

氏名（本籍）	添田 聡（岩手県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第59号
学位授与年月日	平成11年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学位論文題目	牛ハイエナ病に関する研究 特に骨端軟骨板に対するビタミンAの作用に 関する研究
審査委員	主査 岩手大学 教授 谷口和之 副査 帯広畜産大学 教授 山田純三 副査 岩手大学 教授 内藤善久 副査 東京農工大学 教授 山根義久 副査 岐阜大学 教授 佐々木榮英

### 論文の内容の要旨

牛ハイエナ病は、主に後肢骨の長軸方向の成長障害を特徴とする疾患であり、ビタミンA（以下VA）の大量投与によって牛ハイエナ病が発症することが実験的に確認されている。組織学的には四肢長管骨の骨端軟骨板の縮小および消失が認められるが、これらの病変形成過程についての詳細な研究は少ない。そこで、本研究では、牛ハイエナ病における骨端軟骨板の病変形成機序を明らかにすることを目的とし、VA大量投与時の骨端軟骨板の軟骨細胞や軟骨基質の変化について、*in vitro*と*in vivo*において詳細な検索を行った。

第1章では、VA大量投与によって生ずる骨端軟骨板の初期変化を検索した。4週齢のラットにVA 100,000 IU/体重100g/Dayを1から5日間経口投与し、投与1日目から5日目に採取した脛骨近位端の骨端軟骨板について組織化学的検索を行った。この結果、VA投与期間の初期には5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 陽性軟骨細胞として識別できる増殖軟骨細胞の減少およびX型コラーゲン陰性部位の減少が認められ、投与期間の後期にはさらにX型コラーゲン陽性部位の減少が認められた。また、投与期間後期において増殖細胞層の軟骨基質

はメタクロマジーおよびⅡ型コラーゲン陽性反応を示さず、Ⅰ型コラーゲン陽性反応を示した。以上の結果から、VA大量投与は一次的には増殖軟骨細胞に影響を与え、正常な軟骨細胞の分化過程から逸脱させ、その結果、増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化が抑制されるものと考えられた。

第2章では、VA大量投与による骨端軟骨板の部分的な消失の過程を検索した。4週齢のラットにVA 100,000 IU/体重100g/Dayを5日間経口投与し、投与期間終了後7日目および14日目に採取した脛骨近位端の骨端軟骨板について組織化学的検索を行った。その結果、VA投与期間終了後7日目では、脛骨近位端の骨端軟骨板においてメタクロマジーとⅠ、ⅡおよびⅩ型コラーゲン陽性反応を示さない石灰化軟骨基質の形成が認められた。非石灰化軟骨基質の大部分はメタクロマジーとⅡ型コラーゲン陽性反応を示さず、Ⅰ型コラーゲン陽性反応を示した。また、骨端軟骨板には多数の浸食部位が認められ、同部位には多数の破骨細胞と骨芽細胞の浸潤および類骨の形成が認められた。VA投与期間終了後14日目においては、骨端軟骨板は断裂し、あるいは部分的に骨組織に置換されていた。以上の結果から、VA大量投与においては、骨端軟骨板内部に通常とは異なる過程で生じた石灰化軟骨基質の出現、非石灰化軟骨基質の骨基質様の形質への変化、これらの軟骨基質に対する破骨細胞の浸潤と浸食および同部位における骨組織の形成によって、骨端軟骨板の部分的な消失および骨組織への置換が行われていくものと考えられた。

第3章では、遠心管内培養法を用いて、増殖軟骨細胞と肥大軟骨細胞に対するレチノイン酸 (RA) の作用を比較検討した。2日齢のラットから分離した軟骨細胞を遠心管内培養法にて培養を行い、培養後4、11、18および25日目にall-trans retinoic acid (atRA) を1  $\mu$ Mの濃度に培養液に添加 (atRA群)、あるいはエタノールを添加 (対照群) し、それぞれ72時間後の培養7、14、21および28日目に軟骨細胞塊を採取した。採取した軟骨細胞塊については組織化学的検索を行い、さらに軟骨細胞塊中のウロン酸量およびマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を検索した。この結果、対照群の培養軟骨細胞では、培養後7日目ではBrdU陽性軟骨細胞数が最大となり増殖軟骨細胞の性質を示した。培養28日目では軟骨細胞の肥大化、軟骨基質におけるⅩ型コラーゲン陽性反応および石灰化が認められ、肥大軟骨細胞の性質を示した。atRAの軟骨細胞に対する作用に関しては、atRA処理により増殖軟骨

細胞でⅡ型コラーゲン陽性反応の減少、メタクロマジールの消失、軟骨細胞塊中のウロン酸量の有意な減少、BrdU陽性軟骨細胞数の有意な減少、MMP-1の著明な誘導およびMMP-2とMMP-9の増加が認められた。また、肥大軟骨細胞においてはメタクロマジールの消失、軟骨細胞塊中のウロン酸量の有意な減少、MMP-1の軽度の誘導およびMMP-2の増加が認められた。以上の結果から、軟骨基質の変化に対するatRAの作用は、肥大軟骨細胞よりも増殖軟骨細胞で強く発現することが示唆された。

本研究の結果、牛ハイエナ病をはじめVA過剰症においては、VAの代謝産物であるRAにより一次的に増殖軟骨細胞が影響を受け、その後、骨組織様の軟骨基質の形成、異常な石灰化軟骨基質の形成および著明な軟骨基質の吸収と骨組織の形成とによって骨端軟骨板の部分的な消失が生ずるものと考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

牛ハイエナ病は、主に後肢骨の長軸方向の成長障害を特徴とする疾患であり、ビタミンA（以下VA）の大量投与によって牛ハイエナ病が発症することが実験的に確認されている。しかし、これらの病変形成過程についての詳細な研究は少ない。よって、本研究は、牛ハイエナ病における骨端軟骨板の病変形成機序を明らかにすることを目的とし、VA大量投与時の骨端軟骨板の軟骨細胞や軟骨基質の変化について、ラットを用いてin vitroとin vivoにおいて詳細な検索を行ったものである。

第1章では、VA大量投与によって生ずる骨端軟骨板の初期変化を組織化学的に検索した。その結果、VA投与期間の初期には増殖軟骨細胞の減少およびX型コラーゲン陰性部位の減少が認められ、投与期間の後期にはさらにX型コラーゲン陽性部位の減少が認められた。また、投与期間後期において増殖細胞層の軟骨基質はメタクロマジールおよびⅡ型コラーゲン陽性反応を示さず、Ⅰ型コラーゲン陽性反応を示した。以上の結果から、VA大量投与は一次的には増殖軟骨細胞に影響を与え、正常な軟骨細胞の分化過程を逸脱させ、二次的に増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化を抑制させるものと考えられた。

第2章では、4週齢のラットにVA 100,000 IU/体重100g/Dayをを5日間経口投与し、VA大量投与による骨端軟骨板の部分的な消失の過程を組織化学的に検索した。その結果、VA投与期間終了後7日目では、脛骨近位端の骨端軟骨板

においてメタクロマジーとI、IIおよびX型コラーゲン陽性反応を示さない石灰化軟骨基質の形成が認められた。また、骨端軟骨板には多数の浸食部位が認められ、同部位には多数の破骨細胞と骨芽細胞の浸潤および類骨の形成が認められた。VA投与期間終了後14日目においては、骨端軟骨板は断裂し、あるいは部分的に骨組織に置換されていた。以上の結果から、VA大量投与においては、骨端軟骨板内部に通常とは異なる過程で生じた石灰化軟骨基質の出現、非石灰化軟骨基質の骨基質様の形質への変化、これらの軟骨基質に対する破骨細胞の浸潤と浸食および同部位における骨組織の形成によって、骨端軟骨板の部分的な消失および骨組織への置換が行われていくものと考えられた。

第3章では、遠心管内培養法を用いて、増殖軟骨細胞と肥大軟骨細胞に対するオールトランスレチノイン酸(atRA)の作用を比較検討した。その結果、atRAの軟骨細胞に対する作用としては、増殖軟骨細胞におけるII型コラーゲン陽性反応の減少、メタクロマジーの消失、軟骨細胞塊中のウロン酸量とBrdU陽性軟骨細胞数の有意な減少が認められた。また、肥大軟骨細胞におけるメタクロマジーの消失と軟骨細胞塊中のウロン酸量の有意な減少も認められた。以上の結果から、軟骨基質の変化に対するatRAの作用は、肥大軟骨細胞よりも増殖軟骨細胞で強く発現することが示唆された。

本研究の結果、牛ハイエナ病をはじめVA過剰症においては、VAの代謝産物であるレチノイン酸により一次的に増殖軟骨細胞が影響を受け、その後、骨組織様の軟骨基質と異常な石灰化軟骨基質の形成および著明な軟骨基質の吸収と骨組織の形成とによって、骨端軟骨板の部分的な消失が生ずるものと考えられた。

以上について、平成11年1月13日に開催された審査委員会において慎重審査した結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

#### 基礎となる学術論文

1. J. Vet. Med. Sci. 61(3), in press, 1999.