原 著

In vitro マクロファージによる骨吸収に関する 電顕的観察 (第1報)

高橋 常男 松本 圭 小野 理
高橋 和人 栗原 徳喜* 久米川 正好*

神奈川歯科大学口腔解剖学教室 (主任: 高橋和人)

* 城西歯科大学第1口腔解剖学教室 (主任: 久米川正好)

(受付: 昭和61年11月25日)

An electron microscopical observation on bone phagocytosis by macrophages *in vitro*

Tsuneo Takahashi, Kei Matsumoto, Osamu Ono and Kazuto Takahashi,
Yoshinori Kurihara* and Masayoshi Kumegawa*

Department of Oral Anatomy, Kanagawa Dental College,
82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa Japan

* The First Department of Oral Anatomy, Josai Dental University,
Sakado, Saitama 350-02 Japan

(Director: Prof. Masayoshi Kumegawa)

[Accepted for publication: November 25, 1986]

Key words: Macrophage / phagocytosis / bone / culture / electron microscopy

Abstract: The capacity of phagocytosis by mononuclear cells, especially that of the macrophage was investigated by electron microscope on cultured parietal bone fetal mice (ICR strain). By 5 days culture, some macrophages were found adjacent to the bone matrix and parts of the bone seemed to be encapsulated by cytoplasmic processes. The plasma membrane of the macrophages adjacent to the bone demonstrated coated pits. Some bone spicules derived from calcified bone matrix were found within the macrophages, while the feature indicating the phagocytosis of collagen fibrils was not observed. On the calcifying osteoid, macrophage seemed to selectively incorporate and digest cellular debris and/or bone spicules, but the collagen fibrils were not found to be incorporated into the macrophages. Results of the present study strongly indicated that under the culture system macrophages have the capacity of phagocytosing bone spicules, but the possibility of their being associated with the digestion of collagen fibrils is not found

緒 言

組織学的レベルでの骨吸収は骨細胞—骨芽細胞
がその主役をなすとする骨細胞性骨吸収 (osteocytic osteolysis)¹⁾ と破骨細胞がその主役を演ず

るとする破骨細胞性骨吸収 (osteoclastic osteolysis)¹⁾ とに大別できる。前者についての現在の知見では、骨細胞による骨吸収は骨細胞周囲のきわめて小さな範囲で、単にカルシウム代謝のコントロールのみであろうと考えられている。しかし、最近この骨細胞の役割について疑問視する結果も出されている³⁾。一方、後者では破骨細胞は骨を溶

解し、骨基質成分のうち骨塩を胞体内にとり込むことが既知の事実となっている。しかし、その他の有機性基質である非コラーゲタンパク、又はコラーゲンがどの細胞によって吸収、消化されているかについては幾多の報告があるが、混沌としているのが現状である⁴⁻⁶⁾。

また最近では、死骨片とともに培養したヒト単球は骨吸収作用を有していることが、Mundy ら⁷⁾によって報告されて以来、単球由来の組織マクロファージが歯周疾患のような慢性炎症ばかりでなく、骨吸収面の近くに恒常的にみられることから、直接又は間接的にマクロファージの骨改造への関与が示唆された⁸⁻¹⁰⁾。Heersche¹¹⁾ (1978) は骨吸収機構の仮説で、骨吸収は破骨細胞による骨塩溶解と、露出した骨基質付近の線維芽細胞または遊走性単球の貪食によって行なわれるのではないかと提案しているが、メカニズムの実態については未だ不明の部分が多い。そこで我々は、破骨細胞以外の細胞によって起る骨吸収を、マウス胎仔頭頂骨組織片培養法を用いて微細構造学的に検索してきた。その結果、石灰化骨基質表面および類骨中の骨芽細胞様細胞がコラーゲン細線維ばかりでなく、石灰化骨小片を貪食し、骨原性細胞の培養条件下での骨基質消化の可能性を示唆した¹²⁻¹⁴⁾。

今回は同培養組織片中にみられるマクロファージの骨吸収作用について報告する。

材料と方法

1. 実験材料

培養材料は ICR 系妊娠マウスより摘出した胎仔頭蓋冠を用いた。無菌的に取り出した頭蓋冠から、内外骨膜などの軟組織を除去し、1.5×1.5mm 角の頭頂骨組織片とした。

2. 培養方法

数個の頭頂骨組織片を35mm のプラスチック・ディッシュ (Falcon) に植え込んだ。骨片の付着を確認した後、10%牛胎仔血清 (Flow Lab.) を添加した α -MEM (Flow Lab.) 2ml を加え、5%炭酸ガスふ卵器 (37°C) 中で培養した。培養液は2日毎に交換し、5-10日間培養後、形態観察用試料とした。

3. 形態観察

a. 光顕

胎生10-20日の頭蓋冠および培養5-10日目の各頭頂骨組織片を10%緩衝ホルマリン固定後、脱水、一部は2%L-アスコルビン酸 (0.9% NaCl)¹⁵⁾にて脱灰後、パラフィン包埋、H・E染色又はVon Kossa染色を行なった。

b. 電顕

培養組織片は、2.5% glutaraldehyde (0.1M cacodylate buffer pH 7.3) で4°C、90分間固定し、0.08M cacodylate buffer (0.18M sucrose を含む、pH 7.3) で十分洗浄し、1% OsO₄ (上記と同じ buffer 使用、350mOsm) で室温、3時間の後固定を行なった。試料の一部は後固定液に最終濃度1.5%または0.5%となるようにフェロシアン化カリウムまたはルテニウムレッドを加え、同様に固定を行なった。エタノール系列による脱水後、2%酢酸ウラン (無水エタノール) によるブロック染色、スパー又は Quetol 812 (日新) で包埋を行なった。超薄切片は LKB 8800型ウルトラミクロトームにより、ダイヤモンドナイフにて作製、ウラン・鉛の二重染色後、JEOL 100B型透過型電子顕微鏡にて鏡検した。1 μ m エポソ厚切り切片は塩基性フクシン・メチレンブルー二重染色¹⁶⁾、又はトルイジンブルー単染色を施し観察部位の選定に用いた。

結 果

培養12時間後、骨片から細胞の遊出が始まった。遊出した細胞のアルカリフォスファターゼ活性は陽性であった。培養10日後も変性した細胞は認められず、辺縁には骨様および類骨様組織の新生が認められた¹²⁾。組織片中には吸収窩がみられ、破骨細胞と思われる多核の大型細胞もまれに認められた (図1)。

石灰化した骨の周囲には二種類の細胞が認められた (写真2)。その一つは外形に丸味があり、不規則な外形の核をもった細胞で、ミトコンドリア数は少なく、r-ERのあまり発達していない、空胞、水解小体、脂肪滴などがみられるマクロファージと考えられる細胞群である。他の一つは細胞の外形が紡錓形から卵円形を呈し、概して前者より鋭

Fig. 1 A diagram showing newly formed calcified bone matrix (B) and a number of mononuclear cells surrounding the bone matrix. arrow, macrophage; double arrows, osteoclast

い細胞質突起と発達した γ -ER をもつ、グリコーゲン顆粒を豊富に有するもので、細胞周囲に基質小胞などもみられることがあることから、骨芽細胞様細胞と考えられるものである。

培養開始5日目頃になると、骨表面に付着したマクロファージは細胞質の一部が骨面に沿って延び（細胞質突起）、さらにそこから微絨毛様突起を出し、強い遊走能が示された。これらミトコンドリア数の少ないと思われるマクロファージの細胞膜の一部においては、骨表面の外形に沿っていくつかの coated pits が認められた（写真3）。骨表面はルテニウムレッド陽性物質の存在を示す、電子密度の高い線としてみえるが、特に形態的变化を示している様子はなかった。マクロファージは石灰化骨基質を完全に被包しているものから、遊離したと思われる骨小片を coat のない空胞により貪食し、細胞内に取り込んでいる所見がみられた（写真4、5）。取り込まれた骨小片はライソソームと融合、消化、分解をうけ、多数の粗な骨塩の集合体となっていた（写真6）。

一方、石灰化した骨基質に隣接した類骨又は一

部石灰化している類骨においてみられるマクロファージには強い貪食能がみられ、細胞内には細胞崩壊産物や石灰化した骨基質小片が多数みられた（写真7）。写真8は石灰化中の類骨にみられるマクロファージ様細胞の一部拡大である。コラーゲン細線維上に石灰化がみられ、対応するマクロファージの細胞膜に coated pits が形成されている。しかし、今まで検索した限りにおいて、コラーゲン細線維を単独で取り込んでいる所見は認められなかった。

考 察

今回の結果は培養骨組織片由来のマクロファージが骨成分を積極的に貪食、分解する所見から、マクロファージの直接的な骨吸収作用を明らかにしたものである。すなわち、生きた骨組織片内の既存のマクロファージが培養5日目頃から、石灰化基質を被包、貪食するほか、一部石灰化している類骨中での細胞崩壊産物や大小の石灰化基質小片の貪食を行うなど、マクロファージの貪食能が強く示唆された。基本的には、ヒト、ラットから

Fig. 2 An electron micrograph showing two kinds of mononuclear cells (MP and OB) adjacent to the calcified bone matrix (BONE). Osteoblast-like cells contain glycogen deposits (arrow heads) in the cytoplasm. $\times 15200$

Fig. 3 Higher magnification of a macrophage adjacent to the bone surface (BONE). Coated pits (arrow) are formed on the cell membrane in accordance with outline of the bone prominences. {OsO₄-RR} $\times 36000$

Fig. 4 Pseudopod-like projection of a macrophage extending along the bone surface. Bone matrices are being incorporated by way of smooth surface vacuoles. $\times 72000$

Fig. 5 A macrophage adjacent to the bone (BONE). There are many bone particle-containing vacuoles (*) and primary lysosomes (arrows). $\times 10800$

Fig. 6 There are many bone particle containing vacuoles (arrow heads) in the cytoplasm of macrophage adjacent to the bone. RB, residual body $\times 36000$

Fig. 7 Osteoblast-like cells (OB) and a macrophage (MP) in the osteoid (OS). No degradation of collagen fibrils is observed in the macrophage. Asterisks show calcified bone particles. $\times 10800$

Fig. 8 High magnification of amacrophage in the calcifying osteoid (OS). A cluster of collagen fibrils and bone crystals are seen in the coated pits (arrows). DB, dense body $\times 47000$

分離された血液単球や腹腔マクロファージが骨を吸収することを示した Kann ら¹⁷⁾ や Teitelbaum ら¹⁸⁾ の結果と一致するものである。

実際の食食過程として、骨基質に接するマクロファージの形質膜上に coated pits が形成されることは、骨との間になんらかの情報のやりとりがあって骨基質吸収が進行していくものと思われる¹⁹⁾ (receptor mediated endocytosis)。また、微絨毛様突起、又は細胞質突起に接する骨表面の外形に一致した細胞膜陥凹を介して、coat のない空胞によって食食、細胞内に取り込まれる場合とがあった (smooth surfaced endocytosis)。橋本²⁰⁾ は骨面と細胞間の微小環境において、マクロファージの産生する乳酸が骨表面を溶解していることを生化学的に明らかにしているが、本実験からは食食されるべく骨小片に明らかな形態学的特徴を見出すことは出来なかったが、なんらかの表面処理を受けていた可能性は否定できない。

今回観察された単核マクロファージが、1) 破

骨細胞前駆細胞になるべき系列にあるものなのか、2) 骨改造に関連して、*in vivo* でも骨基質の食食、吸収に関与するものなのか、又は単に3) 培養環境下において、異物処理的な意味でなんらかの識別機構により食食、処理していたものなのか、明らかにするためには今後さらに検索を進めねればならないと考えている。

一方、骨基質の有機性成分であるコラーゲン細線維がマクロファージによって消化、分解されるかどうかについては多くの報告があるにも拘らず統一見解は出ていない。一般にカラゲニン肉芽腫の吸収²¹⁾ や分娩後の子宮の退縮時²²⁾、また炎症や組織の修復時にもマクロファージによりコラーゲン細線維が消化されることがよく知られている²³⁾。これはマクロファージ内にコラゲナーゼの存在する事実からも確証されている²⁴⁾。しかし、骨改造部位でみられるマクロファージがコラーゲン細線維消化に関与するかどうかは研究者によって異なるようである。

Dorey と Bick²⁵⁾ はラット歯槽骨を用い、マク

ロファージに glycosaminoglycans 加水分解酵素の局在から、骨または類骨に由来する巨大分子の取り込みのあることを明らかにし、骨リモデリングへの関与のあることを指摘した。Bonucci²⁶⁾ は原発性副甲状腺機能亢進症をもつヒト腸骨稜からの生検材料で、骨基質に接して未発達の骨原性細胞とマクロファージの存在を指摘しているが、マクロファージには骨成分の貪食は認められなかったと述べている。Rifkin と Heijl¹⁰⁾ は猿の歯周疾患のモデル実験で、骨吸収部に線維芽細胞様細胞とマクロファージが豊富に存在することに注目し、前者の細胞にはコラーゲン細線維が認められたとしている。Tran Van ら²⁷⁾ はラットを用いた抜歯後の対合歯槽骨の骨改造部位で、単核性細胞群が破骨細胞の作用後にコラーゲン細線維の消化に関与しているかどうかについては否定的見解をとっている。

一方、*in vitro* では Rifkin ら²⁸⁾ は腹腔マクロファージが失活した長骨の石灰化組織を貪食、すう粗な無機塩とコラーゲン細線維に分解する所見から、マクロファージによる骨吸収の存在を指摘した。さらに彼は類骨中のマクロファージの空胞または多胞体内にコラーゲン細線維と一塊の骨塩の存在していたことを報告している²⁹⁾。Saotome ら³⁰⁾ はラット頭頂骨骨片を用いた副甲状腺ホルモン投与実験で、マクロファージはコラーゲン細線維、破骨細胞は骨塩を吸収すると推察している。

以上の結果は、*in vitro* でのみマクロファージによるコラーゲン細線維分解像がかなり明確に報告されているのがわかる。今回のマウス胎仔頭頂骨骨片培養の結果では、コラーゲン細線維の貪食像は、“いわゆるマクロファージ”ではほとんどみられず、細線維を取り込んでいたのは、多少に

拘らずグリコーゲン顆粒を有する骨芽細胞様細胞であった。この結果は、マクロファージがコラーゲン細線維を取り込むと推察した Rifkin, Saotome らと異なる所見となった。この矛盾を解明すべく、生理学的活性物質添加 (PTH, PGE₂, VitD₃ など) 後の同様の現象変化について、マクロファージそのものの分化段階を考慮に入れ、検索中である。

結 論

約 5～10日間培養後、マウス頭頂骨組織中のマクロファージの骨貪食作用について電顕的に検索し、次のような結論を得た。

1. 培養 5 日目頃よりマクロファージが石灰化骨基質に付着する所見が顕著になった。
2. 骨に近接すると、マクロファージの細胞膜の一部で、骨表面の外形に従って coated pits ならびに陥凹形成がみられ、エンドサイトーシスの存在が示唆された。
3. 培養日数とともに、骨に付着するマクロファージが増え、一部で骨の被包化、貪食像がみとめられた。
4. 細胞内には大小の石灰化した骨小片の貪食、消化像がみられるが、骨面より露出されたコラーゲン細線維単独の分解像はみられなかった。
5. 一部石灰化している類骨中のマクロファージは他の細胞の崩壊産物の貪食のほか、骨小片に強い貪食能を示していたが、コラーゲン細線維の貪食像は同様にみられなかった。

以上のことから、培養条件下においてマクロファージは骨と類骨吸収に深く関与していることが示唆された。

本論文の要旨の一部は、第 11 回国際電子顕微鏡学会 (1986 年 8 月、京都) において展示発表した。

抄録：マウス胎仔頭頂骨の組織片培養を用いて、単核性細胞とくにマクロファージの骨貪食能について電顕的に検索した。

培養 5 日目頃よりマクロファージは石灰化骨基質に付着し、一部で骨を被包化する像がみられた。骨に付着した細胞膜の一部は coated pits を形成、細胞内には石灰化骨基質由来の骨小片の貪食、その消化像がみられたが、コラーゲン細線維単独の貪食像はみられなかった。また石灰化中の類骨でも、マクロファージは細胞崩壊産物や骨小片を選択的に貪食、分解しているが、コラーゲン細線維単独の貪食像はみられなかった。

以上の結果から、組織片培養下においてマクロファージは骨小片に対する強い貪食能を示したが、コラーゲン細線維そのものの分解には直接関与していないことが示唆された。

文 献

- 1) Belanger, F.: Osteocytic osteolysis. *Calcif. Tissue Res.* **4**: 1-12, 1969.
- 2) Bonucci, E.: New knowledge on the origin, function and fate of osteoclasts. *Clin. Orthop.* **158**: 252-269, 1981.
- 3) Boyde, A.: Evidence against "osteocytic osteolysis". *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* **2**: 239-255, 1980.
- 4) Sasaki, T., Yamaguchi, A. Higashi, S. and Ychshiki, S.: Uptake of horseradish peroxidase by bone cells during endochondral bone development. *Cell Tissue Res.* **239**: 547-553, 1985.
- 5) Göthlin, G. and Ericsson, J. L. E.: Observations on the mode of uptake of thorium dioxide particles by osteoclasts in fracture callus. *Calcif. Tissue Res.* **10**: 216-222, 1972.
- 6) Takagi, M., Parmley, R. T., Toda, Y. and Denys, F. R.: Extracellular and intracellular digestion of complex carbohydrates by osteoclasts. *Lab. Invest.* **46**: 288-297, 1982.
- 7) Murdy, G. R., Altman, A. J., Gondek, M. D. and Bandelin, J. G.: Direct resorption of bone by human monocytes. *Science* **196**: 1109-1110, 1977.
- 8) Dominguez, J. H. and Mundy, G. R.: Monocytes mediated osteoclastic bone resorption by prostaglandin production. *Calcif. Tissue Int.* **31**: 29-34, 1980.
- 9) Mundy, G. R.: Monocyte-macrophage system and bone resorption. *Lab. Invest.* **49**: 119-121, 1983.
- 10) Rifkin, B. R. and Heijl, L.: The occurrence of mononuclear cells at sites of osteoclastic bone resorption in experimental periodontitis. *J. Periodontol.* **50**: 636-640, 1979.
- 11) Heersche, J. N. M.: Mechanism of osteoclastic bone resorption: A new hypothesis. *Calcif. Tissue Res.* **26**: 81-84, 1978.
- 12) 高橋常男, 蘇 正堯, 池内孝芳, 高橋和人, 久米川正好: マウス calvaria の *in vitro* における osteoblast-like Cell による collagen の貪食—電顕的研究—, *日歯周誌* **26**: 710-725, 1984.
- 13) Takahashi, T., So, S., Wang, J., Takahashi, K., Kurihara, N. and Kumegawa, M.: Phagocytosis of different matrix components by different cell types at bone-forming sites in cultured mouse calvariae. *Cell Tissue Res.* **245**: 9-17, 1986.
- 14) Takahashi, T., Kurihara, N., Takahashi K. and Kumegawa M.: An ultrastructural study on phagocytosis of bone tissues by osteoblasts cultured from fetal mouse calvaria. *Arch. Oral Biol.* **31**: 703-706, 1986.
- 15) Wakita, M., Kobayashi, M. and Shioi, T.: The decalcification method for electron microscopy using L-ascorbic acid. *Jpn. J. Oral Biol.* **25**: 691-699, 1983.
- 16) Sato, T. and Shamoto, M.: A simple rapid polychrome stain for epoxy-embedded tissue. *Stain Technol.* **48**: 223-227, 1973.
- 17) Kahn, A. J., Stewart, C. C., Teitelbaum, S. L.: Contact-mediated bone resorption by human monocyte *in vitro*. *Science* **199**: 988-990, 1978.
- 18) Teitelbaum, S. L., Stewart, C. C., and Kahn, A. J.: Rodent peritoneal macrophages as bone resorbing cells. *Calcif. Tissue Int.* **27**: 225-261, 1979.
- 19) Baron, R., Tran Van, P., and Vognery, A.: Local control of bone remodeling: A suggested role for receptor-mediated endocytosis. *Current Advances in skeletalgeneses*, 123, 1982 Amsterdam, Excerpta Medica
- 20) 橋本勝一, 木村明美, 奥村晴一, 宮澤忠蔵, 清水秋雄: マウスマクロファージによる骨組織溶解に関与する諸因子について. *歯基礎誌* **25**: 1050-1056, 1983.
- 21) Perez-Tamayo, R.: Collagen resorption in carrageenin granulomas. II Ultrastructure of collagen resorption. *Lab. Invest.* **22**: 142-159, 1970.
- 22) Parakkal, P. F.: Involvement of macrophages in collagen resorption. *J. Cell Biol.* **41**: 345-354, 1969.
- 23) Welsh, R. A. and Meyer, A. T.: Intracellular collagen fibers. In human mesenchymal tumors and inflammatory states. *Arch. Pathol.* **84**: 354-362, 1967.
- 24) Werb, Z. and Gordon, S.: Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* **142**: 346-360, 1975.
- 25) Dorey, C. K. and Bick, K. L.: Ultrastructural analysis of glycosaminoglycan hydrolysis in the periodontal ligament. *Calcif. Tissue Res.* **24**: 135-142, 1977.
- 26) Bonucci, E., Cascio, V. L., Adami, S., Cominacini, L., Galvanini, G. and Scurio, A.: The ultrastructure of bone matrix in human primary hyperparathyroidism. *Virchows Arch. [Pathol. Anat.]* **379**: 11-23, 1978.
- 27) Tran Van, P., Vignery, A. and Baron, R.: An electron-microscopic study of the bone-remodeling sequence in the rat. *Cell Tissue Res.* **225**: 283-292, 1982.
- 28) Rifkin, B. R., Baker, R. L. and Coleman, S. J.: An ultrastructural study of macrophage-mediated resorption of calcified tissue.

- Cell Tissue Res. **202** : 125-132, 1979.
- 29) Rifkin, B. R., Baker, R. L., Somerman, M. J., Pointon, S. E., Coleman, S. J. and Au, W. Y. W. : Osteoid resorption by mononuclear cells *in vitro*. Cell Tissue Res. **210** : 493-500, 1980.
- 30) Saitome, K. and Hoshino, T. and Harada, T. : Bone resorption under the influence of parathyroid hormone *in vitro*. J. Jpn. Orthop. Ass. **56** : 777-789, 1982.