



Title	マイクロキャリアーは、株化骨芽細胞、MC3T3-E1において石灰化を促進する
Author(s)	島、雅昭
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36643">https://hdl.handle.net/11094/36643</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	しま 島	まさ 雅	あき 昭
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	8386	号
学位授与の日付	昭和	63年	12月1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	マイクロキャリアーは、株化骨芽細胞、MC 3T3-E1において石灰化を促進する		
論文審査委員	(主査) 教 授 蔡内 百治	(副査) 教 授 坂本 幸哉	教 授 小野 啓郎

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

MC 3T3-E1細胞は小玉らにより樹立された骨芽細胞系のcell lineであり、アルカリリフォスファターゼ活性(以下、ALP活性)、コラーゲン産生能、in vitroにおける石灰化能を有し、また副甲状腺ホルモン(以下、PTH)、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、プロスタグランジンE<sub>2</sub>に対する反応性も持ちあわせており、骨芽細胞を研究する上で有用なcell lineである。我々は、MC 3T3-E1細胞とマイクロキャリアーを混合し静置培養することにより、石灰化が早期におこることをみいだした。この石灰化のメカニズムを検討する為に以下の実験を行った。

#### 〔方法ならびに成績〕

MC 3T3-E1細胞の培養は10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地で、5%CO<sub>2</sub>気相下にて行った。 $5 \times 10^4$ 個の細胞を4mgのマイクロキャリアーと混合し、35mmシャーレ上で静置培養した。マイクロキャリアーを含まない群を対照とした。5、7、10、14日培養後に細胞を回収し、Lowry法によりALP活性を測定した。蛋白量の測定はBradfordの方法で、DNA含量の測定はLabarcaらの方法により行った。実験の24時間前に血清を含まず、0.3%BSAを含む $\alpha$ -MEM培地に交換し、1-34h PTH  $5 \times 10^{-8}\text{M}$ に対するcAMP産生量を測定した。細胞の観察は位相差顕微鏡下で行った。また、ALP活性を有する細胞の分布はALP染色で、Ca沈着の分布はVon Kossa染色により評価した。

対照群は培養後4日以内にコンフルエントに達した。マイクロキャリアー培養群は、コンフルエントに至るまでは5~6日間要したが培養後7日以内に明らかな石灰化を示した。このような石灰化の領域は、シャーレ上に白い点としてみえ、Von Kossa染色により褐色に染色され、石灰化であることが確認

された。マイクロキャリアーと接していない細胞は石灰化を認めなかつた。光顯上はマイクロキャリアーの周囲に重層化し、石灰化した細胞を認めた。一方、対照群は7日培養後は石灰化を認めなかつたが、14日培養後には石灰化を示した。

対照群は、培養日数と平行して蛋白量が増加した。マイクロキャリアー培養では、培養10日までは対数増殖期で、10日以降に plateau となる傾向を示した。蛋白含量は、7, 10, 14日間培養後、に対照に比し高値を示した。ALP活性も対照群では培養日数と平行して増加した。マイクロキャリアー培養では蛋白量増加の著しい培養10日までは低く抑えられ、蛋白量が plateau となつた10~14日の培養では、急激なALP活性の上昇を認め対照と比較して差を認めなかつた。cAMPの基礎値は対照と比較して差を認めず、また、培養日数が増えても増加は認められなかつた。PTH添加後のcAMP産生量は対照群において、培養日数及びALP活性と有意な正の相関を示した。マイクロキャリアー培養群は対照群に比し、cAMP産生量は低下していた。

ALP染色では、対照群は4日培養後少数の細胞においてALP活性が認められるのみであったが、7日培養後では、染色される細胞の数が増加し集落を形成していた。マイクロキャリアー培養では4日培養後には活性は認めなかつたが7日培養後にはマイクロキャリアー周囲を中心に強い活性を認めた。

#### 〔総括〕

マイクロキャリアー培養では、培養7日までに石灰化がみられたが、ALP活性やPTH刺激後のcAMP産生量は対照に比較して低値を示した。これはマイクロキャリアーが有効培養面積を対照の3倍以上に増加させた為にコンフルエントに達するまでにさらに1~2日間要し、コンフルエントに達してからも対数増殖期が続いた為であると考えられた。

Ecarrot-Charrierらは、骨芽細胞の石灰化は細胞が多層となった領域にのみみられるとのべており骨芽細胞の重層化は石灰化の重要な要素であると考えられる。対照群ではコンフルエントに達してからゆっくりと重層化していくのに対し、マイクロキャリアーとともに培養するとマイクロキャリアーの周囲に細胞が容易に重層化し、ALP染色で示した様に分化がおこり、培養後1週間で石灰化をきたしたと考えられる。

このようにマイクロキャリアーは細胞の重層化と分化を促し、石灰化に適した培養環境を与えていたと推定された。

#### 論文の審査結果の要旨

株化骨芽細胞MC3T3-E1は、アルカリフォスファターゼ活性、Type 1コラーゲン産生能石灰化能と、骨芽細胞の性格を多くかねそなえている。

この石灰化能は、骨形成のメカニズムを検討するうえで、近年注目をあつめている。

本研究はマイクロキャリアーとともに静置培養することで、石灰化が促進されることを実証したもので、細胞の重層化が、石灰化をきたす原因の一つであることを示した点で非常に興味深い。