ラット切歯の舌側象牙質形成に関する 微細構造学的ならびに細胞化学的研究

鈴木 章 則

新潟大学歯学部口腔解剖学第一教室 (指導: 小澤 英浩教授)

[受付: 昭和59年12月13日]

Ultrastructural and cytochemical studies on the dentinogenesis of rat incisors at the lingual side

Akinori Suzuki

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

5274, 2-Gakkocho-Dori, Niigata 951

(Chief and Director: Prof. Hidehiro Ozawa)

[Accepted for publication: December 13, 1984]

Key words: rat incisor / calcification / matrix vesicles / Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase / ALPase

Abstract: This study was attempted to elucidate the ultrastructural and cytochemical characteristics of lingual dentin formation of rat incisors where no subsequent enamel formation took place. Special attention was paid to the initial calcification mechanism of mantle dentin by matrix vesicles.

The ultrastructural characteristics of the developing lingual dentin from the regions near the cervical loop to the established calcified dentin resembled those of the labial dentin formation of rat incisors except for the cytodifferentiation of inner enamel epithelial cells (IEE).

Enzyme cytochemistry of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase was performed using a modified Sundström and Mörnstad's method after decalcification with EDTA. Near the cervical loop area, intense reaction products were demonstrated in the plasma membrane of the outer enamel epithelial cells as well as IEE. In the area where matrix vesicle calcification appeared, reaction products gradually disappeared from IEE and conversely were demonstrated in the plasma membrane of odontoblasts as well as the matrix vesicles. All the reactions disappeared once the dentin calcification was established.

Alkaline phosphatase (ALPase) was seen in the distal plasma membrane of IEE in the vicinity of the cervical loop, and its intensity gradually decreased towards the site of the initial calcification. The reaction products were also seen in the matrix vesicles as well as in the plasma membrane of odontoblasts at the more advanced stage. The closer to the initial site of calcification, the more strongly the odontoblasts and matrix vesicles reacted. When a layer of calcified dentin was established, the enzyme activity gradually decreased from the odontoblasts.

The results of this study suggest that both Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase and ALPase activities play an important role in the initial calcification of dentin and that the matrix vesicles in the lingual dentin of rat incisors may be derived from odontoblasts.

緒 言

ラット等ゲッ歯類の切歯は無根歯あるいは常生歯と呼ばれ、常に歯牙硬組織の形成が行われ萌出している。このため、エナメル質や象牙質などの歯牙硬組織の形態やその形成に関する研究にゲッ歯類の切歯はよく用いられている。特にこれらの切歯は上下顎共に唇側にのみエナメル質が形成され、その反対側、すなわち舌側あるいは口蓋側にはエナメル質が形成されないという形態学的特徴を有するために、多くの研究は唇側を対象として行われている。象牙質形成の研究においてもその観察部位は、通常の有根歯にみられるようにエナメル質形成を伴う部位、すなわち唇側を用いることが多く、電子顕微鏡による微細構造学的研究もその報告は多い (Nagai^{1,2)}, Weinstock *et al.*³⁾, Eisenmann & Glick⁴⁾, Weinstock & Leblond^{5,6)}, Appleton & Morris⁷⁾, Almuddaris & Dougherty⁸⁾, Nygren *et al.*⁹⁾, Karim *et al.*¹⁰⁾, Takagi *et al.*¹¹⁾, Ozawa *et al.*¹²⁾, Orams & Snibson¹³⁾。唇側がこのように有根歯冠部に類似した形態学的特徴を有する半面、舌側では前述のごとく象牙質は形成されるがエナメル質形成はみられないという有根歯の歯根形成部位に類似した形態学的特徴を有している。すなわち、歯頸彎曲部から歯乳頭側に面して配列する内エナメル上皮細胞は唇側のようにエナメル芽細胞へと分化することなく、次第に扁平化し、外エナメル上皮細胞と共にヘルトビッチ上皮鞘を形成し、遂には外エナメル上皮細胞は変性消失するに至る。象牙質形成の進行に伴い、やがて内エナメル上皮細胞も細胞間結合を失い、互いに遊離、孤立化し、周囲の結合組織中に埋め込まれ、消失する運命をたどる。このようにして形成された舌側象牙質は、単にその表面にエナメル質が形成されないだけでなく、唇側象牙質に比べてホルモンやビタミン等の影響を受けやすいことも知られている (神尾¹⁴⁾)。従ってエナメル質形成を伴わない舌側象牙質は、その基質形成や石灰化についても唇側と異なった形態を取る可能性が強く、また唇側にみられるような上皮・間葉間の誘導現象 Epithelio-Mesenchymal Interaction (Slavkin *et al.*¹⁵⁾, Croissant¹⁶⁾)

についても異なった形態学的所見を呈する可能性は強い。

しかしながら、ラットに限らず、ゲッ歯類切歯舌側象牙質形成に関する微細構造学的所見は、ラット切歯における象牙芽細胞の形態分化について報告した Takuma & Nagai¹⁷⁾の論文にとどまり、内エナメル上皮細胞の形態変化、象牙基質形成やその石灰化機構に関する微細構造学的研究は皆無である。

そこで本研究は、ラット上顎切歯舌側象牙質形成部位について、象牙質形成に伴う内エナメル上皮細胞と象牙芽細胞の微細構造学的変化、上皮・間葉細胞間、すなわち内エナメル上皮細胞と象牙芽細胞間の微細形態学的関係、象牙基質の微細構造学的特徴と石灰化現象、特に基質小胞性石灰化についての微細構造学的特徴を明らかにする目的で、非脱灰標本による電子顕微鏡的検索を行った。さらに舌側における象牙質形成に関する微細構造学的特徴の機能的考察、特に象牙質初期石灰化機構の担い手とみなされている基質小胞性石灰化について新たな酵素細胞化学的知見を加え、エナメル芽細胞の関与する唇側における所見と比較検討を行うために、アルカリ性フォスファターゼ (以下 ALPase と略す) 活性とカルシウム・マグネシウム依存性アデノシン三リン酸フォスファターゼ (以下 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase と略す) 活性の局在を酵素細胞化学的に検出することを試みた。

材料と方法

材料には体重 150~200g のウィスター系雄ラットの上顎切歯を用いた。

1. 微細構造学的観察

ペントバルビタールナトリウム (ソムノベンチル, ピットマン・ムーア社) を 0.4ml/kg 腹腔内投与して全身麻酔したのち開胸し、左心室から上行大動脈にカニューレを挿入後、直ちに生理食塩水で約 1 分間、血液を流し去ってから、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で灌流固定した。直ちに上顎切歯を注意深く摘出し、切縁側 $\frac{2}{3}$ を歯科用電気エンジンにとりつけたダイヤモンドディスクを用いて固定液で

冷却しながら切除したのち、同じ固定液を用いて4°Cで一晩浸漬固定した。その後非脱灰のまま4%ショ糖を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.3)で洗浄したのち、同じ緩衝液で緩衝した1%OsO₄で2時間、後固定した。試料はエタノール系列で脱水したのちエポン812に包埋した。電顕用としてLKB 8800型あるいはポーターブラムMT 2-B型超ミクロトームとダイヤモンドナイフを用いて超薄切し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を施したのち、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。

2. Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 活性局在の観察

ラットを全身麻酔下で開胸後、左心室から上行大動脈にカニューレを挿入し、生理食塩水で約1分間血液を流し去ったのち0.1Mカコジル酸緩衝液(pH 7.3)で緩衝した1%グルタルアルデヒド—1%パラフォルムアルデヒドで灌流固定した。その後直ちに上顎切歯を摘出し、同じ固定液中に4°Cで2時間浸漬固定した。次いで0.25Mショ糖を含む0.1Mカコジル酸緩衝液(pH 7.3)(以下C-S緩衝液と略す)で洗浄してから7%ショ糖を含む5%EDTA溶液中にて4°Cで2週間脱灰した。脱灰終了後、7%寒天溶液に包埋し、ついでビブラトーム(オックスフォード社)で約100μmの縦断切片を作成、一部は光顕で微細構造を観察するため酵素反応を行わずに0.1Mカコジル酸緩衝液(pH 7.3)で緩衝した1%OsO₄で1時間後固定し、エタノール系列で脱水、エポン812に包埋した。試料は、ポーターブラムMT 2-B型超ミクロトームで約1μmに薄切、0.5%トリジンブルー(pH 7.3)で染色して光線顕微鏡で観察した。残りのビブラトーム切片はC-S緩衝液で洗浄したのち、Sundström & Mörnstad¹⁸⁾のクエン酸鉛法を改良したTakano *et al.*¹⁹⁾に準じて以下の浸漬液を用いて酵素反応を行った。すなわち、pH 8.5に緩衝した80mMトリスマレイン酸緩衝液に1mMのATP(ナトリウム塩、シグマ社)を基質として、Na⁺-K⁺-ATPaseの阻害剤として0.25mMのウアバイン、非特異的ALPaseの阻害剤として0.1mM L-テトラミソールを、また酵素活性の賦活剤として塩化カルシウムと塩化マグネシウムをそれぞれ3mM、さらに

3mMのクエン酸鉛を沈澱剤として加えた浸漬液を用いた。反応は30分間、37°Cで行った。なお、基質を含まない浸漬液を対照として用いた。反応終了後、C-S緩衝液で洗浄し、0.1Mカコジル酸緩衝液(pH 7.3)で緩衝した1%OsO₄で4°C、1時間、後固定しエタノール系列で脱水、エポン812に包埋した。光顕用には厚さ約1μmの切片を作成し、硫化アンモニウム処理したのち、0.5%メチレンブルーで染色し検鏡した。電顕用にはダイヤモンドナイフで超薄切し、無染色あるいはクエン酸鉛で染色を施し、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。

3. ALPase 活性局在の観察

固定、脱灰はATPaseの場合と同じ方法で行った。その後ATPase活性局在の観察と同様に作成したビプラトーム切片をYoshikiら²⁰⁾の方法に従って50mMの硫酸マグネシウムを含む再活性液を用い、室温で30分間、ALPaseの再活性を行い、ついでMayaharaら²¹⁾の方法に従って以下の浸漬液を用いて酵素反応を行った。すなわち、3.9mMの硫酸マグネシウムと0.23Mのショ糖を含むpH 8.5に緩衝した28mMトリス塩酸緩衝液に基質として20mMのβ-グリセロリン酸ナトリウム(和光純薬社)を、さらに2mMのクエン酸鉛を沈澱剤として加え、0.1N水酸化ナトリウムで最終pHを9.2~9.4に調整した浸漬液を用い、37°C、30分間反応させた。なお、対照実験には基質を含まない浸漬液を用いた。反応終了後はATPase活性局を検出の場合と同様に後固定、包埋、薄切、検鏡した。

結 果

I. 切歯舌側象牙質形成部位の組織・細胞学的所見

本論文では、未分化な歯乳頭細胞から添加的石灰化開始後の象牙芽細胞までを便宜的にStage IからStage Vまでの5段階に分類して記述することとする。

Stage Iは歯頸彎曲部に近接した部位で内エナメル上皮細胞に接する歯乳頭細胞は未分化である(Fig. 1a)。Stage IIは歯乳頭細胞が象牙芽細胞への分化を開始し、いわゆる前象牙芽細胞となる

Fig. 1 Light micrographs of the rat maxillary incisor at the lingual side. a. Stage I, b. Stage II, c. Stage III, d. Stage IV and e. Stage V of dentinogenesis. Epon sections and toluidine blue staining. $\times 440$

時期で (Fig. 1 b), Stage III は細胞極性の顕著な幼若象牙芽細胞の時期で 未石灰化の象牙基質が扁平化した内エナメル上皮細胞との間にみられる (Fig. 1 c). Stage IV は象牙芽細胞の背丈がさらに伸び、象牙基質には石灰化像が出現する時期で内エナメル上皮細胞間が不連続性を示すようになる (Fig. 1 d). Stage V は石灰化象牙質層が明確となり象牙芽細胞との間に象牙前質層が区別されるようになる時期で、内エナメル上皮細胞の多くは消失し、象牙芽細胞間には血管の侵入がみられるようになる (Fig. 1 e)。以下各 Stage の電子顕微鏡所見を示す。

1) Stage I: 外エナメル上皮細胞は扁平ないし立方状を呈し、正染色質に富む類円形の核が細胞の大部分を占めており、核小体もときに認められた。細胞質の核対比は小さく、ミトコンドリア、未発達な粗面小胞体、ゴルジ装置が散在し、その間に多数のリボゾームが認められた。また核をとり囲むように、わずかな微小管、微細線維もみられた。隣接する細胞同士はデスモゾームやギャップ結合で結合しており、張原線維の発達も良好であった (Fig. 2)。

内エナメル上皮細胞は外エナメル上皮細胞よりやや大型で立方状を呈し、卵円形の核を持ち、その対細胞質比は外エナメル上皮細胞同様大きかった。核の異染色質はわずかで全体として明るく、多くの核には明瞭な核小体がみられた。細胞質には未発達な粗面小胞体、ゴルジ装置、やや集団化して存在するミトコンドリアがみられ、それらの間に多数の遊離リボゾームが認められた。微小管や微細線維もわずかにみられたが、張原線維はほとんどみられなかった。細胞間はデスモゾームやギャップ結合により結合しており、遠心基底側には外エナメル上皮細胞から歯頸彎曲部を経て連続する基底板が存在し、基底板と遠心細胞膜の間には半接着斑が点在していた (Fig. 2)。基底板には直角方向に走る微細線維が付着しており、歯乳頭側へおよそ500nmの幅で伸びていた。また遠心側細胞膜には、ところどころ滑面小胞や被覆小胞が認められた (Fig. 3)。

これらの内・外エナメル上皮細胞間には、扁平な細胞が通常一層みられた。その微細構造は、全体が扁平である以外は外エナメル上皮細胞と同様であった (Fig. 2)。

Fig. 2 Stage I. Electron micrograph survey of an area where the differentiating dental papilla cells (DP) and the inner enamel epithelial cells (IEE) lie on either side of a narrow predental space. BL: basal lamina. OEE: outer enamel epithelial cells. Uranyl acetate and lead staining. $\times 3200$

内エナメル上皮細胞と基板を介して存在する歯乳頭側には，歯乳頭細胞が比較的密に存在していたが，その形は不規則で細胞極性はほとんどみられなかった。核は卵円形あるいは長円形で，異染色質は少なく，核小体は顕著であった。細胞小器官の発達も悪く，散在性の粗面小胞体，ミトコンドリア，小さなゴルジ装置のほかに細胞全体に

遊離リボゾームがみられた (Fig. 2)。わずかな微小管と微細線維，ときに細胞周辺に被覆小胞も観察された (Fig. 3)。これらの歯乳頭細胞同士は主としてギャップ結合で結合しており，その間わずかの線維性の細胞間基質もみられた (Fig. 2)。

2) Stage II: 歯乳頭細胞が前象牙芽細胞へと分化を開始した時期で，内・外エナメル上皮細胞

Fig. 3 Stage I. High magnification of a narrow predentinal matrix seen between the dental papilla cells (DP) and the inner enamel epithelial cell (IEE) with underlying basal lamina (BL) which is attached by perpendicularly arranged numerous fine filaments. arrow head: coated pit. CV: coated vesicle. MT: microtubule. Uranyl acetate and lead staining. $\times 63000$

にも歯乳頭細胞にも分裂像はほとんどみられなかった。内エナメル上皮細胞はやや扁平な立方状を呈し、核は卵円形で正染色質に富み、その周辺には小さな粗面小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ装置、微小管、微細線維が遊離リボゾームとともに散在していた。この時期に至ると、内エナメル上皮細胞にも膠原線維がみられるようになった (Fig. 4)。遠心基板側は比較的平坦であり、半接着斑、滑面及び被覆小胞や水解小体様構造物もしばしばみられた (Fig. 5a)。この時期では、内エナメル上皮細胞は扁平化した外エナメル上皮細胞に直接接し、両細胞間には細胞の介在は認められなかった (Fig. 4)。

基板に付着する微細線維はその方向が不規則になるとともに、減少傾向を示した (Fig. 5a)。内エナメル上皮細胞と分化を開始した歯乳頭細胞の間には、この頃から一定の幅の基質が存在する

ようになり、基板とほぼ平行に走る太さ約50nmの膠原線維が出現しはじめ、その間に基質小胞が散在しているのが観察された (Fig. 5a)。基質小胞の大きさは直径約70nmから130nmで、ほぼ円形ないし楕円形を呈し、内部は比較的明るいものや、やや電子密度が高いもの、また小胞膜の内葉に沿って、あるいは小胞内部に電子密度の高い果粒状物質を含む小胞がみられた (Fig. 5b)。

内エナメル上皮細胞に近接する歯乳頭細胞は、細胞小器官の発達とともに、卵円形の核の偏在化が認められるようになり、分化が進むに従い、細胞極性は一段と顕著になるとともに、細胞は互いに密接して配列するようになった (Fig. 4)。粗面小胞体、ゴルジ装置とともに発達が著しくなり、ゴルジ装置の周辺には内部に微細線維や微小果粒を含んだ分泌果粒様構造物もわずかに認められた (Fig. 6)。微小管や微細線維もさらに顕著になり、

Fig. 4 Stage II. Electron micrograph survey of an area where the flattened outer and inner enamel epithelial cells (OEE, IEE) are still intact and continuous. The cell organelles of preodontoblasts are fairly well developed in the cytoplasm distal to the nucleus (N). The Golgi apparatus (G) is close to the nuclear region surrounded by well developed rough endoplasmic reticulum (ER) and scattered mitochondria. CDA: clear distal area. N: nucleus containing a nucleolus. Uranyl acetate and lead staining. $\times 3200$

それらは細胞極性に浴って長軸方向に配列するものが多かった。細胞の遠心端には膜性細胞小器官をほとんど含まない，いわゆる遠心明調野 clear distal area (CDA) (Takuma & Nagai¹⁷⁾) が出現し，そこには複雑な細胞質突起が形成され，時に小胞様構造も認められた (Fig. 4, 5a)。細胞質中には水解小体，滑面小胞体，多胞体も認められ，ミトコンドリアは遠心細胞質中に集合する傾向を示した (Fig. 4, 6)。

3) Stage III: 前象牙芽細胞から幼若な象牙芽細胞へ分化し，象牙基質中に点在する石灰化像が出現する時期に至ると，内・外エナメル上皮細胞はさらに扁平化し，外エナメル上皮細胞はところで欠如していた (Fig. 7)。内エナメル上皮

細胞は全体が扁平になった点を除けば細胞小器官の特徴は Stage II とほぼ同じであったが被覆小胞は減少し，遠心端の細胞膜はやや凹凸を示すようになった (Fig. 8)。内エナメル上皮細胞間には結合が失われた像もみられ，その間には周囲結合組織から膠原原線維が侵入し，それに伴い基底板にも不連続性がみられるようになった (Fig. 7)。

基底板から伸びる微細線維は著しく減少し (Fig. 8, 9)，象牙基質中の膠原原線維は全体としては基底板と平行に走行するものが多かった (Fig. 8)。基底板に近接した象牙基質中には，内部構造の多様な基質小胞が多数みられたが (Fig. 8)，その多くは高い電子密度を示し (Fig. 9 a)，内部に結晶様構造を含む小胞 (Fig. 9 b) も観察

Fig. 5 Stage II.

a. High magnification of the matrix vesicles (MV) in the developing predentinal matrix seen between the inner enamel epithelial cell (IEE) and predontoblasts. Co: collagen fibril. BL: basal lamina. CV: coated vesicle. CP: coated pit. Ly: lysosomes. Uranyl acetate and lead staining. $\times 33000$

b. A higher magnified electron micrograph of matrix vesicles (MV) containing electron dense inclusions. Uranyl acetate and lead staining. $\times 88000$

された。さらにそれらの基質小胞に混在して針状結晶塊も観察された。基底板付近の膠原線維の周囲には微細果粒状ないし羊毛状構造物が付着し

ていることが多かったが、いわゆる Coarse-Textured Material (Kallenbach²²⁾) に相当する構造物は認められず (Fig. 9a), これは他の Stage で

Fig. 6 Golgi area of the preodontoblast in stage II. Golgi apparatus which is composed of Golgi lamellae (GL), Golgi vesicles and Golgi vacuoles (GV), is surrounded by rough endoplasmic reticulum (ER) showing various dilated cisternae. Mitochondria (M) containing electron dense granules, multivesicular bodies (MVB) and scattered polyribosomes are shown. Uranyl acetate and lead staining. $\times 32000$

も同様であった。

前象牙芽細胞の象牙芽細胞への分化はさらに進み、核の偏在性と細胞小器官の著しい発達で特徴づけられた (Fig. 7)。すなわち、正染色質に富む長円形の核は著しく近心に偏在し、核小体は大きく顕著であった。核の遠心近傍のゴルジ野の周囲には槽状ないし内腔の拡張を示す粗面小胞体が発達し、ゴルジ装置も数層のゴルジ層板、ゴルジ小胞、ゴルジ空胞が顕著に発達していた。しかし濃縮胞ないし分泌果粒はあまり認められなかった (Fig. 10)。散在する多数のミトコンドリアの他に、滑面小胞体、多胞体、水解小体も認められた。上皮様配列した象牙芽細胞は遠心端部に結合装置を持ち、ところどころにターミナルウェブもみられた。遠心端は細胞小器官の少ない、やや明るい細胞質から成る遠心明調野を形成していたが、細胞質突起の発達は悪くわずかに認められる

のみであった (Fig. 7)。

4) Stage IV: 大小の石灰化球が多数形成され、次第にそれらが癒合しはじめる時期に至ると、外エナメル上皮細胞はほとんど消失してみられなくなった。内エナメル上皮細胞もさらに扁平化して、長楕円形の核とわずかな粗面小胞体、ミトコンドリア、遊離リボソームなどが残るだけであって、細胞間結合がなくなり互いに遊離して存在するものが多くなった。同時に周囲結合組織からの膠原線維の侵入もより顕著になった (Fig. 11)。

基板はわずかに残り、その直下から象牙基質の中ほどにかけて多数の結晶塊が観察された (Fig. 11)。基質小胞の多くは結晶様構造を含み、その周囲には直径約 200~400nm 位の結晶塊が多数認められた。結晶塊の多くは膠原線維とは独立して存在しており、その中心部には基質小胞様

Fig. 7 Stage III. Electron micrograph survey of an area where the more developed dentin matrix containing numerous matrix vesicles, is seen between discontinuous inner enamel epithelial cells (IEE) and young odontoblasts. An arrow indicates collagen filaments located between the epithelial cells. Young odontoblasts are characterized by a well developed Golgi apparatus (G) surrounded by rough endoplasmic reticulum (ER) showing somewhat dilated cisternae. The nucleus (N) which is located at the proximal end of the odontoblast is rich in euchromatin and contains a prominent nucleolus. Uranyl acetate and lead staining. $\times 3300$

構造物が認められた。しかし結晶塊の中には周囲の膠原線維へ結晶を伸ばしているものも観察された (Fig. 12a, b, c)。

象牙芽細胞はさらに背丈を伸ばし、正染色質に富み、核小体の顕著な長楕円形の核の近心偏在性がより著しくなった。核の遠心近傍にはゴルジ装

Fig. 8 Stage III. High magnification electron micrograph showing the inner epithelial cell (IEE) and the predental matrix which is characterized by numerous matrix vesicles and irregularly arranged collagen fibrils. TF: tonofilaments. BL: basal lamina, Uranyl acetate and lead staining. $\times 21000$

置と粗面小胞体がよく発達し (Fig. 11), 粗面小胞体は内腔が拡張しているものも多数みられ, ゴルジ装置では特にゴルジ空胞とゴルジ小胞の発達が著しかった。しかし, いわゆる濃縮胞や分泌果粒はまだ余り多くは存在していなかった。被覆小胞や多胞体もゴルジ装置の近くにみられ, 水解小体, 滑面小胞体も散見された (Fig. 13)。ミトコンドリアは細胞質全体に散在し, 微小管, 微細線維が主に細胞の長軸方向に走っていた。細胞質突起中には微小管, 微細線維が発達し, 突起周辺には小胞構造が認められた。象牙芽細胞同士はその細胞質遠心端で結合複合体により結合し, 細胞側壁にも斑状の結合がみられた。

5) Stage V: 一層の明らかな石灰化象牙質が形成され, 未石灰化の象牙前質が区別される時期に至ると, 内エナメル上皮細胞は相互の結合性を完全に失って, 不連続性を示すようになり, 核の

著しい縮小化と粗面小胞体, ミトコンドリア, 遊離リボゾームなどが散在するわずかな細胞質で特徴づけられていた。これらの断裂した内エナメル上皮細胞の間には多数の膠原原線維が侵入していた (Fig. 14)。

内エナメル上皮細胞が石灰化象牙質に接している部分では, 痕跡的な不連続性の基板がみられたが, 膠原原線維が侵入している部分では消失していた (Fig. 14)。象牙前質中にはもはや基質小胞は認められず, 密に配列する膠原原線維は象牙芽細胞の突起周辺を除いては, 主として石灰化前線に平行に走っていた (Fig. 14)。

象牙芽細胞はさらに背丈が伸び, 核は極度の近心偏位を示していた。遠心端には歯頸彎曲方向へ傾斜した突起を有し, 突起の一部は石灰化象牙質中に埋入していた。粗面小胞体の大部分は長い槽状を呈し, ゴルジ装置はより顕著な機能分化像を

Fig. 9 Stage III.

a. Higher magnification of the box in Figure 8 showing matrix vesicles (MV) containing various shaped electron dense inclusions. BL: basal lamina. TF: tonofilament. IEE: inner enamel epithelial cell. Uranyl acetate and lead staining. $\times 98000$

b. High magnification of a matrix vesicle containing crystal-like structures. Uranyl acetate and lead staining. $\times 100000$

示していた (Fig. 15)。すなわちゴルジ装置周辺には、濃縮胞や微細線維と電子密果粒を内在する特殊分泌果粒が出現し、さらに水解小体様構造、多胞体、滑面小胞体もその周囲に散見された (Fig. 16)。ミトコンドリアは全体に散在し、電子密果粒を含むものが多かった (Fig. 15)。遠心明調野ならびに突起には主に微小管、微細線維、特殊分泌果粒、被覆小胞などがみられた。これらの象牙芽細胞は突起の基部で結合複合体を作って互いに結合していた。

II. 組織化学・細胞化学的所見

1. Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活性

光顕的に Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活性の局在を示す硫化鉛の沈着は、歯頸彎曲部に近接した外エナメル上皮細胞に強くみられたが、対応する内エナメル上皮細胞にはきわめてわずかの活性しか認め

られなかった。Stage が進むにつれ、外エナメル上皮細胞にみられた Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活性は急速に減弱し、Stage II から Stage III にかけてはごく弱い活性が内・外エナメル上皮細胞にみられるのみであった。Stage II までの未分化な歯乳頭細胞および前象牙芽細胞には活性の局在は全く認められなかったが、Stage III に至ると象牙芽細胞にも Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活性がみられるようになったが、対応する内エナメル上皮細胞には活性はほとんどみられなくなった。特に内エナメル上皮細胞の活性は内エナメル上皮細胞が連続性を失うころには全く認められなくなった。一方象牙芽細胞にみられた活性は次第に強くなり、象牙基質が石灰化を開始するころに最大の活性が認められた。しかし、一層の石灰化象牙質が形成され、そこに石灰化前線が出現し象牙芽細胞に毛細血管の

Fig. 10 Stage III. Golgi apparatus of a young odontoblast showing well developed Golgi vacuoles (GV) and condensing vacuoles (Con). ER: rough endoplasmic reticulum. Ce: centriole. Ly: lysosome. Uranyl acetate and lead staining. $\times 50000$

介在がみられる Stage V になると， Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活性は徐々に減弱し，ついには消失した。

電顕的には Stage I では内・外エナメル上皮細胞の細胞膜に活性の局在がみられたが，外エナメル上皮細胞では反応はしばしば極めて弱い，または認められなかった。象牙基質，歯乳頭細胞にも活性の局在は認められなかった (Fig. 17)。

Stage II では Stage I と同様，内・外エナメル上皮細胞に反応がみられ，象牙基質中にも弱い反応が散在性にみられるようになった (Fig. 18a)。基質小胞にもわずかながら，その膜の内葉，外葉に沿って反応がみられ，内部にも反応生成物がみられるものもあった (Fig. 18b)。前象牙芽細胞では，反応はほとんどみられなかった (Fig. 19)。

Stage III に至ると，内・外エナメル上皮細胞にみられる反応は著しく弱くなり，ほとんど認め

られなくなった (Fig. 20)。基質小胞における活性は著しく強まり，大部分の小胞はその全体にわたって強い活性を示したが，中にはほとんど活性を示さない基質小胞も存在した (Fig. 21, 22 a, b)。特に内部に結晶様構造のみられる基質小胞には反応はほとんど認められなかった (Fig. 22 a, b)。象牙芽細胞における活性も，細胞膜に沿って明瞭に認められ，また象牙芽細胞に近接する象牙基質中にも散在性の反応がみられた (Fig. 20, 23)。

Stage IV で象牙基質中に多数の結晶塊が出現すると，内・外エナメル上皮細胞には反応がみられなくなった (Fig. 24)。石灰化の進行している象牙基質中の反応は，象牙芽細胞に近接した部分でわずかに点状に認められるだけであった。象牙芽細胞における活性の局在は Stage III と同様に明瞭であった (Fig. 24)。

Stage V に至り一層の石灰化象牙質が形成され

Fig. 11 Stage IV. Electron micrograph survey of an area where numerous dense calciferous spherules are seen between compactly packed collagen fibrils in the predentinal matrix. Flattened inner enamel epithelial cells (IEE) are discontinuous, and young odontoblasts (OB) are characterized by well developed cell organelles and clear distal area (CDA). Uranyl acetate and lead staining. $\times 3700$

ると内エナメル上皮細胞における反応は全く消失し、象牙前質中の活性もほとんどみられなくなった。象牙芽細胞の細胞膜にみられた活性も弱まり、わずかに遠心結合部位に近接した細胞膜に局限して認められた (Fig. 25)。

これらの Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活性の局在は、ATP を含まない反応液を用いた 対照群には認められなかった。

2. ALPase 活性

光顕的に ALPase 活性の局在を示す硫化鉛の沈着は、内・外エナメル上皮細胞にはほとんど認められず、Stage II の前象牙芽細胞ではじめて出現し、Stage III から IV における象牙芽細胞では、象牙基質に面した細胞膜では弱く、遠心結合部位から近心の細胞側壁で強く、それらは象牙芽細胞下層の細胞周辺にも及んでいた。

Stage V に至り、添加的石灰化が開始すると、

象牙芽細胞の ALPase 活性は減弱、消失しはじめ、活性は象牙芽細胞下層に局限して認められるようになった (Fig. 26a, b, c, d, e)。

電顕で観察すると、Stage I では内エナメル上皮細胞の遠心基板側の細胞膜、未分化な歯乳頭細胞の細胞膜とゴルジ装置 (Fig. 27b) に ALPase 活性の局在がみられた。さらに歯乳頭細胞の周囲と象牙基質中にも散在性の反応が認められた (Fig. 27a)。

Stage II に至ると内エナメル上皮細胞の遠心基板側細胞膜における活性は減弱し、逆に前象牙芽細胞の細胞膜における ALPase 活性の反応は強くなった。前象牙芽細胞の周囲および象牙基質中に散在している活性の局在性は Stage I と同様であったが、前象牙芽細胞のゴルジ装置にみられた活性は、やや減弱していた (Fig. 28a)。また基質小胞にもその膜に沿って、あるいはその内部に

Fig. 12 Stage IV. Higher magnified electron micrographs illustrate different appearances of calcifying dentin matrix which is stained by lead.

- a. The matrix vesicle almost completely filled with crystal-like inclusions. $\times 100000$
- b. Small calcified nodule in which the membrane structure of the matrix vesicle is no longer visible. $\times 100000$
- c. A region of calcified matrix shows dense cores or calcified nodules and a calcifying matrix vesicle (single arrow). Double arrows indicate crystals which are deposited in a manner which suggests that they are associated with collagen fibrils. $\times 100000$

反応がみられたが，その強さはさまざまであった (Fig. 28b)。

Stage III では内エナメル上皮細胞の遠心基板側細胞膜における ALPase 活性はほとんど消失し，これに対し象牙芽細胞の細胞膜における活性はさらに強くなったが，象牙芽細胞のゴルジ装置における活性の反応は弱かった (Fig. 29a)。基質小胞における ALPase 活性は著しく強まり，小胞全体に強い反応を示すものが多かったが，内部に結晶様構造を含む小胞には反応がみられなかった (Fig. 29b)。象牙基質中の活性は象牙芽細胞に近接した部分に強く認められた (Fig. 29a)。

Stage IV に至ると内エナメル上皮細胞には活性はみられなくなり，象牙芽細胞膜の活性もやや減少する傾向を示し，反応を示す基質小胞はわずかであった (Fig. 30a, b)。

Stage V では象牙基質中の活性は象牙芽細胞に近接した部分に認められ，象牙芽細胞同士は間隙が広がり，そこにそれまでより大きい鉛粒子の沈着がみられたが，それらは急速に消失して象牙芽細胞下層に限局するようになった。

なお， β -グリセロリン酸を除去した反応液を用いた対照群には ALPase 活性はみられなかった。

考 察

1. ラット切歯舌側象牙質形成の組織・細胞学的特徴

緒言でも述べたように組織学的にはラット切歯舌側象牙質はその表面がエナメル質で覆われている唇側象牙質と比較して，エナメル質が形成されずセメント質で覆われている点が異なっている。したがって切歯を横断面で観察すると唇側は有根

Fig. 13 Golgi area of a young odontoblast in stage IV, showing Golgi vacuoles (GV) and different appearances of condensing vacuoles (Con). Ly: lysosome. ER: endoplasmic reticulum. Uranyl acetate and lead staining. $\times 23000$

歯の歯冠、舌側はその歯根に類似している。

切歯舌側象牙質の有根歯歯根象牙質との類似性に関しては、有根歯歯根形成部位を微細構造学的に検索した Lester²³⁾, Ten Cate²⁴⁾, Owens²⁵⁾らの所見からもうかがえる。すなわち歯頭乳細胞の象牙芽細胞への分化に関する微細構造学的特徴や初期石灰化像ならびに内エナメル上皮細胞の象牙質形成に伴う微細形態の変化は、基本的には本研究の結果と一致しており、外エナメル上皮細胞が内エナメル上皮細胞より早く不連続化する点 (Lester²³⁾, Owens²⁶⁾) についても同様である。ただし、有根歯歯根形成部位では石灰化が開始して一層の象牙質が形成された後も基板が比較的に残り内エナメル上皮細胞の突起がそれを貫くようになる点や、内エナメル上皮細胞の遠心端が象牙質形成の進行に伴い著しく不規則化する点、さらにはこれらの上皮細胞が集団化しマラッセの上皮遺残を作り、その周囲をセメント質が取り囲

むようになる点 (Lester²³⁾) などは切歯舌側象牙質形成部位とは異なり、これらはおそらく、有根歯と無根歯の差に起因するものと考えられる。

エナメル芽細胞へ分化することなく内エナメル上皮細胞のまま結局は互いの結合性が失われていく過程については中原²⁷⁾によってラット切歯の舌側ヘルトビッヒ上皮鞘の電顕的観察でも報告されており、上皮細胞間が開離する前にシャーピー線維の侵入があり上皮細胞が離れるとその間に結合組織細胞が入り込むことを明らかにしているが、上皮細胞と歯乳頭細胞あるいは象牙芽細胞の関係等については触れていない。

すでに述べたようにラット切歯の舌側と唇側の違いはエナメル質形成の有無にある。いいかえれば、内エナメル上皮細胞がエナメル芽細胞へ分化するかが唇舌側の差をもたらしている。この分化は上皮・間葉間の相互作用 Epithelio-Mesen-

Fig. 14 Stage V. Electron micrograph survey of an area where a layer of calcified dentin (D) and predentin (PD) lies between secretory odontoblasts (OB) and the periodontal connective tissue in which cementoblasts (CB) and disrupted inner enamel epithelial cells (IEE) are seen. Uranyl acetate and lead staining. $\times 3200$

chymal Interaction (EMI) として知られており、何らかの情報が上皮・間葉間で受け渡されることにより生ずるとされているが、その詳細については不明な点が多い。上皮・間葉間の誘導に関係して一般に、細胞突起による接触や細胞間物質を介しての誘導が知られており、上皮の分化に関与す

る細胞間物質としてコラーゲンやグリコサミノグリカンが注目されている。Slavkin ら¹⁵⁾ は兎切歯の唇側歯頸彎曲部を電顕的に観察し、歯乳頭細胞の突起 filopodia が内エナメル上皮細胞の基板と接触すること、特に基板に直交してみられる微細線維 microfilaments とその突起との関係を重

Fig. 15 Secretory odontoblasts in stage V are characterized by odontoblast processes (TP) and a well developed Golgi apparatus (G) which is surrounded by rough endoplasmic reticulum showing long canalicular profiles running parallel to the cell axes. Mitochondria with dense interiors are scattered throughout the cytoplasm. N: nucleus with nucleolus. BC: blood capillary. D: calcified dentin. PD: predentin. Uranyl acetate and lead staining. $\times 3200$

視し、その現象を介して EMI の生じている可能性を論じている。一方、本研究においては、歯頸彎曲部から象牙質石灰化部位にかけて、内エナメル上皮細胞と歯乳頭細胞ないし、象牙芽細胞との間には突起を介しての直接像も、また基板へ

の、あるいは基板と直交する微細線維と間葉系細胞突起の直接像は極めてまれにしか観察されなかった。さらにラット舌側象牙質形成部位の内エナメル上皮細胞の基板はその直交する微細線維が有根歯歯胚あるいはゲッ歯類切歯の唇側部とは

Fig. 16 Golgi apparatus of the secretory odontoblast in stage V is made of well developed Golgi vacuoles (GV), and condensing vacuoles. Note that dense small particles have appeared in the condensing vacuoles. Uranyl acetate and lead staining. $\times 50000$

異なり，象牙基質が形成されるに従い不規則化し減少する傾向を示した。このような基板の形態や性状が組織の分化と深い係わり合いを有することはよく知られており（梶川）²⁸⁾，もしSlavkinら¹⁵⁾の主張するようにこれらの基板と関係した微細線維の存在が歯乳頭細胞の突起と関係を持つことが歯牙発生におけるEMIにとって重要であるとするならば，内エナメル上皮細胞のエナメル芽細胞への分化を伴わない舌側における基板ならびに微細線維の唇側と異なった形態学的特徴はその考えを支持する一つの情況証拠となり得る可能性はある。しかし，犬の前臼歯でヘルトビッヒ上皮鞘を電顕観察したOwens²⁶⁾の所見は内エナメル上皮細胞間が開離する頃になると象牙芽細胞の突起が基板に直接接すること，さらに基板の断裂に伴い上皮細胞間に象牙芽細胞の突起が入り込むことを明らかにしており，上皮細胞と間葉細胞の直接接合や，基板の間葉細胞が単に接するのみではEMIの直接要因とはならず，むしろそのような

接触のおこる時期あるいは基板と関係している微細線維をとりまく微小環境との細胞接触が重要な引きがねになっているとも考えられる。さらにCroissant¹⁶⁾らSlavkin一派が提唱しているRNA蛋白複合体を含んだ基質小胞様構造物が拡散性の誘導因子として分泌され，情報伝達をする可能性も否定できないが，本研究ではこの問題に対しては特別な所見を得ることはできなかった。ただ細胞から分泌された拡散性誘導因子はリセプターを介して取り込まれることが考えられ，内エナメル上皮細胞の遠心端細胞膜に多数認められた被覆小窩や被覆小胞はそれらの取り込みに関与している可能性を暗示しているのかもしれない。

ラット舌側象牙質形成部位が唇側や有根歯歯冠象牙質形成と異なる点の一つに象牙基質の膠原原線維の配列が挙げられる。歯冠象牙質と歯根象牙質で線維の配列方向が異なる点についてはKramer²⁹⁾によって光顕的にすでに報告されており，Lester²³⁾もその電顕写真で歯根形成部位の膠原原

Fig. 17 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity.

Stage I. Reaction products are found principally on the lateral plasma membranes of the inner enamel epithelial cells (IEE), but cannot be seen on the dental papilla cells (DP). Lead staining. $\times 12000$

線維が内エナメル上皮細胞の基板に平行に配列していることを示している。寛ら³⁰⁾はラット切歯におけるセメント象牙境の初期像を電顕的に観察し、唇側と比較して細い膠原原線維が不規則に配列しており、唇側のように基板に直交することはないことを明らかにしている。さらに Ten Cate²⁴⁾はマウス臼歯歯胚を用い、歯冠部と歯根部象牙質形成部位を比較してコルプの線維が人工産物である可能性を指摘するとともに、歯冠部と歯根部での膠原原線維の配列が異なり、歯根部ではヘルトビッヒ上皮鞘に平行に配列していることを詳細に観察している。歯冠部と歯根部あるいはラット切歯唇側と舌側でのこのような線維配列の差が何に起因するかは明らかにされておらず、本研究においても結論を導き得るような形態学的知見は得られなかった。しかし一般に上皮の形態が近接する間葉中の膠原線維の配列を規定することは

知られており (Dodson³¹⁾, Berliner³²⁾), 舌側と唇側を比較した場合にもその可能性は大きい。特に基板に直交する微細線維 microfilaments の形態と機能が膠原原線維の配列に直接間接的に作用している可能性は強い。すなわち有根歯歯冠部あるいはゲッ歯類切歯唇側ではよく発達した微細線維をアンカーとして基板に直交した膠原原線維が配列され、舌側あるいは歯根象牙質形成部位では微細線維の不規則な配列とその未発達性から細い膠原原線維が基板に平行に、あるいは不規則に配列するのもかも知れない。一方これらの微細線維の形成は上皮細胞に近接している間葉系細胞から形成された基底膜網状層に相当すると考えられるので、膠原原線維の配列は結局、内エナメル上皮細胞と歯乳頭細胞によって規定されるとも考えられる。歯乳頭細胞から象牙芽細胞へと分化する過程で、細胞はその遠心端に複雑な突起を形成する

Fig. 18 Stage II. Reaction products of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity are seen on the lateral membranes of the inner enamel epithelial cells (IEE) and slightly on the matrix vesicles (arrows) (Fig. 18b). Lead staining. a. $\times 15000$. b. $\times 60000$

が，唇側あるいは有根歯歯冠象牙質形成部位ではこれらの突起の多くが，微細線維と関係しており，そこをアンカーとして細胞は伸張し極性を有する象牙芽細胞へと分化して行く可能性が強く，舌側あるいは有根歯歯根象牙質形成部位では逆に微細線維の発達が悪く，規則性に乏しいため，分化しつつある象牙芽細胞の遠心端突起形成も不規則かつ未発達な様相を呈するのかもしれない。これら歯乳頭細胞や象牙芽細胞の形態学的特徴もまた基質線維の配列に影響を与えるものと考えられるが，その実証はまだない。

なお以上挙げた構造物の他にエナメル質形成を伴う象牙質形成部位には後述する基質小胞や石灰化構造物に混じって微細な果粒状構造物の集積が認められている。Reith⁸³⁾はこれを stippled materials と称し，エナメル基質と考え，Kallenbach²²⁾はこれを coarse-textured materials (以下 CTM と略す)あるいは fine-textured materials (以下

FTM と略す) と称し，エナメル基質との関係を論じている。しかし CTM，FTM あるいは stippled materials に相当する構造物は本研究のラット切歯舌側象牙質形成部位には認められず，従ってこれらの構造物がすくなくともエナメル質形成と何らかの関係を有することを強く示唆している。

ラット切歯舌側象牙芽細胞の分化に伴う形態変化に関しては，すでに緒言で触れたように Takuma & Nagai¹⁷⁾によって詳細に報告されており，本研究によって得られた結果も基本的には同様であった。Takuma らは象牙芽細胞を未分化な歯乳頭細胞から切端側の象牙芽細胞までそれぞれの形態学的特徴によって A：象牙芽細胞へ分化しつつある歯乳頭細胞，B：前象牙芽細胞，C：幼若象牙芽細胞，D：成熟象牙芽細胞，E：短小化した象牙芽細胞の5段階に分けている。このように象牙芽細胞の分化の全過程について微細構造学的に記

Fig. 19 Reaction products of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity are rarely found on the preodontoblasts in stage II. M: mitochondria. ER: rough endoplasmic reticulum. G: Golgi apparatus. Lead staining. $\times 15000$

載したその他の論文としては、マウスの臼歯歯胚での Gartner ら³⁴⁾の報告があり、彼らは pre-polarizing stage, polarizing stage, secretory stage の3段階に分けて論じている。本研究では象牙質石灰化過程を明らかにすることを主目的としたので象牙基質の形態変化を中心に便宜的に歯乳頭細胞から成熟象牙芽細胞に至るまでを5段階に分けた。何れの報告も象牙芽細胞への分化の過程で細胞は著しい極性を持つようになり、同時に粗面小胞体、ゴルジ装置を主体とする細胞小器官の発達

が顕著になり、明らかな蛋白多糖体を形成、分泌する細胞へと変化して行くことを共通所見として示している。しかもその微細構造学的特徴は未分化の歯乳頭細胞の時期からすでに分泌性の蛋白多糖体を形成している可能性を示唆しており、さらに細胞極性が著しくなるにしたがい、粗面小胞体、ゴルジ装置の発達は顕著になり、その微細構造学的特徴は活発に線維形成や骨形成を行っている線維芽細胞や骨芽細胞に類似してくる。特にゴルジ装置は数層のゴルジ槽と羊毛状ないしは微細線

Fig. 20 Stage III. Reaction products of $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ activity are seen on both matrix vesicles and odontoblasts (OB), but not on the inner enamel epithelial cells (IEE). Lead staining. $\times 7200$

維状構造を含んだゴルジ空胞，小さな被覆小胞からなり，本研究で Stage V の時期に近づくと，その周囲には微細線維や微小果粒を含んだ濃縮胞ないしは，いわゆる特殊分泌果粒 (Reith³⁵) が出現してくる。このような発達したゴルジ装置を有する象牙芽細胞は分泌期象牙芽細胞に相当し，その微細構造学的研究は多い。すなわちその微細形態に関しては Takuma & Nagai¹⁷⁾，Gartner³⁴⁾ の他に Reith³⁵⁾ や Nagai ら¹⁾ の研究があり，何れも分泌期象牙芽細胞の微細構造を詳細に観察し，粗面小胞体，ゴルジ装置を中心とした有機基質成分の形成・分泌との関係を論じている。ゴルジ装置ならびに分泌果粒の細胞化学的特徴とコラゲン，多糖体形成を論じた研究には Weinstock & Leblond⁶⁾ や Takagi ら¹¹⁾ による多糖体染色法による研究，Karim ら¹⁰⁾ Leblond 一派による Procollagen I を抗原として用いた免疫電顕細胞化学的研究がある。さらにコラゲンや多糖体の合成分泌過程は

^3H -proline (Reith³⁵⁾，Frank³⁶⁾，Weinstock & Leblond⁶⁾，Kajikawa & Kakiyama³⁷⁾， ^3H -fucose (Weinstock *et al.*³¹⁾ などによる電顕オートラジオグラフィーで明らかにされている。それらの結果は何れもゴルジ装置由来の分泌果粒が procollagen や蛋白多糖体を含んでおり，象牙芽細胞の突起を経て細胞外象牙質中へ開口分泌されることを示唆している。さらにこれら特殊分泌果粒の多くは酸性フォスファターゼ活性が陽性で (Nagai²⁾)，しかもそのあるものは免疫細胞化学的に Cathepsin D を含んでいることも明らかにされている (Nygren *et al.*⁹⁾)。

本研究で観察された Stage IV から V にみられる象牙芽細胞もほとんど同様の形態学的特徴を持ち，活発な基質形成能を有するものと考えられるが，後述する象牙質の添加的石灰化にも重要な役割を果たしている可能性を示している。

II. 舌側象牙質石灰化の特徴

Fig. 21 High magnification electron micrograph showing intense reaction products seen on the matrix vesicles (MV) in stage III. Arrowheads indicate matrix vesicles showing no reaction. BL: basal lamina. IEE: inner enamel epithelial cells. Lead staining. $\times 35000$

象牙質石灰化に関する微細構造学的研究はその多くがゲッ歯類切歯唇側象牙質形成部位と有根歯歯冠象牙質形成部位で行われており、切歯舌側における所見はまだ報告されていない。

一般に象牙質石灰化現象は石灰化開始機構を伴う初期石灰化と、引き続いての石灰化前線でおこる添加的あるいは2次の石灰化に分けて論じられることが多く (Bernard³⁸⁾, 小沢ら³⁹⁾), ここでも便宜的にラット切歯舌側象牙質石灰化をその2段階に分けて論ずることとする。

1. ラット切歯舌側象牙質の初期石灰化

1) 象牙質初期石灰化部位における基質小胞の微細構造学的特徴: 1967年, Anderson⁴⁰⁾ と Bonucci⁴¹⁾ によってそれぞれ石灰化しつつある骨

端硝子軟骨中に生体膜で囲まれた直径約 30nm から 1 μ m 位の小胞構造が発見され、基質小胞 matrix vesicles と命名された。細胞外基質中に存在する基質小胞はその内部にリン酸カルシウムを高濃度に有し、それらがアパタイト結晶へと転移して、生体の石灰化が起ることが指摘されるに及んで、以来初期石灰化機構の重要な担い手として注目される今日に至っている (小澤⁴²⁾, 小澤ら⁴³⁾)。

象牙質の石灰化開始部位に基質小胞様の構造物をはじめて見出したのは Slavkin ら¹⁵⁾, Croissant¹⁶⁾ であったが、彼らはその構造物が RNA を含み、上皮・間葉の相互作用に関与すると考え、石灰化との直接関連付けは行わなかった。その後、象牙質形成部位における石灰化との関連性を論じた研

Fig. 22 Higher magnified views of the same region as Figure 21.

a. Reaction products of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity are located principally on the membranes of the matrix vesicles, but those matrix vesicles having crystal-like inclusions (arrow) are not reactive. Lead staining. $\times 113000$

b. Larger matrix vesicles almost completely filled with intense reaction products of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity. An arrow indicates no reaction products in matrix vesicles having crystal-like inclusions. Lead staining. $\times 111000$

究が相次いで報告され，微細構造学的にはラット臼歯歯胚 (Ozawa & Yajima⁴⁴⁾, Larsson & Bloom⁴⁵⁾, Katchburian⁴⁶⁾, 小沢ら⁴⁷⁾, Katchburian & Severs⁴⁸⁾, Tominaga *et al.*⁴⁹⁾, マウス臼歯歯胚 (Bernard³⁸⁾, Slavkin *et al.*⁵⁰⁾) ラット切歯唇側 (Eisenmann & Glick⁴⁾, Almuddaris & Dougherty⁸⁾, ヒト乳歯歯胚 (Sisca & Provenza⁵¹⁾, ネコ (Hayashi^{52,53)}, メダカ (Yamada & Ozawa⁵⁴⁾), その他，魚類，ハ虫類，両棲類 (小沢ら⁵⁵⁾) でそれぞれ基質小胞の形態学的特徴，結晶形成の過程，基質小胞の形成由来等について論じられている。Kallenbach²²⁾ もラット切歯におけるエナメル芽細胞の分化に関する微細構造学的研究の中で膜に囲まれた細胞外構造について触れているが，石灰化と関係した所見はなく，また石灰化との関係についても論じていない。象牙質初期石灰化機構と基質小胞の関係について詳細な報告を行った論文は Eisenmann & Glick⁴⁾ と Bernard³⁸⁾ で，それぞれラット切歯とマウス臼歯歯胚で観察を行い，基質小胞様構造物が象牙芽細胞の発芽によって形

成され，その中に結晶が出現すること，結晶は小胞中で増加成長し，放射状に膜を破って伸張し，遂には周囲の膠原線維に及んで象牙質石灰化が進行し，それらの癒合によって一層の石灰化象牙質 mantle dentin が作られることを明らかに示している。一層の石灰化象牙質が形成されると象牙前質中にはもはや基質小胞が認められないこともすでに確かめられており，象牙質の石灰化現象も層板骨の場合と同様に，幼若な初期石灰化現象と引き続いて起る成熟型の，あるいは添加的石灰化現象に分けて考えるべきであると主張している (Bernard)³⁸⁾。

ラット切歯舌側象牙質初期石灰化部位ならびに引き続いての添加的石灰化部位における所見は基本的にはほぼ同様であり，エナメル芽細胞の分化しない舌側においても，象牙質の形成，石灰化は他の部位と変わらないことが確認された。

Katchburian⁴⁶⁾ はラット臼歯歯胚を用い，基質小胞 (membrane-bound bodies) の微細構造を詳細に観察し，膜形態の類似性から基質小胞が象牙

Fig. 23 Reaction products of $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ activity seen on young odontoblasts in stage III. G: Golgi apparatus. ER: rough endoplasmic reticulum. Lead staining. $\times 15000$

芽細胞の細胞膜に由来し、形成された基質小胞はその時すでにリン酸カルシウムを含んでいる可能性を示唆している。さらに基質小胞の中には水解小体様構造物も混在しており、Thyberg & Friberg^{56,57)} が軟骨組織で指摘しているように、基質をより石灰化しやすい状態に変化させる作用を水解小体様基質小胞が営んでいる可能性がある

と論じている。基質小胞の形態が多様であることは Slavkin ら⁵⁸⁾ によっても指摘されており、形態の多様性は機能の多様性も有するとしており、後述する細胞化学的研究もその多様性を支持している。本研究の結果もその大きさや内容の微細形態等はある程度の多様性を示唆しているものの、そのほとんどは出現初期のものは比較的内容が明る

Fig. 24 Stage IV. Reaction products of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity are seen on the lateral plasma membranes of the odontoblasts (OB) as well as on the matrix vesicles lying between calcifying dentin and predentin matrix (white arrows). No reactions can be seen on the inner enamel epithelial cells (IEE). Lead staining. $\times 4300$

く，しかも少数で，それらは次第に数を増すとともに内部に電子密度の高い物質が充満するようになり，遂には結晶様構造物が出現するという，基質小胞内の石灰化過程を暗示するような形態変化によるものが大部分である。従って臼歯歯胚や軟骨基質中にみられるような多様性は形態的にも機能的にも少ないものと考えられ，舌側象牙質中

にみられる基質小胞は石灰化のためにのみ作用を営むものが大部分を占める可能性を示唆している。なぜこのような差が同じ象牙質形成部位でみられるかについては確かなことは不明であるが，比較解剖学的には，エナメル質をもたないメダカの歯の象牙質形成部位に出現する基質小胞はほぼ同一形態を有し，ほとんど象牙質石灰化開始機構

Fig. 25 Stage V. Reaction products of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity are rarely found on the lateral plasma membranes (arrowheads) of secretory odontoblasts (OB), but no reaction products can be seen on the inner enamel epithelial cells (IEE). Lead staining. $\times 4500$

に關与するが (Yamada & Ozawa⁵⁴⁾), さらに高等動物になると, 例へばエナメル質を有するカナヘビやカエルの歯の象牙質石灰化部位に出現する基質小胞様構造物は多様となり, 直接結晶化と關係する基質小胞はその一部にすぎなくなる (小沢ら⁵⁵⁾) ことが知られており, 少なくとも歯においてはエナメル質形成の有無によって基質小胞様構造物の形態多様性が異なる可能性を示唆しているように思われる。すなわち, エナメル質形成, いいかえると内エナメル上皮細胞のエナメル芽細胞への分化を誘導する特殊な基質小胞が多様な形態を示す基質小胞様物質中に含まれている可能性 (Slavkin *et al.*)¹⁵⁾, あるいは象牙質石灰化に引き続いて起るエナメル質形成のために, 基質小胞様構造物の中には直接石灰化に關与するものの他

にある種のプロテアーゼ等, 微小環境を変化させるための物質を含んだ基質小胞様構造物が存在するのかも知れない。何れにしても, この基質小胞の多様性に関する問題は今後の研究課題の一つとして残されている。

基質小胞性石灰化過程を形態学的に把える時, 重要な所見の一つにカルシウム, リン等のミネラルや結晶の局在性が挙げられる。本研究においても基質小胞中に電子密な物質が, 象牙質形成の進行に従い次第に貯留し, 次いで結晶構造へと置き変わっていく過程と, これらの構造物が脱灰操作によってほとんど消失することを明らかにした。結晶出現以前に基質小胞中に貯留するミネラルがリン酸カルシウムであるか否かは本研究では結論できないが, 他の象牙質石灰化部位において基質小

Fig. 26 Light micrographs of the location of alkaline phosphatase (ALPase) activity of the rat maxillary incisor at the lingual side.

- a. Stage I. No reaction products can be seen.
- b. Stage II. Reaction products are seen on the preodontoblasts.
- c. Stage III. Reaction products are intense in the odontoblasts and subodontoblastic layer.
- d. Stage IV. Reaction products are seen on the odontoblasts and also intensely around the subodontoblastic layer cells. No reactions occur on the inner enamel epithelial cells.
- e. Stage V. Reaction products are principally seen around the subodontoblastic layer cells. Epon sections and methylene blue staining. $\times 440$

胞とミネラルの関係を検索した結果 (Ozawa & Yajima⁴⁴⁾, Almuddaris & Dougherty⁸⁾, Ozawa *et al.*¹²⁾) から、基質小胞中にはカルシウム、リンが貯留されていることが推測される。すなわち、Ozawa & Yajima⁴⁴⁾ はカルシウムと結合して不溶性沈澱を生ずるピロアンチモン酸カリ (PPA) を用いて基質小胞におけるカルシウムの局在をラット臼歯歯胚で明らかにしており、Almuddaris & Dougherty⁸⁾ は通常の固定液によってもカルシウムの存在を基質小胞中に示し得るとし、特に基質小胞膜にカルシウムがリン酸と結合した形で局在することを示し、Katchburian⁴⁶⁾ の仮説を支持している。Ozawa ら¹²⁾ はまた固定液中にカルシウムを加えることにより、結合性のカルシウムの流

失を防ぎ、象牙芽細胞の細胞膜と基質小胞にカルシウムが局在することを元素分析法を用いて明らかにし、さらにカルシウムの局在を確実にするために、無固定急速凍結切片法を導入し、基質小胞中のリン酸カルシウムの局在を確かなものに行っている。しかも鉛をトレーサーとして用いた実験を行い基質小胞中には投与した鉛が取り込まれ、カルシウムと置換してリン酸鉛の形で沈着すること、それらの鉛は象牙芽細胞の細胞膜中にも見出され、基質小胞の形成についても論じている。

2) 基質小胞性石灰化機構についての細胞化学的考察

以上のごとく、ラット舌側象牙質石灰化開始部位では基質小胞性の石灰化が生じている可能性が

Fig. 27 Stage I. Electron micrograph survey of ALPase activity. Reaction products are principally seen on the preodontoblasts and slightly on the distal plasma membranes of the inner enamel epithelial cells(IEE). (Fig. 27a). b. Higher magnification of the box in Figure 27a, showing reaction products on the Golgi apparatus (G). Lead staining. a. $\times 7200$, b. $\times 50000$

微細構造学的に明らかにされたが、基質小胞性石灰化機構については未だ不明な点が多く残されているのが現状である。

一般に基質小胞は強いアルカリ性フォスファターゼ (ALPase), ATPase, ピロフォスファターゼ (PPase) 活性を有し、主として局所におけるリン酸イオン濃度の押し上げ、カルシウムの能動輸送、非結晶性リン酸カルシウムの安定剤として ATP の加水分解による除去、さらに、結晶毒として知られているピロリン酸の加水分解による除去等を行っており、しかもカルシウムに強い親和性を有する酸性リン脂質を高濃度に含んでいることなどが明らかにされている (小澤^{42,43})。

ALPase や ATPase (Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase) が強い活性局在を示すことは、本研究において切歯舌側象牙質形成部位でも明らかにされ、ラット臼歯歯胚や切歯唇側象牙質での Mg^{2+} -ATPase (Ozawa

& Yajima⁴⁴), ALPase (Larsson⁵⁹), Orams & Snibson¹³), Ca^{2+} -ATPase (杉沢⁶⁰) 及びピロフォスファターゼ (Larsson⁶¹) の活性局在の結果とほぼ一致した所見と考えられる。基質小胞の膜に沿って、あるいは内部を満たすように観察された Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase や ALPase がいかなる機能的意義を持つかについては明確に論ずることはできないが、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase, ALPase 共に、結晶構造が内在している基質小胞にはほとんど活性が認められず、従って結晶化を起すために必要とされ結晶化の過程を調整する酵素であることは明らかである。現在、基質小胞における Ca^{2+} -ATPase についてはカルシウムの能動的取り込み説よりはむしろ ATP の除去とリン酸の押し上げに関与し、結晶化を調整していると考えられており、また ALPase に関しては局所のリン酸イオン濃度の押し上げとともに、ピロフォスファターゼ

Fig. 28 Stage II. Reaction products of ALPase activity are intense on the predontoblasts and slight on the distal plasma membranes of the inner enamel epithelial cells (IEE). (Fig. 28a). Reaction products are also seen diffusely in the predentinal matrix in which some matrix vesicles are slightly reactive (Fig. 28b, c). Lead staining. a. $\times 7600$, b, c. $\times 48000$

としても作用し、ピロリン酸の除去にも関与しているものと考えられているが(小澤¹²⁾、基質小胞性石灰化理論の確立のためには生化学的にも形態学的にもより多くの研究が必要とされよう。

Orams と Snibson¹³⁾ はまた ALPase 活性が proteoglycans や phosphoprotein のようなカル

シウムと強く結合している構造物を分解し、そこからカルシウムを遊離させる作用がある可能性を論じており、基底板に直交して存在する線維は膠原線維の幼若型ではなく、proteoglycan であり、そこに沿った ALPase 活性の局在を示している。同様な所見は本研究における ALPase や

Fig. 29 Stage III.

a. Intense reaction products of ALPase activity are found on the young odontoblasts, matrix vesicles and in the predental matrix closely associated to the distal end of the odontoblasts. No reaction products can be found on the inner enamel epithelial cells (IEE).

b. Higher magnification of the arrow in Figure 29a, showing intense reactions on matrix vesicles. Note no reaction products on the matrix vesicles having crystal-like inclusions (arrowheads). Lead staining. a. $\times 3200$, b. $\times 85000$

Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase の場合にも認められているが (Figs. 21, 28), 果してそれらが Orams らが考えているような機能を意味するか否かは不明である。

一方、基質小胞にも多糖体の局在が細胞化学的に検出されており (Bonucci⁶²⁾, Silbermann & Frommer⁶³⁾, Scherft *et al.*⁶⁴⁾, Kogaya *et al.*⁶⁵⁾), 基質小胞に結合している蛋白多糖体がカルシウムを集める能力を有している可能性が論じられている。細胞化学的に基質小胞に検出された ALPase 活性の局在は、Orams & Snibson¹³⁾ の主張するように基質小胞に結合している蛋白多糖体を分解し、そこで遊離のカルシウムイオンの押し上げを行い、同時に遊離してきたリン酸イオンと結合して石灰化を導く可能性も否定できない。さらに最

近骨端軟骨から分離した基質小胞にはある種のプロテアーゼが存在することも確かめられており (藤原⁶⁶⁾, Fujiwara *et al.*⁶⁷⁾), その基質小胞性石灰化に果たす役割についての作業仮説も提唱されている。

3) 基質小胞の由来に関する細胞化学的考察

従来、一般に基質小胞の由来については細胞膜の発芽性分泌説、開口分泌説、細胞の変性、死による全分泌説などがあり、結論は得られていない (小沢ら⁴⁷⁾)。象牙質石灰化においても同様であり、Zinc-Iodide-Osmium (ZIO) 染色で基質小胞と前象牙芽細胞のゴルジ-滑面小胞体との染色性の一致性から、基質小胞の由来を論じている報告 (Uchida & Ozawa⁶⁸⁾) も含め、多くの報告は象牙芽細胞からの発芽説を有力視している。しか

Fig. 30 Stage IV. ALPase activity in the odontoblasts (OB) in association with the plasma membranes (a, b). Reaction products are also diffusely seen in the predental matrix in the vicinity of odontoblasts and matrix vesicles (arrowheads). No significant reaction can be found on the inner enamel epithelial cells (IEE). G: Golgi apparatus. N: nucleus. Lead staining. a. $\times 11000$. b. $\times 11000$

し直接的に発芽を示した所見は少なく，僅かに Slavkin⁶⁹⁾，小沢ら⁴⁷⁾，Yamada & Ozawa⁵⁴⁾，Almuddaris & Dougherty⁸⁾のみで他は推測の域をでない。本研究の結果も微細構造学的には直接発芽を明確に示す像は得られず，透過電顕の方法で発芽性分泌所見を得る確率の低さを再認識すると

ともに，今後固定法等の検討が重要であることを確認した。しかし，その他の方法でも象牙質の基質小胞が象牙芽細胞の細胞膜に由来していることを示唆している所見がある。すなわち凍結割断法で象牙芽細胞の突起と基質小胞の膜内粒子の共通性を示した所見 (Katchburian & Severs⁴⁸⁾，To-

minaga *et al.*⁴⁹⁾) はより直接的に象牙芽細胞の細胞膜と基質小胞の関連性を示唆しており、さらに免疫細胞化学的手法で象牙芽細胞と基質小胞の組織調和性抗原が一致することを示した Slavkin ら⁵⁰⁾ の研究も両者の膜の共通性を明らかにしている。なお、前述のごとく Almuddaris & Dougherty⁸⁾ は基質小胞膜と象牙芽細胞の細胞膜に沿って高電子密果粒が点在する所見を示し、それらが結合性カルシウムである可能性を指摘し、基質小胞が細胞膜の発芽性突起形成に起因するとしている。本研究でも象牙芽細胞の細胞膜と基質小胞に同様の果粒構造を認め、しかもそれらの果粒は鉛染色で強染されるところから鉛染色時にカルシウムと鉛が置換された結果と考えている。象牙芽細胞の細胞膜に結合したカルシウムが、基質小胞中に組み入れられる可能性は、石灰化部位で鉛とカルシウムの置換作用が起る現象を利用して行った鉛のトレーサー実験でも示されている (Ozawa *et al.*¹²⁾)。すなわち、ラットに投与された Pb-EDTA は、速やかに象牙芽細胞に取り込まれ、ゴルジ装置を経由して細胞膜に輸送され、細胞膜に結合することが示されており、それらは恐らく発芽性の突起形成と分泌時の細胞膜の癒合にも関与し、基質小胞中に組み込まれて細胞外へ分泌されると考察されている (小沢⁴²⁾)。

基質小胞の由来を検索する他の方法として酵素細胞化学的方法が知られている。特に ALPase は基質小胞の最も重要な酵素の一つであり、細胞化学的にも検出しやすいために、この酵素の局在性の共通性から基質小胞の由来を論じた研究は多い。象牙質形成に関しては Larsson⁵⁹⁾ はラット臼歯歯胚で、Orams & Snibson¹³⁾ はラット切歯唇側でそれぞれ ALPase 活性局在の検出を行い、象牙芽細胞の細胞膜と基質小胞膜の共通性を示唆している。本研究においても基質小胞の ALPase 活性の局在は象牙芽細胞の細胞膜における局在とほぼ一致することから、大部分の基質小胞は Stage II から III にかけて ALPase 活性の強い象牙芽細胞の細胞膜から形成されることを示唆している。

一方、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性の局在性と基質小胞との関係はやや ALPase 活性とは異なっていた。すなわち、ラット切歯舌側象牙質形成部位に

おける $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性の局在は、Stage I から II にかけては内エナメル上皮細胞の細胞膜に強く、歯乳頭細胞や分化しつつある象牙芽細胞には $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性はほとんど認められず、この時期における基質小胞の酵素活性が内エナメル上皮細胞に由来する可能性を示している。しかし Stage II から III にかけては内エナメル上皮細胞の酵素活性は急激に減弱し、かわって象牙芽細胞の細胞膜の活性が強くなり、同時に基質小胞の酵素活性も Stage II から III に進むにつれ強まるため、この部位では明らかに基質小胞の酵素活性は象牙芽細胞に由来し、その形成由来も象牙芽細胞の細胞膜に求めるのが妥当であるように思われる。

$\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性の局在性は、しかしながら舌側と唇側とはまったく異なっている。すなわち、唇側では $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ は象牙芽細胞や歯乳頭細胞には全く検出されず、内エナメル上皮細胞とエナメル芽細胞ならびに基質小胞にのみその酵素活性が検出され (Takano *et al.*¹⁹⁾)、従って唇側では少なくとも基質小胞にみられた $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性は内エナメル上皮細胞ならびにエナメル芽細胞にその由来を求めざるを得ず、この場合でももし基質小胞の由来を象牙芽細胞に求めるとするならば、基質小胞に一致してみられた酵素は上皮側から分泌され、基質小胞に結合したものと考えられる。舌側と唇側のこのような相違がいかなる生物学的意義を有するかは不明であるが、舌側では内エナメル上皮細胞はエナメル芽細胞へは分化せず、結局退化してしまうために、本来エナメル芽細胞が必要とする $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性を途中から象牙芽細胞が肩がわりして持つようになったのかも知れない。これらの点については今後さらに検討が必要と考えられる。

2. ラット切歯舌側象牙質の添加的石灰化

象牙質では一旦連続した一層の石灰化象牙質が形成されると、もはや基質小胞は認められず、象牙芽細胞層を介した添加的石灰化が石灰化前線に起るとされている。本研究におけるラット切歯舌側においても同様で、一旦石灰化象牙質層が形成されると基質小胞は観察されなかった。

基質小胞の関与なしに石灰化前線で起る象牙芽

細胞による添加的石灰化がどのようにして生ずるのかについては不明な点が多い。しかしカルシウムに強い親和性を有するリンタンパク質が象牙芽細胞によって作られ石灰化前線に運ばれる可能性 (Weinstock & Leblond⁵¹⁾) や、結合性のカルシウムがゴルジ装置を経て分泌果粒中に組み込まれ分泌される可能性がピロアンチモン酸法を用いて細胞化学的に検索された結果示唆されており (小沢⁷⁰⁾, Reith⁷¹⁾, Appleton & Morris⁷¹⁾), さらに ^{45}Ca オートラジオグラフィの結果 (Nagai & Frank⁷²⁾) も細胞内のカルシウム輸送の可能性を示している。象牙芽細胞層を介してのカルシウム輸送経路については、従来より細胞間と細胞内の2つの経路があるとされているが (小沢⁷⁰⁾, Reith⁷¹⁾, Tanaka⁷³⁾), 特に添加的石灰化部位における象牙芽細胞は細胞間結合も発達し, tight junction も顕著になってくるので, 石灰化前線への細胞内カルシウム輸送の可能性は強いものと考えられる。本研究においても添加的石灰化部位に近接するに従い, ゴルジ装置由来の分泌果粒の形態が特徴的になり, 内部にコラーゲンの前駆線維と共にカルシウムを含むといわれる分泌果粒 (小沢⁷⁰⁾, Reith⁷¹⁾, Appleton & Morris⁷¹⁾) が増加してくることが明らかに観察され, 添加的石灰化へと象牙芽細胞が機能分化を開始したことを示しているものと思われる。

さらに $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ の局在性は象牙芽細胞を介してのカルシウムの能動輸送を示唆している。象牙芽細胞の ATPase は Ca^{2+} と Mg^{2+} で活性化され ALPase とは異なった酵素であることが指摘されており (Granström *et al.*⁷⁴⁾), さらに象牙芽細胞における $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ は, 生化学的には至適 pH 9.8 で, 石灰化前線へのカルシウムの能動輸送に関係する可能性が論じられている (Granström & Linde⁷⁵⁾)。

しかしながら組織化学的には Magnusson⁷⁶⁾, Magnusson & Linde⁷⁷⁾, Mörnstad & Sundström⁷⁸⁾ らによって ATPase の反応が歯胚で観察されているが, 象牙芽細胞に関する所見は乏しく, エナメル芽細胞との関係が主として論じられている。また, 象牙芽細胞の $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性を電顕的に検出した所見は Granström ら⁷⁹⁾ のカドミウム

法による pH 9.4 の結果と, 杉沢⁶⁰⁾ の中性領域における Wachstein-Meisel 法による結果のみであり, いずれも反応はゴルジ小胞やゴルジ層板に局限して観察されており, pH 7.4 での杉沢の観察では石灰化前線や一部の基質小胞にも反応が認められているが, 象牙芽細胞の細胞膜には局在性は認められておらず, 従って細胞膜を介してのカルシウムの能動輸送に関しては記載がない。これらの結果は, 主として象牙芽細胞の細胞膜に局限して認められた本研究とは異なるが, この違いは主として固定法, pH, 沈澱剤等の違いによる方法論上の差に起因するものと考えられ, 今後さらに検討を行うつもりである。

結 論

エナメル質の形成がおこらないラット切歯舌側において, 象牙質形成に伴う内エナメル上皮細胞と象牙芽細胞の変化, 象牙基質の特徴, 特に基質小胞の形態, 由来等を明らかにするために, 微細構造学および酵素細胞化学的に検索してエナメル芽細胞のみられる唇側と比較検討を行って以下の結論を得た。

1) 内・外エナメル上皮細胞は象牙基質形成の進行に伴い退化し, 石灰化象牙質が形成されると周囲の結合組織中に埋めこまれその多くは消失した。

2) 象牙芽細胞は唇側と同様な特徴を持って歯乳頭細胞から分化したが, わずかに遠心端の突起の形態が異なっていた。

3) 象牙基質中の膠原原線維は唇側と異なって基板と平行に配列していた。基板から伸びる微細線維は細胞分化に伴い急速に配列が乱れ石灰化開始時にはほとんど消失していた。これらの特徴は有根歯歯根象牙質形成に類似していた。

4) 基質小胞は歯乳頭細胞に極性が生じる時期に出現し, 次第に数と内部の電子密度を増し, ついには多数の結晶が小胞外へ伸び, 結晶塊が集積, 癒合して石灰化象牙質を形成した。以上の過程は唇側象牙質とほぼ同様であったが, 唇側に比べ基質小胞の形態多様性は少なく, また唇側象牙質形成部位にみられるいわゆる CTM あるいは stippled materials がみられない点が異なっていた。

5) $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性は象牙芽細胞が未分化な時期には主として内エナメル上皮細胞にみられ、象牙芽細胞の分化とともに内エナメル上皮細胞の活性は消失し、かわって象牙芽細胞にみられるようになった。基質小胞にも早期から活性がみられその酵素の由来は主として象牙芽細胞であろうと考えられたが一部は内エナメル上皮細胞の可能性も示唆された。なお唇側では、酵素活性はエナメル芽細胞にのみ認められ、その局在性は舌側とは著しく異なっていた。ALPase は唇側とほぼ同様に主として象牙芽細胞に局在しており、分

化に伴うその活性局在部位の変化は基質小胞の活性局在の変化とほぼ一致することから基質小胞の象牙芽細胞由来が示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究の遂行に終始変らぬ熱意を持って御指導、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澤英浩教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を進めるにあたり終始御助言、御援助いただきました口腔解剖学第一教室員の皆様はじめ、大阪大学歯学部口腔解剖学第一教室高野吉郎助教授、岡山大学歯学部口腔解剖学第一教室山本敏男助教授に心より感謝の意を表します。

抄録：エナメル質形成がおこらないラット切歯舌側象牙質において基質小胞の形態、由来等を明らかにするために、微細構造学的、酵素細胞化学的に検索し、唇側象牙質と比較検討した。

材料は雄ラットの上顎切歯舌側を用い微細構造観察にはグルタルアルデヒド、オスミウム酸の二重固定を施し非脱灰切片を透過電顕で観察した。酵素細胞化学には Sundström and Mörnstad の変法で $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性を、Mayahara らの方法で ALPase 活性を検出した。

象牙基質の特徴と象牙芽細胞の分化の状態に基づき、未分化な状態から一層の石灰化象牙質の出現まで便宜的に Stage I から V までを区分した。その結果、内・外エナメル上皮細胞は象牙基質形成とともに退化し Stage V では周囲結合組織中に埋めこまれ、その多くは消失した。一方、歯乳頭細胞から分化した象牙芽細胞は遠心端の突起の形態を除けば唇側とほぼ同様であった。

象牙基質は膠原原線維の増加とともに、その厚さが増加したが、線維の配列は基底板と平行であり、唇側での基底板に垂直に配列する膠原原線維とは異なっていた。基底板には垂直方向に配列する微細線維がみられたが細胞分化に伴いその配列は急速に乱れ、石灰化開始時にはほとんど消失していた。

基質小胞は Stage II から出現し、しだいに数を増すとともに内部の電子密度が高まり Stage III では結晶構造を含むものが多くなった。Stage III から Stage IV にかけては多数の結晶塊が象牙質の基底板側に偏って集積するようになった。これは互いに癒合し、Stage V で一層の石灰化象牙質を形成した。以上の過程は唇側とほぼ同様であるが、基質小胞の形態は唇側ほど多様でない点、また唇側象牙質に出現するいわゆる CTM あるいは stippled materials に相当する構造はみとめられなかった。

$\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性の局在は未分化な時期には主として内エナメル上皮細胞にみられたが、これらの反応は象牙芽細胞の分化とともに急速に弱まり、消失し、かわって象牙芽細胞に活性局在がみられるようになった。基質小胞にも同酵素活性が早期からみられ、その酵素の由来は主として象牙芽細胞に求められるものの一部は内エナメル上皮細胞由来が示唆された。なお唇側においては本酵素の局在はエナメル芽細胞のみにみられ、細胞分化に伴い酵素活性の局在性が著しく異なることを明らかに示していた。一方、ALPase は唇側とほぼ同様で主として象牙芽細胞に局在し $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性とともに基質小胞の象牙芽細胞の細胞膜由来を強く示唆していた。

以上の結果から基質小胞の由来とその機能的役割、特に初期石灰化機構との関連性を論じた。

文 献

- 1) Nagai, N.: Electron microscopy of the cytoplasmic bodies in the odontoblasts of young rat incisors. Bull. Tokyo Dent. Coll. 11 : 47-83, 1970.
- 2) Nagai, N.: Ultrastructural localization of acid phosphatase in odontoblasts of young rat incisors. Bull. Tokyo Dent. Coll. 11 : 85-120, 1970.
- 3) Weinstock, A., Weinstock, M. and Leblond, C. P.: Autoradiographic detection of ^3H -fucose incorporation into glycoprotein by odontoblasts and its deposition at the site of calcification front in dentin. Calcif. Tissue Res. 8 : 181-189, 1972.

- 4) Eisenmann, D. R. and Glick, P. L. : Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. *J. Ultrastruct. Res.* **41** : 18-28, 1972.
- 5) Weinstock, M. and Leblond, C. P. : Radioautographic visualization of the deposition of a phosphoprotein at the mineralization front in the dentin of the rat incisor. *J. Cell Biol.* **56** : 838-845, 1973.
- 6) 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.
- 7) Appleton, J. and Morris, D. C. : An ultrastructural investigation of the role of the odontoblast in matrix calcification using the potassium pyroantimonate osmium method for calcium localization. *Archs. Oral Biol.* **24** : 467-475, 1979.
- 8) Almuddaris, M. F. and Dougherty, W. J. : The association of amorphous mineral deposits with the plasma membrane of pre-and young odontoblasts and their relationship to the origin of dentinal matrix vesicles in rat incisor teeth. *Am. J. Anat.* **155** : 223-244, 1979.
- 9) Nygren, H., Persliden, B., Hansson, H.-A. and Linde, A. : Cathepsin D: Ultra-immunohistochemical localization in dentinogenesis. *Calcif. Tissue Int.* **29** : 251-256, 1979.
- 10) 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.
- 11) Takagi, M., Parmley, R. T. and Denys, F. R. : Ultrastructural localization of complex carbohydrates in odontoblasts, predentin, and dentin. *J. Histochem. Cytochem.* **29** : 747-758, 1981.
- 12) Ozawa, H., Yamada, M. and Yamamoto, T. : Ultrastructural observations on the location of lead and calcium in the mineralizing dentine of rat incisors. In : *Matrix Vesicles. Proc. 3rd Int. Conf. Matrix Vesicles* (Ascenzi, A., Bonucci, E. and de Bernard, B. eds) 179-187, Wichtig Editore s. r. l. Milano Italy, 1981.
- 13) Orams, H. J. and Snibson, K. J. : Ultrastructural localization and gradient of activity of alkaline phosphatase activity during rodent odontogenesis. *Calcif. Tissue Int.* **34** : 273-279, 1982.
- 14) 神尾則光：副甲状腺機能の欠落による歯の石灰化像の変化。歯学 **64** : 779-810, 1976.
- 15) Slavkin, H. C., Bringas, P. and Bavetta, L. A. : Ribonucleic acid within extracellular matrix during embryonic tooth formation. *J. Cell Physiol.* **73** : 179-190, 1969.
- 16) Croissant, R. D. : Isolation of an intercellular matrix "RNA-protein complex" during odontogenesis. *J. Dent. Res.* **50** : 1065-1071, 1971.
- 17) Takuma, S. and Nagai, N. : Ultrastructure of rat odontoblasts in various stages of their development and maturation. *Archs. Oral Biol.* **16** : 993-1011, 1971.
- 18) Sundström, B. and Mörnstad, H. : Lead citrate-containing media for use at alkaline pH: their stabilization with glucose and increased buffer strength. *Stain Technol.* **50** : 287-288, 1975.
- 19) Takano, Y., Ozawa, H. and Crenshaw, M. A. : Localization of Ca-ATPase and ALPase activities at the initial calcification sites of dentin and enamel. In : *Endocrine control of bone and calcium metabolism. Vol 8B* (Cohn, D. V., Potts Jr, J. T. and Fujita, T. eds), p. 438-440, International Congress Series 635, Excerpta Medica, Amsterdam-New York-Oxford, 1984.
- 20) Yoshiki, S., Umeda, T. and Kurahashi, Y. : An effective reactivation of alkaline phosphatase in hard tissues completely decalcified for light and electron microscopy. *Histochemie* **29** : 296-304, 1972.
- 21) 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 (Orthophosphoric monoester phosphohydrolase) *Histochemie* **11** : 88-96, 1967.
- 22) Kallenbach, E. : Electron microscopy of the differentiating rat incisor ameloblast. *J. Ultrastruct. Res.* **35** : 508-531, 1971.
- 23) Lester, K. S. : The incorporation of epithelial cells by cementum. *J. Ultrastruct. Res.* **27** : 63-87, 1969.
- 24) Ten Cate, A. R. : A fine structural study of coronal and root dentinogenesis in the mouse : observations on the so-called 'von Korff fibres' and their contribution to mantle dentine. *J. Anat.* **125** : 183-197, 1978.
- 25) Owens, P. D. A. : A light and electron microscopic study of the early stages of root surface formation in molar teeth in the rat. *Archs. Oral Biol.* **24** : 901-907, 1980.
- 26) Owens, P. D. A. : Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root

- development in premolar teeth in dogs. *Archs. Oral Biol.* **23** : 91-104, 1978.
- 27) 中原 皓, 笥 光夫 : ラット切歯におけるヘルトウィッヒ上皮鞘と初期シャーピー線維の電子顕微鏡による研究. 城歯大紀要 **5** : 7-11, 1976.
 - 28) 梶川欽一郎 : 結合組織, 第1版, 377-378, 金原出版, 東京, 1984.
 - 29) Kramer, I. R. H. : The distribution of collagen fibrils in the dentine matrix. *Br. Dent. J.* **91** : 1-7, 1951.
 - 30) 笥 光夫, 中原 皓, 北村尚子 : ラット切歯における初期エナメル象牙境とセメント象牙境の微細構造. 城歯大紀要 **6** : 7-10, 1977.
 - 31) Dodson, J. W. : On the nature of tissue interactions in embryonic skin. *Exp. Cell Res.* **31** : 233-235, 1963.
 - 32) Berliner, J. : The effects of the epidermis on the collagenous basement lamella of anuran larval skin. *Dev. Biol.* **20** : 544-562, 1969.
 - 33) Reith, E. J. : The early stage of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *J. Ultrastruct. Res.* **17** : 503-526, 1967.
 - 34) Gartner, L. P., Seibel, W., Hiatt, J. L. and Provenza, D. V. : A fine-structural analysis of mouse molar odontoblast maturation. *Acta Anat.* **103** : 16-33, 1979.
 - 35) Reith, E. J. : Collagen formation in developing molar teeth of rats. *J. Ultrastruct. Res.* **21** : 383-414, 1968.
 - 36) 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.
 - 37) Kajikawa, K. and Kakiyama, S. : Odontoblasts and collagen formation : an ultrastructural and autoradiographic study. *J. Electron Microsc.* **23** : 9-17, 1974.
 - 38) Bernard, G. W. : Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel. *J. Ultrastruct. Res.* **41** : 1-17, 1972.
 - 39) 小沢英浩, 岩久彦彦, 山田まりえ, 高野吉郎, 山本敏男, 内田 隆 : 歯髄に関するトピックス. 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.
 - 40) Anderson, H. C. : Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J. Cell Biol.* **35** : 81-101, 1967.
 - 41) Bonucci, E. : Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* **20** : 33-50, 1967.
 - 42) 小澤英浩 : 基質小胞性石灰化について細胞生理学的最近の知見. 結合組織. **15** : 1-12, 1983.
 - 43) 小澤英浩, 高野吉郎, 山本敏男, 江尻貞一, 山田まりえ : 生物学的石灰化機構の最近の知見. 第21回河口湖カンファレンス「カルシウム代謝とホルモン」(尾形悦郎, 須田立雄, 藤田拓男編), p. 59-76, 医歯薬出版, 東京, 1984.
 - 44) Ozawa, H. and Yajima, T. : Ultrastructure and cytochemistry of matrix vesicles in the developing cartilage and tooth germ. In : *Proceedings of the Fourth International Congress of Histochemistry and Cytochemistry*. Kyoto Japan, p. 311-312, 1972.
 - 45) Larsson, Å. and Bloom, G. D. : Studies on dentinogenesis in the rat. Fine structure of developing odontoblasts and predentin in relation to the mineralization process. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **139** : 227-246, 1973.
 - 46) Katchburian, E. : Membrane-bound bodies as initiators of mineralization of dentine. *J. Anat.* **116** : 285-302, 1973.
 - 47) 小沢英浩, 山田まりえ, 矢嶋俊彦 : 基質小胞石灰化に関する微細構造学的, 細胞化学的研究 第10回国際解剖学会硬組織シンポジウム記録「硬組織の形成と石灰化」(Roy, V. Talmage, 小沢英浩編), p. 9-57, 社会保険出版社, 東京, 1978.
 - 48) Katchburian, E. and Severs, N. J. : Origin of matrix vesicles of developing dentine investigated by freeze-fracture. *J. Anat.* **134** : 615-616, 1982.
 - 49) Tominaga, H., Sasaki, T. and Higashi, S. : Morphological heterogeneity of matrix vesicles in rat molar tooth germs with relation to predentin maturation. *Jpn. J. Oral Biol.* **25** : 1111-1115, 1983.
 - 50) Slavkin, H. C., Trump, G. N., Mansour, V., Matosian, P. and Mino, W. G. : Localization of H-2 histocompatibility alloantigens on mouse embryonic tooth epithelial and mesenchymal cell surfaces. *J. Cell. Biol.* **60** : 795-801, 1974.
 - 51) Sisca, R. F. and Provenza, D. V. : Initial dentin formation in human deciduous teeth. An electron microscope study. *Calcif. Tissue Res.* **9** : 1-16, 1972.
 - 52) Hayashi, Y. : Crystal growth in matrix vesicles of permanent tooth germs in kittens. *Acta Anat.* **116** : 62-68, 1983.
 - 53) Hayashi, Y. : Crystal growth in calcifying fronts during dentinogenesis. *Acta Anat.* **118** : 13-17, 1984.
 - 54) Yamada, M. and Ozawa, H. : Ultrastructural and cytochemical studies on the matrix vesicle calcification in the teeth of the killifish *Oryzias latipes*. *Arch. Histol. Jpn.* **41** : 309-323, 1978.
 - 55) 小沢英浩, 矢嶋俊彦, 山田まりえ, 高野吉郎, 皆川幸夫 : 基質小胞と石灰化—比較解剖学的研究1. 魚類, 両棲類, 爬虫類の歯牙形成と基質

- 小胞。歯基礎誌 17 : 513(会), 1975.
- 56) Thyberg, J. and Friberg, U.: Ultrastructure and acid phosphatase activity of matrix vesicles and cytoplasmic dense bodies in the epiphyseal plate. *J. Ultrastruct. Res.* 33 : 554-573, 1970.
- 57) Thyberg, J. and Friberg, U.: Electron microscopic enzyme histochemical studies on the cellular genesis of matrix vesicles in the epiphyseal plate. *J. Ultrastruct. Res.* 41 : 43-59, 1972.
- 58) Slavkin, H. C., Croissant, R. D., Bringas, P., Matosian, P., Wilson, P., Mino, W. and Guenther, H.: Matrix vesicle heterogeneity: possible morphogenetic functions for matrix vesicles. *Fed. Proc.* 35 : 127-134, 1976.
- 59) Larsson, Å.: 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.
- 60) 杉沢治二：ラット臼歯 odontoblast の分化に伴う Ca-ATPase に関する電顕的観察。日大歯学 57 : 966-973, 1983.
- 61) Larsson, Å.: Studies on dentinogenesis in the rat. The interaction between lead-pyrophosphate solutions and dentinal globules. *Calcif. Tissue Res.* 16 : 93-107, 1974.
- 62) Bonucci, E.: Fine structure and histochemistry of "calcifying globules" in epiphyseal cartilage. *Z. Zellforsch.* 103 : 192-217, 1970.
- 63) Silbermann, M. and Frommer, J.: Demonstration and distribution of acidic glycosaminoglycans in mouse secondary cartilage. Light and electron microscopic study. *Histochemistry* 38 : 85-93, 1974.
- 64) Scherft, J. P. and Groot, C. G.: The development of matrix vesicles into bone nodules, studied with colloidal thorium dioxide. In: *Matrix Vesicles*. (Ascenzi, A., Bonucci, E. and de Bernard B. eds) p. 173-177. Wichtig Editore s. r. l. Milano, Italy, 1981.
- 65) Kogaya, Y., Nishida, K., Kawakami, F., Miyaji, T., Nakayama, M. and Furuhashi, K.: Ultrastructural localization of ruthenium red positive substances associated with matrix vesicles in progenitor predentine. *Jpn. J. Oral Biol.* 25 : 1121-1124, 1983.
- 66) 藤原敏勝：石灰化機構の研究。基質小胞のプロテアーゼについて。歯基礎誌 24 : 393-405, 1982.
- 67) Fujiwara, T., Kawamura, M. and Katsura, N.: Studies on the mechanism of calcification on a protease associated with matrix vesicles. In: *Endocrine control of bone and calcium metabolism Vol 8B* (Cohn, D. V., Potts, Jr. J. T., Fujita, T. eds) p. 418-420, International Congress Series 635, Excerpta Medica, Amsterdam-New York-Oxford, 1984.
- 68) Uchida, T. and Ozawa, H.: ZIO staining of matrix vesicles in the epiphyseal cartilage and mineralizing dentin. In: *Endocrine Control of Bone and Calcium Metabolism Vol 8B* (Cohn, D. V., Potts, Jr J. T. and Fujita, T. eds) p. 441-443 International Congress Series 635, Excerpta Medica, Amsterdam-New York-Oxford, 1984.
- 69) Slavkin, H. C.: The isolation and characterization of calcifying and noncalcifying matrix vesicles from dentine. In: *International Colloquium on Physical Chemistry and Crystallography of Apatites of Biological Interest*, (Montel, G. ed). p. 161-177, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1975.
- 70) 小沢英浩：石灰化組織における Ca の局在と動態—電顕的 Ca 検出法を中心に— 歯基礎誌 14 : 125-130, 1972.
- 71) Reith, E. J.: The binding of calcium within the Golgi saccules of the rat odontoblast. *Am. J. Anat.* 147 : 267-272, 1976.
- 72) Nagai, N. and Frank, R. M.: Electron microscopic autoradiography of ^{45}Ca during dentinogenesis. *Cell Tiss. Res.* 155 : 513-523, 1974.
- 73) Tanaka, T.: The origin and localization of dentinal fluid developing rat molar teeth studied with lanthanum as a tracer. *Archs. Oral. Biol.* 25 : 153-162, 1980.
- 74) Grandström, G., Jontell, M. and Linde, A.: Separation of odontoblast Ca^{2+} -ATPase and alkaline phosphatase. *Calcif. Tissue Int.* 27 : 211-217, 1979.
- 75) Grandström, G. and Linde, A.: A comparison of ATPase-degrading enzyme activities in rat incisor odontoblasts. *J. Histochem. Cytochem.* 24 : 1026-1032, 1976.
- 76) Magnusson, B. C.: The effects of magnesium and calcium ions on phosphatase activities at alkaline pH in the molar region of newborn mice. *Histochemistry* 42 : 211-219, 1974.
- 77) Magnusson, B. C. and Linde, A.: Alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase and ATPase activity in the molar region of the mouse. *Histochemistry* 42 : 221-232, 1974.
- 78) Mörnstad, H. and Sundström, B.: Adenosine triphosphate hydrolysis in rat dental tissues. A histochemical study of ion dependencies. *Histochemistry* 48 : 33-42, 1976.
- 79) Granström, G., Linde, A. and Nygren, H.: Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in rat incisor odontoblasts. *J. Histochem. Cytochem.* 26 : 359-368, 1978.