ヒト乳歯の生理的歯根吸収における破歯細胞 による象牙質の吸収機構に関する分析 電子顕微鏡ならびに細胞化学的研究

茂 木 伸 夫

昭和大学歯学部第二口腔解剖学教室（指導：東 昇平教授）

〔受付：昭和62年12月21日〕

Analytical electron microscopy and ultracytochemistry of a mechanism of dentine resorption mediated by odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth

Nobuo Motegi

*The Second Department of Oral Anatomy, School
of Dentistry, Showa University, 1-5-8 Hatanodai,
Shinagawaku, Tokyo 142*

(Chief. Director: Prof. Shohei Higashi)

〔Accepted for publication: December 21, 1987〕

Key words: Deciduous teeth / root resorption / odontoclast / acid phosphatase / analytical electron microscopy

Abstract: The author examined the ultrastructure and acid phosphatase activity of odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth. Extracted teeth undergoing resorption were fixed with a mixture of formaldehyde and glutaraldehyde and processed for scanning (SEM)-and analytical transmission-electron microscopy (STEM). In SEM observation of resorbing dentine surfaces treated with NaOCl, the peritubular matrices were strongly dissolved resulting in the enlargement of dentinal tubules. The multinucleated giant cells, odontoclasts, were characterized by an abundant mitochondria, Golgi complexes, many lysosomes, endocytotic vacuoles, and well-developed ruffled borders against the resorption lacunae. The odontoclasts located in resorption lacunae contained numerous small fragments of dentine crystals in endocytotic vacuoles and extracellular canals of ruffled borders. A STEM analysis confirmed remarkably lower energy spectrum peaks of Ca and P in crystal fragments in these endocytotic vacuoles than those in unresorbed dentine matrix. The resorbing dentine surfaces consisted of alternative two electron-dense and two electron-lucent layers: these dense and lucent layers showed lower Ca and P peaks than those from unresorbed dentine. Lysosomal acid phosphatase activity was further demonstrated in the Golgi complex, dark lysosomes, and some endocytotic vacuoles of odontoclasts. These results suggest that odontoclasts are responsible for decalcification of dentine crystals at resorbing dentine surfaces and subsequent resorption and digestion of mobilized crystals.

緒 言

後継永久歯の萌出運動に伴う乳歯の脱落は、生理的な歯根の吸収によって生じる。この乳歯の歯根吸収は、次の2つの現象に分けて考えることができる。第一は、象牙質（あるいはセメント質、エナメル質）の無機結晶の脱灰であり、第二は、有機性基質の変性ならびにその消化、吸収である¹⁾。ただし、これらの現象がどのような過程を経て行われるかは全く知られていない。これまでの *in vitro* の実験では、仔牛の乳歯の吸収面から得られた吸収組織が、培養液中の象牙質片上に、吸収窩を形成すること、また同時に培養した collagen gell に、加水分解を起こすことなどが知られてきた¹⁾。多核の巨細胞である破歯細胞は、このような歯の石灰化基質の吸収に必須の細胞であると考えられているが、この破歯細胞が、コラーゲン線維の分解ならびに吸収、消化能を有するか否かは、今のところ明らかではない。また破歯細胞は、破骨細胞とほぼ同様の微細構造学的特徴を示すが、一方で、生理的な歯根吸収は、骨の改造現象とは異なった機構で調節されていると考えられる^{2,3)}。

骨吸収においては、破骨細胞の波状縁と骨表面の間の狭い領域が酸性の pH を呈し、骨結晶の溶解と、破骨細胞から分泌された酸性水解酵素の活性化により、有機性基質の変性を促進するものと考えられている²⁾。ヒト乳歯の象牙質の吸収に、破歯細胞がどのように関与するかは殆ど知られていないが、Freilich³⁾ はライソゾーム性の酸性ホスファターゼ活性の局在を、犬の乳歯の破歯細胞に初めて電顕組織化学的に証明した。しかし、この実験では、破歯細胞のライソゾーム中の酵素活性が極めて弱く、Freilich 自身も、これが組織固定中における酵素タンパクの破壊、あるいは不適切な組織化学の実験によるものと考察している。このように、ヒト乳歯の生理的な歯根吸収過程における破歯細胞の機能的役割に関する形態学的知見は、未だ殆ど得られていないのが現状である。象牙質吸収面に存在する破歯細胞の微細構造については、すでにヒト乳歯を用いた Furseth⁴⁾、イヌ乳歯を用いた Freilich³⁾ およびネコ乳

歯を用いた Ten Cate と Anderson⁵⁾ らの報告があるが、ヒト乳歯の破歯細胞に関する報告⁴⁾は、電顕初期のもので解像度が低く、ヒト破歯細胞の微細構造を再検討する必要がある。そこで著者は、ヒト乳歯の生理的な歯根吸収過程において、破歯細胞がどのように象牙質の吸収に関与するかを、微細構造学的、細胞化学的ならびに分析電子顕微鏡的に研究を行った。

材料および方法

研究に用いた試料は、5歳から11歳までの小児の乳切歯、乳犬歯、乳臼歯33症例である。外来での抜歯に先立ち、歯の動揺度ならびにX線診査を行い、吸収の程度や後継永久歯歯胚との位置関係を確認したのち、脱落期に至った症例、あるいは矯正治療上抜歯を要する症例を研究に用いた。これらの試料はすべて有髄歯であり、かつ健全歯である。

1) 光学顕微鏡観察

抜歯後ただちに、乳歯を0.1M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液 (pH 7.3) で、4°C にて1日から数日間浸漬固定し、歯冠をダイヤモンドディスクで切断したのち、4規定蟻酸溶液で1-2か月間脱灰した。脱灰後、試料を流水下で水洗し、通法のごとく上昇アルコール系列による脱水後、パラフィン包埋を行った。なお、抜去乳歯は固定後、近遠的に切断し、その半側を非脱灰のまま走査電子顕微鏡用の試料とし、他の半側を光顕用試料とした。パラフィン切片は、Leiz 1512ミクロームで4-5 μm の厚さに作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を施して Nikon Biophoto で鏡検、写真撮影を行った。

2) 走査電子顕微鏡観察

抜去乳歯を上記のリン酸緩衝10%ホルマリン、または0.1M リン酸緩衝2.5%グルタルアルデヒド溶液 (pH 7.3) で浸漬固定し、固定後8%次亜塩素酸ナトリウム溶液に2-4時間浸漬して有機成分を除去した。次いで0.1Mリン酸緩衝液で洗滌し、さらに超音波洗滌を行って組織残渣を取り除き、0.1M リン酸緩衝1%四酸化オスミウム酸溶液で4°C にて2-3時間後固定を行った。これらの試料は蒸留水で洗滌し、通法のごとくエ

タノール系列による脱水を行ったのち、酢酸イソアミル溶液に浸漬・置換し、液化 CO₂ を用いて臨界点乾燥を行った。この乾燥試料に白金のイオン・スパッター・コーティングを施し、日立 S-430 の走査型電子顕微鏡（以下、走査電顕）を、15kV の加速電圧で操作して観察、写真撮影を行った。

3) 非脱灰および脱灰超薄切片観察

抜去乳歯を 0.1M カコジル酸緩衝 2.5 % グルタルアルデヒド・2 % ホルムアルデヒド混合液 (pH 7.3) で 3-4 時間浸漬固定後、同緩衝液で 24 時間洗滌し、フェロシアン化カリウム還元 1 % 四酸化オスmium 酸溶液で、4°C にて 2 時間後固定した。さらに 10 % エタノールに溶解した 1 % 酢酸ウラン溶液で、室温にて試料を 1 時間塊染色し、上昇エタノール系列ならびに QY-1 による脱水後、通法どおりエポキシ樹脂 (Epon 812 または Poly Bed 812) に包埋した。一部の試料は、前固定後、10 % ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) で約 1 カ月間 4°C にて脱灰したのち、他の非脱灰試料と同様に標本処理した。

4) 酸性ホスファターゼ活性

抜去乳歯を 0.1 M カコジル酸緩衝 1 % グルタルアルデヒド・1 % ホルムアルデヒド混合液 (pH 7.3) で、4°C にて 2 時間浸漬固定し、10 % EDTA で約 3 週間脱灰した後、約 50 μ m の厚さの切片をマイクロスライサー（堂阪 EM, 大阪）を用いて作製した。切片を緩衝液および蒸留水でよく洗滌後、次の反応浸漬液に、室温（約 25°C）で 30 分間浸漬し、酵素活性を検出した。反応浸漬液は、0.6mM sodium trimetaphosphate (Sigma 社 St. Louis, MO, USA), 4.5mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0), そして 4 mM 酢酸鉛 (Sigma 社) からなり、最終 pH は 1 規定硝酸を用いて 3.9-4.0 に調整した。対照実験には、反応浸漬後に 10mM のフッ化ナトリウムまたは酒石酸ナトリウムを加えたもの、および浸漬液から基質 (trimetaphosphate) を除いたものの 2 種類を用いた。試料の後固定、塊染色、脱水、包埋は上記 3) のごとく行った。ただし、試料の後固定、塊染色は各々 15 分間とした。

超薄切片は、Reichert-Jung Ultracut OmU-4

に装着したダイヤモンドナイフで作製し、染色（酢酸ウランおよびクエン酸鉛）または無染色のまま、日立 HU-12A 透過型電子顕微鏡（以下、透過電顕）を 75kV で操作して観察を行った。なお、非脱灰超薄切片は、ナイフポートに ethylene glycol を満たして無水的に作製した。

5) エネルギー分散微小部 X 線分析

非脱灰超薄切片を、無染色のまま、日立 H-600 透過電顕を、75kV で操作して観察した。この電顕には切片試料の走査装置と KEVEX7000A エネルギー分散型微小部 X 線分析装置がついており、超薄切片試料の分析部分を、試料の透過像および走査像で確認したのち、試料電流 2×10^{-9} A, 分析径 15nm の条件で分析した。分析時間は 200 秒である。

結 果

1) 光顕および走査電顕所見

活発に吸収が進行している乳歯歯根象牙質の吸収面には、拡張した毛細血管と、エオジン好染の多核巨細胞である破歯細胞を数多く含む血管結合組織が観察され、破歯細胞の多くは、不規則な外形の吸収窩を形成しつつ、象牙質中に深く侵入していた。破歯細胞の形態は、象牙質吸収窩上に存在する場合と、吸収窩から離れて存在する場合とで異なり、吸収窩上に局在する場合にのみ、吸収窩に面して、泡沫状の波状縁を有していた（図 2, OC）。このような波状縁を有する破歯細胞に隣接して、象牙質表面には、紡錘形を呈する単核の細胞が数多く観察されたが、これらの単核の細胞は、深い吸収窩を形成することなく、比較的平滑な象牙質表面に分布していた（図 2, MMC）。また、単核の細胞の中には、破歯細胞とともに、吸収窩内に見られたものもあるが、この場合も、単核の細胞自身が吸収窩を形成することはなかった。吸収組織中には、この他に、前破歯細胞と思われる単核の大型の細胞（図 2, POC）や、組織球、顆粒白血球、そして線維芽細胞などが存在し、組織球や白血球は、象牙質吸収表面に近接する拡張した毛細血管や、細静脈内にも数多く観察された（図 2）。一般に象牙質吸収面は、深部象牙質よりも、ヘマトキシリンに対して染色性が良い

が、破歯細胞の波状縁に面する部分は、染色性が低下し、ときにその輪郭が不明瞭であった。

次に、光顕所見によって吸収期にある乳歯歯根と、吸収の停止期にある乳歯歯根を区別し、各々を走査電顕で観察した。光顕的に、象牙質吸収がほぼ停止し、象牙質の吸収面上に細胞成分をほとんど認めない症例では、吸収表面は、魚鱗状の陥凹のみから成り、象牙細管周囲の管周基質の脱灰の形跡は、全く認められなかった（図3）。これに対し、活発に吸収が進行している症例の象牙質吸収面は、極めて粗造な面を呈し、部分的に非常に深い陥凹、すなわち吸収窩が観察された（図4, RL）。この吸収窩に開放する象牙細管には、管周基質の溶解による細管口径の拡大が生じていた。つまり、このような象牙質吸収面は、大小の深い吸収窩の存在と、そこに開放する象牙細管の管周基質の溶解によって特徴づけることができる。

2) 脱灰および非脱灰超薄切片の透過電顕所見

脱灰切片では、破歯細胞は、明瞭な核小体を含む数個の核を細胞体のほぼ中央部分に有し、象牙質の吸収窩表面に面して、よく発達した波状縁（ruffled border）を有することを第一の特徴とする。波状縁は、形質膜の細胞質に向けての深い陥入と微絨毛（microvilli）様の細胞突起から成り、細胞突起の一部は、吸収窩に開放する象牙細管中にも侵入していた。波状縁に面する吸収窩表面には、多くのコラーゲン線維が分布し、その一部は波状縁の細胞間隙にも認められたが、破歯細胞の貪食空胞内には、コラーゲン線維の取り込み像は観察されなかった。また、破歯細胞において明瞭な明帯（clear zone）は、破歯細胞では、多くの場合認められなかった。次に、波状縁と核の間の細胞質は、無数の電子密度の低い貪食空胞によって占められ、空胞相互の癒合像も随所に観察された。貪食空胞の一部には、無構造のやや電子密度の高い物質が観察されたが、明瞭な線維構造は認められなかった。一方、核周囲の細胞質には、多くのゴルジ装置と多胞体が局在し、これら以外の細胞質領域には、豊富な糸粒体、そして粗面小胞体などが観察され、貪食空胞の分布はむしろ少なかった。この様に、吸収窩に分布し、象牙質に接する破歯細胞には、細胞内小器官の分布に一種の

極性があることが、第二の形態的特徴であった（図5）。このような破歯細胞を、非脱灰超薄切片で観察すると、破歯細胞の波状縁の細胞間隙ならびに隣接する貪食空胞中に、無数の象牙質結晶の微小片が観察された（図6, 7）。これに対し、破歯細胞に被われていない象牙質の浅い吸収面を脱灰切片で観察すると、単核の線維芽細胞様細胞によって被覆されていた（図8）。この場合にも、象牙質表面にはコラーゲン線維が多数観察され、さらに線維芽細胞様細胞の形質膜の陥凹部ならびに貪食空胞中に、コラーゲン線維の取り込み像が観察された（図9, 10）。

次に吸収期にある象牙質吸収面の基質構造を、破歯細胞によって直接被われている部分と被われていない部分とで、非脱灰超薄切片を用いて比較観察すると、両者共に象牙質の吸収窩表層は、4層に分けることができた。すなわち、破歯細胞に面する部分から、1) いう粗な象牙質結晶の微小片を含む吸収最表層（resorbing surface, 0.5-1 μm ）、2) 次にこれらの結晶片が狭い幅で密に凝集する高電子密度層（thin dense layer, 約0.2 μm ）3) そして電子密度のやや低い中間層（intermediate layer, 0.2-0.4 μm ）4) 最後に再び幅の広い高電子密度層（thick dense layer, 約0.8 μm ）である。このような吸収層の象牙質の微細構造は、破歯細胞に面する部分とそうでない部分との間で基本的に大きな差異はみられないが、破歯細胞に面する部分では吸収層に開放する象牙細管にしばしば象牙質管周基質の溶解が起きているのに対し、破歯細胞に被われていない部分では、管周基質の溶解はほとんど認められなかった（図11, 12）。

3) 酸性ホスファターゼ活性の局在

Inorganic trimetaphosphate を基質に用いた酸性ホスファターゼ活性の局在は、電子密度の高い磷酸鉛の沈着物質として検出された。この酵素活性は、象牙質吸収窩に局在する波状縁を有する破歯細胞に、特に強く観察された。この様な破歯細胞では、酵素活性はゴルジ装置、粗面小胞体、多胞体、ライソゾーム（水解小体）、そして波状縁に隣接する貪食空胞内に強く検出された。また、核、形質膜そして細胞質基質には、常に反応物質

は観察されなかった (図13)。なお反応検出液への、フッ化ナトリウムや酒石酸ナトリウムの添加、および検出液からの基質の除去による対照実験では、極めて微細な反応物質が、わずかに破歯細胞の糸粒体とゴルジ膜に見られる以外、上記のゴルジ・ライソゾーム系に強い反応は検出されなかった。

4) 非脱灰超薄切片の微小部X線分析

非脱灰超薄切片を用いて、破歯細胞及び吸収象牙質の結晶中のカルシウム (Ca)、リン (P)、そして硫黄 (S) の各元素の濃度を微小部X線分析法で検索したところ、切片からは生物組織に由来する Ca, P, S の他、エポキシ樹脂に由来するクロル (Cl)、固定液に由来するオスミウム (Os) ならびにカリウム (K)、そして塊染色液に原因するウラン (Ur) が検出された。なおシリカ (Si) は分析中の何等かの汚染 (例えば分析チップそのものからの Si の流出) によるものと考えられる (図14)。Ca, P そしてSの濃度を、図1の切片を

Fig. 22 Schematic drawing of the analysed portions by energy-dispersive X-ray microanalyzer presented in figures 14-21.

23

Fig. 23 A proposed model for odontoclastic resorption of dentine crystals in physiological root resorption of human deciduous teeth. The odontoclasts are thought to secrete protease and acid which results in decalcification of dentine crystals at resorbing surface. The odontoclasts further resorb mobilized crystals by way of ruffled borders and endocytotic vacuoles and digest them by an action of hydrolytic enzymes supplied from the Golgi apparatus.

用いて各部位毎に比較すると、最も低いスペクトル・ピークは、破歯細胞の食食空胞と波状縁の細胞間隙に分布する結晶片から得られた (図14, 15)。一方、吸収象牙質では、吸収最表層の結晶から、最も低い Ca, P のスペクトル・ピークが得られ、これは、破歯細胞の波状縁に分布する結晶と、ほぼ同じ値を示した (図16)。吸収象牙質の中間層の結晶は、吸収最表層におけるよりも高い Ca, P のスペクトル・ピークを示したが、高電子密度層の Ca, P 濃度は、この中間層におけるよりも、高い値を示した (図17, 18)。二つの高電子密度層を比較すると、深層の幅の広い高電子密度層の方がやや高い値を示し、これは吸収を受けていない象牙質の管間象牙質の Ca, P 濃度とほぼ同じ値であった (図18)。また管周象牙質は、象牙質全領域中、最も高い Ca, P 濃度を示

した(図21)。以上の分析点は、図22に示した。

考 察

破歯細胞の微細構造学的ならびに細胞化学的特徴

破歯細胞の微細構造に関する電子顕微鏡的研究は、ヒトの乳歯を用いた Furseth⁴⁾ に始まり、イヌの乳歯を用いた Freilich³⁾ によって基本的には確立されている。その後、Ten Cate と Anderson⁵⁾ によって、ネコ乳歯においても破歯細胞に関する同様の所見が報告された。本邦では、大野⁶⁾によってこれらの所見が、詳細に再確認されている。今回の著者の観察でも、破歯細胞の微細構造学的特徴は、これらの報告にあるように、およそ次の諸点に要約される。すなわち、破歯細胞は、1) 細胞体の中央部に数個の核を有し、象牙質吸収窩に面して形質膜の陥入と細胞突起から成る発達した波状縁(ruffled border)を形成する。2) 破歯細胞の核と波状縁の間の細胞質領域は、無数の食食空胞によって占められ、空胞相互の融合像が観察される。これらの食食空胞は波状縁の形質膜から、直接形成されたものと思われる。これに対し、3) 波状縁の反対側の細胞質は、多くの糸粒体と粗面小胞体によって占められ、核周囲の細胞質領域には、ゴルジ装置とライソゾーム(水解小体)が局在する。この様に、破歯細胞は、波状縁を有することを第一の形態的特徴とし、次にこの波状縁に由来する食食空胞と核周囲のゴルジ・ライソゾーム系の分布に形態的極性があることを第二の特徴とする。このような細胞内小器官の極性化した配列は、象牙質吸収窩に存在する破歯細胞にのみ見られる。破歯細胞の分化過程に関する最近の細胞化学的研究⁷⁾では、破歯細胞は、吸収象牙質に接して波状縁を形成するまでは、単核の前駆細胞から多核化した後も、不規則な細胞内小器官の分布を示すことが明らかにされている。破骨細胞においても、破歯細胞同様の極性化した細胞内小器官の分布が報告されている⁸⁻¹¹⁾。従って、破歯細胞は、破骨細胞同様、硬組織の吸収のために特殊化した多核巨細胞であり、その最終的な形態的、機能的分化には、硬組織(象牙質)中の何等かの有機、無機成分が必須の誘導物質と

して作用するものと推測される。

破歯細胞の電顕細胞化学的研究には、酸性の beta-glycerophosphatase を示した Freilich³⁾ の報告がある。しかし、この報告では試料を高濃度の glutaraldehyde で固定したことなどから、破歯細胞中の酵素活性が、極めて低く、酵素反応はゴルジ装置ならびにライソゾーム中に痕跡程度に認められるにすぎない。今回著者は、trimetaphosphate を基質として、初めて酸性ホスファターゼ活性の破歯細胞内局在を明確にした。本酵素活性は、ゴルジ装置、一部の粗面小胞体、ライソゾーム、そして食食空胞に明瞭に検出され、特に、核と波状縁の間の細胞質に局在するゴルジ装置、ライソゾームならびに食食空胞に最も強い酵素活性が認められた。このことは、この酸性ホスファターゼ活性が、破歯細胞による細胞外物質の取り込みと、その細胞内消化機構に密接に関与していることを意味する。なお、粗面小胞体に検出された酵素活性は、酵素タンパクの合成過程を示すものと思われる。このような破歯細胞における酸性ホスファターゼ活性の局在は、破骨細胞における同酵素の局在とよく一致している¹²⁻¹⁵⁾。破歯細胞における酸性ホスファターゼ活性は、フッ化ナトリウムならびに酒石酸ナトリウムによって完全に阻害されるため、非特異的な酸性ホスファターゼの isoenzyme の一つと考えられる。このような酸性ホスファターゼの存在は、後述する破歯細胞による象牙質結晶の消化、吸収機構と密接に関係するものと思われる。

今回の著者の研究において最も重要な所見の一つは、破歯細胞の波状縁の細胞間隙と食食空胞中に、細分化した象牙質結晶片が認められ、これらの結晶片から、Ca, P, S の各元素のスペクトル・ピークが検出されたことである。これらの結晶片は、深層の正常な象牙質結晶よりも、はるかに低い Ca, P 濃度を示した。すなわち、破歯細胞は、吸収窩の象牙質表層において部分的な象牙質結晶の脱灰を行い、続いてこれらの結晶片を、細胞内に吸収するものと考えられる。これまで、破歯細胞^{4,6)}ならびに破骨細胞^{8,9)}の波状縁に結晶様構造物の存在が推測されてきたが、非脱灰超薄切片の微小部X線分析によって、破歯細胞による象牙質

結晶の細胞内取り込みを明確にしたのは、本研究が最初である。また、Ca、P とともに検出された S は、象牙質結晶に結合したムコ多糖類に由来するものと考えられるため¹⁶⁻¹⁹⁾、破歯細胞は、象牙質結晶と共に少なくともこの結晶に結合している有機性のムコ多糖類をも吸収している可能性が高い。この様な象牙質結晶の取り込み像は、破歯細胞の波状縁の細胞間隙と食食空腔中にも観察された。一方、上述の酸性ホスファターゼ活性が、破歯細胞のゴルジ・ライソゾーム系と共に食食空腔中に強く検出されたことを考え合わせると、破歯細胞は象牙質結晶を食食空腔中に取り込んだ後、ゴルジ・ライソゾーム系からの水解酵素（酸性ホスファターゼを含む）の供給を受けて、その細胞内消化を行うものと考えられる。この様な破歯細胞による象牙質結晶の吸収、消化機構は最近培養系における骨髓細胞由来の破骨細胞にも存在することが確認されたため²⁰⁾、破歯細胞は破骨細胞と同様の硬組織の吸収、消化能を有するものと思われる。

これまでの生化学的研究では、破歯細胞²¹⁾ならびに破骨細胞²²⁾の何れにも、コラーゲン分解酵素（コラーゲン）の存在は、報告されていない。従って、破歯細胞が象牙質のコラーゲンの分解に寄与しているか否かは今のところ不明である。しかしながら、破歯細胞に面する吸収象牙質の表層には、無数の断片化したコラーゲン線維が分布し、その一部は破歯細胞の波状縁の細胞間隙にも認められた。ただし、これらのコラーゲン線維が破歯細胞の食食空腔内に観察されることはなかった。この様な結果はこれまでの Furseth⁴⁾、Freilich³⁾、大野⁶⁾、そして著者ら²³⁾の報告と同一であり、破骨細胞に関する従来の所見ともよく一致している。このことは、次の可能性を示唆している。すなわち、破歯細胞に隣接する線維芽細胞様細胞が、コラーゲナーゼを合成分泌し、コラーゲンの消化吸収を担うとする解釈である。吸収象牙質表面のコラーゲン線維は、破歯細胞ばかりでなく線維芽細胞様細胞に被われている部分にも多量に存在した。また、この線維芽細胞様細胞には、コラーゲンの取り込み像が観察された。さらに、線維芽細胞を起源とする骨芽細胞が、コラーゲナーゼ活性

を有することが免疫組織化学的に示されている²²⁾。これらのことから、吸収象牙質のコラーゲンの分解、吸収には、破歯細胞に隣接する線維芽細胞が関与している可能性が高い。歯根膜や歯肉の線維芽細胞が、コラーゲンの合成ばかりでなく、その吸収、消化をも行うことは、すでによく知られた事実である^{24,25)}。

吸収象牙質の微細構造と微小部 X 線分析

乳歯歯根吸収面の表面形態は、これまで走査電子顕微鏡を用いて検索されてきた^{21,26-30)}。しかしこれらの報告では、光顕あるいは透過電顕像との対比を行っていないうえに、吸収面を水洗したのみで観察しているため、多様な吸収窩の形態を解釈することが困難であった。著者は、同一歯を光顕と走査電顕で比較観察することによって、吸収期にある吸収窩と吸収の停止期にある吸収窩とを区別し、前者が象牙質管周基質の溶解像によって特徴づけられることを明らかにした。この様な所見は、次亜塩素酸ソーダ処理によって実際以上に強調されたものと思われるが、主として破歯細胞によって形成されつつある吸収窩の象牙質吸収層に、無機性基質の脱灰が生じていることを明瞭に示している。Boyde と Lester²⁶⁾ は、象牙質吸収面をレプリカ法で観察し、そこに基質線維（コラーゲン）の横紋像を認めたことから、象牙質の吸収では、無機結晶の脱灰が、有機性基質の脱却に先行すると述べている。この様な見解は、著者の観察結果ともよく一致している。

今回の研究では、象牙質吸収層は、さらに4層に区分された。すなわち、破歯細胞側の最表層から深層に向けて、1) 吸収最表層、2) 高電子密度層、3) 中間層、そして、4) 幅の広い高電子密度層である。微小部 X 線分析では、これら4層のうち、深層の幅の広い高電子密度層が、吸収による変化を受けていない正常象牙質管間基質と同程度の（ただし、やや低い）Ca、P 濃度を示した以外は、他の3層は、全て正常象牙質よりも、かなり低い Ca、P 濃度を示した。従って、少なくともこれら3層において、象牙質結晶の部分的な脱灰が生じていたと考えられる。4層の吸収象牙質の形態的区分は、結晶の密度の差に基づくものであり、一方微小部 X 線分析による Ca、P 濃度の

変化は、個々の結晶の一部（分析径15nm）から得られたものである。従って、吸収象牙質各層のCa, P濃度の差異は、今回の分析値よりも大きなものになると予想され、現在さらにSEM-EDX法で検討中である。

象牙質吸収層の形態変化に関しては、これまでに大野⁶⁾、鈴木³⁰⁾によって吸収最表層におけるdark lineの存在のみが報告されているが、これは著者の観察では、深層の幅の広い高電子密度層に相当する。これまでの報告に、他の3層の象牙質吸収層が欠如しているのは、標本の処理過程に原因するものかもしれない。すなわち、非脱灰超薄切片中の微細な結晶はナイフポート中の蒸留水(pH 6付近)によって脱灰される可能性がある³¹⁾。著者は、この蒸留水による結晶の脱灰を防ぐために、蒸留水の代わりにethylene glycolを用いて無水的に非脱灰超薄切片を作成した。従って、今回の著者の所見は、より正確な吸収象牙質の微細構造を示すものと考えられる。吸収象牙質の中では、吸収最表層と中間層が最も低いCa, P濃度を示し特に最表層におけるCa, Pのスペクトル・ピークは、破歯細胞の波状縁ならびに食食空腔中の結晶片から得られたものとほぼ同じレベルであった。このことは、吸収最表層の象牙質結晶が、破歯細胞による吸収を受けやすい状態にまで、細胞外で脱灰されていることを示唆している。吸収最表層と中間層の間の幅の狭い高電子密度層は、前2者よりも高い結晶の密度と個々の結晶のCa, P濃度を示した。このような高石灰化層の出現は、一度脱灰を受けた象牙質結晶が周囲の遊離のCa, Pを取り込むことによって一種の再石灰化を来したためと考えられる。同様の所見は、エナメル質ならびに象牙質齲蝕病層において結晶の酸による脱灰に続く再石灰化機構としてTakuma³²⁾によって詳細に報告されている。

このような、象牙質結晶の脱灰は、どのような機序で生じるのだろうか？最近、Baronら²⁾は、破骨細胞が、波状縁から骨基質に向けて水解酵素を分泌するとともに、波状縁の形質膜に局在する100Kd-タンパク($H^+K^+-ATPase$ に相当すると考えられている)によって、 H^+ を骨基質に向けて放出し、局所のpHを酸性領域に下げる有機

酸を分泌する機能を持つことを示唆した。破歯細胞が破骨細胞と同様に $H^+K^+-ATPase$ を有し、 H^+ を象牙質吸収窩に向けて放出し、局所のpHを下げることによって、象牙質結晶を脱灰している可能性は充分に考えられるが、現在までのところ裏付けとなる形態的知見はなにも一つ報告されていない。しかしながら、少なくとも破歯細胞の波状縁に面する象牙質吸収窩の結晶が、部分的な脱灰を受けた後、破歯細胞の波状縁によって吸収され、さらに食食空腔内で細胞内消化を受けることは、ほぼ疑いのない事実である。従って、破歯細胞による象牙質吸収においては、象牙質の無機成分の脱灰は有機成分の脱却に先行するか、あるいは両現象がほぼ同時に進行するものと考えられる。

以上の実験結果から、生理的な乳歯の歯根吸収過程における象牙質の吸収には、破歯細胞が必須の要素であることが明らかにされた。この破歯細胞による象牙質の吸収は次のような機構で行われるものと考えられる(図23)。すなわち、破歯細胞は何等かの未知の機構で、象牙質結晶の部分的な脱灰を行う。脱灰によって断片化し、吸収され易い状態になった結晶片は、破歯細胞の波状縁を通じて食食空腔内に取り込まれ、さらにそのゴルジ・ライソゾーム系によって細胞内消化を受ける。破歯細胞は、象牙質結晶とともに、結晶に結合したムコ多糖類も取り込む。しかし、破歯細胞がコラーゲナーゼを分泌し、コラーゲンの分解、吸収能を有するか否かは不明である。このコラーゲンの分解、吸収には、破歯細胞に隣接する線維芽細胞様細胞の関与が考えられるが、この問題は、将来の研究を通じて明確にしていきたい。

結 論

(1) 生理的な歯根吸収が活発に進行している象牙質の吸収面には、多核の巨細胞である破歯細胞と毛細血管を多く含む吸収組織が観察された。

(2) 吸収象牙質表面には、様々な深さの吸収窩が観察され、この吸収窩に開放する象牙細管には、管周基質の溶解が認められた。

(3) 多核の破歯細胞は、形態的極性を有する。すなわち、象牙質吸収窩に面してよく発達した波

状縁を持ち、この波状縁と核領域との間に、無数の食食空胞が分布していた。細胞体の反対側には、主に糸粒体と粗面小胞体が分布し、核周囲の細胞質領域には、ゴルジ装置とライソゾーム（水解小体）が局在していた。

(4) trimetaphosphate を基質に用いた酸性ホスファターゼ (pH 4) 活性は、破歯細胞のゴルジ装置、粗面小胞体、ライソゾームならびに食食空胞中に強く検出された。

(5) 破歯細胞の波状縁の細胞間隙と食食空胞中には、微細な象牙質結晶片が観察され、微小部X線分析では、これらの結晶片から Ca, P そして S の各スペクトル・ピークが検出された。

(6) 吸収窩を形成する吸収象牙質は、最表層から深層に向けて、吸収最表層 (0.5-1 μm)、高電子密度層 (約0.5 μm)、中間層 (0.2-0.4 μm) そして幅の広い高電子密度層 (約0.8 μm) の4層に区分され、深層の高電子密度層を除いては、すべて正常の象牙基質よりも低い Ca, P 濃度を示した。

抄録：歯根の吸収期にあるヒト乳歯を抜去後、ホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド混合液で固定し、走査電顕および透過型分析電子顕微鏡を用いて検索した。SEM 観察では、深く類円型を呈する吸収窩が観察され、吸収窩に開放する象牙細管には管周基質の溶解が認められた。吸収窩に局在する破歯細胞の非脱灰超薄切片では、食食空胞と波状縁の細胞間隙に無数の象牙質結晶の微小片が観察され、STEM による分析では、これらの結晶片から Ca, P, S のスペクトル・ピークが検出された。波状縁に面する象牙質表層は、深層の象牙質に比べ結晶の密度が低く、その Ca, P 濃度も低い値を示した。また酸性ホスファターゼ活性は、破歯細胞のゴルジ装置、粗面小胞体、ライソゾーム、食食空胞に検出された。以上の結果は、ヒト乳歯の生理的歯根吸収において、破歯細胞が、吸収窩表面で象牙質結晶を脱灰し、その無機及び有機性基質成分の細胞内吸収と消化を行うことを強く示唆している。

文 献

- 1) Morita, H., Yamazaki, H., Shimizu, M. and S. Sasaki.: The collagenolytic activity during root resorption of bovine deciduous tooth. Arch. Oral Biol. 15 : 503-508, 1970.
- 2) Baron, R., Neff, L., Louvard, D. and Courtot, P.: Cell mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protaine at the osteoclast ruffled border. J. Cell Biol. 101 : 2210-2222, 1985.
- 3) Freilich, L. S.: Ultrastructure and acid phosphatase cytochemistry of odontoclast: Effects of parathyroid extract. J. Dent. Res. 5 : 1047-1055, 1971.
- 4) Furseth, R.: The resorption processes of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography and electron microscopy. Arch. Oral Biol. 13 : 417-431, 1968.
- 5) Ten Cate, A. R. and Anderson, R. D.: An ultrastructural study of tooth resorption in the kitten. J. Dent. Res. 65 : 1087-1093, 1986.
- 6) 大野絃八郎：ヒト乳歯歯根吸収時に出現する odontoclast の電子顕微鏡的研究。口病誌 39 : 133-158, 1972.

(7) 吸収象牙質表面には無数の断片化したコラーゲン線維が分布し、その一部は破歯細胞の波状縁の細胞間隙内に観察されたが、破歯細胞によるコラーゲン線維の食食像は観察されなかった。これに対し、破歯細胞に隣接する単核の線維芽細胞様細胞には、食食空胞内へのコラーゲンの取り込み像が観察された。

本論文の要旨は、第4回昭和歯学会総会（1984年7月東京）ならびに第35回 JADR 総会（1987年12月横浜）において発表した。

謝辞：本稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導と御校閲を賜った本学第二口腔解剖学教室の東昇平教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に対し、直接多大な御教示と御協力を戴いた同教室の佐々木崇寿助教授に感謝の意を表します。さらに、非脱灰試料のX線分析にご協力頂いた本学第一口腔解剖学教室の出張一博助手および東京歯科大学形態系研究室の田所克己氏に感謝いたします。最後に、共同研究者の鈴木浩、渡辺千秋研究生の協力に厚く御礼申し上げます。

- 7) 鈴木 浩, 渡辺千秋, 茂木伸夫, 佐々木崇寿, 東 昇平: ヒト破歯細胞の分化, 成熟過程における酸性ホスファターゼ活性の局在変化に関する細胞化学的研究. 昭和歯誌, 8: 126, 1988.
- 8) Gothlin, G. and Ericsson, L. E.: The osteoclast. Review of ultrastructure, origin and structure-function relationship. Clin. Orthop. 120: 201-231, 1976.
- 9) Holtrop, M. E. and King, G. J.: The ultrastructure of the osteoclast and its function implications. Clin. Orthop. 123: 177-196, 1977.
- 10) Kallio, D. M., Garant, P. R. and Minkin, C.: Evidence of coated membranes in the ruffled border of the osteoclast. J. Ultrastruct. Res. 37: 169-177, 1971.
- 11) Takagi, M., Parmley, R. T., Toda, Y. and Denys, F. R.: Extracellular and intracellular digestion of complex carbohydrates by osteoclasts. Lab. Invest. 46: 288-297, 1982.
- 12) Lucht, U.: Acid phosphatase of osteoclasts demonstrated by electron microscopic histochemistry. Histochemie 28: 103-117, 1971.
- 13) Doty, S. B., Schofield, B. H.: Electron microscopic localization of hydrolytic enzymes in osteoclasts. Histochem. J. 4: 245-258, 1972.
- 14) Rath, N. C., Hand, A. R. and Reddi, A. H.: Activity and distribution of lysosomal enzymes during collagenous matrix-induced cartilage, bone and bone marrow development. Dev. Biol. 85: 89-98, 1981.
- 15) Baron, R. Neff, L., Van, P. T., Nefussi, J. R. and Vignery, A.: Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. Am. J. Pathol. 122: 363-378, 1986.
- 16) Engel, M. B.: Microprobe analysis of calcifying matrices and formative cells in developing mouse molars. Histochemistry 72: 443-452, 1981.
- 17) Goldberg, M. and Escaig, F.: Incorporation of (³⁵S) sulfate and (³H) glucosamine into glycoaminoglycans in rat incisor predentine and dentine.: Comparison by autoradiography of fixation by rapid freezing, freeze-substitution, and aldehyde fixation. Calcif. Tissue Int. 37: 511-518, 1985.
- 18) Goldberg, M. and Septier, D.: Ultrastructural localization of complex carbohydrates in developing rat incisor enamel. Anat. Rec. 216: 181-190, 1986.
- 19) Takagi, M., Parmley, R. T. and Denys, F. R.: Ultrastructural localization of complex carbohydrates in odontoblasts and dentine. J. Histochem. Cytochem. 29: 747-758, 1981.
- 20) Sasaki, T., Takahasi, N., Higasi, S. and Suda, T.: Multinucleated giant cells from mouse marrow cells resorb calcified dentine with exhibiting ruffled border. J. Dent. Res. 67: 732, 1988.
- 21) 木村亜都子: 歯根吸収による歯質無機成分の溶解に関する研究. 口病誌 39: 800-810, 1972.
- 22) Sakamoto, S. and Sakamoto, M.: Biochemical and immunohistochemical studies on collagenase in resorbing bone in tissue culture. J. Periodont. Res. 17: 523-526, 1982.
- 23) 茂木伸夫, 鈴木 浩, 渡辺千秋, 佐々木崇寿, 東 昇平: ヒト乳歯の生理的象牙質吸収に関する微細構造学的研究. 歯基礎誌 27: 1101-1114, 1985.
- 24) Ten Cate A. R. and Deporter, D. A.: The role of the fibroblast in collagen turnover in the functioning periodontal ligament of the mouse. Arch. Oral Biol. 19: 339-340, 1974.
- 25) Garant, P. R.: A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. J. Periodontol. 47: 380-390, 1976.
- 26) Boyde, A. and Lester, K. S.: Electron microscopy of resorbing surface of dental hard tissues. Z. Zellforsch. 83: 538-548, 1967.
- 27) 佐藤裕久: ヒトの歯の交換期における乳歯歯根吸収部の走査電子鏡的研究. 日大歯学 47: 51-56, 1973.
- 28) 木村光孝, 内上堀征人, 森高久恵, 竹中正史, 渡辺尚海, 中村 聖, 中村嘉明: 交換期における乳歯歯根吸収面の走査型電子顕微鏡的研究. 小児歯誌 22: 26-35, 1984.
- 29) 野村昌誌: 走査型電子顕微鏡による乳歯歯根吸収面の観察. 歯科学報 74: 1482-1486, 1974.
- 30) 鈴木駿介: ヒトの乳歯象牙質吸収に関する電子顕微鏡的研究. 歯基礎誌 16: 186-244, 1974.
- 31) Bishop, M. A. and Warshawsky, H.: Electron microscopic studies on the potential loss of crystallites from routinely processed sections of young enamel in the rat incisor. Anat. Rec. 202: 177-186, 1982.
- 32) Takuma, S.: Demineralization and remineralization of tooth substance. An ultrastructure basis for caries prevention. J. Dent. Res. 59: 2146-2156, 1980.

Fig. 1 X-ray micrograph of human deciduous tooth undergoing resorption (arrow indicated).

Fig. 2 Light micrograph of resorbing dentine surface of human deciduous tooth. Multinucleated odontoclasts (OC) are located in resorption lacunae (RL) of dentine. At the resorbing dentine surface, many mononuclear cells (MNC) and preodontoclasts (POC) are seen. BC : blood vessel.

- Fig. 3 Scanning electron micrograph of dentine surface showing many irregular-shaped shallow lacunae.
- Fig. 4 Scanning electron micrograph of activity-resorbing dentine surface, which contains deep resorption lacuna (RL).
- Fig. 5 Lower magnification view of multinucleated odontoclast located in resorption lacuna of dentine. The cell exhibits well developed ruffled border (RB) against the resorbing dentine surface and contains numerous endocytotic vacuoles (EV) and Golgi complexes (Go). Nu: nucleus; DT: dentinal tubule.
- Fig. 6 Undecalcified thin section of odontoclast and adjacent resorbing dentine. VR: vacuolar region of odontoclast; RB: ruffled border of odontoclast; RD: resorbing dentine.
- Fig. 7 Ruffled border (RB) and adjacent endocytotic vacuoles (EV) of odontoclast. Note the presence of numerous tiny fragments of dentine crystals (arrows) in vacuoles and extracellular space of ruffled border. RD: resorbing dentine surface.
- Fig. 8 Two mononuclear fibroblast-like cells on resorbing dentine surface (DE). DT: dentinal tubule.
- Fig. 9 Higher magnification view of fibroblast-like cell located on resorbing dentine surface. Note the presence of collagen fiber in endocytotic vacuole (arrow indicated).
- Fig. 10 Numerous fragments of collagen fibers (arrows) at the resorbing dentine surface.
- Fig. 11 Undecalcified thin section of resorbing dentine surface occupied by odontoclast is subdivided into 4 layers: resorbing surface (RS), thin dense layer (ThDL), intermediate layer (IL), and thick dense layer (TkDL).
- Fig. 12 Undecalcified thin section of resorbing dentine covered by fibroblasts is also subdivided into 4 layers: resorbing surface, thin dense layer (ThDL) intermediate layer (IL), and thick dense layer (TkDL). DT: dentinal tubule; PD: peritubular dentine.
- Fig. 13 Cytochemical localization of acid trimetaphosphatase activity in odontoclast. Enzymatic reaction can be seen in numerous endocytotic vacuoles (EV). RB: ruffled border.
- Fig. 14-21 Spectrum peaks of calcium (Ca), phosphorus (P) and sulphur (S) in dentine crystals observed in endocytotic vacuole (Fig. 14), ruffled border (Fig. 15), resorbing surface (Fig. 16), thin dense layer (Fig. 17), thick dense layer (Fig. 18), intermediate layer (Fig. 19), unresorbed intertubular dentine (Fig. 20) and unresorbed peritubular dentine (Fig. 21) by an energy-dispersive X-ray microanalysis.