

氏名(本籍) : 木村泰子(東京都)

学位の種類 : 博士(歯学) 学位記番号 : 歯博第496号

学位授与年月日 : 平成21年3月25日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : 胎生期ラット頭蓋骨器官培養系における骨基質石灰化進行過程の検討

論文審査委員 : (主査) 教授 福本 敏

教授 笹野泰之 教授 鈴木 治

論文内容要旨

【目的】本研究は、胎生期ラット頭蓋冠を器官培養して、カルシウム (Ca) の総量と組織局所の元素濃度を指標とし、各種培養条件下における骨基質の石灰化過程について評価することで、生理的石灰化の進行を再現する実験系の確立を目的とした。

【方法】胎生18日齢および20日齢の Wistar 系ラット頭蓋冠を規格化して摘出し、骨形成誘導培地として、Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) に10% Fetal Bovine Serum (FBS), 抗生物質 (ペニシリン 100unit/ml, ストレプトマイシン 100ug/ml), アスコルビン酸 (100ug/ml) および β -glycerophosphate (10mM) を添加したものをを用いて、1日、3日および5日間培養した。培養頭蓋冠を硝酸で湿式分解した後、原子吸光分光光度計を用いて、培養頭蓋冠に含まれる Ca 総量を定量した。また培養頭蓋冠を、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィンに包埋して薄切し、von-Kossa 染色およびヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて組織学的検討を行った。さらに隣接切片を SEM-EDX (エネルギー分散型 X 線分析装置) を用いて、骨組織局所に含まれる Ca, リン (P), 炭素 (C) の相対的な元素濃度を定量した。

【結果】頭蓋冠の Ca 総量は、培養前に比較して、胎生18日齢頭蓋冠では培養5日間で約2.9倍に、また胎生20日齢では約2.0倍に増加した。von-Kossa-HE 染色では、いずれの頭蓋冠でも培養前に von-Kossa 陽性の骨基質が認められ、胎生18日齢頭蓋冠では5日間の培養期間で染色強度の増強が見られた。胎生18日齢頭蓋冠の全培養期間を通して、von-Kossa 陽性領域には骨芽細胞と骨細胞が常に認められたが、胎生20日齢では培養3日以降、骨芽細胞は減少し、骨細胞は萎縮する傾向を示した。さらに胎生18日齢頭蓋冠における骨組織局所の Ca 元素濃度は、培養5日間で約2.1倍に、C 元素濃度は、培養5日間で約2.7倍に上昇した。一方、P 元素濃度は培養期間中において、変化は見られなかった。また、胎生20日齢頭蓋冠では Ca, P, C の元素濃度は、いずれも培養5日間で変化しなかった。

〔考察〕胎生20日齢頭蓋冠の培養では、石灰化は進行しなかった。その原因として、胎生20日齢頭蓋冠は胎生18日齢頭蓋冠に比較して、細胞外基質が豊富で石灰化程度も高いため、酸素や栄養の浸透が悪くなり、骨芽細胞の基質産生能やカルシウム蓄積能等の細胞機能が維持できなくなることが考えられた。一方、胎生18日齢ラット頭蓋冠培養では、骨芽細胞および骨細胞が培養環境下で活性を保ち石灰化が生理的に進行したものと考えられた。このことから、胎生18日齢頭蓋冠を用いた、器官培養法は、骨基質の生理的石灰化進行を培養条件下で再現できることが示された。

審 査 結 果 要 旨

骨基質は、骨芽細胞が類骨を形成し、更に類骨を石灰化することで形成される。石灰化は、類骨内の局所から始まり、カルシウム濃度が上昇して進行すると報告されているが、詳細は不明である。知見の乏しい一因として、多様な細胞組織の関わる生理的な石灰化現象を *in vitro* で進行させる実験系がなかったことが挙げられる。本研究は、胎生期ラット頭蓋冠を器官培養して、カルシウム (Ca) の総量と組織局所の元素濃度を指標とし、各種培養条件下における骨基質の石灰化過程について評価することで、生理的石灰化の進行を再現する実験系の確立を目的としたものである。

本研究では、胎生18日齢および20日齢の Wistar 系ラット頭蓋冠を規格化して摘出し、骨形成誘導培地にて、1日、3日および5日間培養した。原子吸光分光光度計を用いて、培養頭蓋冠に含まれる Ca 総量を定量した。また培養頭蓋冠を、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィンに包埋して薄切し、von-Kossa 染色およびヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて組織学的に検討した。さらに隣接切片を SEM-EDX (エネルギー分散型 X 線分析装置) を用いて、骨組織局所に含まれる Ca, リン (P), 炭素 (C) の相対的な元素濃度を定量し検討している。

本研究によると、頭蓋冠の Ca 総量は、培養前に比較して、胎生18日齢、20日齢頭蓋冠共に培養5日間で増加した。いずれの頭蓋冠でも培養前に von-Kossa 染色陽性の骨基質が認められ、胎生18日齢頭蓋冠では5日間の培養期間で染色強度の増強が見られた。胎生18日齢頭蓋冠の全培養期間を通して、von-Kossa 陽性領域には骨芽細胞と骨細胞が常に認められたが、胎生20日齢では培養3日以降、骨芽細胞は減少し、骨細胞は萎縮する傾向を示した。さらに胎生18日齢頭蓋冠における骨組織局所の Ca と C の元素濃度は、培養5日間で共に上昇した。一方、P の元素濃度は培養期間中において、変化は見られなかった。また、胎生20日齢頭蓋冠では Ca, P, C の元素濃度は、いずれも培養5日間で変化は認められなかった。

胎生20日齢頭蓋冠の培養では、石灰化は進行しなかったが、胎生18日齢ラット頭蓋冠培養では、骨芽細胞および骨細胞が培養環境下で活性を保ち石灰化が生理的に進行したものと考えられた。このことから、胎生18日齢頭蓋冠を用いた器官培養法で、骨基質の生理的石灰化進行を培養条件下で再現できることが示された。

本研究結果は、*in vitro* で生理的石灰化の進行を再現する実験系を確立したものであり、骨の発生と成長の研究領域に貢献し得るものである。よって本論文を博士 (歯学) の授与に値するものと認める。