

マウス臼歯歯胚における基底膜付随無周期性 細線維の形成とその性質について

石関 清人 坂倉 康則 立花 民子
名和 橙黄雄

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)

[受付: 1984年9月19日]

抄録: 胎生10日から生後2日のマウス歯胚の内エナメル上皮側基底膜に付随する無周期性細線維(細線維)の形成を光顕および電顕的に観察した。さらにその性質について酸性ムコ多糖類の検出と酵素消化法により組織化学的に検討を試みた。

胎生10日から14日目の歯堤では、すでに基底板の形成がみられるが、細線維とコラーゲン線維は見られない。胎生16日目になると基底板に付随する少数の細線維の形成が観察される。胎生18日目では、これらの細線維の他に、コラーゲン様細線維が出現し、20日目になると基底板の明帯を貫く多数の細線維の形成が観察された。生後1日目の象牙前質形成領域では、細線維が最も発達している。象牙質基質形成領域につれて細線維は前エナメル芽細胞の陥凹部に凝集し、歯冠部側では前エナメル芽細胞突起間に集合してみられた。生後2日のエナメル質形成領域の細線維は stippled material と混在する時期もあるが、針状結晶が出現してくると、まもなく不明瞭になる。

組織化学的に細線維はRR染色、PAM染色に陽性であった。しかし Neuraminidase あるいは Hyaluronidase 消化後のPAM染色では細線維は両者ともに陰性を示した。コラーゲン線維は Collagenase, Pepsin, Trypsin などの酵素では、いずれも消化されたが、細線維と基底板は不溶性であった。また、Neuraminidase と Hyaluronidase あるいはこの内のいずれかと上記の酵素との組み合わせ消化試験ではコラーゲン線維は溶失するが、細線維と基底板は不溶性であった。

以上の結果から細線維はシアル酸とヒアルロン酸を含み、その core-protein は Collagenase などに強い抵抗性を示し、基底板と類似の性質を有することが明らかとなった。

Key words: tooth germ, aperiodic microfibril, basal lamina, histochemistry, electron microscopy.

緒 言

電子顕微鏡が硬組織に応用されて以来、歯胚の内エナメル上皮側基底膜に付随する無周期性細線維(以下細線維と呼ぶ)の存在については多くの報告がみられる。これらの線維は研究者によって non-striated fibril¹⁾, microfilament²⁾, aperiodic fibril³⁾ あるいは filamentous

material⁴⁾ などと呼ばれているが、いずれも同一の細線維を示すものである。この細線維は odontogenesis の初期に形成されるが、細線維に関する報告はいずれも歯胚の発生段階における形態形成の中で断片的に取り扱つかわれていただけで、細線維の形成過程を経時的に観察した報告ははまだ見当たらない。

細線維の組織化学的性質については電顕的に

On the formation and its natures of the aperiodic microfibrils closely related to basal lamina of mouse molar tooth germ.

Kiyoto ISHIZEKI, Yasunori SAKAKURA, Tamiko TACHIBANA and Tokio NAWA.

(Department of Oral Anatomy II, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通 1-3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 9 : 148-161, 1984

Ruthenium red (RR) 染色法による若干の報告があり⁵⁻⁹⁾, これらの結果から酸性ムコ多糖類の存在が示唆されている。また Orams⁸⁾ はリンタングステン酸 (PTA) 染色で, Slavkin と Bringas²⁾, Meyer ら⁹⁾ はタンニン酸固定を施すと陽性反応を示すことから, 糖タンパクに富む性質の線維であることを指摘している。しかしながら, この細線維の本態と機能については未だ統一した見解が得られていない。

本研究ではマウス臼歯歯胚を用い, 細線維形成の経時的变化を電顕的に観察するとともに, 細線維の性質について電顕的酵素消化法, 多糖類検出法を用いて, 基底膜およびコラーゲン線維との関連性から検討を加えた。

材料および方法

1. 光顕および電顕的方法

胎生10日から生後2日目までのマウス (BALB/c) 下顎臼歯歯胚 (M1) を用いた。動物は断頭後直ちに下顎骨ごと摘出し, 4°C, 2.5% グルタルアルデヒド (pH 7.2) に浸漬した。その後, 実体顕微鏡下で歯胚を摘出し, 同じ固定液で1時間固定, さらに1% オスミウム酸で1時間後固定を行った。その際, 発生段階の若いマウスでは歯胚の摘出が困難なため, 下顎骨のままその後の操作を行った。また組織化学的検索には生後1日目の歯胚を用い, 一部の材料は4% パラホルムアルデヒド・2.5% グルタルアルデヒドで1時間半固定した。その後通常のごとく上昇アルコール系列で脱水し, QY-1を通してエポン812に包埋した。超薄切片は酢酸ウラニウムとクエン酸鉛による二重染色を施し, 電顕で観察した。

一方, 光顕用として1.0μmのエポン厚切り切片を作製し, トルイジンブルー染色を施し, 歯胚のステージ決定と電顕観察のための方向づけとして用いた。試料の一部は10%中性ホルマリンで5時間固定して水洗, 脱水後アクリトロンEに包埋し, Bielschowsky-Gomori法による鍍銀染色を施し細網線維との比較に供した。

2. 組織化学的方法

酸性ムコ多糖類の検出のために Periodic-acid-methenamin (PAM) 染色と Ruthenium red (RR) 染色法を用いた。PAM染色は金メッシュに貼付した電顕用超薄切片を1% 過ヨウ素酸で5分間酸化後, 中島ら¹⁰⁾の方法に従って60°Cで40分間反応させた。対照標本は過ヨウ素酸無処理の切片を同様に反応させた。

RR染色には市販の Ruthenium red (Merk社) にカコジル酸緩衝液 (pH 7.2) を少量加え, 乳鉢で十分に粉碎したものを用いた。さらにこのRRを3000回転で10分間遠沈し, その上清RR液を約1.0mMの割合で2.5% グルタルアルデヒドと1% オスミウム酸に加えた。

また, PTA染色は2.5% グルタルアルデヒドと1% オスミウム酸に phosphotungstic acid (PTA) を0.5—1.0%の濃度で加え, ブロック染色を行った。

電顕的酵素消化法として Neuraminidase (Arthrobacter ureafaciens 由来, 0.5mg/ml 0.1M酢酸緩衝液, pH 5.4) あるいは Hyaluronidase (Clostridium perfringens 由来, Type VII, 5 mg/ml 生食, pH 5.6~6.0ないし酢酸緩衝液, pH 5.0) で3~5時間前処理を施し, その後PAM染色を行った。さらに細線維の core-protein の検出のため, Pepsin, Trypsin と種々の Collagenase (Collagenase AMANO. Collagenase type I, II, III, IV) を用い, Neuraminidase と Hyaluronidase, あるいは両者のいずれかと, 上記の酵素との組み合せ消化試験を試みた。

結 果

1. 無周期性細線維の形成

図1 a—dは胎生10日から16日までの歯堤および歯胚の形成過程を経時的に示したものである。これらの内エナメル上皮直下にはいずれも明瞭な基板が認められるが, 細線維の形成は胎生14日までの歯胚では観察されなかった。

胎生16日目の歯胚では立方状ないし短円柱状の上皮細胞と不定形の間葉細胞がみられ, 両者の間には少数の細線維の形成が認められるよう

になる。またこの間隙には同定困難な、細かな線維状物質が散在して認められた (Fig. 2)。

胎生18日目では未だ内エナメル上皮の極性化は認められないが、大型で明調な核の他にミトコンドリア、リボゾームなどが細胞遠心端側にみられる。この時期になると基質形成域に基板に付随する細線維とコラーゲン様線維の増加がみられる。後者の線維の太さは約30 nmで、通常のコラーゲン線維より細いが、一部の線維にはバンド模様が認められた (Fig. 3)。

胎生20日目のエナメル器は中央部が陥凹し、咬頭の形成がみられてくる。(Fig. 4 a)。電顕的に咬頭部の内エナメル上皮は短円柱状を呈し、核小体を有する明調な核は遠心端ないし中央部に位置し、細胞の極性化が認められる。この時期には基板の明帯、あるいは内エナメル上皮遠心端の細胞膜より派生するかのように見える多数の針状細線維が基板を貫ぬいて歯乳頭側に突出している (Fig. 4)。この線維の長さは約0.3 μm で、時に長いものでは1.0 μm にも達することがあるが、細いコラーゲン線維とはバンドの有無と走行から明瞭に識別することができる。

生後1日の基質形成領域を電顕的に観察すると、内エナメル上皮は背丈を増し、ミトコンドリアと核が近位端に移動し、細胞の極性がより明瞭になってくる。同時に Golgi-ER 系の発達に伴い遠心端には膜に包まれた有芯小胞が多数みられる。基板に直立する細線維はほぼ1.0 μm まで伸長し、その数も著しく増加する (Fig. 5)。象牙前質は多数の太いコラーゲン線維によって占められ、細線維とコラーゲン線維が混在する部位には種々の大きさの基質小胞が散見される。

咬頭側に向うに従い、しだいに内エナメル上皮の極性化が明瞭になり、遠心端には不規則な細胞質の突起が出現してくる。このような状態になると基板に断裂が生じて基板は不明瞭になるが、その一部は細線維とともに細胞陥凹部に凝集する傾向がみられる (Fig. 6)。

象牙質の石灰化が進んだ咬頭部では通常細線

維は不明瞭であるが、エナメル芽細胞陥凹部分には未だ細線維が残存し、単独あるいは、stippled material, コラーゲン線維と混在してみられる (Fig. 7)。その後、エナメル芽細胞の分泌が進み、基質中に針状結晶が出現するようになると、この細線維は一層不明瞭になり確認できなくなった。

2. 組織化学的所見

生後1日目の歯胚のPAM染色では象牙前質のコラーゲン線維に最も強い陽性反応がみられた。この染色ではコラーゲン線維の太さに比例して強い銀粒子の沈着が認められ、詳細に観察するとRR染色と同様にコラーゲン線維の縞模様、特に暗調バンドに強い反応がみられた。基板もPAM染色によって好銀性を示すが、なかでも暗帯 (lamina densa) に強い染色性がみられた。細線維も同様に染色されるが、その染色性は暗帯にくらべて劣っていた (Fig. 8)。

一方、17日歯胚の一見無構造に見える上皮一問葉細胞接合部 (Fig. 2) はRR染色では網状に反応し、その網目上にRR陽性粒子の分布が確認された (Fig. 9)。象牙前質では、特にコラーゲン線維のバンド上にRR粒子が規則正しく付着するのがみられた (Fig. 10)。その他、RR染色では細線維と基板上にも弱い反応が認められ、コラーゲン線維中に介在する基質小胞にもRR粒子の付着がみられた。

Gomori法による鍍銀染色を施した光顕標本では基底膜付近に暗褐色を呈する強い反応がみられた。コラーゲン線維は灰色ないし淡褐色に染色されるが、基底膜に比べて多少染色性に乏しかった (Fig. 11)。

PTA染色ではコラーゲン線維が最も高電子密度に染まり、バンドの周期性がより明瞭に認められた。基板と細線維も陽性に染まるが、コラーゲン線維に比較して、その染色性は弱く、細線維にはバンド構造は認められなかった (Fig. 2)。

Hyaluronidase 消化後 PAM 染色を施した標本では、細線維と基板には反応が認められなかった。これに対し、コラーゲン線維上には、

銀粒子の反応産物が走行に一致して認められるが、PAM単染色に比較して、その染色性は減弱していた (Fig. 13)。

Neuraminidase で消化後 PAM 染色を行った標本では、基板とコラーゲン線維に弱い沈着反応がみられた。しかしながら細線維は Hyaluronidase と同様に染色されなかった (Fig. 14)。

一方、細線維の core-protein 検出のため、Neuraminidase, Hyaluronidase あるいはこれらの両者で処理後、種々の Collagenase で消化処理を施した結果では、コラーゲン線維は完全に消失したが、細線維と基板には変化は認められなかった (Fig. 15)。Pepsin あるいは Trypsin による消化実験でも同様の結果が示された。

考 察

今回の観察では、胎生10日目の歯胚の上皮一間葉細胞間にはすでに明瞭な基板の存在が認められるが、コラーゲン線維と細線維はみられなかった。電顕的には、この時期の基板は口腔上皮直下あるいは歯堤部外側部の基板と同様の構造を呈し、両者間に何ら構造的に差異は認められなかった。このような状態が14日目まで継続するので、この時期の内エナメル上皮と間葉細胞はいまだ細線維やコラーゲン線維を形成する能力を備えていないことを示唆している。

16日歯胚になると基板に付随する細線維の他に、細かな線維が上皮一間葉細胞間隙に認められる。後者の線維はこの段階では同定困難であるが、18日目になるとこれらの中にバンド構造を有する線維が認められてくることから、この細線維はおそらく形成中のコラーゲン線維であり、その後の象牙前質の主体を成す太いコラーゲン線維に移行するものと思われる。

胎生20日目になると、あたかも内エナメル上皮の細胞膜、あるいはその直下の基板明帯より派生するかのように見える細線維が観察された。この細線維の由来に関しては、現在のところ統一した見解はないが、今回の所見から判断

するかぎり、多数の細線維が基板明帯から派生してみられることから、無周期性細線維は内エナメル上皮直下の明帯内で合成され、針状の線維に成長して、暗帯を貫ぬき徐々に歯乳頭側に伸び出してくるものと考えられる。この細線維の形成には、この時期の内エナメル上皮と基底膜が深く関与している可能性が考えられる。

生後1日目の歯胚を観察すると象牙前質形成領域では細線維が著しく増加し、その長さもほぼ一定になる。象牙前質は網状に走行する多量のコラーゲン線維から成り、その一部は細線維と混在してみられる。この領域で特に注目される所見は、基質小胞が細線維とコラーゲン線維の混在する部位に多く出現することである。多くの研究者は象牙質の石灰化開始部位が象牙前質の先端で、前エナメル芽細胞直下付近であることを報告している^{11,12,17)}。この部位はわれわれの所見でみられた細線維とコラーゲン線維との混在する部分に相当している。このことから、細線維はコラーゲン線維とともに基質小胞を保持し、そこに最初の石灰化を起こさせるのに十分な微小環境を提供している可能性が考えられる。

Slavkin ら¹⁸⁾は細線維は上皮一間葉細胞相互の情報伝達の担い手として働らくと述べており、また Orams と Snibson¹⁹⁾は線維状物質は外套象牙質の基になると考えている。後藤⁷⁾は基底膜付着微細線維は最初に造られる象牙質のコラーゲン線維の方向づけと密接な関係をもつと述べている。最近、名和ら²⁰⁾は培養下での内エナメル上皮は無周期性細線維の存在下で急速に分化が促進されることを報告している。このように細線維の機能については間接的ではあるが、何れも基質形成と細胞分化に関与している可能性を示唆している。

今回の観察で細線維が確認できなくなるのは、生後2日目の歯胚のエナメル質形成領域であった。この時期になるとエナメル芽細胞遠心端の stippled material 内にエナメル質の針状結晶が出現し、場所によってはあたかも細線維が針状結晶に転化するのように見られる部位が

ある。細線維の消失について、山²¹⁾は微細線維がエナメル芽細胞によって coated vesicles として細胞質中に取り込まれ、消化されてしまうと報告している。本観察では、この細線維が消失するのか、あるいは基質中に組み込まれるのか、この点に関しては直接的な確証は得られなかった。しかしながら、少なくとも象牙質の石灰化開始期までは十分に認知できる構造物であり、またエナメル質形成期にはエナメル質の細胞外基質である stippled material と混在してみられることもあるので、最終的には何んらかの形でエナメル質基質中に組み込まれるものと推測される。

2. 組織化学的所見

PAM染色は始め Gomori²²⁾によって光顕的に糖の検出法として開発され、後に Churg²³⁾, Marinozzi²⁴⁾, Movat²⁵⁾等によって電顕的組織化学の一方法として用いられるようになった。本法によって cell coat の多糖類は勿論のこと、腎糸球体基底膜、コラーゲン線維、弾性線維、赤血球、核クロマチンの他、白血球顆粒、ミトコンドリア膜、Zymorgen 顆粒などの染色性が知られている²²⁻²⁵⁾。PAM染色自体は従来のPAS反応と原理的には類似しており、ムコ多糖類や糖タンパクの検出が可能であるといわれている^{10, 26)}。今回の我々の結果ではコラーゲン線維、基板、細線維がPAM染色で陽性反応を示した。この結果、細線維や基板には多糖類ないし糖タンパクが存在し、中でも反応の強いコラーゲン線維には多量に含まれているものと考えられる。コラーゲン線維上の銀の付着を詳細に観察すると、RR染色と同様に暗調なバンド構造上に強い染色が認められ、そこには多量のムコ多糖類が存在することが示唆される。一方、基板では暗帯に沿って強い銀粒子の沈着がみられ、ムコ多糖類の存在が示唆される。この所見は腎糸球体の基底膜の結果と一致するものである^{24, 25)}。

RRは希金属性色素で多糖類との選択的親和性が強く、組織内の glyocalyx と容易に結合することが知られている。そのためRR染色は

腎糸球体の基底膜²⁷⁾や cell coat²⁹⁾など酸性ムコ多糖類の検出に好んで用いられ、歯胚においても一つの代表的な酸性ムコ多糖類の検出法として用いられている。Orams⁸⁾とMeyerら⁹⁾はRR陽性顆粒が基質内の無周期性ないし周期性細線維に付着するのを報告している。Nagaiら⁶⁾はコラーゲン線維の横紋外側部にRR粒子の付着することを観察している。これらの結果から、細線維やコラーゲン線維には酸性ムコ多糖類の存在することが示唆される。また、Orams⁸⁾はPTA染色で陽性を示す微細線維は糖タンパクに富むものであると報告している。今回の観察では、細線維とコラーゲン線維はPTA染色で上記と同様の結果が得られた。RR染色ではコラーゲン線維のバンド上に規則正しく分布するRR粒子が見られ、基板と細線維にもその存在が確認された。この結果は先人の観察と一致するもので、細線維にも酸性ムコ多糖類が存在することを示すものである。以上のようなPTA染色、RR染色とPAM染色の結果から、コラーゲン線維と基板、細線維に酸性ムコ多糖類が存在することはまちがいないようである。

酸性ムコ多糖類自体は糖とタンパク質の複合体として存在するため、その複合体成分を特異的に分解するHyaluronidaseあるいはNeuraminidaseなどの酵素で消化試験を試みた。細菌由来Hyaluronidaseはヒアルロン酸を分解するといわれている²⁹⁾。Hyaluronidaseで消化後PAM染色を施した場合、基板と細線維は染色されず、またコラーゲン線維にもPAM染色の減弱がみられた。これは基板と細線維にはヒアルロン酸が存在し、コラーゲン線維にも多少なりともヒアルロン酸が含まれることを示すものである。Meyerら⁹⁾は歯乳頭細胞とともに分離した基底膜を器丸由来Hyaluronidaseで消化するとRR陽性顆粒が陰性化することから、基底膜はコンドロイチン硫酸とヒアルロン酸、あるいはその何れか一方を含む proteoglycan から成ることを同様の実験方法によって結論づけている。

一方, Neuraminidase はシアル酸を特異的に分解することが知られている²⁹⁾。この酵素と PAM染色との組み合わせ試験では, 細線維は陰性で, 基底板とコラーゲン線維が弱陽性に染まることから, 細線維にはシアル酸が含まれ, 基底板とコラーゲン線維にも少量ながらシアル酸の存在することが判明した。

細線維の core-protein を検出するため Neuraminidase 消化後 Collagenase, Pepsin, Trypsin で処理するとコラーゲン線維はいずれの場合にも消化された。しかし基底板と細線維は不溶性で, これらの酵素に強い抵抗性を示した。これらの結果から, 細線維は基底板に類似した構成成分を有し, コラーゲン線維とは異なる成分要素から成ることが推察される。このような両者の差異は鍍銀染色を施した場合, 細線維と基底膜は同じ染色性を示すが, コラーゲン線維とは異なることから明らかである。しかしながら鍍銀染色を施した細網線維とを比較した場合, 確かに好銀性において両者は類似しているが, 微細構造的にはバンド構造の有無から細網線維と細線維とは明らかに異なっている。また, 表皮直下で通常みられる固着線維も同様に好銀性を示すが, この線維には細かなバンド構造が確認されており¹¹⁾, その成分はコラーゲン性であろうといわれている³³⁾。したがって細線維は好銀性を示す点では, これらの線維と類似するが, 無周期性細線維であるという点が微細構造上, この線維の大きな特徴といえる。

現在歯胚の基底膜成分としてコラーゲン・タイプ IV, laminin, fibronectin, proteoglycan などの存在が知られている³⁰⁾。そもそも基底膜自体は酸や酵素に対して抵抗性が強く, 腎糸球体基底膜は中性 pH では難溶性であり, 稀酢酸やクエン酸緩衝液によっても可溶化できず, 尿素, グアニジン塩酸あるいは SDS のような強

力な変性剤を用いることにより, ジスルフィド架橋を還元アルキル化することにより初めて可溶化できるといわれている^{31,32)}。また梶川³³⁾によると基底膜を構成するコラーゲン・タイプ IV は Collagenase に抵抗性を示すとの報告もあり, こうした事実から, もし細線維が同様の構成成分であれば, その可能性も十分に考慮しなければならない。この点に関しては今後免疫組織化学的な方面からの検討が必要であると考えられる。

結 論

- 1) 無周期性細線維は胎生16日歯胚の内エナメル上皮直下の基底板明帯から出現し, 象牙前質の基質形成部位で最も発達してみられる。
- 2) 無周期性細線維は基底板の断裂後も前エナメル芽細胞の陥凹部に集積し, 象牙質の石灰化開始期まで残存してみられる。
- 3) エナメル質形成期になると無周期性細線維は針状のエナメル質結晶の出現にともなって不明瞭になり, その結果としてエナメル質形成に組み込まれるものと推察される。
- 4) 無周期性細線維は好銀性であるとともに, PAM染色, RR染色陽性を示し, 酸性ムコ多糖類を含むと考えられる。
- 5) 酸性ムコ多糖類の成分として, Neuraminidase あるいは Hyaluronidase と PAM染色の結果からシアル酸とヒアルロン酸の存在が明らかとなった。
- 6) 無周期性細線維の core-protein は今のところ不明であるが, コラーゲン線維とは異なり, むしろ基底板に類似した性質を示す。

本論文の要旨は第88回日本解剖学会総会(昭和58年4月, 大阪)にて発表した。

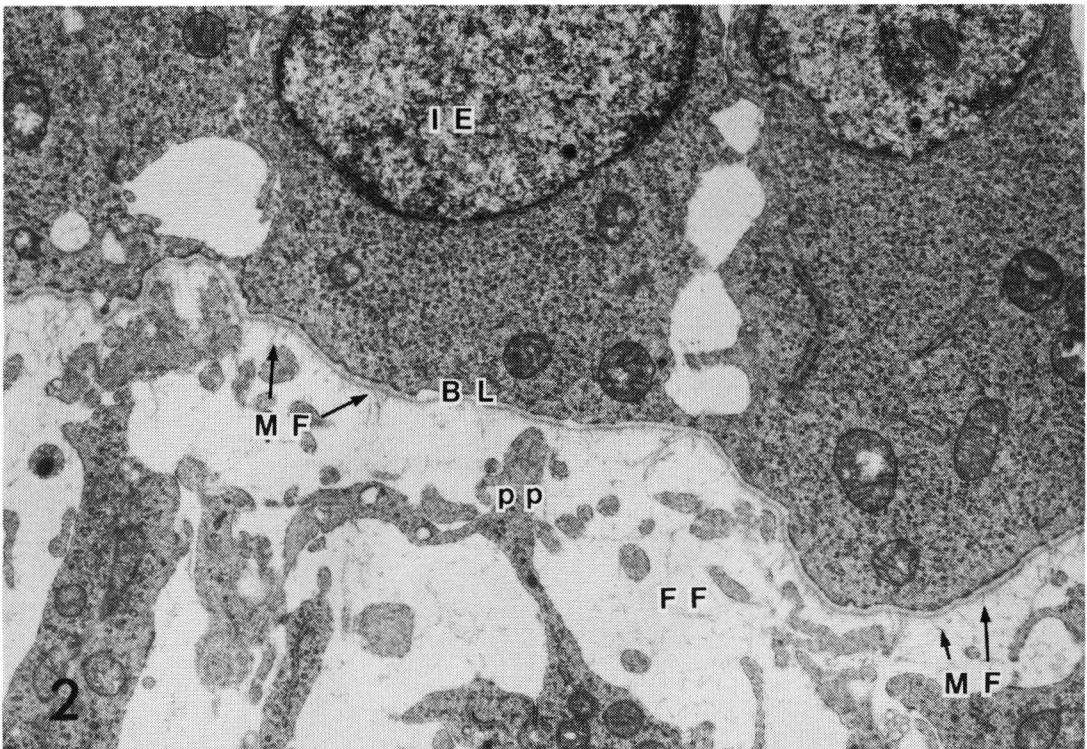
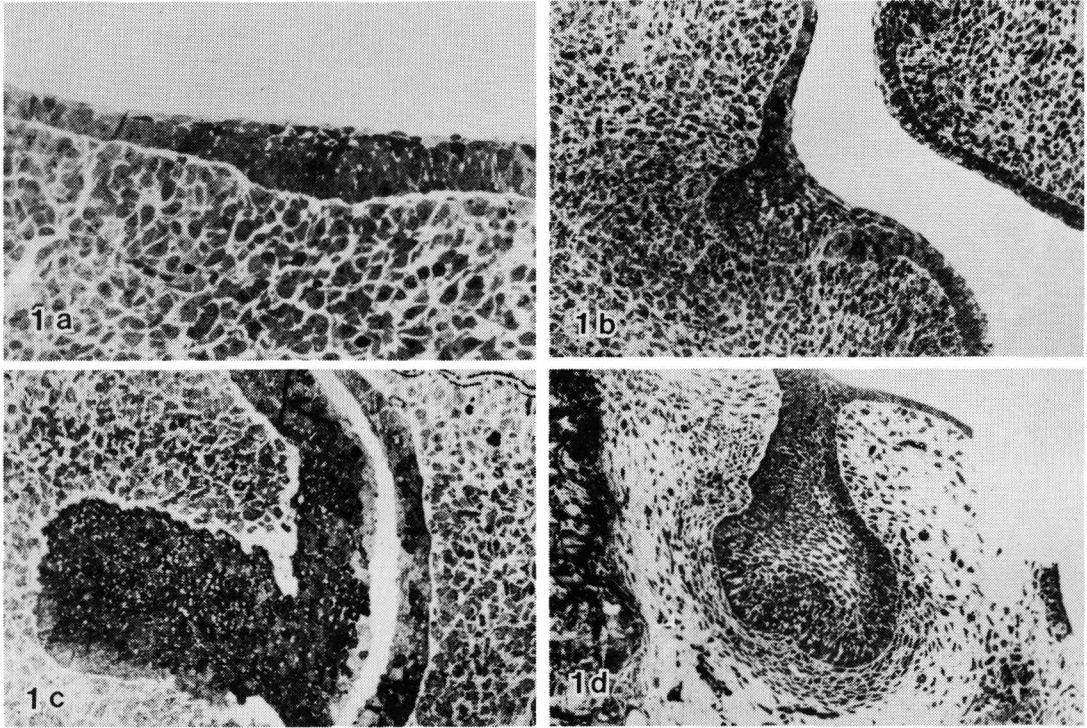
Abstract : The formation of aperiodic microfibrils perpendicular to the basal lamina of a mouse tooth germ and its nature were observed by light and electron microscopy. In addition, some histochemical examination of mucopolysaccharide and enzyme digestion were also carried out using the tooth germ of one-day-old mouse. In the dental bud stage of a 10 to 14-day-old mouse embryo, the basal lamina has been clearly formed, however aperiodic microfibrils and collagen fibers can not be observed. In the 16-day-old mouse embryo, a few formative aperiodic microfibrils were first observed in association with the basal lamina. In the epithelial-mesenchymal junction of the 18-day-old mouse embryo, fine collagenous fibrils appeared in addition to aperiodic microfibrils. A large number of aperiodic microfibrils which seemed to derive from the lamina rara interna were observed in the tooth germ of 20-day-old mouse embryo. Furthermore, in the predentine formative zone of the tooth germ of the one-day-old mouse, aperiodic microfibrils were well-developed, and distributed among the processes of the preameloblast. In the mineralization zone of the dentine matrix the aperiodic microfibrils were still present at the invaginated portion of the preameloblasts, but they had disappeared as a secretion of enamel matrix in the tooth germ of 2-day-old mouse.

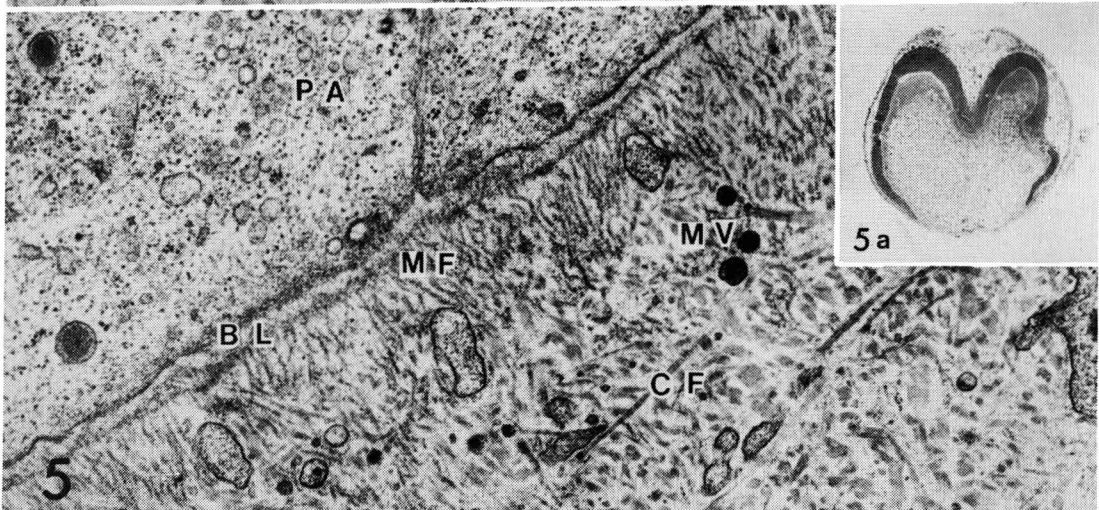
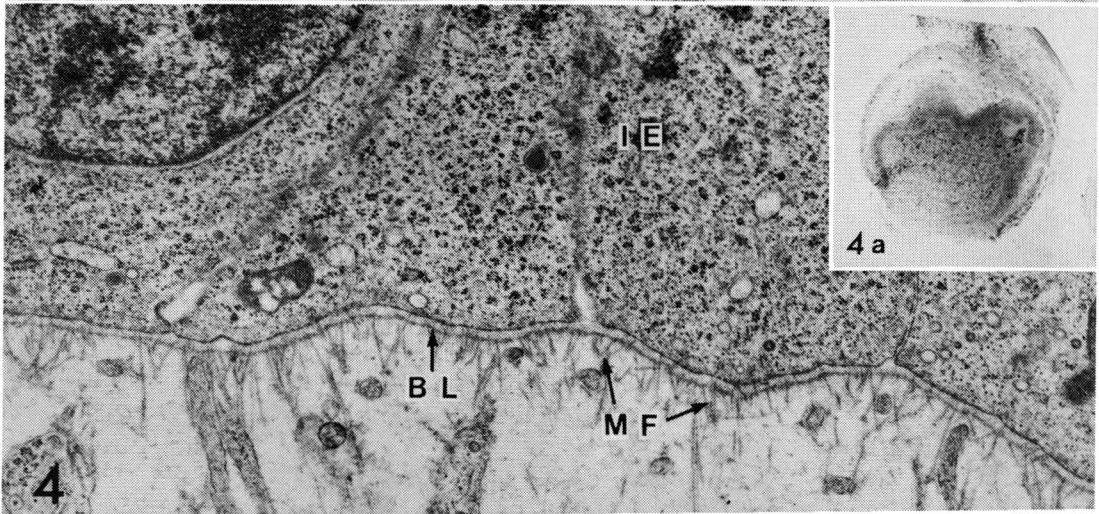
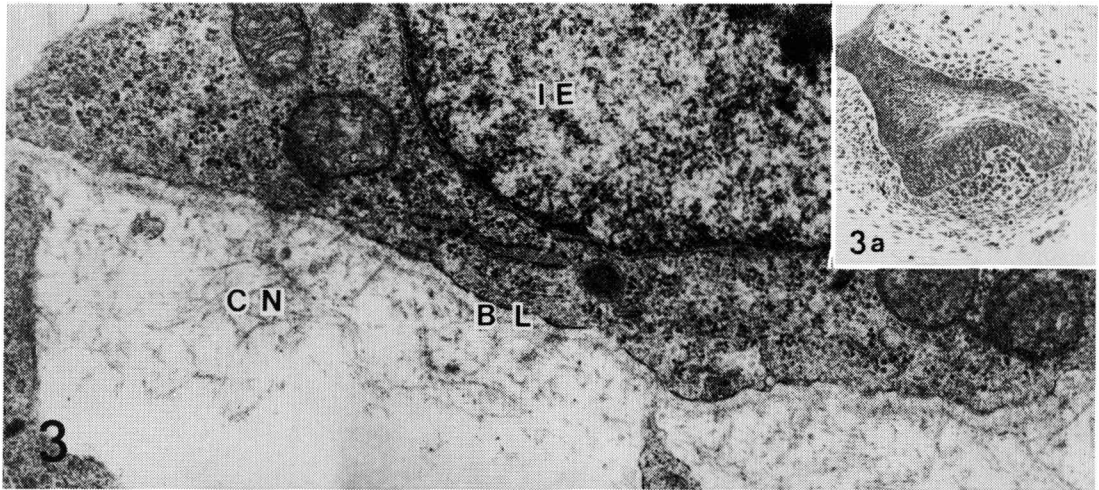
The histochemical examination indicated that the aperiodic microfibrils were positive for RR and PAM staining, but they were negative for PAM staining after treatment by hyaluronidase or neuraminidase. Also, aperiodic microfibrils were resistant to collagenase, pepsin and trypsin after hyaluronidase and/or neuraminidase treatment. These results indicate that the aperiodic microfibrils include hyaluronic acid and sialic acid. From these results, it was indicated that the aperiodic microfibrils were more similar to basal lamina than to collagen fibers.

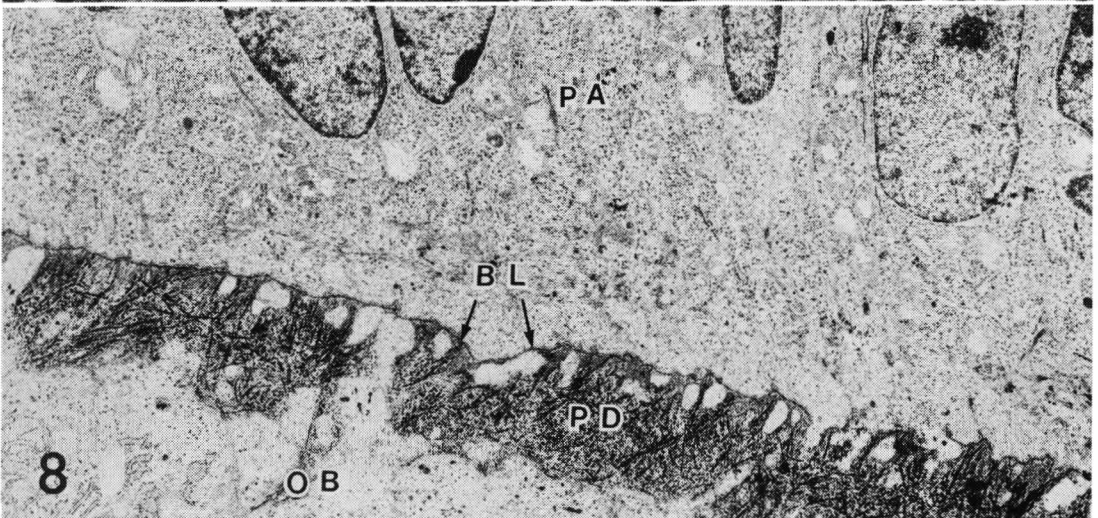
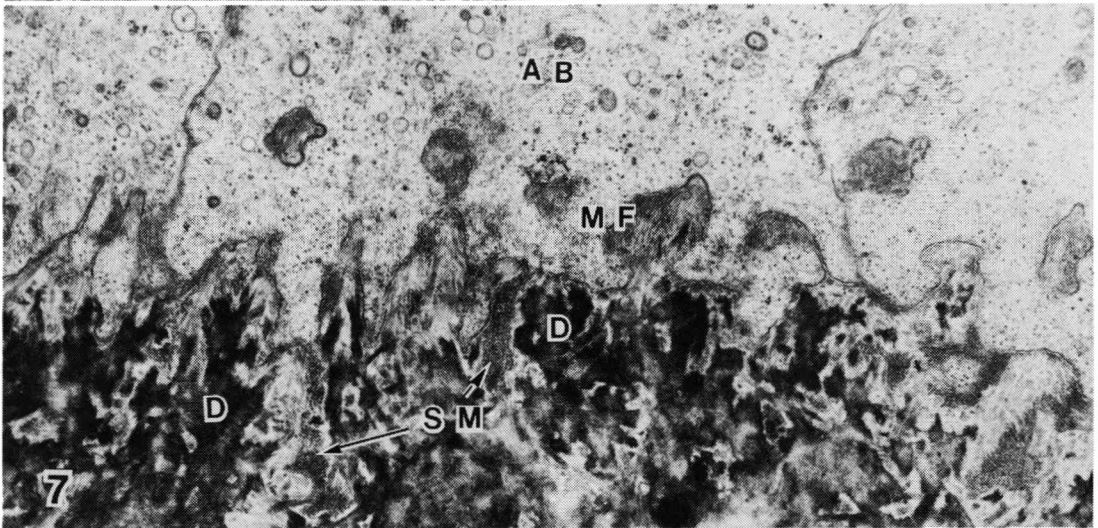
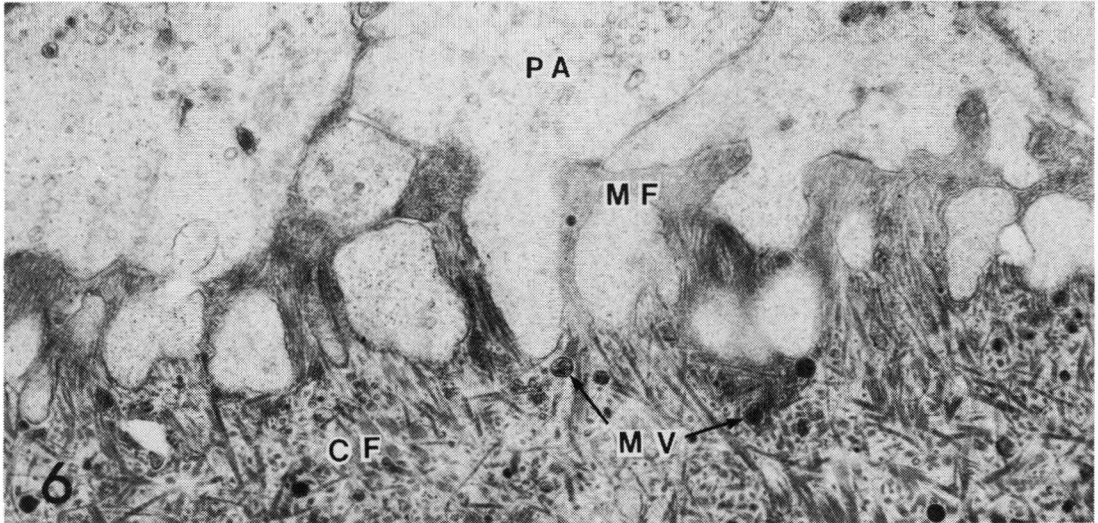
文 献

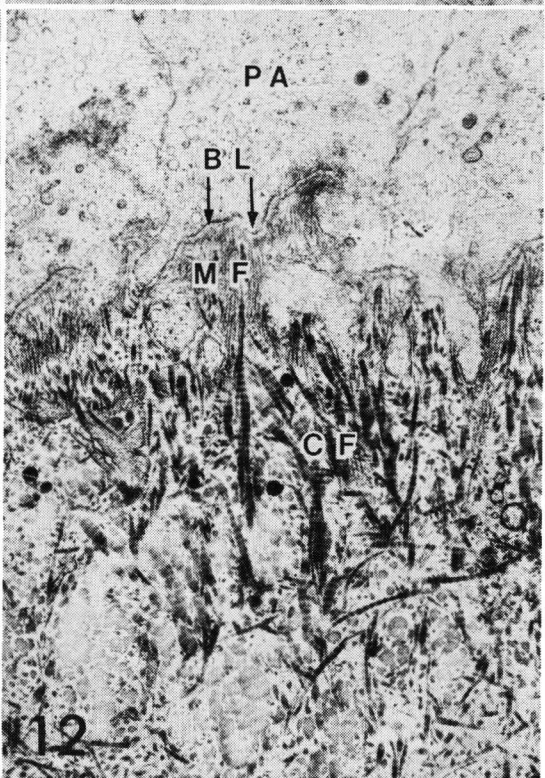
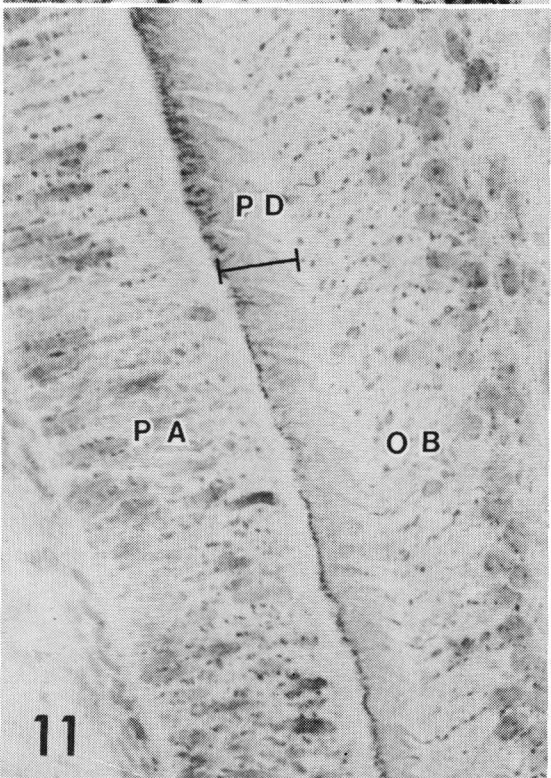
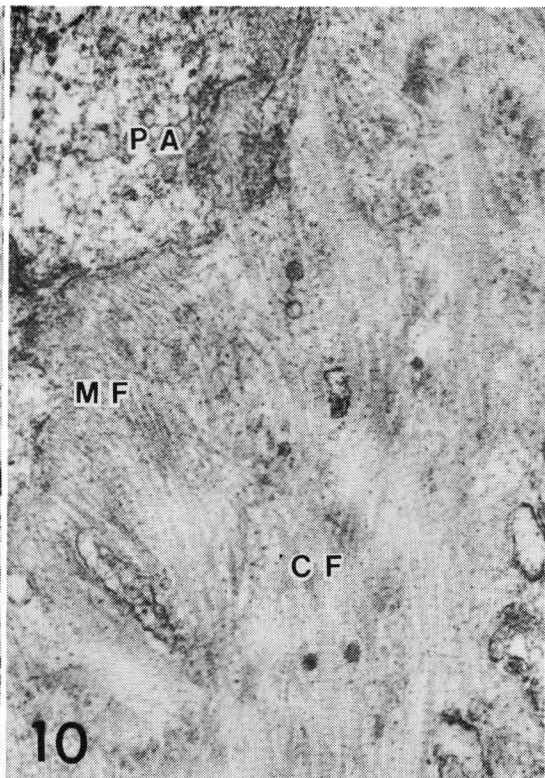
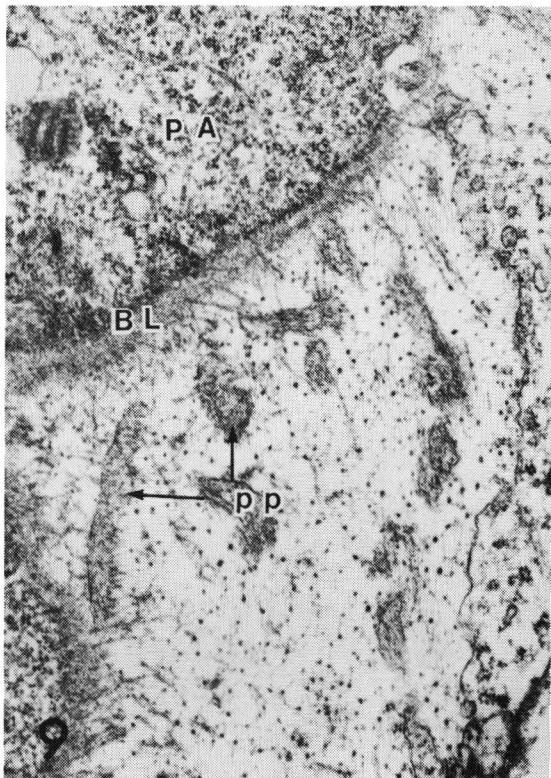
- 1) Reith, E. J. : The early stage of amelogenesis observed in molar teeth of young rats. *J. Ultrastruct. Res.* 17 : 503-526, 1967.
- 2) Slavkin, H. C. and Bringas, Jr. P. : Epithelial-mesenchyme interactions during odontogenesis. IV. Morphological evidence for direct heterotypic cell-cell contacts. *Develop. Biol.* 50 : 428-442, 1976.
- 3) Ten Cate, A. R. : A fine structural study of coronal and root dentinogenesis in the mouse : observations on the so-called von Korff fibers and their contribution to mental dentine. *J. Anat.* 125:183-197, 1978.
- 4) Matthiessen, M. E. and Pömert, P. : Ultrastructure of the human enamel organ. I. External enamel epithelium, stellate reticulum, and stratum intermedium. *Cell Tissue. Res.* 205 : 361-370, 1980.
- 5) Nagai, N., and Takuma, S. : Electron probe and electron microscope studies of acid mucopolysaccharide in developing rat molars. *J. Dent. Res.* 52 : 386, 1973.
- 6) Nagai, N., Takuma, S., Goto, Y. and Ogiwara, H. : Electron microscopy of dentine and predentine of developing rat molars stained with ruthenium red. *J. Biol. Buccale.* 2 : 73-83, 1974.
- 7) 後藤芳郎 : ラット歯胚の酸性ムコ多糖類の局在に関する電子顕微鏡的研究(Ⅱ) Ruthenium red による染色所見 *歯科学報*, 74 : 1344-1358, 1974.
- 8) Orams, H. J. : The ultrastructure of tissues at the epithelial-mesenchymal interface in developing rat incisors. *Arch. oral. Biol.* 23 : 39-44, 1978.
- 9) Meyer, J. M., Staubli, A. and Ruch, J. V. : Ruthenium red staining and tannic acid fixation of dental basement membrane. *Cell Tissue, Res.* 220 : 589-597, 1981.
- 10) 中島興治, 金川卓郎, 森本佐喜子 : Periodic acid methenamine silver 染色の電子顕微鏡法への応用, 電子顕微鏡試料技術集 (日本電子顕微鏡学会関東支部編), 第2版, p359-361, 誠文堂新光社, 東京, 1971.
- 11) 平井五郎, 久米川正好 : 上皮と固有層の境界, Ten Cate 口腔組織学, 第1版, p302-310, 医歯薬出版, 東京, 1972.
- 12) Bernard, G. W. : Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel. *J. Ultrastruct. Res.* 41 : 1-17, 1972.
- 13) Eisenmann, D. R. and Glick, P. L. : Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. *J. Ultrastruct. Res.* 41 : 18-28, 1972.
- 14) Almuddaris, M. F. and Dougherty, W. J. : The association of amorphous mineral deposits with the plasma membrane of pre- and young odontoblasts and their relationship to the origin of dental matrix vesicles in rat incisor teeth. *Am. J. Anat.* 155 : 223-244, 1979.
- 15) Slavkin, H. C., Bringas, Jr. P., Croissant, R. and Bavetta, L. A. : Epithelial-mesenchy-

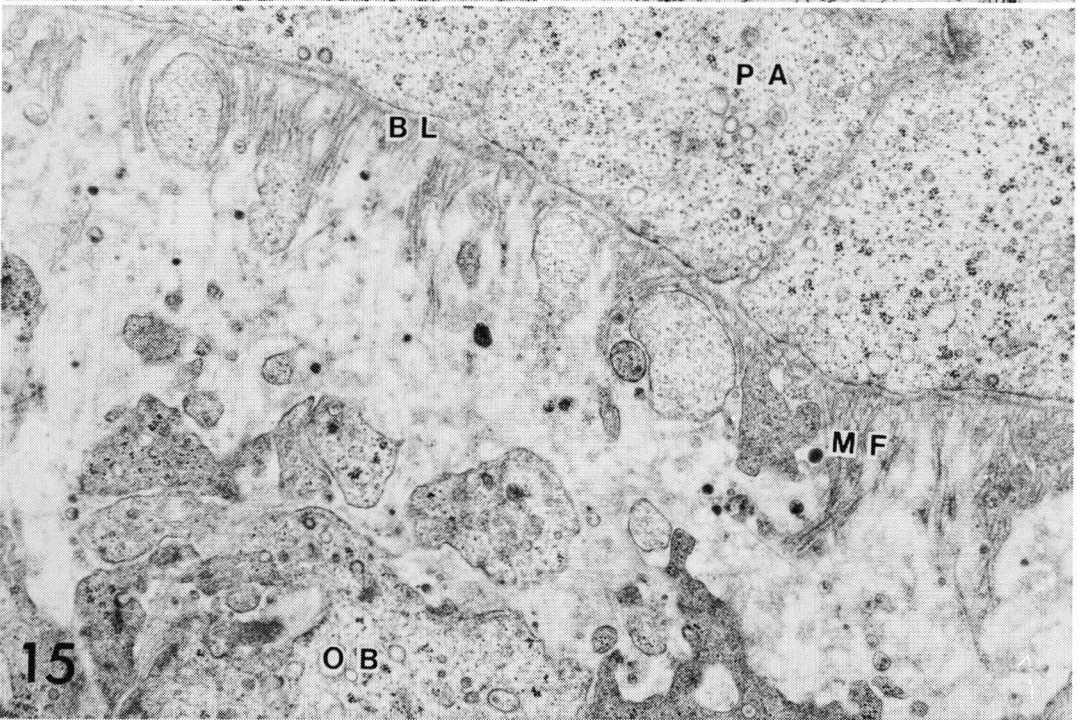
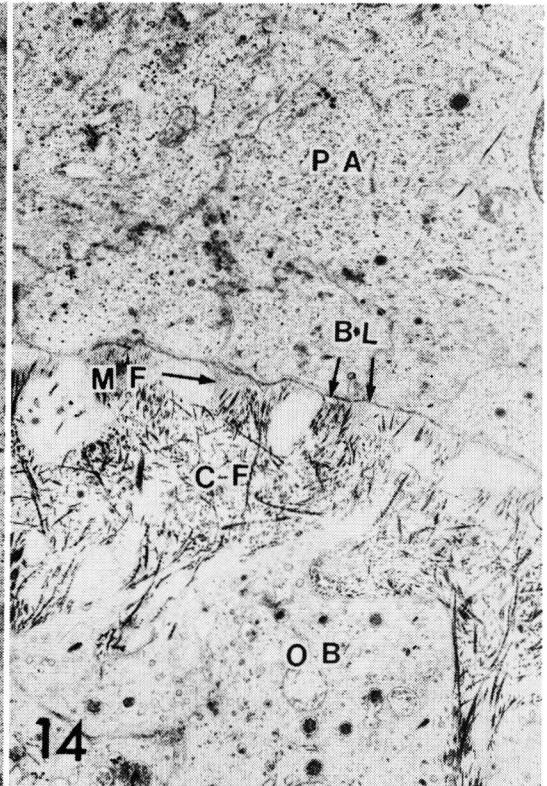
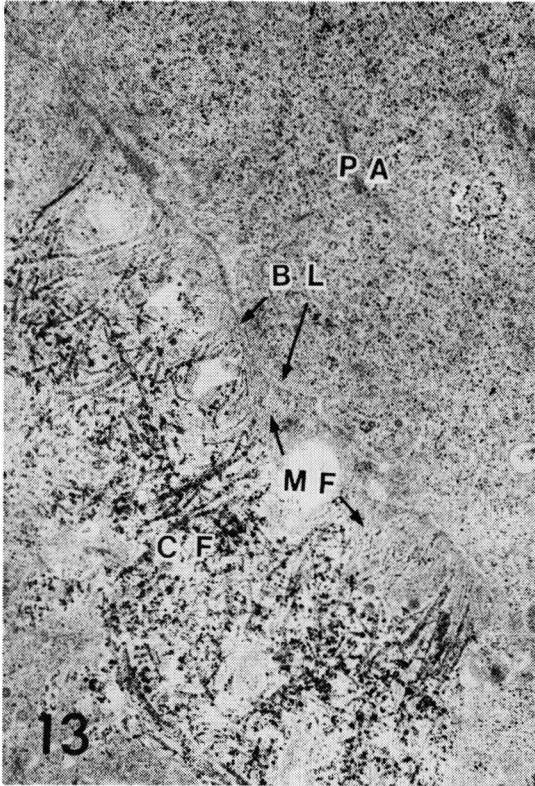
- mal interactions during odontogenesis. II. Inter-cellular matrix vesicles. *Mech. Age. Dev.* 1 : 139-161, 1972.
- 16) 小沢英浩 : 石灰化における細胞の役割—その微細構造的展望—, 歯界展望, 39 : 801-810, 1972.
- 17) 小沢英浩 : 硬組織石灰化とその微細構造—象牙質石灰化を中心に—, 歯界展望, 50 : 223-234, 1977.
- 18) Slavkin, H. C., Bringas, Jr. P., Lebaron, R., Cameron, J. and Bavetta, L.A. : The fine structure of the extracellular matrix during epithelio-mesenchymal interactions in the rabbit embryonic incisor. *Anat. Rec.* 165 : 237-256, 1969.
- 19) Orams, H. J. and Snibson, K. J. : Ultrastructural localization and gradient of activity of alkaline phosphatase activity during rodent odontogenesis. *Calcif. Tissue. Int.* 34 : 273-279, 1982.
- 20) 名和 橙黄雄, 石関清人, 坂倉康則, 立花民子 : 培養マウス歯胚の微細構造 : 基底膜ならびにそれに付随する微細線維と細胞分化との関係について 歯基礎誌, 22 : 357-365, 1980.
- 21) 山 清 : ヒトほうろう芽細胞の超微細構造 歯科学報, 71 : 1531-1574, 1971.
- 22) Gomori, G. : A new histochemical test for glycogen and mutin. *Am. J. Clin. Path.* 10 : 177-179, 1946.
- 23) Churg, J., Mautner, W. and Grishman, H. : Silver impregnation for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 121-133, 1960.
- 24) Marinozzi, V. : Silver impregnation of ultrathin sections for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 121-133, 1960.
- 25) Movat, H. Z. : Silver impregnation methods for electron microscopy. *Am. J. Clin. Path.* 35 : 528-537.
- 26) 矢島権八 : 過ヨー素酸メセナミン銀染色 (PAM染色) (月刊 Medical Technology 編), 第1版, p 38-43, 医歯薬出版, 東京, 1980.
- 27) 山中宣昭, 杉崎祐一 : 糸球体の発生と基底膜 (木原 達, 清水不二雄, 荒川正昭, 堺 薫編), 第1版, p 33-60, 西村書店, 新潟, 1982.
- 28) Luft, J. H. : Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. *Anat. Rec.* 171 : 369-416, 1971.
- 29) 森 富 : 複合糖質 (小川和朗, 武内忠男, 森富編), 第2版, p 540-580, 朝倉書店, 東京, 1977.
- 30) Thesleff, I., Barrach, H. J., Foidart, J. M., Vaheri, A., Pratt, R. M. and Martin, G. R. : Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Develop. Biol.* 81 : 182-192, 1981.
- 31) Kefalides, N. A. : Chemical properties of basement membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 10 : 1-39, 1971.
- 32) 小出 輝 : 糸球体基底膜の生化学 (木原 達, 清水不二雄, 荒川正昭, 堺 薫編), 第1版, 西村書店, 新潟, 1982.
- 33) 梶川欽一郎 : 基底膜の構造, 代謝, 19 : 1259-1265, 1982.











Explanation of Figures

- Fig. 1 a-b.** Light micrographs showing the dental lamina and dental bud from 10 (1 a), 12 (1 b), 14 (1 c) and 16-day (1 d) tooth germ in the mouse mebryo. 1 a, $\times 210$ 1 b, $\times 170$ 1 c, $\times 150$ 1 d, $\times 170$
- Fig. 2.** Electron micrograph demonstrating epithelial-mesenchymal junction of the 16-day tooth germ : a few aperiodic microfibrils (MF) are observed firstly in associated with basal lamina (BL). PP : preodontoblast processes, IE : inner enamel epithelium, FF : fine fibrils $\times 11,600$
- Fig. 3.** The tooth germ of 18-day-old mouse embryo. Electron micrograph showing basal lamina (BL) and fine collagenous fibrils (CN) appeared among the fine fibrils, but the definite collagen fibers did not seen in this stage. IE ; inner enamel epithelium $\times 24,300$ Inset ; light micrograph. $\times 170$
- Fig. 4.** The tooth germ of 20-day-old mouse embryo. Electron micrograph demonstrating many developing aperiodic microfibrils (MF) derive from lamina rara interna. IE : inner enamel epithelium, BL : basal lamina $\times 14,100$ Inset : light micrograph. $\times 210$
- Fig. 5.** The tooth germ of the one-day-old mouse. Aperiodic microfibrils (MF) are most developing in predentine area of this stage. Also, note the numerous collagen fibers (CF) and the matrix vesicles (MV). BL : basal lamina, PA : preameloblast $\times 22,800$ Inset : light micrograph. $\times 210$
- Fig. 6.** Electron micrograph showing nearer the cuspal side than in Fig. 5. In these area basal lamina disappears, and the aperiodic microfibrils (MF) condense into invaginal portion of the preameloblasts (PA). MV : matrix vesicles, CF : collagen fibers $\times 14,600$
- Fig. 7.** Electron micrograph showing a portion of initiating mineralization of the dentine (D). In this area the aperiodic microfibrils (MF) are still in existance among the processes of ameloblasts (AB). SM : stippled material $\times 22,100$
- Fig. 8.** Electron micrograph of predentine area (PD) stained with PAM for 40 min at 60°C . Silver deoposition is intensive on the collagen fibers, basal lamina (BL) and aperiodic microfibrils. PA : preameloblast, OB : odontoblast $\times 5,600$
- Fig. 9.** Electron micrograph of RR stain in a portion of epithelial-mesenchymal junction of the 16-day tooth germ. Note the distribution of PR positive granules, giving the stellate appearance. PA : preameloblast, PP : preodontoblast processes, BL : basal lamina $\times 22,300$
- Fig. 10.** Electron micrograph of RR stain in formative area of predentine of the one-day-old mouse. Counter staining is not performed. Many RR positive granules deposit upon the band of collagen fibers (CF), and a few granules disperse on aperiodic microfibrils (MF). PA : preameloblast $\times 17,600$
- Fig. 11.** Light micrograph showing silver impregnation with Bielschowsky-Gomori method. Counter staining was used to hematoxylin. Note that the more stained basement membrane and aperiodic microfibrils. PD : predentine, PA : preameloblast, OB : odontoblast $\times 750$
- Fig. 12.** Electron micrograph demonstrating collagen fibers (CF) stained with phosphotungstic acid. Clearly lattice-like Patterns are seen at collagen fibers, however aperiodic microfibrils (MF) are not. PA : preameloblast, BL : basal lamina $\times 14,200$
- Fig. 13.** PAM staining after hyaluronidase treatment for 4 hrs at 37°C . The basal lamina (BL) and aperiodic microfibrils (MF) are unstained and also silver deposition of collagen fibers (CF) decrease compared with Fig. 8. PA : preameloblast $\times 12,700$
- Fig. 14.** PAM staining after neuraminidase treatment for 5 hrs at 37°C . Although silver particles can be seen upon the basal lamina (BL) and collagen fibers (CF), its number are less than PAM staining only. Aperiodic microfibrils (MF) are unstained with PAM. OB : odontoblast, PA : preameloblast $\times 8,700$
- Fig. 15.** Electron micrograph indicating predentine formative area digested by collagenase after hyaluronidase and neuraminidase treatment for 5 hrs at 37°C . Collagen fibers are completely digested, but basal lamina (BL) and aperiodic microfibrils (MF) remain intactly. PA : preameloblast, OB : odontoblast $\times 15,400$