



Title	ラット成長軟骨培養細胞の骨形成能に関する生化学的研究
Author(s)	米田, 俊之
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/31540
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	柴 田 俊 之
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 3 5 8 1 号
学位授与の日付	昭 和 51 年 3 月 25 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学臨床系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ラット成長軟骨培養細胞の骨形成能に関する生化学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 竹田 義朗 (副査) 教授 川勝 賢作 教授 八木 俊雄 助教授 三好作一郎

論 文 内 容 の 要 旨

幼若動物の骨端軟骨部にみられる内軟骨性骨形成過程は、まず軟骨細胞が分裂・増殖して、骨基質を合成・分泌した後、その細胞が肥大化し、最終的には、軟骨組織が骨組織に移行する過程である。しかしながら、この過程の生化学的機作、特に肥大化した成長軟骨細胞の動態については、未だ充分明らかではない。

そこで、著者は内軟骨性骨形成過程における成長軟骨細胞の重要性に着目し、この骨形成過程を詳細に検討するために、まず成長軟骨細胞を分離培養し、移植実験を行なうことにより、骨形成の可能性を検討した。

ラット肋軟骨移行部の成長軟骨 (GC) および静止軟骨 (RC) より、軟骨細胞を、EDTA、トリプシン、コラゲナーゼ処理により分離し、10%牛胎児血清添加のハム F-12 培地中で培養した。

GC 細胞および RC 細胞を別個に分離培養することに、初めて成功した。培養 GC 細胞は、*polygonal* な形態を保持し、また細胞外には基質を著明に分泌しており、トルイジンブルーで染色すると、その基質の部分に顕著なメタクロマジーを認めた。これに対して、RC 細胞は線維芽細胞様形態を呈し、また細胞外への基質の分泌も少なく、トルイジンブルーで染色しても、ほとんどメタクロマジーを示さなかった。

次に、この培養軟骨細胞の骨形成の可能性を検討するために、GC 細胞および RC 細胞を、*diffusion chamber* に封入し、同系ラットの腹腔内に移植した。そして、6 週後にこの *chamber* を取り出し、組織学的検索を行なった。

フィルターに孔をあけずに移植した場合、GC・RC のいずれの細胞の場合にも *chamber* 内で軟骨

組織の再構成が認められたが、骨形成には至らなかった。しかしフィルターに21ゲージの注射針で小孔をあけ、宿主の細胞が *chamber* 内へ流入しうるようにした状態で移植を行なうと、RC細胞では、孔をあけない場合と同様に骨形成は全く認められなかったにもかかわらず、GC細胞では、旺盛な新生骨の形成を観察することができた。

さらに、培養軟骨細胞の種々の代謝活性を追求し、骨形成機作の生化学的解析を試みる目的で、以下に述べる実験を行なった。

培養細胞を $^{45}\text{CaCl}_2$ を含む Earle の溶液中でインキュベートした後、アルカリ処理により細胞を溶解し、 ^{45}Ca の軟骨細胞へのとりこみを調べた。また、とりこみに対するカルチトニン (CT, 10mU/ml), 副甲状腺ホルモン (PTH, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 1α -ヒドロキシビタミン D_3 (1α -OH- D_3 , 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の影響についても検討した。

GC細胞では、CTにより ^{45}Ca のとりこみが促進され、逆に PTH では抑制された。 1α -OH- D_3 はさらに強くとりこみを抑制した。これに対して RC細胞では、PTH, 1α -OH- D_3 の影響は全く認められなかった。ただ CT はわずかにとりこみを促進した。

次に、培養軟骨細胞の酸性ムコ多糖合成能を組織化学的に検索した。

軟骨細胞を培養後、経時的にトルイジンブルーで染色を施し、メタクロマジーを調べた。

GC細胞では培養約14日でメタクロマジーがピークに達し、全細胞の約60%がメタクロマジーを示した。また培地に CT を加えるとメタクロマジーは一層顕著となった。一方、RC細胞ではメタクロマジーはほとんど認められず、また CT を加えても、メタクロマジーにはほとんど変化が見られなかった。

最後に、培養軟骨細胞のムコ多糖合成能に対するホルモン、ビタミンの影響を定量的に分析した。

培養軟骨細胞を $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ を含む Earle の溶液中でインキュベートし、プロナーゼ処理後、セチルピリジニウムクロリドで酸性ムコ多糖を沈殿させて、その放射能を測定した。

GC細胞では、 $^{35}\text{SO}_4$ のムコ多糖へのとりこみは CT, PTH により共に促進されたが、 1α -OH- D_3 によっては影響を受けなかった。また細胞では $^{35}\text{SO}_4$ のとりこみ量も少なく、CT, PTH, 1α -OH- D_3 のいずれに対しても、全く反応を示さなかった。

本研究において、ラット肋軟骨移行部より分離した成長軟骨細胞が *in vitro* で培養後も、宿主細胞成分の関与のもとに、旺盛な骨形成能を発現することを初めて見出した。これに対して静止軟骨細胞では骨形成能を認めることができなかった。このように同じ軟骨細胞であっても、成長軟骨細胞と静止軟骨細胞では、その細胞学的性質、骨形成能、代謝活性、およびホルモンやビタミンに対する応答性のいずれの面でも両者の間で全く異なることが明らかとなった。また従来、CT, PTH および 1α -OH- D_3 に関しては骨組織あるいは骨細胞のみが研究の対象とされて来たが、本研究によって骨細胞のみならず、成長軟骨細胞もこれらホルモンおよびビタミンに対して、極めて鋭敏な応答性を示すことが明らかとなった。

以上の事実は、成長軟骨細胞が骨形成に対して重要な役割を有することを示すと共に、成長軟骨細胞と骨細胞との間に、極めて近い類縁関係が存在することを強く示唆するものである。

論文の審査結果の要旨

本研究は、幼若ラット肋軟骨より分離した成長軟骨培養細胞を用いて、その骨形成能を生化学的に解明しようと試みたものである。

本研究により、成長軟骨培養細胞は著明な骨形成能を有すること、およびホルモン、ビタミンに対する反応性という点からみて、骨細胞と非常に近い類縁関係を有することが明らかとなった。

この結果は骨の成長、発育および修復機構を追求する上で、きわめて重要な知見であり、また臨床における応用をも示唆する研究として価値ある業績であると認める。

よって、研究者は歯学博士の学位を得る資格があると認める。