

## 最終試験の結果の要旨

神奈川歯科大学大学院 歯学研究科 神経組織発生学講座 宮城直美に  
対する最終試験は、主査 松尾雅斗 教授、副査 槻木恵一 教授、  
副査 小松知子 講師により、論文内容ならびに関連事項につき口頭試問を  
もって行われた。

その結果、合格と認めた。

主 査 松 尾 雅 斗

副 査 槻 木 恵 一

副 査 小 松 知 子

論文審査要旨

低出力超音波パルス LIPUS を照射したヒト歯槽骨  
骨膜由来スフェロイドに関する超微細構造学的研究

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

神経組織発生学講座 宮城直美

(指導：高橋理教授)

主査 松尾雅斗 教授

副査 槻木恵一 教授

副査 小松知子 講師

## 論文審査要旨

学位論文である『低出力超音波パルス LIPUS を照射したヒト歯槽骨骨膜由来スフェロイドに関する超微細構造学的研究』は培養ヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPCs) から作製した球状のスフェロイドに低出力超音波パルス (Low-intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS)) を照射した後の形態学的変化を、光学顕微鏡、免疫組織化学法、透過型電子顕微鏡により観察したものである。現在、LIPUS 照射は骨折治癒における効率的な治療法として整形外科・口腔外科領域にて応用されているが、細胞組織学的変化は明らかにされていない点も多い。本研究ではヒト骨膜由来細胞を用い、インプラント治療や歯周治療時の骨造成を目的として行われ、明確で新規性がありかつ臨床的にも有意義な研究目的を有していると評価した。

研究方法として三次元細胞スフェロイドの作製は、本学歯周外科の処置時、歯槽骨表面に存在する骨膜組織を2.0×2.0 mm程度で採取した。この骨膜組織より得たHABPCsは継代培養を行い、HABPCsシートから直径約3 mmの三次元細胞スフェロイドを形成した。その後、照射側では1, 3, 7, 14日間、毎日15分間のLIPUS照射 (1 MHz, パルス周波数100 Hz, 出力は178 mW/cm) を継続した。スフェロイドの組織学的な観察方法として、(1) トルイジンブルー染色による光学顕微鏡観察、(2) 免疫組織化学法によるスフェロイドの組織学的検索を共焦点レーザー顕微鏡観察、(3) 厚さ約1 μmの超薄連続切片による透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察を行った。このスフェロイドについて、用いられた細胞は均一なのかという質疑に対して1名の患者から100個超のスフェロイドを作製したことより均一な性質を持つ試料であるとの回答を得た。この細胞は、神奈川県歯科大学倫理委員会の承認 (認証番号第178番) のもとに、神奈川県歯科大学附属病院に来院し、インフォームドコンセントの得られた患者より採取され、ヘルシンキ宣言を遵守して実験は行われた。また、スフェロイドの一方からのみLIPUS照射をすることは完全な対照群ならないのではないかとの質疑には、過去の本学研究グループによる一連の論文よりLIPUS照射の影響は表層のみに留まるとの回答を得た。

組織学的観察では、スフェロイドは細胞の形態により表層、中層、深層に区分できた。各群とも表層では扁平な細胞で深層へ行くに従って多角形の径の大きい細胞で構成されていた。また、表層から深層に向かって細胞が連なって索状構造を呈していた。索状構造を含む細胞の密な部分、顆粒を多く含む部分において免疫陽性の出現が見られた。また、TEM観察においては電子密度の高い顆粒の存在が認められた。時間の経過と共に層構造は失われ一様な組織へと変化し、組織内に類骨様の構造が観察された。この類骨様の構造周囲に著しい免疫陽性の出現が見られた。これらのことから、光顕像、電顕像、免疫染色像でほぼ一致していることが示された。組織学的所見から定量的な分析が示されていないことについては、本研究は過去の本学学位論文における一連の研究ですでに示されているとの説明があり、形態学的領域においては妥当かつ適当な方法であると考えられた。

本研究は、ヒト培養歯槽骨骨膜由来細胞に LIPUS 照射を用いて分化を促進させる糸口をつかんだ。今後、動物実験などにより歯周組織再生、骨造成療法へ関連させて研究を展開させていく方向が示された。以上のように本研究はさらなる研究の発展により臨床への貢献が期待されるものである。そこで、本審査委員会は申請者の博士論文が博士 (歯学) の学位に十分値するものと認めた。