

氏名 (本籍)	伊藤正志 (愛知県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 271 号
学位授与日付	平成 6 年 3 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	破骨細胞および前破骨細胞を中心とした骨髄細胞の食菌能について
審査委員	(主査) 教授 松永隆信 (副査) 教授 岡伸光 教授 渡邊邦友

論文内容の要旨

破骨細胞の起源はマクロファージと同一の幹細胞で、両者とも骨吸収能を有している。しかし、破骨細胞は骨吸収時に波状縁を形成するのに対し、マクロファージは形成しない。また、破骨細胞はカルシトニンによってコントロールされているのに対しマクロファージはこれに影響されないなど両者の間には明らかな相違がある。一方、マクロファージは食菌能を含む貪食能を有し、破骨細胞は bone crystal, グルタルアルデヒドで固定した赤血球やラテックス粒を貪食する。しかしながら、破骨細胞や前破骨細胞が食菌能を有するかどうかについての報告はいまだない。申請者はこの点に着目し、ラットの骨髄より破骨細胞と前破骨細胞を選択採取し、これらの食菌能について検討した。

実験方法

1) 破骨細胞および前破骨細胞を中心とした骨髄細胞の採取について

Wistar/ST ラット (生後 1~7 日齢) の大腿骨と脛骨の骨髄細胞を細胞培養液 (Medium 199) 内で搔爬し、60 分インキュベーション (37°C, 5% CO₂) 後、非付着細胞を洗浄除去し、付着細胞のみを使用した。

2) 採取細胞の特徴付けについて

採取細胞を Naphthol AS-BI Phosphate を基質、Fast Garnet GBC Base Solution をカップラーとしたジアゾ法による酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ染色 (TRAP 染色) に供し、光学顕微鏡下に観察した。さらに、採取細胞を抗ラットマクロファージマウスモノクローナル抗体 (ED1 抗体) を使用した avidin-biotin complex 法にて染色し、光学顕微鏡にて観察した。また、骨髄細胞をウシ皮質骨上に付着させ、洗浄して非付着細胞を除去し、これを 10% ウシ胎児血清加 α Minimal Essential Medium で 18 時間インキュベーション (37°C, 5% CO₂) し、グルタルアルデヒドで固定、次亜塩素酸ソーダで細胞を破壊した後、走査型電子顕微鏡にて骨吸収窩を観察した。

3) 採取細胞による食菌能の検索について

シャーレに骨髄細胞を付着採取し、Medium 199 を用いて作製した 1×10^7 CFU/ml の *Staphylococcus aureus* 浮遊液 4 ml と 30 分インキュベーション (37°C, 5% CO₂) した。また、細菌浮遊液のみを 30 分インキュベーションしコントロールとした。インキュベーション後の Medium 199 内の生菌数を定量培養法で測定し、コントロールとの差を採取細胞が細菌を表面に吸着あるいは細胞内に捕捉した菌数とした。さらに、*S. aureus* が採取細胞内に取り込まれたことを証明するために、リゾスタフィンで細胞外の *S. aureus* を溶菌し (10 μ g/ml, 37°C, 10 分)、超音波にて細胞を破碎し生菌数を算定した。*S. aureus* は 10% ラット血清でオプソニン化 (37°C, 30 分) したものとしないものを使用した。

結果

1) 1 シャーレあたり $(3.2 \pm 0.7) \times 10^5$ 個の骨髄細胞が採取され、これらの細胞は多核細胞 1.5 ± 0.3 (%)、単核細胞 98.5 ± 0.3 (%) であった。また、多核細胞は 56 ± 18 (μ m) のサイズで、板状偽足や分葉状偽足を呈し、時に細繊維状偽足を呈していた。単核細胞は 29 ± 15 (μ m) のサイズで、板状偽足や細繊維状偽足を呈し

ていた。いずれも形態学的に破骨細胞あるいは前破骨細胞の特徴を有していた。

2) 採取細胞の TRAP 陽性率は、多核細胞では 100.0 ± 0.0 (%)、単核細胞では 97.7 ± 1.2 (%) であり、ED1 抗体陽性率は、多核細胞では 8.3 ± 2.9 (%)、単核細胞では 7.3 ± 2.1 (%) であった。また、採取細胞はウシ皮質骨上に $10 \sim 40 \mu m$ の骨吸収窩を形成した。以上により採取細胞が破骨細胞ならびに前破骨細胞であると判定した。

3) これらの細胞は、非オプソニン化 *S. aureus* の $(4.8 \pm 3.5) \times 10^6$ CFU を吸着あるいは捕捉し、 $(5.1 \pm 2.7) \times 10^3$ CFU を細胞内に取り込んだ。またオプソニン化 *S. aureus* の $(1.1 \pm 0.3) \times 10^7$ CFU を吸着あるいは捕捉し、 $(3.1 \pm 2.5) \times 10^5$ CFU を細胞内に取り込んでおり、食菌能を有することを証明し得た。

考 察

実験に使用した骨髄細胞には破骨細胞あるいは前破骨細胞のほかにリンパ球、マクロファージなどが存在し、骨髄細胞から破骨細胞あるいは前破骨細胞のみを抽出する方法を確立することが問題となった。申請者は骨髄細胞をインキュベーション後、非付着細胞であるリンパ球を洗浄除去し、ついでマクロファージは採取直後であれば TRAP 活性を示さないという特徴を利用し、採取直後に TRAP 活性を検索し、陽性細胞を選別した。選別された細胞は破骨細胞あるいは前破骨細胞ということになる。

さらに、採取細胞が破骨細胞であることをより確実にする証拠として骨吸収窩形成能を検討し、選別された多核細胞は骨吸収窩を形成し破骨細胞と判定した。一方、上述の方法で選別された単核細胞の TRAP 陽性率は 97.7% で、これらのうちにマクロファージが存在することも考えられる。また、多核細胞にもマクロファージが混在する可能性もある。そこでさらにマクロファージの 95% が陽性を呈する ED1 抗体を用いて採取細胞のマクロファージ混入率を検討した。すなわち、ED1 抗体は腹腔内マクロファージの 94.7% に陽性を呈したことを予備実験で確認後、ED1 抗体を実験に供した結果、多核細胞の ED1 抗体陽性率は 8.3% で、単核細胞は 7.3% であった。このことより、多核細胞の 91.2% が破骨細胞、単核細胞の 92.3% が前破骨細胞と判定した。

以上実験に供した細胞は、TRAP ならびに ED1 抗体によって確実に証明された破骨細胞ならびに前破骨細胞ということができ、複雑な操作ではあるが破骨細胞ならびに前破骨細胞を高い純度で抽出する方法を確立し得た。

多核白血球は、1細胞あたり 0.6 CFU の *S. aureus* を吸着あるいは捕捉すると報告され、申請者の実験の破骨細胞および前破骨細胞は 1細胞あたり多核白血球の 24.0~65.2 倍の *S. aureus* を食食した。またマクロファージは 1細胞あたり 15~16 CFU の *S. aureus* を食食すると報告され、申請者の実験の非オプソニン化 *S. aureus* の食食数にほぼ一致した。実験条件が異なり正確には比較し得ないが、破骨細胞および前破骨細胞はマクロファージと同等の食菌能を有するといえる。

骨髄内での細菌制御には、マクロファージ、多核白血球、リンパ球が関与するが、今回の研究によって破骨細胞および前破骨細胞もこれらの細胞と同様細菌制御能力をもった細胞であることを明らかにした。しかし、整然とした骨吸収形成のメカニズムの中に組み込まれた破骨細胞が骨髄炎の際に細菌食食能を発揮するとの報告はない。これらの細胞がどのような環境におかれたとき細菌食食能を発揮するのかを今後検討する必要がある。

論文審査の結果の要旨

申請者 伊藤正志は、ラットの骨髄より破骨細胞と前破骨細胞を選択採取し、これらの細胞が食菌能を有することを初めて明らかにした。この新しい知見は骨改構機転の解明ならびに骨感染症研究の進歩に大きく貢献するものと考えられる。

[主論文公表誌]

破骨細胞および前破骨細胞を中心とした骨髄細胞の食菌能について

岐阜大医紀 42(2) : 掲載予定, 1994