



Title	ラット味蕾におけるCalbindin D28kの分布に関する免疫組織化学的研究
Author(s)	宮脇, 泰子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40808
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ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	宮 脇 泰 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 7 9 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床専攻
学 位 論 文 名	「ラット味蕾における Calbindin D28k の分布に関する免疫組織化学的研究」
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 祖父江鎮雄 (副査) 教 授 栗栖浩二郎 助教授 小川 裕三 講 師 竹村 元秀

論文内容の要旨

【研究目的】

カルシウムは、細胞内のセカンドメッセンジャーとして知られており、細胞内のカルシウム濃度の調節は多くの機構によって調節されている。カルシウム結合蛋白質のうち Calbindin D28k (CB) は、カルシウムイオンと結合することにより、細胞内のカルシウム濃度の調節に関与することが明らかにされている。CB は生体組織に広く認められ、味覚情報の伝達路にも分布することが、免疫組織化学的研究によって明らかにされている。このうち、味覚の末梢受容器である味蕾においても、一部の味蕾細胞に CB が存在することが既に報告されている。しかし、味蕾細胞のどの型の細胞に局在しているかについては明らかではない。また、哺乳類の味蕾の発生、維持、再生には、神経支配が深く関与することが報告されている。そこで本研究では、味蕾における CB の機能を形態学的に解析するため、(1)正常ラットの口腔内味蕾における CB 様免疫活性を示す構造物の分布、(2)味蕾の発生における CB の分布の動態、(3)支配神経損傷後の味蕾の再生における CB の分布の動態、(4)味蕾細胞の細胞周期と CB との関連性について詳細に検索した。

【研究方法】

実験1) 味覚上皮における CB の分布

体重180～200 g のラットを灌流固定し、舌乳頭、切歯乳頭、口蓋粘膜を摘出し、凍結切片を作成後、抗 CB を用いて ABC 法により免疫染色を行ない、光学顕微鏡で観察した。有郭乳頭については、免疫染色後、透過型電子顕微鏡にて観察した。

実験2) 有郭乳頭の味蕾の発生と CB との関係

胎生18日齢以降のラットを経日的に固定し、有郭乳頭の連続凍結切片を作成後、免疫染色を行い、光学顕微鏡にて観察し、味蕾および CB 陽性味蕾細胞の数の変化を調べた。

実験3) 舌咽神経損傷による有郭乳頭での味蕾の変性、再生と CB との関係

体重180～200 g のラットの両側の舌咽神経を剖出し、ピンセットにて圧迫損傷を加えた。術後動物を経日的に灌流固定し、有郭乳頭の連続切片を作成して、免疫染色を施し、味蕾と CB 陽性味蕾細胞の数の変化を調べた。

実験4) 有郭乳頭での味蕾細胞の細胞周期と CB との関係

体重180～200 g のラットの尾静脈に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; 60mg/kg, b.w.) を注入後、動物を経

的に灌流固定した。有郭乳頭の連続凍結切片に抗 CB 抗体と抗 BrdU 抗体を用いて二重染色を行い、CB 陽性味蕾細胞と BrdU 陽性味蕾細胞の関係を調べた。

【研究結果】

実験 1) CB 陽性神経線維は味蕾直下で神経叢を形成し、一部は味蕾内に進入していた。葉状乳頭と有郭乳頭では、紡錘形を呈した味蕾細胞の一部が CB 陽性を示したが、他の部位の味蕾には CB 陽性細胞は認められなかった。葉状乳頭においては、支配神経が異なるにもかかわらず、乳頭の前方部と後方部では CB 陽性味蕾細胞の数に明らかな差は認められなかった。免疫電子顕微鏡での所見では、味蕾内の CB 陽性神経線維終末が CB 陽性味蕾細胞とシナプス様の結合を示している像が見られた。

実験 2) 有郭乳頭では、胎生 18 日では既に固有層に CB 陽性神経線維が神経叢を形成していた。味孔をもった味蕾は生後 1 日で出現し、その後味蕾の数は増加していった。CB 陽性神経線維の味蕾内への進入は生後 5 日で観察された。一方、CB 陽性味蕾細胞の出現は生後 10 日で初めて認められ、生後 35 日ではほぼ成獣と同じになった。

実験 3) 舌咽神経の損傷実験では、損傷後 8 日目までに有郭乳頭の味蕾および CB 陽性味蕾細胞は完全に消失した。再生味蕾は、損傷後 12 日目から認められ、損傷後 40 日目ではほぼ健常な数に回復した。CB 陽性神経線維は、損傷後 16 日目に認められ、再生味蕾での CB 陽性味蕾細胞は損傷後 20 日目に出現し、その数は徐々に増加した。

実験 4) BrdU 注入後 4 時間では、BrdU 陽性反応は上皮の基底部の細胞の核に認められた。注入後 2 日では、BrdU 陽性反応を示す細胞は味蕾の基底部だけでなく、味蕾内に広範に認められた。注入後 4 日で初めて少数の CB 陽性味蕾細胞の核が BrdU 陽性を示した。注入後 6 日後では、BrdU 陽性味蕾細胞は減少していたが、CB と BrdU の両方に陽性の細胞は注入後 4 日と同様にわずかに認められた。

【考察】

口腔内の味蕾のうち、舌後方に位置する葉状乳頭と有郭乳頭の一部の細胞が CB 陽性を示した。免疫電子顕微鏡での所見で、これらの細胞はⅢ型細胞であることが分かった。一般に舌後方の味蕾は、苦み刺激に対して感受性が高いとされ、苦み刺激が細胞内のカルシウム濃度を上昇させることが報告されている。従って、CB は、苦み刺激におけるⅢ型細胞での細胞内カルシウム濃度の調節に関与している可能性がある。

さらに、味蕾の発生過程や神経損傷後の再生過程のいずれにおいても、CB 陽性味蕾細胞は、味蕾が形成されてから約 10 日後に出現した。ラットの味蕾細胞の寿命が約 10 日であることや、BrdU 取り込み 4 日後の味蕾細胞に初めて BrdU に標識された CB 陽性味蕾細胞が認められることから、CB は成熟したⅢ型細胞に発現することが分かった。さらに、CB は脳においてニューロンの変性を防ぐ作用があると言われている。従って、CB は味蕾細胞においても細胞死と関わっている可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

本研究は味蕾における Calbindin D28k (CB) の機能を形態学的に解析したものである。

その結果、口腔内の味蕾のうち、舌後方に位置する葉状乳頭と有郭乳頭の一部の味蕾細胞が CB 陽性を示し、他の部位の味蕾には CB 陽性神経線維が味蕾内に進入しているものの CB 陽性味蕾細胞はみられなかった。免疫電子顕微鏡での所見では、CB 陽性味蕾細胞はⅢ型細胞であり、CB 陽性神経終末とシナプス様結合をしていた。さらに味蕾の発生過程、再生過程いずれにおいても CB 陽性味蕾細胞は味蕾が形成されてから約 10 日後に出現し、ラットの味蕾細胞の寿命が約 10 日であることと、BrdU 取り込みの 4 日後に BrdU に標識された CB 陽性味蕾細胞が出現することからも CB は分化した一部のⅢ型細胞に発現することが明らかになった。

以上の研究結果は味蕾の発生、維持、再生に関して新たな知見を加えるものであり、博士（歯学）の学位を与えるに値するものと認める。