

学 位 論 文 題 名

Prenatal development of the palatine gland of rats

（ラット口蓋腺胎生期発生過程に関する組織学的研究）

学位論文内容の要旨

【緒言】

口蓋腺は口蓋上皮下に存在し、複数の排泄管を有する小唾液腺である。これまで口蓋腺に関しては種々の報告がなされているものの、組織発生に関するものは極めて少なく、今なお不明な点が数多く残されている。そこで本研究では、口蓋腺の胎生期発生過程における細胞増殖活性および細胞分化について明らかにすることを目的とした。

この目的のために、ラット胎仔の口蓋腺に対し組織学的検索および BrdU による免疫組織化学的検索に加え、コンピューターを用いた腺上皮の 3 次元立体再構築を行った。

【材料と方法】

実験動物には妊娠 17、18、20、21、22 日目の Wistar 系ラットから摘出した胎仔を各 4 匹ずつ用いた。それぞれの妊娠ラットには免疫組織化学的検索のため、胎仔摘出 1 時間前に S 期細胞の核に取り込まれる 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 50 mg/kg の割合で腹腔内投与した。

摘出した胎仔の頭部を 4% パラホルムアルデヒド水溶液 (pH 7.4) にて 24 時間浸漬固定後、5% 蟻酸水溶液にて 24～48 時間脱灰した。次に頭部を正中矢状断し、片側試料から 5 μ m のパラフィン連続切片を作製した。

これら連続切片には組織学的検索のためにヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色およびアルシアンブルー (AB) 染色を行った。

免疫染色には各ラットにつき無作為に選んだ 5 枚の切片を用いた。これら切片に 0.1% トリプシンおよび 3 N の HCl にて前処理を行った後、1 次抗体として抗 BrdU マウスモノクローナル抗体 (Bu20a, DAKO, Denmark)、2 次抗体としてウサギ抗マウスビオチン化 IgG (DAKO) を用い、ストレプトアビジン-ビオチン複合体 (DAKO) を順に反応させた。各反応後には PBS にて十分に洗浄を行った。最後に H₂O₂-DAB 反応により呈色させ、マイヤーのヘマトキシリンにて対比染色を行

った。染色後、口蓋腺発生過程に出現した上皮索、導管、腺房について1切片あたり任意に200核を選び、各ラットの陽性率を算出した。そして4匹のラットの平均値を求め、各胎齢の BrdU 標識率とした。これらデータはすべて Stat View 4.5 (Abacus Concepts; Berkley, CA, USA)ソフトウェアを用いて、有意水準5%にて Kruskal-Wallis 検定ならびに Bonferroni/Dunn 法による多重比較検定を実施した。

また腺上皮の3次元立体再構築のために、各胎齢のラットの HE 染色連続切片の光学顕微鏡写真より腺上皮外形をトレースし、コンピューターに入力した。そして3次元立体再構築ソフトウェア NIKON COSMOZONE 2SA を用いて立体的なカラー画像を作成した。これらの画像から発生過程における腺実質を立体的位置関係により分類し、それぞれの割合を算出した。

【結果】

組織学的には、胎齢17日目に充実性で蕾状の上皮索が口蓋上皮の肥厚として数箇所認められた。口蓋上皮は未分化な間葉細胞で占められていた。胎齢18日目にはこれら上皮索が間葉中へと伸長し、細長い茎状部分と蕾状に膨らんだ先端部から構成されていた。上皮索の分枝は胎齢20日目で初めて認められ、同時に口蓋上皮に近い部分で管腔が生じていた。胎齢21日目では AB 陽性を示す未熟な腺房への分化が初めて認められた。また、胎齢17、18日目で主に見られる充実性の上皮索はほとんど観察されなくなっていた。胎齢22日目では、粘液性腺房の成熟および腺実質の増大が顕著であった。

免疫組織化学的には、発生過程における上皮索、導管、腺房のいずれにおいても多数の BrdU 陽性細胞が認められ、実験期間を通してそれぞれが5%を超える高い BrdU 標識率を示していた。特に発生初期の胎齢17、18日目の上皮索における標識率は非常に高く、40%を超えていた。胎齢20日目以降においても、上皮索の標識率は導管や腺房に比べ有意に高かった。導管と腺房との標識率の間に有意差は認められなかった。

3次元立体再構築の結果より、発生過程における上皮索、導管、腺房の立体的位置関係には、3つのタイプのみが存在していることが明らかとなった。そこでこれらを充実性上皮索のみからなる Type 1、近位部（口蓋上皮に近い側）が導管、遠位部（口蓋上皮に遠い側）が上皮索からなる Type 2、そして近位部が導管、遠位部が腺房からなる Type 3 に分類した。胎齢17、18日目には Type 1 のみが観察されたが、以降その割合は低下していった。胎齢20日目には Type 2 が、胎齢21日目には Type 3 が出現し、Type 2 の割合の低下に伴い Type 3 の割合が上昇し、胎齢22日目には Type 3 が最も高い割合を占めていた。

【考察】

口蓋腺の組織発生は口蓋上皮の肥厚から生じる充実性の上皮索として開始してい

た。これら上皮索は非常に高い増殖活性を有する未分化な細胞から成っており、管腔や腺房の形成に先立って間葉中深くへ伸長するとともに活発に分枝していた。このことは、口蓋腺の発生初期においては腺としての分化よりも腺組織外形の形成が優先されるということを示すものと考えられた。

管腔形成については、同じ小唾液腺であるヒト口蓋腺、ヒト口唇腺の報告に一致し、1箇所のみから生じていた。大唾液腺である耳下腺では管腔形成が複数箇所から生じるとされており、この相違は、小唾液腺に比べ長い導管を有する耳下腺において、効率的に導管形成を進める必要性に起因するのではないかと思われた。また、管腔形成の進行方向はヒト口蓋腺、ヒト口唇腺における報告とは異なり、近位から遠位へ向かっていた。この理由については今回の実験からは明らかにできず、今後のさらなる検討が必要であると思われた。

3次元立体再構築の結果より、発生初期に全数を占めていた Type 1 は Type 2 の出現とともに減少し、さらに出生までには Type 2 も減少し、Type 3 が多数を占めることが明らかになった。このことは、口蓋上皮より生じた上皮索である Type 1 は Type 2 へ、そして Type 2 は Type 3 へという過程を経て分化することを示唆するものと考えられた。すなわち、口蓋腺の発生過程においては充実性上皮索の近位部からは導管が、次いで遠位部から腺房が分化すると考えられた。

【結論】

ラット口蓋腺の胎生期組織発生は、口蓋上皮に由来する極めて増殖活性の高い充実性上皮索として開始していた。そして上皮索の近位部より導管が、遠位部より腺房が分化し、それぞれの腺実質の活発な増殖により口蓋腺は増大するものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 田 学
副 査 教 授 脇 田 稔
副 査 教 授 吉 田 重 光

学 位 論 文 題 名

Prenatal development of the palatine gland of rats

(ラット口蓋腺胎生期発生過程に関する組織学的研究)

審査は森田、脇田および吉田審査委員それぞれ個別に、学位申請者に対して提出論文の内容と、それに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

口蓋腺は口蓋上皮下に存在し、複数の排泄管を有する小唾液腺である。これまで口蓋腺に関しては種々の報告がなされているものの、組織発生に関するものは極めて少なく、今なお不明な点が数多く残されている。

本研究は口蓋腺の胎生期発生過程における細胞増殖活性および細胞分化について明らかにするために、ラット胎仔の口蓋腺に対し組織学的、免疫組織化学的検索に加え、コンピューターを用いた腺上皮の3次元立体再構築を行ったものである。

実験動物には妊娠17、18、20、21、22日目のWistar系ラットから摘出した胎仔を各4匹ずつ用いた。それぞれの妊娠ラットには免疫組織化学的検索のため、胎仔摘出1時間前に5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)を50mg/kgの割合で腹腔内投与した。摘出した胎仔の頭部は4%パラホルムアルデヒド水溶液にて固定後、5%蟻酸水溶液にて脱灰し、正中矢状断した片側試料から5 μ mのパラフィン連続切片を作製した。

これら連続切片には組織学的検索のためにヘマトキシリン-エオジン(HE)染色およびアルシアンブルー(AB)染色を行い、合わせて細胞増殖活性について検索するために抗BrdUモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行った。

腺上皮の3次元立体再構築として、HE染色連続切片より腺上皮外形をトレースしコンピュータに入力後、NIKON COSMOZONE 2SAソフトウェアを用いて立体的なカラー画像を作成し分類した。

得られたデータはすべて有意水準 5%にて Kruskal-Wallis 検定ならびに Bonferroni/Dunn 法による多重比較検定を実施した。

その結果、胎齢 17 日には充実性で蕾状の上皮索が口蓋上皮の肥厚として数カ所で認められ、胎齢 18 日にはこれらが伸長し細長い茎状部と蕾状に膨らんだ先端部から構成されていた。上皮索の分枝は胎齢 20 日で初めて認められ、同時に口蓋上皮に近い部分で管腔が生じていた。胎齢 21 日では AB 陽性を示す未熟な腺房への分化が初めて認められ、胎齢 22 日では粘液性腺房の成熟および腺実質の増大が顕著であった。

免疫組織化学的には発生過程に出現する上皮索、導管、腺房のいずれにおいても実験期間を通して 5%を超える高い BrdU 標識率を示していた。特に発生初期の上皮索における標識率は非常に高く、40%を超えていた。また胎齢 20 日以降においても上皮索の標識率は導管や腺房に比べ有意に高く、導管と腺房との標識率の間に有意差は認められなかった。

3 次元立体再構築の結果より、発生過程における上皮索、導管、腺房の立体的位置関係には 3 つのタイプのみが存在し、充実性上皮索のみからなる Type1、近位部が導管、遠位部が上皮索からなる Type2、そして近位部が導管、遠位部が腺房からなる Type3 に分類された。胎齢 17、18 日には Type1 のみが観察されたが、以降その割合は低下していった。胎齢 20 日には Type2 が、胎齢 21 日には Type3 が出現し、Type2 の割合の減少に伴い Type3 の割合が上昇し、胎齢 22 日には Type3 が最も高い割合を占めていた。

以上の結果から、口蓋腺の組織発生は口蓋上皮の肥厚から生じる充実性の上皮索として開始し、これらは非常に高い増殖活性を有する未分化な細胞で構成されていることが明らかとなった。これら上皮索は、管腔や腺房の形成に先立って間葉中深くへと伸長するとともに活発に分枝していた。そして上皮索の近位部より導管が、遠位部より腺房が分化し、それぞれの腺実質の活発な増殖により口蓋腺が増大していくことが示唆された。

本論文申請者に対し、主査ならびに副査より本論文の概要についての説明が求められた。続いて行われた口頭試問においては口蓋腺の一般的な特徴、大唾液腺の胎生期発生過程との具体的な相違点、BrdU 陽性率の経時的な推移、口蓋腺が他の唾液腺と比べ早い時期に発達を遂げることの意義等について詳細に行われた。

申請者はこれらの設問に対しそれぞれ適切な回答を行うとともに、今後当該組織のさらなる解析の準備を進めていることを明らかにした。このことから申請者は、本研究に直接関連する事項のみならず、組織学全般にわたり広い学識を有していると認められ、さらに将来の展望についても評価された。

従って本論文申請者は博士（歯学）の学位授与に相応しい者と認められた。