

ン誘導体のうち、2種類が、濃度依存性に有意に細胞増殖及び、ALP活性、タイプIコラーゲン合成を刺激した。
 〈結論〉1. フェニトインのosteogenicな作用にTGF- β のみならずBMP-2のup-regulationも関与している可能

性が示唆された。2. ある種のフェニトイン誘導体には、in vitroにおいてフェニトインと同様のosteogenicな作用があることが示された。

19. 細胞外カルシウム濃度の上昇がラット腹直筋器官培養におけるBMPsの遺伝子発現に及ぼす影響

○有路 博彦, 小山 宏樹, 中出 修,
 賀来 亨
 (北海道医療大学歯学部口腔病理学講座)

〈目的〉われわれは、これまで細胞外カルシウム濃度の上昇が短時間作用において正常ヒト歯肉線維芽細胞のBMP-2, -4, -5のmRNAの発現を上昇させることを報告してきた。本研究は細胞外カルシウム濃度の上昇がラット腹直筋の器官培養においてBMPsのmRNAの発現に影響を及ぼすかどうかを調べるために行われた。

〈方法〉1. 腹直筋は10週齢ラットを屠殺後、直ちに摘出、約1×5×5mm²大に細切し、生理的食塩水で約5分間洗浄したものを用いた。2. その後、種々のカルシウム濃度に調節された0.01%BSA添加DMEMあるいは0.01%BSA添加生理的食塩水において0.5あるいは24時間、器官培養を行い、細胞外カルシウム濃度の上昇がBMPs (BMP-1-5) のmRNAの遺伝子発現に与える影響を半定量的RT-PCR法により検討した。

〈結果〉1. BMP-1-5のうち、ラット腹直筋において

mRNAの発現が認められたのはBMP-4のみであった。2. 0.01%BSA添加DMEMを用いた器官培養において、短時間作用 (0.5h) の細胞外カルシウム濃度の上昇は0.4mMにおいてBMP-4のmRNAの発現を増加させた。3. しかしながら、長時間作用 (24h) においてはこのような効果は認められなかった。4. 短時間作用 (0.5h) の細胞外カルシウム濃度の上昇は1.2mM上昇させた場合において、0.01%BSA添加生理的食塩水においてもBMP-4のmRNAの発現を増加させた。

〈結論〉細胞外カルシウム濃度の上昇はラット腹直筋の器官培養においてBMP-4のmRNAの発現を上昇させる。

〈考察〉本研究の結果はわれわれの仮説をさらに支持する結果と考えられた。

20. in vitroにおける象牙質リンタンパク質による石灰化誘導実験

○斎藤 隆史, 松田 浩一
 (北海道医療大学歯学部歯科保存学第二講座)

〈目的〉齶蝕によって失われた歯質を生物学的に再建することは、歯科医学の究極的な目標のひとつである。本研究の目的は、in vitro実験系において、象牙質基質中に存在するタンパク質 (ホスホホリン) の石灰化誘導能を明らかにするとともに、臨床における象牙質再建の可能性を検討することである。

〈材料と方法〉8カ月齢牛象牙質より、EDTA脱灰、カルシウム沈殿、および、DEAE-Celluloseカラムクロマトグラフィーを経て、ホスホホリンを抽出、精製した。1型コラーゲンは、牛皮膚より抽出したものを使用した。線維化したコラーゲンにホスホホリンを吸着、あるいは架橋剤を用いて共有結合した試料を用いて、ハイドロキ

シアパタイトに対する飽和度7.74, 7.59, 7.53, および7.41を有するカルシウム-リン酸石灰化溶液中にてインキュベートすることにより、石灰化誘導能を比較した。さらにNielsenのClassical Nucleation Theoryを用いて、試料と誘導された石灰化物間の界面エネルギーを計算した。

〈結果〉1型コラーゲンにホスホホリンを吸着した場合、ホスホホリンは石灰化を誘導せず、むしろ阻害した。一方、共有結合した場合、 μg オーダーで短時間のうちに石灰化を誘導し、石灰化物はX線回折パターンよりハイドロキシアパタイトであることが確認された。また、石灰化誘導能の指標として界面エネルギーを測定したとこ

ろ、ハイドロキシアパタイト上への結晶沈着に匹敵する値が得られた。

《結論》象牙質内において、ホスホホリンは1型コラーゲンに共有結合しているもののみ石灰化誘導活性を有しており、1型コラーゲンやハイドロキシアパタイトに吸

着している遊離型ものは石灰化成長を制御することが示唆された。さらに、共有結合型ホスホホリンはハイドロキシアパタイトに匹敵する石灰化誘導能を有することが明らかになり、ホスホホリンの臨床応用の可能性が示唆された。

21. 老齢ラット頭部骨膜下におけるBMP/コラーゲン複合物による骨増生

○村田 勝, 牧 富弥代, 柴田 敏之,
有末 眞

(北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座)

《目的》骨形成タンパク質 (BMP) を用いた頭部骨膜下骨増生実験の担体として、従来非吸収材料が使用されてきた。今回、吸収性であるコラーゲンに注目し、アテロコラーゲン溶液を凍結乾燥して加圧することで一定の形状が得られることと操作性に優れていることに着目して、BMPの担体として使用した。実験動物としては老齢期ラットを用い、挙上部の骨形成過程と担体コラーゲンの吸収変化を形態学的に検討した。

《材料と方法》

1. BMPと担体の複合化 ウシ脱灰骨基質抽出液を限外濾過と透析操作後に沈殿物を回収した。次にHeparin-SepharoseカラムとSephacryl S-200ゲル濾過カラムを用いて、分子量16kDaから35kDa相当の溶出画分を分取し、BMP部分精製物とした。BMP(300 μ g)を含む0.1% TFA溶液と0.3% I型アテロコラーゲン酸性溶液 (3.3 ml) を滅菌チューブ内に加えて混和後凍結乾燥した。対照として、コラーゲン酸性溶液 (3.3ml) のみを凍結乾燥した。埋入前にステンレス棒を用いて円柱状に加圧整形した。2. 埋入観察方法 全身麻酔下で18カ月齢のウイ

スター系雄性ラット頭部骨膜下の矢状縫合部に埋入物を挿入した。1, 2, 3, 8週後に摘出し、試料は固定脱灰後、ヘマトキシリン-エオジン染色を施して光学顕微鏡で観察した。

《結果》BMP/コラーゲン群において、1週後に骨芽細胞と類骨様基質の産生が認められた。2週後に梁状の線維性骨形成が進行し、3週後には全体的に骨梁の連続性が増加して既存骨と結合していた。担体コラーゲン線維は大部分吸収されたが、モザイク様骨基質内にエオジン好染性で線維状の担体コラーゲンが封入されていた。8週後には脂肪髄を伴う緻密骨に改造された。一方、コラーゲン単独群においては、全期間を通じて骨・軟骨形成は全く認められず、コラーゲン線維は密に配列して重積し、間葉系細胞の担体内への侵入は極めて乏しかった。コラーゲンと頭蓋骨の界面には数層の線維性組織の侵入による被包化が観察された。

《結論》BMP/コラーゲン複合物は骨誘導能を有する優れた吸収性挙上移植材であり、高齢者への応用の可能性が示唆された。

22. ラット顎関節円板におけるデコリンの加齢的变化に関する免疫組織化学的研究

○桑原 幹夫, 溝口 到, 坂倉 康則,
矢嶋 敏彦

(北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座, 北海道医療大学歯学部口腔解剖学第一講座)

《目的》デコリンは、結合組織に広く分布している小型のプロテオグリカンであり、種々の細胞外基質や成長因子と結合能を有し、細胞増殖、基質形成、組織の機械的特性等に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、成長期ラット顎関節円板におけるデコリンの加齢に伴う局在の変化を免疫組織化学的手法を用い検

討した。

《方法》実験動物には、生後0, 2, 4, 8, 16週齢のWistar系雄性ラットを用いた。4%paraformaldehyde in 0.1M phosphate bufferで灌流固定後、顎関節部を摘出し、さらに同固定液を用い4°Cで一晩浸漬固定した。洗浄後、10%EDTA溶液で脱灰し、6 μ mの矢状断