

ヒト破骨細胞活性化因子 (osteoclast-activating factor) の
in vivo における骨リモデリングに及ぼす影響に
ついでの臨床的, 実験的検討

新潟大学医学部整形外科学教室 (主任: 田島達也教授)

谷澤龍彦

Clinical and Experimental Investigation of the Effect of Human
Osteoclast-Activating Factor on Bone Remodeling in Vivo

Tatsuhiko TANIZAWA

*Department of Orthopedic Surgery Niigata
University School of Medicine
(Director: Tatsuya TAJIMA)*

Osteoclast-activating factor (OAF) has been known to be a potent bone resorbing factor *in vitro*. Although its activity is elevated in pathological conditions such as multiple myeloma and periodontal disease, little has been focused on its action *in vivo*. The present study was undertaken to assess the effect of OAF on human bone remodeling with monocytic bone mineral (^{45}Ca -hydroxyapatite crystals) resorption assay system in osteoporotic patients and healthy volunteers. Iliac bone biopsies from 17 subjects were also performed to determine its role *in vivo*. After these investigations, following results have been obtained.

1. There was no significant difference of OAF activity in osteoporotic patients in comparison to that in healthy volunteers.
2. Increase of OAF activity was found in patients with rheumatoid arthritis.
3. OAF activity has significant correlation with the parameters related to bone formation which are based in bone histomorphometry.

These results lead to the conclusion that OAF activity varies among diseases but is not likely to be elevated in osteoporotic patients except in rheumatoid arthritis. OAF can be primarily acting on osteoblasts to stimulate bone formation which takes place after bone resorption.

Key words: osteoclast-activating factor, osteoporosis, bone remodeling, bone histomorphometry

破骨細胞活性化因子, 骨粗鬆症, 骨リモデリング, 骨組織形態計測

Reprint requests to: Tatsuhiko TANIZAWA,
Department of Orthopedic Surgery Shinrakuen
Hospital, Nishiariake-cho Niigata City,
950-21 JAPAN.

別刷請求先: 〒950-21 新潟市西有明町
信楽園病院整形外科

谷澤龍彦

I 本研究の目的

従来骨の代謝は PTH や活性型ビタミンDなどの systemic factor が、その主役を演じていると考えられていた。近年免疫学の進歩によりリンパ球や単球などの免疫担当細胞が産生する local factor が骨の代謝にも関与していることが明らかになってきた。

1972年 Horton¹⁾らは、末梢血中の白血球を歯垢や phytohemagglutinin (PHA) で刺激すると、その培養上清中に in vitro で骨吸収を促進する因子を見出し、osteoclast-activating factor (OAF) と名付け、この分野における初めての報告をした。その後この因子の一部は interleukin- 1β ²⁾ (IL- 1β) や tumour necrosis factor³⁾ (TNF) であることが示されたが、この他にも複数の因子が OAF に含まれていると考えられている。

ところで臨床面でこの OAF と疾患の関連については、骨髄腫⁴⁾やリンパ腫⁵⁾などの血液系の腫瘍や歯周病⁶⁾などの炎症性疾患で産生が亢進していることが報告されているが、最も普遍的に認められる骨代謝疾患である骨粗鬆症との関連について言及した報告は Rifas⁷⁾らの小報告を認めるのみである。そこで本研究では、

1. in vitro で簡単なヒト OAF 活性の測定法を開発し、
2. 健常人と骨量減少を示す骨粗鬆症患者、慢性関節リウマチ患者における OAF 活性を比較し、
3. ヒト OAF 活性と骨組織学的形態計測法による骨動態とを比較して、これらの local factor を含む OAF 活性が、骨の remodeling にどのように関わっているのか検討した。

II 各実験の目的、材料と方法および結果

実験 I. OAF 上清による骨塩吸収実験 (ヒト末梢血単球による合成 ^{45}Ca -hydroxyapatite 吸収試験)

1. 目的

OAF 活性の測定は、Raisz⁸⁾らによって示されたように、 ^{45}Ca でラベルされた新生マウスないしラット胎子の頭蓋冠もしくは長管骨を器官培養し、培養液中への ^{45}Ca 放出量を OAF 添加群と非添加群で比較する系を用いていた。しかしこの方法では、培養中の骨組織に含まれる破骨細胞や骨芽細胞以外に、骨髄系の細胞による影響を無視できず、作用をうけた細胞の特定は困難である。用いた動物の種による違いも考慮に入れる必要があり、bioassay であるため操作も繁雑である。これらの問題を解決し、出来るだけ単純化した骨塩吸収実験を行うた

め、佐藤⁹⁾によって示されたヒト末梢血単球による合成 ^{45}Ca -hydroxyapatite 吸収試験により OAF 活性の測定を試みた。

2. 材料および方法

a) ^{45}Ca -Hydroxyapatite 粒子の作成

佐藤⁹⁾の方法に従い合成した。すなわち18.3%塩化カルシウム溶液 4ml に 1mCi の $^{45}\text{CaCl}_2$ (NEN, U.S.A.) を加え、これを 53.3% NaOH 3ml 存在下の35.8% Na_2HPO_4 溶液 3ml 中に、3時間以上かけて攪拌しながら滴下した。この操作により白色の結晶物が沈澱し、24時間室温で静置した。この結晶物を脱イオン水で充分洗浄したのち、80℃一夜乾燥させた。乾燥させた結晶物を乳鉢で充分に粉碎し、顆粒状になった結晶物を、ステンレスメッシュ (Testing-sieve, Ikemoto, Tokyo) により粒子径の大きさによって分別し、直径が約 40micron の粒子を得た。これを加圧滅菌 (160℃, 60分) したのち RPMI 1640 中に懸濁浮遊させ、実験に供した。培養液中の粒子の濃度は 0.44mg/ml とした。合成した粒子は、反射角 2θ で X 線解析 (旭光学, 東京) を行ない、結晶構造を検討した。

b) OAF 上清の採取 (Table. 1)

健常人ボランティアから静脈血を採取し、Ficoll Conray 比重遠心法により、単核球成分 (単球とリンパ球を含む) を得た。細胞密度を $4 \times 10^6/\text{ml}$ とし RPMI 1640 に浮遊させた。これに20% AB 血清と8% phytohemagglutinin (PHA) を加え、24well の培養プレート (Falcon 3047, Becton Dickinson and Company, U.S.A.) 上で48時間培養した (5% CO_2 , 37℃)。培養後その上清を採取し、OAF 上清として実験に供した。control 上清は、上記の培養系で単核球成分を含まない系を同時に作成す

Table 1 Method of harvesting OAF supernatant fluid derived from peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood	
mononuclear cells $4 \times 10^6/\text{ml}$	200 $\mu\text{l}/\text{well}$
(lymphocytes + monocytes)	
20% AB serum (heat inactivated)	100 $\mu\text{l}/\text{well}$
8% PHA (Phytohemagglutinin)	100 $\mu\text{l}/\text{well}$
RPMI 1640	400 $\mu\text{l}/\text{well}$

culture ↓ 48hrs
(5% CO_2 , 37℃)
supernatant fluid
↓
OAF

ることにより得た。

c) ヒト末梢血単球の採取

健康人ボランティアから静脈血を採取し、前述の Ficoll Conray 比重遠心法により単核球成分 (単球とリンパ球を含む) を得た。次に Gelatine-Fibronectin 吸着法により、リンパ球を除き、単球を得た。得られた単球は 0.25 % bovine serum albumin (BSA) 加 RPMI 1640 中に浮遊させ、実験に供した。

単球の細胞密度は $0.25 \times 10^6/\text{ml}$, $0.5 \times 10^6/\text{ml}$, $1 \times 10^6/\text{ml}$ の 3 種類を検討した。

なお単球の donor は本研究の経過を通じて同一人とした。

d) OAF 活性の測定

^{45}Ca -hydroxyapatite 粒子含有 RPMI 1640 を $50\mu\text{l}$, OAF 上清もしくは control 上清 $100\mu\text{l}$, ヒト末梢血単球浮遊液 $50\mu\text{l}$ を 96 well 培養プレート (Falcon 3072, Becton Dickinson and Company, U.S.A.) 上で混和し、 37°C , 5 % CO_2 条件下で培養した。培養時間は 24, 48, 72 時間とした。培養後、遠心分離 (3000 回転, 10 分) により上清 $100\mu\text{l}$ を採取し、ジオキサシンチレーター 5ml に加えたのち、液体シンチレーションカウンター (Aloka, Tokyo) にて上清中に release され

た ^{45}Ca 量を測定した。OAF 活性は control 上清による ^{45}Ca 放出量と比較することにより検討した。

3. 結果

a) 合成した粒子の X 線解析 (Fig. 1)

31.8° に最大の peak をもち 32.2° および 32.9° に二つの peak をもつ hydroxyapatite の解析パターンを示した。

b) 単球の細胞密度と OAF 活性の関係 (Fig. 2)

単球の細胞密度が $0.25 \times 10^6/\text{ml}$ では、OAF 上清による ^{45}Ca の放出量は paired control と有意差を認めなかったが、 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の細胞密度では、paired control に比し有意 ($p < 0.01$) に増加していた。さらに最も高い細胞密度である $1 \times 10^6/\text{ml}$ での OAF 活性は、他の dose に対し有意 ($p < 0.01$ vs. $0.5 \times 10^6/\text{ml}$, $p < 0.001$ vs. $0.25 \times 10^6/\text{ml}$) に高かった。

c) 培養時間と OAF 活性の関係 (Fig. 3)

OAF 活性は時間依存性に上昇した。72 時間培養時の OAF 活性は他の 2 者に比し、有意 ($p < 0.05$ vs. 48 hours, $p < 0.01$ vs. 24 hours) に高かった。

4. 実験 I の小括

OAF 活性測定に至適条件を得るため、単球の細胞密度と培養時間の検討を行なった。この結果、 $1 \times 10^6/\text{ml}$

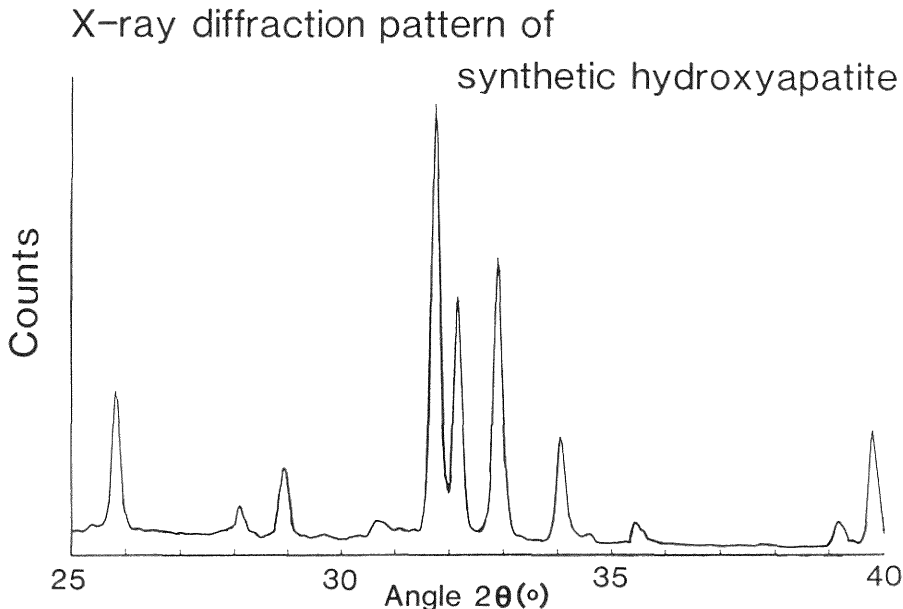


Fig. 1 X-ray diffraction pattern of synthetic hydroxyapatite There were three main peaks at 31.8° (maximum), 32.2° , 32.9° . The pattern was same as that of hydroxyapatite.

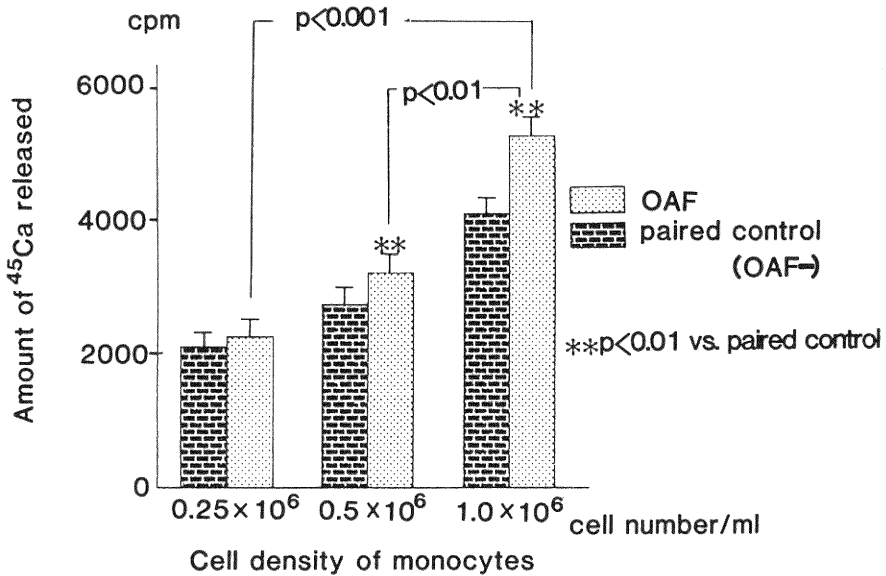


Fig. 2 Correlation between cell density of monocytes and OAF activity Monocytes with OAF supernatants released ⁴⁵Ca significantly in a dose dependent fashion. (culture for 48 hours)

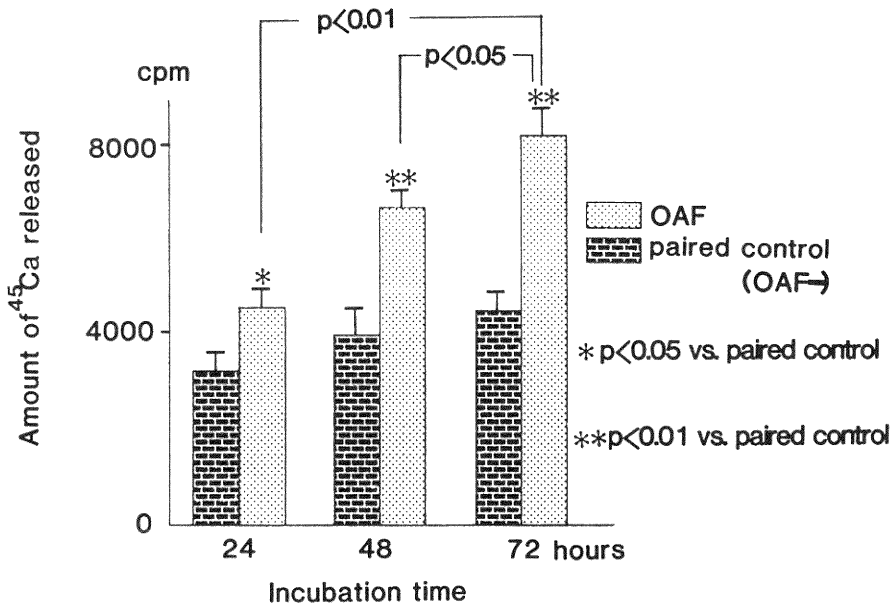


Fig. 3 Correlation between incubation time and OAF activity Monocytes with OAF supernatants released ⁴⁵Ca significantly in a time dependent fashion. (cell density of monocytes: 1 × 10⁶ / ml)

の単球細胞密度で72時間培養した場合、最も高い OAF 活性を得た。

実験 II. 骨粗鬆症患者および慢性関節リウマチ患者における OAF 活性の検討

1. 目的

実験 I で用いた方法により、一次性及び二次性骨粗鬆症患者における OAF 活性を測定する。また同じく骨量減少を示す疾患として慢性関節リウマチ患者における OAF 活性も測定し、疾患の違いによる OAF 活性の相違を検討する。

2. 対象および方法

a) 患者群と健常者群の選定

患者群は新潟大学整形外科あるいはその関連施設を受診中の骨粗鬆症患者27名（一次性16名，二次性11名），慢性関節リウマチ9名の36名を対象とした（Table 2）。

骨粗鬆症患者の選択にあたっては、脊椎 X 線写真において2個以上の圧迫骨折が認められるか慈大分類でI度以上の骨量減少を認めるものを基準とした。

慢性関節リウマチはアメリカリウマチ協会の定めた診断基準で definite 以上を示すものを対象とした。

健常者群は新潟市福祉事業協会有明センターにて週2回以上スポーツ活動を行なっている60歳以上の健常老人45名に本教室員8名を加えた53名とした（Table 2）。

なお患者群，健常者群ともに過去1カ月以内に外傷，感染，手術などの侵襲を受けていないことを条件とした。

b) OAF 活性の測定

対象全員からへパリン加静脈血を10~15ml 採血し，実験 I で示した方法により，OAF 活性を測定した。用

いた単球の細胞密度は 1×10^6 /ml で培養時間は72時間とし，OAF 活性の感度が最大となるように設定した。

OAF 活性はコントロール上清に対する OAF 上清の ^{45}Ca 放出量の百分率比をもって表わした。

c) 血清 bone Gla protein (S-BGP) の測定

採血時に得られた血清を用いて，骨形成の指標とされる S-BGP を，ウシ BGP に対するウサギ抗体を用いた ^{125}I radioimmunoassay により測定した（東洋醸造研究所，静岡）。

d) OAF 上清中の interleukin- 1β (IL- 1β) の測定

IL- 1β は，OAF の一部と考えられており，OAF 上清に含まれる IL- 1β を ^{125}I radioimmunoassay kit により測定した（Interleukin- 1β (^{125}I) RIA Kit, CISTRON, U.S.A.）。

e) OAF 上清中の prostaglandin E $_2$ (PGE $_2$) の測定

OAF 産生のためには PGE $_2$ が必要と考えられており，OAF 上清に含まれる PGE $_2$ を ^{125}I radioimmunoassay kit により測定した（prostaglandin E $_2$ ^{125}I RIA Kit, NEN, U.S.A.）。

3. 結果

a) 患者群と健常者群との比較 (Table 3)

両群間における年齢の統計学的な差は男女別においても，男女全体においても認められなかった。

また S-BGP, IL- 1β , PGE $_2$ のいずれも両群間で男女別，男女全体のいずれも有意差を認めなかった。

b) 疾患別の OAF 活性 (Table 4)

一次性及び二次性骨粗鬆症と健常者間における OAF

Table 2 Number and age of the patients and healthy controls

	Patients		Healthy controls	
	N	Range of age (mean)	N	Range of age (mean)
Primary osteoporosis	16	57-81 (71.5)		
Female	14	58-81 (71.1)	Female 27	61-75 (65.8)
Male	2	72-73 (74.0)	Male 26	26-76 (58.2)
Secondary osteoporosis	11	33-83 (56.5)		
Female	8	33-83 (53.9)		
Male	2	57-72 (63.3)		
Rheumatoid arthritis	9	39-63 (52.4)		
Female	8	39-61 (51.1)		
Male	1	63		
Total	36	33-83 (62.1)	53	26-76 (62.1)

Table 3 Age, OAF, IL-1, PGE and BGP in patients with osteoporosis and rheumatoid arthritis and healthy controls

Patients			Healthy controls	Statistics
Age (years)	Total	62.1±13.3	62.1±12.7	N.S.
	Female	61.2±13.9	65.8± 3.8	N.S.
	Male	66.8± 6.9	58.2±16.9	N.S.
OAF (%)	Total	164.0±49.3	148.7±37.8	N.S.
	Female	160.5±49.1	142.0±24.9	N.S.
	Male	181.5±42.3	155.6±46.6	N.S.
IL-1 (pg/ml)	Total	1860±1596	1874±1720	N.S.
	Female	1889±1601	1610±1523	N.S.
	Male	1714±1395	2006±1744	N.S.
PGE ₂ (pg/ml)	Total	9681±7186	8576±6574	N.S.
	Female	8341±6772	9675±7119	N.S.
	Male	9753±4438	9684±6992	N.S.
BGP (ng/ml)	Total	15.0± 9.9	11.6± 5.0	N.S.
	Female	14.8± 9.2	13.2± 5.1	N.S.
	Male	14.5±10.6	9.8± 4.2	N.S.

Values are expressed as mean±S.D.

There was no significant difference between the osteoporotic and RA patients and healthy controls as to age, OAF, IL-1, PGE₂ and BGP.

Table 4 OAF activity in osteoporotic and rheumatoid patients

Disease	OAF activity %
Rheumatoid arthritis	189.4±48.3*
Primary osteoporosis	160.4±37.9
Secondary osteoporosis	148.4±54.3

There was no significant difference of OAF activity between osteoporotic patients and healthy controls, but it was significantly elevated in rheumatoid patients (* p < 0.05 vs. healthy controls).

活性は有意差がなかったが、慢性関節リウマチの OAF 活性は、健常者群に比し有意 (p<0.05) に亢進していた。

二次性骨粗鬆症の個々の疾患については、いずれも症例数が1例ずつで統計学的な比較はできないが、上皮小体機能低下症例では OAF 活性が低下傾向にあり、逆に甲状腺機能亢進症例や骨髄腫、悪性リンパ腫症例では亢進傾向にあった (Table 5)。

一方、健常者においても100%以下を示すものから200

Table 5 OAF activity in patients with secondary osteoporosis

Disease	N	OAF activity (%)
hypoparathyroidism	1	51.9
post pregnancy	1	62.7
hyponutrition	1	99.9
bronchial asthma	1	122.6
multiple sclerosis	1	144.5
mixed connective tissue disease	1	171.9
dermatomyositis	1	178.7
SLE	1	183.0
hyperthyroidism	1	194.2
malignant lymphoma	1	208.3
multiple myeloma	1	215.1

%を越すものまで様々であったが、患者群よりは標準偏差は少なかった。

c) OAF 活性と S-BGP, IL-1 β , PGE₂ との相関 (Table 6)

Table 6 Correlation between OAF and other biochemical parameters

OAF vs.	Patients		Healthy controls	
	r	p	r	p
IL-1 β	-0.21	N.S.	-0.06	N.S.
PGE ₂	0.39	<0.05	-0.01	N.S.
BGP	0.15	N.S.	-0.06	N.S.

患者群では OAF 活性と PGE₂ との間に正に相関を認めた (r=0.39, p<0.05) が、他のパラメーター、特に OAF の一部と考えられている IL-1 β との間に相関はなかった。

健常者群では OAF 活性と他のパラメーターとの間に相関を認めなかった。

4. 実験 II の小括

一次性及び二次性骨粗鬆症患者は健常者群との間に OAF 活性の有意差を認めなかったが、慢性関節リウマチ患者では OAF 活性が健常者群に比し有意に亢進していた。OAF 活性と他の生化学的パラメーターには、特別な相関はなく、OAF 活性が直接これらのパラメーターを反映し

ている可能性は少ないと思われた。

実験 III. OAF 活性と骨組織との関連

1. 目的

実験 II で示された OAF 活性が、実際に骨の remodeling のどの場面を反映しているのか知るために、腸骨を採取し骨組織を検討した。

2. 対象および方法

a) 対象

実験 II で OAF 活性を測定した対象のうち、同意の得られた17名を対象とした。対象の特徴を Fig. 4 に示す。

b) 方法

実験 II の方法で OAF 活性を測定し、同日に局所麻酔下に腸骨生検を施行した。前上腸骨棘から後方 2cm さらに下方に 2cm の部位で、内径 8mm の trephine を用いて、core 状の骨を採取した。標本は70% ethanol

Table 7 Variables of histomorphometry used in this study

Variables	Abbreviations
Surface parameters	
Eroded surface	ES/BS
Osteoclast surface	Oc. S/BS
Osteoblast surface	Ob. S/BS
Dynaic parameters	
Mineral apposition rate	MAR ¹⁾
Mineralizing surface	MS/BS ²⁾
Percentage of osteoid mineralizing	MS/OS ²⁾
Bone formation rate (total surface referent)	BFR/BS ²⁾
Bone formation rate (total volume referent)	BFR/BV ³⁾

ES : Total scalloping surface with or without osteoclast

BS : Total bone surface

Oc. S : Scalloping surface with osteoclast

Ob. S : Formation surface with osteoblast

MS : Tetracycline labled surface (double+1/2 single)

OS : Osteoid surface

1) MAR=Distance between labels/Day interval of tetracycline administration

2) BFR/BS²⁾=MAR×MS/BS

3) BFR/BV³⁾=MAR×MS/BV BV : Total bone volume

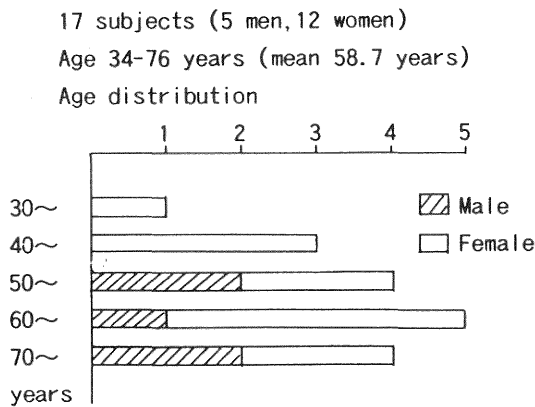


Fig. 4 Age distribution and disorders of 17 subjects that underwent iliac bone biopsies.

固定後, Villanueva bone stain を施し, 非脱灰薄切片とした. 光顕ないし蛍光顕微鏡下に半自動画像解析装置 (Mutoh, Tokyo) を用いて, 組織形態計測を行なった. 計測パラメータは Parfitt ら¹⁰⁾により承認されたものを使用した. 使用した計測パラメータを **Table 7** に示す.

3. 結 果

OAF 活性と計測パラメータとの相関をみると, 骨芽細胞に覆われた骨梁面を示す osteoblast surface (Ob. S/BS, $r=0.61$, $p<0.01$), 骨梁面中のテトラサイクリン標識率を示す mineralizing surface (MS/BS^{''}, $r=0.69$, $p<0.05$), 類骨面中のテトラサイクリン標識率を示す percentage of osteoid mineralizing (MS/OS^{''}, $r=0.62$,

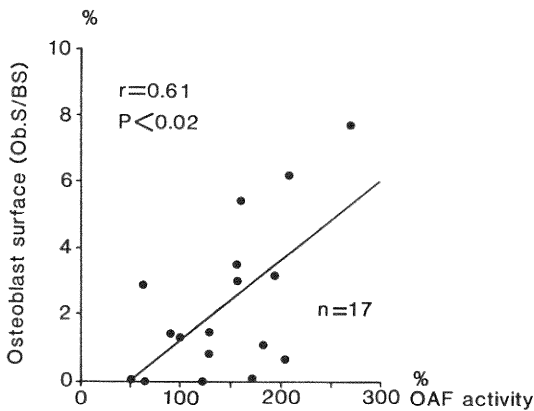


Fig. 5 Correlation between OAF activity and osteoblast surface (Ob. S/BS)

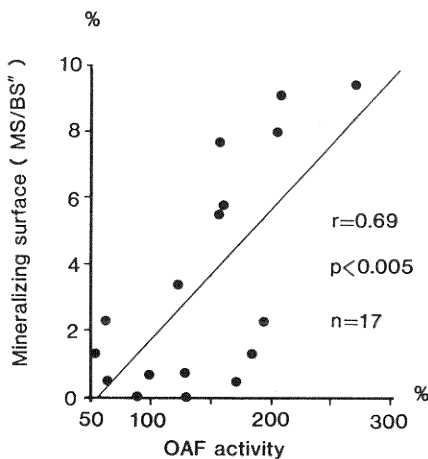


Fig. 6 Correlation between OAF activity and mineralizing surface (MS/BS^{''})

$p<0.01$), 骨組織面当りの骨形成率を示す bone formation rate-tot surf ref. (BFR/BS^{''}, $r=0.64$, $p<0.01$), 骨組織量当り骨形成率を示す bone formation rate-tot vol ref. (BFR/BV^{''}, $r=0.61$, $p<0.01$) などの骨形成に関するパラメータとの間に有意の正の相関を認めた (Fig. 5~9).

しかし, 骨梁面中の Howship's lacuna を示す eroded surface (ES/BS) や骨梁面中破骨細胞の存在する吸収面を示す osteoclast surface (Oc. S/BS) などの破骨細胞性骨吸収を表わすパラメータとは, 相関がなかった

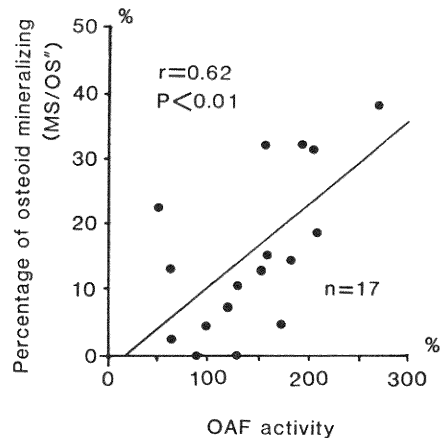


Fig. 7 Correlation between OAF activity and percentage of osteoid mineralizing (MS/OS^{''})

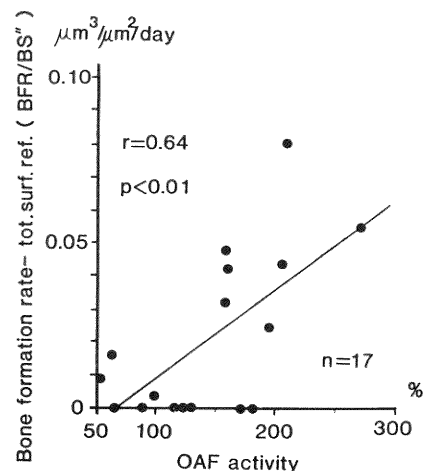


Fig. 8 Correlation between OAF activity and bone formation rate-tot. surf. ref. (BFR/BS^{''})

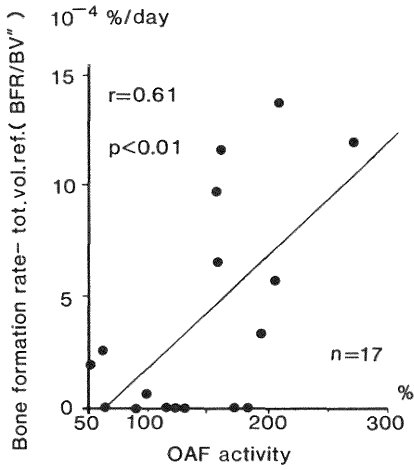


Fig. 9 Correlation between OAF activity and bone formation rate-tot. vol. ref. (BFR/BV%)

Table 8 Correlation between OAF activity and histomorphometric parameters of bone resorption

	r	p
OAF vs. Eroded surface (ES/BS)	0.43	N.S.
Osteoclast surface (Oc. S/BS)	0.37	N.S.

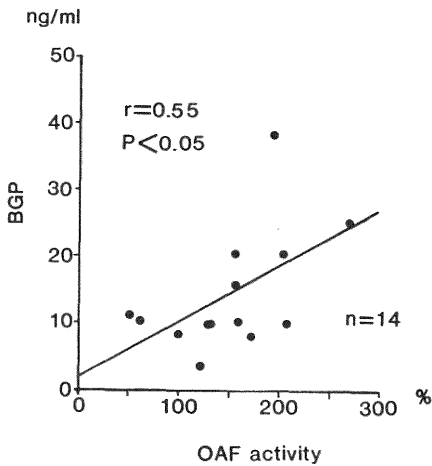


Fig. 10 Correlation between OAF activity and BGP

(Table 8).

またこの17名中 S-BGP の測定された14名の OAF 活性と S-BGP は有意の正の相関を認めた ($r=0.55$, $p<0.05$) (Fig. 10).

また S-BGP と石灰化速度を示す mineral apposition rate (MAR, $r=0.56$, $p<0.05$), 類骨面中のテトラサイクリン標識率を示す percentage of osteoid mineralizing (MS/OS², $r=0.79$, $p<0.001$) との間にも有意の正相関を認めた (Fig. 11, 12).

また PGE₂ は eroded surface (ES/BS, $r=0.57$, $p<0.02$), osteoclast surface ($r=0.67$, $p<0.01$) など

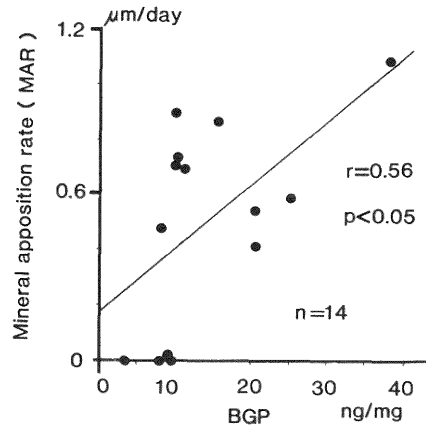


Fig. 11 Correlation between BGP and mineral apposition rate (MAR)

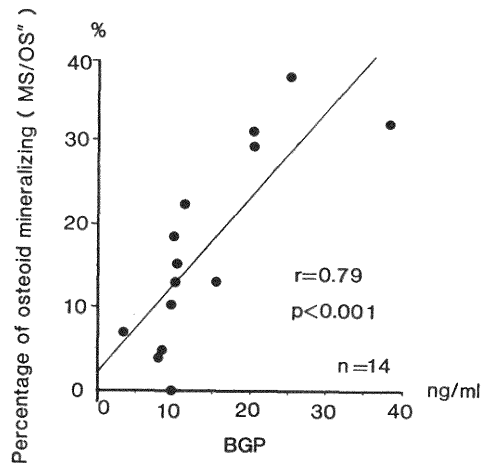


Fig. 12 Correlation between BGP and percentage of osteoid mineralizing (MS/OS²)

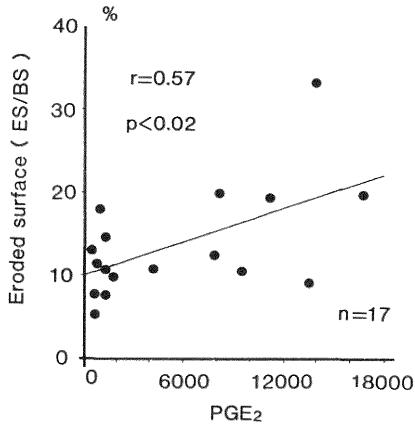


Fig. 13 Correlation between PGE₂ and eroded surface (ES/BS) (PGE₂: pg/ml)

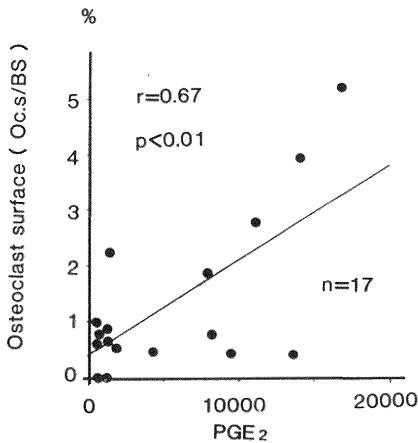


Fig. 14 Correlation between PGE₂ and osteoclast surface (Oc. S/BS) PGE₂ (pg/ml)

の骨吸収パラメーターとの間に有意の相関を認めた (Fig. 13, 14).

d. 実験Ⅲの小括

OAF 活性は骨吸収を反映せず、むしろ骨形成を反映していた。この series では OAF 活性は S-BGP と相関を示した。

骨芽細胞で産生され、骨形成の生化学的指標とされる S-BGP は、骨形成パラメーターとの相関を示した。また破骨細胞による骨吸収を促進すると考えられる PGE₂ は、骨吸収パラメーターとの相関を示したことから、この series における生化学的指標は、骨組織所見と一致していた。

III 実験全体の結果

上記実験 I, II, III の結果は以下のように要約できる。

1. OAF 活性を簡単に測定するため、ヒト末梢血単球による ⁴⁵Ca-hydroxyapatite 試薬を試み、至適単球密度 (1×10^6 /ml)、培養時間 (72時間) を決定した。

2. この方法を用いて、27名の骨粗鬆症および9名の慢性関節リウマチ患者における OAF 活性を測定し、53名の健常者と比較した。その結果、骨粗鬆症患者と健常者間には差がなかったが、慢性関節リウマチ患者では健常者に比し、有意 ($p < 0.05$) に亢進していた。同時に測定した OAF 上清中の IL-1 β , PGE₂, 血清中の BGP は骨粗鬆症患者及び慢性関節リウマチ患者と健常者群の間では有意差がなかった。

3. 実験 II で OAF 活性を測定した17名から腸骨を採取し、骨形態計測所見と OAF 活性の関連を検討した。その結果 OAF 活性は、骨吸収に関するパラメーターとの間には相関がなかったが、骨形成に関するパラメーターとは有意に (Ob. S/BS $p < 0.01$, MS/BS” $p < 0.005$, MS/OS” $p < 0.01$, BFR/BS” $p < 0.01$, BFR/BV” $p < 0.01$) 相関していた。また OAF 上清中の PGE₂ は骨吸収パラメーターと有意に (ES/BS $p < 0.02$, Oc. S/BS $p < 0.01$) 相関し、血清中の BGP は骨形成パラメーターと有意に (MAR $p < 0.05$, MS/OS” $p < 0.001$) 相関していた。

IV 考 察

A. 健常人と骨粗鬆症患者及び慢性関節リウマチ患者における in vivo の OAF について

In vivo における OAF について言及した報告は少ない。Mundy⁴⁾らは myeloma 患者から得た骨髄細胞の培養上清中に骨吸収活性を持った OAF 様因子の存在を初めて報告した。その後 lymphoid cell line⁵⁾, lymphosarcoma cell leukemia¹¹⁾などの血液系細胞の腫瘍と OAF の関連が論じられてきた。Durie ら¹²⁾は myeloma 患者の骨破壊病変部を X 線写真で graded scale で評価し、OAF 総量との間に比例関係があるとし、OAF と骨変化の関係に初めて定量的な解析を加えた。また歯周病患者由来の OAF が健常人に比し、有意に亢進していたことを hydroxyapatite を用いた骨塩吸収実験で池田¹³⁾は示し、腫瘍性疾患だけではなく炎症性疾患における OAF の意義についても関心が寄せられてきた。

しかし最も普遍的に認められる骨代謝疾患である骨粗鬆症と OAF について検討した報告はなく、また健常人における OAF 活性も未知の問題であった。本研究

ではこの点を明らかにするために、骨粗鬆症患者と健康者における OAF 活性について検討を加えた

その結果、骨粗鬆症患者と健康者間では OAF 活性に差が認められず、OAF 上清中の IL-1 β と PGE₂ 量も両者で差がなかった。また個々の患者では OAF 活性にばらつきがあり、また原疾患によっても差が認められた。

このことは myeloma のように自律的に血液細胞が増殖する腫瘍性疾患と異なり、個々の骨粗鬆症患者もしくは健康人では、骨代謝に動員されるリンパ球や単球は各個体で差があるものの、免疫学的に異常を指摘し得るほどの違いがないことを示唆していると考えられる。

一方慢性関節リウマチ患者では OAF 活性が亢進していた。OAF を発見した Horton ら¹⁾は慢性関節リウマチなどの慢性炎症性疾患における OAF の関与を想定しており、Krane ら¹⁴⁾の慢性関節リウマチ患者の培養滑膜細胞における骨吸収因子産生の報告などを支持する結果と思われた。

これは慢性的な滑膜炎のために、単球-マクロファージやリンパ球が常時動員される慢性関節リウマチと、加齢や閉経による一次性骨粗鬆症とでは免疫学的に病態が異なっており、この差が OAF 活性に違いをもたらしたと考えられた。

B. OAF 活性と骨組織形態計測値との関係

上述のように疾患の多様性、各個体の多様性に起因する OAF 活性が、実際に in vivo での bone remodeling のどの場面を反映するかは、未知の問題であった。この問題を解決するために実験Ⅲでは、OAF 活性測定と同時に腸骨生検を施行し、in vivo における骨の組織動態を検討に加えた。この結果、in vitro での OAF 活性はむしろ in vivo での骨芽細胞の activity を示す骨形成の程度と相関しており、破骨細胞性骨吸収の程度とは無相関であった。

この理由として、第一に破骨細胞による骨吸収は非常に短時間で終了するために、in vivo の組織ではすでに破骨細胞は消失している可能性が考えられる。

第二にいわゆる Howship's lacuna と呼ばれる骨吸収高は、骨吸収が終了して骨形成へと移行する reversal phase¹⁵⁾を表現している可能性が高く、酸性フォスファターゼ染色などの酵素染色の技法を用いない限り正しく定量的に骨吸収面を評価できず、相関が得られない可能性が考えられる。

第三に OAF が直接骨芽細胞に作用し、骨形成を促進している可能性が考えられる。この可能性については

近年比較的多くの文献的考察がある。Gowen¹⁶⁾らは OAF の component の一つである IL-1 が、ヒト由来の骨芽細胞の性格を示す bone cell の DNA 合成を促進し、細胞数を増加させたことを報告した。さらに Ikeda¹⁷⁾らは、ラットの骨芽細胞様株 MC3T3E1 を用いて、IL-1 β が同様に細胞数や DNA 合成を促進したことを報告した。しかし彼らは、同時に IL-1 β が collagen 合成や Alp 活性を抑制したことも認め、IL-1 β は骨形成の一種の regulator の役割を演じていると推論した。

Canalis¹⁸⁾は IL-1 が同様に DNA 合成や collagen 合成を促進することを認めたが、これは low dose の場合であり、high dose や長時間の exposure では、抑制的な結果が得られたことをラットの calvaria を用いて報告している。

これらの微妙な実験結果の違いは用いた骨芽細胞の違いや培養条件の差によって生ずる可能性が考えられるが、IL-1 による骨吸収を認めるいくつかの実験系¹⁹⁾²⁰⁾でも、その作用は骨芽細胞存在下ではじめて発現されることから、IL-1 すなわち OAF の target cell は骨芽細胞であり、OAF に曝された骨芽細胞からなんらかの mediator が放出され破骨細胞に作用を及ぼすことが考えられる。Ikeda¹⁷⁾、Canalis¹⁸⁾、Sato ら²¹⁾は、IL-1 により骨芽細胞の PGE₂ 産生が促進されることを観察しており、PGE₂ が骨吸収促進因子であることから、この mediator の一つは PGE₂ であろうと考えている。

Rifas ら⁷⁾は、骨形態計測の手法を用いて IL-1 活性と bone remodeling の関連について初めての報告をした。彼らも本研究と同様に、骨芽細胞の活動の指標である骨標識率、骨形成率との間に正の相関を認めている。high turnover osteoporosis の IL-1 活性が、low turnover osteoporosis の10倍以上であったことから、IL-1 が primary osteoporosis の turnover を上昇させる一因子である可能性を示唆している。

C. OAF の由来、組成と作用点

本研究における OAF 活性は、ヒト末梢血単球による ⁴⁵Ca hydroxyapatite 吸収活性であり、OAF の component である IL-1 を定量したものではない。事実 OAF 活性と IL-1 活性の間には相関が認められなかった。しかし、OAF は単独の因子ではなく、種々の cytokine の複合体であると考えられ、現在までに生化学的に明らかにされたのは、Dewhirst ら²²⁾の IL-1 と Bertolini ら³⁾の tumour necrosis factor のみである。この他にも複数の未知の因子が OAF 中に存在していると考えられ、今回ヒト末梢血単球と ⁴⁵Ca-hydroxyapatite

を用いたこの OAF 活性測定系が、いずれの因子を強く反映したのかは、さらに検討を要する点である。しかし本来破骨細胞を活性化すると考えられてきた OAF がこのように、むしろ骨形成を反映している点は、骨の remodeling の過程を理解する上で興味深い。つまり活性化型ビタミン D や PTH などの強力な骨代謝調節因子の受容体は破骨細胞にはなく、骨芽細胞に存在しており、骨芽細胞は本来の機能である骨形成以外に破骨細胞による骨吸収を regulate している可能性が示唆されているからである。このことから考えると、OAF も同様にまず骨芽細胞に作用し、なんらかの mediator によって間接的に破骨細胞が活性化されるという過程をとることが予測される。骨の remodeling を調節する key cell は骨芽細胞であり、骨吸収と骨形成の不均衡 (uncoupling) は、骨芽細胞のもつこの bifunctional な働きの異常に起因する可能性が考えられる。

ヒト末梢血単球と ^{45}Ca -hydroxyapatite を用いたこの骨塩吸収による OAF 活性測定法は、細胞間の相互作用が排除でき、作用を単純化して観察できる点で有利と考えられる。しかし用いている細胞が単球であり、破骨細胞ではない点が唯一の弱点である。これはヒトでは、破骨細胞を単離することが現在までのところ成功しておらず、利用できないためである。しかし、破骨細胞の前駆細胞は、血液幹細胞から分化した単球・マクロファージ系と考えられており、Mundy ら²²⁾が初めて単球による骨吸収を報告して以来、骨吸収は破骨細胞のみでなく、単球との共同作用によって営まれると考えられてきた。従ってこの実験系は直接破骨細胞の activity を反映するよりは、その前駆細胞である単核細胞もしくは、破骨細胞と共同して骨吸収を営む単球の activity を反映していると推測される。この実験系で測定された OAF 活性は、骨芽細胞の activity を強く反映したことから、OAF は直接骨芽細胞に作用したのち、間接的にこれらの前駆細胞ないし単球に作用している可能性が考えられた。患者群において、OAF 活性と単球の major product である PGE_2 の間に有意の正の相関があったことは、この推測を支持する一所見と思われた。

また骨組織形態計測パラメーターと生化学的指標の関連については、骨芽細胞により産生される BGP が、骨形成パラメーターと相関しており、骨吸収因子の一つである PGE_2 が骨吸収パラメーターと相関していた。これらの結果から、骨組織形態計測によって定量化された骨動態は、種々の骨代謝因子の作用を矛盾なく反映していると考えられ、OAF の骨に対する作用を検討するために

骨組織形態計測学的手法を用いることは、有効な方法であると思われた。

またこのように末梢血の採取という比較的簡便な方法で、骨組織学的動態がある程度推測されるこの測定系は、non-invasive に骨動態を免疫学的手法により窺い知る一方法となる可能性が示唆された。

結 語

ヒト単球による ^{45}Ca hydroxyapatite 吸収実験により、骨粗鬆症患者と慢性関節リウマチ患者における OAF 活性を健常者と比較した。さらにこの内の17名の腸骨生検を同時に行ない、骨組織形態計測学的検討を行ない、以下の結論を得た。

1. OAF 活性は健常者と骨粗鬆症患者間では差がなかったが、慢性関節リウマチ患者との間では有意に亢進していた。それは慢性関節リウマチでは骨粗鬆症と異なり、炎症性変化のために免疫動態が異なっているためと考えられた。

2. OAF 活性は骨形態計測の結果から骨形成の程度と有意に相関しており、OAF の骨芽細胞に対する促進的作用が示唆された。

3. ヒト単球と ^{45}Ca -hydroxyapatite を用いたこの OAF 活性測定系は、non-invasive に骨動態を推測する一方法となる可能性が考えられた。

稿を終えるにあたり、御助言御校閲を頂いた新潟大学整形外科田島達也教授、直接御指導を頂いた高橋栄明助教授と信楽園病院内科青木忠夫博士、同研究部宮腰秀夫博士、また実験に協力頂いた同研究部三井田ゆか女史に感謝いたします。

(本研究内容の一部は 5th International Congress on Bone Morphometry, 第6回日本骨代謝学会、第3回日本整形外科学会基礎学術集会で口演した。)

参 考 文 献

- 1) Horton, J.E., Raisz, L.G., Simmons, H.A., Oppenheim, J.J. and Mergenhagen, S.E.: Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science*, 177: 793~795, 1972.
- 2) Dewirst, F.E., Stashenko, P.P., Mole, J.E. and Tsurumachi, T.: Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1β . *J.*

- Immunol.: 2562~2568, 1985.
- 3) 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.
 - 4) Muday, G.R., Raisz, L.G., Cooper, R.A., Schechter, G.P. and Salmon, S.E.: Evidence for the secretion of an osteoclast stimulating factor in myeloma., *N. Eng. J. Med.*, **291**: 1041~1051, 1974.
 - 5) Mundy, G.R., Luben, R.A., Raisz, L.G., Oppenheim, J.J. and Buel, D.N.: Bone-resorbing activity in supernatants from lymphoid cell lines. *N. Engl. J. Med.* **290**: 867~871, 1974.
 - 6) Manson, J.D.: Bone morphology and bone loss in periodontal disease. *J. Clin. periodontol.* **3**: 14~22, 1976.
 - 7) Rifas, L., Pacifici, R., Teitelbaum, S., Slatopolsky, E., Miller, R., Bergfeld, M., Lee, W., Avioli, L.V. and Peck, W.A.: Release of interleukin 1-like activity from human blood monocytes is elevated in high-turnover osteoporosis. *Clin. Res.* **34**: 686 A, 1986.
 - 8) Raisz, L.G. and Niemamn, I.: Effect of phosphate, calcium, and magnesium on bone resorption and hormonal responses in tissue culture. *Endocrinology*, **85**: 446~452, 1969.
 - 9) 佐藤巖雄: ヒト単球の骨吸収機構への関与に関する研究—単球の骨塩 (合成ハイドロキシアパタイト) 破壊作用—, *歯基礎誌*, **28**: 143~151, 1986.
 - 10) Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M. and Recker, R.R.: Histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J. Bone Min. Res.* **2**: 595~610, 1987.
 - 11) Mundy, G.R., Rick, M.E., Turcotte, R. and Kowalski, M.A.: Pathogenesis of hypercalcemia in lymphosarcoma cell leukemia. *Am. J. Med.*, **65**: 600~606, 1978.
 - 12) Durie, B.G.M., Salmon, S.E. and Mundy, G.R.: Relation of osteoclast activating factor production to extent of bone disease in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, **47**: 21~30, 1981.
 - 13) 池田克己: 歯周疾患における炎症と骨の吸収—特に, OAF 活性に及ぼす単球~マクロファージの効果—, *歯科ジャーナル*, **22**: 842~844, 1985.
 - 14) Krane, S.M., Emkey, R.D. and Ferzoco, L.: The enhancement by rheumatoid synovial culture media of ⁴⁵Ca release from prelabeled fetal bones. *Arthritis Rheum.* **14**: 396~397, 1971.
 - 15) Baron, R.: Importance of the intermediate phases between resorption and formation in the measurement and understanding of the bone remodeling sequence. In: *Bone histomorphometry*, Meunier P.J., Ed., Armour Montagu, Paris, pp179~183, 1977.
 - 16) Gowen, M., Wood, D.D. and Russell, G.G.: Stimulation of the proliferation of human bone cells in vitro by human monocyte products with interleukin-1 activity. *J. Clin. Invest.* **75**: 1223~1229, 1985.
 - 17) Ikeda, E., Kusaka, M., Hakeda, Y., Yokota, K., Kumegawa, M. and Yamamoto, S.: Effect of interleukin 1 beta on osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *Calcif. Tissue Int.* **43**: 162~166, 1988.
 - 18) Canalis, E.: Interleukin-1 has independent effect on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in cultures of rat calvariae. *Endocrinology*. **118**: 74~81, 1986.
 - 19) Thompson, B.M., Saklatvala, J. and Chambers, T.J.: The effect of pig interleukin-1 (catabolin) on bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. *British J. Rheum.* **24** (suppl): 140~142, 1985.
 - 20) Thompson, B.M., Saklatvala, J. and Chambers, T.J.: Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by

- rat osteoclasts. *J. Exp. Med.* **164**: 104~112, 1986.
- 21) Sato, K., Fujii, Y., Asano, S., Ohtuki, T., Kawakami, M., Kasano, K., Tsushima, T. and Shizume, K.: Interleukin 1 alpha and beta stimulate mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) to produce macrophage-colony stimulating activity and prostaglandin E₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**: 285~291, 1986.
- 22) Mundy, G.R., Altman, A.J., Gondek, M.D. and Bandelin, J.G.: Direct resorption of bone by human monocytes. *Science.* **196**: 1109~1111, 1977.

(平成元年2月6日受付)
