

氏名・(本籍)	菅野秀俊(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第22号
学位授与の日付	平成8年3月22日
学位授与の要旨	学位規則第5条2項該当(課程博士)
学位論文題目	口腔内の細胞, 組織におけるアポトーシスに関する研究 —特に, in vitroにおけるアポトーシスの誘発と in vivoにおける生理的細胞死の観察—
論文審査委員	主査 教授 賀来 亨 副査 教授 武田 正子 副査 教授 小鷲 悠典

論文内容の要旨

I. 緒言

組織発生過程において著明な細胞増殖と共にあらゆる場面で、細胞死の起きていることが、古くから知られており、プログラム細胞死と呼ばれている。プログラム細胞死の大半がアポトーシスの形態をとると言われてきているが、in vivoにおけるアポトーシスの証明方法が必ずしも確実性の高いものではなかったために、口腔組織を含む全身諸臓器の組織発生過程におけるアポトーシスの関与については不明な点が少なくない。最近になり、通常の組織切片上でDNAの断片化を標識するTUNEL法が報告された。本研究では、まずin vitroで口腔扁平上皮癌細胞株によるアポトーシスのモデル系を確立し、TUNEL法の有用性について確認し、ラットを用い、胎生期から出生、成熟個体に至るまでの様々な時期の口腔組織において、TUNEL法と透過型電子顕微鏡TEMによる観察を行い、口蓋縫合部、歯牙発生過程、メッケル軟骨を含めた軟骨消失過程、歯牙の萌出過程における周囲組織、成熟ラットの歯周組織について詳細に検索し、同部におけるアポトーシスの関与について観察することを目的とした。

II. 材料および方法

TUNEL法の有用性について検討するためにin vitroにおいて人為的にアポトーシスを誘発させ、アポトーシスの生化学的マーカーであるDNA ladderのみられる細胞について、TUNEL法を応用した。細胞にはヒト舌扁平上

皮癌由来細胞株SASを用いアポトーシス誘発のために、コンフルエントになった時点で、培養液を無血清に交換し、抗Fas抗体を添加し18時間培養を行った。実験動物にはSprague-Dawley系のラットを用い、胎生期から成熟に至る経時的に屠殺し、TUNEL法とTEMで観察した。TUNEL法はGavrieliらの原法に従い、パラフィン切片上または細胞のある培養皿上で、TdT bufferとbiotin標識16-UTPにより断片化したDNAの標識を行い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン反応により検出した。TEMによる観察のために、組織および細胞は変法Kamovskyの固定液にて固定を行い、通法に従い、Epon 812にて包埋し、超薄切片を作製し観察した。

III. 結果

1. 扁平上皮癌細胞株SASの抗Fas抗体によるアポトーシス誘発について

抗Fas抗体添加後18時間経過すると1/4程度の細胞は浮遊しており、浮遊した細胞の大半と培養皿に残存した細胞の一部に核の断片化を伴ったアポトーシス小体が観察された。これらはDNA電気泳動により、アポトーシスに特徴的なDNA ladderが観察された。培養皿に残存した細胞についてTUNEL法を行うと、形態的にアポトーシスと認識された細胞よりも、多くの細胞で陽性反応が観察された。

2. 口腔組織発生過程のTUNEL法による観察

胎仔におけるTUNEL陽性反応は、歯乳頭ならびにエナメル器付近、および左右口蓋突起の癒合で散在性にア

ポトース小体を思わせる核より小さい顆粒状の物質として認められた。また、骨化の始まった下顎骨上方に存在しているメッケル軟骨では、その周囲を取り囲む様に散在性に陽性部が観察された。口腔上皮は胎生期の時間と共に肥厚し、錯角化する傾向にあり扁平上皮3～4層まで厚みを増していた胎生20日目において、陽性を示す核が最も多く観察された。新生仔ラットでは下顎骨正中縫合部の軟骨、骨組織の境界部にTUNEL陽性の核が一列に配列していた。歯冠萌出過程においては、萌出直前に退縮エナメル上皮が歯冠直上に観察され、陽性部は、その上皮と口腔上皮との間に介在する結合織、および上皮同士が癒合した部分では上皮全層にわたり認められた。退縮エナメル上皮は咬頭部付近で重層扁平上皮となっており、TUNEL陽性部は退縮エナメル芽細胞の扁平上皮に移行する部分で広く観察された。

3. 口腔組織発生過程の電子顕微鏡的観察

歯胚においては、TUNEL陽性反応が比較的多く認められた蓄状期から帽状期の初期に相当するものについて観察したが、その一部に核が濃染し断片化を伴ったアポトーシス小体が観察された。メッケル軟骨では明らかなアポトーシス小体は観察されず、むしろ壊死の細胞死の形態をとっていた。胎生20日目の口腔上皮について電顕的に観察すると、TUNEL陽性部の細胞は基底層の細胞と比べて細胞内小器官に乏しく、核は扁平で濃縮していた。歯牙萌出過程では、退縮エナメル上皮と口腔上皮の間の結合織部にはアポトーシスを思わせる細胞あるいは著変を伴った細胞は観察されなかったが、退縮エナメル上皮の部分でアポトーシス小体が観察された。

IV. 考察およびまとめ

壊死とは違った細胞死の概念アポトーシスに着目し、口腔扁平上皮癌細胞株SASの抗Fas抗体による細胞死と

口腔組織発生過程におけるプログラム細胞死におけるアポトーシス関与の有無について検索を行い、以下の結果を得た。

1. ヒト舌扁平上皮癌由来細胞株SASは無血清培養条件下で抗Fas抗体を添加することにより著しい細胞死が観察され、この細胞死はアポトーシスの経路を介したものと考えられた。
2. ラットの発生過程で口蓋癒合部をTUNEL法を用いてDNA断片化部をin situで観察すると、TUNEL陽性のアポトーシス小体と一部の核で陽性反応が観察された。
3. 歯胚の発生過程をTUNEL法で観察すると蓄状期から帽状期にかけてTUNEL陽性のアポトーシス小体が多数観察された。
4. 口腔上皮をTUNEL法で観察すると、上皮の落屑部に一致してTUNEL陽性を示す核が観察され、電顕的にアポトーシス小体は認められなかったものの核の濃縮が観察され、アポトーシスによる細胞死の範疇にはいるものと思われた。
5. 軟骨細胞消失部においては、TUNEL陽性部は下顎正中縫合部では軟骨組織と成熟した骨組織との移行部、およびメッケル軟骨の周囲を取り囲むように観察された。この陽性部を電顕的に観察すると、壊死を思わせる細胞死の形態が観察された。
6. 歯牙の萌出過程においては、骨吸収後の歯冠上部の軟組織において歯牙の萌出に伴いTUNEL陽性の細胞が出現し、その一部で電顕的にもアポトーシスの像が確認された。

以下の結果から、口腔組織発生過程を含めた様々な部において、アポトーシスの経過をとる生理的な細胞死が観察され、これらは口腔組織の恒常性の維持のために重要な働き担っているものと考えられた。

学位論文審査の要旨

組織発生過程にみられる、プログラム細胞死の大半がアポトーシスの形態をとると言われてきているがin vivoにおけるアポトーシスの証明方法が必ずしも確実性の高いものではなかったために、不明な点が少なくない。本研究では、in vitroで口腔扁平上皮癌細胞株におけるアポトーシスのモデル系を確立し、in vivoにおいて口腔組織発生過程の組織にTUNEL法を応用し、電顕的観察も併せて行い口腔組織におけるアポトーシスの関与について考察することを目的とした。

ヒト舌扁平上皮癌由来細胞株SASは、抗Fas抗体を添加することによって細胞死が誘発され、DNA電気泳動に

より、アポトーシスに特徴的なDNA ladderが観察された。これらの細胞にはTUNEL法により陽性反応が観察され、TUNEL法のアポトーシス検索のための有用性が確認された。胎仔におけるTUNEL陽性反応は、歯乳頭ならびにエナメル器付近、および左右口蓋突起の癒合部、メッケル軟骨の周囲に観察された。口腔上皮は、扁平上皮が3～4層まで厚みを増した胎生20日目において、陽性を示す核が最も多く観察された。新生仔ラットでは下顎骨正中縫合部の軟骨、骨組織の境界部に、歯冠萌出過程においては、萌出直前の歯冠直上の退縮エナメル上皮と口腔上皮との間に介在する結合織、および上皮同士が

癒合した部分では上皮全層にわたり認められた。これらを電顕的に観察すると、メッケル軟骨周囲部ではむしろネクロシスの形態をとっていたが、歯胚の一部および退縮エナメル上皮の部分に明らかなアポトーシス小体が観察された。以上の結果から、口腔組織発生過程を含めた様々な部において、アポトーシスの経過をとる生理的細胞死が観察され、これらは口腔組織の恒常性の維持のために重要な働きを担っているものと考えられた。

本審査委員会では、1)研究の目的、意義、2)TUNEL法によるアポトーシス判定の信頼性、3)歯胚発生過程におけるアポトーシスを示す細胞は上皮系か、間葉系か、4)上皮におけるturn overとアポトーシスの関係、などについて質問が行われたが、適切な回答が得られた。本論文は歯学の発展に寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位論文として価値あるものと判定した。

氏名・(本籍)	原 口 克 博 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	乙 第23号
学位授与の日付	平成8年3月22日
学位授与の要旨	学位規則第5条2項該当(課程博士)
学位論文題目	齶蝕自然発症ラットエナメル質の物理化学的性状について
論文審査委員	主 査 教 授 松 田 浩 一 副 査 教 授 矢 嶋 俊 彦 副 査 教 授 大 野 弘 機 副 査 教 授 上 田 五 男

論 文 内 容 の 要 旨

I. 緒 言

齶蝕発症要因のうち、細菌および食物の影響については、既に多くの知見が得られているが、宿主要因に関してはいまだ十分な検討がなされていない。

エナメル質の物理化学的性状は、主要な宿主要因の一つであり、エナメルアパタイトの結晶学的、物理化学的な性質が齶蝕感受性と深く関連しているのではないかと推論されてきた。しかし、実際の齶蝕発症において、エナメル質の物理化学的性状の差異がどの程度発症に関与しているかは、明らかではない。この点を追求するには、その構造および物理化学的性状を明らかにする必要がある。

本研究では固型飼料のみで齶蝕が自然発症するラット(SDCラット)とその対照系のラット(CSCラット)について、白歯部エナメル質の物理化学的性状を、X線回折、赤外吸収スペクトル分析、比重測定、化学分析(Ca/

P比)およびエナメル質の耐酸性を併用して調べ、両系統間および系統内における世代間、月齢間の差異について検討を行った。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物

実験動物は、SDCラットとCSCラットを使用した。実験に用いたラットは、世代により2つのグループに分けた。すなわち、8、9世代の両系統のラットの計90匹をAグループとし、13から15世代の両系統のラット計85匹をBグループとした。

2. 試料の作製方法

生後1、2、3、4カ月のラットを屠殺後、上下顎を取り出し、軟組織を取り除いた。白歯部を片顎ずつエポキシ樹脂で包埋し、近遠心的に切断し、一顎から片側について厚さ0.3mm程度の切片を2~3枚採取した。この切片からエナメル質のみを注意深く削り取った。この削片