



Title	培養軟骨におけるコラーゲンのMagnetization Transfer Contrastに及ぼす影響
Author(s)	青木, 純; 開, 祐司; 徐, 貴淑 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1996, 56(12), p. 877-879
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19108
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

培養軟骨におけるコラーゲンのMagnetization Transfer Contrastに及ぼす影響

青木 純^{1,4)} 開 祐司²⁾ 徐 貴淑¹⁾ 宿南 知佐²⁾
森谷 浩人³⁾ 唐木田 修¹⁾ 上田 仁¹⁾ 曾根 脩輔¹⁾

1) 信州大学医学部放射線医学教室 2) 大阪大学歯学部生化学教室
3) GE横河メディカルシステム(株)研究開発部 4) 現 群馬大学医学部附属病院中央放射線部

Effect of Collagen on Magnetization Transfer Contrast Assessed in Cultured Cartilage

Jun Aoki^{1,4)}, Yuji Hiraki²⁾, Gwy Suk Seo¹⁾,
Chisa Shukunami²⁾, Hiroto Moriya³⁾,
Osamu Karakida¹⁾, Hitoshi Ueda¹⁾
and Shusuke Sone¹⁾

We investigated the effect of collagen on magnetization transfer contrast (MTC) in cultured cartilage. In our culture system, only collagen synthesis was increased by the addition of vitamin C, while proteoglycan synthesis and the number of chondrocytes were unaffected. The MTC effect was assessed by using an off-resonance RF pulse (0.3 KHz off-resonance, sinc wave of 18 msec, maximum amplitude $4.61 \times 10^{-4}T$) on a GRASS sequence. The cartilage cultured with vitamin C showed a higher MTC effect than that cultured without vitamin C. The major role of collagen on MTC was confirmed in living cartilage tissue.

Research Code No. : 505.9

Key words : Magnetization transfer contrast, Cartilage, Cell culture

Received May. 21, 1996; revision accepted Jul. 26, 1996

- 1) Department of Radiology, Shinshu University School of Medicine
- 2) Department of Biochemistry, Osaka University Faculty of Dentistry
- 3) Department of Research and Development, GE Yokogawa Medical Systems, Ltd.
- 4) Present address: Diagnostic Radiology, Gunma University Hospital

はじめに

magnetization transfer contrast (MTC)は、大分子に束縛されたプロトンから自由水のプロトンへと遷移する磁化を反映するMR画像法である。硝子軟骨基質は多量の水分と高分子蛋白や多糖類により構成されているため、MTCのよい対象と考えられてきた。すでにMTCの臨床応用において関節軟骨と関節液の間に高コントラストが得られており、さらに正常あるいは異常軟骨の構成成分の解析にMTCを応用する試みがなされている。硝子軟骨においてMTCを生み出す主体はコラーゲンであると報告されているが^{1),2)}、これらはコラーゲン単一ゲルや酵素処理後の関節軟骨を用いた実験に基づくものであり、細胞成分やプロテオグリカンが生理的にコントロールされた状態での検討はなされていない。今回われわれは、より生体に近い培養軟骨を用いた実験系において、コラーゲンのMTCに及ぼす影響を検討した。

材料と方法

生後4週齢のニュージーランドウサギ肋軟骨を無菌的に採取し、成長軟骨板のコラーゲナーゼ処理により幼若軟骨細胞を分離した³⁾。得られた細胞を10%ウシ胎仔血清添加ハムF12培地に懸濁し(5×10^4 個/ml)、10mlディッシュと48穴マルチウエルプレート(0.2ml/well)に播種した。細胞がコンフルエントに達した後、ビタミンC(50 μ g/ml)添加と非添加の2群にわけて5日間培養した。

培養細胞によるコラーゲン合成能は以下の方法で検討した³⁾。48穴マルチウエルプレートで培養された軟骨組織をコンフルエントに達した0, 1, 3, 5日後に回収し、それぞれにペプシン処理(0.3mg/ml, 4°C, 16時間)を行った。ペプシン消化を受けない蛋白成分をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に展開した。

次に、培養細胞によるプロテオグリカン合成速度を以下の方法で検討した³⁾。やはりコンフルエントに達した0, 1, 3, 5日後に、48穴マルチウエルプレートでの培養系に培養終了3時間前に³⁵S硫酸(20 μ Ci/well)を添加した。培養終了時の細胞層ならびに培養液をプロナーゼ処理(1,000チロシン

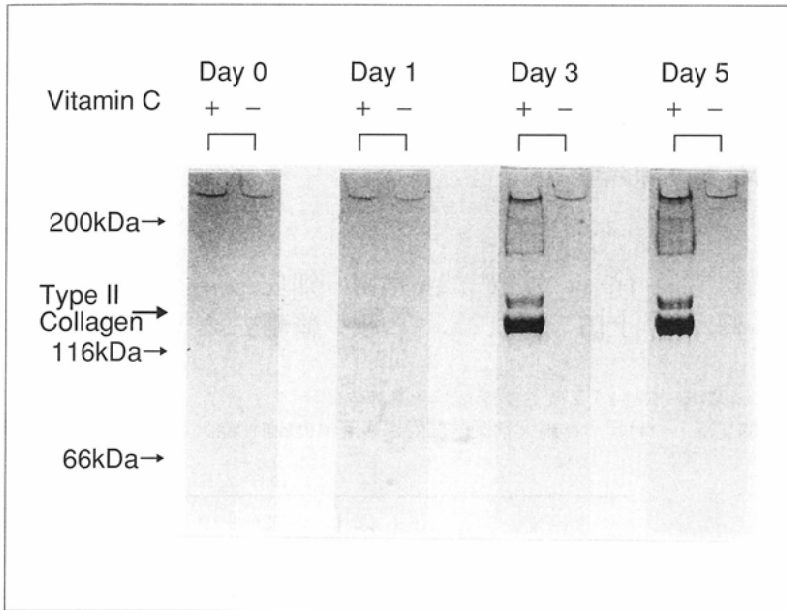


Fig.1 Effect of vitamin C on type II collagen synthesis of chondrocytes. The cartilage cultured with vitamin C for three to five days shows higher expression of type II collagen in comparison to that cultured without vitamin C.

単位/mg, 55°C, 12時間)した後, CPC沈殿法によってプロテオグリカンに取り込まれた ^{35}S の放射活性を測定した。

培養軟骨のMTCをみるため, 10mlディッシュで5日間培養した軟骨細胞層を採取し, 1mm角以下に細片した後, 10mlチューブに移し, 140gにて5分間遠心し, 軟骨ペレットを作成した。コントロールとして, ウサギ肋軟骨の細片を同様に遠心したペレットならびに培養液のMTCも観察した。軟骨組織の1部にアルシアンブルー・パス染色を行い, 顕微鏡下の観察も行った。

使用したMRI装置は1.5T超伝導型(Signa, ver. 4.8, General Electric)で, MTC画像の撮像にはGRASS法50/15/20(TR/TE/FA)を用いた。off-resonance RF pulse(0.3kHz off resonance, sinc型, 18msec照射, 最大amplitude $4.61 \times 10^{-4}\text{T}$)の照射前後の信号強度の変化(MTR, 次式)を遷移磁化量の指標とした。

magnetization transfer rate (MTR) = $1 - \text{Mpost} / \text{Mpre}$
(Mpost: off-resonance RF pulse照射後の組織の信号強度, Mpre: off-resonance RF pulse照射前の組織の信号強度)

今回用いたoff-resonance RF pulseはGRASS法に併用する低エネルギーのものであり(SAR < 0.4W/kg), off-resonance RF pulseによって起こるもう一つの現象であるT1の短縮効果については検討していない。

結 果

培養軟骨組織内に産生されたペプシンに消化されない蛋白成分をSDS-PAGEに展開したところ, ビタミンC添加群ではII型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の分子量に相当する蛋白が多量に産生されていた(Fig.1)。一方,

^{35}S 硫酸の取り込みにより検討した培養軟骨のプロテオグリカン合成速度では, ビタミンC添加群と非添加群に有意の差を認めなかった(Fig.2)。

培養組織のアルシアンブルー・パス染色でも, 両者の軟骨基質のプロテオグリカンはよく青染されており, 細胞密度にも大きな差のないことが観察された(Fig.3)。

ビタミンC添加により培養された軟骨組織のペレットのMTRは0.20で, ビタミンC非添加群のMTRの0.12に比し高値を示した(Fig.4)。コントロールとして測定した, ウサギ肋軟骨細片のペレットと培養液のMTRはそれぞれ0.32と0.08であった。

考 案

硝子軟骨の95%以上は細胞間基質により占められており, そのコロイドの性質により軟骨細胞の代謝と軟骨固有の硬さと弾性が維持されている。軟骨基質は多量の水とII型コラーゲン, プロテオグリカン, 少量の非コラーゲン蛋白, 電解質より構成されている。II型コラーゲンは軟骨基質内に線維網を構成し, 軟骨総重量の約10%, 乾燥重量の約50%を占める。プロテオグリンは親水性が強く, コラーゲンの形成する網目の中に保持されている。軟骨乾燥重量の約40%を占める。

過去に報告された軟骨のMTCに関する研究では, MTCの効果を来すおもな軟骨構成成分はコラーゲンとされてきた^{1,2)}。大分子によるMTCの効果は, おもに分子の表面構造と分子運動の早さにより規制される。自由水のプロトンとの磁気交換の場としては, 水酸基やアミン基あるいはカルボキシル基が主要な役割を果たすとされる³⁾。分子運動の早さに関しては, correlation timeが 10^{-9}sec 以上の比較的遅いものが強

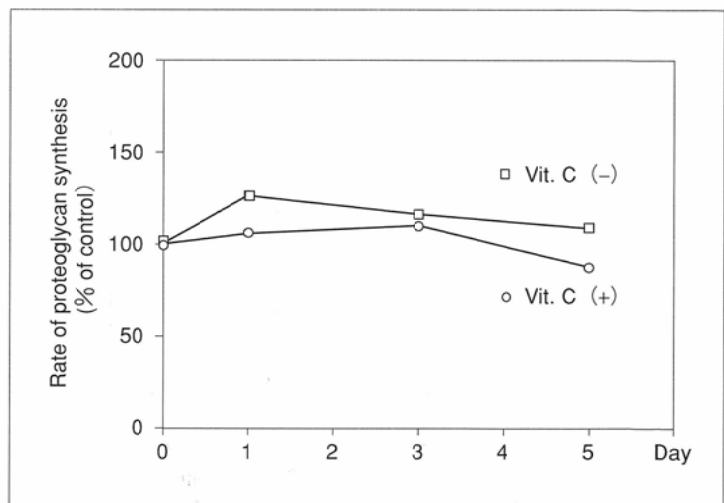


Fig.2 Effect of vitamin C on proteoglycan synthesis of chondrocytes. Vitamin C shows no significant effect on rate of proteoglycan synthesis in cultured cartilage.

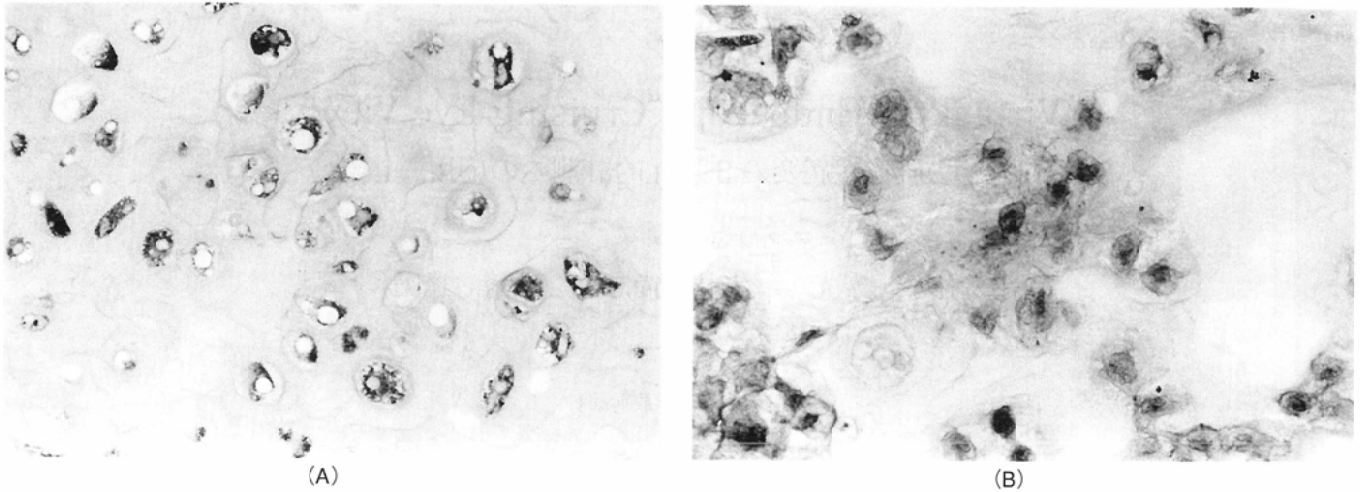


Fig.3 Photomicrographs of cultured cartilage.

Both the cartilage cultured with (A) and without (B) vitamin C contain almost the same number of chondrocytes per volume. (Alcian blue and PAS stain, original magnification x100)

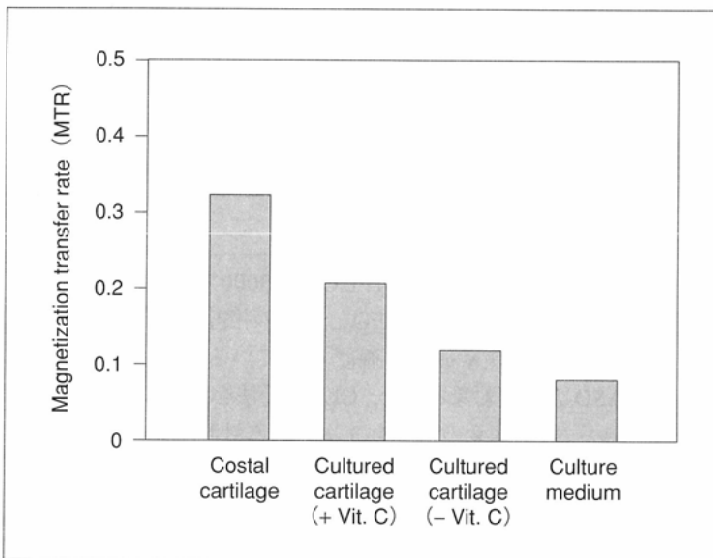


Fig.4 Magnetization transfer rate of cultured cartilage.

The cartilage cultured with vitamin C shows higher MTR than that cultured without vitamin C. However, original costal cartilage shows much higher MTR than cultured cartilage.

いMTCの効果を示すとされる。プロテオグリンの側鎖には多量の水酸基が存在するが、分子運動が早いいため、MTCの効果弱いものと考えられる⁵⁾。一方、コラーゲンの correlation timeは 10^{-8} secと長く⁴⁾、今回ならびに過去の実験結果をよく説明しうる。

しかし、過去の報告のように軟骨の酵素処理によりコラーゲンを除いた場合、同時にプロテオグリカンも失われ、また細胞の脱落や形態変化が生じるため、軟骨内でのコラーゲン単一のMTC効果の検討とはいえない。今回のわれわれの実験結果から、生理的に近い状態でも軟骨基質の構成成分ではコラーゲンがMTC効果の主体であることがわかった。なお、成熟したウサギ肋軟骨のMTRはビタミンC添加培養軟骨より強いMTRを示したため、細胞密度や生体内コラーゲン束の高次構造がMTCに及ぼす影響も今後検討すべきと考えられた。

文 献

- 1) Kim DK, Ceckler TL, Hascall VC, et al: Analysis of water-macromolecule proton magnetization transfer in articular cartilage. *Magn Reson Med* 29: 211-215, 1993
- 2) Gray ML, Burstein D, Lesperance LM, et al: Magnetization transfer in cartilage and its constituent macromolecules. *Magn Reson Med* 34: 319-325, 1996
- 3) Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, et al: Bone morphogenic protein (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner Res* 6: 1373-1385, 1991
- 4) Ceckler TL, Wolff SD, Yip V, et al: Dynamic and chemical factors affecting water proton relaxation by macromolecules. *J Magn Reson* 98: 637-645, 1992
- 5) Torchia DA, Hasson MA, Hascall VC: Investigation of molecular motion of proteoglycans in cartilage by ^{13}C magnetic resonance. *J Biol Chem* 252: 3617-3625, 1977