

ラット耳下腺の開口分泌過程における細胞骨格の形態的研究(東日本学園大学博士(歯学)論文の内容および審査の要旨(平成4年度))

著者名(日)	佐々木 泰裕
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	12
号	1
ページ	84-86
発行年	1993-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00007821/

の、最適溶射距離は15~25cmであった。また、使用した市販溶射材のなかで最大の接着強さを示したNi-Cr-Al-Mo溶射材の接着強さは、コントロール群としたリテンションビーズ試験片の値と同程度であった。また、レジンと強固に接合する溶射材を検索する目的で、歯科用接着用Co-Cr合金を粉碎して溶射材を試作したところ、Al粉末を30wt%添加した溶射材で最も高い接着強さを示し、熱サイクル40,000回負荷後においてもリテンションビーズ試験片よりも高い値が得られ、有意差が認められた。また、本試作溶射材で溶射した溶射皮膜表面を光電子分析装置を用いて分析した結果、すべての元素は、溶射皮膜表層では酸化物の状態が存在した。特にAlは表層

で46wt%を占め、Al₂O₃の状態であった。剪断試験後の破断面を観察したところ、リテンションビーズ試験片は機械的維持だけで接合しているが、本試作溶射材の試験片では、溶射表面とレジンは化学的に接着していると考えられる像を呈していた。

火炎溶射法を貴金属合金の表面改質法に応用することにより、接着性レジンと貴金属合金の化学的接着効果を改善できることが本研究で示唆された。

以上の結果から、本論文は、歯科補綴学の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	佐々木 泰 裕 (北海道)		
学位の種類	博 士 (歯学)		
学位記番号	甲 第15号		
学位授与の日付	平成5年3月19日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)		
学位論文題目	ラット耳下腺の開口分泌過程における細胞骨格の形態的研究		
論文審査委員	主 査	教授	金 澤 正 昭
	副 査	教授	市 田 篤 郎
	副 査	教授	武 田 正 子
	副 査	助教授	東 城 庸 介

論 文 内 容 の 要 旨

近年、口腔乾燥を訴えて来院する患者が増えている。このような唾液の分泌障害の原因は、腺組織の器質的変化をはじめとして多数挙げられている。これまで、その治療として、人工唾液などによる対症治療が行われているが、根本的な治療法はないのが現状である。したがって、唾液の分泌機構を解明することは意義があるものと考えられる。近年、内分泌、外分泌および神経分泌にみられる開口分泌過程で、細胞骨格が重要な役割を果たすといわれている。しかし、この細胞骨格の役割についてはまだ不明な点が少ない。そこで、本研究では、ラット耳下腺遊離腺房を用いて、分泌時の細胞骨格の変化とその制御因子について検討した。

材料と方法

1) 蛍光試薬と抗体

ローダミン・ファロイジン、抗ミオシン抗体、抗アクチン抗体、抗サイトケラチン抗体 (PKK1)、抗 α および β チューブリン抗体、抗フォドリン抗体と抗カルデスモン抗体を用いた。

2) 耳下腺腺房の調製

Wistar系ラット (雄性、8-12週齢) の耳下腺を摘出し、細切の後、Takuma and Ichidaの方法により、酵素処理を行い耳下腺遊離腺房を得た。この遊離腺房の浮遊液に、アミラーゼ分泌刺激薬として、 β アドレナリン作動性のイソプロテレノール、またコリン作動薬であるカルバミ

ルコリンを添加して、遊離腺房を刺激し、経時的に遊離腺房を採取した。

3) 静止時の腺房細胞の細胞骨格構成蛋白の検索

細胞質中の蛋白質をSDS-PAGEにより蛋白展開し、PVDF膜に転写して、前述の様な各種の細胞骨格蛋白の抗体を用いウエスタンブロットで検索した。

4) 蛍光抗体法による観察

遊離腺房を4%パラホルムアルデヒドまたは冷アセトンで固定し、凍結切片を作製した。これらの試料に対して、ローダミン・ファロイジンと前述の各種抗体による、二重染色を行い、蛍光顕微鏡により観察した。

5) 電子顕微鏡による観察

通常の電子顕微鏡用試料のほか、とくに微細繊維を詳細に観察するため、ヘビメロミオシン修飾法を併せ行い、電子顕微鏡で観察した。

6) 微細繊維の制御蛋白質の検索

蛍光抗体法により静止時と分泌刺激時の腺房細胞のミオシン、フォドリンおよびカルデスモンの局在について観察した。

結果と考察

1) 腺房細胞中の細胞骨格構成蛋白について

静止時の腺房細胞中にはケラチン (44, 50, 54KD), α , β チューブリン (50KD) およびアクチン (42KD) が認められた。また、微細繊維の制御蛋白質であるミオシン (200KD), フォドリン (240KD) とカルデスモン (70KD) も認められた。

2) 開口分泌過程における細胞骨格の変化について

(1) 微細繊維

静止時の腺房細胞の蛍光顕微鏡所見で、ローダミン・ファロイジンで認識される微細繊維は、腺腔膜に近接して局在し、腺腔を取り囲むように観察された。また、アクチンの蛍光は、細胞質に細顆粒状に局在していた。電子顕微鏡的観察では、微細繊維は腺腔膜の直下にあつて、分泌顆粒と腺腔膜を隔絶していた。また、微細繊維は分泌顆粒の周囲や分泌顆粒間にはみられなかった。

以上のことから、静止時の腺房細胞では、未重合のアクチンは細胞質中にび慢性に存在し、重合したアクチンである微細繊維は主に腺腔膜の直下にあることが明らかとなった。

刺激時には、細胞質中の微細繊維の蛍光は葡萄の房状に増強していた。一方、アクチンの蛍光は、静止時に比し腺腔側で蛍光が増強したが、細胞質中にも顆粒状に認められた。ヘビメロミオシン修飾法による電子顕微鏡的

観察では、刺激直後から腺腔は開大し、腺腔膜と融合・開裂した分泌顆粒周囲に微細繊維網が観察されたが、腺腔膜と融合していない分泌顆粒の周囲に微細繊維網は認められなかった。

なお、分泌終了時には、蛍光顕微鏡による観察では、微細繊維とアクチンの局在は、静止時のそれに近似していた。また、電子顕微鏡的観察では、分泌時に開大していた腺腔は狭小となり、微細繊維は腺腔膜の直下に存在することが観察された。

以上の結果から、微細繊維は静止時には、分泌顆粒と腺腔膜との融合を阻止する障壁として作用し、開口分泌過程では、腺腔膜と融合・開裂した分泌顆粒の内容物を、その収縮作用により腺腔外に放出することが推察された。さらに、微細繊維は開大した腺腔膜を収縮させる役割を演じていることが示唆された。

(2) 中間径繊維

蛍光抗体法の所見からケラチンの蛍光は、静止時および刺激時でも核を包み込む様なバスケット状の配列を示し、分泌過程での局在変化は認められなかった。電子顕微鏡による観察でも、分泌時の中間径繊維の変化は認められなかった。

(3) 微小管

微小管は、静止時ならびに分泌刺激時には、腺腔膜から細胞の基底側に向って放射状に配列しており、その局在に変化を認めなかった。しかし、分泌刺激後には微小管の短小化が認められた。

3) 微細繊維の制御蛋白について

開口分泌時の細胞骨格の挙動を検索すると、顆粒内容物の腺腔外への放出は、微細繊維の収縮によって惹起されることが示唆された。そこで、この微細繊維の制御因子とされている、ミオシン、フォドリンおよびカルデスモンについて開口分泌時の挙動を蛍光抗体法で観察した。

その結果、ミオシンは、微細繊維と同一の局在を示す所見が得られ、アクチン-ミオシン収縮機構の存在が示唆された。

また、フォドリンは、静止時には微細繊維と局在が同じであるが、開口分泌時には消失し、分泌が終了すると回復することから、微細繊維と細胞膜との結合を介して細胞膜を安定させることが示唆された。

さらに、カルデスモンは、静止時に腺腔側の細胞質中に存在するが、開口分泌時および開口分泌終了時には、消失することから開口分泌への関与が示唆されたが、その具体的な役割は解明できなかった。

学位論文審査の要旨

近年、唾液分泌量の減少に起因する様々な症状を訴え、来院する患者が増加している。これらの患者のうち、原疾患の明らかなものでは、その治療により唾液の分泌は正常に復するが、加齢による唾液分泌機能の低下症例などでは、まだ的確な治療法が確立されていない。

これまで、唾液の分泌機構に関しては、生化学的、生理学的および病理学的に種々検討されてはいるが、まだ不明な点が少なくない。

そこで、本論文の著者、佐々木泰裕は、ラット耳下腺腺房を用い、その分泌過程における細胞骨格の役割と細胞骨格のうち、とくに分泌過程に大きく関与するといわれ、微細繊維の制御蛋白であるミオシン、フォドリンおよびカルデスモンについて検討した。

その結果、微細繊維は静止時に腺腔膜直下に存在して分泌顆粒と腺腔膜の融合を阻止する障壁として働き、開口分泌時には、腺腔膜と分泌顆粒の融合の結果生じる開大した腺腔膜を収縮させることにより、顆粒内容を腺腔外に押し出す働きを担っていることが示唆された。

微細繊維の制御蛋白質として、ミオシン、フォドリン

およびカルデスモンが耳下腺腺房細胞中に存在していることを確認した。これらの蛋白質のうち、開口分泌時にミオシンは微細繊維と一致した局在を示すことから、アクチン-ミオシン収縮機構が存在することが示唆された。

また、フォドリンは静止時には、微細繊維と共存するが、開口分泌時に消失し、分泌終了時に回復することから、微細繊維と細胞膜の結合を介して細胞膜の安定化に働いていることが推察された。

なお、カルデスモンは、静止時には腺腔側の細胞質に局在しているが開口分泌時に消失し、分泌終了時においても認められないことから、開口分泌に何らかの役割を演じていることが示唆されたが、その具体的な役割については解明できなかった。しかし、このカルデスモンに関する知見は、国内外を問わずはじめてのものであり、今後の研究が期待される。

これらのことから、本研究は唾液分泌機構の解明に寄与するところが大きく、学位論文として十分価値があるものと思われる。

氏名・(本籍)	渋谷 祐史 (東京都)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第16号
学位授与の日付	平成5年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)
学位論文題目	人為的骨性癒着歯を用いた顎整形力の応用について
論文審査委員	主査 教授 石井 英司 副査 教授 賀来 亨 副査 教授 小鷲 悠典

論文内容の要旨

I. 緒 言

矯正歯科臨床に使用する矯正力は、歯を移動させるための矯正力と骨格の構造を変化させる顎整形力の二つに大別される。顎整形力を応用する場合、多くは歯を介して顎骨に力を作用させる。その際歯が顎骨内で移動して

しまうことにより骨格性の変化が少なくなる可能性がある。したがって固定歯の顎骨内での移動を可及的に防止することが、より大きな顎整形効果を生じさせるために必要であると考えられる。

そこで本研究ではイヌ上顎犬歯を抜歯し、再植することにより人為的に歯の骨性癒着を生じさせ、この歯を固