The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	成長軟骨細胞培養系における石灰化の誘導
Author(s)	岩本, 容泰
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35948
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

【3】

氏名・(本籍)	岩本容泰（いわもと まさひろ）
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 8135 号
学位授与の日付	昭和63年3月25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	**成長軟骨細胞培養系における石灰化の誘導**
論文審査委員	(主査) 教授 渕端 孟 (副査) 教授 鈴木不二男　助教授 高野 吉郎　助教授 白砂 兼光

論文内容の要旨

骨端軟骨板に存在する成長軟骨細胞は，長管骨の伸長に重要な役割を果たしている点で他の部位の軟骨細胞と機能的に異なる。骨端軟骨板には「増殖軟骨細胞層」,「成熟軟骨細胞層」及び「肥大軟骨細胞層」が存在するが，これらの部位における軟骨細胞のcytodifferentiationは，内軟骨性骨化と密接に連動している。成長軟骨細胞は活発に増殖したのち，軟骨型プロテオグリカン及びII型コラーゲンを旺盛に産生する大型の成熟軟骨細胞となる。次いで，成熟軟骨細胞はアルカリホスファターゼ（ALPase）およびX型コラーゲンを産生する肥大軟骨細胞に分化する。ALPaseおよびX型コラーゲンは，基質小胞に局在しており，軟骨基質の初期石灰化に重要な役割を果たしていると推察されている。しかし，従来の培養法では成長軟骨細胞のALPase活性は生体内のレベルよりも著しく（1／20－1／100）低く，基質小胞も容易に出現しないため，成長軟骨細胞のcytodifferentiationと内軟骨性骨化との関係をin vitroで解析することは不可能であった。

そこで，本研究では遠心管内で高密度浮遊培養（遠心管内培養系）したウサギ成長軟骨細胞を用いて，軟骨細胞のcytodifferentiationおよび軟骨基質石灰化の機構について検討した。

成長軟骨細胞は，生後4週目のNew Zealandウサギの肋軟骨・骨移行部より分離した。分離した細胞は，ただちに15mlのプラスチック遠心管内でペレット状の細胞塊にしたのち10%血清存在下で培養した。遠心管内で培養した軟骨細胞は，4世代増殖したのち軟骨様組織を再構成した。この軟骨様組織を組織学的に観察すると，肥大化した軟骨細胞が多量の細胞外基質に囲まれて散在していた。また，細胞外基質を生化学的に分析すると，軟骨型プロテオグリカン，II型コラーゲンおよび分子量70kdの低分子コラーゲンの存在が確認された。

遠心管内培養系において軟骨基質は，著明なALPase活性および1 α，25（OH）$_2$ビタミンD$_3$受容体レベルの上昇（それぞれ培養開始時の100倍および22倍）に伴って石灰化した。これに対して，プラスチックシャーレ上での従来の培養法では，ALPase活性および1 α，25（OH）$_2$ビタミンD$_3$受容体レベルは低値であった。また，軟骨基質の石灰化も見いだされなかった。従って，遠心管内培養系で観察された石灰化は，人工的な現象ではなく，高度に分化機能を保持した成長軟骨細胞によって誘導された生理的な現象であると考えられる。

次に，軟骨細胞の分化機能の発現を制御する各種の因子の影響を検討した。5－bromodeoxyuridineは，遠心管内培養系において，細胞の対数増殖期に添加すると，細胞増殖に影響することなく，ウロン酸量，ALPase活性および組織内カルシウム（Ca）含量の増加を抑制した。また，すでに増殖を終えて成熟した軟骨細胞培養系を低濃度（1％－0.3％）の血清含有培地で維持すると，以後のALPase活性および組織内Ca含量の増加は見られなかった。すなわち，成長軟骨細胞の肥大化および石灰化には血清因子の関与が不可欠であった。さらに，Fibroblast growth factor（FGF）は，単層低密度培養系および軟寒天培養した成長軟骨細胞の増殖および成熟化を促進することが報告されているが，本系へのFGFの添加は成熟軟骨細胞から肥大軟骨細胞への変換を特異的に抑制した。

［結　　論］

軟骨細胞培養系は軟骨の分化と増殖の制御を研究するために，過去30年間活発に用いられてきた。しかし，軟骨のcytodifferentiationの最終階段および軟骨基質石灰化を細胞培養系で明確に示したのは本研究が最初である。従って，遠心管内培養系は内軟骨性骨化に先立って必要な軟骨石灰化に関与する調節因子を同定するための有力な実験系である。

論文の審査結果の要旨

内軟骨性骨化の過程は「増殖軟骨細胞」,「成熟軟骨細胞」及び「肥大軟骨細胞」を経由して進行するが，従来の軟骨細胞培養系では，この細胞分化の過程を再現することが困難であった。そこで岩本容泰君は，ウサギ助軟骨より成長軟骨細胞を分離し，これを遠心管内で軽く遠心して細胞塊をつくらせ，そのまま高密度浮遊培養を試みた。その結果，この方法で培養した軟骨細胞は，1）軟骨型プロテオグリカンや，軟骨に特有のⅡ型及び70kd低分子コラーゲンを産出しつつ開発に増殖すること，2）in vivoのレベルに匹敵する程の著明なアルカリホスファターゼ活性及び1 α，25（OH）$_2$ビタミンD$_3$受容体レベルの上昇を伴う石灰化を起こす細胞に分化することが明らかとなった。

以上のように岩本容泰君の論文は，従来困難であった軟骨細胞分化の最終段階及び軟骨基質石灰化を初めてin vitroで証明した優れた業績であり，歯学博士の学位請求に十分，値するものと認める。