原	著
---	---

マウス臼歯歯胚の器官培養系に及ぼす 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) の影響

醍 醐 毅

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面顎部機能再建学系専攻

顎顔面機構制御学講座 顎顔面解剖学分野

(主任・指導：山下靖雄教授)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 生体支持組織学系専攻

生体硬組織再生学講座 硬組織構造生物学分野

(指導：寺島達夫助教授)

(2003 年 3 月 3 日 受付)

Effects of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on the Formation of Dental Hard Tissue of Mouse Molar Tooth Germs in Organ Culture System

DAIGO Tsuyoshi

Maxillofacial Anatomy, Department of Maxillofacial Biology, Division of
Maxillofacial/Neck Reconstruction, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. YAMASHITA Yasuo)

Biostructural Science, Department of Hard Tissue Engineering,
Division of Bio-Matrix, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

(Director : Assoc. Prof. TERASHIMA Tatsuo)

In the developing tooth, 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) causes hypoplasia and hypomineralization of enamel and dentine. The present study was undertaken to clarify the effects of HEBP on the formation of dental tissues of tooth germs in an organ culture system. Mandibular first molars from 17.5-day-old mouse embryos were cultured with or without 250 μ M HEBP in culture medium. Cultured tooth germs were analyzed by histological examination and by immunohistochemical localization using anti-amelogenin antibody. In cultured tooth germs treated with HEBP before the commencement of calcification in dentine, calcification of dentine matrix was inhibited completely and enamel formation was not observed. Ameloblasts were directly adjacent to dentine matrix. However, immunohistochemical data indicated that these ameloblasts secreted amelogenin. In the experiments of adding HEBP to cultured tooth germs on culture day 13, calcified dentine and enamel had formed before the administration of HEBP, but the dentine matrix newly formed after the administration of HEBP had not calcified. It was confirmed by immunohistochemical observations that enamel matrix-like material had penetrated into uncalcified dentine matrix and accumulated in dental papilla of tooth germs. However, no enamel matrix-like material was observed in calcified dentine and predentine underneath the calcified dentine by immunohistochemical staining. From these results, it might be concluded that ameloblasts secreted enamel matrix in the presence of HEBP and diffused through uncalcified dentine matrix into dental papilla. These findings suggest the calcification of dentine might be essential for the physical barrier to accumulate the enamel matrix and form a distinct layer of enamel as enamel.

I. 緒 言

Bisphosphonate は無機ピロリン酸の誘導体で、腸管

から吸収された bisphosphonate は大部分が骨組織に速やかに移行し¹⁾、リン酸カルシウムと結合して長期間骨組織に留まり^{2,3)}、さらにリン酸カルシウム結晶の相

変換や、結晶成長を抑制すること⁴⁾により、リン酸カルシウムに対して強い結晶毒として作用する⁵⁾。一方、bisphosphonate で処理されたハイドロキシアパタイト結晶は溶解性が著しく低下し、bisphosphonate の物理化学的性質により硬組織での石灰化の開始および進行を阻害することが知られている^{6,7)}。

Bisphosphonate による歯牙に対する影響に関する研究では、齧歯類の切歯に特有な形成障害が生じることが多数報告されている。Reynold ら⁸⁾が最初に bisphosphonate の一種である HEBP (1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate) によるエナメル質に形成障害を報告し、Ogawa ら⁹⁾は HEBP の 1 回注射で結晶成分がみられない形成不全線がエナメル質に生じ、HEBP の連続投与でエナメル質基質形成の抑制を伴う形成不全線が生じることを報告した。Wakamatsu¹⁰⁾は、HEBP の 7 日連続投与で上顎切歯の基質形成期エナメル質に投与回数に一致するエナメル質形成不全部位とエナメル質形成部位が繰り返して出現することを報告し、HEBP の血中濃度が高濃度に維持されていると、結晶の成長を直接的に抑制するために、外套象牙質の石灰化が阻害され、未石灰化象牙質基質が形成され、エナメル質形成不全部位が生じることを報告した。HEBP の血中濃度が 24 時間サイクルで行われる薬物投与に対応して、周期的な島状エナメル質が切歯表層に出現すると推測した。

HEBP 投与で生じた外套象牙質の石灰化が阻害されて、エナメル質の形成が認められない部位と、象牙質に石灰化が生じており、象牙質を覆うエナメル質が形成されている部位で、エナメル芽細胞を比較すると、両者には明瞭な微細構造上の相違はないとの報告もある^{11,12)}。一方、HEBP の投与でトームス突起に変性が生じるとの報告もある¹⁰⁾。Fouda ら¹³⁾は HEBP 投与ラットの歯牙に出現する島状エナメル質基質の両端に、エナメル芽細胞に囲まれた空胞形成がしばしば観察され、空胞内にはヘマトキシリンで染色される無定型物質が観察されることを報告した。この無定型物質はエナメル質基質であることが免疫組織学的に確認されている。このような空胞形成は、エナメル芽細胞の部位による HEBP に対する感受性の違いにより生じ、エナメル芽細胞に対する HEBP の直接的な影響による細胞間結合の脆弱化の結果、嚢胞状の構造が生じたとしている。この空胞内に貯留したエナメル質基質は、HEBP によるエナメル質の結晶成長の阻害と、部分分解されたアメロゲニンに対するエナメル芽細胞の有機成分の吸収障害によるエナメル質基質の局所的な増加の結果と推測した。

臼歯に対する bisphosphonate の影響に関する報告は少なく、Fouda ら¹³⁾は HEBP 投与ラットの臼歯にも島状エナメル質形成不全が生じることを示し、エナメル芽

細胞の分化度による HEBP に対する感受性に相違があると推測した^{14,15)}。

歯胚の器官培養系に対する HEBP の効果を調べた研究は少ない。近藤¹⁶⁾は胎生 17 日齢のマウス下顎第一臼歯の器官培養で、培地に HEBP を添加する実験を行い、HEBP の添加により培養 7 日で象牙前質を形成するが、石灰化象牙質は認められず、エナメル芽細胞の分化も観察されなかったことから、組織学的に石灰化抑制が認められたと報告し、HEBP が、歯胚の培養系でも象牙質の石灰化抑制とエナメル質の形成障害を引き起こすことを確認した。一方、HEBP 添加を行った歯胚の器官培養系のもう一つの報告である Liu ら¹⁷⁾の実験では歯胚の初期発生を対象としており、石灰化硬組織の形成に対する影響については詳述されていない。

今回用いた培養系に HEBP を添加した場合では、生体に HEBP を投与した場合と異なり、細胞に対して常に一定の薬物量が存在すると考えられ、生体の代謝による HEBP 濃度の変化を考慮する必要がないために、HEBP が細胞に対して連続して、かつ直接的に作用していると考えることができる長所がある。したがって、今回用いた歯胚の器官培養系では、歯牙硬組織を形成する象牙芽細胞とエナメル芽細胞に対して HEBP の直接的な作用を観察することが可能と考えられる。今回の研究では歯胚の器官培養系に及ぼす HEBP の作用とその機序を明らかにする目的で、培養系に HEBP を添加した場合における歯胚の分化および発育を、組織学的観察とエナメル質の主要な構成成分であるアメロゲニンに対する免疫組織学的観察を行い検索した。

II. 材料と方法

1. 実験動物

胎生 17.5 日齢の ICR 系マウス胎仔の下顎第一臼歯 226 個を実験に用いた。動物実験は東京医科歯科大学動物実験の基本指針に従って行った。

2. 歯胚の摘出

妊娠 17.5 日齢の ICR 系マウスをエーテル麻酔下で、頸椎脱臼にて安楽死後、無菌的に開腹した。胎仔は penicillin (萬有製薬, 東京) 100 unit/ml, streptomycin (明治製薬, 東京) 100 μ g/ml および Fungizone (Invitrogen Corp., USA) 0.25 μ g/ml を添加したハンクス液 (Nissei, 東京) に取り出した後、同液中で下顎を摘出した。実体顕微鏡下で、無菌的に下顎から第一臼歯歯胚を摘出した。

3. 器官培養法

摘出した臼歯を、Trowell 変法を用いて器官培養した。培養条件は 37°C、相対湿度が 100% の環境下で、マルチガスタイプの CO₂ インキュベーターを用いて、炭酸ガス

分圧を5%に、酸素分圧が22.5%になるように炭酸ガスと酸素ガスを添加し、最長18日間培養した。基本培地としてBGJ-b培地(Sigma, USA)を用い、10%牛胎仔血清(Filtron, Australia)と2 mM glycine(Sigma, USA), 2 mM glutamine(Sigma, USA), 0.5 mM ascorbic acid(Sigma, USA)を添加し、さらに、penicillin(100 unit/ml), streptomycin(100 μ g/ml)およびFungizone(0.25 μ g/ml)の抗生物質を添加した。培養期間中は2日ごとに培地を交換した。

HEBPの歯胚の発育に及ぼす影響を検索するための実験として、上記の培地に250 μ M HEBP(1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate, 本学硬組織薬理学分野 大谷啓一教授より分与)を添加した。添加実験は、培地にHEBPを添加し続けた連続添加実験群と、培地にHEBPを連続的に添加し続けた後に培地よりHEBPを除去後さらに培養を続けた回復実験群に分けた。

連続添加実験群は、培養0, 4, 8日目にHEBPを培地に添加した後、さらに12日目まで培地にHEBPを連続して添加して培養した実験群と、培養13日目にHEBPを培地に添加して、さらに14日目まで連続して培地にHEBPを添加して培養した実験群で構成した。

回復実験群は、培養4日目から8日目までにHEBPを培地に添加した後、培地よりHEBPを除去してさらに培養14日目および17日目まで培養を続けた実験群と、培養10日目から11日目までHEBPを培地に添加した後、培地よりHEBPを除去してさらに培養12日目まで培養を続けた実験群、および培養13日目から14日目までHEBPを培地に添加した後、培地よりHEBPを除去してさらに培養18日目まで培養を続けた実験群で構成した。

4. 組織学的観察

培養歯胚は培養終了後、リン酸緩衝液(0.1 M, pH 7.4)で緩衝した2%パラフォルムアルデハイド-2.5%グルタルアルデハイド固定液で2~4時間固定した後、脱灰操作を行わずに、リン酸緩衝液(0.1 M, pH 7.4)で緩衝した1%四酸化オスミウムで後固定を2時間行った。通法に従って、アルコール系列を用いて脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。光学顕微鏡での観察には、厚さ1 μ mの厚切り切片を作成し、トルイジンブルーで染色した後、観察した。

5. 免疫組織学的観察

培養歯胚は培養終了後、リン酸緩衝液(0.1 M, pH 7.4)で緩衝した0.5%グルタルアルデハイド-4%パラホルムアルデハイド固定液で固定後、四酸化オスミウムによる後固定は行わずに、通法に従って、アルコール系列を用いて脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。その後、厚さ1 μ mの厚切り切片を作成し、抗体として抗ブタアメロ

ゲニンウサギポリクロナール抗体を用い、さらにプロテインA-コロイド金法により、免疫組織化学的反応を行った。切片はPBS(pH 7.4)で室温5分間3回洗浄した後、非特異的反応を除くために、5%山羊正常血清と1%牛血清アルブミンを含むPBS(pH 7.4)で室温で30分間ブロッキングを行った。その後1%牛血清アルブミンを含むPBS(pH 7.4)で室温で5分間洗浄した後、4,000倍に希釈した抗ブタアメロゲニンウサギポリクロナール抗体を4°Cで20時間反応させた。反応終了後、1%牛血清アルブミンを含むPBS(pH 7.4)で室温で5分間5回洗浄した後、40倍希釈したプロテインA-コロイド金(直径20 nm, E-Y Lab, USA)で室温で2時間反応させ、PBS(pH 7.4)および蒸留水で洗浄し、乾燥した。その後、アメロゲニンの局在を示すコロイド金の粒子をSilver Enhancing Kit(BBInternational, UK)を用いて銀増感することにより、黒色の銀粒子とし、可視化した。一部はトルイジンブルーで後染色した。

III. 結 果

1. 胎生17.5日齢のマウス下顎第一臼歯歯胚の形態

歯胚の上皮成分であるエナメル器は、高円柱形の内エナメル上皮とほぼ立方形の外エナメル上皮、星状のエナメル髓からなり、間葉組織の歯乳頭は多角形の細胞で構成され、数層の扁平な細胞層の歯小嚢が周囲を取り囲む典型的な帽状期の形態を示していた。内エナメル上皮に隣接している歯乳頭細胞に極性は認められず、象牙芽細胞への分化はまだ観察されなかった。歯胚は歯堤を介して口腔粘膜と連続していた(図1)。

2. 正常培養歯胚の形態学的変化

1) 培養4日目の歯胚(図2)

内エナメル上皮は背丈を伸ばし、高円柱状となり、中間層細胞が内エナメル上皮とよく発達したエナメル髓との間に立方形の細胞として認められた。咬頭頂に相当する領域では内エナメル上皮と接する歯乳頭細胞の最外層の細胞の一部は円柱形となり、上皮に対してほぼ垂直に配列し、さらに核は近位側に位置して明瞭な極性を示し、象牙芽細胞へと分化しており、内エナメル上皮と象牙芽細胞との間に象牙質基質の形成が観察された。

2) 培養8日目の歯胚(図3)

培養4日目以後、象牙芽細胞の分化は咬頭頂部から歯頸側に向かって進み、象牙質基質層の厚みも増加していた。象牙質基質と接している内エナメル上皮は高円柱状を示し、核がやや近位側に移動し始め、極性を示すようになり、前エナメル芽細胞へと分化していた。培養8日目になると咬頭頂部では象牙質基質内に石灰化が生じており、石灰化象牙質の形成が観察された。石灰化象牙質に相対している内エナメル上皮は核が近位側に移動し、

核上部にはゴルジ野の形成が認められ、エナメル芽細胞へと分化してエナメル質基質を分泌していた。さらに、厚いエナメル質基質層が観察される部位では、エナメル芽細胞の遠位部にトームス突起の形成が観察された。

3) 培養 12 日目 (図 4)

培養 12 日目では、歯牙硬組織の形成が進み、臼歯歯冠の形態が明瞭となっていた。歯頸側付近まで象牙芽細胞の分化が進行し、形成された歯冠の中央部付近では活発な基質形成が認められる典型的な象牙芽細胞が観察され、象牙前質層と石灰化した象牙質が認められた。しかし、咬頭直下では厚い石灰化象牙質が形成されている一方、象牙前質層はその厚さが減少し、象牙芽細胞層の細胞の配列が乱れ、一部の象牙芽細胞が変性し消失している場合も観察された。エナメル芽細胞によるエナメル質の形成はさらに進み、歯頸部付近まで形成されていた。歯冠中央部より咬頭頂側では象牙質層より厚いエナメル質が観察された。エナメル芽細胞は典型的な基質形成期の形態を示し、エナメル芽細胞の遠位端に形成されたトームス突起は咬頭頂部から歯頸部の 1/3 まで連続して認められた。

4) 培養 15 日目 (図 5)

培養歯胚の象牙質の形成は歯頸部付近まで進み、ほぼ歯冠の形態が完成していた。歯冠咬頭頂部付近では、エナメル芽細胞の背丈が急激に減少し、また、遠位端のトームス突起も退縮消失し、核の位置が乱れ、極性が不明瞭な移行期エナメル芽細胞が観察された。さらに咬頭頂部ではエナメル芽細胞はその背丈をわずかに増加させ、隣接するエナメル芽細胞との間に広い細胞間隙を示す成熟期エナメル芽細胞が観察された。また、成熟期エナメル芽細胞と接するエナメル質はトルイジンブルーによる染色性の減少が認められた。厚いエナメル質と石灰化が進んだ象牙質からなる咬頭頂部では、象牙芽細胞は配列が乱れ、さらに変性消失する象牙芽細胞が増加して、象牙芽細胞層が消失し、歯髄を構成する星状の細胞が象牙質基質に接していた。

3. 培養歯胚の分化期における HEBP 添加実験

1) HEBP 連続添加実験群

HEBP の歯胚の発育に及ぼす影響を調べるために、培養開始から 12 日目までの培養期間内で、培地に HEBP を連続的に添加した。HEBP 添加培養歯胚では咬頭が形成され、臼歯歯冠の形態が観察された (図 6)。HEBP を培地に添加していない正常発育培養歯胚と歯胚の外形を比較すると (図 4)、歯胚の大きさや咬頭の形態に差は認められなかった。実験群培養歯胚では象牙質基質の形成は正常発育培養歯胚と同程度認められ、形成された象牙質の厚みは、HEBP 未添加培養歯胚の象牙質層の厚みと比べるとわずかに減少していた。しかし、象牙質基質に

は石灰化は観察されなかった (図 6)。

象牙質基質の形成が認められる領域では、象牙芽細胞は円柱形を示し、細胞突起が内エナメル上皮に向かって伸びており、内エナメル上皮は高円柱形で、核は近位側に位置し、核上部に発達したゴルジ野が観察された (図 6)。薄い象牙質基質層が形成されている歯頸部領域では、高円柱形で核は近位側に位置し、細胞極性が明瞭な前エナメル芽細胞が認められ、細胞の背丈が著しく増加しているために、前エナメル芽細胞層は歯乳頭側に向かって突出していた (図 6)。

歯冠中央部では、象牙芽細胞は高円柱形で、明瞭な極性を示し、厚い象牙質基質の形成が認められるが、象牙質基質には石灰化は認められなかった。象牙質基質の外表面にエナメル質の形成は観察されず、エナメル芽細胞が象牙質と接していた。エナメル芽細胞は高円柱形で、大部分の核は近位側に位置しているが、一部の細胞の核は極性が乱れ、中間部や遠位側に位置しており、エナメル芽細胞の遠位端部にはトームス突起の形成は観察されなかった。

咬頭頂部ではエナメル芽細胞の背丈が減少し核の位置も不規則となり、細胞間隙がやや開大しているものも認められた。エナメル芽細胞の近位側の細胞間隙や乳頭層の細胞間、あるいはエナメル芽細胞の遠位端と象牙質基質の境界部にエナメル質基質の集積が観察された (図 6)。さらに、象牙芽細胞の遠位側の細胞間隙にエナメル質基質が集積している場合も認められた。

HEBP の培地への添加期間を短縮した場合、すなわち、正常培養歯胚で象牙質基質の形成が開始する培養 4 日目から培養 12 日目まで HEBP を連続添加した培養歯胚 (図 7) や、正常培養歯胚で象牙質の石灰化とエナメル質の形成が開始する培養 8 日目から 12 日目まで HEBP を連続添加した培養歯胚 (図 8) では、HEBP の培地への添加期間の減少にかかわらず、培養歯胚の大きさや、咬頭の形態に差は認められず、すべての培養歯胚の象牙質層には石灰化は観察されなかった。また、象牙質の外表面にはエナメル質の形成は観察されず、全培養期間に HEBP を培地へ添加した歯胚と同様に、エナメル芽細胞が象牙質と接していた (図 7, 8)。エナメル芽細胞は高円柱形を示し、配列の乱れも少なく、大部分の核は近位側に位置し、トームス突起の形成は観察されなかった。

2) HEBP 連続添加後の回復実験群

HEBP の歯胚の発育に及ぼす影響からの回復を調べるために、培養 4 日目から 8 日目まで HEBP を連続添加後、培地から HEBP を除去して、培養 14 日目 (図 9) および培養 17 日目 (図 10) まで培養を続けた。培養歯胚の象牙質には石灰化象牙質は観察されず、形成された象

牙質基質の厚みは HEBP を 12 日間連続添加した歯胚と比べ増加しており、さらに培養期間の延長に伴い増加していた。象牙質基質の中層にはトルイジンブルーでやや濃染する層が認められた。象牙芽細胞は高円柱形を呈し、発達したゴルジ野をもち、明瞭な極性を示すことから活発な象牙質の形成が認められ、さらに正常発育歯胚で観察された咬頭頂部における変性像を示す象牙芽細胞は観察されなかった。象牙質の外表面にはエナメル質の形成は観察されず、エナメル芽細胞が象牙質と接して観察された (図 9, 10)。

エナメル芽細胞は、高円柱形を示し、近位側に位置する核が多く、一部のエナメル芽細胞は中央部に核が位置していた (図 9)。遠位側に発達したゴルジ野が認められ、遠位側細胞質および細胞間隙にエナメル質基質様物質が観察された (図 9)。またエナメル芽細胞の遠位端にはトームス突起は認められなかった。17 日間培養した歯胚では、象牙芽細胞層および直下の歯乳頭細胞間に多量のエナメル基質様物質の蓄積が認められた (図 10)。一方、17 日間培養した歯胚の咬頭頂部ではエナメル芽細胞間に広い細胞間隙が認められ、成熟期エナメル芽細胞へと分化していた (図 10)。

4. 硬組織形成が開始した培養歯胚における HEBP 添加後の回復実験群

硬組織形成開始後の培養歯胚に対する、HEBP の歯胚の硬組織の発育に及ぼす影響を調べるために、培養歯胚に石灰化象牙質とエナメル質の形成が開始する培養 8 日目以降に、HEBP を培地に添加して歯胚を器官培養し、HEBP の影響を観察した。

1) 歯牙硬組織形成初期に相当する培養 10 日目から 11 日目に HEBP を連続して培地に添加した後、さらに HEBP を除去した培地で培養 12 日目まで培養した回復実験群

培養歯胚の咬頭頂部の象牙質基質の表層には、HEBP 添加以前にすでに形成されていた連続した石灰化象牙質とエナメル質が観察された。しかし、HEBP 添加後は、象牙質基質の石灰化およびエナメル質の形成が完全に抑制されていた (図 11)。HEBP 添加以前に象牙質の石灰化とエナメル質の形成が生じていた領域では、エナメル芽細胞は高円柱形で、エナメル質の外層に配列しており、発達したゴルジ野が観察されるが、トームス突起の形成は観察されず、エナメル質基質様物質はエナメル芽細胞の遠位側の細胞間に集積していた。エナメル芽細胞層の一部の細胞に細胞形態とその配列に著しい乱れが生じて、エナメル芽細胞層がエナメル質表面から遊離し、エナメル質とエナメル芽細胞間にエナメル質基質様物質がプール状に集積している場合が観察された (図 11)。

石灰化象牙質の歯髄側に位置する象牙芽細胞層では、

象牙芽細胞の配列が乱れ、一部の象牙芽細胞の変性像も観察された。象牙質の石灰化は突然に停止し、その歯髄側に石灰化していない象牙質基質層が観察された。象牙芽細胞や歯髄側の細胞間にはエナメル質基質様物質は観察されなかった (図 11)。HEBP の添加後に形成された歯頸側の象牙質では、象牙質基質に新たな石灰化は認められず、トルイジンブルー染色でメタクロマジーを示す象牙質基質のみが観察された (図 11)。この領域では象牙質の表層にエナメル質の形成は観察されず、エナメル芽細胞は象牙質基質と接していた。エナメル芽細胞は高円柱形を示し、核は近位側に位置するが、一部のエナメル芽細胞で核の位置は乱れていた。また遠位端にトームス突起は観察されなかった。

2) 歯牙硬組織が盛んに形成されている時期に相当する培養 13 日目から 14 日目に HEBP を培地に添加して培養後、HEBP を培地から除去して、さらに培養 18 日目まで培養した回復実験群

培養歯胚の咬頭頂部では、HEBP を培地に添加する以前に形成された厚い石灰化象牙質と厚いエナメル質が認められるが、HEBP の添加により象牙質の石灰化およびエナメル質の形成は進展せず、完全に抑制されていた (図 12)。厚い石灰化象牙質とエナメル質が観察される領域では、エナメル芽細胞の遠位端部には基質形成期のエナメル芽細胞の形態を示すエナメル芽細胞においてもトームス突起の存在は認められず、エナメル芽細胞の遠位側の細胞間にエナメル質基質の集積が観察された。さらに、エナメル質を覆うエナメル芽細胞は咬頭頂に向かうにつれ、高径が減少し、核の配列の乱れが観察され、細胞間隙が増加して、移行期エナメル芽細胞から成熟期エナメル芽細胞へと分化が進んでいた (図 12)。

厚い石灰化象牙質層が観察される領域では、石灰化象牙質より歯髄側で象牙前質層の厚さが著しく減少していた。この部位の象牙芽細胞の配列は乱れており、象牙芽細胞が変性し、一部は消失していた。一方、石灰化象牙質が観察される部位よりも歯頸側では、歯牙硬組織の形成が突然停止し、さらにエナメル芽細胞層は細胞の背丈が著しく増加し、歯乳頭側に向かって突出していた (図 12)。石灰化していない薄い象牙質基質からなる歯頸側では、象牙芽細胞層間およびその内側の歯髄細胞間に無定形のエナメル質基質様物質の集積が観察され、さらに石灰化象牙質直下の象牙前質に向かって拡散するようにエナメル質基質様物質が観察された (図 12)。

5. HEBP を添加した培養歯胚におけるアメロゲンに対する免疫組織化学的観察

1) HEBP を培地に添加せずに正常に発育した培養 14 日目の培養歯胚における免疫組織化学
正常発育した培養歯胚の培養 14 日目では、石灰化象牙

質が観察され、厚いエナメル質の形成が認められた。アメロゲニンの免疫反応を示す銀粒子はエナメル質に多数認められ、さらに形成期エナメル芽細胞の遠位側の細胞質およびエナメル芽細胞の細胞間隙に観察された。また、エナメル芽細胞の外層のエナメル器および歯小囊の細胞には免疫陽性反応を示す銀粒子は観察されなかった。エナメル質の内側に位置する石灰化象牙質、象牙前質および象牙芽細胞には免疫陽性反応を示す銀粒子は認められなかった(図 13)。歯胚の歯頸側端のサービカルループ領域では、象牙芽細胞の分化が生じており、形成された象牙質基質内にアメロゲニンの局在を示す銀粒子が観察され、特に象牙芽細胞の周囲に銀粒子の集積が認められた(図 13)。

2) 培養 4 日目から 12 日目まで HEBP を連続添加した培養歯胚における免疫組織化学

象牙質に石灰化象牙質が観察されず、エナメル質の形成も認められなかった。アメロゲニンの免疫反応を示す銀粒子はエナメル芽細胞の細胞質と細胞間隙のエナメル質基質様物質にわずかに観察された。また、エナメル芽細胞の外層のエナメル器および歯小囊の細胞にも免疫陽性反応を示す銀粒子がわずかに観察された(図 14)。石灰化していない象牙質基質には、弱い免疫陽性反応を示す銀粒子が少数認められた。培養歯胚の中央部では、象牙質基質直下の象牙芽細胞および歯乳頭細胞間にアメロゲニンの局在を示すエナメル質基質様物質の大量の集積が認められた(図 15)。

3) 歯牙硬組織が盛んに形成されている時期に相当する培養 13 日目から 14 日目まで、HEBP を培地に連続添加した培養歯胚における免疫組織化学

厚いエナメル質と石灰化象牙質層が観察され、エナメル質にはアメロゲニンの局在を示す銀粒子が観察された。石灰化象牙質の歯頸側領域では、歯頸側部の未石灰化象牙質基質に免疫反応を示す銀粒子が観察され、さらに、銀粒子は連続して象牙芽細胞層間およびその内側の歯乳頭の細胞間に存在するエナメル質基質様物質に認められた。一方、高度に石灰化した象牙質および象牙前質や内側に位置する象牙芽細胞および歯乳頭細胞には銀粒子の局在は観察されなかった(図 16)。

IV. 考 察

今回の培養実験から、歯胚の器官培養系に直接 HEBP を添加した場合は、歯胚の形態形成には影響は認められず、歯牙硬組織のうちの象牙質基質形成には強い影響は及ぼさないが、象牙質の石灰化が阻害され、エナメル質の形成は観察されず、エナメル芽細胞が象牙質と接して存在して、エナメル質の形成は完全に阻害されることが明らかとなった。

生体内に bisphosphonate を投与した場合、大量のビタミン D 3 誘導体の投与により生じる大動脈や腎臓の石灰化、歯石形成などを抑制したり^{18,19)}、成長期の動物における骨や軟骨の石灰化が抑制されることが知られている²⁰⁾。

また、bisphosphonate における歯牙に対する影響に関する研究から、齧歯類の切歯に特有の形成障害が生じることが多数報告されている^{8-10,21)}。これらの形成障害は HEBP の血中濃度が高濃度に維持されていると、結晶の成長を直接的に抑制するために、外套象牙質の石灰化が阻害され、未石灰化象牙質基質が形成され、エナメル質形成不全部位が生じると考えられている。

今回、HEBP を連続的に添加して歯胚の器官培養を続けた結果から、HEBP を生体に投与した場合に切歯に認められる外套象牙質の石灰化阻害とエナメル質形成不全とに同様な形成障害が観察された。このことは、歯胚の硬組織形成過程で、象牙芽細胞と象牙質基質、さらにエナメル芽細胞に対して、培地内に含まれる HEBP が直接連続的に石灰化抑制作用を及ぼした結果と考えられる。また、培地に HEBP を 12 日間連続して添加した場合(図 6)と、培養 4 日目から 12 日目まで添加した場合(図 7)、または培養 8 日目から 12 日目まで添加した場合(図 8)とを比較すると HEBP の歯牙硬組織に対する石灰化抑制作用に差は認められず、象牙質の石灰化とエナメル質の形成が完全に抑制されていた。正常な歯胚の器官培養系では培養 4 日目に象牙質の基質の形成が開始し(図 2)、8 日目に象牙質の石灰化とエナメル質の形成が開始する(図 3)ことから、HEBP の添加時期の相違は象牙質の基質形成には影響を与えないことが確認された。さらに、HEBP の効果は、培養 8 日目から 12 日目までの 4 日間の添加と、培地に HEBP を 12 日間連続して添加した場合とに同様の抑制効果が認められることから、象牙質の石灰化抑制効果は象牙質の石灰化が開始する時期に HEBP が培地に存在していることが必要であることが推測された。

歯胚の器官培養系における HEBP の効果を調べた近藤¹⁶⁾の実験では、胎生 17 日齢のマウス下顎第一臼歯の器官培養で、培地に HEBP を添加する実験を行い、HEBP の添加により培養 7 日で象牙前質を形成していたが、石灰化象牙質は認められず、エナメル芽細胞の分化も観察されなかったことから、組織学的に石灰化抑制が認められたことを報告した。この報告は今回の実験結果と一致しており、HEBP が象牙質の石灰化抑制とエナメル質の形成障害を引き起こすことが確認された。

ラットに HEBP を毎日投与すると、切歯の基質形成期エナメル質に投与回数に一致するエナメル質形成不全部位とエナメル質形成部位が繰り返し、周期的な島状エ

ナメル質が出現する¹⁰⁾。この島状構造は HEBP の血中濃度が 24 時間サイクルで変化することにより、高濃度に維持されている時期に未石灰化象牙質基質とエナメル質形成不全部位が形成され、その後生体内の代謝により HEBP の血中濃度が低下すると HEBP の石灰化阻害効果が低下し、再び石灰化が生じて石灰化象牙質が形成される。一方、HEBP を浸透圧ポンプを利用して連続的に投与した場合でも、エナメル質形成不全と象牙質の石灰化障害からなる繰り返し構造が観察されることから、ラットの切歯の形成端には象牙質の石灰化における内在する固有の周期の存在も考えられている²²⁾。さらにラットの切歯では連続的に象牙質が形成されているために、未石灰化象牙質の根尖側に新たに形成された石灰化外套象牙質が形成され、その結果、周期的島構造が生じると考えられている。この場合、未石灰化象牙質の基質には高濃度の HEBP が沈着しており、その後の石灰化を抑制していると考えられる。

本研究ではこの現象を確認するために、HEBP 添加した培養歯胚に認められる石灰化阻害からの回復を調べる回復実験を行った。象牙質基質の石灰化が開始する以前の培養 4 日から 8 日まで HEBP を連続添加した後、HEBP を除去した培地でさらに 6 日間培養した歯胚 (図 9) では、培養 0 日から 12 日まで HEBP を連続添加した培養歯胚 (図 6) と同様に、象牙質には石灰化は観察されず、象牙前質と同様の組織像が観察された。このことは、培地から HEBP を除去した培地でさらに培養を続けても、象牙質基質内に沈着した HEBP が象牙質基質の新たな石灰化を抑制していることを示唆している。

正常な歯胚の器官培養で石灰化象牙質が形成された場合には、培地からの栄養物の浸透が石灰化象牙質により阻害された結果生じる象牙芽細胞の変性像は、HEBP 添加培養歯胚の咬頭頂部において観察されなかった。このことから HEBP 添加培養歯胚の象牙質基質は象牙芽細胞の代謝に必要な物質の通過を抑制せずに、象牙芽細胞は培地からの栄養物の十分な浸透を受けていることが考えられ、石灰化していない象牙質基質はかなり自由に物質の移動を行うことができると考えられる。

また、HEBP 添加した培養歯胚では象牙質の外表面にエナメル質の形成は観察されず、エナメル芽細胞が象牙質と接して存在していた (図 9)。エナメル芽細胞は、背が高い円柱形で、明瞭な極性を示すが、遠位端にはトームス突起は認められなかった。しかし、エナメル芽細胞の遠位側細胞質および細胞間隙にエナメル質基質様物質が観察され、免疫組織学的にも確認された (図 9, 15)。エナメル芽細胞の遠位端にトームス突起の形成が認められなかったことは、トームス突起がエナメル小柱の形成に関与するだけではなく、エナメル質の厚みの増大と密

接な関係をもつ可能性を示唆している。

HEBP を培地から除去後、さらに 9 日間培養した歯胚では、培養歯胚の象牙質には石灰化象牙質は認められず、象牙質の外表面にはエナメル質の形成は観察されず、エナメル芽細胞が象牙質と接して存在するが、エナメル芽細胞は隣接するエナメル芽細胞との間に広い細胞間隙を示すようになり、成熟期エナメル芽細胞へと分化していた。この実験から、HEBP 添加の影響は、培養歯胚では HEBP を除去した後、長期間維持され続けていることが推測された。また、エナメル芽細胞はエナメル質の形成が認められなくても、時間経過に従って基質形成期から移行期を経て成熟期に分化が進むことが証明された。また、象牙芽細胞層および直下の歯乳頭細胞間に多量のエナメル基質様物質の蓄積が観察されたことから、HEBP を添加した培養歯胚の未石灰化象牙質は、象牙芽細胞の代謝に必要な物質以外にも、表面を覆っているエナメル芽細胞が産生したエナメル質基質も自由に拡散して移動できることを意味している。

HEBP によるエナメル質形成障害に関して、Ohya ら²¹⁾は HEBP が象牙質の石灰化を阻害し、その結果としてエナメル質の形成障害が生じるとした。一方、Beertsen ら²³⁾は HEBP が一度開始したエナメル芽細胞の基質を合成する能力を阻害しないとし、さらに HEBP を注射したときにすでに石灰化していた象牙質を覆うエナメル芽細胞はエナメル基質を分泌する¹²⁾との報告もある。また、HEBP 投与がエナメル質基質の形成に直接影響するとの報告もある^{24,25)}。さらに、HEBP 投与で生じた外套象牙質の石灰化が阻害されエナメル質の形成は認められない部位と、象牙質に石灰化が生じており象牙質を覆うエナメル質が形成されている部位で、エナメル芽細胞を比較すると、両者には明瞭な微細構造上の相違はないとの報告もある^{11,12)}。一方、HEBP の投与でトームス突起に変性が生じるとの報告もある¹⁰⁾。このように HEBP によるエナメル質形成障害のメカニズムに関しては不明な点が残されている。

アメロゲニンとはエナメル質に特異的なタンパク質で、エナメル芽細胞により産生、分泌され、エナメル質の外形を作り、エナメル質結晶の成長の空間を確保することが知られている^{26,27)}。Yamada ら²⁸⁾は、HEBP 投与ラット切歯でエナメル質基質形成期に相当する切歯の表層に、島状に出現するエナメル質形成不全部位のエナメル芽細胞に *in situ* hybridization によるアメロゲニンの発現を観察し、HEBP 投与群でも正常なエナメル質基質の合成と分泌における機能は維持していると報告した。Fuangtharnthip ら²⁹⁾は、HEBP を 7 日間投与したラットに³H-proline によるオートラジオグラフィを行った結果、エナメル質基質の形成障害はエナメル質基質の合

成障害ではなく、分泌または沈着障害のためであると結論し、Yamada ら²⁸⁾の報告を確認した。

今回の HEBP 連続投与実験から、HEBP を連続して培地に投与した培養 12 日目の歯胚では、エナメル質基質様物質が象牙芽細胞間および歯乳頭に貯留している場合も認められた。このことは Yamada ら²⁸⁾の報告と一致し、エナメル芽細胞は HEBP による象牙質の石灰化の阻害と関係なくエナメル質基質を分泌し、そのエナメル質基質は象牙質基質内に拡散していることを示唆している。

また、培養歯胚に厚い石灰化象牙質やエナメル質の形成が認められる培養 13 日目の歯胚に HEBP を添加した場合は、厚い石灰化象牙質が形成されている部位の象牙質表層にエナメル質の形成が認められ、石灰化象牙質の歯頸側端部位ではエナメル質基質様物質が石灰化していない象牙質基質内に観察され、石灰化した象牙質直下の石灰化していない象牙前質の基質内に向かって拡散していた。今回の観察結果から、象牙質の石灰化はエナメル質基質がエナメル質としての細胞外集積を可能とする重要な物理的役割を果たしていることが示唆された。

今回の培養歯胚を用いた HEBP の連続投与実験の結果から、HEBP 存在下でエナメル芽細胞はエナメル質基質を合成分泌し、このエナメル質基質は石灰化していない象牙質基質を拡散し、さらに歯乳頭に拡散して貯留することにより、歯乳頭にエナメル質基質のプールを形成することが明らかとなった。培養歯胚では機能している血管系が存在しないために、血管系を介したエナメル質基質の除去が生じない結果、歯乳頭側に拡散した多量のエナメル質基質やエナメル器の乳頭層の細胞間にエナメル質基質の貯留が生じると考えられる。このことは、HEBP によるエナメル質の形成障害は象牙質の石灰化障害によりエナメル質基質が象牙質基質に流出してエナメル象牙境部に蓄積しない結果生じたと考えられる。

V. 結 論

HEBP が齧歯類の切歯や臼歯にエナメル質形成不全を生じることが知られている。本研究では歯胚を構成する各細胞に HEBP が直接的に、かつ連続的に作用することを可能とする歯胚の器官培養系を用いて、歯牙硬組織形成細胞に対する HEBP の作用とエナメル質形成不全の発症機序を検索した。実験材料として胎生 17.5 日齢の ICR 系マウス胎仔の下顎第 1 臼歯を用い、器官培養法により歯胚を培養した。器官培養の種々の時期に HEBP を培地に添加して培養し、その後、組織学的ならびにアモロゲンに対する免疫組織化学的観察を行った結果、以下のような結論を得た。

1. 正常培養歯胚では培養 8 日目に咬頭頂部の象牙質

に石灰化が生じ、石灰化象牙質に接してエナメル質の形成が認められた。培養日数の増加に伴い、石灰化象牙質およびエナメル質の厚さは増加し、培養 15 日目では歯冠がほぼ完成し、咬頭頂部のエナメル芽細胞は移行期エナメル芽細胞を経て成熟期エナメル芽細胞へと分化が進展していた。

2. HEBP 連続添加実験から、象牙質の石灰化およびエナメル質の形成が開始する以前に HEBP を培地に添加すると、培養歯胚の大きさや咬頭の形態に関して正常発育歯胚との間に差異は認められないが、象牙質基質に石灰化が認められず、エナメル質の形成も観察されなかった。

3. HEBP 連続添加実験後に HEBP を培地より除去して培養を続けても、象牙質基質における石灰化は認められず、エナメル質の形成も観察されないが、基質形成期エナメル芽細胞の細胞質内およびエナメル芽細胞の細胞間隙にエナメル質基質様物質が認められ、歯胚中央部の歯乳頭にはエナメル質基質様物質の多量の集積が観察された。咬頭頂部のエナメル芽細胞は基質形成期から成熟期エナメル芽細胞へと分化が進展していた。

4. 硬組織形成が認められる培養歯胚に対する HEBP の添加実験から、HEBP 添加以前にすでに形成されていた石灰化象牙質とエナメル質はそのまま認められたが、HEBP 添加後に形成された象牙質基質の石灰化とエナメル質の形成は完全に抑制されていた。すでに形成されていた石灰化象牙質の歯頸側では、HEBP 添加後に形成された象牙質基質には石灰化は認められず、象牙芽細胞層間およびその内側の歯乳頭細胞間にエナメル質基質様物質の集積が観察され、さらに石灰化象牙質が存在する象牙質基質に向かってエナメル質基質様物質の拡散が観察された。一部のエナメル芽細胞は細胞形態とその配列に著しい乱れが生じており、エナメル芽細胞層がエナメル質表面から遊離し、エナメル質とエナメル芽細胞間にエナメル質基質様物質が集積していた。

5. HEBP を添加した培養歯胚におけるアモロゲンに対する免疫組織化学的観察から、HEBP を連続添加した培養歯胚のエナメル芽細胞の細胞質と細胞間隙および培養歯胚の中央部の歯乳頭細胞間に認められるエナメル質基質様物質に、アモロゲニンの局在を示す銀粒子が観察された。また石灰化象牙質がすでに形成されている場合は、その歯頸側領域で、歯頸側部の未石灰化象牙質基質に免疫反応を示す銀粒子が観察され、さらに、銀粒子は象牙芽細胞層間およびその内側の歯乳頭の細胞間に存在するエナメル質基質様物質に連続して認められた。一方、高度に石灰化した象牙質および象牙前質や内側に位置する象牙芽細胞および歯乳頭細胞には銀粒子の局在は観察されなかった。

6. 今回の培養歯胚を用いた HEBP の連続投与実験の結果から, HEBP 存在下でエナメル芽細胞はエナメル質基質を合成分泌し, このエナメル質基質は石灰化していない象牙質基質内を拡散し, さらに歯乳頭へと拡散することにより, 歯乳頭にエナメル質基質の貯留が形成されることが明らかとなった。このことから, HEBP によるエナメル質の形成障害は, 象牙質の石灰化障害によりエナメル質基質が象牙質基質に流出してエナメル象牙境部に蓄積しない結果と考えられる。したがって, 象牙質に生じた石灰化が, エナメル質基質がエナメル質として特定の部位に集積するための重要な物理的構造物として作用していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, ご懇篤なるご指導を賜りました本学大学院医歯学総合研究科 顎顔面機構制御学講座 顎顔面解剖学分野 山下靖雄教授に, 深甚なる感謝の意を表します。また, 直接ご懇切なるご指導を賜りました本学大学院医歯学総合研究科 生体硬組織再生学講座 硬組織構造生物学分野 寺島達夫助教授に心より感謝申し上げます。また, HEBP を供与いただいた本学大学院医歯学総合研究科 生体硬組織再生学講座 硬組織薬理学分野 大谷啓一教授に厚くお礼申し上げます。

最後に終始温かいご支援を賜りました本学大学院医歯学総合研究科 顎顔面機構制御学講座 顎顔面解剖学分野の諸先生方にお礼申し上げます。

本研究の要旨の一部は, 第 36 回歯科基礎医学学会学術大会ならびに総会 (1994 年 10 月, 大阪) にて発表した。

文 献

- 1) 竹内鉄夫: 骨スキニング用^{99m}Tc 標識リン酸系化合物の生体内分布と骨集積機序の研究. 金沢大学十全医学会雑誌 88 : 849-866, 1979.
- 2) Francis, M. D. and Fogelman, I. : ^{99m}Tc-diphosphonate uptake mechanism on bone. Fogelman, I. : Bone scanning in clinical practice. London, 1987, Springer-Verlag, 7-17.
- 3) Osterman, T. and Lauren, L. : Level of clodronate in bone after single and repeated subcutaneous injections in rats. Pharmacol. Toxicol. 69 (5) : 369-371, 1991.
- 4) Francis, M. D. : The inhibition of calcium hydroxyapatite crystal growth by polyphosphonates and polyphosphates. Calcif. Tiss. Res. 3 : 151-162, 1969.
- 5) Francis, M. D., Russel, R. G. G. and Fleisch, H. : Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals *in vitro* and pathological calcification *in vivo*. Science 165 : 1264-1266, 1969.
- 6) Fleisch, H., Russell, R. G. G. and Francis, M. D. : Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution *in vitro* and bone resorption in tissue culture and *in vivo*. Science 165 : 1262-1264, 1969.
- 7) Russell, R. G. G., Mühlbauer, R. C., Bisaz, S., *et al.* : The influence of pyrophosphate, condensed phosphonates, phosphonates and other phosphate com-

- pounds on the dissolution of hydroxyapatite *in vitro* and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. Calcif. Tiss. Res. 6 : 183-196, 1970.
- 8) Reynold, J. J., Murphy, H., Mühlbauer, R. C., Morgan, D. B. and Fleisch, H. : Inhibition by diphosphonates of bone resorption in mice and comparison with Grey-lethal osteopetrosis. Calcif. Tiss. Res. 12 : 59-71, 1973.
 - 9) Ogawa, Y., Adachi, Y., Hong, S. S. and Yagi, T. : 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) simultaneously induces two distinct types of hypomineralization in the rat incisor dentine. Calcif. Tissue Int. 44 (1) : 46-60, 1989.
 - 10) Wakamatsu, H. : A study of the effects of successive injections of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the enamel formation in the rat incisor. 歯基礎誌 33 : 82-96, 1991.
 - 11) Fejerskov, O., Josephsen, K. and Weile, V. : The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on secretory ameloblasts and enamel formation in rat incisors. J. Biol. Buccale 18 (4) : 339-354, 1990.
 - 12) Josephsen, K., Fejerskov, O., Baelum, V. and Weile, V. : The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on presecretory ameloblast differentiation in rat incisors. J. Biol. Buccale 18 (4) : 321-337, 1990.
 - 13) Fouda, N., Caracatsanis, M. and Hammarstrom, L. : Developmental disturbances of the rat molar induced by two diphosphonates. Adv. Dent. Res. 3 (2) : 234-240, 1989.
 - 14) Fouda, N., Kut I. A. and Hammarstrom, L. : Effects of phosphonoformic acid and 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on distribution of tetracycline in the developing rat molar. Scand. J. Dent. Res. 100 (5) : 257-265, 1992.
 - 15) Fouda, N., Caracatsanis, M., Kut, I. A. and Hammarstrom, L. : Mineralization disturbances of the developing rat molar induced by mono- and bisphosphonates. J. Biol. Buccale 19 (1) : 106-115, 1991.
 - 16) 近藤 真: マウス培養歯胚の石灰化に対する Chlorpromazine の効果: Retinoic acid および HEBP との比較. 日本薬理学雑誌 97 (2) : 85-95, 1991.
 - 17) Liu, J.-G., Tabata, K. J., Fujii, T., Ohmori, T., Abe, M., Ohsaki, Y., Kata, J., Wakisaka, S., Iwamoto, T. and Kurisu, K. : Parathyroid hormone-related peptide is involved in protection against invasion of tooth germs by bone via promoting the differentiation of osteoclasts during tooth development. Mechanisms of Development 95 : 189-200, 2000.
 - 18) Levy, R. J., Wolfrum, J., Schoen, F. J., Hawley, M. A., Lund, S. A. and Langer, R. : Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by local controlled-release diphosphonate. Science 228 : 190-192, 1985.
 - 19) 篠田 壽, 瀬戸尚子: EHDP による実験的歯石形成の抑制. 骨代謝 14 : 35-44, 1981.
 - 20) Dziedzic-Goclawski, A., Ostrowski, K., Wojtowicz, A., Michalik, J. and Stachowicz, W. : Effect of ethene-1-hydroxy-1,1-diphosphonate/EHDP on the amount and crystallinity on bone mineral in growing and adult rats. Metab. Bone Dis. Relat. Res. 2 : 325-330, 1981.

- 21) Ohya, K., Matakai, S., Wakamatsu, H. and Ogura, H. : Effects of successive injection of 1-hydroxyethane-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the rat incisor enamel. Fearnhead, R. W. : Tooth enamel 5, Yokohama, 1989, Flprence Publishers, 227-234.
- 22) Sakai, H., Takano, Y., Ohya, K. and Kurosaki, N. : Intermittent inhibition of dentin mineralization of rat incisors under continual infusion of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) using a subcutaneous mini osmotic pump. Arch. Histol. Cytol. 62 : 171-179, 1999.
- 23) Beertsen, W., Niehof, A. and Everts, V. : Effects of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the formation of dentin and the periodontal attachment apparatus in the mouse. Am. J. Anat. 174 : 83-103, 1985.
- 24) Taya, Y. and Suga, S. : Disturbed mineralization of developing enamel by the single injection of HEBP. Fearnhead, R. W. : Tooth enamel 5, Yokohama, 1989, Flprence Publishers, 219-226.
- 25) Weile, V., Josephsen, K. and Fejerskov, O. : Effects of single doses of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate on the mineralizing front of rat incisor enamel ; a microradiographic and scanning electron microscopic study. Arch. Oral Biol. 35 (11) : 857-867, 1990.
- 26) Slavkin, H. C., Bessem, C., Bringas, P. Jr., Zeichner-David, M., Nanci, A. and Snead, M. L. : Sequential expression and differential function of multiple enamel proteins during fetal, neonatal, and early postnatal stages of mouse molar organogenesis. Differentiation 37 (1) : 26-39, 1988.
- 27) Nanci, A., Ahluwalia, J. P., Pompura, J. R. and Smith, C. E. : Biosynthesis and secretion of enamel proteins in the rat incisor. Anat. Rec. 224 (2) : 277-291, 1989.
- 28) Yamada, Y., Fuangtharntip, P., Tamura, Y., Takagi, Y. and Ohya, K. : Gene expression and immunolocalization of amelogenin in enamel hypoplasia induced by successive injections of bisphosphonate in rat incisors. Arch. Oral Biol. 45 (3) : 207-215, 2000.
- 29) Fuangtharntip, P., Yamada, Y., Takagi, Y. and Ohya, K. : Autoradiographic investigation of the effect of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate on matrix protein synthesis and secretion by secretory ameloblasts in rat incisors. Arch. Oral Biol. 45 (6) : 495-506, 2000.

付図説明

- 図 1 胎生 17.5 日齢のマウスの第一臼歯歯胚。器官培養に用いた第一臼歯歯胚を含む下顎骨臼歯部の近遠心断の組織像。歯胚は鍾状期を示し、エナメル器 (EO) と歯乳頭 (DP) が観察され、象牙芽細胞およびエナメル芽細胞への分化は認められない (AB : 歯槽骨)。トルイジンブルー染色 (×75)
- 図 2 正常器官培養 4 日目の歯胚。エナメル器 (EO) と接する歯乳頭 (DP) の最外層で、象牙芽細胞の分化が認められ、象牙質基質の形成が開始している。トルイジンブルー染色 (×90)
- 図 3 正常器官培養 8 日目の歯胚。象牙芽細胞 (OB) は厚い象牙質基質を形成し、咬頭頂部では象牙質基質に石灰化が認められる。エナメル芽細胞 (AB) は高円柱形となり、石灰化象牙質 (CD) に接している領域のみに、エナメル質基質 (E) の形成が観察される (PD : 象牙前質) (×400)。挿入図は全体像を示す (×34)。トルイジンブルー染色
- 図 4 正常器官培養 12 日目の歯胚。歯冠の外形がほぼ完成し、エナメル芽細胞 (AB) にはトームス突起が観察される。歯頸部では象牙前質 (PD) は幅が広く、高円柱形の象牙芽細胞層 (OB) が観察される。咬頭側の厚いエナメル質 (E) が形成されている領域 (*) では象牙前質が薄くなり、象牙芽細胞は一部変性消失している (CD : 石灰化象牙質) (×280)。挿入図は全体像を示す (×33)。トルイジンブルー染色
- 図 5 正常器官培養 15 日目の歯胚。歯冠の硬組織形成はほぼ完了し、歯頸部側では基質形成期エナメル芽細胞 (AB) が観察され、咬頭頂側ではエナメル芽細胞は移行期から、成熟期エナメル芽細胞へと分化が進行している。(E : エナメル質, CD : 石灰化象牙質, PD : 象牙前質, OB : 象牙芽細胞) (×330)。挿入図は全体像を示す (×25)。トルイジンブルー染色
- 図 6 培養 0 日目から培養 12 日目までの 12 日間 HEBP を連続添加した培養実験。歯冠の外形が完成し、歯冠には正常培養歯胚とほぼ同じ厚みを示す象牙質 (D) が形成されているが、象牙質基質に石灰化は観察されない。象牙質表面にはエナメル質が認められず、エナメル芽細胞 (AB) は象牙質表面と接している。エナメル芽細胞の核の極性に乱れが認められる (OB : 象牙芽細胞) (×280)。挿入図は全体像を示す (×30)。トルイジンブルー染色
- 図 7 培養 4 日目から培養 12 日目までの 8 日間 HEBP を連続添加した培養実験。形成された象牙質基質 (D) に石灰化は認められない。歯頸部側では、前エナメル芽細胞の背丈が著しく増加して歯乳頭側に向かって突出している。象牙質基質表面にはエナメル質の形成は認められず、エナメル芽細胞 (AB) は厚い象牙質基質と接している (OB : 象牙芽細胞) (×170)。挿入図は全体像を示す (×30)。トルイジンブルー染色
- 図 8 培養 8 日目から培養 12 日目までの 4 日間 HEBP を連続添加した培養実験。象牙質基質 (D) には石灰化象牙質が観察されず、エナメル質の形成も認められない (AB : エナメル芽細胞, OB : 象牙芽細胞) (×190)。挿入図は全体像を示す (×36)。トルイジンブルー染色
- 図 9 HEBP 添加培養後の回復実験 (培養 4 日目から 8 日目までの 4 日間 HEBP を添加培養後、HEBP を除去してその後 14 日目まで培養)。象牙質基質 (D) には石灰化象牙質が観察されず、エナメル質形成も認められない。エナメル芽細胞 (AB) の細胞間隙およびエナメル芽細胞の細胞質内にエナメル基質様物質 (EM) が観察される。トルイジンブルー染色 (×250)
- 図 10 HEBP 添加培養後の回復実験 (培養 4 日目から 8 日目までの 4 日間 HEBP を添加培養後、HEBP を除去してその後 17 日目まで培養)。象牙質基質 (D) には石灰化象牙質が観察されず、エナメル質の形成も認められない。象牙質基質直下の歯髓細胞間にエナメル基質様物質 (EM) の多量の蓄積が観察される (AB : エナメル芽細胞, OB : 象牙芽細胞)。トルイジンブルー染色 (×220)

- 図 11 硬組織形成開始期における HEBP 添加培養後の回復実験 (培養 10 日目から 11 日目までの 1 日間 HEBP を添加培養後, HEBP を除去してその後 12 日目まで培養)。咬頭頂部に石灰化象牙質層 (CD) が形成され, 石灰化象牙質上にはエナメル質 (E) が観察される。HEBP 添加後の石灰化象牙質およびエナメル質の形成が抑制され, エナメル質と接しているエナメル芽細胞 (AB) には著しい形態と配列の変化が生じ, エナメル芽細胞間にエナメル質基質が拡がっている (OB: 象牙芽細胞, D: 象牙質基質) (×220)。挿入図は低倍像を示す (×37)。トルイジンブルー染色
- 図 12 硬組織形成期における HEBP 添加培養後の回復実験 (培養 13 日目から 14 日目までの 1 日間 HEBP を添加培養後, HEBP を除去してその後 18 日目まで培養)。咬頭頂部には厚い石灰化象牙質基質 (CD) とエナメル質 (E) が観察される。形成されたエナメル質の歯頸側では象牙質基質層が著しく減少し, 象牙芽細胞 (OB) の配列も乱れ, 象牙芽細胞層および歯髄細胞間にエナメル質基質様物質 (EM) の集積が観察される。石灰化象牙質直下の象牙芽細胞層および歯髄細胞間にはエナメル質基質様物質の集積は認められない (AB: エナメル芽細胞) (×350)。挿入図は低倍像を示す (×45)。トルイジンブルー染色
- 図 13 正常器官培養 14 日目の培養歯胚のアメロゲニンに対する免疫組織化学。エナメル質 (E) およびエナメル芽細胞 (AB) の遠位側の細胞質およびエナメル芽細胞の細胞間隙のエナメル質基質様物質 (EM) に免疫陽性反応を示す銀粒子が認められる。サービカルループでは形成された象牙質基質内に銀粒子がわずかに認められる。エナメル質と接している石灰化象牙質 (CD) および象牙前質 (PD) には免疫陽性物質は観察されない (OB: 象牙芽細胞) (×530)。
- 図 14 HEBP 連続添加培養実験 (培養 4 日目から 12 日目まで連続して HEBP 添加して培養) の免疫組織化学。エナメル芽細胞 (AB) の細胞質とエナメル芽細胞の細胞間隙のエナメル質基質様物質 (EM) に, アメロゲニンの局在を示す銀粒子がわずかに観察される (D: 象牙質基質, OB: 象牙芽細胞) (×400)。
- 図 15 図 14 と同一の歯胚の中央部の歯髄における免疫組織化学。歯胚中央部では石灰化していない象牙質基質 (D) 直下の歯乳頭細胞間にアメロゲニンの局在を示すエナメル質基質様物質 (EM) の集積が認められる (AB: エナメル芽細胞) (×250)。
- 図 16 硬組織形成時における HEBP 添加培養実験 (培養 13 日目から 14 日目までの 1 日間 HEBP を連続添加して培養)。厚いエナメル質 (E) にはアメロゲニンの局在を示す銀粒子が観察される。石灰化象牙質 (CD) の直下に位置する象牙前質 (PD), 象牙芽細胞 (OB) および歯乳頭細胞には銀粒子の局在は観察されない。石灰化象牙質の歯頸側部の象牙質基質, 象牙芽細胞層間およびその内側の歯乳頭細胞間に集積しているエナメル質基質様物質 (EM) に銀粒子の局在が観察される (AB: エナメル芽細胞) (×490)。