修復象牙質の形成に関する微細構造学的 ならびに細胞化学的研究

相 場 剛

新潟大学歯学部歯科保存学第一教室 (主任: 岩久正明教授, 指導: 細田裕康教授*)

新潟大学歯学部口腔解剖学第一教室 (指導: 小沢英浩教授)

[受付: 昭和57年12月20日]

Ultrastructural and cytochemical studies on the formation of reparative dentin

Tsuyoshi Aiba

Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Niigata University

(Chief: Prof. Masaaki Iwaku)

(Director: Prof. Hiroyasu Hosoda*)

1st Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Niigata University

(Director: Prof. Hidehiro Ozawa)

5274, 2-Gakkochō, Niigata 951

[Accepted for publication: December 20, 1982]

Key words: rat molar/reparative dentin/ ^3H -proline/alkaline phosphatase/time record

Abstract: This study was performed to investigate the formation of reparative dentin experimentally produced in rat molars. Special attention was paid to the morphology and functions of the dentin-forming cells involved.

The cells in the pulp affected by cavity preparation were investigated both ultrastructurally and enzyme-cytochemically. The capacity of these cells to synthesize and secrete dentin matrix was also examined by ^3H -proline autoradiography. A lead-labeling technique (Okada and Mimura, 1938) was used to record the formation rate of the reparative dentin by injecting rats with EDTA-Pb.

The odontoblasts, the processes of which had been damaged by the experimental cavity preparation, degenerated soon afterwards. The formation of the reparative dentin began within 5 days after cavity preparation, and was most active from the 5th to the 15th day. On the 3rd day, multi-layers of spindle-shaped cells appeared in the pulp along the affected area of dentin. The cells became double or single-layered by day 7. Although the spindle-shaped cells on days 3 and 7 were different in shape from intact odontoblasts, they possessed well-developed Golgi apparatus, rough endoplasmic reticula and intense alkaline phosphatase activity along the cell membrane indicative of the presence of high matrix-forming activity in these cells. The patterns of ^3H -proline labeling indicated that these cells were responsible for the formation of reparative dentin. By the 18th day, the cells lining the newly formed reparative dentin had become typical, well differentiated odontoblasts. The metabolic turnover of proline in the differentiated odontoblasts was less on day 18 than on day 7. The patterns of lead-labeling and ^3H -proline autoradiograph and the ultrastructural features of the odontoblasts all indicated that additional dentin formation in the same area of control teeth was negligible throughout the experimental period.

It was concluded that the formation of reparative dentin was initiated by spindle-shaped odontoblast-like cells which possess high matrix-formation potential, induced by the stimulus of cavity preparation. While continuously secreting reparative dentin matrix, the odontoblast-like cells gradually developed into typical odontoblasts.

新潟市学校町通り2番町5274(〒951)

* 東京医科歯科大学歯学部第一歯科保存学教室 東京都文京区湯島1-5-45(〒113)

* present address: Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University 1-5-45, Yushima, Bunkyo-Ku, Tokyo, 113

緒 言

生活歯髄を有する歯牙硬組織において、咬耗、磨耗、う蝕などの生理的ないし病的原因ならびに、窩洞形成、支台歯形成などにより、象牙質に及ぶ実質欠損が生じた場合、欠損部に対応する歯髄内壁に二次象牙質が形成されることはよく知られている。

この二次象牙質に関する研究については、藤田¹⁾によるとHunterが1778年に「歯が咬耗すると歯髄腔に新しい歯質が発生してこれを補う」と記述したのが最初で、それ以来多くの研究が行われている。Baume, L. J. (1980)²⁾によると、19世紀末までの研究は主に研磨標本による二次象牙質そのものの観察が行われたが、組織学的手法が発達してからは、その形成機序についての記述がみられるようになり、Baume, R. (1875)は初めて象牙芽細胞の萎縮後にも二次象牙質が形成されつづけることを観察した。その後、二次象牙質の形成機序については、von Korff (1906)やStudnicka (1907), Kantrowicz (1910)が歯髄内の好銀性線維の関与を、von Ebner (1906)やHeinrich (1909)が象牙芽細胞のみの関与を主張し対立した。しかし、後のHeß (1948), Bermann & Masler (1958), Herald & Landino (1970)の研究では、前者の考えを支持する所見が得られている³⁾。

二次象牙質という名称やその分類については、Bödecker (1882)³⁾が規則的な構造を呈する象牙質を原生象牙質とし、刺激により形成された不規則な構造を呈する象牙質をはじめて二次象牙質として区別した。しかし、その後二次象牙質という名称の使い方は研究者により異なり、藤田 (1957)¹⁾は原生象牙質形成終了後にその歯髄側に形成された象牙質を全て二次象牙質と呼んでいるが、他の研究者は形成された原因、構造により分類しており、特別な原因がなく生理的条件下に形成されるものを *normales sekundäres Dentin* (Kantrowicz, 1910)⁴⁾, *physiological secondary dentin* (Benzer, 1948)⁵⁾, *late dentin* (Rushton, Cooke & Duckworth, 1970)⁶⁾,あるいは *regular secondary dentin* (Scott & Symons, 1971)⁷⁾と呼んでいる。

一方、本論文で論じている二次象牙質とは過度の磨耗、う蝕などの病的原因、または窩洞形成による歯牙の実質欠損に対応して形成される象牙質を指し、著者はOrbanの教科書⁸⁾に従い、特に修復象牙質 *reparative dentin* と呼ぶことにする。この種の二次象牙質は *anormales sekundäres Dentin* (Kantrowicz, 1910)⁴⁾, *adventitious dentin* (Hopewell-Smith, 1925)⁹⁾, *adventitious secondary dentin* (Benzer, 1948)⁵⁾, *tertiary dentin* (Kuttler, 1959¹⁰⁾; Stanley et al., 1966¹¹⁾), *irregular secondary dentin* (Scott & Symons, 1971)⁷⁾に相当するものである。

これら修復象牙質の構造や性質については前述のごとく、古くから組織学的に検索されており、さらに最近では組織化学¹²⁻¹⁴⁾、マイクロラジオグラフィー¹³⁻¹⁶⁾、X線マイクロアナライザーによる元素分析^{15,16)}、テトラサイクリンによる生体染色法^{13,15,17,18)}、電子顕微鏡による観察^{19,20)}などの方法を用いて研究され、その特徴として象牙細管の数の減少および走行、太さの不規則性と石灰化度の不均一性、ときに変性細胞の埋入がこれらの報告の中で挙げられている。

また、修復象牙質の形成機序や形成細胞、およびその由来については、実験病理学的検索^{13,15) 21-29)}や³H-サイミジンをういたオートラジオグラフィーによる検索³⁰⁻³³⁾の結果から、活動性を増した既存の象牙芽細胞が修復象牙質を形成するという説^{13,22,33,34)}と新生象牙芽細胞が形成するという説^{26-30,32-34)}があり、さらにその新生象牙芽細胞の由来についても諸説がある。

酵素化学的にも、Zach & Cohen (1963)³⁵⁾や平田 (1963)³⁶⁾は窩洞形成後あるいは覆髄後の歯髄におけるアルカリ性フォスファターゼなどの酵素活性について検索し、その存在意義について論じている。

しかし、これら修復象牙質の形成機序や形成細胞についての研究の多くは光学顕微鏡（以下光顕と略す）レベルの検索であり、電子顕微鏡（以下電顕と略す）レベルの報告^{33,34)}は少なく、したがって修復象牙質を形成する細胞の経時的形態変化についての細胞学的知見は乏しく、いまだ不明な点が多く残されている。ことに修復象牙質の形成

細胞の象牙質基質形成能についてはいまだ詳細な報告はみられない。

本研究は、修復象牙質の形成過程とその形成細胞の形態を明らかにするために、ラット臼歯に実験的に窩洞形成し、その結果作られる修復象牙質を形成する細胞について、その微細構造的な特徴、およびアルカリ性フォスファターゼ活性の局在ならびに³H-プロリンを用いたオートラジオグラフィと修復象牙質の鉛による時刻描記法により象牙質基質形成能を経時的に検索し、窩洞形成を行わない臼歯の象牙芽細胞と比較し、検討を行った。

材料と方法

材料には、150～200 g の雄ウイスター系ラット24匹を用いた。

1. 窩洞形成法

ラットに pentobarbital sodium (Nembutal, アボット社) を 25 mg/kg, また気道分泌抑制のため硫酸アトロピン (東洋製薬化成) を 160 mg/kg, それぞれ腹腔内投与し全身麻酔を施した。窩洞形成は Maurice & Schour (1955)³⁷⁾ の方法に準じ、左上顎第一臼歯に行い、これを実験歯とした。ラットを手術台に固定したあと実験歯の近心面歯肉直上部に、約 2,000-2,500rpm の電気エンジンに装着したダイヤモンドポイント (#15A, 松風社) とスチールバー (#699, マイジンガー社) を用い、注水しながら深さ約 0.4 mm, 直径約 0.6 mm の円形窩洞を形成した。窩洞は実験終了時まで開放、放置した。一方、右上顎第一臼歯は未処置のままとし、対照歯とした。

2. 硬組織時刻描記

岡田と三村(1937³⁸⁾, 1938^{39,40)} の鉛による硬組織内時刻描記法に準じて行った⁴¹⁾。窩洞形成直後、5日目、10日目、15日目の4回にわたりラットにそれぞれ 30 mg/kg の Pb-EDTA (同仁化学社) を腹腔内投与し、窩洞形成後20日目に断頭、屠殺した。直ちに取出した左右上顎臼歯列を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で緩衝した10%ホルマリン固定液中に1週間浸漬固定し、次いで硫化水素で飽和させた 0.2N 塩酸中にて脱灰した。脱灰終了後、試料をゼラチン包埋し、電子冷却式凍結ミクロトーム (MA-101 型, 小松エレクトロニクス

社) を用いて、厚さ約 20 μ m の凍結切片を作製した。切片は鍍金後、無染色のままグリセリンゼリーで封入、観察した。一部の切片は H-E あるいはトルイジンブルー染色を施し、同様に観察した。

3. 光顕ならびに電顕による観察

窩洞形成後1時間、3日目、7日目、18日目にそれぞれラットを全身麻酔下にて開胸後、左心室から上行大動脈にカニューレを挿入し、4 IU/ml のヘパリンナトリウム (ノボ社) を含む生食水で短時間灌流後、0.1% ショ糖と 0.5% デキストランを含む 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で緩衝した 2.5% グルタルアルデヒド 固定液で灌流固定した。その後、直ちに左右上顎臼歯列を取り出し、同じ固定液中に 4°C 下で一晩浸漬固定し、次いで 4.13% EDTA (pH 7.3) 中にて 4°C 下で脱灰した。脱灰を終えた試料は 0.15 M リン酸緩衝液中で一晩洗浄したのち、窩洞全体を含む臼歯冠近心部を約 1.5 mm 角の小片に細切し、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で緩衝した 1% オスミウム酸固定液中で1時間30分後固定を行った。試料はアセトン系列で脱水後、Epon 812 に包埋した。光顕用には Porter-Blum MT-2B Ultramicrotome を用いて厚さ約 1 μ m の切片を作製し、0.5% トルイジンブルーで染色したのち検鏡した。電顕用には Porter-Blum MT-2B Ultramicrotome を用いて超薄切片を作製し、酢酸ウランと鉛の二重染色を施し、日立 HU-11D-S 型透過型電子顕微鏡により加速電圧 75kV で観察した。

4. アルカリ性フォスファターゼ活性局在の観察

窩洞形成後3日目、7日目、18日目にそれぞれラットを全身麻酔下にて開胸し、左心室より上行大動脈にカニューレを挿入し、生食水で短時間灌流後、0.05% 塩化カルシウムを含む 0.075M カコジル酸緩衝液 (pH 7.3) で緩衝した 2.5% グルタルアルデヒド 固定液で灌流固定した。その後、直ちに左右上顎臼歯列を取り出し、同じ固定液中に 4°C 下で4時間浸漬固定し、次いで 4% ショ糖を含む 4.13% GEDTA 中にて 4°C 下で脱灰した。脱灰の終了した試料は、4% ショ糖を含む 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.3) (以下 C-S buffer と略す) 中で一晩洗浄したのち、Vibratome (Oxford

Fig. 1 Light micrographs of the first upper molars of a rat 20 days after cavity preparation. After cavity preparation the rat was injected with EDTA-Pb 4 times at intervals of 5 days. Mesio-distal sections. The left side of each figure is the mesial end of the tooth crown. Unstained. $\times 45$

- a. Control tooth : Note that only one dark line of lead deposits is recorded in the mesial cusp area of the primary dentin.
- b. Experimental tooth : Reparative dentin (arrow) is formed along the part of the primary dentin where the dentinal tubules are open to the cavity (C). Four dark lines of lead deposits are discernible in the reparative dentin.

社)を用いて厚さ約 $50\mu\text{m}$ の切片を作製し、再び C-S buffer で数回洗浄した。これらの切片はアルカリ性フォスファターゼ活性の検出のため、Mayahara et al. (1967)⁴²⁾の方法に従い、基質として β -グリセロリン酸ナトリウム(和光純薬社)を用いて 22°C で15分間 incubation を行った。incubation 終了後、C-S buffer で数回洗浄し、1.5% フェロシアン化カリウムを含む0.075M カコジル酸緩衝液(pH 7.3)で緩衝した1% オスミウム酸固定液中で1時間後固定を行った。試料はアセトン系列で脱水後、Epon 812 に包埋し、電顕用に Porter-Blum MT-2B Ultramicrotome で超薄切片を作製、無染色のまま日立 HU-11D-S型透過型電子顕微鏡により加速電圧75kV で観察した。

5. ^3H -プロリンを用いたオートラジオグラフィによる観察

窩洞形成後3日目、7日目、18日目にそれぞれラットに全身麻酔下にて L-[2,3- ^3H]-Proline (N EN 社) $30\mu\text{Ci/g}$ を頸静脈内投与し、その30分後、4時間後にそれぞれ光顕と電顕による観察と同じ方法で灌流固定、脱灰、包埋し、試料を作製した。

オートラジオグラム作製のため、Porter-Blum MT-2B Ultramicrotome を用いて厚さ約 $1\mu\text{m}$ の光顕用切片を作製し、あらかじめきれいに洗浄し、薄くゼラチンを塗布したスライドガラスに張りつけた。次いで感光乳剤(サクラ NR-M₂, 1.8倍希釈)中に dipping し、 4°C の乾燥暗所で3~4週間露出したのち、現像(コニードール X, 20°C , 6分)、定着(12% ハイポ水溶液, 20°C , 5分)し、0.5% トルイジンブルーにて染色、観察した。

結 果

1. 硬組織時刻描記の所見

1. 対照群 (Fig. 1-a)

対照歯の歯冠象牙質に認められたラベリング線の特徴は部位により異なり、次の3部に分けられた。天蓋、髄床底、および近遠心側の中央部から歯根にかけての象牙質には、滑らかな走行を示す、太さおよび染色性のほぼ一定した4本のラベリング線が明瞭に認められ、その間隔は天蓋では約 $25\mu\text{m}$ 、髄床底では約 $10\mu\text{m}$ 、歯根では約 $20\mu\text{m}$ でほぼ一定していた。また髄角部においては、うねりのある走行を示す、太さおよび染色性ともに

Fig. 2 Light micrographs of the dentin-pulp interface at the mesial cusp area of the control tooth (a) and of the affected areas of the teeth after experimental cavity preparation (b-d). Toluidine blue stain. $\times 490$ PD, predentin

- a. Light micrograph of the primary dentin (D) and intact odontoblasts at the mesial cusp area of the control tooth.
- b. 3rd day : Typical odontoblasts are lost and large spindle-shaped cells with prominent nucleoli and well-developed Golgi areas are observed along the pre formed dentin, separated by the amorphous matrix layer (*).
- c. 7th day : The spindle-shaped cells are smaller in size than on day 3. They are aligned in double or single layers along the irregularly formed reparative dentin (RD). No typical dentinal tubule is seen in the thick reparative dentin.
- d. 18th day : Columnar cells with long cytoplasmic processes extending into the reparative dentin (arrows) are seen.

不規則なラベリング線が一部重なり合って認められ、したがってその間隔も一定していなかった。一方、近遠心側の中央部から髄角に至るまでの象牙質ではラベリング線は全て重なり合い、1本の太い線として認められ、その走行はほぼ直線を示し染色のつよさも一定していた。

2. 実験群 (Fig. 1-b)

実験歯の歯冠象牙質に認められたラベリング線の特徴は、天蓋、髄床底、髄角および遠心側象牙質では対照歯と同様であったが、近心側象牙質には窩洞に対応して修復象牙質が観察された。その中には4本のラベリング線が明瞭に認められ、そ

れぞれ髄角および歯根からのラベリング線と連続していた。修復象牙質中のラベリング線については、窩洞形成直後のものはほぼ直線的な走行を示し、やや太く染色性もつよかった。窩洞形成後5日目のものは大きく波状にうねった走行を示し、その太さは不規則でところどころに島状にふくらんだ部位や凸部がみられ、染色性は他のラベリング線に比べかなりつよかった。窩洞形成後10日目のものはややうねりのある走行を示し、太さは窩洞形成後5日目のものよりは一定していたが島状のふくらみは依然として認められた。染色性は全体的にかなり弱く、ラベリング線の一部には著し

く不明瞭なところも認められた。窩洞形成後15日目のものは比較的滑らかな走行を示し、太さもほぼ一定しており、染色性は全体的に弱いが一部に強い部分も認められた。これら修復象牙質中のラベリング線の間隔は、中央部で測ると、0~5日では約20 μ m、5~10日では約50 μ m、10~15日では約30 μ m、15~20日では約30 μ mであったが、それぞれ髄角に近い側では間隔は狭くなっており、一方、歯根側では中央部とあまり変わらない間隔を保っていた。

II. 光顕ならびに電顕による所見

1. 光顕所見

1) 対照群 (Fig. 2-a)

近心側歯冠象牙質直下の象牙芽細胞層には、紡錘形ないし円柱形を呈する象牙芽細胞が象牙前質に対してその長軸をやや歯頂側に傾けて2~3層に配列しており、丈が高く細胞質の豊富な象牙芽細胞と丈が低く細胞質のやや乏しい象牙芽細胞とが混在していた。象牙芽細胞は互いに密に接していたが、ところどころに毛細血管が介在していた。象牙芽細胞の細胞質近心側には、異染色質に富む長楕円形の核が偏在していたが、核小体の発達はみられなかった。遠心側では細長い細胞質突起を象牙細管内に送っていた。しかし、丈の低い象牙芽細胞の一部には核が遠心側に偏在しているものも観察された。

象牙芽細胞下層では、不定形の核をもち細胞質に乏しい扁平な細胞が象牙前質とほぼ平行に2~3層観察された。

2) 窩洞形成後3日目 (Fig. 2-b)

窩洞直下の石灰化前線は全体として不規則で、原生象牙質から続く象牙細管は象牙前質に入ると認められなくなり、また不均一な幅の象牙前質中には埋め込まれた細胞や無定形の細胞遺残物がところどころに観察された。窩洞直下の象牙芽細胞層には対照群で観察されたような既存の象牙芽細胞は観察されず、象牙芽細胞層から数層にわたり細胞質の豊富な大型の紡錘形の細胞が密集していた。これらの細胞の核は明るく大型で円形ないし卵円形を呈し、正染色質に富み顕著な核小体を有しており、近心側に偏在する傾向を示していた。

紡錘形細胞群直下の象牙芽細胞下層に相当する

部位では、核小体の発達した明るい類円形の核をもつ長楕円形ないし扁平な細胞がその長軸を紡錘形細胞群に向けて並んでいるのが観察され、それらの間には毛細血管が介在していたが、象牙芽細胞層への血管の進入は認められなかった。

3) 窩洞形成後7日目 (Fig. 2-c)

窩洞直下には不均一にトルイジンブルーで淡く染まる修復象牙質が形成されており、その象牙細管はほとんど認められず、中には無定形の変性細胞の遺残を埋め込んでいる像も観察された。石灰化前線は極めて不明瞭で凹凸が多く不規則であった。

このような特徴をもった修復象牙質下には細胞質の豊富な紡錘形ないし円柱形の細胞が不均一な幅の象牙前質を介して垂直あるいは斜めに1~2層に配列しており、細胞の大きさは3日目の細胞に比べ減少していた。これらの細胞の核は円形ないし卵円形を呈し近心側に偏在しており、やや異染色質に富み核小体の発達は3日目にみられた細胞より顕著ではなかった。細胞質中央部から核上部には広い範囲で染色性の淡いゴルジ野が認められたが、遠心側に明瞭な細胞質突起の形成は認められなかった。

これら紡錘形ないし円柱形細胞の下層には、細胞質に乏しく、核小体のやや発達した明るい長楕円形の核を持つ不定形の細胞が集まって観察された。毛細血管はこれらの細胞間に介在していたが、象牙芽細胞層への進入は認められなかった。

4) 窩洞形成後18日目 (Fig. 2-d)

窩洞直下には厚い修復象牙質が形成されており、初期に形成されたものは染色性が不均一で細管の数も少なく、走向も不規則であったが、後で形成されたものは染色性は比較的均一で細管の走向も規則的で数も多く、原生象牙質に近い構造を呈しており、石灰化前線の凹凸は少なかった。この傾向は歯根に近い側の修復象牙質では特に強く、形成された量も髄角側に比べ多かった。

修復象牙質下に並ぶ細胞は象牙芽細胞の形態を呈していたが、歯根側と髄角側では多少形態学的特徴が異なっていた。歯根側では均一な幅の象牙前質を介して、丈の比較的高い細胞質の豊富な円柱形の象牙芽細胞がほぼ垂直に1~2層に密に配

Fig. 3 Control

Electron micrograph of intact odontoblasts along the primary dentin. The Golgi apparatus (Go) and a large number of mitochondria are located at the supranuclear region. The odontoblastic processes (OP) extending into the primary dentin are rich in microtubules but contain few cell organelles. N, nucleus BC, blood capillary

列しており，細胞質近心側には卵円形の異染色質の多い核が偏在し，遠心側には象牙細管内に伸びる細胞質突起が形成されていた。一方，髄角側では幅狭い象牙前質下に丈の高さがさまざまな紡錘形の象牙芽細胞がかなり傾斜して2～3層に配列しており，細胞近心側には異染色質の多い長楕円形の核が偏在し，遠心側にはやはり象牙細管内に

伸びる細胞質突起を有していたが，その数は歯根側に比べると少なかった。これらの象牙芽細胞の間には対照群と同様に毛細血管が介在しているのが観察された。

象牙芽細胞下層の細胞は対照群で観察された細胞とほぼ同様に，楕円形の核を持ち細胞質に乏しく扁平な形を呈するものが多いが，中には類円形

Fig. 4 Control

Electron micrograph of the Golgi area of the odontoblast. Although the Golgi cisterns (GC) are well-developed, only a few Golgi vacuoles (GV) and secretory granules (SG) are seen. There are scattered ill-developed rough endoplasmic reticula (RER).

N, nucleus Mt, mitochondria

や多角形を呈する細胞も観察された。

2. 電顕所見

1) 対照群 (Fig. 3, 4)

象牙芽細胞は紡錘形ないし円柱形を呈し、細胞間隙がほとんど認められないほど密にかつ平行に配列していた。核は長楕円形を呈し、多くは近心側に偏在しており、核膜内葉および核質全体に異染色質が散在性に分布していた。核上部にはゴルジ野が認められ、その周囲と細胞質遠心部には未発達な粗面小胞体が散見された。ミトコンドリアもまたゴルジ野周辺から細胞質遠心部にかけて観察され、その外形は楕円ないし長桿状を呈し、多くは細胞長軸方向にそって配列していた。細胞質遠心部から細胞質突起にかけては、わずかなミトコンドリアと小胞様構造物、長軸方向に走向する微細小管と微細線維以外には細胞内小器官は観察されなかった (Fig. 3)。

ゴルジ野では、Fig. 4に示す如く、3～4層のゴルジ槽板、数少ないゴルジ小胞が観察され、ゴ

ルジ空胞は未発達であった。またこの周辺部には分泌顆粒様構造物やときに電子密度中等度で均一な内容物を含む水解小体様構造物が観察された。

2) 窩洞形成後1時間目 (Fig. 5, 6)

光顕所見では Fig. 5-a に示す如く、象牙質、象牙前質ともに対照群とほぼ同様で石灰化前線も凹凸なく滑らかであった。象牙芽細胞層では細胞質に乏しい紡錘形の象牙芽細胞が1～2層に配列していたが、その核は不規則な外形を呈し染色質の濃縮した様相を呈していた。ときにこれら変性像を呈する象牙芽細胞の間には丸く明るい核を有し、細胞質の染色性の淡い細胞が介在していた。象牙芽細胞下層では、細胞質に乏しい扁平な細胞が象牙前質と平行に配列しており、対照群と比べ変化は認められなかった。

電顕所見では、窩洞直下の象牙芽細胞の核は不規則な凹凸のある長楕円形ないし類円形を呈し、異染色質に富みそれらは核質のところどころに島状に集積、あるいは核膜内葉にそって凝集してお

Fig. 5 1 hr after cavity preparation :

- a. Light micrograph of the dentin-pulp interface in the affected area. The odontoblasts appear as pyknotic cells. Some clear cells are seen between these odontoblasts (arrowheads). Tolu-idine blue stain. $\times 600$
- b. Electron micrograph of the odontoblasts (Od) in same area as in Fig. 5-a. The odontoblasts show the pyknotic nuclei (N). The electron density of the cytoplasm is rather increased. A large amount of cell debris is scattered in the intercellular spaces of the odontoblasts and also in the dentinal tubules (arrowheads).

OP, odontoblastic process AP, autophagosome

り、核濃縮の様相を呈していた。核濃縮を呈する象牙芽細胞の細胞質では細胞内小器官の萎縮は観察されず、対照群と同様な像を呈していたが、中には自家食胞を持つ象牙芽細胞も認められた (Fig. 5-b)。これら象牙芽細胞の間には単位膜で囲まれた空胞状構造物の大きな集塊が認められ、同様の空胞状構造物は象牙芽細胞と象牙前質の間や細胞質突起と象牙細管壁の間隙にまで達しているのが観察された。この中にはミトコンドリア様の明らかに細胞内小器官由来と思われる空胞状構造物も認められた (Fig. 6-a, b)。

3) 窩洞形成後3日目 (Fig. 7, 8, 9)

窩洞直下の紡錘形細胞は正染色質が均一に分布する大型の円形ないし卵円形の核を有し、核小体

は顕著であった。細胞質は遊離のリボゾームに富み、粗面小胞体とゴルジ体を主とする細胞内小器官が良く発達していた。粗面小胞体は長い槽状あるいは小胞状を呈し、細胞質全体にわたりほぼ細胞長軸方向にそって配列しており、その内腔には電子密度中等度の均一な内容物を含み、中には拡張した粗面小胞体も認められた。核近傍から細胞質中央部には多くのゴルジ空胞が認められる広いゴルジ野が観察された。ミトコンドリアは長桿状ないし楕円形を呈しており、クリステの発達は良く、細胞質全体にほぼ均一に分布していた (Fig. 7)。

ゴルジ野ではゴルジ槽板はあまり発達していないが、槽板に連続する多数のゴルジ空胞が認めら

Fig. 6 1 hr after cavity preparation :
 Cell debris in the extracellular space between the predentin matrix and the odontoblasts (a)
 and in the dentinal tubule (b).
 PD, predentin Ob, odontoblast OP, odontoblastic process

Fig. 7 3rd day after cavity preparation :
 Electron micrograph of a spindle-shaped cell in the affected area. The cell contains a well-developed Golgi apparatus (Go) and rough endoplasmic reticula (RER). The nucleus (N) contains a characteristically prominent nucleolus (arrowhead). Compare with figure 2-b.

Fig. 8 3rd day after cavity preparation :

The supranuclear region of the spindle-shaped cell. Flocculent material is seen in many of Golgi vacuoles (GV). Some of the Golgi vacuoles contain filamentous material (arrow). Some of the rough endoplasmic reticula are dilated (arrowheads) and contain material of moderate electron density.

N, nucleus Mt, mitochondria MVB, multi-vesicular body

Fig. 9 3rd day after cavity preparation :

Electron micrograph of the cell and cell debris embedded in the predentin (PD).

- a. Various vesicles and tubular structures are scattered around the embedded cell fragment.
- b. The embedded cell showing signs of slight degeneration.

N, nucleus

Fig. 10 7th day after cavity preparation :

Electron micrograph of the spindle-shaped cells lying along the reparative dentin. Here two types of spindle-shaped cells are distinguished. One (lower right) has a well-developed Golgi apparatus (Go) and rough endoplasmic reticula (RER) at the distal side of the nucleus (N) and is of moderate electron density (dark spindle-shaped cell). Portions of the rough endoplasmic reticulum are distended and contain amorphous material (arrowheads). The other type of cell (upper left) contains very few rough endoplasmic reticula and has relatively electron-lucent cytoplasm (light spindle-shaped cell). The Golgi apparatus is located proximally to the nucleus in some of this type of cell. Compare with figure 2-c.

Co, collagen fibrils

れ、その中には電子密度の低い羊毛状の内容物を含むものや、一定方向に走る微細線維状構造物を含むものが観察された。ゴルジ野とその周辺部には電子密度中等度の内容物を含む多数のゴルジ小胞と coated vesicle 様の小胞が観察され、電子密度の高い内容物を含む水解小体様構造物、内に数個の小胞を含む多胞体も認められた (Fig. 8)。

象牙前質付近では微細小管と微細線維のみを残し細胞質基質が消失した変性細胞、その近くには膜で囲まれた大小の小胞様構造物が散在していた (Fig. 9-a)。また象牙前質中に埋め込まれている細胞も認められ、そのような細胞は長楕円形の核を有し細胞質の電子密度は高く、一部の細胞質基質は消失しており、ミトコンドリア、水解小体様構造物、微細小管、微細線維以外には細胞内小器官は認められなかった (Fig. 9-b)。

4) 窩洞形成後7日目 (Fig. 10, 11, 12, 13, 14)

修復象牙質下には、電子密度中等度の細胞質を持つ紡錘形ないし円柱形の細胞とその間に数は少ないが電子密度の低い細胞質を持つ紡錘形細胞の2種類の細胞が混在して観察された (Fig. 10)。

電子密度の低い明調な細胞質を有する紡錘形の細胞は正染色質に富む楕円形の核を有し、細胞質は微細小管、微細線維の占める割合が多く、細胞内小器官は未発達であった。ゴルジ野は核の近心側に偏在する傾向がみられ、ゴルジ槽板は発達しているが、ゴルジ空胞は少なく、また粗面小胞体もきわめて散在して観察された。

一方、電子密度中等度の細胞質を持つ紡錘形ないし円柱形細胞は核膜の一部に凹凸を持つ円形ないし卵円形の核を有しており、核膜外葉には多数のリボゾームが付着し、ときにその一部が電子密

Fig. 11 7th day after cavity preparation :
The Golgi area of the dark spindle-shaped cell. Many Golgi vacuoles (GV) contain flocculent material. The cisterns of the well-developed rough endoplasmic reticulum (RER) are arranged in parallel.
Mt, mitochondria N, nucleus arrowhead, lysosomal body

度中等度の均一な内容物を含み拡張している像が観察された。核質中には正染色質が多く，それらは核膜内葉にそった部位や核質内各所に集積しており，核小体はさほど顕著に発達していなかった。核上部から細胞質中央部にかけては広くゴルジ野が発達し，その周辺部，核近傍および細胞質遠心部には細胞長軸方向にそって整然と配列する発達した粗面小胞体が観察された。粗面小胞体はその内腔に中等度の電子密度を持つ内容物を含

み，大きく拡張しているものも認められた。ミトコンドリアは球状，楕円状，長桿状を呈し，核およびゴルジ野の周辺や細胞質遠心部に観察され，クリステは発達していた。細胞質遠心端には明瞭な突起は形成されていないが，細胞の幅は狭くなっており，ここには長軸方向に走る微細小管と微細線維，わずかな小胞様構造物以外には細胞内小器官は認められず，いわゆる clear distal area を形成していた。

Fig. 12 7th day after cavity preparation :
Higher magnification of the Golgi vacuoles in the dark spindle-shaped cell. Some of the vacuoles contain filamentous material in parallel formation (single arrowheads) while another contains a mat of entangled filamentous material (double arrowhead).

Fig. 13 7th day after cavity preparation :
Electron micrograph of the dark spindle-shaped cell (DSC) and the neighboring pulp cells. A cell with a large nucleus (N) and ill-developed cell organelles is located between the spindle-shaped cell and the cells in the subodontoblastic layer (SO).
Go, Golgi apparatus BC, blood capillary
Arrow points towards the dentin side.

Fig. 14 7th day after cavity preparation :
Matrix vesicles in the predentinal matrix of the reparative dentin.
a. A large number of matrix vesicles of various sizes and electron densities are located along the collagen fibrils (CO).
b. Higher magnification of the matrix vesicles. Distinctive limiting membranes of the vesicles are seen.

細胞間隙には，規則正しい横縞を示すコラーゲン細線維束が細胞長軸方向にそって密に配列していた。

細胞質の電子密度の高い紡錘形細胞のゴルジ野では，Fig. 11に示すごとく，ゴルジ槽板の発達は良くないが，多数のゴルジ空胞が観察され，その中には電子密度の低い，一定方向に走る微細線維状構造物が認められる内容物を含んでいた (Fig. 12)。ゴルジ野とその周辺部では多数のゴルジ小胞と coated vesicle 様構造物も認められ，さらに水解小体様構造物や多胞体も散見された。

また，これら紡錘形細胞とその下層の扁平な形をした細胞群との間には，核が比較的大きく細胞質に乏しい未分化な不定形の細胞が介在していた (Fig. 13)。

象牙前質では，紡錘形細胞の遠心端や石灰化前線の近くに，電子密度のさまざまな無定形の内容物を含む，単位膜に囲まれた直径約 20～180 nm の大小の基質小胞様の構造物がコラーゲン細線維

にそって並んでいるのが散見された (Fig. 14)。

5) 窩洞形成後18日目 (Fig. 15, 16, 17)

修復象牙質下に並ぶ象牙芽細胞は対照群と同様に紡錘形ないし円柱形を呈し，丈が高く比較的細胞質の豊富なものから丈が低く細胞質に乏しいものまで混在しており，修復象牙質に対しやや傾斜して密に2～3層配列していた。歯根側の修復象牙質下の象牙芽細胞と髄角側の修復象牙質下の象牙芽細胞とを比べると前者の方が丈が高く細胞質を豊富に有しており粗面小胞体やゴルジ体などの細胞内小器官も発達していた。

この時期の象牙芽細胞の核は長楕円形または卵円形を呈して近心側に偏在しており，核膜内葉や核質各所に染色質の集積が観察されたが，核小体は発達していなかった。核上部にはやや発達したゴルジ野が観察され，核近傍，ゴルジ野周辺，細胞質中央部には中等度に発達した粗面小胞体が細胞長軸方向に伸びた槽状を呈して2～3列に配列しているのが観察された。その内腔には電子密度

Fig. 15 18th day after cavity preparation :
Electron micrograph of the columnar cells associated with the reparative dentin. The nucleus (N) is located almost at the proximal end of the elongated cell body which contains a well-developed Golgi apparatus (Go) and rough endoplasmic reticula. The thick cytoplasmic process of columnar cell extends into the predentinal matrix (PD) of the reparative dentin (RD).
Compare with figure 2-d.

中等度の内容物が含まれていたが、拡張した粗面小胞体は認められなかった。ミトコンドリアは楕円、長桿状を呈し、クリステの発達は良く、ゴルジ野周辺と細胞質中央部、ときに遠心部に認められた。細胞質遠心部ではミトコンドリア以外に細胞内小器官はほとんど認められず、それより遠心側では象牙細管内へ伸びる細胞質突起を形成して

いた。また象牙前質中にはコラーゲン細線維が縦横に走り、変性した細胞や細胞遺残物、小胞様構造物は観察されなかった (Fig. 15)。

ゴルジ野には、3～4層のゴルジ槽板、多数のゴルジ小胞が認められたが、ゴルジ空胞は少なく、その内部には電子密度の低い羊毛状の内容物を含んでいた。中には、電子密度の高い顆粒を1～4

Fig. 16 18th day after cavity preparation :
The Golgi area of the columnar cell. In contrast to the relatively well-developed Golgi cisterns, very few Golgi vacuoles (GV) containing filamentous material are seen. Secretory granules and vesicles containing from one to five electron dense granules (arrowheads) are seen in the middle of the Golgi apparatus.

N, nucleus RER, rough endoplasmic reticulum Mt, mitochondria

個含む小胞や分泌顆粒様構造物を有する象牙芽細胞も観察された (Fig. 16)。

細胞質突起中には，長軸方向に走る微細小管と微細線維が豊富に認められ，長軸方向にそって配列した滑面小胞体，さまざまな電子密度の高い顆粒を含む小胞状ないし桿状の分泌顆粒様構造物が観察された (Fig. 17)。

Ⅲ. アルカリ性フォスファターゼ活性局在の

所見

1) 対照群 (Fig. 18-a)

アルカリ性フォスファターゼ活性の局在を示す鉛の沈着は，象牙芽細胞では近心側の細胞膜にそってわずかに認められたのみで，象牙前質や象牙芽細胞間基質にはほとんど認められなかった。

2) 窩洞形成後3日目 (Fig. 18-b)

鉛の沈着は窩洞直下に密集する紡錘形細胞の細

Fig. 17 18th day after cavity preparation :

Higher magnification of the cytoplasmic process of the columnar cell extending into the pre-dentinal matrix of reparative dentin. Secretory granules (SG) and smooth endoplasmic reticulum (SER) are observed between the microtubules (MT) and the microfilaments (MF) running along the long axis of the process. PD, pre-dentin

胞膜にそって認められ、象牙前質に近接する細胞では反応は弱く、象牙芽細胞下層に近づくにしたがい反応は強くなる傾向が認められた。細胞質中では鉛の沈着はゴルジ槽板やゴルジ空胞にわずかに認められた。象牙前質中では鉛の沈着は拡散して認められ、紡錘形細胞間に散在するコラーゲン細線維束にも反応が認められた。

3) 窩洞形成後7日目 (Fig. 18-c)

鉛の沈着は修復象牙質下の紡錘形ないし円柱形細胞の細胞膜にそって認められたが、遠心の細胞膜では反応は弱く、細胞質中ではゴルジ小胞にわずかな反応が認められ、ゴルジ野近傍には鉛の沈着を多く含む電子密顆粒が散見された。象牙前質では鉛の沈着は、コラーゲン細線維とは無関係に拡散して認められ、細胞間を細胞長軸方向に走向するコラーゲン細線維束にも反応が強く認められた。

4) 窩洞形成後18日目 (Fig. 18-d)

修復象牙質下の象牙芽細胞では鉛の沈着は遠心

側以外の全ての細胞膜に弱く認められたのみで、象牙前質や細胞間基質にはほとんど認められなかった。象牙芽細胞間のコラーゲン細線維上には反応がわずかに認められた。

一方、象牙芽細胞下層では対照群、実験群を通じて、主にここに存在する細胞の細胞膜にそって鉛の沈着が認められ、窩洞形成後3日目、7日目では対照群と比べ、反応は強く認められた。

Ⅳ. ^3H -プロリンを用いたオートラジオグラムの所見

^3H -プロリンの局在を示す銀粒子の分布は、対照歯と実験歯とでは窩洞直下に当る近心側歯髄を除いてはほぼ同様であった。なお、組織切片以外の部分や組織切片上の樹脂だけの部分に認められた銀粒子はほとんど皆無で、バックグラウンドとして無視できる程度であった。

a) ^3H -プロリン投与後30分

髓角、天蓋、髓床底部では銀粒子は象牙芽細胞の細胞質中央、ゴルジ野付近に多く局在し、一部

は象牙前質に散在して認められたが，象牙芽細胞下層や歯髄深層の細胞中にはわずかしこ認められず，細胞間基質と原生象牙質中にはほとんど認められなかった。

b) ^3H -プロリン投与後 4 時間

天蓋，髄角，髄床底の象牙芽細胞中の銀粒子は減少し，かわりに象牙前質中の銀粒子が増加した。それらは天蓋部では広く帯状に，髄角および髄床底では象牙芽細胞に近接して狭く帯状に認められた。象牙芽細胞下層や歯髄深層の細胞，および細胞間基質には銀粒子はわずかしこ認められなかったが，その数は30分例より増加していた。また原生象牙質中には銀粒子はほとんど認められな

かった。

1) 対照群

a) ^3H -プロリン投与後30分 (Fig. 19-a)

近心側歯冠象牙質直下の象牙芽細胞およびその下層の細胞には前述の天蓋，髄角，髄床底に比べ銀粒子の数ははるかに少なく，その分布も散在性であったが，多くは象牙芽細胞の細胞質および突起中に存在し，ときに核にも認められた。また象牙芽細胞下層の細胞や象牙前質中には銀粒子はわずかしこ認められなかった。

b) ^3H -プロリン投与後 4 時間 (Fig. 19-b)

30分例と比べ銀粒子の数はわずかに増加しているものの，その分布はほぼ同様で主に象牙芽細胞

Fig. 18 Electron micrographs showing the location of alkaline phosphatase (ALPase) activity in the odontoblasts and the cells in the area of the tooth affected by the experimental cavity preparation.

N, nucleus Go, Golgi apparatus PD, predentin

- a. Control: The ALPase reaction products (lead deposits) are moderate in the cells in the subodontoblastic layer, but very sparse in the odontoblasts.
- b. 3rd day after cavity preparation: In the spindle-shaped cell, the ALPase reactions are intense along the cell membrane (arrowheads) and moderate in some of vesicles at the Golgi apparatus (arrows).
- c. 7th day after cavity preparation: In the spindle-shaped cell, the ALPase reactions are moderate at the cell membrane (arrowheads) but intense in the large vacuoles near the Golgi apparatus (arrows).
- d. 18th day after cavity preparation: In the columnar cell, ALPase activity along the cell membrane (arrowhead) and in the Golgi apparatus is much weaker than that on day 3 and day 7.

Fig. 19 ^3H -proline autoradiographs (Control):

A small number of silver grains are scattered on the odontoblastic layer 30 min (a) and 4 hr (b) after injection. D, primary dentin PD, predentin

Toluidine blue stain. $\times 1,200$

の細胞質、突起および象牙前質中に散在しており、天蓋、髓角、髓床底のような象牙前質中の帯状の銀粒子の広がりとは認められなかった。また象牙芽細胞下層の細胞では少数の銀粒子が認められた。

2) 窩洞形成後3日目

a) ^3H -プロリン投与後30分 (Fig. 20-a)

銀粒子は窩洞直下の紡錘形細胞群全体にわたり数多く認められ、とくに象牙前質に近接した細胞により多く局在する傾向が認められた。また銀粒子の数は隣接する正常な原生象牙質の象牙芽細胞よりもはるかに多く認められた。銀粒子の局在については細胞質中央部や核上部付近に集中している細胞もあったが、細胞質全体に拡散して認められる細胞が多く、核にも銀粒子はわずかに認められた。象牙前質中にもかなりの数の銀粒子が分布するのが認められたが、その中に埋め込まれた細胞中にはほとんど認められなかった。また一部の原生象牙質の象牙細管では象牙前質に近接した部分に少数の銀粒子が認められた。これら紡錘形細胞群の下層の細胞にも少数の銀粒子が認められ

た。

b) ^3H -プロリン投与後4時間 (Fig. 20-b)

紡錘形細胞の細胞質中に多数認められた銀粒子は著しく減少し、その下層の細胞と同様散在して認められるだけとなったが、これらの細胞に近接した象牙前質中には幅の狭い帯状の広がりとして多数の銀粒子が認められ、その数は隣接の正常な原生象牙質の象牙前質中よりも多かった。また一部の原生象牙質の象牙細管では、象牙前質に近接した部分に少数の銀粒子が認められた。

3) 窩洞形成後7日目

a) ^3H -プロリン投与後30分 (Fig. 21-a)

銀粒子は主に修復象牙質下に並ぶ紡錘形ないし円柱形細胞の細胞質中に多数認められ、とくに核上部のゴルジ野付近に集中しており、核質内や核膜上にもわずかに存在していた。また銀粒子の数は隣接する正常な原生象牙質下の象牙芽細胞中でみられるよりも多く認められた。象牙前質中にも少数の銀粒子が散在して認められたが、紡錘形ないし円柱形細胞の下層の細胞にはわずかしこ認め

Fig. 20 ^3H -proline autoradiographs (3rd day after cavity preparation):

Most of the silver grains are concentrated on the cytoplasm of the spindle-shaped cells at 30 min (a) and on the predentin (PD) at 4 hr (b) after injection. D, primary dentin
Toluidine blue stain. $\times 1,200$

られなかった。

b) ^3H -プロリン投与後 4 時間 (Fig. 21-b)

紡錘形ないし円柱形細胞の細胞質中の銀粒子は減少し，その下層の細胞と同様に散在して認められるだけとなったが，修復象牙質の幅広い象牙前質中には多数の銀粒子が広く帯状に認められ，その数は隣接する正常の原生象牙質の象牙前質中の数よりも多かった。

4) 窩洞形成後 18 日目

a) ^3H -プロリン投与後 30 分 (Fig. 22-a)

銀粒子は主に象牙芽細胞の細胞質中に認められ，その分布は象牙芽細胞の局在によりやや異なっていた。すなわち髄角に近い修復象牙質下の象牙芽細胞では銀粒子はその細胞質中に散在して認められ，一方，歯根に近い側の象牙芽細胞では核上部のゴルジ野付近に多くの銀粒子が集中しているのが観察された。銀粒子の数は 7 日目の細胞に比べると減少しており，隣接する正常な原生象牙質下の象牙芽細胞と比べてもわずかに多いか，ほぼ同じ位であった。象牙前質および象牙芽細胞突

起中にも散在して銀粒子が認められたが，象牙芽細胞下層の細胞にはわずしか認められなかった。

b) ^3H -プロリン投与後 4 時間 (Fig. 22-b)

銀粒子は主に修復象牙質の象牙前質中に帯状に集まって認められるようになり，その数は隣接する正常な原生象牙質の象牙前質中とほぼ同じ位であった。しかし，歯根に近い側の修復象牙質の象牙前質の方が，髄角に近い側よりも多くの銀粒子が局在する傾向を示した。象牙芽細胞中の銀粒子は減少し，象牙芽細胞下層の細胞と同様にその細胞質中に散在して認められるだけであった。

以上，対照群と実験群で認められた銀粒子の数を比較するために， ^3H -プロリン投与 30 分後の象牙芽細胞あるいは修復象牙質下の細胞の細胞質中の銀粒子の数，および ^3H -プロリン投与 4 時間後の象牙前質中の銀粒子の数を対照群における銀粒子数に対する比としてグラフ (Fig. 23) に表わした。

Fig. 21 ^3H -proline autoradiographs (7th day after cavity preparation):

Most of silver grains are concentrated on the Golgi areas of the spindle-shaped cells at 30 min (a) and on the predentin (PD) of the reparative dentin (RD) at 4 hr (b) after injection. Toluidine blue stain. $\times 1,200$

考 察

1. 修復象牙質の鉛によるラベリング像について

いままで修復象牙質の形成に関して、テトラサイクリンやクエン酸鉛を用いた時刻描記実験は、石橋と本谷 (1965)^{24,25)}、中村 (1966)¹³⁾、Fischer et al. (1970)¹⁷⁾、Tagger et al. (1975)¹⁸⁾、割田 (1976)¹⁵⁾などが報告している。

中村 (1966)¹³⁾、Tagger et al. (1975)¹⁸⁾、割田 (1976)¹⁵⁾は、修復象牙質に観察されたテトラサイクリンによるラベリング線と原生象牙質のそれとを比べ、前者の走行は不規則で波状にうねったり、各所で島状にふくらんだりしており、その蛍光の幅も不均一でときに帯状に広がり、ラベリング線同志の間隔も不規則であることを観察している。

本研究の鉛による時刻描記実験においても、修復象牙質内のラベリング線は、その走行、太さ、染色性は不規則であったが、経目的に次第に規則的なラベリング線となり、15日目のものは比較的

滑らかな走行を呈し、太さもほぼ一定であった。鉛の硬組織への沈着機構は未だ不明な点が残されているが、一般に鉛が石灰化部位に沈着するのは、リン酸鉛がリン酸カルシウムの溶解度積よりはるかに小さいため容易にカルシウムと置換することによるとされており⁴³⁾、本実験における鉛のラベリング線も投与時の象牙質の石灰化前線に一致すると考えられる。したがって、鉛のラベリング線は、修復象牙質の形成初期の石灰化がかなり不規則であるのに対し、その後に形成された修復象牙質の石灰化は次第に規則的になることを示しており、テトラサイクリンの場合と同様に理解される。

しかし、本実験では窩洞形成後最初の鉛の投与時からラベリング線は投与回数に一致して明瞭に認められたのに対し、テトラサイクリンによる実験ではラベリング線の数投与回数より一本少ないことが報告されている^{13,15,17)}。

この違いは、本実験では、窩洞形成後3日目のオートラジオグラムの所見で示されているように

Fig. 22 ^3H -proline autoradiographs (18th day after cavity preparation):

Most of the silver grains are concentrated on the cytoplasm of the columnar cells at 30 min (a) and on the predentin (PD) of the reparative dentin (RD) at 4 hr (b) after injection.

Toluidine blue stain. $\times 1,200$

修復象牙質の形成がすでに窩洞形成後5日目以前に開始されているのに対し、テトラサイクリン実験の場合には、窩洞形成後最初のテトラサイクリン投与までの期間中(中村¹³⁾は7日、割田¹⁵⁾は9日、Fischer et al.¹⁷⁾は15日)、象牙芽細胞や歯髄細胞の機能が完全に回復せず、象牙質基質形成や石灰化が行われなかったため、窩洞形成前のラベリング線と形成後最初のラベリング線が重なったことによると解釈されており、このように修復象牙質の形成細胞が出現し、機能するのが、ヒト、犬、サルに比べラットでは早く、かつその形成速度も速やかだったためと考えられる。さらにこの修復象牙質の形成細胞の出現する時期は、窩洞形成の方法、充填物の種類やその有無によっても異なるが、動物種や年齢と関連する歯髄のいわゆる生活力の差によるところも大きいと考えられる。すなわち、ラット歯髄は他種の動物に比べ一般に自然治癒能力に優れ⁴⁴⁾、早期に防禦反応を示す組織であると考えられており^{29,45)}、このことはラットにおける修復象牙質の形成速度が、本実験では

1日平均5~6 μm で Weider et al. (1956)²¹⁾ がラットで報告した1日平均3~8 μm に一致し、ヒトにおける1.5 μm ¹¹⁾、サルにおける4 μm ¹⁷⁾ や1.8 μm ⁴⁶⁾ に比べ大きいことから裏付けられる。

2. 修復象牙質の形成細胞について

対照群の象牙芽細胞は異染色質に富む核を有し、ゴルジ体や粗面小胞体など細胞内小器官の発達は乏しく、 ^3H -プロリンの取り込み、分泌もわずかで、明らかに象牙質基質の合成、分泌の活性がきわめて低く休止期の状態を示唆していた。

しかし、窩洞形成後1時間では既存の象牙芽細胞の多くは変性像を呈し、窩洞形成時の機械的刺激により多くの象牙芽細胞が傷害を受けていることが示唆された。同様な所見は高速切削による歯髄への影響をみた Searls (1975)⁴⁷⁾ によっても報告されており、ラット切歯象牙芽細胞の象牙質基質形成能についての、 ^3H -プロリンのオートラジオグラフィーによる定量的な観察結果では、突起の切断された象牙芽細胞は窩洞形成直後からプロリンの取り込みが激減し、形成直後の急激な細胞変

Fig. 23 Diagram showing the changes in the Relative Numbers* of silver grains in the ^3H -proline autoradiogram counted on the dentin-forming cells (30 min after injection) or on the predentin (4 hr after injection) along the time course after the experimental cavity preparation.

$$\text{* Relative Number} = \frac{A}{B}$$

A : Grain counts on the specific structures in the experimental sections.

B : Grain counts on similar structures in the control sections.

性と細胞の機能低下を明らかにしている。一般に窩洞形成直後の歯髄の変化として、象牙芽細胞の萎縮、核の濃染、細管内への吸引および象牙芽細胞層の乱れ、空胞形成などが報告されているが^{13, 15, 26, 28, 29, 48)}、微細構造学的変化としては象牙芽細胞の細胞内浮腫、細胞内小器官の破壊や空胞化、核濃縮などの所見が示されており、これらは蛋白変性の結果生じたものと考察されている⁴⁹⁾。本実験の場合もほぼ同様な結果が得られており、窩洞形成時には一過性に多くの象牙芽細胞が変性、死滅するものと考えられるが、象牙芽細胞下層や歯髄細胞にはあまり変化はみられず、これらの変化が主として象牙芽細胞の突起に対する直接作用によるものであることを示している。しかし、本実

験では斉藤(1976)⁵⁰⁾による象牙芽細胞の細管内への吸引所見は認められず、また山田(1976)³⁴⁾による窩洞形成直後の象牙芽細胞には変化が認められなかったとする報告とも異なっている。このような差異は主に窩洞形成時に象牙芽細胞に与えられる刺激や傷害の程度が異なることに起因するものと考えられる。

なお、全ての象牙芽細胞が変性、死滅するのではなく中には生存し続ける象牙芽細胞もあることは確かである。例えば後に述べるように、原生象牙質と修復象牙質の象牙細管の連続性を示す像や窩洞形成後3日目のオートラジオグラムにおいて原生象牙質の象牙細管内にプロリンの局在が認められる所見などは、一部の既存の象牙芽細胞が再活性されたことを示唆するものであるが、それらの数はごくわずかであると考えられる。

窩洞形成後3日目では、核小体が顕著で正染色質に富む核および豊富な細胞質を有する紡錘形細胞が多数観察され、著しいプロリンの取り込みと分泌の所見や微細構造学的特徴からもこの細胞が活発な象牙質基質の合成、分泌を営んでいることが示唆された。すでに、修復象牙質形成過程でこれと同様な時期に観察された細胞として、Sveen & Hawes (1968)³⁰⁾は紡錘形細胞、清水(1978)²⁸⁾は類円形ないし多角形の大型細胞、岡(1981)²⁹⁾は大型の類円形、楕円形あるいは不規則な形の細胞を挙げているが、これらとの形態学的相違は動物種、歯髄傷害の程度、細胞の由来や分化程度の違いに起因するものと考えられる。

一方、これと同様な微細構造学的特徴をもつ紡錘形細胞は赤峰(1981)³³⁾が同じくラット臼歯において窩洞形成後5日目に観察している。本実験で観察された紡錘形細胞は明確な突起を有していないこと、ゴルジ野の局在性が不明瞭なこと、粗面小胞体の配列が不規則で一部に拡張が認められるものが多いこと、さらに後述する分泌顆粒がみられない点や細胞極性が不明確であることなどから、分化途中の象牙芽細胞であって Takuma & Nagai (1971)⁵¹⁾による前象牙芽細胞に相当するものと考えられる。

窩洞形成後7日目になると、3日目に比べ細胞はやや小型化し、核の異染色質もわずかに増加す

るが， ^3H -プロリンの取り込みと分泌は3日目同様活発で微細構造学的にも活発な象牙質基質の合成，分泌を示唆していた。この細胞はゴルジ体と粗面小胞体の分布の極性が明瞭になること，細胞質遠心端に突起を形成しつつあることより Takuma & Nagai (1971)⁵¹⁾ による幼若象牙芽細胞に近い特徴を有するものと考えられ，有機性基質形成と石灰化に直接関与しながら歯髄側へ後退し新たな象牙細管をもった修復象牙質を形成しはじめたものと思われる。

赤峰 (1981)³³⁾ は，同じ時期に，形成されつつある修復象牙質下に幼若象牙芽細胞よりさらに分化の進んだ成熟した象牙芽細胞を観察しているが，この差異は窩洞形成の方法，充填物の有無などによる歯髄傷害度の違いに起因するものと考えられる。

窩洞形成後18日目には，修復象牙質下に並ぶ細胞は光顕レベルでは対照群とほぼ同様の形態を示し，微細構造学的には比較的細胞内小器官の発達した成熟した象牙芽細胞の様相を呈していた。 ^3H -プロリンの分布も窩洞形成後3日目や7日目の細胞に比べその数は少ないが (Fig. 23)，依然として活発な象牙質基質の合成，分泌を行っていることを示唆している。

微細構造学的には窩洞形成後7日目から18日目にいたると象牙芽細胞の突起形成は顕著になり，分泌顆粒も突起中に多く認められるようになる。しかも，それらの顆粒をとり囲むように良く発達した微細小管と微細線維が密集し，分泌顆粒の輸送や分泌との関係を暗示している。

このように分泌顆粒の出現とそれが突起中へ移動する所見は，ラット切歯の正常な発育過程における，添加的象牙質石灰化開始以降の最も活発に基質形成と石灰化を行っている象牙芽細胞にみられる所見と類似している。すなわち，象牙質形成の活発な象牙芽細胞には蛋白分泌系細胞の構成要素であるゴルジ体と粗面小胞体の発達以外に，特徴的な構造物として分泌顆粒が多数認められている。この構造物は，単に secretory granules⁵²⁻⁵⁴⁾，あるいは dense granules^{52, 55)}，rod shaped dense bodies⁵⁶⁾，abacus bodies⁵⁷⁾ という名称でも呼ばれており，この分泌顆粒とコラーゲン細線

維前駆物質やカルシウムの細胞内輸送経路との関係が論議されている。

Weinstock & Leblond (1974)⁵⁴⁾ によれば， ^3H -プロリンの電顕オートラジオグラフィーと微細構造学的観察結果より，コラーゲン細線維前駆物質の合成は粗面小胞体で始まり，次いでゴルジ体，とくに線維状物質を含むゴルジ空胞由来の球状ないしは円柱状構造物を経由し，さらに円柱状構造物からの発芽により前分泌顆粒が形成され，その内容物が濃縮されることにより成熟した分泌顆粒になると報告されている。この分泌顆粒は象牙芽細胞突起の細胞質中にも出現し ^3H -プロリンのラベルもこれに限局してみられることから，コラーゲン細線維前駆物質の細胞内輸送は分泌顆粒を介して行われると述べている。Frank (1970)⁵²⁾ も同様な実験を行い， ^3H -プロリンのラベルが象牙芽細胞突起の分泌顆粒に多く細胞質にほとんどないことより，コラーゲン細線維前駆物質の細胞内輸送がこの分泌顆粒を介して行われるとしている。

さらに，Karim et al. (1979)⁵⁸⁾ は免疫細胞化学の手法を用いて procollagen I の象牙芽細胞内の局在を検索した結果，コラーゲン細線維前駆物質の輸送経路であると考えられている粗面小胞体，ゴルジ空胞由来の球形ないしは円柱形構造物，および分泌顆粒と進むにしたがい強い反応が認められるようになることを明らかにし，Weinstock & Leblond (1974)⁵⁴⁾ の所見を裏付けている。

しかし，Reith (1968)⁵⁵⁾，Kajikawa & Kaki-hara (1974)⁵⁹⁾ の ^3H -プロリンによる電顕オートラジオグラフィーの結果では粗面小胞体とゴルジ体にラベルされた後，ラベリングの大部分は象牙芽細胞突起の細胞質基質中に認められ膜性構造物中にはなかったこと，および細胞質中の小胞様構造物と粗面小胞体との形態学的関連が認められなかったことから，コラーゲン細線維前駆物質の細胞内輸送は細胞質基質を介して行われると述べており，Weinstock & Leblond (1974)⁵⁴⁾ とはやや異なった見解を示している。しかし，この相違はおそらく動物種や歯種の違い，象牙芽細胞の分化の程度の違いなどによるものと思われる。すなわち，本実験でも象牙質基質形成の活発な窩洞形成後3日目と7日目の前象牙芽細胞様の細胞と幼若

象牙芽細胞様の細胞には、線維状物質を含んだゴルジ空胞由来の球状ないしは円柱状構造物が数多く観察されたが、オートラジオグラムでプロリンの活発な象牙前質への分泌が観察されたにもかかわらず、この時期の象牙芽細胞様の細胞には分泌顆粒はほとんど認められなかった。しかし、象牙質基質形成のやや減退した18日目の成熟した象牙芽細胞では、ゴルジ野と細胞質突起中には分泌顆粒や種々の小胞様構造物が認められた。

これらの所見は、象牙芽細胞の分化の割合によりコラーゲン細線維前駆物質の細胞内輸送経路が異なることを示唆しており、永井 (1970⁶⁰, 1978⁶¹)、小沢ら (1979)⁶²、赤峰 (1981)³³の微細構造学的検索結果もその可能性を示している。すなわち、永井 (1970⁶⁰, 1978⁶¹)は、ラット切歯の象牙芽細胞において、前象牙芽細胞にはわずかし分泌顆粒を認めないにもかかわらず一層の象牙前質が形成されていることより、分化の時期によりコラーゲン細線維前駆物質の輸送経路が異なる可能性や複数の経路をもつ可能性があるとしている。また、赤峰 (1981)³³の所見でもその写真からは窩洞形成後5日目の前象牙芽細胞に近い形態を示す細胞では分泌顆粒は少なく、それに比べ窩洞形成後7日目の成熟した象牙芽細胞にはゴルジ体付近に多数の典型的な分泌顆粒が認められる。

さらに、Reith (1976)⁵⁷、小沢ら (1979)⁶²はこれら分泌顆粒がカルシウムの細胞内輸送や石灰化機構と関係すると論じている。すなわち、基質小胞性石灰化が行われている象牙質下の幼若な象牙芽細胞中には分泌顆粒は少なく、一方活発な添加的石灰化が進行している時期の成熟した象牙芽細胞中には、高濃度のカルシウムを含むゴルジ体と分泌顆粒が認められることから、分泌顆粒がコラーゲン細線維前駆物質と共に添加的石灰化に必要な結合性カルシウムを輸送する可能性があるとしている。同時に、本実験の所見および伊津 (1976)⁶³、Sela et al. (1981)⁶⁴、Hayashi (1982)⁶⁵の観察結果が示すように、修復象牙質の初期の不規則な石灰化が基質小胞性石灰化機構によるものである可能性も考えあわせると、この分泌顆粒の出現と象牙芽細胞の成熟化ならびに規則的に修復象牙質が形成される現象は、添加的石灰化機構と分泌

顆粒との関係を強く示唆しているものと思われる。

本実験において窩洞形成後3日目、7日目にみられた前象牙芽細胞、および幼若象牙芽細胞様の細胞が高い細胞活性を保っていることは、これらの細胞に強いアルカリ性フォスファターゼ (以下ALPase と略す) 活性が局在することからも裏付けられた。

一般に象牙質形成時のALPase活性の局在は、象牙芽細胞下層と活発に象牙質形成を行っている時期の象牙芽細胞に認められ、細胞化学的検索では象牙芽細胞の近心側および細胞側壁の細胞膜、象牙芽細胞下層の細胞の細胞膜および細胞間基質に活性が認められたとする報告⁶⁶⁻⁶⁹が多い。

一方、修復象牙質形成時のALPase活性の局在については、平田 (1963)³⁶が覆髄後の dentin bridge 形成時にALPase 活性が傷害部表層歯髄に認められ、石灰化が進むにつれ減弱していくことを観察し、ALPase は有機性基質形成と関係するとしている。また、Zach & Cohen (1965)³⁵は窩洞直下歯髄の細胞稀薄層に強いALPase 活性を認め、象牙芽細胞での活性は弱かったとし、細胞稀薄層が歯髄修復時における細胞活性の高い部位であろうとしているが、修復象牙質形成との関連については述べていない。Seltzer et al. (1962)⁷⁰や小川 (1976)⁷¹は、ALPase の水溶液やペーストで覆髄を行った歯髄では、高頻度で多量の修復象牙質形成がみられたことを示し、ALPase が象牙芽細胞の分化を促し、修復象牙質形成を促進する可能性があるとしているが、外界から添加したALPase が細胞や組織に直接的に働くか否かは疑問である。

本実験において、修復象牙質の基質形成や石灰化の盛んな時期に強いALPase 活性が窩洞下歯髄の細胞に認められたことは、ALPase 活性と基質形成、石灰化との関連を示唆するとともに、細胞分化との関連性も暗示している。

しかし、これらのALPase 活性局在の真の機能的意味は不明で、はたしてカルシウムやリン酸の輸送に関係するのか、その他の物質輸送や代謝と関係するものであるのかなどについては今後の研究にまたざるを得ない。

3. 修復象牙質の形成細胞の由来について

緒言でも述べたように，修復象牙質の形成細胞の由来については既存の象牙芽細胞の賦活化と，新生象牙芽細胞の分化の2つの考え方に分けられる。

浪江(1959)²²⁾や中村(1966)¹³⁾による，既存の象牙芽細胞が再び活動性を増して修復象牙質を形成するという考えは，原生象牙質の象牙細管と修復象牙質のそれとが連続している像が認められるという形態学的所見より支持され³⁴⁾，本実験において形成された修復象牙質の一部にも同様な所見が観察された。また，窩洞形成後3日目のオートラジオグラムで原生象牙質の一部の象牙細管中にも銀粒子が認められた所見は，まだ細胞質突起を象牙細管中に保有している象牙芽細胞が存在しプロリンを取り込んでいることを示しており，既存の象牙芽細胞が象牙質基質を形成していることを示唆している。しかし，その数のごくわずかであることは，連続している象牙細管が少ないことや窩洞形成後1時間でほとんどの既存の象牙芽細胞が変性，死滅している所見からも容易に推測される。

また，これら既存の象牙芽細胞の変性，萎縮，機能低下の所見は，原生象牙質の大部分の象牙細管が修復象牙質との境で途切れその数が激減する像²³⁾と共に，既存の象牙芽細胞の賦活化が起こりにくいことを示唆している。Marsland & Shovelton (1970)²⁶⁾，Stanley (1976)²⁷⁾，清水 (1978)²⁸⁾，岡 (1981)²⁹⁾の経時的な実験病理学的検索結果では，本実験と同様に，既存の象牙芽細胞の消失，象牙芽細胞層における未分化な細胞の出現，その後の修復象牙質形成が観察されており，この所見は新生象牙芽細胞の出現とそれによる修復象牙質形成を強く示唆している。

このように本実験の形態学的検索所見は，窩洞形成による象牙芽細胞の傷害程度により多少異なるとしても，修復象牙質の形成細胞の大部分が新しく分化した新生象牙芽細胞であって，賦活化した既存の象牙芽細胞は少ないことを示唆しており，赤峰(1981)³³⁾の微細構造学的検索と³H-サイミジンによるオートラジオグラフィーおよびコルヒチン投与実験の結果を支持するものである。

さらに，新生象牙芽細胞の由来については，歯髄内あるいは細胞緻密層の未分化間葉系細胞^{26-29,72)}，残存した象牙芽細胞²⁹⁾，線維芽細胞⁷²⁾，一度変性した歯髄細胞²⁸⁾などが挙げられている。また，³H-サイミジンを用いたオートラジオグラフィー³⁰⁻³³⁾の結果からは，新生象牙芽細胞は既存の象牙芽細胞には由来しないとされているものの，Zach et al. (1969)³²⁾は線維芽細胞，Sveen & Hawes (1968)³⁰⁾は血管周囲の幹細胞あるいは未分化な歯髄細胞，赤峰 (1981)³³⁾は細胞緻密層において歯髄固有細胞から分裂，増殖した未分化な大型細胞に由来すると述べており，未だその由来については確かな結論は得られていない。

本実験では，窩洞形成後3日目の象牙芽細胞下層内にみられる核小体の発達した細胞の所見，および窩洞形成後7日目の幼若象牙芽細胞と象牙芽細胞下層の細胞の間に介在した細胞の所見より，本実験で観察された前象牙芽細胞や幼若象牙芽細胞は象牙芽細胞下層からの未分化な細胞に由来することが推察され，それらはやがて新生の成熟した象牙芽細胞に分化していく可能性が示唆される。

結 論

修復象牙質の形成過程およびその形成細胞を明らかにするために，ラット臼歯を用いて実験的に窩洞形成を行い，窩洞下の歯髄に観察された細胞の微細構造学的特徴，細胞化学的特徴を経時的に検索すると共に，³H-プロリンのオートラジオグラフィーおよび象牙質の時刻描記法により，これら細胞の象牙質形成能も同時に検索し，以下の結論をえた。

1) ラット臼歯における修復象牙質の形成は，形成初期ではきわめて活発であり，その形成量も他種動物に比べ多く，その後徐々に減少した。

2) 修復象牙質形成初期には，窩洞直下に前象牙芽細胞と微細構造学的に類似した紡錘形細胞が現れ，次いで象牙質形成を行いながら，幼若な象牙芽細胞を経て成熟した象牙芽細胞に分化してゆくことが明らかとなった。

3) これらの細胞は修復象牙質の形成細胞であり，強いALPase活性と活発な象牙質基質形成能

を有しており、いわゆる活性化された状態にあることが明らかとなった。

4) 修復象牙質形成細胞の由来は、その多くが既存の象牙芽細胞以外の、主として象牙芽細胞下層の細胞であろうと推測された。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究の懇切なる御指導ならびに御校閲を賜りました新潟大学歯学部口腔解剖学第一教室小沢英浩教授に、深甚なる謝意を表しま

す。また本研究の機会を与えて下さいました東京医科歯科大学歯学部第一歯科保存学教室細田裕康教授、ならびに御鞭撻いただきました新潟大学歯学部歯科保存学第一教室岩久正明教授に、心から感謝いたします。さらに、本研究を進めるにあたり、終始御援助いただきました口腔解剖学第一教室員の皆様と歯科保存学第一教室員の皆様に感謝いたします。

抄録：修復象牙質の形成細胞およびその形成過程を明らかにする目的で、ラット臼歯に実験的に窩洞形成を行い、修復象牙質の形成量の経時的变化を硬組織時刻描記法で検索すると共に、窩洞下の歯髄に観察された細胞について微細構造学的特徴、細胞化学的特徴およびオートラジオグラフィーによるプロリンの代謝過程を経時的に検索した。

ラット臼歯における修復象牙質の形成は窩洞形成後速やかに開始され、その形成量は窩洞形成後5～15日目まで多く、それ以後減少した。窩洞形成を行わない対照群の象牙芽細胞は細胞内小器官の発達も悪く、プロリンの代謝およびアルカリ性フォスファターゼ活性も僅かであったのに対し、窩洞形成後3日目、7日目の窩洞直下に観察された前象牙芽細胞、幼若象牙芽細胞様の紡錘形細胞は明瞭な核小体を有し、ゴルジ体と粗面小胞体の発達も顕著で蛋白合成および分泌の活性が高いことを示唆していた。またプロリンの取り込み、象牙前質への分泌も活発で、アルカリ性フォスファターゼ活性も細胞膜にそって強く認められた。窩洞形成後18日目に至ると、これらの細胞は成熟した象牙芽細胞の形態を呈するようになり、プロリンの代謝活性およびアルカリ性フォスファターゼ活性はやや減弱傾向を示した。

以上の結果より、修復象牙質は最初活発な基質形成能を有する幼若な象牙芽細胞により形成され、これらの細胞は成熟した象牙芽細胞に分化しながら修復象牙質形成を行っていくことが示された。

文 献

- 1) 藤田恒太郎：歯の組織学，p.66～70，医歯薬出版，東京，1957.
- 2) Baume, L. J.: The Biology of Pulp and Dentin: A Historic, Terminologic-Taxonomic, Histologic-Biochemical, Embryonic and Clinical Survey. p.159-162, S.Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, 1980. より
- 3) Bödecker, C. F. W.: The minute anatomy, physiology, pathology, and therapeutics of the dental pulp. Dental Cosmos 24: 292-299, 337-345, 393-402, 449-457, 1882.
- 4) Kantorowicz, A.: Zur Histogenese des Dentins insbesondere des Ersatzdentins. Dtsch. Mschr. Zahnheilk. 28: 545-564, 1910.
- 5) Benzer, S.: The development and morphology of physiological secondary dentin. J. Dent. Res. 27: 640-646, 1948.
- 6) Rushton, M. A., Cooke, B. E. D. and Duckworth, R.: Oral Histopathology. 2nd edn., p.102, E. & S. Livingstone, Edinburgh, London, 1970.
- 7) Scott, J. H. and Symons, N. B. B.: Introduction to Dental Anatomy 6th edn., p. 201-229, E. & S. Livingstone, Edinburgh, London, 1971.
- 8) Avery, J. K.: Dentin, Orban's Oral Histology and Embryology (Bhaskar, S. N.), 9th edn., p.124-126, C.V. Mosby Company, St. Louis, Toronto, London, 1980.
- 9) Hopewell-Smith, A.: Adventitious dentins and infection of the dental pulp. Dent. Items 47: 477-498, 557-574, 1925.
- 10) Kuttler, Y.: Classification of dentine into primary, secondary, and tertiary. Oral Surg., Oral Med. & Oral Path. 12: 996-1001, 1959.
- 11) Stanley, H. R., White, C. L. and McCray, L.: The rate of tertiary(reparative)dentine formation in the human tooth. Oral Surg., Oral Med. & Oral Path. 21: 180-189, 1966.
- 12) Burstone, M. S.: The ground substance of abnormal dentin, secondary dentin, and pulp calcifications. J. Dent. Res. 32: 269-279, 1953.
- 13) 中村博亘：実験的に形成された第二象牙質の病理組織学的ならびに組織化学的研究。歯学 54: 143-175, 1966.
- 14) 片桐正隆：人の第二象牙質の石灰化像について。

- 歯学 56 : 9-39, 1968.
- 15) 割田一敏：窩洞形成とその修復にともなう歯髄変化と第2象牙質の形成について。歯学 64 : 45-89, 1976.
- 16) 山田元樹：原生象牙質と第2象牙質との石灰化の比較について。歯科月報 35:670-680, 1961.
- 17) Fischer, F. M., El-Kafrawy, A. and Mitchell, D. F.: Studies of tertiary dentin in monkey teeth using vital dyes. J. Dent. Res. 49:1537-1540, 1970.
- 18) Tagger, M., Perlmutter, S., Galon, H. and Helft, M.: In vivo tetracycline labeling of experimentally induced reparative dentin in human teeth. J. Dent. Res. 54 : 444-448, 1975.
- 19) Scott, J. N. and Weber, D. F.: Microscopy of the junctional region between human coronal primary and secondary dentine. J. Morph. 154 : 133-146, 1977.
- 20) 桑幡常昭：第2象牙質の走査電子顕微鏡的観察。日大歯学 53 : 1059-1065, 1979.
- 21) Weider, S. R., Schour, I. and Mohammed, C. I.: Reparative dentine following cavity preparation and fillings in the rat molar. Oral Surg., Oral Med. & Oral Path. 9 : 221-232, 1956.
- 22) 浪江幸太郎：第二象牙質形成に関する病理組織学的研究。第一編 各種条件が第二象牙質の組織像に及ぼす影響について。歯学 47 : 1-41, 1959.
- 23) 磯川宗七，山田元樹：第二象牙質の発生に関する実験的研究。解剖学雑誌 37:159-169, 1962.
- 24) 石橋真澄，本谷昭：充填物の歯髄刺激性と第2象牙質形成に関する研究(そのI)。口科誌 13 : 81-88, 1964.
- 25) 石橋真澄，本谷昭：充填物の歯髄刺激性と第2象牙質形成に関する研究(そのII)。口科誌 14 : 338-351, 1965.
- 26) Marsland, E. A. and Shovelton, D. S.: Repair in the human dental pulp following cavity preparation. Archs. Oral Biol. 15 : 411-423, 1970.
- 27) Stanley, H. R.: Human Pulp Response to Operative Dental Procedures. p.20-38, Stortter Printing Co. Inc., Gainesville, Florida, 1976.
- 28) 清水洋一：窩洞形成，充填後の歯髄の変化に関する神経組織学的研究。九州歯会誌 32 : 305-324, 1978.
- 29) 岡喜七郎：損傷歯髄の修復に関する実験的研究。九州歯会誌 35 : 359-378, 1981.
- 30) Sveen, O. B. and Hawes, R. R.: Differentiation of new odontoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. Archs. Oral Biol. 13 : 1399-1412, 1968.
- 31) Cotton, W. R.: Pulp response to cavity preparation as studied by the method of thymidine-H³ autoradiography. In Biology of the Dental Pulp Organ : A symposium. (Finn, S. B.), p.69-101, Univ. of Alabama Press, Alabama, 1968.
- 32) Zach, L., Topal, R. and Cohen, G.: Pulpal repair following operative procedures. Oral Surg., Oral Med. & Oral Path. 28 : 587-597, 1969.
- 33) 赤峰昭文：ラットにおける窩洞形成後の歯髄細胞の動態について。日歯保誌 24 : 494-519, 1981.
- 34) 山田繁治：窩洞形成後におけるヒト歯髄の微細構造の変化に関する研究。歯科医学, 39 : 357-386, 1976.
- 35) Zach, L. and Cohen, G.: Histochemistry of pulpal response ; II. Stress and dentinogenesis. J. Dent. Res. 43 : 5, 1965.
- 36) 平田昌弘：歯髄内における実験的象牙質形成に関する酵素組織化学的研究。歯科学報 63:254-271, 1963.
- 37) Maurice, C. G. and Schour, I.: Experimental cavity preparations in the molar of the rat. J. Dent. Res. 34 : 429-434, 1955.
- 38) 岡田正弘，三村二：鉛塩ニヨル骨及び歯牙組織新生化灰部位ノ生体染色法。口病誌 11 : 365-367, 1937.
- 39) 岡田正弘，三村二：硬組織ノ生理及ビ薬理 (第1報) 鉛塩ヲ以テスル硬組織ノ生体染色法ト其ノ応用ニヨル歯牙硬組織縞模形成ノ週期性ニ関スル研究。日薬物誌 25 : 122-123, 1938.
- 40) Okada, M. and Mimura, T.: Zur Physiologie und Pharmakologie der Hartgewebe. I. Mitteilung : Eine Vitalfärbungsmethode mit Bleisalzen und ihre Anwendung bei den Untersuchungen über die rhythmische Streifenbildung der harten Zahngewebe. Jap. J. Med. Sci., IV, Pharmacol. 11 : 166-170, 1938.
- 41) 小掠秀亮：硬組織内時刻描記法。歯の研究法 (須賀昭一，田熊庄三郎，佐々木哲)，p.157-184, 医歯薬出版，東京，1973.
- 42) Mayahara, H., Hirano, H., Saito, T. and Ogawa, K.: The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase (Orthophoric monoester phosphahydrolase). Histochemie 11 : 88-96, 1967.
- 43) 麻生田亮：硬組織における重金属塩の沈着機構に関する研究。お茶の水医学雑誌 8:510-518, 1960.
- 44) Massler, M. and Mansukhani, N.: Effects of formocresol on the dental pulp. J. Dent. Child. 26:277-297, 1959.
- 45) Berman, D. S. and Massler, M.: Experimental pulpotoomies in rat molars. J. Dent. Res. 37 : 229-242, 1958.
- 46) El-Kafrawy, A. H. and Mitchell, D. F.: Pulp reactions to open cavities later restored with silicate cement. J. Dent. Res. 42 : 874-884, 1963.

- 47) Searls, J. C. : Radioautographic evaluation of changes induced in the rat incisor by high-speed cavity preparation. *J. Dent. Res.* 54 : 174-181, 1975.
- 48) Stanley, H. R. and Swerdlow, H. : Aspiration of cells into dentinal tubules? *Oral Surg., Oral Med. & Oral Path.* 11 : 1007-1017, 1958.
- 49) Searls, J. C. : Light and electron microscope evaluation of changes induced in odontoblasts of the rat incisor by the high-speed drill. *J. Dent. Res.* 46 : 1344-1355, 1967.
- 50) 斉藤利夫 : 窩洞形成直後の歯髄反応に関する電子顕微鏡的研究. 特に象牙細管内への各種細胞の移動について. *松本歯学* 2 : 92-121, 1976.
- 51) Takuma, S. and Nagai, N. : Ultrastructure of rat odontoblasts in various stages of their development and maturation. *Archs. Oral Biol.* 16 : 993-1011, 1971.
- 52) Frank, R. M. : Etude autoradiographique de la dentinogenese en microscopie electronique a l'aide de la proline tritiee chez le chat. *Archs. Oral Biol.* 15 : 583-596, 1970.
- 53) Weinstock, M. : Collagen formation-Observations on its intracellular packaging and transport. *Z. Zellforsch.* 129 : 455-470, 1972.
- 54) Weinstock, M. and Leblond, C. P. : Synthesis, migration, and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after [³H]proline administration. *J. Cell Biol.* 60 : 92-127, 1974.
- 55) Reith, E. J. : Collagen formation in developing molar teeth of rats. *J. Ultrastruct. Res.* 21 : 383-414, 1968.
- 56) Jessen, H. : The ultrastructure of odontoblasts. In perfusion fixed, demineralised incisors of adult rats. *Acta Odont. Scand.* 25 : 491-523, 1967.
- 57) Reith, E. J. : The binding of calcium within the Golgi saccules of the rat odontoblast. *Am. J. Anat.* 147 : 267-272, 1976.
- 58) Karim, A., Cournil, I. and Leblond, C. P. : Immunohistochemical localization of procollagens. II. Electron microscopic distribution of procollagen I antigenicity in the odontoblasts and predentin of rat incisor teeth by a direct method using peroxidase linked antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 27 : 1070-1083, 1979.
- 59) Kajikawa, K. and Kakiyama, S. : Odontoblasts and collagen formation : An ultrastructural and autoradiographic study. *J. Electron Microsc.* 23 : 9-17, 1974.
- 60) Nagai, N. : Electron microscopy of the cytoplasmic bodies in the odontoblasts of young rat incisors. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 11 : 47-83, 1977.
- 61) 永井教之 : 歯牙形成細胞の機能. 基質形成とその石灰化機構. *細胞* 10 : 406-418, 499-512, 1978.
- 62) 小沢英浩, 岩久文彦, 山田まりえ, 高野吉郎, 山本敏男, 内田隆 : 歯髄と象牙質の接合部の微細構造. 象牙質形成と石灰化を中心に. *歯科ジャーナル* 9 : 615-631, 1979.
- 63) 伊津進弘 : 象牙質被蓋形成機序に関する光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡的研究. *歯科医学* 39 : 583-622, 1976.
- 64) Sela, J., Tamari, I., Hirschfeld, Z. and Bab, I. : Transmission electron microscopy of reparative dentin in rat molar pulps. *Acta Anat.* 109 : 247-251, 1981.
- 65) Hayashi, Y. : Ultrastructure of initial calcification in wound healing following pulpotomy. *J. Oral Path.* 11 : 174-180, 1982.
- 66) Yoshiki, S. and Kurahashi, Y. : A light and electron microscopic study of alkaline phosphatase activity in the early stage of dentinogenesis in the young rat. *Archs. Oral Biol.* 16 : 1143-1154, 1971.
- 67) Leonard, E. P. and Provenza, D. V. : Alkaline phosphatase activity in sequential mouse molar tooth development. An electron microscopic study. *Histochemie* 34 : 343-354, 1973.
- 68) Larsson, A. : Studies on dentinogenesis in the rat. Ultrastructural observations on early dentin formation with special reference to "dentinal globules" and alkaline phosphatase activity. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.* 142 : 103-115, 1973.
- 69) 小沢英浩, 山田まりえ, 山本敏男, 高野吉郎, 内田隆, 岩久文彦, 森田修一 : アルカリフォスファターゼの電顕細胞化学. *骨代謝* 12 : 6-15, 1979.
- 70) Seltzer, S., Bender, I. B., Kaufman, I. J. and Moodnik, R. : Alkaline phosphatase in reparative dentinogenesis. *Oral Surg., Oral Med. & Oral Path.* 15 : 859-866, 1962.
- 71) 小川充盈 : 生物学的歯髄保存に関する研究. 2, 3の薬剤が歯髄におよぼす影響に関する実験的研究. *歯科医学* 39 : 30-46, 1976.
- 72) Seltzer, S. and Bender, I. B. : *The Dental Pulp* 2nd edn., p. 295-300, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Tronto, 1975.