組織培養における骨コラーゲンの合成と吸収

梶 井 美 香

東京医科歯科大学歯学部生化学教室 (指導: 佐々木哲教授)

(受付: 昭和 43 年 10 月 15 日)

The Synthesis and Degradation of Bone Collagen in Tissue Culture.

Mika Kajii

Department of Biochemistry (Director: Professor Satoshi Sasaki)

School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

は し が き

「骨はどのようにして作られるか?」, という研究の歴史は古く, 2 世紀以上前にさかのぼる。しかし, その多くは動物の生体内実験又は, 臨床所見に基づいて行なわれてきたために, 他の細胞や組織と相互に作用し合っていて, 骨の形成と吸収の様相を一義的に考えることは非常に困難である。一方, 組織培養法は生体内に及ばないまでも, 生理的条件に比較的近い条件で細胞や組織を研究できるので, 最近の医学生物学領域において広く応用されるようになった。

骨組織の培養の試みは, 1911 年 Carrel, Alexis and Burrows により始められ, その後いくつかの研究が報告された。1928 年に Fell が組織培養下で肢原基を成長分化させることにはじめて成功した。その後, Demuth, Heinen, Gaillard, Bassett^{1, 2)} が骨の組織培養の報告をしてきた。しかし, いずれも長管骨を培養して, 骨由来の細胞又は線維芽細胞様細胞を形態学的に観察している。

一方, 1958 年に Goldhaber³⁾ は新生マウスの頭蓋骨を血漿と鶏胚浸出液とでカバーグラスに付着させ, Leighton 管の中で静置培養して, 骨吸収を *in vitro* に再現した。さらに骨吸収に影響を及ぼす諸因子, 例えば気相の酸素分圧⁴⁾, 上皮小

体抽出物, ビタミン A, ビタミン D⁵⁾ 並びに補助因子としてヘパリンなどの作用を組織学的に明らかにした。Stern et al.⁷⁾ はマウス頭蓋骨を ³H-プロリンを含む培地で培養し, 培地に溶出する ³H-ハイドロキシプロリンを測定し, Goldhaber の骨吸収が上皮小体抽出物と 50 % 酸素分圧下で促進されるという所見を支持した。さらに組織培養下に見られる骨吸収には, コラーゲン分解因子が関与していることを報告した⁸⁾。

しかし, これらの報告においては, 骨から培地に溶出したハイドロキシプロリン量を測定していない。培養下でどれだけのコラーゲンが合成され, どれだけのコラーゲンが溶出しているかを明らかにすることは, 骨の代謝の研究上きわめて重要と思われる。また, Goldhaber が用いた培養方法は, 栄養供給が不十分であること, outgrowth が伸び出し組織分化が余り良くないこと, 気相の制御が不完全なこと等の方法上の問題点が考えられる。

以上の点を考慮に入れ, 本報告では Trowell の器官培養装置⁹⁾ を改良したガラス器官培養装置¹⁰⁾ による grid 法を採用した。この装置は, 1) 気相の維持が完全であり, 2) 液体培地を用い, 間歇的に振盪するので, 培地の部分的 pH の低下は避けられ, 酸素の培地への拡散が均一である,

3) 定量性があり, 4) ホルモンやビタミンを培地に加え生理化学的研究にも応用できる等の利点がある。この方法でラットの胎性頭蓋骨(embryonic calvaria)を培養し, 培養下における骨の形成と吸収をコラーゲンの合成と崩壊に関連づけ, 生化学的に解析した。さらに, 天然培地と合成培地を比較検討し, 上皮小体抽出物のコラーゲン合成と崩壊に対する作用も検討した。

実験材料と方法

実験材料: 胎生 19 日の Wister 系ラットを, ネブタール麻酔下で無菌的に取り出し, その頭蓋骨(calvaria)を摘出する。Calvaria の前頭骨及び後頭骨部分には軟骨組織が混入するので, 主に頭頂骨部分を取り扱った。培養に供した calvaria は大きさ約 4 mm×7~8 mm, 厚さ 70~100 μ , 湿性重量 12 mg 前後である。

培養方法: 使用したガラス器官培養装置(図 1)は, 気相を完全に制御できるようにした小型デシケーター型容器内に培養シャーレ(直径 22 mm)を置き, その中に置いたステンレス網台の上にレンズペーパーを敷き, 1 シャーレに 1 個の calvaria を入れ, 液体培地 1.5 ml を加えて calvaria を浮かせ, 容器内を酸素 50 %, 炭酸ガス 5 %, 窒素 45 % の気相で満たし, 37°C の恒温器中で間歇振盪培養を行なう¹⁰⁾。培地は 2 日ごとに交換する。

培地: 予備的に表 1 の如き組成の培地を検討した。なお, いずれの培地にも D-glucose を 200 mg/ml, L-glutamine を 20 mg/ml 添加し, 感染防止のために dihydrostreptomycin を 50 μ g/ml 及び penicillin-G-K を 50 単位/ml 加え, pH indicator として phenol red を 0.002 % になるように入れ, 2.8 % NaHCO₃ 3.2 ml/dl で pH を 7.4 に調整した。さらに必要に応じて ³H-プロリン(224 mc/mM) を 1 μ c/ml 加えた。また, 上皮小体抽出物(parathyroid extract, 以後 PTE と略す)の骨コラーゲン代謝への作用を調べるために Parathormone (Lilly) を 1 単位/ml 添加した培地も用

図 1 ガラス器官培養装置

glc: ガラス培養容器 d: 培養シャーレ
cal: calvaria gc: ガス室
lp: レンズペーパー sr: シリコンゴム栓
cm: 液体培地 s: 1.5 寸シャーレ
sg: ステンレス網台 dw: 蒸留水
p: 孔あき金属板 E₁, E₂: ガス口

表 1. 培地 組 成

培 地	CM 1	CM 2	CM 3	CM 4
培地の組成 %				
合成培地 TC199	60	60		25
非働化馬血清	20	20	75	75
11日鶏胚浸出液	20			
13日鶏胚浸出液		20	25	
培養結果				
培地交換時 pH	6.2~6.4	6.4	6.8~7.0	6.6~6.8
10日後付着性	++	+	±	-

いた。

2 日ごとの培地交換時に BTB pH 試験紙で調べた培地の pH と 10 日培養後の培養体のレンズペーパーへの付着性は表 1 のようであった。CM 3 の天然培地において付着性は少なく, また pH 緩衝作用ももつとも良好であったので, 以下の実験には主としてこれを用いた。

組織学的方法: 同腹の胎児から得た calvaria を培養前, 培養 4 日, 8 日, 12 日目に 10 % 中性ホルマリンで固定し, 通法に従ってパラフィン包埋, 5 μ の連続切片を作製し, hematoxyline-eosin 染色及び alcian blue-chlorantin fast red 染色を行なった。

培養期間中のプロリンのコラーゲンへの取り込みを調べるために、オートラジオグラムを作製した。すなわち、培養終了前4日間の培地に ^3H -プロリンを $1\mu\text{C}/\text{ml}$ 加えておき、培養後 calvaria を Hanks 氏塩類溶液で十分洗い、前述と同様に固定、包埋、パラフィン切片とし、冷 10% TCA 処理 30 分の後、乳剤 Sakura NR-M2 を用い、dipping 法でオートラジオグラムを作製した。5 週間露出させた後、Konidol-X で 20°C 、5 分間現像し hematoxyline-eosin 染色を施した。

生化学的分析方法：生化学的検索には、calvaria 中のコラーゲンに特有なアミノ酸であるヒドロキシプロリンに注目して、その合成と培地への溶出を測定した。すなわち、 ^3H -プロリンを培地に加えて培養すると、 ^3H -プロリンは calvaria のコラーゲンに取り込まれて水酸化され、 ^3H -ヒドロキシプロリンとなり、コラーゲンの崩壊に伴って培地に溶出してくる。培地のヒドロキシプロリンは、再びコラーゲンに取り込まれることはないことが知られている。従って calvaria と培

地にあるヒドロキシプロリン量の和(C+D)から培養前に培地にあつたそれ(E)を差し引くと、new collagen と培養前から骨にあつたコラーゲン(仮りに old collagen という)の量の和、すなわち total collagen 量となり、培地中のヒドロキシプロリン量の培養前後の差(D-E)から培地中に溶出したコラーゲン量が算出できる。このように考え calvaria と培地を分析し、コラーゲンの合成と溶出を測定した。

表 2. Calculation of Collagen Synthesis and Degradation

A+B	: Index of new collagen
B	: Index of released new collagen
C+D-E	: Amounts of total (new and old) collagen
D-E	: Amounts of released total collagen

- A: Radioactivity of ^3H -hypro. in calvaria after culture (dpm)
 B: Radioactivity of ^3H -hypro. in media after culture (dpm)
 C: Hypro. in calvaria after culture (μg)
 D: Hypro. in media after culture (μg)
 E: Initial hypro. in media (μg)

地に含まれている ^3H -ヒドロキシプロリンの放射能の和(表2のA+B)は培養中に合成されたコラーゲン(仮りに new collagen という)の量の index となり、培地の ^3H -ヒドロキシプロリンの放射能(B)は培養中に合成され、さらに溶出したコラーゲン(released new collagen)の量の index となる。また、培養後の calvaria と培

注、Hypro:ヒドロキシプロリン、Pro:プロリン

図2 Calvaria と培地のヒドロキシプロリンの分析方法

$1\mu\text{C}/\text{ml}$ の ^3H -プロリンを加えた培地で calvaria を培養し、培養後の培地は calvaria ごとに凍結保存しておく。培養後の calvaria はエタノールで十分洗い、遊離のプロリンとヒドロキシプロリンを除去した後、アセトンで脱脂乾燥して乾燥重量を測定する(calvaria 1 個の乾燥重量: $1.893 \pm 0.437\text{mg}$)。Calvaria は2個を1群として、 6N 塩酸 2ml で、 105°C 、24 時間加水分解した。培地は $3000 \times g$ で 20 分間遠心し、その上清 2ml に対し濃塩酸 2ml を加え同様の条件で加水

分解した。各々の加水分解物の一定量について、Prockop and Udenfriend の方法¹²⁾ の LeRoy の変法¹³⁾ に従ってヒドロキシプロリン量を測定した(図2の①)。すなわち、加水分解物の一定量を活性炭と Dowex 1X8(Cl 型) レジンで脱色、脱フミンし、クロラミンTで20分間室温酸化する(プロリンのピロール化)。これをトルエンで4回抽出しプロリンを除去した後100°Cで30分間加熱し、流水冷却してヒドロキシプロリンをトルエンで抽出し、そのトルエン層について1.5 Mの塩酸セミカルバチッドで抽出してから、エールリッヒ試薬で発色させ、570 μ で比色定量し、calvaria 又は培地にあるヒドロキシプロリン全量を算出した。このようにすると加水分解物中には³H-ヒドロキシプロリンに比べ、³H-プロリンを非常に多く含むため、³H-ヒドロキシプロリンを抽出したトルエン層に³H-プロリンの放射能が混入して、³H-ヒドロキシプロリンの比放射能の測定には不適當である。そこで加水分解物の残りは、Dowex 50 WX 8 (100~200 メッシュ, H 型) のレジncラム (直径0.7 cm, 長さ10 cm) を通し³H-ヒドロキシプロリンを³H-プロリンから分離した(図2の②)。溶出液に2 N塩酸を用い、流出速度を0.6 ml/分にすると、ヒドロキシプロリンは7~10 ml に、プロリンは11~20 ml に溶出されてくるので、プロリンを含まないヒドロキシプロリンの分画が得られる。この分画について前述と同様にヒドロキシプロリンを定量し、比色に用いたトルエン層の一部について、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し、比放射能を算出した。②のようにレジncラムを通し分離を良くすると回収率が一定しないので、①の方法で測定したヒドロキシプロリン全量と比放射能の積から calvaria 及び培地の全放射能を算出した。

結 果

Calvaria を天然培地における Trowell の grid 法で間歇振盪培養すると、培養日数の増加に伴って、肉眼的に厚さの増加が認められるが、大きさ

図3-A. 培養前, 図3-B. 12日間培養後の Calvaria
(10%中性ホルマリン固定, alcian blue-chlorantini fast red 染色 $\times 300$) OB: Osteoblasts, OC: Osteoclasts, OI: Osteoid, CT: 結合組織

は増加しない。Calvaria はレンズペーパーには余り強く付着せず、ピンセットで軽くつまみ培地から取り出すことができた。組織切片を染色、検鏡すると12日間培養後(図3-B)も calvaria はよくその形態を保ち、変性細胞は認められなかった。培養前(図3-A)に比べ骨の厚さの増加は見られないが osteocytes 及び osteoblasts は正常の形態を維持し、吸収窩には osteoclasts と思われる多核の大型細胞が認められる。また、chlorantini fast red に染まらず alcian blue に染まる石灰化していない osteoid と思われる部分もある。しかし、12日目には結合組織の層が厚くなり、増殖が著

図4-A. 8日培養, 4-B. 12日培養の
Calvaria のオートラジオグラム
(10%中性ホルマリン固定, HE 染色, $\times 300$)
B: 骨組織, CT: 結合組織, 4: 銀粒子

明になってくる。

オートラジオグラムの所見においては, 培養4日目及び8日目の calvaria の ^3H -プロリンの取り込みは盛んで, 骨の内部あるいは骨小腔の周辺

部にまで銀粒子を認めた(図4-A)。しかし, 12日目では銀粒子は少なく骨の辺縁部に一層認められるだけであつた(図4-B)。

1 生化学的分析結果

生化学的分析は培養前の calvaria, ^3H -プロリンを加えた培地で4日, 8日, 12日間培養した calvaria 及び培地についてハイドロキシプロリン量と ^3H -ハイドロキシプロリンの放射能を測定した。また calvaria を入れずに同じ条件においた培地を対照としてハイドロキシプロリン量を計り, 培養した培地のそれから差し引き溶出したコラーゲン量の index とした。但し, calvaria を入れなかつた培地には ^3H -ハイドロキシプロリンの放射能は検出されず, 日数に伴うハイドロキシプロリン量の増加もなかつた。

培養後の calvaria の乾燥重量, calvaria 1mg に含まれるハイドロキシプロリン量, その比放射能と全放射能及び, calvaria 1mg が培地に溶出したハイドロキシプロリン量とその全放射能の培養日数に伴う変化について, 3回の実験の平均と標準偏差を表3に示した。

i) Calvaria のハイドロキシプロリン含有量。

Calvaria の乾燥重量に対するハイドロキシプロリンの含有量は図5の如くであつた。培養下では12日目まで著しい増加は認められなかつた。

ii) Calvaria の ^3H -ハイドロキシプロリンの比放射能。

Calvaria に含まれるハイドロキシプロリン量に対する放射能の割合, すなわち, ^3H -ハイドロキ

表3. 培養後の Calvaria と培地のハイドロキシプロリン含有量と ^3H -ハイドロキシプロリンの放射能

culture days (days)	dry weight (mg)	calvaria			media	
		hypro. content ($\mu\text{g}/\text{mg cal.}$)	^3H -hypro. specific activity (dpm/ μg)	^3H -hypro. activity (dpm/mg cal.)	released hypro. ($\mu\text{g}/\text{mg cal.}$)	^3H -hypro. activity (dpm/mg cal.)
0	1.80 ± 0.08	11.83 ± 1.07	—	—	—	—
4	1.95 ± 0.42	13.19 ± 1.01	728.7 ± 64.7	9420 ± 760	3.94 ± 1.28	13160 ± 3620
8	1.82 ± 0.56	12.70 ± 1.30	858.5 ± 104.2	10720 ± 1260	7.00 ± 1.41	21760 ± 2600
12	1.93 ± 0.69	13.20 ± 0.90	813.8 ± 80.5	10650 ± 1530	13.54 ± 1.83	28330 ± 2510

図5 Calvaria のハイドロキシプロリン含有量

図6 Calvaria の ^3H -ハイドロキシプロリンの比放射能

シプロリン比放射能は図6の如くであつて、8日目まで上昇し、以後上らず下降もしくは平衡を保っていた。

iii) 培養中のコラーゲン合成と溶出

^3H -ハイドロキシプロリンの放射能を index として培養中のコラーゲン合成を図7-A に表わした。すなわち、乾燥重量1mgのcalvariaの ^3H -ハイドロキシプロリンの放射能(dpm)及びcalvaria 1mgに相当する培地の放射能のそれぞれ3回の実験の平均を示した。コラーゲン合成は12日間にわたって続く。そのnew collagenの60~70%が崩壊して培地に ^3H -ハイドロキシプロリンを溶出していることがわかる。

図7-Bは定量したハイドロキシプロリン量のcalvariaと培地における分布を示している。Total collagen量は12日目まで増加し、その増加量とほぼ同量のコラーゲンが溶出していることが明らかであつた。

図7 組織培養下における骨コラーゲンの合成と溶出

図8 天然培地と合成培地の比較
NM: 天然培地, CDM: 合成培地

図9 骨コラーゲンの合成と崩壊に対する上皮小体抽出物の影響

かであつた。

2 天然培地と合成培地

次に合成培地で同様に培養し、分析を行なつた。すなわち、合成培地 TC 199, 非働化馬血清, 13日鶏胚浸出液(8:1:1)からなる培地と天然培

地を2日及び4日培養で比較してみた。結果は図8-A, 8-B のようであつた。 ^3H -ハイドロキシプロリンの放射能でみたコラーゲン合成は合成培地では、天然培地の73.4~78.5%に減少し、コラーゲンの溶出は new collagen に関しても total collagen に関しても天然培地のほぼ2倍に増加している。

3 上皮小体ホルモンの作用

上皮小体ホルモンの骨代謝への直接作用を調べるために、Parathormone を1単位/ml 培地に加え、2日及び4日間培養し(PTE 群)、それを加えなかつた対照群と比較した。PTE 群の calvaria の ^3H -ハイドロキシプロリン 比放射能は対照群の53~55%に下がる。 ^3H -ハイドロキシプロリンの放射能でみたコラーゲンの合成は対照群の57.5~70.2%となつていた(図9-A)。一方、コラーゲンの溶出は new collagen に関しては64.3~75.2%と、total collagen に関しては73.3~79.4%と少なく(図9-B)コラーゲンの培地への溶出も減少している。

考 察

1 培養方法と分析方法について

骨の代謝の研究には、従来多くは骨幹端(metaphysis)をホモジナイズしたり、スライスして用いたので、骨髄細胞の混入や、細切する時の傷害が問題にされてきた。最近、マウスやラットの calvaria が骨の代謝の研究に用いられるようになった¹⁴⁾。Metaphysis は軟骨性化骨をするのに対し、calvaria は軟骨細胞は少なく、骨膜性化骨をする非常に薄い骨組織で、スライスすることなく、傷害を最少限に摘出することができる。しかも、骨髄を含まず metaphysis に比べ osteoblasts, osteocytes, osteoclasts 及び preosseous mesenchymal cells 等の細胞成分が多く、代謝の研究には好適と思われるので、本実験には胎生ラットの calvaria を材料として用いた。

骨組織の器官培養法は、① plasma clot(固形培地)による watch-glass 法、② Trowell の器官培養装置による grid 法、③ roller-tube 法に大

別される。

Watch-glass 法は outgrowth が顕著であり、主に培養体と環境(培地、他の組織器官)との関係を形態発生学、細胞学、組織学方面から研究するのに適している。Grid 法は液体培地を用いるので、ホルモンやビタミン、その他の作用を生理化学的に研究するために、あるいは、定量性が要求される生化学的研究に広く応用されている。Goldhaber の roller-tube 法は、定量的研究には十分でない点がある。佐藤ら(1968)¹⁰⁾は Trowell の器官培養装置を改良し、ガラス器官培養器を作製し、間歇的に振盪しながら培養することをはじめた。著者の実験ではこの方法に従つた。培地にとり上げた CM1 は Goldhaber が用いた培地の Gey 液を合成培地 TC 199 に代えた培地であつた。CM 2 は鶏胚浸出液の調整方法を Endo の方法¹⁵⁾から、Fell の方法¹⁶⁾に代えた培地であつた。CM 3 は組織培養に広く利用されている典型的天然培地であつた。CM 4 は CM 3 の鶏胚浸出液を合成培地 TC 199 に代えた培地であつた。

pH 緩衝能の低い合成培地では、培養後に正常な組織構造を維持できないので、pH 緩衝能があり、培養体の outgrowth によると思われるレンズペーパーへの付着性という観点から、結局天然培地がもつとも適当と判断し、これを用いた。

胎生19日ラットの calvaria を天然液体培地で、50%酸素分圧下で培養すると、培養後、calvaria を取り出した後のレンズペーパーにはわずかではあるが、増殖した周囲の結合組織あるいは、outgrowth が残る。また、培養シャーレの底には、培養体から遊離したと思われる細胞が少し沈着してくる。しかし、これ等の中の ^3H -ハイドロキシプロリンあるいは ^3H -プロリンの放射能は、calvaria 1個を1.5 ml の天然培地で2日間培養した場合の培地の放射能の0.6~0.7%であり、無視するものと考え、培地の分析には3000×g で20分間遠心したその上清を用いた。

Prockop らは1961年に放射性ハイドロキシプロリンの比放射能の測定方法を発表した¹²⁾。以来、改良を重ねて来たが、結局 ^3H -プロリンが非

常に多い場合には、シリカゲルカラムで ^3H -ハイドロキシプロリンを ^3H -プロリンから分離するようになった¹⁷⁾。著者の実験には、シリカゲルカラムより簡便な Dowex 50 WX8 (100~200 メッシュ, H 型) の $0.7 \times 10 \text{ cm}$ のカラムで ^3H -ハイドロキシプロリンを分離し、さらに、LeRoy ら (1966) の変法¹³⁾を加えて分析した。なお、本研究には ^3H -ハイドロキシプロリンの比放射能及びハイドロキシプロリンの全量を測定しなければならない。しかし、レジンカラムを通すと回収率が一定せず全量を測定するには不適當なので、分析を二分して行つた。これらの改良によつて、非ハイドロキシプロリン性の放射能を除き、比色の際に発色を妨害する物を除けるようになった。

2 結果について

Calvaria 乾燥重量 1 mg に対するハイドロキシプロリンの含有量は培養前に $1.02 \sim 1.29 \%$ で、12 日間培養後 $1.22 \sim 1.41 \%$ とやや増加しているが、培養前の calvaria よりも in vivo で 3~4 日経過したもの、すなわち生後 12 時間以内のラットの calvaria のそれが $1.73 \sim 2.24 \%$ と増加していることと比較すると、ハイドロキシプロリン含有量が培養下で増加しているとはいい難い。

^3H -ハイドロキシプロリンは、 ^3H -プロリンを加えた培地で培養した calvaria とその培地に検出され、calvaria を入れずに同じ条件においた培地には ^3H -ハイドロキシプロリンは検出されず、ハイドロキシプロリン量の増加もなかった。これ等の事実から、組織培養という条件下でも、比較的長期間 (12 日) にわたつて、骨組織のコラーゲン合成が続いているといい得る。しかし、calvaria 中のコラーゲン ^3H -ハイドロキシプロリンの比放射能は 8 日目まで上昇し、以後平衡又はやや下降の傾向がある。このことはオートラジオグラムの所見にも一致しているように思われる。これには 2 つの理由が考えられる。①コラーゲン合成能が 8 日前後を最高に、以後合成は殆んど行なわれていない。②あるいはコラーゲン合成は続いていても、それと同じ程度の速度で new collagen が培地に溶出している。このどちらか又は両方が起こつて

いると考えられる。そこで培養下でのコラーゲン合成を ^3H -ハイドロキシプロリンの放射能を index として、崩壊を培地に溶出したハイドロキシプロリン量を index として考えてみたところ、培養 12 日目までコラーゲン合成は続き、その new collagen の約 $2/3$ が培地に溶出していることが明らかとなった。Total collagen に関しては calvaria のハイドロキシプロリン含有量は殆んど増加せず、合成量とほぼ同量のコラーゲンが溶出している。この 12 日間培養後の値は、Goldhaber¹⁸⁾ が生後 5 日のマウスの calvaria を plasma clot して Gey 液、非働化馬血清、11 日鶏胚浸出液 (6:2:2) からなる培地で 14 日間 roller-tube 法で培養した結果と近似している。すなわち、50 %酸素分圧下では new collagen の $2/3$ が培地に溶出し、total collagen では合成量とほぼ同量のコラーゲンが培地に溶出していると報告している。

著者が実験に用いた天然培地は $5.06 \sim 8.50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のハイドロキシプロリンを含んでいるので、培養日数が長くなり、2 日ごとに培地を交換し、使用する培地が増加すると、calvaria から溶出したハイドロキシプロリンより、内在のその方が多くなり、分析上好ましくない。また、鶏胚浸出液は、調整時の状態によつて、ハイドロキシプロリン含有量が一定しないのも、分析上不都合である。このような点を解決するには、ハイドロキシプロリンを完全に除いた合成培地を用いることが望ましい。しかし、鶏胚浸出液は骨膜の osteogenic cells の活性を保つために不可欠である¹⁵⁾。また、血清には培養下で骨吸収を起こす因子が含まれている⁶⁾ともいわれる。

そこで、この二要素を 10 %づつに減じ、他の 80 %に合成培地 TC 199 を用いた培地で 4 日まで培養し、天然培地と比較分析した。合成培地 TC 199 は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のハイドロキシプロリンを含んでいて、ハイドロキシプロリンを含まない培地という観点からは、余り適當ではなかったが、各種ビタミンや補酵素も含んだ栄養豊富な合成培地として、広く利用されている。しかし、この TC 199 を主体とした培地においてすら、コラー

ゲン合成は天然培地の73.4~78.5%と約 $\frac{3}{4}$ に減少し、溶出する傾向だけが強くなっている。今後、ハイドロキシプロリンを含まない培地、或いは含有量の少ない培地で、かつ、コラーゲン合成能が高く、合成されたコラーゲンを骨の基質として沈着せしめ、骨塩の沈着を促し、骨の成熟を促進できる培地を開発しなければならない。

上皮小体ホルモンの骨組織への直接作用は、局所での osteoclast like cells の数を増加させるか、又は細胞1個当りの酵素活性を高めるかして、collagenolytic activity を高める。Goldhaber は新生マウスの calvaria を roller-tube 法で培養し、培地に1単位/mlの上皮小体抽出物(parathormone)を加えておくと、対照群よりも骨吸収が著しいこと⁴⁾、その骨吸収窩には巨大な空胞を含む osteoclast like cells があり、骨を貪食していくことを Time-Lapse-Microcinematography で確認し⁶⁾、他の生体内実験の結果と良く一致していると述べている。また、彼は培養後の培地のカルシウムイオン濃度が培養4~6日目に最高になり、³H-ハイドロキシプロリンの放射能が4日目に最高に達することと合わせて、顕微鏡下で見た骨吸収の経過と良く一致すると述べ⁵⁾、Martin et al.¹⁹⁾ は同じく calvaria を roller-tube 法で培養した後、培地中のカルシウム、リン酸、クエン酸の濃度を測定し、1単位/mlのPTEを培地に加えておくと、培養10日目までは対照群よりもPTE群のカルシウム及びリン酸の溶出が多いことを明らかにした。2日の短期間におけるカルシウムとリン酸の溶出と、ハイドロキシプロリンのそれが並行するともいつている。しかし、これ等の報告では培地に溶出したものを測定しているのであつて、コラーゲンの合成、或いは骨塩の沈着に対するPTEの作用については検討していない。Gaillard²⁰⁾は長管骨を使つて6時間の incubation において、培地に1単位/mlのPTEを加えると、骨へのグリシンの取り込みが非常に下がることを、¹⁴C-グリシンを使つたオートラジオグラムで明らかにした。de Voogd van der Straaten²¹⁾はPTE 0.1~0.5単位/mlがあると、橈骨の24

時間培養で¹⁴C-グリシンの取り込みが50%位に下がることを、放射能を測定して確認している。Heersche²²⁾は¹⁴C-グリシンではコラーゲンに特異的でないので、³H-プロリンを用いたオートラジオグラムで、PTEを含んでいる培地の橈骨は24時間培養で osteoblasts によるコラーゲン合成能が抑制されると述べた。一方、Martin et al.¹⁹⁾は calvaria を0.5単位/mlのPTEを含む培地で培養すると¹⁴C-ハイドロキシプロリンの合成は52%に下がると報告している。このように培養下では上皮小体抽出物は、osteoblastic function を抑制し、コラーゲン合成を減少させるという結果は、著者の実験でも証明された。しかし、PTEがコラーゲンの崩壊をも阻止するという報告はない。本実験の結果では、コラーゲンの培地への溶出が減少してはいるが、合成量が57.5~70.2%に下がっていることを考慮に入れ、溶出率(溶出量/合成量)の対照群に対するPTE群の比を計算すると1.06となり、溶出が阻害されているとはいえない。

また、粗抽出物である Parathormone の生物学的に有効な分画は10%にすぎないといわれていて²³⁾、組織培養下という直接作用では、その有効な部分より、余り有効でない部分が強く作用し、このように代謝活性を下げているように見えるのかもしれない。

この組織培養法を応用した骨の代謝の研究方法には、改良の余地は多分にあるが、上皮小体ホルモンの他、ビタミンD、サイロカルシトニン等の骨組織の代謝に直接作用すると考えられる因子、あるいは代謝的骨疾患、発育等の研究に今後広く応用していけるものと思われる。

総 括

1. 組織培養下における骨コラーゲンの合成と吸収の様相を明らかにするために胎生19日のラット頭蓋骨を、液体天然培地を用い、酸素分圧50%の気相のもとで、12日間まで間歇振盪培養を行なつた。

2. 組織学的には、培養12日目まで著しい変

性像は認められなかった。しかし、オートラジオグラムの所見では ^3H -プロリンのコラーゲンへの取り込みは、培養8日目以前に比べ8日目以後は非常に低下するようであった。

3. 生化学的には、 ^3H -プロリンを加えた培地で頭蓋骨を培養し、コラーゲンに特有なアミノ酸である ^3H -ハイドロキシプロリンの放射能を index としてコラーゲン合成を測定した。また、培地に溶出したハイドロキシプロリン量からコラーゲンの吸収を測定した。コラーゲン合成は培養12日目まで続き、合成量とほぼ同量のコラーゲンが培地に溶出していた。

4. 合成培地 TC 199 を主体とした培地（合成培地 TC 199：非働化馬血清：13日鶏胚浸出液、8：1：1）におけるコラーゲン合成は、天然培地（非働化馬血清：13日鶏胚浸出液、3：1）のその約 $\frac{3}{4}$ に減少し、コラーゲンの溶出は約2倍に増加し、合成培地はコラーゲンの崩壊を促進する系であった。

5. 上皮小体抽出物の骨コラーゲンの代謝に対する作用は、Parathormone を培地に1単位/ml 加えた場合には、コラーゲン合成を57.5～70.2%に抑制したが、コラーゲンの崩壊には著明な変化を与えなかった。

稿を終るにあたり、終始御篤実な御指導と御校閲を賜りました佐々木哲教授、研究の緒をお与え下さいました東北大学歯学部、荒谷真平教授ならびに組織培養法を御教示下さいました横浜市立大学医学部、佐藤温重助教授に心から感謝を捧げます。また、培養実験にあたり便宜をお計らい下さいました硬組織研究施設の麻生田亮教授をはじめとする教室員の方々に、厚くお礼を申し上げますと共に、実験に多大な御支援を下さいました生化学教室の方々にも心からお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Bassett, C. A. L. : Bone Biodynamics, Boston, 1964, Little Brown and Co., p. 233.
- 2) Bassett, C. A. L., Herrmann Ingeborg : Influence of Oxygen Concentration and Mechanical Factors on Differentiation of Connective Tissues in Vitro, Nature, 190 : 460, 1961.
- 3) Goldhaber, P. : Calcification in Biological

- Systems, Washington, 1960, Am. Assoc. Advancement Sci., p. 349.
- 4) Goldhaber, P. : The Parathyroids, Springfield, 1961, Charles C Thomas, p. 243.
- 5) Goldhaber, P. : Mechanisms of Hard Tissue Destruction, Washington, 1963, Am. Assoc. Advancement Sci., p. 609.
- 6) Goldhaber, P. : The Parathyroid Glands, Chicago, 1965, Univ. Chicago Press, p. 153.
- 7) Stern, B. D., Mechanic, G. L., Glimcher, M. J., Goldhaber, P. : The Resorption of Bone Collagen in Tissue Culture, Biochem. Biophys. Res. Commun., 13 : 137, 1963.
- 8) Stern, B. D., Glimcher, M. J., Mechanic, G. L., Goldhaber, P. : Studies of Collagen Degradation During Bone Resorption in Tissue Culture, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119 : 577, 1965.
- 9) Trowell, O. A. : The Culture of Mature Organ in a Synthetic Medium, Exp. Cell Res., 16 : 118, 1959.
- 10) 佐藤温重, 梶井美香 : 器官培養法, 化学と生物, 6 : 254, 1968.
- 11) 妹尾, 高木編 : 新細胞学, 朝倉書店, 昭40, 東京, p. 605.
- 12) Prockop, D. J., Udenfriend, S., Lindstedt, S. : A Simple Technique for Measuring the Specific Activity of Labeled Hydroxyproline in Biological Materials, J. biol. Chem., 236 : 1395, 1961.
- 13) LeRoy, E. C., Harris, E. D., Sjoedsma, A. : A Modified Procedure for Radioactive Hydroxyproline Assay in Urine and Tissues after Labeled Proline Administration, Anal. Biochem., 17 : 377, 1966.
- 14) Dowse, C. M., Neuman, M. W., Lane, K., Neuman, K. F. : Mechanisms of Hard Tissue Destruction, Washington, 1963, Am. Assoc. Advancement Sci., p. 589.
- 15) Endo, H. : Ossification in Tissue Culture. 1. Histological Development of the Femur of Chick Embryo in Various Liquid Media, Exp. Cell Res., 21 : 151, 1960.
- 16) Fell, H. B. : The Biochemistry and Physiology of Bone, New York, 1956, Acad. Press Inc., p. 401.
- 17) Juva, K., Prockop, D. J. : Modified Procedure for the Assay of ^3H -or ^{14}C -Labeled Hydroxyproline, Anal. Biochem., 15 : 77, 1966.
- 18) Stern, B., Glimcher, M. J., Goldhaber, P. : The Effect of Various Oxygen Tensions on the Synthesis and Degradation of Bone Collagen in Tissue Culture, Proc. Soc. Exp.

- Biol. Med., 121 : 869, 1966.
- 19) Martin, G. R., Mecca, C. E., Schiffmann, E. : The Parathyroid Glands, Chicago, 1965, Univ. Chicago Press, p. 261.
 - 20) Gaillard, P. J. : The Parathyroids, Springfield, 1961, Charles C Thomas, p. 20.
 - 21) de Voogd van der Straaten : A further Radiometrical Analysis of the Influence of Parathyroid Extract on the Glycine-binding Capacity of the Cultivated Mouse Radius Rudiment, Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc. Ser. C, 65 : 506, 1962.
 - 22) Heersche, J. N. M., Straaten, W. A. : Radioautographic and Radiometric Analysis of the Influence of Parathyroid Extract on the Proline-binding Capacity of Cultivated Mouse Radius Rudiments, Koninkl. Ned. Acad. Wetenschap. Proc. Ser. C, 68 : 277, 1965.
 - 23) Aurbach, G. D., Potts, J. T. : Partition of Parathyroid Hormone on Sephadex G-100, Endocrinology, 75 : 290, 1964.