

論文審査の要旨

報告番号	甲第2701号	氏 名	丸山 範子
論文審査担当者		主査 口腔病態診断科学講座口腔病理学部門 美島健二 教授 副査 歯科薬理学講座 高見正道 教授 副査 歯科補綴学講座 馬場一美 教授	
(論文審査の要旨)			
<p>学位申請論文「Bone micro-fragility caused by the mimetic aging processes in α-<i>klotho</i> deficient mice: <i>in situ</i> nanoindentation assessment of dilatational bands」について、上記の主査1名、副査2名が個別に審査を行った。</p> <p>骨粗鬆症などの退行性疾患は人口の高齢化とともに増加し、骨強度の低下による骨折を生じやすくなる。この骨折の実態は骨量の減少だけでなく、ナノレベルの材質的な劣化が原因となりえる。骨はマクロの階層的三次元構造から引っ張り試験や3点曲げなどのバルク試験による材質的議論は難しい。一方、ナノインデンテーションは超微小領域の力学的特性を求めるナノテクノロジーであり、骨組織のような構造体への応用が期待できる。そこで本研究ではナノインデンテーションを応用し、ナノレベルでみられる骨質の変化を老化マウスモデルにおいて解析した。すなわち、老化モデルとして5週齢雄 B6.129-Kltm1Yin/Jcl 系統 α-<i>klotho</i> 遺伝子欠損マウス、対照群として同腹 Wild type, より採取した頭蓋骨と脛骨を非脱灰硬組織凍結切片作製法の応用により断面試料とした。その結果、Wild type 頭蓋骨はひずみ速度上昇に依存した弾性係数の向上が見られた。一方、ひずみ速度を低下させると、形態回復を伴う大きな応力緩和を示した。α-<i>klotho</i> 遺伝子欠損マウスではひずみ速度による変化は見られなかった。ラマン分光法による分子構造解析では、α-<i>klotho</i> 遺伝子欠損マウスにでコラーゲン架橋度が低下していた。これらのことより、ナノインデンテーションは、老化における骨質の変化を解析するのに有用な方法であることが確認され、本研究から、老化現象は骨の質的劣化を招き、病的骨折の増加に関与する可能性が示唆された。</p>			
<p>本論文の審査において、副査の高見委員および馬場委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p>			
<p>高見委員の質問とそれらに対する回答：</p> <p>ナノインデンテーション法で得られた WT と α-<i>klotho</i>^{-/-}の骨質の相異についての結果は、骨組織を構成する要素のうち、何を反映していると考えられるか。 α-<i>klotho</i>^{-/-}マウスの遺伝的形質的特性を踏まえて考察せよ。（α-<i>klotho</i>^{-/-}マウスでは、ビタミンDフィードバック機構が機能せず、骨代謝の異常をおこしオステオカルシンの発現が著しく低下します⁴。オステオカルシンは骨質に存在する非コラーゲン性タンパクの中では最も多く存在し、その発現量は骨芽細胞の石灰化マーカーとしても利用されています。骨は複雑な階層的三次元構造を有しており、ナノレベルにおいてオステオカルシンはカルシウムに対する強い親和性を持ち、ハイドロキシアパタイト結晶と結合すると同時にオステオポンチンを介してコラーゲン線維にリンクしています。ハイドロキシアパタイト結晶とこれら非コラーゲン性タンパクが形成する骨の最小構造は、動的応力に対してひずみをコラーゲン線維に分散させる周波拡張帯（dilatational bands）として機能し、破壊靱性値を向上させる可能性があると言えます。正常皮質骨のひずみ速度に依存した弾性係数向上と著しい応力</p>			

緩和は、ナノスケールで周波拡張帯が機能していることを示していると考察しています。一方、 α -*klotho*^{-/-} マウスではマトリクス架橋度の低下やオステオカルシンの低下により本質的な破壊を防止する材料レベルの機構が喪失されていると考えられます。)

馬場委員の質問とそれらに対する回答：

1. 本研究で乾燥骨を使用した意味は何か。湿潤骨の場合は物性値にどのような影響を与えると考えるか。
(過去の研究において、ナノインデンテーション法を用いて乾燥骨と湿潤骨の物性値の違いを発表しています。過去の報告において、9週齢 C57BL/6♀マウスでは Oliver-Pharr の式から同じく弾性係数を求めた場合、乾燥骨が 20GPa、湿潤骨は 11.5GPa となっています。これは粘弾性の影響により、荷重に対する変形量が過剰に大きくなることを示しています。本来では生体内を考慮すると湿潤状態で行う方が望ましいですが、本研究においては、実験条件を均一化させやすいために乾燥骨で行いました。しかし完全な乾燥条件の場合、クリープや応力緩和などの粘弾性挙動は起こらないため、本研究で用いたサンプルは弾性挙動と粘弾性挙動を議論できるだけの湿潤状態を保持しているものと考えられます。)
2. 今後、本研究を矯正学的に役立てることについてどのように考えるか。
(近年歯の移動を予測し矯正治療のゴール設定を明確化できるシミュレーション技術が発達しています。しかし、現在の治療体系において予測と実際の歯の動きに差がでてしまうことがあります。これは骨や歯根膜などの力学的解析が困難であり、物性を把握できなかったことが大きな理由の一つです。今回の研究を通して、コラーゲンとアパタイトから成る複合材料である骨の物性を解析する試み、とくに時間依存で挙動が異なる現象は新しい発見であり、今後のシミュレーション技術に発展させていく一助となると考えます。)

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査・美島委員からの質問：

金属などの均一な構造の物質と異なり生体組織など不均一な物質を評価する際に必要とされる測定条件は何か。(採取骨はすべて皮質骨の中で石灰化度が高い部位をラマン分光で確認し、その後走査型電子顕微鏡で表面粗さを把握して測定部位を決めました。脛骨においては中央部の骨幹部から採取しました。骨は不均一な構造体であり、骨が測定サイズや方向性に依存した物理的特性を示します。すなわち、マクロの測定レンジは構造(隙間)をとらえやすく、変形量が大きくなるため弾性係数が低下し、マイクロスケールでは上昇する傾向がみられます。この点、Oliver-Pharr の定理によりダイヤモンド圧子を用いたナノインデンテーション法が提唱され、材質レベルで硬組織を評価できる可能性が見出されました。本研究で用いた深さ方向への測定では、頭蓋骨や脛骨の弾性係数はおおよそ 60~200nm 圧子接触深さで均一な値を示していました。測定値が均一なレンジですべての動的試験や準静的試験を行うことにより、構造に左右されない材質レベルの評価が可能と考えられます。不均一な構造体の物性値を議論する上では、プレ実験として測定レンジを定めることが材料レベルの議論を行う上で重要です。)

主査の美島委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士(歯学)の学位授与に値するものと判断した。

