

# 原著 リアルタイム細胞分析システムによる破骨細胞 定量法を用いたエピガロカテキンガレートの 細胞分化抑制効果

昭和大学医学部薬理学講座 (医科薬理学部門)

江守 永 龍 家 圭 小口 勝司

昭和大学薬学部社会健康薬学講座 (医薬品評価薬学部門)

岩井 信市

昭和大学歯学部歯科薬理学講座

天野 均

抄録：骨密度の低下は、破骨細胞が骨を溶かす骨吸収と骨芽細胞が新しい骨をつくる骨形成のバランスが崩れ、骨吸収が多くなることによって生じる。骨粗鬆症は、骨密度の低下が原因である代表的疾患である。従って、破骨細胞は、骨粗鬆症の治療のための重要な標的細胞の1つである。最近リアルタイム細胞分析システム (RTCA) が、生体外における細胞形態と細胞接着の定量のために開発された。RTCA は、プレート上電極の電子インピーダンス (Cell Index; CI) を測定することで定量する。われわれ以外で破骨細胞分化に対する RTCA を使用した報告は今までになかった。そこで、RTCA が、骨粗鬆症の治療薬等のスクリーニングに使えるのではと考えた。また、われわれは、破骨細胞分化に対するエピガロカテキンガレート (EGCG) の抑制効果を報告してきた。今回われわれは、この新しい定量法を用いて破骨細胞分化に対する EGCG の抑制効果の定量を試みた。雄性 ddy マウス (5~8 週齢) の大腿骨および脛骨より、骨髓細胞を採取した。骨髓細胞を 100,000/well で播種させた。EGCG を 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M の濃度で培地に添加させ、CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、骨髓細胞を破骨細胞へと誘導した。計 188 時間の破骨細胞培養を行い、24 時間後および 72 時間後に培地の交換および EGCG の添加を行った。酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色陽性にて核が 3 個以上の多核破骨細胞数を測定した。EGCG 添加により濃度依存的に CI 値および TRAP 染色による多核破骨細胞数は、抑制された。さらに、CI 値および多核破骨細胞数は、強い相関を示していた。また、1  $\mu$ M の低濃度 EGCG でも抑制が認められた。緑茶 1 杯 (カテキン含有 400 mg) の飲用により、血漿中の最高濃度が 2  $\mu$ M 程度になるという報告も考えると、骨粗鬆症予防効果が有ることが強く示唆される。RTCA は、連続して測定が可能であり染色等の必要も無いため比較的簡便に、破骨細胞に対する薬物のスクリーニングが可能となる。この RTCA システムは、骨粗鬆症治療薬の適正濃度および作用点を知ることができる可能性が示唆された。

キーワード：破骨細胞, 定量法, リアルタイム細胞分析システム (RTCA), エピガロカテキンガレート (EGCG), 骨髓細胞

破骨細胞は、樹状細胞と前駆細胞を共有する単球・マクロファージ系の細胞が分化したものであり、細胞同士が融合した巨大な多核細胞である<sup>1)</sup>。骨密度は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が均衡を保つことで維持されている。骨粗鬆症をはじめとする多くの骨疾患は、骨吸収と骨形成の均

衡が破れて破骨細胞による骨吸収が過度になっている状態である<sup>2)</sup>。骨粗鬆症によって股関節骨折や脊椎骨折をはじめとする多くの骨折が引き起こされ、老年における大きな問題の一つである<sup>3)</sup>。骨粗鬆症およびその関連疾患を予防することは、高齢者における生命の質、健康の維持、自立等において重要な

要素である<sup>4)</sup>。これらのことから、破骨細胞は、骨粗鬆症の治療に対する一番重要な標的細胞である。破骨細胞は、分化・融合して多核の巨大破骨細胞となり、さらにアクチンリングを形成し成熟破骨細胞となり骨吸収の活性を持つとされる<sup>5)</sup>。従って、破骨細胞形態を観察することは、破骨細胞を標的とする薬物の効果を判定するためには、非常に重要である。従来は、破骨細胞を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色やローダミンファロイジン染色等を行い、光学顕微鏡を用いて細胞形態を把握することが行われてきた<sup>7)</sup>。これらの分析方法は、連続性の中の一瞬を捉える方法であり、連続して破骨細胞形態を捉えることは、非常に困難である<sup>8)</sup>。

近年、細胞イベントの動的なモニタリングを実現するために、専用の細胞培養・解析プレートを利用し、インピーダンス (電気抵抗) の変化を測定する Real-Time Cell Analyzer (RTCA: スクラム社, 東京) xCELLigence システムが開発された<sup>8-10)</sup>。プレート各ウェルの底面には、微小金電極のアレイが配置されており、電極上に細胞が存在すると、電極・培地境界面の局所的なイオン環境に変化が生じ、インピーダンスを上昇させる。より多くの細胞が電極に接着すると、インピーダンスはさらに増加する。RTCA では、このインピーダンスを Cell Index (CI) と呼ばれるパラメータに変換し、細胞集団の生存活性・数・形態あるいは接着強度をモニターする指標としている<sup>8-10)</sup>。従って、測定は、各種標識物 (蛍光色素等) を必要とせず、細胞数の増減・生存活性・形態変化・遊走などの挙動を定量的に描出することが出来る。われわれは、RTCA を用いて口腔内癌の遊走能および浸潤能の報告を行ってきた<sup>11)</sup>。RTCA を用いた破骨細胞に関する報告は、今まで無かった。そこで、われわれは、破骨細胞分化過程において新しい定量法である RTCA を用いることで捉えることか出来るかどうかの検討を行ってきた。

茶における効能の主要な役割を担っているのは、ポリフェノールであり、中でもカテキンは生理作用が多く報告されている。緑茶には、乾燥重量で 10 ~ 20% のカテキン類が含まれているが、その約半分をエピガロカテキンガレート (EGCG) が占めている。生理作用が強いとされる EGCG は、茶以外の植物には、見い出されていない<sup>12)</sup>。海外でも、お茶の摂取と骨密度の関係について閉経後の高齢の女性を

対象として調べた症例対照研究では、お茶が骨密度を上昇させる報告が散見され<sup>13, 14)</sup>。また、日本人女性を対象とした症例対照研究でも、緑茶飲用が骨密度を高めるという報告がある<sup>15)</sup>。われわれは、ラットの破骨前駆細胞を用いた、EGCG による破骨細胞への融合阻害効果<sup>6)</sup>およびマウスの骨髄細胞を用いた破骨細胞への分化誘導に対する EGCG の阻害効果の報告を行ってきた<sup>16)</sup>。

本研究においてわれわれは、破骨細胞分化過程における EGCG の阻害効果に対して、RTCA を用いた新しい定量法を確立する目的で行った。

## 研究方法

### 1. 動物および材料

本研究は 5 ~ 8 週齢の雄性 ddY マウスを使用した。マウスは、三共ラボサービス (東京) より購入し、実験は「昭和大学動物実験実施指針」に基づき倫理的に行った (承認番号; 13041)。EGCG は、和光純薬工業 (大阪) から購入した。マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF/CSF-1) および NF- $\kappa$ B 活性化受容体リガンド (RANKL) は、Peprotech 社 (NJ, 米国) より購入した。

### 2. 破骨細胞形成

マウスの大腿骨と脛骨から Sepadex G10 カラム (GE ヘルスケア・ジャパン; 東京) により骨髄細胞を採取した。骨髄細胞は、M-CSF 単独の刺激では、チロシンキナーゼがリン酸化されマクロファージ・単球系に分化する<sup>17)</sup>。また、RANKL 単独の刺激では、TNF 受容体関連因子 6 (TRAF6) を介して樹状細胞に分化する<sup>18)</sup>。この 2 つのサイトカインを添加した場合は、破骨細胞の特徴である TRAP 陽性細胞にほぼ 100% 分化する系を用いた<sup>17-19)</sup>。 $\alpha$ -MEM (minimum essential Eagle; Sigma-Aldrich, MO, 米国) 培地に 15% のウシ胎児血清、25 ng/ml の M-CSF と 100 ng/ml の RANKL を含有させ骨髄細胞を  $1.0 \times 10^6$  個/穴にて RTCA のための E-プレートおよび 96 穴プレートに播種した。培養は、37°C、湿度 95%、5% CO<sub>2</sub> 飽和の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 8 日間行い、培地は 1 日後と 3 日後に交換を行った。EGCG は、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M で培養開始時より添加させ、培地交換時も同様に添加した。陰性対照として、M-CSF および RANKL を含まない培地を調整し細胞を培養した<sup>17)</sup>。

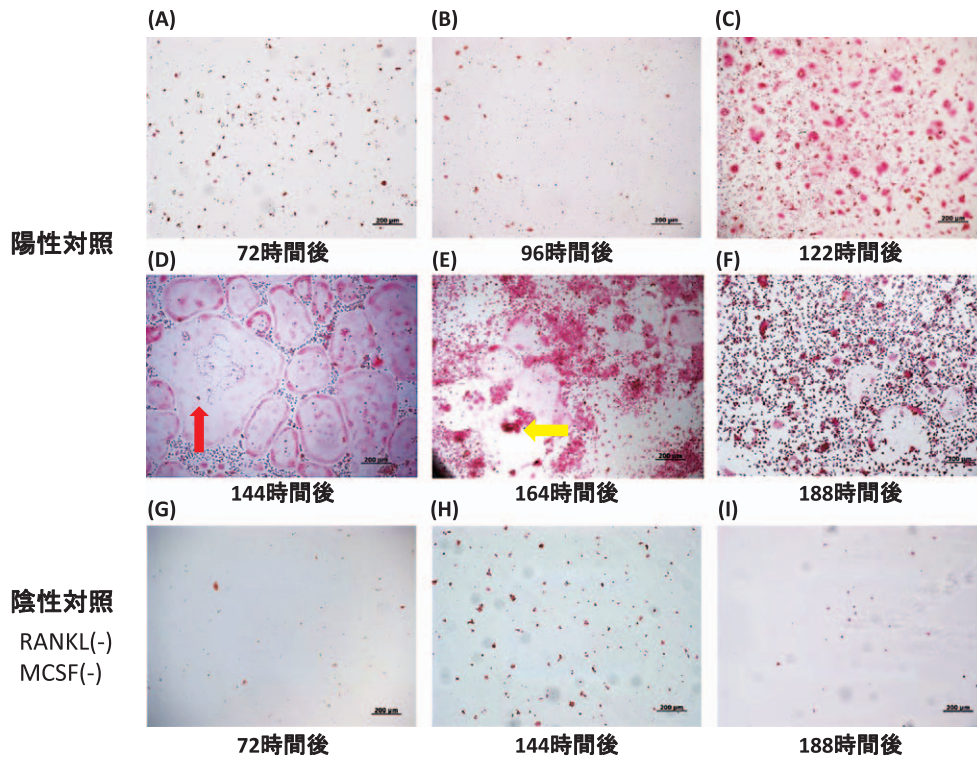


図 1 破骨細胞の TRAP 染色

マウス骨髄細胞の培養後の光学顕微鏡による写真を示す。陽性対照は、A：72 時間後、B：96 時間後、C：122 時間後、D：144 時間後、E：164 時間後、F：188 時間後。陰性対照 (RANKL (-), MCSF (-)) は、G：72 時間後、H：144 時間後、I：188 時間後。赤矢印は、巨大多核破骨細胞、黄矢印は、巨大多核破骨細胞のアポトーシスを示す。図のスケールは 200  $\mu\text{m}$  を示す。

### 3. RTCA および TRAP 染色

xCELLigence RTCA DP システムは、CO<sub>2</sub> インキュベーターに RTCA DP アナライザーを設置し 16 穴の E-プレートに乗せて RTCA 制御ユニットで、10 分ごとに 192 時間後までの CI 値の定量をおこなった。

E-plate と同じ底面積である 96 穴プレートで同様に骨髄細胞を培養し、72, 96, 122, 144, 164, 188 時間後において TRAP 染色を行った。TRAP 染色陽性かつ 3 核以上の細胞を多核破骨細胞として細胞数の計測を行った<sup>6)</sup>。

### 4. 統計解析

データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。統計学的有意差は  $p$  値  $< 0.05$  を持って統計学的有意差ありと判定した。多群間における統計学的有意差解析は、一元配置分散分析を用いて Bonferroni の補正を行った。また、直線回帰分析を行い相関性の検討を行った。

## 結 果

### 1. 骨髄細胞培養による破骨細胞分化

本研究の条件下にマウス骨髄細胞の培養を行うと陽性対照において、72 時間後は、骨髄細胞の増殖を認めるものの破骨細胞をほとんど確認できないが、96 時間後に小さな破骨細胞を認め、144 時間後には、多核巨大破骨細胞 (図 1D：赤色矢印) を認めた。破骨細胞は、多核巨大破骨細胞に最終分化するとその後アポトーシスを生じる<sup>20)</sup>。本研究に於いても 164 時間後に、破骨細胞のアポトーシス (図 1E：黄色矢印は、巨大な細胞の跡 (白色部分) の中に TRAP 強陽性の非常に小さくなった細胞を示す) を認めた。188 時間後には、明らかな多核破骨細胞の減少を認めた (図 1A~F)。M-CSF と RANKL が添加されていない陰性対照では、全期間に於いて骨髄細胞の増殖や破骨細胞と言えるものは確認できな

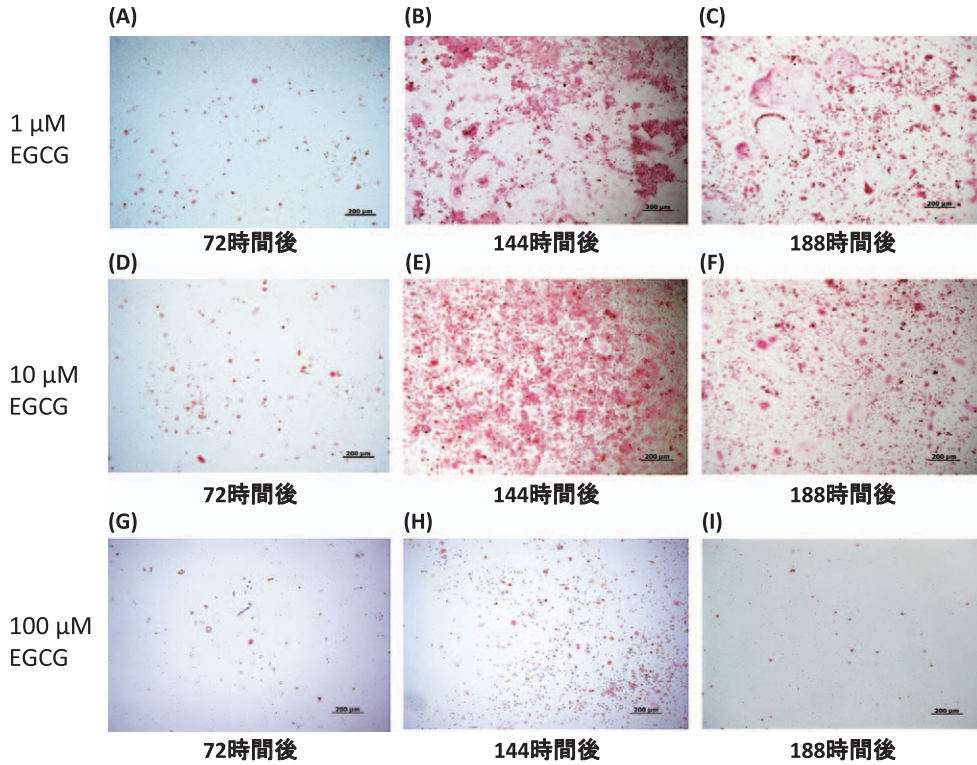


図 2 EGCG 添加による破骨細胞の TRAP 染色

EGCG 添加によるマウス骨髄細胞の培養後の光学顕微鏡による写真を示す。1 μM EGCG 添加は、A : 72 時間後、B : 144 時間後、C : 188 時間後。10 μM EGCG 添加は、D : 72 時間後、E : 144 時間後、F : 188 時間後。100 μM EGCG 添加は、G : 72 時間後、H : 144 時間後、I : 188 時間後。図のスケールは 200 μm を示す。

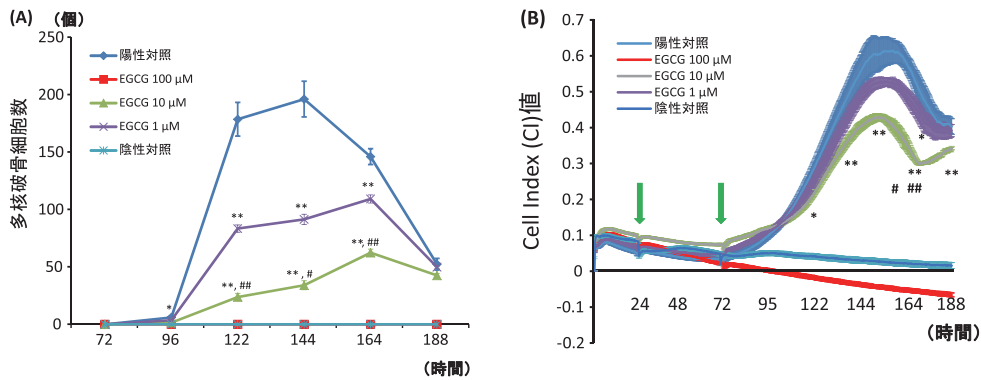


図 3

- A) グラフは、TRAP 染色陽性による多核破骨細胞数の EGCG 添加による変化を示す。グラフの値は、平均値 ± 標準誤差で示した。n = 4。\* : P < 0.01 vs 陽性対照、# : P < 0.05, ## : P < 0.01 vs EGCG 1 μM。
- B) グラフは、RTCA による多核破骨細胞数の EGCG 添加による変化を示す。グラフの値は、平均値 ± 標準誤差で示した。緑矢印は、培地交換を示す。n = 8。\* : P < 0.05, \*\* : P < 0.01 vs 陽性対照、# : P < 0.05, ## : P < 0.01 vs EGCG 1 μM。
- C) グラフは、CI 値と多核破骨細胞数の散布図および回帰直線を示す。R<sup>2</sup> = 0.764, P = 6.99 × 10<sup>-9</sup>。

かった (図 1G~I).

## 2. EGCG による破骨細胞分化への影響

EGCG 添加群では、多核破骨細胞形成が濃度依存的に抑制されていることが観察できた (図 2A~I). 100  $\mu$ M の EGCG 添加群では、多核破骨細胞は、観察できなかった. しかしながら、陰性対照に比べて 100  $\mu$ M の EGCG 添加群では、6 日目で骨髄細胞もしくは破骨前駆細胞が明らかに増殖していた. 従って、少なくとも 100  $\mu$ M の EGCG において、骨髄細胞に対する毒性は、ほとんどないと考えられる. 図 3A は、培養開始 72, 96, 122, 144, 164, 188 時間後の TRAP 染色による多核破骨細胞数を示している. 多核破骨細胞数は、培養開始 96 時間後で対照群  $6.00 \pm 1.46$  個, 1  $\mu$ M 群  $3.50 \pm 1.15$  個, 10  $\mu$ M 群  $1.50 \pm 0.56$  個, 100  $\mu$ M 群は、0 個であった. 144 時間後では、対照群が  $195.75 \pm 15.51$  個で最大となり、1  $\mu$ M 群は、 $91.25 \pm 4.39$  個, 10  $\mu$ M 群は、 $34.00 \pm 3.91$  個, 100  $\mu$ M 群は、0 個で対照群と比べて有意に EGCG が抑制した. 164 時間後では、対照群が  $145.75 \pm 6.90$  個と減少し、1  $\mu$ M 群は、 $109.00 \pm 3.52$  個, 10  $\mu$ M 群は、 $62.25 \pm 3.11$  個, 100  $\mu$ M 群は、0 個で対照群と比べて有意に EGCG が抑制した. 188 時間後では、アポトーシスにより細胞が減少し対照群, 1  $\mu$ M 群, 10  $\mu$ M 群の間では、細胞の多核破骨細胞数の有意差は、認めなくなった.

## 3. RTCA による破骨細胞の定量

図 3B は、TRAP 染色と同時に同条件で培養を行い CI 値を縦軸に、時間経過を横軸に示した図である. 陽性対照の CI 値は、培地交換後の 72 時間後より徐々に増加し 153 時間後に最大値 ( $0.61 \pm 0.05$ ) になり、その後徐々に減少した. 1  $\mu$ M 群と 10  $\mu$ M 群も 153 時間後に最大値 ( $0.52 \pm 0.02, 0.42 \pm 0.01$ ) になった. 陰性対照群と 100  $\mu$ M 群は、有意な CI 値を検出出来なかった. 10  $\mu$ M 群は、112 時間後より対照群と有意差 ( $p = 0.047$ ) が認められ、1  $\mu$ M 群も対照群と比べ減少傾向を示しており 165 時間後に対照群と有意差 ( $p = 0.038$ ) を認めた. 1  $\mu$ M 群と 10  $\mu$ M 群は、160 時間後に有意差 ( $p = 0.034$ ) を認めた. 図 3C は、CI 値と多核破骨細胞数を直線回帰分析したものである. その結果、 $R^2 = 0.764$ ,  $P = 6.99 \times 10^{-9}$  と非常に強い相関関係を示した.

## 考 察

われわれは、RTCA を用いた新しい破骨細胞定量法を、確立することが出来た. さらに、EGCG による破骨細胞形成阻害をリアルタイムにモニターすることが可能になった.

本研究により、下記のような RTCA の利点を列挙することができる.

- ・破骨細胞形成およびその阻害をリアルタイムにモニタリングすることができる.
  - ・再現性が高い.
  - ・染色等の必要がないので比較的、短時間かつ容易にできる.
  - ・従来の TRAP 染色の多核破骨細胞数と高い相関性が有るため、信頼度も高い.
  - ・多核破骨細胞数を計測する場合と異なり、主観的要因やそれに起因するバイアスがかかりにくい.
- しかしながら、下記のような RTCA の欠点も列挙される.
- ・1 穴あたりに  $1.0 \times 10^5$  個の大量の骨髄細胞が必要である.

・破骨細胞は、他の細胞に比べて CI 値が低いので、他細胞の混入により精度が下がる.

・RTCA に使用される E-プレートは光学顕微鏡で観察することが出来ない.

・E-プレートは、やや高価である.

これらのことを総合的に判断すると、RTCA は、破骨細胞形成における新たな定量法になると考えられ、特に破骨細胞に対する薬物のスクリーニングに適していると考えられる.

RTCA は、細胞の浸潤能および遊走能を定量することも出来る<sup>11, 17, 21, 22</sup>). しかしながら、破骨細胞の CI 値は、他の細胞と比べても低く、浸潤能および遊走能の定量には、さらに多くの細胞も必要になることから、破骨細胞における浸潤能および遊走能の定量には向かないと考えられる.

カテキン含有 400 mg の緑茶を 1 杯ほど飲むと EGCG の最高血漿濃度が 2  $\mu$ M 程度になるという報告がある<sup>23</sup>). 本研究において、1  $\mu$ M の EGCG 濃度においても破骨細胞形成抑制効果が認められたことから、生体内においても抑制効果が期待できる. 前述したとおり、実際に茶の服用により骨密度等の低下抑制作用の報告がなされている<sup>13-15</sup>). 最近、メ

チル化カテキンを多く含んだべにふうき緑茶に対する報告がある<sup>24, 25)</sup>。べにふうき緑茶は、一般的な緑茶よりもカテキンの血中濃度が高くなるために、今まで以上の効果が期待できると考える。

RTCA は、連続して測定が可能であり染色等の必要も無いため比較的簡便に、破骨細胞に対する薬物のスクリーニングが可能となる。実際に、破骨細胞に対する EGCG の効果も定量出来た。従って、このシステムを用いた新しい破骨細胞定量法は、骨粗鬆症治療薬の適正濃度および作用点を従来の方法より短時間で知ることができる可能性が示唆された。

#### 利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反は、ありません。

#### 文 献

- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999;20:345-357.
- Woo JT, Yonezawa T, Cha BY, *et al.* Pharmacological topics of bone metabolism: antiresorptive microbial compounds that inhibit osteoclast differentiation, function, and survival. *J Pharmacol Sci.* 2008;106:547-554.
- Suzuki A, Sekiguchi S, Asano S, *et al.* Pharmacological topics of bone metabolism: recent advances in pharmacological management of osteoporosis. *J Pharmacol Sci.* 2008;106:530-535.
- Miller PD. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis: t-scores vs fractures. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006;7:75-89.
- Suda T, Nakamura I, Jimi E, *et al.* Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res.* 1997;12:869-879.
- Oka Y, Iwai S, Amano H, *et al.* Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation. *J Pharmacol Sci.* 2012;118:55-64.
- Irie Y, Iwai S, Amano H, *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits differentiation and matrix metalloproteinases expression in osteoclasts. *Showa Univ J Med Sci.* 2014;26:63-74.
- Atienza JM, Zhu J, Wang X, *et al.* Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *J Biomol Screen.* 2005;10:795-805.
- Limame R, Wouters A, Pauwels B, *et al.* Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One.* 2012;7:e46536.
- Jonsson MK, Wang QD, Becker B. Impedance-based detection of beating rhythm and proarrhythmic effects of compounds on stem cell-derived cardiomyocytes. *Assay Drug Dev Technol.* 2011;9:589-599.
- Ono T, Iwai S, Egawa S, *et al.* Investigation of cell migration and invasion using real-time cell analysis, as well as the association with matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinomas. *Showa Univ J Med Sci.* 2013;25:203-212.
- 立花宏文. 茶カテキン. 食品機能性の科学編集委員会編. 食品機能性の科学. 東京: 産業技術サービスセンター; 2008. pp323-327.
- Devine A, Hodgson JM, Dick IM, *et al.* Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:1243-1247.
- Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, *et al.* Green tea and bone metabolism. *Nutr Res.* 2009;29:437-456.
- Muraki S, Yamamoto S, Ishibashi H, *et al.* Diet and lifestyle associated with increased Bone mineral density: cross-sectional study of Japanese elderly women at an osteoporosis outpatient clinic. *J Orthop Sci.* 2007;12:317-320.
- 岩井信市. 茶ポリフェノールの多機能生理作用. 昭和大薬誌. 2013;4:103-118.
- Niida S, Kaku M, Amano H, *et al.* Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med.* 1999;190:293-298.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93:165-176.
- 高橋直之. 骨と免疫系のクロストーク 破骨細胞の分化メカニズム. 医のあゆみ. 2012;242:649-654.
- Karakawa A, Fukawa Y, Okazaki M, *et al.* Diclofenac sodium inhibits NFkappaB transcription in osteoclasts. *J Dent Res.* 2009;88:1042-1047.
- Eisenberg MC, Kim Y, Li R, *et al.* Mechanistic modeling of the effects of myoferlin on tumor cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:20078-20083.
- Daker M, Ahmad M, Khoo AS. Quercetin-induced inhibition and synergistic activity with cisplatin — a chemotherapeutic strategy for nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Cell Int.* 2012;12:34.

- 23) Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Antioxidant activity of black tea vs. green tea. *J Nutr.* 2002;132:785.
- 24) Maeda-Yamamoto M, Ema K, Monobe M, *et al.* Epicatechin-3-O-(3"-O-methyl)-gallate content in various tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) and its in vitro inhibitory effect on histamine release. *J Agric Food Chem.* 2012;60:2165-2170.
- 25) Maeda-Yamamoto M, Ema K, Shibuichi I. In vitro and in vivo anti-allergic effects of 'Benifuuki' green tea containing O-methylated catechin and ginger extract enhancement. *Cytotechnology.* 2007;55:135-142.

THE INHIBITING EFFECT OF CELL DIFFERENTIATION BY EPIGALLOCATECHIN  
GALLATE USING THE OSTEOCLASTS ASSAY WITH THE REAL-TIME  
CELLULAR ANALYSIS SYSTEM

Haruka EMORI, Kakei RYU and Katsuji OGUCHI

Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

Shinichi IWAI

Department of Healthcare and Regulatory Sciences, Showa University School of Pharmacy

Hitoshi AMANO

Department of Pharmacology, Showa University School of Dentistry

**Abstract** — The decrease in bone density occurs by the increase in bone resorption, due to the breakdown in the balance of resorption of bone by osteoclasts dissolving and bone formation by osteoblasts. Osteoporosis is a representative disease caused by the decrease in the bone density. Therefore, osteoclasts are one of the important target cells for the treatment of osteoporosis. Recently, a real-time cellular analysis system (RTCA) was developed to analyze the quantity of cytomorphology and the cell adhesion *in vitro* by measuring the electronic impedance (Cell Index; CI) of the electrode in a plate. To date, there was no report on the use of RTCA for osteoclast differentiation until our report. Therefore, we thought that RTCA is useful for the screening of therapeutic drugs for osteoporosis. We reported inhibition of osteoclast differentiation by epigallocatechin gallate (EGCG). In this study, we attempted to quantify the inhibitory effect of EGCG for osteoclast differentiation using a new method. We have taken bone marrow cells from femur and tibia bone of male mice (5-8 weeks of age). We cultured bone marrow cells of  $1.0 \times 10^5$  cells/well. We added EGCG to culture media of bone marrow cells in 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M with CO<sub>2</sub> incubator and induced osteoclasts. We cultured osteoclasts for 188 hours in total, and exchanged the culture media and added EGCG after 24 and 72 hours. We counted the cells for osteoclasts which appeared as tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) -positive and had three or more nuclei. The multinuclear osteoclast number by TRAP staining and the CI level were inhibited concentration dependent by EGCG. Furthermore, the CI level and the multinuclear osteoclast number had a strong correlation. In addition, we found that 1  $\mu$ M EGCG of low-concentration inhibited the osteoclast differentiation. There is a report that the highest plasma concentration of EGCG becomes 2  $\mu$ M by drinking one cup of green tea (400 mg of catechin components). Therefore, it is strongly suggested that EGCG has an osteoporosis prophylaxis effect. RTCA does not require the staining and the measurement is possible sequentially. RTCA is relatively simple and easy, and the screening of drugs for osteoclasts is enabled. It is suggested that this RTCA system might be useful to determine the appropriate level and the site of action of osteoporotic therapeutic drugs.

**Key words:** osteoclasts, assay, real time cellular analysis system (RTCA), epigallocatechin gallate (EGCG), bone marrow cells

[受付：1月6日，受理：1月22日，2014]