培養関節軟骨細胞に対するステロイドの作用

右近良治・新名正由・菊池寿幸・下村 裕*

Steroid effects for cultured articular chondrocytes

Yoshiji Ukon・Masayuki Shinmei・Toshiyuki Kikuchi・Yutaka Shimomura*

ステロイド製剤は有効な抗炎症作用を有する反面、関節軟骨に障害を及ぼすことは、臨床面や動物実験などで広く知られている。今回われわれは、培養関節軟骨細胞を用いて、ステロイドの軟骨細胞の酸性ムコ多糖代謝に及ぼす直接作用と、滑膜細胞の影響下における作用につき検討した。

材料と方法

関節軟骨は生後4～8週の家兎の膝および肩より採取した。細切した軟骨片に EDTA, trypsin, collagenase を用いて細胞解離を型のごとく行い¹⁾、1ml 当たり 10^3 個の割合で播種し、10%仔ウシ胎児血清添加 HamF-12 溶液で10～14日間培養した初代培養細胞を実験に供した。

酸性ムコ多糖合成および分解は $^{35}\text{SO}_4$ の取り込みと、 $^{35}\text{SO}_4$ で prelabel した軟骨細胞のマトリックスからメザウム中への $^{35}\text{SO}_4$ の遊離を指標として検討した。

滑膜細胞を5%仔ウシ胎児血清添加 DMEM 溶液で培養した conditioned medium (SCM) を用いて、滑膜細胞の影響下における軟骨細胞に対するステロイドの作用を検討した。滑膜細胞培養は家兎の滑膜部分をミリポアフィルターに吸着させて採取し、まず plasma clot 法にて増殖させる。2～3週の後、増殖した細胞を dispase にて解離し、単層培養を行い、培養1週以後に SCM を採取した。その際、ステロイド存在下で培養した SCM も併せて採取した。

結果

(1) ステロイドの培養軟骨細胞に対する直接作用

hydrocortisone, dexamethasone, prednisolone を 10^{-4} ～ 10^{-8} M の濃度に添加すると、 $^{35}\text{SO}_4$ の取り込みはコントロールに比し70～90%となり、酸性ムコ多糖合成能の軽度低下が観察された。しかし、濃度依存性は認められなかった(図1)。一方、マトリックスからの $^{35}\text{SO}_4$ の遊離に対しては、ステロイド添加とコントロールとの差は認められなかった。

(2) SCM の培養軟骨細胞に対する作用

SCM の50%、100%添加により $^{35}\text{SO}_4$ の取り込みは明らかに低下し、酸性ムコ多糖合成はコントロールに比し有意に抑制された。また、遊離実験においては、 $^{35}\text{SO}_4$ のマトリックスからの遊離増加を認め、SCM 添加により酸性ムコ多糖の分解が促進されるのが観察された

図1 effects of steroid hormones on the synthesis of acidic glycosaminoglycans

図2 effect of SCM on the release of acidic glycosaminoglycans

(図2). 合成抑制、分解促進の両作用とも、SCM 100%のものが、SCM 50%に比べて顕著であった。

(3) 上記の SCM の作用に対するステロイドの影響

SCM 存在下の培養軟骨細胞に hydrocortisone (10^{-5} M)を添加した場合と、あらかじめ hydrocortisone (10^{-5} M)を添加して得られた SCM を培養軟骨細胞に加えた場合の酸性ムコ多糖代謝に及ぼす作用について検討した。 $^{35}\text{SO}_4$ の取り込み実験では SCM 単独の場合と差を認めず、酸性ムコ多糖合成能に対するステロイドの作用はみられなかった(図3)。しかし、遊離実験では、hydrocortisone 存在下に培養採取した SCM で、酸性ムコ多糖分解促進作用は抑制される傾向が認められた。一方、軟骨細胞培養系に SCM と hydrocortisone を同時に添加したものでは、かかる効果は観察されなかった(図4)。

* Department of Orthopedic Surgery, National Defence Medical College 防衛医科大学整形外科学教室

図3 effect of hydrocortisone on the synthesis of acidic glycosaminoglycans of SCM treated chondrocytes

考察

ステロイドが関節軟骨代謝に障害を及ぼすことは、Mankin²⁾, Behrens³⁾らが家兎において生化学的に証明して以来、培養系においても、Blondelon⁴⁾, Steinberg⁵⁾などの報告がみられる。われわれは、このステロイドの直接作用と、SCMの影響下における作用につき、培養軟骨細胞の酸性ムコ多糖代謝の面から検討した。その結果、ステロイドが培養軟骨細胞の酸性ムコ多糖合成を抑制するのを認めたが、その低下率は20%前後と低く、濃度依存性も $10^{-4} \sim 10^{-8} \text{M}$ の範囲では明らかではなかった。さらに、分解促進効果も認められていない。したがって、ステロイドの軟骨細胞に対する作用については、今後、抗炎症作用と細胞活性に対する障害作用の両面からのより詳細な検討が必要と考えられた。

また、滑膜細胞の培養メデウムには、軟骨細胞の酸性ムコ多糖合成を抑制し、分解を促進する作用が認められた。そして、このうち、ステロイドは滑膜細胞の有する分解促進作用を抑制することが明らかとなった。さらに、このステロイドの作用は、hydrocortisone添加により得られたSCMの場合にのみ認められたことから、滑膜細胞のレベルに働くものと推測された。軟骨破壊に関与する滑膜因子には、各種蛋白分解酵素、カタボリン⁶⁾などがあげられるが、今回の結果は、ステロイドがこれらの産生もしくは活性化機構に作用する可能性を示唆するものである。

ステロイドの関節腔内注入の功罪について、特に、その軟骨代謝への悪影響が強く主張されているが、合成系の影響をより少なくし、分解系に対する有効な抑制作用

図4 effect of hydrocortisone-treated SCM on the release of acidic glycosaminoglycans

を期待しうる薬剤として、ステロイドは、なお、その投与方法や濃度など十分検討される必要がある。

文献

- 1) 下村 裕, 米田俊之, 鈴木不二男: 成長軟骨における肥大細胞の運命. 2. 軟骨細胞の分離. 中部整災誌, 16: 729~730, 1973.
- 2) Mankin, H.J., Conger, K.A.: The acute effect of intraarticular hydrocortisone on articular cartilage in rabbits. J. Bone Joint Surg. 48-A: 1383-1388, 1966.
- 3) Behrens, F., Shepard, N., Mitchell, N.: Metabolic recovery of articular cartilage after intraarticular injections of glucocorticoid. J. Bone Joint Surg. 58-A: 1157-1160, 1976.
- 4) Blondelon, D., Adolphe, M., Zizine L., Lechat, P.: Evidence for glucocorticoid receptors in cultured rabbit articular chondrocytes. Elsevier 117: 195-198, North-Holland Biomedical Press, 1980.
- 5) Steinberg, J., Sledge, C.B.: Synovial factors and chondrocyte-mediated breakdown of cartilage; inhibition by hydrocortisone. J. Orthop Res. 1: 13-21, 1983.
- 6) Sheppard, H., Pilsworth, L.M.C., Hazleman, B., Dingle, J.T.: Effects of antirheumatoid drugs on the production and action of porcine catabolin. Ann. Rheum. Dis. 41: 463-468, 1982.