原 著

順天堂医学 40(1)
P. 52 ~ 60 (1994)

Lipopolysaccharide (LPS) とヘパリンの 骨吸収作用におけるサイトカインの関与

Effect of cytokine on chick osteoclast activity
stimulated by lipopolysaccharide and heparin

濱 田 千江子* 窪 田 実* 富 野 康日己*
CHIEKO HAMADA, M.D. MINORU KUBOTA, M.D. YASUHIKO TOMINO, M.D.
小 出 輝*
HIKARU KOIDE, M.D.

骨新生が行われる微小環境下での lipopolysaccharide (LPS) とヘパリンの骨吸収促進効果は、まず破骨細胞に隣接する骨芽細胞や骨髄の単核細胞からのサイトカイン産生を促し、この分泌されたサイトカインが直接的に破骨細胞の骨吸収活性を刺激することを、雛鶏の骨髄からの分離破骨細胞を用いて検討した。

LPS ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) は、血清成分非添加培養下で効果を示し、その作用はシクロスポリン A ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) で抑制され、インドメサシン (10^{-5}M) では変化がなかった。ヘパリンは血清成分の有無にかかわらず破骨細胞の骨吸収活性を促進し、シクロスポリン A ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) で抑制され、インドメサシン (10^{-5}M) でも抑制される傾向がみられた。サイトカインの各種抗体を使用したところ、LPS およびヘパリンの効果は抗 TNF- α 抗体で有意に抑制された。あらかじめ LPS で処理した骨芽様細胞株である bone marrow-derived stromal cell (ST 2) や clonal osteogenic cell (MC3 T3-E1) と破骨細胞を co-culture すると、破骨細胞を LPS で直接刺激したのと同様に骨吸収は促進され、この効果は抗 TNF- α 抗体で抑制された。

以上の結果より、LPS およびヘパリンの破骨細胞への効果は、骨芽様細胞や骨髄の単核細胞から産生されたサイトカインの 1 つである TNF- α の分泌促進を介するものであることが示された。

キーワード：破骨細胞、骨芽細胞、骨吸収、サイトカイン、シクロスポリン A、リボポリ
サッカライド、ヘパリン

Key words: osteoclast, osteoblast, bone resorption, cytokine, cyclosporin A,
lipopolysaccharide, heparin

緒 言

骨新生は骨形成相－骨吸収相－骨休止相からなり、骨形成相は主に骨芽細胞 (osteoblast) が、骨吸収相は破骨細胞 (osteoclast) が担っている

と考えられている。近年、骨表面の各種細胞が形成する微小環境 (microenvironment) の概念が広く認められ、骨代謝においての各細胞間の相互作用が注目されてきた。この結果情報伝達系としての骨細胞間での <gap-junctional intercellular communication> の存在が示唆されている¹⁾²⁾。

さらに、従来から知られる骨細胞以外の骨髄中に存在する細胞が、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, PTH) などの刺激に対して、骨代謝調節因子の産生を介して骨芽細胞や破骨細胞の

* 順天堂大学医学部内科学教室腎臓内科学講座
Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan
〔Oct. 21, 1993 原稿受領〕 (Dec. 16, 1993 掲載決定)

活動性に関与する³⁾⁴⁾ことが推察されている。

殊に骨吸収に関しては、PTH やビタミン D₃ のような骨吸収因子 (general factor)⁵⁾の他に、微小環境下で作用する局所因子 (local factor) としての各種サイトカインが、破骨細胞の骨吸収活性に重要な役割を果たしていることが報告されている^{6)~10)}。

従来の実験で破骨細胞の骨吸収活性を促進する¹¹⁾とされている lipopolysaccharide (LPS) は、グラム陰性菌の細胞壁の主要成分であり、歯牙組織を破壊する毒素および酵素として注目されている¹²⁾¹³⁾。その後、LPS が肢骨や頭蓋骨の培養系において、破骨細胞の骨吸収能を亢進させる効果が見いだされ、骨吸収に関する様々な作用機序が提唱されているが¹⁴⁾¹⁵⁾、未だ明らかではない。同様に骨吸収促進作用が認められているヘパリンは、その抗凝固作用から広く臨床作用されているが、以前からヘパリン使用患者での骨折治癒の遷延¹⁶⁾や骨粗鬆症¹⁷⁾の好発の報告から、骨代謝への影響が推察されていた。しかし、破骨細胞へのヘパリンの直接作用については、著者らが報告した¹⁸⁾強い塩基性物質としての〈charge effect〉と、lysosomal enzyme を介した効果が影響されているにすぎない。

今回、著者らは微小環境での LPS およびヘパリンの骨吸収亢進効果が、破骨細胞への直接的な効果のほかに、隣接する骨芽細胞や骨髄の単核細胞からのサイトカインの産生、放出を介しての作用であるか否かを、分離破骨細胞培養系でサイトカインの各種抗体を用いて検討した。

方 法

実験には SPAFAS 社 (Norwich CT) から購入した Leghorn 受精卵の胎生16~18日の chick を使用した。LPS (*E. coli* 055 : B5 株由来)・ヘパリン・インドメサシンは、SIGMA 社 (St. Louis MO) より購入した。シクロスポリン A (Cs A) は Sandoz 社 (East Hanover NJ) より供与された。

抗サイトカイン抗体は、骨吸収亢進作用の認められる interleukin-1 (IL-1) と interleukin-6 (IL-6)・tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) を、また骨吸収抑制作用があるとされる tumor necrosis factor-beta (TNF- β) の抗体を EPOGEN 社 (Boston MA) から購入した。

Bone marrow-derived stromal cell line (ST2) は理研 (Tsukuba Japan) から購入、clonal osteogenic cell line (MC3T3-E1) は明海大学歯学部久米川正好先生のご好意により供与された。

この分離破骨細胞の培養は、既報¹⁹⁾²⁰⁾の方法によった。

1. 骨吸収活性の測定

実験系は Chambers ら²¹⁾、Boyde²²⁾らの変法であり、胎生16~18日の chick の肢骨骨髓から得られた分離細胞を0.1%アルブミン含有の Medium 199 (Earle's salt を含む) に浮遊させ細胞浮遊液を作り、予め骨片を静置させた同様の培養液に満たされた培養皿にその浮遊液を加えた。これを 37°C、5% CO₂ の培養器内で24時間培養の後培養液を廃棄し、0.1M cacodylate buffer (pH 7.3) を含んだ2%グルタルアルデヒドで固定した。細胞を超音波衝撃によって骨片上から剝離し、トルイジンブルー染色で骨片を染色した。次いで、光学顕微鏡下で全骨片上の青染された破骨細胞の形成した吸収窩数を数え、その数を破骨細胞の骨吸収活性とした。

2. 破骨細胞の測定

骨片上の多核の細胞は、トルイジンブルー染色で核数3核以上、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) で2核以上を破骨細胞と判断して、全視野での数を算出した。

3. LPS 前処置 ST2 および MC3T3-E1 細胞の培養

骨髓から抽出の分離破骨細胞の培養に先行して、10% fetal calf serum (FCS) を含んだ α -minimum essential medium (MEM) 培養液の入った培養皿に骨片を静置し、10⁵/mm³ の ST2 あるいは MC3T3-E1 細胞を播種し、同時に LPS (10 μ g/ml) を添加して37°C 5%の培養器内で24時間培養を行った。

結 果

1. LPS およびヘパリンの効果に対する培養液中の血清濃度

LPS の破骨細胞の吸収窩形成促進効果は, 血清の含まれない培養液では, 対照群と比較して有意に発現されたが ($p < 0.01$), 10% 血清含有培養液では対照群とほぼ同様の吸収窩数であった (Tab.-1).

ヘパリンの破骨細胞の活動性に対する効果は, 0.01% の BSA 培養液では, 吸収窩数は対照群で 3.6 ± 1 であったのに対し, $5 \mu\text{g/ml}$ のヘパリン添加群では, 5.6 ± 1 と有意に増加していた ($p < 0.05$). 更に 5% の血清含有培養液でも, 対照群の吸収窩数は 29 ± 5 であったのに対して, ヘパリン添加群では 52 ± 5 であった. ヘパリンの破骨細胞への効果は, LPS とは異なり培養液中の血清の存在にもかかわらず, 十分に発現された ($p < 0.01$).

2. 濃度依存性

$0.1 \mu\text{g/ml}$ $1.0 \mu\text{g/ml}$ $10 \mu\text{g/ml}$ の LPS と $5 \mu\text{g/ml}$ $25 \mu\text{g/ml}$ $125 \mu\text{g/ml}$ のヘパリンの chick の破骨細胞への効果は, Fig.-1 (a) (b) で示す通り, いずれも濃度依存性があった.

3. シクロスポリリン A の効果

Tab.-1 EFFECT OF LPS ON THE NUMBER OF EXCAVATED PITS IN 24H CULTURES SUPPLEMENTED WITH OR WITHOUT SERUM

	control	$10 \mu\text{g/ml}$ LPS
0.1% BSA	29 ± 5	68 ± 20^a
2.5% FBS	41 ± 6	56 ± 10
10% FBS	68 ± 17	69 ± 12

Number of excavated pits per slice was determined by toluidine blue staining. The data are shown as mean $\pm$ SEM for 5 chicks. P values are for differences from individual control.

a: $p < 0.01$

LPS の破骨細胞の活動性への影響は, Fig.-2 で示す通り, CsA によって有意に抑制された. ヘパリンの骨吸収亢進効果への CsA の作用は, 著者らが以前ラットの破骨細胞で示した³²⁾と同様に, ヘパリン単独群が 51 ± 10 であったのに対し, CsA 併用群では 21 ± 5 と有意に抑制されていた ($p < 0.02$).

4. インドメサシンと抗サイトカイン抗体の効果

10^{-5}M のインドメサシンを $10 \mu\text{g/ml}$ の LPS とともに, 分離破骨細胞の入った培養皿に投与したところ, LPS の骨吸収活性の促進効果は抑制されなかったが (Fig.-3 a), $5 \mu\text{g/ml}$ のヘパリンと併用した場合には, ヘパリン単独群と比べ抑制

Fig.-1 a Dose-dependent effect of LPS on the number of excavated pits per slice.

Values are mean $\pm$ SEM for 5 chicks. Significantly different from control: a, $p < 0.05$, b, $p < 0.001$.

Fig.-1 b Dose-dependent effect of heparin on the number of excavated pits per slice.

Values are mean $\pm$ SEM for 5 chicks. Significantly different from control: c, $p < 0.001$.

Fig. - 2 Effect of $0.1 \mu\text{g/ml}$ CsA on the number of excavated pits by LPS-stimulated chick osteoclasts. Values are mean $\pm$ SEM for 5 chicks. Significantly different from control: a, $p < 0.01$.

される傾向にあった (Fig. - 3 b).

骨髄からの分離細胞を骨片上に播種後, LI-1 LI-6 TNF- α TNF- β のそれぞれ抗体 ($20 \mu\text{l}$) を, 直ちに添加し24時間培養した結果, LPS で刺激された破骨細胞の呼吸窩数 (96 ± 6) は, 切片

Tab. - 2 EFFECT OF CYTOKINE ANTIBODIES ON CHICK OSTEOCLAST ACTIVITY STIMULATED BY LPS^a

	No. of pits	No. of MNC
control	37 ± 7^b	7 ± 1
LPS ($10 \mu\text{g/ml}$)	96 ± 6	12 ± 3
LPS +IL-1 antibody	92 ± 5	10 ± 3
LPS +IL-6 antibody	100 ± 12	8 ± 2
LPS +TNF- α antibody	65 ± 9^c	14 ± 2
LPS +TNF- β antibody	96 ± 21	11 ± 4

a Number of multinuclear cells (MNC) was determined by TRAP and toluidine blue staining and of pits by toluidine blue staining. The data are shown as mean $\pm$ SEM for 5 chicks.

b $p < 0.001$ compared to LPS alone.

c $P < 0.01$ compared to LPS alone.

上の破骨細胞数に差が無いにもかかわらず, 抗TNF- α 抗体を添加した群で 65 ± 9 と有意に減少していた ($p < 0.01$) (Tab. - 2). 抗 IL-1 抗 IL-6

Fig. - 3 a Effect of 10^{-5}M indomethacin on the number of excavated pits by LPS-stimulated chick osteoclasts. Values are mean $\pm$ SEM for 5 chicks. Significantly different from control: a, $p < 0.002$.

Fig. - 3 b Effect of 10^{-5}M indomethacin on the number of excavated pits by heparin-stimulated chick osteoclasts. Values are mean $\pm$ SEM for 5 chicks. Significantly different from control: a, $p < 0.002$, b, $p < 0.05$.

抗 TNF- β 抗体は, LPS によって刺激された破骨細胞の骨吸収活性を抑制できなかった. 同時に各抗体単独投与群の細胞数および吸収窩数を調べたが, 対照群との間に有意な差は認められなかった.

また, 破骨細胞の骨吸収活性は, ヘパリンに抗 TNF- α 抗体を添加した群では, LPS 単独投与群の 159 ± 29 に対して, 123 ± 16 と有意に抑制されていた ($p < 0.05$) (Fig. - 4).

5. 前処置を施した ST2 および MC3T3-E1 との培養

骨切片上にあらかじめ ST2, あるいは MC3T3-E1 を播種し $10 \mu\text{g/ml}$ の LPS で 24 時間培養後, 試薬や血清を含まない培養液に置換し, 直ちに分離破骨細胞を骨切片上に上乗せして, さらに 24 時間培養した.

破骨細胞は直接 LPS と接しないにもかかわらず, 前処置した ST2 や MC3T3-E1 と coculture することにより, 対照群 (ST2 : 66 ± 10 MC3T3-

Tab. - 3 EFFECT OF CYTOKINE ANTIBODIES ON CHICK OSTEOCLAST ACTIVITY ON A CO-CULTURE OF LPS-PRETREATED ST2 AND MC3T3-E1^a

Osteoclasts+ST2	No. of pits	No. of MNC
control	66 ± 10^b	16 ± 5
LPS ($10 \mu\text{g/ml}$)	120 ± 21	12 ± 3
LPS + IL-1 antibody	96 ± 9	14 ± 4
LPS + IL-6 antibody	85 ± 9	12 ± 2
LPS + TNF- α antibody	40 ± 7^b	11 ± 1
LPS + TNF- β antibody	97 ± 12	10 ± 2

Osteoclasts+MC3T3-E1	No. of pits	No. of MNC
control	70 ± 11	55 ± 10
LPS ($10 \mu\text{g/ml}$)	128 ± 20	51 ± 6
LPS + IL-1 antibody	94 ± 32	68 ± 10
LPS + IL-6 antibody	103 ± 14	76 ± 24^d
LPS + TNF- α antibody	82 ± 18^c	41 ± 8
LPS + TNF- β antibody	105 ± 20	38 ± 16

a Number of multinuclear cells (MNC) was determined by TRAP and toluidine blue staining and of pits by toluidine blue staining. The data are shown as mean $\pm$ SEM for 5 chicks.

b $p < 0.02$ compared to LPS alone.

c $p < 0.02$ compared to LPS alone.

d $p < 0.02$ compared to control.

	No. of pits per slice	No. of TRAP(+) cells
control	72 ± 7	29 ± 8
heparin ($5 \mu\text{g/ml}$)	143 ± 27	70 ± 9
heparin + IL-1 antibody	150 ± 17	78 ± 9
heparin + IL-6 antibody	148 ± 20	89 ± 19
heparin + TNF- β antibody	138 ± 20	102 ± 14

Fig. - 4 Effect of cytokine antibodies on chick osteoclast Values are mean $\pm$ SEM for 5 chicks for each experiment. Significantly different from control : a, $p < 0.001$, and from heparin alone : b, $p < 0.05$.

Fig. - 5 Time-course dependent effect of CsA on the number of excavated pits by LPS-stimulated chick osteoclasts. Values are mean $\pm$ SEM for 5 chick. Significantly different from control : a, $p < 0.02$, b, $p < 0.01$.

E1: 70 ± 11) と比較して ST2 では 120 ± 21 , MC3T3-E1 では 128 ± 20 と有意に骨吸収活性が上昇していた (各々 $p < 0.02$ $p < 0.01$) (Tab.-3)。

この効果は破骨細胞と同時に抗 TNF- α 抗体を投与すると, ST2 では 40 ± 7 ($p < 0.02$), MC3T3-E1 では 82 ± 18 ($p < 0.02$) を示し, LPS 単独投与群に比較して明らかに抑制されていた (Tab.-3)。IL-1 IL-6 TNF- β の抗体を投与した場合には, いずれも吸収窩数に変化は認められなかった。

さらに, この co-culture 系を用いて細胞毒性を示さない濃度の CsA を投与し, この効果が骨芽細胞・破骨細胞のいずれにも作用し, 骨吸収活性を抑制するかを検討した。CsA を破骨細胞と同時に添加した場合, 骨表面の破骨細胞数の有意な減少とともに, 骨吸収窩の低下が認められた (Fig.-5)。

考 察

近年, 骨新生に破骨細胞や骨芽細胞・類骨細胞, さらに骨髄細胞や血中の細胞が相互に作用し合っていることが解明されてきている^{1)~4)}。細胞相互の情報伝達の方法として, 可溶性物質の産生殊にサイトカインの分泌^{8)~12)23)}と<gap-junctional intercellular communication>の存在が, 次々と報告され¹⁾²⁾, 破骨細胞の骨吸収作用の調節に関して免疫機能が重要な役割を果たすことが明らかとなり, 骨新生の起きている微小環境下での, 局所因子 (local factor) が注目をあびている^{8)~14)}。

McSheehy らは PTH やビタミン D₃ で, ラットの骨肉腫由来のクローン細胞 (UMR106) を刺激すると, 培養液中に破骨細胞の骨吸収活性を促進する可溶性の物質が分泌されることを報告した⁴⁾。彼らはさらにこの物質が凍結や 4℃での冷所保存に安定で, 分子量 2,000 以上であることを報告している。この報告によって, なんらかの刺激に対して骨芽細胞や骨髄由来細胞が, サイトカインを始めとする局所因子の分泌を介し, 破骨細胞の骨吸収活性を促進する機序が存在することが

示唆された。今回の著者らの分離破骨細胞を用いた実験の結果, LPS およびヘパリンも骨芽細胞や骨髄幹細胞系細胞に作用してサイトカインの産生・放出を促し, これを介して破骨細胞の骨吸収をすることが明らかとなった。

歯牙疾患の病因として着目され, 肢骨や頭蓋骨の全骨培養から, 破骨細胞の刺激物質の 1 つとされている LPS は, その作用機序として従来から lysosomal enzyme の分泌やコラゲナーゼ活性の刺激が重要とされている¹⁴⁾¹⁵⁾。Hausmann らは LPS の Lipid A の部分が, 破骨細胞の細胞膜上のレセプターと直接結合して効果を発揮すると報告した²⁴⁾。その後, 腹腔内のマクロファージや末梢血中の単核細胞, マウスの脾細胞の培養で, LPS が培養液中の IL-1 IL-6 TNF- α の濃度を上昇させる作用があるとの報告^{13)25)~28)}や, マクロファージや単核細胞を使った頭蓋骨の培養で, IL-1 や TNF- α ・osteoclast-activating factor (OAF)・PGE₂ が, 骨からの Ca⁴⁵ 流出を亢進させるとの報告²⁵⁾と, 今回の結果を総合すると, 破骨細胞の近傍に存在する骨芽細胞や単核細胞が LPS の刺激で, サイトカインの 1 つである TNF- α を分泌し, TNF- α が破骨細胞の骨吸収活性を促進すると考えられる。また今回, 抗 IL-1 IL-6 TNF- β 抗体では LPS の作用は抑制されなかったが, これらサイトカインも単独では有効な効果を示さぬ程度の, 骨芽細胞や単核細胞から産生がみられる可能性は残されている。

骨芽細胞や単核細胞に対する LPS の作用として, 最近 Samuel らは LPS が血漿中の lipopolysaccharide binding protein (LBP) と結合して LPS-LBP 複合体を形成し, この複合体の LBP 部分がマクロファージや単核細胞膜表面の特異的レセプターと結びつき, サイトカインの分泌を促すことを発表²⁶⁾²⁹⁾³⁰⁾し注目をあびた。しかし, 今回の研究では, LPS の作用は血清の存在の有無にもかかわらず発揮されることから, 必ずしも LBP を必要としない経路でのサイトカインの分泌があると推察される。また, ヘパリンは LPS に比較して破骨細胞の活性刺激効果が強く, 抗サイトカ

イン抗体で抑制されるほかに, インドメサシンでも抑制される傾向があり, 著者らがすでに報告した結果¹⁸⁾とあわせ, ヘパリンの破骨細胞への作用には複数の経路が存在すると考えられた。

今回, LPS およびヘパリンの免疫機構への関与を検討するため CsA を使用したが, CsA による LPS の破骨細胞への効果の抑制は, サイトカインの分泌細胞である骨芽細胞や骨髄幹細胞への LPS の作用に対してではなく, むしろ LPS により影響を受けた骨芽細胞のサイトカイン分泌に対して, 抑制効果を発揮すると推察された。

今後, サイトカインの破骨細胞への効果が, 未分化細胞から成熟破骨細胞への誘導促進効果, または破骨細胞の骨接着促進効果, あるいは成熟破骨細胞の活動性の促進効果の, いずれであるのか検討する必要があると思われる。しかし Murillらは, 外因性のサイトカインは破骨細胞の骨吸収活性を促進しえないことを報告しており³¹⁾, LPS やヘパリンが骨芽細胞や骨髄の単核細胞の TNF- α 分泌を介して, 破骨細胞の骨吸収を促進するというわれわれの成績は, LPS やヘパリンの作用メカニズムの解明に重要な所見といえよう。

結 語

1. LPS やヘパリンは, 血清を含まない培養で破骨細胞の活性を促進した。
2. LPS やヘパリンの分離破骨細胞への効果は, シクロスポリン A と抗 TNF- α 抗体で抑制された。
3. LPS で前処置された ST2 や MC3T3-E1 と破骨細胞を co-culture すると, 破骨細胞の活性は促進され, この効果は抗 TNF- α 抗体で抑制された。

稿を終えるにあたり, ご援助いただいた D.W. Dempster, PhD., M.H. Chowdhury, PhD. に深甚の謝意を表します。また, 本研究に重要な細胞を提供いただきました。明海大学歯学部米川正好教授のご好意に感謝いたします。

文 献

- 1) Schiller, P. C., Mehta, P. P. : Hormonal regulation of intercellular communication : parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells. *Mol. Endocrinol.*, **6** : 1433~1440, 1992
- 2) Umezawa, A. & Hata, J. : Expression of gap-junctional protein (connexin 43 or alpha 1 gap junction) is down-regulated at the transcriptional level during adipocyte differentiation of H1/A marrow stromal cells. *Cell Struct. Funct.*, **17** : 177~184, 1992
- 3) Gowen, M., Chapman, K., Littlewood, A., Hughes, D., Evans, D. & Russell, G. : Production of tumor necrosis factor by human osteoblasts is modulated by other cytokines, but not by osteotropic hormones. *Endocrinology*, **126** : 1250~1255, 1990
- 4) McSheehy, P. M. J. and Chambers, T. J. : 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates rat osteoblastic cells to release a soluble factor that increases osteoclastic bone resorption. *J. Clin. Invest.*, **80** : 425~429, 1987
- 5) Holtop, M. E., Raiz, L. G. and Simmons, H. A. : The effect of parathyroid hormone, colchicine and calcitonin on the ultrastructure and the activity of osteoclasts in organ culture. *J. Cell. Biol.*, **60** : 346~355, 1974
- 6) 佐藤幹二 : 骨・軟骨とサイトカイン. *実験医学*, **17** : 1261~1265 A, 1989
- 7) 赤津拓彦, 須田立雄 : 骨芽細胞と破骨細胞のカップリング機構. *臨床科学*, **25** : 627~634, 1989
- 8) Tashjian, Jr. A. H., Voelkel, E. F., Lazzaro, M., Singer, F. R., Roberts, A. B., Derynck, R., Winkler, M. E. and Levine, L. : α and β human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **82** : 4535~4538, 1985
- 9) Tashjian, Jr. A. H., Voelkel, E. F., Lazzaro, M., Goad, D., Bosma, T. and Levine, L. : Tu-

- mor necrosis factor- α (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinology*, **120** : 2029~2036, 1987
- 10) Hanazawa, S., Amano, S., Nakada, K., Ohmori, Y., Miyoshi, T., Hirose, K. and Kitano, S. : Biological characterization of interleukin-1-like cytokine produced by cultured bone cells from newborn mouse calvaria. *Calcif. Tissue. Int.*, **41** : 31~37, 1987
 - 11) Murray, C.M., Gowen, M. and Reynolds, J. J. : Effect of streptococcal cell wall components on bone metabolism *in vitro*. *Calcif. Tissue. Int.*, **34** : 359~364, 1982
 - 12) Van Winkelhoff A.J., Van Steenberghe T.J. M. and De Graaff J. : The role of black-pigmented bacteroides in human oral infections. *J. Clin. Periodontol*, **15** : 145~155, 1988
 - 13) Sherry, B. and Cerami, A. : Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J. Cell. Biol.*, **107** : 1269~1277, 1988
 - 14) Raisz, L.G., Alander, C., Eilon, G., Whitehead, S.P. and Nuki, K. : Effect of two bacterial products, muramyl dipeptide and endotoxin on bone resorption in organ culture. *Calcif. Tissue. Int.*, **34** : 365~369, 1982
 - 15) Wahl, L.M., Wahl, S.M., Mergenhagen, S.E. and Martin, G.R. : Collagenase production by endotoxin-activated macrophages. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **71** : 3598~3601, 1974
 - 16) Jaffe, M.D. and Willis, P.W. : Multiple fractures associated with long-term sodium heparin therapy. *JAMA*, **193** : 158~160, 1965
 - 17) Griffith, G.C., Nichols, G., Asher, J.D. and Flanagan, B. : Heparin osteoporosis. *JAMA*, **193** : 85~88, 1965
 - 18) Chowdhury, M.H., Hamada, C. and Dempster, D.W. : Effect of heparin on osteoclast activity. *J. Bone. Miner. Res.*, **7** : 771~777, 1992
 - 19) Dempster, D.W., Murrills, R.J., Hobbert, W. R. and Arnett, T.R. : Biological activity of chicken calcitonin : effect on neonatal rat and embryonic chick osteoclasts. *J. Bone Mineral Res.*, **2** : 443~448, 1987
 - 20) Arnett, T.R. & Dempster, D.W. : A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro effects of calcitonin and prostaglandins. *Endocrinology*, **120** : 602~608, 1987
 - 21) Chambers, T.K., McSheehy, P.M.J., Thomson, B.M. and Fuller, K. : The effect of calcium regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclast disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinology*, **116** : 234, 1985
 - 22) Boyde, A., Ali, N.N. and Jones S.T. : Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br. Dent. J.*, **156** : 216, 1984
 - 23) Desch, C.E., Kovach, N.L., Present, W., Broyles, C. and Harlan, J.M. : Production of human tumor necrosis factor from whole blood *ex vivo*. *Lymphokine Research* : 141~146, 1989
 - 24) Hausmann, E., Luderitz, O., Knox, K., Wicken, A. and Weinfeld, N. : Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. *J. Dent Res.*, **54** : B94~B99, 1975
 - 25) Bom-van Noorloos, A.A., van der Meer, J.W. M., van de Cevel, J.S., Schepens, E., van Steenberghe, T.J.M. and Berger, E.H. : Bacteroides gingivalis stimulates bone resorption via interleukin-1 production by mononuclear cells. *J. Clin. Periodontol.* **17** : 409~413, 1990
 - 26) Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. and Mathison, J.C. : CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, **249** : 1431~1433, 1990
 - 27) Mathison, J.C., Wolfson, E. and Ulevitch, R. J. : Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J. Clin. Invest.*, **81** : 1925~1937, 1988
 - 28) Rossomando, E.F., Kennedy, J.E., Hadjimichael, J.E. and Hadjimichael, J. : Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in

- humans. Arch. Oral. Biol., **35** : 431~434, 1990
- 29) Wright, S. D., Tobias P. S., Ulevitch, R. J. and Ramos, R. A. : Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-binding particles for recognition by a novel receptor on macrophages. J. Exp. Med., **170** : 1231~1241, 1989
- 30) Tobias, P. T., Soldau, K. and Ulevitch, R. J. : Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. J. Biol. Chem., **264** : 10867~10871, 1989
- 31) Murills, R. J., Stein, L. S. and Dempster, D. W. : Inhibition of bone resorption by interleukin-1 alpha in the disaggregated osteoclast resorption assay. (not established)

Original Paper

Summary

Effect of cytokine on chick osteoclast activity stimulated by lipopolysaccharide and heparin

We examined whether osteoblasts and bone marrow stromal cells mediate the effect of LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) and heparin ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) in chick osteoclast activity *in vitro*, using disaggregated osteoclast resorption assay.

LPS stimulated osteoclasts to excavate bone in culture without serum. The stimulation was blocked by cyclosporin A ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$), but not indomethacin (10^{-5}M). Although heparin elicited osteoclastic bone resorption with or without serum, cyclosporin A and indomethacin suppressed these stimulatory effects. Using the antibodies against : interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and tumor necrosis factor-beta (TNF- β), TNF- α antibody blunted the effect of LPS or heparin to chick osteoclastic bone resorption, whereas the antibodies against IL-1, IL-6 and TNF- β had no effect on LPS or heparin stimulation. Moreover, the osteoclasts cocultured bone marrow-derived stromal cells (ST2) or clonal osteogenic cells (MC3T3-E1) and pretreated with LPS for 24hrs, showed increased activity, which was inhibited by TNF- α antibody.

These results suggest that LPS and heparin cause an increase in bone resorption *in vitro* by releasing TNF- α from osteoblasts and bone marrow stromal cells.

Key words : osteoclast, osteoblast, bone resorption, cytokine, cyclosporin A, lipopolysaccharide, heparin

CHIEKO HAMADA, M. D. MINORU KUBOTA, M. D.
YASUHIKO TOMINO, M. D. & HIKARU KOIDE, M. D.

Division of Nephrology, Department of Internal Medicine,
Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan