原 著

コルヒチンの一回注射によるラット切歯 形成期エナメル質の石灰化異常

瀬戸口浩彰 小野夫俱子 北島俊秀 須賀昭一

日本歯科大学歯学部病理学教室（主任：須賀昭一教授）

〔受付：平成3年12月27日〕

Disturbed mineralization of the developing enamel of rat
incisor induced by single injection of colchicine

Hiroaki Setoguchi, Hukuko Ono, Toshihide Kitajima and Shoichi Suga

Department of Pathology, The Nippon Dental University School of Dentistry at Tokyo
(Chief: Prof. Shoichi Suga)

1-9-20, Fujimi, Chiyoda-ku Tokyo, 102, Japan

[Accepted for publication: December 27, 1991]

Key words: colchicine/developing enamel/mineralization/hypomineralization/rat incisor

Abstract: Disturbed mineralization in the developing enamel of rat incisor induced by the single injection of colchicine which has been considered to bound to microtubular protein (tubulin) and inhibits polymerization of microtubules as well as dissociates the microtubular structure was investigated. Wistar rats weighing about 100 g were injected with colchicine (0.17 mg/100 g body weight) subcutaneously and were sacrificed from 6 hours to 10 days after the injection. The animals were also injected with tetracycline hydrochloride (10 mg/100 g body weight) 6 hours before the sacrificing in order to observe the mineralizing sites at the time of sacrificing. The longitudinal undemineralized ground sections and demineralized sections of the developing enamel of upper incisors were investigated by means of micro-radiography, fluorescence microscopy and the various histological stainings.

Most characteristic change observed in the developing enamel was alternate appearance of hypomineralized and hypermineralized regions at the middle and late stages of maturation. The former was much wider in its range than the latter and was labelled intensely by tetracycline whereas the latter not labelled. These changes were observed from the surface layer to the innermost layer. The irregular arrangement and detachment of the ameloblasts were also observed mainly at the middle and late stages of maturation. However, the cellular changes and the disturbed mineralization pattern could not be correlated with the cyclical cell modulation of the maturation ameloblasts. The hypomineralized enamel was secondarily mineralized as it moves towards incisal side by the tooth eruption. On the other hand, the very narrow hypoplastic incremental line was formed at the matrix formation stage immediately after the injection.

緒 言

コルヒチン (colchicine) はユリ科の植物イヌサフラン (*Colchicum autumnale*) の球根 および 種子からとれるアルカロイドで、代表的な微小管阻害剤であり、その構成タンパクである チューブリン (tubulin) に特異的に結合し、これらを解重合させて破壊する作用を持つ。このような微小管阻害剤には、他にビンブラスチン (vinblastine) やコルセミド (colcemid) が知られている。微小管は、細胞内骨格としての形態形成や維持、細胞外分泌に関わる機能を持つと考えられている。実際、動物にコルヒチンを投与すると様々な器官においてこれらの機能が障害されることが確かめられている¹⁻⁵⁾。

コルヒチンの注射によって、エナメル質の形成が障害されることも確かめられている。例えば、基質形成期のエナメル芽細胞ではゴルジ体などの細胞内小器官の転位や形態異常、トームス突起の形態変化、基質物質の分泌の阻害などが認められており⁶⁻¹²⁾、また成熟期では、エナメル芽細胞の細胞内小器官の転位、形態異常が生じることが知られており、特に障害を強く受ける部分としてはいわゆる ruffle-ended ameloblast (RA) の刷子縁であるという報告¹³⁾ と smooth-ended ameloblast (SA) であるという報告がある¹⁴⁾。

以上のように、今までのところエナメル質形成細胞の変化についての研究が主であり、エナメル質の石灰化に及ぼす影響についての観察はきわめて少ない。しかもそれは基質形成期に現れる変化に限られており^{8,15)}、成熟期に現れる変化についての観察は全く行われていない。

かねてから、われわれの教室では各種の化学物質投与による形成期エナメル質の石灰化異常の出現について系統的な観察を行い、様々な知見を得てきた。これらによると、投与物質の種類に応じて、特に、成熟期での石灰化の進行に独特な変化が生じることが明らかにされてきた。こうした事実、実験条件により、成熟期の石灰化進行のメカニズムの障害される部分の異なることを示唆しており、これらの所見を詳細に解析し、比較する

ことにより、正常な状態では知ることのできなかったエナメル質形成のメカニズムを知ることが可能であると考えられる。

以上の観点から本研究では、コルヒチン投与が成熟期エナメル質の石灰化に及ぼす影響を中心に観察した。

実験方法と観察方法

本実験に用いた動物は、体重約 100 g 前後のウィスター系ラット (雄) 90匹である。その内、8匹を対照群、82匹を実験群とし、後者にコルヒチン (colchicine; Sigma 社, USA) を生理食塩水に 0.085% (w/w) の割合で溶解し、体重 100 g 当たり 0.2 cc (体重 100 g 当たり 0.17 mg) 皮下に一回注射し、注射後 6 時間、12 時間 および 1, 2, 3, 4, 5, 10 日にかけて屠殺した。

なお、屠殺時での石灰化進行部位をラベルするために、屠殺 6 時間前に (ただし注射後 6 時間目に屠殺した動物については屠殺 4 時間前に)、塩酸テトラサイクリン (Neocycline powder, Meiji, 明治製菓) を体重 100 g 当たり 10 mg, 水に溶解して腹腔内に一回注射した。

ラットは Karnovsky 液で灌流固定して¹⁶⁾、解体の後、上顎切歯をさらに同液に浸漬、約 24 時間固定した。次いで、一側の上顎切歯は脱水の後、polyester 樹脂に浸漬、包埋、硬化させた後、厚さ約 60 μ m の非脱灰の歯軸に沿った縦断研磨片とし、他側の切歯は脱灰薄片切片とした。前者についてはマイクロラジオグラムの撮影、蛍光顕微鏡法によるテトラサイクリンラベリング像の撮影、トルイジンブルー染色、などを行い、後者については hematoxylin-eosin (H-E) 染色を行った。

1. マイクロラジオグラフィによる形成期エナメル質の石灰化進行像の観察

研磨片をフィルム (Spectroscopic film, 640-O, Kodak 社製) の乳剤面に密着させ、軟 X 線を照射してマイクロラジオグラムを撮影した。使用した装置は日本ソフテックス社のマイクロラジオグラフィ装置、CMS 特注型 (X 線管球の Cu ターゲットからフィルム面までの距離は 15 cm) で、管電圧 25 kV, 管電流 13 mA, 照射時間は 15~18 分

Fig. 1 Microradiogram (A) and tetracycline labelling pattern revealed by fluorescence microscopy (B) of a longitudinal undemineralized ground section of upper incisor of a control rat. **a** indicates the beginning of matrix formation, **b** the end of matrix formation (the beginning of maturation), **c** the end of mineralization at the innermost layer, **d** the end of mineralization at the middle layer, **e** the end of mineralization at the inner layer, and **f** the end of mineralization at the outer layer.

間である。なお現像は Kodak 社指定の処方 D-158 によった。現像、定着、水洗、さらに乾燥したフィルムは、オブジェクトガラスとカバーガラスの間に封入して顕微鏡観察した。

2. 蛍光顕微鏡法によるテトラサイクリンラベリング像の観察

研磨片をオブジェクトガラスとカバーガラスの間に水で封入して、蛍光顕微鏡によりラベリング像を観察し、撮影した。テトラサイクリンは注射時における石灰化進行部位に取り込まれ、紫外線照射によって黄金色の蛍光を発する。切歯の形成期エナメル質の蛍光像を基質形成期の初めから成熟期の末期以降に至るまでを分割して撮影し、その拡大プリントをボード上に貼り合わせ、エナメル質の石灰化進行期間中におけるラベリング像の

消長、末期でのラベリングの消失位置の変化を観察した。

3. 研磨片のトルイジンブルー染色による細胞変化の観察

研磨片をマイクロラジオグラフィーと蛍光顕微鏡法で観察した後、歯質の石灰化進行像の変化に対応させて細胞の変化を観察するため、研磨片をさらに 0.1% トルイジンブルーで染色し、観察した。

4. 脱灰切片の H-E 染色による細胞変化の観察

一側の上顎切歯を 3% 蟻酸で約 1 週間脱灰した後、唇・舌的な縦断パラフィン切片とし、H-E 染色によって観察した。

Fig. 2 Microradiogram (A), tetracycline labelling pattern revealed by fluorescence microscopy (B) and Toluidin blue staining (C), of a longitudinal undemineralized ground section of upper incisor of a rat injected with colchicine 1 day before the sacrificing. **a** indicates the beginning of the matrix formation, **b** the end of matrix formation (the beginning of maturation), **c** the end of mineralization at the innermost layer, **d** the end of mineralization at the middle layer, **e** the end of mineralization at the inner layer, and **f** the end of mineralization at the outer layer.

Open circle indicates the range of hypomineralized enamel, solid circle the range of hypermineralized enamel, triangle the range of heavily disturbed ameloblasts, and bar the smooth-ended ameloblasts (SA).

Fig. 3 Microradiogram (A) and tetracycline labelling pattern revealed by fluorescence microscopy (B), of a longitudinal undemineralized ground section of upper incisor of a rat injected with colchicine 2 days before the sacrificing. **a** indicates the beginning of matrix formation, **b** the end of matrix formation (the beginning of maturation), **c** the end of mineralization at the innermost layer, **d** the end of mineralization at the middle layer, **e** the end of mineralization at the inner layer, and **f** the end of mineralization at the outer layer.

Open circle indicates the range of hypomineralized enamel and solid circle the range of hypermineralized enamel.

観察所見

本実験による変化の理解のしやすさを考慮してエナメル基質の石灰化像の変化から述べることにする。

1. マイクロラジオグラムの所見

1) 対照動物の所見 (Fig. 1-A)

基質形成期では、基質が形成されるとすぐに軽度石灰化する。ただし、ごく幅狭い最内層は象牙質より高い石灰化度を示す。しかしこの期間中、二次的な石灰化度の上昇はほとんど認められない。この時期のエナメル質の石灰化度は最内層を除いて象牙質のそれよりも低い。

成熟期に入ると石灰化度の二次的な上昇が全層

にわたって始まる。成熟期の初期では初め、幅狭い最内層が最も高い石灰化度を示している。しかしその石灰化度の上昇は緩慢である。それに対して、内層や中層での石灰化度の上昇は急で、それに対して、幅狭い外層は最もゆっくりとした石灰化度の上昇を示す。成熟期中期に入ると、中層が最も急な石灰化度の上昇を示し、それに次ぐのが内層で、幅狭い外層はなお、最も緩やかな上昇を示す。この時期の中頃を過ぎると全層の石灰化度は象牙質のそれを上回るようになる。そして、層別の石灰化度の高さは、中層、最内層、内層、外層の順である。

成熟期の後期に入ると、最内層、中層、内層の順に石灰化度上昇は緩やかになり、次いで、停止するが、一方、幅狭い外層は急な上昇を始め、最

Fig. 4 Microradiogram (A) and tetracycline labelling pattern revealed by fluorescence microscopy (B), of a longitudinal undemineralized ground section of upper incisor of a rat injected with colchicine 3 days before the sacrificing. **a** indicates the beginning of matrix formation, **b** the end of matrix formation (the beginning of maturation), **c** the end of mineralization at the innermost layer, **d** the end of mineralization at the middle layer, **e** the end of mineralization at the inner layer, and **f** the end of mineralization at the outer layer.

Open circle indicates the range of hypomineralized enamel and solid circle the range of hypermineralized enamel.

も最後に石灰化度上昇を終える。最終的に石灰化度は外層で最も高く、中層、最内層、内層の順である。

2) 実験動物の所見

石灰化像上、変化の現れるのは注射後、1日目頃である。それは、成熟期中期から後期に相当する範囲での全層にわたる低石灰化部の断続的な出現である。この変化は特に内層と幅狭い外層で著明である。この断続的に出現した低石灰化部の切歯基部側や次ぎの低石灰部との境目には比較的高い石灰化度を示す部分が介在している。この高い石灰化度を示しているようにみえる部分が事実異常な高石灰化を示しているのか、単に、正常な石灰化度を示しているのにすぎないのかは明らかではない。ここではとりあえず高石灰化部と

呼ぶことにする。

このような低石灰化部の出現は4回から5回ぐらいのくり返しであるが、低石灰化部と高石灰化部のそれぞれが示す歯軸上の距離は一樣ではない。一般に、高石灰化部より低石灰化部の取る距離の方がはるかに長い。低石灰化部と高石灰化部との境目は移行的であるが、それはエナメル質の表面に対してほぼ垂直な方向をとっているのが注目される。また、一本の歯牙の中では、低石灰化部の石灰化度は切端側に向かうに従って少しずつ高まる傾向がある (Fig. 2-A)。このような変化は2日目以降になるとより明瞭になる (Fig. 3-A, 4-A, 5-A)。日数の経過に伴って、低石灰化部のくり返し回数が増すのか否かについては確かめることはできなかった。

Fig. 5 Microradiogram (A) and tetracycline labelling pattern revealed by fluorescence microscopy (B), of a longitudinal undemineralized ground section of upper incisor of a rat injected with colchicine 4 days before the sacrificing. **a** indicates the beginning of matrix formation, **b** the end of matrix formation (the beginning of maturation), **c** the end of mineralization at the innermost layer, **d** the end of mineralization at the middle layer, **e** the end of mineralization at the inner layer, **f** the end of mineralization at the outer layer.

Open circle indicates the range of hypomineralized enamel and solid circle the range of hypermineralized enamel.

注射後の日数が経過するに従って、以上のような石灰化異常部は次第に切端側に移動する。その間、低石灰化部は切端側からわずかに石灰化度を増してゆくのが観察される。しかし、注射後、5日目以降になっても、正常な石灰化度に到達することはないようである(Fig. 6-A)。なお、その間に、注射した時点で成熟期の初期にあった部分はほとんど正常な石灰化進行像を示し、そこに新しい石灰化異常部が出現することはない。

以上の変化とは別に、注射後24時間以内に、注射時に基質形成期にあった部分に、ごく幅狭い減形成的な低石灰化の発育線とそれに沿う幅狭い高石灰化の線の出現がみられる。注射後3日目を過ぎると、この低石灰化の発育線がエナメル質表面

と接する部分が他の部分より僅かに高い石灰化度を示すことがある。

2. テトラサイクリンによるラベリング像の変化

1) 対照動物の所見

形成期にあるエナメル基質は、基質形成期の初めから成熟期の末期にかけてテトラサイクリンによってラベルされ、黄金色の蛍光を発する。ただし、段階によって蛍光像に変化が現れる。基質形成期と成熟期の初期では蛍光度は比較的低いが、中期に入ると、中層から最内層にかけて蛍光の度合いが高まるように見える。しかしこれは研磨片上でみられる光の複屈折度の上昇に伴うもので、本当の蛍光度の上昇度ではない。

Fig. 6 Microradiogram (A) and tetracycline labelling pattern revealed by fluorescence microscopy (B), of a longitudinal undemineralized ground section of upper incisor of a rat injected with colchicine 5 days before the sacrificing. **a** indicates the beginning of matrix formation, **b** the end of matrix formation (the beginning of maturation), **c** the end of mineralization at the innermost layer, **d** the end of mineralization at the middle layer, **e** the end of mineralization at the inner layer, and **f** the end of mineralization at the outer layer.

Open circle indicates the range of hypomineralized enamel and solid circle the range of hypermineralized enamel.

その部位より切端側に移行すると、外層以上では蛍光度の低下が始まり、次いで、まず、幅狭い最内層でラベリングの消失が起こる（各図上でcで示した）。さらに、切端側に向かって、中層(d)、内層(e)の順でラベリングは消失する。その頃には、幅狭い外層でのラベリングの度合いは逆に上昇を示すようになる。しかし、この外層のラベリングもかなり切端側に移行した点で消失する(f)。この間に、マイクロラジオグラム上では、外層は石灰化度の急な上昇を示し、最終的に全層中で最高の石灰化度を示すようになる (Fig. 1-B)。

2) 実験動物の所見

実験動物の形成期エナメル質のラベリング像上

に現れた変化の第一は、マイクロラジオグラム上、成熟期中期以降に現れた低石灰化部の間に介在していた高石灰化部での蛍光度の低下である。それは幅広い中層と内層で著しい。それに対して、低石灰化部では強い蛍光がみられるが、それは中層と幅広い内層で著しい。ただし、それは先に述べた光の複屈折を伴うものである。このような所見は注射後1日目ですでにみることができる (Fig. 2-B)。

注射後の日数の経過に伴い、歯の萌出によって石灰化異常部が切端側に移動しても、低石灰化部はしばらくの間はテトラサイクリンでラベルされ、それに対して、高石灰化部はラベルされることは

Fig. 7 Hematoxyline-Eosin stain of longitudinal demineralized section of the upper incisor of a control rat. A shows from the late stage of matrix formation to the middle stage of maturation and B from the middle stage to the late stage of maturation. Asterisk indicates the end of matrix formation.

Bar indicates the smooth-ended ameloblasts (SA).

なく両部位を明瞭に区別することができる。しかし、低石灰化部のラベリングの強度は切端側に向かうに従って次第に強くなる傾向がある（それに伴って、光の複屈折度も低下し、遂には消失する）(Fig. 3-B, 4-B, 5-B)。注射後5日目になって、マイクロラジオグラム上、低石灰化部の切端側の部分がなお、わずかに低石灰化であっても、その部分はもはやほとんどラベルされない (Fig. 6-B)。

以上の変化に伴って、成熟期の末期においてエナメル質の各層でのラベリングが消失する位置が基底側、ないしは、切端側にわずかにずれることがある。しかし、ラベリングが消失する層別の順序には変化はみられない。

基質形成期において出現した低石灰化の減形成線では、わずかに蛍光度が低いのが認められる。

3. エナメル質形成細胞の変化

1) 対照動物の所見 (Fig. 7-A, B)

ラット切歯の形成過程は基質形成期と成熟期に分けられるが、基質形成期では、高円柱状のエナメル芽細胞がその遠心端のトームスの突起を経てエナメル基質物質を分泌し、その所定の厚みまで基質形成を継続する。基質はエオジンで好染される。

成熟期に入ると、エナメル芽細胞はにわかに背が低くなり、トームス突起は消失する。成熟期間中、エナメル芽細胞は形態と構造の上で2つの型をくり返し示す(cyclical cell modulation)¹⁷⁻¹⁹⁾。すなわち、遠心端が波状縁(ruffled border)を持つ状態(ruffle-ended ameloblast, RA)と平坦である場合(smooth-ended ameloblast, SA)とである。RAとSAはともに核は近心端側に片寄っており、位置する高さはほぼ一定しているが、背の高さはRAよりもSAの方が低く、また、RAが連なる距離に比べるとSAのそれははるかに短い。

成熟期中期から鉄顆粒がエナメル芽細胞の原形質内に出現し、次第に大きさを増し、蓄積してゆく。成熟期の末期で、外層の石灰化が終り、テトラサイクリンによるラベリングが消失すると(f)、まもなく、エナメル芽細胞は鉄顆粒をエナメル質の幅狭い表層に分泌する。それより切端側で鉄の分泌が終ると、エナメル芽細胞の背は低くなり始め、次第に扁平化する。

2) 実験動物の所見

まず脱灰切片の hematoxylin-eosin 染色像について述べる (Fig. 8-A, B)。注射後6時間目ですでに細胞の形態変化が観察される。まず、基質形成期ではエナメル芽細胞のトームスの突起の崩壊

Fig. 8 Hematoxyline-Eosin stain of longitudinal demineralized section of the upper incisor of a rat injected with colchicine 2 days before the sacrificing. A shows from the late stage of matrix formation to the middle stage of maturation and B from the middle stage to the late stage of maturation. Asterisk indicates the end of matrix formation. Detachment of the maturation ameloblasts and the cyst formation can be observed at the late stage of maturation.

と基質表面からの一時的な剥離、細胞の配列不整、などである。以上の変化に伴って基質に幅狭い減形成線が形成される。2日以上経過するとエナメル芽細胞は再び基質表面に付着し、比較的規則正しい配列を示し、基質の形成を再開しているのが観察される。成熟期にある細胞の変化は注射後12時間目から1日の後に現れる。それは、主に、成熟期の後期にあるエナメル芽細胞の基質表面からの剥離と、内部にエオジン好性の液状物を入れた嚢胞の形成である。嚢胞を囲むエナメル芽細胞は扁平化している。このような変化が果たしてRAの状態を示すエナメル芽細胞に出現したのか、それともSAの状態にある細胞に出現したのかは明らかでない。以上の変化に伴って、隣接する乳頭層細胞にも配列の不整がみられる。

以上とは別に、エナメル芽細胞の背が低くなり、不規則に配列している部分がとびとびに出現しているのを見ることがある。ただし、本来、SAはRAに比べて背がはるかに低いことから、このような変化とSAの所見との区別にあたっては慎重でなくてはならない。

一本の切歯で以上のような変化が現れる箇所は

それほど多くない。3～5カ所程度である。少なくとも光学顕微鏡的な観察では、それ以外に明確な変化を見出すことはできなかった。

さらに、日数が経過すると、一度剥離した細胞はエナメル質表面に再付着するためか嚢胞の存在は認められなくなる。そのかわり、細胞の背が低くなり、配列の不規則な部分が点在するのはなお、みられる。

基質の石灰化像やラベリング像の変化と細胞変化の関係を知るために、研磨片をトルイジンブルーで染色して観察した。

注射後6時間で細胞変化はみられるが、基質の石灰化像の変化と対応できるのは注射後1日目からである。切片の染色像でみられたのと同じ変化が観察されるが、そのような変化の出現部位と低石灰化部とが一致するのを見ることがある。ただし、その範囲は必ずしも正確に一致しているわけではない。しかし、低石灰化部に沿うエナメル芽細胞の形態が正常に近く、配列が規則正しくみえる場合もある。一方、高石灰化部に沿う細胞はほとんどの場合、規則正しい形態と配列を示している (Fig. 2-C)。

注射後の日数が長くなるにつれて、かつて出現した細胞変化が部分的に回復するせいか、細胞変化の存在範囲と低石灰化部の範囲が一致することが少なくなる。その中で、よく一致するのはかつて嚢胞を形成し、その後、エナメル芽細胞が基質表面に再付着した部分とその下の低石灰化部である。

試料片の厚みと細胞変化の二次的回復の進行の関係から、この方法による観察で、低石灰化部の出現が RA または SA のいずれの状態にあったエナメル芽細胞に現れた変化によるものかを確認することはできなかった。

エナメル基質をみると、マイクロラジオグラム上、低石灰化部に相当する部分では内層以下で光の複屈折度が高く、不透明にみえ、それに対して、高石灰化部では比較的透明にみえることがわかる。しかし、日数の経過に伴って、切端側から、不透明部は次第に透明化して行く。この変化はマイクロラジオグラム上でみられる二次的な石灰化度の上昇と関連している。

考 察

コルヒチンを始めとする微小管阻害剤によるエナメル質形成の障害についての実験は、これまでにかなり多くの研究者によって行われてきた。しかし、その多くはエナメル質形成細胞に現れる変化についてであった。例えば、基質形成期のエナメル芽細胞では基質物質の合成の障害、ゴルジ体など細胞内小器官の転位や形態の異常、トームス突起の崩壊や形態変化、などが報告されている^{6-12, 20-24)}。一方、成熟期のエナメル芽細胞については、遠心端の波状縁(ruffled border)の消失、細胞内小器官の転位や形態の異常、成熟期末期でのエナメル質表層への鉄の分泌の抑制などが観察されている^{13, 14, 25)}。

それに対して、歯質に生じる変化についての研究例はきわめて少ない。Wakita ら⁸⁾は、イヌにコルヒチンを一回注射することにより基質形成期のエナメル質に一本の減形成線が出現することを、また、溝渕¹⁵⁾はラットにビンブラスチン(vinblastine)を一回皮下に注射すると、基質形成期のエ

ナメル基質に形成障害線が出現するのをみている。それに対して成熟期のエナメル基質に生ずる変化は、これまでのところ、まったく研究の対象とされていなかった。その理由として、本来、コルヒチンは細胞外分泌を阻害する作用をもつと考えられていたことから、研究の関心はもっぱら分泌を盛んに行っている基質形成期のエナメル芽細胞とその直下のエナメル基質に集まったこと、さらに、成熟期のエナメル質は高度に石灰化しているので、その基質変化の観察のための標本作製に技術的な難しさがあることから、その観察を避ける傾向があったこと、などがあげられる。

本研究は、コルヒチンの一回注射によって形成期のエナメル質、特に、成熟期のそれに現れる変化に焦点を当てて観察したことに特徴があり、その結果、以下に要約するような興味ある知見を得ることができた。

1. 注射後1日目から、成熟期中期から後期にかけて、エナメル質の表層から最内層に及ぶ低石灰化部がくり返し出現し、さらに、その間に、ごく短い高石灰化部が介在しているのが観察された。それに対して、成熟期の初期にある基質には特別な変化は観察されなかった。

2. エナメル芽細胞には形態と配列の異常が観察されたが、特に、成熟期後期でのエナメル芽細胞の剝離と嚢胞の形成が注目された。

3. 石灰化異常部のくり返し出現と、細胞変化との関係を確認することはできなかった。また、本来、成熟期のエナメル芽細胞でみられる RA と SA の周期的なくり返し(cyclical cell modulation)との間にも関連を見出すことはできなかった。

以下、それぞれの事実について、成熟期エナメル質の表層から深層にかけて現れた低石灰化部と高石灰化部のくり返し出現と併せて考察を行うことにする。

エナメル質の石灰化は基質形成期と成熟期の2つの過程を経て進行する。前者での石灰化度は低いですが、後者の段階に入ると、急な上昇を示す。ただし、それに要する時間は標本上の計測によると、基質形成期のその3~4倍にも達することがわかる²⁶⁻²⁸⁾。その間、エナメル質の層により、また、時期により石灰化度とその上昇の勾配が異

なことが知られている^{27,28)}。

ここで、成熟期中期と後期に焦点を当てて石灰化の進行像を考えてみよう。石灰化度上昇の勾配の最も急なのは初期で、ラットの切歯では中層で最も著しく、以下、外層、内層、最内層の順である（ただし、石灰化度はすでに基質形成期で高度に石灰化していた最内層、中層、外層、内層の順である）。ところが、中期に入ると、石灰化度上昇の勾配は中層で最も著しいが、以下、内層、外層の順となり、最内層はもはや石灰化度を上昇させない（石灰化度は、最内層、中層、外層の順となる）。この時期に入って間もなくエナメル質の石灰化度は象牙質のそれを越すようになる。後期に入ると、中層と内層での石灰化度上昇はゆるやかになり、テトラサイクリンによるラベリング像によると中層、内層の順で石灰化を終える。それに対して、今まで最もゆっくりと石灰化度を増してきた幅狭い外層はにわかに急な石灰化度の上昇を始め、ラベリング像上、全層中、最後に石灰化を終えることがわかる。最終的な石灰化度は外層で最も高く、以下、中層、最内層、内層の順である。エナメル芽細胞側から幅狭い表層への鉄の沈着は外層の石灰化が終わってから起こる^{27,28)}。従来、多くの研究において、観察の対象はもっぱら初期の段階に限られていたが、以上述べた所見からも明らかなように、中期以降においても初期とは異なるパターンをとってゆっくりではあるが石灰化を進めており、その過程に対しても注意を払うべきであることを述べてきた(須賀, 1987)²⁹⁾。

以上の過程はエナメル芽細胞を始めとするエナメル器の細胞によってコントロールされていると考えられるが、それらが果たす役割としては次のことが考えられている。

(1) 基質形成期で沈着した amelogenin を初めとする基質物質の二次的な脱却を行う。そのためにはあらかじめ基質には蛋白分解酵素による解重合が起こっており³⁰⁻³³⁾、それは次いで、ruffled border を持つエナメル芽細胞(RA)によって二次的に脱却されると考えられている^{17,34)}。このような基質物質の脱却によって、アパタイト結晶の成長のためのスペースが提供される。脱灰切片上、基質の染色性の低下や、脱灰に用いられた酸によ

って溶失するようになるのは成熟期の初期でみられることから、基質の脱却は初期で最も活発であると一般には考えられている。

(2) 二次的な石灰化度の上昇にとって必要な Ca^{2+} と PO_4^{3-} の transport を行っていることがさまざまな組織化学的検索によって確かめられている³⁵⁾。

(3) 成熟期の初期では、エナメル芽細胞はなお、基質物質の合成能を持ち、基質物質(amelogeninと思われる成分)を基質側に放出しているという^{36,37)}。ただし、その機能的意義は不明である。

(4) ラットなど齧歯目の一部の動物の切歯では、成熟期、特に、中期以降のエナメル芽細胞の原形質中に鉄が ferritin の形で濃縮し、石灰化の最後の段階が終るとエナメル質に向かって分泌、放出される。

(5) 以上のほかに、未知の役割を果していることが想像される。

以上の観点から、本実験で観察された変化の出現のメカニズムを考えてみることにする。

エナメル質での低石灰化の出現は、基質の二次的な脱却の障害とミネラル沈着の抑制の一方、または両方によって生じたことが想像される。コルヒチンの作用は微小管の機能の障害であることを考えると、それによってエナメル基質の脱却や Ca^{2+} の輸送、などの機能が妨げられる可能性が大きい。

塩化ストロンチウム(SrCl_2)、フッ化ソーダ(NaF)、HEBP、などさまざまな化学物質の投与によるエナメル質の石灰化障害の観察によって、基質形成期の末期や成熟期にあるエナメル芽細胞が選択的に侵されて変性、配列不整、剝離などが起こり、その直下のエナメル基質は表層から深層に及ぶ低石灰化が起こること、しかも、脱灰染色切片上、有機性基質の酸可溶性の障害と残存が起こること、などが一般的に知られている^{38,39)}。

その観点からも、本実験の所見はきわめて特異であるといわなくてはならない。本実験においては、脱灰染色切片上、低石灰化部において有機性基質の酸可溶性の障害と残存を確かめることはできなかった。しかし、これは有機基質の解重合や脱却が起こらなかったことによるのではなく、変化の

起こった段階（成熟期中期以降）では、それまでにすでに大量の基質物質の脱却が起こっており（脱灰染色切片上、有機基質は脱灰によって完全に溶失している）、基質脱却の障害が起こっても脱灰染色切片上で認め得るほどの変化を残さなかったものと想像される。もちろん、そのほかに、 Ca^{2+} や PO_4^{3-} の transport の障害も起こっていたであろうが、それを組織化学的に確めることはできない。

Suga (1987)⁴⁰⁾ は、ヒトのエナメル質に現れる低石灰化をいくつかのタイプに分類した。すなわち、基質形成期間中か、それが終了した直後（成熟期の初期）のエナメル器細胞に選択的な機能障害が起こることがあり、それらの場合、その直下のエナメル基質の全層に著明な低石灰化が起こる。一方、慢性のフッ素中毒による斑状歯では、主に外層に限局した部域のみに低石灰化が起こり、それは成熟期末期でのエナメル芽細胞の早期萎縮によると考えた。

今回の実験で、成熟期中期以降に突然生じたエナメル芽細胞の機能の障害によって、その直下の全層にわたって低石灰化が出現したことには、成熟期中期以降においてもエナメル芽細胞をはじめとするエナメル器の細胞は、その直下のエナメル質のほとんど全層の石灰化進行をコントロールするための重要な役割を演じていることを示唆している。

長い距離に及ぶ低石灰化部と、ごく短い距離の高石灰化部が周期的にくり返して出現していた。このような所見はいまだかつて報告されたことはない。なぜこのような特異な変化が現れたのかの説明にあたってまず考えられることは、本来、成熟期でみられるエナメル芽細胞の形態と機能の周期的くり返し (cyclical cell modulation) との関係である。すなわち、コルヒチン注射がそのある特定の段階にある細胞 (RA か SA か) を選択的に障害したことの結果ではないかと一応想像される。現在までの報告にはコルヒチンの注射によって RA が選択的に障害されるとするもの¹³⁾ と、SA が障害されるとするもの¹⁴⁾ とがある。しかし、本観察によると、成熟期中期以降での低石灰化部位の出現の回数は RA と SA のくり返し

の回数をはるかに上回っていたことに注意しなければならない。すなわち、本実験でみられた石灰化不全は RA と SA の周期的なくり返しに必ずしも正確に対応していないことを考えさせるものである。コルヒチンに対する感受性は、RA, SA のような明確な細胞学的所見で示されるような周期とは別な細胞学的状態の周期が関係しているのかもしれない。

事実、本実験の脱灰染色切片の所見、研磨片の染色所見のいずれでも、コルヒチンの作用が RA, SA のどの段階で著しいかを特定することはできなかった。なお、この場合、注意しなければならないことは、注射後の日数の経過に伴い、細胞の形態と配列に回復がみられ、その後、形態的に異常を残す細胞はきわめて断続的にしかみられなかったことである。

それにしても、成熟期の末期において細胞の障害が強く、しばしば細胞がエナメル質表面から剝離して嚢胞を形成しているのをみたことは重要である。その理由については今後の検索を待たなくてはならないが、成熟期の後期においてはエナメル芽細胞の細胞質内に微小管が特に密に分布し、さまざまな機能に重要な役割を担っていることを示唆するものではないかと考えられる。

例えば、成熟期中期以降では原形質内への鉄顆粒 (ferritin) の蓄積が進み、次いで、末期になると、エナメル質表層への分泌と沈着が起こるが、これらの過程には微小管が関与していると考えられている¹⁴⁾。

成熟期のエナメル芽細胞が、二次的な高度な石灰化度の上昇に対して終始重要な役割を果たしていることはすでに述べたが、コルヒチンの注射が特に中期以降の細胞を障害し、時には、エナメル質表面からの剝離さえ起こし、しかも、その直下に全層にわたる低石灰化を起こしたことは、多分にこの時期で活発な微小管の機能が選択的に障害され、それに伴って基質物質の吸収能や Ca^{2+} を transport する能力が障害されたことが考えられる。しかし、成熟期にあるエナメル芽細胞は、本来、多面的な働きをしていることが考えられるから、中期以降において以上とは別の独特な機能があり、それが障害された結果である可能性もあ

る。

低石灰化部と隣在する正常に石灰化した基質, または, 高石灰化部との境目は移行的ではあるが, エナメル基質表面に対してほぼ垂直な線を描いていた。この事実は, 本来, 成熟期での個々のエナメル芽細胞はその直下の全層に対してのみ作用していることの反映であると考えられる。

低石灰化部の間に出現していた高石灰化部の出現は, なお石灰化進行中の基質にみられたものであり, それが一時的に加速された所見と考えるべきであろう。テトラサイクリンによるラベリング像上で蛍光度の低下がみられたことは, それを裏づけている。このような所見はかつて報告されたことはなく, その出現のメカニズムは今のところまったく不明である。

切歯の萌出に伴い, 低石灰化部が次第に切端側へ移動するにつれて, その石灰化度が上昇する傾向がみられた。このような現象が, その上に位置するエナメル芽細胞の機能が回復したことによるのか, 単なる物理化学的な現象としての無機塩の二次的沈着によるのか, については今後の検索が必要である。

今まで, もっぱら成熟期中期以降にみられた特異な石灰化現象について考察を加えてきた。それとは別に, 注射時に基質形成期にあった部分に減形成的な低石灰化線とそれに沿う幅狭いわずかな高石灰化の線が出現した。このような所見はすでに何人かの研究者によって報告されている^{8,15)}。これは注射によって生じた一時的な基質物質の合成と, 分泌の障害によるものと考えられる。これに似た所見はフッ化ソーダ(NaF)やHEBPの一回注射の場合にも認められている^{39,41,42)}。この減形成線がエナメル質表面に接する部分に小さな高石灰化部の出現がみられたが, 部位的にみて

減形成的な基質と関係するもので, 中期以降にみられた高石灰化部とは出現のメカニズムからいってまったく異なるものと考えられる。

結 論

1. ラットにコルヒチンを一回注射して, 上顎切歯の形成期エナメル質に現れる変化を観察した。

2. マイクロラジオグラム上, 注射時に成熟期中期と後期にあったエナメル基質に表層から深層に及ぶ低石灰化部と高石灰化部がくり返し出現するのが観察された。ただし, 前者が占める距離は後者のそれよりはるかに長い。

3. 屠殺直前に注射したテトラサイクリンにより低石灰化部は強くラベルされるのに対し, 高石灰化部はほとんどラベルされない。

4. 脱灰切片と非脱灰研磨片の染色所見によると, 成熟期中期以降にエナメル芽細胞の配列異常や剥離(嚢胞形成)が観察された。このような変化が, 本来この時期でみられる ruffle-ended ameloblasts と smooth-ended ameloblasts のくり返しのどの段階で出現するのかを特定することはできなかった。

5. また, 細胞変化と石灰化異常所見との関係を明らかにすることもできなかった。

6. 低石灰化部は歯の萌出による切端側への移動に伴い, 二次的に石灰化度を高める傾向がある。

7. 成熟期中期以降に出現したこの特異な変化は, この時期で活発なエナメル芽細胞内の微小管の機能の障害に続く変化と考えられる。

8. 以上とは別に, 注射時に, 基質形成期にあった部分に, 發育線に沿った低石灰化の減形成線の出現が観察された。

抄録: 微小管を選択的に障害することが知られているコルヒチン (colchicine) を体重 100 g のウイスター系ラットに一回注射し, それによって起こった上顎切歯の形成期エナメル質の変化を, 非脱灰研磨片についてマイクロラジオグラフィー, テトラサイクリンラベリング, トルイジンブルー染色像, などによって, また, 脱灰切片の hematoxylin-eosin 染色像によって, 比較観察した。

注目すべき変化は, 成熟期中期以降に出現したエナメル質の表層から深層に及ぶ低石灰化部と高石灰化部のくり返しの出現である。前者の占める範囲は後者のそれよりはるかに長い。

成熟期中期以降のエナメル芽細胞に配列不整やエナメル質表面からの剥離, それに続く嚢胞の形成がみ

られた。しかし、その出現とエナメル質石灰化異常部との位置的関係、また本来、この段階でみられたエナメル芽細胞の RA から SA へのくり返しとの関係を明らかにすることはできなかった。

文 献

- 1) Ehrlich, H.P., Ross, R. and Bornstin, P. : Effects of anti-microtubular agents on the secretion of collagen. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.* **62** : 390-405, 1984.
- 2) Stein, O., Sanger, L. and Stein, Y. : Colchicine-induced inhibition of lipoprotein and protein secretion into the serum and lack of interference with secretion of biliary phospholipids and cholesterol by rat liver *in vivo*. *J. Cell Biol.* **62** : 90-103, 1974.
- 3) Seybold, J., Bieger, W. and Kern, H. F. : Studies on intracellular transport of secretory proteins in the rat exocrine pancreas. II. Inhibition by anti-microtubular agents. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* **368** : 309-327, 1975.
- 4) Harwood, R., Grant, M.E. and Jackson, D.S. : The route of secretion of procollagen. The influence of piperydyl, colchicine and antimycin A on the secretory process in embryonic chick tendon and cartilage cells. *Biochem. J.* **156** : 81-90, 1976.
- 5) Patzelt, C., Brown, D. and Jeanrenaud, B. : Inhibitory effect of colchicine on amylase secretion by rat parotid glands : Possible localization in the Golgi area. *J. Cell Biol.* **73** : 578-593, 1977.
- 6) Kudo, N. : Effect of colchicine on the secretion of matrices of dentide and enamel in the rat incisor : An autoradiographic study using H-proline, *Calcif. Tiss. Res.* **18** : 37-46, 1975.
- 7) Lin, W., Kumamoto, Y., Ogura H., Watanabe, K. and Takuma, S. : Effect of colchicine administration on rat ameloblasts, odontoblasts and osteoblasts. *J. Dent. Res.* **59** (Special Issue B) : 919, 1980.
- 8) Wakita, M. and Kobayashi, S. : The three dimensional structure of Tome's processes and the development of the microstructural organization of tooth enamel. In : *Mechanisms of Tooth Enamel Formation*. (Edited by Suga, S.), pp. 65-89, Quintessence, Tokyo, 1983.
- 9) Akita, H. and Kagayama, M. : Ultrastructure of mouse incisor ameloblasts after vascular perfusion with colchicine. *Cell Tissue Res.* **239** : 567-574, 1985.
- 10) Bronckers, A.L.J.J., Lyaruu, D.M., Bervoets, Th. J.M. and Woltgens, J.H.M. : Autoradiographic, ultrastructural and biosystematic study of the effect of colchicine on enamel matrix secretion and enamel mineralization in hamster tooth germs *in vitro*. *Archs oral Biol.* **33** : 7-16, 1988.
- 11) Matsuo, S., Takano, Y., Wakisaka, S., Ichikawa, H., Nishikawa, S., Itotagawa, T. and Akai, M. : Cytochemical study of the Golgi apparatus and related organelles of the secretory ameloblasts of rat molar tooth germs cultured with and without colchicine. *Archs. Oral Biol.* **33** : 433-441, 1988.
- 12) Matsuo, S., Takano, Y., Wakita, S., Ichikawa, H., Nishikawa, S. and Akai, M. : Effect of colchicine on the transport of precursor enamel protein in secretory ameloblasts studied by H-proline radioautography *in vitro*. *Anat. Rec.* **221** : 812-822, 1988.
- 13) Akita, H., Kagayama, M. and Sato, R. : Light and electron microscopy of the effects of colchicine and vinblastine on maturing rat ameloblasts *in vivo*. *Archs. oral Biol.* **28** : 263-271, 1983.
- 14) Ogura, H., Ohya, K., Mataka, S., Hashimoto, K. and Kubota, M. : Experimental studies on the transport mechanisms of iron in rat incisors using Fe and colchicine. In : *Tooth Enamel IV*. (Edited by Fearnhead, R.W. and Suga, S.), pp. 256-260, Elsevier Science, Amsterdam, 1984.
- 15) 溝淵寿一 : ビンブラスチン投与によるラットの切歯珐瑯質の形成障害に関する電子顕微鏡的研究. *歯科学報*, **84** : 1105-1136, 1984.
- 16) Karnovsky, M.J. : A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27** : 137-138, 1965.
- 17) Suga, S. : Amelogenesis, some histological and histochemical observations. *Int. Dent. J.* **9** : 364-420, 1959.
- 18) Josephsen, K. and Fejerskov, O. : Ameloblast modulation in the maturation zone of rat incisor enamel organ. A light microscopic study. *J. Anat.* **124** : 45-70, 1977.
- 19) Warshawsky, H. and Smith, C.E. : Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *Anat. Rec.* **179** : 423-446, 1974.
- 20) Moe, H. and Mikkelsen, H. : Light microscopical observations on the effect of vinbla-

- stine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. I. Short-term effect on secretory ameloblasts, *Acta path. microbiol. scand. Sect. A* **85** : 73-88, 1977.
- 21) Moe, H. and Mikkelsen, H. : On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. 2. Protracted effect on secretory ameloblasts. A light microscopical study. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A* **85** : 319-329, 1977.
 - 22) Moe, H. and Mikkelsen, H. : On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. 3. Acute and protracted effect on differentiating ameloblasts. A light microscopical study. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A* **85** : 330-334, 1977.
 - 23) Karim, A. and Warshawsky, H. : The effect of colcemid on the structure and secretory activity of ameloblasts in the rat incisor as shown by radioautography after injection of ^3H -proline. *Anat. Rec.* **195** : 587-610, 1979.
 - 24) Nanci, A., Uchida, T. and Warshawsky, H. : The effects of vinblastine on the secretory ameloblasts : An ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical study in the rat incisor. *Anat. Rec.* **219** : 113-126, 1987.
 - 25) 高田克重 : ビンブラスチン投与によるラット切歯成熟期珐瑯芽細胞の超微細構造的変化. 歯科学報, **86** : 1-44, 1986.
 - 26) Suga, S., Murayama, Y. and Musashi, T. : A study of mineralization process in the developing enamel of guinea pigs. *Archs. oral Biol.* **15** : 597-612, 1970.
 - 27) Suga, S. : Comparative histology of progressive mineralization pattern of developing incisor enamel of rodents. *J. Dent. Res.* **58(B)** : 1025-1026, 1979.
 - 28) Suga, S. : Comparative histology of the progressive mineralization pattern of developing enamel. In : *Mechanisms of Tooth Enamel Formation* (Suga, S. Ed.), pp. 167-203, Quintessence Publishing Co., Tokyo, 1983.
 - 29) 須賀昭一 : エナメル質形成過程のあらまし. エナメル質. その形成, 構造, 組成と進化. (須賀昭一編). pp. 46-49, クインテッセンス出版, 東京, 1987.
 - 30) Suga, S. : Histochemical observation of proteolytic enzyme activity in the developing dental hard tissues of the rat. *Arc. Oral Biol.* **15** : 555-558, 1970.
 - 31) Shimizu, M., Tanabe, T. and Fukae, M. : Proteolytic enzyme activity in porcine immature enamel. *J. Dent. Res.* **58(B)** : 782-789, 1979.
 - 32) Crenshaw, M.A. and Bawden, J.W. : Proteolytic activity in embryonic bovine secretory enamel. In : *Tooth enamel IV.* (Fearnhead, R.W. and Suga, S. Eds.), pp. 109-113, Elsevier Science, Amsterdam, 1984.
 - 33) Carter, J., Smillie, A.C. and Shepherd, M.G. : Proteolytic enzyme in developing porcine enamel. In : *Tooth enamel IV.* (Fearnhead, R.W. and Suga, S. Eds.), pp. 229-233, Elsevier Science, Amsterdam, 1984.
 - 34) Reith, E.J. and Cotty, V.F. : The absorptive activity of ameloblasts during the maturation of enamel. *Anat. Rec.* **157** : 577-588, 1967.
 - 35) Takano, Y., Ozawa, H. and Crenshaw, M.A. : The mechanism of calcium and phosphate transport to the enamel. In : *Mechanisms of Tooth Enamel Formation* (Suga, S. Ed.), pp. 49-64, Quintessence Publishing Co., Tokyo, 1983.
 - 36) 相馬脩司 : エナメル質基質形成のオートラジオグラフィによる研究. 歯学, **62(6)** : 1026-1053, 1975.
 - 37) Nancy, A., Slavkin, H.C. and Smith, C.E. : Immunocytochemical and radioautographic evidence for secretion and intracellular degradation of enamel proteins by ameloblasts during the maturation stage of amelogenesis in rat incisors. *Anat. Rec.* **217** : 107-123, 1987.
 - 38) Weinmann, J.P. : Recovery of ameloblasts. *J. Am. Dent. Ass.* **30** : 874-888, 1943.
 - 39) 田谷雄二, 大滝義晴, 杉山雅章, 須賀昭一 : HEBP 一回注射によるラット形成期エナメル質の変化. 歯基礎誌, **32** : 270-288, 1990.
 - 40) Suga, S. : Enamel hypomineralization viewed from the pattern of progressive mineralization of human and monkey developing enamel. *Adv. Dent. Res.* **3** : 188-198, 1989.
 - 41) Weber, D. and Yaeger, J.A. : A microradiographic interpretation of abnormal enamel formation induced by subcutaneous sodium fluoride. *J. Dent. Res.* **43** : 50-56, 1964.
 - 42) 小川裕三 : NaF, SrCl₂, EHDP 投与によるラット切歯エナメル質, 象牙質の形成障害に関する研究. 歯基礎誌, **22** : 199-226, 1980.