

学 位 論 文 題 名

エナメル質形成野，及び成熟野におけるリン酸の動態：

^{32}P －リン酸オートラジオグラフィーによる検討

学位論文内容の要旨

オートラジオグラフィーは、全身における様々な物質の分布とその代謝経路、及び代謝速度を調べる手段としてすぐれた方法であり、広く用いられている。しかし注入する標識化合物が水溶性の場合もあり、通常行なわれている組織標本作製過程、つまり固定や脱水、包埋、薄切等の過程で標識化合物が移動してしまう危険がある。そこで全身、もしくは組織を急速凍結し凍結薄切、凍結乾燥してX線フィルムに圧着する方法が試みられてきたが、解像力が低いという欠点があった。解像力向上のため、薄切した切片に湿式法（ディッピング法）で乳剤を貼付する方法が用いられているが、これは水溶性標識化合物の人工的な移動を引き起こす危険がある。さらに、いわゆる chemography（化学かぶり）発生の危険性も指摘されている。

エナメル質の形成過程においてはカルシウムとリン酸が多量に取り込まれることが知られており、過去にも ^{45}Ca や ^{32}P 、 ^{33}P を用いた多くのオートラジオグラフィーによる研究が行なわれている。しかし上記のような技術的制約から、所見の大きく異なる部分が見られ、未だに見解の一致が得られていない。著者らは近年、カルシウムの動態に関して、 ^{45}Ca で標識した試料を急速凍結・凍結置換後、Epon包埋し、乾式法で乳剤貼付を行なうことで、 ^{45}Ca オートラジオグラフィーで再現性のある安定した結果が得られることを確立し、従来の報告にみられた所見の不一致をもたらした手技上の問題点を明らかにすることができた。

エナメル質の石灰化機構を検討する上で、カルシウムとリン酸の添加様式の異同を探ることは重要と思われる。よって本研究は、エナメル質へのリン酸の取り込み経路を明らかにすることを目的に、 $\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{O}_4$ を用いて、先に開発した急速凍結置換、乾式乳剤貼付法を応用して、ラット切歯のエナメル質形成野、及び成熟野におけるリン酸の動態を検索したものである。

実験動物は16日齢Wistar系ラットである。すべてエーテル麻醉下で断頭、右側下顎切歯歯胚を摘出し、直ちに液体窒素で冷却した液体プロパン中に投入し急速凍結した。凍結した歯胚は、あらかじめ冷却しておいたアセトン（ -80°C ）に移し、4日間凍結置換した。置換後、Epon-812に包埋した。試料はガラスナイフで切歯の長軸方向に平行に、形成端からエナメル質成熟期に及ぶ未脱灰の連続縦断切片（厚さ約 $2\ \mu\text{m}$ ）を無水的に作成した。成熟期に相当する部位では、あらかじめ象牙質の大部分を除去してから薄切した。切片は微量のエチレングリコールでスラドグラスに貼付した。

まず、化学かぶりの検討のため、標識物質を投与しない動物から作製した切片に、①直接乾式で乳剤貼付したもの、②切片をコロジオンの薄膜で被覆してから乾式で乳剤貼付したもの、③切片に直接乾式で乳剤貼付し、一定時間感光させたもの、④切片をコロジオンの薄膜で被覆してから乾式で乳剤貼付し一定時間感光させたもの、の4種類を作成し通常の方法に従い現像、定着を行なった。

次に、動物にエーテル麻醉下で $\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{O}_4$ (80KBq/g体重) の水溶液を右頸静脈より注入し、10秒、30秒、3分、10分、60分後に断頭、上記の方法で切片を作製した。切片上をコロジオンの薄膜で被覆してから乾式法で乳剤を貼付し露出後、現像、検鏡した。エナ

メル質とエナメル器の細胞上の銀粒子の分布と経時的変化を調べるために、軟組織上及び硬組織上での銀粒子数の計測並びに統計処理を行なった。なお一部切片には湿式法で乳剤貼付を行なった標本、並びにコロジオン膜で被覆せずに直接乾式で乳剤貼付した標本も作成し、比較検討した。

切片に直接、及びコロジオン膜で被覆してから乾式法で乳剤貼付を行なったものでは、いわゆる positive chemography はみられなかった。しかし切片に直接乳剤貼付し、感光させてから現像したものでは、現像後、数時間でエナメル質及び象牙質上の銀粒子が徐々に消退するという、いわゆる negative chemography が観察された。これらの現象は、切片をあらかじめコロジオン膜で被覆することにより発生を防止できた。

通常湿式法で貼付したものでは、乳剤の流れた方向に一致して、試料上からスライドグラス上まで、連続して多量の銀粒子が観察されたが、乾式法で乳剤貼付を行なったものでは、現像後の銀粒子は試料上に留まっており、周囲の切片上にはほとんど観察されなかった。よって、 ^{32}P -リン酸の人工的移動の防止には、乾式乳剤貼付法が極めて優れていることが明らかとなった。

以上の点に留意して、切片をあらかじめコロジオン膜で被覆したのち乾式法で乳剤貼付を行なった標本を用いて、エナメル質形成野および成熟野におけるリン酸の動態を検討した。

形成期では、静注後10秒でエナメル質全層に多量の銀粒子が観察され、静注後60分群まで同様な傾向が続いた。軟組織上での標識は弱く、銀粒子が特に集積する部位は観察されなかった。しかし銀粒子数を計測して定量化して調べた結果、静注後短時間では銀粒子は

エナメル質表層に集積する傾向があり、時間の経過とともに、徐々に深層に向かって分布領域が広がってゆく傾向があることがわかった。以上のことから、形成期においては ^{32}P -リン酸はエナメル器の細胞層を急速に通過してエナメル質に達し、全層にわたって急速に拡散する一方で、表層から深層へのゆっくりとした移動様式も存在することが明らかとなった。

成熟期エナメル芽細胞には、細胞遠位端に波状縁をもつもの(RA)とともたないもの(SA)の二種類があり、エナメル質成熟の過程で、交互に周期的な形態変換を示すが、このような細胞の形態変化に伴う ^{32}P -リン酸のエナメル質への取り込みの様子を検索した。静注後10秒ではRA領域ではエナメル質全層に、SA領域ではエナメル質の表層にのみ銀粒子が観察された。静注後3分ではRA領域では全層に銀粒子がみられたが、RA領域の切縁側寄りの部位では銀粒子の分布密度はRA領域の中央部より非常に少なかった。一方SA領域では、銀粒子はエナメル質表層に集積する傾向が続いており、全体の銀粒子数も増加傾向にあった。このようなエナメル芽細胞のRAとSA二種の形態の領域における銀粒子の特徴的な分布傾向は、60分後のものまで引き続き観察された。軟組織上では、時間の経過と関連して銀粒子が特に集積するような領域はみられなかった。このようなことから、エナメル質成熟期において ^{32}P -リン酸は、エナメル器の細胞の制御をうけることなくエナメル質に急速に達することと、エナメル質への ^{32}P -リン酸の添加量とその経時的変動は、エナメル芽細胞の形態変化に密接に関連することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 脇 田 稔
副 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 吉 田 重 光

学 位 論 文 題 名

エナメル質形成野、及び成熟野におけるリン酸の動態：

^{32}P -リン酸オートラジオグラフィーによる検討

エナメル質の形成過程においてはカルシウムとリン酸が多量に取り込まれることが知られており、過去にも ^{45}Ca や ^{32}P 、 ^{33}P を用いた多くのオートラジオグラフィーによる研究が行なわれている。しかし水溶性標識化合物を扱う上での技術的制約から、所見の大きく異なる部分がみられ、未だに見解の一致が得られていない。本論文提出者はカルシウムの動態に関して、 ^{45}Ca で標識した試料を急速凍結・凍結置換後、Epon包埋し、乾式法で乳剤貼付を行なうことで、 ^{45}Ca オートラジオグラフィーで再現性のある安定した結果が得られることを確立し、従来に報告にみられた所見の不一致をもたらした手技上の問題点を明らかにしている。

エナメル質の石灰化機構を検討する上で、カルシウムとリン酸の添加様式の異同を探ることは重要である。よって本研究は、エナメル質へのリン酸の取り込み経路を明らかにすることを目的に、 $\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{O}_4$ を用いて、先に開発した急速凍結置換、乾式乳剤貼付法を応用して、ラット切歯のエナメル質形成野、及び成熟野におけるリン酸の動態を検索したものである。

実験は、まず16日齢Wistar系ラットを用い、すべてエーテル麻醉下で断頭、右側下顎切歯歯胚を摘出し、直ちに液体窒素で冷却した液体プロパン中に投入し急速凍結し、あらかじめ冷却しておいたアセトン（-80℃）に移し、4日間凍結置換した。置換後、Epon包埋し、ガラスナイフで切歯の長軸方向に平行に未脱灰の連続縦断切片（厚さ約2 μ m）を無水的に作製した。切片は微量のエチレングリコールでスラドグラスに貼付した。

まず、化学かぶりの検討のため、標識物質を投与しない動物から作製した切片に、①直接乾式で乳剤貼付したもの、②切片をコロジオンの薄膜で被覆してから乾式で乳剤貼付したもの、③切片に直接乾式で乳剤貼付し、一定時間感光させたもの、④切片をコロジオンの薄膜で被覆してから乾式で乳剤貼付し一定時間感光させたもの、の4種類を作製し通常の方法に従い現像、定着を行なった。

次に、動物にエーテル麻醉下で $H_3[^{32}P]O_4$ (80KBq/g体重) の水溶液を右頸静脈より注入し、10秒、30秒、3分、10分、60分後に断頭、上記の方法で切片を作製した。切片上をコロジオンの薄膜で被覆してから乾式法で乳剤を貼付し露出後、現像、検鏡した。銀粒子の分布と経時的变化を調べるために、銀粒子数の計測並びに統計処理を行なった。なお一部切片には湿式法で乳剤貼付を行なった標本も作製し、比較検討した。

化学かぶりを検討した結果、切片に直接乳剤貼付し感光させてから現像したものでは、現像後、数時間で硬組織上の銀粒子が徐々に消退するという、いわゆるnegative chemographyが観察された。これらの現象は、切片をあらかじめコロジオン膜で被覆することにより発生を防止できた。同時に、乳剤貼付の際に発生する ^{32}P -リン

酸の人工的移動の防止に、乾式乳剤貼付法が極めて優れていることを明らかにした。コロジオン処理の有無にかかわらずいわゆる positive chemographyはみられなかった。

以上の点に留意して、エナメル質形成野および成熟野において現像銀粒子の分布を検索し、独自の方法で決定した各領域中の銀粒子数を計測、統計処理して ^{32}P -リン酸の動態を詳細に検討した。その結果、形成期においては ^{32}P -リン酸はエナメル器の制御をうけることなくエナメル質に急速に達しエナメル質全層にわたって急速に拡散する一方で、表層から深層へのゆっくりとした移動様式も存在することを明らかにし、エナメル質成熟期においては ^{32}P -リン酸は、エナメル器の細胞の制御をうけることなくエナメル質に急速に達することと、エナメル質への ^{32}P -リン酸の添加量とその経時的変動は、成熟期エナメル芽細胞の形態変化(RA及びSA)に密接に関連することを初めて明らかにしている。

本論文に対して主査並びに副査からその概要について説明を求め次いで本論文の内容並びに関連のある質問が行なわれた。これらの試問に関してそれぞれ適切な回答が得られた。また、本研究で示されたオートラジオグラフィーに関する技術的な問題点の克服及び、エナメル質石灰化に関するリン酸の動態については、今後硬組織の石灰化機構究明に対して大いに貢献するであろうことが高く評価され、本論文提出者は博士(歯学)に値すると認められた。