ラット歯槽骨培養上清 (Bone-sup) のラット腹腔 マクロファージ走化活性におよぼす影響

佐藤 巖雄 辰巳 順一 岩川 吉伸
藤 橋 弘 池田 克巳

城西歯科大学歯周病学講座

(主任：池田克巳教授)

(昭和62年12月20日受付)

The Effect of Rat Alveolar Bone-cultured Supernatant on the Chemotactic Activity of Rat Peritoneal Macrophages

Iwao SATO, Junichi TATSUMI, Yoshinobu IWAKAWA,
Hiroshi FUJIHASHI and Katsumi IKEDA

Department of Periodontology, Josai Dental University

(Chief: Prof. Katsumi IKEDA)

There have been several reports on mediators of enhancement of the chemotactic activity of mononuclear phagocytes. We looked for a mediator in alveolar bone by incubating the bone in RPMI 1640 medium with and without a stimulant, and studied the effect on the chemotactic activity of macrophages.

Fragments of alveolar bone were taken under sterile conditions from 8 week-old male Sprague-Dawley rats. Peritoneal macrophages were collected by intraperitoneal injection of 1% sodium chloride solution. Esterase activity and viability of the induced cells was more than 85% and 98% respectively. Rat alveolar bone supernatant (Bone-sup) was prepared by taking out the alveolar bone and incubating it in RPMI 1640 medium at 37°C, in 5% CO₂ in air. During incubation, the stimulants parathyroid hormone

(PTH) or sonicated *Bacteroides gingivalis* 381 (BG), or no stimulant were added. The effect of Bone-sup on chemotactic activity of macrophages was determined by the membrane filter method of bioassay in a multi-well chamber. In all experiments, N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine was used as a positive control.

Chemotactic activity of macrophages was enhanced by Bone-sup with or without a stimulant. The peak of chemotactic activity was reached in 96 hr of incubation.

Factors from rat alveolar bone or fragments of bone accelerated the chemotactic activity of macrophages, suggesting that the factor affects the function of macrophages.

Key words: Rat peritoneal macrophage, Alveolar bone, Chemotactic activity, Chemoattractant, FMLP

要旨: 近年、骨由来のマクロファージ (Mφ) 走化活性促進作用因子が骨吸収機序解明のうえで注目されてきている。

著者らは、とくに慢性辺縁性歯周炎で認められる骨吸収を指標にその骨由来因子を検索する目的で本実験を行った。すなわち、ラット下顎骨片を培養した培養上清 (Bone-sup) を用い、それがラット腹腔 M ϕ 機能に及ぼす影響について、特に走化活性の変化について検討をした。ラット腹腔 M ϕ は 1% オイスター・グリコーゲンにより誘導し、一方 Bone-sup は, stimulant 添加および無添加のものを作製し、実験に供した。

その結果, Bone-sup はラット腹腔 M ϕ に対し, active control として用いた FMLP と同程度あるいはそれ以上の chemoattractant 作用さらに走化機能亢進作用を有することが認められ、骨構成細胞を含む骨成分からの因子が、細胞機能に影響を与えることが示唆された。

索引用語：ラット腹腔マクロファージ、歯槽骨、走化活性、走化因子, FMLP

諸 言

骨吸収機序解明の一端として、Minkin ら^{1,2)}は、これを骨由来の走化性因子のうえから検討し、新生児マウス頭蓋冠を用い骨由来のマクロファージ (M ϕ) 走化活性を促進する作用因子 bone-derived chemotactic factor について興味ある知見を報告している。

著者らも歯周疾患で認められる骨吸収に関与する骨由来の因子を検索する一つの方法として、今回はまず予備的な実験として正常ラットから歯槽骨を摘出し、培養した骨培養上清とラット腹腔 M ϕ を用い、走化実験系の基礎的走化条件の検討および、歯槽骨培養上清のラット腹腔 M ϕ 走化活性におよぼす影響を検討した結果について報告する。

材料および方法

1. 実験動物

8週令 (体重 240~260 g) の Sprague-Dawley 系の雄性ラット (日本クレア) を用いた。

2. ラット腹腔細胞の採取

オイスター・グリコーゲン (Type II, Sigma) により誘導された腹腔 M ϕ を用いた。

すなわち、ラット腹腔に 1% オイスター・グリコーゲン生理食塩液 20 ml を注射し、96 時間後にエーテル麻酔下で開腹し、PBS にて洗浄し採取した。

なお、腹腔 M ϕ のエステラーゼ活性³⁾は 85%, 生存率は 98% 以上であった。

3. ラット下顎骨歯槽部 (歯槽骨) 培養上清 (Bone-sup) の作製法

ラット下顎骨の臼歯歯槽骨相当部を摘出し、血清無添加の RPMI 1640 培地 (以下, Me.) に stimulant を添加し一定時間培養を行い、その培養上清を試料とした (Fig. 1)。

すなわち、まず摘出したラット下顎骨の付着軟組織を可及的に除去し、その臼歯を抜去、抜歯窩の搔爬ののち臼歯歯槽骨相当部を約 1.5 mm 角の骨塊とし、multi dish 4 (NUNC) に 2 個/well ずつ入れ、Me. で 24 時間前培養後リンスした (この培養液を A bone-sup とする)。ついで、Fig. 1 に示すように新鮮 Me. 中に stimulant としてヒト PTH (ペプチド研究所) あるいは *Bacteroides gingivalis* 381 株の凍結乾燥菌体・超音波破壊遠心清 (BG 液) を 10 μ g/ml になるようおのおの調整し、well に 1 cc 当て添加し 24 時間培養、その培養液を B

Remove soft tissue from molar teeth of mandibula. After extracting the molar teeth took out, and remove the area indicated by the oblique lines.

Cut out a 1.5-mm square of alveolar bone in RPMI 1640 medium

Incubate with RPMI 1640 medium in a NUNC multi dish 4.

Incubate in RPMI 1640 medium for 24 hr (A-sup)

rinse

Add stimulant (PTH or BG) or nothing and incubate for 24 hr (B-sup)

rinse

Incubate for 48 hr with only RPMI 1640 medium (C-sup)

rinse

Incubate for 48 hr with only RPMI 1640 medium (D-sup)

Fig. 1 Preparation of Rat alveolar bone supernatants (Bone-sup)

Table 1 Influence of incubation time on chemotaxis of rat peritoneal macrophages

Time (min)	FMLP 10^{-8} M	mix sol.
90	43.0 ± 2.7	2.5 ± 1.3
120	52.1 ± 4.3	2.7 ± 1.3
150	78.6 ± 4.7	4.8 ± 2.7

No. of cells, $1 \times 10^7/\text{ml}$

bone-sup とした。培養後リンスし、さらに骨塊を新鮮 Me. で 48 時間培養 (C bone-sup) した。そしてさらにリンスし、新鮮 Me. で 48 時間培養 (D bone-sup) した。このようにして、A~D の Bone-sup を作製した。また、stimulant 無添加の Bone-sup についても同様の方法で作製した。

なお、上記操作はすべて無菌的に行い、歯槽骨の培養は 37°C 、5% CO_2 、95% moist air 中で行った。

4. 走化試験

走化試験は、multi-well chemotaxis chamber (Neuro Probe) を用いた membrane filter 法^{4,5)}で行った。

すなわち、membrane は $5\ \mu\text{m}$ pore size の poly-carbonate 製 chemotaxis membrane filter (Neuro Probe) を使用した。細胞浮遊液は、Gey buffer に 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma) と 30 mM HEPES (半井化学) を加え、これを重炭酸曹達で pH 7.0 に調整したもの (以下、Gey, BSA) を用いた^{6,7)}。

また、走化因子は chemotactic peptide である N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine^{8,9)} (FMLP, Sigma) を、Veronal buffer と Gey, BSA を 5:7 の割合で混合した溶液 (以下、mix sol.) により希釈して使用した。

上記によって作製した mix sol. を用いて走化因子あるいは Bone-sup を希釈してチャンバーの lower well に満たし membrane filter を装着したのち、upper well に細胞浮遊液のみあるいは Bone-sup を添加した細胞浮遊液を満たし、 37°C 、5% CO_2 、moist air 中で走化させた。なお mix sol. は FMLP および Bone-sup のコントロールとした。

走化能の測定は、走化後 membrane filter を取り出し、Diff Quick (国際試薬) にて固定・染色を行い、油浸にて倍率 800 倍で検鏡し filter 下面まで遊走した細胞数を、at random に 10 視野カウントし、1 視野平均の走化細胞数を算出した。

なお、上記の A~D Bone-sup についてはチェッカー

Table 2 Influence of number of cells on chemotaxis of rat peritoneal macrophages

No. of cells (/ml)	FMLP 10^{-8} M	mix sol.
1×10^6	4.3 ± 1.5	1.0 ± 1.2
2.5×10^6	10.2 ± 2.8	2.6 ± 1.8
5×10^6	29.1 ± 3.0	3.3 ± 1.2
1×10^7	66.8 ± 3.0	3.3 ± 1.5

incubation time, 150 min

ボード分析を Zigmond と Hirsch の方法¹⁰⁾に従って行った。すなわち、各種 Bone-sup を 0~50% (v/v) に調整し、lower well および upper well に加え走化実験を行った。

なお、上記走化実験すべては、triplicate で行い、平均値および標準偏差を求めた。

5. 統計学的分析

Bone-sup 添加による走化促進効果についての統計学的処理は、t 検定に従って行った。

実験結果

1. 走化条件に関する検討

走化実験を行う前に、走化条件に関する基礎的な検討を行った。

(1) 走化時間および走化細胞数

Table 1 に示すように、90 分および 120 分での走化細胞数に比較して、150 分では走化細胞数に著しい増加が認められた。特に 150 分走化では、filter の pore 中の細胞はわずかであった。

一方、添加した細胞数と走化細胞数について、走化因子である FMLP に対する走化実験で検討すると、Table 2 に示すように $1 \times 10^7/\text{ml}$ 細胞濃度においては、 66.8 ± 3.0 個/視野であった。なお、FMLP については 10^{-10}M ~ 10^{-7}M 濃度範囲においては、 10^{-8}M 濃度が最も走化細胞数が多かった。

(2) Gey, BSA 中のヘパース濃度

ラット腹腔 Mφ を 10 mM から 70 mM のヘパースを含む Gey, BSA にて浮遊させ、走化因子に FMLP を用い走化実験を行ったところ、Fig. 2 に示すようにヘパース濃度の上昇とともに走化細胞数が上昇し、30 mM でピークが認められた。しかし、コントロール (mix sol.) では著明な変化は認められなかった。

ところで、細胞に対する毒性を調べる目的で培養 150 分後における生存率を trypan blue を用いた dye excl-

Fig. 2 Effect of HEPES concentration on chemotaxis of rat peritoneal macrophages

Fig. 3 Effect of Bone-sup on chemotaxis of rat macrophages. Bone-sup added to lower chamber. *, significantly different from the control (FMLP 10^{-8} M) at $P < 0.05$

usion test により測定したところ, 10 mM から 40 mM ヘブス濃度ではほぼ 95% 前後の生存が認められた。

以上の, 走化条件の基礎的な検討から, この走化実験では走化時間 150 分, 腹腔 Mφ 数 $1 \times 10^7/\text{ml}$ および細胞浮遊液には 30 mM ヘブスを加えた Gey, BSA を用いて以下の走化実験を行った。

Fig. 4 Effect of Bone-sup on activation of rat macrophages. Bone-sup added to upper chamber. * and **, significantly different from the control (Bone-sup free) at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

2. ラット腹腔マクロファージ走化活性におよぼす Bone-sup の効果

(1) Bone-sup の chemoattractant 作用

Bone-sup の chemoattractant 作用について検討するために, チャンバーの lower well に mix sol. で 2 倍に希釈した Bone-sup を添加し, 走化実験を行った。Fig. 3 に示すように, BG 液, PTH およびこれら stimulant 無添加のそれぞれの A~D の Bone-sup で, 走化 Mφ 数の増加が認められ, 特に各種 Bone-sup ではいずれも C bone-sup で著明であった。active control として用いた FMLP 10^{-8} M に対する走化細胞数は 38.9 ± 4.0 であり, Bone-sup の chemoattractant 作用が FMLP と同程度あるいはそれ以上であることが分った。

なお, random migration (chemokinesis) は 9.8 ± 0.7 個/視野であった。

(2) 腹腔 Mφ の走化活性に対する作用

腹腔 Mφ 走化活性の直接的な Bone-sup の影響について検討するために, チャンバーの upper well に添加する Mφ に Bone-sup を加え, 走化細胞数の変化について検討した結果, Fig. 4 に示すように Bone-sup の添加に

Table 3 Checkerboard analysis of Bone-sup with PTH added

		Concentration of PTH-treated Bone-sup in upper chamber			
		0	3.1%	12.5%	50.0%
Concentration of PTH-treated Bone-sup in lower chamber	0	0.77±0.77	2.23±1.30	7.67±2.35	10.07±1.51
	3.1%	6.13±1.90	4.37±1.45	14.10±2.06	28.30±2.83
	12.5%	21.10±2.57	15.50±2.35	25.10±2.41	38.87±3.87
	50.0%	50.97±2.82	49.23±4.64	64.70±3.73	40.00±4.23

Table 4 Checkerboard analysis of Bone-sup with BG added

		Concentration of BG-treated Bone-sup in upper chamber			
		0	3.1%	12.5%	50.0%
Concentration of BG-treated Bone-sup in lower chamber	0	1.27±0.94	3.90±1.42	11.63±3.21	22.63±3.66
	3.1%	9.73±2.48	8.30±1.82	16.47±2.57	22.07±2.55
	12.5%	17.50±1.85	19.13±3.07	17.53±3.06	30.77±2.98
	50.0%	57.10±4.51	33.40±3.99	29.77±2.42	33.57±5.12

Table 5 Checkerboard analysis of stimulant-free Bone-sup

		Concentration of stimulant-free Bone-sup in upper chamber			
		0	3.1%	12.5%	50.0%
Concentration of stimulant-free Bone-sup in lower chamber	0	1.00±0.74	1.57±0.92	4.33±1.86	6.53±1.94
	3.1%	6.76±1.55	2.43±1.25	7.00±2.44	11.87±2.83
	12.5%	18.83±1.62	13.47±1.96	11.53±2.27	14.37±2.48
	50.0%	30.97±2.65	24.60±2.92	21.17±4.03	18.73±3.33

より走化 Mφ 数の増加が認められた。特に各種の Bone-sup とともに C bone-sup で著明であった。

(3) Bone-sup のチェッカーボード分析

Bone-sup のチェッカーボード分析の結果から Table 3, 4 および 5 に示すように、本走化実験においては random migration の亢進ではなく chemotaxis の亢進であることが示された。

考 察

マクロファージ (Mφ) の代表的機能である走化活性を検討するために、Boyden¹¹⁾ は、membrane を用いた方法を開発したが、近年、48 well の chemotaxis chamber を用いた membrane filter 法が Falk ら⁹⁾ により報告され、微量で多くの検体を同時に測定できるようになった。

教室でもこの方法を導入し、ヒト末梢血単球、好中球さらにラット腹腔 Mφ の走化実験を行ってきている。本稿でのラット腹腔 Mφ を用いた実験系においては、コン

トロールの mix sol. での random migration (chemokinesis) は 1~7 個/視野であるのに対し、active control として用いた FMLP に対しては chemotaxis として十分な走化細胞数が得られ、 10^{-8} M 濃度で一視野当り 78.6 ± 4.7 個であった (Table 1)。

また、細胞浮遊液である Gey, BSA 中のヘベス濃度は 20 mM¹²⁾ あるいは 25 mM¹³⁾ で使用されている系が多いが、今回の実験結果から 30~40 mM では低濃度 (10~20 mM) および高濃度 (50~70 mM) に比較して遊走細胞数の増加が認められ、30 mM 濃度においてピークがみられた。このヘベス濃度については、他種類の細胞を用いた走化実験を行いより詳細な検討を進めているが、本実験で用いたラット腹腔 Mφ についてトリパンブルーを用いた dye exclusion test においては、70 mM ヘベス濃度においても染色細胞数は 20% 以下であった。

一方、骨の破壊機序およびその破壊に関与する細胞については多くの報告^{14~18)}があるなかで、単球—マクロファージ系細胞の関与が示唆される報告、さらにこの Mφ 系細胞の代表的機能の一つである走化活性を亢進させる

骨由来因子についての報告などがいくつか出され、骨吸収との関連のうえでも注目されている。つまり、Minkinらは新生児マウスカルバリアを用い、これをホモジナイズあるいは4°C、48~72時間攪拌して得られた抽出物のマウス腹腔Mφ走化能に対する影響を検討し、このbone derived chemotactic factorの本細胞走化能の亢進作用さらに、このfactorのcharacterizationについては分子量14,000~67,000ダルトンのlipidであると報告し、この因子が骨のリモデリングに関連したパラクラインコントロールの1つではないかと、想定している。さらにMundyら¹⁹⁾は、骨吸収領域における骨基質由来の組織特異的なペプチドにより、血液単球が遊走して骨吸収に関与していると報告し、またSakamotoら²⁰⁾は骨コラーゲン分解ペプチドが単核の前駆破骨細胞に対して走化誘起因子として働くことを報告している。

そこで著者らも骨由来因子を検討したいために骨から遊離される因子について検討するためにpreliminaryな実験を企画した。すなわち、ラット歯槽骨を摘出後Me.中で培養することによって骨由来のmediatorを得、さらにこの培養上清を用いて今回は同系ラットの腹腔Mφ走化能への効果について検討した。

特に、stimulant無添加のBone-sup (stimulant free Bone-sup)において、FMLPと同程度のchemoattractant作用(Fig. 3)ならびに強力な走化機能亢進作用(Fig. 4)を示したことは大変興味あるデータであり、Minkinらの言う「骨のリモデリング」に関与する因子が骨からの伝達因子として周囲細胞へ作用している可能性が考えられる。さらに、本実験系で骨培養系へのstimulantとして用いたPTHおよびBGを添加して作製したBone-sup (PTH treated Bone-sup および BG treated Bone-sup)の作用がstimulant-free Bone-supにくらべて作用効果が大きかった理由の一つとして、骨構成細胞活性化による働きが考えられるが、今後骨構成細胞と骨ならびにeffector cellの動態についての詳細な検討が必要と考えられる。

現在教室では、歯周組織に炎症を惹起したラットの歯槽骨を培養し作製したBone-supを使用した系での検討を加えるとともに、Bone-supのcharacterizationを行っている。

結 果

正常ラット歯槽骨から得たBone-supとラット腹腔Mφを用いた走化実験から、以下に示す結論を得た。

1. ラット腹腔Mφ走化条件の基礎的検討を行った結果は、①走化時間150分、②Mφ数 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 、③細胞浮遊液中でのヘベス濃度は30 mM、であった。

2. Bone-sup (ラット歯槽骨培養上清)は、ラット腹腔Mφに対し走化性因子であるFMLPと同程度あるいはそれ以上のchemoattractant作用を有し、特にPTHあるいはBG液およびこれらstimulant無添加の各種Bone-supではいずれもC bone-supで著明であった。

3. さらにBone-supは、ラット腹腔Mφに作用し、走化活性の亢進作用を示したが、上記各種Bone-supではいずれもC bone-supでその作用は著しかった。

4. Bone-supのチェッカーボード分析から、本走化実験における走化細胞数の増加は、chemotaxisの亢進によることが確認された。

文 献

- 1) Minkin, C., Posek, R. and Newbrey, J. : Mononuclear phagocytes and bone resorption : Identification and preliminary characterization of a bone-derived macrophage chemotactic factor. *Metab. Bone Dis. & Rel. Res.*, 2 : 363-369, 1981.
- 2) Minkin, C., Bannon Jr, D.J. and Pokress, S. : Bone-derived macrophage chemotactic factors : Methods of extraction and further characterization. *Calcif. Tissue Int.*, 37 : 63-72, 1985.
- 3) Yam, L.T., Li, C.Y. and Crosby, W.H. : Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.*, 55 : 283-290, 1971.
- 4) Falk, W., Goodwin Jr, R.H. and Leonard, E.J. : A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immunol. Methods*, 33 : 239-247, 1980.
- 5) Harvath, L., Falk, W. and Leonard, E.J. : Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis : use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multi well assembly. *J. Immunol. Methods*, 37 : 39-45, 1980.
- 6) Wahl, S.M. : Corticosteroid inhibition of chemotactic lymphokine production by T and B lymphocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 256 : 375-

- 385, 1975.
- 7) Wahl, S.M., Altman, L.C., Oppenheim, J.J. and Mergenhagen, S.E. : *In vitro* studies of a chemotactic lymphokine in the guinea pig. *Int. Arch. Allergy*, 46 : 768-784, 1974.
- 8) Schiffmann, E., Corcoran, B.A. and Wahl, S.M. : N-Formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72 : 1059-1062, 1975.
- 9) Aswanikumar, S., Schiffmann, E., Corcoran, B.A. and Wahl, S.M. : Role of peptidase in phagocyte chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73 : 2439-2442, 1976.
- 10) Zigmond, S.H. and Hirsch, J.G. : Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of cell-derived chemotactic factor. *J. Exp. Med.*, 137 : 387-410, 1973.
- 11) Boyden, S. : The chemotactic effect of mixture of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, 115 : 453-466, 1962.
- 12) Landesman, R. and Reddi, A.H. : Chemotaxis of muscle-derived mesenchymal cells to bone-inductive proteins of rat. *Calcif. Tissue Int.*, 39 : 259-262, 1986.
- 13) Boumsell, L. and Meltzer, M.S. : Mouse mononuclear cell chemotaxis I. Differential response of monocytes and macrophages. *J. Immunol.*, 115 : 1746-1748, 1975.
- 14) Howard, G.A., Bottemiller, B.L., Turner, R.T., Rader, J.I. and Baylink, D.J. : Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture : Evidence for a coupling mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78 : 3204-3208, 1981.
- 15) Chambers, I.J. and Magnus, C.J. : Calcitonin alters behavior of isolated osteoclasts. *J. Pathol.*, 136 : 27-39, 1982.
- 16) Burger, E.H., Van Der Meer, J.W.M. and Nijweide, P.J. : Osteoclast formation from mononuclear phagocytes : Role of Bone-forming Cells. *J. Cell Biol.*, 99 : 1901-1906, 1984.
- 17) Weinberg, J.B., Hobbs, M.M. and Musukonis, M.A. : Recombinant human γ -interferon induces human monocyte polykaryon formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81 : 4554-4557, 1984.
- 18) Bertolini, D.R., Nedwin, G.E., Bringman, T.S., Smith, D.D. and Mundy, G.R. : Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumour necrosis factors. *Nature.*, 319 : 516-518, 1986.
- 19) Mundy, G.R., Varani, J., Orr, W., Gondek, M. D. and Ward, P.A. : Resorbing bone is chemotactic for monocytes. *Nature*, 275 : 132-135, 1978.
- 20) 坂本征三郎 : コラゲナーゼと骨代謝, 浜田茂幸, う蝕と歯周病—研究の進歩— [3], 日本歯科評論社, 東京, 1985, 143-173.