



# Additive effects of parathyroid hormone and calcitonin on adenosine 3', 5'-monophosphate release in newly established perfusion system of rat femur

杉本, 利嗣

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-02-26

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1004

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001004>

※ 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）	すぎもととしつぐ 杉本利嗣	（兵庫県）
学位の種類	医学博士	
学位記番号	医博ろ第 870号	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当	
学位授与の日付	昭和61年 2 月26日	
学位論文題目	Additive Effects of Parathyroid Hormone and Calcitonin on Adenosine 3', 5'-Monophosphate Release in Newly Established Perfusion System of Rat Femur （新しく確立されたラット大腿骨灌流系における副甲状腺ホルモンとカルチトニンの Adenosine 3', 5'-Monophosphate 放出に対する相加効果）	
審査委員	主査 教授 藤田 拓男 教授 廣畑 和志 教授 島田 桂吉	

## 論文内容の要旨

### <序 論>

副甲状腺ホルモン（以下PTHと省略）及びカルチトニン（以下CTと省略）が骨組織において速やかに adenylate cyclase 活性を高め、adenosine 3', 5'-monophosphate（以下 cAMPと省略）レベルを上昇させることはよく知られている。さらにラット胎児頭蓋冠を用いた培養実験において PTHは主に osteoblast に作用し、CTは osteoclast に作用すると報告されている。しかし器官としての完全性を保った骨灌流系でPTHとCTの受容体結合部位の違いを証明した報告はない。Martin らはイヌ胫骨の単離灌流系を用いて、PTH依存性 cAMP値の上昇の程度が各種の代謝異常状態において異なることを報告しているが、CTに関する詳細な報告はいまだない。また彼らは同様の実験系を用いて、ウシPTH-（1-84）はN末端フラグメントであるウシPTH-（1-34）に比して cAMP上昇作用が極めて弱く、骨に対する直接作用をほとんど有さないことを報告したが、これは骨組織を用いた培養系から得られた以前の報告と矛盾するものである。著者は病態モデルを作製し易い点で有用と思われるラット単離骨灌流系を確立し、これを用いて①PTH及びCT依存性 cAMPの経時的変化及び容量反応性、②その最大反応量でのCTとPTHの同時投与による相加性の有無、③等モルのヒトPTH-（1-84）とヒトPTH-（1-34）の cAMP値上昇作用の比較検討を行なった。

## <方 法>

5週令ウィスター系雄ラットを麻酔した後へパリンを大腿静脈より投与し、その後速やかに大腿骨を単離した。大腿骨頭直下の栄養孔にドリルで骨皮質厚の約 $\frac{1}{2}$ に達する挿入口を作製し、そこに先端を鈍にした注射針を挿入した後周囲をデンタルセメントで固定した。単離骨の灌流は Miller 型肝灌流装置を改変したものを用いて、37℃ 飽和湿度下で行なった。灌流液は 1 mg/ml ブドウ糖を含む Krebs Ringer bicarbonate (pH 7.4) を 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> で飽和させ、流速は 1 ml / 5 分とした。45分間の前灌流後ホルモンを側管より 5 分かけて注入し、骨表面から漏出する液を 5 分毎に採取し、cAMP 濃度の測定に供した。単離骨の灌流の有効性は、①栄養攷より造影剤注入後の X 線写真、②インドシアニンググリーン添加時の骨表面の色調の変化により確認した。cAMP 濃度は Steiner らの方法に準じてラジオイムノアッセイ法により測定した。サンプルは 5% trichloroacetic acid で除タンパクし、上清を水飽和エーテルで抽出した後蒸発させた。

oxidized PTH は 10  $\mu$ g PTH に 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加え、37℃ 45 分間反応させた後凍結乾燥することにより作製した。CT はウナギ CT の合成同族体である [Asu<sup>17</sup>] ウナギ CT を用いた。

## <結 果>

(1) 経時的变化及び容量反応性：ヒト PTH- (1-34) 及び CT に対する単離骨からの cAMP 放出反応は、両者共に投与後 5 - 10 分で頂値に達し、その後漸減した。PTH 依存性 cAMP 値は投与後 30 分で基礎値に低下したのに比し、CT 依存性 cAMP は頂値が低い傾向にあるにもかかわらず、投与後 60 分でも基礎値より有意に高く、遷延効果を認めた。一方両ホルモン共に容量反応性を示し、また生理的に不活性な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidized PTH の投与では cAMP 値の有意の上昇を示さなかった。(2) ヒト PTH- (1-84) とヒト PTH- (1-34) の cAMP 上昇作用の比較：ヒト PTH- (1-84) は等モルのヒト PTH- (1-34) に比し、cAMP 上昇作用が明らかに低反応であることを認めた。(3) PTH と CT の同時投与による相加効果の有無：両ホルモンが別個の受容体結合部位をもつかどうかを詳細に検討する目的で、最大刺激投与量 (5  $\mu$ g) での CT と PTH の同時投与の効果調べた。その結果両ホルモンの同時投与は単独投与に比べ、有意の cAMP 上昇効果を認めた。

## <考 案>

解剖学的なラット大腿骨の血管走行から考え、灌流液は栄養孔より medulla に入り、そこで骨皮質に浸入した後 sinusoid から central sinus に流れ、最後に骨表面から漏出してくると思われる。骨組織中には骨細胞のみならず軟骨細胞も豊富に含まれ、単離灌流骨に対する PTH 及び CT の作用に軟骨細胞の関与も考えられる。しかし骨端軟骨はほとんど血管を含まず、また著者らの骨組織学的検討でも大腿骨中のうち軟骨の占める割合は 3 ~ 4% に過ぎなかった。また軟骨細胞は PTH 及び CT 依存性 adenylate cyclase 活性を有しているが、最大刺激投与量での両ホルモンの相加性はないことが報告されている。従って単離骨に対する両ホルモンの作用に軟骨細胞の関与は極めて少ないと考えられた。単離骨からの PTH 依存性 cAMP 放出反応は spike and decline 型を示し、頂

値は基礎値の3～4倍であり、他の骨灌流系での報告とよく一致した。一方骨灌流系を用いてはじめてCT依存性 cAMP放出レベルを検討し、PTHの反応様式との相違を証明した。即ちCTはPTHに比し、急速効果は弱い傾向にあるにもかかわらず、遷延効果をもつことを立証した。腎細胞培養系を用いた Chao らの実験結果からサケCTは受容体との強い結合力のため、PTHに比し効果が遷延すると報告されている。また骨に関して Tashjian らはサケCTは頭蓋冠との結合力が極めて強いと報告しており、著者の結果と一致するものと考えられた。Martin らはイヌ胫骨の単離灌流系を用いて、ウシPTH- (1-34) 及び (1-84) の単離骨への  $\mu$ p take 並びにその cAMP放出作用を比較検討し、PTH- (1-34) がPTH- (1-84) に比して著明に強い cAMP放出作用を示し、しかも骨により選択的に取り込まれることを見いだした。また Parsons や Robinson らはネコを用いた実験で副甲状腺抽出物を経静脈的に投与した時に比し、胫骨の栄養血管に直接投与した時には骨からのカルシウム動員作用がほとんどみられないことを報告した。これらの報告はPTH- (1-84) が骨に対する直接作用を有さず、肝臓及び腎臓でPTH- (1-34) などに断片化されることによりはじめて骨に対する作用を発揮することを示唆したものである。しかし一方ではPTH- (1-84) が骨に対して十分な作用を発揮しうるとする成績も培養系の実験から多く得られている。そこで著者は等モルのヒトPTH- (1-84) とヒトPTH- (1-34) のラット単離骨よりの cAMP放出作用を比較した。その結果、単離骨灌流系を用いた場合には Martin らの成績とあわせ、PTHの種差や動物の種差によらず、PTH- (1-34) は (1-84) に比しはるかに強い cAMP放出作用を示すことを明らかにした。Rodan らは胎児ラット頭蓋冠を用いた培養系で、最大刺激投与量でのPTHとCTの同時投与が相加効果を示したと報告している。しかし器官としての安全性を保った adult bone でPTHとCTの受容体結合部位の違いを証明した報告はなかった。そこで著者は単離骨灌流系を用いて、最大刺激投与量でのCTとPTHの同時投与による相加効果の有無を検討し、器官としての完全性を保った adult bone でも相加効果を認め、PTHとCTの受容体結合部位の違いを証明し得た。またこの事実は同時に従来より知られているPTHとCTの生理的拮抗作用が adenylate cyclase-cAMP系の活性化のレベルではおこっていないことを示すものである。最後にラット単離骨灌流系は骨に対するPTH及びCTの直接作用を検討するのに有用であり、さらにラットは病態モデルを作製し易いことから、種々の代謝及び内分泌異常状態における骨のホルモン作用を検討する場合にも極めて有用である。

## 論文審査の結果の要旨

骨代謝の研究は大量の骨塩結晶が存在するために細胞のレベルでの検討が困難であり、又器官としての環境条件やホルモン環境に対する反応も硬組織の構造上障害が多く、肝臓などでしばしば用いられる環境の技術も殆ど応用されておらず、ことに実験動物としてもっとも広く用いられているラットの骨灌流は現在迄行われていない。しかしながら、個々の骨細胞の代謝と個体としての全骨格の代謝反応の中間に単離骨の灌流系の確立が不可欠であることはいうまでもない。

本申請者はこの困難なラット単離骨の灌流系の確立に挑戦し世界に先がけて新しい灌流法を考案し、カルシウム調節ホルモンである副甲状腺ホルモンとカルチトニンに対するサイクリックAMP産生促進反応を検討した。生後5週のウイスター雄ラットからペントバルビタール麻酔下到大腿骨をとり出し、附着する筋肉を除去した後、頸部の遠位側にある栄養孔から21口径の注射針を挿入固定した。肝灌流用のミラーの装置で栄養管から灌流し、骨表面からの流出液を採取した。灌流液としては37℃に保った Krebs Ringer Bicarbonate 緩衝液を用い、95%酸素、5%CO<sub>2</sub>を常時添加した。色素液及びV線造影剤の注入によって骨組織の均一の灌流が確認された。灌流液中に人副甲状腺ホルモン 1-34, 1-84, Aso<sup>1,7</sup> うなぎカルチトニン（エルカトニン）を5分間にわたって添加し、5分毎に流出液を採取した。5μgのヒト副甲状腺ホルモン 1-34又は5μgのエルカトニンの添加によって流出液のサイクリックAMPは著明に上昇し、5～10分で頂値に達した。副甲状腺ホルモンによる刺激後のサイクリックAMPの放出は30分後には前値に復したが、エルカトニンによる刺激後のサイクリックAMPの放出は持続時間が長く、60分後にも尚前値より有意に高い値がみとめられた。刺激後30分間のサイクリックAMPの放出量の刺激前30分間のそれと比較して得られた増加量は、副甲状腺ホルモン及びカルチトニンの投与量に平行して増加した。過酸化水素によって不活性化した副甲状腺ホルモンではサイクリックAMP放出の増加はおこらなかった。84個の全アミノ酸配列をもつヒト副甲状腺ホルモンは予期に反して34個のN末端アミノ酸から成る断片よりもサイクリックAMP放出促進作用が弱く、N末端断片が副甲状腺ホルモンの骨に対して作用する活性断片であると考えられた。更に副甲状腺ホルモンとエルカトニンの骨に対する作用機序の差を検討するために、副甲状腺ホルモン5μgとエルカトニン5μgを同時に投与した所、これらの最大刺激量を用いたときにも同時投与の時のサイクリックAMPの放出量はそれぞれのホルモンの単独での投与のときの放出量の和に略々等しく、両者の作用は相加的であり、骨におけることになった部位、又はことになった細胞群に対して両ホルモンが夫々作用することが示唆された。骨において副甲状腺ホルモンの受容体は骨芽細胞に、カルチトニンの受容体は破骨細胞に証明されているが本研究の結果によって両ホルモンの作用部位が異なることが改めて確認された。

以上本研究はラット単離灌流法を世界に先がけて確立するとともにこの方法がカルシウム調節ホルモンに対する骨の反応を研究する上にきわめて有用であることを証明したものであり、従来殆ど行われなかった骨代謝の調節機序の単離骨における研究において重要な知見を得たものであり、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があるものと認められる。