

Title	Ultrastructural immunolocalization of dentin matrix protein 1 on Sharpey ' s fibers in monkey tooth cementum
Author(s)	石川, 敏樹
Journal	歯科学報, 113(3): 330-331
URL	http://hdl.handle.net/10130/3105
Right	

氏名(本籍)	いし かわ とし き 石 川 敏 樹 (神奈川県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1974号(乙第758号)
学位授与の日付	平成24年12月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Ultrastructural immunolocalization of dentin matrix protein 1 on Sharpey's fibers in monkey tooth cementum
掲載雑誌名	Biotechnic & Histochemistry 第87巻 5号 360-365頁 2012年7月
論文審査委員	(主査) 山本 仁教授 (副査) 東 俊文教授 齋藤 淳教授 澤田 隆准教授 上松 博子講師

論文内容の要旨

1. 研究目的

非コラーゲン性タンパクの一つである dentin matrix protein-1 (DMP-1)は、象牙芽細胞の分化と象牙質の石灰化に関与している。最近、DMP-1はセメント質にも分布していることが報告されているが、その微細構造レベルでの局在については解析されておらず、また、セメント質形成における同分子の機能についても不明な点が多い。今回、酵素抗体法および金コロイド標識法により DMP-1 の微細構造レベルでの局在を免疫電顕的に解析した。

2. 研究方法

材料には京都大学霊長類研究所より供与された生後3年(体重約4.5kg)のニホンザル2頭を用いた。全身麻酔下にて頸部動脈より4%パラホルムアルデヒドによる頭部灌流固定を1時間施し、上顎骨を摘出後、さらに6時間浸漬固定を行い、歯周組織と臼歯を一塊として採取した。EDTAにて脱灰した試料を急速凍結した後、クリオスタットで厚さ10 μ mの凍結切片を作製した。切片を5%正常山羊血清に浸漬し非特異反応を阻止した後、一次抗体にウサギ抗DMP-1抗体を用い4 $^{\circ}$ Cで一晩浸漬した。PBS洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ二次抗体にて一晩浸漬し、DABで発色を行った。切片を封入し光学顕微鏡観察を行った。免疫電顕観察のためには、DABで発色後、オスミウム酸に1時間浸漬、エタノール脱水、エポキシ樹脂に包埋した。一部の試料は一次抗体に浸漬後、10nm金コロイド標識二次抗体で反応させた後、オスミウム酸後固定、脱水、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片を作製後、ウラン・鉛染色を施し、電子顕微鏡観察を行った。対照標本には、一次抗体の代わりに正常ウサギ血清あるいはPBSを同様の条件下で浸漬したものをを用いた。

3. 研究成績および結論

サル上顎臼歯歯根は歯根端部に細胞セメント質があり、根端1/3から歯頸部にかけて無細胞セメント質が覆っていた。無細胞セメント質にはよく発達したシャーピー線維がみられた。DMP-1による免疫染色を施すと、無細胞セメント質および細胞セメント質共に陽性染色像がみられた。拡大すると、セメント質-歯根膜境界部およびシャーピー線維に比較的強い染色像が認められた。細胞セメント質ではセメント小腔に強い染色がみられた。電顕観察では、ペルオキシダーゼ反応産物が歯根膜の主線維とシャーピー線維の境界部に多くみられ、セメント質中に進入しているシャーピー線維にも認められた。主線維と線維芽細胞には反応産物は認めら

れなかった。金コロイド標識法による観察ではシャープ線維を構成するコラーゲン細線維に沿って金粒子の沈着が認められた。細胞セメント質では、金粒子は主にセメント小腔の壁面に沈着していた。陽性コントロールとして象牙質を染色したものでは、象牙細管壁に金粒子の沈着が認められた。陰性コントロールには金粒子の沈着は認められなかった。

以上の所見により、DMP-1はセメント質、特にシャープ線維の石灰化に関与することが示唆された。また、細胞セメント質においては既に報告にあるように歯槽骨の骨小腔に対するDMP-1の役割と同じように、セメント小腔に対してもその形態維持とスペースの保持にDMP-1が関与していることが考えられた。

論文審査の要旨

本論文は、非コラーゲン性タンパクの一つである dentin matrix protein-1 (DMP-1) のセメント質における局在について、免疫電子顕微鏡を用い詳細に検討したものである。その結果、DMP-1は無細胞セメント質の大部分を構成しているシャープ線維に、また細胞セメント質では主にセメント小腔とセメント細管に局在が認められた。電子顕微鏡レベルでは、シャープ線維を構成するコラーゲン細線維に沿ってDMP-1は局在し、特に石灰化前線部が強くラベルされていた。セメント小腔ではその壁面に沿って局在が観察された。

本審査委員会では、始めに石川敏樹専攻生による提出論文の内容説明が行われ、次いで各審査委員との質疑応答が行われた。質問内容は、1) 包埋前染色法を採用した理由と本法の利点と欠点について、2) シャープ線維にDMP-1が局在するのに対し、これに連続する歯根膜主線維には局在しない理由、3) DMP-1ノックアウトマウスにみられるセメント質の所見とヒトの遺伝性疾患(低リン血症性くる病)におけるセメント質の所見の相違について、4) DMP-1の微細局在と機能との関連性、ならびにその臨床的意義について、5) 使用動物の飼育条件、口腔内所見、観察に供した歯根状態の記載、6) セメント細胞によるDMP-1産生能について、であり、それぞれに概ね妥当な回答を得た。その他、文章の表現法や付図の配置などに若干の改善点があるとの指摘があったが、本研究で得られた知見は歯学の進歩発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。なお、英・独2ヶ国語につき試験を行った結果、合格と認定した。