

氏名	秦 春 林
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 1717 号
学位授与の日付	平成10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	Aging and ectopic bone formation induced by partially purified bone morphogenetic protein (部分精製BMPによる異所性骨形成と加齢に関する研究)
論文審査委員	教授 滝川正春 教授 松村智弘 教授 永井教之

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

骨誘導能を有する骨形成タンパク質 (BMP) は硬組織再建への応用が注目されている。加齢に伴い細胞の代謝活性が低下し、生体の予備能力が低くなることが知られているが、BMPによる異所性骨形成と加齢の影響に関する知見はほとんど得られていない。本研究では、BMPによる異所性骨形成に及ぼす加齢の影響を明らかにすることを目的に、部分精製BMPとI型コラーゲン複合体を月齢の異なるラット (4週齢、10ヶ月齢、18ヶ月齢) の皮下組織に埋入し、摘出物を形態学的観察、組織計量学的分析および血管の基底膜に存在するIV型コラーゲンに対する免疫組織化学的染色法を用いて観察するとともに、摘出物のカルシウム量とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定して、BMPによる骨形成能を評価した。

### 【材料および方法】

BMPはウシ脱灰骨粉から4Mグアニジン塩酸を用いて骨タンパク質を抽出し、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィで部分精製した。安定な活性を維持するために、5kgの骨粉から得られるBMPをプールして使用した。BMP群としては、BMP 2mgをI型アテロコラーゲン (高研) 10mgと混合後、凍結乾燥して複合体とした。対照群としては、I型アテロコラーゲン10mgのみを凍結乾燥した。実験動物として、4週齢と10ヶ月齢、18ヶ月齢のウィスター系雄性ラットを合計60匹を使用した。ネンブタール (Pentobarbital sodium) 腹腔内全身麻酔下で、ラット皮下4カ所に皮下切開を加え、BMP/I型コラーゲン複合体3点とI型コラーゲンのみ1点を埋入した。埋入後7、14、21日目に屠殺し、埋入物を摘出した。摘出物の一部は4%パラフォルムアルデヒド溶液にて16時間浸漬固定を行い、常法に従いパラフィン包埋して4 $\mu$ mの切片を作製した。その後、ヘマトキシリン-エオジン (H.E) 染色し、形態学的観察と組織計量学的分析を行なうと共に、Peroxidase anti-peroxidase (PAP) 法によるIV型コラーゲンの免疫組織化学的染色を行ない光学顕微鏡で観察した。他の摘出物は凍結乾燥後、O-cresolphthalein complex (OCP C) 法にてカルシウム量測定およびKind-Kind法にてALP活性検定を行なった。

## 【結果】

### 1. 埋入7日後

4週齢ラット群では、摘出物周囲に間葉系細胞の増殖と多数の血管の増生が認められるとともに、担体コラーゲン内に侵入した血管も観察された。10ヶ月齢および18ヶ月齢群では、4週齢群と比べて間葉系細胞の増殖や血管の増生は少なかった。これら3群とも骨および軟骨の形成は認められなかった。18ヶ月齢群のALP活性は4週齢群と10ヶ月齢群より低く、その差は有意であった。

### 2. 埋入14日後

4週齢群では、骨髓様組織を伴う梁状骨が担体外周囲全体に認められ、また担体コラーゲン中央部には少数の血管侵入が観察された。10ヶ月齢群では、4週齢群に比べ少ないものの摘出物外側に塊状骨が観察されたが、担体コラーゲン中央部への血管侵入は極めて少なかった。両群とも膜性骨化に類似した直接骨形成であった。18ヶ月齢群では骨や軟骨組織は認められなかった。摘出物のカルシウム量は10ヶ月齢群は4週齢群の約2/3で、有意差が認められた。ALP活性では18ヶ月齢群は4週齢群と10ヶ月齢群より低く、その差は有意であった。

### 3. 埋入21日後

4週齢群では、多数の成熟した梁状骨内に多量の骨髓様組織が観察され、担体コラーゲンはほぼ消失し、間葉系組織に置換されており多数の血管侵入が観察された。10ヶ月齢群では骨髓様組織に伴う骨形成が認められ、中央部の担体コラーゲンは残存し、その中には少数の血管侵入が観察された。18ヶ月齢群では塊状骨が摘出物の辺縁部に局所的に観察され、摘出物中央部には担体コラーゲンが多量に残存しており、同部への血管侵入はほとんど認められなかった。10ヶ月齢群のカルシウム量は、4週齢群の約2/3で、その差は有意であった。10ヶ月と18ヶ月齢群のALP活性は4週齢群より低く、その差は有意であった。

## 【考察および結論】

1. 部分精製BMPによる異所性骨形成は加齢により遅延し骨形成量も著しく減少したことから、骨形成能と細胞の代謝活性低下との相関が示された。
2. 18ヶ月齢ラット群においても骨形成がわずかに認められたことから、老齢ラットにおいても骨形成能が維持されることが示唆された。
3. 各月齢ラット群における骨化様式は、これら3群とも膜性骨化に類似した直接骨形成であることが示された。
4. 加齢に伴う異所性骨形成能の差異は間葉系細胞の増殖、血管分布およびALP活性の変化と関連していると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、牛骨から精製した部分精製BMP／I型コラーゲン複合体を4週齢（幼若）、10か月齢（成熟）および18か月齢（老齢）三群のラットに埋入し、各群の異所性骨形成過程を組織学的観察、組織計量学的分析、Ca含有量測定、ALP活性検定、血管分布の分析により経時的に追求し、三群の差異を詳細に比較検討したものである。

本研究の結果から、BMPによる異所性骨形成は加齢により遅延し骨形成量も著しく減少することが明らかになった。18ヶ月齢ラット群においても骨形成がわずかに認められ、老齢ラットにおいても骨形成能が維持されることが示唆された。加齢によって血管の埋入物への侵入は遅延し、その程度も低下したことから、加齢に伴う異所性骨形成能の差異は血管分布の変化と関連して生じていると考えられた。また、各月齢ラット群における骨化様式は、いずれも膜性骨化に類似した直接骨形成であることが示された。

これらの知見は、BMPの歯科における臨床応用ための基礎的研究として重要な情報を与え、有用な業績であると認める。

よって、本申請者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。