

独立に抑制させることができることを示唆している。

そこで、本研究では、金以上に粒界反応を抑制し、かつ、ごく微量で有効な添加元素を見いだすための実験を行った。その結果、Sn, Cr, Inを見いだした。特にSnは400°Cで無添加時に比較してその成長速度を1/18に低下させた。次に、このSnによる抑制機構を解明するために、本合金のノジュール構成相のPdCu規則相とAg-rich相について2種類の合金を溶製し、各合金の相変態に及ぼすSnの影響を検討した。その結果、PdCuの規則相の規則化は促進したがAg-rich相の粒界反応は著しく抑制され

た。このことから、Ag-Pd-Cu合金のSnによる粒界反応抑制の機構は粒内反応が促進された結果、粒界反応のための化学的駆動力が低下したことによると結論づけられた。また、微量のCr添加により金銀パラジウム合金の粒内反応を促進させ、一方、ノジュールの成長を遅延させることができた。

以上のように、本論文は、金銀パラジウム合金のみならず他の貴金属合金の粒内・粒界反応に及ぼす添加元素の影響を理解する上で重要な示唆に富む内容を有するものであり、審査の結果、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	中 出 修(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙 第7号
学位授与の日付	平成5年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(論文博士)
学位論文題目	犬オステオカルシンの一次構造解析, 抗体作製および免疫組織化学的研究
論文審査委員	主 査 教 授 賀 来 亨 副 査 教 授 市 田 篤 郎 副 査 教 授 武 田 正 子

論 文 内 容 の 要 旨

1. 緒 言

オステオカルシンは別名、骨のGla含有蛋白(Bone Gla Protein)とも呼ばれ、骨の全蛋白質の1-2%、非コラーゲン蛋白質の10-20%を占めている。その分子量は約6,000で、47-50個のアミノ酸からなる。現在までにその一次構造についてはヒト、サル、ニワトリ、ウシ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ワラビー、ネコ、メカジキ、エミューなどの報告がある。

オステオカルシンは循環血液中にも微量ながら存在し、その血中濃度の測定は骨代謝回転を反映するマーカーの一つとして、また免疫組織化学的研究や骨芽細胞系の細胞のin vitroの研究においては、細胞の分化マーカーとしての意義が注目されている。近年、高齢化社会到来による骨粗鬆症の増加などにより骨代謝に関する研究が注目され、これらの研究にラット、マウスなどのげっ

歯類よりヒトにより近い代謝回転を有する犬を用いた実験系の必要性がいわれている。しかし、これまで犬のオステオカルシンに関する研究はほとんどなく、犬のオステオカルシンの一次構造および免疫組織化学的局在に関する研究はない。

本研究では、犬オステオカルシンの一次構造解析、抗体作製および正常骨、軟骨組織における免疫組織化学的検索を行い、犬を用いた種々の骨に関する研究に有用と思われるので報告する。

2. 実験方法

1) 材 料

ビーグル犬の皮質骨を摘出し、液体窒素を注ぎ、ステンレス製の杵で150-710 μ mの大きさまで粉碎した。粉碎骨はプロテアーゼインヒビターを添加したトリス緩衝液で洗浄後、脱脂し材料とした。

2) 抽出および精製法

抽出のための脱灰液はPriceらの方法に従い20%ギ酸を用いた。抽出後の精製はGundbergの方法に準じカラムクロマトグラフィーにより行い精製した。

3) 純度の検定

精製犬オステオカルシンの純度の検定はSDS-PAGEおよびHPLCにより行った。

4) 一次構造の解析

システイン残基の分析のためオステオカルシン中のシステインの還元およびピリジリエチル化を行った後、全蛋白およびそのプロテアーゼ消化後のペプチドをABI社製477A Protein SequencerにてN末端より自動エドマン分解し、同社製120A PTH AnalyzerにてPTHアミノ酸の同定を行った。

5) アミノ酸組成分析

ピリジリエチル化犬オステオカルシンを1回の分析につき蛋白量当り100 μ g秤量し、窒素置換、減圧封管下にて酸加水分解(6N-HCl, 110°C, 24hr.)およびアルカリ加水分解(2N-KOH, 24hr.)を行った。分解物は高速アミノ酸分析装置(日立858型)を用いて、アミノ酸の組成分析を行った。

6) 抗犬オステオカルシン抗体の作製

精製犬オステオカルシンを家兎の背部皮下に免疫を行い、抗血清を得た。得られた抗血清はProtein A固定化ゲルカラム(Ampure PAKit)によりIgGを分離し、抗犬オステオカルシン抗体とした。

7) 抗体価およびその特異性の検討

抗体価の検討はELISA法により行った。また抗体の特異性の検討はWestern blotting法により行った。

8) 免疫組織化学的検討

動物は1ヵ月齢の雄ビーグル犬を用い、頭頂骨組織および第一中足骨を10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬固定した。脱脂後、ギ酸クエン酸ナトリウム液にて脱灰し、パラフィン包埋、約4 μ mの薄切標本を作製した。オステオカルシンの免疫組織化学的染色は20倍に希釈した抗犬オステオカルシン抗体を一次抗体としたavidin-biotin complex法により行った。

3. 結 果

1) 精製について

犬皮質骨のギ酸脱灰抽出物よりカラムクロマトグラフィーにより犬オステオカルシンを精製し、SDP-PAGEでシングルバンド(分子量, 12,000), またHPLCでシングルピークを示す精製犬オステオカルシンを得た。

2) 一次構造解析

一次構造より算定された分子量は5,682(残基数49個)

で、N末端よりYLDSGLGAPVPPYDPLXPKRXCXLNPNCDELADHIGFQEAYRRFYGPV(X=G1a)であり、G1a(17,21,24位)の位置、Cys(23,29位)の位置、全体の配列など他の動物と比較的高い相同性が認められた。

3) 抗体の作製

作製抗体はELISA法で精製犬オステオカルシンと約5,000倍希釈まで反応する抗犬オステオカルシン抗体が得られ、Western blotting法による抗体の特異性の検討ではギ酸抽出粗蛋白との反応で、オステオカルシンにのみ反応することが確認された。

4) 免疫組織化学的検討

オステオカルシンの局在は骨芽細胞、骨細胞、一部の前骨芽細胞および一部の破骨細胞に陽性反応として認められた。対照ではこのような陽性反応は認められなかった。また骨膜部の線維芽細胞および成長軟骨層における観察ではその局在は認められなかった。

4. 考 察

従来よりオステオカルシンには種間で高い相同性があることがいわれていたが、犬のオステオカルシンについても同様の結果を得た。

オステオカルシンの免疫交差性についてPatterson-Allenらは抗ウシオステオカルシンウサギ血清のRIA法による実験でウシとヒト、サル、ウマなどには交差性が認められるが、ウシとラット、犬およびモルモットには交差性が認められないことを報告している。さらにPatterson-Allenらはラットと犬の間に交差性があることを報告しているが、犬オステオカルシンの一次構造はヤギ、ウシ、ヒツジなどと相同性が高いが、ラットオステオカルシンとはこれらの動物ほど相同性が高いとはいえず、今後精製犬オステオカルシンおよび抗犬オステオカルシン抗体を用いた犬オステオカルシンの他動物との交差性の有無について詳しい検索が必要と思われる。

オステオカルシンの免疫組織化学的局在についてはその局在が比較的成熟した骨芽細胞や骨細胞のみならず一部の破骨細胞に陽性反応として認められた。この結果は1989年、Vermeulenらのヒト骨組織における報告と一致した結果であり、彼ら同様破骨細胞での局在は破骨細胞が骨を吸収する際、細胞内に取り込んだオステオカルシンに反応した結果だと考えている。

5. 結 論

本研究により得られた成果は、犬を用いた種々の骨に関する研究に有用と思われる。

学位論文審査の要旨

オステオカルシンは別名、骨のGla含有蛋白(Bone Gla Protein)とも呼ばれ、骨の非コラーゲン蛋白質の10-20%を占めており、現在までにその一次構造についてはヒト、サル、ニワトリ、ウシ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ワラビー、ネコ、メカジキ、エミューなどの報告がある。オステオカルシンは血中にも微量ながら存在し、その濃度の測定は骨代謝回転を反映するマーカーの一つとして、また免疫組織化学的研究や骨芽細胞系の細胞のin vitroの研究においては、細胞の分化マーカーとしての意義が注目されている。

しかし、これまで犬のオステオカルシンに関する研究は少なく、犬のオステオカルシンの一次構造および免疫組織化学的局在に関する研究はない。本研究は犬オステオカルシンの精製から一次構造解析、抗体作製および免疫組織化学的検索までの一連の研究であり、結果の概要は以下のごとくである。

1. 犬皮質骨よりギ酸脱灰抽出、カラムクロマトグラフィーにより犬オステオカルシンを精製した。
2. 犬オステオカルシンの一次構造はYLD SGLGAPVPYPDPLXPKRXVCXLNPNCDLADHIGFQEAYRRFYGPV (X=Gla, アミノ酸残

基数49個)、分子量5,682で、他の哺乳類動物と比較的高い相同性が見られた。

3. 精製犬オステオカルシンを家兎に免疫し、抗体を作製した。

4. 作製抗体による免疫組織化学的局在に関する検索では、オステオカルシンの局在は骨芽細胞、骨細胞、一部の前骨芽細胞および一部の破骨細胞で認められたが、軟骨細胞、線維芽細胞では認められなかった。

本研究は抜歯窩の治癒過程、歯科インプラントの実験的研究など歯科領域でも繁用されている。またヒトと類似した骨代謝様式を有し、ヒトの骨粗鬆症モデルとして最もふさわしい動物の一つとされている犬で行った研究として興味深く、歯学および骨代謝研究など広い分野での応用が期待される。

本審査委員会では、1)研究の目的、意義、2)オステオカルシンの血清マーカーとしての意義、3)犬と他動物のオステオカルシンの相同性および免疫交差性、4)オステオカルシンの機能などについて質問が行われたが、適切な回答が得られた。本論文は歯学の発展に寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位論文として価値あるものと判定した。