Japan Society of Obstetrics and Gynecology

245 ヒト海綿骨由来破骨細胞の分離・培養・同定法の確立

高知医大
前田長正、小栗啓義、相良祐輔

【目的】骨吸収は骨内の多核巨細胞である破骨細胞により営まれ、骨芽細胞と共に骨のリモデリングに強く関与している。しかしながら、ヒト破骨細胞の分離・培養・同定法は未だ確立していない。今回はヒト海綿骨由来破骨細胞の機能解析のための分離・培養・同定法の確立を目的とした。【方法】1）破骨細胞分離：同意を得て外科的に摘出したヒト大腿骨頭を細切し、0.25%collagenase にて 30 分間撹拌した。ナイロンメッシュにて硬組織を除去し、浮遊細胞を 10% 牛胎仔血清添加 D'MEM (Dulbecco modified Eagle's Medium) にて 37℃5% CO_2 下で培養した。培養 72 時間後、0.25%trypsin にて骨芽細胞および線維芽細胞を除去し、ディッシュ付着細胞を実験に供した。2）破骨細胞同定-1：ディッシュ付着細胞を位相差顕微鏡にて観察した。同定-2：ディッシュ付着細胞を methanol 固定後、酒石酸添加 Gimsa-Grunwald-acid phosphatase (ACP-ase)染色法にて染色し、赤紫染した細胞を位相差顕微鏡にて観察した。3）ディッシュ付着細胞を 1×10^4/well に調整し、2%albumin 添加 D'MEM にて 72 時間培養後、培養上清中の酒石酸抵抗性 ACP-ase (TrAP)活性を測定した。【成績】1）位相差顕微鏡では、ディッシュ付着細胞は破骨細胞に特徴的な 2 つ以上の核、分葉状偽足様突起を有する 10～100 μm の大型細胞として認められた。2）破骨細胞に特異的な TrAP 染色では、観察した細胞の 80%以上が染色された。非染色細胞は、小型の単核球であった。3）培養上清中には、強い TrAP 活性を認めた(7.09±3.73 IU/l) 。【結論】今回初めてヒト海綿骨由来破骨細胞の分離培養同定法を確立した。今後はこの系を用いて、ヒト破骨細胞および骨リモデリングの機能的解析が可能となった。

246 骨芽細胞様細胞株のステロイド代謝酵素活性について

昭和大
桑野 譲、 下平和久、 藤川 浩、
大倉史也、 斎藤 裕、 矢内原巧

[目的]近年、骨芽細胞は性ステロイド(S)の標的臓器としてのみならず、骨芽細胞自身が各種S代謝酵素活性を有し、直接細胞機能に関与していることが注目されている。従来より骨芽細胞にアンドロゲンおよびエストロゲン(E)生成に介在する各種S代謝酵素のうち、aromatase、5α-reductase、steroid-sulfatase、17β-hydroxysteroid dehydrogenase 活性を認めたとの報告がされている。今回、Eおよび、テストステロン(T)、アンドロステンジオン(A)産生に不可欠な 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD)の有無をヒト骨芽細胞株 MG-63、HOSを用いて検討した。[方法]10%FCSを含むMEM培地にて細胞培養を行い、phenor red free無血清培地に交換し、基質として[^{3}H]DHA又は、[^{3}H]pregnenolone (0.36 μci/1.5×10^5cells,100 nM)を加え24時間培養した。回収率補正用[^{14}C]Aまたはprogesterone(P)を加え培養液中の放射性代謝物を酢酸エチルにて抽出した後、薄層クロマトグラフィ-(TLC)にて分離精製しA生成量を酵素活性とした。放射性代謝物は再結晶法にて同定した。[成績]DHAよりA生成を認め、HOSは28.7pmol/10^6cells/24h、MG-63では7.7であったが、P生成は確認出来なかった。さらに放射性代謝物Aは再結晶法により同定された。なおA生成は24時間まで時間依存性に直線的に増加した。[結論]今回、骨芽細胞に3β-HSD活性の存在を初めて示した。また、本活性はDHAに親和性を有することが示された。このことは、従来の報告と合わせ、骨芽細胞自身が血中に多量存在するΔ_5Sより、より生物学的活性の高いT及びEを産生し得る可能性を示している。

NII-Electronic Library Service