

研 究

ラット臼歯萌出過程における萌出路上皮組織の変化に関する
形態学的並びに免疫組織化学的研究

遠藤 真

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座

(主任 : 名和 橙黄雄 教授)

(受付 : 2001年10月12日)

(受理 : 2001年11月1日)

Abstract : Although it is well known that crown cusps of teeth break through the covering oral epithelium at the final stage of tooth eruption, the detailed mechanism of its process is still obscure. This study investigated the morphological and immunohistochemical changes in the gingival and odontogenic epithelia during the late stages of tooth eruption in the rat molar, using antibodies to cytokeratin 14 (CK14), cytokeratin 18 (CK18), EGF receptor, p75 NGFR receptor and PCNA. Conventional H-E staining and immunohistochemistry for CK14 showed that the dental lamina for rat molars is composed of an oblique part that connects to the oral epithelium and a horizontal part that directly connects to tooth germs. The oblique part of the dental lamina did not disrupt throughout the development of molar teeth, but regressed during the late eruption period. The regressing dental lamina contained a number of epithelial pearls and few apoptotic cells. The apical portion of every molar tooth germ was combined with horizontal dental lamina with a wide transitional zone, characterized by multiple layers of cuboidal epithelial cells. The immunohistochemistry by PCNA indicated that the cells in the epithelium of the transitional zone have a higher potential of mitosis than cells in the typical outer enamel epithelium. Disruption occurred in the epithelium of the transitional zone and in the connective tissue with blood vessels penetrating into the stellate reticulum of the enamel organs during the advanced eruption stages. Epithelial cells that proliferated from the epithelium of the transitional zone extended towards the stellate reticulum layer, and formed a reticular formation of reduced enamel epithelium by fusion with epithelial cords that proliferated from stratum intermedium cells of the enamel free area. While the reticular reduced enamel epithelium showed a weak EGFR-like immunoreaction, a similar structure was negative to anti-NGFR. By the final stage of eruption, reduced enamel epithelium completely fused with oral epithelium at every cusp region, and keratinization progressed not only from the outer surface but also from the inner surface in the fused epithelium. Distribution of Merkel cells was investigated using anti-CK18 as the contribution of these cells in the formation of eruption passage was suspected. However, no Merkel cell was detected during entire period of tooth eruption stage.

Key words : tooth eruption, molar tooth germ, eruption passage, immunohistochemistry

Morphological and immunohistochemical changes of epithelial tissues of eruption passage of the rat molar teeth during eruption period.

Makoto ENDOH

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University,
1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 26 : 132-145, 2001

緒 言

歯の萌出は歯根の形成とともに始まる。現在のところ萌出には歯根膜が深く関わっているという考えが有力である¹⁻³⁾。歯の萌出に先立って、歯堤の断裂によって離れていたエナメル上皮と口腔上皮は、高い細胞分裂活性を示すようになり⁴⁻⁷⁾、その形態を変化させながら両者が癒合し萌出路を形成するとされている⁸⁻¹⁵⁾。エナメル上皮や口腔上皮の細胞分裂活性の上昇を促す因子は十分には解明されていない。また歯の萌出の最終段階で歯冠咬頭は上皮を貫いて口腔に露出するが、この上皮貫通が単なる萌出力による機械的な上皮破壊によるのか、それとも上皮自体に積極的な貫通路を形成するメカニズムが作用しているのかは不明である。もしも後者であれば、歯の上皮貫通路に一致したアポトーシスなどの細胞変化が起こることが予想される。

上皮成長因子 (EGF) は、全身の広範な組織に上皮性、非上皮性に関わらず発現しており、その受容体の分布についても同様の報告がある¹⁶⁾。歯の萌出の際には、*in vivo* の実験によって EGF が萌出を促進することが報告されており^{17,18)}、萌出中の歯牙を覆う縮合エナメル上皮や口腔上皮にも EGF が何らかの影響を与えていることが予測される。一方、神経成長因子受容体の 1 つである p75 神経成長因子受容体 (NGFR) が、上皮系の組織にも発現することが示され、ケラチノサイトの分化との関連が示唆されている¹⁹⁻²¹⁾。この NGF を供給する細胞は不明であるが、萌出路周囲の上皮分化にも NGFR が関与している可能性も考えられる。

歯肉は歯の萌出によってその解剖学的、組織学的特徴が確立される特異な粘膜である。歯肉にはメルケル細胞が豊富に分布することが報告されている²²⁻²⁷⁾、最近、Ramieri ら²⁶⁾、Hilliges ら²⁷⁾、および Tachibana ら²⁸⁾ は口腔粘膜に神経終末と接合しないメルケル細胞の存在を報告している。このメルケル細胞は、神経と接合しないにもかかわらず多量の分泌顆粒を

み、胎生期皮膚のメルケル細胞²⁹⁾と同様にケラチノサイトの分化などに影響をおよぼしている可能性が考えられている²⁸⁾。歯の萌出時の上皮癒合や萌出路の形成においてメルケル細胞が何らかの役割を果たす可能性も考えられるが、歯肉におけるメルケル細胞の出現時期は明らかになっていない。

そこで本研究は、歯の萌出過程における歯原性上皮と歯肉予定域口腔上皮における細胞分裂活性の変化や生理的細胞死 (アポトーシス) の頻度、および成長因子受容体の局在変化について免疫組織化学的に検討した。さらに歯の萌出前後における歯肉予定域口腔上皮におけるメルケル細胞の分布や出現時期についても免疫組織化学的に検討した。

材料および方法

1. 実験材料

雌雄 Wistar 系ラットを用い、生後 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 16, 17 日齢の幼若ラット 30 匹と 3 匹の成獣を使用した。これらの動物は岩手医科大学歯学部動物舎にて一定の環境下 (温度 23°C ± 1°C, 湿度 55% ± 5%) で飼育し、飼育期間中、飼育用固形飼料 (オリエンタル酵母工業) と水を自由に摂取させた。なお、動物は出産された日を 0 日齢とした。

動物はペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) を腹腔内投与し十分に麻酔した後、左心室より 0.01M 磷酸緩衝生理食塩水を灌流し、脱血を行った。その後 4% パラホルムアルデヒド (0.01M 磷酸緩衝液, pH7.4) で灌流固定後、上顎を摘出し、同固定液でさらに 4°C で 24 時間浸漬固定を行った。標本はその後 10% 蟻酸・クエン酸液または 10% EDTA で 4°C にて脱灰を行い、通法に従いアルコール脱水後、パラフィン包埋した。標本は厚さ 5 μm の矢状断連続切片とし、シラン処理を施したスライドガラスに貼付した。

各試料の一部はヘマトキシリン・エオジン染色を施して組織像の一般観察に、残りは免疫組織化学染色およびアポトーシス検出に供した。

Table 1. Antibodies and conditions for immunohistochemical stainings

| Antibody | Dilution | Incubation |
|-------------------------------------|----------|----------------|
| CK14 (mouse mono, NEOMARKERS) | 1 : 200 | 37°C 1h |
| PCNA (mouse mono, madac) | 1 : 200 | 37°C 1h |
| EGFR (rabbit poly, Santa Cruz Bio.) | 1 : 300 | 4°C over night |
| NGFR (mouse mono, oncogene) | 1 : 200 | 37°C 1h |
| CK18 (mouse mono, PROGEN) | 1 : 100 | 4°C over night |

2. 免疫組織化学

切片は通法に従い脱パラフィンした後、1% H₂O₂を含むメタノール液に30分間浸漬し、内在性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。0.85% NaClを含む0.01M 磷酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、一次抗体で所定の時間インキュベートした。使用した一次抗体と反応条件は、Table 1 に示した。

一次抗体反応後の切片はPBSで洗浄し、ヒストファインシンプルステイン PO キット (ニチレイ) を用いて高感度ポリマー法にて、horseradish peroxidase (HRP) とともに高分子ポリマーに結合した二次抗体と反応させた。その後PBSで洗浄後、diaminobenzidine (DAB) 反応により反応産物を発色させた。切片には、希釈ヘマトキシリンまたはエオジンにて対比染色を施した後、通法に従い脱水、封入後に、観察した。対照染色には、一次抗体の代わりに抗原で吸収した抗体又は抗体を作成した動物の正常血清を、使用抗体と同様の希釈倍率で使用した。

なお、前処理として、抗-CK18についてはトリプシン処理による抗原賦活化を施した。また抗-PCNA、抗-CK18抗体については、内在性ペルオキシダーゼ活性の阻害後、0.2% Triton-X 100/PBS 溶液で室温60分間の前処理を施した。

3. アポトーシス検索

アポトーシスの検出には、TACS 2 TdT-DAB *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Trevigen, USA) を用いて TUNEL 法で行った。切片は通法に従って脱パラフィンし、前処理としてマイクロウェーブによる賦活化 (10

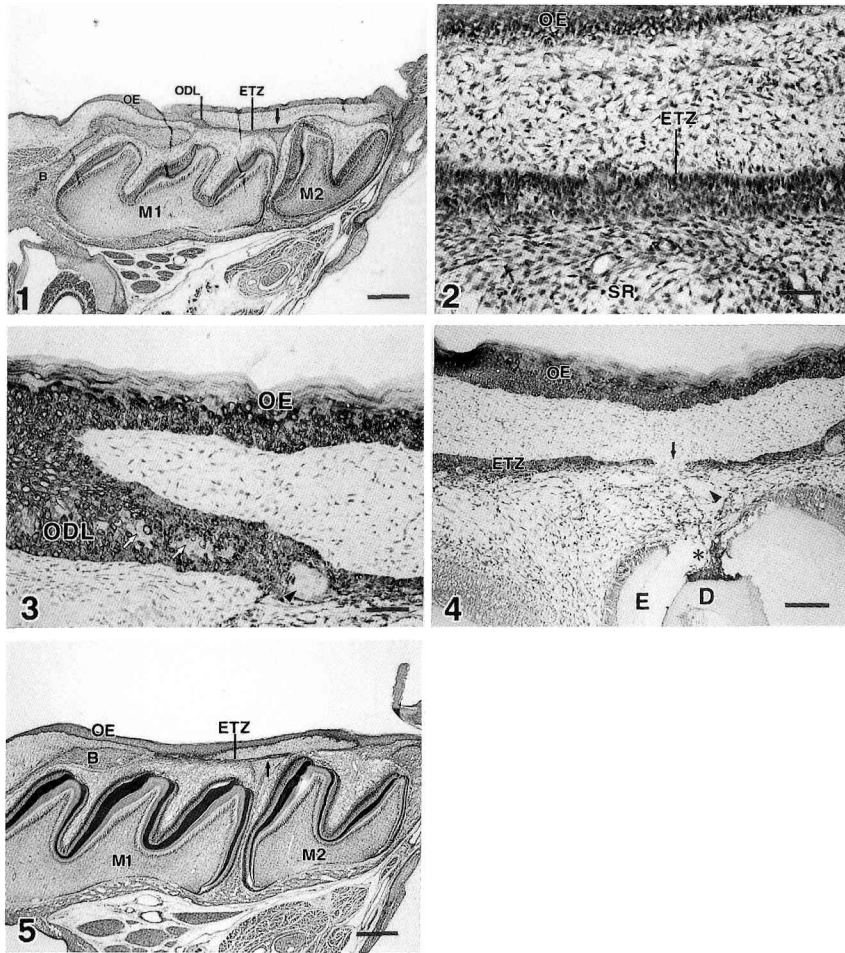
mM クエン酸ナトリウム緩衝液 pH6.0浸漬下) を行った後に0.2% Triton-X100/PBS 溶液に室温で60分間浸漬した。PBSで洗浄後、1% H₂O₂を含むメタノール液に30分間浸漬し、内在性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。その後、再びPBSで洗浄し、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) labeling buffer に室温で5分間浸漬した。次にTdT deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) とTdTを含んだ反応液と37°C、60分間反応させた。PBSで洗浄後streptavidin-HRP液と10分間反応させ、DAB反応により発色させた。希釈したヘマトキシリンで対比染色を行い、通法に従い脱水、封入して顕微鏡にて観察した。対照としてnucleaseで前処理し、意図的にDNAの断片化を生じさせた切片で同様の染色を行った。

4. 細胞分裂活性の検定

細胞分裂活性の判定のため、抗-PCNAによる陽性細胞数の計測を行った。各日齢の任意の3枚の切片から歯堤とエナメル器の結合部、およびこの部位に隣接する外エナメル上皮相当部からそれぞれ200 μm × 150 μmの一視野を選び、各視野中の全上皮細胞数および、その中のPCNA陽性細胞数を数え、上皮細胞に対する陽性細胞の割合を細胞分裂活性指数とした。各日齢について細胞分裂活性の平均値と標準偏差を算出し、*t*-testにより有意差を検定した。

結 果

1) エナメル上皮と口腔上皮の形態学的変化
すでに知られているようにラットの歯堤は、口腔上皮から歯槽堤結合組織内に斜めに伸びる



- Fig. 1. Sagittal section of molar area of a 3 day-old rat, stained with hematoxylin and eosin. No disruption is seen the oblique part of dental lamina (ODL). It is seen that enamel organs of tooth germs widely contact with the horizontal part of dental lamina at their apical portions. We tentatively call this area as "transitional zone". Epithelium of horizontal part of dental lamina between the first (M1) and second (M2) molar (arrow) is continuous.
 B : bone, ETZ : epithelium of the transitional zone, OE : oral epithelium;
 Bar : 500 μ m
- Fig. 2. An enlargement of the transitional zone of the first molar of a 3 day-old rat (hematoxylin and eosin staining). Note that the epithelium of the transitional zone (ETZ) is consist of multi-layered cuboidal cells.
 OE : oral epithelium, SR : stellate reticulum; Bar : 50 μ m
- Fig. 3. Immunohistochemistry for oblique part of dental lamina of 5 day-old rat first molar using anti-cytokeratin 14 (CK14) antibody. Note that cell clusters with irregular outline (arrows) and epithelial pearl-like structures (arrowhead) exhibit negative affinity to anti-CK14.
 OE : oral epithelium, ODL : oblique part of dental lamina; Bar : 50 μ m
- Fig. 4. Immunohistochemical localization of CK14-like immunoreaction in the cusp region of 5 day-old rat first molar and covering oral epithelium. Note the irregular and discontinuous epithelium of transitional zone (arrow). Blood vessels entered from the holes of the transitional zone can be seen in the stellate reticulum of the tooth germ (arrowhead).
 D : dentin, E : enamel, ETZ : epithelium of the transitional zone, OE : oral epithelium, asterisk : enamel free area; Bar : 100 μ m
- Fig. 5. Hematoxylin and eosin staining image of the molar tooth area of a 7 day-old rat. Epithelium of horizontal part of dental lamina between the first (M1) and second (M2) molars (arrow) is still continuous.
 B : bone, D : dentin, ETZ : epithelium of the transitional zone, OE : oral epithelium; Bar : 500 μ m

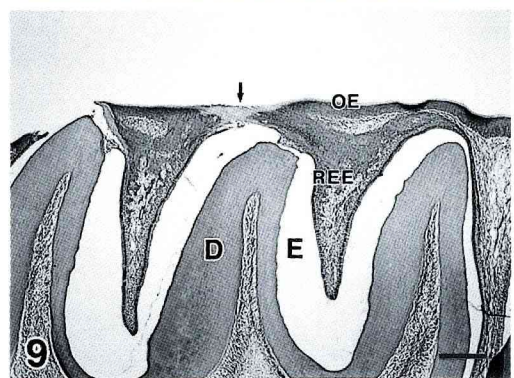
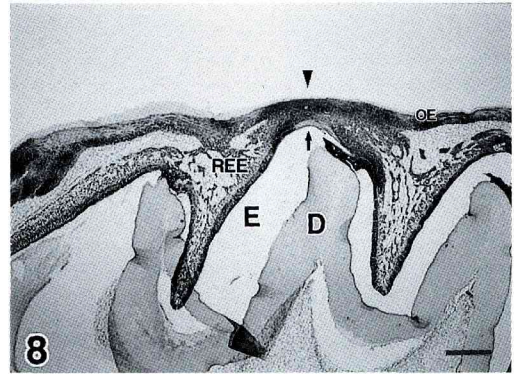
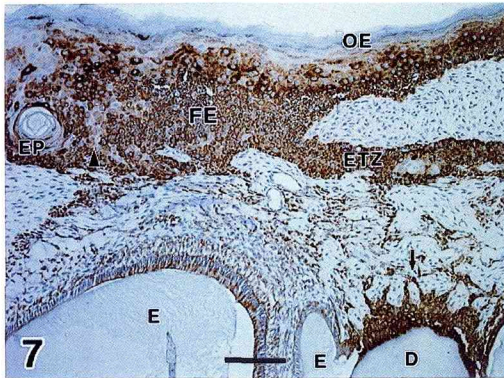
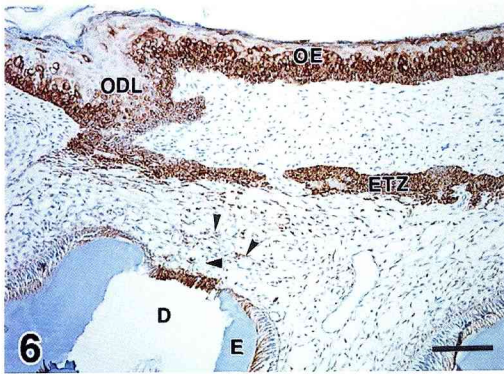


Fig. 6. Immunohistochemical localization of CK14-like immunoreactions in the eruption zone at 7 day-old rat first molar. Basal layer and prickle cell layers of oral epithelium, whole layers of oblique and horizontal parts of dental lamina, and inner enamel epithelium and stratum intermedium of enamel free area show positive reactions of anti-CK14. Note that some cells in free and groups (arrowheads) also show positive reaction to anti-CK14 in the stellate reticulum. D : dentin, E : enamel, ETZ : epithelium of the transitional zone, ODL : oblique part of dental lamina, OE : oral epithelium; Bar : 100 μ m

Fig. 7. Immunohistochemical localization of CK14-like immunoreactions in the eruption zone of the 11 day-old rat first molar. Oblique part of dental lamina has been regressed and oral epithelium and the boundary region of oblique and horizontal parts of dental lamina fuse each other. The fusion epithelium (FE) contains cell clusters (arrowhead) and epithelial pearls (EP) immuno-negative to anti-CK14. Note that a reticular formation of CK14-positive cells in stellate reticulum is continuous with epithelia of the transitional zone (ETZ) and enamel free area (arrow). D : dentin, E : enamel, EP : epithelial pearl, FE : fusion epithelium, OE : oral epithelium; Bar : 100 μ m

Fig. 8. Immunohistochemistry for eruption zone of 15 day-old rat first molar using anti-CK14. Complete fusion between oral epithelium and reduced enamel epithelium covering the central cusp can be seen. Note that not only external surface (arrowhead) but also internal surface (arrow) of the fusion epithelium exhibit keratinization. D : dentin, E : enamel, OE : oral epithelium, REE : reduced enamel epithelium; Bar : 250 μ m

Fig. 9. Eruption area of the 17 day-old rat first molar stained with hematoxylin and eosin. The tip of mesial cusp has already emerged to oral cavity. The fusion epithelium over the central cusp shows complete keratinization (arrow). In the pit region, reticular formation of reduced enamel epithelium can be seen (REE). D : dentin, E : enamel, OE : oral epithelium; Bar : 250 μ m

部分とその遠位部から口腔上皮に対してほぼ水平に広がる部分から成っていた。本論文ではこれらの部位を区別するために口腔上皮から斜めに伸びる部分を歯堤斜走部、水平に広がる部分

を歯堤水平部として記載する。

H-E 染色による連続切片の観察の結果、生後 0 日目では上顎臼歯は鐘状期晩期の状態であり、第一臼歯では象牙質の形成は既に始まって

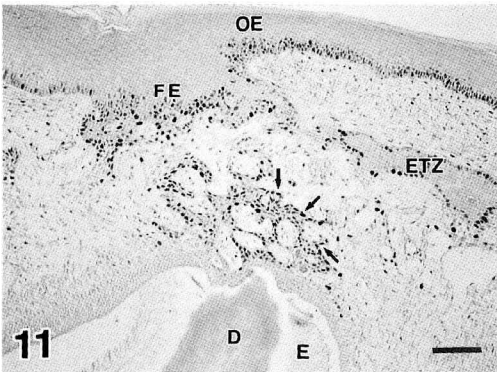
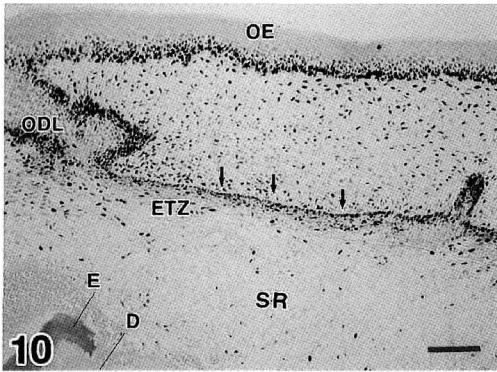


Fig. 10. Immunohistochemical localization of PCNA-immunoreactive cells in the eruption area of 5 day-old rat first molar. A number of PCNA-immunoreactive cells are distributed in the basal layer of oral epithelium (OE) and in the outer layer of oblique part of dental lamina (ODL). Many positive cells are also seen in epithelium of the transitional zone (ETZ), especially in its oral side (arrows).

D : dentin, E : enamel, SR : stellate reticulum; Bar : 100 μ m

Fig. 11. Immunohistochemical localization of PCNA-immunoreactive cells in the eruption area of 11 day-old rat first molar. Many PCNA-immunoreactive cells are seen in the reticular formation of reduced enamel epithelium (arrows) at the cusp region. Note that the PCNA-immunoreactive cells exclusively exist on the external layer of epithelial cords. Abundant PCNA-immunoreactive cells are also distributed in the conjunctive area of the reduced enamel epithelium and the fusion epithelium (FE).

D : dentin, E : enamel, ETZ : epithelium of the transitional zone, OE : oral epithelium; Bar : 100 μ m

いたが、エナメル質はまだ形成されていなかった。歯堤斜走部の断裂は認められず、歯堤水平部は歯胚の頂部で幅広くエナメル器と結合していた。CK14に対する陽性反応は、生後0日目では歯胚を覆う口腔上皮の基底層と有棘層、および歯堤上皮の全体とエナメル器全体に認められた。

生後3日目になると歯堤斜走部は幾分短くなった様に見えたが、断裂は認められなかった (Fig. 1)。歯胚エナメル器は頂部ではかなり幅広く歯堤水平部と結合しており、この結合部上皮は数層の立方状細胞から成り、扁平な単層上

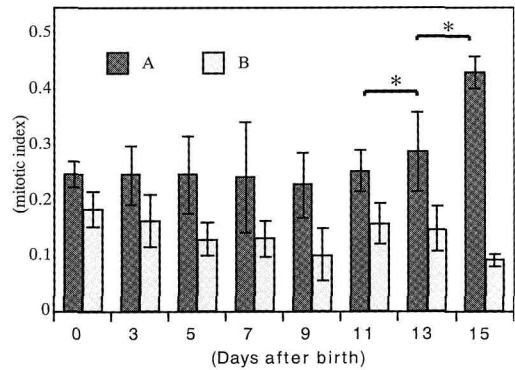


Fig. 12. Comparison of percentage of positive cells between epithelia of transitional zone and outer enamel epithelium (mean \pm SD). Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$).

A : epithelia of transitional zone, B : outer enamel epithelium

皮様構造を呈する外エナメル上皮とは明らかに異なっていた (Fig. 2)。そのため本論文ではこのエナメル器に結合する歯堤水平部上皮を特に「歯堤-歯胚結合部」と呼び、外エナメル上皮と区別することとした。この時期、隣接する歯胚の歯堤-歯胚結合部の間にある歯堤水平部にも断裂は認められなかった (Fig. 1矢印)。また、口腔上皮におけるCK14の発現パターンは生後0日目と同様であったが、内エナメル上皮と星状網の細胞の反応には減弱がみられた。

生後5日目では、咬頭部には僅かなエナメル質の層が形成されていた。生後3日目と比較

し、歯胚を覆う口腔上皮には大きな変化は認められなかったが、歯堤斜走部の短縮がみられた。免疫染色では口腔上皮と歯堤上皮に陽性反応が認められたが、歯堤上皮の中間層に抗-CK14陰性の細胞群が散在し (Fig. 3 矢印)、上皮真珠様の抗-CK14陰性を示す球状構造が見られた (Fig. 3 矢頭)。歯堤-歯胚結合部では、その厚さが不規則となり、一部で上皮が断裂し (Fig. 4 矢印)、この断裂部位から結合組織が血管と共に歯胚の星状網に侵入するのが認められた (Fig. 4 矢頭)。この時期、咬頭頂の enamel free area の内エナメル上皮と中間層の細胞はエナメル芽細胞に比較して強い抗-CK14陽性反応を示した (Fig. 4 星印)。

生後7日目においても前後の臼歯歯胚間には歯堤水平部上皮が断裂せずに残存しているのが観察された (Fig. 5 矢印)。歯堤斜走部はさらに短縮し、口腔上皮と歯胚の距離は一段と近接していた (Fig. 6)。エナメル器の星状網には結合組織や血管に混じって抗-CK14抗体に強陽性を示す細胞塊が散見された (Fig. 6)。このCK14陽性細胞群は主に歯堤-歯胚結合部上皮付近に分布していたが、一部は咬頭頂の enamel free area のエナメル上皮付近に集中する傾向がみられた (Fig. 6 矢頭)。

生後11日目までには歯冠はほぼ完成時の大きさにまで発育していたが、歯根形成は開始されていなかった。歯堤斜走部はさらに短縮され、歯堤-歯胚結合部の一部と口腔上皮が幅広く結合するようになった (Fig. 7)。以後、このような口腔上皮と歯原性上皮の癒合した上皮を癒合上皮 (fusion epithelium) と呼ぶこととする。癒合上皮は表層の角質層を除いてほとんど全層がCK14を発現していた。生後5日目から歯堤上皮内に観察されるようになった上皮真珠は、主として癒合上皮内に観察されるようになり、その大きさが増し、明瞭な同心円状の構造を示すものがみられるようになった (Fig. 7, EP)。また、癒合上皮内には多数の抗-CK14陰性細胞がCK14陽性細胞の間に不規則な大小の島状をなして分布するのが認められた (Fig. 7 矢頭)。

エナメル器星状網内にはCK14陽性細胞が増加し、それらは不規則な上皮網構造を呈して、歯堤-歯胚結合部上皮と enamel free area の抗-CK14陽性細胞群とが連絡しているように見られた。したがって、以後、この上皮網と歯堤-歯胚結合部上皮および enamel free area のエナメル上皮を合わせて縮合エナメル上皮と呼ぶこととする (Fig. 7 矢印)。

生後15日目までにエナメル質の形成は完了し、歯根の形成が開始されていた。咬頭部では、縮合エナメル上皮がさらに網状に発達し、一部の咬頭では縮合エナメル上皮と癒合上皮が幅広く一体化する様子が認められた (Fig. 8 矢頭)。このような上皮の癒合は各咬頭にはほぼ一致して形成されていた。癒合上皮では、内部の上皮真珠、上皮表層の角化層に加え、エナメル質に接する内面の上皮にも角化が生じているのが認められた (Fig. 8 矢印)。これらの上皮真珠の中には口腔上皮の表層で角質層と癒合しているものも認められた。

生後17日目になると第一臼歯咬頭の一部は口腔内に露出しており、連続切片の観察から未萌出の咬頭部の癒合上皮では萌出路に当たる部分の上皮が全層にわたって角化しているのが認められた (Fig. 9 矢印)。咬頭間の縮合エナメル上皮には依然として網状構造が残存しており、内エナメル上皮は単層円柱上皮様構造を維持していた (Fig. 9, REE)。

2) 細胞増殖 (細胞分裂活性)

細胞分裂マーカーとして用いた抗-PCNA抗体に対する陽性細胞は、口腔上皮では生後0日目には基底層から有棘層にかけて多数分布しており、細胞層が増加する生後7日目まで陽性細胞の分布傾向に変化は見られなかった。しかし、生後9日目以降、陽性細胞数は減少し、その分布は次第に基底層に限られるようになった。

歯堤では生後0日目から5日目まで歯堤斜走部に多数のPCNA陽性細胞が認められた。この陽性細胞は歯堤上皮索の内層より外層 (基底

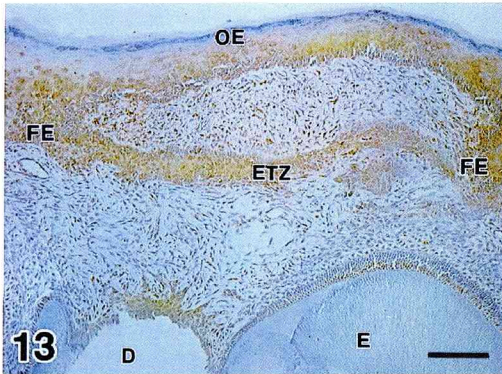


Fig. 13. Immunohistochemical localization of EGFR-like reactions in eruption area of 11 day-old rat first molar. Weak EGFR-like immunoreaction are localized on the oral epithelium (OE), fusion epithelium (FE) and epithelium of the transitional zone (ETZ). D : dentin, E : enamel; Bar : 100 μ m

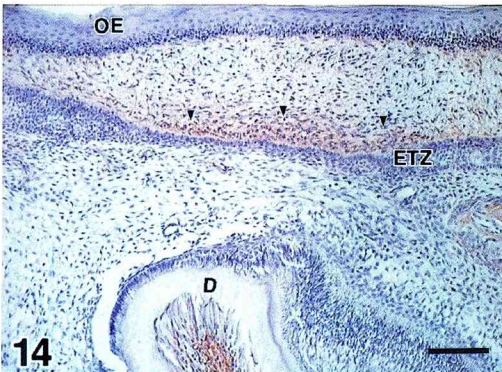


Fig. 14. Localization of NGFR-like immunoreaction in eruption area of the 3 day-old rat first molar. A weakly positive NGFR-immunoreaction is seen on the connective tissue adjacent to epithelium of the transitional zone (arrowheads). D : dentin, ETZ : epithelium of the transitional zone, OE : oral epithelium; Bar : 100 μ m

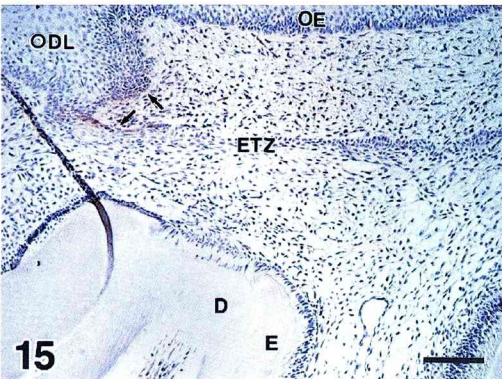


Fig. 15. Localization of NGFR-like immunoreaction in eruption area of the 7 day-old rat first molar. Positive NGFR-immunoreactions are seen on the outer layers of epithelia of the oblique part of dental lamina (arrows) and proximal region of the transitional zone (arrows). D : dentin, E : enamel, ETZ : epithelium of the transitional zone, ODL : oblique part of dental lamina, OE : oral epithelium; Bar : 100 μ m

層)に多く分布する傾向がみられた (Fig. 10)。歯堤-歯胚結合部の上皮では生後0日目からすでに多数のPCNA陽性細胞が観察され、陽性細胞は上皮の星状網に面する層よりも口腔上皮に面する層に多く分布していた (Fig. 10矢印)。隣接歯胚間に存在する歯堤水平部でも、少なくとも生後11日目までは歯堤-歯胚結合部と同等のPCNA陽性細胞が観察された。これに対し、外エナメル上皮には、陽性細胞はごく少数であった。

生後11日目には歯胚咬頭部に形成された縮合エナメル上皮網に多数のPCNA陽性細胞が観察された (Fig. 11矢印)。縮合エナメル上皮網と癒合上皮の移行部にも多数の陽性細胞が認められた。縮合エナメル上皮網では陽性細胞は結合組織に面する上皮外層に多く分布していた (Fig. 11)。

歯堤-歯胚結合部上皮と外エナメル上皮の細胞分裂活性指数の変化を分析した結果、歯堤-エナメル器結合部上皮では外エナメル上皮部分

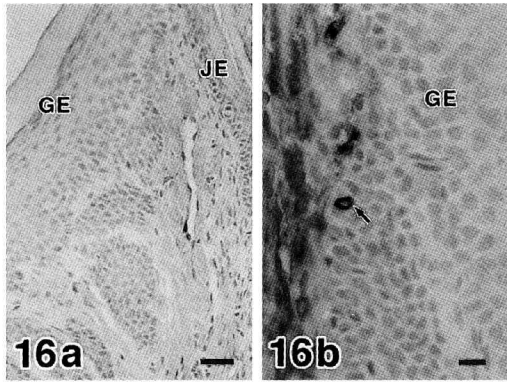


Fig. 16. Immunohistochemical localization of CK 18-immunoreactive cells in the maxillary gingiva of an adult rat. Molar gingival epithelium contains no CK 18-immunoreactive cell (a), whereas incisor gingival epithelium contains a few numbers of CK18-immunoreactive cells (b, arrow).
GE : gingival epithelium, JE : junctional epithelium;
a Bar : 50 μ m, b Bar : 20 μ m

に比較して全ての日齢で細胞分裂活性が高く、特に生後13, 15日目には、それ以前に比較して有意に高い活性を示した。これに対し、外エナメル上皮域では、日齢による大きな細胞分裂活性の変動はみられなかった (Fig. 12)。

3) アポトーシス

TUNEL 陽性反応は、萌出開始前のどの時期の歯堤においても、また萌出に先立って形成された縮合エナメル上皮と口腔上皮の癒合した上皮においてもほとんど検出されなかった (図示しない)。しかし、enamel free area の内エナメル上皮細胞と顎骨表面の破骨細胞には TUNEL 陽性反応が観察された (図示しない)。また nuclease によって前処理したコントロール切片では、ほぼ全ての細胞に TUNEL 陽性反応が認められた (図示しない)。

4) EGFR および NGFR 様反応の局在変化

抗-EGFR に対する陽性反応は、口腔上皮では生後 0 日目には弱い反応が基底層と有棘層に局限して観察され、3 日目になると反応が強

なった (図示しない)。同時期の歯堤では斜走部と水平部の上皮全体に EGFR 様反応が認められた。その後、歯堤斜走部は一段と短縮し生後 11 日目までには消失したが、この間、短縮された歯堤斜走部上皮、歯堤水平部上皮ともに EGFR の発現の継続が認められた (Fig. 13)。エナメル器でも生後 0 日目に内エナメル上皮に EGFR 様反応の発現が認められ、エナメル芽細胞に分化した後も発現は続いたが、生後 9 日目から反応は減弱傾向を示した。生後 13 日目になると咬頭部の網目状に増殖した縮合エナメル上皮様構造の全体に反応が出現したが、口腔上皮との癒合が進むにつれその発現は徐々に消失した。

抗-NGFR に対する陽性反応は、生後 0 日目には歯小嚢に強く発現していたが、同時期の歯堤やエナメル上皮、口腔上皮には全く陽性反応は認められなかった (図示しない)。生後 3 日目には、歯小嚢の反応は認められなくなったが、歯堤-歯胚結合部上皮に近接する結合組織には弱い反応が認められた (Fig. 14 矢頭)。生後 7 日目には咬頭頂付近の歯堤斜走部上皮の外表層、およびその近位の歯堤-歯胚結合部上皮の外表層に近接する結合組織に陽性反応が局在したが、遠位部には反応はみられなかった (Fig. 15 矢印)。

これに対し、網状を呈する縮合エナメル上皮やその近傍の結合組織には NGFR 陽性反応は全く認められなかった (図示しない)。一方、歯胚を覆う口腔粘膜では生後 9 日目から上皮直下の結合組織層に陽性反応が観察され始めた。この反応は生後 11 日目には減弱し、13 日目には消失した。これに代わり、上皮基底層に反応が新たに認められるようになった (図示しない)。この反応は、咬頭が萌出し、歯肉が形成された後も歯肉口腔上皮基底層に持続的に認められた。

5) メルケル細胞の出現と分布

観察したいずれの生後日数においても臼歯部歯肉予定域の口腔上皮、歯堤、および臼歯萌出後の歯肉には CK18 陽性細胞を認めることは出

来なかった。対比のために同時に染色した成獣ラット上顎においては、切歯部歯肉上皮の基底層に少数のCK18陽性細胞が観察されたが、やはり臼歯部歯肉には全く陽性細胞を認めることはできなかった (Fig. 16a, b)。

考 察

本研究において著者はラット上顎臼歯の鐘状期晩期から萌出までの期間における臼歯部歯槽堤口腔上皮、歯堤、エナメル上皮の形態、性状の変化について免疫組織化学的方法で検討した。

CK14は、一般に上皮の基底層マーカーとして知られているが³⁰⁾、Tabataらは、このタンパク質がエナメル器由来の細胞にも発現することを報告し、エナメル上皮のマーカーとしても有用であることを示した³¹⁾。そこで今回、歯胚上皮と口腔上皮の局所的な関係をH-E染色と抗-CK14を用いた免疫組織化学により検討した。その結果、ラットでは歯堤が断裂することなく、歯堤斜走部が短縮、消失して縮合エナメル上皮と口腔上皮が癒合することが明らかになった。一方、歯堤水平部は広い範囲でエナメル器と接合しており、この部位の上皮は高い細胞分裂活性を口腔上皮との癒合時まで維持すること、またエナメル上皮の全体がいわゆる縮合エナメル上皮を形成するのではなく、咬頭部の一部のみが網状の上皮となって歯堤-歯胚結合部上皮と連絡し、縮合エナメル上皮となることが判明した。ラット臼歯の歯堤に断裂が生じないことは既に見明ら¹²⁾により報告されているが、歯堤斜走部が歯の萌出に先立って著しく短縮し、消失することは今回新たに判明した点である。

ヒトや多くの動物の歯の発生では、その経過中に歯堤が断裂し歯胚は口腔上皮から切り離される。この歯堤の断裂の際にアポトーシスが関与するかどうかに興味を持たれている。Khajornbutら¹⁵⁾は、透過型電子顕微鏡による観察から萌出間際のラットの歯堤上皮に細胞死が認められたと報告している。歯堤が断裂しな

いラットにアポトーシスが起るとすれば、それは歯堤の長さの減少に関与している可能性が考えられる。しかしながら、本研究では歯堤上皮の短縮期間中にも、また縮合エナメル上皮と口腔上皮の癒合部にもTUNEL陽性細胞はほとんど観察されなかった。逆に本研究では短縮中の歯堤にも高い細胞分裂活性が認められ、その一方で歯堤上皮には上皮真珠が頻繁に出現し、中には萌出路近傍の口腔上皮の角化層と癒合するものも認められた。したがって、歯堤の短縮が上皮真珠による細胞角化と上皮真珠の排除によってなされている可能性も考えられる。

見明ら¹²⁾は萌出路の形成には上皮真珠の形成による角化が関与することを示唆している。しかしながら、本研究では上皮真珠は主に歯堤の中に観察され、癒合上皮内にも散見されるが、上皮真珠が漸次癒合して萌出路を形成することを支持する積極的な所見は観察されなかった。むしろ萌出路では癒合上皮の表層と深層から角質化が進行し、最終的に中間層からも角化細胞が星状網内に侵入して上皮全体が角化するという可能性が強く示唆された。

歯堤における上皮真珠の形成や癒合上皮の角化に先立ち、上皮内にはCK14陰性細胞が出現した。見明ら¹²⁾は上皮真珠の形成に先立って明調細胞が出現し、この細胞が萌出路の形成に関与することを示唆しているが、今回観察されたCK14陰性細胞と見明らが報告した明調細胞は、その分布の特徴から同一のものである可能性が高く、CK14陰性化は細胞の角化と密接な関係があることを示唆している。

今回、TUNEL陽性細胞は歯堤ばかりではなく縮合エナメル上皮と口腔上皮の癒合部にも、ごく稀にしか観察されなかった。歯槽骨に付着した破骨細胞や歯胚周囲の間葉細胞中には多数のTUNEL陽性反応が観察されたことや、nucleaseを作用させたコントロールにおいては縮合エナメル上皮や癒合上皮にも明敏な陽性反応が得られたことから、歯堤や縮合エナメル上皮、口腔上皮の癒合部に、ごく稀にしか観察されなかったのは手技の問題ではなく、上記の

上皮には TUNEL 陽性細胞がもともと少ないことを示していると思われる。Shibata ら³²⁾や Kaneko ら³³⁾も同様の所見を報告している。

ラット^{6,7)}やサル⁴⁾を用いたオートラジオグラフィによる研究では、萌出期にはエナメル器外層の細胞の分裂活性が上昇することが知られており、萌出にあたって、縮合エナメル上皮の増殖が上皮癒合の原動力となることが示唆されている。今回の抗-PCNA 陽性反応をマーカーとして調べた結果でも、咬頭頂に形成された網状の縮合エナメル上皮の細胞分裂活性が高いことが示された。これは、従来の結果を支持するものである。

本研究では縮合エナメル上皮にみられる、上記の細胞分裂活性の上昇を促す因子を特定するため、EGFR、NGFR の局在について検索した。EGFR 免疫陽性反応は、歯堤とエナメル上皮に発現していたが、エナメル上皮では生後 9 日目頃から発現が減弱した。Wise ら³⁴⁾は、萌出前の生後 12 日目までのラット下顎臼歯における EGF とその受容体の局在について報告し、EGF と EGFR は生後 9 日目頃までは歯胚、歯槽骨および骨芽細胞に発現しているが生後 10 日目には消失するとしており、本研究の結果と一致している。しかし、本研究では生後 13 日目頃から縮合エナメル上皮にこの EGFR に対する免疫反応の発現が観察された。EGFR が口腔上皮との癒合に先立って歯原性上皮に再発現したことは、EGF が細胞分裂活性の上昇による縮合エナメル上皮の増殖に関与している可能性を示すものと思われる。

一方、NGFR は、歯胚発生の初期にはエナメル器にも発現するが、鐘状期では歯小囊、歯乳頭の未分化間葉細胞や象牙芽細胞に発現するとされている³⁵⁻³⁸⁾。本研究でも生後 0 日目には歯小囊における NGFR の発現が観察されたが、エナメル上皮には終始発現が認められなかった。したがって、縮合エナメル上皮の形成や歯の萌出路形成には NGF は直接的には関与しないものと推測される。これに対し、歯肉予定域の口腔粘膜では、生後 11 日目までは NGFR は

上皮直下の結合組織に発現していたが、生後 13 日目になると上皮基底層に発現するようになり、萌出後も歯肉上皮の基底層に局限して発現していた。NGFR は、末梢神経の誘導にも関与することが知られており、萌出前の歯小囊における NGFR の存在は歯根膜への神経誘導と関連する可能性が高い。一方、口腔上皮における NGFR は、支配神経の維持、あるいはケラチノサイトの分化や維持に関与する可能性も考えられる。

Tachibana²⁹⁾ は口腔粘膜のメルケル細胞には多形性があり、一部の細胞は神経支配を受けていないにもかかわらず分泌能を有することを報告した。従来から胎生期の皮膚において同様のメルケル細胞が上皮性構造物の形態形成やケラチノサイトの分化に関与することが示唆されてきた²⁹⁾。そこで歯の萌出路形成へのメルケル細胞の関与を検討した結果、臼歯萌出前の歯肉予定域口腔上皮および、萌出後の歯肉においてもメルケル細胞はまったく検出されなかった。対照とした成獣ラットの顎切歯歯肉と臼歯部歯肉については、メルケル細胞は切歯部歯肉にのみ観察された。ラットの口蓋粘膜には生後 4 日目頃からメルケル細胞が出現し、生後 1 ヶ月までの間にその数が激増することが報告されている^{38,40)}。したがって、今回の観察の結果は、ラットの臼歯部歯肉にはメルケル細胞が欠如している可能性を示すものであり、少なくともこの細胞が臼歯の萌出路の上皮増殖や細胞変化に関与する可能性は無いと考えられる。歯肉に多数のメルケル細胞が分布することはヒト^{22,23)}、サル²⁴⁾、スunks²⁵⁾などで報告されており、ラットについては Nikai ら²²⁾が報告している。しかし、彼らは歯肉の部位を明らかにしてはいない。本研究によりラット臼歯部歯肉にメルケル細胞が欠如するという新発見が得られた。

従来から、歯の発生や萌出に関する研究には主にラットが用いられてきた。今回の研究においてもラットを用いたが、歯堤の断裂が生じないラットの場合と、断裂が生じるヒトの場合とは歯の萌出路形成過程に若干の相違がある可

能性は否定出来ない。特にラットでは歯堤-歯胚結合部上皮が幅広く歯胚の頂部を覆っており、細胞分裂活性の上昇もこの部位において特に高いことから、ヒトの歯の萌出の場合とは異なり、歯堤上皮の果たす役割が大きいように思われる。今後の萌出の研究には齧歯類以外の動物を使用する必要性があるものと思われる。

結 論

1. ラットの歯の発生においては歯堤に断裂は起こらず、歯堤は短縮し、歯堤-エナメル器結合部の上皮および咬頭部 enamel free area の中間層細胞が網状に増殖して形成された縮合エナメル上皮とともに口腔上皮と癒合して萌出路上皮となることが明らかとなった。
2. 萌出路に当たる上皮にはアポトーシス像は少なく、上皮中央部の細胞が角質化して萌出路を形成することが明らかとなった。
3. 増殖中の縮合エナメル上皮にはEGFRの発現が認められ、EGFが縮合エナメル上皮増殖に関与している可能性が示された。NGFRの発現は認められなかった。
4. 萌出前の臼歯部口腔上皮や歯堤にはメルケル細胞は存在せず、この細胞が萌出路上皮増殖に関与する可能性は低いと考えられた。

謝辞：稿を終えるにあたり、ご懇篤なる指導、校閲を賜った岩手医科大学口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授ならびに立花民子助教授に深甚なる謝意を表します。また、同口腔解剖学第二講座石関清人講師に謹んで感謝の意を表します。さらに、本研究に際し数々のご教示、ご助言を戴いた同口腔解剖学第二講座藤原尚樹助手に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は平成12年度大学院重点特別経費によって行われた。

本論文の要旨は、第42回歯科基礎医学会学術大会、総会（2000年10月1日、大阪）において発表した。

参 考 文 献

- 1) Cahill, D. R., and Marks, S. C., Jr. : Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J. Oral Pathol.* 9 : 189-200, 1980.
- 2) Kristerson, L., and Andreasen, O. : Autotransplantation and replantation of tooth germs in monkeys. *Int. J. Oral Surg.* 13 : 324-333, 1984.
- 3) Marks, S. C., and Cahill, D. R. : Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Arch. Oral Biol.* 29 : 311-322, 1984.
- 4) Mchugh, W. D., and Zander, H. A. : Cell division in the periodontium of developing and erupted teeth. *Dent. Pract.* 15 : 451-457, 1965.
- 5) Diab, M. A., Stsllard, R. E., Zander, H. A., and Rochester, N. Y. : The life cycle of the epithelial element of the developing molar. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 22 : 241-251, 1966.
- 6) Formicola, A. J., and Ferrigno, P. D. : A radiographic study of the developing periodontium of the rat. *Periodontol.* 4 : 297-301, 1966.
- 7) Glavind, L., and Zander, H. A. : Dynamics of dental epithelium during tooth eruption. *J. Dent. Res.* 49 : 549-555, 1970.
- 8) Mchugh, W. D. : The development of the gingival epithelium in the monkey. *Dent. Pract.* 11 : 314-324, 1961.
- 9) Listgarten, M. A. : Phase-contrast and electron microscopic study of the junctional between reduced enamel epithelium and enamel in unerupted human teeth. *Arch. Oral Biol.* 11 : 999-1016, 1966.
- 10) Provenza, D. V., and Sisca, R. F. : Fine structure of monkey (*Macaca mulatta*) reduced enamel epithelium. *J. periodontol.* 41 : 313-319, 1970.
- 11) Ten Cate, A. R. : Physiological resorption of connective tissue associated with tooth eruption. *J. Periodont. Res.* 6 : 168-181, 1971.
- 12) 見明 清, 森口美津子, 上松博子, 山田雅子, 平山明彦 : 歯周組織の形成過程に関する研究 (第2報) 歯牙萌出と口腔粘膜および上皮真珠との関係について, 三越厚生事業団研究年報, 14 : 113-133, 1978.
- 13) 西川眞二 : ラット臼歯の萌出にともなう歯堤の歯槽堤粘膜上皮の変化に関する研究, 大阪大歯誌, 33 : 104-128, 1988.
- 14) 浜田義信 : ラット臼歯部付着上皮の発生に関する研究, 歯科学報, 88 : 633-662, 1988.
- 15) Khaejornbut, J., Wilson, D. J., and Owens, P. D. A. : The development and fate of dental lamina of the mandibular first molar tooth in the rat. *J. Anat.* 179 : 85-96, 1991.

- 16) Fukuyama, R., and Shimizu, N. : Expression of epidermal growth factor (EGF) and the EGF receptor in human tissue. *J. Exp. Zool.* 258 : 336-343, 1991.
- 17) Cohen, S. : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 237 : 1555-1562, 1962.
- 18) Topham, R. T., Chiego, D. J., Jr., Gattone, V. H., Hinton, D. A., and Klein, R. M. : The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Dev. Biol.* 124 : 532-543, 1987.
- 19) Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P.C., Cancedda, R., and De Luca, M. : Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J. Biol. Chem.* 268 : 22838-22846, 1993.
- 20) Pincelli, C., Sevigiani, C., Manfredini, R., Grande, A., Fantini, F., Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., Ferrari, S., Cossarizza, A., and Giannetti, A. : Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 103 : 13-18, 1994.
- 21) Pincelli, C. : Nerve growth factor and keratinocyte : a role in psoriasis. *Eur. J. Dermatol.* 10 : 85-90, 2000.
- 22) Nikai, H., Rose, G. G., and Cattoni, M. : Merkel cell in human and rat gingiva. *Arch. Oral Biol.* 16 : 835-843, 1971.
- 23) Hashimoto, K. : Finestructure of Merkel cell in human oral mucosa. *J. Invest. Dermatol.* 58 : 381-387, 1972.
- 24) Turner, D. F. : The morphology and distribution of Merkel cells in primate gingival mucosa. *Anat. Rec.* 205 : 197-205, 1983.
- 25) Yamamoto, T., and Sakada, S. : Sensory innervation of gingival and alveolar mucosa of the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Tohoku J. Exp. Med.* 150 : 327-336, 1986.
- 26) Ramieri, G., Panzica, G. C., Viglietti-panzica, C., Modica, R., Springall, D. R., and Polak, J. M. : Non-innervated Merkel cells and Merkel-neurite complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. *Arch. Oral Biol.* 37 : 263-269, 1992.
- 27) Hilliges, M., Astbäck, J., Wang, L., Arvidson, K., and Johansson, O. : Protein gene product 9.5-immunoreactive nerves and cells in human oral mucosa. *Anat. Rec.* 245 : 621-632, 1996.
- 28) Tachibana, T., Yamamoto, H., Takahashi, N., Kamegai, T., Shibana, S., Iseki, H., Nawa, T. : Polymorphism of merkel cells in the rodent palatine mucosa : Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Arch. Histol. Cytol.* 60 : 379-389, 1997.
- 29) Tachibana, T. : The Merkel cell : Recent findings and unresolved problems. *Arch. Histol. Cytol.* 58 : 379-396, 1995.
- 30) Purkis, P. E., Steel, J. B., Mackenzie, I. C., Nathrath, W. B. J., Leigh, I. M., and Lane, E. B. : Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J. Cell Sci.* 97 : 39-50, 1990.
- 31) Tabata, J. M., Matsumura, T., Liu, J., Wakisaka, S., and Kurisu, K. : Expression of cytokeratin 14 in ameloblast-lineage cells of the developing tooth of rat, both *in vivo* and *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* 41 : 1019-1027, 1996.
- 32) Shibata, S., Suzuki, S., Tengan, T., and Yamashita, Y. : A histochemical study of apoptosis in the reduced ameloblasts of erupting mouse molars. *Arch. Oral Biol.* 40 : 677-680, 1995.
- 33) Kaneko, H., Ogiuchi, H., and Shimono, M. : Cell death during tooth eruption in the rat : surrounding tissues of the crown. *Anat. Embryol.* 195 : 427-434, 1997.
- 34) Wise, G. E., Lin, F., and Fan, W. : Localization of epidermal growth factor and its receptor in mandibular molar of the rat prior to during prefunctional tooth eruption. *Dev. Dyn.* 195 : 121-126, 1992.
- 35) Luukko, K., Arumae, U., Karavanov, A., Moshnyakov, M., Sainio, K., Sariola, H., Saarama, M., and Thesleff, I. : Neurotrophin mRNA expression in the developing tooth suggests multiple roles in innervation and organogenesis. *Dev. Dyn.* 206 : 87-99, 1996.
- 36) Luuko, K., Moshnyakov, M., Sainio, K., Saarama, M., Sariola, H., and Thesleff, I. : Expression of neurotrophin receptor during rat tooth development is developmentally regulated, independent of innervation, and suggests functions in the regulation of morphogenesis and innervation. *Dev. Dyn.* 210 : 117-129, 1997.
- 37) Mitsiadis, T. A., Dicou, E., Joffre, A., and Magloire, H. : Immunohistochemical localization of nerve growth factor (NGF) and NGF receptor (NGFR) in the developing first molar tooth of the rat. *Differentiation* 49 : 47-61, 1992.
- 38) Byers, M. R., Schattelman, G. C., and Bothwell, M. : Multiple functions of NGF receptor in developing, aging and injured rat teeth are suggested by epithelial, mesenchymal and neural immunoreactivity. *Development* 109 : 461-471, 1990.
- 39) 高橋直樹 : ラット口蓋ヒダの形成過程における抗 cytokeratin 18陽性細胞の分布に関する免疫組織化学的研究, 歯基礎誌, 40 : 515-527, 1998.
- 40) Tachibana, T., Fujiwara, N., and Nawa, T. : Postnatal differentiation of Merkel cells in the

rat palatine mucosa, with special refernce to the timing of peripheral nerve development and the potency of cell mitosis. *Anat. Embryol.* 202 : 359-367, 2000.