The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	成長軟骨細胞と骨髄細胞との相互作用 : In vitroにおける石灰化機構の解析
Author(s)	高瀬, 俊幸
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32190
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	高瀬俊幸（たかせ　としゆき）
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 4579 号
学位授与の日付	昭和54年3月24日
学位授与の要件	歯学研究科　歯学臨床系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**成長軟骨細胞と骨髄細胞との相互作用** **——In vitroにおける石灰化機構の解析——**
論文審査委員	(主査)教授 作田　正義 (副査)教授 鈴木不二男　助教授 長谷川　清　講師 山本　克彦

論文内容の要旨

幼若動物における骨形成の過程では，まず骨端軟骨部の軟骨細胞が分裂・増殖して成長軟骨細胞となり，その細胞が脂大化するとともに酸性ムコ多糖やコラーゲンなどの高分子基質を合成・分泌する。つぎに，この細胞層の間隙にも毛細血管が侵入して，ついには軟骨組織が骨組織に置き換わってゆくことが知られている。しかしながら，この過程における軟骨細胞の分化機構，さらには骨形成機構の詳細については未だに不明な点が多く残されている。

そこで，著者は内軟骨性骨形成過程を in vitro で再現すべく，成長軟骨細胞と骨髄細胞との混合培養系という新しい方法を用い，両細胞の相互作用にもとずく石灰化機構，さらにはその過程における軟骨基質の動態を，生化学的ならびに超微形態学的方法により解析した。

まず，鈴木らの方法に従い，S-D系雄性ラット（体重80g前後）肋軟骨・骨移行部より，成長軟骨細胞(GC) および静止軟骨細胞(RC) を分離し，プラスチックシャーレ上で培養した。つぎに，Okadaらの方法に準じて，シャーレに対して斜め方向のエポン切片を作成し，これら両細胞の in vitro における動態を観察した。その結果，Lux 社プラスチックシャーレ上で，10日以上培養した GC においては，ムコ多糖合成能や形態的特長から考えて，軟骨細胞としての分化機能を高度に維持した状態で増殖することが確認された。さらに，電子顕微鏡による観察から，このGCの細胞間基質部にはin vivo の骨端軟骨部にみられる matrix vesicle と極めて類似した小胞様構造物をみとめた。しかしRCでは細胞は線維芽細胞様に増殖し，基質の合成も少なく，GCでみられた小胞様構造物もみとめられなかった。また，これらの細胞を細胞培養用に表面処理をしていないシャーレ上で培養した場合・細胞は浮遊状態で疑集して増殖し，3ケ月以上経た疑集塊では，肥大化，胞状化した細胞と多数の小

胞様構造物の散在する基質をみとめることができた。しかし，GC単独の系では，いずれの条件においてもAnderson やBonucci が in vivo で見出しているmatrix vesicle に付随する針状結晶をみとめることができなかった。ところで，骨化が起こる前の段階では，まず軟骨細胞が分化して規則正しく柱状に並んだ成長軟骨細胞層が形成され，この細胞層の間隙に幼若赤血球を含む骨髄細胞が侵入してはじめて石灰化が起こるといわれている。また，diffusion chamber を用いた移植実験によると，GC あるいは骨髄細胞の各々単独では骨形成が起こらないのに対して，両者の混合系では広範な新生骨の形成がみとめられることが分っている。そこで，前述の，軟骨細胞としての分化機能を十分に発揮した状態のGCに，同系のラットより採取した骨髄細胞を混合して培養したところ，GCの産生した酸性ムコ多糖が著明に消失することが組織化学的に明らかとなった。この現象は，$Na_2{}^{35}SO_4$を用いた酸性ムコ多糖の定量実験によっても裏づけられた。この活性は，骨髄細胞のConditioned mediumや腹腔より採取したマクロファージのConditioned medium にも存在し，しかも100℃で15分間の熱処理により，その効果が消失することから，骨髄細胞やマクロファージが産出する酵素様物質がGC の産出したムコ多糖を分解・遊離させたと考えられる。

ところで，クル病におけるmatrix vesicle での石灰化遅延をビタミンDが改善するとの報告にもとづき，単独では石灰化を起こし得なかったGCに対し，活性型ビタミンD_3を作用させたところ，軟骨細胞自身の肥大化，胞状化の促進およびコラーゲン合成の抑制などの作用はみられたものの，ビタミンD_3投与によっても，matrix vesicle での石灰化は観察されなかった。

さて，先ほどのGCと骨髄細胞との混合培養系において，GCの細胞間基質部を，ルテニウムレッドで染色・固定した試料で，電顕的に検索したところ，全ての試料に，Anderson らが骨端軟骨細胞間基質中にみとめたmatrix vesicle に付随する針状結晶塊と同様の結晶構造を見出した。これをX線微量分析装置で元素分析した結果，Caの存在を示す$K\alpha$および$K\beta$の位置と，Pの存在を示す位置に明らかにピークをみとめたので，これがリン酸カルシウムの結晶であることが明らかとなった。

以上の結果より，内軟骨性骨形成過程においては，まず軟骨細胞が分化して成長軟骨細胞になるとともに高分子基質が合成・分泌され，その細胞間基質中にはmatrix vesicle が形成される。つぎに骨髄細胞によって産生される分解酵素，さらには活性型ビタミンD_3などの作用によって高分子基質が減少するとともに，matrix vesicle を中心として石灰化が始まり，やがては骨形成に向うものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究は，ラット肋軟骨，骨移行部より分離した成長軟骨細胞と，同系ラットの骨髄細胞との混合培養系という新しい方法を導入して，両細胞の相互作用にもとづく石灰化機構を，超微形態学的ならびに生化学的方法により解析したものである。

その結果，1）成長軟骨細胞(GC)は，コラーゲンやグリコサミノグリカン(GAG)を活発に合成す

するばかりでなく，その細胞間基質部に，“Matrix vesicle”（MV）を形成しうること。しかし，GGC単独の系では，MVに付随する針状結晶は認められないこと。

2）活性型ビタミンD_3は，GCのコラーゲン合成を抑制するとともに，細胞の肥大化，胞状化をも促進すること。

3）十分に基質を合成しつつあるGCに，骨髄細胞を作用させると，GAGが分解するとともに，MVに付随した針状結晶（リン酸カルシウム）が形成されること，などを見出した。

このように，従来の方法に較べて，in vivo に近く，格段に進歩した，石灰化のモデルシステムを確立し，in vitro における石灰化機構解明の手がかりを得ることに成功した高瀬君の業績は，今後の骨形成機作の解明に新たな突破口を開いたものであり，基礎および臨床応用の両面からみて，価値が高く，学位請求に値する優れた研究と認める。