Disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate

(EHDP) の免疫薬理学的作用

1. EHDP 投与幼若ラットの胸腺細胞及び脾細胞のレクチンに対する分裂応答性

戸田 佳子 相田 宜利 嶋越 美和*

山田久仁子 青野 正男

九州大学歯学部歯科保存学第1教室

(主任：青野正男教授)

* 住友製薬医薬開発部

(昭和61年9月30日受付)

The Pharmacological Effects of Disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on the Function of Immunocompetent Cells

1. The Mitogenic Response of Thymocytes or Spleen Cells of Young Rats Injected with EHDP

Yoshiko TODA, Yoshitomi AIDA, Yoshikazu SHIMAKOSHI*,
Kuniko YAMADA and Masao AONO

Department of Endodontics & Periodontics, Faculty of Dentistry Kyushu University
(Chief: Prof. Masao AONO)

* Clinical Research and Development Office, Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd., Osaka, Japan

The effect of *in vivo* administration of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on the mitogenic response of thymocytes or spleen cells were studied in young rats. When rats (2~3 weeks of age) were injected with EHDP (10 mg/kg/day) subcutaneously for more than 6 days or injected once with EHDP (100 mg/kg) subcutaneously or intraperi-

toneally, lipopolysaccharide-induced proliferative response of spleen cells were diminished. The *in vivo* administration of EHDP did not affected the proliferative response of thymocytes or spleen cells to concanavalin A. These results indicated that the *in vivo* administration of EHDP did induce the dysfunction of splenic B lymphocytes but not that of T lymphocytes.

Key words : B lymphocyte, Concanavalin A, EHDP, Lipopolysaccharide, T lymphocyte

要旨：歯周疾患の臨床症状の1つに、歯槽骨の吸収が認められる。そこでわれわれは、このような骨吸収を抑制する化合物を臨床的に応用する目的で、骨吸収を抑制するといわれている化合物の1つである、Disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) の免疫薬理学的作用について調べた。EHDP 10 mg/kg を幼若ラットに連日皮下注射するか、あるいは 100 mg/kg を1回皮下または腹腔内に注射することにより、脾細胞の細菌リポ多糖体 (LPS) に対する分裂応答が著明に低下することがわかった。しかし、EHDP 投与は、胸腺細胞及び脾細胞の concanavalin A に対する分裂応答には、明らかな影響を及ぼさなかった。これらの事実は、EHDP 投与が、B細胞の機能低下を誘導

するが、T細胞機能には著明な影響を与えないことを示すものである。

索引用語：B細胞 コンカナバリン A, Disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate, 細菌リポ多糖体, T細胞

緒 言

Disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) は bisphosphonates と呼ばれる一連の化合物の1つであり、それらの生物活性は骨代謝の抑制にある¹⁾。EHDPの生物活性には骨形成の抑制と骨吸収の抑制との2面があり、どちらが主に発揮されるかはその濃度によって左右される^{2,3)}。両活性ともその発現機序の詳細な点は不明のようである^{1,2)}。

Bisphosphonates は本来骨吸収の抑制を目的として開発された物質群であり、構造により活性の強さも異なっている⁴⁾。Bisphosphonates が骨吸収を抑制する機序については、骨におよぼす作用によるものと骨吸収を担う細胞におよぼす作用によるものの2つが考えられている。前者については、bisphosphonates が hydroxyapatite に強い親和性で結合し、骨の性質を変えるためと考えられている¹⁾。後者については、bisphosphonates が破骨細胞に作用し、その活性を低下させるためと考えられているが、そのことを示す直接的証拠はない。その点に関して Chambers らは、hydroxyapatite に吸着した EHDP がマクロファージに対し、toxic に作用するためではないかと推測している⁵⁾。その他マクロファージの機能におよぼす bisphosphonates の作用についての報告はいくつかあり、われわれも EHDP がマクロファージのインターロイキン1様活性物質の産生を抑制することを報告した⁶⁾。

最近 Milhaud ら⁷⁾は、dichloromethane diphosphonate (chrodronate) をラット新生児皮下に連続投与することにより、osteopetrosis 様骨病変を惹起することに成功した。興味深いことに chrodronate 投与ラットにおいて、胸腺細胞のレクチンに対する分裂応答性が著明に低下していた。また、osteopetrotic mutant rat においても、胸腺細胞の機能低下が見られるという以前の報告⁸⁾を考え合わせて、osteopetrosis における破骨細胞の機能低下が T 細胞の機能低下と密接に関連していることを示した。しかし、いずれの報告においても、脾細胞、特に B 細胞機能の変化は著明ではなく、また一定していない^{7,8)}。これに対し、破骨細胞と T 細胞の関連に否定的な報告も散見される^{9~11)}。

歯周疾患の臨床症状である歯周ポケットの形成と歯槽

骨吸収の進行について、骨吸収を抑制するような化合物の作用機序がわかれば、臨床的に応用することも可能である。

実際、骨吸収や骨新生の促進しているような疾患に使用されているという報告もある¹⁾。

われわれは、EHDP の *in vivo* 投与が免疫担当細胞におよぼす作用を調べた。その結果、EHDP 投与は脾細胞の concanavalin A (Con A) に対する分裂応答性には影響しないが、B 細胞 mitogen である細菌リポ多糖体 (LPS) に対する分裂応答性を著明に抑制することがわかった。このことは、EHDP の作用が B 細胞にもおよび得ることを示すものである。

材料と方法

動物および EHDP 投与法；生後2~3週齢の WKA 系ラットを用いた。EHDP 投与は以下に行った。(1) 連続投与；0~10 mg/kg の濃度の EHDP を毎日、背皮下に注射した。実験は7~28日にわたって行い、最終投与の1日後に屠殺した。(2) 単一投与；皮下あるいは腹腔に0~100 mg/kg の濃度の EHDP を投与し、種々の時間経過の後屠殺した。

胸腺細胞、脾細胞の回収；エーテル麻酔下にラットを屠殺し、無菌的に胸腺と脾臓を摘出し、はさみで細く切った後、ステンレスメッシュを通して遊離細胞浮遊液を調製した。生存細胞数はトリパンプブルー排除試験により算定した。

レクチンによるリンパ球分裂応答の測定；培地は RPMI 1640 (Difco Lab. Detroit, Mich.) を用い、10 mM HEPES, 2 mM グルタミン, 100 units/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた。細胞 1×10^6 個/well を 10% 牛胎児血清 (FCS, Flow Lab., Stanmore, NSW, Australia) と 5×10^{-6} M の 2-メルカプトエタノールを含む培地中で 96 穴マイクロプレート (Falcon Plastics, Oxnard, Calif.) を用いて培養した (0.2 ml/well)。胸腺細胞は Con A (0.08~20 µg/ml) で刺激して分裂応答を測定した。脾細胞は Con A (0.08~20 µg/ml)、または LPS (E. coli 0-113, Difco Lab.) (0.08~10 µg/ml) で刺激して分裂応答を測定した。培養は 72 時間行い、終了前 14~16 時間に 0.2 µCi の ^3H -Thymidine (^3H -TdR, 0.5 Ci/nmol, Amersham Eng-

Figure 1

上：EHPD 100 mg/kg を 1 回腹腔投与後 7 日目の脛骨
 中：EHPD 100 mg/kg を 1 回皮下投与後 7 日目の脛骨
 下：対照

land)を加えた。培養後細胞をセルハーベスター (Mash II, Microbiological Associates, Rockerill, Md)を用いて、グラスフィルター上に回収、洗浄後、とり込まれた³H-TdRを液体シンチレーションカウンター (Packard Instrument Co., Downer's Grove, Ill.)で計測した。培養は triplicate で行い、結果は平均値で示した。

X線学的検索；ラット屠殺後、後肢大腿骨または脛骨を採り軟組織を除去した後、X線写真を撮影した。撮影には、SOFRON TYPE SRO-M 50を用い、条件は35 kV, 5 mA, 40 秒間とした。フィルムは FG Filmを用いた。

結 果

EHPD 投与による骨 X 線像の変化；EHPD 100 mg/kg を 1 回皮下または腹腔に投与した後、脛骨の X 線像を調べると、骨端が棍棒状変形を呈していた (Figure 1)。また EHPD 100 mg/kg を投与してから 3 週間を経過した骨の X 線像には、不透過領域がバンド状に認められた (Figure 2)。これは過去に、骨吸収が抑制された時期が存在したことを示すものと考えられる。しかし、EHPD 10 mg/kg を 7 日から 28 日間にわたって皮下投与した場合、骨 X 線像は骨稜の減少を示し、骨形成の抑制が惹起されたことを示すものであった。この頻回投与の

Figure 2

上：EHPD 100 mg/kg を 1 回皮下投与後 3 週間目の脛骨
 下：対照

場合に骨吸収の抑制を示す像が認められなかった理由は不明であるが、骨形成抑制下に骨吸収の抑制が生じた場合、X線学的検索では吸収抑制の有無はわからぬ可能性もある。

胸腺細胞の Con A に対する分裂応答に及ぼす EHPD 投与の影響；EHPD 0.01~10.0 mg/kg を 7 日にわたって皮下投与しても、胸腺細胞の Con A による分裂応答には明らかな影響は認められなかった (Table 1, Exp. 1)。同様に 10 mg/kg の EHPD を 28 日まで投与しても対照との間に著明な差異は見出せなかった (Table 1, Exp. 2~4)。また 100 mg/kg の EHPD を 1 回皮下または腹腔投与して 2~7 日後の胸腺細胞にも、Con A による分裂応答は無処置対照群との間に差異は見出せなかった (Table 1, Exp. 5, 6)。

脾細胞の Con A に対する分裂応答に及ぼす EHPD 投与の影響；EHPD 投与は、脾細胞の Con A に対する分裂応答には著明な影響は与えなかった。すなわち、EHPD 0.01~10 mg/kg を 7 日間皮下投与しても、10 mg/kg の EHPD を 28 日にわたり投与しても、脾細胞の Con A に対する分裂応答性は無処置対照群と著明な差異は認められなかった (Table 2)。また、EHPD 100 mg/kg を腹腔に 1 回投与後 2, 4, 6 日後の脾細胞も、対照とは差異を示さなかった (Table 2)。

脾細胞の LPS に対する分裂応答性に及ぼす EHPD 投与の影響；EHPD 10 mg/kg を 7~25 日間皮下投与した場合、その脾細胞の LPS に対する分裂応答は著明に

Table 1 Con A-induced proliferative response of thymocytes of EHDP-injected rats

Exp. No.	Treatment		³ H-TdR uptake (CPM×10 ⁻⁴)			
	mg/kg×times	route	Con A (μg/ml)			
			0.04	0.2	1.0	5.0
1 ^a	None		0.01	0.71	3.36	3.38
	0.01×7	sc	0.03	1.07	2.52	3.12
	0.1×7	sc	0.02	0.78	2.78	2.96
	1.0×7	sc	0.02	0.54	2.08	2.60
	10×7	sc	0.02	0.78	2.89	3.89
			0.31	1.25	5.0	20
2 ^a	None		6.54	4.98	6.57	0.33
	10×14	sc	7.34	4.42	6.10	0.31
3 ^a	None		0.60	3.69	1.09	0.25
	10×21	sc	0.28	2.83	0.81	0.06
4 ^a	None		7.93	9.33	9.23	0.28
	10×28	sc	6.51	8.98	9.15	0.12
			0.08	0.4	2.0	10
5 ^b	None		0.03	2.42	3.60	4.00
	0.01×1	sc	0.02	2.00	3.16	3.64
	1.0×1	sc	0.03	2.03	3.41	4.02
	100×1	sc	0.05	4.62	4.63	5.87
6	None		—	—	5.25	—
	100×1	ip ^c	—	—	7.07	—
		sc ^c	—	—	5.77	—
		ip ^d	—	—	7.35	—
		sc ^d	—	—	6.81	—
		ip ^e	—	—	6.87	—
		sc ^e	—	—	6.20	—

a : Rats were sacrificed on the day after the final injection of EHDP

b : Rats were sacrificed on the day 7 after the final injection of EHDP

c—e : Rats were sacrificed on ^c day 2, ^d day 4, ^e day 6 after the final injection of EHDP

抑制されることがわかった (Table 3)。同様の変化は、50 mg/kg の 1 回皮下投与によっても (Table 4, Exp. 1)、また 10 mg/kg あるいは 100 mg/kg の腹腔内 1 回投与によっても認められた (Table 4, Exp. 2, 3)。これらの結果は、EHDP の *in vivo* 投与は、脾細胞の LPS に対する分裂応答すなわち B 細胞の分裂応答を抑制することを示すものである。さらに、EHDP 10 mg/kg を 7 日間投与した後、17 日後の脾細胞の LPS に対する分裂応答は、対照とほとんど差がなかった (データには示していない)。このことから、EHDP 投与による脾細胞の LPS

に対する分裂応答の低下は、EHDP 投与終了後は、比較的早期に回復するものと思われる。

以上のように、EHDP 投与は、幼若ラットに osteopetrotic 様骨病変を惹起できるとともに、EHDP 投与ラットの免疫担当細胞の中で、脾細胞の LPS に対する分裂応答性の低下が著明であった。

考 察

EHDP 投与が免疫担当細胞の分裂応答性におよぼす

Table 2 Con A-induced proliferative response of spleen cells of EHDP-injected rats

Exp. No.	Treatment		³ H-TdR uptake (CPM×10 ⁻⁴)			
	mg/kg×times	route	Con A (μg/ml)			
			0.04	0.2	1.0	5.0
1 ^a	None		0.14	6.23	5.62	3.69
	0.01×7	sc	0.06	5.61	7.12	4.32
	0.1×7	sc	0.34	6.19	4.17	3.08
	1.0×7	sc	0.25	5.94	5.03	3.48
	10×7	sc	0.19	5.29	5.64	2.93
2 ^a	None		0.31	1.25	5.0	20
	10×14	sc	5.21	2.08	2.04	5.53
3 ^a	None		7.81	3.30	4.08	8.39
	10×21	sc	4.97	1.56	4.66	0.06
4 ^a	None		0.04	2.91	0.06	0.03
	10×28	sc	2.85	2.45	2.40	2.14
5 ^b	None		6.13	1.84	1.68	0.55
	0.01×1	sc	0.08	0.4	2.0	10
	1.0×1	sc	0.62	0.59	3.22	2.78
	100×1	sc	0.71	0.58	2.80	2.84
6	None		0.75	0.48	2.46	1.83
	100×1	sc	0.26	0.01	0.04	0.05
		ip ^b	—	—	1.62	—
		sc ^b	—	—	0.92	—
		ip ^c	—	—	7.91	—
		sc ^c	—	—	3.93	—
		ip ^d	—	—	1.48	—
		sc ^d	—	—	1.74	—
			—	—	4.18	—

a : Rats were sacrificed on the day after the final injection of EHDF

b—d : Rats were sacrificed on ^b day 2, ^c day 4, or ^d day 6 after the final injection of EHDP

影響について調べた。その結果、EHDP の皮下または腹腔投与は、脾細胞の LPS に対する分裂応答を著明に抑制することがわかった。

最近、骨代謝と免疫系との関連、特に骨吸収の免疫系細胞による制御に関する研究が蓄積されつつある。Milhaud ら⁷⁾は、chondronate をラット新生児に皮下注射することにより、osteopetrosis 様骨病変を惹起させること、および EHDP 投与ラットの T 細胞のレクチンに対する分裂応答が低下していることを示し、T 細胞による破骨細胞の機能調節の存在を示唆した。これより先に

彼らは、osteopetrotic mutant rat の T 細胞機能低下を報告している⁸⁾。それに対し Schneider ら¹¹⁾は、osteopetrosis を伴う *ia* ラットの免疫担当細胞は Ficoll-Hypaque 法で分離した単核細胞画分で比較すると、対照との差は認められなかったとの結果を報告した。また彼らは、*ia* ラットにおいて、細胞移入による osteopetrosis の治癒を調べる実験系で、骨髄、脾臓、新生児肝細胞の Ficoll-Hypaque 法で分離した単核細胞、特に Thy 1, 1 抗原陽性細胞が有効であることから、osteopetrosis に対し治癒効果のある細胞は stem cell であることを示し

Table 3 LPS-induced proliferative response of spleen cells of EHDP-injected rats (multiple sc injection)

Exp. No.	Treatment mg/kg×times	³ H-TdR uptake (CPM×10 ⁻³)			
		LPS (μg/ml)			
		0.31	1.25	5.0	20.0
1	None	1.4	1.4	1.0	0.4
	10×7	0.3	0.3	0.3	0.2
2	None	10.2	7.9	6.1	0.7
	10×21	3.5	4.0	4.3	0.4
3	None	4.1	4.9	8.0	11.1
	10×17	1.7	1.7	3.4	4.5
4	None	8.0	11.3	11.7	11.1
	10×12	2.5	2.8	2.8	1.5
	None	30.3	25.7	17.6	20.3
	10×25	5.9	4.9	7.8	2.9
		0.08	0.4	2.0	10.0
5	None	3.2	9.0	22.6	18.8
	10×7	1.6	1.7	1.9	1.7
	10×7	3.6	2.5	4.2	5.4

Rats were sacrificed on the day after the final injection of EHDP.

た。同様の結果は、Nisbet⁹⁾によっても報告されている。すなわち、Grüneberg microphthalmic mice と op op osteopetrotic rat の病変は、骨髓細胞の移入により治癒するが、胸腺細胞の移入によっては治癒できなかったことから、骨吸収の調節における胸腺の役割を否定している。

われわれの結果の中で、EHDP 投与は脾細胞の LPS に対する分裂応答を低下させるという事実は、bisphosphonate の投与が必ずしも T 細胞系の機能低下のみをもたらすものではないことを示すとともに、osteopetrosis における破骨細胞の機能低下と免疫系細胞の機能低下との関連がもし存在するにしても、T 細胞系の細胞に限らないことを示すものである。しかしわれわれは、EHDP 投与ラット胸腺細胞のインターロイキン 1 に対する分裂応答が低下していたという結果を得ており、EHDP 投与は、胸腺細胞の機能低下をもたらし得ることが考えられる（未発表データ）。

破骨細胞は骨髓由来であり、単核球/マクロファージがその前駆細胞であるとの考えが有力である¹²⁾。Chambers ら¹³⁾は、osteopetrotic マウスの腹腔マクロフ

Table 4 LPS-induced proliferative response of spleen cells of EHDP-injected rats (single injection)

Exp. No.	Treatment mg/kg route		³ H-TdR uptake (CPM×10 ⁻³)			
			LPS (μg/ml)			
			0.32	1.25	5.0	20.0
1	None		2.8	3.0	2.9	1.5
	50	sc	0.6	0.8	0.8	0.6
			0.08	0.4	2.0	10
2	None		2.6	1.7	1.7	1.9
	0.01	ip	4.8	3.0	3.3	3.1
	1.0	ip	4.5	2.1	2.4	1.9
	100	ip	0.2	0.1	0.2	0.2
3	None		3.1	4.0	5.2	6.5
	10	ip	2.3	1.9	2.8	2.2
	100	ip	2.0	1.6	1.8	2.3

Rats were sacrificed on the day after the injection of EHDP

ァージは、spreading、ラテックス食食能および骨吸収刺激物質の産生能において低下していることを示した。また Minkin¹⁴⁾ は、osteopetrotic マウスのマクロファージは走化性が低下していることを示した。これらの結果は、osteopetrosis とマクロファージ機能との関連を示唆するものである。一方 bisphosphonate は、*in vitro* でマクロファージによる骨吸収を抑制すること⁵⁾、およびマクロファージによるインターロイキン 1 産生を抑制する⁶⁾ことが報告されている。また、bisphosphonate は *in vivo* で、破骨細胞の形態異常をもたらすとの報告もある^{3,7)}。これらのことから、bisphosphonate は骨髓由来細胞群の分化のある時期に作用し、一方ではその後のリンパ球系細胞の機能異常を、他方では単核球/マクロファージ系細胞、ひいては破骨細胞の機能異常をもたらすのではないかという推論も可能であると考えられる。

結 論

1) EHDP 投与による骨の変化を X 線学的に検索したところ、EHDP 単一投与で骨吸収の抑制が認められた。

2) EHDP の *in vivo* 投与により、脾細胞の LPS に対する分裂応答が著明に抑制されることがわかった。

3) 一方、EHDP 投与は、脾細胞の T-cell mitogen

(Con A) に対する分裂応答には明らかな影響をおよぼさなかった。

4) 以上の結果から, EHDP は骨病変を起こすとともに, 脾細胞, とりわけ B 細胞の mitogen に対する分裂応答性の低下を惹起することがわかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究の X 線学的検索を行う際に御協力頂きました本学放射線学教室の荒木和之先生に感謝いたします。

本稿をまとめるにあたり御尽力頂きました松本さえ技官に感謝いたします。

文 献

- 1) Fleisch, H. : Diphosphonates : History and mechanism of action. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.*, 4 & 5 : 279-288, 1981.
- 2) Russell, R.G.G., Kislig, A.M., Casey, P.A., Fleisch, H. : Effect of diphosphonates and calcitonin on the chemistry and quantitative histology of rat bone. *Calc. Tiss. Res.*, 11 : 179-195, 1973.
- 3) Muhlbauer, R., Russell, R.G.G., Fleisch, H. : Effect of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate. (Cl_2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage metaphysis of rats. *Calc. Tiss. Res.*, 11 : 196-214, 1973.
- 4) Shinoda, H., Felix, R., Fleisch, H. : Structure-activity relationship of diphosphonates with alkyl groups of various length. *Min. Electrol. Metab.*, 2 : 268-269, 1979.
- 5) Chambers, T.J. : Diphosphonates inhibit bone resorption by macrophages *in vitro*. *J. Pathology*, 3 : 255-262, 1980.
- 6) Aida, Y., Toda, Y., Shimakoshi, Y., Yamada, K., Aono, M. : Effect of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on the interleukin 1 production by macrophages. *Microbiol. Immunol.*, 30 (in press), 1986.
- 7) Milhaud, G., Labat, M.-L., Moricard, Y. : (Dichloromethylene) diphosphonate - induced impairment of T-lymphocyte function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 4469-4473, 1983.
- 8) Milhaud, G., Labat, M.-L., Parant, M., Damais, C., Chedid, L. : Immunological defect and its correction in the osteopetrotic mutant rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 339-342, 1977.
- 9) Nisbet, N.W. : Bone absorption and the immune system, *Scand. J. Immunol.*, 14 : 599-605, 1981.
- 10) Schneider, G.B., Byrnes, J.E. : Cellular specificity of the cure for neonatal osteopetrosis in the ia rat. *Expl. Cell Biol.*, 51 : 44-50, 1983.
- 11) Schneider, G.B., Relfson, M. : Immunological competence in osteopetrotic (ia) rats. *Immunobiol.*, 167 : 318-327, 1984.
- 12) Marks, Jr., S.C. : The origin of osteoclasts : Evidence, clinical implications and investigative changes of an extra-skeletal source. *J. Path.*, 12 : 226-256, 1983.
- 13) Chambers, T.J., Loutit, J.F. : A functional assessment of macrophages from osteopetrotic mice. *J. Path.*, 129 : 57-63, 1979.
- 14) Minkin, C. : Defective macrophage. Chemotaxis in osteopetrotic mice. *Calcif. Tissue Int.*, 33 : 677-678, 1981.