

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 培養歯胚における分泌期エナメル芽細胞での<br>Horseradish Peroxidase (HRP) の取り込みと輸送に<br>ついて   |
| Author(s)    | 松尾, 三郎  |
| Citation     | 大阪大学, 1986, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/35600">https://hdl.handle.net/11094/35600</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていない<br>ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利<br>用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文につい<br>て <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【2】

|         |   |        |          |           |
|---------|---|--------|----------|-----------|
| 氏名・(本籍) | まつ<br>松   | お<br>尾 | さぶ<br>三  | ろう<br>郎   |
| 学位の種類   | 歯   | 学      | 博        | 士         |
| 学位記番号   | 第   | 7428   | 号        |           |
| 学位授与の日付 | 昭和61年8月5日   |        |          |           |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当  |        |          |           |
| 学位論文題目  | 培養歯胚における分泌期エナメル芽細胞でのHorseradish Peroxidase (HRP) の取り込みと輸送について |        |          |           |
| 論文審査委員  | (主査)  |        |          |           |
|         | 教授  | 赤井三千男  |          |           |
|         | (副査)  |        |          |           |
|         | 教授  | 作田 正義  | 助教授 石田 武 | 助教授 北村清一郎 |
|         | 講師  | 森崎市治郎  |          |           |

論文内容の要旨

エナメル質形成時のエナメル芽細胞の機能については、エナメル基質の合成分泌とCaイオンの移動について多くの研究がなされてきた。近年、分泌期エナメル芽細胞内の物質輸送機構に関連して種々のトレーサー実験がおこなわれているが、細胞内外の移動経路についてはまだ明らかにされていない。その原因の一つは、トレーサーの性質と生体での実験に種々の制約があるためと思われる。

そこで本研究では、薬物処置が簡単で、生体内投与方法では避けることのできない全身的な二次的影響をうけない培養系を用い、分泌期エナメル芽細胞での物質の取り込みと輸送をHRPを用いて調べた。実験は、まずHRPを用いて分泌期エナメル芽細胞の取り込みとその分布を経時的に調べた。つぎに、ランタンを用いて細胞間の透過性を調べて、培養された歯胚でのエナメル芽細胞がin vivoのものと変わらないことを確かめた。さらに、細胞内の輸送に関与する微小管をコルヒチンで破壊した時にHRPが分泌期エナメル芽細胞層内でどのように分布を変えるかを調べた。

歯胚の器官培養は、5日齢Wistar系ラットの下顎第一臼歯胚を用いて行った。培養液はBGJb mediumにFCS (20%), ascorbic acid (100 μg/ml) と抗生物質を加えた液を用い、気相条件をO<sub>2</sub>: 95%, CO<sub>2</sub>: 5%とした。この条件下で4時間培養した歯胚を固定し、エポン包埋して電子顕微鏡で観察したところ、分泌期エナメル芽細胞の微細構造はin vivoのそれと変わらず、核、小胞体、ゴルジ装置は正常な形態と細胞内分布を示していた。

次に、上記培養法に従い歯胚を2時間予備培養した後に、HRP (1 mg/ml) を培養液に加え、10, 30, 45, 60, 120分間さらに培養を続けてHRPの細胞内移動を時間的に追跡した。エナメル芽細胞内に取り込まれたHRPは、10分後には核上部や核下部にある小胞にわずかに含まれているだけであったが、

30分後にはHRPを含む円形や管状の小胞がエナメル芽細胞の近位や側面の周辺細胞質に多数みられるようになった。同時にTomes突起内にもHRPを含む小胞が見られた。さらに細胞質内のlysosome様顆粒内にもHRPが取り込まれていた。細胞内のHRPは時間の経過とともに次第に増加し、60分や120分後には、Tomes突起内に多数のHRPを含む小胞が見られ、一部のものはTomes突起の細胞膜と癒合していた。また、120分後には一部の分泌顆粒内にもHRP反応物が見られた。一方、細胞外のHRPはエナメル芽細胞の近位や側面の細胞外には常に認められたが、遠位側の細胞外にHRP反応物が見られたのは、Tomes突起内にHRPを含む小胞が現われるようになった後であった。そして、遠位側の細胞外にあるHRPは時間経過とともにその量を増し、エナメル質表層にも見られた。

これら遠位側細胞外で見られたHRPが、培養により遠位側接着装置の透過性が変化したために見られたものかどうかを確かめるため、4時間培養した歯胚をランタンを含む固定液で前固定し、ランタンが細胞間を透過するかどうかを調べた。ランタンは、従来のin vivoでの実験所見と同じように遠位側細胞外では見られなかった。したがってこの培養系でのエナメル芽細胞にある遠位側接着装置はランタンを通過させず、in vivoと同じ状態にあることが示された。

次に、コルヒチンで細胞内の輸送を破壊した状態下で加えられたHRPの細胞内外の分布がどのように変化するかを調べた。コルヒチンのみを1-10 $\mu$ M加えた培養液で6時間培養した歯胚では、1 $\mu$ Mのコルヒチン処理では分泌期エナメル芽細胞に著明な細胞構造的変化を起さなかったが、5 $\mu$ M以上ではTomes突起内の分泌顆粒は消失していた。培養液にコルヒチンを1-25 $\mu$ M加えた液で4時間予備培養した後に、HRP(1mg/ml)を加えてさらに2時間培養した歯胚では、いずれの濃度でもHRPは細胞内に取り込まれていたが、5 $\mu$ M以上のコルヒチン処理ではエナメル芽細胞の遠位部でのHRPの分布に、1 $\mu$ Mのものとの間に差がみられた。すなわち、1 $\mu$ Mコルヒチン処理ではHRPは、Tomes突起内の小胞内や遠位側細胞外で見られたが、5 $\mu$ M以上のコルヒチン処理ではHRPはTomes突起内や遠位側細胞外にはみられなかった。したがって、細胞内の物質輸送が阻害され、Tomes突起内や遠位側細胞外にHRPが運ばれなくなることが示された。

以上の結果から、HRPは分泌期エナメル芽細胞の近位や側面から小胞により細胞内に取り込まれ、一部のものはlysosome系に運ばれるが、多くのものはlysosome系に入ることなく、微小管系による細胞内輸送機構により小胞や分泌顆粒によって、Tomes突起内に運ばれ、さらに遠位側細胞外に放出されると考えられる。これらのことは、分泌期エナメル芽細胞内に近位や側面の細胞外から取り込んだ物質を遠位側細胞外に向かって運ぶ輸送路があることを示し、この輸送路に微小管系が関与していることを示唆している。

## 論文審査結果の要旨

本研究は発育期ラット臼歯胚の器官培養系を用いて、分泌期エナメル芽細胞の物質の取り込みと輸送、特に細胞内経路の輸送路の存在とその機構について検討を加えたものである。

本実験では培養臼歯胚において、HRPの移動を時間経過を追って追跡し、さらにコルヒチン処理後にこの分布がどのように変化するかをしらべている。その結果、分泌期エナメル芽細胞ではHRPのような高分子蛋白性物質を近位や側面の細胞表面から取り込み、小胞体やゴルジ装置などの合成系を通ることなく、エナメル質表面に向かって輸送する細胞内経路が存在すること、この輸送路に細胞内微小管系が関与していることを明らかにしている。

以上のように、本研究は形成期エナメル質への物質輸送に重要な役割をもつ分泌期エナメル芽細胞内の輸送機構に新しい知見を加えた価値ある業績である。よって本研究者は歯学博士の学位を得るに十分な資格があると認める。