

学位論文審査の要旨

歯の主要構成成分であるハイドロキシアパタイトの結晶性は、歯質の耐酸性に関する一因子である。一般に齶蝕感受性は幼若な歯質で高く、加齢に伴い低下するといわれている。また、電子顕微鏡像の詳細な解析から、 CO_3^{2-} の置換によって結晶構造の原子配列に乱れが生じ、結晶の崩壊がおこることが確認されている。すなわち、結晶性の低下により齶蝕感受性が高まり、耐酸性あるいは抗齶蝕性の低下によって、齶蝕に罹患しやすくなる。ハイドロキシアパタイトの結晶性の良い状態では、Ca/Pは理論値の1.67に近づくと考えられるが、一般に生体ハイドロキシアパタイトのCa/Pは理論値より低い値を示す報告がほとんどである。しかし、これまでにヒト象牙質の各部位や成熟過程の違いによるCa/Pの変動については十分に究明されていない。そこで本研究では、ヒト永久歯象牙質の歯根完成歯と未完成歯の2つの群についてCa/Pを算出した。さらに、Ca/Pを算出した切片に近接した象牙質切片についてX線回折法によって結晶性を評価し、Ca/Pと結晶性の相関関係を検討した。

得られた結果は次の通りである。1. 被験歯10歯から

得た象牙質切片を用いてCa/Pを算出したところ、象牙質の部位によってCa/Pが異なっていた。しかし、本実験の範囲内では被験歯の部位や履歴による系統的な傾向は認められなかった。2. Ca/Pのヒストグラムを作成したところ、根未完成歯ではCa/Pが1.48から1.63の間に、根完成歯では1.46から1.78までに分布し、根完成歯の方がCa/Pの分散は大きかった。3. 各部の象牙質切片を微小領域X線回折法によって分析した結果、部位によってハイドロキシアパタイトによる回折線強度は異なっていた。4. Ca/PとX線回折法で得られた結晶性との相関を調べた結果、正の相関が認められた。

以上のことからCa/Pを測定することで歯の結晶性の状態を予測でき、それを基に耐酸性あるいは抗齶蝕性を判断する一つの指標として臨床上有用な指標となり得る可能性のあることが示唆された。

本研究から得られた結果は、歯科医学特に齶蝕学の進歩発展に寄与するところは大きく、よって審査の結果、本論文は博士(歯学)の学位を授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	藤 條 一 江 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第84号
学位授与の日付	平成12年3月17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	ヒト歯槽骨由来骨芽細胞様細胞におけるbFGFの効果
論文審査委員	主 査 教 授 五十嵐 清 治 副 査 教 授 矢 嶋 俊 彦 副 査 教 授 賀 来 亨

論文内容の要旨

【目 的】

歯科領域において、顎を構成する骨体部と歯槽骨の骨形成に中心的な役割を担っている骨芽細胞に関する研究は顎の発育、咀嚼機能の発育に密接に関わる重要な研究

である。現在、骨芽細胞機能および骨の局所代謝に関わる局所因子としてのサイトカインの研究は急速に進められている。basic Fibroblast Growth Factor(以下bFGF)は骨に含まれる主要なサイトカインの1つでin vivoにおいてラットの骨折の治癒促進、骨髄への投与による骨

密度の増加, イヌやラットの卵巣摘除後の骨量回復と, 骨の形成に対し促進的な活性をもつことが示されている。一方, *in vitro*の研究では, 比較的未分化な骨芽細胞の増殖をup-regulateするとされているが, 分化促進因子存在下におけるbFGFの増殖, 分化, 石灰化への影響はほとんど明らかにされていない。本研究はbFGFのヒト歯槽骨由来骨芽細胞様細胞 (human alveolar bone-derived cells; 以下HABcells) の効果を検討することを目的とする。

【材料および方法】

1. 細胞培養; 細胞は8歳の男児から得られた健全な上顎正中歯槽骨をcollagenase処理し, explantした後, 遊走した細胞を継代培養した。細胞は継代2~8代のもので用いた。なお, 基本培地として10%Fetal bovine serum (FBS), 0.25mM L-アスコルビン酸-2-リン酸, および100U/mlペニシリン, 100U/mlストレプトマイシン添加D-MEMを用いた。さらにbFGF, 5 nM 活性型ビタミンD₃ (D₃), 100nM dexamethasone (Dex), および10nM β -glycerophosphate(β -GP) を各々単独で, あるいは共存下で投与し以下の実験を行った。
2. bFGFの至適濃度の決定; bFGFの濃度 (0~50ng/ml) が細胞増殖に及ぼす影響をdiaminobenzoic acid法を用いたDNAの定量により, 培養4日目で測定を行った。なお, これらの効果はD₃およびDex非存在下, D₃の存在下, Dexの存在下で行った。
3. bFGFがHABの細胞増殖に及ぼす影響; 上記の実験の結果, 今回の実験に用いるbFGFの濃度は2.5ng/mlとした。bFGFが細胞増殖に及ぼす影響をD₃およびDex非存在下, D₃存在下, Dex存在下のそれぞれの培養条件でdiaminobenzoic acid法を用いたDNAの定量により, 培養0~14日まで経時的に測定した。
4. bFGFがHABの細胞分化に及ぼす影響; bFGFがHABの細胞分化に及ぼす影響を, D₃およびDex非存在下, D₃存在下, Dex存在下のそれぞれの培養条件で, pNPPを基質とした細胞ALP assayにより, 培養0~14日まで経時的に測定した。なお, 細胞ALP活性はDNA量あたりの値として算出した。さらに, 細胞分化の指標としてosteocalcin, type I collagen, ALPのmRNAの遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法により, bFGF投与1日目, 3日目, 6日目, 13日目, 20日目において半定量的に調べた。
5. bFGFが細胞外基質石灰化能に及ぼす影響; bFGFがHABの石灰化に及ぼす影響は10mM β -GP, 100nM Dexを含む培養条件下において23日間培養したときの

nodule形成によりvon Kossa染色を用いて検討した。また, 細胞外基質に取り込まれるCa量を⁴⁵Caを用いたtracer実験により検索した。すなわち, ⁴⁵Caを培養21日目に添加し, さらに48時間作用させたときの放射活性をシンチレーションカウンターにて測定した。

6. 統計処理; 各群間の有意差検定はMann-Whitney U-testもしくはANOVAの2元配置分散分析により有意差検定し, 危険率が0.05以下の場合を有意差ありとした。

【結果および考察】

1. 細胞増殖に及ぼす影響; bFGFは添加2日目より14日目までD₃存在下, あるいは非存在下において, 8日目を除きDNA量を有意に増加したことより細胞増殖促進効果を有することが明らかとなった。また, Dex存在下におけるbFGFの細胞増殖に及ぼす作用に関しては, 統計的な有意差は6日目までしか認められなかったが, 促進傾向があることが明らかとなった。
2. 細胞分化に及ぼす影響; bFGFは添加2日目より14日目までD₃存在下および非存在下において, ALP活性を有意に抑制した。また, Dex存在下においては2日目を除きALP活性を有意に抑制した。mRNAレベルにおいてもbFGFはD₃およびDex非存在下においてALPのmRNA発現を抑制させた。一方, bFGFはosteocalcinのmRNA発現を上昇させた。この上昇はDex存在下においてより高度であった。また, bFGFはこれらの培養条件下でtype I collagenのmRNAには顕著な効果は認められなかった。以上のことよりbFGFは細胞分化に対し調節作用のあることが示唆された。
3. bFGFが細胞外基質石灰化能に及ぼす影響; bFGFはnoduleの大きさ, 数を顕著に減少させた。この減少は⁴⁵Caの細胞外基質への取り込み抑制として示されたことより, ヒト骨芽細胞の石灰化に対しては抑制的に作用することが示された。

【結 論】

これまで分化促進因子存在下におけるbFGFの骨芽細胞様細胞の作用はほとんど明らかにされていなかったが, 本研究において, 分化促進因子非存在下と同様に, 細胞増殖促進, 石灰化抑制および分化調節作用を有することが示された。

学位論文審査の要旨

Basic fibroblast growth factor (以下bFGF) は骨芽細胞によっても産生され、骨組織に含まれる主要サイトカインとして知られている。In vitroにおけるbFGFの近年の知見においては、ヒト新生児頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞にbFGFを作用させた場合、細胞増殖促進、alkaline phosphatase (以下ALP) 活性およびtype I collagenの産生抑制を示し、osteocalcinの産生および石灰化に関してはbFGFの添加時期によってその作用が一定ではないことが示されている。一方、ヒトやラットの骨髄細胞ではbFGFにより細胞増殖が促進されALP活性、type I collagen, osteocalcinの分泌および石灰化が促進されたと報告されている。これらの報告よりbFGFの作用は細胞の種類、分化段階、および培養条件で異なることが考えられるが、顎骨由来の骨芽細胞におけるbFGFの作用に関しては、ほとんど明らかにされていない。そこで本研究はrecombinant human bFGF (rhbFGF) のヒト歯槽骨由来骨芽細胞様細胞 (human alveolar bone-derived cells: 以下; HAB) における細胞増殖、分化、石灰化に及ぼす作用を検討することを目的に行い、HABの長期培養におけるbFGFの連続投与の作用について検討した。さらに、これらの作用は分化促進因子である 1α ,

25-dihydroxyvitamin D_3 (Vit D_3) 存在下、および dexamethasone (Dex) の存在下においても検討し、以下の結果を得た。

1. bFGF (2.5ng/ml) はHABのDNA量を有意に増加した。
2. bFGFはHABのALP活性を有意に抑制した。
3. bFGFはHABにおけるALPのmRNA発現に対し促進的に作用した。しかしtype I collagenのmRNA発現には顕著な作用は認められなかった。
4. bFGFはHABの石灰化を高度に抑制した。
5. これらのHABにおけるbFGFの細胞増殖および分化に対する作用はVit D_3 (5 nM) あるいはDex (100nM) 存在下においても、ほぼ同様であった。

これらのことより、HABに対するrhbFGFの連続投与における作用は細胞増殖に対して促進的であり、細胞分化に対しては石灰化能の低下も含め抑制的であると考えられた。また、本研究の結果より、HABはbFGFを顎骨領域で応用する際の培養系研究モデルとして有用であると考えられた。以上の結果から、本論文は歯科医学の発展に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。