

氏名	にし 西	お 尾	けん 健
学位(専攻分野)	博士(医学)		
学位記番号	医博第2328号		
学位授与の日付	平成13年3月23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	医学研究科外科系専攻		
学位論文題目	The effects of bioactive materials on osteoblastic differentiation of bone marrow cells (生体活性材料による骨髄細胞の骨芽細胞への分化促進能)		
論文調査委員	(主査) 教授 開	祐司	教授 岡 正典 教授 中村孝志

論文内容の要旨

緒言

骨に直接結合しない純チタンに対して、アルカリ加熱処理をおこなったチタンやさらにこれを擬似体液に浸漬することによりアパタイトを形成させたチタンは生体内で骨と直接結合すること、すなわち生体活性チタンになることを示されてきた。また生体活性骨セメントとして開発された AW-GC セメントや δ アルミナセメントは、 α アルミナセメントと異なり生体内で骨と直接結合することが示されてきた。

近年ラット大腿骨骨髄細胞はデキサメサゾンを加えた培養により骨芽細胞へ分化誘導され、さらに生体の骨と類似する石灰化した結節を形成することが報告された。動物の生体内での実験に替わり、培養法により骨への生体活性を評価できれば動物への負担を軽減でき、さらに欠損した骨などを補充する組織工学に発展できる可能性がある。

本研究では、骨髄細胞培養法を用いて生体活性材料による骨芽細胞への分化促進作用について検討した。実験材料

(実験1) 純チタン (Cp Ti), アルカリ加熱チタン (AH Ti), アパタイトチタン (Ap Ti) を用いて円盤を作成した。

(実験2) Bis-GMA レジンで、AW-GC 粉体、 δ アルミナ粉体、 α アルミナ粉体を各フィラーとして重量比で70%含む円盤(各 AWC, ABC, α ALC) を作成した。

骨髄細胞は6週齢のラット大腿骨より採取した。

実験方法

二次培養の骨髄細胞を各々の円盤上にまき、 β グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメサゾンを加え、培養後7, 14日に、ALP 染色, ALP 活性, DNA 量, および Northern blot 法にて osteocalcin (OC), osteopontin (OP), osteonectin (ON), α I (I), collagen (COL) の mRNA レベルを解析した。チタンに対しては細胞を伴わない培養条件での表面の変化も、薄膜 X 線解析および X 線光電子分光により解析した。セメントに対しては細胞の形態を走査型電子顕微鏡により調べた。

実験結果

(実験1) Ap Ti では7, 14日の ALP 活性, 14日の OC 及び COL, さらに7日の OP で最も高い発現量を認め、AH Ti はその次に高い値であった。AH Ti 及び Cp Ti は7日では共に低い ALP 活性であったが、14日では AH Ti の ALP 活性は Cp Ti に比べ上昇した。細胞を伴わない条件下で、AH Ti では時間経過とともに増大するリン酸カルシウムの沈着がみられたが、Cp Ti では検出できなかった。

(実験2) AWC では7, 14日の ALP 活性, 14日の OC 及び COL, さらに7日の OP で最も高い発現量を認め、ABC はその次に高い値であった。走査型電子顕微鏡では、AWC では、最も豊富な石灰化した球体と膠原繊維を認め、ABC はそれに次ぐ量が見られた。

考察及び結論

表面にアパタイト層を形成することは生体活性のために必要であり、この層は選択的に成長因子等の蛋白を吸着し、骨芽細胞の分化を促進することが報告されている。Ap Ti は培養前より豊富なアパタイト結晶を有しているため、AH Ti より骨芽細胞への分化を強く促進すると考えられた。また AH Ti は、リン酸カルシウムを形成できる能力があることより、その形成されうる後半において Cp Ti より分化を促進すると考えられた。

同様にアパタイトを形成できる AWC は分化を最も促進した。AWC には及ばないものの、ABC は α ALC より分化を促進したことより、化学的にアパタイト形成能はないアルミナの中でも δ アルミナは骨芽細胞への分化を促進する働きをもっていると推測される。

骨髄細胞培養法は骨と直接結合する生体材料の開発に有効な方法と思われる。

論文審査の結果の要旨

生体内において、アルカリ加熱チタン (AH Ti) やアパタイトチタン (Ap Ti) は純チタン (Cp Ti) に比べて、また AW-GC セメント (AWC) や δ アルミナセメント (ABC) は α アルミナセメント (α ALC) に比べて骨と直接結合することが証明されている。近年ラット大腿骨骨髄細胞はデキサメサゾン下の培養で骨芽細胞へ分化誘導され、骨と類似する石灰化した結節を形成することが報告され、この培養法を用いて生体活性材料による骨芽細胞への分化促進作用について検討した。

骨髄細胞を材料上で培養し、ALP 活性、DNA 量、およびノーザンブロット法にてオステオカルシン、オステオポンチン、オステオネクチン、コラーゲンタイプ 1 を解析した。チタンに対しては細胞を伴わない培養条件での表面の変化を薄膜 X 線解析および X 線光電子分光により解析した。

Ap Ti は分化を最も促進し、AH Ti は後半において Cp Ti よりも分化を促進した。これは Ap Ti は培養前より豊富なアパタイト結晶を有しているためであり、また AH Ti はリン酸カルシウムを形成できる能力があることより、その形成されうる後半において Cp Ti より分化を促進すると考えられた。

AWC は分化を最も促進し、次に ABC は α ALC よりも分化を促進した。アパタイトを形成できる AWC には及ばないが、化学的にアパタイト形成能はないアルミナの中でも δ アルミナは分化を促進すると推測される。

以上の研究は生体材料による骨髄細胞の骨芽細胞への分化促進作用の解明に貢献し、生体活性材料の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 13 年 1 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。