

氏名	西 一 也
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 1336 号
学位授与の日付	平成7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	ヒト歯肉微小血管内皮細胞の分離, 培養
論文審査委員	教授 渡邊達夫 教授 滝川正春 教授 杉本朋貞

学位論文内容の要旨

【緒言】

血管内皮細胞は、血管の透過性や血管新生に関与し、炎症において重要な働きをしている。現在、歯肉炎・辺縁性歯周炎における培養系での血管内皮細胞の研究では、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞が広く使用されている。ところが、培養血管内皮細胞は、由来臓器の違いにより機能が異なるため、歯肉炎・辺縁性歯周炎の研究においては、歯肉の微小血管内皮細胞を使用することが要求される。本研究の目的は、ヒト歯肉から微小血管内皮細胞を分離、同定し、その培養条件を検討することである。

【材料と方法】

1. 分離

抜歯及び歯周外科時に得られた歯肉組織(12-320mg, n=20)を抗生物質含有PBSで洗浄し、約3mm角の小片に切り、0.5%コラゲナーゼ、1% EDTAを含む培養液中に37℃で1時間インキュベートした。この歯肉片を培養液を入れたシャーレ内で擦過して内皮細胞を遊離させた。遠心して集めた細胞を、10% FBS(fetal bovine serum), 75 μ g/ml ECGS(endothelial cell growth supplement), 30 μ g/mlヘパリンおよび抗生物質などを含んだMCDB107培地に懸濁後、タイプIコラーゲンでコートされた96ウェルプレートに均等に播種し、培養した。コンフルエントに達した細胞のうち、単層敷石状配列を呈し、かつ、他細胞の混入が認められないウェルの細胞を、ヒト歯肉微小血管内皮細胞として、以後継代培養した。

2. 同定

分離した細胞が、血管内皮細胞であることを、以下の4項目で確認した。

(1)単層敷石状配列：コンフルエント時の形態を、位相差顕微鏡で観察した。

(2) von Willebrand factor (vWF)の存在：抗ヒトvWF抗体を一次抗体とする間接蛍光抗体法で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

(3) Ac-LDLの取り込み：10 μ g/mlの蛍光標識Ac-LDL (acetylated low density lipoprotein)を含む培養液で37°Cで4時間培養し、3%ホルマリンで固定後、蛍光顕微鏡で観察した。

(4) 血管様網目構造の形成：マウスEHS肉腫から分離された再構成基底膜であるMatrigel上に細胞を播種し、位相差顕微鏡で観察した。

3. 培養条件の検討

96ウェルプレートに1ウェル当たり1,500個の細胞を播種し、24時間培養した。ついで、増殖因子、ヘパリンおよびFBSを所要濃度に調整した培養液と交換した。さらに48時間培養して、細胞数をMTT比色定量法で測定した。

【結果】

96ウェルプレートに播種された細胞は、平均4.8ウェルでコンフルエントに達し、この内13%が血管内皮細胞と同定された。分離の成功率は、歯肉提供者の年齢が若いほど高かったが、性別、湿重量とは、相関が認められなかった。

分離した細胞は、血管内皮細胞に特徴的な単層で敷石状配列を呈した。また、間接蛍光抗体法での染色で細胞質に顆粒状の陽性像が認められた。Ac-LDLの取り込みについても、細胞質に明瞭な蛍光が観察されたが、臍帯静脈血管内皮細胞と比較してやや弱いものであった。さらに、Matrigel上に播種された細胞は、血管様網目構造を形成した。以上のことから、これらの細胞を、血管内皮細胞と同定した。

培養条件の検討により、ヒト歯肉微小血管内皮細胞は、MCDB107培地に20% FBS, 75 μ g/ml ECGS, 30 μ g/mlヘパリンなどを添加した培養条件で良好に増殖することが分かった。また、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞と比較して、細胞増殖において、FBS依存性が高いことが認められた。

【考察】

血管内皮細胞の分離法には、他種の細胞を機械的に除去する方法、メッシュで濾過して分離する方法、特異抗体をコートした微小磁気ビーズを利用して分離する方法などがある。これらの方法を、歯肉微小血管内皮細胞の分離に応用してみたが、いずれの方法も成功しなかった。

そこで、組織より得られた細胞を、96ウェルプレートに均等に播種するという方法を用い、ヒト歯肉より血管内皮細胞を分離することができた。

ヒト歯肉微小血管内皮細胞の分離、培養法の応用により、歯肉炎・辺縁性歯周炎の研究において、臍帯静脈血管内皮細胞に代わり、ヒト歯肉微小血管内皮細胞の使用が可能となった。

論文審査結果の要旨

本論文は、ヒト歯肉から微小血管内皮細胞を分離・同定し、その培養条件を検討したものである。コラゲナーゼ処理したヒト歯肉を、擦過して細胞を遊離させた。遠心して集めた細胞をMCDB 107培地に懸濁し、96ウェルプレートに播種した。コンフルエントに達した細胞のうち、単層敷石状配列を呈し、且つ、他の細胞が混在していないウェルの細胞を継代培養した。von Willebrand factor の存在と、Dil-Ac-LDLの細胞内への取り込みにより、血管内皮細胞であると同定した。さらに、Matrigel上に播種した細胞が血管様網目構造を形成することも確認した。また、ヒト歯肉微小血管内皮細胞はMCDB 107培地に20%FBS, 75 μ g/ml ECGS, 30 μ g/ml ヘパリンを添加した培養条件で良好に増殖することを示した。

歯肉炎・辺縁性歯周炎における血管内皮細胞の研究では、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞が広く使われている。ところが、培養血管内皮細胞は由来臓器の違いにより機能が異なるため、ヒト歯肉由来の血管内皮細胞を使用することが要求されている。本論文の分離培養法を応用することにより、ヒト歯肉微小血管内皮細胞の利用が可能になったといえよう。

以上のような観点から、審査委員は一致して、本論文が博士（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。