ラット切歯のエナメル質形成に及ぼす薬剤の影響

阿部敏男 宮嶋宏彰 武田薬品工業株式会社・薬剤安全性研究所

EFFECT OF DRUGS ON DEVELOPING ENAMEL IN RAT INCISORS

Toshio Abe and Hiroaki Miyajima Drug Safety Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.

Abstract: The basic structure of rat incisors and the process of enamel formation are reviewed, and the drug-induced lesions of rat incisors are described.

The rodent incisors grow, calcify and erupt continuously throughout the life of the animal, and show in one longitudinal section the complete life cycle of tooth development from inception to maturity. Therefore it is a valuable biologic indicator which reflects and records, during its development, the metabolic status of the animal. Drug-induced lesions in developing enamel of incisors are white discoloration of enamel surface, degeneration, necrosis, and atrophy of ameloblasts and/or papillary cells, disturbance of pigmentation, and hypocalcification of enamel. These changes correlate with the stage of enamel formation. The advantage of using rat incisors for toxicity studies is stressed. (J Toxicol Pathol 3: 245~256, 1990)

Key words: Rat incisors, Biologic indicator, Enamel, Ameloblasts, Drug-induced lesions, Disturbance of pigmentation

緒言

歯牙は生体を構成する重要な器官の一つであるが、哺乳類では成長に伴って分化が終了し、肝臓や腎臓のように薬剤の吸収・代謝・排泄などとの直接的な関連性が少ないことから毒性学的にはあまり重視されてこなかった。しかし、ラットやマウスのような齧歯目の切歯は生体内でもっとも旺盛に成長し続ける器官の一つであり、薬剤の投与によって歯牙の形成が阻害された場合は、ある日数を経過した後に器質的变化として外見上からも明確に識別されることがある。したがって、歯牙は薬剤の影響を retrospective に知る上で重要な情報を提供する biological indicator であり、毒性学的な意義は大きいと考えられる。

本稿では、筆者らの経験例を中心に、薬剤投与による切歯のエナメル質形成過程における病理形

態学的変化ならびに発生病理に関する考察を報告する。歯牙の形成障害を理解し易くするため、はじめに歯牙の基本構造、ラットにおける切歯の基本構造およびエナメル質の形成過程について概説し、次いでラット切歯のエナメル質形成における毒性病理について論述する。

歯牙の基本構造

歯牙は鳥類以外のすべての脊椎動物にみられ、いずれもエナメル質 (enamel)、象牙質 (dentin) およびセメント質 (cementum) の三つの硬組織と歯髄などから構成されている。エナメル質は外胚葉由来のエナメル芽細胞 (ameloblast) によって形成され、最も石灰化度が高い組織で、約 95% の無機成分を含んでいる¹。象牙質およびセメント質はそれぞれ中胚葉由来の象牙芽細胞 (odontoblast) およびセメント芽細胞 (cementoblast) によって形成され、骨と類似の組成でそれぞれ約 65% および 45% の無機成分を含み、膠原線維を主体とした有機質と水分から構成される¹。このように主要な石灰組織がエナメル芽細胞、象牙芽細胞およびセメ

Accepted for publication: August 1, 1990

Mailing address: Toshio Abe, Drug Safety Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd., 6-10-1, Himuro-cho, Takatsuki, Osaka, 569, Japan.

ント芽細胞という発生由来を異にする3種類の細胞群によって形成されるところに歯牙の特徴がある。

ラット切歯の基本構造 (図1, 2)

ラットやマウスのような齧歯目およびウサギのような重歯目は、ノミのようにするどい切歯を上・下顎にそれぞれ一対もっている。これらの切歯は、根尖部にある歯胚の細胞の分裂増殖によって終生成長し続けることから、常生歯 (continuously growing tooth) あるいは無根歯 (rootless tooth) と呼ばれている²。唇側はエナメル芽細胞、舌側はセメント芽細胞がそれぞれ切歯の長軸に沿って発育の順に配列し、歯髄腔ではそれを内張りして象牙芽細胞が配列している。エナメル芽細胞は有機性基質を分泌し、電解質輸送によって、石灰化を行いながらエナメル質を形成し、やがて基質を脱却してエナメル質の成熟を促進する³。このようにエナメル質の形成過程においては、いったん分泌された基質が石灰化の進行とともに脱却され、最終的にその基質の占めていた空間がハイドロキシアパタイトを主成分とする鉱質によって占められるようになる。そのため石灰化したエナメル質は病理標本作製の際の脱灰操作によって溶失してしまう。象牙芽細胞およびセメント芽細胞はそれぞれ有機性基質を分泌し、電解質輸送を行って石灰化を促進し、象牙質およびセメント質を形成する。しかし、象牙質の石灰化においては、エ

ナメル質の場合と異なり、象牙質基質が石灰化の進行に伴って脱却されるという複雑な過程は存在しない。いずれにしても、これらの芽細胞は歯質を形成しながらエスカレーター式に切歯端に向かって移動する。歯の萌出あるいは長軸的移動を起こす要因としては、歯髄あるいは歯周囲組織内に発生する液圧あるいは線維芽細胞によって牽引力が発生するという説が有力視されている⁴。萌出した切歯端は噛み合わせによって磨耗し、切歯の長さはほぼ一定に保たれる。一侧の切歯を切断した場合には対側の切歯の萌出速度は増加する⁵。ラットの切歯は一週間に上顎で2.1 mm, 下顎で2.8 mmの割合で萌出し、40日から50日で全て生え代わる⁶。筆者らの測定では、10週齢のF344ラットの切歯の萌出速度は餌の形状にあまり関係が無く、一週間に上顎で約3 mm, 下顎で約4 mmであった。ラット切歯では生後10~12日齢から色素沈着が開始され⁷, 加齢とともに切歯の表面は褐色調を呈するようになる。上顎切歯においては、下顎切歯に比較して切歯表面の褐色調が濃くみられるが、それは後述するエナメル質形成過程における色素沈着期が長いことと関連する⁸。

ラットにおける切歯エナメル質の形成過程

前述のようにラットの切歯は常生歯であり、一本の縦断面でエナメル質形成の全過程を同時に観察することができる。エナメル質は上・下顎切歯ともに唇側を占め、エナメル芽細胞によって形成されるが、その過程の分類は人によってさまざまである⁹⁻¹²。本稿では比較的汎用されている須賀

図1. ラット上顎切歯の正中矢状断模式図およびエナメル質の形成過程

E: エナメル質, D: 象牙質, C: セメント質, P: 歯髄, G: 歯肉, Am: エナメル芽細胞, Od: 象牙芽細胞, Pa: 乳頭層

図2. 正常ラット上顎切歯の正中矢状断面

a: 細胞増殖期および組織分化期, b: 基質形成期, c: 移行期, d: 成熟期, e: 色素沈着期, f: 退縮期, H.E., $\times 5.2$

の分類⁹に準じてエナメル質の形成過程を以下の4 stageに分類する。

1) 細胞増殖期 (stage of cell proliferation) (図3)

根尖部にある歯胚の上皮性細胞が分裂、増殖する時期で、エナメル芽細胞に分化する内エナメル上皮細胞および後に乳頭層を形成する中間層細胞、エナメル髓細胞および外エナメル上皮細胞が出現する。

2) 組織分化期 (stage of histodifferentiation) (図3)

エナメル基質の分泌は象牙質の形成より少し遅れて始まるが、この象牙質の形成開始からエナメル基質の分泌が始まるまでの時期を指す。この時期には内エナメル上皮細胞における細胞内小器官の分化が進行する。

3) 基質形成期 (stage of matrix formation) (図4)

エナメル芽細胞がエナメル基質を形成する時期を指す。エナメル基質はアメログニンやエナメルンなどのエナメル蛋白からなっており、高度な石灰化を示さず、酸不溶性である¹⁸。エナメル芽細胞は高さ約60~70 μm の高円柱状で、基底側細胞質には1~2個の核小体をもつ楕円形の核が偏在している。また、すべての核が同位置に並列しているのではなく、少しずつ高さを異にして配列する傾向をもっている。この時期のエナメル芽細胞には先端部に突起の形成(Tomesの突起)がみられ、電顕的には典型的な蛋白分泌型の細胞形態を備えている¹⁴。エナメル芽細胞の基底側には扁平な中間層細胞、その外側に広い細胞間隙をもった星状のエナメル髓細胞、さらにその外側には不整立方形の外エナメル上皮細胞があり、それが周囲の結合組織に接している。これらの細胞の機能的役割はよくわかっていないが、¹²⁵I 標識血清アルブミンの分布様式から、血液とエナメル基質の間の「血液-エナメル基質関門 (blood-enamel matrix barrier)」の形成に関与している可能性がある¹⁵。

4) 成熟期 (stage of maturation) (図5~8)

エナメル基質の形成が終了してから萌出するまでの時期を指す。この時期においてエナメル芽細胞やエナメル基質の機能と形状が劇的に変化する。これらの変化は、初期におけるエナメル芽細胞の形態変化(高円柱状→立方状)に始まり、エナメル蛋白の脱却とそれに伴う石灰化度の上昇ならびにエナメル質における石灰化の完了、鉄色素

の沈着(色素沈着期)、エナメル芽細胞の退縮(退縮期)と続く。成熟期の初期においてエナメル芽細胞は高円柱状から、短小化して立方状の形態に移行し、その形態的な特徴からこの時期を移行期と呼ぶ(図5)。移行期において約25%のエナメル芽細胞は変性・壊死を呈し、これらは中間層細胞あるいはマクロファージによって処理される^{16,17}。成熟期に入ってから後、エナメル芽細胞の退縮が始まるまでの期間、エナメル芽細胞は細胞質の基質側末端に刷子縁をもつ時期(ruffle-ended ameloblasts: RA)と、もたない時期(smooth-ended ameloblasts: SA)を交互に3~4回くり返しながら変化する。これはエナメル質の有機性基質脱却の他に、ミネラルの添加をはじめとするエナメル質成熟化のための諸機能と密接に関連した形態変化と考えられている^{12,18}。色素沈着期(図7)にはエナメル芽細胞の胞体内に鉄反応陽性の色素顆粒が出現し、この色素顆粒は次第にエナメル質表面へと移行沈着する。切歯の表面が褐色調を示すのはこの鉄色素に由来する。鉄色素はトランスフェリンを介して血清中の鉄イオンがエナメル芽細胞に輸送されて形成されたもので、前述した刷子縁をもつ時期のエナメル芽細胞(RA)にはトランスフェリンのレセプターが多く分布している¹⁹。色素沈着期を経過するとエナメル芽細胞は次第に退縮する(図8)。このようにして形成された切歯の先端部はやがて萌出し、噛み合わせによって切歯端から磨耗消失する。前述した中間層細胞、エナメル髓細胞および外エナメル上皮細胞は成熟期に入ると、形態と配列を変えて乳頭層を形成し、その間に毛細血管が介在するようになる。

エナメル質形成障害の毒性病理

筆者らは各種の薬剤による毒性試験の際に、ラット切歯に白色変色巣(白色化)が発現することに注目し、これらの変化が肉眼的には類似しているにもかかわらず病理組織学的には病変が多様であることを経験した。そこでエナメル質形成過程において、最初に病理組織学的変化が発現する時期を指標に切歯の障害を以下の4種類のタイプに分類した。

1. 基質形成期に始まるエナメル芽細胞の障害
2. 移行期に始まるエナメル芽細胞の障害

図 3. 細胞増殖期および組織分化期のエナメル芽細胞

図 2 の a の拡大。エナメル芽細胞の分裂像（矢印）が観察される。

Am: 内エナメル上皮細胞, Od: 象牙芽細胞, H.E., $\times 156$

図 4. 基質形成期のエナメル芽細胞

図 2 の b の拡大。エナメル芽細胞 (Am) は高円柱状で、遠位側にエナメル基質の形成が観察される。Od: 象牙芽細胞, D: 象牙質, H.E., $\times 156$

図 5. 移行期のエナメル芽細胞

図 2 の c の拡大。壊死性のエナメル芽細胞およびその残渣が観察される（矢印）。

E: メナメル質, D: 象牙質, H.E., $\times 156$

図 6. 成熟期のエナメル芽細胞

図 2 の d の拡大。エナメル芽細胞 (Am) の近位側に接して乳頭層 (Pa) が観察される。早期のエナメル質 (E) は石灰化を示さず、酸不溶性である。

D: 象牙質, H.E., $\times 156$

図 7. 色素沈着期のエナメル芽細胞

図 2 の e の拡大。エナメル芽細胞 (Am) の胞体内に微細顆粒状の色素沈着が観察される。エナメル質 (E) は高度な石灰化を示し、脱灰処置によって溶失する。Pa: 乳頭層, H.E., $\times 156$

図 8. 退縮期のエナメル芽細胞

図 2 の f の拡大。エナメル芽細胞 (Am) の胞体内の色素沈着は消失している。

E: エナメル質, D: 象牙質, H.E., $\times 156$

図 9. フルオロウラシル誘導体投与ラットの下顎切歯

基質形成期におけるエナメル芽細胞の変性と配列不整に伴う嚢胞形成 (*) および異常なエナメル基質 (矢印) を示す。D: 象牙質。H.E., $\times 32$

図 10. フルオロウラシル誘導体投与ラットの下顎切歯

図 9 の拡大。嚢胞内には異常なエナメル基質 (矢印), マクロファージおよび線維芽細胞の増生が観察される。H.E., $\times 156$

図 11. フルオロウラシル誘導体投与ラットの下顎切歯

色素沈着期におけるエナメル芽細胞の配列不整および胞体内鉄色素顆粒の減少を示す。E: エナメル質。ベルリン青, $\times 156$

図 12. フルオロウラシル誘導体投与ラットの下顎切歯

エナメル質における石灰化不全線 (矢印) および石灰化不全帯 (*) を示す。エナメル質, D: 象牙質。顕微 X 線法, $\times 45$

図 13. フルオロウラシル誘導体投与ラットの下顎切歯

エナメル質における石灰化不全線 (矢印) を示す。E: エナメル質, D: 象牙質。顕微 X 線法, $\times 45$

3. 色素沈着期に始まるエナメル芽細胞および乳頭層細胞の障害

4. 基質形成期～退縮期のエナメル芽細胞の障害

検査方法

投薬を終了した動物は、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、剖検した。摘出した上顎および下顎切歯は、周囲の筋肉組織を取り除いた後に、骨組織を軽く研磨して歯髄を露出させ、10% 中性緩衝ホルマリン液に固定した。

病理組織学的検査には、切歯を EDTA-4Na あるいはトリクロール酢酸で脱灰し、パラフィンあるいはセロイジン・パラフィン二重包埋の後、薄

切し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E), アザン・マロリー, ベルリン青およびアルシアンブルー・PAS の各染色を行った。顕微 X 線法 (マイクロラジオグラフィー) による観察には、切歯をポリエステル樹脂 (Rigolac®) に包埋し、約 $40\mu\text{m}$ 厚の研磨標本作製した後、Softex® (日本ソフテックス社, CMR 型) で Contact microradiogram (7Kv, 3 mA, 10~30 min.) を撮影した^{20,21}。

切歯中のフッ素濃度の化学的測定には下顎切歯を微粉化した後、Lanthan-Alizarin Complexon method で測定した。

1. 基質形成期に始まるエナメル芽細胞の障害 (図9~13)

本実験に用いた二種類のフルオロウラシル誘導体は各々の分子量の約7~8%のフッ素を含有している。それらの200 mg/kg/day および500 mg/kg/day を4週齢の雌ラットに8週間経口投与すると、肉眼的には投薬4週以降に下顎切歯の歯頸部表面に横縞状の白色巣が発現した。この変化は下顎切歯において顕著であり、萌出に伴って順次移動するとともに歯頸部付近からは新たな白色巣が発現し切歯の表面全体に広がった。病理組織学的には、エナメル質形成過程における最初の変化が基質形成期エナメル芽細胞に認められた。基質形成期にあるエナメル芽細胞には空胞変性、壊死、同細胞層の配列不整と嚢胞形成およびエナメル基質の異常な産生がみられ、成熟期においてもエナメル芽細胞の配列不整が認められた。色素沈着期以降にある同細胞には鉄色素沈着障害および萎縮が認められた。このようなエナメル芽細胞の変化は基質形成期に障害を受けたエナメル芽細胞が色素沈着期に至っても修復せずに存在していることを示している。顕微X線法では、エナメル質に成長線と一致して斜めに走る線状の低石灰化、いわゆる石灰化不全線 (Calcio-traumatic line) およびエナメル質表層からエナメル・象牙質の境に向かう帯状あるいは巣状の低石灰化、いわゆる石灰化不全帯 (Calcio-traumatic zone) がみられた。これらエナメル質における低石灰化の発現様式²² から、石灰化不全線は基質形成期エナメル芽細胞の障害に、また、石灰化不全帯は成熟期エナメル芽細胞の障害に起因すると考えられる。

両薬剤がフッ素を含むことに注目し、切歯の変

化と切歯に含まれるフッ素濃度との関連性について検討した。フッ化ナトリウム (NaF) および両薬剤を、いずれもフッ素 (F) 換算で等量になるように調整し、4週齢の雌ラットに8週間経口投与した。その結果、各投与群には肉眼的な切歯の白色変色巣が発現し、フッ化ナトリウム投与群ではその変化が最も強く認められた。切歯のフッ素濃度はフッ化ナトリウム投与群で最も高く、無処置対照群の約10倍を示し、また、フルオロウラシル誘導体投与群では2.4および7.5倍と比較的低値であったがいずれも切歯の肉眼病変の程度とよく関連していた (表1)。

以上の病理組織学的検査および顕微X線法でみられた病変および発現時期は、ラットのフッ素症で報告されている切歯の変化に類似していた。また、切歯中のフッ素濃度と切歯の肉眼病変の程度もよく関連しており、病変の発現には両薬剤に含まれるフッ素の関与が示唆された²³。両薬剤投与ラットにおいて細胞増殖期および細胞分化期のエナメル芽細胞に異常が認められないことから、切歯の変化は休薬に伴って切歯端へと移動し、順次正常の組織に置換されると考えられる。

2. 移行期に始まるエナメル芽細胞の障害 (図14~17)

ある種のマクロライド系抗生物質の大量 (5000 mg/kg/day) を4週齢の雌雄ラットに5週間経口投与すると、肉眼的には投薬4週以降に上顎および下顎切歯の表面に周期性をもった帯状あるいは不規則な横縞状の白色変色巣がみられ、とくに下顎切歯における出現頻度が高かった。病理組織学的には、エナメル質形成過程における最初の変化が移行期エナメル芽細胞に認められた。この時期

表1. フルオロウラシル誘導体およびフッ化ナトリウムを投与されたラット切歯におけるフッ素濃度および切歯の肉眼変化

化 合 物		フッ素濃度 (ppm)	肉眼変化
無処置	(5) ^a	60.0±13.3 ^b	—
フルオロウラシル誘導体 A	(5)	146.6±17.2 ^{**}	+
フルオロウラシル誘導体 B	(5)	453.2±57.9 ^{**}	+
フッ化ナトリウム	(5)	604.6±37.9 ^{**}	++~+++

^a: Number of rats. ^b: Mean±S.D.

^{**}: Significantly different from control, p<0.01

Grading of discoloration: —, none; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

図 14. マクロライド系抗生物質投与ラットの下顎切歯移行期におけるエナメル芽細胞の変性・壊死（矢印）を示す。

E: エナメル質, H.E., $\times 156$

図 15. マクロライド系抗生物質投与ラットの下顎切歯

成熟期エナメル芽細胞の変性および配列不整を示す。H.E., $\times 156$

図 16. マクロライド系抗生物質投与ラットの下顎切歯

成熟期エナメル芽細胞の変性・萎縮および結合組織の増生が巣状（*）に観察される。H.E., $\times 78$

図 17. マクロライド系抗生物質投与ラットの下顎切歯

エナメル質（E）における石灰化不全帯（*）を示す。D: 象牙質。顕微 X 線法, $\times 16$

において変性・壊死を示すエナメル芽細胞が多発し、これに続く成熟期においてはエナメル芽細胞の空胞変性、壊死がみられた。変性したエナメル芽細胞に接する部位には脱灰によって溶出すべきエナメル基質が残存しており、基質の脱却が障害されていることを示していた。また、エナメル芽細胞の変性・萎縮像が周期的に巣状に分布し、その直下の乳頭層領域には結合組織の増生が認められた。色素沈着期において変性あるいは変形に陥ったエナメル芽細胞の胞体内には鉄反応陽性の顆粒が異常に充満し、鉄色素の分泌障害を示していた。顕微 X 線法では、エナメル質の表層部に石灰化不全帯が周期的に認められた。休薬 9 週後には切歯の肉眼的変化は萌出に伴い消失し、変化の再発は認められなかった。

移行期におけるエナメル芽細胞は基質形成期から成熟期への機能変化に対応して、微細形態学的

には細胞内小器官の再構成が行われ、短小化する²⁴。この時期において同細胞の壊死が多発してみられることは、成熟期エナメル芽細胞への機能および形態転換の障害が生じたものと推察される。エナメル質の周期的な石灰化不全帯は成熟期エナメル芽細胞の変性・萎縮像に対応した所見であり、エナメル基質の脱却および石灰化の障害を示す所見と考えられる。また、エナメル芽細胞の変性・萎縮像が周期的に巣状に発現することから、成熟期エナメル芽細胞が薬剤投与の影響を一様に被るのではなく、高感受性を持つ特定の細胞群の存在することが考えられる。この細胞群が刷子縁のある細胞(RA)あるいは刷子縁のない細胞(SA)のいずれかの可能性が考えられるが、詳細は不明である。

図 18. セフェム系抗生物質投与ラットの上顎切歯色素沈着期における乳頭層 (Pa) の構築の乱れ (*) およびエナメル芽細胞の萎縮を示す。H.E., $\times 78$

図 19. セフェム系抗生物質投与ラットの上顎切歯図 18 の拡大。乳頭層細胞の変性・壊死およびエナメル芽細胞の萎縮を示す。

Pa: 乳頭層, H.E., $\times 312$

図 20. セフェム系抗生物質投与ラットの下顎切歯色素沈着期における乳頭層細胞の変性・壊死を示す。

Pa: 乳頭層, H.E., $\times 156$

3. 色素沈着期に始まるエナメル芽細胞および乳頭層細胞の障害 (図 18~20)

ある種のセフェム系抗生物質の大量 (3000 mg/kg/day) を 5 週齢の雌雄ラットに 5 週間経口投与すると、肉眼的には投薬 4 週以降に上顎および下顎切歯に横縞状の白色変色巣が発現した。病理組織学的には、色素沈着期に最初の変化がみられた。この時期の乳頭層細胞は変性・壊死を呈し、乳頭層の構築は乱れ、それらの周囲には多数の鉄反応陽性の顆粒が散在していた。また、近接するエナメル芽細胞の萎縮と鉄色素を保有したエナメル芽細胞の乳頭層への埋没が認められた。これらの変化は乳頭層細胞の障害が先行し、次いでエナメル芽細胞の鉄色素分泌障害が生じたことを示していると考えられる。乳頭層細胞はエナメル芽細胞と終末毛細血管との間の物質輸送あるいは細胞外物質の吸収等に関連すると考えられているが、その本態については不明である²⁵。しかし、エナメル芽細胞が成熟に伴って形態変化を示すと同時に、支持組織ともいべき乳頭層細胞もそれに伴って変化することから、両細胞間にはエナメル質形成において密接な関連のあることが伺われる。なお、乳頭層細胞の萎縮はビタミン A 欠乏ラットでもみられているが、その意義については不明である²⁶。

4. 基質形成期～退縮期のエナメル芽細胞の障害 (図 21~24)

ある種の糖尿病薬の大量 (600 mg/kg/day) を 5 週齢の雌雄ラットに 26 週間経口投与すると、肉眼的には投薬 17 週以降に下顎切歯の表面に白色変色巣が発現し、エナメル質表層の剝離、および切歯先端部の破損もみられた。これらの肉眼的変化の推移には個体差があり、経時的に変化が増強する例もあり、また回復する例もみられた。病理組織学的には、変化は基質形成期から発現し、エナメル芽細胞の変性と異常なエナメル基質の分泌および色素沈着障害が広範囲にわたって強くみられた。エナメル芽細胞は配列不整で、接する乳頭層には陥入したエナメル芽細胞およびマクロファージの集簇が認められた。退縮期においては、鉄色素を保有するエナメル芽細胞が歯肉層に埋没してみられた。肉眼的変化は、実験の後期 (17 週以降) に強度の削蝕と関連して発現しており、動物の強度の代謝障害が全域のエナメル芽細胞の成熟過程を障害したものと考えられる。

以上、4 種類の薬剤投与によるラット切歯の病変分布を表 2 に示す。

- 図 21. 糖尿病薬投与ラットの下顎切歯
基質形成期におけるエナメル芽細胞の広範な変性・壊死およびエナメル基質の形成障害を示す (*). H.E., $\times 32$
- 図 22. 糖尿病薬投与ラットの下顎切歯
成熟期におけるエナメル芽細胞の変性・壊死および配列不整を示す。H.E., $\times 156$
- 図 23. 糖尿病薬投与ラットの下顎切歯
成熟期におけるエナメル芽細胞の変性および配列不整, およびエナメル基質の形成障害を示す。H.E., $\times 78$
- 図 24. 糖尿病薬投与ラットの下顎切歯
色素沈着期におけるエナメル芽細胞の変性と配列不整および乳頭層 (Pa) の鉄色素を保有した変性エナメル芽細胞およびマクロファージの集簇を示す。H.E., $\times 156$

考察およびまとめ

薬剤の過剰投与による障害は、一般に肝臓や腎臓のような軟組織の器官に多く発現することが知られているが、歯牙のように歯根が完成し、萌出が終了した硬組織は薬剤の影響をあまりうけないといわれている²⁷。一方、歯牙はその形成期において全身的あるいは局所的な種々の因子の影響を受けた場合には形成異常をきたす。全身的因子としては各種栄養素の欠乏、ホルモンの異常、その他の全身的疾患、フッ素の過剰摂取などがあり、局所的因子としては歯胚におよぼす外傷、炎症、放射線の作用がある^{1,6,26}。ラットの切歯は終生成長し続けることから、未分化の細胞から成熟した細胞まで各発育段階の細胞が配列しており、薬剤の

影響をうけた場合は歯牙の形成が阻害されて各種の病理変化を招来する。エナメル質の形成障害の原因となり得るものは多彩であり、各種の薬剤による実験的歯牙形成障害に関する報告は多い。

フッ素化合物はヒトの斑状歯をもたらすことで知られているが、ラットでは基質形成期エナメル芽細胞の分泌を障害し、異常基質を形成するだけでなく、成熟期のエナメル芽細胞にも傷害を与え、水分や有機性基質の脱却を障害することにより二次石灰化にも異常を招来する^{22,28,29}。

歯牙に現れる病変との因果関係が明らかにされている抗生物質にはテトラサイクリンおよびピユーロマイシンがある。テトラサイクリンを新生児に投与すると黄色歯と形成不全歯の発生することが知られているが、ラットでは基質形成期エ

表2 各種薬剤を投与されたラット切歯における病理組織学的変化の分布

薬剤	エナメル質の形成過程		成熟期			
	細胞増殖期 組織分化期	基質形成期	移行期 (形態変化)	色素沈着期	退縮期	
1. フルオロウラシル誘導体		↓				
2. マクロライド系抗生物質			↓			
3. セフェム系抗生物質					↓	
4. 糖尿病薬		↓				

■ 病理組織学的変化の分布
↓ : エナメル質形成過程において病理変化が最初に発現した時期

ナメル芽細胞に障害を与え、エナメル質の形成不全をもたらす³⁰。また、ピューロマイシンもラットの基質形成期のエナメル芽細胞に障害を与えるが、これらの変化の発現には、両薬剤の蛋白合成阻害作用の関与が示唆されている³¹。

ストロンチウム(Sr)はラットの基質形成期エナメル芽細胞の空胞化および成熟期エナメル芽細胞の萎縮、配列の乱れ、囊胞形成などを引き起こす。電子顕微鏡的には成熟期のエナメル芽細胞にミトコンドリアの膨化・空胞化がみられることから、Sr投与によって、同細胞のエネルギー代謝に障害が起こり、それが細胞の吸収能やCa移送能を阻害し、エナメル質の成熟に障害を与えると考えられている³²。

微小管阻害剤であるコルヒチン、ビンブラスチンおよびビンクリスチンなどはラットの基質形成期エナメル芽細胞に対しては、細胞骨格系の維持機能および基質の分泌機能に関与するマイクロチューブルを阻害し、また、成熟期エナメル芽細胞に対してはとくに鉄色素の形成および分泌に関与するマイクロチューブルを阻害し、エナメル質の形成障害と色素沈着障害を引き起こす^{33,34}。

筆者らの実験では、各種薬剤を投与したラットの切歯には共通して肉眼的な白色変色巣が発現し、これらの変化は切歯が磨耗によって消失するまで長期にわたって観察することができた。病理組織学的にはエナメル芽細胞の変性・壊死、同細胞層の配列不整と囊胞形成、エナメル基質の異常な産生、鉄色素沈着障害、乳頭層細胞の変性・壊死およびエナメル質の低石灰化層などが認められた。エナメル質形成過程における病変の発現開始

は基質形成期、移行期および色素沈着期と、各薬剤で異なっており、また、障害を受けたエナメル芽細胞は修復せずに経過する傾向が認められた。各薬剤投与により病変の発現開始時期に差異があったが、最終的には共通して色素沈着障害が認められることから、本所見はエナメル質形成過程の障害を反映する鋭敏な指標になると考えられる。

各薬剤の薬効と発現病変との関連性およびそれぞれの病変の発現機序については不明な点が多い。しかし、エナメル芽細胞を障害する因子としては、先に述べたように蛋白合成阻害、エネルギー代謝障害、微小管阻害などの作用が考えられる。また、ある種の糖尿病薬のように肉眼的変化が投薬17週以降に強度の削瘦と関連して遅延性に発現する場合は、代謝障害などの全身的原因による可能性も考えられる。

歯牙の毒性に関する報告は多いが、発生病理に関しては不明な点が多い。しかし、ラットの切歯はその構造上の特徴から、他の諸臓器にみられない以下の特徴をもっており、毒性病理学的分野における有用性は高いといえる。

① 一本の切歯の縦断面でエナメル質形成の細胞増殖期から退縮期に至る全過程の同時観察が可能である。また、薬剤に対して高感受性の細胞およびそのstage、病変の経時的推移およびその回復性を比較的容易に観察することができる。

② 形成が終了し、萌出した歯牙には血流を介した薬剤による毒性変化は発現しない。したがって、一旦エナメル質に出現した変化は磨耗によって消失するまで長期にわたる肉眼的観察が可能で

あり、薬剤の影響を retrospective にとらえることができる。

③ 薬剤の初回投与から、切歯の肉眼的変化が発現するまでの時間的経過を検索することによって薬剤の標的時期 (target stage) を予測することができる。

④ 切歯の色素沈着はエナメル質形成障害を反映する鋭敏な指標となる。

エナメル質形成細胞はその発育分化の時期によって、それぞれ特徴的な形態と機能を示す。このような特徴のあるラットの切歯では、薬剤投与に高感受性の細胞あるいはステージを明らかにし、とくにエナメル質形成過程における標的時期 (target stage) を特定することは毒性発現機序を知る上で重要である。今回は微細形態学的検索は実施していないが、このような技術を併用することによって初期病変や回復性の詳細を明らかにし、切歯における総合的な毒性病理を解明することが必要であろう。

文 献

1. Barker, IK and Van Dreumel, AA: The alimentary system. In: Pathology of domestic animals, Vol 2, Jubb, KVF, et al Eds, Academic Press, New York, pp. 1-11, 1985.
2. 後藤仁敏: 緒論. 後藤仁敏編. 歯の比較解剖学. 医歯薬出版, 東京, 1-30 頁, 1986.
3. 小澤英浩: 歯牙硬組織の微細構造. 細胞 4(8): 2-24, 1972.
4. 和泉隆之: ラット下顎非咬合切歯萌出率, および切歯硬組織形成に及ぼす 1-Hydroxy-ethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) の影響. 日薬理誌 93: 75-87, 1989.
5. Robinson, C, Kirkham, J, and Nutman, CA: Relationship between enamel formation and eruption rate in rat mandibular incisors. Cell Tissue Res 254: 655-658, 1988.
6. Schour, I and Massler, M: The teeth. In: The Rat in Laboratory Investigation, ET Farris and JQ Griffith Ed, JB Lippincott Co., Philadelphia pp. 104-165, 1963.
7. Halse, A: Location and first appearance of rat incisor pigmentation. Scand J Dent Res 80: 428-433, 1972.
8. Lindemann, G: Rat incisor pigmentation. Tandlaegebladet 74: 662-670, 1970.
9. 須賀昭一: エナメル質形成過程のあらまし. 須賀昭一編. エナメル質, その形成, 構造, 組成と進化. クインテッセンス出版株式会社, 東京, 46-49 頁, 1987.
10. Leblond, CP and Warshawsky, H: Dynamics of enamel formation in the rat incisor tooth. J Dent Res 58(B): 950-975, 1979.
11. Warshawsky, H and Smith, CE: Morphological classification of rat incisor ameloblasts. Anat Rec 179: 423-446, 1974.
12. 小澤英浩: 歯の形成と構造. 骨の科学. 医歯薬出版, 東京, 76-109 頁, 1985.
13. 佐々木哲: エナメル基質の生化学—アメロゲンとエナメルリン. 須賀昭一編. エナメル質, その形成, 構造, 組成と進化. クインテッセンス出版, 東京, 153-162 頁, 1987.
14. 小澤英浩: エナメル芽細胞の微細構造学的特徴と機能. 細胞 16(12): 6-11, 1984.
15. Ogura, H and Kinoshita, Y: The difference in the distribution pattern of administered serum albumin between developing dentine and enamel matrix in the rabbit incisor. In: Mechanisms of tooth enamel formation, Suga, S Ed, Quintessence, Tokyo, pp. 143-154, 1983.
16. Smith, CE and Warshawsky, H: Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor: evidence for ameloblast death immediately after enamel matrix secretion. Anat Rec 187: 63-97, 1977.
17. Moe, H: Physiological cell death of secretory ameloblasts in the rat incisor. Cell Tissue Res 197: 443-451, 1979.
18. 高野吉郎, 小澤英浩: エナメル質成熟化—細胞機能と基質変化. 細胞 16(12): 12-17, 1984.
19. McKee, MD, Zerounian, C, Martineau-doizé, B, and Warshawsky, H: Specific binding sites for transferin on ameloblasts of the enamel maturation zone in the rat incisor. Anat Rec 218: 123-127, 1987.
20. 磯川宗七: 硬組織薄片切の作り方. 星野 孝・須賀昭一編. 顕微 X 線法. 医学書院, 東京, 12-23 頁, 1970.
21. 須賀昭一: 硬組織の microradiography. 歯界展望 27 (4): 495-515, 1966.
22. 石田 武: 急性フッ素中毒症におけるエナメル質形成に関する実験的研究. 歯基礎誌 12: 88-107, 1970.
23. Abe, T, Masuoka, M, Nomura, M, and Miyajima, H: Effects of fluoride on developing enamel and dentin of rat incisors. fluoride Research 1985, Stud Environ Sci 27: 299-305, 1986.
24. Reith, EJ: The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. Ultrastr Res 30: 111-151, 1970.
25. 須賀昭一: 歯の細胞—特にエナメル質の形成. 小川和朗, 黒住一昌, 小池聖淳, 佐藤正一編. 動物細胞学 I. 朝倉書店, 東京, 15-46 頁, 1977.
26. Pindborg, JJ: Pathology of the Dental Hard Tissues. W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 138-210, 1970.
27. 小椋秀亮: 薬物による歯の形成障害. 歯科ジャーナル 17(6): 797-807, 1983.
28. 伊集院直邦: 急性フッ素中毒症におけるエナメル質形成細胞の障害に関する実験的研究. 歯基礎誌 13: 39-61, 1971.
29. 長谷川清: 慢性フッ素中毒症におけるエナメル質形成障害に関する実験的研究. 歯基礎誌 13: 239-254, 1971.
30. Westergaard, J: Structural changes induced by tetracycline in secretory ameloblasts in young rats. Scand J Dent Res 88: 481-495, 1980.

31. Weinstock, A : Cytotoxic effects of puromycin on the golgi apparatus of pancreatic acinar cells, hepatocytes and ameloblasts. *J Histochem Cytochem* 18: 875-886, 1970.
32. 古井 瞭: ストロンチウム投与によるラット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 77: 847-879, 1977.
33. Hashimoto, K : The effect of colchicine on the pigmentation of the enamel surface in rat incisors. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 31: 115-126, 1984.
34. 小椋秀亮: エナメル質の形成異常に関する実験薬理学的研究. 須賀昭一編. エナメル質, その形成, 構造, 組成と進化. クインテッセンス出版, 東京, 324-337 頁, 1987.