

In vivo における破骨細胞 F-アクチン帯の形態及び そのカルシトニン (CT) と副甲状腺ホルモン (PTH) による影響

黒田 洋史

東北大学歯学部小児歯科学講座
(指導: 神山紀久男教授)

(平成4年12月2日受付, 平成5年3月30日受理)

The structure of F-actin bands of osteoclasts in vivo ; the effects of calcitonin (CT) and parathyroid hormone (PTH)

Hiroshi Kuroda

*Department of Pediatric Dentistry, Tohoku University School
of Dentistry, Sendai*

(Director : Prof. Kikuo Kamiyama)

Abstract : To elucidate the distribution of F-actin in osteoclasts in vivo, undecalcified whole mount specimens and decalcified paraffin sections of calvariae from 1, 3, 7 and 10-day-old Wistar strain rats were examined.

The results are summarised as follows :

1. The distribution of F-actin in osteoclasts were observed as the ring-formed F-actin bands and arch- or line-formed F-actin bands on endocranial surface of calvariae stained with FITC-phalloidin. These F-actin bands were seen typically in 7-day-old rats. 82.8% of F-actin bands was ring-formed type and 17.2% of F-actin bands was arch- or line-formed type.

2. The cytoplasm of cells were doubly stained with FITC-phalloidin and a rat monoclonal antibody, ED1, indicating that F-actin bands stained with FITC-phalloidin were the clear zone of osteoclasts.

3. To clarify the relation between the form of F-actin bands and the bone resorbing activity of osteoclasts, the effects of calcitonin (CT) and parathyroid hormone (PTH) were examined in 7-day-old rats. At 30 min after injection of CT (salmon, 0.1 $\mu\text{g}/10\text{ g}$), F-actin bands changed from ring-formed bands to arch- or line-formed bands. F-actin bands were scarcely found in osteoclasts after 1h and the number of F-actin bands recovered to normal level after 6h of CT injection. After injection of PTH (bovine, 0.5 $\mu\text{g}/10\text{ g}$), the number of ring-formed F-actin bands did not change significantly, while the increased intensity of fluorescence was seen in the ring-formed bands. These results suggested that the osteoclasts with ring-formed F-actin bands actively resorb bone and the osteoclasts with arch- or line-formed F-actin bands less actively resorb bone.

4. The observation of whole mount specimens of calvariae might be useful to examine the effects of factors affecting activities of osteoclasts in vivo.

Key words: Osteoclasts, Bone resorption, F-actin bands, rat calvariae, CT and PTH

緒 言

骨吸収は骨形成と同様に骨組織の形態形成やミネラルの恒常性維持に重要な役割を演じている。この骨吸収は主として破骨細胞によって行われる。破骨細胞は多核(2~数十核)の巨細胞で、細胞質にはよく発達したリソソーム、エンドソーム、粗面小胞体、ゴルジ装置などの細胞内小器官が多数存在する。酵素組織化学的に破骨細胞には酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ活性(tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP)が検出され、破骨細胞に特有のマーカー酵素とされている。破骨細胞の骨吸収面には波状縁とその周囲に明帯が形成される。波状縁では細胞膜の infolding がよく発達し、明帯は細胞内小器官に乏しい。

骨吸収現象は、破骨細胞の波状縁部において酸(水素イオン)や各種分解酵素が分泌放出されることにより起こる。明帯は、波状縁の周囲にリング状の sealing zone を形成し、酸や酵素が効率よく作用するための微小環境を形づくると考えられている^{1,2)}。また、明帯の sealing zone にはアクチン・ビンクリン・タリンなどの細胞骨格蛋白質を多く含み³⁾、それらの細胞骨格はインテグリンと細胞膜内面で結合し⁴⁾、一方インテグリンの細胞外へ伸びる部分はオステオポンチンなどの基質蛋白と結合することにより破骨細胞と骨基質との接着に寄与していると考えている⁵⁾。この明帯のアクチン線維(F-アクチン)は電顕的には heavy meromyosin を用いて^{6,7)}、また光顕的にはファロイジン⁸⁾を用いて検出可能である。

従来、多くの研究者が、象牙質切片や骨切片上に培養した破骨細胞の F-アクチン分布を検索し、in vitro における破骨細胞の明帯がリング状 F-アクチン帯として示されることを明らかにした^{2,3,9~11)}。しかし in vivo においては主として切片を用いて超微形態的に、また光顕的に明帯の F-アクチンが検出され、その存在が提示されているが^{7,12)}、in vitro と同様に全載標本を用いて破骨細胞全体に分布する F-アクチンを観察した報告は少なく¹¹⁾、in vivo においては明帯における F-アクチンの形態は十分に理解されていない。

本研究において筆者は、ラットの頭頂骨内面に分布する破骨細胞を F-アクチンに特異的に反応する FITC 標識ファロイジンを用いて染色し、全載標本を

蛍光顕微鏡で直接観察することにより明帯における F-アクチンの形態を検索した。その結果、明帯は2種、すなわちリング状及びアーチ状またはライン状 F-アクチン帯として認められ、これらの F-アクチン帯の形態が破骨細胞の機能状態を反映するものと考えられたので、Ca 調節ホルモンであるカルシトニン(CT)と副甲状腺ホルモン(PTH)を投与して、明帯における F-アクチン帯の形態変化について検索を行った。

実験材料及び方法

1. 実験動物

生後1日・3日・7日及び10日の Wistar 系ラット(静岡・船橋農場より購入)を使用した。

2. 全載標本による破骨細胞 F-アクチンの分布

断頭後、左右の頭頂骨を取り出して約5mm四方の大きさに切断し、ただちに3%パラホルムアルデヒド固定液(10mMリン酸緩衝液を含む塩類溶液;以下PBS, pH 7.4)を用い、室温にて30分間固定した。試料をPBSで洗浄し、0.05%コラゲナーゼ(WAKO Pure Chemical Industries, LTD.)により37℃にて10分間処理した。その後、実体顕微鏡下で頭頂骨内面の骨膜を注意深く除去し、PBSで洗浄、FITC標識ファロイジン(1μM)を37℃にて30分間処理した。試料はPBSで十分に洗浄の後、スライドガラス上に封入した。封入剤には、グリセリン、トリスーリン酸緩衝液(pH 9.0)、フェノールレッド、クロロブタノールおよびパラフェニレンジアミンを加えたポリビニールアルコールを用いた¹³⁾。標本は、落射型蛍光顕微鏡(オリンパスBH2-RFK)を用いて観察し、コダック社のT-MAXフィルムにより写真撮影を行った。頭頂骨の中で縫合部付近の場所を設定し、左右の頭頂骨の300×600μm²中に存在するF-アクチン帯の数を算定した。

3. 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性(TRAP)染色

2と同様に頭頂骨を取り出して、直ちに3%パラホルムアルデヒド(PBSでpH 7.4としたもの)で室温にて2時間固定、5%EDTA(PBSでpH 7.4としたもの)により、4℃にて1週間脱灰した。脱灰後試料を通

法に従い脱水、パラフィンに包埋し、厚さ 5 μm の切片を作製した。切片を脱パラフィンし、PBS に 5 分間浸漬した後、TRAP 染色を行った。基質に Naphthol AS-BI Phosphate (SIGMA, St. Louis, Mo, USA) を、そして染色のために Pararosanilin を用いた¹⁴⁾。0.5M の L (+) 酒石酸 (SIGMA, St. Louis, Mo, USA) を基質の溶液に加えた。反応は室温にて 15 分間行い、蒸留水で洗浄しメチルグリーンで核染色を施した後、封入し光学顕微鏡で観察した。

頭頂骨全載標本の TRAP 染色も試みた。試料は 2 と同様に頭頂骨の摘出、固定後、コラゲナーゼ処理し、脱灰せずに頭頂骨全体を TRAP 染色、封入して透過光による顕微鏡観察を行った。

4. 破骨細胞の FITC 標識ファロイジンとローダミン標識 ED1 による二重染色

2 と同様にして得られたラットの頭頂骨を 2.5% ヤギ血清で 37°C にて 1 時間処理し、PBS で洗浄、試料を 1 μM FITC 標識ファロイジンで 37°C、30 分間反応させ、PBS で洗浄、さらにマウス抗ラット単球・マクロファージモノクローナル抗体 ED1¹⁵⁾ (PBS で 100 倍希釈; Serotec, Oxford, UK.) を用いて 37°C にて 1 時間反応させた。その後、試料を PBS で洗浄、ローダミン標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (PBS で 100 倍希釈; E·Y Labs, INC. san Mateo, CA, USA) を用いて 37°C にて 1 時間反応させ、PBS で洗浄、2 と同様にスライドガラスに封入し、観察に供した。

5. 破骨細胞 F-アクチン分布の CT と PTH による影響

CT と PTH の投与により破骨細胞の F-アクチンの分布がどのような影響を受けるのかを検索した。合計 48 匹の生後 7 日ラットを 2 つのグループに分け、各々のグループに対して CT (salmon, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Peninsula Laboratories, INC. Belmont, CA, USA) と PTH (bovine sequence-fragment 1-34, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; SIGMA, St. Louis, Mo, USA) を腹腔内に投与した。投与後 5 分・15 分・30 分・1 時間・3 時間・6 時間後にラットを断頭し、頭頂骨を取り出し、前述と同様の方法で F-アクチンの分布を検索した。対照として生理的食塩水を投与した 4 匹のラットを用いた。また、以上より得られた F-アクチン帯の数について 2 つの標本の平均値の差について t 検定を行った。

結 果

1. 破骨細胞 F-アクチンの分布

従来、in vitro で報告されているような典型的な破骨細胞の F-アクチン帯が、生後 7 日の資料で観察された。図 1A は、生後 7 日のラット頭頂骨内面の FITC 標識ファロイジン染色標本の蛍光顕微鏡写真で、骨内面に分布する細胞の中にリング状 F-アクチン帯が認められた(矢頭)。これらの F-アクチン帯は不規則な形ではあるが輪郭は滑らかであった。このリング状 F-アクチン帯は、図 1B に示すようにときにその一部が欠如したアーチ状(矢印)またはライン状(2重矢印) F-ア

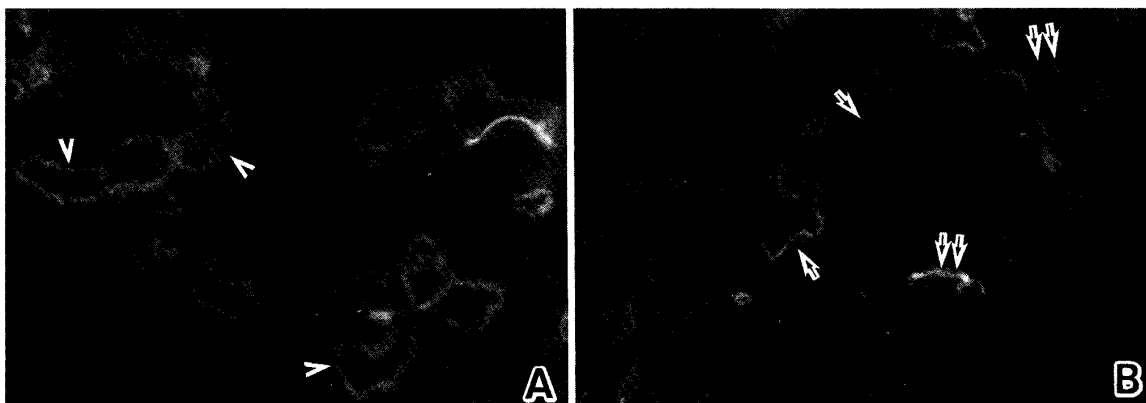


図 1 生後 7 日のラット頭頂骨内面の FITC 標識ファロイジン染色標本の蛍光顕微鏡写真 ($\times 260$)。A; 骨内面に分布する細胞の中にリング状 F-アクチン帯が認められる(矢頭)。B; ときに F-アクチン帯の一部が欠如したアーチ状(矢印)またはライン状(2重矢印)の帯として観察された。

クチン帯として観察された。リング状及びアーチ状またはライン状 F-アクチン帯はその輪郭の大きさとこれまで報告された *in vitro* の観察結果から破骨細胞の明帯に相当すると考えられる。4匹のラットを用いて左右の頭頂骨内面に設定した $300 \times 600 \mu\text{m}^2$ 中に存在するリング状 F-アクチン帯とアーチ状またはライン状 F-アクチン帯の数と総数に対する各々の比率を表 1 に示す。F-アクチン帯が認められる破骨細胞のうち 82.8% はリング状 F-アクチン帯を示し、17.2% がアーチ状またはライン状 F-アクチン帯を示した。

生後 1 日・3 日・7 日及び 10 日のラット頭頂骨内面の FITC 標識ファロイジン染色標本を比較観察する

表 1 生後 7 日ラットの破骨細胞 F-アクチン帯の形態と分布

生後 7 日のラット 4 匹を用いて、左右の頭頂骨内に設定した $300 \times 600 \mu\text{m}^2$ 中に存在する 1 匹あたりのリング状とアーチ状またはライン状 F-アクチン帯の数と総数に対する各々の比率を表した。明帯を有する破骨細胞のうち 82.8% がリング状を示し、17.2% がアーチ状またはライン状を示した。

	リング状	アーチ状 または ライン状	総数
F-アクチン帯の数	102.5±22.5	21.3±7.7	123.8±20.2
総数に対する比率 (%)	82.8	17.2	



図 2 生後 3 日のラット頭頂骨内面の FITC 標識ファロイジン染色標本の蛍光顕微鏡写真 (×260)。リング状とアーチ状またはライン状 F-アクチン帯が観察されたが、7 日のラットと比較すると大きさが小さく数も少なかった。

と、生後 1 日・3 日の資料では、リング状とアーチ状またはライン状 F-アクチン帯が観察されたが、生後 7 日のラインと比較すると小さく、数も少なかった (図 2; 生後 3 日)。生後 10 日では頭頂骨内面の湾曲が強くなり、同一焦点上では個々の F-アクチン帯は明瞭に観察されなかった。

2. 破骨細胞の TRAP 染色

図 3 に示すように、生後 7 日のラットの頭頂骨内面に多数の破骨細胞が観察された (矢印)。破骨細胞は多核であり、細胞質内に TRAP 活性を示した。

TRAP 染色の頭頂骨全載標本では、一部で破骨細胞

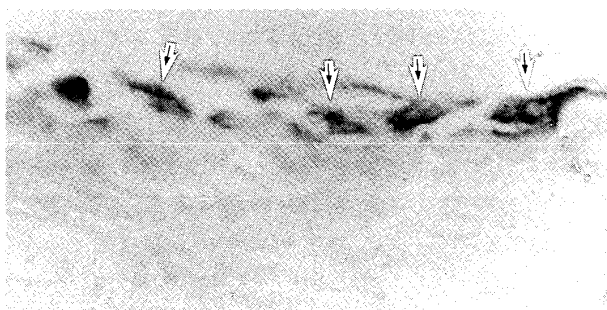


図 3 生後 7 日のラット頭頂骨切片の TRAP 染色標本の光学顕微鏡写真 (×100)。頭頂骨内面に多数の破骨細胞が観察された (矢印)。破骨細胞は多核であり、細胞質内に TRAP 活性を示した。



図 4 生後 7 日のラットの頭頂骨内面に存在する破骨細胞の FITC 標識ファロイジンとローダミン標識 ED1 による二重染色 (×210)。破骨細胞の細胞質全体がローダミンにより橙色に染色され、その周囲をリング状に FITC によって黄緑色に染色された。

を示す所見が得られたが(図示せず), その輪郭は不鮮明で透過光による観察には不適であると判断された。

3. 破骨細胞の FITC 標識ファロイジンとローダミン標識 ED1 による二重染色

図 4 は, 生後 7 日のラットの頭頂骨内面に対して F-アクチンを認識するファロイジンとラットのマクロファージ及び破骨細胞を認識するモノクローナル抗体 ED1 を用いた二重染色の蛍光顕微鏡写真である。ED1 は, 抗原の局在が細胞質にあるとされており, 破骨細胞の細胞質全体がローダミン ED1 により橙色に染色され, その周囲にリング状を呈した F-アクチン帯が FITC ファロイジンによって黄緑色に染色されている。明帯の直径は 10~50 μm の範囲にあった。同様の所見, すなわちアーチ状またはライン状 F-アクチン帯と ED1 抗原との共存が頭頂骨全載標本によって認められ, これらの F-アクチン帯が破骨細胞に由来することが確認された。

4. 破骨細胞 F-アクチン帯の FITC-ファロイジンに対する反応性: CT と PTH による影響

CT 投与ラットにおいては, 図 5 に示すように, 破骨細胞の F-アクチン帯の幅と蛍光の強さは投与後 0 分(図 5A)と比較して 15 分(図 5B)で減少し, 1 時間(図 5C)ではほぼ消失した。その後 F-アクチン帯は再び出現し(投与後 3 時間), 6 時間後(図 5D)ではほぼ投与前の状態に回復した。PTH 投与ラットにおいては, F-アクチン帯の幅と蛍光の強さは投与後 30 分から 3 時間(図 5E)にかけて増加し, その後 6 時間(図 5F)で 0 分と同様になった。

5. CT と PTH 投与後のリング状 F-アクチン帯とアーチ状またはライン状 F-アクチン帯の数に関する統計的検討

表 2 に示すように, CT 投与ラットにおいては, F-アクチン帯を有する破骨細胞の総数とリング状 F-アクチン帯の数は, 投与後 15 分から 1 時間にかけて 5% の危険率で統計的に有意に減少した。アーチ状またはライン状 F-アクチン帯の数は投与後 1 時間から 3 時間にかけて統計的に有意に減少した。PTH 投与ラットにおいては, F-アクチン帯を有する破骨細胞の総数とリング状 F-アクチン帯の数は投与後, 統計的有意差を示さなかった。アーチ状またはライン状 F-アクチン帯の数は投与後 15 分から 6 時間にかけて統計的に有意

に減少した。

考 察

本実験では, in vivo における生後 7 日の頭頂骨内面に, リング状とアーチ状またはライン状の 2 種類の F-アクチン帯が観察された。組織切片により TRAP 陽性の多核細胞が頭頂骨内面の吸収窩に観察されることから, 破骨細胞の存在が示された。さらに, ファロイジンと ED1 による二重染色において, ラットのマクロファージ及び破骨細胞を認識する ED1 により F-アクチン帯を有する細胞が染色されたことから, これらの細胞が破骨細胞であることが裏づけられた。

従来の研究において, 破骨細胞の明帯は超微形態学的観察により波状縁を取り囲むように破骨細胞の周辺に観察されている^{10,16,17}。また in vitro における観察では, 出生後 1 週間以内の動物を用いた破骨細胞の明帯はリング状 F-アクチン帯として報告されている^{2,3,9~11}。

破骨細胞の明帯は, 細胞内小器官が乏しいが, アクチン・ピンクリン・タリンなどの細胞骨格蛋白質を多く含む³。それらの細胞骨格は細胞内においてインテグリンと結合し, 一方インテグリンは細胞膜を通過して細胞外へ伸びている⁴。細胞表面においてインテグリンは, Arg-Gly-Asp 配列を有する基質蛋白, すなわちオステオポンチン⁵ や BSP¹⁸ などと結合して, 破骨細胞と骨基質との接着に寄与していると考えられている。

今回, in vivo で観察された 2 種の F-アクチン帯のうち, 正常ラットでリング状を呈する F-アクチン帯は 82.8% を示した。このことから従来波状縁領域を取り囲むようにリング状に発達する F-アクチン帯の存在は, 明帯が波状縁領域を閉鎖するという機能の根拠とされてきた考え方と通じるものである。このリング状 F-アクチン帯は骨吸収面の微小環境が効率的に閉鎖されており, 骨吸収活性が高いものと考えられる。しかし, 残りの 17.2% の F-アクチン帯はアーチ状またはライン状を示し, このような F-アクチン帯を持つ破骨細胞では閉鎖帯が完全であるという前述の考え方とは矛盾すると考えられる。破骨細胞は monocyte に由来する細胞で活発に運動することが知られている。骨基質上を移動する際には, 骨基質とそのレセプターすなわちインテグリンとの結合が一部ではずれ, また一部では新たな結合が付加されて動的であると考えられ

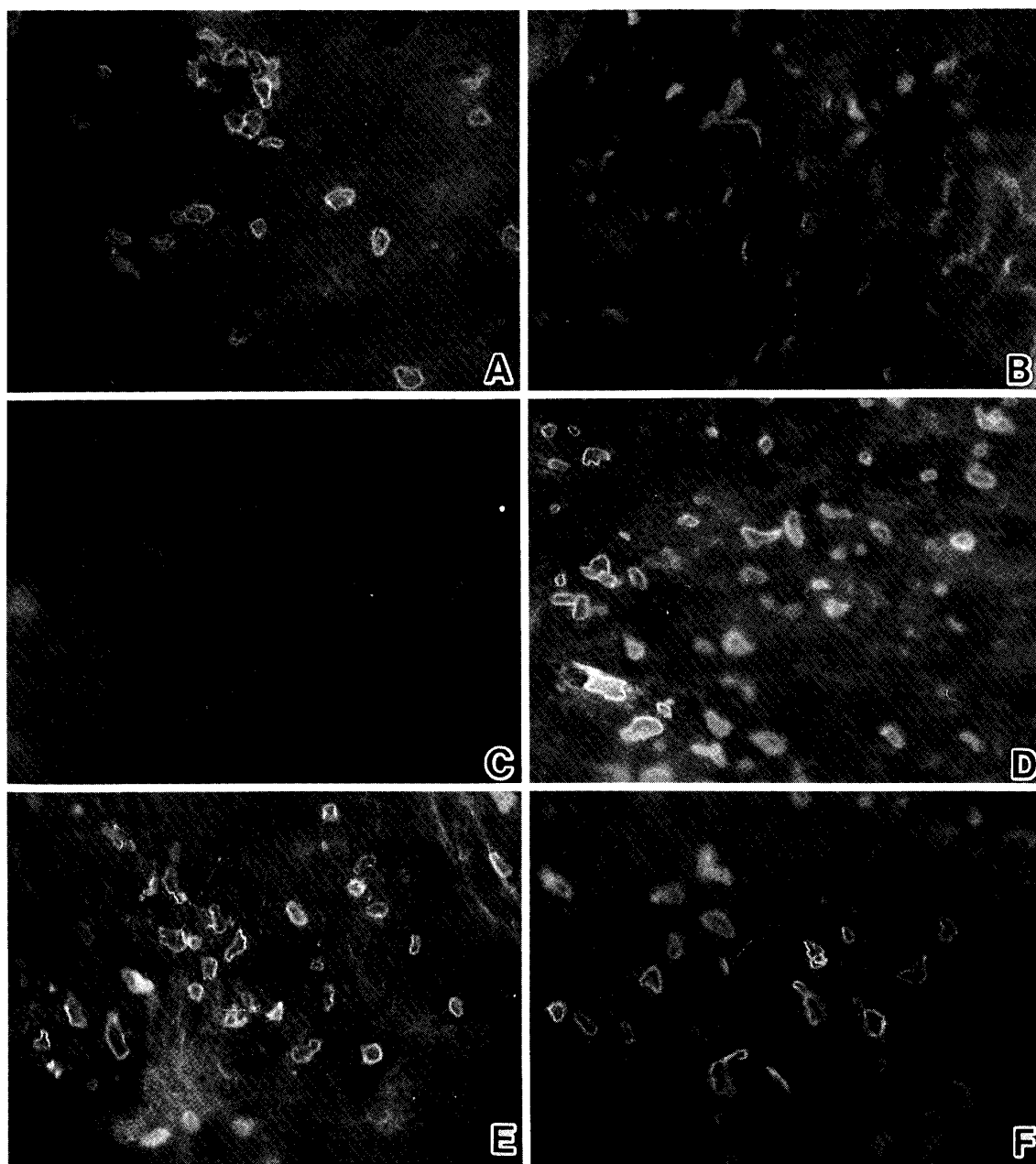


図5 CTとPTHの投与後の、生後7日のラット頭頂骨内面のFITC標識ファロイジン染色標本の蛍光顕微鏡写真(×130)。

A ; 0分(生理食塩水投与)

B ; CT投与後15分

C ; CT投与後1時間

D ; CT投与後6時間

E ; PTH投与後3時間

F ; PTH投与後6時間

CT投与のラットでは、F-アクチン帯の幅と蛍光の強さは投与後0分(A)と比較して15分(B)で減少し、1時間(C)ではほぼ消失した。6時間後(D)では0分と同様に回復した。PTH投与のラットでは、F-アクチン帯の幅と蛍光の強さが投与後30分から3時間(E)にかけてやや増加し、6時間(F)で0分と同様になった。

表2 F-アクチン帯の CT と PTH 投与による変化

表1と同様な方法で生後7日のラット52匹を用いて、F-アクチン帯の分布を検索した。CT投与のラットでは、明帯を有する破骨細胞の数とリング状F-アクチン帯の数は投与後15分から1時間にかけて統計的に有意に減少した。アーチ状またはライン状F-アクチン帯の数は投与後1時間から3時間にかけて統計的に有意に減少した。PTH投与のラットでは、明帯を有する破骨細胞の数とリング状F-アクチン帯の数は投与後統計的に有意差はなかった。アーチ状またはライン状F-アクチン帯の数は投与後15分から6時間にかけて統計的に有意に減少した。

CT 投与

投与後の時間	0分	5分	15分	30分	1時間	3時間	6時間
リング状の数	87.5±7.6	87.5±14.5	*37.0±14.0	*8.0± 8.2	*0.75±1.3	44.5±47.3	98.3±14.0
アーチ状またはライン状の数	21.3±2.9	23.5± 8.8	27.3±15.3	9.8± 8.8	*1.0 ±1.7	*9.0± 5.2	19.3± 6.8
明帯を有する破骨細胞の数(総数)	108.8±7.5	111.0±16.8	*64.3±29.0	*17.8±16.1	*1.8±3.0	53.5±51.5	117.5±11.1

Mean±S.D., *: P<0.05

PTH 投与

投与後の時間	0分	5分	15分	30分	1時間	3時間	6時間
リング状の数	87.5±7.6	77.0±11.8	93.5±3.9	100.3±11.0	108.3±30.9	110.5±17.7	77.5±21.2
アーチ状またはライン状の数	21.3±2.9	13.8± 7.7	*14.0±2.9	*15.0± 2.9	*11.8± 4.5	*13.0± 3.2	*12.5± 4.7
明帯を有する破骨細胞の数(総数)	108.8±7.5	90.8±17.9	107.5±5.3	115.3±13.6	120.0±34.1	123.5±20.0	90.0±23.2

Mean±S.D., *: P<0.05

る。

Kanehisa et al. (1990) は、in vitro において破骨細胞の骨吸収窩の広がりや時期的経過を追って観察し、アーチ状F-アクチン帯を有する破骨細胞が吸収窩の進行方向にアーチの先端を向けて移動中であることを報告した⁸⁾。この事実は、in vivo においてもアーチ状またはライン状F-アクチン帯を有する破骨細胞が移動中であり、骨吸収面における微小環境の維持は不完全で、骨吸収活性が低い状態であることを示唆している。

そこで、これらの明帯F-アクチン帯の形態と破骨細胞の機能との関連を明らかにするため、Ca 調節ホルモンであるカルシトニン (CT) と副甲状腺ホルモン (PTH) を投与して明帯F-アクチン帯の形態変化を検索した。その結果、CT投与後破骨細胞明帯のF-アクチン帯は著明に変化した。すなわちCT投与後30分においてリング状F-アクチン帯はかなり減少、アーチ状またはライン状F-アクチン帯の割合が増加し、CT投

与後1時間でほとんどのF-アクチン帯が消失した。さらにCT投与後3時間でF-アクチン帯の再出現が見られ、CT投与6時間後には投与前の状態に回復した。このF-アクチン帯の経時的変化は報告されている骨吸収抑制効果にほぼ一致する¹⁹⁾。なお図では示さなかったが、CT投与によってF-アクチン帯がほぼ消失した標本においても破骨細胞が存在することを、ED1を用いた二重染色標本にて確認している。

破骨細胞にはCTのレセプターが多く存在し²⁰⁾、CTは破骨細胞に直接作用することにより骨吸収を抑制する。CTの投与により数十分で破骨細胞の波状縁が消失して、破骨細胞が扁平化し、骨表面から遊離することが報告され^{21,22)}、またCTは破骨細胞の細胞運動性や細胞内消化作用などの細胞機能を抑制することも知られている²³⁾。さらに、破骨細胞をCTを添加した培地で培養すると破骨細胞は短時間で小型化し休止状態に陥るが、CTを除去すると再び大型の活性化した状態に戻ることが報告されている²⁴⁾。

従って、CT 投与ラットにおける F-アクチン帯の経時的変化は、破骨細胞に CT に対するレセプターが存在し²⁰⁾、CT 投与後数十分で波状縁を消失した破骨細胞^{23,24)}は、ほぼ同時に明帯の F-アクチン帯をリング状からアーチ状またはライン状へと移行して、その後 F-アクチン帯を消失し骨表面から離れることを示唆するものと考えられる。すなわち CT 投与時に一過性に存在するアーチ状またはライン状 F-アクチン帯を示す破骨細胞は、単に骨吸収の微小環境の維持停止のみならず波状縁消失を伴って骨吸収活性を低下させていることが考えられる。しかし、その経時的変化の中でアーチ状またはライン状 F-アクチン帯を示す破骨細胞に波状縁が残存して僅かな骨吸収活性を有するか否かを検索するには、電顕的観察または蛋白分解酵素活性や酸産生機序に関する酵素活性などの検討が必要である。

PTH は破骨細胞による骨吸収を促進させる²⁵⁾。Holtrop et al. (1974) は胎児ラットの骨吸収測定系を用いて PTH が骨吸収活性を促進させることを示し、それに伴い破骨細胞数の増加と破骨細胞の活性に関与する波状縁の増大を観察した¹⁶⁾。破骨細胞における PTH レセプターの有無については相反する報告が見られるが、一般的に PTH は、そのレセプターを有する骨芽細胞への作用を介して間接的に破骨細胞の形成や機能を促進させるものと考えられている²⁶⁾。分子量 9,000 ダルトンのペプチドが、PTH によって刺激された骨芽細胞から骨吸収促進因子として分泌されることが報告されているが、その本態は今なお不明である²⁷⁾。

PTH 投与のラットにおいて、短時間のうちにアーチ状またはライン状 F-アクチン帯の数が減少したが、リング状 F-アクチン帯の数と F-アクチン帯総数については統計的有意差を示さなかった。また定性的所見として F-アクチン帯の FITC-ファロイジンに対する反応性は、PTH 投与後 30 分から 3 時間にかけて増強し、6 時間で投与前と同様になった。この実験結果は、Holtrop et al. が報告している PTH による破骨細胞数の増加¹⁶⁾が *in vivo* における生後 7 日のラットの頭頂骨では著明でなく、一方 FITC-ファロイジンに対する反応性の変化から個々の破骨細胞の sealing zone がより強く発達して骨吸収の微小環境を維持していることを示唆すると考えられる。Hunter et al. (1988) は、3 週ニワトリの脛骨から破骨細胞を分離・培養してアクリジンオレンジの蛍光を測定することにより骨吸収微小環境の酸性度を測定した²⁸⁾。その結果、PTH 投

与後酸性度は 1 時間で減少したが 3 時間で増加のピークを示し、6 時間でまた減少することを提示した。骨吸収微小環境の酸産生には炭酸脱水素酵素がその主役を演ずるとされているが、F-アクチン帯のファロイジンに対する反応性の経時的変化は、Hunter et al. (1988) の報告した酸性度の変化にほぼ対応している。このことは sealing zone としての機能が on or off のスイッチ的機能ではなく、上皮の tight junction のように接着の仕方に段階のある閉鎖系であることを示唆しており興味深い。しかし今回の実験では F-アクチン帯のファロイジンに対する反応性については定性的に観察したものであり、今後定量的検討が望まれる。

破骨細胞による骨吸収は、骨芽細胞による骨形成と同様にリモデリングを介して骨組織の正常な形態形成に重要な役割を演じており、さらに骨折治癒や骨量減少を伴う骨粗鬆症などの病的過程においても破骨細胞は大きな役割を演じている。従って骨吸収調節系の理解のためには、破骨細胞の機能状態を把握することがぜひ必要である。この研究では *in vivo* における破骨細胞の F-アクチン帯を全載標本により観察した結果、骨吸収活性が高い、または低いと考えられる破骨細胞を直接顕微鏡下で観察し得ることが見いだされた。このことは、全載標本による観察法を破骨細胞の機能に関与する構成成分すなわち細胞骨格系としての F-アクチンや酸産生に関与する炭酸脱水素酵素・ H^+/K^+ ATPase²⁹⁾、さらに骨基質分解に関わるカテプシン C³⁰⁾ などへ応用すれば、骨代謝に関与する各種のホルモンやビスフォスフォネートなどの骨吸収抑制剤の効果判定にも有用であることを示唆しており、今後一層の研究推進を図りたい。

結 語

筆者は、ラットの頭頂骨内面に存在する破骨細胞を頭頂骨全載標本により観察して以下の所見を得た。

1. 生後 1 日・3 日・7 日及び 10 日のラット頭頂骨内面において、破骨細胞の明帯はリング状 F-アクチン帯とアーチ状またはライン状 F-アクチン帯として観察された。

2. 生後 7 日のラットにおいて、リング状とアーチ状またはライン状 F-アクチン帯を有する破骨細胞の数を比較すると、82.8% がリング状であり、17.2% がアーチ状またはライン状であった。これらの F-アクチン帯を有する細胞が破骨細胞であることが、モノク

ローナル抗体 ED1 とファロイジンによる二重染色で確認された。

3. 生後7日のラットに対して、CTの投与によりF-アクチン帯はリング状からしだいにアーチ状またはライン状となり、その後F-アクチン帯は消失したが、さらに時間が経過すると投与前の状態に回復した。またPTHの投与により、明帯を有する破骨細胞数に対するリング状F-アクチン帯の比率を増加させた。この結果からリング状F-アクチン帯を有する破骨細胞は高い骨吸収活性を示し、アーチ状またはライン状F-アクチン帯は移動中または骨基質から離脱中で、その骨吸収活性は低いものと考えられる。

4. 頭頂骨全載標本による観察法は、in vivo における破骨細胞の機能状態を把握するために有益であると

考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました本学小児歯科学講座神山紀久男教授ならびに口腔解剖学第二講座加賀山学教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、終始御教示頂きました本学口腔解剖学第二講座中村雅典博士をはじめ、小児歯科学講座及び口腔解剖学第二講座教室員各位にあわせて深く感謝致します。

本論文の一部は、第38回国際歯科研究学会日本部会「JADR」総会(1990年11月、仙台)および第10回日本骨代謝学会(1992年7月、東京)において発表した。

内容要旨: 破骨細胞のF-アクチン帯の分布を明らかにするため、生後1日・3日・7日及び10日ラット頭頂骨の非脱灰全載標本及び脱灰薄切標本を用いて検討し以下の結果を得た。

1. FITC 標識ファロイジン染色の全載標本で破骨細胞のF-アクチンはリング状とアーチ状またはライン状の帯として認められた。これらのF-アクチン帯は生後7日のラット頭頂骨で最も典型的に観察され、リング状F-アクチン帯は82.8%、アーチ状またはライン状F-アクチン帯は17.2%の比率を示した。

2. ファロイジンとモノクローナル抗体ED1との二重染色全載標本によりF-アクチン帯が破骨細胞に由来することが確認された。

3. 生後7日ラットの実験でF-アクチン帯はCT投与によりリング状からアーチ状またはライン状を経由して投与後1時間ではほぼ消失し、さらに投与後6時間で投与前の形態に回復した。PTH投与ではリング状F-アクチン帯を示す破骨細胞の増加が示唆されたが、その増加は著明ではなく個々のリング状F-アクチン帯のファロイジンに対する反応性増強が認められた。これらの結果からリング状F-アクチン帯は高い骨吸収活性を、またアーチ状またはライン状F-アクチン帯は低い骨吸収活性を示すものと考えられた。

4. 頭頂骨全載標本の観察は、in vivo における破骨細胞の機能状態を反映し種々の骨吸収調節因子の効果検討などに有用であると考えられた。

文 献

- 1) Schenk, R.K., Spiro, D. and Wiener, J.: Cartilage resorption in the tibial epiphyseal plate of growing rats. *J. Cell Biol.* **34**: 275-291, 1967.
- 2) Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Carano, A. and Marchisio, P.C.: The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae; effect of retinol. *J. Bone Miner. Res.* **3**: 517-523, 1988.
- 3) Lakkakorpi, P., Tuukkanen, J., Hentunen, T., Järvelin, K. and Väänänen, K.: Organization of osteoclast microfilaments during the attachment to bone surface in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **4**: 817-825, 1989.
- 4) Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Grano, M., Rubinacci, A., Abbadini, M., Gaboli, M. and Marchisio, P.C.: Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts; a β_3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp. Cell Res.* **182**: 645-652, 1989.
- 5) Reinholt, F.P., Hultenby, K., Oldberg, Å. and Heinegård, D.: Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA **87** : 4473-4475, 1990.
- 6) Malkani, K., Luxemburger, M. -M. and Rebel, A. : Cytoplasmic modifications at the contact zone of osteoclasts and calcified tissue in the diaphyseal growing plate of foetal guinea-pig tibia. *Calcif. Tiss. Res.* **11** : 258-264, 1973.
 - 7) King, G.J. and Holtrop, M.E. : Actin-like filaments in bone cells of cultured mouse calvaria as demonstrated by binding to heavy meromyosin. *J. Cell Biol.* **66** : 445-451, 1975.
 - 8) Barak, L.S., Yogum, R.R., Nothnagel, E.A. and Webb, W.W. : Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phalloidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** : 980-984, 1980.
 - 9) Turksen, K., Kanehisa, J., Opas, M., Heersche, J.N.M. and Aubin, J.E. : Adhesion patterns and cytoskeleton of rabbit osteoclasts on bone slices and glass. *J. Bone Miner. Res.* **3** : 389-400, 1988.
 - 10) Yoshida, S., Domon, T. and Wakita, M. : Studies of the clear zone of osteoclasts; immunohistological aspects of its form distribution. *Arch. Histol. Cytol.* **52** : 513-520, 1989.
 - 11) Kanehisa, J., Yamanaka, T., Doi, S., Turksen, K., Heersche, J.N.M., Aubin, J.E. and Takeuchi, H. : A band of F-actin containing podosomes is involved in bone resorption by osteoclasts. *Bone* **11** : 287-293, 1990.
 - 12) Hancox, N.M. and Boothroyd, B. : Motion picture and electron microscope studies on the embryonic avian osteoclast. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.* **11** : 651-661, 1961.
 - 13) Lenette, D.A. : An improved mounting medium for immunofluorescence microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.* **69** : 647-648, 1978.
 - 14) Barka, T. and Anderson, P.J. : Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10** : 741-753, 1962.
 - 15) Sminia, T. and Dijkstra, C.D. : The origin of osteoclasts; an immunohistochemical study on macrophages and osteoclasts in embryonic rat bone. *Calcif. Tissue Int.* **39** : 263-266, 1986.
 - 16) Holtrop, M.E., Raisz, L.G. and Simmons, H.A. : The effects of parathyroid hormone, colchicine, and calcitonin on the ultrastructure and the activity of osteoclasts in organ culture. *J. Cell Biol.* **60** : 346-355, 1974.
 - 17) Domon, T. and Wakita, M. : The three-dimensional structure of the clear zone of a cultured osteoclast. *J. Electron Microsc.* **40** : 34-40, 1991.
 - 18) Oldberg, Å., Franzen, A. and Heinegård, D. : The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J. Biol. Chem.* **263** : 19430-19432, 1988.
 - 19) Grubb, S.A., Markham, T.C. and Talmage, R. V. : Effect of salmon calcitonin infusion on plasma concentrations of recently administered ⁴⁵Ca. *Calcif. Tiss. Res.* **24** : 201-208, 1977.
 - 20) Nicholson, G.C., Moseley, J.M., Sexton, P.M., Mendelsohn, F.A.O. and Martin, T.J. : Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. *J. Clin. Invest.* **78** : 355-360, 1986.
 - 21) Kallio, D.M., Garant, P.R. and Minkin, C. : Ultrastructural effects of calcitonin on osteoclasts in tissue culture. *J. Ultrastruct. Res.* **39** : 205-216, 1972.
 - 22) Hunter, S.J., Schraer, H. and Gay, C.V. : Characterization of the cytoskeleton of isolated chick osteoclasts; effect of calcitonin. *J. Histochem. Cytochem.* **37** : 1529-1537, 1989.
 - 23) Chambers, T.J. and Magnus, C.J. : Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J. Pathol.* **136** : 27-39, 1982.
 - 24) Chambers, T.J. and Dunn, C.J. : Pharmacological control of osteoclastic motility. *Calcif. Tissue Int.* **35** : 566-570, 1983.
 - 25) Mundy, G.R. and Roodman, G.D. : Osteoclast ontogeny and function. Peck, W.A. (edit.) : *Bone and Mineral Research/5*. Elsevier Science Publishers B.V., New York, 1987, pp. 209-279.
 - 26) Mcsheehy, P.M.J. and Chambers, T.J. : Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* **118** : 824-828, 1986.
 - 27) Morris, C.A., Mitnick, M.E., Weir, E.C., Horowitz, M., Kreider, B.L. and Insogna, K.L. : The parathyroid hormone-related protein stimulates human osteoblast-like cells to secrete a

- 9,000 dalton bone-resorbing protein. *Endocrinology* **126**: 1783-1785, 1990.
- 28) Hunter, S.J., Schraer, H. and Gay, C.V.: Characterization of isolated and cultured chick osteoclasts; the effects of acetazolamide, calcitonin, and parathyroid hormone on acid production. *J. Bone Miner. Res.* **3**: 297-303, 1988.
- 29) Baron, R.: Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat. Rec.* **224**: 317-324, 1989.
- 30) Baron, R., Neff, L., Brown, W., Courtoy, P.J. and Louvard, D.: Polarized secretion of lysosomal enzymes; Co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway. *J. Cell Biol.* **106**: 1863-1872, 1988.