

Title	成長板軟骨細胞の分化機能発現に及ぼすX線照射の影響
Author(s)	平沼, 広子
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39088">https://hdl.handle.net/11094/39088</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	平沼 弘子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 11838 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	成長板軟骨細胞の分化機能発現に及ぼすX線照射の影響
論文審査委員	(主査) 教授 淵端 孟
	(副査) 教授 鈴木不二男 講師 山本 照子 講師 岩本 容泰

### 論文内容の要旨

#### 【緒言】

成長期の個体が高線量のX線に被曝すると骨の長軸方向の成長が抑制されることは古くから知られている。X線照射された骨を組織学的に観察すると、骨の伸長に重要な働きを担っている成長板軟骨に顕著な変化が生じている。したがって、X線照射による骨の伸長抑制は、成長板軟骨の障害に起因すると考えられるが、この詳細なメカニズムについては未だ不明である。

成長板軟骨において、軟骨細胞は盛んに増殖を繰り返した後に、基質を豊富に産生し、引き続き肥大軟骨細胞へと変化する。次いで、細胞外基質に石灰化を誘導し、毛細血管、破骨細胞の侵入により石灰化軟骨基質は新生骨へと置き替わる。このように成長板軟骨は一連の分化段階の細胞から構築されており、これらの細胞の増殖、分化の速度は長幹骨の伸長速度と連動している。したがって、X線照射による成長板軟骨の障害機構を解明するためには、それぞれの分化段階の成長板軟骨細胞集団にX線を照射し、その後の分化機能の変化を追跡する必要がある。そこで本研究では、in vitroにおいて一連の成長板軟骨細胞の分化を忠実に再現できるウサギ成長板軟骨細胞培養系を用い、各分化段階における成長板軟骨細胞のX線感受性を解析した。

#### 【方法】

##### 1) ウサギ成長板軟骨細胞培養系

生後4週齢のウサギ肋軟骨から単離した成長板軟骨細胞をII型コラーゲンにてコートしたプレート上に5.5万個/cm<sup>2</sup>の高密度で播種し、10%牛胎仔血清を含む $\alpha$ MEM培地にて培養した。

##### 2) X線照射条件

日立小動物X線照射装置を用い、線量率25cGy/min、管電圧130kV、管電流3mA(半価層0.1mm銅, 0.5mmアルミニウム)にて1から10GyのX線照射(一回照射)を行った。増殖期終了直後(培養4日目)、基質形成期(培養8日目)、そして最終分化、石灰化については肥大化期(培養15日目)に照射し、成長板軟骨細胞の機能に与える影響を調べた。

##### 3) 軟骨細胞の機能分析

軟骨細胞外基質の主成分であるII型コラーゲンおよびプロテオグリカン(PG)の合成および蓄積を検討した。最終分化に関しては、アルカリフォスファターゼ(ALPase)活性とX型コラーゲンの発現を検討し、細胞外基質の石

灰化はカルシウム含量および合成能を測定した。カルシウムの取り込み、PGの合成はそれぞれ [ $^{45}\text{Ca}$ ], [ $^{35}\text{S}$ ] 硫酸にてパルスラベルし、放射活性を測定した。PGの分解は、 [ $^{35}\text{S}$ ] 硫酸にてグリコサミノグリカン基質をプレラベルし、培地中に放出される放射活性を追跡した。

#### 【結果】

II型コラーゲンプレートに播種した軟骨細胞はコンフルエントに達する4日目までは活発に増殖して、それ以降、球形の成熟軟骨細胞へと分化した。軟骨細胞の成熟化に伴い、細胞層への [ $^{35}\text{S}$ ] 取り込み能は約10倍増加した。培養10日目頃より、軟骨細胞のアルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性の急激な上昇と細胞の肥大化が起こった。培養30日までに石灰化物の沈着が観察された。

軟骨細胞が成熟軟骨細胞へと分化を開始する4日目に、1から10GyのX線を照射すると、照射直後より線量依存的にPG合成能の低下および培地中へのPGリリースの増加が認められた。また、10GyのX線を照射すると、細胞あたりのPG量は培養25日目には非照射群の約20%と低値であった。さらに10Gy照射群においては培養15日目のX型コラーゲンの産生をほぼ完全に抑制し、ALPase産生は非照射群の約40%に低下した。培養33日目のカルシウム沈着量は非照射群の160  $\mu\text{g}/\text{mg}$  蛋白量に対して10Gy照射群では70  $\mu\text{g}/\text{mg}$  蛋白量であった。

成熟軟骨細胞 (培養8日目) への10Gy照射は、細胞のPG合成には影響しなかった。しかし、PGの培地中へのリリースの増加が観察され、結果として細胞層のPG量は培養25日目には非照射群のそれに比べて60%に低下した。培養15日目におけるX型コラーゲンの産生は影響を受けなかったが、ALPase活性、カルシウム沈着量はそれぞれ非照射群の70%、63%に低下した。

培養15日目の肥大化軟骨細胞に対して1から10GyのX線照射は、PG、X型コラーゲン、ALPaseの産生には影響を与えなかった。しかし、 [ $^{45}\text{Ca}$ ] の取り込みは有意に低下した。培養33日目における石灰化物の沈着量は非照射群の71%であった。

いずれの分化段階の軟骨細胞に1から10GyのX線を照射してもII型コラーゲン産生は全く影響がみられなかった。

#### 【考察】

今回の研究で、X線照射が成長板軟骨細胞の基質合成、および基質の分解、肥大化、石灰化を抑制することが判明した。X線照射が成長板軟骨細胞の増殖を抑制することは既に報告されており、今回の実験結果と合わせると、X線照射は成長板軟骨細胞のほとんどの分化機能を直接障害しうることが明らかになった。したがって、X線照射によって引き起こされる成長板の組織変化の大部分はX線の成長板軟骨に対する直接的な効果によると考えられる。

成長板軟骨細胞は成熟化とともに増殖を停止するが、さらに肥大化して、石灰化を誘導する。10GyのX線照射は増殖の停止した肥大軟骨細胞のその後の石灰化誘導を抑制したことから、X線照射は増殖とは無関係に軟骨細胞の分化機能を障害しうることが判明した。

本実験系では成長板軟骨細胞は分化が進むにつれて、X線抵抗性を示した。しかし、一度成長板軟骨細胞がX線照射による障害を受けるとその後の分化機能の発現は実験期間を通じて完全に回復することはなかった。このことはX線に被曝した細胞が成長板に存在する限り、照射による影響は持続することを示唆するものである。

### 論文審査の結果の要旨

放射線照射による内軟骨性骨形成障害機構を追究するためには、成長板軟骨細胞の増殖のみならず分化機能に及ぼすX線照射の影響を解明する必要がある。本研究では、成長板軟骨細胞培養系の種々の分化段階にX線を照射し、その分化機能に与える影響を検討した。この結果、X線照射により成長板軟骨細胞のほとんどの分化機能が直接的に障害され、また、その障害程度はX線照射の時期が遅くなるとともに減少することが判明した。以上の研究は、成長板軟骨細胞の分化過程におけるX線照射の直接的な影響を明らかにし、人体硬組織成長発育に関する放射線生物学的研究に新しい知見を加えるものとして価値ある業績であり、博士 (歯学) の学位請求に十分値するものと認められる。