



Title	三色蛍光標示法によるワニの歯と顎骨の発育に関する研究
Author(s)	狩山, 昌万
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/30418">https://hdl.handle.net/11094/30418</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 三色螢光標示法によるワニの歯と顎骨の発育に関する研究

狩 山 昌 万

## Studies on Growth of Crocodilian Teeth and Jaw Bones by Three-Colour Fluorescent Labelling Method

Masakazu KARIYAMA

(昭和44年11月10日受付)

### 緒 言

ワニの歯に関する研究は、古く Owen (1840)<sup>1)</sup> にはじまり、歯の発生の分野では、Röse (1894),<sup>2)</sup> Bolk (1912)<sup>3)</sup> Woerdeman (1919)<sup>4)</sup> 1921<sup>5)</sup> らがとくにくわしく記載しており、Parrington (1936)<sup>6)</sup>, Wettstein (1937)<sup>7)</sup>, Romer と Price (1940)<sup>8)</sup>, James と Wellings (1943)<sup>9)</sup>, Kvan (1957)<sup>10)</sup>, 1958<sup>11)</sup>, 1960<sup>12)</sup>, Smith (1958)<sup>13)</sup>, Edmund (1960)<sup>14)</sup>, 1962<sup>15)</sup> らがワニの歯の発生と萌出、交換について、種々の観察をし、検討を加えている。しかし、これらはいずれも、初期発生の細胞学的あるいは組織学的な観察が主で、歯の萌出、交換、脱落についての経時的な観察は、Edmund のレ線的研究<sup>15)</sup> と Kvan の脱灰切片染色法<sup>11)</sup> による報告以外みられない。とくに歯が発生し、発育して、それが口腔に向かって移動してゆくとき、歯の周囲の結合組織線維がどのように変化するか、あるいは歯や骨が、経時的にどのように発育し、石灰化してゆくかについては、これらの研究でも記載は少なく、くわしく報告されていない。

著者らはさきに *Caiman crocodilus* (頭蓋長34~50mm) を用いて、ワニの歯が発生し、つぎの歯と交換するまでの硬組織の発育と歯の移動にともなう結合組織線維の排列をしらべ、その結果、結合組織線維が歯の発育や移動と密接な関係をもって変化してゆくことを知った<sup>16)</sup>。

しかし、さらに適当なトレーサーを利用することによって、歯の移動、脱落、交換にともなう各時期における時間的な硬組織の発育成長と石灰化の進行過程、および同一歯槽窩内での異った世代の歯と歯の相互関係、あるいは結合組織線維によってつながる歯と歯槽骨との相互的な形成伸

長、あるいは吸収添加の消長などをしらべ、歯の発育と交換に関与する歯と周囲の顎骨の動的変化を知ろうとして本研究を進めてきた。

これらの目的を達成するために、まず多くの生体染色法を検討し、その中から新しい螢光標示法を見出すことができた。

その方法は、単に二色の螢光標示法でおこなった場合には、エナメル質、象牙質の観察には有効な方法であったが、セメント質や顎骨では添加吸収が著しくその相互的発育関係を知ることは出来なかった。そこで、さらに異なった色としてあらわれる他の螢光標示薬を加えることによって、三色螢光標示法を見出すことにつとめた。そのため数種の螢光剤をえらび、注入液の種類、注入液の組成、注入量、注入順序、注入間隔などを検討した結果、Tetracycline, Calcein, Alizarin を用いる三色螢光標示法がもっともよいことを知った。

本研究は、この三色螢光標示法によって、*Caiman crocodilus* の歯系硬組織の発育について長期観察をおこない、歯の発生から脱落にいたる各硬組織の発育形成状況を知るとともに、歯と歯、歯と歯槽骨の相互的關係、それにとともなうセメント質や顎骨の吸収添加および骨組織内での構造改築の経時的・動的変化を知ることが出来たので、ここに報告する。

### 材 料 と 方 法

実験動物として、*Caiman crocodilus* を研究室において長期間飼育し、頭蓋長 34~100 mm, 体重 40~1200g のもの60匹を用いた。

研究方法は、三色螢光標示法によっておこなった。

三色螢光標示法：螢光標示薬としては、筋注用の結晶塩酸 Tetracycline\*, ドータイト Calcein\*\*, Alizarinsulfonsäure Natriumsalz (MERCK製) を使用した。注入液として Tetracycline-HCL (Tetracycline 100 mg に対し

大阪大学歯学部口腔解剖学第一講座 (主任 西嶋庄次郎教授)  
本論文の要旨は、昭和42年5月、日本解剖学会第40回近畿地方会、昭和42年10月、第9回日本歯科基礎医学会総会、昭和42年11月、大阪大学歯学会総会、昭和43年4月、第22回日本口腔科学会総会、昭和43年6月、日本解剖学会第42回近畿地方会、昭和44年8月、第74回日本解剖学会総会において発表した。

て、塩化マグネシウム 46.84mg, アスコルビン酸 250mg を含んだもの)を生理食塩水 2~5cc 中に 2~5% の割りにとかしたものを、ドータイト Calcein は Calcein 100mg を 0.050~0.055N (pH≒12) の水酸化カリウム液 20cc 中に溶解させたものを必要に応じて生理食塩水 20cc~60cc と混合したもの、Alizarin red S は Alizarinsulfonsäure Natriumsalz 1% 水溶液 (2.6<pH<2.8) を酢酸緩衝液で、4.3<pH<4.8 に調整したものを用いた。

注入方法は、これらの注入液を体重 kg 当り、それぞれ、1回量として Tetracycline-HCL (以下 TE と略す) では 15~50mg, ドータイト Calcein (以下 CAL と略す) では 4~8 mg, Alizarin red S (以下 AL と略す) では 30~80 mg に相当する量を腹側尾部の筋肉内に注射した。

注入間隔は目的に応じて 3~40 日とし、最後に注入してから、1時間から10日後にネプタール麻酔のもとで、心臓より生理食塩水を注入し、血管内の血液を生理食塩水と入れかえ、ただちに10%ホルマリンを注入して充分固定したのち、最後に80%アルコール中で再固定(4~5日, 2~3回交換)した。

脱水はアルコールにより、90, 95, 99%にそれぞれ2~3日, 100%に3~4日, 充分に行ったのち、ベンゾールに浸漬(4日間, 毎日夜交換)した。

つぎに、(1) 資料(歯を含んだ顎骨)をスチロールモノマー(重合促進剤として0.2%の割合に過酸化ベンゾールを混入)を入れた試験管中に入れ、試験管を密閉して恒温槽(55°C)中で樹脂を重合硬化させたもの<sup>1)</sup>、および、(2) スチロールモノマーに浸漬した資料を bio-plastic 中に3~4日浸漬し、硬化剤を入れて樹脂を硬化させたものをつくり、これらのブロックから20~50 $\mu$ の研磨標本を作製した。研磨標本は日本光学製の SUR-FS 型蛍光顕微鏡により、BV 励起法により観察した。フィルターは、一次フィルター B をもちいて、蛍光励起したのち、二次フィルター Y51 と 2B によって 5000Å 以上の紫外線を遮断し、4047~4348Å 間の波長の紫外線をもちいた。写真撮影は、暗視野照明の下で、フジカラーフィルム R100 (ASA100), Kodachrom (ASA64) で1分30秒から5分間露出した。

なお、硬組織形成量は蛍光発育線間の距離であらわし、標本の顕微鏡写真スライド(312枚)をつくり、プロジェクターで10倍の拡大像を板上の白紙に写し、 $\frac{1}{20}$ mm 副尺付の滑動計で測った。

## 研究成績

### 1. 蛍光標示薬と三色蛍光標示法

#### 1) 注入液の濃度と注入量

CAL 蛍光標示液としては、CAL 濃度 0.17~0.50% リンゲル液 (9<pH<11) の 5~8mg/kg 注入量が標示薬として最適であった。

TE 蛍光標示薬 (TE濃度2~5%液) は注入量として、15 mg/kg では蛍光度が弱く観察像としてはやや不十分であるが、20mg/kg では観察容易な蛍光像を得ることができ、50mg/kg では蛍光度は一層強くなるが、蛍光線の中が太くなった。したがって 20~30mg/kg が形成障害の副作用の考慮をも含めて最適であった。

AL 蛍光指示薬は酢酸緩衝液で pH を 4.1~4.8 に調整した均一に溶解された AL 濃度 1% 溶液の使用により、注入量 40mg/kg 以下では蛍光像としての鮮明さが劣り、確実な蛍光像を得ることはむずかしかったが、50~70mg/kg では観察像として十分な蛍光像が得られ、さらに 70~80mg/kg の注入量は確実で鮮明な蛍光像を得ることができた。

#### 2) 注入量と注入間隔

注入間隔の決定には注入後に新しく形成された部分に蛍光剤がとり込まれるため、すなわち薬剤注入の結果あらわれる蛍光像の中を考慮する必要があった。この部分は薬剤が体内に持続し存在している限り、蛍光線となってあらわれてくるからで、薬剤の体内での存在分量により大きく左右される。

そこで、各蛍光剤についてみると、CAL と AL では比較的体内での存在期間は短かく、3~4日ではほとんど体外に排泄されるため、注入量の差により蛍光線の中にあまり大差をみないのであるが、TE では体内での持続時間が非常に長いために、蛍光線の蛍光強度と巾は注入量により大きく左右された。

CAL と AL は注射後3~4日の間に新しく形成された部分がとくに強い蛍光線となってあらわれるが、その後形成された部分にはほとんど蛍光を残さないで、シャープな線となってあらわれた。したがって CAL と AL では 3~4 日間隔で投与しても像は重ならなかった。

しかし、TE の注入量 20mg/kg では注射後 4~5 日間の形成部分が、40 mg/kg では 6~7 日間の形成部分が強い蛍光線の中となり、その後形成された部分に対しては diffuse で弱い蛍光像を残した。さらにこれ以上の分量投与は多量の TE が体内に長く存在するために、蛍光線の中は強い蛍光像となって増加していくようであった。したがってこれらのことから、TE 蛍光標示薬の 20mg/kg 注入量は 5~6 日の間隔注入でも、強い蛍光像が重ならないので、標示薬として適した量であることがわかった。

本研究の如き、歯と顎骨の相互的な長期観察には、各蛍光線間のコントラストや形成障害等の逆効果も考慮に含めたとき、10日以上の間隔が必要であり、15~20日の間隔で最後の標示薬注入後は 1~2 日後に材料を採取するのがもっとも適しているようであった。しかし、Ca の時間的変動のいちじるしいエナメル質の観察には、CAL のみ、あるいは TE との併用により短い間隔と注入後の短い時間内で観察することも必要であった。

#### 3) 注入方法

本実験では、注入方法はつぎにあげる利点から腹側尾部

\* 武田薬品工業株式会社製

\*\* 同仁薬化学研究所製

の筋肉内注射がもっとも適切であるように思われた。

すなわち、その利点として 1) 場所的に注入刺激による危険性が少なかったこと。 2) 注入が比較的容易であったこと。 3) 注入液が体内に確実に注入されるため、注入量による差が標本の上で確実にとらえることができたこと。 4) 注入液と生体 pH の差が体内でなめらかに緩衝されるため、注入によるショックが実験中に生じなかったこと等である。

## 2. 歯および顎骨の発育期の分類

若いワニの歯は同一歯槽窩内で、全時期を通じて、2~3世代の歯を観察することができる(図1)。これは、2生歯の哺乳動物ではみることのできないワニ特有の多生歯性の交換のためである。

この同一歯槽窩内でみられる2~3世代の歯とは、ある時期のある世代の歯(これをAとする)が歯胚(A)として、Aの第1先行歯(これをA<sup>1</sup>とする)の舌側根端部に発生してから、機能歯として、出齦し、萌出し、脱落するまでの間に1つの歯槽窩内にあらわれる発育時期の異なった歯であって、Aが機能歯として発育成長する頃にはつづいてAのつぎの世代の歯胚(これを<sub>1</sub>A<sub>2</sub>Aとする)がつぎつぎと同一歯槽窩内に発育成長してくる。

そこで、ある時期の歯をAとして、Aの歯槽窩内での発育時期と位置的関係により、AがAの先行歯(A<sup>1</sup>)の舌側根端部で発生する時期を第1期、A<sup>1</sup>の舌側根端部で発育しつつA<sup>1</sup>の舌側根端部を吸収し穿孔するまでの時期を第2期、AがA<sup>1</sup>の歯髓腔内に入り、発育成長するがA<sup>1</sup>の

頬側根端部を吸収しない時期を第3期、A<sup>1</sup>の頬側根端部を吸収しはじめてからA<sup>1</sup>を脱落させるまでを第4期、A<sup>1</sup>が脱落しAが出齦萌出する時期を第5期、Aが完全に萌出し、咀嚼機能を営み、つぎの世代の歯<sub>1</sub>Aが歯根を穿孔し吸収をおこなう時期を第6期、<sub>1</sub>Aにより頬舌側根がともに吸収され、脱落せんとする時期を第7期とすると、歯Aの発育過程からみて、これらの各期はそれぞれ、歯胚発生期、歯胚幼若期、歯胚発育期、歯冠完成期、出齦萌出期、萌出機能期、機能晩期としてあらわされる。これらのうちで、前3者は後継歯としてあらわされるAが歯胚の時期で、歯冠完成期は後継歯と先行歯の両方の役割をする移行期で、後3者は、先行萌出歯として、それぞれ、機能的役割を示すので、これらを、第1図に示すように歯胚期、移行期(先行後継歯)、萌出機能期として区分した。

しかも図1に示された発育過程は、歯の世代を考えないで、歯槽と歯槽窩内に存在する歯の発育状態の上から分類すると、図2に示すように、一期\*から三期\*の3つの時期のくり返しであることがわかる。

さらにこの3つの期の範囲を示すために、図3に示すように各期を初期と末期に分けた。本論文では個々の歯のエナメル質、象牙質、セメント質に関しては図1に示す7つの時期について記載し、歯槽突起と歯槽窩壁の変化は図2と図3の分類によって記載した。

これは歯の硬組織の変化はその発生より脱落に至るまでの歯の life circle に関係するが、歯槽突起や歯槽窩壁の変化は歯槽窩内に存在する歯の数とその発育状態によって大きく影響されるためである。

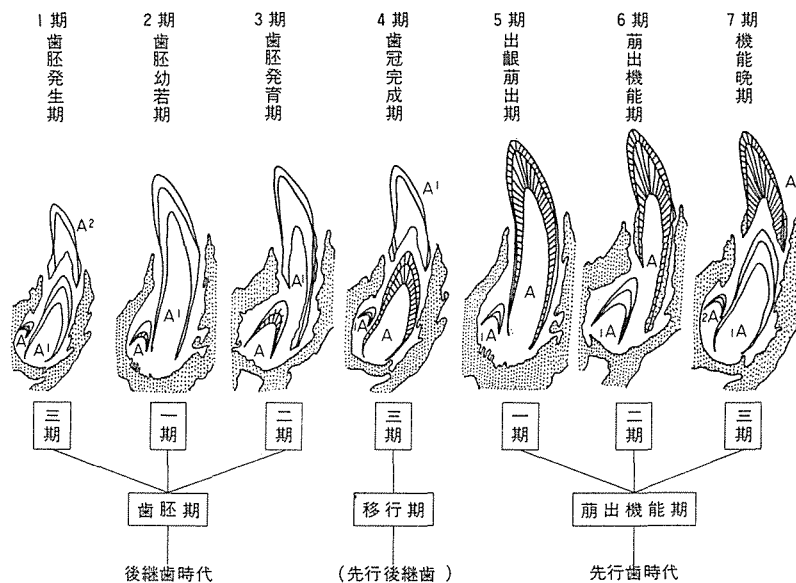


図1. A 歯胚の発生から脱落に至る発育過程が各歯の歯槽窩内の位置的関係より7期に分類される。Aはある世代の歯を示し、A<sup>1</sup>はAの第1先行歯、A<sup>2</sup>はAの第2先行歯、<sub>1</sub>AはAの第1後継歯、<sub>2</sub>AはAの第2後継歯としてあらわす(著者の分類による)。

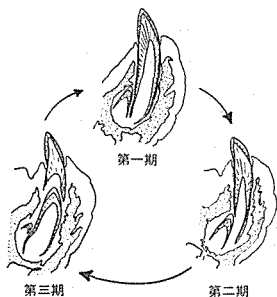


図2. 顎骨の前頭断により観察できる歯槽窩内發育歯のタイプはつねに一、二、三期のうちのいずれかを観察することになる。

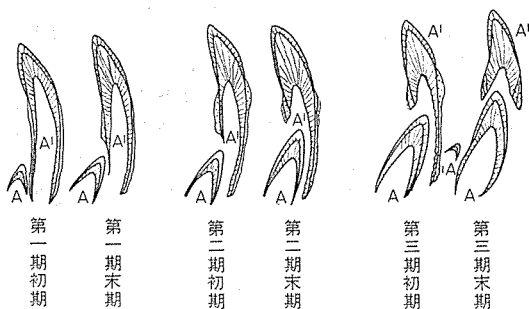


図3. 図2に示す第一期、第二期、第三期における同一歯槽窩内の歯を發育状態によってさらに初期と末期に分けたもの。

### 3. 各期における歯の發育 (図1)

1期(歯胚発生期) : ある世代の歯が発生を開始する期で、歯冠頂のエナメル質と象牙質の形成がおこなわれる。

2期(歯胚幼若期) : この期はエナメル質と象牙質の形成はある程度進行し、歯胚が先行歯  $A^1$  の舌側根端部で發育形成をおこないつつ、先行歯  $A^1$  の舌側根端部に向かって移動をはじめる時期であり、先行歯  $A^1$  の根端部が吸収穿孔されていないときは歯胚  $A$  の發育速度はゆるやかである。この期の發育期間は歯によってかなり差がみられ、大体30~40日前後であるが、歯の種類と周囲の状況により、80日をこえるものもある。しかし後半の吸収移動期は比較的短かく、10~20日の間に移動し、 $A^1$  の舌側歯根の一部が吸収され、ついには穿孔される。

3期(歯胚發育期) : 2期において  $A^1$  の歯根部を穿孔したのち、 $A^1$  の歯髓腔内に入った  $A$  は  $A^1$  の歯髓腔内で

\* 算用数字により示された第1期、第2期、第3期は、1つの歯が発生から脱落に至るまでの間を7つの發育過程に分けて表したものであり(図1を参照)、漢用数字で示された第一期、第二期、第三期は歯槽窩内での歯と歯および歯と顎骨の相互関係をあらわしたものである(図2, 3参照)。

發育成長するが、原則として象牙質の歯髓側からの吸収はおこなない(但し、 $A$  の發育によるエナメル器の圧力により、 $A$  の対抗部分がうすくなっていると思われる部はある)。歯冠の中径は1期の約1.5~1.8倍程度、發育期間は比較的一定しており、30~50日前後である。

4期(歯冠完成期) : 歯胚  $A$  が先行歯  $A^1$  の歯髓腔内で發育し歯冠を完成させる時期であり、つぎの後継歯歯胚がすでに発生しており、同一歯槽窩内に3つの歯がみられる時期である。後継歯から先行歯となる移行期の歯で、 $A^1$  歯髓腔内での發育成長はもっとも活発旺盛である。

發育期間は15~30日前後で比較的短い、歯冠象牙質の發育は外側に急激に巾を広げ、歯冠外形を完成する。

5期(出齦萌出期) : 機能晩期となった先行歯  $A^1$  が脱落した後に、つづいて出齦し、萌出をつづける時期で、歯根形成がもっともいちじるしい。この期の前半において歯根形成の伸びは完了するが、後半期では、 $iA$  の發育・移動により舌側根端部が吸収され穿孔されはじめる。2次セメント質が形成され、骨植が安定する。

この期には後継歯として、幼若期歯胚  $iA$  があらわれる。發育期間は幼若期と同じである。

6期(萌出機能期) :  $iA$  により舌側歯根部が穿孔され、 $iA$  が歯髓腔内で發育成長するために、歯根部の吸収は増加するが、2次セメント質および3次セメント質の活発な形成により、機能歯として充分な骨植が保たれる。その發育期間は歯胚發育期と同じである。

7期(機能晩期) : 歯胚  $iA$  が歯髓腔内でもっとも活発な發育成長をおこなうために、歯髓腔側からの吸収も活発となり、頬および舌側の歯根が吸収されるとともに、歯冠部も吸収され、ついには脱落するまでの期間である。

### 4. エナメル質

1) 第1期(歯胚発生期)~第2期(歯胚幼若期) : 歯胚発生期のエナメル質では、CAL, TE, AL のいずれの螢光も細い發育螢光線としてはあらわれない。形成部全層がdiffuseな螢光帯としてあらわれ、その螢光度はTEがわずかに強く、CAL, AL では非常に弱い(図18, 図19)。

とくに興味あることは、象牙質形成後、エナメル芽細胞が活動してつくられるエナメル質では、もっとも初期(図18)の基質形成期の螢光強度は象牙質のそれよりもはるかに弱いのに対して、やや時間が経過した歯胚(図19)では、エナメル質の螢光強度は象牙質のそれとほとんど変わらないことである。しかし、末期になると、CALによる緑色螢光線が明確な線としてあらわれてくる(図14)。

2) 第3期(歯胚發育期) : この期においてはエナメル質歯冠頂部からこの期までに形成された歯冠中央部にかけて、エナメル質發育線にそってdiffuseなTEの黄色螢光線(図15)とはっきりしたCALの緑色螢光線(図20)をみることができる。

3) 第4期(歯冠完成期) : この期の初期では、歯冠中

尖部から歯頸部付近にかけてエナメル質の發育線にそって、TE と CAL の綠色發育螢光線をみることができが(図16)、この時期の末期、すなわちエナメル質の外形が完成すると、部分的な螢光線はほとんどみられなくなり、エナメル質全層にうすい diffuse な綠色螢光がみられるようになる(図17)。しかし TE や AL の螢光は全層にあらわれることはない。

一方、このころには TE や CAL の螢光が、エナメル葉様構造<sup>10)</sup>の中に認められることがある(図8)。以後、出歯期から機能晩期にかけて、エナメル質にみられる螢光は徐々に減退し、ついにはエナメル質全層が螢光を失いほとんど透明になってしまう(図16)。

## 5. 象牙質

1) 第1期(歯胚発生期)～第2期(歯胚幼若期)：歯冠頂象牙質の発生期には、螢光帯は細い發育線としてでなく、全体に diffuse な螢光帯としてあらわれ(図18, 図19)、この傾向は注入液や注入間隔にはほとんど関係がないようである。しかし、歯胚幼若期には歯胚発生期と異なり、發育成長線にそって細く規則正しい明確な發育螢光線としてあらわれてくる(図14)。またこの期の1日形成量は約5～8 $\mu$ 程度である。

2) 第3期(歯胚發育期)：この期における歯冠象牙質の形成量は、歯胚幼若期よりも多く、歯冠の中径は歯胚幼若期の約1.5～1.8倍程度、長径は2～2.5倍となり、歯冠中央部から歯頸部にかけて象牙質が形成され、歯冠部の大きさは完成した歯冠象牙質の約90%程度までつくられる(図15, 図16)。

先行歯 A<sup>1</sup> の歯髓腔内に入る直前と歯髓腔内に入った直後ではその發育程度はほとんど差はないが、歯髓腔内に入ったのちはその形成量は歯の發育とともに急激に増大する。この時期の1日形成量は約8～15 $\mu$ 程度である。象牙質の發育螢光線も歯胚幼若期よりも發育成長線にそった規則正しいはっきりした線であられる傾向が強くなる。また、歯胚幼若期ではほとんどあらわれなかった AL の發育螢光線も明確にみとめられるようになる(図15)。

3) 第4期(歯冠完成期)：この期には歯胚發育期までにほぼ完成された歯冠形成にひきつづき、歯頸部から歯根部にかけて外方に大きく中径を増加させる。このため歯頸部付近から歯根部にかけて歯冠部よりもはるかに巾の広い大きな歯根形成がおこなわれる。

すなわちこの期は歯冠部歯髓腔の容積を増大させ、次期の出歯期に大きな歯髓腔をもった歯根形成をおこなうための移行期間である。象牙質の1日形成量は歯胚發育期にひきつづき増量し、全時期を通じて最高となり、その1日形成量は15～20 $\mu$ 程度となる(図17)。

4) 第5期(出歯期)：歯冠完成期において、歯冠部の中径を15～20%増大させ歯冠部を完成し、歯髓腔も大きくなったのち、象牙質は歯冠部とともに歯根部でも形成

され、いちじるしい歯根の増大がおこなわれる。このためこの時期に入ると歯根々端部の伸びは急激に増大し、歯髓腔に入る前の歯冠完成期にくらべると約3.5～4倍大となる(図14)。しかしこの期の1日象牙質形成量は歯冠完成期にくらべると、減退の傾向を示すが、まだ歯冠部の最大形成部で12～16 $\mu$ 、歯根中心部で8～12 $\mu$ 程度である。

5) 第6期(萌出機能期)：前期にひきつづき象牙質の形成量は歯冠部、歯根部ともにまだ發育をつづける。しかし、その形成量はますます減退の傾向を示し、歯冠部で約1～3 $\mu$ 、歯根部ではほとんど形成されなくなり、最大形成部で約1～2 $\mu$ 程度にとどまる。

またつぎの世代の歯<sub>1</sub>A の侵入によって歯根部が吸収されるため、<sub>1</sub>A 侵入に対抗する部や、吸収側の歯冠部、歯根部付近などで發育形成線のあらわれ方や象牙質の形成量に差がみとめられるようになる(図4, 図14)。

6) 第7期(機能晩期)：この期に入ると、象牙質の形成は完全に停止し、吸収が活発となってくる。吸収は舌側根端部はすでに吸収されているため、頬側根端部の歯髓腔からはじまり、歯冠部へと進行する(図17)。象牙質の吸収窩縁には、3つの型の吸収像がみられる(図12)。第1型は象牙質の吸収窩縁に再び新しい Ca の沈着がみとめられる像で(図12)、第2型ではその吸収窩縁がまだ吸収をうけていない象牙質と石灰化の程度になんら差を認めない。第3型ははっきりとしたハウシツ窩があらわれないで、吸収窩全体が比較的なめらかな吸収窩縁を示すものである(図5)。

またこの頃には、薬剤注入時より以前に形成された古い成熟象牙質の象牙細管を通じ、TE, CAL, AL が侵入し、象牙細管の中にこれらの螢光を認めることが多い。この傾向は TE ではとくに著明で、強拡大のもとでもはっきりと黄色螢光が認められる(図5, 図9)。

## 6. セメント質

1) 第5期(出歯期)：歯冠完成期において歯冠形成の完了とともに歯根形成がはじまり、歯の中径の増大とともにいちじるしい歯根部象牙質の形成がはじまるが、これとともに歯頸部付近から根尖部にかけて、形成量が均一で、セメント細胞を含まない層状の發育形成線を示す1次セメント質が形成される。

この期におけるセメント質形成量は、この期の歯根象牙質形成量よりやや少なく、1日の形成量は6～8 $\mu$ 程度である(図14)。

2) 第6期(萌出機能期)：先行歯の舌側根端部が後継歯によって穿孔され、吸収が進んでくるところ、吸収側の舌側では吸収のない歯頸部から歯根上部付近で、頬側では歯頸部付近から根尖部にかけて二次的な有細胞セメント質が形成される。その形成量は歯頸部付近では少なく、2～4 $\mu$ 程度で、根尖部に向うにつれてやや増量し、6～10 $\mu$ 程度となる。この期の後半に入ると、その形成量も減退し、一時形成は停止する(図15, 図16)。

ついで、このころより歯頸部付近にやや複雑な發育形成線を示すセメント質が形成され、舌側根端部の吸収とともにその形成量は増大する。したがって、舌側根端部の穿孔部の増大とともに舌側歯頸部のセメント質の形成量（1日形成量 $6\sim 14\mu$ ）は、頰側のそれ（1日形成量 $2\sim 6\mu$ ）にくらべていちじるしく大となり、2~3倍の形成量を示すようになる（図20）。

3) 第7期（機能晩期）：この期に入ると象牙質の吸収が歯髓腔側から次第に活発となってくる（図16~17）。

前の萌出機能期においてはまだ歯の骨植は安定しており、比較的規則正しい周期の發育形成線を示すセメント質が形成され、歯が歯槽突起にしっかりと保持されていたが、内部からの象牙質の吸収、根尖部の吸収が増すとともに、再びセメント質の形成量が大きくなり、穿孔部以外の歯頸部付近や歯根々端部に新しいセメント質が形成され、象牙質やセメント質の吸収を補って、歯根部象牙質の厚さを一定に保っている。これらのセメント質は結合面積を大きくし保持力をつよくするために波状發育形成線を示し、機能歯として働いていることを示している（図5）。

しかし、さらに吸収が進んで、象牙質がある程度までうすくなると、新しいセメント質の形成は減退し、また一部では吸収が休止する。この休止期には吸収縁に新しい石灰塩が沈着されたとみられるつよい螢光を放つセメント質の添加をみることもある（図13）。

この期をすぎると、歯根々端部から歯冠に向って近遠心側のセメント質側からしだいに吸収が進んでくる（図8、図9）。しかしこの時期でも、まだ頰側部ではかなりのセメント質形成がみられる（図8）。さらに吸収がすすみ、ついに歯根は歯頸部付近のみを残す状態となるが、この時点でもなお頰側歯頸部でセメント質が形成され（1日形成量は $1\sim 2\mu$ ）、この状態は歯の脱落直前までつづく（図17）。

## 7. 歯槽突起部（図2、図3）

1) 第一期（歯胚幼若期、出齦萌出期）：この期における歯槽突起部は、第5期出齦萌出期の歯Aのいちじるしい歯根形成により、歯根がのびるとともに、その周囲の歯槽骨や顎骨では活発な骨形成がおこなわれる。

歯槽突起部の形成程度も、第二期、第三期にくらべると頰側骨と舌側骨でかなり差が認められる（図14、図15）。歯槽突起部は形成骨全体に diffuse な螢光がみられるが、薬剤が注入された時期に相当して、新生骨の發育螢光線がとくに強くあらわれ、しかも新生骨は頰側に向ってのびていく。しかし、この期の初期においては、頰側の歯槽窩側からの吸収がはじまっているが、その吸収程度は少なく、前の世代に形成された古い骨がまだ残っている（図14）。

ところが、後半になると前の世代に形成された古い骨は、徐々にその吸収率が増加し、前の世代に形成された古い骨はほとんど吸収されてしまう。その結果この期の末から二期の初期にかけて歯槽窩容積はもっとも大きくなる（図15）。それとともに、外側歯槽突起部の新生骨増生が活発

となり、この部の伸び成長率はこの末期で最大となる。そしてこの歯槽突起部はほとんど新生骨（40~60日以内に新生された骨）とおきかわってしまう。しかし、舌側部は頰側歯槽突起にくらべると、骨の形成が少なく、ほとんど伸長しない（図14~15）。

2) 第二期（歯胚發育期、萌出機能期）：頰側歯槽突起の伸びはこの期に入ってから減少せず、活発な骨形成がみられ、舌側歯槽突起の形成は一層少なくなる傾向を示す。しかし先行歯の歯根舌側穿孔部が拡大するとともに、頰側歯槽突起での骨形成はほとんどなくなる。第一期末からこの期を通じて、歯槽突起では古い骨と新しい骨の發育線は不明瞭に入りまじり、各螢光線の境界がはっきりしなくなる（図15、図20）。

第一期から第二期初期における先行歯の發育と歯胚の頰側移動にともない、頰側歯槽突起がいちじるしく伸びるとともに、頰側歯槽窩壁が吸収されて歯槽窩容積が増大するため、舌側歯槽突起は頰側歯槽突起ほど伸びる必要がなく、むしろ歯槽窩容積が大きくなるにつれてうすくなった歯槽骨をおぎなうため内壁に添加形成がおこる。

しかし、第二期の末から、頰側歯槽突起の伸長は、次第に減退の傾向を示すとともに、逆に舌側歯槽突起部は、徐々に形成率が増加し、發育形成線も明確になってくる（図16）。

3) 第三期（歯冠完成期、機能晩期）：この期に入ると、頰側歯槽突起では新生骨の伸びはさらに少なくなり、新生骨の形成は一時休止する。歯A（図1、第7期機能晩期）の吸収が進行し、Aに対応する頰側歯槽突起の形成が減少するか停止すると、舌側歯槽突起部の伸びも再び減少し、休止期に入る（図16~17）。これらの現象はAの脱落が近づくために生ずるものと思われる。

しかし、この期の末には、すでにA（図1、第7期）がいちじるしく發育成長し、これに対応して歯槽窩内縁から歯槽突起外縁にかけて新生骨の形成が、頰側、舌側ともに活発となり、一期へと移行する。しかも、三期末から一期への移行期の新生骨は、diffuseな螢光が強く、Caの移動が活発におこなわれていることを思わせる（図17）。

## 8. 歯槽窩基底部の骨梁

歯槽窩基底部骨梁は、たえず吸収と形成をくりかえしているが、骨形成は主に外側に向って規則正しく進行するものと、内側部の吸収をおぎなうために添加形成するものとがみられる。

骨吸収は主に内側部からおこなわれ、歯胚の發育とともに吸収部は大きくなるが、ある程度吸収されると外部からも吸収がおこり、その速度を速めるようである。

まず、第一期（第2期歯胚幼若期）で歯Aの發育初期では、まだ歯槽窩基底部は外部へと形成がすすんでおり、内部からの吸収はない（図14）。

第一期の終り頃から歯胚の發育がすすむとともに内側から吸収がはじまり、しだいに活発となるが、外部への骨形

成も同時に進行している(図16)。

しかし、歯胚の發育とともに骨吸収が骨形成よりも大となり、その結果骨が全体としてうすくなると内部からも突起状の骨が添加され、骨梁は一定の厚さを保持しようとする(図10)。

さらに吸収が活発となってくると、部分的に外部からの吸収もおこり、一部では骨が穿孔される(図15)。しかし、その部はまもなく、新しい骨により閉鎖される(図16)。

このような吸収と添加のくり返し現象は、第三期の後半までみられ、この間に前の世代に形成された古い骨はほとんどなくなってしまふ。そして、つぎの歯胚 $\mu A$ の発生とともに再び新しい骨の形成が活発となる。すなわち、齒槽窩基底部の骨梁は、歯胚が発生し、脱落するまでの間に、完全に新しい骨と入れかわってしまう。

### 9. 齒槽窩壁の骨

1) 第一期：齒槽窩壁の骨の吸収は、歯Aの出齦萌出期における歯根と齒槽突起のいちじるしい伸長とともに、齒槽窩容積は急激に大きくなるが、この際、頰側齒槽窩壁の骨はもっともよく吸収されるため、この期の終りには頰側齒槽窩壁では、前の世代に形成された古い骨はほとんどなくなってしまふ(図14~15)。しかし、この期では、なお、齒槽窩基底部で骨梁形成がみられ、前の世代にひきつづいて骨の添加形成が進行しており、また舌側齒槽窩壁でも骨の吸収像はみられず、添加形成が進行している(図14)。

2) 第二期：この期に入ると、頰側齒槽窩壁の骨はあまり吸収されなくなり、後半には一時的に吸収を停止し、骨の添加形成が始まる(図16)。しかし、第一期とは対称的に齒槽窩基底部から舌側齒槽窩壁にかけて、歯胚 $\mu A$ の發育によっておこる骨の吸収が添加形成よりも活発となり、次第に骨添加が少なくなり、この期の末には、この部分にほとんど新しい骨がみられなくなる(図16)。

3) 第三期：第二期にひきつづき、この期に入っても、なお、つぎの世代の歯 $\mu A$ がいちじるしく發育成長するために齒槽窩壁全体に吸収がひろがってくるが、この期の末からさらにつぎの世代の新しい歯胚 $\mu A$ が発生し、齒槽窩壁に新しい骨梁の形成がはじまる。また齒槽窩基底部にも、新生骨の添加形成がみられるようになる。このようにして、骨の添加は次第に齒槽窩壁全体にひろがり、第一期へと移行する(図17)。

### 10. 顎骨骨体部

顎骨骨体部における骨増生は主に、顎骨の外周にみられ、齒槽窩内壁では吸収がおこなわれ、顎は全体として大きくなるとともに齒槽窩も大きくなる。

とくに、骨体内部の海綿骨では、新しい骨梁が形成される(図6)、骨梁の立体的構築がはじまり、これが支柱となつて、大きな骨髓腔壁を形成し、その部からさらに内部に向つて骨の添加が進行し、全体として網目様の螢光線を示す骨構造を形成する(図21)。

一方、ち密骨では骨の外周縁にそつて、新生骨を規則正

しく積み重ねるとともに、内部ではたえず骨小管を通じて新しい骨と古い骨の置換がおこなわれる(図22)。また、外周骨においては、ハバース管主幹と思われる部分からの改造も認められる(図7)。

これらのことから、骨体内部の骨髓腔壁、osteon、骨梁などで、さまざまな様式の骨の吸収や増成がおこなわれ、たえず骨組織の構築に改造や置換が加えられていることがわかる。

## 考 察

1. ワニの歯について：ワニは他の爬虫類や魚類と同様、多生歯性動物であるが、その歯の保持形態齒槽を有する thecodont type で現在地球上に生存する爬虫類のうちで、歯根膜をもつ唯一の動物であり、歯と齒槽との関係はもっとも哺乳類に似ているとされている<sup>11,21</sup>。

しかも、魚類や他の一部の爬虫類にみられるようなエスカレーター式萌出とは異なり、後継歯が先行歯の骨髓腔の中に入って成長するという特異な様式をとるものであって、哺乳動物の歯の交換現象に似ている。ことに、齒槽窩内での結合組織線維の発達をよく、同一齒槽窩内で、つぎつぎと歯が出現する<sup>16)</sup>。

2 生歯性哺乳動物の場合、第1生歯の萌出期間は比較的短かく、第2生歯は一生機能歯として働らくものであり、したがつて萌出後、機能する期間は長い。しかし、乳歯はそれが機能を営む期間中に歯根の大部分が吸収され、その骨植均衡が弱められる。これに比較すると、ワニの歯は、生涯を通じ、たえず發育、交換しており、それぞれの萌出機能歯の歯根は根尖孔の完全な形成をまたないでつぎの世代の歯が發育成長するために吸収される。すなわち、ワニの萌出歯の歯根は、歯が機能歯として働いている期間の大半はすでに、歯根が吸収されており、2生歯性動物の永久歯のように歯根表面のすべてが骨と完全に結合した骨植状態で機能を営んでいるのではない。したがつて、どちらかという哺乳動物の乳歯に似た状態にあるといえる。

これらのことから、ワニは歯の交換という現象を研究するには、興味深く、有用な実験動物といえよう。

また、別の観点から、ワニは本来爬虫類に属するものであるが、その中でも哺乳類にもっとも近接した動物で、archosaurs の中で唯一の研究材料であり、dinosaurs との比較研究は進化的、系統發生学的見地から興味深い知識を提供すると報告されている<sup>21,14),15)</sup>。

一方、ワニのもっとも初期の歯胚(第1生歯)は卵生時に他の動物と同様、口腔粘膜上皮から発生するが、ふ化後、機能歯になるまでには、何回か歯の交換があるとされている<sup>2-4)</sup>。そのためふ化したときにはすでに機能歯を含め、2~3世代の歯を齒槽窩内で観察することができる。

しかし第2生歯以後の後継歯々胚の発生に関しては、まだ定説がなく、歯胚近くの間葉組織内に口腔粘膜上皮から

離れた上皮索が存在する事実から、この上皮索が一生涯歯を生み出す源泉になることも記載されているが<sup>2)</sup>、一般的には先行歯のエナメル上皮の増殖によりつくられると考えられている<sup>9), 14), 15)</sup>。

また、歯胚発生時に、先行歯のエナメル上皮が増殖し、この上皮と間葉組織内に口腔粘膜の一部分から分離したと思われる上皮細胞が増殖し、両者が交叉することも認められているが<sup>10), 16)</sup>、後継歯歯胚の発生機構については、まだはっきりとした定説はない。これらのことについては別の機会にゆずる。

歯の交換については、Edmund (1960<sup>14)</sup>, 1962<sup>15)</sup>), Parrington (1936)<sup>6)</sup>, Romer (1940)<sup>8)</sup> らがワニの歯は同一顎内で、相互の歯に影響を与えながら顎にそって移動するという規則正しい交換の pattern があることを認め、この pattern によって同一顎内での相互の歯の発育関係がコントロールされていると考えている。したがって、同一顎内に、歯の発生から脱落、交換にいたる異なった時期の歯があり、同一個体でいろいろな歯の発育、交換現象を観察することができるわけである。

2. 硬組織発育の標示法： 骨の発育変化を知る方法として、古くからX線、metallic implants あるいは dried bone の計測などがある。しかしこれらは成長の結果からその過程を推定するもので、骨発育の全体的な変化を知ることができるにすぎない。

生体染色により連続的に骨の発育成長を知る方法としては、アカネを豚の餌の中に入れることにより、骨の発育や改造の変化を知ろうと試みられたのがはじめて、その後、AL がアカネから分離され、Trypan blue とともに、歯や骨の発育研究の生体染色剤として利用されるようになった<sup>19-22)</sup>。

これと前後して、酢酸鉛法が発見され<sup>23)</sup>、この方法を利用した顎骨の発育や歯の発育および歯の移動に関する報告が数多くなされている<sup>24-26)</sup>。

つづいて、アイソトープ <sup>45</sup>Ca の硬組織への応用が考えられ、これが新生骨質部と古い骨質部の差をみるのに適したトレーサーであることがわかり、<sup>45</sup>Ca を用いて歯や顎骨の発育状態が調べられるようになった<sup>27-29)</sup>。また AL との併用による比較観察もおこなわれた<sup>30)</sup>。

さらに抗生物質である TE が人間や動物の発育しつつある骨や歯にとりこまれ、しかもその部が紫外線照射により、螢光を発する性質があることが明らかにされて以来、TE の硬組織への沈着機構や沈着分布が知られるとともに<sup>31), 32)</sup>、<sup>45</sup>Ca との比較観察<sup>33), 34)</sup>や、TE と硬組織の減形成に関する報告等がつつぎとあらわれた<sup>35), 36)</sup>。

Bevelender は TE 標示法を、アイソトープによるオートラジオグラフィ法と比較し、TE 標示法の利点として (1)薬物の入手が容易であること。(2)標本が永持ちすること。(3)取扱いや貯蔵が容易であること。(4)その投与や沈着部位の同定が容易であること。(5)微量投与すると

障害のないことをあげ<sup>37)</sup>、須賀は使用目的によっては TE がアイソトープにかわって硬組織の有力なトレーサーとして使用できることを指摘している<sup>38)</sup>。

### 3. 三色螢光標示法

以上の事実からも、TE が硬組織の有力なトレーサーとして使用されつつある。しかしさらに本研究の意図するような硬組織の長期にわたる経時的成長や変化を観察するためには、1種類のトレーサーでは、吸収添加が複雑に入りまじった硬組織の内部変化を追求することはむずかしい。最近 Cleall 等により、長期にわたって骨組織を観察する試みとして、TE, AL, Trypan blue, Acid alizarin blue など種々の生体染色剤を用いて、ラットの骨発育を比較検討した報告<sup>39)</sup>や、Suzuki らによる TE と 2, 4 bis [N,N'-di (carbomethyl) aminomethyl] の二色螢光標示法による報告がなされるようになってきた<sup>40)</sup>。

しかし、これらの報告もまだ生体染色剤の応用評価の域を脱せず、ラットや家兎の象牙質や脛骨などのように単純な生長発育変化を示す材料を用いた予備的な実験で、注入液の濃度、注入量、注入方法などにおいて改良すべき多くの点を残している。

そこで、われわれは生体染色剤として応用され得る薬剤について、注入液の濃度と注入量、注入方法、注入間隔をしらべ、TE, CAL と AL の3つの螢光剤を適切に使用することによって、三色螢光で硬組織の発育を標示し、複雑な硬組織の発育成長変化を長期にわたって観察できることを見出した<sup>41)</sup>。

なお、三色螢光標示法に使用された薬剤のうち CAL と TE の注入量は、一般に形成障害を誘発させるといわれる分量よりは、はるかに少ない分量によりおこなわれ、標本の上では硬組織形成が障害されたという像はみられなかった。しかし、CAL では kg 当り 40mg でも、多量の TE 投与時に似た硬組織の形成障害が認められるともいわれているので<sup>42)</sup>、これらの点についてはさらに検討を進めてその応用を広げていきたい。

### 4. 三色螢光標示法に利用された3つの螢光標示薬の特質と硬組織との関係

1) Alizarin red S: AL は1924年にすでに、Robiquent と Colin がアカネを主成分として分離しており、1931年には Perkin と Story が alizarin monosulfonic acid のナトリウム塩として合成したもので<sup>43)</sup>、これは酸性染料として分類されているが、alizarin 自身は染色剤ではなく、組織の中に添加されると金属性の水酸化物により不溶解性の pigment や lake を作るため、アルカリ性溶液では溶解するが、水には難溶性を示す。

しかし、alizarin をスルホン化したナトリウム塩は水溶性で、1~2%水溶液は 2.6 < pH < 3.0 (製品により多少異なる)を示すが、これを pH をあげるためにアルカリ性溶液を点滴すると viscous gel が生成され、注入液として

は不適当なものとなる。したがって、使用に際しては、1% Alizarin のリンゲル液をそのまま使用するか、あるいは、これにあらかじめつづいておいた酢酸緩衝液を加えて pH を調節したのち ( $4.3 < \text{pH} < 4.8$ ) 使用するとよい。

注入液として報告されている AL の濃度は骨の発育成長部をはっきりと示すためには 2% 水溶液がもっとも適しているといわれ、Hoffman ら<sup>44)</sup>、Schour ら<sup>45)</sup> は 2% 溶液を用いており、体重 kg 当り 100 mg が必要であるとしている。

Cleall らは雄の Sprague Dowly rats を使用した場合、kg 当り 4% の溶液 300 mg を標準液とし、300~400 mg までが安全範囲であるとしている<sup>39)</sup>。Adkins は 1% 水溶液を使用しているが、kg 当り 25mg では普通照明では観察できないが、紫外線下では蛍光を観察することができることと報告している<sup>46)</sup>。

一方、著者は 1% AL のリンゲル液を体重 kg 当り 30~80 mg の割合でワニの腹側尾部基底部に筋肉注射し、歯および骨の中で Alizarin の蛍光をみるには 50~70 mg/kg で充分であるが、70~80 mg/kg 注入する方が鮮明で確実に蛍光線を得ることができることを知った。

2) ドータイト Calcein : Calcein は Fluorescein Complexone, Fluorescein, Calcein W などともいわれ、いずれも Carboxymethyl-aminomethyl complexone 誘導体で、古くから Diehl<sup>47)</sup> らにより合成され、 $\text{Ca}^{2+}$  のキレート滴定用金属指示薬として紹介されたものであるが、当初の Calcein はその性能の点で鋭敏度に欠けるものであった。

本研究に使用した CAL, 3,6-Di-hydroxy-2,7-bis[N,N'-di (carbomethyl) aminomethyl]-fluoran は初期の Calcein とは異なり<sup>48)</sup>、Körbl らの Fluorexone, Wilkins ら<sup>49)</sup> の Calcein W に相当し、純度が高く、非常に鋭敏な蛍光指示薬である。Calcein はアルカリ性ではそれ自体は蛍光を発しないが、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$  の存在で緑色蛍光を発するので、金属指示薬として最適のものであるといわれている<sup>48-50)</sup>。とくにアルカリ土類金属の定量には、その蛍光強度は、pH 8 をピークとし、生体 (pH 7.4) でも充分にその性能を発揮する。

Körbl<sup>51)</sup> らは 0.025N NaOH アルカリ性で、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$  の指示薬として、とくに  $\text{Ca}^{2+}$  に対してもっとも鋭敏であることを認めており、Reyden<sup>52)</sup> は、NaOH 中にある微量の  $\text{Ca}^{2+}$  の定量に利用しており、Bozhevol'nov ら<sup>53)</sup> は紫外線照下で 0.1N KOH 中の  $\text{Ca}^{2+}$  の微量定量に利用している。また、Calcein の金属イオン定量に際して、 $\text{Ca}^{2+}$  への利用がもっとも多く<sup>48)</sup>、<sup>50)</sup>、リン酸の影響を受けることも少なく、 $\text{Mg}^{2+}$  共存下の  $\text{Ca}^{2+}$  を EDTA で滴定する場合、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$  の妨害がなく、しかもナトリウム塩が大量に共存してもさしつかえないとされている<sup>48)</sup>。

その他一般分析、生体試料分析への利用あるいは in vitro における臨床用分析利用として血しょう、血液、尿

溶血、黄だん血などの Ca 定量にも応用されている。しかも、その際、10ml 中の 0.2 $\mu\text{g}$  の Ca を定量できるといわれる<sup>48)</sup>。このことは、生体内に注入された微量の Calcein でもって、生体組織中の微量の  $\text{Ca}^{2+}$  に対しても充分に反応を示すことが想像される。

Suzuki らは Calcein の異体性である 2,4 bis[N,N'-di (carbomethyl) aminomethyl] の使用に際して、これを 0.2N の強アルカリ KOH 水溶液中に溶解したものを体重 kg 当り 25 mg という多量を注入している<sup>40)</sup>。

Calcein は水に対する溶解濃度が低く、pH < 12 の溶液では完全に溶解しにくいいため、アルカリ性溶液の中で溶解させるのであるが、NaOH 溶液は back ground の蛍光度を高め、観察を不正確にするため、KOH 溶液がよいといわれている。

われわれはまず CAL 100mg を 0.050~0.055 N KOH 水溶液 (pH=12) 20 cc に溶かし、さらに必要に応じ、これに 2~4 倍の生理食塩水を加えて (40~80cc にする)、希釈したものを筋肉内注射で生体内に注入した。

注入量は体重 kg 当り 4~8mg 程度でも必要かつ充分な量である。これは TE や AL の注入必要量にくらべ、はるかに少ない量である。

また、CAL の注入により、あらたに形成されつつある硬組織にとり入れられてあらわれる緑色の蛍光分布線は、TE では diffuse にあらわれる傾向を示すのに、CAL でははっきりとした蛍光線として示される。さらにまた、TE ではあらわれにくい成熟期のエナメル質でも鮮明な蛍光発育線を示すこと、あるいは、硬組織に対する TE の沈着現象が複雑な機構によっておこなわれると想像されているのに対して、CAL は Ca に特異的に結合し、Calcein-calcium の蛍光としてあらわれることである。これらの特性は複雑なエナメル質の石灰化発育過程の応用に際しても TE による蛍光分布線よりは説明がつけやすい。

したがって、CAL は TE とともに生体の硬組織の生体染色剤として有能なトレーサーとなり得るであろう。また、TE や他のトレーサーと併用することにより、その性能を一層発揮するものと思う。

3) Tetracycline (TE) : 最近 TE が硬組織、とくに骨や象牙質、セメント質等における trace element として多く利用されてきている。

これは TE の蛍光集積分布がこれらの硬組織に対しては radio calcium の accumulation や retention の分布とよく一致し、今なお、初期の研究者である Frost や Villaneuva<sup>54)</sup>、Bevelander<sup>55)</sup> の意見が、現在の多くの人達の意見とも一致しており、これらの硬組織の研究に対しては、操作が困難で、危険性をともなうアイントープの使用よりも有効かつ実用的であるとされているからである<sup>37)</sup>、<sup>38)</sup>。

しかし、エナメル質に関しては、TE のとり込みによる蛍光集積分布に対する意見は、過去の報告においてもまちまちであり、意見の一致をみない。

これは、エナメル質に対する蛍光分布は、骨や象牙質、セメント質と異なり、その石灰化進行過程の Ca の沈着量が基質形成期から成熟期の時間的推移にともない、いちじくしく変動することや、TE の蛍光減退がエナメル質の maturation における有機性基質成分の脱出と結びつけられるという報告や<sup>34), 38)</sup>、これに関連して、エナメル質中の TE 蛍光は有機性基質成分の脱出が妨げられていると考えられる石灰化減形成部のみ強くあらわれているという報告<sup>35)</sup>など、エナメル質中の TE 蛍光出現の機構に対する解釈は種々である。これはエナメル質の石灰化機構の特殊性によるものであろうが、一方、これらの TE が硬組織の無機成分のみ関係するという報告<sup>56)</sup>に対し、最近の TE と <sup>45</sup>Ca の同時注入による研究や組織化学的研究によると、エナメル質中の TE 分布がアミノ酸に関係することから、これがエナメル質中の有機成分を構成する蛋白質と関係するという報告もみられ<sup>34), 38), 57)</sup>、TE が無機質の結合のみによるのではなく、新しく形成されつつある有機性基質にも結びつくと考えられている<sup>34), 57)</sup>。

著者も、TE のエナメル質にあらわれる蛍光集積分布が CAL のそれとはかなり異なることや、さらに TE が歯根膜、骨髓、歯髓等の軟組織の有機成分にも付着し、かなり著明な蛍光を示すのに対して、CAL は象牙前質、エナメル前質や類セメント質、類骨質等には沈着して強い蛍光を示すが、軟組織に対しては、蛍光を示さないことを観察した。

また、有機成分に沈着したと思われる TE の蛍光は、TE が組織に結合したときにはじめて発するもので、その蛍光の消失はラベルされた組織の移動によるためとする報告<sup>58)</sup>や、TE 自身は pH<10 ではその蛍光の強さが極度に弱くなり、ほとんどみることができないという報告があり<sup>59)</sup>、もしこれらの報告が正しければ、TE は軟組織の有機成分や象牙線維あるいは象牙質の基質とも結合することも考えられる。

なお、さらに興味あることは、エナメル質の成熟とともに蛍光集積が減退する現象である。この現象は TE は CAL よりも早くあらわれ、TE は歯冠完成期初期にはすでにエナメル質中にみられる葉様構造<sup>18)</sup>にあらわれるだけで、その他の部にはほとんどみられなくなるが、CAL はその後、エナメル質の形成期を通じてしばらく全層にわたってびまん性に存在する。しかしこの蛍光もエナメル質の成熟が進むにつれ、ほとんどみられなくなる。

**5. エナメル質：** 歯胚発生期におけるエナメル質の初期基質形成期では、CAL による蛍光集積分布は、diffuse で非常にわずかな蛍光を認めるにすぎないのに対し、TE による蛍光集積分布は、やはり diffuse ではあるが、CAL より蛍光強度はかなり強くあらわれる。このことは、基質形成期では有機性基質成分の形成が主体で、無機成分とくに Ca の沈着が少ないことを思わせる。

つぎに象牙質がある程度形成された發育形成期では、

TE、CAL とともにその蛍光集積分布は、明瞭にあらわれるが、TE のそれは幼若期とさほど差をみとめない。しかし、CAL のそれは、鮮明度においてはるかに著明で、象牙質にあらわれる蛍光發育線と区別がつけにくいほどである。

このことは、この期には主として Ca の沈着がおこなわれるため、TE の蛍光集積分布強度はエナメル質中の有機成分の形成の程度に比例するものと思われる。

しかし、歯冠完成期に入り、エナメル質の外形形成が完了したのちは、TE の蛍光集積分布はエナメル葉様構造以外にはほとんど認められなくなる。このことはこの時期にはエナメル質中の有機質の脱出がおこっているものと考えられ、CAL のそれに変化のないことは Ca の移動が少ないことを示している。

しかし、さらに發育が進み、萌出機能期に入る頃より、エナメル質の maturation の進行にともない、エナメル葉様構造にみられた TE の蛍光がなくなり、CAL の蛍光も徐々に減退し、ついに認められなくなる。このことはこの時期には Ca の移動が少なく、新しく Ca が侵入し、沈着することがないためと思われる。

なお、AL の蛍光集積分布は全時期を通じて、エナメル質にはほとんど認めることができなかった。

これは、AL がエナメル質成分(無機質、有機質ともに)に対して沈着しにくいのか、あるいはこれらの alizarin 化合物の強度が CAL や TE にくらべて低いことによるものと思われる。

しかし、以上のような事実から、エナメル質の發育過程は象牙質のそれとは異なり、發育時期により、エナメル質への CAL と TE の蛍光集積分布の様相が異なり、エナメル質形成初期には有機性基質成分と無機成分の増減が著明で、Ca<sup>2+</sup> の反応も相当異なることが推測され、ワニのエナメル質においても、やはり、哺乳動物のそれと同様、複雑な石灰化の特殊機構があるものと思われる。

## 6. 象牙質

象牙質は歯冠部で厚く、根尖に向うにしたがって次第に薄くなり、根尖孔は広く開放しているが、根端の象牙質はやや内方に曲がっている。

形成が進行している象牙質では、歯髓腔壁に新しく分化した象牙芽細胞がならび、新生象牙質が形成されると蛍光物質の注入時期に応じて發育蛍光線があらわれる。

蛍光發育線によって示される象牙質の形成量は歯冠完成期までは歯胚の發育とともに増加するが、出齦萌出期以後は、次第に少なくなり、晩期に入ると、ついにその形成は停止する。

哺乳動物の象牙質の石灰化はエナメル質と異なり、最初からほぼ本来の石灰化程度まで石灰化するといわれており、形成時期による差は少ないといわれている。

しかし、もっとも初期の歯胚では歯冠頂形成時に、TE のびまん性蛍光集積がみられるが、CAL による蛍光集積は弱く、かすかに認めるにすぎない。これは、この時期の

象牙質には Ca の沈着が少ないためと思われる。しかし、歯冠がある程度形成されると、程度の差はあるが、注入時期に相当してあらわれる3種の色素の蛍光集積は、いずれも線としてはっきりと示されるようになる。

さらに、出齦萌出期に入り、後継歯々胚が発育し、歯が移動しはじめるとともに、後継歯の侵入側に対抗する象牙質の部分に限局して、形成量の減少が生ずる。これはおそらく、後継歯の移動によって生じる圧力のためと思われる。

また、象牙質形成部の蛍光線はくわしくは2つの層に分けることができる。すなわちその一つは、注射前にすでに石灰化がはじまっていたと思われる層にあらわれるもので、他の一つは、すでに石灰化した象牙質の象牙前質に接するところにあらわれるものである。

後者の蛍光線は、時間の経過とともに、線の中を増してくるが、ここは注射後に新しく石灰化がはじまったため、象牙質の中に蛍光剤がとり込まれた部分である。この層は蛍光線のあらわれ方がもっとも強く、薬剤が体内に存在している限りとりこまれる部分であると思われる。その理由として、TE のように体内での貯留時間が長いものでは、kg 当り 100mg も注入すると、8週間以上にわたって形成された象牙質層全体に diffuse な強い蛍光集積を残し、ときには、象牙質の発育線にそって、蛍光の強弱を示す発育線としてあらわれることがあり、1回の注入にもかかわらず、あたかも2回以上の注射によってあらわれたような像を示すことがある。

本研究に使用した3つの蛍光剤の注入量では、TE(20~40mg/kg) で1回の注射により新しくあらわれる蛍光線の中は、注射後、4~7日の間に新しく形成された象牙質の中として示され、CAL(4~8mg/kg) や AL(60~80mg/kg) では3~4日前後の象牙質の形成量の中を示した。

したがって、この巾径は形成率の高いところでは、太い巾をもった線として示され、形成率の低いところでは、細い線となって示されるようである。

ところが、他の一つの層、すなわち注射前にすでに形成されていたと思われるところの蛍光線は、おもに、象牙細管の中に蛍光集積がみられる(この蛍光集積はTEではとくに著明にあらわれる)。

これは生体中の pH では、TE そのものの蛍光性はごく弱く<sup>59)</sup>、また CAL や AL もそれ自身は蛍光を発する性質のものではないといわれるから<sup>59), 60)</sup>、これらの蛍光剤が象牙質の無機質や有機成分と化学的に結合した状態で蛍光を発しているものと考えられる。このことから、ワニの象牙質は発育がかなり進行したのちでも、象牙細管壁で石灰化が進んでいることが想像される。

また、吸収窩縁の近くで、象牙細管が吸収窩に開放しているところでは、まだ吸収をうけていない象牙質の象牙細管壁にとくに著明な蛍光集積がみられる傾向がある。さらに吸収窩縁近くの象牙質にしばしば強い蛍光があらわれる

が、これは吸収が一時休止し、その部分に Ca が再沈着したものである。

## 7. セメント質

セメント質は、形成時期により、1次セメント質、2次セメント質、3次セメント質(hypertrophic cementumともいうべきものであるが、ワニでは常にみられるので生理的なものと考え、このように名付けた)の3種類に分類することができる。すなわち、1次セメント質は、歯根象牙質の形成にひきつづいて形成されるもので、全層がほぼ均一な無細胞層を示し、その形成時期や形成量は歯根象牙質のそれとほぼ同じで、根端部は象牙質と同様、根尖にむかうにしたがい少なくなっている。

2次セメント質は、うすい1次セメント質の外周にそって形成されるもので、有細胞層を示し、歯頸部から根尖部にかけて形成され、その形成量は1次セメント質よりもやや多く、1次セメント質とは逆に根尖部にむかうにしたがい増量する傾向がある。そしてある程度形成されて歯根部の厚さが一定すると、形成が停止する。つづいてこのセメント質は歯頸部付近で形成されるようになるが、その形成量も少なく、萌出状態が機能的に安定している時期に形成されるものである。

3次セメント質は、後継歯が発育して先行歯の歯髓腔内に侵入し、先行歯がいちじるしく吸収されるため歯を顎骨に保持しようとして形成されるセメント質で、膠原線維を多く含む有細胞層を示し、おもに、歯根々端部および歯頸部に形成される。とくに吸収されている象牙質と反対側の根端部および歯頸部付近によくあらわれる。このセメント質の形成と吸収は歯の交換の状況に応じて増減し、先行歯と機能的に顎骨に保持するために合目的におこなわれているようである。

このセメント質の1日あたりの形成量は1次セメント質や2次セメント質にくらべると大きく、その発育線は1次セメント質や、2次セメント質とは異なり、常に歯の外周に一致して形成されるとはかぎらず、しばしば波状発育形成線としてあらわれてくることがある。これは表面積を大にして歯と顎骨の結合を強固にしようとするもので、ヒトの歯などにみられる肥大セメント質や、棘状セメント質に相当するものであろう。このセメント質の組織構造は線維骨のそれによく似ている。

一方、セメント質の蛍光線のあらわれ方は1次セメント質では、象牙質のそれと非常によく似た蛍光集積を示すが、3次セメント質では線維骨のそれとよく似ている。

2次セメント質、3次セメント質においても2種類の蛍光線がみられる。その一つは無機塩のさかんに沈着しつつある部分に相当してあらわれる高濃度の蛍光集積で、骨では類骨質にもっとも近いところにあられる。他の一つは、形成されてから相当時間が経過し、無機塩の沈着が休止したと思われる層に diffuse にあらわれる低濃度の蛍光集積である。2次セメント質の蛍光線はどちらかといえば、象

牙質や1次セメント質のそれとよく似ているが、セメント小腔に螢光集積がみられる点異なる。セメント小腔や骨小腔の壁にそってあらわれる強い螢光集積は前者に相当するもので、ここでは無機塩の沈着がさかんにおこなわれているのであろう。

#### 8. 齒槽突起と齒槽高壁の骨

齒槽突起部と齒槽高壁骨は、古い歯と新しい歯の交換にともないもっともいちじるしい消長現象がみられるところで、この間、Caの移動も活発におこなわれているようである。

歯の交換に際しては、まず、古い先行歯を保持している齒槽突起の上部内縁から吸収が開始される。その吸収窩縁では、まさに萌出しようとする新しい歯の發育成長にさきだち、骨の添加形成が開始され、その歯が發育するとともに、齒槽窩内壁全体にわたって添加形成が活発となってくる(機能晩期末期)。

そしてついに古い歯が脱落すると、つぎの世代の歯の齒根がいちじるしく伸び、歯は口腔内に萌出するとともに、近心頰側の方への移動する(出齦萌出期)。その結果、主として、頰側の齒槽窩内壁がいちじるしく吸収され、齒槽突起の頰側外縁では骨の増成がおこなわれる。しかしこの間、舌側齒槽突起部の伸びはほとんどみられない。

このようにして、齒槽窩の容積を増大させるとともに、舌側齒槽内壁から齒槽窩基底部にかけて、添加形成が進行するわけである。

しかし、歯が完全に出齦萌出すると、齒槽突起の頰側外周骨の形成は休止するが、逆に、この頃から舌側齒槽突起の伸びが進行し、頰側齒槽内壁にもわずかではあるが、添加形成が開始され、歯の骨植性が安定する(萌出機能期)。

しかし、つぎの後継歯が發育成長して、齒根の吸収がさかになると、一時的に3次セメント質との結合対抗部に添加形成がおこり、保持機能を回復させるが、ついにその結合が弱くなり、歯の脱落期となると、ふたたび齒槽内縁部から吸収が開始し、つぎの世代の歯と入れかわる(機能晩期前期)。

このようにして、萌出機能から機能晩期にかけて齒槽高壁の付近で、先行歯を保持していた骨と後継歯を保持する骨の完全な入れかえが、骨の吸収と添加によりおこなわれる。

また骨質にあらわれる螢光線は、2次セメント質、3次セメント質とほぼ同じで、やはりさきに述べた2種類の螢光線がみられる。

#### 9. 歯と顎骨の發育関係

実験中のワニ(入手時、頭蓋長は35~40mm、体重は40~60gであった)の頭蓋長は、1年間で約2~3倍程度發育する。

ワニの体重や身長の發育は、個体や環境によっていちじるしく差があるが、頭蓋長の發育はほぼ一定しているといわれる。これは、爬虫類全般に通じていわれることで、古

くから爬虫類の年齢は、頭蓋長によって推測されている<sup>2)</sup>。

ワニは、ふ化したときすでに機能歯をもっており、咀嚼活動ができる状態になっている。そのうち、生涯を通じて10数年の間にその体重はすくなくとも1000倍、頭蓋長は10倍程度に發育するが、歯の数は変わることがない。

したがって、歯の交換によって歯が大きくなるとともに、顎骨を大きくして一定の数の歯を収容できるようにすることが必要となってくるのである。後継歯の齒冠径は先行歯のそれよりも約15~20%増大する。

その間、歯の増大にともない、頰側の齒槽突起がいちじるしく外方に向ってのび、同時にそれに対向する齒槽高壁に吸収がおこり、結果として齒槽窩容積が増大する。

### 結 論

本研究は、Caiman crocodilusを用いて、歯ならびに周囲の顎骨の経時的發育變化を、三色螢光標示法により追求したもので、つぎの結果を得た。

(1) Tetracycline (TE), ドータイト Calcein (CAL) および Alizarin red S (AL) の三色螢光標示法が、歯と顎骨の發育變化を長期間にわたって観察するに適した方法である。

(2) CAL はあらたに形成されつつある硬組織のCaに特異的に結合し、Calcein-calciumの螢光線としてTEのそれよりも、細い鮮明な線としてあらわれる。

(3) 象牙質の形成量は歯の發育時期、場所により、かなり差がある。

(4) 象牙質の形成において、もっとも初期齒胚の齒冠頂形成時には、Ca沈着の少ない時期がある。

(5) 齒冠頂がある程度形成されると、3つの螢光剤による各螢光線は、象牙質の發育線にそって規則正しくあらわれる。象牙質の形成は象牙質がある程度の厚さになると停止する。

(6) 初期齒胚のエナメル質の基質形成期には主として、TEのdiffuseな螢光線のみをみとめるのみである。

(7) エナメル質成熟期では、CALによる螢光線がエナメル質發育線にそって明確にあらわれる。

(8) エナメル質の外形完成後は、CALの螢光集積はTEの螢光消失後もしばらくの間エナメル質全層にびまん性にあらわれる。

(9) セメント質は、組織構造の上から、異なった3種類のセメント層があり、これらはそれぞれ、歯の形成時期と場所、および形成状況や吸収状況により、形成量、形成様式が異なる。

(10) 齒槽窩基底部の骨梁は齒胚が発生し、脱落するまでの間に完全に新しい骨と入れかわる。

(11) 骨増生は主として顎骨の外周にみられ、齒槽窩壁では吸収が行なわれる。顎はこのようにして全体として大きくなるが、齒槽窩壁でも發育時期と場所により、吸収以外に添加形成が行なわれる。

(12) 顎骨の外周, 骨髓腔壁, osteon, 骨梁では, さまざまな様式の骨の吸収や増生がみられ, たえず, 骨組織の構築に改造や置換が加えられている。

#### 謝 辞

稿を終るに臨み, 終始と懇篤なるご指導とご校閲を賜った西嶋庄次郎教授と赤井三千男助教授に対し, 衷心より感謝の意を表わし, あわせて種々のご教示いただいた久米川正好博士およびご協力をいただいた教室員諸氏に厚くお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Owen, R. (1840): Odontography. 2, Bailliere, London. 1-37 from Edmund, A. G. (1960): Tooth replacement phenomena in the lower vertebrates. *Life Sci. Div.*, **52**, 113-120.
- 2) Röse, C. (1894): Über die Zahnentwicklung der Crocodile. *Morph. Arb.*, **3**, 195-228.
- 3) Bolk, L. (1912): On the structure of the dental system of reptiles. *Proc. Acad. Wet. Amsterdam*, **15**, 950-961.
- 4) Woerdeman, M. W. (1919): Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähne und Gebiss der Reptilien. Beiträge II: Über die Anlage und Entwicklung der Zähne. *Arch. Mikr. Anat., Abt. I*, **92**, 201-413.
- 5) Woerdeman, M. W. (1921): Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähne und Gebiss der Reptilien. Beiträge IV: Über die Anlage der Ersatzgebiss. *Arch. Mikr. Anat., Abt. 1*, **95**, 265-395.
- 6) Parrington, F. R. (1936): On tooth replacement in the theriodont reptiles. *Phil. Trans., B*, **226**, 121-142.
- 7) Wettstein, O. (1937): Crocodilia. *Handb. Zool. Berl.*, **7**, 236-320.
- 8) Romer, A. S. and Price, L. I. (1940): Review of the pelycosauria. *Spec. Pap. Geol. Soc. Amer.*, **28**, 1-538.: from Edmund, A. G. (1962): Sequence and rate of tooth replacement in the crocodilia. *Life Sci. Div.*, **56**, 7-39.
- 9) James, W. W. and Wellings, A. W. (1943): The dental epithelium and its significance in tooth development. *Proc. Roy. Soc. Med.*, **37**, 1-6.
- 10) Kvan, T. (1957): The teeth of alligator mississippiensis Daud. I. Initiation and shaping of the tooth germ. *Nytt. Magazine for Zoologi.*, **5**, 11-16.
- 11) Kvan, T. (1958): The teeth of alligator mississippiensis Daud. IV. tooth succession. *Nytt. Magazine for Zoologi.*, **6**, 92-96.
- 12) Kvan, T. (1960): The teeth of alligator mississippiensis Daud. VI. Periodontium. *Acta, Odont. Scand.*, **18**, 67-82.
- 13) Smith, H. (1958): Evolutionary lines in tooth attachment, and replacement in reptiles. *Kansas Acad. Sci. Trans.*, **61**, 216-225.
- 14) Edmund, A. G. (1960): Tooth replacement phenomena in the lower vertebrates. *Roy. Ont. Mus., Life Sci. Div.*, **52**, 11-190.
- 15) Edmund, A. G. (1962): Sequence and rate of tooth replacement in the crocodilia. *Roy. Ont. Mus. Life Sci. Div.*, **56**, 7-39.
- 16) 西嶋庄次郎, 今西市治, 赤井三千男, 狩山昌万(1966): ワニの歯の発生に関する研究(1)口腔科学会誌**15**,149(抄録), 昭和41.
- 17) 信藤博夫(1957): スチロール樹導入による歯牙硬組織の微細構造の研究. 阪大歯学誌 **2**, 23-25, 昭和32.
- 18) Kvan, T. (1959): The teeth of alligator mississippiensis Daud. V. Morphology of the enamel. *Acta. Odont. Scand.* **17**, 45-59.
- 19) Marshall, J. S. (1921): A study of the rate of the interstitial growth of the persistent teeth of the albino rat, as shown by vital dyes. *J. dent. Res.* **3**, 241-261.
- 20) Ercoli, N. and Lewis, M. N. (1943): The age factor in the response of bone tissue to alizarin dyes and the mechanism of dye fixation. *Anat. Rec.* **87**, 67-76.
- 21) Massler, M. (1944): Postnatal growth pattern of the cranium as measured by vital injections of Alizarin red S. *J. Dent. Res.* **23**, 193-194.
- 22) Massler, M. and Schour, I. (1951): The growth pattern of the cranial vault in the albino rat as measured by vital staining with Alizarin red S. *Anat. Rec.* **110**, 83-101.
- 23) 岡田正弘, 三村二(1937): 鉛塩による骨および歯牙組織新生灰化部位の生体染色法. 口病誌. **11**, 365-366. 昭和12.
- 24) 廖春木(1949): 酢酸鉛生体染色法による家兎の顎発育に関する研究. 御茶水学会誌. **1**, 36-46. 昭和24.
- 25) 対木桂次(1948): 酢酸鉛生体染色法による下顎骨の発育の組織学的研究. 倉敷中央病院年報. **23**, 51-57. 昭和23.
- 26) 滝本和男(1958): 顎発育と歯列の変化に関する実験的研究. 日本口腔科学会誌. **7**, 138-159. 昭和33.
- 27) Leblond, C. P., Wilkinson, G. W., Belanger, L. F. and Robichon, J. (1950): Radio-autographic visualization of bone formation in the rat. *Amer. J.*

- Anat.* **86**, 289-326.
- 28) Jarabak, J. R. and Kamins, M. (1951): The uptake of radiocalcium ( $\text{Ca}^{45}$ ) in the skull and face of the rat. *J. Dent. Res.* **30**, 511. (Abst)
  - 29) Belanger, L. F. (1957): The mineralization of rat enamel in the light of  $^{45}\text{Ca}$  autoradiography and microincineration. *J. Dent. Res.* **36**, 595-601.
  - 30) Jarabak, J. R. (1953): Radiocalcium uptake as compared with alizarin in the mineralization of bone. *Amer. J. Orthodont.* **39**, 62. (Abst)
  - 31) Bevelander, G. and Nakahara, H. (1965): Correlation between tetracycline binding and mineralization in dentin and enamel. *Anat. Rec.* **153**, 141-147.
  - 32) Storey, E. (1963): Tetracycline antibiotics and their effects on calcified and noncalcified tissues. *Austr. Ann. Med.* **12**, 325-332.
  - 33) Likins, R. C. and Pakis, G. A. (1964): Bone growth and uptake of radiocalcium in tetracycline treated rats. *Nature (Lond.)* **203**, 1069-1070.
  - 34) Hammarström, L. (1967): Different localization of tetracycline and simultaneously injected radiocalcium in developing enamel. *Calc. Tiss. Res.* **1**, 229-242.
  - 35) Nylen, M. U., Omnell, K. A. and Löfgren, C. G. (1964): Fine structure of tetracycline-induced hypoplastic and hypomineralized defects in rat incisor enamel. *J. Dent. Res.* **43**, 850. (Abst)
  - 36) Bevelander, G., Rolle, G. K. and Cohlan, S. G. (1961): The effect of the administration of tetracycline on the development of teeth. *J. Dent. Res.* **40**, 1020-1024.
  - 37) Bevelander, G. (1964): The effect of tetracycline on mineralization and growth, from Staple, P. H. (1964): *Advances in Oral Biology*, 1 Academic press, New York. 205-223.
  - 38) 須賀昭一(1965): 硬組織とテトラサイクリン. 歯学. **53**, 137-143, 昭和40.
  - 39) Cleall, J. F., Perkins, R. E. and Gilda, J. E. (1964): Bone marking agents for the longitudinal study of growth in animals. *Arch. Oral Biol.* **10**, 627-646.
  - 40) Suzuki, H. K. and Mathews, A. (1966): Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-Bis[N,N'-DI-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein. *Stain Technol.* **41**, 57-60.
  - 41) Kariyama, M., Akai, M. and Nishizima, S. (1969): Three-color fluorescent labeling method for calcified tissues. *Arch. Oral Biol.* **14**, 1349-1350.
  - 42) Harris, W. H., Travis, D. F., Friberg, U. and Radin, E. (1964): The in vivo inhibition of bone formation by Alizarin red S. *J. Bone and Joint Surg.* **46**, 493-506.
  - 43) Perkin, A. G., and Story, C. W. (1931): 31-Iodo Alizarin. *J. Chem. Soc., Part II*, 2620: from Rubin, P. L. and Frank, B. S. (1969): Comparative efficacy of administering Alizarin red S in dogs. *Oral Surg., Oral Med., Oral Path.* **28**, 122-125.
  - 44) Hoffman, M. M., and Schour, I. (1940): Quantitative studies in the development of the rat molar, alveolar bone, cementum and eruption. *Anat. Rec.* **78**, 223-249.
  - 45) Schour, I., Hoffman, M. M., Sarnat, M. D. and Engel, M. S. (1941): Vital staining of growing bones and teeth with Alizarin red S. *J. Dent. Res.* **20**, 411-418.
  - 46) Adkin, K. F. (1965): Alizarin red S as an intravital fluorochrome in mineralizing tissue. *Stain Technol.* **40**, 69-70.
  - 47) Diehl, H., Ellingboe, J. L. (1956): Indicator for titration of calcium in presence of magnesium with disodium dihydrogen ethylenediaminetetraacetate. *Anal. Chem.* **28**, 882-884.
  - 48) 今村寿明(1968): ドータイト試薬カタログ, 8版, 同仁薬化学研究所, 熊本 20-131, 昭和43.
  - 49) Wilkins, D. H. and Hibbs, L. E. (1959): The determination of copper with triethylenetetramine with a metalfluorechromic indicator. *Talanta.* **2**, 201-208.
  - 50) 榎 健寿, 森 逸男(1968): カルセインおよびその誘導体の金属蛍光指示薬としての利用について, ドータイトニュースレター. **16**, 9-13. 昭和43.
  - 51) Kőrbl, J., Svoboda, V., Terzijska, D. and Pribil, R., (1957): A new group of metallochromic indicator. *Chem. and Ind.* 1624-1625.
  - 52) Van der Reyden, A. J. (1962): Determination of trace amounts of calcium in causticsoda. Complexometric titration after separation on Dowex A-1 chilating resin. *Z. Anal. Khim.* **187**, 241-249.
  - 53) Bozhevov'nov, E. A. and Kreingold, S. U. (1962): Fluorescence complexometric determination of trace amounts of calcium. *Z. Anal. Khim.*, **17**, 560-564, from Anal. Abst. (1963): **10**, 3108.
  - 54) Frost, H. M., and Villaneuva, A. R. (1960): Tetracycline staining of newly forming bone and mineralizing cartilage in vivo. *Stain Technol.* **35**, 135-138.
  - 55) Bevelander, G., Goldberg, L. and Nakahara, H. (1960): The effect of tetracycline on skeletal development in the larval sand dollar, *Arch. Oral Biol.* **2**, 127-131.

- 56) Urist, M. R. and Ibsen, K. H. (1963): Chemical reactivity of mineralized tissue with oxytetracycline, *Arch. Path.* **76**, 484-496.
- 57) Hammarström, L. (1968): Tetracycline in developing rat enamel in relation to protein synthesis and maturation. *Acta Odont. Scand.* **26**, 337-356.
- 58) Antalowska, Z. (1966): Laws of tetracycline antibiotic deposition in rat incisor. *J. Dent. Res.* **45**, 1430-1438.
- 59) 石塚直隆, 石原 実, 中塚 勉 (1964): 齶組織の tetracycline にみる螢光分析的研究. アクロマイシン V 文献集. 21-24. 昭和39.
- 60) Rubin, P. L. and Frank, B. S. (1969): Comparative efficacy of administering Alizarin red S in dogs. *Oral Surg., Oral Med., Oral Path.* **28**, 122-125.

## Studies on Growth of Crocodilian Teeth and Jaw Bones by Three-Colour Fluorescent Labelling Method

Masakazu KARIYAMA

*Department of Oral Anatomy, Osaka University Dental School,  
32, Joan-cho, Kita-ku, Osaka, Japan*

*Caiman crocodilus* is one of the most interesting animals in which to research on the tooth and alveolar bone, and their relation. Although every developmental stage of several teeth can be observed at the same time, the connection between the tooth and alveolar bone, and tooth alternation are very similar to mammal's.

This report describes the development of the tooth and alveolar bone, and their relation in *Caiman crocodilus* by a three-colour labelling method with Tetracycline-HCL (TE), Calcein (CAL) and Alizarin red S (AL).

(1) A three-colour labelling method with TE, CAL and AL used in this research enabled the investigator to evaluate better osseous changes, even the cement and alveolar bone in which mineral deposition and resorption were active and complicated.

(2) Remarkable difference was detected in the dentine formation at the developmental stage and the site. At the cusp of the dentine, mineral deposition was poor at early stage. Each fluorescent band was observed along the incremental lines after the dentine formation at the cusp.

(3) CAL fluoresced green along the incremental lines of enamel at formative stage, although TE and AL did at organizing stage. CAL is supposed to connect with mineral components, and TE and AL with mineral and/or organic components.

(4) There were three kinds of cements in structure; cellular, acellular and hypertrophic cement. They were related to the developmental stage and the site.

(5) Ordinarily mineral deposition occurred at the peripheral parts of the alveolar bone, and resorption did at the inner parts, periodontal side. But at the some developmental stage and the site, bone formation was observed at the inner parts of alveolar bone.

Further results, the relation between tooth and alveolar bone, three-colour labelling method are reported and discussed.

## 付 図 説 明

- 図4. 後継歯 (iA)が先行歯 (A) の舌側で発育して近ずいたため、先行歯の舌側根端部が吸収され、先行歯歯根の舌側と頰側で象牙質形成に差がみられる。先行歯の象牙質、セメント質には CAL, TE の2本の蛍光線があり、後継歯のエナメル質にはかすかに一層の蛍光集積線が、象牙質には2本の蛍光線がみられる。(×4(対物鏡)×5(接眼鏡)×1.5(写真拡大))
- 図5. 機能晩期の先行歯歯根の水平断。象牙質では歯髓側(P)から吸収が進み、象牙質はうすくなっている。象牙細管中の蛍光はセメント象牙境付近までみられる。セメント質では、三次的な hypertrophic cementum が形成され、波状の蛍光発育線を示す。(×20×5×1.5)
- 図6. 上顎歯槽中隔から顎骨骨体内部にかけての海綿骨で、新しい骨梁が形成されている(↑)。(×4×5×1.5)
- 図7. 下顎骨の矢状断で、顎骨の外周部を示す。縦に走っているのはハバース管で(↑)、黒い部分(↓)は、ハバース管の主幹で、この部から osteon の改造がはじまる。(×10×5×1.5)
- 図8. 機能晩期の先行歯 (A) と歯冠完成期の後継歯 (iA) の水平断。先行歯の歯髓腔の中に後継歯が入った状態で、先行歯の舌側部は完全に吸収され、後継歯に対抗する歯髓腔側象牙質も吸収されている(↓)。両隣接面にも吸収がみられるが(↓)、頰側のセメント質形成はなおつづいている(↑)。歯冠完成歯 (iA) のエナメル質では、エナメル葉様構造に蛍光がみられる(↓)。(×4×5×1.2)
- 図9. 相隣接する歯 (a, c) の顎骨水平断で、b は歯槽中隔部である。a と b の間は広く、b, c の間は狭くなっており、c の歯のセメント質は吸収され、歯槽中隔から頰側にかけて骨の吸収がみられる(↑)ことから歯が近心頰側へ移動しているものと思われる。象牙細管内に蛍光が認められる。(×4×5×1.2)
- 図10. 歯槽窩基底部の骨梁形成を示したもの。歯槽窩基底部骨梁は外部から吸収され、内部に向かって突起状の骨が形成される。(×4×5×1.2)
- 図11. 歯胚 (iA) の発育にともない歯槽窩基底部骨梁の一部が穿孔されたのち新しい骨(↑)で閉鎖されている。
- 図12. 象牙質の吸収像。吸収窩縁に新しい CAL の蛍光が認められるところと(↑)、新しい CAL の蛍光がみられないところとがある(↑)。(×10×5×1.2)
- 図13. 後継歯侵入時に一度吸収されたセメント質に再び Ca が沈着したことを示す。CAL の蛍光がみられ(↑)、さらにその部に新しい機能的セメント質が形成されている(↑)。(×4×5×1.2)
- 図14. TE (黄), CAL (緑), AL (赤), CAL (緑) を15日間隔で注入、最後の CAL 注入後2日で殺し材料をとった。先行歯 (A) の象牙質では、歯髓 (P) に向かって、順番に黄, 緑, 赤, 緑と4本の蛍光線がみられ、セメント質では最後の CAL の緑色蛍光線のみが一次セメント質にあらわれている。幼若期歯胚 (iA) では、エナメル質には最後の CAL の蛍光線が、象牙質には AL, CAL の2本の蛍光線があらわれている。頰側歯槽突起部 (B) では、全体に、diffuse な蛍光を発しているが、注入時期に相当して各蛍光発育線が著明にあらわれており、外方に向けてのびていることがわかる。歯槽窩内方への骨添加は主として最初の TE 注入時にみられるのみで、以後は主として吸収のみである。歯槽窩基底の骨梁は3回目の AL と4回目の CAL の注入後に形成された骨により形成されている。舌側歯槽窩壁の骨は、歯胚 (iA) の発育のために部分的に吸収されているが、新しい骨の添加も多く(↑)、全体として添加形成が進行している。(×4×5×1.5)
- 図15. TE, CAL, AL, TE を15日の間隔で注入し、最後の TE を注入後、24時間後に材料を採取したもの。萌出歯 (A) では AL 注入後に2次セメント質が形成されたことがわかる。後継歯 (iA) では、歯冠部エナメル質に1回目の TE 蛍光線がみられるとともに(↑)、2回目注入の CAL と最後の TE 蛍光が混合し、全層にわたって diffuse な蛍光集積としてあらわれている(↑)。歯槽突起外縁 (B) では骨形成が進行しているが、舌側歯槽窩基底部から舌側歯槽窩壁にかけて、歯胚 (iA) の発育のため吸収が進行し、歯槽窩基底の骨梁に穿孔がみられる。(4×5×1.5)
- 図16. TE, AL, CAL, TE を10日, 10日, 20日の間隔で注入し、最後の TE 注入後24時間経って材料を採取した。萌出歯 (A) は萌出機能末期のもので、象牙質の形成はほとんど停止している。しかし2次有細胞セメント質の形成はさかんである(↑)。後継歯は歯冠完成期のもので、象牙質には、4本の蛍光線があらわれている。エナメル質では CAL (↑) と TE (↓) の蛍光線がみられる。頰側歯槽突起 (B) では、古い骨が多く、骨外縁には新しい骨はあまりみられない。しかし舌側歯槽突起 (L) の外縁では新しい骨の形成がさかんである。頰側の歯槽窩縁には吸収がなく、わずかではあるが骨の添加がみられる(↑)。歯槽窩基底部から舌側歯槽窩壁にかけては主に吸収のみがみられるが、骨梁の外側部には新しい骨の形成があり、骨梁の厚さを保っている(↑)。(×4×5×1.5)
- 図17. 第14図と同一動物の標本で、先行歯 (A) は脱落が近くなった機能晩期のもので、歯根の大半が吸収されている。頰側では歯頸部に3次セメント質の形成をみるが(↑)、舌側では、その形成はみられない。後継歯 (iA) は、エナメル

ル質の外形が完成し、同時に歯冠形成も終わってまさに歯冠象牙質の中経を増大させ、歯根の形成がはじまろうとしている。エナメル質では、歯冠頂形成時に注入された TE の蛍光線が diffuse に残っている(↑)。エナメル質の全層にわたって CAL の著明な蛍光集積(↑)がみられる。歯槽突起では形成がはじまり、歯槽窩壁では全体にわたって活発な添加形成がおこなわれている(↑)。とくに舌側のそれは、吸収窩縁に新しい骨梁が形成され、また歯槽頂の伸長がみられる(↑)。(×4×5×1.5)

- 図18. 発生初期の歯胚。象牙質が形成されたところに diffuse な TE の蛍光集積がみられるが(↑)、エナメル質の蛍光集積は非常に弱い(↑)。(×20×5×1.5)
- 図19. 図18の歯胚よりも、歯冠頂がすこし発育したもの。象牙質の形成とともに、エナメル質の基質形成がすすんでいることを示すもので、TE と AL の蛍光集積が diffuse にみられる(↑)。(×20×5×1.5)
- 図20. CAL, TE, AL 最後に TE を20日間隔で注入し、3日後に材料を採取したもの。エナメル質には歯冠頂形成時に注入された最初の CAL の緑色蛍光線がはっきりとあらわれているが(↑)、その後形成されたエナメル質では、TE のうすい蛍光集積がみられるのみである(↑)。セメント質では、歯根根端部の象牙質形成につづき、まず単調な発育線を示す無細胞層が形成され、ひきつづいて有細胞セメント質が歯頸部から根尖にかけて形成される(↑)。さらに歯頸部付近では3次セメント質 (hypertrophic cementum) の形成がみられる(↑)。頬側歯槽突起 (B) では、diffuse な蛍光を発しているが、注入時期に相当して、それぞれの蛍光発育線があらわれている。舌側歯槽突起 (L) では、各期の発育蛍光線は不明瞭で、たがいに入りまじっており、頬側と舌側とでは骨形成のあらわれ方が異なる。(×4×5×1.5)
- 図21. 上顎の頬側骨体部。4つの時期の発育蛍光線がみられる。緑色蛍光線はいずれも最初に注入された CAL (↑)によってあらわれたもので、同一時期に形成されたものである。CAL の緑色蛍光線を境として骨は外縁では、外側に向って新生骨が生長し、内部では、CAL 注入後は骨の添加がなく、吸収のみで、中心部では、骨髓腔に向って骨の添加が進行している。(×4×5×1.5)
- 図22. 下顎骨骨体部。外周縁では、外側に向って新しい骨の形成がすすみ、骨体内部では形成時期の異なる赤と黄色の蛍光線をもつ新生骨が入りまじって形成されている(↑)。これは、骨体内部での骨組織の置換現象を示すものである。(×4×5×1.5)

