ラット切歯の反復切断が歯胚部細胞増殖 に及ぼす影響

中 川 健 三

東京医科歯科大学歯学部薬理学教室（指導：三村二教授）

（昭和43年1月16日受付）

The response of the cell proliferation at the base of
the rat incisor tooth to experimental shortening.

Kenzo Nakagawa

Department of Pharmacology, School of Dentistry,

Tokyo Medical and Dental University.

(Director; Prof. Tasuku Mimura)

I. 緒 論

齧歯類の切歯は絶えず萌出を続けており、その歯胚部には活潑な細胞分裂がみられることから、切歯の萌出の原動力は恐らく細胞増殖によるものであると、古くから言われているが¹⁾、これを確証する事実は未だ示されていない。

Ness および Smale(1959)⁵⁾らは、Taylor および Butcher(1951)⁹⁾らのラット切歯の歯冠部を反復切断して咬合圧が加わらない状態におけば、その歯牙の萌出は促進されるとの報告に着目し、切歯の萌出とその歯胚部の細胞増殖の関係を知るべく、家兎の下顎切歯の一侧を反復切断した結果、切断側切歯の萌出量は対照側切歯の1.9倍に増大し、またこの歯胚部における内エナメル上皮細胞の分裂細胞の割合は対照歯の1.47倍に増加したと報告している。

この事実は、齧歯類切歯の萌出量が増大した場合には、その歯胚部組織の増殖が旺盛になることを示唆している。

しかしながら、細胞増殖活性の増減を判定するには、一定の組織細胞の細胞分裂率（分裂細胞の割合）のみならず、細胞増殖率（1時間内に分裂

した細胞の割合）および DNA 合成が進行中の細胞の割合、ならびに世代時間（細胞が分裂してから再び分裂するまでに要する時間）の他に更に、増殖範囲（分裂細胞の分布する範囲）などを詳細に知る必要がある。

上記の細胞増殖活性を判定するに必要な事項の数値を求める方法は、近年著しく開発され、例えば、細胞増殖を求める方法としては、Stevens および Leblond(1953)⁸⁾らは Colchicine が細胞分裂を分裂の中期で阻止することを利用して、これを求めることに成功しており、また、DNA を合成している細胞の割合とか、世代時間の測定については、Quastler および Sherman (1959)⁷⁾らによつて、次のような方法が開発された。すなわち、DNA の必須構成成分である Thymidine が DNA 合成期にある細胞核に特異的にとりこまれることに着眼し、Tritium (H^3)で標識した H^3 -thymidine を投与すれば、その時期に DNA 合成期にあつた細胞は H^3 -thymidine で標識されるので、これらの細胞核はオートラジオグラフィー法によつて明確に検出され、DNA 合成進行中の細胞の割合は、 H^3 -thymidine で標識された細胞の割合すなわち標識率として求めることができ、また、世代時間

は H^3 -thymidine 投与後の経過時間と分裂細胞に対する標識分裂細胞の割合の変動から求めることが可能となった。一方、増殖範囲を求めるには、普通の組織標本について分裂細胞の分布する範囲を求めても良いが、Chiba, Nakagawa および Mimura(1967)⁴⁾らは、正常ラット切歯の内エナメル上皮細胞層について、 H^3 -thymidine 投与後1時間以内の標識細胞の分布する範囲と分裂細胞の分布する範囲とはほぼ一致し、同一標本に見られる標識細胞数は分裂細胞数よりも遙かに多く、それ故、増殖範囲を求めるには、 H^3 -thymidine による標識細胞の分布する範囲として求めた方が誤差が少なくなることを報告している。

以上のような細胞増殖活性を判定する方法を利用して、まず、ラット上顎切歯の一侧の歯冠部を反復切断すれば、この切歯の萌出量が増大することを確認し、次に、その切歯の歯胚部組織、特に内エナメル上皮細胞層において、細胞増殖活性が増強されたか否かを以下に述べる実験を試み検討した。

II. 歯冠部を反復切断したラット上顎切歯の萌出量の測定

Ness (1965)⁶⁾はマウス下顎切歯の一侧を48時間間隔で数回切断し、その萌出量を計測した結果、3回目の切断時までは切断歯の萌出量は増加したが、それ以上切断を反復しても萌出量はほぼ一定となることを報告しているので、本実験では、ラット上顎切歯の一侧を48時間おきに3回の切断を施し、切断歯の萌出量を対照歯の萌出量と比較した。

a) 実験方法

生後32日から35日、体重60g~70gの雄のWistar系ラット9匹の右側上顎切歯の歯冠部を歯肉縁上で、歯科用エアタービンを使用し、エーテル麻酔下で48時間間隔で3回切断した。

萌出量の測定は、3回目の右側上顎切歯の切断時に、左側上顎切歯歯肉縁部に接するエナメル質上に、ダイヤモンドポイントで削痕を印し、その後、切断歯では切断端と歯肉縁との距離を、ま

た対照歯ではエナメル質上に印された削痕と歯肉縁との距離をエーテル麻酔のもとに実体顕微鏡下で、3回目の切断2日後および3日後に測定し、この値をもつて、その間の萌出量とした。

b) 実験結果

3回目の切断後、2日目および3日目における萌出量の平均値および標準偏差は、切断歯ではそれぞれ 1.56 ± 0.26 mm, 2.31 ± 0.31 mm, 一方、対照歯では 1.07 ± 0.23 mm, 1.61 ± 0.26 mm と計測され、1日あたりの萌出量の平均値は、切断歯で0.77 mm, 対照歯では0.54 mm と算出され、確かに対照歯よりも切断歯の萌出量が増大したことが認められた。

III. 歯冠部を反復切断したラット上顎切歯の内エナメル上皮細胞層における細胞増殖について

ラット上顎切歯の一侧を反復切断すれば、切断歯の萌出量は対照歯よりも増大することが確認されたので、このように萌出量に明瞭な差異のある対照歯と切断歯との歯胚部組織の細胞増殖活性の強弱を判定するため、対照歯と切断歯の内エナメル上皮細胞層における増殖範囲、 H^3 -thymidine による標識率、細胞分裂率、細胞増殖率および世代時間などを、前に述べた方法を用いて夫々の値を求めた。

実験 1. 増殖範囲と H^3 -thymidine による標識率

a) 実験方法

生後29日から32日の体重45g~50g、雄のWistar系ラットを購入し、日本クレア株式会社製の混合固型飼料(CA-1)と水の自由摂取のもとに飼育し、5日後に発育状態良好なもの8匹を選んで実験に供した。右側上顎切歯の歯冠部を歯肉縁上で、エーテル麻酔のもとに歯科用エアタービンを使用し切断し、引き続き、48時間間隔で2回切断した。一方、左側上顎切歯には、歯冠部の切断を施すことなく対照とした。

以上の処置により、歯冠部を切断された右側上顎切歯の萌出量の増大が見られたので、標識率と増殖範囲を知るために、以下のような実験を行つ

た。

すなわち、第3回目の切歯24時間後、8匹のラットに H^3 -thymidine 溶液 (specific activity 5.0 curies/mM, from the Radicchemical Centre, Amersham, England) 1 ml (H^3 -thymidine 1 mc 含有)に 1.2% NaCl 溶液 3 ml を加え、 H^3 -thymidine 250 μ C/ml, 0.9% NaCl 溶液になるように希釈し、体重 1 g あたり 0.7 μ C の割合で腹腔内注射した。

H^3 -thymidine (以下、 H^3 -T と略記する)投与後 1 時間に 8 匹のラットをエーテル麻酔下で断頭した。直ちに頭部の皮を剥ぎ、上顎骨および前上顎骨を含めて上顎切歯をとりだし、pH 7.0 に調整した 10% Buffered Formalin で 24 時間固定した後、pH 7.0 に調整した EDTA-2Na で約 2 週間脱灰し、パラフィン包埋してから、厚さ 5 μ の唇舌的連続縦断切片をつくり、近遠心的に中央部に相当する切片 5 枚について、以下の方法を用いて検索した。

標識細胞を検出するためのオートラジオグラムの作製は、乳剤サクラ NR-EI (小西六写真工業株式会社製)を用い、Dipping 法によった。露出は 4°C~8°C の条件下で 30 日から 60 日行い、規定の現像、定着処理を施した後、ヘマトキシリン、

エオジン染色標本を作製した。

このようにして作製した標本について、歯胚部の内エナメル上皮細胞層を油浸下で netmicrometer を使用し、Basal end²⁾ から切端方向へ 100 μ ずつ区切り、内エナメル上皮細胞層における標識細胞の分布範囲とその範囲に含まれる細胞数、分裂細胞数、標識細胞数および標識分裂細胞数を計測した。

なお、エナメル髓細胞は、内エナメル上皮細胞との判別は困難であるので、便宜上、基底膜より歯根膜側に向つて 30 μ の深さに含まれる細胞を内エナメル上皮細胞層に含めた。

また、オートラジオグラム標識細胞の判定は、1 細胞核に 4 個以上の銀粒子をもつものと定めた。

b) 実験結果

図 7, 8, 9 に示される如く、 H^3 -T により標識された細胞が内エナメル上皮細胞層に多数認められ、この標識細胞の見られる範囲、すなわち、増殖範囲は Basal end から対照歯では $1040.0 \pm 81.6 \mu$ であるのに対し、切断歯では $1367.5 \pm 68.8 \mu$ であった。従つて、切歯歯冠部を反復切断することにより、明らかに増殖範囲の拡大が認められ ($p < 0.001$)、また左右両側の増殖範囲内に含まれる細胞数も異なり、表 1 に示す如く、対照歯で

表 1. Number of cells, mitoses, labelled cells, labelled mitoses and percentage of labelled cells in the internal enamel epithelium of impeded (left) and unimpeded (right) maxillary incisors of the young rat at one hour after injection of H^3 -thymidine.

Rat No.	Number of cells		Number of mitoses		Number of labelled cells		Number of labelled mitoses		Labelling index (%)	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
325	3282	4212	67	53	973	1284	2	1	29.6	30.5
327	3379	4018	45	67	955	1200	0	6	28.3	29.9
328	3079	3966	42	78	814	1259	3	11	26.4	31.4
329	3393	3788	50	83	857	1302	3	11	25.3	34.4
330	3172	4014	70	82	969	1244	8	8	30.5	31.0
331	3466	3600	50	76	1016	1289	2	6	29.3	35.8
332	3474	3726	74	70	684	908	1	2	19.7	24.4
333	3075	3930	61	72	884	974	3	2	28.7	24.8
Total	26320	31254	459	581	7152	9460	22	47		
Mean	3290.0	3906.8	57.4	72.6	894.0	1182.5			27.2	30.3
S.D.	163.9	193.4			108.5	153.4			3.5	4.0

L : 対照歯 R : 切断歯

は 3290 ± 164 個であるのに対し、切断歯では 3907 ± 193 個であった。これらの細胞の中で、 H^3 -T によつて標識された細胞核は、対照歯で 894 ± 109 個であったのに対し、切断歯では 1183 ± 153 個であり、明らかに切断歯においては増殖範囲の拡大とともに標識細胞数の増加が認められ、これらの点から、反復切断により細胞増殖活性が高められたことが確かめられた。

次に、増殖範囲全体の標識率を求めた結果、切断歯では $30.3 \pm 3.0\%$ 、対照歯では $27.2 \pm 3.5\%$ と両側間に有意の差は認められなかったが、切断歯では増殖範囲の拡大に伴い、標識率を求める際の分子となる標識細胞数は増加したにもかかわらず、分母となる増殖範囲に含まれる内エナメル上皮細胞数も同時に増加した結果、標識率の上昇は困難となることに起因するものである。

そこで、次に Basal end から 100μ ずつ区切り、対照歯と切断歯の各区間別に標識率を算出し図 1 に示した。

図1 内エナメル上質細胞層における H^3 -thymidine投与後1時間の標識率の場所による変動

その結果、対照歯では Basal end から $600 \sim 700 \mu$ の区間で、また、切断歯では $700 \sim 800 \mu$ の区間で最も高い標識率を示し、夫々、 44.6% 、 47.1% であった。Basal end から $200 \sim 800 \mu$ の区間では両側ともに 40% 前後の標識率を示し、大きな差は認められなかったが、Basal end から

200μ までの区間においては、切断歯の方が幾分高い標識率を示し、増殖に参加する細胞の割合が高くなっていることが認められた。ところが、Basal end から 800μ を越えた切端に近い区域では、対照歯の標識率は次第に低くなり、増殖能力を失いつつあるが、切断歯では未だ高い標識率を呈し、この区域でも強い増殖能力を保持していることが認められた。

実験 2. 細胞分裂率と細胞増殖率

Chiba, Nakagawa および Mimura (1966)³⁾ らは Colchicine と同様の作用があり、しかも毒性の小さい Colcemid を用い、正常ラットの内エナメル上皮細胞層における細胞増殖率の算出を試み、Colcemid 投与後2時間までは、分裂細胞が分裂の中期で阻止されたまま蓄積されることを確かめ、投与後2時間における細胞分裂率から投与後1時間における細胞分裂率を差引くことにより、1時間内に分裂した細胞の割合、すなわち細胞増殖率を求め $2.33\%/hr$ の値を得ている。

そこで、実験2では、対照歯と切断歯の細胞分裂率は何も薬物を投与しない動物の通常のヘマトキシリン、エオジン染色標本について求め、一方、細胞増殖率は上記の方法に従い Colcemid を投与し、投与1時間後、2時間後に動物を屠殺し、夫々の細胞分裂率の差として求めた。

a) 実験方法

生後29日から32日の体重 $45g \sim 50g$ 、雄の Wistar 系ラット24匹を用い、右側上顎切歯の歯冠部を48時間間隔で3回切断し、第3回目の切断24時間後に、細胞分裂率を求めるために8匹はエーテル麻酔のもとに断頭し、一方、細胞増殖率を求めるために残りの16匹には、 0.1% Colcemid 溶液 (CIBA Ltd., Basal 7, Switzerland) $4mg$ に 1.5% NaCl 溶液 $6ml$ を加え、 0.04% Colcemid, 0.9% NaCl に調整し、体重 $1g$ あたり Colcemid $0.001mg$ の割合で皮下注射した。16匹のラットを8匹ずつ2群に分け、この注射後1時間および2時間に夫々8匹を断頭し、Bouin 液で24時間固定後、Bouin PFF (picric acid, formaldehyde and formic acid) で約1週間脱灰し、パラ

フィン包埋した後、 5μ の連続縦断切片を作製し、ヘマトキシリン、エオジン染色を施した。

観察は近遠心的に中央部に相当する切片5枚について、切断歯および対照歯の内エナメル上皮細胞層について行つた。

b) 実験結果

1) 細胞分裂率

通常のヘマトキシリン、エオジン標本に見られる内エナメル上皮細胞層の分裂細胞は非常に少く図10の如くであつた。

対照歯および切断歯の内エナメル上皮細胞層における分裂細胞数は夫々60.1個、93.1個、またこれらの分裂細胞の見られる範囲にある細胞数は夫々 3112.1 ± 215.8 個、 3959.0 ± 369.9 個であつた。

従つて、細胞分裂率は対照歯では1.94%、切断歯では2.39%となり、反復切断により細胞分裂率の増加が認められた。

表2. Number of cells and mitoses and percentage of mitoses in the internal enamel epithelium of impeded (left) and unimpeded (right) maxillary incisors of the young rat, after injection of Colcemid.

Hours after injection of Colcemid	Number of rats		Number of cells		Number of mitoses		Percentage of mitoses
			Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Control	8	L	3112	216	60	7	1.94
		R	3959	370	93	22	2.39
1 hr.	8	L	3170	190	79	18	2.45
		R	3981	273	136	23	3.43
2 hr.	8	L	3207	154	194	27	6.04
		R	4106	411	290	38	7.14

L: 対照歯 R: 切断歯

2) 細胞増殖率

Colcemid 投与により分裂の中期で阻止された細胞は図11および図12に見る如く多数認められ、投与後1時間における細胞分裂率は、対照歯で2.54%、切断歯では3.43%、また投与後2時間では夫々6.04%、7.14%であつた。従つて、1時間に蓄積された分裂細胞の割合すなわち細胞増殖率は、Colcemid 投与後2時間の細胞分裂率

から投与後1時間値を差引くことにより、対照歯では3.59%/hr、切断歯では3.71%/hrと算出された。その結果、増殖範囲全体の細胞増殖率に関して両側間に有意の差は認められなかつた。

ところが表2に見る如く、1時間あたりの分裂細胞蓄積量、言い換えれば1時間あたりの細胞生産量は、対照歯では115個であるのに対し、切断歯では154個を示し明らかな増加が認められた。

図2 内エナメル上皮細胞層における細胞増殖率の場所による変動

次に、Basal end から100 μ ずつ区切つて、各区間毎に細胞増殖率を算出し図2に示した。

対照歯および切断歯の細胞増殖率は Basal end から700 μ の区間では、両側間に大きな差は認められなかつたが、700 μ を越えて切端に近い区域では、切断歯の方が遙かに高い値を示し、反復切断により、このような区間の増殖活性が特に増強されたことが認められた。

実験3. 世代時間の測定

細胞が1回分裂してから、再び分裂を起すまでには、図3に示す如く、細胞分裂期(M)からはじまつて、DNA 合成準備期(G_1)、DNA 合成期(S)、分裂準備期(G_2)の各時期を経過し、全体として1つの周期をなしている。この周期は、細胞周期 (Cell Cycle)とも呼ばれており、その1周期を経過するに要する時間を世代時間 (Generation Time 或いは Cell Cycle Time)と呼んでいる。この世代時間の測定方法は、以下に述べる Quastler および Sherman(1959)⁷⁾らの方法に従つた。

H^3 -T 投与によつて標識された細胞は、 H^3 -T 投

図3 細胞の増殖周期

図4 分裂細胞標識率の変動
B, F. は夫々第1, 第2のカーブの山
における上昇脚の50%点を示す

与時には DNA 合成中の S 期にあつた細胞であるが、投与後の時間経過につれて、G₂ 期を経て M 期に移行して分裂すると、はじめて H³-T 標識された細胞が分裂細胞中に出現するようになり(図4中A)、その後時間の経過につれて、分裂細胞中に占める標識細胞の割合(分裂細胞標識率)は次第に増加する(図4中A→C)。しかしながら更に時間が経つと標識された細胞は M 期を経過して G₁ 期に移行し、また一方、H³-T 投与時には G₁ 期にあつて、H³-T により標識されていなかった細胞が S 期および G₂ 期を経て M 期に移行してくるので、分裂細胞標識率は次第に減少する(図4中 D→E)。

ところが、更に時間を追つてオートラジオグラフィで観察していくと、H³-T 投与によつて標識され、一度は M 期を通過した細胞が、G₁ 期→S 期→G₂ 期を経て、第2回目の M 期に入ってくるため、再び分裂細胞標識率が増加し、図4に見る如く第2の山ができる。

この現象に基づき、通常、このカーブの第1の山の上昇脚の50%点(B)から第2の山の50%点(F)に達するまでの時間をもつて世代時間としている。

そこで、この理論に基づき、以下の実験を行い、反復切断により萌出量が増大したラット切歯の内エナメル上皮細胞の世代時間がどのように変わるかを検索した。

a) 実験方法

生後29日から32日の体重45g~50g、雄の Wistar 系ラット26匹を用い、右側上顎切歯の歯冠部を48時間間隔で3回切断し、第3回目の切断24時間後に H³-thymidine を実験1と同様に体重1g あたり 0.7 μc の割合で腹腔内注射し、その時刻に DNA 合成期(S)にあつた細胞を標識した。次いで、これら26匹のラットを2匹ずつ13群に分ち、H³-T 投与後1時間から25時間に亘り、2時間間隔で各々2匹ずつに、分裂細胞の算定を容易にせしめるため、Colcemid を実験2と同様に、体重1g あたり 0.001 mg の割合で皮下注射し、その2時間後に全ての動物をエーテル麻酔のもとに断頭した。すなわち、H³-T 投与後3時間から27時間に亘り、2時間間隔で2匹ずつ屠殺した。

以下、上述の実験1と全く同様の手順で、顕微鏡標本を作製し、内エナメル上皮細胞層に含まれる H³-T で標識された分裂細胞数と標識されていない分裂細胞数を計測し、分裂細胞標識率を求めた。

b) 実験結果

対照歯および切断歯の内エナメル上皮細胞層における分裂細胞中に占める H³-T による標識分裂細胞の割合の変動を H³-T 投与後の経過時間を追つて求め、図5、図6に示した。

H³-T 投与後1時間における分裂細胞標識率は、すでに実験1において求められており、表1に示される如く、対照歯では分裂細胞中4.8%が、一方、切断歯では8.1%が H³-T で標識された。このように分裂細胞中に、H³-T で標識された細胞がはじめて出現するまでの時間は G₂ 期を経過するに要する最小時間であり、切断歯および対照歯ともに H³-T 投与後1時間において既に標識された分裂細胞が認められたことから、G₂ 期に要する最小時間は1時間以内であることが確かめられ

図5 対照歯における分裂細胞標識率の変動

図6 切断歯における分裂細胞標識率の変動

た。

図13, 図14に見る如く, H^3-T 投与後1~3時間においては, 分裂細胞中, H^3-T 標識された細胞が多数認められ, H^3-T 投与後3~5時間に至つては, 対照歯および切断歯の分裂細胞は全て標識され, H^3-T 投与後3~5時間における両切断歯の内エナメル上皮細胞層の分裂細胞は, 全て H^3-T 投与時にS期にありDNA合成進行中の細胞であつて, H^3-T 投与後時間の経過につれてG₂期を経て, H^3-T 投与後3~5時間でM期に到達した細胞であることが判明した。

H^3-T 投与後, 対照歯では9時間以降, 切断歯では7時間以降になると, H^3-T 投与時にはG₁期にあつて H^3-T で標識されていない細胞がS期→G₂期を経てM期に入ってくるので, 分裂細胞標識率は低下してくる。

H^3-T 投与後, 更に時間が経過すると, さきに

述べたように, H^3-T によつて標識され1度はM期を通過した細胞がG₁期→S期→G₂期を経て, 第2回目のM期に入ってくるため, 再び分裂細胞標識率は上昇を示し, 図5の如く対照歯では H^3-T 投与後23~25時間で54.4%を示し, 切断歯では図6の如く, 投与後19~21時間で58.8%を示した。

このように第2回目の細胞周期における分裂細胞標識率が第1回目の細胞周期に見られるほど高くならないのは, 細胞増殖している細胞の世代時間が一定していないことと, H^3-T 投与後, 第1回目の細胞分裂によつてオートラジオグラムにおいて1つの細胞核に見られた銀粒子数は半減してしまうために, 第2回目の細胞周期においては標識細胞の判定規準に達しなくなる場合, 例えば, 第1回目の細胞分裂期には6個の銀粒子をもつて標識細胞と判定された細胞が, 第2回目の細胞分

中 川 論 文 付 図 (1)

図 7 H^3 -Thymidine 投与後 1 時間の切断歯
歯根端部 エナメル器 の オートラジオ
グラム
B.E: Basal end
I.E.E: 内エナメル上皮細胞層
O.D: 象牙芽細胞

図 8 H^3 -Thymidine 投与後 1 時間の切断歯の
オートラジオグラム
Basal end から凡そ 500~700 μ の区間
S.I: 中間層細胞
矢印 A: H^3 -T で標識されていない分裂像

図 9 H^3 -Thymidine 投与後 1 時間の切断歯の
オートラジオグラム
Basal end から凡そ 1200~1400 μ の区
間
矢印 B は最も切端に近く位置する H^3 -T
標識細胞

図 10 切断歯の正常のヘマトキシリンエオ
ジン標本
Basal end から凡そ 600~800 μ の
区間
矢印 C は分裂後期像

中 川 論 文 付 図 (2)

図 11 Colcemid 投与後 1 時間の切断歯
Basal end から凡そ 600~800 μ
の区間
矢印Dの如く分裂細胞は 分裂の
中期で 阻止されたまま蓄積 され
ている

図 12 Colcemid 投与後 2 時間の切断歯
Basal end から 600~800 μ の区
間
阻止された分裂像が多数認めら
れる

図 13 H³-Thymidine 投与後 3 時間の 切断歯
のオートラジオグラム
屠殺 2 時間前に Colcemid を投与して
あるため、矢印E.F. の如く 分裂細胞
が 分裂の中期で 阻止されたままになっ
ており E は H³-T で 標識されているが
F は 標識されていない

図 14 H³-Thymidine 投与後 5 時間の切断歯
のオートラジオグラム
矢印Gの如く 分裂細胞は 全て H³-T
標識されていた

裂期においては半減して、1細胞核あたり3個の銀粒子しか持たなくなるため、標識細胞の規準から除外しなければならない場合が生ずる。従つて、 $H^3\text{-T}$ 投与後第2回目の細胞周期における分裂細胞標識率は、図5、図6に示される如く、第1回目の細胞周期に見られる程、高い値は得られなかつた。

そこで対照歯の世代時間は、第1回目の細胞周期ではじめて $\frac{1}{2} \times 100\%$ に分裂細胞標識率になるまでに要する時間 ($H^3\text{-T}$ 投与後1.9時間) から、第2回目の細胞周期ではじめて $\frac{1}{2} \times 54.4\%$ になるまでの時間 ($H^3\text{-T}$ 投与後20.7時間) を求め、18.8時間と測定された。同じようにして切断歯の世代時間は15.4時間と測定された。

その結果、反復切断した切歯の世代時間は対照歯に比し3.4時間の短縮が認められた。

IV. 考 察

まず実験1において、歯冠部を反復切断した9匹のラット上顎切歯の1日あたりの平均萌出量は、対照歯では0.54mm、切断歯では0.77mmであることが判明し、ラット切歯の歯冠部を反復切断すれば、その萌出量は増大することが確かめられた。

このように萌出量が増大した切歯の歯胚部の内エナメル上皮細胞層について、以下に述べる事実が認められた。

第1. 歯胚部の内エナメル上皮細胞層の増殖範囲に拡大が見られた。すなわち、反復切断によつて、増殖範囲(分裂細胞の分布する範囲)は、対照歯では Basal end から $1040.0 \pm 81.6 \mu$ であるのに対し、切断歯では $1367.5 \pm 68.8 \mu$ であつた。なお、この値は、Chiba, Nakagawa および Mimura(1967)⁴⁾らが生後5週の正常ラット上顎切歯の内エナメル上皮細胞層について増殖範囲として求めた値 $1073 \pm 62 \mu$ に比して大であるので、切断歯の増殖範囲は明らかに拡大したことが認められた。

第2. 対照歯および切断歯の増殖範囲における $H^3\text{-T}$ による標識細胞の消長について検討した。まず両者における標識細胞数を求めたところ、対

照歯では 894.0 ± 108.5 個(8例の平均)、切断歯では 1182.5 ± 153.4 個(8例の平均)であつたので、この現象から、切断歯では細胞増殖が旺盛であることが窺えた。

ところが、切断歯では増殖範囲の拡大にともない、上記の如く $H^3\text{-T}$ 標識細胞の増加を見たが、標識されていない細胞も増加した結果、切断歯の増殖範囲全域についての標識率は $30.3 \pm 4.0\%$ を示し、一方、対照歯は $27.2 \pm 3.5\%$ を示し、両者の間に有意の差が認められなかつた。

次に、内エナメル上皮細胞層では、Basal end から切端方向に向い、幼若細胞から成熟細胞に至る各種細胞が成熟度に従い配列しているの、さきに述べた増殖範囲を Basal end から 100μ 宛に区切り、その各区間における $H^3\text{-T}$ による標識率を求め、図1に示した結果を得た。この図に見るように Basal end から $200 \sim 700 \mu$ の区間における標識率は切断歯、対照歯ともに 40% 前後の値を示し、両者の間に差は認められなかつたが、Basal end から 200μ までの曲線の立上り区間と、 800μ より 1500μ に至る曲線下降の区間においては、切断歯の標識率は対照歯より大きい値を示し、このような区間において、切断歯の細胞増殖が高められたことが確かめられた。

第3. 細胞分裂率は対照歯の 1.94% に対し切断歯では 2.39% を示し、反復切断により増加が認められた。細胞分裂率で比較すると、切断歯は対照歯の約1.2倍に過ぎなかつたが分裂細胞数で比較すると切断歯は対照歯の約1.5倍にもおよび、反復切断により細胞増殖が旺盛になつたことが認められた。

第4. 1時間あたりの細胞生産量は対照歯では 115 個/hr であるのに対し切断歯では 154 個/hr と明らかに増加が認められたが、細胞増殖率を増殖範囲全域について求めた場合には、切断歯では増殖範囲が拡大することによつて分母となる細胞数が増加するため、 $3.71\%/hr$ 。一方対照歯では $3.59\%/hr$ と示され両者の間に有意差は認められなかつた。

次に、増殖範囲を Basal end から 100μ 宛に区

切り、その各区分における細胞増殖率を求め、図2に示した結果を得た。図2に見られる如く、Basal end から 700μ までの区間では対照歯および切断歯の細胞増殖率間に大きな差が認められなかったが、Basal end から 700μ より切端に近くなるに従い、対照歯の細胞増殖率は急速に低下するのに対し、切断歯ではなお高い値を示し、歯冠部を反復切断することにより、細胞生産量の増加が見られたが、その原因は主として、このような Basal end から $700\sim 1500\mu$ の区間の増殖活性が高まったことによるものであろう。

第5. 世代時間が短縮した。すなわち、対照歯では分裂してから再び分裂を繰り返すまでの時間が18.8時間を要しているのに対し、切断歯では3.4時間短縮され15.4時間の周期で分裂を繰り返しており、増殖の速度が反復切断によつて速められたことが確認された。

以上のように、萌出量が增大した切断歯の歯胚部内エナメル上皮細胞層においては、細胞増殖活性の増減を判定するのに必要な何れの事項についても、細胞増殖活性の増強を首肯させるような結果が得られ、切歯萌出と歯胚部細胞増殖とは密接な関係にあることが確認された。

V. 結 論

ラット上顎切歯の一侧の歯冠部を48時間間隔で3回切断した後の切歯の1日当りの萌出量は対照歯の1.42倍に増大した。

このような萌出量の増大を見た切断歯の歯胚部組織では、内エナメル上皮細胞層における細胞増殖に以下の如き事実が認められた。

1) 切断歯の増殖範囲(分裂細胞の見られる範囲)は対照歯の1.31倍に拡大した。

2) 細胞分裂率は対照歯の1.23倍に増加した。

3) H^3 -T 投与後1時間における標識細胞数は対照歯の1.32倍に増大したが、増殖範囲全域の標識率では両者間に有意の差は認められなかった。

4) 増殖範囲全域の細胞増殖率についても、対照歯と切断歯との間に有意の差は認められなかつ

たが、切断歯における1時間あたりの細胞生産量は対照歯の1.34倍に増加した。

5) 対照歯および切断歯の増殖範囲を Basal end から切端方向に 100μ ずつに区切り、各区分別に、 H^3 -T 標識率と細胞増殖率を求め、両切歯を比較した結果、切断歯では 800μ 区間から切端に近い区間において著しく高い標識率ならびに細胞増殖率を示した。

6) 世代時間については、対照歯の18.8時間に対し、切断歯では15.4時間であり、反復切断により3.4時間の短縮が見られた。

以上の事実から、ラット上顎切歯の萌出が促進された場合には、その歯胚部組織の細胞増殖活性が増大することが確認された。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった三村二教授、小椋秀亮助教授、ならびに直接指導して下さった千葉元承先生に謹んで感謝致します。更に、種々御援助下さった薬理学教室員の方々に深謝致します。

また、オートラジオグラフィー用乳剤を提供して下さいた小西六写真工業株式会社化学研究所の平田先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Addison, W. H. F. and Appleton, J. L.: The structure and growth of the incisor teeth of albino rat. : J. Morph. 26: 43-96, 1915.
- 2) Chiba, M.: Cellular proliferation in the tooth germ of the rat incisor. Archs. oral Biol. 10: 701-718, 1965.
- 3) Chiba, M., Nakagawa, K. and Mimura, T.: Estimation of mitotic rate and mitotic duration in the internal epithelium of the rat maxillary incisor using a colchicine technique. : Archs. oral Biol. 11: 803-814, 1966.
- 4) Chiba, M., Nakagawa, K. and Mimura, T.: DNA synthesis and cell cycle in rat incisor. : Archs. oral Biol. 12: 865-876, 1967.
- 5) Ness, A. R. and Smale D. E.: The distribution of mitoses and cells in the tissues bounded by the socket wall of the rabbit mandibular incisor. : Proc. r. Soc. B # 151, 106-128, 1959.
- 6) Ness, A. R.: Eruption rates of impeded and unimpeded mandibular incisors of the adult laboratory mouse. : Archs. oral Biol. 10: 439-451, 1965.

- 7) Quastler, H. and Sherman, F. G. : Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. : Expt. Cell Res. 17 : 420-438, 1959.
- 8) Stevens, C. E. and Leblond, C. P. : Renewal of the mucous cells in the gastric mucosa of the rat. : Anat. Rec. 115 : 231-243, 1953.
- 9) Taylor, A. C. and Butcher, E. O. : The regulation of eruption rate in the incisor teeth of the white rat. : J. Expt. Zool. 117 : 165-188, 1951.