

方法

胎生14日目 (E14) のマウスから顎下腺をとりだし、EGF (50 ng/ml) あるいは KGF (200 ng/ml) を添加した無血清の BGJb メディウムに浮かべた Nuclepore 膜上で一定期間器官培養を行った。培養後、顎下腺を Nuclepore 膜から回収し、ホモジネートを作成した。ホモジネート中のリン酸化タンパク質は、それぞれの特異抗体を用いたイムノブロットティング法によって検出した。また、胎生13日目の顎下腺に各種酵素阻害剤 (PD98059 あるいは U73122) を添加して器官培養を行い、実体顕微鏡下で形態を観察した。さらに、胎生13日目の顎下腺を摘出した後、ディスペーゼ処理を行って上皮と間葉を分離した。分離後の上皮をマトリゲル (growth factor-reduced) で覆って培養を行った。

結果

EGF と KGF はともに顎下腺の分枝形態形成を促進させた。EGF を添加して培養を行った顎下腺はおもに分枝形成が促進し小葉の数が増加した。一方、KGF を添加して培養を行った場合、小葉の数よりもその大きさを増加させた。胎生14日の顎下腺に EGF あるいは KGF を添加して培養を行った結果、Erk-1/2 のリン酸化は、EGF の刺激によって著しく促進したが、KGF の刺激にはほとんど反応を示さなかった。PLC γ 1 のリン酸化は、EGF と KGF の刺激とともに促進した。PI3K のリン酸化は成長因子の添加の有無に関わらず、常に亢進していることが分かった。顎下腺上皮を分離し、EGF を添加して培養を行った結果、cleft 形成 (小葉形成) が促進したのに対し、KGF を添加して培養を行ったものでは、茎部の伸長 (elongation) が促進した。EGF と KGF の両成長因子で刺激した顎下腺上皮は、cleft 形成を促進することが分かった。EGF と KGF の両成長因子で刺激した顎下腺上皮に MEK 阻害剤 (Erk 活性化阻害剤: PD98059) を同時に作用させると、KGF を単独で作用させたものに類似した茎部の伸長が認められた。それに対し、PLC γ 1 阻害剤 (U73122) を同時に作用させたものは、EGF 単独で処理したものに類似した cleft 形成の促進が認められた。

考察

以上の結果から、EGF は顎下腺上皮の EGFR と結合し、主に Erk の活性化を介して、上皮の cleft 形成を促進すること、また、KGF は顎下腺上皮の FGFR に結合し、主に PLC γ 1 の活性化を介して、茎部の伸長を促進させると考えられた。

座長 岩久 文彦 教授

4. *Polypterus senegalus* の鱗における硫酸化複合糖質の超微局在

○小萱 康徳・佐藤 和彦・久保 金弥・岩久 文彦
(朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座
口腔解剖学分野)

目的

歯は系統発生的に約5億年前の無顎類の皮甲に起原する。皮甲は骨、象牙質およびエナメル質 (もしくはエナメロイド) から構成されていたが、*Polypterus senegalus* のガノイン鱗はその原始的形態を現在にまで継承している。従ってその鱗の発生ならびに組織構造は、歯の系統進化に関する様々な情報を保有していることが予期される。従来演者らは下等および高等脊椎動物の歯の硬組織形成過程における硫酸化複合糖質の局在様式の違いと系統進化的意義について報告してきた。本研究では歯の系統進化に関する研究の一環として、*Polypterus senegalus* の鱗における硫酸化複合糖質の超微局在を検索した。

材料と方法

体長10~15cmの *Polypterus senegalus* の鱗を剥離し、1% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde (0.1M sodium cacodylate buffer, pH7.4) で3~12時間固定、high iron diamine (HID) 液に12時間浸漬、蒸留水で洗浄後通法に従って脱水、Taab Epon812に包埋した。ステンレス製グリッドに超薄切片を載せ、thiocarbohydrazide (TCH) in 10% acetic acidに10分間浸漬、蒸留水で洗浄、1% silver proteinate (SP) に5分間浸漬後検鏡した。一部上記固定試料は、4% EDTAで4週間脱灰、0.01% bovine testicular hyaluronidase (0.1M sodium acetate buffer, pH5.8) もしくは heparitinase from *Flabobacterium heparinum* (0.15U/ml. sodium acetate buffer, pH7.0) で6時間酵素消化後上記 HID-TCH-SP 染色を施した。

結果

Polypterus senegalus の鱗の硬組織はガノイン質 (エナメル質と相同)、象牙質および骨からなり、数種類の上皮細胞で被覆されている。上皮細胞層では、最表層の被蓋細胞の粘液顆粒内および樹状細胞の高電子密度顆粒内に硫酸化複合糖質を認めた。上皮細胞最内層の細胞はガノイン形成細胞に分化し、ガノイン質の形成成熟に関与する。基質形成期ガノイン質に硫酸化複合糖質はまったく検出されず、成熟期に出現するガノイン膜の表層域に硫酸化複合糖質を認めた。上皮間葉境界面基底膜の lamina densa 両側に硫酸化複合糖質が検出された。この上皮に面する間葉細胞から象牙芽細胞が分化し象牙質を形成する。象牙質には数は少ない

が不規則に配列する象牙細管様構造とコラーゲン線維の錯綜がみられ、象牙質全層に多量の硫酸化複合糖質が検出された。骨は象牙質の下面に直接添加された。硫酸化複合糖質は類骨層に多量に認められたが、石灰化した骨では骨細胞周囲を除き検出されなかった。骨形成面の骨芽細胞に隣接して高電子密度顆粒を有する紡錘状の細胞が頻繁に観察され、その顆粒内に硫酸化複合糖質を認めた。酵素消化試験は象牙質および骨内の硫酸化複合糖質の大部分は、コンドロイチン硫酸、基底膜の硫酸化複合糖質はヘパラン硫酸であることを示した。

考察および結論

哺乳類の象牙質は一般的に外套象牙質と髓周象牙質に区分される。前者の硫酸化複合糖質は石灰化後も基質内に残存するが、後者の場合石灰化とともに脱却されより高度に石灰化した組織になる。これは両者の系統発生的な石灰化機序変遷の一部を示すもので、*Polyphteurs senegalus* の鱗の象牙質硫酸化複合糖質の局在様式も前者のそれに一致した。歯牙硬組織形成細胞の分化は上皮間葉相互作用に依存し、歯胚基底膜はその中心的役割を果たしている。ガノイン鱗上皮間葉境界面に基底膜構成成分の一つヘパラン硫酸の存在が確認されたが、細胞分化に伴うダイナミックな局在様式の変化は観察されなかった。上皮性硬組織の硫酸化複合糖質も系統発生と密接に関連している。すなわち、下等脊椎動物の無柱エナメル質形成に硫酸化複合糖質はまったく関与しないが、哺乳類小柱エナメル質形成には小柱形態を規制する新たな硫酸化複合糖質が加わる。*Polyphteurs senegalus* のガノイン質は構造的にも組成的にも無柱エナメル質に分類された。骨と象牙質の系統発生的な起原については、現存のところ明確な結論はえられていないが、ガノイン鱗の骨と象牙質の個体発生を見る限り象牙質の発生が先行する。またガノイン鱗の骨はすでに硫酸化複合糖質の脱却機構を獲得しており、この点においても象牙質に先行している。このようにガノイン鱗の硫酸化複合糖質の超微局在様式は、象牙質の系統発生的原始性を示唆した。

—本研究は平成16年度宮田研究奨励金（A）の補助を受けた—

座長 土井 豊 教授

5. CO₂レーザーによるリン酸カルシウムのエナメル質表面への融着

○後藤 博祐¹・若松 宣一²・土井 豊³
田村 康夫⁴

(¹朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座

小児歯科学分野)

(²朝日大学歯学部口腔機能修復学講座

歯科理工学分野)

我々は幼弱永久歯の小窩裂溝齲蝕予防を目的として、歯科用レーザーを用いたリン酸カルシウムのエナメル質への融着を試みている。本研究では、リン酸一カルシウム1水和物 (MCPM) とリン酸二水素カルシウム2水和物 (DCPD) を用い、CO₂レーザーにてエナメル質への融着を試みた。さらに、高エネルギー密度でのCO₂レーザー照射では、エナメル質の亀裂の発生および、歯髄組織の熱損傷を引き起こす可能性があるため、より低いエネルギー密度でリン酸カルシウムをエナメル質に融着させるために、リン酸カルシウム圧粉体にエネルギー密度を変えてレーザー照射し、照射痕の大きさ、深さを測定した。また、口腔内でレーザー照射されたリン酸カルシウムの溶解性を調べるため、酢酸バッファ (pH5.0) 中での溶解性試験を行った。MCPM, DCPD を1500℃で1時間焼成したものを溶解させ、Ca イオンの溶出量を測定した。

その結果、2.0W、30秒のレーザー照射において、MCPM, DCPDともエナメル質に融着することが分かった。エネルギー密度365J/cm²未満 (1.0W、0.8秒) のレーザー照射において、レーザー照射痕の大きさは0.55~0.80mmとMCPM, DCPDの間でほとんど差が認められなかった。照射痕中央部にできたクレーターの大きさはMCPMが0.20~0.40mmだったのに対し、DCPDは0.05~0.40mmと低出力においてより小さい値を示した。また、照射痕の深さはMCPMが0.20~0.30mmだったのに対し、DCPDは0.10~0.15mmとより小さい値を示した。溶解性試験では、1500℃で焼成したMCPMよりもDCPDのCaイオン溶出量が小さいことが分かった。

座長 土井 豊 教授

6. 炭酸含有アパタイト焼結体の超塑性変形について

○足立 正徳・若松 宣一・亀水 秀男・飯島まゆみ
土井 豊

(朝日大学歯学部口腔機能修復学講座

歯科理工学分野)

緒言

近年、リン酸カルシウム系基材が生体材料として利用されている。そのなかで炭酸含有アパタイト焼結体は、水酸化アパタイトおよびβ-リン酸三カルシウムに比べ生体親和性に富み、骨補填材や骨置換材のような生体材料として広く応用できる可能性が示唆されている。また、アパタイト焼結体は高温下で適度な荷重