

colchicine 投与後のマウス切歯odontoblastsにおける³H-glycine と³H-serine の取り込みに関する研究

黒田直寿

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座

(指導：名和橙黄雄教授)

[受付：1991年10月4日]

[受理：1991年11月19日]

Abstract : The effects of colchicine on the incorporation of ³H-glycine and ³H-serine into odontoblasts at various developmental stages was studied radioautographically.

The ddY mice, 14 days old, were twice given intraperitoneal injection of colchicine (5μg/10g b. w.). At 1, 24 and 48 hours after colchicine administration, the mice were injected with ³H-glycine and ³H-serine. They were sacrificed 10, 40 or 120 mins after isotope injection and their incisors processed for light microscopic radioautography. The numbers of silver grains over the cells and matrices increased with the differentiation of odontoblasts, but the drug did not appreciably affect the incorporation of ³H-glycine or the successive transport to the dentin matrices. On the other hand, the labeling with ³H-serine decreased with the differentiation of odontoblasts. The numbers of cells and matrices labeled with ³H-serine decreased after colchicine administration. These results suggested that the transport of ³H-glycine was independent on microtubules, but that of ³H-serine was closely related with microtubules.

Key words : colchicine, radioautography, odontoblasts, ³H-glycine, ³H-serine

緒 言

抗微小管薬である colchicine は、微小管が関与する様々な細胞現象に影響を及ぼす。その微小管の機能としては、1) 細胞骨格、2) 染色体の移動と細胞分裂、3) 細胞運動、(鞭毛、線毛運動)、4) 神経細管(軸索内輸送・神経分泌・感覚細胞の機能)、5) 分泌(細胞内取り込み、および細胞外排出)などに関与していることが知られている¹⁾。colchicine は、微小管のチューブリンと結合することによって微小管重合を阻害し、特に細胞骨格、細胞分裂、細胞分泌に影響を及ぼすことが知られている²⁻⁴⁾。その他に細胞膜のヌクレオシド透過も阻害すると

報告されている⁵⁾。

細胞分泌における colchicine の作用については、Kudo⁶⁾ がラットに³H-proline を投与した報告がみられる。その結果、細胞上の粒子数は増加するが、基質上の粒子数は減少し、細胞と基質上の総銀粒子数が変化しなかったことから、colchicine は odontoblasts の取り込みと合成に対してはあまり影響を及ぼさないが、基質への分泌抑制を示すこと、またこのような反応が細胞の分化の程度によって異なることを報告した。

odontoblasts における collagen の合成と分泌の一連の経路については、collagen 前駆物質が粗面小胞体で合成され、Golgi 装置を経由し

The effects of colchicine on the dentinogenesis in mice as examined by radioautography with ³H-glycine and ³H-serine.

Naotoshi KURODA

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

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 16 : 65-83, 1991

て、分泌顆粒として、exocytosisによって細胞外に分泌されるという考え方と⁷⁻¹⁰⁾、Golgi装置を経由したのちに細胞内基質を通してodontoblastsの突起部で分泌されるという報告がみられる¹⁰⁻¹²⁾。colchicineがこれらのどこの部分に作用してcollagen分泌を抑制するかについては、粗面小胞体からGolgi装置への転位や微小管依存性の分泌移動を抑制することなどについて報告されている¹³⁻¹⁹⁾。

上記の分泌過程に関する研究は、主として³H-prolineの取り込みと分泌についての報告が大多数であり、成熟硬組織の有機成分の主要なアミノ酸としてglycineの占める割合が高いが、glycineについての報告は少ない。glycineは、collagenの主要アミノ酸であり、幼若硬組織では少なく、成熟硬組織では数倍になるといわれている²⁰⁾。またserineは、dentin phosphoproteinの主要構成要素であり、glycine同様に幼若期と成熟期では比率が異なり、ヒトの象牙質では少なく、齧歯類象牙質では多いといわれている²¹⁾。しかしながら、これらのodontoblastsにおける分泌動態については十分に解明されていないのが現状である。

本研究では上記の点を考慮して、odontoblastsの分化度にとまなう³H-glycineと³H-serineの取り込みと分泌の様相を解明する目的で、colchicine投与後のマウス切歯odontoblastsについて検討を試みた。

実験材料および方法

生後14日目の授乳期ddY系雌雄マウスを使用した。実験群は、colchicine (Merck, Darmstadt, FRG) 5 µg/10 g body weightを生後14日と48時間後の16日目に2回腹腔内に投与した。対照群は、生理食塩水0.1 ml/10 g body weightを実験群と同様に腹腔内に投与した。2回目のcolchicine投与後3群(1群3匹)に分け、1, 24, 48, 時間目に[2-³H]-glycine (specific activity: 47.5 Ci/mmol. New England Nuclear) と L-[³H(G)]-serine (specific activity: 22.5 Ci/mmol. New

England Nuclear) を100 µCi/10 g body weight腹腔内に投与した。各radioisotope投与後、10分、40分と120分後にエーテル麻酔下でKarnovskyの固定液で灌流固定を行った。

その後、直ちに下顎骨を摘出し、0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4) で緩衝した2.5% glutaraldehyde (4°C) で一晩浸漬固定を行い、下顎骨より切歯成長端を摘出し、さらに一晩同じ固定液で浸漬固定を行った。固定後0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4) で洗浄し、2%OsO₄で4°C 2時間後固定を行った。後固定後0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4) で洗浄、エタノール系列で脱水後、Epon 812に包埋した。成長端を矢状断方向で2 µmの非脱灰連続切片を作製し、dipping法にてKonica NR-M 2 autoradiographic emulsion (Konika Corporation, Japan)でラジオオートグラフィを作製し、4°Cで23日間露出した。D-19で現像し、Fujifix (Fuji Photo Film Co., LTD., Tokyo)で定着後、0.1% toluidine blue (含0.1% 硼砂)で染色を行い、光学顕微鏡で銀粒子数を計測した²²⁾。

1. 銀粒子の計測と処理

計測部位は、odontoblastsの分化、分泌段階にしたがって以下の4部位に分け (Fig. 1), preentin, odontoblasts上の銀粒子数について計測した。各部位で基底膜に沿って幅50 µmの領域の銀粒子数を連続切片5枚について計測した。backgroundの銀粒子数は、平均0~2であり、その結果、実測値を用いることにした。平均値の差の検定にはt検定を用いた。

region 1 (undifferential area): 成長端から約140 µmの位置で、未分化歯乳頭細胞からなり、基質の形成も未だ認められない領域。

region 2 (preentin area): 象牙質の石灰化開始部位より基底膜に沿った歯根方向、約100 µmの位置。立方形ないし、短円柱形の細胞が配列し、基底膜面に沿ってpreentinの基質形成が観察される領域。

region 3 (dentin + early enamel area): エナメル質の分泌開始部位より基底膜に沿って切歯端方向、約100 µmの位置。odontoblastsは十

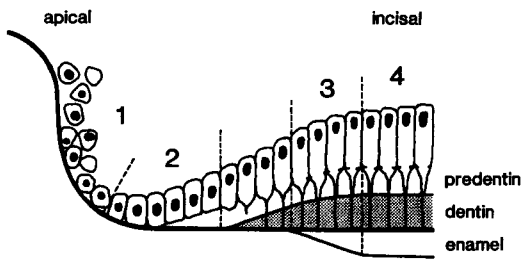


Fig. 1 A schematic diagram of the odontoblast layer in the longitudinal section of the lower incisor. The odontoblast layer was divided into four regions.
 Region 1 : undifferentiated area
 Region 2 : predentin area
 Region 3 : dentin + early enamel area
 Region 4 : dentin + enamel area

分に分化し、象牙質の形成と石灰化が起こり、それとともにエナメル質形成が開始している領域。

region 4 (dentin + enamel area) : エナメル質の分泌開始部位より基底膜に沿って切端方向、約500 μ mの位置。odontoblasts, ameloblastsともに十分に分化し、象牙質、エナメル質の形成が明瞭に認められる領域。

2. 電顕的観察

ラジオオートグラフィと同様に、colchicine 2回目投与後1, 24, 48時間にKarnovskyの固定液で灌流固定を行った。その後、直ちに下顎骨を摘出し、0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4)で緩衝した2.5% glutaraldehyde (4 $^{\circ}$ C)で一晩浸漬固定を行った。固定後0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4)で洗浄し、5% EDTA-2 Na (4 $^{\circ}$ C)で約1ヶ月間脱灰し、0.25 M ショ糖緩衝液 (4 $^{\circ}$ C)で一晩洗浄、その後0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4)で洗浄、2% OsO₄で4 $^{\circ}$ C 2時間後固定を行った。後固定後0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4)で洗浄、エタノール系列で脱水後、Epon 812に包埋した。超薄切片を作製し、ウランと酢酸鉛で二重染色を行い透過電顕で観察した。

結 果

1. ³H-glycine の取り込み

1) colchicine 投与後1時間群

a) odontoblasts 上の取り込み (Table 1, Fig. 2 A) : odontoblasts の銀粒子の取り込みは、全般的には各群の region 間と時間経過の間には有意差は認められなかったが、実験群で減少の傾向がみられた。しかし実験群 120 分の region 間には有意差がみられ、特に region 4 での取り込みは対照群より多くなった。一般的に未分化領域では取り込みが少なく、細胞分化にともなって取り込みの増加する傾向がみられた。

b) predentin 上の取り込み (Table 1, Fig. 2 B) : region 1 では基質形成がみられないため取り込みはみられなかったが、実験群、対照群ともに経時的に基質への銀粒子の移行増加がみられた。対照群では³H-glycine 注射後40分に基質上への銀粒子移行の増加が認められたが、実験群ではこれより遅れて120分に銀粒子の移行がみられ、この移行は特に region 4 の高分化度細胞領域での増加が著明であった。120分の実験群と対照群の間には有意差は認められなかった。

c) 総銀粒子数 (Table 1, Fig. 2 C) : odontoblasts と基質上の総銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、region 1 では両群間に有意差は認められなかったが、実験群では全般的に取り込みの抑制が認められた。その傾向は、10分、40分で著明であったが、120分になると実験群と対照群の間には有意差はみられないが、特に実験群の region 4 では著しい取り込み増加が認められた。

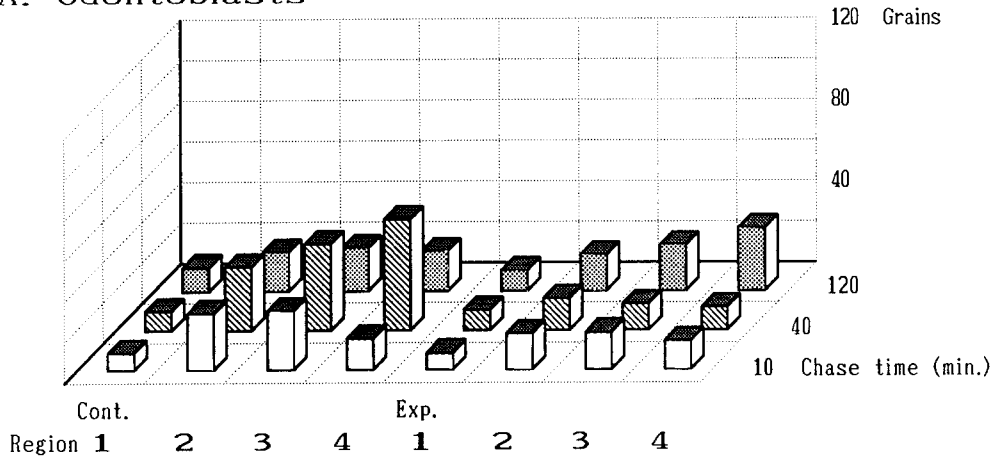
2) colchicine 投与後24時間群

a) odontoblasts 上の取り込み (Table 1, Fig. 3 A) : odontoblasts 上での銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、両群とも経時的な取り込みには大きな差は認められなかった。全般的に、細胞の分化が高くなるにしたがって取り込み増加の傾向がみられた。両群ともに経時

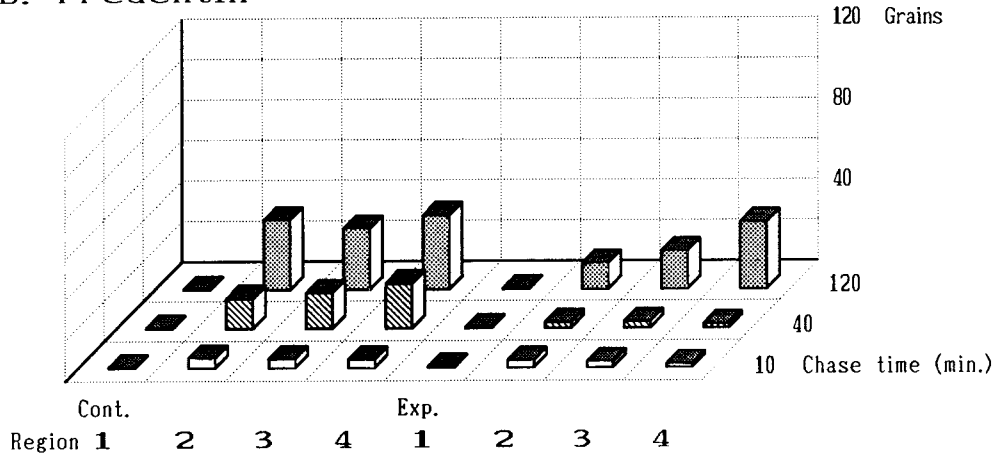
Table 1 Effect of colchicine on silver grain count over cells and matrices after labeling with ^3H -glycine, as assessed by radioautography. (Grain counts/50 μm intercept, mean \pm SD) * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$ for experimental versus control

| Colchicine injection | Portion | Cont./exp. | Chase time | Region | | | | |
|----------------------|--------------|--------------|------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| after 1h | Odontoblasts | Cont. | 10min. | 8.2 \pm 3.1 | 27.7 \pm 10.0 | 28.8 \pm 6.5 | 15.2 \pm 2.0 | |
| | | | 40 | 9.4 \pm 1.7 | 31.2 \pm 9.1 | 42.3 \pm 15.1 | 54.2 \pm 37.1 | |
| | | | 120 | 11.7 \pm 6.6 | 19.0 \pm 8.8 | 21.1 \pm 11.2 | 19.5 \pm 1.3 | |
| | | Exp. | 10 | 8.1 \pm 4.7 | 17.6 \pm 17.5 | 18.1 \pm 15.7 | 13.9 \pm 14.3 | |
| | | | 40 | 9.8 \pm 0.6 | 15.5 \pm 8.3 | 12.8 \pm 5.4 | 11.1 \pm 4.1 | |
| | | | 120 | 10.0 \pm 2.0 | 17.6 \pm 1.4 | 22.4 \pm 2.3 | 30.7 \pm 4.4 | |
| | Prederitin | Cont. | 10 | — | 4.7 \pm 1.0 | 4.3 \pm 3.0 | 3.8 \pm 2.3 | |
| | | | 40 | — | 14.9 \pm 11.2 | 17.6 \pm 15.8 | 22.1 \pm 21.4 | |
| | | | 120 | — | 34.2 \pm 22.1 | 29.8 \pm 6.3 | 36.5 \pm 8.3 | |
| | | Exp. | 10 | — | 3.6 \pm 2.0 | 2.7 \pm 1.0 | 1.6 \pm 0.3 | |
| | | | 40 | — | 2.7 \pm 0.7 | 3.2 \pm 2.8 | 1.9 \pm 0.1 | |
| | | | 120 | — | 12.8 \pm 2.8 | 18.8 \pm 13.0 | 32.9 \pm 16.3 | |
| | Total | Cont. | 10 | 8.2 \pm 3.1 | 32.4 \pm 9.1 | 33.1 \pm 3.5 | 19.0 \pm 4.2 | |
| | | | 40 | 9.4 \pm 1.7 | 46.1 \pm 20.2 | 59.9 \pm 31.0 | 76.3 \pm 58.4 | |
| | | | 120 | 11.7 \pm 6.6 | 53.2 \pm 30.8 | 50.9 \pm 17.4 | 56.0 \pm 7.1 | |
| | | Exp. | 10 | 8.1 \pm 4.7 | 21.2 \pm 19.5 | 20.8 \pm 14.7 | 15.5 \pm 14.0 | |
| | | | 40 | 9.8 \pm 0.6 | 18.2 \pm 7.6 | 16.0 \pm 8.2 | 13.0 \pm 4.2 | |
| | | | 120 | 10.0 \pm 2.0 | 30.4 \pm 1.4 | 41.2 \pm 10.7 | 63.6 \pm 11.9 | |
| | after 24h | Odontoblasts | Cont. | 10min. | 15.6 \pm 7.7 | 44.8 \pm 10.7 | 47.7 \pm 18.1 | 54.7 \pm 11.5 |
| | | | | 40 | 15.7 \pm 5.4 | 31.7 \pm 8.4 | 30.9 \pm 7.2 | 44.8 \pm 7.0 |
| | | | | 120 | 16.6 \pm 5.6 | 19.7 \pm 5.8 | 27.1 \pm 6.1 | 41.5 \pm 6.5 |
| | | | Exp. | 10 | 14.2 \pm 6.5 | 40.8 \pm 20.9 | 47.1 \pm 2.7 | 52.6 \pm 3.4 |
| | | | | 40 | 19.3 \pm 1.8 | 41.4 \pm 0.3 | 50.3 \pm 5.2* | 69.7 \pm 1.8* |
| | | | | 120 | 13.3 \pm 3.0 | 28.6 \pm 18.7 | 33.3 \pm 3.3 | 44.0 \pm 10.5 |
| Prederitin | | Cont. | 10 | — | 5.3 \pm 2.5 | 5.7 \pm 0.8 | 5.7 \pm 1.5 | |
| | | | 40 | — | 11.5 \pm 1.1 | 23.7 \pm 18.0 | 28.8 \pm 6.3 | |
| | | | 120 | — | 17.3 \pm 6.4 | 32.7 \pm 5.5 | 61.9 \pm 25.2 | |
| | | Exp. | 10 | — | 3.4 \pm 0.1 | 5.1 \pm 1.3 | 8.8 \pm 3.7 | |
| | | | 40 | — | 12.9 \pm 2.4 | 36.1 \pm 4.4 | 50.8 \pm 10.5 | |
| | | | 120 | — | 23.1 \pm 16.8 | 27.5 \pm 26.2 | 47.1 \pm 33.0 | |
| Total | | Cont. | 10 | 15.6 \pm 7.7 | 50.1 \pm 13.2 | 53.5 \pm 18.6 | 60.4 \pm 12.6 | |
| | | | 40 | 15.7 \pm 5.4 | 43.2 \pm 9.4 | 54.7 \pm 24.5 | 73.6 \pm 1.8 | |
| | | | 120 | 16.6 \pm 5.6 | 36.9 \pm 10.5 | 59.8 \pm 4.9 | 103.4 \pm 30.0 | |
| | | Exp. | 10 | 14.2 \pm 6.5 | 44.2 \pm 20.8 | 52.2 \pm 1.4 | 61.4 \pm 0.3 | |
| | | | 40 | 19.3 \pm 1.8 | 54.3 \pm 2.7 | 86.4 \pm 9.6 | 120.5 \pm 12.3 | |
| | | | 120 | 13.3 \pm 3.0 | 51.7 \pm 35.5 | 60.8 \pm 29.4 | 91.1 \pm 43.4 | |
| after 48h | | Odontoblasts | Cont. | 10min. | 6.3 \pm 2.1 | 14.8 \pm 4.3 | 14.9 \pm 3.5 | 11.2 \pm 4.8 |
| | | | | 40 | 11.6 \pm 1.1 | 29.3 \pm 13.7 | 33.3 \pm 8.6 | 36.2 \pm 12.5 |
| | | | | 120 | 8.2 \pm 3.5 | 12.1 \pm 2.6 | 14.7 \pm 3.0 | 15.7 \pm 2.3 |
| | | | Exp. | 10 | 7.2 \pm 0.8 | 19.2 \pm 6.2 | 23.0 \pm 8.1 | 29.1 \pm 8.6* |
| | | | | 40 | 12.7 \pm 2.3 | 33.3 \pm 10.7 | 40.1 \pm 12.6 | 43.5 \pm 4.4 |
| | | | | 120 | 13.6 \pm 7.1 | 27.9 \pm 12.5 | 21.2 \pm 9.2 | 25.8 \pm 12.9 |
| | Prederitin | Cont. | 10 | — | 3.4 \pm 1.2 | 2.3 \pm 0.6 | 2.3 \pm 0.8 | |
| | | | 40 | — | 17.2 \pm 9.6 | 24.7 \pm 8.0 | 27.8 \pm 2.7 | |
| | | | 120 | — | 16.6 \pm 3.5 | 22.3 \pm 6.5 | 29.9 \pm 1.9 | |
| | | Exp. | 10 | — | 3.1 \pm 0.9 | 3.7 \pm 1.7 | 5.2 \pm 3.0 | |
| | | | 40 | — | 18.8 \pm 3.8 | 30.3 \pm 9.7 | 39.5 \pm 11.6 | |
| | | | 120 | — | 35.5 \pm 19.2 | 42.1 \pm 20.8 | 40.8 \pm 15.1 | |
| | Total | Cont. | 10 | 6.3 \pm 2.1 | 18.2 \pm 5.4 | 17.1 \pm 4.0 | 13.5 \pm 5.5 | |
| | | | 40 | 11.6 \pm 1.1 | 46.5 \pm 23.3 | 57.9 \pm 15.3 | 64.0 \pm 13.6 | |
| | | | 120 | 8.2 \pm 3.5 | 28.7 \pm 6.0 | 36.9 \pm 9.4 | 45.7 \pm 3.5 | |
| | | Exp. | 10 | 7.2 \pm 0.8 | 22.3 \pm 5.4 | 26.7 \pm 9.8 | 34.3 \pm 11.5* | |
| | | | 40 | 12.7 \pm 2.3 | 52.1 \pm 14.2 | 70.5 \pm 19.5 | 83.0 \pm 15.8 | |
| | | | 120 | 13.6 \pm 7.1 | 63.5 \pm 31.6 | 63.3 \pm 29.8 | 66.6 \pm 27.2 | |

A. Odontoblasts



B. Predentin



C. Total

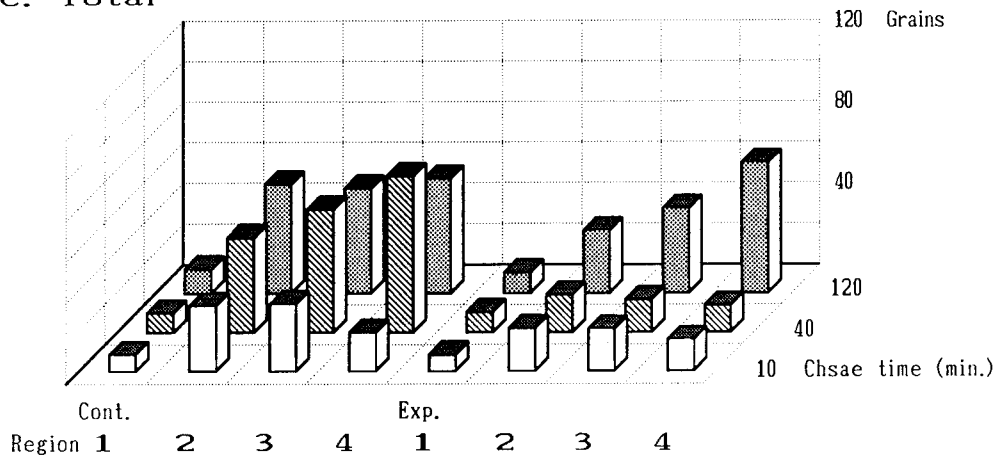
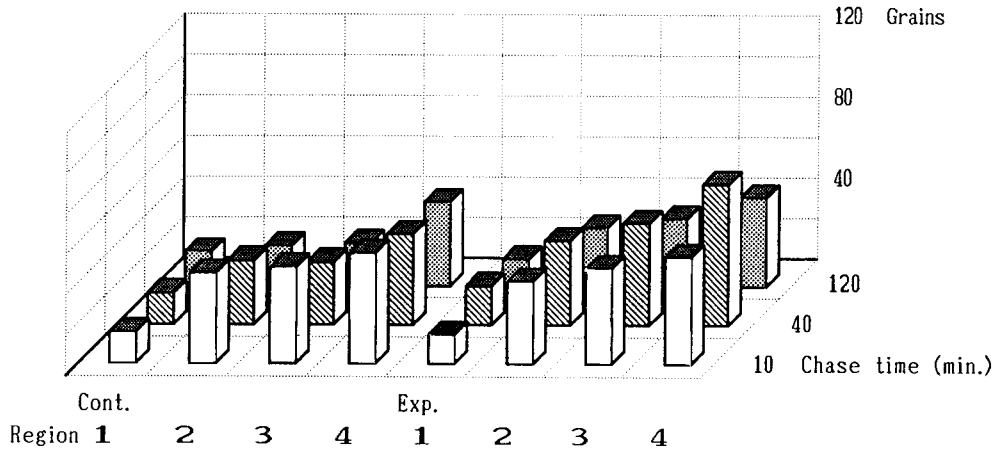
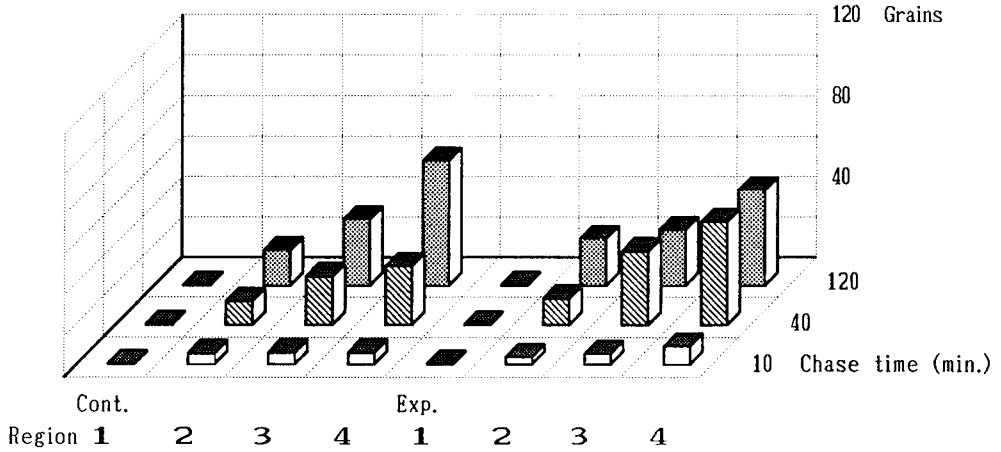


Fig. 2 The mean numbers of silver grains of ³H-glycine over cells and matrices at 1 hr after colchicine administration.
 Cont.: control group; Exp. : colchicine - treated group

A. Odontoblasts



B. Predentin



C. Total

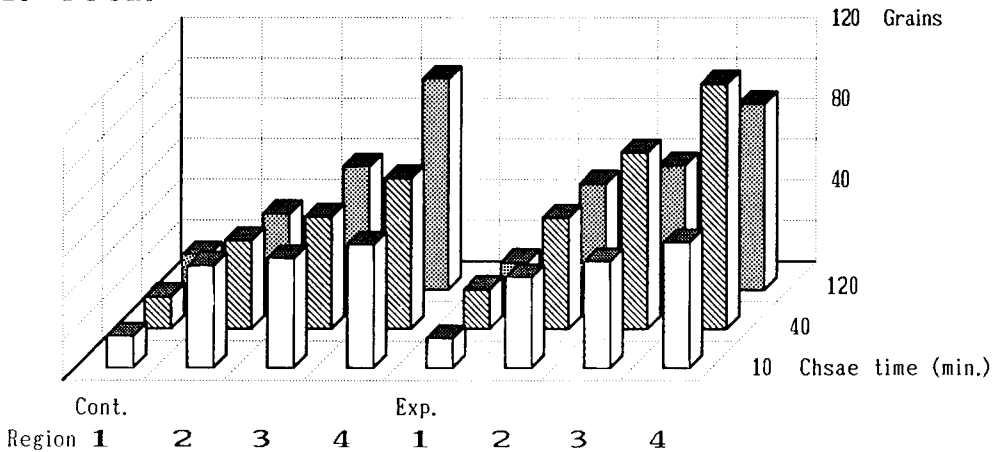
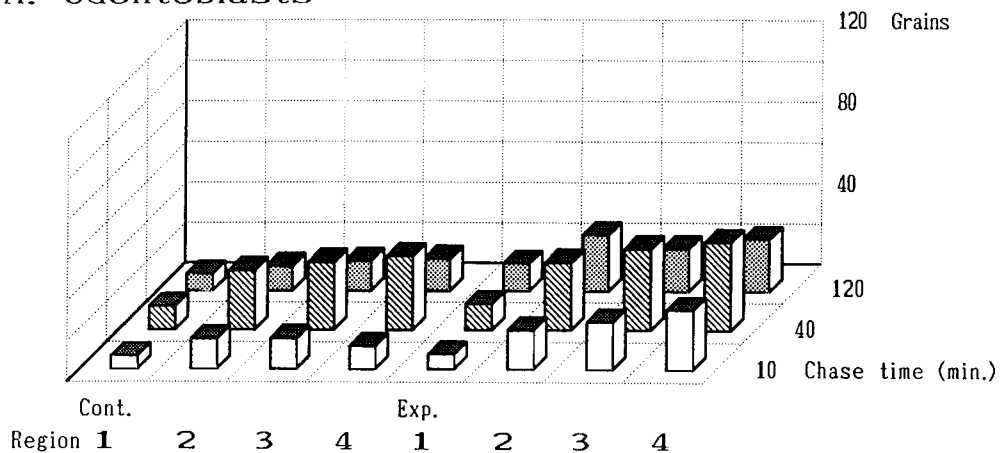
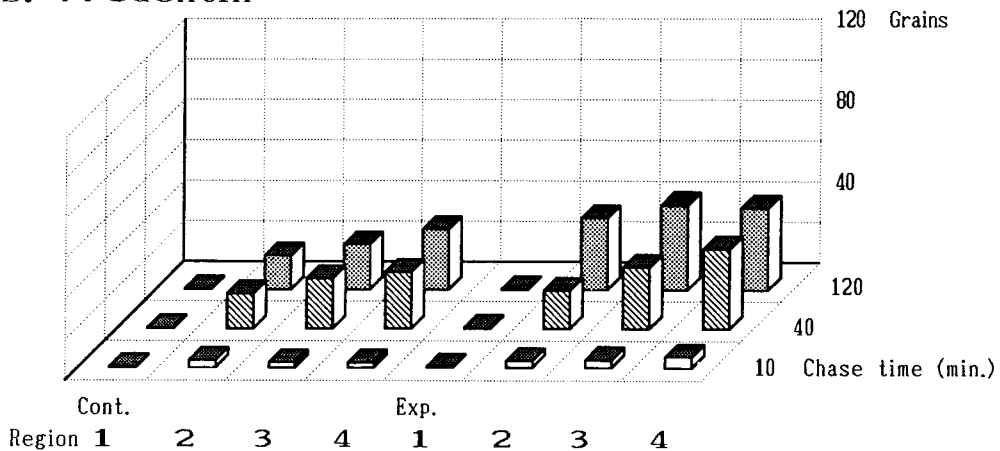


Fig. 3 The mean numbers of silver grains of ³H-glycine over cells and matrices at 24 hrs after colchicine administration.

A. Odontoblasts



B. Predentin



C. Total

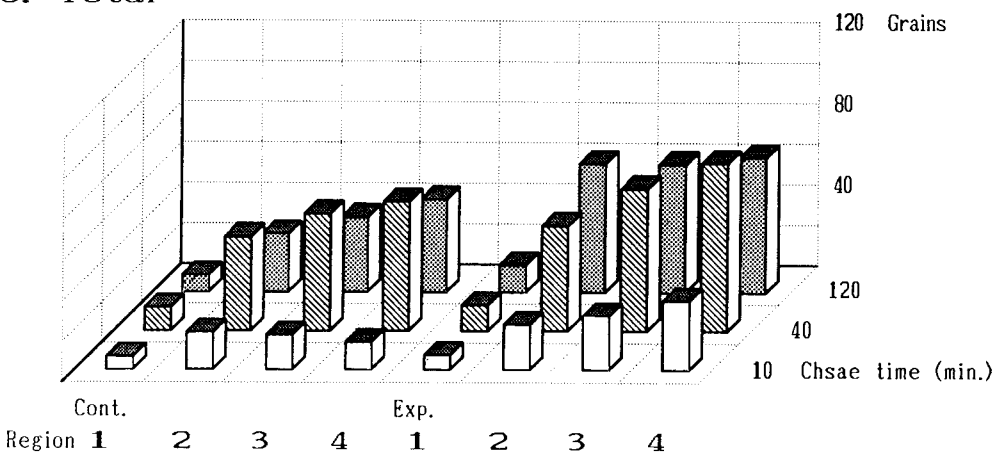


Fig. 4 The mean numbers of silver grains of ³H-glycine over cells and matrices at 48 hrs after colchicine administration.

的には10分、40分で銀粒子の取り込みが増加し、120分ではむしろ減少の傾向がみられた。

b) preentin 上の取り込み (Table 1, Fig. 3 B): 基質上の銀粒子数の全体的様相については、対照群と実験群で著しい差異は認められなかった。両群ともに10分の取り込みは少なく、40分に取り込みの増加がみられ、40分 region 3, 4で対照群に比べ実験群が多く、120分にはそれに反し対照群で多くなっていた。

細胞の分化度で比較すると、odontoblastsと同様に対照群、実験群ともに分化の進んでいる部位、すなわち region 2, region 3, region 4の順に取り込みの多くなる傾向を示しており、この傾向には有意差も見られた。

c) 総銀粒子数 (Table 1, Fig. 3 C): odontoblasts と基質上での総銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、両群間にはあまり大きな差異はみられなかった。10分で対照群と実験群で差は見られなかったが、40分、120分では対照群に対して実験群で多くなる傾向がみられた。

細胞の分化度で比較すると、対照群、実験群ともに分化度の高くなる群で取り込みの増加傾向がみられた。特に region 4での取り込み増加が著しかったが、この増加はodontoblastsから、基質への移行増加を示唆している。

3) colchicine 投与後 48 時間群

a) odontoblasts 上の取り込み (Table 1, Fig. 4 A): odontoblasts 上の銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、全体として実験群で取り込みの増加がみられた。両群とも region 間には大きな差異は認められなかったが、経時的には40分で最大の取り込みがみられ、120分で減少する傾向にあった。

b) preentin 上の取り込み (Table 1, Fig. 4 B): 基質上の銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、有意差はみられなかったが、実験群で増加の傾向がみられた。

細胞の分化度で比較すると有意差はみられなかったが、対照群の10分を除いて、細胞の分化度にしたがって増加の傾向がみられた。

経時的には、対照群、実験群ともに時間の経過とともに増加する傾向にあった。

c) 総銀粒子数 (Table 1, Fig. 4 C): odontoblasts と基質上での総銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、有意差はみられなかったが、実験群で多くなる傾向がみられた。実験群で相対的に総銀粒子数の多いことは、対照群と比較して実験群で基質への銀粒子の移行が多いことを反映している。

細胞の分化度で比較すると、対照群、実験群ともに分化度とともに増加の増加がみられ、経時的に取り込みが増加する傾向を示していた。

2. ³H-serineの取り込み

1) colchicine 投与後 1 時間群

a) odontoblasts 上の取り込み (Table 2, Fig. 5 A): odontoblasts 上の銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、有意差はみられなかったが、総体的には対照群に比べ実験群で取り込みが少ない傾向がみられた。

細胞の分化度で比較すると、³H-glycineとは異なり、未分化領域で取り込みが多く、細胞の分化とともに減少する傾向がみられた。

経時的には、対照群、実験群ともに10分、40分で増加を示し、120分には減少した。

b) preentin 上の取り込み (Table 2, Fig. 5 B): 基質上の銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、総体的には実験群で取り込みの減少傾向はみられるが、³H-glycineに比較して、基質への移行は40分にみられ、120分まで横ばいの傾向を示していた。

細胞の分化度で比較すると、region 2のpreentin領域で移行増加がみられ、分化度とともにむしろ移行の減少傾向がみられた。

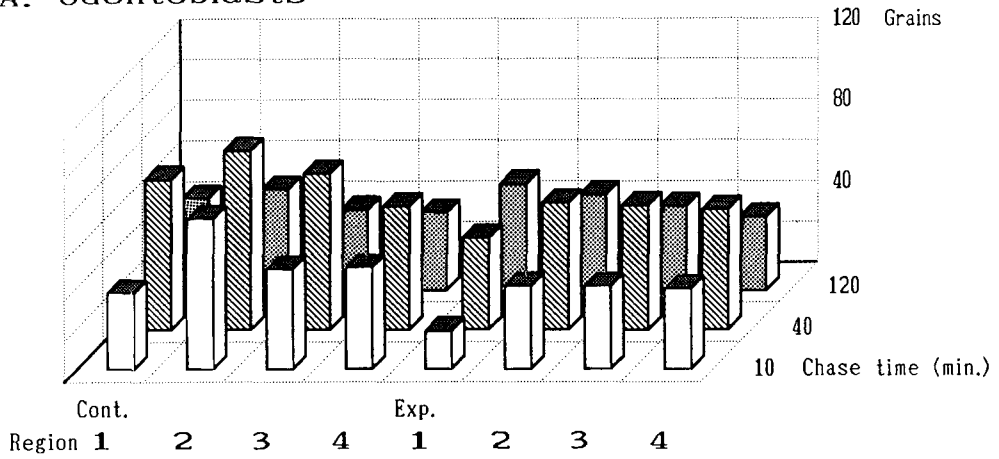
経時的にみると、対照群、実験群ともに40分で基質への取り込みがみられ、120分でも同程度であり、120分に増加する³H-glycineとは異なる様相がみられた。

c) 総銀粒子数 (Table 2, Fig. 5 C): odontoblasts と基質上での総銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、対照群に比べ実験群で取り

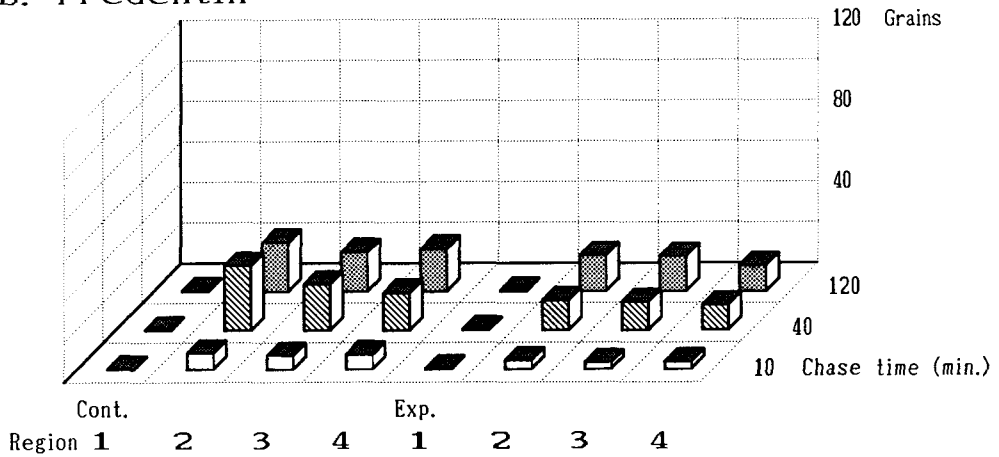
Table 2 Effect of colchicine on silver grain count over cells and matrices after labeling with ³H-serine, as assessed by radioautography. (Grain counts/50μm intercept, mean ± SD) * : P<0.05 ** : P<0.01 for experimental versus control

| Colchicine injection | Portion | Cont./exp. | Chase time | Region | | | | |
|----------------------|--------------|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| after 1h | Odontoblasts | Cont. | 10min. | 37.0± 2.8 | 74.0± 20.9 | 48.7± 4.1 | 49.4± 6.2 | |
| | | | 40 | 74.1± 22.5 | 87.9± 20.8 | 76.8± 19.2 | 60.7± 9.2 | |
| | | | 120 | 45.5± 4.9 | 49.9± 17.7 | 39.7± 21.6 | 38.2± 16.1 | |
| | | Exp. | 10 | 18.5± 10.0 | 40.5± 25.0 | 40.2± 21.5 | 39.2± 15.3 | |
| | | | 40 | 45.0± 22.6 | 62.3± 15.7 | 61.1± 33.2 | 59.1± 30.4 | |
| | | | 120 | 52.5± 22.5 | 47.0± 9.9 | 41.5± 4.4 | 36.4± 6.2 | |
| | Pre dentin | Cont. | 10 | - | 8.0± 1.4 | 6.7± 0.1 | 7.3± 1.0 | |
| | | | 40 | - | 31.9± 16.3 | 22.6± 10.2 | 18.5± 6.6 | |
| | | | 120 | - | 24.1± 12.9 | 19.3± 8.9 | 20.9± 3.8 | |
| | | Exp. | 10 | - | 4.3± 1.6 | 3.2± 0.3** | 3.6± 1.4 | |
| | | | 40 | - | 14.6± 7.1 | 13.8± 7.1 | 12.3± 0.4 | |
| | | | 120 | - | 17.5± 0.7 | 17.2± 2.5 | 12.6± 3.7 | |
| | Total | Cont. | 10 | 37.0± 2.8 | 82.0± 22.3 | 55.4± 4.2 | 56.7± 5.2 | |
| | | | 40 | 74.1± 22.5 | 119.8± 37.1 | 99.4± 29.4 | 79.2± 15.8 | |
| | | | 120 | 45.5± 4.9 | 74.0± 30.5 | 59.0± 30.5 | 59.1± 19.9 | |
| | | Exp. | 10 | 18.5± 10.0 | 44.8± 26.6 | 43.4± 21.8 | 42.8± 16.7 | |
| | | | 40 | 45.0± 22.6 | 76.9± 22.8 | 74.9± 40.3 | 71.4± 30.8 | |
| | | | 120 | 52.5± 22.5 | 64.5± 10.6 | 58.7± 1.8 | 49.0± 9.9 | |
| | after 24h | Odontoblasts | Cont. | 10min. | 32.0± 15.9 | 64.4± 23.7 | 48.4± 20.8 | 49.4± 24.0 |
| | | | | 40 | 53.3± 28.2 | 69.8± 28.2 | 59.4± 22.6 | 58.9± 9.7 |
| | | | | 120 | 50.1± 16.1 | 53.4± 16.7 | 38.1± 4.4 | 35.1± 9.8 |
| | | | Exp. | 10 | 19.7± 3.4 | 38.1± 3.1 | 43.4± 11.9 | 46.5± 19.8 |
| | | | | 40 | 33.1± 15.8 | 56.1± 23.6 | 51.2± 16.3 | 62.1± 27.8 |
| | | | | 120 | 43.0± 18.8 | 41.4± 18.3 | 34.5± 13.3 | 49.8± 10.4 |
| Pre dentin | | Cont. | 10 | - | 10.5± 6.5 | 8.2± 3.1 | 12.2± 6.9 | |
| | | | 40 | - | 26.2± 14.9 | 27.3± 7.6 | 32.7± 9.8 | |
| | | | 120 | - | 24.1± 11.2 | 27.7± 6.6 | 22.4± 4.8 | |
| | | Exp. | 10 | - | 4.1± 2.4 | 5.1± 1.1 | 4.9± 2.8 | |
| | | | 40 | - | 8.2± 6.1 | 9.6± 6.1* | 15.3± 9.9 | |
| | | | 120 | - | 13.1± 10.8 | 13.7± 4.0* | 28.1± 2.8 | |
| Total | | Cont. | 10 | 32.0± 15.9 | 74.9± 29.9 | 56.6± 23.7 | 61.6± 30.8 | |
| | | | 40 | 53.3± 28.2 | 96.0± 43.0 | 86.7± 29.6 | 91.6± 18.4 | |
| | | | 120 | 50.1± 16.1 | 77.5± 27.8 | 65.8± 10.8 | 57.5± 14.5 | |
| | | Exp. | 10 | 19.7± 3.4 | 42.2± 3.9 | 48.5± 12.3 | 51.3± 22.6 | |
| | | | 40 | 33.1± 15.8 | 64.3± 29.6 | 60.8± 20.0 | 77.3± 33.1 | |
| | | | 120 | 43.0± 18.8 | 54.5± 28.9 | 48.2± 16.8 | 77.9± 7.7 | |
| after 48h | | Odontoblasts | Cont. | 10min. | 43.3± 7.2 | 73.0± 12.6 | 54.7± 10.7 | 49.2± 3.3 |
| | | | | 40 | 51.5± 3.4 | 59.0± 3.1 | 59.8± 12.2 | 67.2± 14.7 |
| | | | | 120 | 57.3± 25.2 | 62.2± 38.0 | 41.5± 17.5 | 39.5± 14.7 |
| | | | Exp. | 10 | 17.7± 5.2** | 30.7± 7.5** | 24.1± 9.3* | 21.4± 11.8* |
| | | | | 40 | 29.4± 9.8* | 35.1± 21.6 | 34.1± 14.8 | 35.1± 16.1 |
| | | | | 120 | 45.8± 17.6 | 46.7± 14.4 | 34.0± 12.5 | 40.1± 22.3 |
| | Pre dentin | Cont. | 10 | - | 11.3± 0.7 | 8.0± 1.4 | 6.5± 3.1 | |
| | | | 40 | - | 20.1± 1.6 | 20.1± 2.8 | 22.0± 7.3 | |
| | | | 120 | - | 25.7± 14.5 | 25.0± 11.2 | 25.7± 12.4 | |
| | | Exp. | 10 | - | 3.9± 1.4** | 5.6± 3.0 | 3.5± 0.8 | |
| | | | 40 | - | 12.5± 8.0 | 12.6± 10.5 | 11.7± 5.7 | |
| | | | 120 | - | 20.7± 9.0 | 19.8± 9.4 | 17.4± 8.8 | |
| | Total | Cont. | 10 | 43.3± 7.2 | 84.3± 12.6 | 62.7± 10.3 | 55.7± 6.4 | |
| | | | 40 | 51.5± 3.4 | 79.1± 4.5 | 79.9± 13.3 | 89.2± 21.9 | |
| | | | 120 | 57.3± 25.2 | 87.9± 52.5 | 66.5± 28.6 | 65.2± 26.9 | |
| | | Exp. | 10 | 17.7± 5.2** | 34.7± 7.3** | 29.7± 11.7* | 24.9± 11.3* | |
| | | | 40 | 29.4± 9.8* | 47.7± 29.6 | 46.7± 24.9 | 46.8± 21.5 | |
| | | | 120 | 45.8± 17.6 | 67.5± 23.4 | 53.8± 21.5 | 57.5± 24.2 | |

A. Odontoblasts



B. Predentin



C. Total

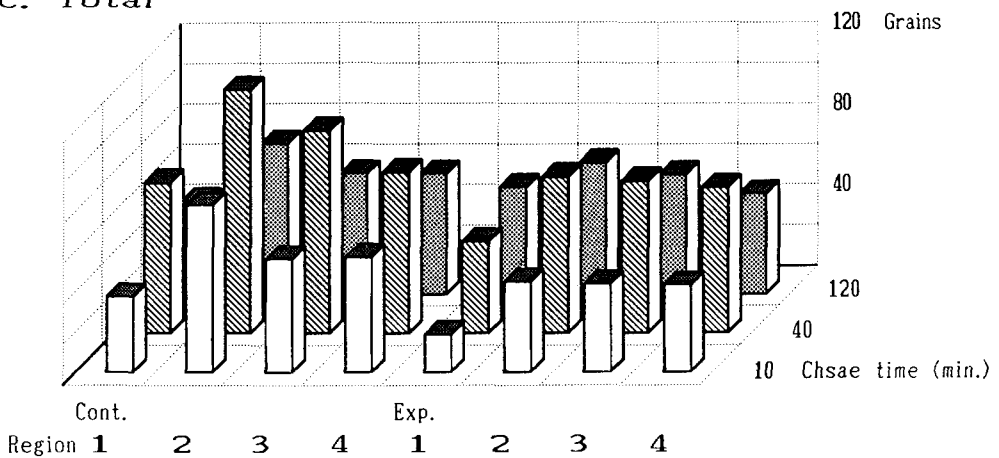
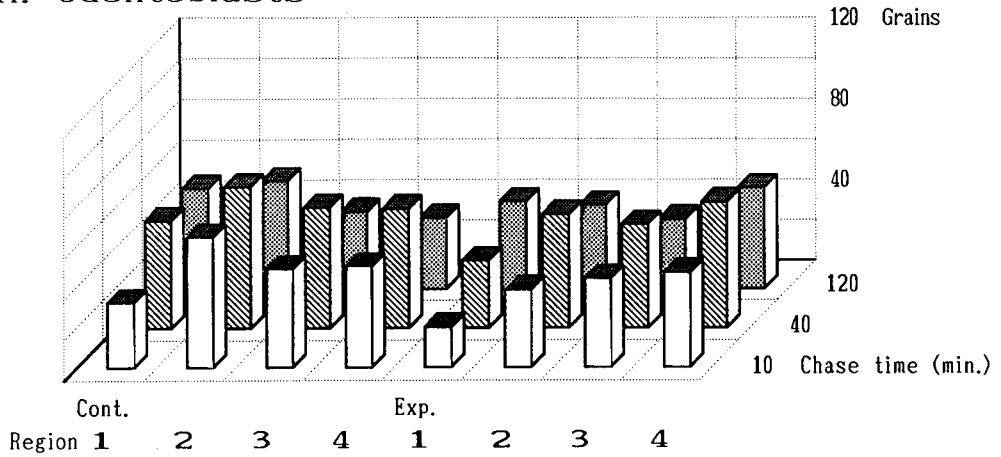
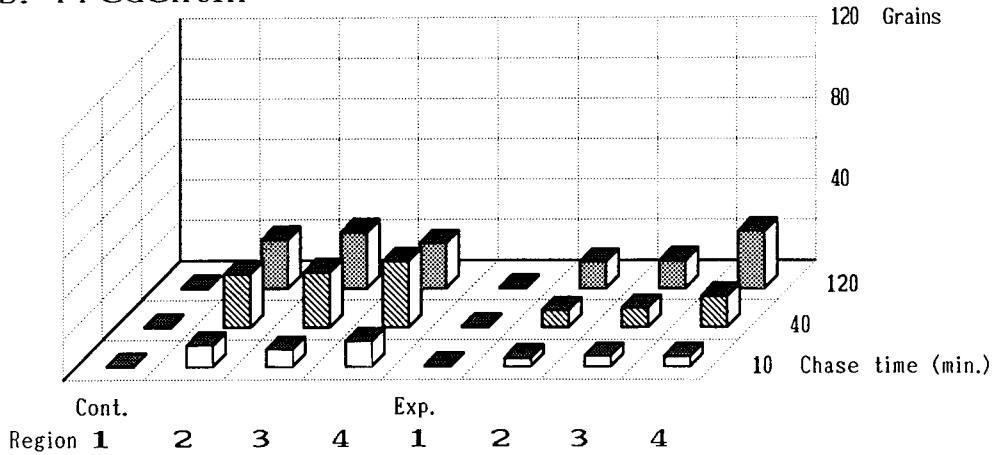


Fig. 5 The mean numbers of silver grains of ³H-serine over cells and matrices at 1 hr after colchicine administration.

A. Odontoblasts



B. Predentin



C. Total

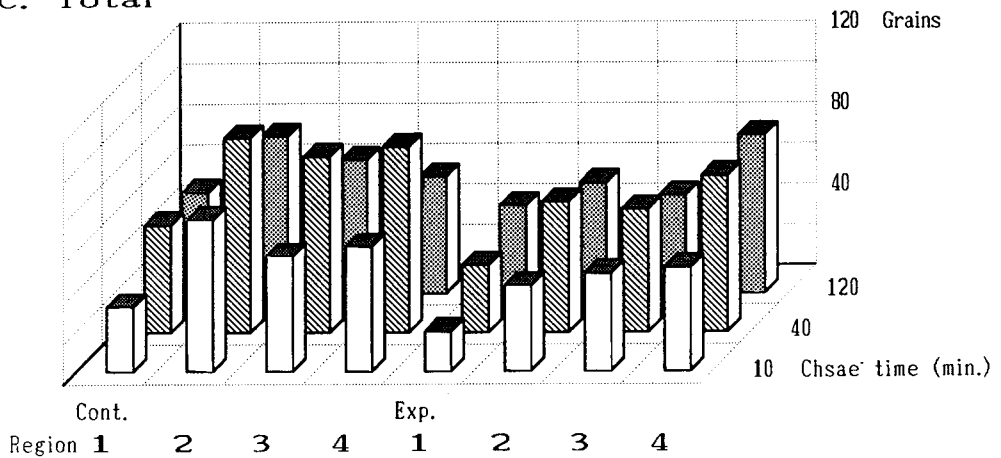
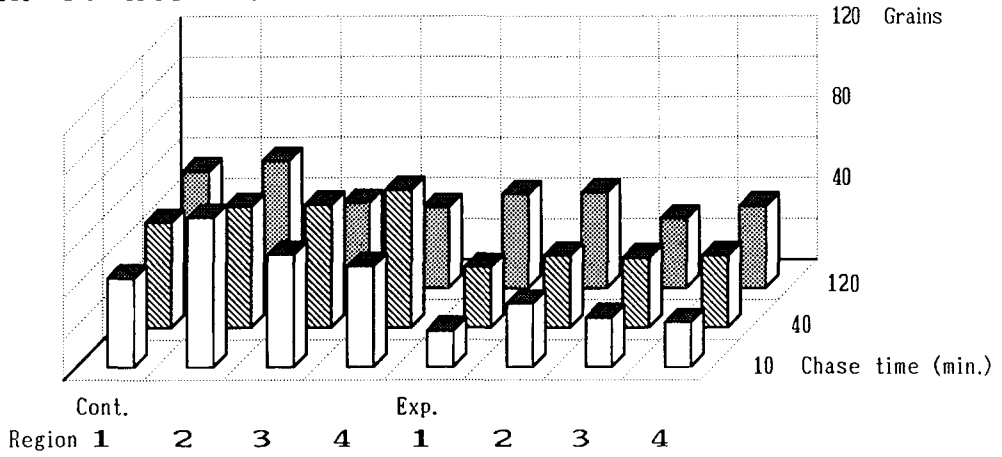
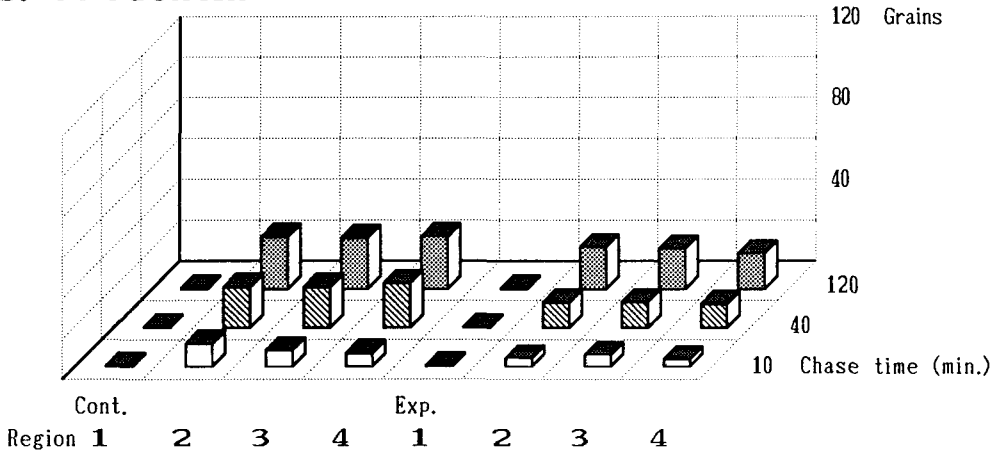


Fig. 6 The mean numbers of silver grains of ³H-serine over cells and matrices at 24 hrs after colchicine administration.

A. Odontoblasts



B. Predentin



C. Total

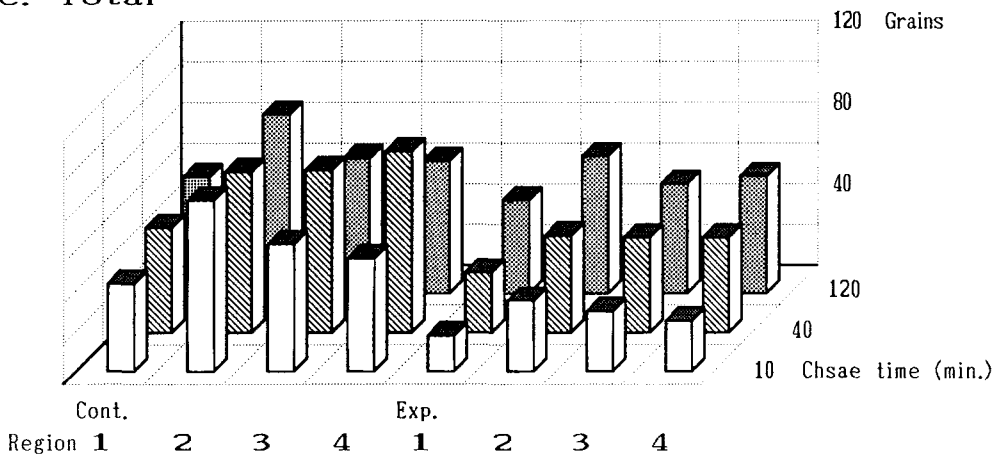


Fig. 7 The mean numbers of silver grains of ³H-serine over cells and matrices at 48 hrs after colchicine administration.

込みの減少がみられた。

細胞の分化度で比較すると、 ^3H -glycineの取り込み様相とは異なり、未分化領域 (region 1) でも、かなりの取り込みがみられた。region 2で最大の取り込みがみられ、むしろ分化度の高い region 3, 4で減少の傾向がみられた。

経時的には、10分で取り込みがみられ、40分で最大となり、120分ではむしろ減少の傾向がみられた。また Fig. 5A, 5Bからみると、総銀粒子数の大部分はodontoblasts上の銀粒子数であり、基質への移行の少ないことを示唆している。この点は ^3H -glycineの場合とは異なっていた。

2) colchicine 投与後 24 時間群

a) odontoblasts 上の取り込み (Table 2, Fig. 6A): odontoblasts 上の銀粒子の取り込みは、1時間群 (Fig. 5A) とほぼ同様の様相を示していた。対照群に比較して実験群で取り込みの減少する傾向が認められ、 ^3H -glycineの取り込みとは異なり、未分化領域 (region 1) での取り込みが高く、region 2~4にかけては横ばいの取り込みの傾向がみられた。

b) preentin 上の取り込み (Table 2, Fig. 6B): 基質上での銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、実験群では取り込みの抑制がみられ、1時間群に比較して基質の取り込みは増加しているものの、実験群の region 2と region 3の取り込みの抑制は持続しているものと考えられた。細胞の分化ならびに経時的な銀粒子の取り込みの間には、実験群、対照群とも大きな差異は認められなかった。

c) 総銀粒子数 (Table 2, Fig. 6C): odontoblasts と基質上での総銀粒子数は、実験群で少ない傾向を示すものの、両者間には有意差はみられなかった。

細胞の分化度で比較すると、 ^3H -glycineとは異なり region 1の未分化領域から region 4の分化度の高い領域まで、対照群に比較して実験群では少ないものの、ほぼ均等に銀粒子の取り込みが認められた。この傾向は、Fig. 6Aの細

胞上の取り込みと同様の傾向を示すものであり、両者間の相同性は、結果として ^3H -glycineとは異なって、実験群では基質への銀粒子の移行が少ない結果を反映しているものと思われた。

3) colchicine 投与後 48 時間群

a) odontoblasts 上の取り込み (Table 2, Fig. 7A): 総体的にodontoblastsの銀粒子の取り込みは、対照群に比較して実験群では少なく、経時的には10分と40分で有意に減少していたが120分ではほとんど差異が認められなくなっていた。

細胞の分化度でみると、対照群では24時間群に比べて、region 1~4まではほぼ均等に取り込みの増加がみられたが、実験群では減少の傾向にあった。

b) preentin 上の取り込み (Table 2, Fig. 7B): 基質上での銀粒子数を対照群と実験群で比較すると、両者間には有意差はみられなかったが、実験群で減少の傾向がみられた。

120分で増加はみられたが、経時のおよび細胞の分化度による銀粒子の取り込みの様相は24時間群と同様の傾向を示していた。

c) 総銀粒子数 (Table 2, Fig. 7C): odontoblasts と基質上での総銀粒子数は、多少のばらつきはあるが、傾向としては24時間群と同様の取り込みの様相がみられた。

細胞の分化度で比較すると、有意差はみられないものの、region 1から取り込みがみられ、region 2で増加が頂点に達し、region 3, 4で減少の傾向がみられた。この点は、 ^3H -glycineの取り込みとは大きく異なっていた。

3. 電子顕微鏡による観察

Fig. 8は、region 1 (undifferential area) の電顕写真であるが、立方形のエナメル上皮直下には明瞭な基底膜が存在していた。さらにその下には明瞭な核小体を有する球形ないし楕円形の大型の核を持ち、細胞質の少ない紡錘形の未分化なodontoblastsが存在していた。この領域のodontoblastsに対するcolchicineの形態的变化はほとんど認められなかった。

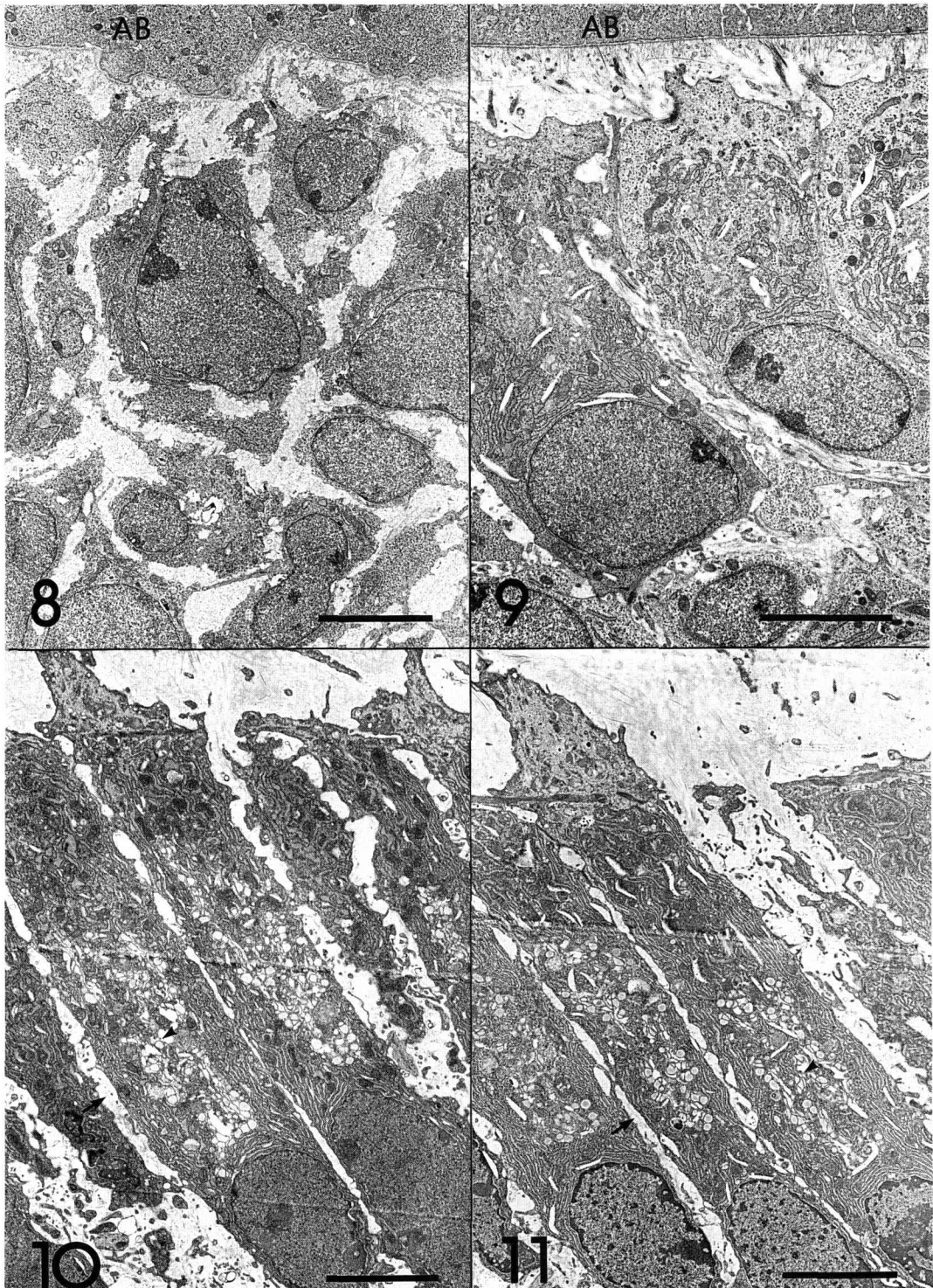


Fig .8 An electron micrograph of region 1 in control. Spindle - shaped undifferentiated odontoblasts were arranged beneath the clear basement membrane.
AB : ameloblasts, bar = 5 μ m

Fig. 9 は, colchicine 処理群の region 2 (pre dentin area) の電顕写真であるが, 直線的な基底膜直下に, 球形ないし楕円形の大型な核が近心側に位置し, やや極性化した短円柱形の odontoblasts が配列していた。colchicine 処理により, 多少粗面小胞体の膨大がみられる以外は大きな形態的变化は, 認められなかった。

colchicine 処理により, 対照群と比較して形態的な変化が認められてくるのは region 3 から region 4 の部位であった。特に colchicine 処理による著しい変化は, 核上部の Golgi 領域に出現してきた。region 3 になると, このような Golgi 装置の拡大と空胞化が生じ, それに加えて隣接細胞との間隙が著しく拡大し (Fig. 10), この傾向は, region 4 に継続されていた (Fig. 11)。

考 察

^3H -glycine と ^3H -serine をマウスに投与し, 切歯 odontoblasts における glycine と serine の取り込みと基質への移行について検討を加えた。glycine は, collagen の全アミノ酸の $\frac{1}{3}$ を占め, 優先的に collagen に吸収されることが知られており²³⁻²⁵⁾, Carneiro と Leblond²⁶⁾ は, ^3H -glycine と数種の核種を投与した実験で glycine が象牙質の collagen に優先的に取り込まれることを報告している。一方, serine は, 一部が collagen と結合しているが, phosphoprotein の全アミノ酸の 40% を占め, phosphoprotein のラジオオートグラフィ標識

として最適であると考えられている^{23, 27-30)}。glycine と serine を比較することによって, 他方では phosphoprotein と collagen の分泌に関する様相を比較することが可能である。

本研究では, 上記の異なる核種を用いて, odontoblasts の分化度による取り込みの差異と colchicine 投与後の分泌の様相について検討を試みた。colchicine の作用機序は, 大きく 2 つに分けられ, 微小管結合による阻害³¹⁾と, 細胞膜結合による阻害³¹⁻³³⁾が考えられている。また分泌過程において, 分泌顆粒は微小管の MAP (microtubule-associated protein) と結合すると考えられている。それゆえに微小管の阻害は, 細胞分泌を抑制するものと考えられることができる。colchicine と細胞膜との結合は, 膜の融合抑制と透過性の低下を生じ, exocytosis の過程で, 細胞膜と分泌顆粒の融合を妨げると考えられており, また Golgi の膜にも作用すると報告されている^{18, 34, 35)}。

colchicine 投与による odontoblasts の ^3H -proline の取り込みに対する変化については, Kudo⁶⁾ が, 細胞の ^3H -proline の取り込みは影響されないが, 銀粒子の増加に対し glycine の基質上への分泌が抑制されることを報告している。Bronckers ら³⁶⁾ は, ^3H -proline の基質への取り込みが colchicine の濃度依存的に抑制されることを報告している。同じ抗微小管薬である vincristine³⁷⁾, vinblastine^{38, 39)} などでも同様の傾向が報告されている。

odontoblasts の ^3H -glycine の取り込みにつ

Fig. 9 An electron micrograph of region 2 at 24 hrs after colchicine administration. Short columnar odontoblasts with their nuclei located at the pulpal side were arranged beneath the clear basement membrane. Regions 1 and 2 of experimental groups with colchicine administration showed the same appearance as the controls.

Fig. 10 An electron micrograph of region 3 at 24 hrs after colchicine administration, showing the arrangement of tall columnar odontoblasts with their nuclei located at the proximal end. The supranuclear Golgi areas (arrowhead) were widely spreaded and vacuolated, and the intercellular spaces (arrow) were extremely expanded by colchicine administration compared with the controls.

Fig. 11 An electron micrograph of region 4 at 48 hrs after colchicine administration. The ultrastructure was similar to that shown Fig.10. It indicated that the effect of colchicine at regions 3 or 4 lasted for 48 hrs.

いて Carneiro と Leblond²⁶⁾, Young と Greulich⁴⁰⁾は, glycine が象牙質基質の collagen に取り込まれることを報告し, 最初 odontoblasts に glycine が取り込まれ, 経時的に predentin, さらに象牙質基質へと順次に移行していくことを明らかにし, この移行の様相は, エナメル質とは異なることを報告している。これらの報告から推察すると, colchicine のような象牙質の基質形成を障害する薬物を用いることにより, odontoblasts の障害と, それにともなう glycine の移動の動態が判明するものと考えられる。

上記の観点から, 本研究では, colchicine を 48 時間間隔で 2 回動物に注射し, colchicine の動物に対する効果を高めた後に ³H-glycine を腹腔内に注射して, 取り込みの様相について検討を行った。

その結果, 対照群, 実験群ともに ³H-glycine の取り込みは region 1 では少なく, 細胞の分化の進む region 2 から region 4 にかけて増加する傾向がみられた。この傾向は ³H-proline を用いた Kudo⁶⁾, Bronckers ら³⁶⁾, Nogueira ら⁴¹⁾の報告, また vincristine を用いた Stene と Koppang³⁷⁾の報告と同様の傾向を示していた。しかしながら, 本研究の ³H-glycine の結果は, 彼らの ³H-proline の報告と大きく異なるところがあった。すなわち, 本研究の 1 時間群では多少傾向は異なるが, 24 時間群と 48 時間群では, むしろ colchicine 処理群で細胞への取り込みが増加し, また基質への移行が増加する傾向が認められた。colchicine 処理による ³H-proline の取り込みについては, 細胞への取り込みを抑制しないが, 細胞に取り込まれた proline の predentin 基質への移行が大きく阻害されることが報告されている。また, colchicine の感受性は細胞の分化程度によって異なり, odontoblasts の未分化領域では対照群と差は認められないが, 基質への移行阻害は分化機能の高度な領域で高いとされている^{6, 36, 37, 41)}。

本研究では, 形態学的にみると colchicine の

影響は, odontoblasts の未分化領域では感受性が少なく, 分化度の高い領域で, 特に Golgi 装置に colchicine 投与の影響が強く出現してくる傾向がみられた。この傾向は上記の ³H-proline の報告と同様であるが, odontoblasts の取り込みと基質への移行については ³H-proline と異なる傾向が示された。

一方, phosphoprotein は, 象牙質基質の non-collagenous protein の主要な構成要素であり, ラット切歯の phosphoprotein の総アミノ酸の半分が serine であるといわれている^{21, 42)}。また, serine の一部は collagen にも含まれるが, Weinstock と Leblond²⁹⁾は ³H-proline と対比して, ³H-serine が dentin phosphoprotein の有効なトレーサーとなることを報告している。その結果, odontoblasts における ³H-proline と ³H-serine との取り込みの相違がみられ, 特に基質への取り込みに特異性がみられ, ³H-serine は急速に石灰化前線に集積し, 象牙質の石灰化部位への移行はほとんどみられず, 経時的には消失することから, serine の石灰化への重要な役割が示唆されている^{30, 35, 43)}。³H-serine の odontoblasts 内の取り込み経過については, 時間的な差異は認められるが, ³H-proline と同様の経路を通過すると言われている³⁰⁾。³H-serine の取り込みの抑制については, Goldberg ら⁴⁴⁾による vinblastine 投与後の ameloblasts の変化に対する報告がみられる。その報告によると形態的には本研究の colchicine と同様の変化がみられ, ³H-proline と同じく ³H-serine も vinblastine 投与により, 基質への移行が阻害されるが, odontoblasts への ³H-serine の詳細な取り込みについての報告はみられない。

本研究の ³H-serine の取り込みの様相は ³H-glycine と比較すると, 実験群, 対照群ともに ³H-serine は分化度の低い region 1, とりわけ region 2 の領域で高く, 分化度の進む region 3, 4 の領域で低くなる傾向のあることが, 大きく相違する点である。また colchicine 処理群では, 相対的に ³H-serine の取り込みが対照群に

比較して低く、1, 24, 48時間ともに基質への移行が阻害されている。colchicineによる³H-serineの細胞への取り込み、基質への移行の阻害の程度は、分化度の高いregion 3,4で高く、細胞の分化度により感受性の相違が認められた。

³H-colchicineを用いた報告では、注射後48時間で胆汁中に約68%が排泄されると言われているが⁴⁵⁾、単回注射で形態的变化は少なくとも2週間継続するといわれている。Yamadaら⁴⁶⁾のラット切歯に及ぼすcolchicine高濃度単回注射実験(本法の約2倍の投与量)では、投与6日後まではnecrotic odontoblastsの出現がみられ、odontoblastsの再生は8~10日の間に生じることを報告している。同様にラット切歯を用いたNogueriaら⁴⁷⁾の高濃度単回注射実験(本法の約1/3の投与量)では投与7日後においても³H-prolineの取り込み異常のみられることが報告されている。本法ではcolchicineの効果を高めるために初回注射48時間後に再度同量のcolchicineを注射し、その後の48時間にも十分に形態的变化が継続されていることを確認して³H-glycine、³H-serine実験が行われた。

その結果、³H-glycineの取り込みは、odontoblasts未分化領域(region 1,2)では取り込みが少なく、細胞の分化にともなって、取り込みの増加がみられた。colchicine処理1時間群での短時間標識群では、対照群に比較して取り込みの減少傾向がみられるが、120分標識群ではほぼ対照群と同等の取り込みに回復すること、またcolchicine処理24時間、48時間群ではいずれも対照群と同等か、それ以上の取り込み増加が認められることから、³H-glycineは³H-prolineとは異なり、すべての分泌経路が微小管依存性ではないことを示唆している。

一方、dentin phosphoproteinに関与する³H-serineの取り込みは³H-glycineと異なりodontoblasts未分化領域(region 1, 2)での取り込みの増加がみられ、分化にともなって減少する傾向が認められた。このことからserine

は象牙質の石灰化に何んらかの役割を果たしていることが推測される。また、colchicine処理群では³H-serineの取り込みが対照群に比較して減少し、基質への移行も減少することから、³H-serineの分泌は微小管依存性であることが示唆される。

結 論

1) 生後14日目の授乳期ddYマウスにcolchicine連続投与の結果、odontoblastsの細胞間隙の拡大、Golgi領域の拡大と空胞化が認められた。

2) ³H-glycineの取り込みは、odontoblastsの分化にともなって増加する傾向がみられた。colchicine処理によりodontoblastsへの³H-glycineの取り込み、また基質への移行の増加傾向が認められた。

3) ³H-serineの取り込みは、³H-glycineとは異なり、むしろodontoblastsの未分化領域で取り込みが多く、細胞の分化にともなって減少する傾向が認められた。colchicine処理によりodontoblastsの取り込みと基質への移行阻害が認められた。

4) 上記の結果から、odontoblastsの基質へのglycineの分泌は、大部分が微小管非依存性であり、serineは、微小管依存性の分泌であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った、岩手医科大学歯学部第二口腔解剖学講座、名和橙黄雄教授に深甚なる謝意を表します。実験にあたり終始御懇切なる御指導、御鞭撻をいただいた立花民子助教授、石関清人講師、坂倉康則講師、藤原尚樹助手、永野弘之助手に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第37回日本解剖学会東北・北海道連合大会(1991年9月21日、郡山)において発表した。

文 献

- 1) 小椋秀亮 : 微小管阻害薬 - その硬組織研究分野への応用, 口病誌, 48 : 199 - 218, 1981.
- 2) Borisy, G.G., Olmsted, J.B. and Klugman, R.A.: In vitro aggregation of cytoplasmic microtubule subunits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69: 2890 - 2894, 1972.
- 3) Margolis, R.L. and Wilson, L. : Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell.* 13: 1 - 8, 1978.
- 4) Olmsted, J.B. and Borisy, G.G.: Characterization of microtubule assembly in porcine brain extracts by viscometry. *Biochemistry.* 12: 4282 - 4289, 1973.
- 5) Mizel, S.B. and Wilson, L. : Nucleoside transport in mammalian cells. Inhibition by colchicine. *Biochemistry.* 11: 2573 - 2578, 1972.
- 6) Kudo, N.: Effect of colchicine on the secretion of matrices of dentine and enamel in the rat incisor: An autoradiographic study using [³H]-proline. *Calcif. Tiss. Res.* 18: 37 - 46, 1975.
- 7) Leblond, C.P. : Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin. *Anat. Rec.* 224: 123 - 138, 1989.
- 8) Weinstock, M. and Leblond, C.P. : Synthesis, migration, and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after [³H] proline administration. *J. Cell. Biol.* 60: 92 - 127, 1974.
- 9) Ross, R : The connective tissue fiber forming cell, ed. Gold, B.S., *Treatise on collagen.* Vol. 2 B, Academic Press, London and New York, pp 1 - 82, 1968.
- 10) 野田春彦, 永井裕, 藤本大三郎 : コラーゲン, 第1版, 南江堂, 東京, 140 - 144 ページ, 1975.
- 11) Reith, E.J. : Collagen formation in developing molar teeth of rats. *J. Ultrastruct. Res.* 21 : 383 - 414, 1968.
- 12) Kajikawa, K. and Kakiyama, S. : Odontoblasts and collagen formation : An ultrastructural and autoradiographic study. *J. Electron Microsc.* 23: 9 - 17, 1974.
- 13) Dehm, P. and Prockop, D.J. : Time lag in the secretion of collagen by matrix-free tendon cells and inhibition of the secretory process by colchicine and vinblastine. *Biochim. Biophys. Acta.* 264: 375 - 382, 1972.
- 14) Goldman, R.D. : The role of three cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. I. Microtubules and the effects of colchicine. *J. Cell. Biol.* 51: 752 - 762, 1971.
- 15) Diegelmann, R.F. and Peterkofsky, B.: Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblasts by microtubular disruptive drugs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69: 892 - 896, 1972.
- 16) Morton, D. , Jr. , Steinbronn, K. , Lato, M. , Chvapil, M. and Peacock, E.E., Jr.: Effect of colchicine on wound healing in rats. *Surg. Forum* 25: 47 - 49, 1974.
- 17) Scherft, J.P. and Heersche, J.N.M. : Accumulation of collagen-containing vacuoles in osteoblasts after administration of colchicine. *Cell. Tiss. Res.* 157: 353 - 365, 1975.
- 18) Cho, M. I. and Garant, P. R. : An electron microscopic radioautographic study of collagen secretion in periodontal ligament fibroblasts of the mouse: II. Colchicine-treated fibroblasts. *Anat. Res.* 201: 587 - 598, 1981.
- 19) Cho, M.I. and Garant, P.R. : An electron microscopic radioautographic study of collagen secretion in periodontal ligament fibroblasts of the mouse: I. Normal fibroblasts. *Anat. Res.* 201: 577 - 586, 1981.
- 20) Simpson, J.W. : Proteins in teeth., ed. Lazzari, E.P., *Dental biochemistry,* 2nd ed., Les & Febriger, Philadelphia, pp 24 - 47, 1976.
- 21) Linde, A: Dentin and dentinogenesis vol. II, CRC Press, Florida, pp 55 - 92, 1984.
- 22) 永田哲士 : ラジオオートグラフ多量作製簡便法, 細胞, 14 : 40-45, 1982.
- 23) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋米明 : 骨の科学, 第1版, 医歯薬出版, 東京, 110 - 119 ページ, 1985.
- 24) Neuberger, A. and Slack, H.G.B.: The metabolism of collagen from liver, bone, skin and tendon in the normal rat. *Biochem. J.* 53: 47 - 52, 1953.
- 25) Stack, M.V.: The chemical nature of the organic matrix of bone, dentin, and enamel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 60: 585 - 595, 1955.
- 26) Carneiro, J. and Leblond, C.P.: Role of osteoblasts and odontoblasts in secreting the collagen of bone and dentin, as shown by radioautography in mice given tritium-labelled glycine. *Exp. Cell Res.* 18: 291 - 300, 1959.
- 27) Butler, W.T., Hall, W.T. and Richardson, W.S.: Purification and some properties of the phosphoprotein from rat incisors. *Biochim. Biophys. Acta* 427: 262 - 276, 1976.
- 28) Butler, W.T., Finch, J.E., Jr. and Desteno, C.V.: Chemical character of proteins in incisors. *Biochim. Biophys. Acta* 257: 167 - 171, 1972.
- 29) Weinstock, M. and Leblond, C.P. : Radioautographic visualization of the deposition of a phosphoprotein at the mineralization front in the dentin of the rat incisor. *J. Cell Biol.* 56: 838 - 845, 1973.
- 30) Inage, T. and Toda, Y. : Phosphoprotein synthesis and secretion by odontoblasts in rat incisors as revealed by electron microscopic ra-

- dioautography. *Am. J. Anat.* 182: 369 - 380, 1988.
- 31) Wunderlich, F., Müller, R. and Speth, V.: Direct evidence for a colchicine-induced impairment in the mobility of membrane components. *Science* 182: 1136 - 1138, 1973.
- 32) Stadler, J. and Franke, W.W.: Characterization of the colchicine binding of membrane fractions from rat and mouse liver. *J. Cell Biol.* 60: 297 - 303, 1974.
- 33) Altstiel, L.D. and Landsberger, F.R.: Interaction of colchicine with phosphatidylcholine membranes. *Nature* 269: 70 - 72, 1977.
- 34) Redman, C.M., Banerjee, D., Howell, K. and Palade, G. E.: Colchicine inhibition of plasma protein release from rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 66: 42 - 59, 1975.
- 35) Patzelt, C., Brown, D. and Jeanrenaud, B.: Inhibitory effect of colchicine on amylase secretion by rat parotid glands. Possible localization in the Golgi area. *J. Cell Biol.* 73: 578 - 593, 1977.
- 36) Bronckers, A.L.J.J., Lyaruu, D.M., Bervoets, T.J. M. and Wöltgens, J.H.M.: The effect of colchicine on protein secretion by differentiating odontoblasts and ameloblasts in the hamster tooth in vitro as shown by radioautography with ³H-proline. *Cell Tissue Res.* 252: 631 - 638, 1988.
- 37) Stene, T. and Koppang, H.S.: Autoradiographic investigation of dentin production in rat incisors after vincristine administration. *Scand. J. Dent. Res.* 88: 104 - 112, 1980.
- 38) Bennett, G., Parsons, S. and Carlet, E.: Influence of colchicine and vinblastine on the intracellular migration of secretory and membrane glycoproteins: I. Inhibition of glycoprotein migration in various rat cell types as shown by light microscope radioautography after injection of ³H-fucose. *Am. J. Anat.* 170: 521 - 530, 1984.
- 39) Goldberg, M., Escaig, F., Septier, D., Molonoblot, M., Weill, R.: Etude autoradiographique de l'activité des odontoblastes et des améloblastes sécréteurs de l'incisive de rat : modifications induites par la vinblastine. *Jour. Biol. Buccale.* 7: 377 - 385, 1979.
- 40) Young, R.W. and Greulich, R.C.: Distinctive autoradiographic patterns of glycine incorporation in rat enamel and dentine matrices. *Arch. oral Biol.* 8: 509 - 521, 1963.
- 41) Nogueira, T.O., Zorn, T.M.T., Stene, T. and Koppang, H.S.: Autoradiographic investigation of effects of high-dose colchicine on dentinogenesis in rat incisors. *Acta Anat.* 133: 45 - 49, 1988.
- 42) Dimuzio, M.T. and Veis, A.: The biosynthesis of phosphophoryns and dentin collagen in the continuously erupting rat incisor. *J. Biol. Chem.* 253: 6845 - 6852, 1978.
- 43) Beertsen, W. and Niehof, A. : Root-analogue versus crown-analogue dentin: A radioautographic and ultrastructural investigation of the mouse incisor. *Anat. Rec.* 215: 106- 118, 1986.
- 44) Goldberg, M., Escaig, F. and Septier, D. : The effects of vinblastine on the cell structure and activity in the rat incisor enamel organ during the secretory stage in vivo as shown by radioautography using ³H-proline, ³H-serine and ³H-fucose. *Jour. Biol. Buccale.* 10: 237- 254, 1982.
- 45) Hunter, A.L. and Klaassen, C.D.: Biliary excretion of colchicine. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 192: 605- 617, 1975.
- 46) Yamada, M., Hirayama, A., Miake, K., Kasugai, S. and Ogura, H.: An ultrastructural study of reparative dentinogenesis in the rat incisor after colchicine administration. *J. Electron Microsc.* 36: 398- 407, 1987.