



Title	培養軟骨細胞を用いたソマトメジンの研究 1. 培養軟骨細胞に対するソマトメジン様ペプチドの作用 2. 培養軟骨細胞によるソマトメジン活性の測定
Author(s)	那須, 範満
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32894
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	那須範満
学位の種類	医学博士
学位記番号	第5032号
学位授与の日付	昭和55年7月2日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	<p>培養軟骨細胞を用いたソマトメジンの研究</p> <p>1. 培養軟骨細胞に対するソマトメジン様ペプチドの作用</p> <p>2. 培養軟骨細胞によるソマトメジン活性の測定</p>
論文審査委員	<p>(主査) 教授 小野 啓郎</p> <p>(副査) 教授 薮内 百治 教授 松本 圭史</p>

論文内容の要旨

[目的]

骨格の成長には成長ホルモンが不可欠とされているが、このホルモンの骨・軟骨への作用は直接の作用ではなく、ソマトメジンと呼ばれるポリペプチドを介して発現することが知られている。また、ここ数年、下垂体性小人症や腎疾患などの成長障害をきたす疾患とソマトメジンの関係が注目されている。血清中のソマトメジン活性測定法としてはradioimmunoassayやradioreceptor assayが報告されているが、ソマトメジンの抽出・精製には大量の血液を必要とするためその入手が困難であり、一般的な検査法とはいひ難い。本研究は、軟骨細胞培養系を用いてソマトメジンの生理作用を追求するとともに、血清中のソマトメジン活性を簡単に測定できる臨床的に応用可能なbioassay法の確立を試みた。

[方法]

1. 軟骨細胞の分離・培養

雄性New Zealand系ウサギあるいは雄性Sprague-Dawley系ラットの助軟骨・骨移行部より成長軟骨細胞を、EDTA、トリプシン、コラゲナーゼ処理により分離し、10%ウシ胎児血清添加のHAM F-12培地中で培養した。

2. multiplication-stimulating activity (MSA) の部分精製

Baffalo Rat肝細胞を10%ウシ胎児血清添加のEagle MEM培地で2日間培養後、血清を含まないDulbeccoの変法Eagle培地に換えその交換培養液を集めてconditioned mediumとした。このconditioned mediumをアセトン処理後、1M酢酸に溶解しSephadex G-75ゲル濾過により部分的に精

製した。

3. DNA合成, RNA合成, 酸性ムコ多糖合成, 蛋白質およびコラーゲン合成

DNA合成とRNA合成は, [6-³H]-thymidineのDNAへの取り込みと[5-³H]-uridineのRNAへの取り込みを指標として測定した。酸性ムコ多糖合成は, ³⁵SO₄²⁻と[6-³H]-glucosamineの取り込みを指標とした。蛋白質およびコラーゲン合成は, L-[G-³H]-prolineのcollagenase-insensitiveおよびcollagenase-sensitive proteinへの取り込みを指標として測定した。

4. ラット血清

Sprague-Dawley系ラットの下垂体摘出(hypox.)を行った後, ブタ成長ホルモン(0.42IU/mg, NIH)を生理食塩水に溶かし腹腔内に注射した(10μg/g体重)。血清は心臓穿刺により採血して得た。

[成績]

1. 最近, DulakとTeminは, Buffalo Ratの肝由来の株細胞のconditioned mediumより精製したmultiplication-stimulating activity (MSA)がソマトメジンと非常によく似た物質であることを示唆している。しかし、その詳細については、なお不明の点が多く残されていた。そこで、まず、軟骨細胞に対してMSAがソマトメジンと同じ作用を有するか否かを検討した。培養軟骨細胞にMSAを添加すると、その添加量に比例して³H-thymidineのDNAへの取り込みが著しく増大した。また、酸性ムコ多糖への³⁵SO₄²⁻の取り込み、さらには非コラーゲン蛋白質およびコラーゲン合成についてもMSAはいずれも著明に促進することが明らかとなった。
2. 軟骨細胞の増殖と分化機能に及ぼすMSAの影響を検索した結果、無血清培養液であってもMSAを添加する限り、軟骨細胞としての分化機能の指標である酸性ムコ多糖合成能を高度に保持したまま長期間培養・増殖させることができた。
3. hypox. ラット, hypox. 後成長ホルモンを投与したラット、および正常ラットの血清を軟骨細胞培養液中に添加して光学顕微鏡で観察すると、正常ラット血清の添加ではpolygonalな形態を示したのに反してhypox. ラット血清添加では線維芽細胞様に変化した。ところが、hypox. 後成長ホルモンを投与したラット血清を添加すると正常ラットの血清を添加した場合に近い形態を示した。
4. hypox. ラット; hypox. 後成長ホルモンを投与したラット、および正常ラットの血清中のソマトメジン活性を、³H-thymidineのDNAへの取り込みと³H-glucosamineの酸性ムコ多糖への取り込みを指標として測定すると、いずれの場合でも血清濃度に比例して取り込みが増加した。また正常ラット血清と比較してhypox. ラット血清では活性が低く、hypox. 後成長ホルモンを投与したラット血清ではその活性がよく回復していることが示された。
5. ³H-thymidineのDNAへの取り込みを指標として患者血清中のソマトメジン活性を測定した結果、下垂体性小人症で成長ホルモンの投与をうける患者の1年間の身長の伸びとソマトメジン活性には有意の相関関係が認められた。また、小児腎疾患患者で成長障害をきたす先天性のnephropathyやステロイド投与中のネフローゼ患者でもソマトメジン活性が有意に低いことが明らかとなった。

[総括]

1. MSAは完全なソマトメジン作用を有することが明確に証明された。

2. 分離・培養した軟骨細胞を、軟骨細胞としての分化機能の指標である酸性ムコ多糖合成能を高度に保持したままMSAを添加した無血清培地中で長期間培養できた。
3. 培養軟骨細胞を用いた血清中のソマトメジン活性の測定は、簡単でかつソマトメジンに鋭敏に反応する点などから、今後臨床面でも応用可能であることが分った。

論文の審査結果の要旨

本研究は、軟骨細胞培養系という新しい方法を用いて、MSAがソマトメジン作用を有することを証明するとともに、ソマトメジンの軟骨代謝に及ぼす影響について新たな知見を加えたものである。さらに、今回開発されたBioassay法は臨床面でも応用可能であることが分った。したがって本研究は学位論文として充分価値あるものと認める。