

能性を示唆したものである。

以上の審査結果について、本審査委員会は本論文が歯

科医学の進歩発展に寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値すると判定した。

氏名・（本籍）	河 野 英 司（北海道）
学 位 の 種 類	博 士（歯学）
学 位 記 番 号	乙 第16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 2 項該当（論文博士）
学位論文題目	ヒト歯槽骨由来細胞の 増殖・分化に関する研究
論文審査委員	主 査 教 授 五十嵐 清 治 副 査 教 授 市 田 篤 郎 副 査 教 授 矢 嶋 俊 彦

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 1 目 的

従来の正常ヒト骨芽細胞の培養系研究モデルはほとんどが軟骨内骨化により生じる軟骨性骨由来のものであるのに対し、顎骨は膜内骨化による膜性骨であり、細胞レベルにおいても軟骨性骨とは異なる性格を有していると考えられる。したがって、顎骨や歯槽骨における代謝や種々の形成異常を理解するためには、顎骨・歯槽骨由来の細胞を用いた培養実験系を確立する必要があると思われる。

そこで著者は、ヒト歯槽骨由来骨芽細胞培養系研究モデルを確立することを目的に、正常なヒトの下顎歯槽骨より細胞を分離培養し、その細胞の骨芽細胞様分化形質マーカーについて検索した。

## II 実験材料および方法

### 1. 細胞の分離・培養

本実験に供した細胞は、①21歳女性の下顎左側半埋伏智歯の遠心部皮質骨、②13歳男性の「56 間完全埋伏過剰歯の頬側皮質骨、および③海綿骨、④16歳女性の下顎左側半埋伏智歯周囲の海綿骨の4つの正常ヒト下顎歯槽骨骨片から、Robey and Termineの方法に準じて分離・培養した。すなわち骨片を1.5%コラゲナーゼで37°C、60分間酵素処理した後、ハサミで1mm角程度に細切し、24穴（ウェル）組織培養プレートに移植した。移植骨片の培養は、10%ウシ胎児血清（FBS）、50  $\mu$ g/ml L-アスコ

ルビン酸（AsA）、および抗生物質を添加したダルベッコ変法イーグル培地（D-MEM）を用い、5%CO<sub>2</sub>—95%空気、37°Cの湿潤環境下で行った。約2～4週間の培養後、骨片より遊走した細胞を0.25%トリプシンで浮遊させ回収し、2.7×10<sup>4</sup>個/cm<sup>2</sup>の細胞密度で継代培養した。約1週間に1回の割合でさらに継代培養をくり返し、得られたヒト歯槽骨由来細胞（HAB cells）を以後の実験に用いた。

対照群として用いたヒト歯根膜線維芽細胞（HPLF）は、神奈川歯科大学口腔生化学教室・斎藤滋教授より供与を受けた。

### 2. ALP活性の測定

HAB cellsおよびHPLFを96ウェル培養プレートに2.7×10<sup>4</sup>個/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種し、培養24時間後より100nMデキサメタゾン（Dex）、または5 nM 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>（D<sub>3</sub>）を添加し、培養5日後のアルカリホスファターゼ（ALP）活性を測定した。ALP活性の測定はLowryら、およびPuzasらの方法を基とした久保および川瀬の変法に従った。

また、Dex添加時および非添加時のALP活性の経時的変化を培養19日目まで観察した。

### 3. PTHに対する細胞内cAMPの応答性

HAB cellsおよびHPLFを6ウェル培養プレートに前述の細胞密度で播種し、培養24時間後から100nM Dexの添加・非添加条件下で培養した。培養10日目に、20nM副甲状腺ホルモン（PTH）または100  $\mu$ Mホルスコリンを添

加して37°Cで10分間作用させ、合成された細胞内cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) 量をラジオイムノアッセイにより定量した。

#### 4. DNA量の定量

ALP活性および細胞内cAMPはウェル当りで測定し、一定細胞数当りに換算した。すなわち細胞当りのDNA量が一定であることから、ALP活性および細胞内cAMPの定量時に、同じ条件下で培養したプレートにおけるウェル当りのDNA量を定量し、DNA 1  $\mu$ g当りでALP活性および細胞内cAMPレベルを表示した。なおDNAの定量は、Puzas and Goodmanの方法に準じた。

#### 5. 基質石灰化能の検討

HAB cellsおよびHPLFを24ウェル培養プレートに $2.7 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種した。培地は10%FBS添加D-MEMを基本培地とし、培養24時間後から100nM Dex, 50  $\mu$ g/ml AsA, 10mM  $\beta$ -glycerophosphate ( $\beta$ -GP) を各々単独で、あるいは組み合わせて添加した。以後35日目まで培養し、細胞外基質をvon Kossa染色し、肉眼および光学顕微鏡的に観察した。

### III 結果および考察

#### 1. 細胞の分離・培養

今回、3人の患者の4部位より得た4種の細胞(HAB-1~4)は、培養系において紡錘形から多極形を示したが、各々の間に位相差顕微鏡レベルにおける形態学的な相違は認められなかった。

#### 2. HAB cellsのALP活性

通常培養条件におけるHAB cellsのALP活性をHPLFと比較すると、HAB-1のみは差が認められなかったが、HAB-2, HAB-3およびHAB-4は有意に高い活性を示していた。またDexおよびD<sub>3</sub>は、HAB cellsのALP活性を有意に上昇させた。一方HPLFのALP活性は、D<sub>3</sub>では有意に上昇したが、Dexでは有意差は認められなかった。ALP活性の経時的変化は、細胞の種類および培養条件により多様な結果を得たが、中でもHAB-2および

HAB-4はDex添加時に著しい活性の上昇を認めた。また、骨・肝臓・腎臓型ALPに特異的な活性阻害剤であるレバミゾールはほとんどの細胞・培養条件においてALP活性を90%以上阻害した。この結果から、本細胞に発現するALPは骨・肝臓・腎臓型と判断された。

#### 3. PTHに対する細胞内cAMPの応答性

Dex非添加培養では、全ての細胞でPTHに対する細胞内cAMPの応答は見られなかったが、Dex添加培養では、HAB-4でPTHに応答した細胞内cAMPレベルの顕著な上昇が観察され、HAB-2およびHAB-3でも有意な上昇を示した。この結果HAB cellsは、通常培養条件では成熟骨芽細胞としての形質を十分に発現しないことが示唆された。したがって、本細胞を骨芽細胞の研究モデルとして用いる場合には、培養条件としてDexの投与が必要であると考察された。

#### 4. 細胞外基質の石灰化能

長期培養後のvon Kossa染色では、HAB-2, HAB-3およびHAB-4で石灰化を示す濃染像が観察された。HAB-2およびHAB-4はAsAのみ、HAB-4はASA+Dexの培養条件で石灰化基質を形成したが、HAB-3は $\beta$ -GPの非存在下では石灰化しなかった。

### IV 結 論

正常ヒト歯槽骨より細胞を分離・培養し、その分化形質について検討した結果、以下の結論を得た。①HAB-1は骨芽細胞としての形質を持たなかったが、HAB-2, HAB-3およびHAB-4は、高いALP活性、DexやD<sub>3</sub>、PTHに対する応答性、基質石灰化能などの点において骨芽細胞様の分化形質を有していた。②HAB cellsの成熟骨芽細胞としての分化形質の発現にはDexおよびAsAの存在が要求された。③デキサメタゾンに対する分化形質発現の応答性には、HAB-2とHAB-4で相違が見られた。

以上により、著者が正常ヒト下顎歯槽骨より分離・培養したHAB cellsはヒト歯槽骨研究のための培養系研究モデルとして極めて有望であると思われる。

### 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

噛まない子、噛めない子が増加しつつあることは、歯科界ばかりではなく社会的な問題となっている。歯科臨床の場においても、顎骨の劣成長やそれに伴う歯列の不正、咀嚼力の低下、咀嚼障害などに如何に対処してゆくかが今後の重要課題のひとつとして挙げられている。

一方、骨の代謝に関する研究は非常に盛んであり、近年では正常ヒト骨組織より分離した骨芽細胞を用いた細胞レベルでの研究も数多く報告されている。しかし、顎

顔面領域の骨より細胞を分離・培養した培養系研究モデルは確立されておらず、歯学として独自のアプローチが待たれるところである。

そこで申請者は、ヒト歯槽骨由来骨芽細胞培養系研究モデルを確立することを目的として、正常なヒトの下顎歯槽骨より細胞を分離・培養し、その細胞の骨芽細胞分化形質マーカーについて検索した。

その結果、今回3人の正常なヒトより分離した4種の

細胞（HAB-1～4）のうち、HAB-1を除く3種は、高いアルカリホスファターゼ活性、グルココルチコイドや活性型ビタミンD<sub>3</sub>に対応する応答性、副甲状腺ホルモン受容体の存在、および基質石灰化能の点で骨芽細胞様と称するに足る分化形質を有していた。さらに、本細胞が成熟骨芽細胞としての十分な形質を発現するための培養条件として、L-アスコルビン酸とデキサメタゾンの存在が要求されることが明らかとされ、申請者が正常ヒト下顎歯槽骨より分離・培養したHAB cellsはヒト歯槽骨研

究のための培養系研究モデルとして極めて有望であると思われた。

本研究により得られた知見は、小児期の顎の成長発育の調節機構を解明するため、今後さらに細胞生化学的な研究を推進するにあたって基礎をなす有益なものと考え

る。以上のことから、本論文は小児歯科学の進歩発展に寄与するところ大と考え、審査の結果、博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。

氏名・（本籍）	星 和 明（東京都）
学位の種類	博 士（歯学）
学位記番号	乙 第17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2項該当（論文博士）
学位論文題目	エブネル腺アミラーゼ分泌における自律神経性調節に関する研究
論文審査委員	主 査 教 授 猪 股 孝 四 郎 副 査 教 授 武 田 正 子 副 査 教 授 市 田 篤 郎 副 査 教 授 倉 橋 昌 司

## 論 文 内 容 の 要 旨

### I 目 的

ラットの舌エブネル腺は漿液性の腺房細胞を有し、有郭乳頭や葉状乳頭の溝に開口する。この分泌唾液は味覚機能と密接な関係があると考えられており、またリパーゼやアミラーゼなどの消化酵素を多量に含んでいる。このエブネル腺アミラーゼは耳下腺機能が低下した場合に口腔および胃内におけるデンプン消化に生理的な役割を果たしていることが示唆されている。

しかしながら、有郭乳頭に分泌されるエブネル腺唾液中のアミラーゼ活性を検討した研究や摂食などの生理的刺激によるエブネル腺アミラーゼ分泌における自律神経系の役割を検討した報告は見られない。

そこで本研究はラットにおける自律神経作動薬投与によるエブネル腺組織中のアミラーゼ総活性およびエブネル腺唾液中のアミラーゼ活性の変化、摂食によるエブネル腺アミラーゼ分泌に対する自律神経遮断薬投与の効果

を同一個体、同一条件で耳下腺および膵アミラーゼ分泌における場合と比較検討することにより、in vivoにおけるエブネル腺唾液アミラーゼ分泌の自律神経性調節機序を明らかにすることを目的とした。

### II 実験材料および方法

実験動物には10週齢のウィスター系雄ラット150匹を用いた。

実験1ではラットを24時間絶食後、5群に分け、生理食塩水、 $\beta$ アドレナリン作動薬イソプロテレノール、 $\beta$ アドレナリン遮断薬プロプラノロールとイソプロテレノール、コリン作動薬ピロカルピンとプロプラノロール、コリン遮断薬アトロピンとピロカルピンとプロプラノロールをそれぞれ腹腔内投与1時間後、エブネル腺、耳下腺、および膵臓を摘出し、アミラーゼ活性測定に供した。

実験2ではラットを24時間絶食後、ペントバルビタールで麻酔し、仰臥位に固定した。気管カニューレを挿入