

北海道医療大学博士論文の内容および審査の結果要旨（平成15年度）

氏名・(本籍)	岡 山 三 紀 (京都府)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第111号
学位授与の日付	平成15年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	株化骨細胞 (MLO-Y4-A2) におけるメカニカルストレス応答機構の分子生物学的解析
論文審査委員	主 査 教 授 溝 口 到 副 査 教 授 田 隈 泰 信 副 査 教 授 東 城 庸 介

論 文 内 容 の 要 旨

【緒 言】

歯に矯正力を加えると、力の作用方向に対応する圧迫側では、歯槽骨は吸収され、一方、牽引側では骨形成を生じ、結果として歯は力の作用方向に移動する。このように矯正学的な歯の移動は、機械的刺激（メカニカルストレス）に対する歯周組織の生物学的な一連の過程である。歯の移動に伴う歯周組織の研究では破骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞などを対象としたものがほとんどであり、歯槽骨内の骨細胞の動態に関しては、いまだ不明な部分が多い。

骨細胞は骨に存在するもっとも多い細胞で、細く長い細胞突起をのぼして隣接する骨細胞同士がお互いに接触している。また、この細胞突起は骨表面にも達し、骨芽細胞や破骨細胞とも接触している。このように、骨細胞は細胞間にネットワークを張り巡らし、骨に加わるメカニカルストレスに対するセンサーの役割を担っていると考えられてきた。実際、メカニカルストレスの一つであるシェアストレスは、骨細胞において、eNOSやCOX-2のmRNAを誘導することが報告されている。また、骨芽細胞や破骨細胞に比べメカニカルストレスに対する反応性が高いと報告されている。したがって、骨細胞は骨に加わるメカニカルストレスを感知し、何らかのシグナルを骨芽細胞や破骨細胞に伝達し、骨のリモデリングに重要な役割を果たしている可能性が推察される。

最近テキサス大学のBonewald博士らは、SV40のlarge T-antigen遺伝子をオステオカルシンのプロモーターと

結合し導入したトランスジェニックマウスの長管骨より骨細胞様株細胞MLO-Y4を樹立した。本研究では、MLO-Y4細胞から、細胞突起を数多く有し、より骨細胞に近い形態をもつ細胞としてクローニングされたMLO-Y4-A2細胞を用い、シェアストレス負荷に応答する遺伝子群の検索と分子生物学的解析を試みた。

【材料と方法】

MLO-Y4-A2細胞は、37°C、5%CO₂存在下で、2.5% FBS、2.5%CS含有の α MEMを用いてコラーゲンコートしたdish上で12~48時間培養した。細胞が約60%コンフルエントになった状態で、dishを振盪機の上に乗せ、往復運動（90サイクル/分）によってシェアストレスを負荷した。ストレス負荷後経時的に細胞を採取し、total RNAを調整し、PTH受容体のmRNAの発現量をRT-PCR法およびライトサイクラーを用いた定量的RT-PCR法によって検討した。PTH受容体の蛋白発現量は抗PTH受容体モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により検討した。また、ERKのリン酸化阻害剤U-0126やCOX阻害剤インドメタシン存在下で同様の実験を行った。cAMP濃度はヤマサcAMPアッセイキットによって測定した。PTH受容体遺伝子の転写活性は、PTH受容体のプロモーター・エンハンサー領域をルシフェラーゼベクター（pGL3）に組み込み、ルシフェラーゼ活性を測定することにより行った。

【結 果】

株化骨細胞MLO-Y4-A2にシェアストレスを負荷すると、PTH受容体mRNA発現量は増加し約5～7時間後でピークを迎えその後低下した。定量的RT-PCRの結果、5～8倍にPTH受容体mRNA量が増加していた。

ウェスタンブロットの結果、PTH受容体は蛋白レベルでは7時間から増加し、12～15時間でその発現が最大と(約7倍)なった。

PTH受容体誘導によるcAMPレベルの変化を検討したところ、シェアストレスを負荷した細胞ではシェアストレスを負荷しないものに比べてPTH添加5分後のcAMPレベルが約2倍に増加した。細胞内カルシウム濃度の変化は見られなかった。

MAP Kinaseの一つであるERK-1はシェアストレスにより15分をピークにリン酸化され、ERK-2はシェアストレスにより脱リン酸化された。しかし、ERK Kinaseの阻害剤はPTH受容体の誘導に影響しなかった。

シェアストレスはCOX-2のmRNAを誘導したが、COX活性阻害剤であるインドメタシンを添加しても、シェアストレスによるPTH受容体mRNAの誘導に阻害効果は認められなかった。PGE2自身にはPTH受容体を誘導する作用は見られなかった。

PTH受容体の転写レベルの制御を検討するためシフェラーゼベクターを用いたプロモーターアッセイを行った。その結果、PTH受容体遺伝子の5'上流に存在するP1領域を組み込んだベクターでは、シェアストレス負荷後P1領域を含まないベクターに比べて4倍以上のルシフェラーゼ活性の上昇が見られた。

【考 察】

PTHは細胞膜上のPTH受容体に結合し細胞内のcAMPまたはCa²⁺の上昇を介して作用を発現すると考えられている。骨代謝に対するPTHの作用は2相性を示し、連続投与では骨吸収を、間歇投与では骨形成を引き起こし、骨のリモデリングを調節している。また、PTHはメカニカルストレスによるいくつかの遺伝子発現を増

強することが報告されている。

今回私は、株化骨細胞MLO-Y4-A2にシェアストレスを負荷するとPTH受容体のmRNAが誘導されることを見いだした。PTH受容体は蛋白質レベルでの発現増強も確認され、さらにストレス負荷後にPTHを添加すると、細胞内cAMPの増加が見られたことから、メカニカルストレスはPTH受容体の誘導を介して骨細胞のPTHへの反応性を高めている可能性が示唆された。

骨芽細胞において、シェアストレス負荷はERKのリン酸化(ERK-1/2)を通してCOX-2を誘導することが報告されている。MLO-Y4-A2細胞において、ERK-1はシェアストレスの負荷により15分をピークにリン酸化され、COX-2が誘導された。しかしPTH受容体の発現誘導は、ERK Kinase阻害剤U0126やCOX阻害剤であるインドメタシンの添加によって影響されなかった。したがって、シェアストレス負荷によるPTH受容体の誘導はERK/COX-2/prostaglandin E2を介した経路とは別経路であることが明らかとなった。

PTH受容体遺伝子の5'上流の転写調節領域にはP1、P2と呼ばれるエンハンサー領域が存在する。そこでプロモーターアッセイを行った結果、P1にシェアストレスに応答して転写を正に調節している領域が存在することが明らかとなった。この領域にはAP1、SP1、NFκBなどの転写因子結合配列が存在し、これらがストレスに応答している可能性が示唆された。

【結 論】

株化骨細胞MLO-Y4-A2は、メカニカルストレス負荷に応答し、PTH受容体が誘導された。シェアストレス負荷によるPTH受容体の誘導はERK/COX-2/PGE2のシグナル伝達系とは別経路であった。誘導されたPTH受容体はPTHに反応し、細胞内cAMP濃度の上昇を引き起こしたが、細胞内カルシウム濃度には影響しなかった。PTH受容体の誘導にはPTH受容体遺伝子のP1領域が関与し、転写レベルで調節されていることが明らかとなった。メカニカルストレスによる骨の維持増強にPTH受容体の発現誘導が関与している可能性が示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

骨細胞は、骨に加わるメカニカルストレスを感知し、何らかのシグナルを骨芽細胞や破骨細胞に伝達し、骨代謝を制御していると考えられているが、そのメカニズムには不明な点が多い。そこで、骨細胞のメカノセンサーとしての役割を明らかにすることを目的として、株化骨細胞MLO-Y4-A2を用いて、メカニカルストレスの一つ

であるシェアストレスに対する応答を、分子生物学的手法を用いて解析し、以下の結果を得た。

1. シェアストレスはMLO-Y4-A2細胞のPTHレセプターmRNAを約5～8倍誘導した。
2. PTHレセプターmRNAの誘導は、ERK Kinase阻害剤であるU0126およびCOX阻害剤であるインドメタ

シンでは抑制されなかった。

3. シェアストレスはPTH受容体のタンパク・レベルを上昇させ、PTHによるcAMP合成を促進した。
 4. PTHレセプター遺伝子の5'上流のプロモーター領域 (P1, P2) をクローニングし、ルシフェラーゼアッセイによりシェアストレスに応答する転写調節領域を決定した。
- 以上の結果から、骨細胞はメカニカルストレスを感知し、ERKやCOX-2とは別のシグナル伝達経路を経て

PTHレセプターを誘導し、PTHまたはPTHrPのcAMPを介したシグナルを増強することで骨代謝を制御していることが示唆された。

本研究は、これまで研究が遅れていた骨細胞の役割に着目し、力学的負荷に対する応答を株化骨細胞を用いて分子生物学的に解析したものである。本研究で得られた結果は、矯正歯科学の発展に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判断した。

氏名・(本籍)	川 村 研 二 (岩手県)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第112号
学位授与の日付	平成15年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	HAおよびCaTiO ₃ 薄膜コーティングインプラントの 表面特性と骨形成に関する研究
論文審査委員	主 査 教 授 越 智 守 生 副 査 教 授 大 野 弘 機 副 査 教 授 賀 来 亨

論 文 内 容 の 要 旨

【緒 言】

歯科インプラント治療は、歯牙欠損に対する審美性と機能を回復する手段の一つであり、今日では欠損補綴治療において重要な地位を占めるようになってきている。しかし、インプラント体埋入後、咬合の負荷に耐えうる状態を得るまでには長い時間を要し、患者の抱える負担も大きい。

ハイドロキシアパタイト (以下、HA) コーティングインプラントは、純チタンインプラントと比較して早期に骨結合が得られるとされ、臨床における使用頻度が高くなってきている。しかし、プラズマ溶射法、およびフレーム溶射法によるコーティングでは母材からのHA層の剝離や、層内での破壊などの報告例もあることから、これらの欠点を改善するために、最近では熱分解法による薄膜コーティング法が開発されている。また、インプラント/骨界面における役割が注目されているチタン酸カルシウム (CaTiO₃) をアンダーコーティングに用いること

によって、HA層の密着性を改善する試みもなされている。CaTiO₃は、生体内において純チタンと骨との界面の無構造層に存在しているとされ、それ自身が生体活性を有している可能性も考えられる。

そこで、本研究では、熱分解法によりCaTiO₃とHAを薄膜コーティングした試料を用いて、表面構造と溶解特性、およびウサギ大腿骨における骨形成の状態を調べた。

【材料および方法】

〈実験材料〉

JIS第2種純チタンを基材とし、機械加工により削りだしたインプラント体 (機械加工インプラント)、この表面にアルミナプラストおよび酸エッチング処理を施したもの (プラストインプラント)、プラストインプラントの表面にCaTiO₃をコーティングしたもの (CaTiO₃インプラント)、さらにCaTiO₃インプラント表面にHAをコーティングしたもの (HAインプラント)、これら4種類をインプラント試料とした。

また、純チタン製の円形プレートをを用いてインプラント試料と同様の表面処理を施した3種類（プラスチックプレート、CaTiO₃プレート、HAプレート）をプレート試料とした。

〈実験方法〉

1. 試料表面の分析

3種類のプレート試料表面においてそれぞれ、電子顕微鏡像の観察およびX線マイクロアナライザーによる分析、表面粗さの測定、X線回折分析、X線光電子分光分析（ESCA）を行った。

2. 溶解性試験

プラスチックプレートをコントロールとし、プレート試料を3種類の試験溶液（pH7.0緩衝溶液、pH5.2緩衝溶液、生理食塩水）にそれぞれ浸漬し、実験期間経過後における溶液中のCa²⁺濃度を原子吸光法により測定した。それと同時に溶液のpHを計測した。

3. 動物実験

インプラント試料それぞれをウサギ左右大腿骨遠心端部に埋入し、実験期間経過後、左側において、全身麻酔のもとトルクレンチによるインプラント回転除去トルク値の測定を行った。その直後に屠殺、灌流固定を行い右側の術部を切断し、通法に従って研磨標本を作製した。作製した標本を用いて普通光像および蛍光ラベリング像の観察を行い、CMR画像を用いてコンピュータ解析により骨接触率を計測した。

【結 果】

1. 試料表面の分析

X線解析による分析の結果、プラスチックプレートの表面からは、Tiのみが確かめられ、CaTiO₃プレートの表面ではTiと下地の酸化TiおよびCaTiO₃が、HAプレート表面ではTiと下地の酸化Ti、CaTiO₃、そしてHAが確かめられた。

ESCAによる分析では、HAプレートの表面でTiは検出されなかった。また、CaTiO₃プレートの表面からはTiとCaが検出され、Ti 2pスペクトルおよび、Ca 2pスペクトルそれぞれの結合エネルギーから、検出されたTiとCaはCaTiO₃に由来することが明らかとなった。

2. 溶解性試験

中性溶液中において、1日ではCaTiO₃プレートからのCa²⁺の溶出はみられず、HAプレートでは1日目からCa²⁺が溶出した。1週、2週ではCaTiO₃プレートからのCa²⁺の溶出はごくわずかであった。酸性溶液中ではCaTiO₃プレート、HAプレートのどちらも1日目からCa²⁺の溶出がみられ、pHの値は変動しなかった。生理食塩水中ではCaTiO₃プレート、HAプレートともに浸漬1

日目よりCa²⁺を溶出し、それにともないpH値の上昇がみられた。

3. 動物実験

回転除去トルク値測定の結果CaTiO₃インプラントとHAインプラントは1週、2週ともに、他に比較して有意に高い値を示した。また骨接触率においてはCaTiO₃インプラントとHAインプラントは埋入1週間後から比較的大きな値を示し、ここでも1週、2週ともに他の群に比較して有意に高い値を示した。

【考 察】

HAコーティングインプラントは優れた生体親和性を有しており、また、骨伝導能により骨と直接結合するなどの長所を持つ。しかし、製品によりそれぞれコーティング層の物性や表面性状もまちまちである。表面性状の分析結果ではCaTiO₃インプラント、HAインプラントともに下地が表面に露出することなくコーティング層により完全に被覆されていた。また、動物実験の結果からも分かるようにこれらはチタンインプラントに比較し、骨形成がより早期に得られることが分かった。すなわちその溶解性から、CaTiO₃およびHAは生体内において、Ca²⁺を供給するとともにインプラント周囲の環境を速やかに中性化する効果が期待できる。従来から指摘されていたインプラント周囲における局所的なCa²⁺濃度の上昇に加え、局所的なpHの上昇によって、埋入早期に新生骨の形成が促進されたものと考えられる。

【結 論】

1. 熱分解法で形成したCaTiO₃およびHA層は、溶射したHA層と比較して薄く密着性が良いことから、剝離やコーティング層の破壊が起こりにくい。
2. CaTiO₃試料およびHA試料は、表面がCaTiO₃ならびにHAで完全に被覆されていた。
3. CaTiO₃とHAはともに中性溶液中よりも酸性溶液中で高い溶解性を示した。
4. 溶解性はCaTiO₃よりもHAのほうが高かった。
5. 生理食塩水中（pH6.0）ではCaTiO₃とHAの溶解量は浸漬時間の経過にしたがって増大し、Ca²⁺を溶出するとともに溶液のpHの値を上昇させた。
6. CaTiO₃およびHAコーティングインプラントでは、純チタンインプラントおよびプラスチックインプラントと比較して、より早期に骨結合が得られた。
7. CaTiO₃とHAの骨伝導性には、Ca²⁺の溶出のみならず、pH緩衝能も大きく影響している可能性がある。

学位論文審査の要旨

ハイドロキシアパタイト(以下, HA)コーティングインプラントは, 純チタンインプラントと比較して早期に骨結合が得られるとされ, 臨床における使用頻度が高くなってきている。しかし, プラズマ照射法, およびフレーム照射法によるコーティングでは母材からのHA層の剝離や, 層内での破壊などの報告例もあることから, これらの欠点を改善するために, 最近では熱分解法による薄膜コーティング法が開発されている。また, インプラント/骨界面における役割が注目されているチタン酸カルシウム(CaTiO₃)をアンダーコーティングに用いることによって, HA層の密着性を改善する試みもなされている。CaTiO₃は, 生体内において, 純チタンと骨との界面の無構造層に存在しているとされ, それ自身が生体活性を有している可能性も考えられる。

そこで本研究では, 熱分解法によりCaTiO₃とHAを薄膜コーティングした試料を用いて表面構造と溶解特性, およびウサギ大腿骨における骨形成の状態を調べた。

これら実験の結果より, 次の結論を得た。

1. 熱分解法で形成したCaTiO₃およびHA層は, 溶射したHA層と比較して薄く密着性が良いことから, 剝離やコーティング層の破壊が起こりにくい。
2. CaTiO₃試料およびHA試料は, 表面がCaTiO₃ならびにHAで完全に被覆されていた。
3. CaTiO₃とHAはともに中性溶液中よりも酸性溶液中で高い溶解性を示した。
4. 溶解性はCaTiO₃よりもHAのほうが高かった。
5. 生理食塩水中(pH 6.0)ではCaTiO₃とHAの溶解量は浸漬時間の経過にしたがって増大し, Ca²⁺を溶出するとともに溶液のpHの値を上昇させた。
6. CaTiO₃およびHAコーティングインプラントでは, 純チタンインプラントおよびプラストインプラントと比較して, より早期に骨結合が得られた。
7. CaTiO₃とHAの骨伝導性には, Ca²⁺の溶出のみならず, pH緩衝能も大きく影響している可能性がある。

氏名・(本籍)	小林 孝雄 (茨城県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙 第113号
学位授与の日付	平成15年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(論文博士)
学位論文題目	高齢者における歯周組織の状態と血清IgGサブクラスとの関連
論文審査委員	主査 教授 小 鷲 悠 典 副査 教授 賀 来 亨 副査 教授 矢 嶋 俊 彦

論文内容の要旨

歯周病原細菌に対する体液性免疫応答の主体をなすのは免疫グロブリンG(IgG)である。IgGは構造の違いによりIgG1-IgG4の4つのサブクラスに分類されている。各サブクラスは標的となる抗原の違いによりその産出を調節されている。IgG1とIgG3はタンパク質抗原に対して, IgG2は糖タンパクに対して特異的に産出されることが知られている。これまで, 多くの研究者により血清総

IgG量あるいは血清IgGサブクラス量と歯周病の病態との関連性が報告されてきた。Wiltonらの研究では, 成人性歯周炎患者の血清IgG2量は健常者に比べ有意に高かったと報告されている。また, Luらの研究では, 黒人の若年性歯周炎患者は血清IgG2量が同年齢の対象者に比べ有意に高かったと報告されている。また, Gunsolleyらの研究では, 血清IgG量および血清IgGサブクラス量は

人種などの遺伝的素因や、喫煙などの環境因子により影響を受けていると報告されている。

そこで本研究では、末梢血から得られる情報により歯周病に対する感受性を予測可能かを探る目的で日本人における血清総IgG量および血清IgGサブクラス量と歯周病の病態との関連性を検討した。

[材料と方法]

1999年4月の時点で新潟市の住民票を有する71歳の高齢者、451名(男性239名,女性212名)を選択し、アンケートによる問診と口腔内診査を行った。口腔内診査として残存歯数、歯周ポケット深さ(PPD)、アタッチメントロス量(PAL)、歯石付着の有無(CAL)、プロービング時出血(BOP)の有無、について全歯にわたり測定した。また、各被験者から静脈血を採取し血清を分離後 -80°C にて凍凍保存した。

総IgG量は免疫比濁法により測定した。血清IgGサブクラス量はELISA法により測定した。つまり、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈した抗ヒトIgGサブクラス抗体により96穴マイクロタイタープレートにコーティングし、5%スキムミルク含有PBSでブロッキングした。0.05% Tween20含有PBSで洗浄後、連続希釈したヒト標準血清あるいは被験血清を加え反応させた。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を加え反応させた。その後、基質としてp-ニトロフェニルホスフェートを加えて発色させ405nmにおける吸光度を測定した。標準曲線より各被験血清のIgGサブクラス量を算出した。

Porphyromonas gingivalis 381株を培養し、遠心分離によって得られた培養上清から線毛を分離・精製した。96穴マイクロタイタープレートに線毛をコーティングし、5%スキムミルク含有PBSでブロッキングした。標準血清あるいは被験血清をプレート上で反応させ、洗浄後、抗ヒトIgGサブクラス抗体を反応させた。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体を反応させた。その後、p-ニトロフェニルホスフェートを加えて発色させ405nmにおける吸光度を測定した。標準曲線より各被験血清の線毛に対する抗体価を算出した。

血清コチニン量はNicotine Metabolite Kit (DPC社)により測定した。コチニン量が調整された標準コチニン $25\mu\text{l}$ と被験血清 $25\mu\text{l}$ をそれぞれ ^{125}I でラベルしたコチニン $100\mu\text{l}$ と反応させ、さらにNicotine Metabolite Antiserum $100\mu\text{l}$ を加え反応させた。その後、遠心分離し上清を除去後、ガンマーカウンターにてCPMを測定した。得られたスタンダードのCPM値から標準曲線を描き各被験血清のコチニン量を算出した。

残存歯数に基づき被験者を2群に分け、群間における各パラメーターの検定にWilcoxonの検定を用いた。

[結果]

選択した被験者451名の残存歯数は平均17.41本であった。歯周臨床検査データが得られないため、まず、無歯顎の被験者を除外した。次にアンケート結果から喫煙者を除外しさらに血清中コチニン量が 100ng/ml 以上であった被験者を除外した340名についてその後の解析を行った。残存歯の分布状態から340名を残存歯の少ない群(19本以下)と多い群(20本以上)の2群に分けた。解析にあたって、PPD, PALは4mm以上の部位の割合を、BOP, CALはそれぞれ認められた部位の割合を算出した。その結果、2群間で統計的に有意差が認められたのはPALが4mm以上の部位の割合($p=0.001$)、血清IgG量($p=0.035$)、血清IgG2量($p=0.025$)、血清IgG3量($p=0.011$)、血清IgG4($p=0.022$)であった。PPD 4mm以上の部位の割合、BOP(+), CAL(+)の部位の割合、血清総IgG量、抗線毛IgGおよびIgGサブクラス抗体価、血清コチニン量には有意差は認められなかった。

[考察]

歯周病への感受性を示す指標については統一した見解が得られていないのが現状であるが、本研究ではその指標として残存歯数を選択した。残存歯を指標として2群に分けたところ、残存歯の少ない群ではPAL 4mm以上の部位の割合が有意に高かったことから残存歯の少ない群ではより歯周組織の破壊が進んでいることが明らかになった。また、残存歯の少ない群では血清IgG1量が有意に高く血清IgG2-4量は有意に低かった。新潟市在住の高齢者を対象としたSugitaらの研究では、有意差は認められなかったが歯周病感受性が高い群では血清IgG1量およびIgG3量が高いという同様な所見が報告されている。残存歯の少ない群、つまり歯周組織の破壊が進んでいる群で血清IgG1量が高いという結果は、血清IgG1が歯周組織の破壊に関連していることを示唆している。一方、残存歯数の多い群、つまり歯周組織の破壊が進んでいない群で血清IgG2-4量が高いという結果は、血清IgG2-4が歯周組織の破壊に対する生体防御反応に関連していることを示唆している。*P. gingivalis*線毛に対するIgGおよびIgGサブクラス抗体価については2群間には有意差を見出すことができなかった。Amanoらは*P. gingivalis* 381株の*fimA*遺伝子型は、歯周炎患者から多く検出されるタイプIIではなく健康者から多く検出されるタイプIであったと報告している。*fimA*遺伝子型がタイプIIである線毛を抗原として用いれば、2群間に有意差が認めら

れるかもしれない。本研究は横断的研究であり血清IgGサブクラス量と歯周組織の破壊の間の因果関係は明らかにすることができなかった。しかし、高齢日本人におい

て末梢血中のIgGサブクラス量、特にIgG1量と歯周組織破壊の状態と口腔内の状態に関連があることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

歯周病原細菌に対する体液性免疫応答の主体をなすのは免疫グロブリンG (IgG) である。IgGは構造の違いによりIgG1～IgG4の4つのサブクラスに分類されている。これまで、多くの研究者により血清総IgG量あるいは血清IgGサブクラス量と歯周炎の病態との関連性が報告されてきた。そこで本研究では、血清総IgG量および血清IgGサブクラス量と歯周炎の病態との関連性を検討した。

被験者451名から無歯顎の被験者および喫煙の影響のある被験者を除外した340名について解析を行った。340名を残存歯の少ない群 (19本以下) と多い群 (20本以上) の2群に分けた。解析にあたって、ポケット深さ (PPD)、アタッチメントロス量 (PAL) は4 mm以上の部位の割合を、プロービング時の出血 (BOP)、歯石の沈着 (CAL) はそれぞれ認められた部位の割合を算出した。その結果、2群間で統計的に有意差が認められたのはPALが4 mm以上の部位の割合 ($p=0.01$)、血清IgG1量 ($p=0.04$)、血清IgG2量 ($p=0.03$)、血清IgG3量 ($p=0.01$)、

血清IgG4量 ($p=0.02$)であった。本研究では、残存歯を指標として2群に分けたところ残存歯の少ない群ではPAL 4 mm以上の部位の割合が有意に高かったことから残存歯の少ない群ではより歯周組織の破壊が進んでいることが明らかになった。また、残存歯の少ない群では血清IgG1量が有意に高く血清IgG2-4量は有意に低かった。残存歯の少ない群、つまり歯周組織の破壊が進んでいる群で血清IgG1量が高いという結果は、血清IgG1が歯周組織の破壊に関連していることを示唆している。一方、残存歯数の多い群、つまり歯周組織の破壊が進んでいない群で血清IgG2-4量が高いという結果は、血清IgG2-4が歯周組織の破壊に対する抵抗性に関連していることを示唆している。本研究の結果から、末梢血中のIgGサブクラス量と口腔内の状態の間に関連があることが明らかになった。

以上の結果から、本論文は歯周疾患の発症および進行の解明に寄与するところが大きく、審査の結果、学位論文に値すると判定した。

氏名・(本籍)	茂尾公晴 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	乙 第114号
学位授与の日付	平成15年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (論文博士)
学位論文題目	下顎頭の過剰運動により惹起されたラット顎関節外傷性滑膜炎の組織学的観察
論文審査委員	主査 教授 柴田 考典 副査 教授 矢嶋 俊彦 副査 教授 賀来 亨

論文内容の要旨

【背景】

顎関節症は臨床的な炎症所見、発赤、発熱を伴わずに

慢性的に経過する疾患であるとされていたが、近年の研究からほとんどの症例において滑膜炎を主体とする微小炎症が存在することが判明している。顎関節症における

滑膜炎の原因としては、主に直接的な外力と内部構造の変形や変位による応力変化が考えられるが、前者による顎関節滑膜炎の成立機序については不明な点が多い。

ヒト下顎頭は最大開口時にほとんどが関節結節頂部よりも前方に移動することが知られており、このような関節窩を逸脱するような滑走運動は他の関節には認められない。下顎頭の滑走運動は下顎窩と関節円板との間で営まれ、この両者を連結している滑膜組織は日常的に引張り応力、圧縮応力、剪断応力が加わっていることが推測される。

武藤、川上らはラットに反復的な強制過剰開口を与えることにより、外傷性顎関節滑膜炎モデルを考案し、その病理組織学的所見の経時的变化（滑膜細胞の多層化、血管の拡張、フィブリン沈着）を報告してきた。しかし、これまでは滑膜炎発症後の経過についての観察は成されてきたが、滑膜炎成立過程に関しては十分に検討されていない。

【目 的】

本実験では、ラットの過剰開口に伴う滑膜組織における初期反応を観察することにより、外傷性滑膜炎の成立過程を解明することを目的とする。

【実験動物・実験方法】

本実験では武藤、川上らの実験モデル作成法に習い、8週齢のWistar系雄性ラット（平均体重226g）を用いた。すなわち、1日1度、エーテル麻酔下にラットの上顎両側切歯を手術台に固定し、鑷子で下顎両側切歯を把持して、上下中切歯切端間距離が20mmとなる反復強制過剰開口を連続10回与えた。同処置を1日、3日、5日、7日、10日間施したラットを、それぞれその翌日に、また10日間の処置を終了したラットを5日後に屠殺し、2%glutalaldehyde-2%paraformaldehyde in 0.1M cacodylate bufferにて灌流および、浸漬固定後、4%EDTAにて脱灰した。その後、顎関節部を一塊として通法に従いパラフィン標本とEPON樹脂標本を作製した。なお、武藤、川上らが主病変部位は上関節腔前方滑膜組織であることを報告していることから、同部位を中心に光学顕微鏡ならびに透過型電子顕微鏡下に観察した。また、滑膜組織は顎関節の外側と内側では、その構造が異なるため全体的な変化を知るために前頭断面で観察を行った。

【結 果】

本実験でラット顎関節および滑膜組織に以下のような変化が認められた。

1日の処置後に表層細胞間隙の拡大が見られたが、個々の表層細胞に形態変化は認めなかった。表層下組織は浮腫性に肥厚しており、膠原線維束は散在し、炎症性細胞の浸潤が見られた。3日処置群では1日処置群と同様に表層細胞間隙の拡大を認めた。表層下組織では浮腫性変化と炎症性細胞の浸潤は1日処置群に比べ弱かったが、肥厚は持続し多数の線維芽細胞と膠原線維束の集簇が見られた。5日処置群と7日処置群では、表層細胞間隙の拡大は持続し、新たな表層細胞の補填と思われる所見が得られた。表層下組織は肥厚したまま膠原線維束の集簇化は進行した。10日処置群では表層細胞間隙は対照群と同様で、細胞質内の貪食泡は対象に比べ多かった。表層下組織の線維芽細胞の数は対照群とほぼ同様で、膠原線維束の走行が明瞭であった。10日間の処置が終了し、外傷性刺激が除かれた後、5日目の所見、すなわち5日処置群では、表層細胞の貪食泡は10日処置群に比べて多く、巨大であった。一方、表層下組織では対照群に比べ細い膠原線維束が緊密に併走して存在していた。

【考 察】

滑膜は関節腔に面する細胞成分に富んだ滑膜表層とその下層の表層下組織からなる。滑膜表層にはマクロファージに類似したA細胞と線維芽細胞類似のB細胞、両者の中間型の細胞が存在し、関節包内環境の恒常性に関与していると考えられている。これらの細胞の細胞間接着機構は脆弱である。表層下組織は膠原線維が束状に走行している結合組織である。膠原線維束間にはヒアルロン酸が網目状に存在し、毛細血管を通過可能な分子量の蛋白質でも関節腔内への通過を制限していると考えられている。

本実験では、1日の処置で滑膜組織に漿液性炎が生じ浮腫性に肥厚した。

表層細胞間隙は表層下組織の浮腫性変化に伴い拡大し、関節腔内への漏出が生じていると考えられたが、個々の表層細胞自体には変化を認めなかった。その後、表層細胞間隙から漏出したのであろう関節腔内の不定型物が増加し、表層細胞は活発に貪食を行っていた。このことから、表層細胞は滑膜に対する過度の伸展刺激によって直接に障害されるのではなく、表層下組織の修復に伴って関節腔内に出現する物質を除去するために、反応性に貪食能を亢進させているのではないかと推測された。

また、滑膜表層下組織は引き続き連日、過剰開口を与え続けたにもかかわらず、単調憎悪傾向を示すことなく、肥厚した状態のまま早期に修復が進行し線維化していった。これにより、滑膜組織は弾性および復元性を低下させることが示唆された。

以上より、伸展刺激を加えられた顎関節滑膜には外傷性に滲出性炎が生じ、さらに顎関節組織に対して異なった外傷性刺激が重複して関与することにより、複雑な病態が形成され、遷延化あるいは憎悪傾向を辿り関節内病変を形成するのではないかと推測された。

【結 論】

1. 強制開口処置1日後のラット顎関節では表層細胞間隙の拡大、及び表層下組織の浮腫性変化と炎症性細胞浸潤、膠原線維束の散在化、炎症性滲出物の関節腔への漏出が見られた。
2. 3日間の強制開口処置後、表層細胞間隙の拡大は持続し、表層下組織では浮腫性変化と炎症性細胞浸潤の消退化傾向、および線維芽細胞の増加と膠原線維の集簇化が認められた。

3. 5日、7日と処置を継続すると、表層細胞間隙はさらに拡大し、新たに表層細胞が補填が開始した。表層下組織では、線維芽細胞の増加は減少傾向に転じ、浮腫性変化がほぼ消退していったが、膠原線維束の集簇化は持続し、滑膜は肥厚したままであった。
4. 10日処置群では、表層細胞は緊密となり、貪食胞作用が亢進していた。表層下組織は肥厚しつつ線維化がさらに進行していた。
5. 処置後5日群では、表層細胞の貪食はさらに活発となり、表層下組織には対照より細い膠原線維束が緊密に構築されていた。

以上のことから、本研究で行った外傷性滑膜炎の初期変化の観察は顎関節症の成立機序を解明する上で有効な実験モデルの一つとなり得ることが示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

顎関節における外傷性滑膜炎の成立過程を明らかにすることを目的とし、ラットの過剰開口に伴う顎関節滑膜組織の初期反応を、光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡を用いて経時的に観察した。

実験動物にはラットを用い、顎関節への外傷性刺激として上下切歯端間距離が20mmとなるような連続10回の反復強制過剰開口を1日1度加えた。それら外傷性刺激の持続期間は、1日、3日、5日、7日、10日間とし、前頭断面における上顎関節腔前方滑膜組織の変化を追跡した。

滑膜表層細胞層の変化は、まず、それらの細胞間隙の拡大から生じ、徐々に進行し7日群でピークとなり、10日群で受傷前に復していた。一方、表層細胞における細胞質内の貪食胞は10日群で増加が顕著となり、それ以降も漸増傾向を示した。

滑膜表層下組織で1日群で浮腫性膨大、炎症性細胞の浸潤、および膠原細胞線維束密度の減少が著明となった。その後、3日後ではそれら浮腫性変化と炎症性細胞浸潤

は減弱に転じ、5日および7日群では浮腫性変化は軽微となっていた。また、3日群では線維芽細胞の密度はピークを迎え、5日および7日群では同密度の減少がみられ、10日群では受傷前に復していた。なお、3日群で認められた膠原細線維束の集簇化は、その後、徐々に細線維束の数を増し、10日群では細線維束の走行が明瞭となりながら、その密度を増していた。

以上のことから、実験的に下顎頭の過剰運動により惹起された顎関節外傷性滑膜炎では、初期における漿液性炎の成立後、早期に膠原細線維束を主体とする修復機転が開始し、それら両者が平行して進行しつつ、徐々に修復機転が優位となっていくことが判明した。

以上のことから、本論文は、下顎頭の過剰運動により引き起こされる顎関節外傷性滑膜炎の成立過程を組織学的に解明し、顎関節における病態解明に重要な基礎的研究として寄与するところが大きく、審査の結果、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	西山博雅(大阪府)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第115号
学位授与の日付	平成15年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(論文博士)
学位論文題目	実験的歯の移動に伴うラットセメント細胞の形態変化
論文審査委員	主査 教授 溝口 到 副査 教授 矢嶋 俊彦 副査 教授 田隈 泰信

論文内容の要旨

[緒言]

歯に矯正力を加えると、歯根膜には圧迫力、および牽引力負荷部位が生じる。圧迫側においては、歯根膜の圧迫による血流の阻害、および硝子様変性部位の出現、マクロファージ系の細胞による変性組織の吸収、そして破骨細胞による歯槽骨の吸収(穿下性吸収)が起こる。一方、牽引側では、歯根膜が牽引されることにより血流が活性化され、骨芽細胞、線維芽細胞が増殖し骨形成が行われる。このように、矯正学的歯の移動は、外力に対する歯周組織の一連の反応により特徴づけられた生物学的過程である。また、従来の歯の移動に伴う歯周組織の反応のメカニズムに関する研究では、破骨細胞、骨芽細胞、あるいは線維芽細胞などの歯根膜組織を対象にしたものがほとんどである。歯は生理的条件下で常に改造現象が起こっている骨と比較し吸収されにくいために、矯正治療はこの両者の吸収に対する抵抗性の差を利用し歯の移動を行っている。しかし、臨床的には歯の矯正移動により歯根の短小化などの歯根吸収現象がしばしば起こることが報告されている。

セメント質は歯根象牙質の表面を覆う石灰化組織であり、歯根膜および歯槽骨とともに歯を支持している。一般にセメント質は無細胞セメント質と有細胞セメント質とに分類され、ヒト、ラットおよびマウス等において、無細胞セメント質は歯根上部に、有細胞セメント質は歯根下部に分布している。形態的には有細胞セメント質は、骨小腔および骨細管と同様のセメント小腔およびセメント細管の中に、セメント細胞およびその突起を入れていることなど多くの点で骨組織に類似する。また、血管を

含まない、吸収されにくいなど、骨組織とは異なる特性を有することが報告されているが、いまだにその本態や矯正力に対する反応性に関しては不明な点が多く、歯を構成する硬組織のなかで最も知見に乏しい組織である。

そこで本研究では、歯の移動時における圧迫側歯根表面の動態について有細胞セメント質中のセメント細胞の経時的な形態変化による検討を行った。

[材料と方法]

生後8週齢のWistar系雄系ラットを用い、Igarashiらの方法(1994年)に準じ、矯正用超弾性ワイヤー(0.012 inch)を用いて初期荷重60gfで上顎第一臼歯の頰側移動を行った。実験期間は、歯の移動開始から3, 6, 12時間, 1, 2, 4, 7日とした。なお対照群として、装置未装着の8週齢ラットおよび実験群と同様に観察期間を設けた4, 7日後のラットを用いた。

実験期間終了後、4%paraformaldehyde(0.1M PB, pH 7.4)固定液で30分の灌流固定を行い、上顎骨を摘出後、同固定液を用いて4°C下にて12時間の浸漬固定を施した。固定終了後10%EDTA溶液にて脱灰後、通法によりパラフィン、O.C.T. Compoundに包埋し、水平断のパラフィン切片(厚さ5μm)、および凍結切片(厚さ20μm)を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色およびアポトーシスに特有なss-DNAに対する抗体を用いた免疫染色を施した。凍結切片には、Alexa 488標識phalloidinによるF-actin染色、ならびに4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)による核染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

なお、観察部位は根尖側の硝子様変性組織が出現している第一臼歯近心根、圧迫側セメント質とした。

【結 果】

1) 光学顕微鏡所見

歯に荷重負荷後3時間で第一臼歯近心根歯根膜に一部圧迫像がみられ、エオジン好性の硝子様変性組織が出現した。その後、硝子様変性組織の範囲の増加が認められた。荷重負荷後12時間で変性組織に隣接する有細胞セメント質内のセメント細胞の一部に核の濃縮の所見が、1日では、核の濃縮および断片化が観察された。同部位において、抗ss-DNA抗体に対する陽性反応も認められた。2日ではさらに多数のセメント細胞に抗ss-DNA抗体陽性反応がみられた。その後4日では陽性反応を示す細胞は減少し、セメント小腔内のセメント細胞の消失が著明となった。

2) 共焦点レーザー顕微鏡所見

荷重負荷後12時間で変性組織に対応する有細胞セメント質のセメント細胞の一部に核の濃縮、断片化がみられたが、セメント質表面の細胞との突起のコンタクトは残存していた。1日では、セメント細胞の核の濃縮および断片化が観察されるのに加え、セメント細胞の突起の消

失、および細胞質におけるF-actinの染色性の低下がみられた。2日ではさらにセメント細胞におけるF-actinの染色性の消失も認められた。4日後ではセメント細胞の細胞質や核の染色性はほとんど消失し、萎縮した細胞質がわずかに残存しているのが認められた。

【考 察】

本研究において、硝子様変性組織に隣接した有細胞セメント質のセメント細胞に抗ss-DNA抗体陽性反応や核の濃縮、および断片化などアポトーシスの特徴が観察されたことから、歯の移動初期に認められた細胞形態の変化はアポトーシスの過程であることが示された。

セメント細胞の形態変化の原因としては、硝子様変性組織の出現によるセメント細胞への栄養供給やある種の科学的シグナルの伝達の消失が考えられるが、この点に関しては今後検討していく必要がある。

【結 論】

実験的歯の移動によって、硝子様変性組織に隣接する有細胞セメント質のセメント細胞にアポトーシスが示された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

本論文はラットの歯を移動させた際の圧迫側歯根表面のセメント細胞の動態について、アポトーシスに特有なss-DNAに対する抗体を用いた免疫染色、アクチンおよび核に対する蛍光染色を用いて明らかにしたものである。

従来の矯正学的歯の移動に関する基礎的研究では、歯根膜組織に存在する細胞や歯槽骨表面あるいは無細胞セメント質表面がその観察対象とされており、根尖部表面に存在する有細胞セメント質中のセメント細胞について着目した研究はいままで皆無であった。この点は、本研究の独創性を示すものであり、本研究で確立したセメント細胞の観察方法によって歯の移動時における圧迫側有細胞セメント質のセメント細胞にアポトーシスが示されることを立証したことは高く評価できる。

本研究では従来観察が困難であったセメント細胞の観

察方法として、Alexa 488 標識 phalloidin と 4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) による蛍光染色法を用いている。この方法は従来の方法は困難であった細胞突起の染色性に非常に優れており、セメント細胞の詳細な観察を可能にした。

以上のことより、本研究で確立した実験方法を用い、ラットの歯の移動時、有細胞セメント質中のセメント細胞にアポトーシスが生じることを立証したことは、矯正学的歯の移動における生物学的メカニズムに大きく寄与するものと考えられる。今後、より長期的な観察を行いセメント細胞の細胞死と歯根吸収の変化を検討することで、両者の関連性、ならびに歯根吸収の機序を解明することも可能になると考えられる。このことは、歯科医学・医療の発展に寄与するところ大であり、よって博士(歯学)の学位授与に値するものと考えられる。

氏名・(本籍)	服部 裕 歩 (北海道)		
学位の種類	博士 (歯学)		
学位記番号	乙 第116号		
学位授与の日付	平成15年 3月21日		
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)		
学位論文題目	卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットに及ぼすメラトニンの効果		
論文審査委員	主査	教授	賀 来 亨
	副査	教授	武 田 正 子
	副査	教授	東 城 庸 介

論 文 内 容 の 要 旨

[緒 言]

松果体から分泌されるホルモン、すなわちメラトニンの分泌量低下が骨粗鬆症発症と相関するといった疫学的報告に注目し、メラトニンが骨粗鬆症の予防や治療に有効になると仮説を立て、メラトニンの骨に及ぼす研究に着手した。メラトニンには*in vitro*において、正常ヒト骨芽細胞の細胞増殖およびタイプIコラーゲンの合成促進作用があることが発見され、*in vivo*においてはメラトニンの腹腔内注射が成長期のマウス・成熟ラットの骨吸収を抑制し、骨密度および骨量を増加させる作用があること、さらに粉末飼料に混ぜたメラトニンをラット摂食させ、骨量を増加させることが報告され、その作用はメラトニンの骨吸収抑制作用に起因することが報告されている。しかし、メラトニンの投与が卵巣摘出術 (OVX) 施行後に生じるラットの骨量減少を防止できるかどうかに関しては明らかにされていない。そこで、本研究ではメラトニンの投与がラットにおいて骨粗鬆症の発生が抑制されるかという仮説をたて、OVXあるいは偽手術から3日後よりvehicleあるいはメラトニンを5週間および8週間毎日腹腔内注射による投与を行い、メラトニンのOVXラットにおける骨量減少の抑制効果について検討した。

[方 法]

メラトニン5週間投与群では、6ヶ月齢のWistar系雌ラットを3群(n=6)に分けた。卵巣摘出偽手術後vehicleのみ腹腔内投与した対象群 (CON+VEH 5w)、卵巣摘出手術 (OVX) 後メラトニン非投与でvehicleのみ腹腔内

投与した群 (OVX+VEH 5w)、OVX後10mg/kgb.w./dayのメラトニンを腹腔内投与した実験群 (OVX+10 aMT 5w)とした。次にメラトニンのOVXラットにおける至適濃度および長期投与の効果を検討するため同ラットを5群 (n=6)に分け、メラトニン8週間投与群としCON+VEH 8w群、OVX+VEH 8w群、5mg/kgb.w./dayのメラトニンを腹腔内投与した実験群 (OVX+5 aMT 8w)、OVX+10 aMT 8w群、50mg/kgb.w./dayのメラトニンを腹腔内投与した実験群 (OVX+50 aMT 8w)とし、8週間腹腔内投与した。投与時間は5週間投与群・8週間投与群ともにメラトニン血中濃度のもっとも低い15:00~17:00の間とし、投与開始から5週間後・8週間後のメラトニン投与による影響は、実験終了後屠殺し、体重諸臓器重量測定、血液生化学マーカー測定を行い、脛骨のみを摘出し、脛骨近位端非脱灰薄切標本を用いた海綿骨骨形態計測および脛骨骨幹中央部の横断非脱灰研磨標本を用いた皮質骨形態計測、さらにDEXA法による骨塩量測定により検討した。

[結 果]

1. 体重諸臓器重量測定、血液生化学マーカー測定
5週間投与群において、OVX+VEH 5wはCON+VEH 5wに比べ、OVXによる有意な体重増加を示したがメラトニン投与による影響はなく、諸臓器重量もメラトニン投与による影響は認められなかった。血液生化学マーカーのALPはOVXによる影響が認められた。
2. 骨近位端非脱灰薄切標本を用いた海綿骨骨形態計測
5週間投与のメラトニン投与群 (OVX+10 aMT 5w)は、メラトニン非投与群 (OVX+VEH 5w)に比べ、海

綿骨量が35%以上多く、偽手術対照群(COX+VEH 5w)とほぼ同レベルであった。さらに骨吸収2次パラメータであるOc.S/BSはOVX+VEH 5wに比べ36%の減少、N.Oc/BSは24%の減少、ES/BSは32%の減少、および骨形成2次パラメータであるOb.S/BSは60%の減少を認め、また骨形成速度BFR/BSは76%の著しい減少が認められた。

一方8週間投与群では、メラトニン投与群はOVX+VEH 8wに比べ、海綿骨量がOVX+5 aMT 8wは44%、OVX+10 aMT 8wは35%、OVX+50 aMT 8wは18%多く、CON+VEH 8wとほぼ同レベルに維持されていたことが示された。またOc.S/BSはOVX+5 aMT 8wは26%、OVX+10 aMT 8wは33%、OVX+50 aMT 8wでは32%の減少、N.Oc/BSはOVX+5 aMT 8wでは37%、OVX+10 aMT 8wでは50%、OVX+50 aMT 8wでは35%の減少、ES/BSはOVX+5 aMT 8wでは15%、OVX+10 aMT 8wでは18%、OVX+50 aMT 8wでは16%の減少、Ob.S/BSはOVX+5 aMT 8wでは19%、OVX+10 aMT 8wでは8%、OVX+50 aMT 8wでは15%の減少を示したことより、骨形成・骨吸収2次パラメータともに骨量減少を補正し、5週間投与群と同様の効果が維持されたことがわかったが、OV/BSがOVX+5 aMT 8wは8%、OVX+10 aMT 8wは4%、OVX+50 aMT 8wは0%の減少を示し、BFR/BSはOVX+5 aMT 8wは26%、OVX+10 aMT 8wは22%、OVX+50 aMT 8wは16%の減少を示すもののOVX+VEH 8wと有意な差はなく、ほぼ同レベルであった。

3. 皮質骨形態計測

5週間投与および8週間投与において、ともに皮質骨厚さおよび皮質骨面積は有意な差は得られなかったが、わずかにOVXにより減少し、若干ではあるがメラトニン投与により皮質骨の吸収を抑制していたと考えられた。なお、いずれの群においてもメラトニン投与による諸臓器への影響は認められず、体重への影響にはOVXによる

体重増加は見られたもののメラトニン投与により有意な影響は及ぼさなかった。

4. 脛骨における骨塩量 (BMD) 測定

脛骨近心端部において、OVXにより54%まで減少を示したが、各メラトニン投与群は94%にまで減少が抑制されたことが示された。

[結 論]

- 1) 卵巣摘出施行閉経後骨粗鬆症モデルラットにおいてメラトニン投与は海綿骨領域において骨量の減少を有意に抑制し、CON+VEHとほぼ同レベルに維持した。
- 2) メラトニン投与群はメラトニン非投与群 (OVX+VEH) 同様、骨形態計測において全骨面に対する類骨量 (OV/TV)、海綿骨骨面に対し骨芽細胞の占める割合 (Ob.S/BS)、海綿骨領域における骨形成速度 (BFR/BS) に卵巣摘出による影響は見られたものの、海綿骨量 (BV/TV) および骨吸収2次パラメータを減少させたことより、高回転型骨吸収にメラトニンが抑制効果が示された。
- 3) 卵巣摘出術施工時よりOVX+VEHは経時的に著明な骨吸収を示すものの、メラトニン投与により継続的に骨吸収を抑制した。
- 4) メラトニン投与量は低濃度 (5 mg/kgb.w./day) においても、非卵巣摘出群とほぼ同レベルの十分な骨吸収抑制効果が認められた。
- 5) 本研究は今日までのメラトニンの骨に及ぼす影響に関する研究結果に矛盾せず、より骨吸収への抑制効果が明らかとなった。

以上より、ラットにおいて、メラトニンは破骨細胞の骨吸収機能の抑制により、著しい骨の病的吸収を明らかに抑制ないし防止することが示され、諸臓器および血液などに影響を及ぼさない治療薬として、今後、ヒトにおいても骨粗鬆症をはじめとした骨吸収を伴う疾患に寄与してくると考えられた。

学位論文審査の要旨

松果体から分泌されるメラトニンの加齢による分泌量低下が、骨粗鬆症の発生増加時期と相関する疫学的報告に注目し、メラトニンが骨粗鬆症の予防に有効になると仮説を立て、メラトニンの骨に及ぼす作用の研究に着手した。メラトニンには正常ヒト骨芽細胞の細胞増殖およびタイプ I コラーゲン合成促進作用があること、メラトニン腹腔内投与が、成長期のマウス、成熟ラットの骨吸収を抑制し、骨密度および骨量を増加させる作用があること、メラトニン経口投与が、成熟マウスの骨量を増加

させることは報告されていたが、メラトニン投与が、卵巣摘出術 (OVX) 施行後に生じるラットの骨量減少を防止できるかどうかに関しては明らかにされていない。本研究ではin vivoにおいてメラトニン投与が、OVXラットに及ぼす影響を調べる目的で行われ、メラトニンを5週間および8週間、毎日腹腔内投与し、メラトニンのOVXラットにおける骨量減少の抑制効果について検討した。メラトニン5週間投与群は6ヶ月齢のWistar系雌ラットを3群に分け、卵巣摘出偽手術後vehicleのみ腹腔

内投与した対照群, OVX後vehicleのみ腹腔内投与した群, OVX後10mg/kgb.w./dayのメラトニンを腹腔内投与した実験群とした。さらにメラトニン腹腔内投与の至適濃度, 長期投与の効果を調べるため, 同ラットを8週間投与群とし5群 (n=6) に分け, 偽手術後vehicleのみ腹腔内投与した対照群, OVX後vehicleのみの群, 5, 10, 50mg/kgb.w./dayのメラトニン投与実験群とした。メラトニン投与が5週間, 8週間後の骨に及ぼす影響を, 実験終了後屠殺し体重, 諸臓器重量および血液生化学マーカー測定, 脛骨骨形態計測, 骨塩量測定にて検討し, 以下の結論を得た。OVX施行骨粗鬆症モデルラットにおいて, メラトニン投与はOVXによる高回転型代謝を遅延

させ, 海綿骨量の減少を有意に抑制し, 対照群とほぼ同レベルに維持し続け, 著しい骨吸収および骨塩量の低下を抑制した。さらに低濃度および長期投与でも海綿骨量減少の抑制と強力な骨吸収抑制効果を認めた。閉経後骨粗鬆症モデルラットにおいて, メラトニンは骨吸収機能の抑制作用により, 骨量を維持し, 諸臓器および血液などに影響を及ぼさない治療薬として, 今後, ヒトにおいても歯科臨床領域に限らず, 骨粗鬆症をはじめとした骨吸収を伴う疾患に大きく寄与してくることを示唆する研究と考えられる。

よって審査の結果, 本論文は歯科医学の進歩発展に寄与するところが大きく, 学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	佐藤 大 介 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	乙 第117号
学位授与の日付	平成15年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	ヒト脱灰象牙質とリコンビナントヒトBMP-2の複合インプラントによる骨誘導
論文審査委員	主 査 教 授 有 末 眞 副 査 教 授 賀 来 亨 副 査 教 授 田 隈 泰 信

論文内容の要旨

[背景と目的]

硬組織再生療法が飛躍的に発展を遂げた背景には様々な材料・生体由来材料の開発が挙げられる。しかしながら, 現在, 牛海綿状脳症やクロイツフェルトヤコブ病の発症等に代表されるように生体由来材料の安全性に対する関心が高まり, 従来の生体材料を再度見直す動きがある。したがって, 自家細胞・組織を生体材料として利用することができれば最も安全な移植材料といえる。

従来, 骨内インプラント植立前処置としての上顎洞底挙手術やインプラント植立部の局所骨増生を目的とした手術において, 自家骨移植あるいはリン酸カルシウム系セラミックなどの無細胞性生体材料が使用されてきた。骨移植に関しては, 特に新鮮自家骨移植が広く行われ良好な成績を上げているが, この方法には骨採取における

健常組織の2次的手術侵襲が問題である。無細胞性生体材料では主に, ハイドロキシアパタイトが組織親和性に優れ骨伝導能を有することから, 骨補填剤として広く用いられている。しかし, アパタイトは非吸収性であるため, 生体内で永久に残存し, 真の硬組織再生を阻害することや, 骨誘導能を有さないため, アパタイト単独利用での早期の予知性の高い骨増生は望めないことが指摘されている。

1965年Uristは, 骨基質内に骨誘導物質が存在することを発見した。1967年Yeomans & Uristは象牙質にも骨誘導物質が存在することを明らかにし, ウサギ由来脱灰象牙質が未分化間葉系細胞を骨原性細胞に分化させ軟骨・骨へと誘導することを証明した。1971年Uristは, この骨誘導物質を抽出・部分精製し, 骨形成タンパク質 (BMP) と命名した。1990年Wangらによって, リコンビナントヒ

トBMPが発表された。

ヒト象牙質には直径0.9~2.5 μ mの象牙細管が1mm²中あたり2万本から5万本存在し、象牙質中の有機質は重量比で約20%を占め、その主成分は骨と同様にI型コラーゲンである。また、骨誘導能を有するBMPやトランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、インスリン様増殖因子 (IGF) などの成長因子を含有していることが明かにされている。

本研究では、ヒト抜去歯象牙質を直径0.4~0.8mmの顆粒状として再利用し、ヒト脱灰象牙質顆粒 (DDM) とし、無胸腺マウスおよびWistar系ラット背部皮下にDDMの埋植を行い、骨誘導活性とrhBMP-2投与担体としての効果を組織学的観察および生化学的分析により検討した。生化学的分析は、石灰化の指標であるALP活性、Ca含有量を測定した。

【材料と方法】

ヒト脱灰象牙質の調整：生活歯の埋伏智歯を抜去後、粉碎機を用いて液体窒素中で粉碎し粒径400~800 μ mのサイズを回収した。氷冷下で洗浄、脱脂、完全脱灰後、凍結乾燥しDDMとした。rhBMP-2：山之内製薬より供与されたものを使用した。

実験1：無胸腺マウス背部皮下DDM単独骨誘導実験

DDM 70mgを無胸腺マウス (4週齢、オス) 背部皮下に埋植した。摘出は4週後に行い10%中性ホルマリン浸漬固定後、脱灰標本を作製し、H-E染色を施し、組織学的観察を行った。

実験2：Wistar系ラット背部皮下BMP濃度依存実験

DDM 70mgにBMP量0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 μ gをそれぞれ添加し、Wistar系ラット (4週齢、オス) 背部皮下に埋植した。摘出は3週後に行いH-E染色標本を作製し組織学的観察とWeibel法の形態計測を行った。

実験3：Wistar系ラット背部皮下DDM/BMP埋植の経時的観察・生化学的分析

DDM 70mg/BMP 5.0 μ g群とDDM 70mg単独群を設定した。埋植はラット背部皮下に行い、1, 2, 3, 4, 8, 16, 32週後に摘出した。H-E染色を施し、経時的に組織学的観察とWeibel法の形態計測を行った。生化学的分析としてALP活性、Ca量を測定した。

【結 果】

実験1：無胸腺マウスでは、DDM表面に新生骨が形成され、一部でDDM顆粒間を架橋するように軟骨の形成が観察された。

実験2：BMP量0 μ gでは、軟骨・骨誘導は認められなかった。BMP量0.5 μ gでは、DDM表面に添加性に軟骨が

少量形成されていた。BMP量5.0 μ gでは、DDM顆粒間を架橋するように活発な骨形成が認められ、新生骨は梁状を呈し、骨髄も観察された。

形態計測：BMP量5.0 μ gでは、骨組織は20.3 \pm 4.6%と最大値を示し、骨髄が6.0 \pm 1.6%であった。

実験3：DDM/BMP群、1週後よりDDM表面に添加性に軟骨と骨が形成されていた。3週ではDDM顆粒間を架橋するように活発な新生骨を形成していた。8週では骨梁は太くなり、骨梁間の骨髄形成が進行し、一部では脂肪髄が認められた。32週後では骨髄の大部分は脂肪髄で占められていた。DDM単独群、全観察期間において軟骨・骨誘導は認められなかった。

形態計測：骨組織は1週で1.3 \pm 0.4%認められ、32週では38.0 \pm 1.4%観察され、1週に比べて有意に骨形成量は増加していた ($p < 0.0001$)。担体であるDDMは、1週で56.3 \pm 5.7%残存していたが32週では、21.0 \pm 2.62%であり、1週と比べて有意に吸収されていた ($p < 0.0001$)。

生化学的分析：DDM/BMP群のALP活性は1週で最高値 (4.7IU/Pellet) を示し、経時的に減少していった。

DDM/BMP群のCa量は経時的に増加し、4週で最大値 (11.6mg/Pellet) を示した。

【結 論】

ヒト脱灰象牙質顆粒インプラントによる骨誘導活性とリコンビナントヒトBMP-2投与担体としての効果を、組織形態学・生化学的に検討し、以下の結論を得た。

1. ヒトDDM顆粒単独は無胸腺マウス背部皮下で軟骨・骨誘導が認められた。
2. ヒトDDM 70mgに極めて微量なBMP量0.5 μ gを含浸した結果、ラット背部皮下 (異種移植) においても軟骨・骨を誘導した。BMP量5.0 μ gの含浸では、骨・骨髄が総面積の26.3%と最大値を示した。
3. DDM 70mg/BMP 5.0 μ g群は、4週で骨・骨髄が総面積の36%を占め、Ca量は最大値を示した。32週では骨・骨髄が79%を占め、DDMは21%残留していた。一方、DDM単独群では、ラット背部皮下において、顆粒間で未分化間葉細胞の著明な増殖が認められたものの軟骨・骨誘導は認められなかった。

以上より、ヒト脱灰象牙質はリコンビナントヒトBMP-2の担体として骨原性細胞の増殖・分化の足場となって、経時的に吸収されながら骨・骨髄へと置換されることが明らかとなり、骨置換型マテリアルとして再利用が可能であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

顎口腔系の機能回復においては硬組織の再建を必要とすることが多く、局所骨増生は重要な課題となっている。従来、骨増生法として自家骨移植が広く行われ、良好な成績を上げているが、象牙質にBMPが存在することが明らかとなり脱灰象牙質の有用性についても報告されている。しかし、骨誘導活性について検討したものは少なく、不明の点が多い。

そこで本研究は新たな生物学的手法による硬組織再生方法の確立を目的に、ヒト抜去歯象牙質を再利用し、ヒト脱灰象牙質顆粒(以下DDM)インプラントによる骨誘導活性、吸収過程、およびrhBMP-2投与担体としての効果を組織形態学・生化学的に検討した。

本研究において、申請者は先ず、DDMを無胸腺マウス背部皮下に埋植し、4週後に軟骨・骨形成が誘導されることを確認した。しかし、Wistar系ラットでは確認されずDDMの有する骨誘導能は低く、BMP含有量が低いことが示唆された。DDMのrhBMP-2投与担体としての効果では、DDM/BMP 0.5 μ gで、埋植3週後にWistar系ラット背部皮下(異種移植)に軟骨・骨が誘導され、BMPの投与量の増加とともに、骨・骨髄の形成量はBMP濃度依存性に増加を示した。Wistar系ラット背部皮下DDM/BMP 5.0 μ g埋植の経時的観察・生化学的分析では、骨・

骨髄の形成量は経時的に増加し32週では79%を占め、それに伴いDDMの残留量は21%と減少を示した。一方DDM単独群では顆粒間で未分化間葉細胞の著明な増殖が認められたものの軟骨・骨誘導は埋植後32週においても観察されず、DDMの大部分は残留していた。また、BMP添加群の埋植4週までの生化学的分析では、ALPは1週で最高値を示し、以後経時的に減少傾向を示し、Caは経時的に増加し、4週で最高値を示した。

これらの結果から、ヒト脱灰象牙質は骨基質と同様にBMPを含有するコラーゲン基質であり、さらにBMPを併用することで骨形成シグナルを増幅し、骨形成を促進した可能性が示された。またヒト脱灰象牙質はリコンビナントヒトBMP-2の担体として骨原性細胞の増殖・分化の足場となって、経時的に吸収されながら骨・骨髄へと置換されることが明らかとなり、骨置換型マテリアルとして再利用が可能であることが示唆した。

以上のことから、本論文は、ヒト象牙質を再利用し、象牙質の骨誘導活性とリコンビナントヒト骨形成タンパク質-2 (rhBMP-2) 投与担体としての効果を組織形態学・生化学的に解明し、象牙質を用いた骨誘導の重要な基礎研究として硬組織再建に寄与するところが大きく、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	八 幡 祥 子 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	乙 第64号
学位授与の日付	平成15年 3月21日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 2 項該当 (論文博士)
学位論文題目	歯種・歯面部位別エナメル質表層フッ素濃度分布と 生活環境因子との関連
論文審査委員	主 査 教 授 五十嵐 清 治 副 査 教 授 田 隈 泰 信 副 査 教 授 大 野 弘 機

論 文 内 容 の 要 旨

【緒 言】

齲蝕を予防する場合、各地域の社会的特性や口腔衛生に関する現状を把握し、齲蝕罹患の部位特異性や増加に及ぼす影響を、齲蝕発生における宿主(歯質)側の要因から明らかにすることが、必要と思われる。すなわち、歯質の性状、特にエナメル質表層のF濃度を地域別に測定し、飲料水などの生活環境因子や唾液、プラークなど種々の口腔内環境因子とF濃度分布との関係を明らかにする必要がある。しかし、齲蝕発生部位特異性と関連してenamel assayにより、歯種別および歯面部位別F濃度を細かく測定し、比較検討した一連の研究は現在のところ認められない。また、中国人のエナメル質表層F濃度に関する研究も皆無である。

そこで、生活環境の異なると思われる中国北京市(以下、北京)で得られた上・下顎中切歯および上・下顎第一大臼歯の4歯種を対象に、Micro-Sampling-Techniqueを応用したenamel assayにより、歯面部位別にエナメル質表層F濃度について測定し、口腔内における部位特異性について検討した。また、過去に報告されている札幌市および札幌市近郊を対象にして行った日本人の同様報告(以下、札幌)と比較検討した。

【材料および方法】

試料は北京大学第二臨床医学院口腔科で抜去された肉眼的に齲蝕が認められない上顎中切歯9歯(18面)、下顎中切歯11歯(22面)、上顎第一大臼歯8歯(32面)、下顎第一大臼歯8歯(32面)合計36歯(104面)を用いた。抜去後10%中性ホルマリン溶液中に保存しておいた歯を流

水で24時間洗浄し、自然乾燥後、ブラシコーンで30秒間清掃した。中切歯は唇・口蓋(舌)側面の各中央部の1か所、第一大臼歯は頬・口蓋(舌)側面の近遠心最大豊隆部付近(合計4か所)にネイルバーニッシュで約1×1mmのウインドウを作製し、測定面とした。バーニッシュ乾燥後、0.5Mの過塩素酸で脱灰し、Micro-Sampling-Techniqueで、第4層までサンプリングした。Caの測定は原子吸光度計法、Pの測定は比色法、Fの測定はFイオン電極法で測定分析した。F濃度についてはF濃度(Y)と深さ(X)の式 $Y=aX^{-b}$ (中垣ら, 1979年)から算出し、歯種および歯面部位的な差の検定をMann-Whitney U-test, ANOVA, Kruskal-Wallis test, Scheffe's testにより行った。

【結果及び考察】

1. 歯種別エナメル質表層F濃度および各歯における歯面部位別エナメル質表層F濃度

1) 歯種別エナメル質表層F濃度

上・下顎中切歯は唇舌側のF濃度の平均値で、上・下顎第一大臼歯は4部位の平均値で比較した。深さ5~30 μ mにおいて下顎第一大臼歯>上顎第一臼歯>下顎中切歯>上顎中切歯の順にF濃度が高い傾向を示した。

2) 各歯における歯面部位別エナメル質表層F濃度

(1) 上顎中切歯

唇側面、口蓋側面を比較した場合、統計学的有意差は認められなかったが、1~20 μ mの深さにおいて唇側面より口蓋側面のF濃度が高い傾向を示した。これは唾液クリアランスの差、すなわち新鮮唾液にさらされる口蓋側面の方が唾液中のFをより多くの歯面に取り込む結果

濃度が高くなったと思われた。

(2) 下顎中切歯

唇側面、舌側面を比較した場合、統計学的有意差は認められなかったが、1~30 μm のすべての深さにおいて唇側面より舌側面のF濃度が高い傾向を示した。これは唾液クリアランスの差、すなわち舌下腺および顎下腺開口部に近い舌側面が唇側面より多くFを歯面に取り込むためと思われた。

(3) 上顎第一大臼歯

頬側面近心部、頬側面遠心部、口蓋側面近心部、口蓋側面遠心部の4部位について比較した場合、3 μm において危険率5%で部位の差が認められた。その他の深さでは部位の差は認められなかったが、1~30 μm のすべての深さにおいて頬側面遠心部>口蓋側面遠心部>頬側面近心部>口蓋側面近心部の順にF濃度が高い傾向を示した。頬側面遠心部が最も高く口蓋側面近心部が最も低かった理由としては、頬側面は耳下腺開口部に位置し絶えず唾液にさらされていること、遠心側は近心側よりも清掃しづらいためプラークが蓄積しやすい状況にあること、近心舌側咬頭が機能咬頭であることからwear(すりへり)が他の部位に比較して強く起こっていることなどが推察された。

(4) 下顎第一大臼歯

頬側面近心部、頬側面遠心部、舌側面近心部、舌側面遠心部の4部位について比較した場合、5, 10 μm では危険率5%, 20, 30 μm では危険率1%で部位の差が認められた。1~30 μm のすべての深さにおいて舌側面遠心部>舌側面近心部>頬側面遠心部>頬側面近心部の順にF濃度が高い傾向を示した。舌側面遠心部が最も高く頬側面近心部が最も低かった理由としては、舌側面は舌下腺および顎下腺に分泌される唾液に絶えずさらされていること、遠心側は近心側よりも清掃しづらいためプラークが蓄積しやすい状況にあること、頬側近心咬頭が機能咬頭であることからwear(すりへり)が他の部位に比較して強く起こっていることなどが推察された。

2. 最もF濃度が高かった部位を100%とした場合の歯面部位別エナメル質表層F濃度分布

下顎中切歯舌側面、上顎第一大臼歯頬側面遠心部、下顎第一大臼歯舌側面遠心部ではF濃度が高い傾向を示し、反対に上顎中切歯唇側面、上顎第一大臼歯口蓋側面近心部、下顎第一大臼歯頬側面近心部ではF濃度が低い

傾向を示した(1, 3, 5 μm : $p < 0.05$)。この理由としては、F濃度が高い部位では唾液クリアランスが良く、プラークの蓄積量も多い。反対にF濃度が低い部位では唾液クリアランスが悪く、プラークの蓄積量が少ないためと推察された。このようなF濃度分布は上顎前歯部唇側面、上顎臼歯部口蓋側面および下顎臼歯部頬側面に齲蝕が多いという齲蝕罹患の部位特異性とも一致していた。

3. 地域別エナメル質表層F濃度

下顎中切歯、上・下顎第一大臼歯のすべての深さにおいて北京の方が札幌よりF濃度が高い傾向を示した。この理由としては北京の水道水中のF濃度が札幌より15倍高いことに加え、その摂取頻度も有意に高かったことによると推察された。従って、水道水中のF濃度はエナメル質表層F濃度を高くすることが示唆された。

[結 論]

1. 歯種別に比較したエナメル質表層F濃度は、5~30 μm の深さにおいて下顎第一大臼歯>上顎第一大臼歯>下顎中切歯>上顎中切歯の順であった。また、各歯における歯面部位別エナメル質表層F濃度は、上顎中切歯では口蓋側面、下顎中切歯では舌側面、上顎第一大臼歯では頬側面遠心部、下顎第一大臼歯では舌側面遠心部において、高い傾向を示した。
2. 最もF濃度が高かった部位を100%とした場合の歯面部位別エナメル質表層F濃度分布は、唾液クリアランスの良い部分やプラークの蓄積量の多い部位(下顎中切歯舌側面、上顎第一大臼歯頬側面遠心部、下顎第一大臼歯舌側面遠心部)ではF濃度が高い傾向を示し、反対に唾液クリアランスの悪い部位やプラークの蓄積量の少ない部位(上顎中切歯唇側面、上顎第一大臼歯口蓋側面近心部、下顎第一大臼歯頬側面近心部)ではF濃度が低い傾向を示した。
3. 生活環境因子の1つである水道水中のF濃度が高かった北京のエナメル質表層F濃度は、歯種、歯面部位別さらにすべての深さにおいて、札幌より高い傾向を示した。

以上の結果より、飲料水などの生活環境因子や、唾液、プラークなど種々の口腔内環境因子がエナメル質表層におけるF濃度分布に影響し、齲蝕発生の部位特異性と強く相関することが推察された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

従来、フッ化物の齲蝕予防メカニズムは、歯質の耐酸性増加と乳酸産生抑制として捉えられてきたが、現在で

はフッ素（以下、Fと略す）イオンを作用させることによって、歯表面の脱灰を防ぐと共に、脱灰部の再石灰化を促進させると考えられている。しかし、口腔内のF濃度分布と唾液、プラークなどとの関係については、歯種・歯面部位別F濃度を測定し、比較検討した研究は現在のところ認められない。そこで本研究では、中国・北京市で得られた上・下顎中切歯および上・下顎第一大臼歯の4歯種を対象に、Micro-Sampling-Techniqueを応用したenamel assayにより、歯種・歯面部位別にエナメル質表層F濃度について測定し、口腔内における部位特異性について検討した。また、過去に報告されている日本人の抜去歯（札幌市）の結果と比較検討し、以下の結果を得た。

1. 歯種別に比較したエナメル質表層F濃度は、下顎第一大臼歯>上顎第一大臼歯>下顎中切歯>上顎中切歯の順であった。また、各歯における歯面・部位別エナメル質表層F濃度は、上顎中切歯では口蓋側面、下顎中切歯では舌側面、上顎第一大臼歯では頬側面遠心部、下顎第一大臼歯では舌側面遠心部において、高い傾向を示した。
2. 最もF濃度が高かった部位を100%とした場合の歯面部位別エナメル質表層F濃度分布は、唾液クリアランスの良い部位やプラークの蓄積量の多い部位（下顎中切歯舌側面、上顎第一大臼歯頬側面遠心部、下顎第一大臼歯舌側面遠心部）ではF濃度が高い傾向を示し、反対に唾液クリアランスの悪い部位やプラークの蓄積量の少ない部位（上顎中切歯唇側面、上顎第一大臼歯口蓋側面近心部、下顎第一大臼歯頬側面近心部）ではF濃度が低い傾向を示した。
3. 北京の抜去歯による歯種・歯面部位別F濃度は、日本人の抜去歯に比べ、すべての深さにおいて高い傾向を示した。このことは、生活環境因子の一つである水道水中のF濃度に関連していることが示唆された。

以上の結果より、本研究は飲料水などの生活環境因子や、唾液、プラークなど種々の口腔内環境因子がエナメル質表層におけるF濃度分布に影響し、齲蝕発生の部位特異性と強く相関していることを明らかにした。このことは今後の歯科医学、特に齲蝕学（予防領域）の進歩発展に寄与するところ大であり、審査の結果、本論文は博士（歯学）の学位授与に値すると判定した。