

氏名・(本籍)	西村 学子 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第61号
学位授与の日付	平成10年3月20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	歯根膜由来マラッセ上皮様細胞の培養条件による形態的、機能的变化に関する研究 —特に、細胞外基質蛋白との関わり—
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 小 鷲 悠 典

論文内容の要旨

(目 的)

マラッセ遺残上皮は、歯根膜中に存在し、正常時は分裂増殖することなく、歯根膜の恒常性の維持などに関与していることが示唆されているが、マラッセ上皮細胞の特性についての詳細な報告は僅かであり、その本態については未だ不明な点が少なくない。皮膚や口腔重層扁平上皮と違い、閉鎖性環境の中に上皮塊として存在するマラッセ上皮は、その周囲の細胞外基質の影響をより受けやすいものと考えられる。本研究では、まずin vivoでのマラッセ上皮の特徴、主に細胞外基質蛋白の局在について検索し、次にin vitroにおいてマラッセ上皮様細胞を単離し培養環境、特に、細胞外基質蛋白の違いによる細胞の変化について検索し、マラッセ上皮のin vitroにおける特性、特に細胞外基質蛋白との関わりを明らかにすることを目的とした。

(方 法)

1. in vivoにおける免疫組織化学的検索

生後6ヶ月のブタ小白歯部を4%パラフォルムアルデヒドによる固定、EDTAによる脱灰後、通法に従いパラフィン切片を作製した。ケラチン、CK19、フィブロネクチン(FN)、ラミニン(LM)、タイプIVコラーゲン(Type IV)に対する抗体を用いた蛍光抗体法を行った。

2. in vitroでのマラッセ上皮細胞の単離

細胞は、生後6ヶ月のブタ小白歯の歯根膜から剝離した細胞をoutgrowth法にて培養し、Ca²⁺濃度を調整した

ディスパーゼで線維芽細胞を完全に除去し、上皮様細胞の単離を行った。得られた細胞は、in vivoでの検索と同様の抗体を用いた免疫組織化学的検索、および電子顕微鏡学的観察を行った。

3. 細胞外Ca²⁺濃度による細胞の変化

1) 細胞の分化傾向の観察

得られた細胞は、無血清培地のCa²⁺濃度を低濃度(0.03mM)と高濃度(1.8mM)に調整して培養し、位相差顕微鏡ならびに電子顕微鏡により形態変化を観察した。

2) 細胞増殖能の検索

細胞は、低Ca²⁺濃度、高Ca²⁺濃度条件下でELISA plate上にて培養し、XTT assayにより細胞増殖の相違を比較検討した。

4. 細胞外基質蛋白による形態的、機能的变化

FN, LM, Type IVをコートしたものを基質としていづれも低Ca²⁺の培養条件で培養を行った。

1) 細胞形態(高径)の変化

細胞と細胞外基質蛋白の違いによる細胞形態変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。細胞は、PKH-26で蛍光ラベルされた後、それぞれのディッシュ上で24時間培養、固定後、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞の高径をX-Z方向から観察し、細胞高径を統計的に比較検討した。

2) 細胞増殖能の変化

細胞をそれぞれの蛋白をコートしたELISA plate上で培養し、XTT assayにより比較検討した。

3) 初期接着の違い

細胞をそれぞれの蛋白でコートされたディッシュ上で30分, 120分培養し, 細胞数を計測し初期接着の相違を比較した。

5. コラーゲンゲル3次元培養

マラッセ上皮様細胞を生体内類似の閉鎖性環境を再現するため, 細胞のコラーゲンゲル内培養を試み, その形態変化とFN, LM, Type IVの局在をそれぞれの抗体を用いた蛍光染色および電子顕微鏡により観察した。

(結 果)

1. in vivoによる観察

in vivoでのマラッセ遺残上皮の周囲には明らかなLMの局在が認められ, FN, Type IVも発現は弱いものの観察された。

2. in vivoでの形態的観察

歯根膜から得られた上皮様細胞は多角形に伸長し, コンフルエント時には上皮様敷石状に配列, 増殖していた。免疫組織学的に観察するとケラチン陽性でケラチンフィラメントに富み, また電子顕微鏡学的には, デスモゾーム構造やトノフィラメントが多数観察された。

また, 蛍光抗体法では特に, FN, LMの強い発現が細胞周囲, および細胞と細胞が接する部位に観察された。

3. 細胞外Ca²⁺濃度による細胞の変化

Ca²⁺濃度で培養を行うと全体に細胞が丸く, 細胞間には空隙を伴いながら密に増殖しており, 電顕的に観察すると細胞高径の高い細胞が単層に配列していた。それに対し, Ca²⁺高濃度条件下では, 多角形の比較的扁平な細胞同士が重層しており, ところどころにcornified envelopeがみられた。このことから, Ca²⁺濃度により細胞の分化が誘導されていることが確認された。細胞増殖は, 培養2日目において高Ca²⁺では, 低Ca²⁺に比べ有意に細

胞増殖能が上昇していた (P<0.001)。

4. 細胞外基質蛋白による形態的, 機能的変化

共焦点レーザー顕微鏡にて細胞高径を観察, 比較検討すると, Type IV上の細胞が, FN (P<0.001), LMより有意に高く (P<0.002), FN, LMの細胞高径の低下が認められた。それぞれの基質上で培養した細胞は, XTT assayにより3日目で, LMで最も多い値を示していた。

細胞外基質への初期接着は, 30分, 120分後ともFN基質上で有意に接着していたものの, LM, Type IV基質上ではコントロールと比較して細胞接着に有意差は認められなかった (30分, 120分ともCont<FN: P<0.002)。

5. コラーゲンゲル3次元培養

細胞を生体の閉鎖環境を反映したコラーゲンゲル内で培養すると, 細胞は自時間とともに細長い突起を出しながら伸展し, 一部にはductal structureを形成するところが認められた。細胞外基質蛋白は, コラーゲンゲルによりサンドイッチされた上皮細胞周囲の境界面付近で, 特に, FN, LMの強い発現が観察された。電顕的に, 明らかな基底膜構造は認められなかった。

(考察および結論)

以上の様にマラッセ遺残上皮は周囲がType IV, FN, LMなどの基底膜構成蛋白によって覆われており, in vitroにおいてこれらの細胞外基質蛋白は, マラッセ上皮様細胞の接着, 伸展や細胞の増殖, 遊走などにそれぞれ影響を及ぼすことが明らかとなった。また, コラーゲンゲル内培養による細胞形態の変化, 細胞外基質蛋白の局在は, in vivoに近い状態となっており, マラッセ上皮はその環境および周囲に隣接している細胞外基質蛋白により様々に変化するものと考えられた。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

歯根膜中に存在するマラッセ上皮遺残は, 正常時は分裂増殖することはないが, 一旦炎症などの刺激が加わると, 遊走, 増殖, 分化を行い, 嚢胞の裏層上皮の形成に関与している。

本研究では, マラッセ上皮の特性を明らかにするために, 主に細胞外基質蛋白がマラッセ上皮様細胞のどのような形態的, 機能的変化を引き起こすのかin vitroで検索し, さらに, マラッセ上皮の閉鎖性環境を想定したin vitroモデル系の確立を試みた。

ブタ歯根膜由来マラッセ上皮様細胞は, 細胞外カルシウム濃度を変えた培養条件下で, 分化が誘導され, 明らかなデスモゾーム構造やトノフィラメントがみられたこ

とより, 形態的には一般的にいわれるケラチノサイトと同様の性格をもっていることが解ったが, 細胞増殖に関してはケラチノサイトと異なり, 高濃度の条件で増殖する結果となった。

細胞外基質蛋白のマラッセ上皮様細胞への影響では, 細胞高径は共焦点レーザー顕微鏡の結果から, タイプIVコラーゲン上の細胞が高く, フィブロネクチン, ラミニン基質上で高径の低下が認められた。細胞の初期接着ではフィブロネクチンが高い値を示し, 細胞増殖に関してはラミニンが最も高い値を示した。

コラーゲンゲル内培養でのマラッセ上皮細胞は, 経時的に形態が変化し, 細長い突起を出しながら伸展し,

ductal structureの形成も認められた。電顕的には、基底膜構造はみられなかったが、免疫組織化学的には基底膜構成蛋白が認められた。特に、フィブロネクチン、ラミニンの強い発現がみられ、程度に差はあるものの歯根膜組織の結果と一致するものであった。

以上の結果から、マラッセ遺残上皮は基底膜構成蛋白であるラミニン、フィブロネクチン、タイプIVコラーゲンにより覆われ、in vitroにおいてこれらの細胞外基質蛋白は、マラッセ上皮様細胞の接着、伸展や細胞の増殖、

遊走などを調節していることが明らかとなった。また、コラーゲンゲル内培養における細胞形態、細胞外基質の局在はin vivoでの状態とほぼ一致するものであり、in vitroの研究モデルとして有用であると考えられた。

よって、審査の結果、閉鎖性環境にあるマラッセ上皮遺残における細胞外基質蛋白の発現、局在を明らかにした報告であり、本論文は病理学および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)	牧 富弥代 (鹿児島県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第62号
学位授与の日付	平成10年3月20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	下顎骨骨空洞の治癒過程に関する病理組織学的研究 —特にハイドロキシアパタイト顆粒填入後の組織修復 について—
論文審査委員	主査 教授 有 末 眞 副査 教授 金 澤 正 昭 副査 教授 賀 来 亨

論文内容の要旨

緒 言

顎骨内には嚢胞や腫瘍など様々な疾患が生じるが、病巣の摘出後に大きな空洞状の骨欠損が残るものでは、その修復過程で欠損部を被覆する軟組織が空洞内に陥入するため欠損部が陥凹して治癒する傾向がみられ、顔面の形態や口腔の機能に障害を認めることも少なくない。顎骨の欠損に対する治療法は、骨移植あるいは人工生体材料を用いての補填に大別されている。骨移植に関しては、とくに新鮮自家骨移植が良好な成績を挙げているが、この方法には、骨採取のための健常部への手術侵襲は採取する骨の量と形態が制限されるなど欠点がある。一方、人工生体材料であるハイドロキシアパタイト(以下HAP)顆粒の填入が比較的大きな骨空洞への骨補填材料として臨床で広く用いられているが、骨欠損部へのHAP顆粒填入後の治癒過程に関する研究は補填部が比較的短

期間に治癒する小さな骨空洞でなされており、形態や機能の保持のため骨補填材を必要とする大きな骨空洞を作製して行ったものはない。そのため骨空洞内面と骨膜側からの修復を明瞭に区別することは困難であり、HAP顆粒填入後の治癒過程や外骨膜の役割などについて詳細に観察を行っているものはみられない。そこで今回、顎骨の欠損部の形態保持のため大きな骨空洞内にHAP顆粒を填入した場合の治癒過程とその際の外骨膜の役割を明らかにする目的で、ウサギの下顎骨体部に骨空洞内面と骨膜側からの修復の区別が可能な骨空洞を形成し、空洞内にHAP顆粒を填入し病理組織学的ならびに組織計量学的に検討した。

実験材料・方法

実験動物には、生後30週齢の成熟した雄性、日本白色種ウサギ60匹(平均体重3.5kg)を用い、右側下顎骨骨体