



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サーモンカルシトニンがメダカ破骨細胞に及ぼす影響
Author(s)	山田, 利恵; 土門, 卓文; 井上, 農夫男 他
Citation	北海道歯学雑誌, 33(2), 168-174
Issue Date	2013-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52455
Type	journal article
File Information	12-yamada.pdf



原 著

サーモンカルシトニンがメダカ破骨細胞に及ぼす影響

山田 利恵¹⁾ 土門 卓文²⁾ 井上農夫男¹⁾ 野谷 健治¹⁾

抄 録：破骨細胞は刷子縁により骨を吸収する多核の巨細胞である。哺乳類でカルシトニン（CT）は破骨細胞に直接作用し、細胞体収縮と刷子縁の消失を引き起こすことによって破骨細胞による骨吸収が抑制される。硬骨魚類にもCTは存在するが、その作用はよく分かっていない。本研究は硬骨魚類のメダカ咽頭骨の破骨細胞を分離培養する実験系を確立し、この実験系と咽頭骨の器官培養の実験系を用いてサーモンカルシトニン（sCT）がメダカ破骨細胞に及ぼす影響を形態学的に明らかにすることを目的とした。メダカの咽頭骨より破骨細胞を分離しLeibovitz's L-15培地中で24時間培養した。その後、培地中で 10^{-6} ～ 10^{-10} g/mlになるように5段階の濃度のsCTを添加し、1または3時間培養し、実験群とした。sCTを添加しないものを対照群とした。培養後、試料において酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（TRAP）活性反応を検出し光学顕微鏡で観察した。咽頭骨の器官培養は分離培養と同様のsCTの濃度と時間で培養したものを実験群とし、sCTを添加しないものを対照群とした。培養終了後、試料はEpon包埋し、0.5 μ mの準超薄切片を作製後、光学顕微鏡観察した。分離培養の対照群・実験群では、sCTの濃度と作用時間に関わらず、TRAP活性陽性反応を示す細胞は円形もしくは楕円形の細胞外形を示し、両群間に形態の差異は認められなかった。器官培養の対照群・実験群でも、sCTの濃度と作用時間に関わらず、破骨細胞は刷子縁により咽頭骨上に吸収窩を形成しており、両群間に形態の差異は認められなかった。以上の結果は、sCTはメダカ破骨細胞に対して骨吸収抑制の作用を示さないことを示唆している。

キーワード：メダカ、破骨細胞、サーモンカルシトニン、骨吸収

緒 言

破骨細胞は骨吸収に関与する多核の巨細胞であり、骨上の吸収窩に面する部分に光学顕微鏡観察で刷子縁brush border、透過型電子顕微鏡観察では波状縁ruffled border¹⁾と呼ばれる特殊構造を有し、骨基質を溶解する。哺乳類ではカルシトニン（calcitonin : CT）は甲状腺から分泌され、破骨細胞に直接作用するホルモン²⁾として知られている。CTは破骨細胞のカルシトニン受容体に結合することによって、破骨細胞の波状縁の消失を誘導し³⁻⁵⁾、その結果、破骨細胞が骨表面から離れることによって骨吸収抑制作用を示すと報告されている。

脊椎動物の系統発生を考えた場合、CTは内骨格としての軟骨をもつ円口類⁶⁾や軟骨魚類、内骨格としての骨をもつ硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、そして哺乳類までのすべての動物種に存在している。CTは哺乳類以外の脊椎動物では鰓後腺から分泌され、硬骨魚類⁷⁻⁹⁾や鳥類^{10, 11)}においてはCTの作用は様々に報告されており、哺乳類を除

いた脊椎動物におけるCTの役割、特にその生物学的意義はよく分かっていない。脊椎動物の系統発生において、内骨格としての骨と破骨細胞が出現するのは硬骨魚類からである。このため硬骨魚類におけるCTが破骨細胞に及ぼす影響を調べることは、脊椎動物におけるCTの役割を考える上で重要である。このためには硬骨魚類の骨組織より破骨細胞を分離し、培養下において直接CTを作用させた後の効果を観察し、哺乳類の破骨細胞におけるその効果と比較し、検討することが必要であるが、これまでに硬骨魚類の骨組織より破骨細胞を分離培養した報告はない。

硬骨魚類のメダカは体長が小さく、飼育も簡便である。メダカは多生菌性であり、咽頭骨に存在する咽頭歯の交換は頻繁に生じ、そこでは多数の破骨細胞の出現が報告されている¹²⁾。また、破骨細胞の特異的酵素活性である酒石酸耐性酸性フォスファターゼtartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 活性反応は、哺乳類^{13, 14)}、鳥類¹⁵⁾、爬虫類¹⁶⁾、両生類¹⁷⁾、そして硬骨魚類のメダカ¹²⁾においても報告されている。以上のことから、メダカは硬骨魚類より破骨細胞

〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

¹⁾北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座高齢者歯科学教室（主任：野谷健治 准教授）

〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

²⁾北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座口腔機能解剖学教室（主任：土門卓文 教授）

胞を分離培養する実験動物として適していると考えられる。

現在までにCTはウシ、ブタ、ヒツジ、ヒト、ラット、サケ、ウナギ、ニワトリから単離され、その構造が明らかとなっている。このうち、硬骨魚類のサケとウナギ、鳥類のニワトリのCTは、ラットの血清カルシウム値を低下させる効力が哺乳類由来のCTに比較して著しく高く、その効果はヒトのカルシトニンと比較して、サケは約35倍、ウナギは約50～70倍、ニワトリは約65倍と報告されている¹⁸⁾。これらCTの中で、サーモン（サケ）カルシトニン（salmon calcitonin : sCT）はヒトにおいては骨粗鬆症の治療薬として使用され、試薬としても実験動物の種に関わらず、広く用いられている^{2, 10)}。このことから本研究ではメダカ破骨細胞に作用させるCTとしてsCTを用いることとした。本研究はメダカ咽頭骨の破骨細胞を分離培養する実験系を確立し、この実験系と咽頭骨の器官培養の実験系を用いてsCTがメダカ破骨細胞に及ぼす影響を形態学的に明らかにすることを目的とする。

材 料 と 方 法

1) 実験動物

動物実験は北海道大学大学院歯学研究科の実験動物に関する指針に従い、以下のように行なった。メダカ（ダツ目メダカ科、*Oryzias latipes*, Japanese Medaka）(Hokudo Co, Ltd, Sapporo, Hokkaido) 成魚を54匹を用いた。内訳は実体顕微鏡観察3匹、光学顕微鏡観察3匹、分離培養24匹、器官培養24匹である。メダカはMS222 (SIGMA) の水溶液 (1g/l) 中で麻酔後、断頭し、頭部をその後の試料とした。

2) 実体顕微鏡観察

試料より実体顕微鏡下において咽頭骨を採取し(図1)、10%中性ホルマリンで24時間、室温にて浸漬固定した。固定後、以下に示すアゾ色素法を用いてTRAP活性反応の検出を行なった。基質としてnaphthol AS-MIX (SIGMA)、ジアゾニウム塩としてfast red violet (SIGMA) を用い、10mM酒石酸ナトリウムを含有した0.1M酢酸緩衝液 (pH 5.2) を緩衝液とする溶液に試料を浸漬し、室温で30分間反応させ、TRAP活性反応を検出した。その後、実体顕微鏡にて観察した。

3) 光学顕微鏡観察

試料は10%中性ホルマリンで24時間、室温にて浸漬固定し、その後5% EDTA溶液 (pH 7.4, 4℃) で1週間脱灰した。試料は通法に従い上昇エタノール系列で脱水し、パラフィン包埋を行なった。その後、咽頭骨において前頭方向から厚さ5μmの切片を作製し、上述したアゾ色素法を用いたTRAP活性反応の検出を行なった。その後、ヘマトキシリンによる核染色を行ない、光学顕微鏡で観察した。

4) 分離培養

試料より採取した咽頭骨は、0.1% NaClOに15秒浸漬し、その後70%エタノールに3秒間浸漬し、PBSで30秒間3回洗浄をした。その後、Leibovitz's L-15培地 (GIBCO) (ペニシリン900U/ml, ストレプトマイシン90μg/ml) に10% ウシ胎児血清を添加した培地にて30秒間3回洗浄をした¹⁹⁾。次に、上記培地中で眼科手術用のはさみを用いて咽頭骨を細切後、培地を数回ピペッティングし、機械的に咽頭骨より破骨細胞を分離した²⁰⁾。得られた細胞はChamber Slide (Thermo Fisher Scientific Inc.) 中に上記の培地とともに播種し、室温にて24時間培養した。その後、培地中で濃度が 10^{-6} g/ml, 10^{-7} g/ml, 10^{-8} g/ml, 10^{-9} g/ml, 10^{-10} g/ml になるように、sCT (SIGMA) を添加し、1または3時間、室温、大気中で培養し、実験群とした。また、sCTを培地中に添加しないものを対照群とした。培養後、細胞を10%中性ホルマリンで1時間、室温にて浸漬固定し、TRAP活性反応を検出後、光学顕微鏡にて観察を行なった。

5) 器官培養

試料より採取した咽頭骨は、分離培養と同様の方法で洗浄後、Chamber Slide中に置き、Leibovitz's L-15培地中で濃度が 10^{-6} g/ml, 10^{-7} g/ml, 10^{-8} g/ml, 10^{-9} g/ml, 10^{-10} g/ml になるようにsCTを添加し、1または3時間、室温、大気中で培養し、実験群とした。また、sCTを培地中に添加しないものを対照群とした。その後、試料は通法に従い上昇エタノール系列にて脱水し、Epon 812 (TAAB) に包埋した。試料はウルトラミクロトームを用いてダイヤモンドナイフにより0.5μmの準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡を用いて観察した。

結 果

1) 実体顕微鏡観察

咽頭骨は心臓のほぼ上方に位置する咽頭腔をはさんで上下に存在し(図1)、上咽頭骨は涙滴形状を、下咽頭骨は三角形状を示し、それぞれ左右に一对存在した。咽頭腔面には咽頭腔側を頂点とした円錐形状の咽頭歯の尖端部分が多数突き出ており、これら咽頭歯は咽頭骨表面に対して前頭方向に複数の歯列を形成していた。歯列は上咽頭骨で約10列、下咽頭骨で約6列であった。咽頭歯が見られる咽頭

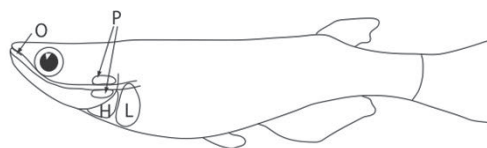


図1) メダカ咽頭骨の位置

上・下咽頭骨は咽頭を挟んで向かい合っている。
O : 口腔 P : 咽頭骨 H : 心臓 L : 肝臓

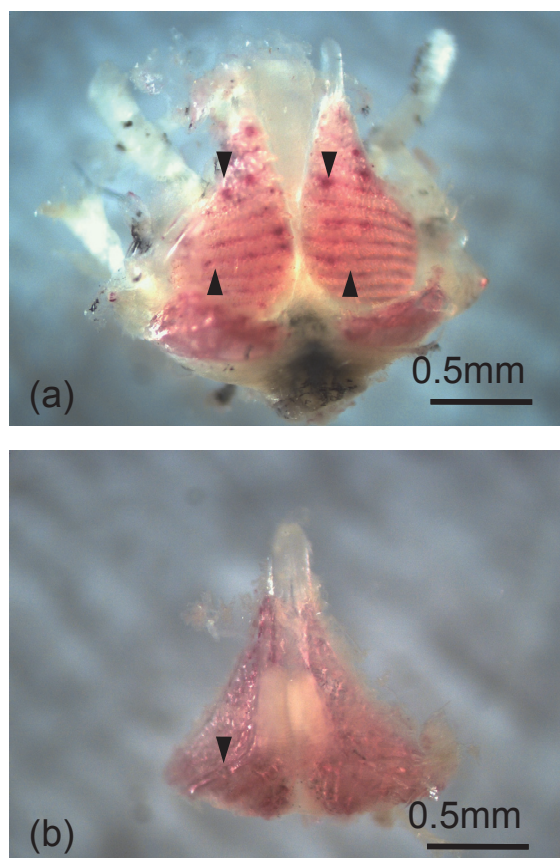


図2) 咽頭骨の実体顕微鏡 (TRAP染色)

図上方が頭側、下方が尾側。歯列(鋸)に沿ってTRAP染色陽性反応を示す。(a) 上咽頭骨 (b) 下咽頭骨

骨の基部では様々な大きさを示すTRAP活性陽性反応が多数認められた(図2)。

2) 光学顕微鏡観察

図3に上咽頭骨の咽頭歯と咽頭骨の組織像を示す。多数の円錐状の咽頭歯はその基部において咽頭骨と骨性結合していた。TRAP活性陽性反応は咽頭歯と結合している咽頭骨表面に多数認められ、それらは円形または楕円形など様々な細胞外形を示していた。核染色によりこれらTRAP活性陽性細胞は多核の破骨細胞として観察された。

3) 分離培養

1時間の培養の対照群において、TRAP活性陽性反応を示す細胞は細胞外形が円形もしくは楕円形を示し、複数の細胞質突起を伸長している像が多数観察された。実験群では、いずれのsCTの濃度でもTRAP活性陽性反応を示す細胞は細胞外形が円形もしくは楕円形の形態を示し、複数の細胞質突起を伸長させており、対照群の細胞とその大きさや細胞外形に差異は認められなかった(図4)。また、機械的に咽頭骨より分離された咽頭歯に複数のTRAP活性陽性反応を示す細胞が接している所見もしばしば観察された

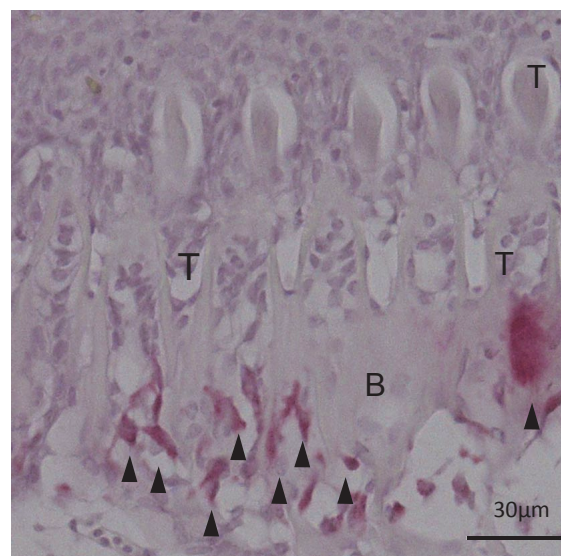


図3) 上咽頭歯・骨の光学顕微鏡像 (TRAP染色)

歯および咽頭骨に接して多数のTRAP陽性細胞が見られる。T: 咽頭歯 鋸: TRAP陽性細胞 B: 咽頭骨

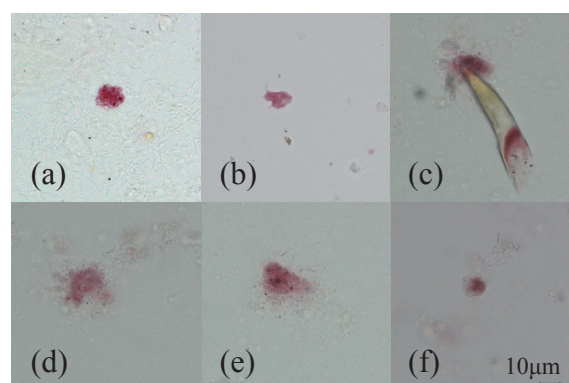


図4) メダカ分離培養破骨細胞のTRAP染色像

24時間培養後、以下の濃度のsCTを添加し1時間培養: (a) Control (b) 10^{-10} g/ml (c) 10^{-9} g/ml (d) 10^{-8} g/ml (e) 10^{-7} g/ml (f) 10^{-6} g/mlいずれの細胞もTRAP陽性反応を示し、細胞の形態は円形または楕円形を示す。いずれの細胞も細胞質突起を伸長させており、対照群と細胞の大きさ、形態に著しい差異は認められない。(c): 脱落した咽頭歯に接して2つのTRAP活性陽性細胞が認められる。

(図4)。

3時間の培養の対照群においても、TRAP活性陽性反応を示す細胞は細胞外形が円形もしくは楕円形を示し、複数の細胞質突起を伸長している像が多数観察された。実験群では、いずれのsCTの濃度でTRAP活性陽性反応を示す細胞は細胞外形が円形もしくは楕円形の細胞外形を示し、複数の細胞質突起を伸長させ、対照群の細胞とその大きさや細胞外形に差異は認められなかった(図5)。sCTの作用時間においては、1時間と3時間では対照群、実験群ともにTRAP活性陽性細胞の大きさと細胞外形に差異は認められなかった。

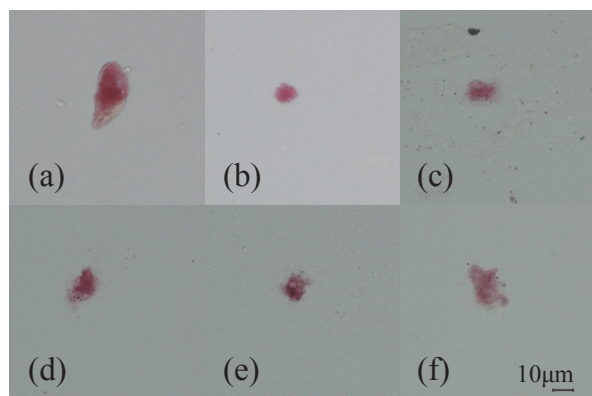


図5) メダカ分離培養破骨細胞のTRAP染色像

24時間培養後、以下の濃度のsCTを添加し3時間培養：(a) Control (b) 10^{-10} g/ml (c) 10^{-9} g/ml (d) 10^{-8} g/ml (e) 10^{-7} g/ml (f) 10^{-6} g/ml いずれの細胞もTRAP陽性反応を示し、細胞の形態は円形または楕円形を示す。いずれの細胞も細胞質突起を伸長させており、対照群と細胞の大きさ、形態に著しい差異は認められない。

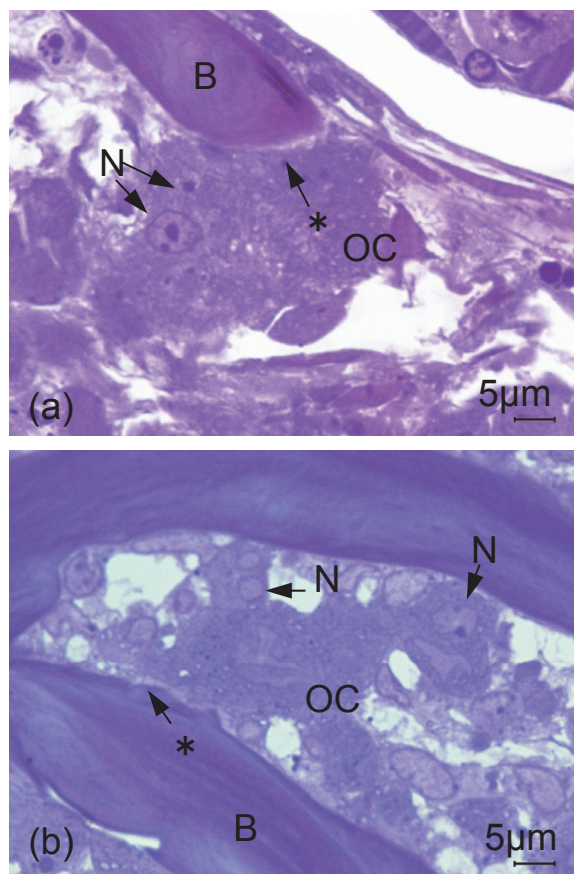


図6) 器官培養したメダカ咽頭骨の準超薄切片

24時間培養後、以下の濃度のsCTを添加し1時間培養：(a) Control (b) 10^{-6} g/ml 破骨細胞は多核の巨細胞で、刷子縁を介して骨と接している。*：刷子縁 B：骨 OC：破骨細胞 N：核

4) 器官培養

1時間培養の対照群においては、破骨細胞は咽頭骨上に位置し、細胞質中に複数の核が認められる巨細胞として観察され、骨表面に刷子縁により吸収窩を形成していた。実験群では、添加したsCTの濃度に関わらず、対照群と同様に、破骨細胞は刷子縁により骨表面に吸収窩を形成する多核の巨細胞として観察され、骨表面から離れて存在する破骨細胞は認められなかった。また、3時間培養の対照群、実験群でも1時間培養のものと同様の所見を示していた。また、sCTの作用時間においては1時間と3時間では破骨細胞の形態に著しい差は認められなかった。

考 察

硬骨魚類の骨代謝におけるsCTの作用に関しては、これまでに幾つかの実験結果が報告されている。nibbler fishの鱗を採取後、器官培養し、sCTを添加させ、TRAP活性反応を吸収光度により検索した実験⁷⁾ではsCT添加後にTRAP活性反応が減少したことから、sCTは破骨細胞の骨吸収活性の抑制作用があると報告している。しかし、この報告はTRAP活性反応のみを検索したものであり、破骨細胞の骨吸収活性は観察していない。金魚の腹腔内にsCTを投与し、血清カルシウム濃度と骨のカルシウム沈着を調べた実験⁸⁾ではsCT投与後に血清カルシウム濃度には変化は認められず、骨にカルシウム沈着が生じていたと報告している。この報告の結果はsCTは血清カルシウム濃度の調節には関与していないことを示している。この結果と反対の結果を報告している実験もある。金魚の腹腔内にsCTを投与し、咽頭骨の骨吸収面積を測定した実験⁹⁾では骨吸収面積は減少したと報告している。以上のことから、nibbler fishや金魚におけるsCT投与による骨代謝への影響、特に破骨細胞への影響を観察した実験結果は様々である。この理由の一つとして、上述した実験系は鱗の器官培養や金魚の生体内での観察であり、生体内の様々な細胞や因子が破骨細胞の骨吸収活性に大きな影響を与えている可能性が考えられる。

生体内に存在する細胞を分離し、培養皿で培養する方法はある特定の細胞の特徴等を観察するためには非常に有効な方法であり、生体内の様々な細胞や因子等に影響されることなく、外部から与えられた刺激に対する細胞の挙動および形態の変化を観察できることが利点である。本研究は初めて硬骨魚類の骨組織から破骨細胞を分離培養した報告である。この破骨細胞の分離培養法はメダカの飼育しやすさ、入手しやすさとあわせて、細胞培養時に二酸化炭素を必要とすることなく、大気中で、かつ室温で細胞を培養できる非常に簡便な方法である。この分離培養の実験系を用いて、本研究ではCTがメダカ破骨細胞に及ぼす影響について形態学的に検索した。

本研究で用いたsCTの濃度と作用時間の設定は以下のよ

うに行った。まず、sCTの濃度設定であるが、ヒト血清CT濃度の基準値は $1.5 \sim 8.6 \times 10^{-11}$ g/mlと報告されており、メダカと同じ硬骨魚類である金魚の血清CT濃度は 9×10^{-10} g/mlと報告されている⁷⁾。Shinozaki and Mugiya⁹⁾は金魚の腹腔内に 10^{-6} g/mlのsCTの投与を行っており、nibbler fishの鱗に 10^{-6} g/ml, 10^{-7} g/ml, 10^{-8} g/ml, 10^{-9} g/ml, 10^{-10} g/mlの5段階の濃度のsCTを培地に添加した報告⁷⁾もある。以上の報告から、本研究におけるsCTの濃度はヒトや金魚の血清CT濃度に近いものから非常に高濃度のものを含むような以下の5段階： 10^{-6} g/ml, 10^{-7} g/ml, 10^{-8} g/ml, 10^{-9} g/ml, 10^{-10} g/mlのsCT濃度を設定した。次に、sCTの作用時間であるが、哺乳類のラットの骨組織より分離培養した破骨細胞にsCTを添加させた場合、2～3分以内に破骨細胞の細胞外形は著しく変化し、細胞体は星状に収縮し、この効果は24時間程度持続することが報告されている²⁾。このことから本研究ではsCTの作用時間は培養破骨細胞の細胞外形の変化を容易に観察できる1時間と3時間の2つに設定した。

本研究では上述した分離培養の実験系を用いて、メダカの破骨細胞にsCTを添加した結果、その濃度および作用時間に関わらず、メダカの破骨細胞の細胞外形は変化せず、対照群と同様の形態を示した。この結果はsCTがメダカの破骨細胞の細胞外形の変化に影響を及ぼしていないことを示している。また、器官培養において、sCTを添加したメダカの破骨細胞は、その濃度と作用時間に関わらず、対照群と同様に、骨表面上に刷子縁を有し吸収窩を形成していた。この結果はsCTがメダカの破骨細胞の骨吸収活性を抑制していないことを示している。これら本研究における破骨細胞の分離培養と器官培養の結果は、sCTはメダカ破骨細胞に対して骨吸収抑制の作用を示さないことを示唆している。この理由について、以下に考察する。

sCTがメダカ破骨細胞に対して骨吸収抑制の作用を示さない理由として、メダカの破骨細胞にCT受容体が存在しない可能性が考えられる。硬骨魚類のニジマスの骨粉砕物にCTが結合するという報告²⁵⁾があるが、この報告は破骨細胞とCT受容体との関係について観察したものではない。硬骨魚類の破骨細胞におけるCT受容体の局在を検索した報告はなく、その存在は不明なままである。硬骨魚類のCT受容体の局在を検索した研究に、硬骨魚類のCT受容体が鰓に存在するという報告^{21, 22)}や、メダカにおけるCT受容体の局在に関する報告ではないが、ゼブラフィッシュではCT受容体は脳、脾臓、鰓、腸管、腎臓そして皮膚に局在するという報告²²⁾がある。また、CTは鰓を介する水中からのカルシウム取り込みの調節に関与していることが報告されている^{23, 24)}。これらのことから、メダカにおいてもCT受容体が鰓に存在し、CTは鰓において水中からのカルシウム取り込みの調節に関与している可能性が考えられる。

脊椎動物の系統発生を考えると、硬骨魚類は脊椎動物の進化の過程で初めて内骨格としての骨と破骨細胞が出現する動物種であることから、この種に出現する破骨細胞は系統発生的に原始的な特徴を有している可能性が考えられる。本研究の結果を踏まえると、哺乳類の破骨細胞が有するCTによる骨吸収抑制作用を持たないことが硬骨魚類の破骨細胞の特徴の一つである可能性が考えられるが、その検証のためには、今後さらなる研究が必要であると思われる。

結 論

メダカの咽頭骨より破骨細胞を分離培養し、sCTを作用させ、破骨細胞の形態変化を観察した。その結果、破骨細胞は実験群と対照群の間に、sCTの濃度と作用時間に関わらず、形態学的な差異は認められなかった。咽頭骨の器官培養では、破骨細胞はsCTの濃度と作用時間に関わらず骨表面上に吸収窩を形成し、実験群と対照群の間に形態学的な差異は認められなかった。以上の結果は、sCTはメダカ破骨細胞に対して骨吸収抑制の作用を示さないことを示唆している。その理由としては、硬骨魚類のメダカにおいてはsCT受容体は破骨細胞に存在せず、鰓をはじめとするその他の器官に存在するため、哺乳類において認められるようなCTの作用である破骨細胞による骨吸収抑制作用を示さない可能性が挙げられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座口腔解剖学教室ならびに口腔健康科学講座高齢者歯科学教室の諸先生に心よりお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Scott BL, Pease DC : Electron microscopy of the epiphyseal apparatus. *Anat Rec* 126 : 465-495, 1956.
- 2) Chambers TJ, Magnus CJ : Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol* 136 : 27-39, 1982.
- 3) Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ : Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. *Biochemical and autoradiographic characterization*. *J Clin Invest* 78 : 355-360, 1986.
- 4) Martin TJ : Calcitonin, an update. *Bone* 24 : 63S-65S 1999.
- 5) Teitelbaum SL : Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289 : 1504-1508, 2000.
- 6) Hull KL, Fathimani K, Sharma P, Harvey S : Calcitropic peptides: neural perspectives. *Comp*

- Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 119 : 389-410, 1998.
- 7) Suzuki N, Suzuki T, Kurokawa T : Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler fish (seawater teleost). *Peptides* 21 : 115-124, 2000.
 - 8) Shinozaki F, Mugiya Y : Effects of salmon calcitonin on calcium deposition on and release from calcified tissues in fed and starved goldfish *Carassius auratus*. *Fish Sci* 66 : 695-700, 2000.
 - 9) Shinozaki F, Mugiya Y : Histomorphometric effects of calcitonin on pharyngeal bone in fed and starved goldfish *Carassius auratus*. *Fish Sci* 68 : 269-276, 2002.
 - 10) Arnett TR, Dempster DW : A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro: effects of calcitonin and prostaglandins. *Endocrinology* 120 : 602-608, 1987.
 - 11) Gay CV : Avian osteoclasts. *Calcif Tissue Int* 49 : 153-154, 1991.
 - 12) Nemoto Y, Higuchi K, Baba O, Kudo A, Takano Y : Multinucleate osteoclasts in medaka as evidence of active bone remodeling. *Bone* 40 : 399-408, 2007.
 - 13) Minkin C : Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34 : 285-290, 1982.
 - 14) Domon T, Sugaya K, Yawaka Y, Osanai M, Hanaizumi Y, Takahashi S, Wakita M : Electron microscopic and histochemical studies of the mononuclear odontoclast of the human. *Anat Rec* 240 : 42-51, 1994.
 - 15) Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Krukowski M, Misko TP, Settle SL, Currie MG, Nickols GA : Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 3569-3573, 1994.
 - 16) Fuenzalida M, Illanes J, Lemus R, Guerrero A, Oyarzún A, Acuña O, Lemus D : Microscopic and histochemical study of odontoclasts in physiologic resorption of teeth of the polyphyodont lizard, *Liolaemus gravenhorsti*. *J Morphol* 242 : 295-309, 1999.
 - 17) 福井亜美, 土門卓文, 小口春久, 脇田稔 : 破骨細胞に関する微細形態学的研究 : *Xenopus laevis*破骨細胞の形態学的特徴とその核数の分布について. *北海道歯誌*, 24 : 178-189, 2003.
 - 18) 須田立雄 : 血清カルシウムの恒常性とその調節機構. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明, 田中栄, 中村浩彰, 森諭史編著, *新 骨の科学*, 193-209, 医歯薬出版, 東京, 2009
 - 19) Komura J, Mitani H, Shima A : Fish cell culture: Establishment of two fibroblast-like cell lines (OL-17 and OL-32) from fins of the medaka, *Oryzias latipes*. *In vitro cellular & developmental biology* 24 : 294-298, 1988.
 - 20) Domon T, Wakita M : Electron microscopic and histochemical studies of the mononuclear osteoclast of the mouse. *Am J Anat* 192 : 35-44, 1991.
 - 21) Peron MF, Moukhtar MS, Gal YL, Milhaud G : Demonstration of specific receptors for calcitonin in isolated trout gill cells. *Comp Biochem Physiol* 68 : 417-421, 1981.
 - 22) Lafont AG, Wang YF, Chen GD, Liao BK, Tseng YC, Huang CJ, Hwang PP : Involvement of calcitonin and its receptor in the control of calcium-regulating genes and calcium homeostasis in zebrafish (*Danio rerio*). *J Bone Miner Res* 26 : 1072-1083, 2011.
 - 23) Milhaud G, Rankin JC, Bolis L, Benson AA : Calcitonin: Its hormonal action on the gill. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 : 4693-4696, 1977.
 - 24) Milhaud G, Bolis L, Benson AA : Calcitonin, a major gill hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 : 6935-6936, 1980.
 - 25) Bonnemaïn YA, Peron MF, Moukhtar MS, Milhaud G : Characterization of target organs for calcitonin in lower and higher vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 76 : 377-380, 1983.

ORIGINAL

Effect of salmon calcitonin on osteoclasts in Japanese medaka

Rie Yamada¹⁾, Takanori Domon²⁾, Nobuo Inoue¹⁾ and Kenji Notani¹⁾

ABSTRACT : Osteoclasts are multinucleated giant cells which resorb bone by light microscopic brush borders. Calcitonin (CT) affects osteoclasts directly and induce morphological changes of cellular contours and the disappearance of brush borders. Teleost fish contain CT, but its function is not clearly understood. This study, established an isolation culture system of osteoclasts from the pharyngeal bones of Japanese medaka. With this culture system and organ culture of the pharyngeal bones, the present study aimed to clarify the effects of salmon calcitonin (sCT) on the osteoclasts of the Japanese medaka, morphologically. Osteoclasts isolated from the pharyngeal bone were incubated in Leibovitz's L-15 medium for 24 hours and then cultured with sCT (10^{-6} ~ 10^{-10} g/ml, experimental groups) or without sCT (control groups) for 1 or 3 hours. After the incubation, the specimens were fixed and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activities were determined, and the specimens were observed under a light microscope. In the organ culture, pharyngeal bones were incubated in the same medium as mentioned above for 1 hour, and then cultured with sCT (experimental groups) or without sCT (control groups) for 1 or 3 hours. After the incubation, the specimens were fixed and embedded in Epon and cut into $0.5\mu\text{m}$ -thick semithin sections, and the sections were observed under a light microscope. The cellular contours of TRAP-positive isolated osteoclasts were round or oval in both the experimental and control groups irrespective of the duration and concentration of sCT. There were no morphological differences between the experimental and control groups. In the organ culture, osteoclasts in both groups made resorptive lacunae on the bone surface by brush borders, and there were no morphological differences between the two groups. These findings suggest that sCT has no effect the suppression of the bone resorptive activity of medaka osteoclasts, and it may be suggested that the function of CT in teleost fish is, different from that of osteoclasts in mammals, in that it is not involved in the suppression of the bone resorptive activity of osteoclasts.

Key Words : Medaka, osteoclast, salmon calcitonin, bone resorption

¹⁾Department of Gerodontology, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine (Chief : Associate Prof. Kenji Notani) North 13 West 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

²⁾Department of Oral Functional Anatomy, Division of Oral Functional Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine (Chief : Prof. Takanori Domon), North 13 West 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, JAPAN