



Title	メダカ咽頭歯・咽頭骨にみられる硬組織間接着界面の形態学的特徴 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	松村, 馨
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11709号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59018
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kaoru_Matsumura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 松村 馨

学 位 論 文 題 名

メダカ咽頭歯・咽頭骨にみられる硬組織間接着界面の形態学的特徴

哺乳類の骨基質には骨接合線が存在し、脱灰標本でヘマトキシリンに染色され、過酸化ヨウ素シッフ反応（PAS）で陽性を示す。口腔領域では骨接合線と類似した構造がセメント象牙境と、固有歯槽骨・支持歯槽骨界面に観察され、これら硬組織間接着界面の特徴として、組織学的には HE 染色でヘマトキシリンに染まり、PAS 染色で陽性を示し、免疫染色では bone sialoprotein, osteopontin, glycosaminoglycans が局在することが知られている。これらの非膠原性タンパクは PAS 陽性物質であると考えられており、これらの物質は硬組織間の接着に関与すると報告されている。歯槽骨を含む骨組織は系統発生学的に硬骨魚類よりみられることから、その骨接合線の構造を理解することは哺乳類の骨接合線の特徴を理解する上で重要であると考えられる。硬骨魚類の歯は哺乳類とは異なり、歯と骨が直接結合する骨性結合と歯と骨の間に歯足骨と呼ばれる硬組織が介在し、歯と歯足骨の間が線維で結合する線維性結合での植立様式の 2 通りを持っている。硬骨魚類のメダカは、顎歯のほかに咽頭骨にも歯をもち、下咽頭歯は骨性結合、上咽頭歯は歯足骨を介在する線維性結合によって咽頭骨に植立している。硬骨魚類におけるこのような硬組織間接着界面は、固有歯槽骨・支持歯槽骨間や、セメント象牙境と類似した構造が見られるが、その部位における PAS 陽性物質の存在については分かっていない。硬骨魚類の一種であるメダカは多生歯性であるため咽頭歯の交換は頻繁に生じており、そこでは骨接合線も観察できると思われる。それゆえ、本研究ではメダカを用いた。本研究はメダカの咽頭歯・咽頭骨にみられる硬組織間接着界面、骨接合線と咽頭歯・歯足骨界面の形態学的特徴を明らかにすることを目的とする。

メダカ（ダツ目メダカ科, *Oryzias latipes*,）成魚 40 匹を用いた。内訳は実体顕微鏡観察 1 匹, 光学顕微鏡観察 20 匹, 電子顕微鏡観察 19 匹である。メダカは 3-アミノ安息香酸エチル・メタンスルホン酸 (MS-222) (SIGMA) の水溶液 (1g/1) 中で麻酔後, 断頭し, 咽頭骨を含む頭部をその後の試料とした。実体顕微鏡観察には, 試料を 10%中性ホルマリンで浸漬固定した後, 試料から上・下咽頭骨を採取し, 実体顕微鏡で観察した。光学顕微鏡観察では, パラフィン包埋用として, 試料を 10%中性ホルマリンで浸漬固定し, その後, 5%EDTA で脱灰した。通法に従い, パラフィン包埋を行なった。得られた試料は前頭方向から, 厚さ $4\mu\text{m}$ の切片を作製し, HE, PAS, AZAN 染色を行った。樹脂包埋には試料を 4%パラホルムアルデヒド 0.1M リン酸溶液で浸漬固定後, 5%EDTA で脱灰し, 通法に従い, 樹脂 (LR-white) への置換後, 室温にて, 紫外線照射による光重合を行った。得られた試料は前頭方向から, 厚さ $1\mu\text{m}$ の切片を作製し, PAS, AZAN 染色を行った。得られた切片は光学顕微鏡で観察した。透過型電子顕微鏡観察では固定液として 2%パラホルムアルデヒド・1.25%グルタルアルデヒド・0.05M カコジル酸緩衝溶液で試料を浸漬固定後, 5%EDTA で脱灰し, 後固定とブロック染色を行い, 通法に従い LR-white に包埋した。その後前頭方向から厚さ 100 nm の超薄切片を作製し, 酢酸ウラン・クエン酸鉛による二重染色を行い, 透過型電子顕微鏡で観察した。

実体顕微鏡では上咽頭骨は涙滴形状を, 下咽頭骨は三角形状を示し, それぞれ左右一対として観察された。咽頭歯は咽頭骨表面に対して前頭方向に複数の歯列を形成して配列していた。

光学顕微鏡では, 上咽頭骨表面には, 多数の咽頭歯が観察され, 互いに平行に配列していた。脱灰されたエナメロイドを含む歯は, 歯足骨と連続していた。上咽頭歯と歯足骨の間を拡大して観察すると, HE 染色でヘマトキシリンに無染色の線状構造が明瞭に観察された。上咽頭歯・歯足骨界面はパラフィン切片と樹脂切片の両方で PAS 染色陰性を示し, 無染色の線状構造として観察された。AZAN 染色で上咽頭歯・歯足骨界面を観察するとアニリン青に弱く染色される膠原線維が観察された。歯足骨と咽頭骨の間の境界は認められなかった。下咽頭骨表面にも多数の咽頭歯が観察され, 互いに平行に配列していた。下咽頭歯・咽頭骨では, HE 染色, PAS 染色, AZAN 染色で, 上咽頭歯・歯足骨界面に認められたような線状構造は観察されず, 咽頭歯と咽頭骨の間には境界は認められなかった。骨接合線は上・下咽頭骨の基部の骨間に多数観察され, HE 染色や PAS 染色, AZAN 染色のいずれの染色にも無染色を示す, 複雑な外形を示す線状構造として観察された。

透過型電子顕微鏡では, 上咽頭歯・歯足骨界面は弱拡大像では歯と骨を構成する基質線維と区別することができる電子密度の低い構造として観察された。

強拡大で観察すると、横紋構造をもつ膠原線維が観察され、これら線維の幾つかは歯と骨を構成している基質線維と連続している像が観察された。咽頭骨には骨小腔は観察されず、骨は電子密度の一定な組織として観察された。このような骨中で、骨接合線は電子染色されない複雑な外形を示す明るい線状構造として観察された。強拡大で観察すると、骨接合線は幅が $0.2\mu\text{m}$ 前後の無構造領域として観察された。骨接合線が骨基質に面する部位には骨基質を構成する横紋構造をもつ膠原線維が露出した像が認められ、電子密度の高い構造は認められなかった。

光学顕微鏡によるパラフィン包埋切片の観察から、上咽頭歯・歯足骨界面は HE 染色と PAS 染色に染まらない線状の無構造領域として観察された。試料作成時の脱パラフィン過程時に PAS 陽性物質が流出する可能性は否定できない。このため、本研究では樹脂包埋試料を作成し、そこでも PAS 染色を行った。その結果、樹脂包埋切片においても上咽頭歯・歯足骨界面はパラフィン包埋切片と同様に PAS 陰性を示した。光学顕微鏡観察による結果は上咽頭歯・歯足骨界面には PAS 陽性物質は存在しないことを示している。AZAN 染色を行った光学顕微鏡観察から、上咽頭歯・歯足骨界面には膠原線維が観察され、透過型電子顕微鏡観察でもこの部分に膠原線維の存在が観察された。これらの結果は上咽頭歯・歯足骨界面には膠原線維が存在していることを示しており、メダカ上咽頭歯と歯足骨は線維を介在した線維性結合しているという過去の報告と一致している。本研究では脱灰標本を光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて観察していることから、以上の結果は上咽頭歯・歯足骨界面には PAS 陽性物質は存在せず、この部分は膠原線維で構成されことを示している。

上・下咽頭骨において見られた骨接合線は光学顕微鏡観察から HE 染色でヘマトキシリンに染まらず、パラフィン・樹脂包埋切片の PAS 染色においても PAS 陰性を示し、AZAN 染色では無染色の線状構造として観察された。透過型電子顕微鏡観察では骨接合線は膠原線維等が存在しない無構造の領域として観察された。脱灰標本から得られたこれらの結果から、骨接合線は膠原線維や PAS 陽性物質を含まない無機質から構成されていると考えられる。

以上の結果から、メダカの上咽頭歯・歯足骨界面と骨接合線は PAS 陽性物質を含まず、上咽頭歯・歯足骨界面は膠原線維から、骨接合線は無機質から構成されていることが示唆された。