

鶏胚頭頂骨器官培養におけるレチノイン酸および 活性型ビタミンD₃の骨形成に及ぼす影響

鈴木 洋之介

口腔生化学講座

(指導：太田 稔教授)

[受付：1991年10月28日]

[受理：1991年11月19日]

Abstract : The effects of retinoic acid (RA) and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) on bone formation were studied using calvarias from 18-day-old chick embryos cultured in a serum-free medium. In a preliminary experiment for determining the DNA and calcium and the DNA synthesis in a cultured half-calvaria and a devitalized calvaria, time-dependent increases in DNA and calcium contents were observed in the cultured bones, indicating that the culture system could be used for the investigation of modulating factors associated bone metabolism.

The addition of RA or 1,25(OH)₂D₃ to the media increased the synthesis of DNA, but decreased the synthesis of collagen in the cultured calvaria. The simultaneous addition of RA and 1,25(OH)₂D₃ to the media exerted a synergistic inhibitory effect against the synthesis of collagen. No significant difference in the uptake of ³H-tetracycline into the bone was observed by the addition of RA or 1,25(OH)₂D₃, suggesting that neither RA nor 1,25(OH)₂D₃ was effective for calcification in this culture condition.

key words : 1,25-dihydroxyvitamin D₃, retinoic acid, bone formation, organ culture, tetracycline.

緒 言

骨組織は、物理的な力に対応し同時に体液中のカルシウム濃度の調節に重要な役割を演じている。歯科領域においても骨は歯の支持組織として極めて重要な役割を演じており、その代謝機構の解明が望まれる。そのため、まず骨に及ぼす生理活性因子の影響をスクリーニングする系が必要となるが、*in vivo*の系では、内因性因子が混在し、複雑に相互作用をしているので、特定の因子の効果を判定するのは容易ではない。それ故、骨代謝に及ぼす調節因子の作用の解明に、骨に由来する細胞^{1~3)}あるいは骨組織^{4,5)}の培養系を用いた研究が行われている。

これらのうち、株化した骨芽細胞系は標的細胞が単一の系なので、投与した因子の生理活性の検討や作用機序の解明に有利である。しかしながら、骨組織では骨形成と骨吸収が互いに共役して進行するため、研究材料としては破骨細胞と骨芽細胞が共存するバイオアッセイ系が適すると思われる。骨の器官培養では、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が維持されており、また骨の細胞構成が生体に近いため、骨代謝調節因子の真の効果を検討するのに優れた実験系と考えられる。

近年、Gronowiczら⁶⁾により無血清で*in vivo*のように石灰化するラット胎仔頭頂骨の器官培養法が開発された。この実験系は骨形成

Effects of retinoic acid and 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ on bone formation in chick embryonic bone *in vitro*.

Yonosuke Suzuki

(Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry, 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 16 : 84 - 94, 1991

のバイオアッセイ系として極めて優れた方法であるが、実験に必要な数のラット胎子を確保するのに難がある。そこで、本研究でははじめに入手の容易な鶏胚に彼らの方法の応用を試みた。

一方、ビタミン A 誘導体であるレチノイン酸 (RA) は、鶏胚肢芽の重複肢を誘導する形態形成因子⁷⁾としての作用が注目され、特に発生分化において重要な役割を担っていると考えられている。また、RA の骨に及ぼす効果も調べられており、器官培養した骨の破骨細胞を活性化し骨吸収を促進すること^{4, 8, 9)}、骨の DNA への [³H] thymidine の取り込みを促進し、コラーゲン活性を上昇させコラゲナーゼインヒビターの産生を低下させること¹²⁾などが報告されている。興味深いことに、これらの効果は RA と同じく脂溶性ビタミンであるビタミン D₃ の活性型の 1, 25 (OH)₂D₃ の効果とよく一致している。さらに、RA が 1, 25 (OH)₂D₃ のレセプターを増加させることが報告されたことから¹³⁻¹⁵⁾、両者の骨代謝に及ぼす相互作用が注目される。しかしながら、未だ明確な研究報告は少なく検討が待たれている。そこで、本研究では、鶏胚頭頂骨の無血清培養を用い、骨形成に及ぼす RA および 1, 25 (OH)₂D₃ の作用を検討した。

材料ならびに方法

1. 培養液および試薬

a) 培養液: Fitton-Jackson Modification BGJb Medium (Sigma 社) に ITS⁺ (insulin 6.25 μg/ml, transferrin 6.25 μg/ml, selenous acid 6.25 ng/ml, bovine serum albumin 1.25 mg/ml, linoleic acid 5.35 μg/ml, Collaborative 社) と Kanamycin sulfate (和光純薬) 60 mg/l を添加した無血清培地を用いた (以下 F-J BGJb-ITS⁺)。培養液の交換は 24 時間ごとに行い、用時調製した ascorbic acid を最終濃度が 100 μg/ml になるよう添加した。

b) 試薬: L (+) - ascorbic acid は関東化学社より、[2, 3-³H] proline (25Ci/mmol),

[methyl³H] thymidine (6.7 Ci/mmol), [7-³H (N)] tetracycline (0.5-1Ci/mmol) は New England Nuclear 社より, diphenylamine は和光純薬より, collagenase form III は Advance Biofactures Corporation より, sodium azide は半井化学より, retinoic acid Type XX は Sigma 社より購入した。1, 25 (OH)₂D₃ は昭和大学口腔生化学須田立雄教授より提供頂いた。

2. 培養および実験方法

a) 培養方法: Gronowicz ら⁶⁾がラット胎仔頭頂骨を用いて行った無血清培養を鶏胚頭頂骨に応用した。はじめに、この培養系における骨の成長を評価するため、孵卵 18 日目の鶏胚頭頂骨を無菌的に左右摘出し、付着する軟組織および骨膜を完全に除去した後、一方の骨片を 12 well の培養プレートに移し、上記の F-J BGJb-ITS⁺ 培地を 0.5 ml ずつ添加して、37°C, 5% CO₂ - 95% air 気相下でそれぞれ 24, 48, 72, 96, 時間振盪培養し実験群とした。もう片方の骨片は、0.1% sodium azide を加え細胞を不活化し (dead bone), 対照群として用いた。それぞれの Ca 含有量, DNA 含有量および DNA 合成量を測定し、これらの経時的变化を対照群と比較した。

一方、RA および 1, 25 (OH)₂D₃ の骨形成に及ぼす影響を検討するため、同一個体から得た左右の頭頂骨骨片をそれぞれ被検試料添加実験群、非添加対照群として pair-mate culture を行った。前述のごとく培養操作を行い、24 時間前培養後、培養液を交換し、実験群には、エタノールで希釈した RA および 1, 25 (OH)₂D₃ をそれぞれ 5 μl 添加し (最終濃度, RA; 1 × 10⁻⁹ ~ 10⁻⁵ M, 1, 25 (OH)₂D₃; 1 × 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁷ M), 対照群にはエタノールを 5 μl 添加した。なお、培養液中のエタノール濃度は、いずれの場合も 0.1% 以下とした。上記のごとく pair-mate culture した頭頂骨の実験群および対照群についてそれぞれの DNA 合成, コラーゲン合成および石灰化について測定し比較検討した。

b) 実験方法:

1) 乾燥重量: 培養終了後, 骨をアセトン-エーテルで脱水, 風乾した後, 微量天秤 (Sartorius 社 2024 MP) にて3回測定し, その平均値を乾燥重量とした。

2) Ca含有量: 培養終了後, 頭頂骨を5% tri-chloroacetic acid (以下 TCA) で2時間ずつ2回脱灰し, その脱灰液を混合した後, 10倍希釈した。希釈した脱灰液を ortho-cresolphthalein complexone (OCPC) 液にて発色させ, 550 nm の吸光度で Ca 含有量を測定した。

3) DNA含有量: 培養終了後, 骨を熱酸抽出 (5% HClO₄) し, Burton 法に準じて抽出液 100 μl に diphenylamine 試薬を加え, 30°C で 16 - 20 時間呈色反応させ, 600 nm の吸光度で測定した¹⁶⁾。

4) DNA合成: 培養終了2時間前に [³H] thymidine (2.5 μCi/ml) を培養液に添加し, 培養終了後骨片を5% TCA で洗浄して遊離の [³H] thymidine を除去した後, アセトンで3回, エーテルで2回洗浄・脱水して風乾後, 乾燥重量を秤量した。この試料に 0.2 N NaOH を 0.5 ml 加え, Handy micro homogenizer (Phycotron 日音医理科) を用いてホモゲナイズし, このホモジネートをミニバイアルに移し, ACS-II シンチレーター (New England Nuclear 社製) を 5 ml 加え, 放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-903) にて測定した。DNA 合成量は, 乾燥重量当りの冷酸不溶性画分への [³H] thymidine の取り込み量 (dpm/μg) で表した。

5) コラーゲン合成: 培養液に [³H] proline (5 μCi/ml) を添加し, 2時間標識を行ない, コラゲナーゼ可溶性蛋白ならびに非コラーゲン性蛋白への取り込みを Peterkofsky と Diegelman¹⁷⁾ の方法で測定した。すなわち, 培養終了後骨片を5% TCA で洗浄し, アセトンおよびエーテルで洗浄, 風乾後, 乾燥重量を秤量した。ついで, この脱灰有機基質に蒸留水を 200 μl 加えホモゲナイズし, これに 1 M Hepes (pH 7.2) を 100 μl 添加し, 十分に混合

した。得られた試料を等量に分け, 一方をコラゲナーゼ処理群, 他方を対照群とした。コラゲナーゼ処理群には, コラゲナーゼ混合液 (25 mM CaCl₂ 溶液, 62.5 mM N-ethylmaleimide 溶液, collagenase form III 2000 units/ml) を 40 μl 加え, よく攪拌し, 90 分間, 37°C で消化処理した。酸素処理後冷却し, 各々に 0.5% tannic acid - 10% TCA を加え攪拌後, 4°C 下で 10,000 rpm にて遠心分離し, その上清に回収される放射活性を測定した。対照群には, 対照用混合液 (25 mM CaCl₂ 溶液, 62.5 mM N-ethylmaleimide 溶液, 5 mM CaCl₂ / Tris-HCl buffer pH 7.4) を 40 μl 添加し, コラゲナーゼ処理群と同様の操作を行った。コラゲナーゼ処理群の放射活性値 (dpm) と対照群の放射活性値の差をコラゲナーゼ可溶性画分 collagenase digestible protein (CDP) とした。さらに, 上記のコラゲナーゼ処理群の残りの沈澱に 0.5 ml の 0.5% sodium lauryl sulfate - 5 mM dithiothreitol 溶液 (SDS-DTT 溶液) を加えて攪拌し, 沸騰水中で 5 分間加熱して可溶化後, その放射活性を測定して, 不溶性画分 non-collagen protein (NCP) を得た。なお, CDP 量はコラーゲンに取り込まれた放射活性であるのでコラーゲン合成能を表わすものと考えた。またコラーゲン合成率 (PCS: Percent Collagen Synthesis) は, 乾燥重量あたりの CDP および NCP の放射活性 (dpm/μg) から次式により算定した。

$$\frac{\text{CDP}}{\text{CDP} + 5.4 \times \text{NCP}} \times 100 = \text{PCS}$$

6) 骨石灰化の測定: Tetracycline は生体に投与すると骨では石灰化が進行する部位に選択的に沈着し, 紫外線をあてると蛍光像として観察できることから, 骨に石灰化の組織学的動態計測のための標識剤として用いられている^{18,19)}。本研究ではこの tetracycline を培養骨の石灰化の定量に用いた。まず, 培養骨に沈着する tetracycline の局在を調べる目的で, 42 時間培養した骨に 12.5 μg/ml の tetracycline を添加し 6 時間 incubate した。一方, tetra-

cycline が biological な系を経ずに機械的に骨に沈着する可能性も考えられたので、凍結融解により細胞を不活化させた骨を培養骨と同じ条件で tetracycline 標識し対照とした。標識終了後、70% エタノールで固定し、Villanueva 染色を施した後、通法に従い樹脂包埋し非脱灰研磨標本を作成して蛍光顕微鏡で観察した。次に tetracycline の沈着量を定量するため $[^3\text{H}]$ tetracycline $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ を培養液に添加し2時間標識した。標識後、骨片を Hanks で洗浄し、遊離の $[^3\text{H}]$ tetracycline を除き、骨片の乾燥重量を測定した。次いで、5% TCA 中で脱灰し、骨に沈着した $[^3\text{H}]$ tetracycline を可溶化した後、この脱灰液中の放射活性を測定した。

3. 統計学的処理

すべての統計学的処理は、Student's t test を用いた。

結 果

1. 無血清培養における鶏胚頭頂骨の成長の評価

培養した頭頂骨の Ca 含有量は経時的に増加し、培養 96 時間で対照群と比較して約 35% (% of control) の上昇が見られた。また、DNA 含有量も Ca 含有量同様、経時的に有意な増加が認められた (Fig. 1)。DNA 合成は、培養 24 時間目から $[^3\text{H}]$ thymidine の高い取り込みが見られ、培養の経過と共にさらに取り込みの増加が認められた (Fig. 2)。また、培養 96 時間の取り込みは 24 時間に比べ約 90% の増加を示した。

以上の結果、本培養法において DNA 含有量および Ca 含有量はともに有意に増加し、さらに DNA 合成量も経時的に増加したことから、本培養系では長時間にわたり骨に高い生物活性が維持されていることが明かとなった。従って、本培養法は骨形成のバイオアッセイ系として有効であることが示された。

2. RA ならびに $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の DNA 合成に及ぼす影響

無血清培地で 24 ~ 96 時間培養した際の RA

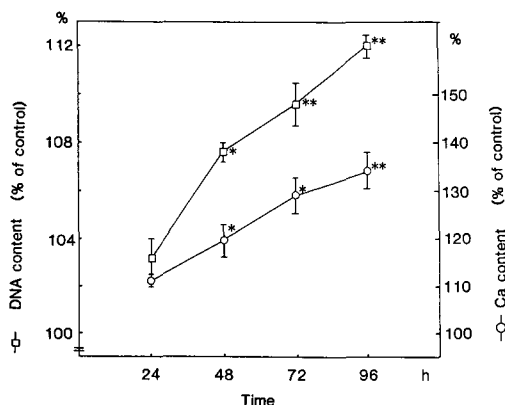


Fig. 1 Time course of the contents of DNA and Ca in cultured chick embryonic calvaria. The bone was cultured as described in Materials and Methods. The values represent the means \pm SD in 9 ~ 12 calvariae. Statistical analysis was performed by student's t test. Significantly different from control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

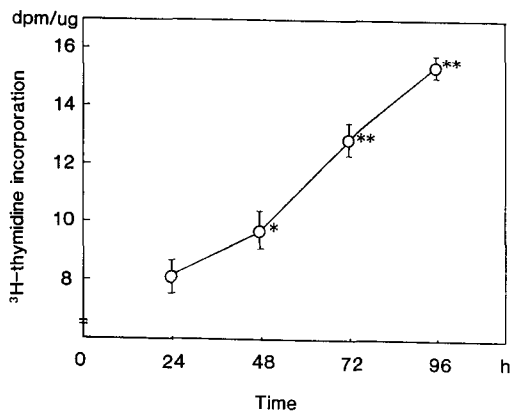


Fig. 2 Time course of the level of DNA synthesis in cultured chick embryonic calvaria. The bone was cultured as described in Materials and Methods. The values represent the means \pm SD in 9 calvariae. Statistical analysis was performed by student's t test. Significantly different from control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

および $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の DNA 合成能に及ぼす効果を $[^3\text{H}]$ thymidine の骨への取り込みを

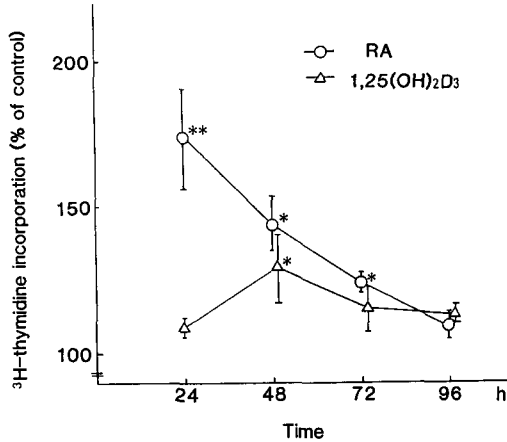


Fig. 3 Time course of the effects of RA (10^{-8} M) and 1,25 (OH)₂D₃ (10^{-8} M) on incorporation of [³H] thymidine into cultured chick embryonic calvaria. The values indicate the means \pm SD in 12 calvarial bones. Statistical analysis was performed by student's t test. Significantly different from control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

指標として調べた。 [³H] thymidine の骨への取り込みは、RA (10^{-8} M) 添加後、24 時間目に最大値を示し、対照群と比較して約 70% の増加が認められた。その後、経時的にその取り込みは減少した。一方、1, 25 (OH)₂D₃ (10^{-8} M) 添加では、48 時間目に [³H] thymidine の骨への取り込みは最大値を示し、RA 同様その後減少した。RA および 1, 25 (OH)₂D₃ は、ともに添加 96 時間後にほぼ対照群のレベルと同等となった (Fig. 3)。また、RA は $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M で、1, 25 (OH)₂D₃ は $10^{-10} \sim 10^{-7}$ M でともに濃度依存的に DNA 合成を促進した (Fig. 4 a, b)。

3. RA ならびに 1, 25 (OH)₂D₃ のコラーゲン合成に及ぼす影響

骨基質であるコラーゲンの合成に及ぼす RA と 1, 25 (OH)₂D₃ の影響をコラーゲンナーゼ可溶性タンパクに取り込まれた [³H] proline の放射活性を指標として調べた。コラーゲン合成

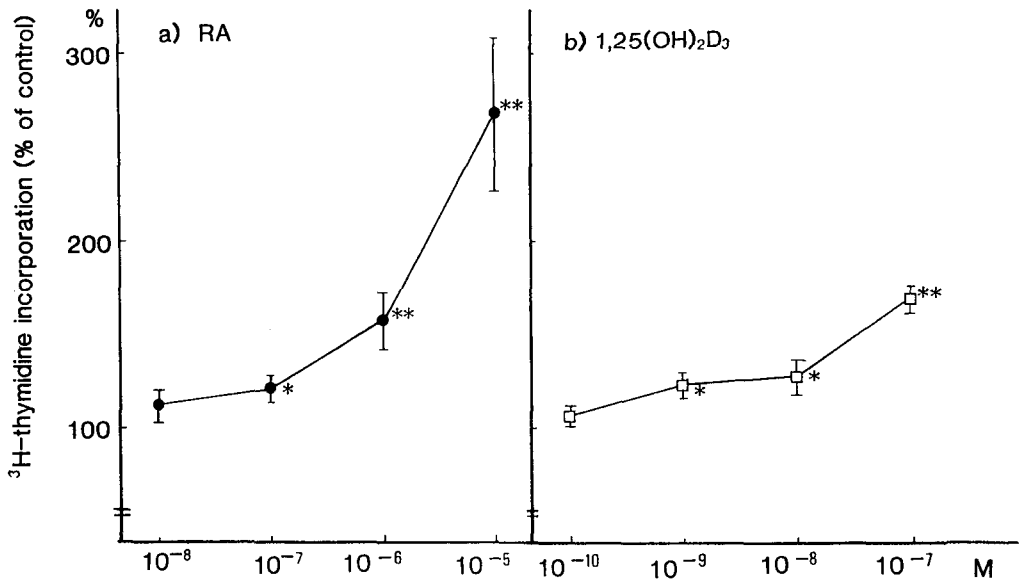


Fig. 4 Effects of RA and 1,25(OH)₂D₃ on incorporation of [³H] thymidine into chick embryonic calvaria after 48 h of culture. Half-calvariae cultured for 48 h were pulsed with [³H] thymidine during the last 2 h. The values indicate the means \pm SD in 12 calvarial bones. Statistical analysis was performed by student's t test. Significantly different from control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table 1 Effects of retinoic acid on incorporation of [³H] proline into CDP and NCP in 18-day-old chick embryonic calvaria cultured for 48 h in F-J BGJb-ITS⁺ medium.

RA	CDP (dpm/ μ g dry wt)	NCP	PCS (%)
control	12.4 \pm 2.1	14.9 \pm 1.5	13.5 \pm 2.2
10 ⁻⁹ M	11.2 \pm 1.0	13.6 \pm 1.1	13.2 \pm 0.6
10 ⁻⁸ M	10.2 \pm 1.7*	14.7 \pm 2.1	11.5 \pm 1.8*
10 ⁻⁷ M	7.5 \pm 1.6**	13.6 \pm 2.3	9.5 \pm 1.5**
10 ⁻⁶ M	6.6 \pm 0.6**	13.2 \pm 1.3	8.5 \pm 1.3**
10 ⁻⁵ M	7.4 \pm 1.3**	16.3 \pm 1.5	7.8 \pm 1.0**

Values are the means \pm SD in 6 ~ 9 half-calvaria cultured for 48 h and pulsed with [³H] proline for last 2h.

Significantly different from control, *p < 0.05.
**p < 0.01

量 (CDP) は, RA (10⁻⁹ ~ 10⁻⁶ M) によって濃度依存的に抑制された。RA 10⁻⁶ M で CDP は最も抑制され, 対照群の約 46% に低下した (Table.1)。また, 非コラーゲン性タンパク (NCP) は RA 添加により有意な変化を示さなかった。NCP に変化がなく CDP が特異的に抑制されたことから, コラーゲン合成率 (PCS), すなわち全合成タンパクに対するコラーゲン合成の比率は濃度依存的に低下した。

一方, 1, 25 (OH)₂D₃ も RA 同様コラーゲン合成には抑制的に働き, 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁷ M の濃度で CDP を有意に抑制した (Table .2)。また, 1, 25 (OH)₂D₃ は NCP に対して高濃度 (10⁻⁸ ~ 10⁻⁷ M) で, わずかに抑制傾向を示したが, RA 同様 PCS を濃度依存的に低下させた。従って, RA および 1, 25 (OH)₂D₃ が, コラーゲン合成を特異的に阻害することが明らかとなった。

さらに, RA (10⁻⁸ M) と 1, 25 (OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) を同時に添加することにより, それぞれの単独投与よりも PCS がさらに抑制された (Fig.5)。このことから, RA と 1, 25 (OH)₂D₃ の同時添加によりコラーゲン合成の抑制が增強されることが示された。

4. Tetracycline による培養骨の石灰化の評

Table 2 Effects of 1,25 (OH)₂D₃ on incorporation of [³H] proline into CDP and NCP in 18-day-old chick embryonic calvaria cultured for 48 h in F-J BGJb-ITS⁺ medium.

1,25 (OH) ₂ D ₃	CDP (dpm/ μ g dry wt)	NCP	PCS (%)
control	6.7 \pm 0.5	11.1 \pm 1.4	10.2 \pm 1.5
10 ⁻¹⁰ M	5.9 \pm 0.1*	13.0 \pm 2.1	8.0 \pm 1.8
10 ⁻⁹ M	2.9 \pm 0.9**	10.4 \pm 0.8	4.9 \pm 0.9**
10 ⁻⁸ M	2.6 \pm 0.8**	9.7 \pm 0.7	4.6 \pm 1.0**
10 ⁻⁷ M	2.0 \pm 0.1**	8.5 \pm 0.7*	4.1 \pm 0.4**

Values are the means \pm SD in 6 ~ 9 half-calvaria cultured for 48 h and pulsed with [³H] proline for last 2h.

Significantly different from control, *p < 0.05.
**p < 0.01

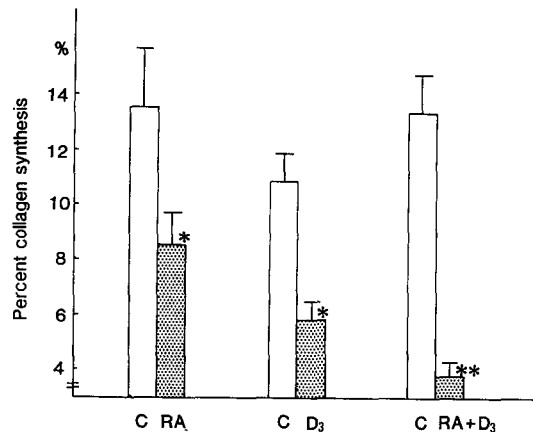


Fig. 5 Effects of RA(10⁻⁸ M) and 1, 25 (OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) on the collagen synthesis in chick embryonic calvaria cultured for 48 h.

The bone was cultured as described in Materials and Methods. Data represent the means \pm SD in 6 calvarial bones.

Significantly different from control,
*P < 0.05
**P < 0.01

価について (RA と 1, 25 (OH)₂D₃ の石灰化に及ぼす影響)

本研究で培養骨の tetracycline の蛍光は類骨の石灰化部位と思われる骨梁表面に局限することが観察された (Fig. 6 a)。また凍結融解により細胞を不活化させた骨では蛍光像は認めら

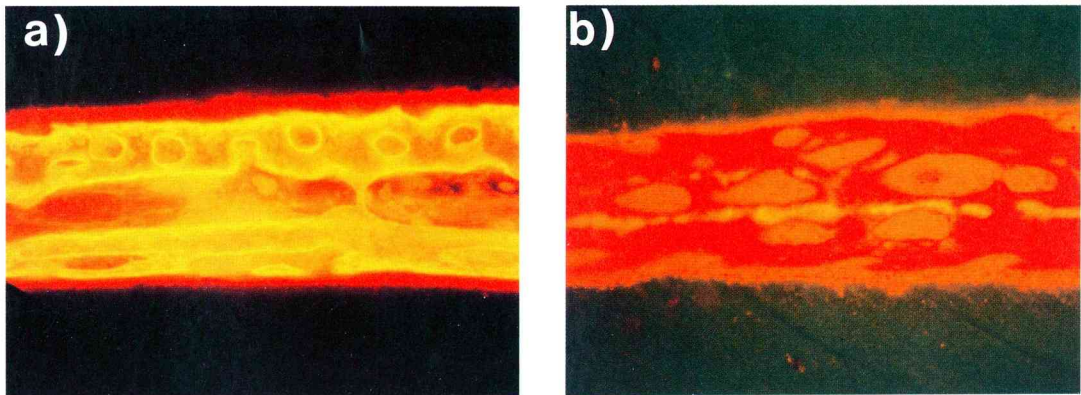


Fig. 6 Fluorescent microscopies of tetracycline treated calvaria. Calvarial bone from 18-day-old chick embryo was labeled with 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of tetracycline for 2 h. a) Fluorescence of tetracycline was observed on the trabecular surface. b) Pevitalized bone was less labeled. ($\times 400$)

れなかった (Fig. 6 b)。このことから tetracycline の沈着は biological な石灰沈着に伴うことが示され、また tetracycline により本培養法でも石灰化を評価できることが明らかとなった。さらに、 $[^3\text{H}]$ tetracycline 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の濃度で標識時間に伴う取り込み量の経時的变化を調べたところ、6 時間まで取り込みは直線的に増加し (Fig. 7)、この範囲で定量的に取り扱えることが示されたので、標識時間を 2 時間とした。そこで次に、 $[^3\text{H}]$ tetracycline の骨への取り込みを指標として石灰化に及ぼす RA

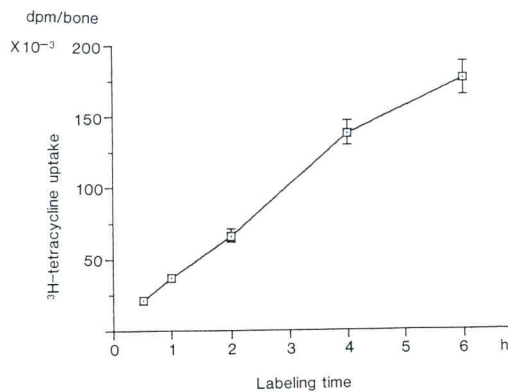


Fig. 7 $[^3\text{H}]$ Tetracycline uptake into chick embryonic calvarial bone 1 to 6 h. The bone was labeled with 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ $[^3\text{H}]$ tetracycline for indicated periods in 48 h of culture.

および 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ の影響を調べた。

RA (10^{-7} M) 添加後の $[^3\text{H}]$ tetracycline の取り込みは、24, 48 および 72 時間目とも対照群と比較して有意な変化は認められず、また 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ (10^{-8} M) についても同様の結

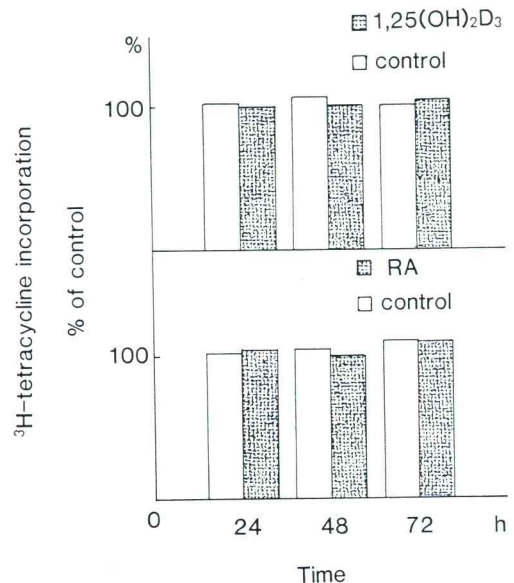


Fig. 8 Effects of RA(10^{-7} M) and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-8} M) on uptake of $[^3\text{H}]$ tetracycline into chick embryonic calvaria culture. The bone was cultured as described in Materials and Methods. Not significantly different from control value.

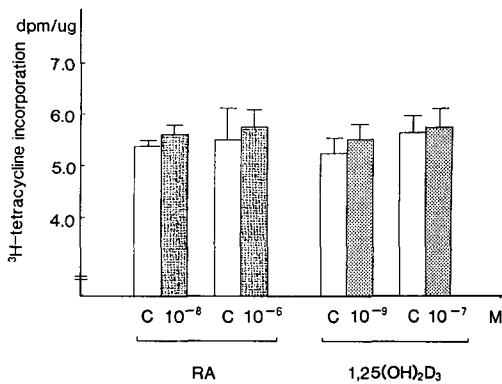


Fig. 9 Effects of RA (10^{-8} , 10^{-6} M) and 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ (10^{-9} , 10^{-7} M) on uptake [3 H] tetracycline into chick embryonic calvaria cultured for 72 h. The bone was cultured as described in Materials and Methods. The data represent the means \pm SD in 6 calvarial bones. Not significantly different from control value.

果であった (Fig. 8)。さらに、RA (10^{-8} , 10^{-6} M) および 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ (10^{-9} , 10^{-7} M) を添加し、培養72時間目における [3 H] tetracycline の取り込みを調べたが、それぞれの対照群と比較し変化は認められなかった (Fig. 9)。従って、RA および 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ は、 [3 H] tetracycline の取り込みに有意な差を示さず、石灰化には影響を及ぼさないものと思われた。

考 察

1) 培養法について

一般に骨器官培養の材料としては、齧歯類であるラットやマウスの胎子を用いる系と鶏胚骨を用いる系があるが、ヒトの骨に対する生理活性のスクリーニングを目的とした場合は、同じ哺乳類である齧歯類が適する。しかし、一度に同じ日齢のラットやマウスを必要数確保するには難がある。これに比べ、骨器官培養に従来より広く用いられている鶏胚は²⁰⁾、安価で大量に購入でき、37°C で孵卵を開始すると同時に発生が始り、研究者が求める日時に、求める個数が

得られるので実験計画がたて易い利点がある。

一方、無血清培養は、未知の成分を含んでいる血清のかわりに、化学的組成が明確な完全合成培地を用いるので、目的とする生理活性物質の真の効果を検討するのに有用である。本研究では、鶏胚頭頂骨の器官培養を行ったが培地として血清のかわりに ITS⁺ を添加した chemically-defined medium を用い、DNA 含有量、Ca 含有量ならびに DNA 合成量の経時変化を観察した。その結果、鶏胚頭頂骨の DNA 含有量の経時的な増加が観察され、骨の盛んな細胞増殖が示唆された。Gronowicz ら⁶⁾ はラット胎仔頭頂骨の無血清培養における生理的な石灰化を組織学的に示したが、本研究では鶏胚頭頂骨中の Ca 含有量が培養と共に増加することを定量的に示した。この Ca 含有量の増加は 0.1% sodium azide で細胞を不活化させた群では認められなかったことから、細胞による biological な Ca の沈着のあることが示された。これらのことから、無血清培地を用いた本培養法において、鶏胚頭頂骨はその生物活性を比較的長時間維持し、種々の骨代謝調節因子の作用を定量的に検討できる実験系として有用なことが示された。この培養法を用いて骨組織の細胞の増殖、基質タンパク合成および石灰化の各面から、RA および 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ の骨形成に及ぼす作用について検討した。

2) DNA 合成、コラーゲン合成について

RA および 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ は、一般に 10^{-8} M 付近で効果が得られるとされているので、この濃度で DNA 合成に対する経時変化を調べたが、RA では最大効果が24時間目に現われたのに対し、1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ では48時間目に最大効果が認められた (Fig. 3)。さらに RA は、 10^{-8} ~ 10^{-5} M において濃度依存的に DNA 合成を促進した (Fig. 4 a)。この結果は、鶏胚骨器官培養を用いた Dickson と Walls¹⁰⁾ の報告と一致する。一方、1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ も 10^{-10} ~ 10^{-7} M で DNA 合成を濃度依存的に促進した (Fig. 4 b)。この結果は 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ が MC 3T3-E1細胞の増殖を促進させるとの Kurihara

らの報告²¹⁾とも一致する。これらの報告^{10, 20)}や本研究の結果はRA および 1, 25 (OH)₂D₃ が骨組織の細胞数の増殖を促進することを示している。

コラーゲン合成についてRA および 1, 25 (OH)₂D₃ は、骨組織のコラーゲン合成をいずれも濃度依存的に抑制し、NCP にはほとんど影響を与えなかった。このことは、Dickson と Walls¹⁰⁾、Raisz ら²⁰⁾ や Harrison ら²³⁾ が行った器官培養の結果と一致する。このコラーゲン合成量の減少は、DNA 合成が促進され、さらにNCP の合成は抑制されていないことから、RA および 1, 25 (OH)₂D₃ の細胞毒性によるものとは考えられない。従って、RA や 1, 25 (OH)₂D₃ は骨基質コラーゲンの産生を特異的に阻害するものと考えられる。また、Harrison らによると 1, 25 (OH)₂D₃ により ROS 17/2.8 cell の Type I コラーゲンの合成が減少すると報告²⁴⁾していることから、培養骨でもRA, 1, 25 (OH)₂D₃ はともに骨基質のコラーゲンの合成を抑制すると考えられる。

さらに、RA (10⁻⁸ M) と 1, 25 (OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) を同時添加してコラーゲン合成について調べたところ、さらに強いコラーゲン合成の抑制を示した (Fig. 5)。RA および 1, 25 (OH)₂D₃ は、いずれも核におけるレセプターを介してその作用を発揮すること^{25, 26)}、またRA がビタミンD₃ のレセプターを増加させる¹³⁻¹⁵⁾ことから、この両者には特異的関係が存在する可能性が示唆された。

3) 石灰化について

紫外線により蛍光を発する tetracycline は、骨組織において石灰化の進行する部位にのみ沈着することから、従来より生体における骨形成の動態を組織学的に観察するためのラベリング剤として用いられてきた^{18, 19)}。このことを利用して本培養法において培養骨にその沈着が認められるかどうか非脱灰研磨標本を作製して蛍光顕微鏡で観察したところ、蛍光像は類骨の石灰部位と思われる骨梁表層に限局することが観察された (Fig. 6 a)。さらに、凍結融解により細

胞を不活化させた骨では蛍光像は認められなかったことから (Fig. 6 b)、培養骨で観察された蛍光像は、tetracycline が単に機械的に骨表面に拡散して沈着したのではなく、細胞の biological な石灰沈着であると考えられる。従って、本培養法では培養時間とともにCa含有量が増加することから (Fig. 1)、tetracycline を用いて石灰化量の変動を生化学的に定量できる可能性が示された。また、従来の組織学的な石灰化像の形態計測は定量性に劣っていることから [³H] tetracycline の骨への取り込みを測定することにより定量性の向上を図った。

まず、培養液に添加する [³H] tetracycline の量について基礎的な検討を行った結果、データには示さなかったが、骨の [³H] tetracycline の取り込み能は極めて高く 0.5 μCi/ml の [³H] tetracycline で十分な取り込みが認められた。この濃度で標識時間に伴う取り込み量の経時的变化を調べたところ、6時間まで取り込みは直線的に増加し、この範囲で定量的に取り扱えることが示された。このことにより、石灰化に及ぼすRA および 1, 25 (OH)₂D₃ の影響を調べたが、 [³H] tetracycline の取り込みに有意な差は見られなかった。

しかしながら、Matsumoto らは骨芽細胞株クローンであり *in vitro* で石灰化能を有する MC 3 T 3 - E 1 で 1, 25 (OH)₂D₃ の効果を検討し、1, 25 (OH)₂D₃ 添加により細胞増殖抑制とともに、単位DNAあたりの基質層へのCaの蓄積が容量依存的に増加したと報告²⁷⁾しており、器官培養による本研究の結果と異なっている。この相違は、株化された骨芽細胞は、単一の細胞種であり生理活性因子の作用が培養細胞全体で同時に発現されその効果が顕著に現われているのに対し、器官培養では骨組織を構成している細胞は多様であり、全細胞に対する 1, 25 (OH)₂D₃ の標的細胞の構成比が低いため著明な効果が認められなかったとも推測される。またもう一つの理由として、骨塩量は形成される類骨の量とそれの石灰化の程度で決定さ

れるが、培養開始前に生体で形成されつつある類骨にも [^3H] tetracycline は取り込まれ、これが大きなバックグランドとなって、培養後の RA や 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ の効果が検出できなかったということも考えられる。しかしながら、培養細胞で認められる石灰化は、骨組織で認められる生理的な石灰化とは言い難く、生体に近い形で培養を行う器官培養系がより生理的な石灰化を検討しうるものと考えるので、今後発生初期の骨原器を用いて骨形成の効果を検討することを計画している。

さらに骨形成に関与するとされるアルカリフォスファターゼ活性 (ALP 活性) に対する RA ならびに 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ の効果についても基礎的な実験を試みたが、今回培養に用いたステージの骨では培養開始時にすでに非常に高いレベルの ALP 活性が認められるため、*in vitro* で誘導される変化を捕らえることができなかった。このように発生の進んだ骨は生体に近い状態の組織であるという利点はあるが *in vitro* で設定した条件に基づき変化を検出しにくいという面もある。そこでノーザンブロットやドットブロットを行い、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンあるいは TGF- β などの骨形成に関与するとされるタンパクの *de novo* の発現と骨形成を関連づけて調べていくことが骨代謝の解明に重要であると考えている。

結 語

無血清培地による鶏胚頭頂骨器官培養系において、骨代謝に及ぼす RA および 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ の作用を検討し以下の成績を得た。

- 1) RA および 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ は [^3H] thymidine の取り込みを促進させた。
- 2) RA および 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ は、特異的にコラーゲンの産生を阻害することが示唆された。
- 3) RA と 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ を同時に添加することにより、コラーゲン合成の抑制は増強された。

4) RA および 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ は、本実験条件下において [^3H] tetracycline の骨への取り込みに対し有意な差異を示さなかった。

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口腔生化学講座、太田稔教授に謝意を表するとともに、本研究の遂行にあたり終始適切なる御指導いただきました永井雅純助手はじめ口腔生化学講座の皆様深く感謝の意を表します。また、1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ を提供くださいました昭和大学歯学部口腔生化学講座須田立雄教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、本研究に対し御助言を頂いた本学口腔解剖学第二講座、名和橙黄雄教授に深く感謝致します。本論文の要旨の一部は第 33 回歯科基礎医学会総会 (平成 3 年 10 月 8 日) において発表した。

文 献

- 1) Wong, G.L. and Cohn, D.V. : Separation of parathyroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature* 252 : 713-715, 1974.
- 2) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. cell Biol.* 96 : 191-198, 1983.
- 3) Bab, I., Ashton, B.A., Syftestad, G.T. and Owen, M.E. : Assessment of an in vivo diffusion chamber method as a quantitative assay for osteogenesis. *Calcif. Tissue Int.* 36 : 77-82, 1984.
- 4) Raisz, L.G. : Bone resorption in tissue culture. Factors influencing the response to parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 44 : 103-110, 1965.
- 5) Raisz, L.G., Trummel, C.L., Holick, M.F. and DeLuca, H.F. : 1, 25-dihydroxycholecalciferol : A potent stimulator of bone resorption in tissue culture. *Science* 175 : 768-769, 1972.
- 6) Gronowicz, G., F.N. Woodiel, M.B. McCarthy and L.G. Raisz. : In vitro mineralization of fetal rat parietal bones in defined serum-free medium. Effect of β -glycerolphosphate. *J. Bone Mineral Res.* 4 : 313-324, 1989.
- 7) Thaller, C. and Eichele, G. : Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327 : 625-628, 1987.
- 8) Oreffo, R.C.O., Teti, A., Triffitt, J.T., Francis, M.

- J.O., Carano, A. and Zallone, A.Z. :Effect of vitamin A on bone resorption : Evidence for direct stimulation of isolated chicken osteoclasts by retinol and retinoic acid. *J. Bone Mineral Res.* 3 : 203 - 210, 1988.
- 9) Scheven, B.A.A and Hamilton, N.J. :Retinoic acid and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ stimulate osteoclast formation by different mechanisms. *Bone* 11 : 53 - 59, 1990.
- 10) Dickson, I. and Walls, J. :Vitamin A and bone formation. Different response to retinol and retinoic acid of chick bone cells in organ culture. *Biochim. Biophys. Acts* 1013 : 254 - 258, 1989.
- 11) Dickson, I. and Walls, J. :Vitamin A and bone formation. *Biochem. J.* 226 : 789 - 795, 1985.
- 12) Sellers, A., Meikle, M.C. and Reynolds, J.J. : Collagenase and collagenase inhibitor levels following changes in bone resorption in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 31 : 35 - 43, 1980.
- 13) Petkovich, M.P., Heersche, N.M., Tincker, D.O. and Jones, G. :Retinoic acid stimulates 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ binding in rat osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* 259 : 8274 - 8280, 1984.
- 14) Lee, K., Petkovich, P.M. and Heersche, J.N.M. : The effects of sodium butyrate on the retinoic acid-induced changes in 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in tumorigenic and nontumorigenic bone derived cell lines. *Endocrinology* 122 : 2399 - 2406, 1988.
- 15) Petkovich, P.M., Heersche, J.N.M., Aubin, J.E., Grigoriadis, A.E. and Jones, G. :Retinoic acid-induced changes in 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ receptor levels in tumor and nontumor cells derived from rat bone. *J. Natl. Cancer Inst.* 78 : 265 - 270, 1987.
- 16) Burton, K. :A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62 : 315 - 323, 1956.
- 17) Peterkofsky, B. and Diegelmann, R. :Use of mixture proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* 10 : 988 - 994, 1971.
- 18) Kaitila, I. : Effect of tetracycline on mineralization in cycloheximide-treated bone in vitro. *Calcif. Tissue Res.* 7 : 46- 57, 1971.
- 19) Milch, R.A., Rall, D.P. and Tobie, J.E. : Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J. Bone Joint Surg.* 40-A : 897 - 910, 1958.
- 20) Endo, H., Kiyoki, M., Kawashima, K., Naruchi, T. and Hashimoto, Y. : Vitamin D₃ metabolites and PTH synergistically stimulate bone formation of chick embryonic femur in vitro. *Nature* 286 : 262- 264, 1980.
- 21) Kurihara, N., Ishizuka, S., Kiyoki, M., Haketa, Y. Ikeda, K. and Kumegawa, M. : Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblastic MC 3 T 3 -E 1 cells. *Endocrinology* 118, 940 - 947, 1986.
- 22) Raisz, L.G., Maina, D.M., Gworek, S.G., Dietrich, J.W. and Canalis, E.M. : Hormonal control of bone collagen synthesis in vitro : Inhibitory effect of 1-hydroxylated vitamin D metabolites. *Endocrinology* 102 : 731 - 735, 1978.
- 23) Harrison, J.R. and Nancy B. Clark. : Avian medullary bone in organ culture : Effects of vitamin D metabolites on collagen synthesis. *Calcif. Tissue Int.* 39 : 35 - 43, 1986.
- 24) Harrison, J.R., Petersen, D.N., Lichtler, A.C., Mador, A.T., Rowe, D.W. and Kream, B.E. : 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits transcription of type I collagen genes in the rat osteosarcoma cell line ROS 17/ 2.8. *Endocrinology* 125 : 327 - 333, 1989.
- 25) Manolagas, S.C. and Deftos, L.J. :Comparison of 1, 25-, 25-, and 24, 25-Hydroxylated vitamin D₃ binding in fetal rat calvariae and Osteogenic sarcoma cells. *Calcif. Tissue Int.* 33 : 655 - 661, 1981.
- 26) Noji, S., Yamaai, T., Koyama, E., Nohno, T. and Taniguchi, S. : Spatial and temporal expression pattern of retinoic acid receptor genes during mouse bone development. *FEBS Lett.* 257 : 93 - 96, 1989.
- 27) Matsumoto, T., Igarashi, C., Takeuchi, S., Harada, S., Kikuchi, T., Yamato, H. and Ogata, E. : Stimulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ of in vitro mineralization induced by osteoblast-like MC 3 T 3 -E 1 cells. *Bone* 12 : 27 - 32, 1991.