氏名	茅野晃弘
学位の種類	歯学博士
学位授与番号	博甲第800号
学位授与の日付	平成2年3月28日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第5条第1項該当）
学位論文題目	合成ハイドロキシアパタイト表面のヒト骨肉腫細胞株（HOS）培養系における初期石灰化
論文審査委員	教授　永井教之　　教授　中井宏之　　教授　西嶋克巳

学位論文内容の要旨

研究目的：合成ハイドロキシアパタイト（ＨＡ）は顎骨組織と高い親和性があることが知られており，骨内組織に埋入されたＨＡ表面で添加性骨形成の発現がみられる。高温度焼結ＨＡ顆粒およびブロック体は顎骨補填材として臨床応用されているが，これらの初期石灰化機構は不明な点が多く，明確な説明がなされていない。本研究はＨＡ表面における石灰化現象を解明するため，初期石灰化のin vitro モデルとされるヒト骨肉腫細胞株（ＨＯＳ）をＨＡ表面で培養し，その表面で初期石灰化の発現様式を超微形態学的に観察した。

材料と方法：1. 合成ハイドロキシアパタイト(ＨＡ)の調製：ＨＡ（太平化学産業㈱より供与）は焼成温度1250℃緻密体，直径17㎜，厚さ約1.0㎜のディスクで表面の平均粗さは0.23 μmである。

2. 実験方法：実験1　ＨＡ上にＨＯＳ細胞を下記の条件で培養した。培地は10％ウシ胎児血清，1㎎/ℓゲンタマイシン，50㎎/ℓＬ－アスコルビン酸ナトリウム，5ｍＭβ－グリセロリン酸ナトリウムを添加したダルベッコ変法ＭＥＭ培地である。増殖中のＨＯＳ細胞をＨＡディスク中央部に2.5×10^4個植え込み，CO_2インキュベーターで1，4，8週まで培養した。培養液は週2回交換した。

実験2　実験1の対照としてＨＯＳ細胞をプラスチックディッシュ(ＰＬ)上に実験1と同条件で培養した。

実験3　ＨＡ界面の石灰化がＨＯＳ細胞関与であるかどうかを検索するため，実験1と2の培養条件でＨＯＳ細胞を除いて浸漬処理した。

3. 標本作製と観察方法：各実験のＨＡおよびＰＬ試料を2％グルタールアルデヒド・2％パラホルムアルデヒド液で固定し，さらに1％OsO_4による後固定を行った。常法に従いEpon 812に包埋した。超薄切片を作製し，酢酸ウラン・鉛二重染色を施して日

立H－800型透過電子顕微鏡で観察，撮影した。また，アルカリ性フォスファターゼ（ALPase）検出はクエン酸鉛法（Mayaharaら）により行い，観察した。

結果：実験1　光顕所見；培養4週間でHA表面に増殖したHOS細胞は上層と下層に区別された。上層はHOS細胞が上皮様で密な配列を示し，下層はHOS細胞が疎となりHOS細胞間空隙にHOS細胞変性物，大小の石灰化物の形成が観察された。また，HA界面に帯状の石灰化層が観察された。培養8週間では下層におけるHOS細胞間は拡大しHOS細胞変性物，石灰化物とHA界面の石灰化層はその幅を増加させていた。電顕所見；培養4週間ではHOS細胞層上層は長紡錘形または卵円形なHOS細胞が細長い細胞突起を出して互いに密接していた。HOS細胞下層ではコラーゲン細線維および基質小胞様構造物，膜様構造物などのHOS細胞変性物が観察され，膜構造に沿って結晶様構造物の沈着と石灰化巣がみられた。またHA界面に厚さ0.1～2.8 μm の結晶沈着層がみられた。培養8週間ではHOS細胞層上層のHOS細胞は紡錘形あるいは多角形で，多角形HOS細胞間には変性，崩壊したHOS細胞成分が密在していた。HOS細胞層下層におけるHOS細胞変性物の増加は顕著であった。さらにHA界面の結晶沈着層は厚さ0.6～4.5 μm と増加しており，時に結晶沈着が塊状に隆起していた。AL－Pase は上層のHOS細胞膜と変性物に認められた。

実験2　光顕的，電顕的にも実験1とほぼ同様の所見を呈しているが，実験1でみられたようなHA界面の結晶沈着層はPL界面では観察されなかった。

実験3　HA界面には約0.1 μmの微細結晶の沈着層が出現していた。この結晶沈着層はHOS細胞培養4週間のHA界面の結晶沈着層と類似していた。

考察と結論：実験1と2からHAおよびPL界面における初期石灰化現象に相違がみられた。HA上培養HOS細胞では初期石灰化としてHOS細胞関与の石灰化とHA界面で結晶沈着層がみられた。HA界面の結晶沈着層は，HOS細胞を除いた実験3でも認められた。本研究から，HA表面に骨原性培養細胞を増殖させた場合，細胞変性物を基盤として生ずる初期石灰化とHA界面で起きる物理化学的石灰化現象とが同時に起きていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は合成ハイドロキシアパタイト表面における初期石灰化現象を明らかにすべく，ヒト骨肉腫細胞株（HOS）を合成ハイドロキシアパタイト表面で培養し，初期石灰化様式を電顕的に検索したものである。合成ハイドロキシアパタイト表面の初期石灰化がHOS細胞変性物質を基盤として生ずる場合と界面で生ずる物理化学的現象とが同時に起きていることを明らかにしたことから，合成ハイドロキシアパタイトの骨形成能について重要な知見を得たものとして価値ある業績として認める。

よって，本研究者は歯学博士の学位を得る資格があると認める。