

グラフィーを用いて組織学的検索を行った。

その結果、エナメル・セメント境に発生したごく初期の根面齲蝕は、エナメル質をセメント質が覆う形態では両者の接するところから象牙質に及び、また両者が根接する形態ではその境界から象牙質に到達し、この時のエナメル・セメント境のセメント質は再石灰化しており、齲蝕が認められないことが多いことを明らかにした。また、エナメル・セメント境に象牙質が露出している形態では、露出している象牙質に齲蝕が発生し、内部に拡大進行していることを明らかにし、エナメル・セメント境のセメント質は再石灰化しやすく、再石灰化したこのセメント質は齲蝕侵襲に対し抵抗性を有すると考察した。さらに、エナメル・セメント境のエナメル質に初発することもあることを明らかにした。

次に本申請者は、セメント質の成長線が齲蝕の深部方

向への進行を抑制・停滞させていること、またX線吸収度の高いセメント・象牙境が象牙質最外層の透明層に一致し、齲蝕の深部方向への進行を抑制・停滞させていること、そして、齲蝕がトームスの顆粒層で著明に側方に拡大していることを明らかにした。

さらに根面齲蝕が象牙細管に及ぶと、それに沿って深部方向に進行し、さらに象牙質の成長線に沿って側方に進行拡大することも確認した。

本申請者の実験目的および方法、結果、考察、結論等は妥当である。これらの知見は、今後の根面齲蝕の予防法や修復法を研究するうえで有用な基礎を築いたものといえる。

以上のことから、本論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと判定した。

氏名・(本籍)	齋藤隆史(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第24号
学位授与の日付	平成6年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)
学位論文題目	骨形成タンパク質(BMP)／線維状ガラス膜(FGM)複合体による軟骨性骨化モデルの開発
論文審査委員	主査 教授 松田浩一 副査 教授 市田篤郎 副査 教授 賀来亨

論文内容の要旨

1.【目的】口腔領域において、顎骨の再建や顎堤の挙上、歯槽骨の再生、覆髄、生活歯髄切断など硬組織の再建を必要とする症例が多い。これらの症例に対して適切な治療法を開発するためには、硬組織形成という複雑な生物学的メカニズムの十分な理解が必要とされる。

近年、骨基質中に存在して骨誘導能を有する制御因子として、骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein: BMP)が発見され注目を集めている。従来よりBMPによる異所性軟骨・骨誘導実験には主として骨不溶性基質(骨の脱灰抽出残渣; Insoluble Bone Matrix: IBM)が担体として使用されてきた。しかし、IBMは化学的性質が明らかではなく、生体内吸収性であり、その形と大きさが逐次変化するため、軟骨・骨形成の方向性、

連続性を検討するのが困難である。また、短期間のうちに軟骨性骨化が進行するため、軟骨性骨化の一連の過程を詳細に分析、観察することが困難であるという欠点を有しているため、BMPの作用機構、あるいはBMPにより誘導される軟骨性骨化過程を分析するうえでIBMは適切ではない。

そこで、軟骨性骨化のメカニズムを追求するために、BMPの担体として、非吸収性担体であり、細胞外マトリックス、特にコラーゲン線維の三次元メッシュ構造をBio-mimicした構造を有する線維状ガラス膜(Fibrous Glass Membrane: FGM)を使用することにより、BMP/FGM複合体が生体内での自然の軟骨性骨形成をシミュレートして、軟骨性骨化のメカニズムを追求する

ことが可能な系と成り得るかを検討した。

2. 【材料および方法】 BMPは、成牛骨を4M塩酸グアニジンにて抽出し、hydroxyapatite, Heparin-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-300HRの3段階のcolumn chromatographyを経て部分精製したS-300 BMP画分、および遺伝子工学的手法を用いて合成された純粋な recombinant BMP2(rh-BMP2)を使用した。担体として、FGM-coarse (Advantec GA-100, メッシュサイズ1.0 μ m, 線径1.0 μ m, 大きさ10×5×0.45mm, 重量6mg) と、FGM-fine (Advantec GA-55, メッシュサイズ0.6 μ m, 線径1.0 μ m, 大きさ10×5×0.44mm, 重量6mg) ならびにIBM (粒径0.2~0.7mm)を使用した。

(実験I) 従来より担体として用いられてきたIBMを対照として、FGM-coarseが軟骨性骨化のメカニズムを解明するのに有用な担体と成り得るかを検討した。S-300 BMP 0.3mgとFGM-coarse 6mg, S-300BMP 0.3mgとIBM 20mgをそれぞれ複合させて、Wistar-King AH系, 雄, 4週齢ラットの背部皮下に埋植した。埋植後, 1, 2, 3そして4週で摘出して, 骨形成の指標としてカルシウム (Ca) 含有量とアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を, 軟骨形成の指標としてII型コラーゲン含有量を, さらに軟骨細胞の最終分化の指標としてX型コラーゲンの有無を生化学的に分析し, 同時に形態学的観察を行った。

(実験II) S-300 BMP中の來雑物の影響を排除するために, 純粋な rhBMP2 を使用して, rhBMP2/FGM-coarse複合体による軟骨・骨形成を分析した。また, メッシュサイズの小さいFGM-fineを使用して, BMPの作用発現に対するFGMのメッシュサイズの影響を検討した。rhBMP2 1.0 μ mとFGM-fine 6mgをそれぞれ複合させて, 実験Iと同様に埋植, 摘出して生化学的分析, および形態学的観察を行った。

3. 【結果および考察】(実験I) 形態学的観察: S-300 BMP/IBM群では, 埋植後1週でIBM粒子間に軟骨が形成されていたが, 軟骨組織はそれぞれ孤立しており, 軟骨分化の方向が明確ではなかった。2週では軟骨に接して骨組織が形成されており, 3週では造血骨髄を伴う旺盛な骨形成が認められた。一方, S-300 BMP/FGM-coarse群では, 1週より膜内部に多量の軟骨が連続的に形成され, 2週では膜表層部より骨形成が起これ, その後経時的に膜内部へ骨形成が進行していた。生化学的分析: S-300 BMP/FGM-coarse群におけるCa含有量, ALP活性はS-300 BMP/IBM群と比較すると $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{2}$ と低いものの, II型コラーゲン含有量は約6倍と高い値を示した。また, S-300 BMP/FGM-coarse群3週摘出物においてX型コラーゲンが検出された。

FGM-coarseを担体として使用した場合, IBMと比較すると骨形成量は少ないものの, 連続性, 方向性を有した軟骨性骨化過程は, 生体の成長板軟骨における軟骨性骨化過程と非常に類似しており, 特に軟骨化分化の過程が強調されていた。したがって, S-300 BMP/FGM-coarse複合体による軟骨・骨形成過程は, 軟骨性骨形成のメカニズムを追求するうえで有用なモデルであることが明らかとなった。

(実験II) 形態学的観察: rhBMP2/FGM-coarse群の1週では膜内部への未分化間葉細胞の集積は認められなかった。2週では多量の軟骨が膜内部に形成されていたが, 膜表層部での骨形成は認められなかった。しかし, 3週では多量の骨形成が認められ, 4週では膜内部に骨髄組織が形成されていた。生化学的分析: Ca含有量, ALP活性, II型コラーゲン含有量ともにS-300 BMP/FGM-coarse群と同様な傾向を示していた。

したがって, S-300 BMP/FGM-coarse複合体と比較すると軟骨・骨形成過程に明らかな差が認められた。さらに, BMPの補助因子の分析が必要であろう。

FGM-coarseの内部に多量の軟骨が形成されたことは, ガラス線維の微細なメッシュ構造が血管侵入を阻止することにより膜内部に低酸素状態をつくり, 遊走してきた未分化間葉細胞を優先的に軟骨細胞に分化誘導したものと考えられる。その後, 細胞の侵入によりFGM-coarseのメッシュ構造が次第に緩やかになり, 毛細血管の侵入が可能となるため, 骨形成が表層より内部に向かって進行したものと考えられる。

また, rhBMP2/FGM-fine群では軟骨・骨形成ともに認められず, BMPの作用発現には未分化間葉細胞の著明な集積を許容する環境が重要であると考えられる。

4. 【結論】

1. BMP/FGM-fine複合体は, 従来より用いられてきたBMP/IBM複合体とは異なり, 連続性, 方向性をもって軟骨・骨形成を誘導することが明らかとなり, 軟骨性骨化研究のより優れたモデルであることが示された。
2. S-300 BMP/FGM-coarse複合体において, 軟骨の分化過程を生化学的に追求した結果, II型コラーゲンの形成量は, S-300 BMP/IBMと比較すると約6倍に達することが明らかになった。また, 軟骨細胞の最終分化のマーカーであり, 軟骨性骨化メカニズム解明の鍵とされているX型コラーゲンをS-300 BMP/FGM-coarse複合体3週摘出物において検出することができた。
3. 部分精製S-300 BMPと純粋なrhBMP2の間には, 軟骨・骨形成過程に明らかな差が認められた。

4. FGM-coarseでは軟骨性骨化が顕著に観察されたのに対して、FGM-fineでは全く認められず、線維状ガラ

ス膜のメッシュ構造の影響が明らかに実証された。

学位論文審査の要旨

口腔領域において硬組織の再建は重要な課題であり、適切で効果的な硬組織再建法を開発するためには、硬組織形成という複雑な生物学的メカニズムの十分な理解が必要とされる。骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein: BMP) は、不溶性骨基質 (Insoluble Bone Matrix: IBM) を、担体として異所性に埋植すると軟骨性骨化を経て骨組織を誘導することが知られている。しかし、BMP誘導軟骨性骨化のメカニズムを追求するうえで、IBMは、生体内吸収性であり、その形と大きさが逐次変化するため、軟骨分化の方向性、連続性を検討するのに適さず、また、短期間のうちに軟骨性骨化が進行するため、軟骨性骨化の一連の過程を詳細に分析、観察することが困難であるという欠点を有している。

そこで本申請者は、BMPの担体として、非吸収性であり、細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲン線維の三次元メッシュ構造に類似した構造を有する線維状ガラス膜 (Fibrous Glass Membrane: FGM) を使用することにより、BMP/FGM複合体が生体内での自然の軟骨性骨形成を再現して、軟骨性骨化のメカニズムを追求することが可能な系と成り得るかを検討した。

その結果、S-300 BMP (牛骨由来部分精製BMP) / FGM-coarse複合体は、従来より用いられてきたS-300 BMP/IBM複合体とは異なり連続性、方向性をもって軟骨・骨形成を誘導することが明らかとなり、軟骨の分化過程を生化学的に分析した結果、軟骨形成の指標であるII型コラーゲンの形成量は、S-300 BMP/IBM複合体と比較すると約6倍に達することが明らかとなった。また、全てのクラスのBMPを含有するS-300 BMPと純粋な recombinant human BMP2との比較では、両者ともに軟骨性骨化が認められたものの、軟骨・骨形成過程に明らかな差が認められた。さらに、FGM-coarse (メッシュサイズ1 μ m) では軟骨性骨化が顕著に観察されたのに対して、FGM-fine (メッシュサイズ0.6 μ m) では全く認められず、担体の幾何学的構造の影響が明らかに実証された。

これらより、BMP/FGM-coarse複合体が軟骨性骨化研究の優れたモデルとなることが明らかになった。

以上の結果から、本論文は、歯学の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、本申請者に対して博士 (歯学) を授与するのに十分に値するものと判定した。

氏名・(本籍)	永井康彦 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第25号
学位授与の日付	平成6年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	実験的根面齶蝕の組織学的研究
論文審査委員	主査 教授 松田 浩一 副査 教授 武田 正子 副査 教授 矢嶋 俊彦

論文内容要旨

1. 目的

高齢社会の到来に伴い、高齢者に多い根面齶蝕の予防と治療法に関する研究の必要性が高まっている。

根面齶蝕の形態や進行速度は、歯冠部齶蝕とは異なると考えられているがそれについての組織学的研究は少ない。

実験的根面齶蝕の脱灰過程を脱灰初期より連続的に組