



Effects of continuous infusion of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide on rat bone in vivo : comparative study by histomorphometry

北澤, 理子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1049

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001049>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	きた ざわ り こ 北 澤 理 子 （兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第772号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成4年3月31日
学位論文題目	Effects of continuous infusion of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide on rat bone in vivo: comparative study by histomorphometry （副甲状腺ホルモン（PTH）および副甲状腺ホルモン関連蛋白（PTHrP）持続注入のラット骨におよぼす効果：形態計測による比較研究）
審査委員	主査 教授 春日 雅 人 教授 千葉 勉 教授 前田 盛

論文内容の要旨

<緒言>

副甲状腺ホルモン関連蛋白（PTHrP）はヒト肺癌細胞株（BEN）より分離同定され、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症（HHM）を惹起する主たる液性因子と考えられている。この蛋白はN端13ケのアミノ酸のうち8ケが副甲状腺ホルモン（PTH）と同一であり、概ねPTHと似た生物学的活性を持つことが明らかにされてきたが、その作用がPTHと完全に同一であるかどうかについては定かではない。1983年 Stewart らはHHMの骨病変（PTHrP過剰状態）と副甲状腺機能亢進症（PTH過剰状態）のそれとを骨形態計測により比較検討して、前者では著しく骨形成が低下していることを報告している。本研究では副甲状腺摘出ラットにヒトPTH（1-34）とヒトPTHrP（1-34）を持続注入し、骨に及ぼす効果の差異について骨形態計測を用いて検討した。

<方法>

雄SDラットをPTH投与群、PTHrP投与群、対照群の3群に分けた。副甲状腺摘出（PTX）後、尾静脈より採血して血清Caの低下を確認後、予めヒトPTH（1-34）又はヒトPTHrP（1-34）を15nmol/kg/dayの注入速度を得られるように調整したAlzet浸透圧ポンプを、エーテル麻酔下にラット背部皮下に移植した。対照群ではペプチドの溶媒（0.2%ウシ血漿アルブミン0.01N酢酸溶液）のみを入れた浸透圧ポンプを移植した。またテトラサイクリン（PTX前日）とカルセイン（屠殺2日前）を腹腔内投与し骨をラベルした。6日間の持続注入後、採血の後、動物を屠殺し大腿骨と近位尾椎を摘出し以下の検討に供した。同様の実験を3回反復した。

PTX前後及び屠殺直前に尾静脈より採血を行い、中外ユニキットCa、ユニキットPを用い比色法にて血清Ca、P濃度を測定した。

左大腿骨は重量測定後、メタノール／クロロホルムにて脱脂し120℃で6時間乾燥、800℃6時間で灰化した。Ash重量を測定後6N塩酸に溶解してCa、P濃度を測定した。

右大腿骨遠位部分、椎骨は70%エタノール固定、脱水、アセトンにて脱脂後にメチルメタクリレートに包埋して非脱灰標本を作成し、前額断方向に5 μ m、10 μ mに薄切した。5 μ m厚の切片はtoruidine blue O 又は Masson 三重染色を行い、光学顕微鏡下で形態計測に供した。10 μ m厚の切片は一部は未染色で蛍光顕微鏡下の観察に供し、一部は好銀繊維の確認の為に、と銀染色を行った。

形態計測は remodeling bone の領域、即ち大腿骨遠位標本においては成長軟骨から近位に0.7mm～1.7mmまでの海綿骨、椎体では上下の成長軟骨から各々0.7mm以上内側に位置する海綿骨を対象として、ニコン光学顕微鏡（蛍光顕微鏡付き）とデジタイザー装備の半自動画像解析装置（Consomzone 98ニコン）を用いて行った。静的パラメーターとして200倍視野で%骨量（BV/TV），%類骨量（OV/BV），%類骨面（OS/BS），%骨芽細胞面（Ob.S/BS），%破骨細胞面（Oc.S/BS），%吸収面（ES/BS），破骨細胞数（N.Oc./TV），%繊維化面積（Fb.V/TV）を計測した。動的パラメーターとしては石灰化速度（MAR）をテトラサイクリンとカルセインのラベル間距離から計算した。

結果は mean \pm SDで表示し、統計は Duncan の multiple range F-test を用いて行った。

<結果>

血清Ca値は、副甲状腺摘出（PTX）前 $9.14\pm0.13\text{mg/dl}$ から18時間後に 7.68 ± 0.20 まで低下したが、hPTH（1-34）又はhPTHrP（1-34）の6日間持続注入により各々 12.31 ± 0.71 、 11.13 ± 0.79 まで上昇した。対照群では 6.75 ± 0.68 と低Ca血症が持続した。血清P値はPTX前 $8.68\pm0.28\text{mg/dl}$ よりPTX後 10.88 ± 0.22 まで上昇し、対照群ではさらに 12.59 ± 0.43 となったが、PTH投与群、PTHrP投与群では各々 6.64 ± 0.67 、 7.79 ± 0.54 と低下した。これらPTHとPTHrPのCa上昇P低下作用には統計学的有意差は認めなかった。

大腿骨湿重量、乾燥重量、Ash重量、AshのCa、P含量について3群間で有意差はなかった。

形態計測上、骨形成のパラメータに関しては、PTH又はPTHrPの持続注入によりOV/BV、MARは対照群の1.5～1.8倍程度に、OS/BS、Ob.S/BSは3～4倍に増加し、骨吸収についてはPTH投与群、PTHrP投与群とも破骨細胞数で10倍程度と著明な増加を呈し、骨形成骨吸収とも両者の作用に有意差は認めなかった。

ところが、PTH投与群においてのみ骨梁表面に多数の繊維芽細胞様細胞の増生（%繊維化面積（Fb.V/TV）で5%と有意の増加）を認め、と銀法にて好銀繊維が証明されたが、PTHrP投与ではこのような変化は観察されなかった。

<考察>

副甲状腺摘出ラットにおいてヒトPTH (1-34) 及びヒトPTHrP (1-34) の6日間持続投与は同程度のCa上昇, 及びP低下作用を示した。骨形態計測により両者は同程度に骨形成, 骨吸収ともに促進することが明かになった。私共の知見は Jaeger ら (1987年) のPTXラットにおけるPTH (1-34) 投与実験, Rosol ら (1988年) のヌードマウスにおけるヒトPTHrP (1-40) 投与の結果と一致している。Thompson ら (1988年) はPTHとPTHrPの2日間投与により両者は同程度に骨よりのCa動員効果を示したことを報告している。

今回の研究において骨吸収の亢進は骨形成の亢進をも伴っておりPTHrP投与により uncoupling (骨吸収と骨形成の不均衡) は必ずしも観察されなかった。従来, HHM患者や腫瘍移植モデル動物において骨吸収の亢進と共に骨形成の抑制が認められるという報告があるが, このような場合は, 腫瘍で産生されるPTHrP以外の液性因子や局所因子の作用や, 治療薬剤により病態が修飾されている可能性をも考慮に入れねばならない。

海綿骨表面の繊維化はPTH投与群でのみ観察された。即ち骨梁表面の類骨上の骨芽細胞の直ぐ外側に重層する繊維芽細胞様細胞の層を認め, その部分に銀好性繊維の出現が観察された。この所見は原発性副甲状腺機能亢進症に合併する繊維性骨炎の所見と呼応している。PTHrP投与群, 対照群においては繊維芽細胞様細胞の増生も銀好性繊維も認められなかった。骨芽細胞は繊維芽細胞と起源を同じくすると考えられているが, 本研究によりヒトPTH (1-34) は骨芽細胞や繊維芽細胞の前駆細胞であるところの未分化な間葉細胞の増殖, 分化を促進する可能性を示唆する所見を得た。

<結語>

PTHとPTHrPは副甲状腺摘出ラットにおいて同程度の骨形成骨吸収促進効果を示したが, 間葉系幹細胞の増殖に対する効果は異なっている可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症 (HHM) を惹起する主たる液性因子と考えられている。この蛋白はN端13ケのアミノ酸のうち8ケが副甲状腺ホルモン (PTH) と同一であり, 概ねPTHと似た生物学的活性をもつことが明らかにされてきたが, その作用がPTHと完全に同一であるかどうかについては定かではない。本研究では副甲状腺摘出ラットに15 nmol/kg/day のヒトPTH (1-34) とヒトPTHrP (1-34) を6日間持続注入し, 骨に及ぼす効果の差異について骨形態計測を用いて比較検討した。摘出した大腿骨, 椎骨は70%エタノール固定後メチルメタクリレートに包埋して薄切, 5 μ m~10 μ mの非脱灰標本を作成し, Masson 三重染色を行い, 形態計測に供した。血清Ca値は, 副甲状腺摘出 (PTX) 前 9.14 ± 0.13 mg/dlから18時間後 7.68 ± 0.20 まで低下したが, hPTH (1-34) 又はhPTHrP (1-34) の6日間持続注入により各々 12.31 ± 0.71 , 11.13 ± 0.79 まで上昇した。血清P値はPTX前 8.68 ± 0.28 mg/dlよりPTX後は 10.88 ± 0.22 まで上昇

し、PTH投与群、PTHrP投与群では各々 6.64 ± 0.67 , 7.79 ± 0.54 と低下した。このようにPTHとPTHrPは同程度のCa上昇及びP低下作用を呈した。

形態計測上、骨形成のパラメータに関しては、PTH又はPTHrPの持続注入により%類骨面 (OS/BS), %骨芽細胞面 (Ob.S/BS) は3~4倍に増加し、骨吸収についてはPTH投与群、PTHrP投与群とも破骨細胞数で10倍程度と著明な増加を呈し、両者の作用に有意差は認めなかった。ところがPTH投与群においてのみ骨梁表面に多数の繊維芽細胞様細胞の増殖 (%繊維化面積 (Fb.V/TV) で5%と有意の増加) を認め、好銀繊維が証明されたが、PTHrP投与ではこのような変化は観察されなかった。

PTHrP投与群において骨吸収の亢進は骨形成の促進を伴っており uncoupling (骨吸収と骨形成の不均衡) は観察されなかった。従来、HHM患者や腫瘍移植モデル動物において骨吸収の亢進の一方骨形成の抑制が認められるという報告があるが、このような場合は、腫瘍で産生されるPTHrP以外の液性因子や局所因子の作用や、治療薬剤により病態が修飾されている可能性をも考慮に入れねばならない。

海綿骨表面の繊維化はPTH投与群でのみ観察され、この変化は原発性副甲状腺機能亢進症に合併する繊維性骨炎の所見と呼応している。骨芽細胞と繊維芽細胞は起源を同じくすると考えられているが、本研究によりヒトPTH (1-34) は骨芽細胞や繊維芽細胞の前駆細胞であるところの未分化な間葉細胞の増殖分化を促進する可能性を示唆する所見を得た。以上本研究者は、PTHとPTHrPについてその骨代謝に及ぼす影響を検討したものであるが、従来ほとんど行われなかったPTHとPTHrPのin vivoでの作用の差について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格を有すると思われる。