

氏名	森 木 大 輔
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1586号
学位授与の日付	平成9年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学位論文題名	機械的刺激下におけるヒト臍帯動・静脈血管内皮細胞の増殖能の違い
論文審査委員	教授 杉本朋貞 教授 村山洋二 教授 渡邊達夫

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】 歯肉にブラッシングによる機械的刺激を与えることによって炎症の改善がみられることは臨床的に知られている。しかし、その基礎的な研究は少なく、その機序は解明されていない。そこでマッサージ効果を細胞レベルで解明するために炎症の消長に關係の深い血管内皮細胞に着目した。本研究ではヒト臍帯動脈と静脈の血管内皮細胞を用い、間欠的な刺激を与えたときの増殖に及ぼす影響を検討することを目的とした。

【材料ならびに方法】

1. 試料の分離と培養 臍帯動・静脈血管管腔内をトリプシンで処理し、血管内皮細胞を分離した。10%ウシ胎児血清、25 μ g/ml ECGS および30 μ g/mlヘパリンを含む抗生物質含有MCDB107培地を用いて5%炭酸ガス存在下、37℃で細胞を培養した。実験には7-9代の細胞を使用した。

2. 機械的刺激の条件 コラーゲンコートしたフレクサーセルプレートに動・静脈血管内皮細胞を1ウェル当たり 10^5 個播種し、24時間静置したものを、0日目 $\square$ の標本とした。その後、非刺激群、間欠的刺激群(6, 12時間刺激/日)、連続刺激群に分け、細胞伸縮装置フレクサーセルを用いて、60回/分、24%の応力を細胞に与えた。

3. 細胞増殖の指標 細胞数、プロモデオキシウリジン(BrdU)の取り込みは最も応力のかかるウェル辺縁を観察した。

1) 増殖率 0, 1, 3, 5, 7, 9日目にウェル辺縁の同一部位を写真撮影(X100)し、細胞数をカウントした。細胞の増殖率は各測定日の細胞数から0日目の細胞数を引いた差を0日目の細胞数で割ることにより算出した。細胞の大きさは印画紙上で観察した。

2) BrdUの取り込み 各測定日で24時間 BrdUを取り込ませ、免疫染色した。顕微鏡下(X200)で核が濃い茶色に染色した細胞を BrdUを取り込んだ細胞とした。

【結果】

1. 動脈血管内皮細胞

1) 細胞の形態 連続的な刺激を与えた群では応力に垂直な方向に細胞が配列した。間欠的な刺激を与えた群では細胞の配列に方向性は観察されなかった。また、連続的な刺激を与えた群では5日目以降、細胞の剥離が観察された。

2) 細胞数、増殖率 5日目までは間欠的な刺激を与えた群が最も高い値を示した。静置した細

胞は、7日目以降いずれの実験群よりも高くなった。

3) BrdU の取り込み 機械的刺激を与えた群では、3日目までは取り込み率が有意に増加した。

2. 静脈血管内皮細胞

1) 細胞の形態 連続的な刺激を与えた群では応力に垂直な方向に細胞が配列した。間欠的な刺激を与えた群では細胞の配列に方向性は観察されなかった。

2) 細胞数、増殖率 与えた刺激時間が長い群ほど高い値を示した。

3) BrdU の取り込み 与えた刺激時間が長い群ほど取り込み率が高くなった。

3. 動・静脈血管内皮細胞の比較

1) 細胞の形態 静脈血管内皮細胞は動脈血管内皮細胞に比較し、幅が太い。しかし、連続的な刺激を与えたとき、動脈とほぼ同じ幅になった。

2) 細胞数、増殖率 静置の状態では動脈血管内皮細胞は静脈血管内皮細胞に比べ、細胞数、増殖率とも高い値を示した。動脈血管内皮細胞は間欠的な刺激を与えた群で最も増加した。これに対し、静脈血管内皮細胞では連続的な刺激を与えた群で最も増加した。

3) BrdU の取り込み 静置の状態では動脈血管内皮細胞の方が静脈血管内皮細胞よりも高かった。動脈血管内皮細胞では刺激を与えた群で3日目まで取り込み率が増加し、5日目以降では増加しなかった。しかし、静脈血管内皮細胞では5日目以降でも刺激を与えた群で取り込み率が増加した。

【考察】 本研究では、同一人物同一臓器由来の細胞を用いて間欠的な刺激を与えたときの増殖におよぼす影響を9日間観察した。その結果、刺激により細胞の増殖が促進されることが示された。動脈血管内皮細胞では間欠的な刺激を短期間(5日間)与えた群で特に効果的であった。しかし、静脈血管内皮細胞では連続的な刺激を長期間与えた群で増殖が促進された。これまでに連続的な刺激の影響は報告されているが、間欠的な刺激の影響はほとんど解明されていない。現在、機械的刺激に対する細胞の応答性に関する分子レベルでの機序は解明されていない。近年、細胞の膜伸展に応じるSA(stretch activated)チャネルが多く、細胞で報告されており、SAチャネルを介したカルシウム流入が細胞の形態応答に関与していることが報告されている。機械的刺激に対する細胞の増殖促進もSAチャネルが関与しているのかもしれない。

長期間の連続的な刺激を与えたとき動脈血管内皮細胞の増殖が抑制された。しかし、BrdU の取り込みは5日目以降でも下降しなかった。動脈血管内皮細胞の増殖抑制の原因としては細胞の増殖能が低下しているのではなく、接着分子の発現の違いに由来した細胞の剥離によるものかもしれない。

本装置はウェル辺縁に最も応力がかかるので機械的刺激に対する細胞の応答性を検討する場合、今回のようにウェル辺縁を評価するのが望ましいといえる。

【結論】 ヒト臍帯動脈と静脈の血管内皮細胞に、機械的刺激を与えたときの増殖におよぼす影響を検討した結果、

1. 静置した状態では動脈血管内皮細胞は静脈血管内皮細胞よりも増殖能が高かった。
2. 機械的刺激により動・静脈血管内皮細胞の増殖が促進された。動脈血管内皮細胞は短期間の間欠的な刺激により最も増殖が促進され、静脈血管内皮細胞は長期間の連続的な刺激により増殖が促進された。

論文審査結果の要旨

本論文では臍帯動・静脈血管内皮細胞に機械的刺激を与えたときの細胞増殖の違いを細胞数の増加、ブロモデオキシウリジンの核への取り込みを指標にして検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. 動脈血管内皮細胞は静脈血管内皮細胞よりも細胞数の増加が大きい。
2. 機械的刺激により動・静脈血管内皮細胞の増殖が促進される。動脈血管内皮細胞は短期間の間欠的刺激により最も増殖が促進され、静脈血管内皮細胞は長期間の連続的刺激により増殖が促進される。

本論文の以下の点が意義あるものとして評価された。

1. 動脈血管内皮細胞と静脈血管内皮細胞は機械的刺激に対して異なった増殖のパターンを示していることを明らかにした。
2. 実際に応力の加わっているウェル辺縁の細胞に限って観察し、機械的刺激に対する細胞の反応を検討した。
3. 同一個体の臍帯動・静脈血管内皮細胞を用いたことにより、動脈と静脈の比較ができた。
4. 一つのウェルの細胞を追って観察しているため使用する細胞の量が少ないこと、本研究で得られた機械的刺激の条件を応用することにより、得られる量の少ない菌肉微小血管内皮細胞への応用を可能にした。

以上のことにより、審査委員は一致して本論文は博士（歯学）の学位を与える基準を満たしているものと判定した。