

氏名・(本籍)	永井泰子(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第57号
学位授与の日付	平成13年9月14日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(課程博士)
学位論文題目	有郭乳頭溝およびエブネル腺導管の形成過程に関する組織化学的研究
論文審査委員	主査教授 武田正子 副査教授 矢嶋俊彦 副査教授 賀来亨

論文内容の要旨

[緒言]

マウスやラットの有郭乳頭は舌背の奥中心部に1個存在し、乳頭溝を囲む重層扁平上皮内に多数の味蕾を持ち、さらに溝の底部にあるいは側面部には小唾液腺の純漿液性のエブネル腺の導管が開口している。有郭乳頭は、胎生末期に舌背上皮がドーム状に盛り上がり、その周囲を囲んで背面上皮から上皮索が結合組織内に伸びて行き、上皮索の中央部分に溝が形成される。この上皮索からはさらにエブネル腺となる上皮索が結合組織内に伸びて枝分かれし、その中に導管の管腔が形成される。

上皮索の中には最初小さな空隙が生じ、それが次第に数を増し、拡大、癒合して生後2日目頃までに乳頭溝と腺管腔を形成するに至る。この過程において、アポトーシスによる細胞死が関与するかどうか、・空隙を取り囲む細胞のケラチフィラメントの性状について、・空隙を囲む細胞の極性形成に関与するtight junction密着帯について組織化学的方法と電子顕微鏡観察により検索した。

[材料と方法]

胎生18日、生後0日、1日、2日のdd-マウスを断頭後、舌背奥の有郭乳頭を含む組織を切り出した。

4%パラホルムアルデヒド固定後、脱水しパラフィン包埋した。前頭断と矢状断の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

[DNA nick-end labeling (TUNEL) 法]

脱パラフィン後の切片を、Apop Tag™ kit (Oncor) によりTdTとdigoxigenin-11-dATP混液を反応させた後、パーオキシダーゼ標識抗digoxigeninを反応させ、

DABで発色を行い、アポトーシス細胞を検出した。

[免疫組織化学]

脱パラフィン後の切片を、一次抗体として抗サイトケラチン8/18抗体(ポリクローナル、8は52.5kD、18は45.5kDのケラチン蛋白と反応する、Progen Biotechnik GMBH)に反応させ、次いで、ビオチン標識二次抗体およびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで反応させDABにより発色した。

一部の有郭乳頭を含む組織は凍結切片を作製し、エタノールとアセトンで固定した。一次抗体として抗オクルディン抗体(ポリクローナル、Zymed Laboratories, Inc.)、二次抗体としてFITC標識抗ウサギIgGを反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

[電子顕微鏡]

有郭乳頭を含む組織を2%グルタルアルデヒドと2%パラホルムアルデヒド混液で前固定した後、1%O₄で固定を行い、エポン包埋し、超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡で観察した。

[結果]

胎生18日の有郭乳頭は、舌背上皮に続く上皮細胞索が結合組織中へ伸び、さらにそこからごく短い少数の細いエブネル腺の上皮索が伸びていた。乳頭上皮索および腺上皮索の中には小さな空隙が認められた。これらの空隙の周囲にはTUNEL陽性のアポトーシス細胞が散見された。サイトケラチン8/18抗体の反応は、空隙周囲を含む乳頭上皮索の中央部の細胞、および腺上皮索の中央部の細胞が陽性を示し、上皮索周縁部の基底膜に接する細胞は陰性であった。tight junctionの膜内性蛋白質である

オクルディンoccludinに対する抗体の反応では、乳頭上皮索および腺上皮索の空隙に沿って点状あるいは線状の蛍光が認められた。

生後0日では、前頭断切片では乳頭上皮索中に上下に一列に並ぶ空隙が、矢状断切片では前後に並ぶ数列の空隙が多数認められ、これらの空隙は癒合の途上であり不整形を呈し、全体として網状であった。この空隙から前後に並んでエブネル腺上皮索が多数伸びており、上皮索の大部分には管腔が形成されていた。

生後1日、2日となるにしたがい乳頭上皮索の中の空隙は癒合、拡大し、表面に続く溝が形成されたが、なお一部にまだ表面とは交通していない空隙も残っていた。腺上皮索も長くなり枝分かれし、ほぼ管腔が形成されていたが、終末部はまだ未形成であった。

アポトーシス細胞は、0日、1日、2日の上皮索の空隙あるいは管腔周辺に散見された。サイトケラチン8/18抗体による反応では、0日以降も空隙周囲を含む乳頭上皮索中央部の細胞が陰性であったが、2日目になって表面に通じる溝が形成された場所では陽性細胞は消失した。腺上皮索では0日以降、中央部の細胞が陽性を示し、管腔が形成されると管腔を囲む1層の細胞が陽性で、基底側の細胞層は陰性であった。電顕で観察すると、上皮索の空隙あるいは管腔を囲む細胞には、束を作らず不規則に散在するケラチン(中間径)フィラメントが見られ、基底膜側の細胞には、密集した束を作るフィラメントが認められた。オクルディン抗体による反応では、0日以降、拡大する空隙あるいは管腔を囲む点状や線状の蛍光が見られたが、乳頭溝が完成した場所では蛍光は消失した。電顕では、空隙あるいは管腔を取り囲む細胞の隣接

面の腔所に近い部分にtight junctionが認められた。

[ま と め]

1. 有郭乳頭上皮索およびエブネル腺上皮索の中に形成された空隙あるいは管腔周辺にTUNEL陽性のアポトーシス細胞が散見されたことから、乳頭溝および腺導管管腔形成の際に余分な細胞を除去し、空隙の形を整えるために一部の細胞がアポトーシスにより死ぬものと考えられる。
2. 乳頭上皮索の空隙を囲む1層の細胞は、サイトケラチン8/18抗体に陽性を示し、電顕ではケラチンフィラメントが束を作らず散在していた。この細胞層は、空隙が拡大、癒合していく過程で伸縮性を保つために散在するフィラメントを持つものと思われるが、乳頭溝が完成後には役目を終え消失した。
腺上皮索の空隙や管腔を囲む細胞も、サイトケラチン8/18抗体に陽性で、散在するフィラメントを有し、管腔の伸縮を容易に行えるものと思われる。
3. 乳頭上皮索の空隙に沿ってオクルディン抗体陽性の蛍光が点状あるいは線状に見られたが、溝が形成されると蛍光は消失した。電顕では、この蛍光に一致して細胞の隣接面の腔所に近い部分にtight junctionが見られ、空隙を囲む細胞に極生を生じたが、溝の完成とともにこの細胞は消失した。腺上皮索の空隙を囲む細胞に極生が生じたが、溝の完成とともにこの細胞は消失した。腺上皮索の空隙あるいは管腔周囲にもオクルディン蛍光が見られ、これは管腔形成後も持続し、電顕でも腔所に近い隣接細胞間にtight junctionが観察され、細胞極性が保たれていた。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

この論文は、マウスに於いて胎生末期から生後早期にかけて形成される舌有郭乳頭の溝と、その溝に開口する小唾液腺のエブネル腺導管管腔の形成過程の詳細について次の3つの点を明らかにした。

1つ目は、舌背上皮から結合組織内に伸びる有郭乳頭上皮索およびエブネル腺上皮索の中に形成された空隙あるいは管腔周辺にTUNEL陽性のアポトーシス細胞が散見されたことから、乳頭溝および腺導管管腔形成の際に余分な細胞を除去し、空隙および管腔の形を整えるために一部の細胞がアポトーシスのために死ぬと考えた。

2つ目は、乳頭上皮索の空隙を囲む一層の細胞が、抗サイトケラチン8/18抗体に陽性を示し、電顕ではケラチンフィラメントが束を作らず散在していたことから、このケラチンは空隙が拡大、癒合することを容易する役目

を果たすと考えた。実際このケラチンは乳頭溝が完成後には役目を終え、消失した。腺上皮索の空隙や管腔を囲む細胞も、抗サイトケラチン8/18抗体に陽性で、散在するフィラメントを有していたが、これは一時的なものではなく、成熟後も存在し、管腔の収縮を容易に行うものと考えた。

3つ目は、乳頭上皮索の空隙に沿って、密着帯を構成する膜内在性の蛋白質の一つであるオクルディンに対する抗体陽性の蛍光が点状あるいは線状に見られたが、溝が完成する帯が見られ、空隙を囲む細胞に極生が生じたが、溝の完成とともにこの細胞は消失した。腺上皮索の空隙あるいは管腔周囲にもオクルディン蛍光が見られ、これは管腔形成後も持続し、電顕でも腔所に近い隣接細胞間に密着帯が観察され細胞極性が保たれていた。

このような結果から見て、この研究は今後の発生の研究の進展の一助となる一定の成果をあげており、学位論

文に値するものであると考えられる。

氏名・(本籍)	政 所 明 弘 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	乙 第58号
学位授与の日付	平成13年 9月14日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	メラトニンの経口投与が骨代謝に及ぼす影響
論文審査委員	主 査 教 授 五十嵐 清 治 副 査 教 授 武 田 正 子 副 査 教 授 賀 来 亨

論 文 内 容 の 要 旨

松果体からの分泌物であるメラトニンは、動物の日内リズムやある種の動物の季節周期による繁殖活動に関与すると言われている他、最近では抗腫瘍作用、抗酸化作用、抗うつ作用など臨床的に注目すべき作用が次々と報告されてきており、その作用の多さには、驚くべきものがあるが、骨代謝に及ぼす影響に関してはほとんど明らかにされていない。その一方で、メラトニンの分泌量の低下が骨粗鬆症の発症と相関する可能性を示唆する疫学的報告がいくつか見受けられている。すなわち、メラトニンの分泌は加齢とともに減少するが、骨粗鬆症の発症は加齢とともに増加すること。また閉経により、メラトニンの分泌は顕著に減少するが、閉経を境に、骨粗鬆症の発症は急増すること、また運動によりメラトニンの分泌が上昇するが、運動は骨粗鬆症の発症を予防するなどの報告である。われわれの研究グループはこれらの報告に着目し、メラトニンの分泌低下が骨粗鬆症の発症に関わっており、メラトニンの補充療法が骨粗鬆症の予防や治療に有効となるとの仮説を立て、メラトニンの骨に及ぼす研究に着手した。その結果、メラトニンには*in vitro*において、正常ヒト骨芽細胞の細胞増殖およびタイプIコラーゲン合成促進作用があることを発見した。さらにメラトニンの腹腔内注射が成長期のマウスの合成促進作用があることを発見した。さらにメラトニンの腹腔内注射が成長期のマウスの骨吸収を抑制し、骨密度および骨量を増加させる作用があることを報告した。しかしながら、メラトニンの経口投与が骨に及ぼす影響に関しては

いまだ十分な検討を行っていない。

本研究は成長期マウスにおけるメラトニンの口腔内投与がマウスの骨組織に注射の場合と同様な骨量増加作用が得られるかどうかを調べる目的で行われた。加えて、*in vitro*においてメラトニンの骨吸収に及ぼす効果についてウサギ骨髄由来破骨細胞様細胞の培養系を用いたdentin pit assayにより検討を行い、以下の結果を得た。

1. 体重に及ぼす影響

実験開始時から終了時までの4週間において、メラトニンの口腔内投与(0.1および1%/食餌)は、コントロールに比べ、マウスの体重に統計学的有意差を及ぼさなかった。

2. 臓器の重量および病理組織像に及ぼす影響

4週間メラトニン投与後、諸臓器(肝臓、腎臓、脾臓、心臓)の重量を検討した結果、メラトニンの口腔内投与(0.1%および1%/食餌)は、ともに諸臓器の重量にコントロールとした統計学的有意な影響をもたらさなかった。また、メラトニンの口腔内投与は病理組織学的検討においても特にメラトニン投与による病的変化を示さなかった。

3. 脛骨および大腿骨の長径および幅径に及ぼす影響

メラトニンの口腔内投与は脛骨および大腿骨の長径および幅径に有意な影響を及ぼさなかった。

4. 形態計測

1) 海綿骨

1%/食餌メラトニンの投与はコントロールに比べ、