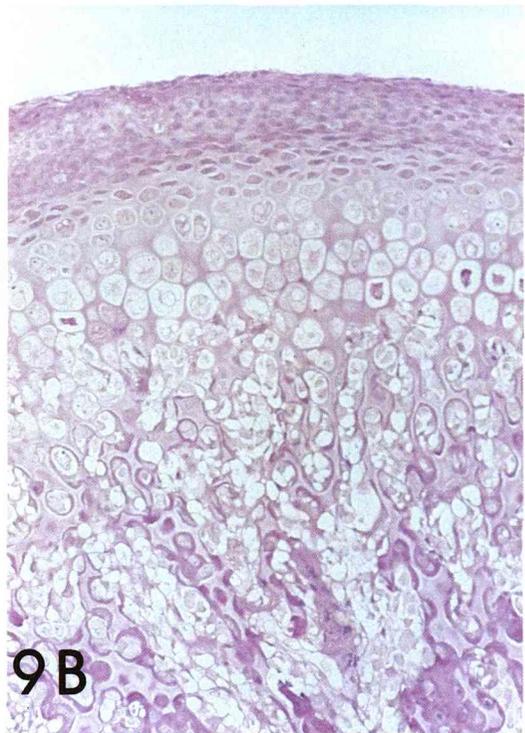
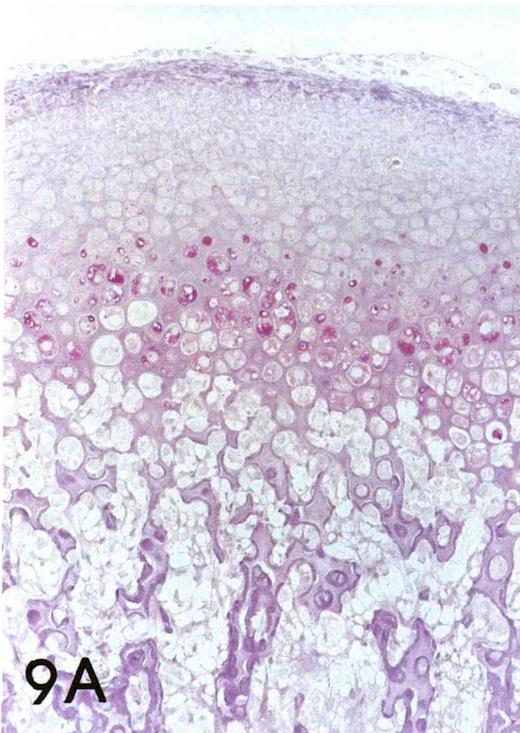
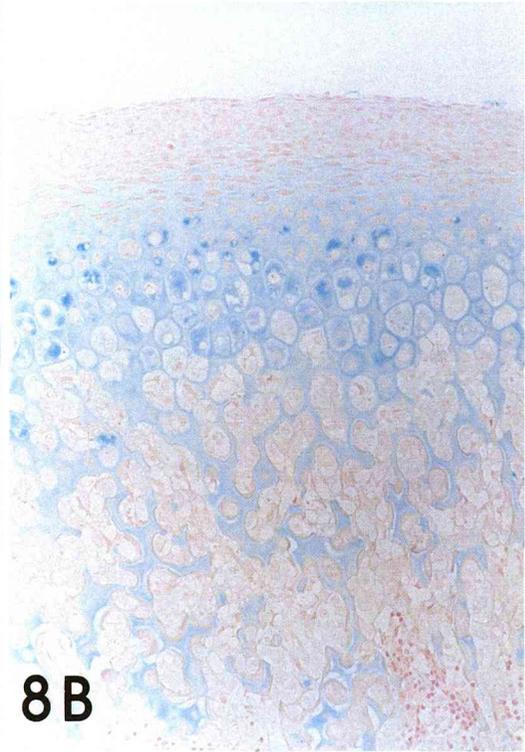


Fig.8 Light photomicrographs stained with alcian blue. Alcian blue stained the matrix and the vacuoles of hypertrophic cells. The reaction of alcian blue staining was weaker in 1α -OH- D_3 treated group (Fig.8B) than the control (Fig.8A). These stainings completely disappeared with hyaluronidase treatment. $\times 100$

Fig.9 Light photomicrographs stained with PAS reaction. PAS reaction was positive in matrix and hypertrophic cells of control group (Fig.9A), on the other hand, in 1α -OH- D_3 groups PAS reaction was negative (Fig.9B). These stainings completely disappeared with amylase treatment. $\times 100$

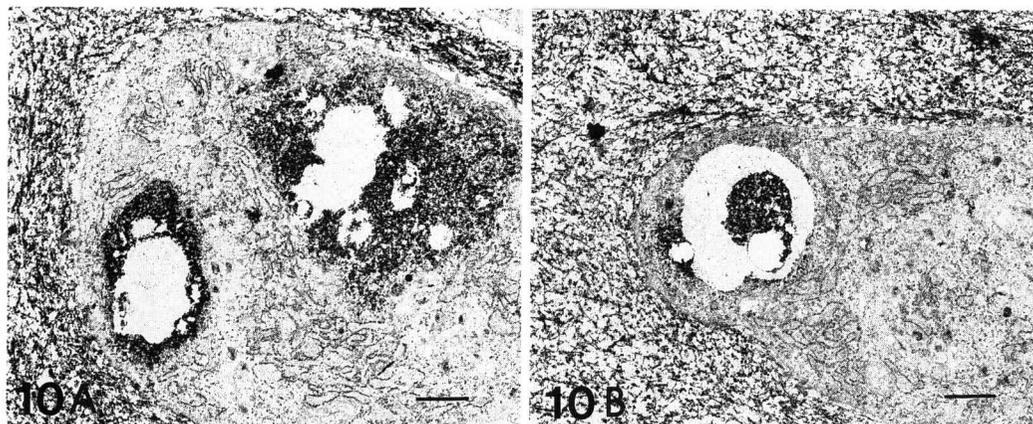


Fig.10 Electron photomicrographs of control specimen stained with PAM. The silver grains of PAM staining deposited on matrix and mature cell vacuoles. Fig.10A shows a peripheral localization of silver grains. Fig.10B shows a central localization of silver grains. Bar=1 μm

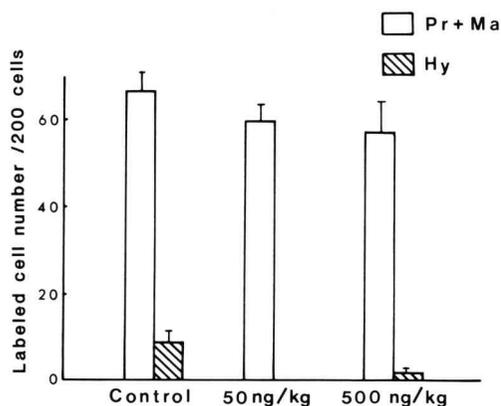


Fig.11 The effect of 9 daily administrations of 1 α-OH-D₃ upon the incorporation of ³H-thymidine in the condylar cartilage. There was no significant difference among each group. Pr + Ma : Proliferating zone + Mature cell zone, Hy : Hypertrophic zone. Vertical bars are means ± SE.

ると考えられている。しかしながら、成体では下顎頭軟骨は関節軟骨と同様の機能を果たしているが、不正咬合や矯正力などの外的因子に対応する能力が維持されていると考えられている^{10,11)}。下顎頭軟骨の形成は一般に胎生期の後半に始まり、ラットの場合は生後8週で成長を停止し、胎生期の硝子軟骨は線維性軟骨に置換される^{12,13)}。このように下顎頭軟骨は下顎骨の成長が停止するまで軟骨内骨化を継続する特異

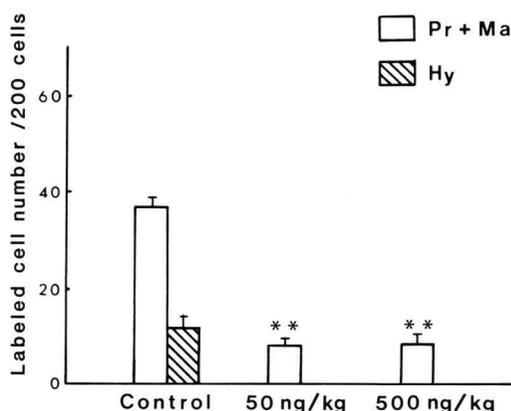


Fig.12 The effect of 15 daily administrations of 1 α-OH-D₃ upon the incorporation of ³H-thymidine in the condylar cartilage. A significant decrease is noted at 50 and 500ng/kg of Pr + Ma (** : P < 0.01). Pr + Ma : Proliferating zone + Mature cell zone, Hy : Hypertrophic zone. Vertical bars are means ± SE.

的な場と考えられ、長管骨の胎生期のモデルとして取り扱われることもある^{14,15)}。下顎頭軟骨はその構造と成長の特異性から骨の成長と分化の研究材料としては好都合の材料であるが、下顎頭軟骨におこる構造的、生化学的变化については未だ不明の点が多い。そこで今回は下顎骨の成長過程における軟骨細胞について1 α-OH-D₃を使用し、1 α-OH-D₃の下顎頭軟骨に及ぼす影

響について検討を試みた。活性型ビタミンD₃の下顎頭軟骨への影響の報告は、今までにもいくつかみられる。Silbermannら¹⁶⁾は生後7日目のマウスを用いて、生理的濃度をこえる1 α -25(OH)₂D₃を皮下注射すると血清Ca濃度が増加し、下顎頭の軟骨層の長さが減少すると報告している。一方、今回、著者が用いた1 α -OH-D₃は肝臓で25位が水酸化され1 α -25(OH)₂D₃に代謝されてからその生理活性を發揮し¹⁷⁾、*in vivo*においては、1 α -OH-D₃は1 α -25(OH)₂D₃とはほぼ同様の生理活性を有するとされている^{18,19)}。須田ら⁷⁾は成体マウスに1 α -OH-D₃を1カ月間投与し、血清Ca濃度増加の発現の見られた最少投与量は1600 ng/kgであると報告しているが、今回は $\frac{1}{3}$ 以下の投与量で、しかも短期間で血清Ca値の増加が観察された。この相異は本実験で用いた幼若マウスと成体マウスとの違いによるものと思われる。DostalとToverud²⁰⁾によると生後9日、16日、38日目のラットに1 α -25(OH)₂D₃をそれぞれ4日間投与したところ、9日目の授乳期幼若ラットの血清Ca濃度が最も高く、血清Ca値は日齢とともに低くなることを報告している。本実験でも、9日目が13.4mg/dl、15日目が12.1mg/dlと9日目の方がやや高い値を示した。この減少についてDostalとToverud²⁰⁾は幼若動物では1 α -25(OH)₂D₃に対するdrug inactivation systemの発現が遅く、授乳期から離乳期にかけて、これらのsystemが発現してくると述べている。軟骨層の厚さは、実験9日目では各層間、ならびに全長について、いずれも有意差は認められなかったが、実験15日目になると500ng/kg高濃度投与群では対照群ならびに低濃度投与群と比較して軟骨層の厚さが約 $\frac{1}{2}$ 以下となり、さらに、光顕的観察では、増殖層と成熟層の形態的識別が著しく不明瞭となった。同様に、1 α -25(OH)₂D₃をラットに投与した実験でWeinrebら²¹⁾は、下顎頭軟骨の減少とともに増殖層と成熟層との区別が出来なくなったことから1 α -25(OH)₂D₃は軟骨細胞の新しい産生を抑制し、この結果、著しく軟

骨増殖が減少する可能性を示唆している。1 α -OH-D₃の増殖層に対する変化は、電顕的にも明らかで、対照群と比較して1 α -OH-D₃投与群では増殖層細胞の粗面小胞体の異常な拡張が著明に認められた。1 α -OH-D₃の増殖層細胞に対する影響をみるために、³H-thymidineの取り込みについて検討を試みた。Blackwood²²⁾の正常ラットの³H-thymidineの取り込みの報告では、最初の標識は注射後4時間で増殖層に出現し、24時間には肥大層への移行が出現する。1週間になると大多数が肥大層に移行し、そのlife spanは5~6日とされている。本研究でも標識細胞は、上記の報告と同様に大多数が増殖層に出現し、肥大層への移行は対照群にのみ認められ、1 α -OH-D₃処理群ではその移行はほとんどが抑制されていた。軟骨各層への取り込みをみると、実験9日目では対照群、実験群ともに標識細胞数には差はみられないが、実験15日目になると1 α -OH-D₃処理群では増殖層と成熟層の標識細胞数は著しく減少し、対照群の約 $\frac{1}{3}$ 以下になる。Silbermannら¹⁶⁾も、1 α -25(OH)₂D₃をマウスに7日間連続注射して³H-thymidineの取り込みをみているが、形態的にはあまり変化のみられない50ng/kgの低濃度投与群ですでに³H-thymidineの取り込みの抑制がみられ、この抑制は1 α -25(OH)₂D₃の用量に比例している事を報告している。また、Frommerら²³⁾は、胎生17日から生後21日のマウスの下顎頭軟骨細胞の³H-thymidineの標識率をみているが、³H-thymidineの標識率は生後1日目でピークとなり、経日的に減少すると報告している。本実験でも同様に対照群でも15日目になると9日目に比較して³H-thymidineの標識細胞数は半分以下となり、マウスの下顎頭の軟骨細胞の分裂活性は幼若な程、高いことが示された。

Sudaら²⁴⁾は、*in vitro*でのビタミンDの軟骨細胞への直接効果を調べるために、鶏胚大腿骨の成長軟骨に1 α -25(OH)₂D₃を加えた実験を行ったが、これによると成長軟骨細胞では1 α -25(OH)₂D₃添加によりglycosaminoglycan

(GAG)合成が抑制されるとともに、すでに軟骨基質に分泌されたGAGの分解も促進されたと報告している。また、Silbermannら²⁶⁾は 1α -25(OH)₂D₃の5000ng/kgの多量投与によりマウス下顎頭軟骨では、軟骨細胞のコラーゲン合成とGAG合成が著しく阻害され、軟骨細胞の増殖活性が抑制されることを報告している。本研究でもalcian blue染色性は対照群に比較して高濃度投与群では弱く、この染色性はヒアルロニダーゼ消化法により完全に消失することから、alcian blueに反応してみられたものは、GAGのうちのヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸と推測される。このように、本研究においても 1α -OH-D₃高濃度投与群によりGAG合成の抑制が示唆された。一方、PAS反応による染色性は対照群に比べて高濃度投与群で著しく減弱していた。この染色性はアミラーゼ消化試験により抑制されたこと、電顕的にはPAM反応陽性であることからみて、PAS陽性の物質の一部はグリコーゲンないしは糖蛋白と考えられ、これらの合成もGAG同様に、 1α -OH-D₃投与により抑制されることを示唆している。軟骨細胞は増殖と分化と同時に、プロテオグリカンやコラーゲンなどの高分子型軟骨基質の合成と分泌を行い、この間に下顎頭は長軸方向へ成長を果すことになるが、高濃度の 1α -OH-D₃投与は、一連の代謝を抑制し、結果として軟骨層の長さの減少をもたらしたものと思われる。

以上のような事実を総合すると本研究では、 1α -OH-D₃は下顎頭軟骨の増殖層と成熟層に作用して軟骨細胞の増殖を抑制し、さらに糖質とGAG合成を抑制することが明らかになった。成長軟骨に対するビタミンD作用は非常に興味のある問題であり、成長軟骨の骨化の過程は軟骨細胞の増殖と最も関係が深い。また軟骨細胞の増殖と成熟は軟骨基質の石灰化をコントロールしていると考えられている。

Anderson²⁶⁾は軟骨の石灰化には軟骨基質中の基質小胞が関与していることを示唆しており、また、軟骨石灰化の初期には軟骨基質中から、

GAGが消失するということが一般的に認められている。Silbermannら²⁶⁾はビタミンD₃により軟骨細胞の増殖は抑制されるが、軟骨基質の石灰化はむしろ促進されると報告している。このようにビタミンD₃は軟骨細胞のみならず骨化という問題も含んでおり、今後はこの点に注目して研究を進めていきたいと考えている。

結 論

1) 生後3日目のddY系マウスに 1α -OH-D₃を連日投与すると、下顎頭の軟骨細胞層の厚さは減少した。

2) 1α -OH-D₃投与群では、光顕的には増殖層と成熟層の識別が対照群に比較して不明瞭であった。電顕的には、 1α -OH-D₃投与により増殖層と成熟層の細胞に著明な形態的な変化が認められた。

3) ³H-thymidineによる増殖層+成熟層の標識細胞数は、 1α -OH-D₃投与群では対照群の1/3以下であった。また、³H-thymidineの取り込み実験から、 1α -OH-D₃投与群では成熟層から肥大層への細胞の移行は認められなかった。

これらの結果から、 1α -OH-D₃は軟骨細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。また、 1α -OH-D₃投与群ではalcian blue染色とヒアルロニダーゼ消化の結果と、PAS染色とアミラーゼ消化の結果から、glycosaminoglycanと糖質の合成が抑制されることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った、岩手医科大学歯学部第二口腔解剖学講座、名和橙英雄教授に深甚なる謝意を表します。実験にあたり終始御懇切なる御指導、御鞭撻をいただいた立花民子助教授、石関清人講師、坂倉康則講師、藤原尚樹助手、永野弘之助手に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第35回日本解剖学会東北・北海道連合地方会(1989年9月26日、帯広)において発表した。

Abstract : To investigate the effects of 1 α -OH-D₃ (ALFAROL) on the condylar cartilage of mouse mandibles, 3-day-old mice (ddY) were used in this experiment. 1 α -OH-D₃ increased serum Ca level and decreased condylar cartilage. With administration of 1 α -OH-D₃, it was difficult to distinguish the proliferating zone from mature cell zone in condylar cartilage by morphology.

Furthermore, the cells in proliferating and mature cell zones were electron microscopically exposed to morphological changes compared with the control. The labeling indexes of ³H-thymidine on the cells in proliferating and mature cell zones were reduced by one-third of control level. Moreover, the positive reaction was stained with alcian blue and PAS reduced with the administration of 1 α -OH-D₃. From the above results, it is suggested that 1 α -OH-D₃ inhibited the proliferation and glycosaminoglycan synthesis of condylar chondrocytes.

文 献

- 1) DeLuca, H.F. : Mechanism of action and metabolic fate of vitamin D. *Vitamins Hormons*. 25 : 315-367, 1967.
- 2) Norman, A.W. and Henry, H.L. : 1, 25-dihydroxycholecalciferol- A hormonally active form of vitamin D₃. *Recent. Prog. Hormon. Res.* 30 : 431-480, 1974.
- 3) Herrmann-Erlee, M.P.M. and Gaillard, P.J. : The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on embryonic bone in vitro : A biochemical and histological study. *Calcif. Tissue Res.* 25 : 111-118, 1978.
- 4) Raisz, L.G., Kream, B.E., Smith, M.D. and Simmons, H.A. : Comparison of the effects vitamin D metabolites on collagen synthesis and resorption of fetal rat bone in organ culture. *Calcif. Tissue Int.* 32 : 135-138, 1980.
- 5) Hock, J.M., Kream, B.E. and Raisz, L.G. : Autoradiographic study of the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on bone matrix synthesis in vitamin D replete rat. *Calcif. Tissue Int.* 34 : 347-351, 1982.
- 6) Holick, M.F., Semmler, E.J., Schones, H.K. and DeLuca, H.F. : 1 α -hydroxy derivative of vitamin D₃ : a highly potent analog of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Science* 180 : 190-191, 1973.
- 7) 須田立雄, 佐々木哲, 金子主悦, 石川正幸, 西井易穂, 新藤 実, 高垣善男, 高梨茂, 鈴木成生 : 1 α -OH-D₃の基礎, 診断と新薬, 13 : 1595-1617, 1975.
- 8) Bloom, W. and Fawcett, D.W. : A textbook of histology 10th ed., Philadelphia, London, Toronto, W.B. Saunders Co., 271-273, 1975.
- 9) 永田哲士 : ラジオオートグラフ多量作製簡便法, 細胞, 14 : 40-45, 1982.
- 10) Folke, L.E.A. and Stallard, R.E. : Condylar adaptation to a change in intermaxillary relationship. *J. periodont. Res.* 1 : 79-89, 1966.
- 11) Stöckli, P.W. and Willert, H.G. : Tissue reactions in the temporomandibular joint resulting from anterior displacement of the mandible in the monkey. *Am. J. Orthod.* 60 : 142-155, 1971.
- 12) Meikle, M.C. : The mineralization of condylar cartilage in the rat mandible : an electron microscopic enzyme histochemical study. *Archs. Oral Biol.* 21 : 33-34, 1976.
- 13) Silbermann, M. and Maor, G. : Mandibular growth retardation in corticosteroid-treated juvenile mice. *Anat. Rec.* 194 : 355-367, 1979.
- 14) Durkin, J.F. : Secondary cartilage : a misnomer? *Am. J. Orthod.* 62 : 15-41, 1972.
- 15) Baume, L.J. : Differential response of condylar, epiphyseal, synchondrotic, and articular cartilages of the rat to varying levels of vitamin A. *Am. J. Orthod.* 58 : 537-551, 1970.
- 16) Silbermann, M., Mirsky, N., Levitan, S., and Weisman, Y. : The effect of 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ on cartilage growth in neonatal mice. *Metab Bone. Dis. Rel. Res.* 4 : 337-345, 1983.
- 17) Fukushima, M., Suzuki, Y., Tohira, Y., Matunaga, Y., Ochi, K., Nagano, H., Nishii, Y. and Suda, T. : Metabolism of 1 α -hydroxyvitamin D₃ to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comum.* 66 : 632-638, 1975.
- 18) Nishii, Y., Ono, M., Fukushima, M., Shimizu, T., Niki, R., Ohkawa, H., Takagaki, Y., Okano, K. and Suda, T. : Osseous changes and abnormalities of mineral metabolism in rats with glycopeptide-induced nephritis. *Endocrinology* 107 : 319-327, 1980.
- 19) Fukushima, M., Niki, R., Okhawa, H., Shimizu, T., Matsunaga, I., Nakano, H., Takagi, Y., Nishii, Y., Okano, K. and Suda, T. : Comparative therapeutic effects of vitamin D₃ and its derivatives on experimental renal

- osteodystrophy. *Endocrinology* 107 : 328-333, 1980.
- 20) Dostal, L.A. and Toverud, S.U. : Enhanced sensitivity of young suckling rats to the toxic effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. *Calcif Tissue Int.* 35 : 432-437, 1983.
- 21) Weinreb, M., Gazit, Jr.E. and Weinreb, M.M. : Mandibular growth and histologic changes in condylar cartilage of rats intoxicated with vitamin D₃ or 1,25 (OH)₂D₃ and pair-fed (undernourished) rats. *J. Dent. Res.* 65 : 1449-1452, 1986.
- 22) Blackwood, H.J.J. : Growth of mandiblar condyle of the rat studied with tritiated thymidine. *Arch. Oral Biol.* 11 : 493-500, 1966.
- 23) Frommer, J., Monroe, C.W., Morehead, J.R. and Belt, W.D. : Autoradiographic study of cellular proliferation during early development of the mandibular condyle in mice. *J. Dent. Res.* 47 : 816-819, 1968.
- 24) Suda, S., Takahasi, N., Shinki, T., Horiuchi, N., Yamaguchi, A., Yosiki, S., Enomoto, S. and Suda, T. : 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and their action in embryonic chick chondrocytes. *Calcif. Tissue Int.* 37 : 82-90, 1985.
- 25) Silbermann, M., von der Mark, K., Mirsky, N., van Menxel, M. and Lewinson, D. : Effects of increased doses of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on matrix and DNA synthesis in condylar cartilage of suckling mice. *Calcif. Tissue Int.* 41 : 95-104, 1987.
- 26) Anderson, H. C. : Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilane. *J. Cell Biol.* 41 : 59-72, 1969.