



Title	歯牙形成過程におけるcalbindin D28kの分布に関する免疫組織学的研究
Author(s)	大西, 智之
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3169557">https://doi.org/10.11501/3169557</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	おおにしともゆき 大西智之
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 15036 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 12 年 1 月 26 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	歯牙形成過程における calbindin D28k の分布に関する免疫組織学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 祖父江鎮雄 (副査) 教 授 伊集院直邦    助教授 脇坂    聡    講 師 永田 英樹

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [緒言]

カルシウム結合蛋白質の 1 つである calbindin D28k (CB) は、以前よりカルシウム輸送機能を有する組織に存在することが免疫組織学的に明らかにされ、CB はカルシウム輸送に関与していると考えられている。それに加えて、CB は、ニューロンなどカルシウム輸送機能を有さない細胞にも認められ、カルシウム輸送以外の機能を有することが示唆されている。歯牙形成過程においても、CB はカルシウム輸送機能を有する細胞であるエナメル芽細胞に認められ、その分化や基質の石灰化に関与していることが示唆されている。しかし、カルシウム輸送機能を有する細胞以外にも歯牙形成過程には様々な細胞が関与している。なかでも、内エナメル上皮および外エナメル上皮由来であるヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) や、それが断裂して形成されるマラッセの上皮遺残は、歯根形成過程において非常に重要な働きを有し、内エナメル上皮由来であるエナメル芽細胞と同様これらの細胞にも CB が分布することが予想されるが、歯根形成過程における CB の分布に関する報告は見あたらない。一方、齧歯類の臼歯咬頭頂には、enamel free area (EFA) と呼ばれる象牙質がエナメル質に覆われていない部位が存在する。歯牙発生時の EFA の象牙質は、内エナメル上皮由来の細胞 (EFA 細胞) に覆われている。この EFA 細胞は、発生過程において、エナメル芽細胞と同様に CB 陽性であることが予想されるが、その CB の分布に関してもほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、ラット臼歯での歯冠および歯根形成過程における CB の分布の変化を免疫組織学的手法を用いて詳細に検討し、その生理機能についても考察を加えた。

### [材料ならびに方法]

生後 1～56 日齢の Sprague-Dawley 系ラットを実験に供した。動物を灌流固定後、上顎骨を 7.5% EDTA にて脱灰した。その後、パラフィン包埋を行い、厚さ 3  $\mu\text{m}$  で薄切した。一部の試料は OCT コンパウンドで包埋し、厚さ 16  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。また、免疫電顕には成獣 (56 日齢) の試料を用い、クリオスタットで 60  $\mu\text{m}$  の浮遊切片を作成し、免疫染色を行った。

免疫染色には、Avidin-biotin-complex (ABC) 法、あるいは間接蛍光染色法を用いた。さらに、歯根形成時に

て、すべての上皮由来細胞がCB陽性反応を示すか否かを評価するために、上皮由来細胞のマーカーとして、cytokeratinを用い、CBとの蛍光二重染色法を行った。この際、0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中で10分間マイクローブで処理して、抗原の賦活化を行った。

電子顕微鏡による観察は凍結切片をABC法にて染色した後、通法に従ってエポン包埋し、超薄切片を作成して透過型電子顕微鏡で観察した。

#### [結果]

1) 成獣の歯周組織においてCB陽性反応は、(1)根分岐部のセメント質表面に散在する細胞集団、(2)中間セメント質に迷入した細胞、(3)歯根膜の歯槽骨側の紡錘状の細胞、にそれぞれ認められた。電顕観察により、CBはいずれの陽性細胞でも細胞質に局在し、根分岐部や中間セメント質では、CB陽性反応を示す細胞は、陥凹した核と発達したトノフィラメントを有し、細胞小器官は少なく、細胞質に乏しかった。このことから、これらの細胞が上皮系の細胞であることが示唆された。さらに、歯根膜のCB陽性細胞は豊富な細胞小器官を有することから、線維芽細胞であることが明らかとなった。

2) 歯根形成段階において、HERS自体はCB陰性であるが、断裂したHERS由来の上皮細胞はCB陽性反応を示した。CB陽性細胞の一部は歯根表面に残存し、一部は中間セメント質内に迷入していた。これらの細胞は経日的に増加した。また、臼歯歯根膜のCB陽性反応を示す線維芽細胞は、咬合を開始した時期から認められ、その数は経日的に増加した。

3) 分泌期エナメル芽細胞に隣接するEFA細胞はすべてCB陽性であり、成熟期エナメル芽細胞に隣接するEFA細胞は、CB陽性のものと陰性のものが存在した。これは、エナメル芽細胞層でのCBの局在の変化と一致した。また、退縮エナメル上皮および初期の歯肉内縁上皮は強いCB陽性反応を示したが、その反応は経日的に低下した。

#### [考察および結論]

歯牙形成過程においてCBは、カルシウム輸送機能を有すると考えられるエナメル芽細胞、EFA細胞のみならず、カルシウム輸送機能を有しないマラッセの上皮遺残、歯根膜線維芽細胞、歯肉内縁上皮などにも分布することが明らかとなった。また、CB陽性反応を示すマラッセの上皮遺残および中間セメント質内に取り込まれた細胞は、その超微構造から細胞活性が低いと考えられた。さらに、臼歯歯根膜でのCB陽性線維芽細胞は咬合開始時期より増加することから、CBは咬合による機械的刺激に対する細胞の生存維持に関与していると考えられた。

以上のことから、CBは歯牙形成過程において、石灰化に関与する細胞のみならずマラッセの上皮遺残などの細胞活性の低い細胞の維持や、歯根膜線維芽細胞などでの種々の刺激に対する細胞の保護といった、様々な機能を有していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ラット臼歯形成過程でのcalbindin D28k (CB)の分布を免疫組織化学的に調べたものである。その結果、CBはエナメル芽細胞のみならず、エナメル質を形成しないenamel-free areaの細胞や、マラッセの上皮遺残、歯根膜線維芽細胞、中間セメント質内の上皮細胞、接合上皮などにも分布することが明らかとなった。このような成果は、従来考えられているようにCBがエナメル質の石灰化に関与するにとどまらず、細胞活性の低い細胞の維持や、種々の刺激に対する細胞の保護などの様々な機能にも関与することを示唆するものである。

以上の業績は、歯牙形成過程に発現する多様な細胞の機能をCBの分布の変化から検討し、それぞれの役割に対して、多大な示唆を与えたものであり、博士(歯学)の学位を得るに値するものと認める。