

| | |
|---------|------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | 國本隆明(北海道) |
| 学位の種類 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 乙第34号 |
| 学位授与の日付 | 平成10年9月25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 | ヒト歯肉由来線維芽細胞による弾性系線維の形成に関する組織細胞学的研究 |
| 論文審査委員 | 主査 矢嶋俊彦 副査 武田正子 副査 溝口 到 |

論文内容の要旨

緒言

歯根膜(歯周靭帯)と歯肉固有層は高度に特殊化した線維性結合組織であり、歯の固定とともに強大な咀嚼力(咬合圧)への緩衝作用も果たしている。これらの組織の主細胞は線維芽細胞であり、多数の細胞突起を結合組織線維束間に延ばし、線維成分を含む細胞外基質の生成・代謝を行っている。弾性系線維(elastic system fibers)はコラーゲン線維とともに主要線維成分の一つである。この弾性系線維はエラスチン(elastin)と微細線維(elastin associated microfibril)の2種類の構成要素からなり、それらの比率によりさらに分けられる。微細線維のみからなるオキシタラン線維(oxytalan fiber)、エラスチンの周囲と内部に多数の微細線維が存在するエラウニン線維(elaunin fiber)、それよりもエラスチンの比率が高い弾性線維(elastic fiber)の3種類に分類される。また、ウシ項靭帯由来の線維芽細胞や血管由来の平滑筋細胞を用いた培養実験により、弾性系線維の発生では最初に微細線維が出現し、それらに沿ってエラスチンが沈着し、弾性線維形成が進行することが報告されている。他方、血管壁弾性線維の新生実験では、エラスチンは微細線維とは独立して沈着するとの報告もある。しかし、歯周組織にも多数のオキシタラン線維をはじめとする弾性系線維が存在するにも関わらず、歯周組織由来の線維芽細胞によるこれらの線維形成に関する報告はない。そこで、ヒト歯肉由来線維芽細胞を用いて弾性系線維形成過程を組織細胞学的に観察し、さらに、アスコルビン酸の線維形成に与える影響も検討した。

材料と方法

培養実験系にはヒト歯肉由来線維芽細胞を用い、細胞は35mmシャーレ中で10%仔ウシ血清を加えた α -MEM(50 μ g/mlアスコルビン酸含有)培地とDM-170(1 μ g/mlアスコルビン酸含有)培地で6週間培養した。経過的に2%パラホルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒド混合固定液で固定し、1%四酸化オスミウムで後固定後、樹脂包埋した。これらのin vitro実験群の比較対照として、ラット(1, 3, 6カ月)の歯周組織を同様に固定・包埋し用いた。超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色、あるいはタンニン酸、酢酸ウランとクエン酸鉛の三重染色を施し、電子顕微鏡で比較観察した。

結果と考察

ラット(1, 3, 6カ月)の歯周組織:歯周結合組織には、管状構造(直径10-12nm)を示す微細線維のみから構成されるオキシタラン線維と、微細線維と少量の無定型均質構造を示すエラスチンからなるエラウニン線維がコラーゲン細線維束間に観察された。しかし、成熟した弾性線維は動脈壁以外には認められなかった。また、通常の酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色では、エラスチンの電子染色性が低いのに対し、タンニン酸染色では強染され、エラスチンの同定が容易となった。

α -MEM培地培養群:培養1週では多数の横紋構造の不明瞭なコラーゲン細線維が細胞間に形成されていた。それらの線維間あるいは周囲に管状構造(直径10-12nm)を示す少数の微細線維のみからなるオキシタラン線維の

形成が観察された。培養2週では、コラーゲン細線維は次第に並走し、線維束を形成するようになり、横紋構造は次第に明瞭になってきた。オキシタラン線維形成量も増加した。3週以降、横紋構造の明瞭なコラーゲン細線維の増加量に比較し、オキシタラン線維増加量は緩やかであった。またエラスチン沈着を伴うエラウニン線維・弾性線維は認められなかった。

DM-170培地培養群：コラーゲン細線維形成は実験期間を通して抑制され、アスコルビン酸欠乏状態にあった。培養1週で α -MEM培地培養群と同様に、管状構造(直径10-12nm)を示す少数の微細線維のみからなるオキシタラン線維の形成が観察された。経過的にオキシタラン線維は緩やかに増加し、線維を構成する微細線維数も増加した。培養2週で、集合した微細線維間にタンニン酸染色で濃染し、均質構造を示すエラスチンが認められ、エラウニン線維形成が観察された。4週以降、多量のエラスチンとその周囲に埋入した少量の微細線維からなるエラウニン線維が増加した。しかし、実験期間中には成熟した弾性線維は観察されなかった。経過的に横紋構造の

不明瞭なコラーゲン細線維がわずかに形成され、部分的には横紋構造の明瞭な成熟コラーゲン細線維も観察された。

これらの実験結果より、ヒト歯肉由来線維芽細胞の培養系においても生体と同様な微細構造を有するオキシタラン線維、エラウニン線維の弾性系線維形成が観察された。また、弾性系線維形成では、最初に微細線維が出現し、それらの線維間にエラスチンが沈着し、エラウニン線維が形成されることが明らかとなった。しかし、生体歯周組織と同様に成熟弾性線維は観察されず、線維の組織特異性等を比較検討する必要があると認められた。また、エラスチン染色・同定にはタンニン酸が簡便で有効であることが認められた。アスコルビン酸は、コラーゲン生成を促進し、微細線維形成には影響を与えないが、エラスチン沈着を抑制することが認められた。従って、低濃度あるいはアルコビン酸非含有培地を用いた培養系は、弾性系線維形成の観察・解析に有効な実験系であることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

歯根膜(歯周靭帯)と歯肉粘膜固有層は高度に特殊化した線維性結合組織であり、歯の固定とともに咀嚼力(咬合圧)の緩衝作用も果たしている。これらの組織ではコラーゲン線維とともにオキシタラン線維とエラウニン線維の弾性系線維が存在し、機能を果たしている。しかし、これらの弾性系線維形成過程は十分には明らかにされていない。

そこで、申請者はヒト歯肉由来線維芽細胞を用いて、弾性系線維形成過程を組織細胞学的に観察し、さらにアスコルビン酸の弾性系線維形成におよぼす影響も合わせて検討した。また、これらの培養実験系の対照として、ラット臼歯歯周組織を観察した。

その結果、ラット歯周組織では、多数のコラーゲン細線維束間に、微細線維から成るオキシタラン線維が観察され、エラウニン線維は加齢に伴い出現頻度が高まること。微細線維を伴わないエラスチンの単独沈着、および成熟した弾性線維は観察されないことを明らかにした。また、アスコルビン酸含有 α -MEM培地培養群では、コラーゲン合成が促進され、多数のコラーゲン細線維が形成され、これらの細線維間に微細線維からなるオキシタラン線維が観察されたこと。培養6週においてもエラウ

ニン線維、および弾性線維形成は認められないことを明らかにした。さらに、アスコルビン酸欠乏状態にあるDM-170培地培養群では、コラーゲン合成は抑制されるが、微細線維から成るオキシタラン線維は形成され、経過的に増加すること。3週以降、微細線維間にエラスチン沈着が開始し、エラウニン線維形成が観察されたが、培養6週においても微細線維を伴わないエラスチンの単独沈着、および成熟弾性線維は観察されないこと等を明らかにした。

本研究により、ヒト歯肉由来線維芽細胞の培養系において、生体と同様な微細構造を有するオキシタラン線維とエラウニン線維の形成が初めて明らかにされた。また、弾性系線維形成では、最初に微細線維が出現し、それらの微細線維間にエラスチンが沈着し、エラウニン線維形成されること、ならびにアスコルビン酸はコラーゲン生成を促進し、微細線維形成には影響をおよぼさないが、エラスチン沈着を抑制することを明らかにし、歯周組織の弾性系線維形成の解明において有益な貢献をし、歯科医学研究に寄与したものと見える。

審査の結果、本論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと判定した。