
原 著

パルス電磁場刺激が培養成長軟骨細胞の分化・
増殖機能に及ぼす影響についての実験的研究

新潟大学医学部整形外科学教室（主任：田島達也教授）

遠藤直人

The effect of pulsing electromagnetic fields on differentiation and
proliferation of rabbit costal chondrocytes in culture

Naoto ENDO

Department of Orthopedic Surgery, Niigata University School of Medicine

(Director: Prof. Tatsuya TAJIMA)

The effect of pulsing electromagnetic fields (PEMF) on growth-cartilage cells was examined at the cellular level. Growth-cartilage cells were isolated from the ribs of young male rabbits. After cultured chondrocytes were reached subconfluency, they were exposed to vertically directed PEMF of average 2.4gauss, 15.4Hz.

The effect of PEMF stimuli on the expression of the differentiated phenotype was evaluated in the light of PTH-responses using cAMP, induction of ODC and synthesis of GAG. And then the effect of PEMF on proliferation of cultured chondrocytes was examined.

The following results were obtained.

1. The basal cAMP level treated with PBS was not changed by PEMF stimuli.
2. Cyclic AMP level treated with PTH was markedly elevated by PEMF.
3. Induction of ODC by PTH and synthesis of GAG by PTH were also enhanced by PEMF.
4. Enhancement of GAG-synthesis by PTH was changed by neither Verapamil nor EGTA.
5. DNA synthesis of cultured chondrocytes was not enhanced by PEMF.

On the basis of these results it was concluded that PEMF stimulated differentiation or expression of the differentiated phenotype of chondrocytes.

Key words: Pulsing electromagnetic fields, parathyroid hormone, growth-cartilage cell

パルス電磁場刺激, 上皮小体ホルモン, 成長軟骨細胞

Reprint requests to: Naoto Endo, Department
of Orthopedic Surgery, Niigata University
School of Medicine, Niigata City,
951 Japan

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部整形外科学教室

遠藤直人

力学的な負荷は骨の形状や骨量の維持と密接な関係がある。1870年、Wolf は人の大腿骨の骨梁が荷重の方向と平行に形成されることを明らかにしており³⁴⁾、また、長期臥床、不動により骨萎縮がおこることや宇宙飛行などの無重力状態下では骨成長が抑制され、骨量減少を招来する²⁰⁾ことが知られている。このように骨の成長や修復過程における力学的負荷の重要性は以前から知られているが、実際にどのような signal を介しているのかなどその作用機序はいまだ不明な点が多い。1953年、Yasuda らは骨に圧力を加えると electrical potential が発生し、圧迫側ではマイナスに、牽引側ではプラスに分極する現象 (piezoelectric phenomenon of bone) を発見³⁶⁾し、さらに1954年体外から骨へ微小電流を通電することにより仮骨が形成されることを報告した³⁷⁾。その後、多くの実験的・臨床的な事実が報告され^{1) 10) 11)}、現在では piezoelectricity は dry bone においてみられる現象であり、stressed fluid-filled bone においてみられる現象は streaming potential で、これが実際に骨の成長や修復に関わっていると考えられている。これらのことより現在では力学的負荷は電気的な signal に変換されて骨の細胞の増殖や分化機能に作用してその成長や分化に関与するものと考えられている^{8) 12)}。

現在、体外から電気刺激を加え骨折治癒や骨成長を促進する方法が臨床に用いられている^{2) 6) 7)}。電気刺激としては、invasive な電極挿入による微小電流刺激や non-invasive な電磁場刺激などがあるが、そのうちパルス電磁場刺激は体外から non-invasive に変動電磁場刺激を加えることにより発生する微小誘導電流が生物学的作用をもつものと考えられている。

力学的な刺激や電気的な刺激などの物理的因子の作用機序について山下らは培養成長軟骨細胞が物理的因子である compressive force に反応して細胞内 cyclic AMP (以下 cAMP) を増加すると報告している³⁵⁾。また、Rodan, Norton らは鶏胚脛骨骨端軟骨を用いた実験より mechanical force または electrical force が bone remodeling に作用する上で cAMP を cellular signal としている可能性を示唆した^{21) 25)}。しかし、細胞の分化や増殖に及ぼす影響など細胞レベルでの作用機序についてはほとんど明らかにされていない。

本研究の目的は物理的刺激である電磁場刺激の骨組織に対する作用機序を検討することである。そのために骨形成や骨折治癒に重要な役割を果たしている軟骨細胞に対してパルス電磁場刺激が、どのような影響を与えるのか、特に成長軟骨細胞の分化・増殖機能にどのような影

響をおよぼすかを in vitro の系で検討した。

材料および方法

1. 材料

ウシ上皮小体ホルモン (PTH; synthetic 1-34 peptide, 6,000IU/mg) は Beckman Inc. より購入した。DL-[1-¹⁴C] オルニチン HCl と [6-³H]-チミジンは New England Nuclear Co. (U.S.A.) より、[³⁵S]-硫酸 (carrier free) は日本原子力研究所 (東京) より、Cyclic AMP assay kit はヤマサ醤油 K.K. (千葉) より購入した。サケ・カルシトニン (SCT) は帝国臓器 K.K. より、Verapamil はエーザイ K.K. (東京) より供与された。その他の試薬は市販の特級品およびそれに準ずるものを使用した。

2. 軟骨細胞の分離・培養 (Fig. 1.)

鈴木らの方法²⁹⁾にしたがい、体重 300g から 600g、生後4から6週の雄性 New Zealand 仔ウサギより無菌的に肋骨をとり出し、Ca, Mg 不含生理食塩水 (CMF) に浸し、肋骨周囲の骨膜、軟骨膜などの軟部組織をとり除く。この肋骨の骨・軟骨境界部より成長軟骨層 (増殖軟骨層と肥大軟骨層を包含した部位) のみをメスにて切断、採取した。このようにして採取した成長軟骨をメスにて細切した後、0.1% EDTA (ethylene

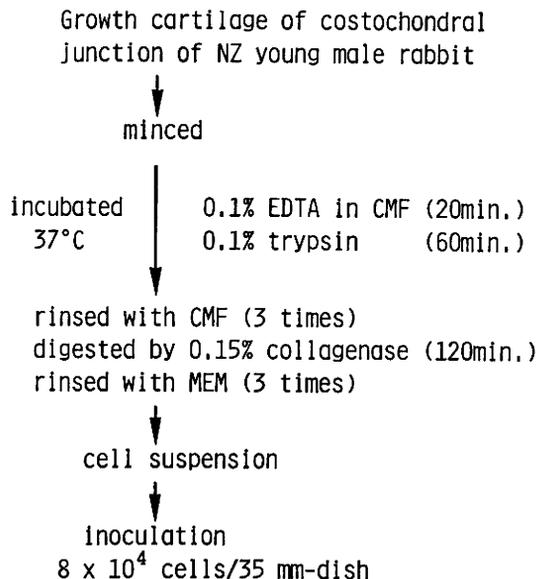


Fig. 1 Isolation and culture procedure of chondrocytes from rabbit costal growth cartilage

diamine tetra-acetic acid, disodium salt) を含む CMF にて 37°C, 20分浸漬したのち上清を捨て, 0.1% トリプシン (0.25%, 阪大微生物研究会, 大阪) を含む CMF にて 37°C, 60分処置する. 次いで上清を捨て CMF にて細切した組織片を3回洗い, トリプシンを除き, その後, 0.15% コラゲナーゼ (和光製薬, 大阪) を含む CMF 液にて 37°C, 2時間消化する.

以上のようにして得られた細胞浮遊液をナイロンメッシュ (孔径 120 μ m) にてろ過し, 細胞成分のみを採取し, 10% ウシ胎仔血清 (F.C.S., GIBCO, New York, 56°C 30分非働化) を含む Eagle's Minimum Essential Medium 培養液 (MEM, 日水製薬, 東京) を入れた遠心管に移した. 1,500rpm で5分間遠心し, 上清を捨てその沈殿をふたたび培養液にて懸濁し, 再度, 遠心する. この操作を3回くりかえして軟骨細胞のみを分離する. このようにして得られた成長軟骨細胞を MEM 培養液にて希釈し, 細胞培養用プラスチックディッシュに播種した. 本研究では原則として 35mm プラスチックディッシュ (テルモ K.K., 東京) 1個あたり 8×10^4 個の軟骨細胞を播種し, 実験に用いた. 培養は炭酸ガス細胞培養装置 (CO₂ 5%, 空気95%, 37°C) を用い, 培養液の交換は通常2日毎におこなった.

3. パルス電磁場 (Pulsing electromagnetic field: PEMF) 刺激

培養軟骨細胞が播種後6日から7日目に subconfluent

に達したのち, 培養ディッシュを直径 35 mm の Helmholtz コイルに挿入しパルス電磁場刺激を加えた. Helmholtz コイルにパルス幅 5msec, パルス波間隔 65msec, 15.4Hz のパルス波電流を流し, 平均 2.4gauss, 最大 45gauss の鉛直方向のパルス電磁場刺激を発生させた (Fig. 2, 3).

4. 細胞内 cAMP レベルの測定

培養液を除去し, 細胞層を Hanks 液にて4回洗浄後, 同溶液 1ml で1時間 37°C, 5% CO₂ 気相下で preincubate した後, ホルモンまたは試薬などの各サンプルを添加した. 添加後2分間 incubate したのち, Hanks

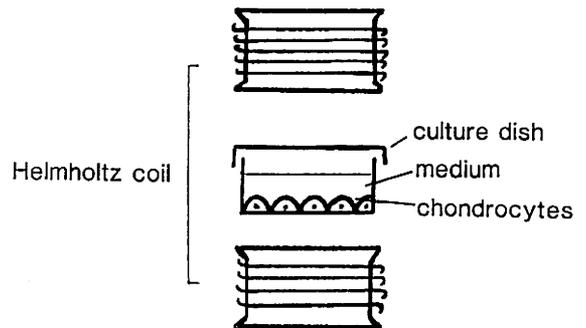


Fig. 2 PEMF generator

After the cultures reached subconfluency, they were exposed to PEMF by placing the culture dishes between the 35-mm-diameter-Helmholtz coils.

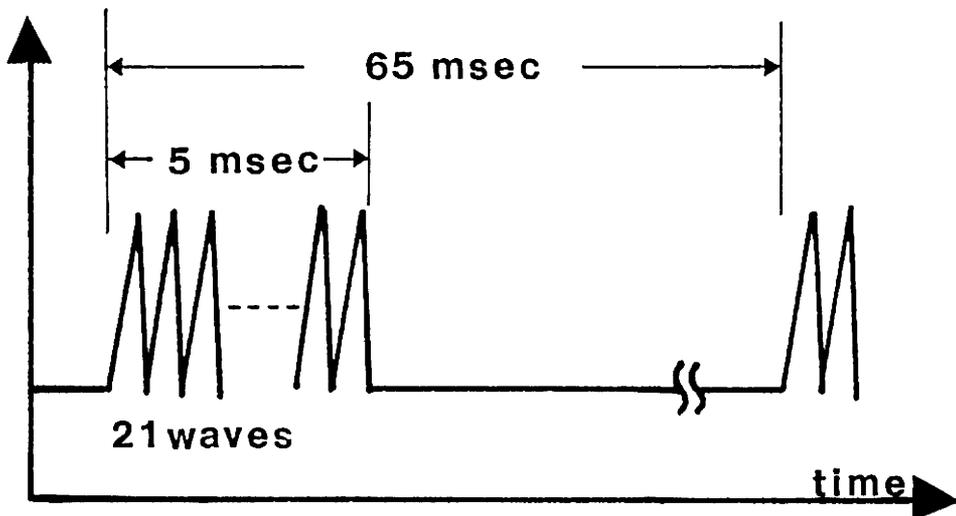


Fig. 3 PEMF stimuli were generated, using Helmholtz coils oriented parallel to the plane of cell adhesion, by pulsating currents in the coils of a 5 msec burst of 210 μ sec and 25 μ sec opposite polarity (15.4Hz, max. 45 gauss, average 2.4 gauss).

溶液を捨て 2ml の氷冷 6% トリクロロ酢酸 (TCA) でラバーポリスマンを用いて細胞をはがし, 20KHz, 60秒間 (30秒 × 2) 超音波処理後, 4°C, 3,000 × g, 10分間の条件で遠心し, 上清を分離した. 上清の TCA 液を水飽和エーテルにて抽出除去し, Honma の方法¹⁴⁾により Cyclic AMP assay kit を用いて測定した. 沈渣は 1N NaOH で溶解し蛋白定量に用いた.

5. オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) 活性の測定

滝川らの方法³¹⁾によった. すなわち, 培養液を除去後, 細胞層を氷冷した phosphate buffered saline (PBS) で 5 回洗浄した後, 0.8ml の標準緩衝液 (I) (Table 1) 中でラバーポリスマンを用いてはがし, 20 KHz, 60秒間 (30秒間 × 2) 超音波処理後, 4°C, 15,000 × g, 15分間の条件で遠心し, その上清を酵素液とした. この酵素液 0.4ml, 反応液 (II) (Table 1) 50μl および L-[1-¹⁴C] オルニチン (1.36μCi/nmol, 5mM) 50μl で全量 0.5ml とし, 37°C, 60分間反応させ, L-[1-¹⁴C] オルニチンから遊離される ¹⁴CO₂ から ODC 活性を測定した.

Table 1

Standard buffer (I)	8.69ml
D.W.	
0.2M Tris HCl+0.8M EDTA (pH7.1)	1.25
1 M DTT (dithiothreitol)	0.05
100mM B6P (pyridoxal phosphate)	0.01
	10.00
Reagent (II)	
D.W.	0.04
0.6M Tris HCl+0.4M EDTA (pH7.1)	0.70
1 M DTT	0.05
100mM B6P	0.01
	1.00

6. グリコサミノグリカン (GAG) 合成能の測定

グリコサミノグリカン合成は Saarni と Tammi の方法²⁸⁾に準じて [³⁵S]-硫酸の GAG へのとりこみにより測定した. 培養液を捨て Gey 溶液 (10% Hanks 溶液を含む) で 3 回洗浄したのち [³⁵S]-硫酸を含む同溶液で (2μCi/ml) で 37°C, 5% CO₂ 気相下で 3 時間 incubate した. Incubation 後, 溶液層と細胞層のそれぞれにわけて以下の処理を行った. 溶液層は 0.2M

トリス-HCl (pH 7.8) を含む 5mM CaCl₂ · 2H₂O 溶液を加え, 次いでコンドロイチン硫酸ナトリウム (CS-Na) 100μg/ml, 2mM MgSO₄ を加え 37°C, 30分間 incubate した後, 1% 塩化セチルピリジニウム (CPC) を含む 0.02M NaCl 溶液を加え CS-Na を沈殿させ, この沈殿物を集め, その放射能を液体シンチレーションカウンター (LKB WALLAC, Sweden) にて測定した. 細胞層は, 一部は蛋白定量に用い, 残りはプロナーゼ E 1mg/ml (科研化学 K.K. 東京) 含有の 0.2M Tris-HCl (pH 7.8), 5mM CaCl₂ · 2H₂O 溶液で 55°C, 10 時間 incubate し, 以下溶液層と同様に処理し測定した.

7. DNA 合成能の測定

培養液中に [6-³H]-チミジン 1μCi/ml を加え, 37°C, 5% CO₂ 気相下にて 4 時間 incubate したのち, 培養液を捨て氷冷した PBS で 3 回洗浄し, 次いで 5% TCA 液とエタノール/エチルエーテル (3:1, v/v) で処理し 0.3N NaOH にて剥離回収した. その液を 6N HCl で中和したのち液体シンチレーションカウンターにて放射能活性を測定した.

8. タンパク定量

SH 基の存在する ODC 酵素液については, Ross と Schatz の方法²⁷⁾により, それ以外は, Lowry の方法¹⁸⁾により測定した. なお, ウシ血清アルブミン (BSA) を標準タンパクとして用いた.

結 果

1. 細胞内 cAMP レベルにおよぼすパルス

電磁場刺激の影響

分離・培養後 6 日から 7 日目, 8 群の subconfluent に達した軟骨細胞を 4 群ずつ 2 分してパルス電磁場刺激下 (2.4gauss, PEMF (+)) または非刺激下 (PEMF (-)) にて 96 時間培養を続け, それぞれに PBS (対照), PTH (2.5IU/ml), プロスタグランジン E₁ (PGE₁, 10μg/ml), プロスタグランジン I₂ (PGI₂, 10μg/ml) を添加したのち, パルス電磁場刺激下または非刺激下で, 2 分後の細胞内 cAMP 量を測定した.

その結果, パルス電磁場刺激の有無にかかわらず, それぞれの対照群 (PBS 添加) では細胞内 cAMP レベルに差を認めなかった. 非電磁場刺激下で PTH 添加後の細胞内 cAMP レベルは対照 (PBS 添加) に比し, 約 20 倍ほどの上昇 (p<0.005) を示した. パルス電磁場刺激下で PTH 添加の cAMP レベルは対照に比して約 30 倍に上昇し (p<0.005), これは非電磁場刺激下 PTH 添加群の 1.4 倍に相当し, 有意の差 (p<0.05) があつた.

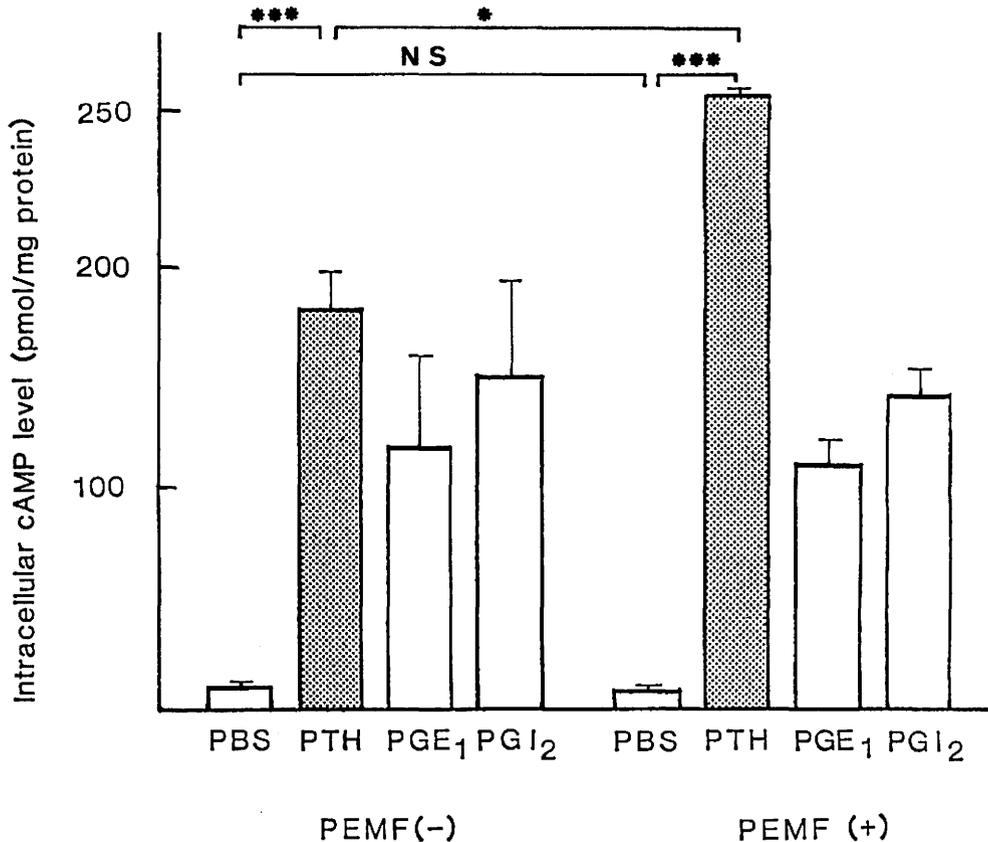


Fig. 4 Effect of PEMF on the intracellular cyclic AMP level treated with PBS, PTH, PGE₁, or PGI₂.

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were exposed to PEMF (2.4 gauss, PEMF (+)) or no PEMF (PEMF (-)) for 96 h. Then intracellular cAMP 2 minutes after adding PBS (control), PTH (2.5 IU/ml), PGE₁ (10 μg/ml), or PGI₂ (10 μg/ml) was assayed. Each value is the average ± S.D. in the duplicate experiments.

*, ***: Difference is significant at $p < 0.05$, $p < 0.005$ respectively.

NS: Difference is not statistically significant.

PTHと同様に細胞内cAMPレベルを上昇させるPGE₁, PGI₂¹⁷⁾を加えた場合, パルス電磁場刺激下の細胞内cAMPレベルはそれぞれ非電磁場刺激下のそれと差はなかった (Fig. 4).

2. PTH添加後の細胞内cAMPレベルと パルス電磁場刺激時間との関係

2.4gaussのパルス電磁場刺激時間を1, 6, 24, 48, 96時間とする5群に分け, 各条件下で軟骨細胞を培養した後, PTH (2.5IU/ml)を添加し, 2分後の細胞内cAMPを測定した. それぞれについてパルス電磁場刺激下PTH添加のcAMP値と非電磁場刺激下PTH添加の細胞

内cAMPとの比(PEMF(+)/PEMF(-))を算出し, 比較検討した. PBS(対照)についても同様にしておこなった.

その結果, PTH添加の条件下で1から24時間の刺激時間のcAMPレベルはそれぞれ非刺激群のcAMPレベルと差はなかったが, 48, 96時間の刺激時間でPTH添加の細胞内cAMPの亢進を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 5). 一方, PBS添加では電磁場刺激時間にかかわらず, cAMPレベルの亢進作用は認められなかった.

このように培養軟骨細胞においてパルス電磁場刺激は単独ではcAMPレベルを上昇させることはなく, PTH

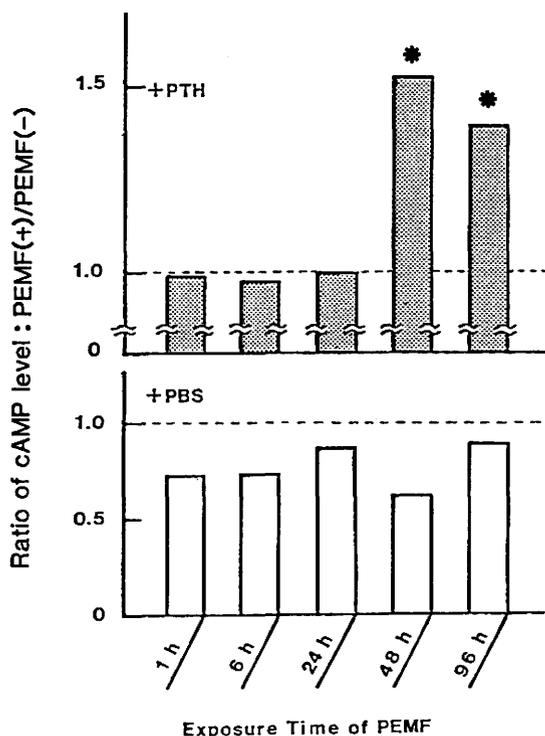


Fig. 5 Effect of exposure time of PEMF on the cAMP level

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were exposed to PEMF (2.4gauss, PEMF (+)) or no PEMF (PEMF (-)) for 1, 6, 24, 48, or 96h. Then intracellular cAMP 2 minutes after adding PBS or PTH (2.5IU/ml) was assayed in the triplicate experiment. Each value is the ratio of cAMP level under PEMF to under no PEMF in the presence or absence of PTH.

*: Difference is significant at $p < 0.05$.

添加後の細胞内 cAMP レベルを上昇させた (Fig. 4, 5).

3. PTH 添加後の細胞内 cAMP レベルとパルス電磁場刺激のつよさとの関係

パルス電磁場刺激のつよさを 0.6, 1.2, 2.4gauss の 3 群に分けて軟骨細胞をそれぞれのパルス電磁場刺激下で48時間培養し, PTH (2.5IU/ml) を添加し, 2分後の細胞内 cAMP を測定した. さらにそれぞれについて非電磁場刺激下 PTH 添加の細胞内 cAMP との比 (PEMF (+)/PEMF (-)) を算出し, 比較した. PBS についても同様にして行った.

その結果, PTH 添加の cAMP レベルは, 0.6gauss のパルス電磁場刺激下では非刺激下のそれとほとんど差

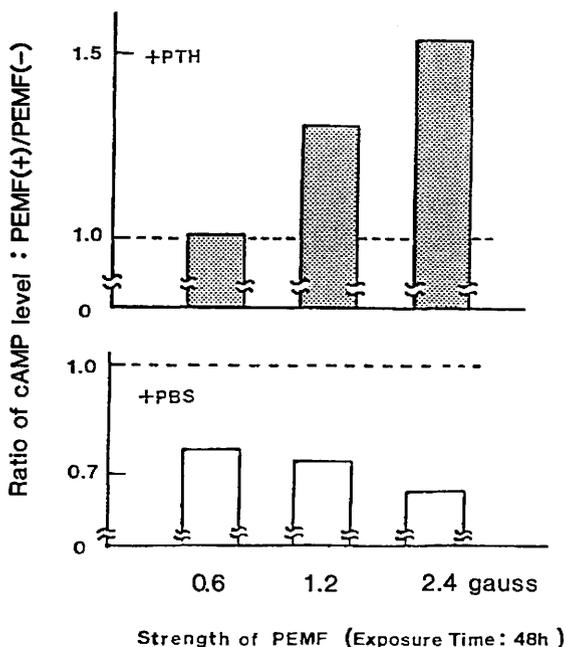


Fig. 6 Effect of strength of PEMF on the cAMP level.

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were exposed to PEMF (PEMF (+), 2.4, 1.2 or 0.6 gauss) or no PEMF (-) for 48h. Then intracellular cAMP 2 minutes after adding with PBS or PTH (2.5IU/ml) was assayed in the triplicate experiment. Each value is the ratio of cAMP level under PEMF to under no PEMF in the presence or absence of PTH.

がなく, 1.2gauss のパルス電磁場刺激下では1.3倍の上昇率を示し, 2.4gauss のパルス電磁場刺激では1.5倍に達し, 最大の亢進作用を示した (Fig.6).

以上のことから, これ以後の実験は特別にことわりのないかぎり, 2.4gauss, 48時間のパルス電磁場刺激を用いた.

4. 軟骨細胞のオルニチン脱炭酸酵素活性におよぼす電磁場刺激の影響

Subconfluent に達した 4 群の培養軟骨細胞を 2 分してパルス電磁場刺激下または非刺激下にて48時間培養し, それぞれ PBS (対照) または PTH (2.5IU/ml) を添加し, 4 時間後の ODC 活性を測定した. その結果, パルス電磁場刺激の有無にかかわらず, それぞれの対照群の ODC 活性に差は認めなかった. 非電磁場刺激下 PTH 添加の ODC 活性は対照に比して約 5 倍の上昇

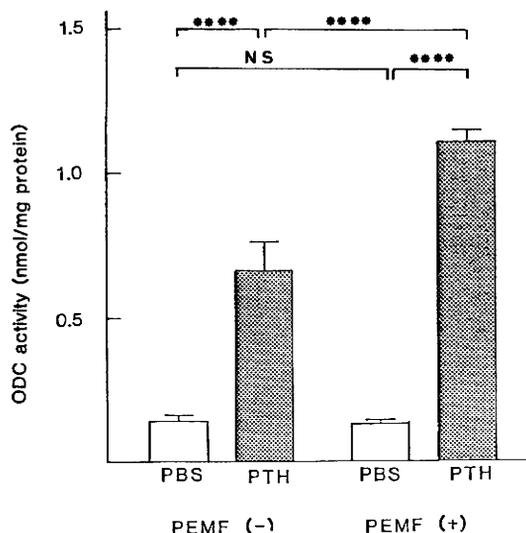


Fig. 7 Effect of PEMF on the ODC (ornithine decarboxylase) activity.

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were exposed to PEMF (2.4 gauss, PEMF (+)) or no PEMF (PEMF (-)) for 48 h. Then ODC activity 4 hours after adding PBS or PTH (2.5 IU/ml) was assayed. Each value is the average \pm S.D. in the triplicate experiment.

****: Difference is significant at $p < 0.001$.

NS: Difference is not statistically significant.

($p < 0.001$) を示した。パルス電磁場刺激下で PTH 添加の ODC 活性は対照に比して約 8 倍に上昇し ($p < 0.001$)、これは非電磁場刺激下 PTH 添加の ODC 活性の 1.7 倍に相当し、有意の差 ($p < 0.001$) があった (Fig. 7)。

5. PTH 添加後のグリコサミノグリカン合成 におよぼすパルス電磁場刺激の影響

Subconfluent に達した 4 群の培養軟骨細胞を 2 分してパルス電磁場刺激下または非刺激下で 72 時間培養したのち、それぞれに PBS (対照) または PTH (2.5 IU/ml) を添加し、さらに 24 時間パルス電磁場刺激下または非刺激下で培養をつづけ、 $[^{35}\text{S}]$ -硫酸の GAG への取りこみを測定した。その結果、パルス電磁場刺激の有無にかかわらず、それぞれの対照 (PBS 添加) 群では GAG 合成に差を認めなかった。非電磁場刺激下で PTH 添加の GAG 合成は対照に比して 1.3 倍に上昇 ($p < 0.01$) した。パルス電磁場刺激下で PTH 添加の GAG 合成は対照に比して約 1.7 倍に上昇し ($p < 0.01$)、これは非

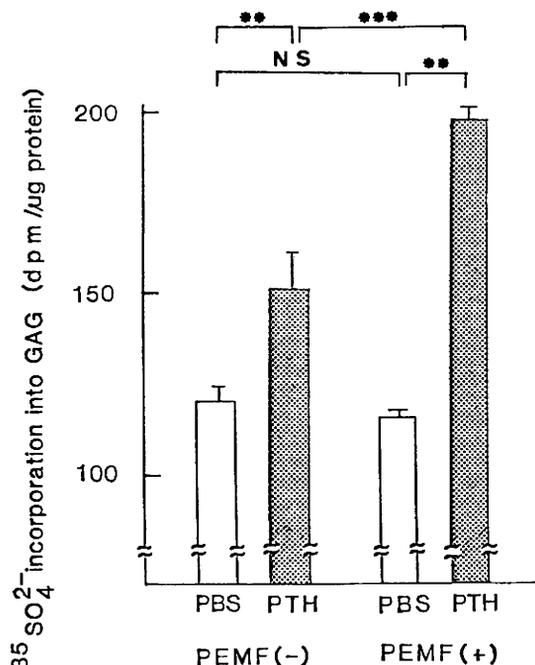


Fig. 8 Effect of PEMF on $[^{35}\text{S}]$ sulfate incorporation into GAG.

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were exposed to PEMF (2.4 gauss, PEMF (+)) or no PEMF (PEMF (-)) for 72 h. After adding PBS or PTH (2.5 IU/ml), they were exposed to PEMF or no PEMF for 24 h. Then $[^{35}\text{S}]$ sulfate incorporation into GAG was assayed. Each value is the average \pm S.D. in the triplicate experiment.

** , ***: Difference is significant at $p < 0.01$, $p < 0.005$ respectively.

NS: Difference is not statistically significant.

刺激下 PTH 添加の GAG 合成の 1.3 倍に相当し、有意の差 ($p < 0.005$) があった (Fig. 8)。

次に PTH 添加後の GAG 合成亢進作用とパルス電磁場刺激時間との関係を検討した。すなわちパルス電磁場刺激時間を 6, 12, 24, 48, 96 時間とする各群に分けてそれぞれの条件にて軟骨細胞を培養した後、PTH を添加し、さらに 24 時間電磁場刺激下で培養し、 $[^{35}\text{S}]$ -硫酸のとりこみを測定した。それぞれについて非刺激下 PTH 添加の $[^{35}\text{S}]$ -硫酸のとりこみとの比 (PEMF (+)/PEMF (-)) を算出し、両者を比較した。その結果、6 から 24 時間の刺激時間では $[^{35}\text{S}]$ -硫酸のとりこみは非刺激時のそれと差を認めず、48, 96 時間の電磁場刺激時間で亢進作用を認めた (Fig. 9)。

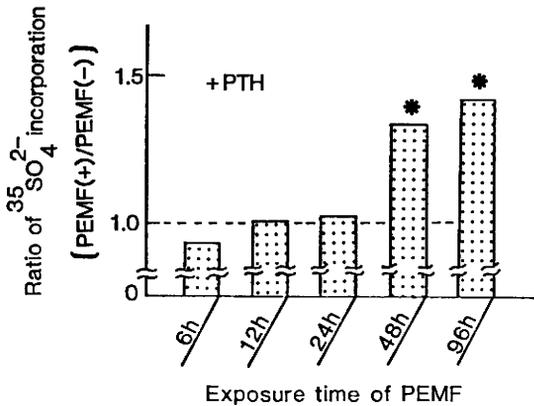


Fig. 9 Effect of exposure time of PEMF on GAG synthesis.

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were exposed to PEMF (2.4 gauss, PEMF (+)) or no PEMF (PEMF (-)) for 6, 12, 24, 48, or 96 h. After adding PTH (2.5 IU/ml), they were exposed to PEMF or no PEMF for 24 h. Then [^{35}S] sulfate incorporation into GAG was assayed in the triplicate experiment. Each value is the ratio of [^{35}S] sulfate incorporation into GAG under PEMF to no PEMF in the presence of PTH.

*: Difference is significant at $p < 0.05$.

6. サケ・カルシトニン添加のグリコサミノグリカン合成に及ぼすパルス電磁場刺激の影響

パルス電磁場刺激下または非刺激下で48時間培養し、それぞれに PBS (対照), SCT (40mU/ml), PTH (2.5IU/ml), SCT+PTH を加え, [^{35}S]-硫酸のとりこみを測定した. その結果, パルス電磁場刺激は SCT 添加のグリコサミノグリカン合成を亢進することはない. また, 電磁場刺激下で PTH 単独添加時の GAG 合成は SCT+PTH 添加のそれと差はなかった (Fig. 10).

7. パルス電磁場刺激の DNA 合成におよぼす影響

パルス電磁場刺激下で48時間培養し, [^3H]-チミジンのとりこみにより DNA 合成を検討した結果, logarithmic growth phase 及び, stationary (confluent) phase のいずれの場合も有意の差はなく, パルス電磁場刺激による影響は認めなかった (Fig. 11).

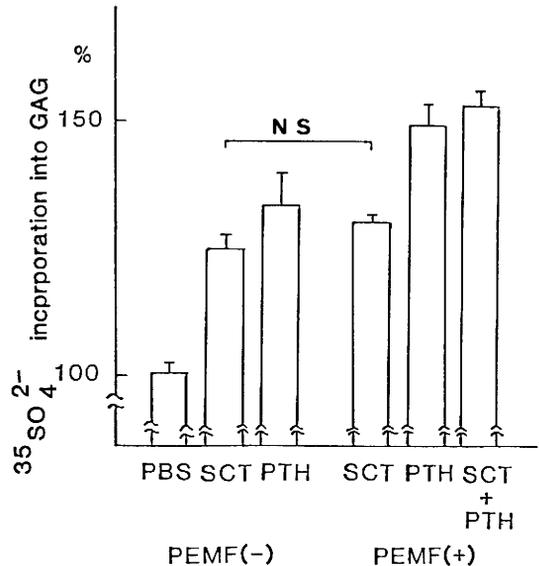


Fig. 10 Effect of PEMF on [^{35}S] sulfate incorporation into GAG.

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were exposed to PEMF (2.4 gauss, PEMF (+)) or no PEMF (PEMF (-)) for 48 h. After adding PBS (control), PTH (2.5 IU/ml), SCT (40mU/ml), or PTH+SCT, they were exposed to PEMF or no PEMF for 24 h. Then [^{35}S] sulfate incorporation into GAG was assayed. Each value is the average \pm S.D. (% of control (PBS)) in triplicate experiment.

NS: Difference is not statistically significant.

8. Verapamil, EGTA 添加後の GAG 合成, DNA 合成におよぼすパルス電磁場刺激の影響

Subconfluent に達した培養軟骨細胞に 5 種類の濃度の Verapamil (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M, calcium channel blocker) を加え, それぞれの GAG 合成及び DNA 合成を測定した. その結果, DNA 合成が dose-dependent に抑制されたが, 一方, GAG 合成については Verapamil の濃度が変化してもほとんど差はなかった (Fig. 12).

次に Verapamil (10^{-4} M) を用いてパルス電磁場刺激下で PTH 添加後の GAG 合成亢進作用に及ぼす影響を検討した. すなわち, subconfluent に達した培養軟骨細胞をパルス電磁場刺激下または非刺激下で48時間培養し, PTH (2.5IU/ml), Verapamil+PTH を加え, さらに24時間培養し [^{35}S]-硫酸のとりこみを測

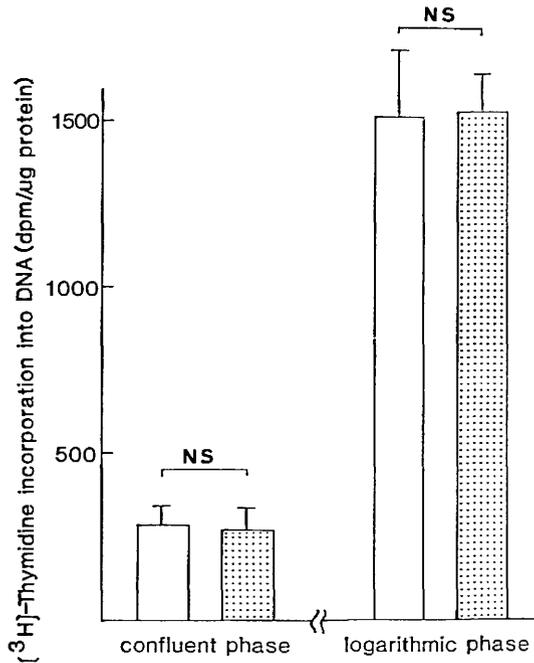


Fig. 11 Effect of PEMF on the ^3H -thymidine incorporation into DNA.

When cultured chondrocytes reached logarithmic state or confluency, they were exposed to PEMF (2.4 gauss, PEMF (+)) or no PEMF for 48h. They were pulse labeled for 2h. with $1.0\mu\text{Ci/ml}$ of ^3H -thymidine. The rate of DNA synthesis was estimated by measuring of ^3H -thymidine into DNA. Each value is the average \pm S.D. in the triplicate experiment.

▨: PEMF (+) □: PEMF (-)
NS: Difference is not statistically significant.

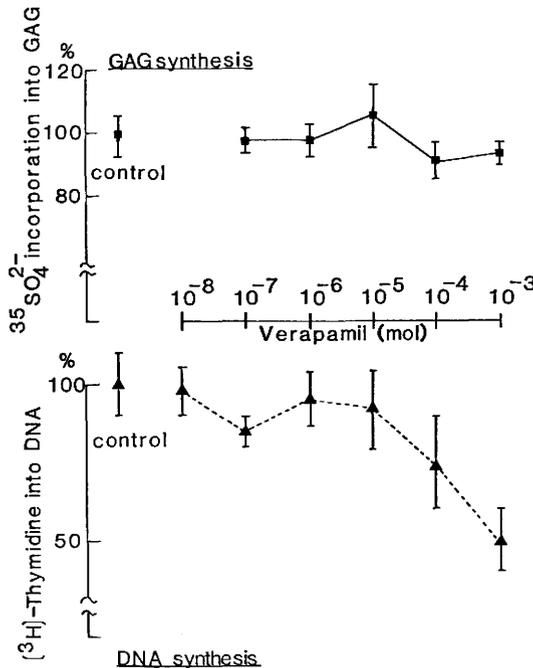


Fig. 12 Effect of Verapamil on GAG synthesis and DNA synthesis.

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were treated with Verapamil. Then ^{35}S sulfate incorporation into GAG and ^3H -thymidine incorporation into DNA were measured. Each value is the average \pm S.D. in the triplicate experiment.

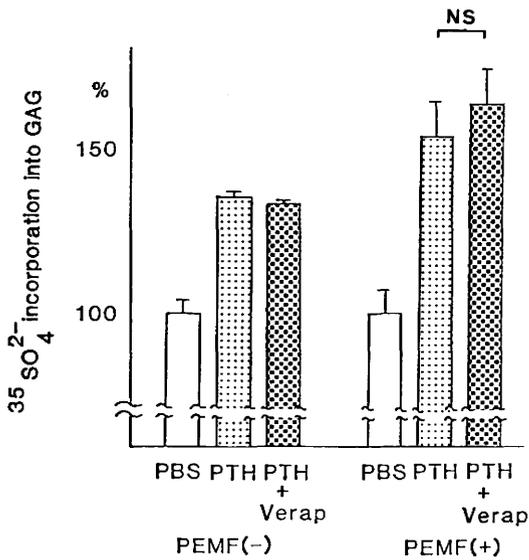


Fig. 13 Effect of PEMF on GAG synthesis treated with PTH, or with Verapamil and PTH.

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were exposed to PEMF (2.4gauss, PEMF (+)) or no PEMF (PEMF (-)) for 48h. After adding PTH (2.5IU/ml), or Verapamil (10^{-4}M) and PTH (2.5IU/ml), they were exposed to PEMF or no PEMF for 24h. Then [^{35}S] sulfate incorporation into GAG was measured. Each value is the average \pm S.D. (% of control (PBS)) in the triplicate experiment.

NS: Difference is not statistically significant.

定した。その結果、電磁場刺激下で PTH 単独添加時の GAG 合成は Verapamil+PTH 添加時のそれと差はなく、Verapamil はパルス電磁場刺激下での PTH 添加後の GAG 合成亢進作用に影響をおよぼさないことが明らかとなった (Fig. 13)。

EGTA (Ethylene glycol Bis (p-aminoethyl-ether)-N, N, N', N'-tetraacetate, calcium キレーター, 10^{-4}M) を加え、Verapamil における同様に PTH 添加後の GAG 合成におよぼす影響を検討した。その結果、電磁場刺激下で PTH 単独添加時の GAG 合成は EGTA+PTH 添加のそれと差はなく、EGTA はパルス電磁場刺激下での PTH 添加後の GAG 合成作用に影響をおよぼさなかった (Fig. 14)。

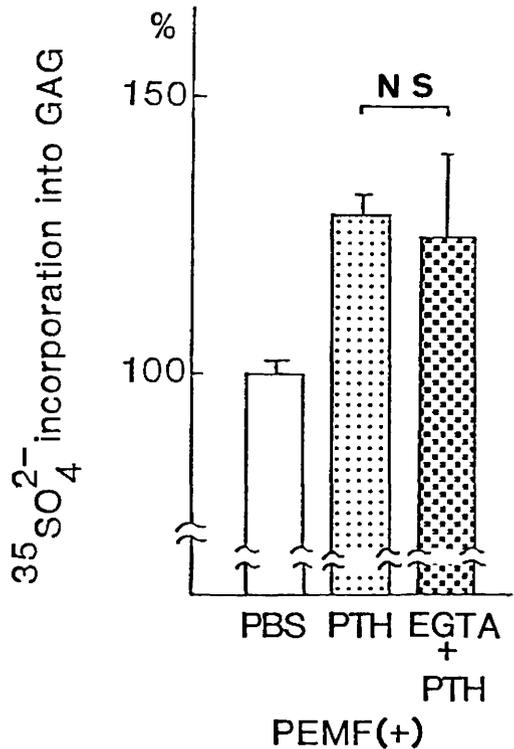


Fig. 14 Effect of PEMF on GAG synthesis treated with PTH, or with EGTA and PTH.

When cultured chondrocytes reached subconfluency, they were exposed to PEMF (2.4gauss) for 48h. After adding PTH (2.5 IU/ml), or EGTA (10^{-4}M) and PTH (2.5 IU/ml), they were exposed to PEMF for 24h. Then [^{35}S] sulfate incorporation into GAG was measured. Each value is the average \pm S.D. (% of control (PBS)) in the triplicate experiment.

NS: Difference is not statistically significant.

考 察

本研究はパルス電磁場刺激の作用機序を細胞レベルで解析するためにウサギ成長軟骨培養細胞を用いて分化機能および増殖におよぼす影響を検討したものである。

A. 成長軟骨細胞の内軟骨性骨形成における意義

成長軟骨細胞は骨形成において、特に内軟骨性骨形成過程において基本的に重要な役割を果たしている。また骨折治癒過程において、修復期の仮骨内軟骨組織が骨組織に置換する過程は内軟骨性骨形成によく類似しており、

さらに、遷延治癒や偽関節では骨折間隙に線維軟骨が多くを占め血管侵入、石灰化、骨化への過程を障害していると考えられる。Bassett らはパルス電磁場刺激が線維組織よりもむしろ線維軟骨組織に作用し血管侵入および石灰化を促進すると報告している⁴⁾。このように軟骨細胞は骨形成や修復に重要な役割を果たしており、さらに、パルス電磁場刺激の作用発現の場として何らかの役割を果たしている可能性が考えられる^{3) 23) 26)}。

Suzuki らはウサギ肋軟骨より分離・培養した成長軟骨細胞が軟骨基質成分であるプロテオグリカンやⅡ型コラーゲンを活発に合成し、高い分化機能を維持していること、種々のホルモンやビタミンに鋭敏に反応すること^{17) 29)}、骨形成能を有することを明らかにしている³⁰⁾。また、軟骨から抽出した局所成長因子である cartilage-derived factor (CDF)¹⁵⁾が培養軟骨細胞の増殖とプロテオグリカン合成を促進するのみならず、培養軟骨細胞の DNA 合成およびコラーゲン合成をも促進することを報告し、軟骨細胞が骨の代謝や成長と互いに深く関連していることを示した^{9) 16)}。

B. 成長軟骨細胞の分化機能に及ぼすパルス電磁場刺激の影響

1. 細胞内 cAMP におよぼす影響

Sutherland らによる cAMP の発見後、cAMP は種々のホルモンの伝達物質としてだけでなく、細胞の増殖や分化と密接に関連することが明らかにされてきた。一方、力学的な負荷や電気刺激が、cAMP の変化を介して細胞の代謝・機能発現に影響をおよぼしていることが報告されている。すなわち、Rodan らおよび Norton らは鶏胚脛骨端軟骨に static pressure (60g/cm²) を加えると cAMP レベルが低下すること、さらに、電場 (electric field, 1,166V/cm²) を加えると細胞内 Ca イオンの取り込みが亢進、cAMP レベルが低下することを示し、mechanical stress や electrical stimuli が共に細胞内 cAMP という (bio) chemical な signal に変換されて作用している可能性を示した^{21) 22) 24) 25) 26)}。

さらに、山下らはラットより分離した培養成長軟骨細胞に compressive stress を加えると細胞内 cAMP が増加することを報告した³⁵⁾。

本研究においてパルス電磁場刺激が PTH 添加後の cAMP レベルを亢進したことは、成長軟骨細胞が種々のホルモンやビタミンに鋭敏に反応するだけでなく、パルス電磁場刺激という物理的刺激にも反応することを示すものである。さらに成長軟骨細胞においてパルス電磁場刺激

が cAMP の変化を介し、細胞の代謝や機能に何らかの作用を及ぼしている可能性を示唆するもので他の報告ともよく対応している^{21) 24) 25) 35)}。

PTH, PGE₁, PGI₂ はいずれも成長軟骨細胞において cAMP を上昇させるが¹⁷⁾、これらのうち PTH 添加後の cAMP のみがパルス電磁場刺激により亢進されており、また対照群 (PBS 添加群) では cAMP に何ら変化をおよぼさなかったこと、さらに PTH 添加後の cAMP レベルを亢進する作用は 0.6 から 2.4gauss 中で dose dependent であったことを考えあわせると、パルス電磁場刺激が単に cAMP の産生を促進するのではなく、PTH のホルモン作用を特異的に増強し、細胞内 cAMP レベルを上昇させていると考えられる。2.4gauss のパルス電磁場刺激が最大の効果を示したが、この強度は実際に臨床応用されているつよさとほぼ同程度の強さであった^{21) 8)}。しかし、本研究では 2.4gauss を越えるつよさでは検討していないため、どの程度のつよさまでが効果を示しうるのかについては今後の課題である。

2. ODC 活性におよぼす影響

ポリアミンは細胞増殖に重要な役割を果たしているだけでなく、細胞分化とも密接に関連を有している。

Verduijzijen らは鶏胚骨端軟骨に intermittent compressive force を加えると ODC 活性が抑制されることを報告し³³⁾、mechanical stress が ODC 活性に影響を及ぼすことを示した。Takigawa らはウサギ肋軟骨より分離した成長軟骨細胞において PTH がポリアミン生成の律速酵素である ODC 活性を著明に上昇することを明らかにし、これらの事実より PTH による ODC の誘導が、軟骨細胞の分化機能のよい指標となることを示した³¹⁾。本研究でパルス電磁場刺激が PTH 添加後の ODC の誘導を促進していることが明らかとなった。このことは、本細胞培養系でパルス電磁場刺激が ODC の誘導を介しポリアミンの合成に影響を及ぼし、軟骨細胞の分化機能の発現に何らかの作用を及ぼしている可能性を示唆するものである。

3. グリコサミノグリカン合成に及ぼす影響

グリコサミノグリカンは軟骨細胞外基質の主要成分であり、その産生能は軟骨細胞の分化機能の指標である。Takigawa らはウサギ肋軟骨培養細胞において PTH 添加により細胞内 cAMP レベルが著明に上昇し、これを介して ODC が誘導されポリアミンが上昇することにより GAG 合成能が亢進することを明らかにし、これら一連の反応が分化機能発現に重要な役割を果たしていることを示唆した^{31) 32)}。本研究でパルス電磁場刺激が

PTH を添加しない状態での GAG 合成には影響せず、PTH 添加後の GAG 合成を亢進した結果は PTH 添加後の cAMP の上昇、PTH 添加後の ODC 誘導の亢進でみられた結果と同様のものであった。このことから、パルス電磁場刺激が PTH 添加後の cAMP の上昇、ODC の誘導、GAG 合成促進という一連の過程を亢進するものと考えられる。また、 PGE_1 、 PEI_2 、SCT ではこのような亢進作用は認められず、PTH の場合においてのみ認められた反応であった。さらに PTH 添加による一連の反応が分化機能と密接に関連していることと考えあわせるとパルス電磁場刺激は PTH のホルモン感受性を増強させて cAMP、ODC、GAG 合成という一連の過程を亢進し、軟骨細胞の分化機能を亢進するものと考えられる。

4. パルス電磁場刺激時間との関係

Hashimoto らはウサギ肋軟骨より分離した成長軟骨培養細胞において PTH 添加後の cAMP が5分間の compressive stress の下では変化しなかったが、24時間の stress で抑制されると報告し、mechanical stress の作用発現には比較的長い時間を要することを明らかにしている¹³⁾。

本研究で PTH 添加後の cAMP レベル亢進作用の発現には48時間以上という比較的長いパルス電磁場刺激時間を要し、さらに PTH 添加後の GAG 合成亢進作用の発現にも同様に48時間以上の刺激時間を要することが明らかとなった。このように PTH の感受性を高め、一連の亢進作用を発現するには比較的長い時間のパルス電磁場刺激が必要であった。一方、PTH は細胞膜受容体を介し adenylyl cyclase を活性化し cAMP を上昇させると考えられている。以上のことを考えあわせると、パルス電磁場刺激の作用は PTH の細胞膜受容体構造を変化させて活性化し、軟骨細胞の分化機能が発現していくものと考えられる。

5. 電磁場刺激と PTH の作用

Luben らは osteoblast-like cell (MMB-1) において電磁場刺激が PTH の作用を抑制し、cAMP レベルを減少させると報告している¹⁹⁾。

この報告と本研究の結果を考えあわせると、電磁場刺激は in vivo において全身性因子である PTH の作用を局所で細胞の種類に応じて増強または減弱し作用発現している可能性があると思われる。

C. 成長軟骨細胞の増殖能に対するパルス電磁場刺激の影響

細胞増殖の指標としての DNA 合成能にパルス電磁場

刺激は影響をおよぼさなかった。ウサギ肋軟骨培養細胞において PTH は cAMP を介し ODC を上昇させ、分化機能に影響をおよぼすが、DNA 合成能には影響をおよぼさないことから³¹⁾、パルス電磁場刺激により PTH の感受性の変化がおこっても DNA 合成能に変化をもたらさないと考えられる。

D. カルシウムイオン濃度変化との関係

カルシウムイオンは cAMP とともに細胞機能の調節や伝達物質として重要であり、また電気刺激の伝達物質とも考えられている^{31) 26)}。

本研究において EGTA や Verapamil のいずれを添加しても PTH 添加後の GAG 合成作用に影響を及ぼさなかったことより、パルス電磁場刺激の作用発現にはカルシウムイオンの濃度変化は大きな役割を果たしていないものと考えられた。パルス電磁場刺激による PTH 応答性の亢進作用がカルシウムイオンの変化に影響されなかったことは短時間におこるイオン濃度の変化を介するものではないと考えられる。

このように物理的刺激であるパルス電磁場刺激が成長軟骨細胞の分化機能に影響を及ぼすという事実は内軟骨性骨形成作用について考えるとき骨組織への作用機序にもあてはまる可能性があると思われる。

結 語

ウサギ肋軟骨・骨移行部より分離した培養軟骨細胞を用いてパルス電磁場刺激の細胞レベルでの分化機能および増殖能に及ぼす影響について検討した。

1. ウサギ成長軟骨細胞は種々のカルシウム調節ホルモンやビタミンなどの化学的刺激に鋭敏に反応するだけでなく、物理的刺激にも鋭敏に反応することが明らかとなった。

2. パルス電磁場刺激は細胞内 cAMP レベルを亢進することから、cAMP パルス電磁場刺激の伝達や作用発現に何らかの役割を果たしているものと考えられた。

3. パルス電磁場刺激は PTH 添加によってひきおこされる細胞内 cAMP の上昇、ODC の誘導、GAG 合成という一連の過程を亢進することが明らかとなった。 PGE_1 (10 μ g/ml)、 PGI_2 (10 μ g/ml) および SCT (40mU/ml) の作用を亢進することはなかった。

4. パルス電磁場刺激の作用発現には48時間以上という比較的長い刺激時間を必要とした。

5. Verapamil や EGTA によるカルシウムイオン濃度変化はパルス電磁場刺激の作用に影響を及ぼさないものと思われた。

6. 培養軟骨細胞におけるパルス電磁場刺激の作用は短時間におこるカルシウムイオンの変化を介するというよりは、むしろ比較的長い時間を要する化学的変化にもとづく反応を介するものと考えられる。

7. 以上のことよりパルス電磁場刺激は培養軟骨細胞において増殖能には作用せず、主としてPTH感受性を特異的に増強し cAMP レベル、ODC 誘導、GAG 合成の一連の過程を亢進し、分化機能の発現に作用していると考えられる。

謝 辞

御校閣下だった新潟大学医学部整形外科学教室田島達也教授と終始御指導下だった高橋栄明助教授に深謝いたします。また技術面で御協力いただいた同教室錦織新一技官、赤沢秀喜技官、吉田芳雄技官および斎藤昌文技官に深く感謝いたします。

本研究に際し、直接の御指導、御教示を賜りました大阪大学歯学部生化学教室鈴木不二男教授に深謝いたしますとともに同教室の滝川正春講師、開祐司博士ならびに同教室の諸先生各位に深く感謝いたします。

本研究の統計処理について御助言をいただいた新潟大学医学部衛生学教室山本正治教授に感謝いたします。

本研究に使用したパルス電磁場刺激装置は新潟大学工学部情報工学科丸山武男助教授により製作されたものでここに慎んで感謝の意を表します。

本研究の費用の一部は財団法人整形災害外科学研究助成財団の昭和60年度研究助成金によったことを付記し、感謝の意を表します。

本論文の一部は、第2回骨代謝学会、第4回BRAGS (4th Annual Meeting of Bioelectrical Repair and Growth Society)、第17回日本結合組織学会、第13回骨と電気刺激研究会、第1回整形外科基礎学術集会上において発表された。

参 考 文 献

- 1) Bassett, C.A.L. and Baker, R.O.: Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science*, 137: 1063~1064, 1962.
- 2) Bassett, C.A.L., Mitchell, S.N. and Gaston, S.R.: Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J. Bone and Joint Surg.*, 63A: 511~523, 1981.
- 3) Bassett, C.A.L.: Pulsing electromagnetic fields: A new method to modify cell behavior. *Calcif. Tissue Int.*, 34: 1~8, 1982.
- 4) Bassett, C.A.L.: The development and application of pulsing electromagnetic fields (PEMFs) for ununited fractures and arthroses. *Orthop. Clin. North. Am.*, 15: 61~87, 1984.
- 5) Bawin, S.M., Adey, W.R. and Sabbitt, I.M.: Ionic factors in release of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ from chicken cerebral tissue by electromagnetic fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 6314~6318, 1978.
- 6) Brighton, C.T., Black, J., Friedenber, Z.A.B. and Easterhai, J.L.: A multicenter study of the treatment of non-union with constant direct current. *J. Bone and Joint Surg.*, 63A: 2~13, 1981.
- 7) Brighton, C.T. and Pollack, S.R.: Treatment of non-union of the tibia with a capacitively coupled electrical field. *J. Trauma.*, 24: 153~155, 1984.
- 8) Brighton, C.T. and Mc Cluskey, W.P.: Cellular response and mechanism of action of electrically induced osteogenesis. In *Bone and Mineral Research*, ed. by Peck, W.A., pp. 213~254, Elsevier Science Publishers B.V., 1986.
- 9) Canalis, E., Kato, Y., Hiraki, Y. and Suzuki, F.: Effect of cartilage derived factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvariae. *Calcif. Tissue Int.*, 36: 102~107, 1984.
- 10) Eriksson, C.: Electrical property of bone. In *The Biochemistry and Physiology of Bone*. ed. by Boune, G.H., pp. 329~384, Academic Press 1976.
- 11) Fukudsa, E. and Yasuda, I.: On the piezoelectric effect of bone. *J. Phys. Soc. Japan*, 12: 1158~1162, 1957.
- 12) Hall, B.K.: Bioelectricity and Cartilage. In *Cartilage III*. Ed. by Hall, B.K., pp. 309~

- 339, 1983.
- 13) 橋本和彦, 菊池寿行, 内田淳正, 下村 裕: 成長軟骨細胞の mechanical stress に対する代謝変動—PTH, カルシトニンに対する反応性について—整形外科基礎科学, 13: 30~32, 1986.
 - 14) Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. and Ui, M.: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue. *Biochem. Med.*, 18: 257~273, 1977.
 - 15) Kato, Y., Nomura, Y., Tsuji, M., Ohmae, H. and Suzuki, F.: Somatomedin-like peptide(s) isolated from fetal bovine cartilage (cartilage-derived factor): Isolation and some peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6831~6835, 1981.
 - 16) Kato, Y., Watanabe, R., Nomura, Y., Tsuji, M., Suzuki, F., Raisz, L.G. and Canalis, E.: Effect of bone-derived growth factor on DNA, RNA, and proteoglycan synthesis in cultures of rabbit costal chondrocytes. *Metabolism*, 31: 812~815, 1982.
 - 17) Kinoshita, M., Kato, Y., Kono, T. and Hiraki, Y., Suzuki, F.: Prostaglandin stimulation of adenosin 3', 5'-monophosphate accumulation in cultured chondrocytes in the presence or absence of parathyroid hormone. *Biochim. Biophys. Acta.*, 753: 324~331, 1983.
 - 18) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265~275, 1951.
 - 19) Luben, R.A., Cair, C.D., Rosen, M.C. and Adey, W.R.: Effect of electromagnetic stimuli on bone and bone cells in vitro: Inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 4180~4184, 1982.
 - 20) Moley, E.R. and Baylink, D.J.: Inhibition of bone formation during space flight. *Science*, 201: 1138~1141, 1978.
 - 21) Norton, L.A., Rodan, G.A. and Bourret, L.A.: Epiphyseal cartilage cAMP changes produced by electrical and mechanical perturbations. *Clin. Orthop.*, 124: 59~68, 1977.
 - 22) Norton, L.A., Bourret, L.A. and Rodan, G.A.: Molecular changes in hard tissue cells in response to bioelectric proliferative signals. In *Mechanisms of Growth Control III*, Ed. by Becker, R.O., Chasc Thomas, pp. 181~191, 1981.
 - 23) Norton, L.A.: Effects of a pulsed electromagnetic field on a mixed chondroblastic tissue culture. *Clin. Orthop.*, 167: 280~290, 1982.
 - 24) Norton, L.A., Hanley, K.J. and Turkewicz, J.: Bioelectric perturbations of bone (Research directions and clinical applications). *The Angel Orthodontist*, 54: 73~87, 1984.
 - 25) Rodan, G.A., Bourret, L.A., Harvey, A. and Mensi, T.: Cyclic AMP and cyclic GMP: Mediators of the mechanical effects on bone remodeling. *Science*, 189: 467~469, 1975.
 - 26) Rodan, G.A., Bourret, L.A. and Norton, L.A.: DNA Synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. *Science*, 119: 690~692, 1978.
 - 27) Ross, E. and Schatz, G.: Assay of protein in the presence of high concentrations of sulfhydryl compounds. *Anal. Biochem.*, 54: 304~306, 1973.
 - 28) Saarni, H. and Tammi, M.: A rapid method for separation and assay of radio-labeled mucopolysaccharides from cell culture medium. *Anal. Biochem.*, 58: 40~46, 1977.
 - 29) Suzuki, F., Yoneda, T. and Shimomura, Y.: Calcitonin and parathyroid-hormone stimulation of acid mucopolysaccharides synthesis in cultured chondrocytes isolated from growth cartilage. *FEBS Lett.*, 70: 155~158, 1976.
 - 30) Suzuki, F., Takase, T., Takigawa, M.,

- Uchida, A. and Shimomura, Y.: Simulation of the initial stage of endochondral ossification: In vitro sequential culture of growth cartilage cells and bone marrow cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2368~2372, 1981.
- 31) Takigawa, M., Isida, H., Takano, T. and Suzuki, F.: Polyamine and differentiation: Induction of ornithine decarboxylase by parathyroid hormone is a good marker of differentiated chondrocytes Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 1481~1485, 1980.
- 32) Takigawa, M., Takano, T. and Suzuki, F.: Effects of parathyroid hormone and cyclic AMP analogues on the activity of ornithine decarboxylase and expression of the differentiated phenotype of chondrocytes in culture. J. Cell. Physiol., 106: 259~268, 1981.
- 33) Veldhuijgen, J.P., Bourret, L.A. and Rodan, G.A.: In vitro studies of the effect of intermittent compressive forces on cartilage cell proliferation. J. Cell. Physiol., 98: 299~306.
- 34) Wolff, J.: Ueber die innere Architektur der Knochen und ihre Bedeutung für die Frage vom Knochenwachstum Virchow's Archiv, 50: 380~450, 1870.
- 35) 山下和夫, 菊池寿幸, 内田淳正, 下村 裕: 成長軟骨細胞 mechanical stress による代謝変動. 整形外科基礎科学, 12: 123~125, 1985.
- 36) Yasuda, I., Nagayama, H., Kato, T., Hara, O., Okada, K., Noguchi, K. and Sato, T.: Fundamental problems in the treatment of fracture. J. Kyoto. Med. Soc., 4: 395~406, 1953.
- 37) 保田岩夫, 野口和彦, 佐多徹郎: 力学的仮骨と電氣的仮骨. 日整会誌, 28: 267~269, 1954.
(昭和62年2月13日受付)
-