



Title	歯牙形成過程におけるcalbindin D28kの分布に関する免疫組織学的研究
Author(s)	大西, 智之
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3169557">https://doi.org/10.11501/3169557</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

- 歯牙形成過程におけるcalbindin D28kの分布に関する  
免疫組織学的研究

大阪大学歯学部小児歯科学講座

大西智之

## <要旨>

カルシウム結合蛋白質の1つであるcalbindin D28kはエナメル芽細胞に認められ、その分化や基質の石灰化に関与していることが示唆されている。しかし、歯牙形成から萌出に至るまでのその他の組織におけるcalbindin D28kの分布に関してはほとんど調べられていない。そこで、本研究ではラット臼歯歯牙形成から萌出、咬合に至るまでの歯牙及び歯周組織におけるcalbindin D28kの消長を、免疫組織学的に検討した。その結果、成獣の歯周組織においてcalbindin D28k陽性反応は、1) 根分岐部のセメント質の表面に隣接して散在する細胞群、2) 中間セメント質の細胞群、3) 歯根膜の歯槽骨側の紡錘状の細胞、にそれぞれ認められた。電顕観察により、calbindin D28kはいずれの陽性細胞でも細胞質に局在し、根分岐部および根部象牙質と有細胞セメント質の間に認められるcalbindin D28k陽性細胞は、ともに陥凹した核と豊富なトノフィラメントを有し、上皮系の細胞であることがわかった。また、歯根膜のcalbindin D28k陽性細胞は豊富な細胞小器官を有することなどの特徴から、線維芽細胞であることが明かとなった。さらに、歯根形成段階において、ヘルトヴィッヒ上皮鞘の細胞自体はcalbindin D28k陰性であるが、断裂したヘルトヴィッヒ上皮鞘由来の上皮細胞はcalbindin D28k陽性反応を示した。また、臼歯歯根膜のcalbindin D28k陽性反応を示す線維芽細胞は、咬合を開始した時期から認められ、その数は経日的に増加した。一方、臼歯の分泌期エナメル芽細胞に隣接するenamel-free areaの内エナメル上皮由来の細胞(以下EFA細胞と略す)はすべてcalbindin D28k陽性であり、成熟期エナメル芽細胞に隣接するEFA細胞は、calbindin D28k陽性のものと陰性のものが存在した。これは、エナメル芽細胞でのcalbindin D28kの分布の変化と一致した。また、退縮エナメル上皮および初期の歯肉内縁上皮は強いcalbindin D28k陽性反応を示したが、その反応は経日的に低下した。以上の所見より歯牙形成過程において、calbindin D28kはエナメル芽細胞や象牙芽細胞など石灰化に関与する細胞のみならず様々な細胞に分布し、種々の機能を有していることが示唆された。

## 緒言

Calbindinは、EFハンドと呼ばれるカルシウムイオンに高い親和性を持つ構造を有するtroponin C superfamily に属するカルシウム結合蛋白質の1つである

(Berddermann and Wasserman, 1974; Gross and Kumar, 1990) . Calbindinはその分子量の違いにより2種類が存在する. すなわち, 8-10kDのcalbindin D9k および 28kDのcalbindin D28kである. calbindin D28kはニワトリの十二指腸粘膜で最初に発見され (Wasserman and Taylor, 1966) , その後, 腸管, 腎, 胎盤など多くのカルシウム輸送機能を有する組織に存在することが免疫組織学的に明らかにされ

(Wassermann and Talyor, 1966; Roth et al., 1981, 1982; Taylor et al., 1982) , calbindin D28kがカルシウム輸送に関与していることが示唆されている. それに加えて, calbindin D28kは, ニューロンなどカルシウム輸送機能を有さない細胞にも認められ, カルシウム輸送以外の機能を有することが示唆されている (Baimbridge et al., 1982; Garcia-Segura et al., 1984; Celio, 1990; Andressen et al., 1993) .

カルシウム輸送は組織の石灰化に見られる重要な現象の一つである. 哺乳類の歯はエナメル芽細胞, 象牙芽細胞, セメント芽細胞といった高度に分化した細胞から作られる石灰化組織である. それらのうち, エナメル芽細胞におけるcalbindin D28kの分布に関しては多くの報告がある (Taylor, 1984; Taylor et al., 1984; Elms and Taylor, 1987; Berdal et al., 1989, 1991a,b; Bailleul-Forestier et al., 1996) . また以前より, 石灰化能を有する組織におけるcalbindin D28kおよびそのmRNAの存在が報告されており, calbindin D28kが石灰化に関与することが示唆されている

(Christakos and Norman, 1975; Celio et al., 1984; Christakos et al., 1989; Zhou et al., 1986; Berdal et al., 1996) ことから, エナメル芽細胞においてもcalbindin D28kは石灰化に関与していることが考えられている.

エナメル芽細胞においては, 石灰化を開始した象牙質に接する前エナメル芽細胞の遠位端よりcalbindin D28k陽性反応が認められ, 分泌期エナメル芽細胞に分化するにしたがいその陽性反応は細胞質全体に広がっていくことが, ラット切



歯および臼歯を用いた免疫組織学的研究により明らかにされている (Taylor, 1984; Elms and Taylor, 1987; Berdal et al., 1989, 1991a) . 一方, 成熟期エナメル芽細胞では, ラット臼歯においてはcalbindin D28k陽性である部位と陰性である部位が交互に出現し (Berdal et al., 1989) , ラット切歯においてはcalbindin D28k陽性反応が強い部位と弱い部位が交互に出現することが報告されている (Berdal et al., 1991a) . このcalbindin D28k陽性反応を示す細胞はruffle-ended ameloblastであり, 陰性である細胞はsmooth-ended ameloblast であるとされている (Berdal et al., 1991a) . エナメル基質の成熟後, エナメル芽細胞は周囲の細胞と共に退縮エナメル上皮を構成し, さらに萌出後は歯肉内縁上皮を構成するが, ラット切歯の退縮エナメル上皮は弱いながらも calbindin D28k陽性反応を示すことが報告されている (Taylor, 1984) . しかし, 臼歯の退縮エナメル上皮や歯肉内縁上皮でのcalbindin D28kの分布に関する報告は今までに見あたらない.

また, エナメル芽細胞と同様に石灰化組織を形成する象牙芽細胞のcalbindin D28kの局在に関しては意見が分かれている. いくつかの研究ではラット象牙芽細胞はcalbindin D28k陰性であると報告されている (Taylor, 1984; Taylor et al., 1984; Elms and Taylor, 1987; Hotton et al., 1995) . しかし, Berdalら (1993,1996) はラット切歯の象牙芽細胞にcalbindin D28kが存在することを示し, また, Magloireら (1988) およびBailleul-Forestierら (1996) はヒト象牙芽細胞がcalbindin D28k陽性であることを報告している.

以上のような石灰化に関与する細胞以外にも歯牙形成過程には様々な細胞が関与している. なかでも, 内エナメル上皮および外エナメル上皮由来であるヘルトヴィッヒ上皮鞘 (以下HERSと略す) や, それが断裂して形成されるマラッセの上皮遺残は, 歯根形成過程において非常に重要な働きを有し, 内エナメル上皮由来であるエナメル芽細胞と同様これらの細胞にも calbindin D28kが分布することが予想されるが, 歯根形成過程におけるcalbindin D28kの分布に関する報告は見あたらない.

齧歯類は臼歯咬頭頂にenamel-free area（以下EFAと略す）と呼ばれる、象牙質がエナメル質に覆われていない部位が存在する（Addison and Appleton, 1921; Gaut, 1956; Cohn, 1957）。近年、マウスおよびラット臼歯の発生段階において、EFAの象牙質表層にはエナメル基質様の構造物が存在することが、光学および電子顕微鏡的研究により明らかにされてきた（Sakakura et al., 1989; Inai et al., 1992）。さらに、この構造物内には、amelogenin（Nakamura et al., 1991; Inai et al., 1992; Bosshardt and Nanci, 1997）やameloblastin（Bosshardt and Nanci, 1998）などの、エナメル基質タンパク質が存在すること、そして、ラットのEFA表層の内エナメル上皮由来の細胞(以下EFA細胞と略す)にamelogenin mRNAが見られることが報告されている（Yamamoto et al., 1997）。これらのことから、EFA細胞はエナメル基質様の基質を分泌する細胞に分化することが示唆される。このことより、EFA細胞は発生過程において、エナメル芽細胞と同様にcalbindin D28k陽性反応を示すことが予想されるが、今までにEFA細胞におけるcalbindin D28kの分布に関してはほとんど調べられていない。

そこで本研究では、ラット臼歯での歯冠および歯根形成過程におけるcalbindin D28kの分布の変化を免疫組織学的手法を用いて詳細に検討し、その生理機能についても考察を加えた。

## 材料と方法

### 1) 組織切片の作成

生後1-56日齢（P1-56）のSprague-Dawley ラット（日本動物，大阪）を実験に供した。動物に抱水クロラル（500mg/kg 体重）の腹腔内注射により全身麻酔を施し、左心室に0.02Mリン酸緩衝生理食塩水（以下PBSと略す; pH 7.4）を注入して瀉血後、4%パラホルムアルデヒド（0.1Mリン酸緩衝液（以下PBと略す）でpH 7.4に調整）で灌流固定を行った。なお、透過型電子顕微鏡（以下TEMと略す）による観察に用いる動物（P56, n=3）には、固定液として4%パラホルムアルデヒド

に、最終濃度が0.05%となるようにグルタルアルデヒドを加えたものを用いた。その後上顎骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて4℃で3日間後固定を行った後、7.5%エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム (EDTA・2Na) にて4℃で1-6週間脱灰を行った。脱灰液は2-3日毎に交換した。

脱灰終了後、一部の試料はアルコールにて脱水した後、パラフィン包埋を行い、厚さ3 $\mu$ mで薄切した。蛍光二重染色には、アミノプロピルシランをコートしたスライドガラス (松浪ガラス, 大阪) に、その他はポリ-L-リジンをコートしたスライドガラスに貼付した。また、その他の試料は、20%スクロース含有PBSにて4℃で一晩浸漬後OCTコンパウンドで包埋し、クリオスタットを用いて厚さ12-16 $\mu$ mの凍結切片を作成し、ポリ-L-リジンでコートしたスライドガラスに貼付した。TEMによる観察では、試料をクリオスタットを用いて60-80 $\mu$ mで薄切し、PBSに回収して浮遊切片として免疫染色を行った。

## 2) 免疫組織化学的染色-光学顕微鏡による観察

### (1) Avidin-biotin-complex (ABC) 法

切片をPBSにて洗浄後、0.3% $H_2O_2$ 含有の100%メタノールで30分間浸漬し、内因性のペルオキシダーゼ活性をブロックした。PBSで洗浄後、3%正常ブタ血清 (以下NSSと略す; DAKO, Glostrup, Denmark) および1%ウシ血清アルブミン (以下BSAと略す; Sigma, St. Louis, MO, USA) 含有PBSで30分間処理した。その後ただちにポリクローナルウサギ抗calbindin D28k抗血清 (1:20000; SWant, Bellinzona, Switzerland) を室温で一晩作用させた。この切片をPBSで洗浄後、ビオチン標識ブタ抗ウサギIgG (1:500; DAKO) と、引き続いてABCコンプレックス (Vector, Burlingame, CA, USA) とそれぞれ90分間室温で反応させた。ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (以下HRPと略す) 活性は0.04%3,3'-ジアミノベンジジン (以下DABと略す) および0.003% $H_2O_2$ 含有0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で発色させて観察した。その際、HRP反応は0.08-0.1%硫酸ニッケルアンモニウム (以下

NASと略す)で増強した。一次抗体および二次抗体の希釈には、1%NSSおよび1%BSA含有PBSを用いた。免疫染色後、それぞれの切片をメチルグリーンで対比染色し、アルコール脱水した後、レモゾール<sup>®</sup> (和光純薬, 大阪)で透徹し、Permount<sup>®</sup> (Fisher Scientific, NJ, USA)で封入した。

## (2) 間接蛍光抗体法

切片をポリクロナルウサギ抗calbindin D28k抗血清 (1:5000; SWant) で室温で一晩作用させた後、PBSで洗浄し、ローダミン (LRSC) 標識抗ウサギIgG (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) を、90分間室温で反応させた。切片をPermaFluor<sup>®</sup> (Immunon, Pittsburgh, PA, USA) で封入し、オリンパス蛍光顕微鏡 (BX 60) にてGフィルターを使用して観察した。観察後カバーガラスを注意深く除去し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施した。

## (3) 間接蛍光二重染色法

歯根形成時における、歯根表面に配列する上皮細胞のcalbindin D28k陽性反応を検討するために、蛍光二重染色法を行った。蛍光二重染色法による観察試料には前述のパラフィン切片を使用した。まず、脱パラフィン後に、切片を0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、10分間マイクロウェーブで処理することにより、抗原の腭活化を行った (Cattoretti et al., 1992)。その後、切片にポリクロナルウサギ抗calbindin D28k抗血清 (1:5000; SWant) を、引き続きモノクロナルマウス抗ケラチン抗血清 (1:100; clone K8.13; Sigma) を室温でそれぞれ一晩作用させた。この抗ケラチン抗体はサイトケラチン1, 5-8, 10, 11および13を認識することが報告されている (Gigi-Letiner et al., 1986)。切片をPBSで洗浄後、LRSC標識抗ウサギIgG (1:500) およびFITC標識抗マウスIgG (1:100; Vector) の混

合液で90分間室温で処理した。切片をPermaFluor<sup>®</sup>で封入し、蛍光顕微鏡（FITCにはBフィルター，LRSCにはGフィルターを使用した）により観察した。観察後カバーガラスを除去し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施した。

### 3) 免疫組織化学的染色-TEMによる観察

凍結切片作成後ABC法にて染色を施した。ただし，HRP反応はNASにより増強せずに行った。反応後，切片を1%OsO<sub>4</sub>および1.5%フェロシアン化カリウム含有0.1M PBに30分間室温で浸漬し，脱水，QY-2<sup>®</sup>（日新EM，東京）にて置換後，Epon 812レジンで包埋し，ダイヤモンドナイフで超薄切片を作成した。作成した切片を酢酸ウランで電子染色を施し，日立H-7000型透過型電子顕微鏡（日立，東京）で観察した。

### 4) calbindin D28k抗体の特異性

ラット小脳を，今回用いた抗calbindin D28k抗体でABC法にて免疫染色を施したところ，プルキンエ細胞に以前報告されている（Celio, 1990）のと同様のcalbindin D28k様免疫反応を認めた。次に，希釈した抗calbindin D28k抗体を過剰のラットrecombinant calbindin D28k（SWant）で吸収し，ラット小脳を用いて免疫反応を行ったところ，プルキンエ細胞におけるcalbindin D28k陽性反応は完全に消失した。また，ラット歯周組織においても同様の結果が得られた。以上より，本研究で用いた抗体は，calbindin D28kに対し特異的であると考えられる。

## 結果

### 1) ラット成獣歯周組織におけるcalbindin D28kの分布

成獣の歯周組織において，calbindin D28k陽性反応は主に以下の3つの部位に存在する細胞群に認められた（図1，2），すなわち，1) セメント質の表面

2) 中間セメント質 (根部象牙質と有細胞セメント質に挟まれた部位) 3) 歯根膜である。セメント質表面のcalbindin D28k陽性細胞のほとんどは根分岐部に認められ、時折歯頸部付近に見られた。しかし、根尖部付近ではほとんど認められなかった (図1a, 2b-d)。根分岐部付近ではcalbindin D28k陽性細胞は数個が集合し、無細胞セメント質に沿って散在していた (図1a, b, 2d)。根尖部付近では、calbindin D28k陽性細胞が根部象牙質と有細胞セメント質の間に密集していた (図1a, c, 2b) が、より歯頸側では、中間セメントにcalbindin D28k陽性細胞は認められなかった。歯根膜におけるcalbindin D28k陽性細胞は紡錘形を呈し、歯槽骨側に局在していた。calbindin D28k陽性細胞

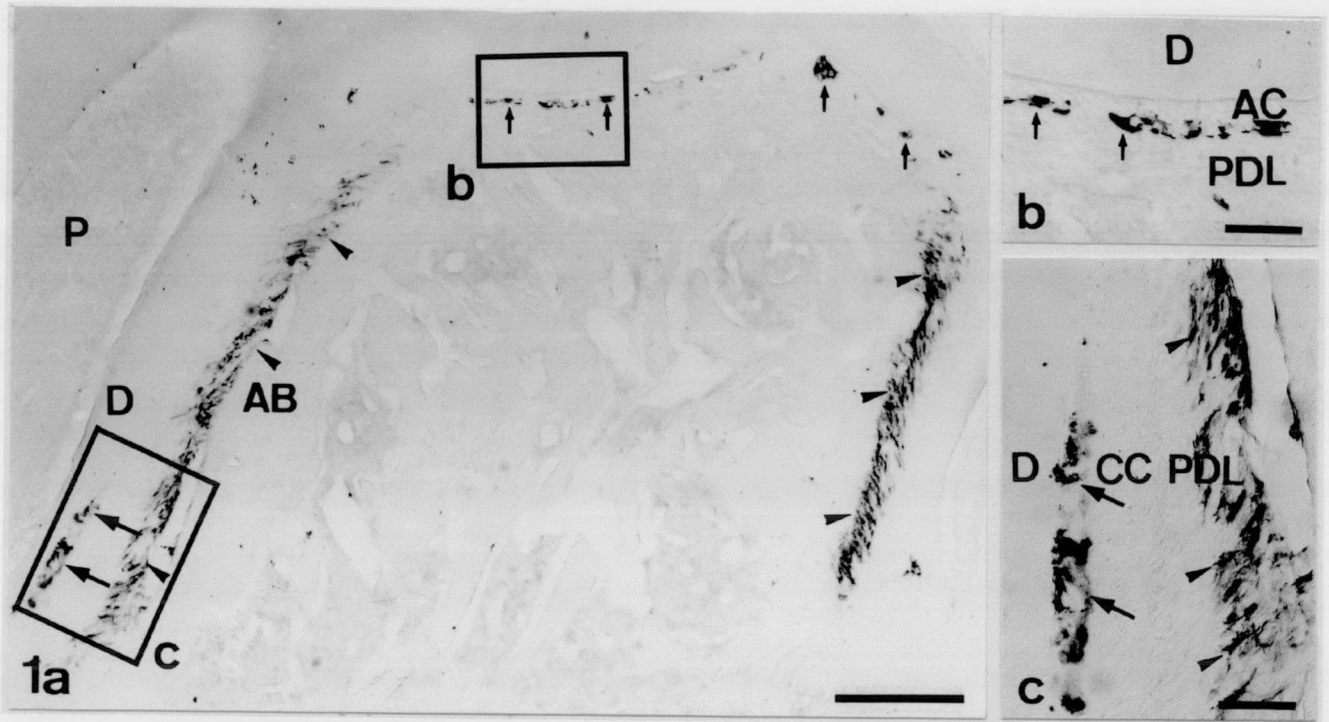


図1 ラット成獣上顎第一臼歯におけるCB陽性反応 (矢状断) の分布.

- calbindin D28k(CB)様免疫反応は、根分岐部 (小矢印)、根部象牙質と有細胞セメント質に挟まれた部位 (大矢印)、および 歯根膜 (矢頭) に認められる。
- 図1aの根分岐部のbox部の強拡大像。CB陽性細胞は無細胞セメント質 (AC) の表面に接して認められる (小矢印)。
- 図1aの根尖部のbox部の強拡大像。象牙質 (D) と有細胞セメント質 (CC) に挟まれた中間セメント質に強いCB陽性細胞を認める (大矢印)。また、歯根膜 (PDL) の歯槽骨側に紡錘形を呈したCB陽性細胞を認める (矢頭)。

P, 歯髄; AB, 歯槽骨。スケールバー, 図1a 500  $\mu$ m, 図1b,c 100  $\mu$ m。

は近心根では遠心側で，遠心根は近心側でより多く認められた（図1， 2）． 根分岐部付近の歯根膜ではcalbindin D28k陽性反応はほとんど認められなかった（図1a， b）． 歯根膜のcalbindin D28k陽性細胞は， 歯槽骨に近接するものがより強い陽性反応を示した（図1c）．

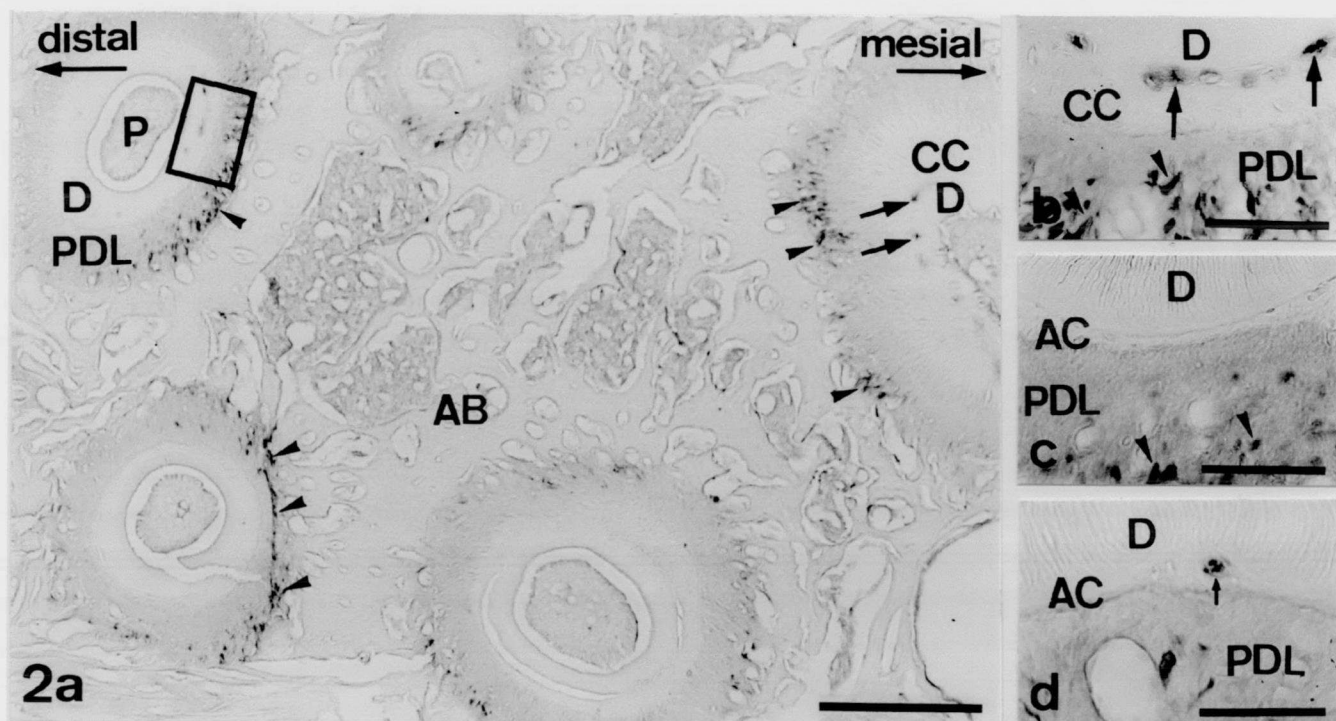


図2 ラット成獣上顎第一臼歯におけるcalbindin D28k(CB)陽性反応（水平断）の分布．

- 根尖部付近の水平断像．歯根膜（PDL）におけるCB陽性細胞は，近心根では遠心側に遠心根では近心側により多く認められる（矢頭）．矢印は象牙質（D）と有細胞セメント質（CC）の間に認められるCB陽性細胞を示す．AB，歯槽骨；P，歯髄．
- 図2aのbox部の強拡大像．象牙質（D）と有細胞セメント質（CC）の間の卵円形の細胞にCB陽性反応を認める（矢印）．歯根膜（PDL）の紡錘形の細胞もまた，CB陽性反応を示している（矢頭）．
- 図2bと同一歯根の根中央部におけるCB陽性反応の分布．象牙質（D）と無細胞セメント質（AC）の間には，CB陽性細胞は認められない．歯根膜（PDL）にCB陽性細胞が認められる．
- 図2b， cと同一歯根の歯頸部におけるCB陽性反応の分布．無細胞セメント質（AC）に近接してCB陽性反応を示す細胞島を認める（矢印）．歯根膜（PDL）におけるCB陽性細胞はほとんど認められない．D，象牙質．

スケールバー，図1a 500  $\mu$ m，図1b-d 100  $\mu$ m．



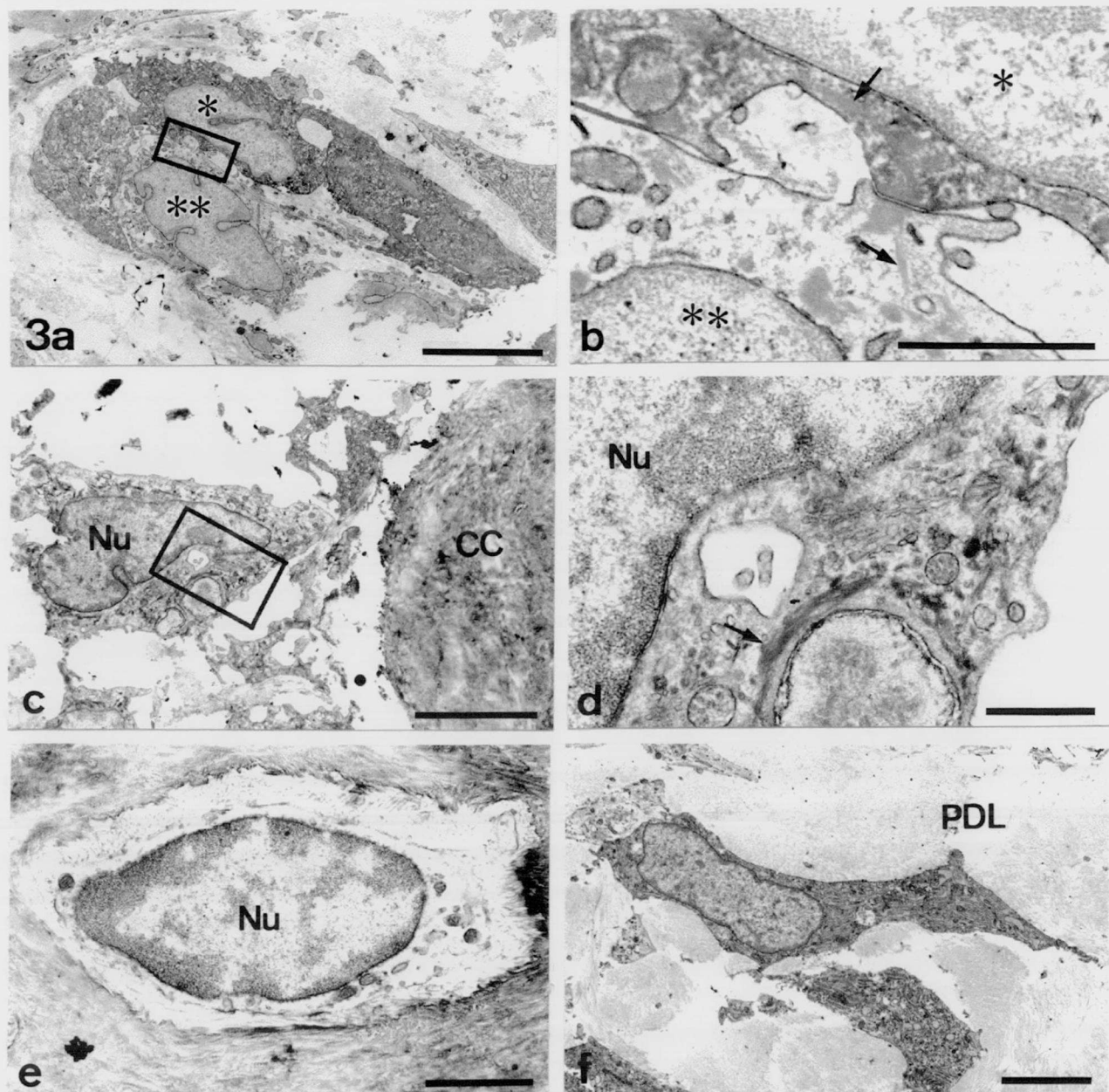


図3 ラット上顎第一臼歯歯周組織におけるcalbindin D28k(CB)陽性細胞の電子顕微鏡写真像.

- 根分岐部において，陥凹した核を有するいくつかの細胞にCB様免疫反応を認める（星印）．CB陽性反応は細胞質に局在している．同様の超微構造を有する隣接した細胞はCB陰性である（二重星印）．
- 図3aの強拡大像．CB陽性細胞（星印），CB陰性細胞（二重星印）はともに豊富なトノフィラメントを有している（矢印）．
- 中間セメント質に存在する細胞は陥凹した核（Nu）を有している．それらの細胞は，細胞質全体にCB陽性反応を示していた．
- 図3cの強拡大像．細胞質内に豊富なトノフィラメントを有している（矢印）．Nu，核
- 有細胞セメント質内のセメント細胞はCB陰性である．Nu，核．
- 歯根膜（PDL）の紡錘形の細胞の細胞質全体にCB陽性反応を認める．

スケールバー，図3a 5  $\mu$ m，図3b 1  $\mu$ m，図3c 5  $\mu$ m，図3d 1  $\mu$ m，図3e 2  $\mu$ m，  
図3f 5  $\mu$ m



TEMによる観察では、免疫反応産物は電子密度の高い沈着物として観察された。calbindin D28k陽性を示す免疫産物は、細胞質全体に認められたが、核には認められなかった（図3a-d, f）。根分岐部では、calbindin D28k陽性反応を示す細胞と示さない細胞が存在した。それらの細胞はどちらも、陥凹した核と発達したトノフィラメントを有し、細胞内小器官は乏しかった（図3a, b）。中間セメント質に認められるcalbindin D28k陽性細胞もまた、根分岐部のcalbindin D28k陽性細胞と同様の超微構造を示した（図3c, d）。また、近接するセメント細胞はcalbindin D28k陽性反応を示さなかった（図3e）。さらに、歯根膜において、線維芽細胞と思われる豊富な細胞内小器官を有する紡錘形の細胞がcalbindin D28k陽性反応を示した（図3f）。

## 2) 歯根形成過程におけるcalbindin D28kの分布の変化

モノクローナル抗ケラチン（clone K8.13）抗体はサイトケラチン1, 5-8, 10, 11, 18のエピトープを認識するので、この抗体に対する免疫反応は「サイトケラチン1, 5-8, 10, 11, 18陽性反応」と記述すべきであるが、本論文では単純に「ケラチン陽性反応」と記載する。

生後7日齢のラット上顎第一臼歯では、すでに、歯頸部より根尖方向に向かいHERSが形成されていたが、歯根象牙質の形成はまだ開始していなかった（図4a）。この時期の全てのHERSの細胞、エナメル芽細胞および中間層細胞に強いケラチン陽性反応を認めた（図4b）。それに対しcalbindin D28k陽性反応は分化後期の前エナメル芽細胞、エナメル芽細胞および一部の中間層細胞にのみ認められ、分化初期の前エナメル芽細胞、HERSの細胞、象牙芽細胞、前象牙芽細胞、および歯乳頭の細胞にはcalbindin D28k陽性反応が認められなかった（図4c）。生後10日齢のラット上顎第一臼歯ではすでに歯根形成が開始しており、近心根に薄い象牙質が観察できた。しかし、HERSの断裂はまだ認められなかった。この時期のケラチン陽性反応、calbindin D28k陽性反応は7日齢のものと同様であった。

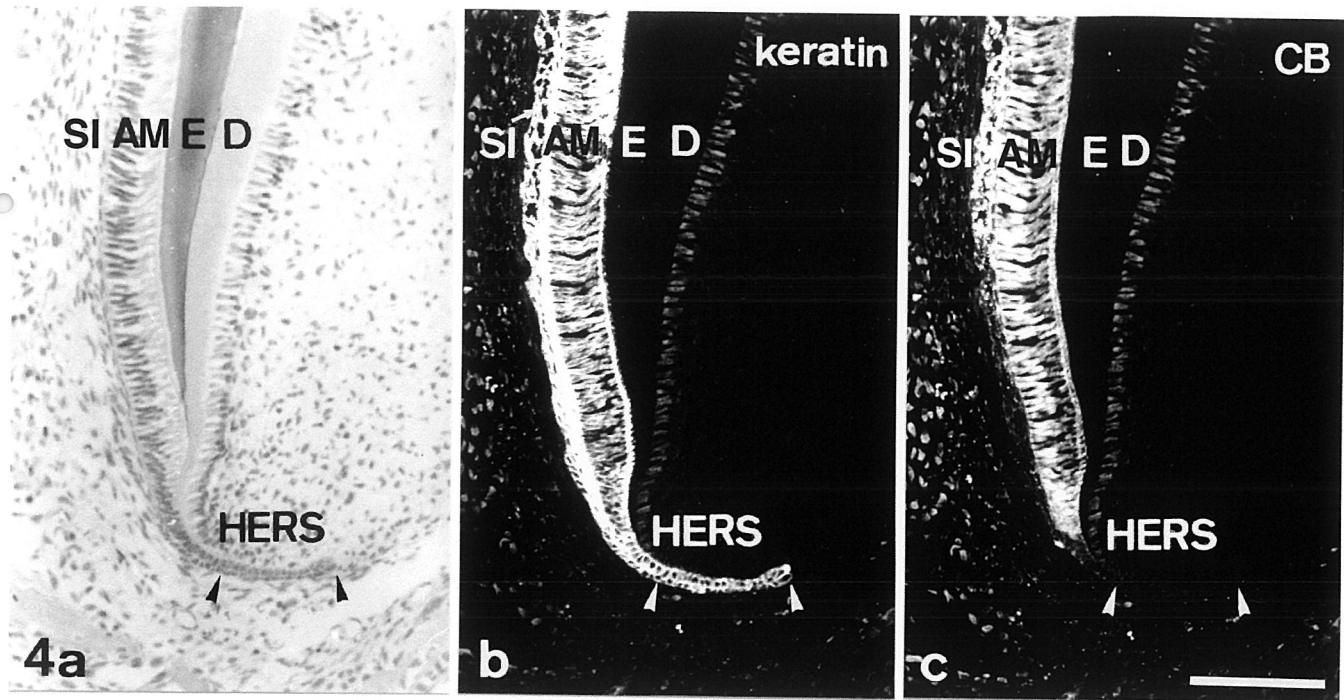


図4 生後7日齢ラット上顎第一臼歯近心根の組織像 (a) , ケラチン陽性反応 (b) および calbindin D28k(CB)陽性反応 (c) の分布.

- 根尖部に矢頭で示すヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) が存在する. HE染色.
  - HERSの細胞はエナメル芽細胞 (AM) および中間層細胞 (SI) と同様に強いケラチン陽性反応を示す.
  - 分化後期の前エナメル芽細胞, 分泌期エナメル芽細胞はCB陽性であるが, HERSの細胞はCB陰性であった. 図4 a-cは全て同一の切片からの写真である.
- E, エナメル質. スケールバー, 図4c 100  $\mu$ m, 全て同一の拡大率である.

生後14日齢ではHERSは歯根の根先端に認められ, 歯頸部付近ではその断裂が開始していた. HERSの細胞の全てと, それに連続して歯根表面に断続的に配列している細胞はケラチン陽性反応を示した. ケラチン陽性細胞はそのほとんどが歯根表面に沿って見られたが, 一部の細胞は歯根表面から離れ, 歯根膜方向に遊走していた (図5a). これらのケラチン陽性反応を示すHERSが断裂した細胞のうち, 歯根表面に配列する細胞のすべてはcalbindin D28k陽性反応を示した. しかし, 歯根表面より遊走した細胞はcalbindin D28k陽性反応を示さなかった. また, HERSの細胞はcalbindin D28k陰性であった (図5c, d). 一方, HERSに沿って配列する前象牙芽細胞の一部 (図5e, f), および初期の象牙芽細胞の一部 (図5b) がcalbindin D28k陽性反応を示した. 根分岐部での

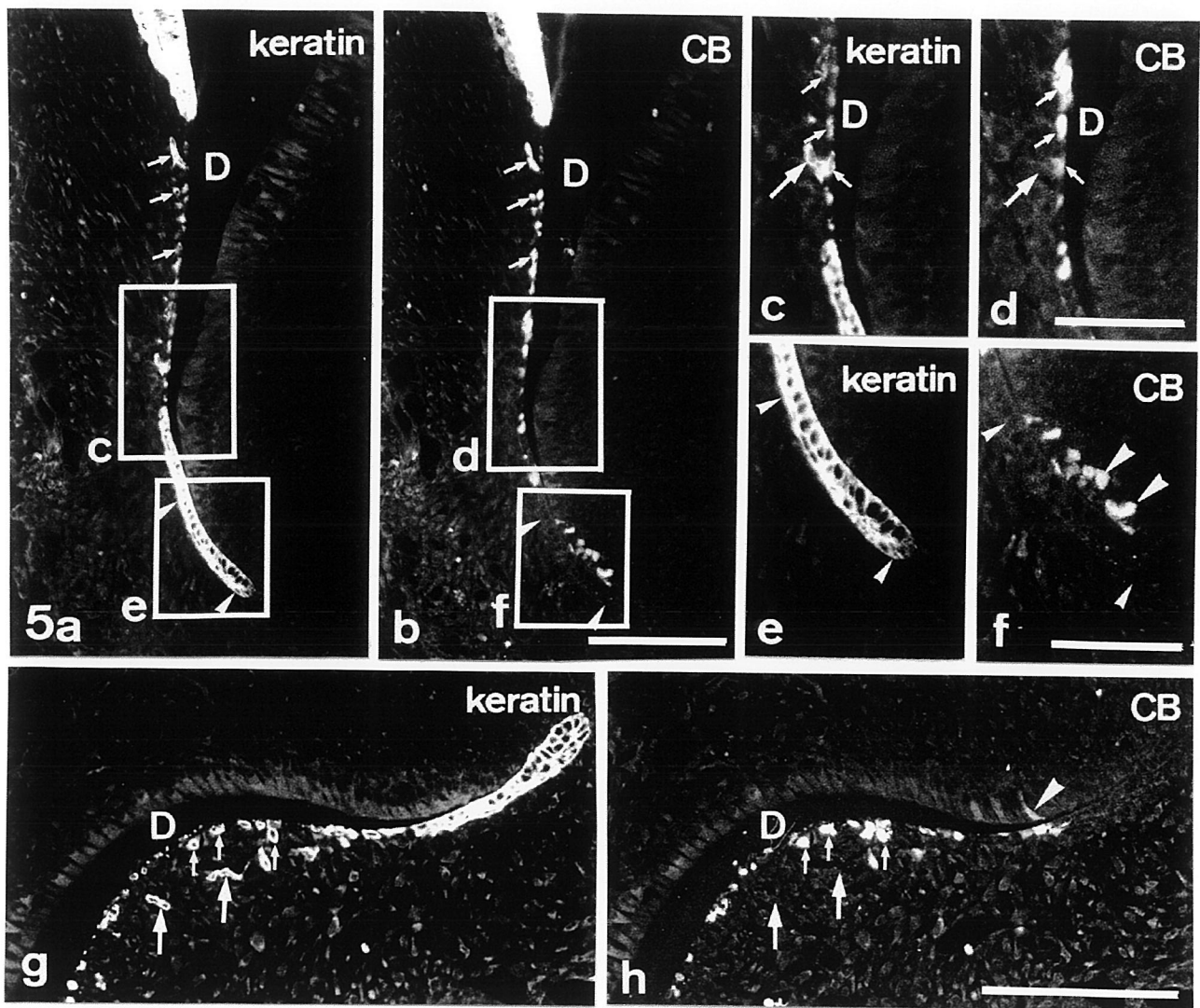


図5 生後14日齢ラット上顎臼歯の近心根 (a-f) および根分岐部 (g, h) における、ケラチン陽性反応 (a, c, e, g) およびcalbindin D28k(CB)陽性反応 (b, d, f, h) の分布。

- a. ヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) はケラチン陽性反応を示す (矢頭) . 歯頸部ではHERSの断裂が開始している (小矢印) .
- b. CB陽性反応はHERSから断裂した細胞に認められる (小矢印) . しかし, HERSの細胞はCB陰性である (矢頭) . また, 一部の前象牙芽細胞にCB陽性反応を認める.
- c, d 図5a,bの歯頸部のbox部の強拡大像. 象牙質 (D) の表面に配列するHERSより断裂した細胞 (小矢印) はケラチン陽性反応 (c) およびCB陽性反応 (d) の両方を示す. しかし, 歯根膜内に遊走したケラチン陽性細胞はCB陰性である (大矢印) .
- e, f 図5a,bの根尖部のbox部の強拡大像. HERSの細胞 (小矢頭) はケラチン陽性反応を示すがCB陰性である. HERSに面する前象牙芽細胞 (大矢頭) はCB陽性であるが, ケラチン陰性である.
- g, h 根分岐部におけるケラチン陽性細胞およびCB陽性細胞の分布. 象牙質 (D) の表層に配列するHERSより断裂した細胞 (小矢印) はケラチン陽性反応 (g) およびCB陽性反応 (h) の両方を示す. しかし, 歯根膜内に遊走したケラチン陽性細胞はCB陰性である (大矢印) . 象牙芽細胞のいくつかはCB陽性反応を示す.

スケールバー, 図5b 100  $\mu$ m, 図5aは同一の拡大率, 図5d,f 50  $\mu$ m, 図5c,eは同一の拡大率, 図5g 100  $\mu$ m, 図5hは同一の拡大率.

calbindin D28k陽性反応及びケラチン陽性反応の分布は、根尖部での分布と同様であった（図5g, h）。

生後21日齢のラットでは、第一臼歯は萌出途上にあり歯根はまだ未完成であった。calbindin D28k陽性反応及びケラチン陽性反応の分布様式は、14日齢におけるそれと類似していたが、歯根表面に沿って認められるcalbindin D28k陽性細胞の数は、歯頸部付近を中心に減少していた。根尖部では、象牙芽細胞、前象牙芽細胞の一部にcalbindin D28k陽性反応を認めた。

生後28日齢において第一臼歯は対合歯と咬合を開始しており、根尖部付近には有細胞セメント質の形成が観察できた。根分岐部では象牙質に隣接して無細胞セメント質が形成されており、セメント質に沿っていくつかのcalbindin D28k陽性細胞が細胞群を形成していた（図6a）。根尖部では、calbindin D28k陽性細胞は有細胞セメント質に沿って認められ、一部の細胞は中間セメント質内に埋入していた。また、歯根膜の歯槽骨側にはcalbindin D28k陽性反応を示す紡錘形の細胞がわずかに存在した（図6b）。生後35日齢において、根分岐部にはcalbindin D28k陽性細胞が認められた。その数は生後28日齢のものと同様であった（図7a）。根尖部では有細胞セメント質の厚みが増加しており、中間セメント質内のcalbindin D28k陽性細胞の数は増加していた。それに対し、セメント質に沿って観察されていたcalbindin D28k陽性細胞の数は減少していた（図7b）。一方、歯根膜の歯槽骨側に認められるcalbindin D28k陽性反応を示す紡錘形の細胞の数は増加していた（図7b）。

図8に、歯根形成から萌出、咬合に至るまでのラット歯周組織におけるcalbindin D28kの分布の変化をまとめた。

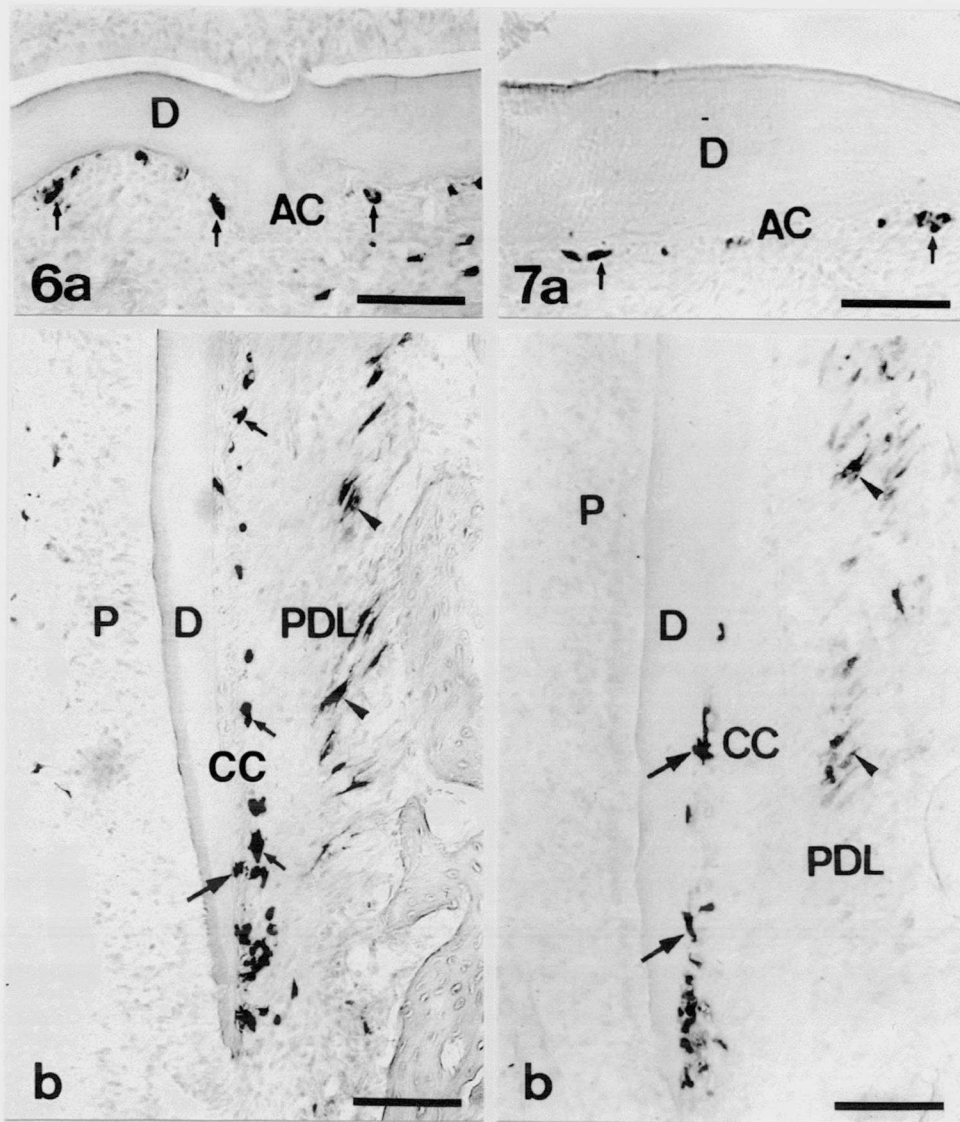


図6 生後28日齢ラット上顎第一臼歯近心根の根分岐部 (a) および根尖部 (b) の calbindin D28k(CB)陽性細胞の分布.

- a. 根分岐部においてCB陽性細胞 (小矢印) が無細胞セメント質 (AC) の表面に散在している.
- b. 根尖部において, 有細胞セメント質 (CC) の表面に沿ってCB陽性細胞 (小矢印) が存在する. いくつかのCB陽性細胞 (大矢印) が中間セメント質内に迷入している. 歯根膜 (PDL) に紡錘形を呈するCB陽性細胞 (矢頭) がいくつか認められる. P, 歯髄  
スケールバー, 100  $\mu$ m.

図7 生後35日齢ラット上顎第一臼歯近心根の根分岐部 (a) および根尖部 (b) の calbindin D28k(CB)陽性細胞の分布.

- a. 根分岐部において, CB陽性細胞 (小矢印) の分布はほとんど図6aの生後28日齢における分布と類似している.
- b. 根尖部において有細胞セメント質(CC) 表層にはCB陽性細胞は認められない. 中間セメント質内に迷入しているCB陽性細胞 (大矢印), および歯根膜 (PDL) におけるCB陽性細胞 (矢頭) の数は増加している. P, 歯髄  
スケールバー, 100  $\mu$ m.



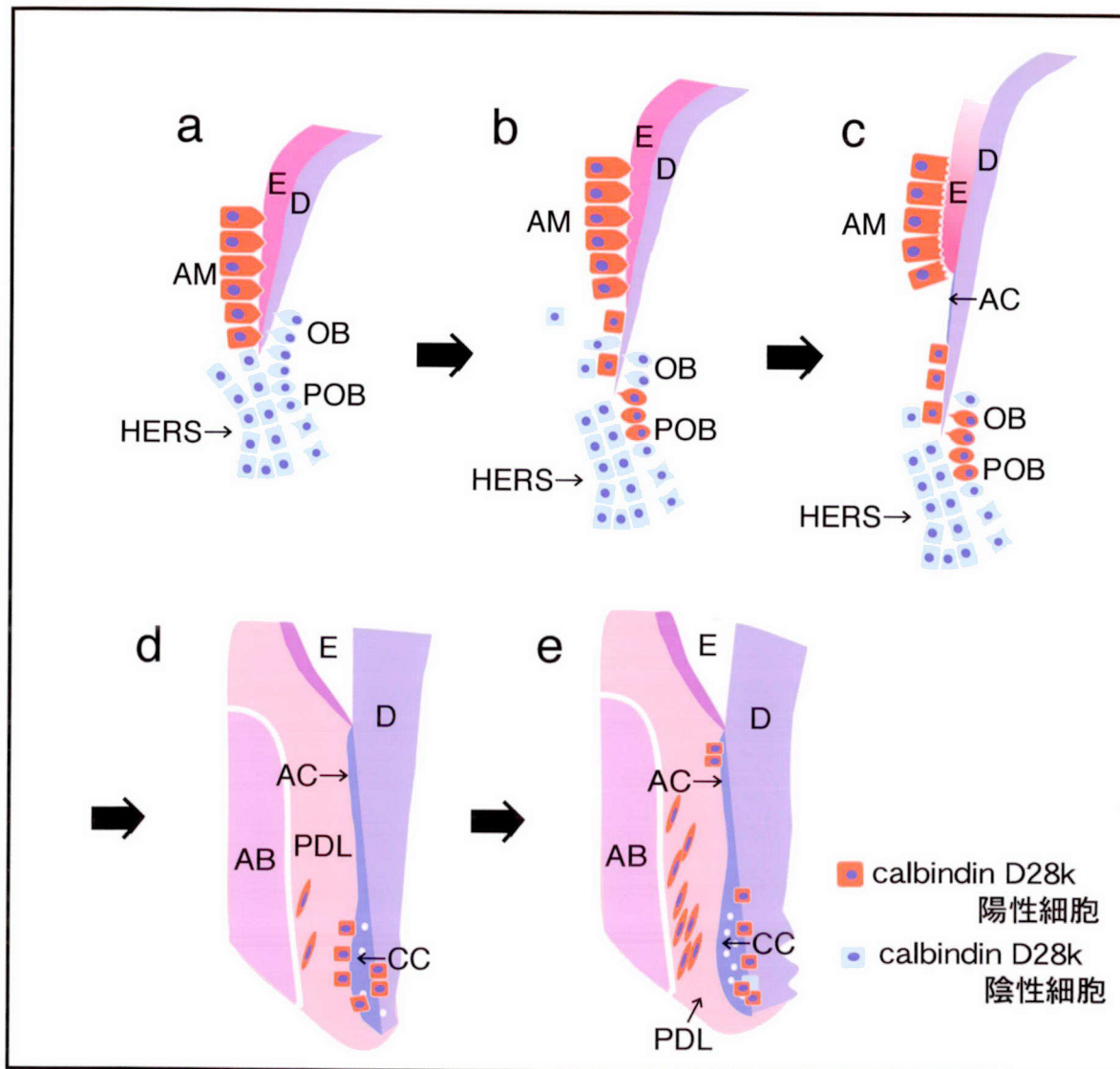


図8 歯根形成過程におけるcalbindin D28kの分布の変化.

- 歯根象牙質形成開始前. ヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) は断裂しておらず, calbindin D28k陰性であった.
- 歯根形成初期. HERSの断列が開始すると, 断裂した細胞のうち歯根象牙質 (D) 表面に配列する細胞は全てcalbindin D28k陽性であった. しかし, 歯根膜内に遊走した細胞はcalbindin D28k陰性であった. また一部の前象牙芽細胞 (POB) および象牙芽細胞 (OB) にcalbindin D28k陽性反応を認めた.
- 歯根形成後期. 歯根形成端のcalbindin D28k陽性細胞の分布には変化はないが, 歯頸部付近の歯根表面のcalbindin D28k陽性細胞の数は減少していた.
- 歯牙萌出後 (咬合開始直後). 根尖部付近の歯根表面には, 依然calbindin D28k陽性細胞が存在した. また, 歯根膜線維芽細胞および中間セメント質内に迷入した上皮細胞に, calbindin D28k陽性反応がわずかに認められた.
- 歯根表面のcalbindin D28k陽性細胞は認められなくなった. 一方, 歯根膜線維芽細胞および有細胞セメント質と象牙質の間に迷入した上皮細胞に認められるcalbindin D28k陽性細胞の数は増加していた. また, マラッセの上皮遺残にcalbindin D28k陽性反応を認めた.

AM, エナメル芽細胞; AB, 歯槽骨; AC, 有細胞セメント質; E, エナメル質;  
PDL, 歯根膜

### 3) 歯冠形成過程におけるcalbindin D28kの分布の変化

生後1日齢において、上顎第一臼歯の近心咬頭頂付近ではすでに象牙質の形成が開始しており、象牙質に面する前エナメル芽細胞はcalbindin D28k陽性反応を示していた。しかし、EFA細胞は全てcalbindin D28k陰性であった（結果は示さない）。生後3日齢では、上顎第一臼歯の内エナメル上皮およびそれに接する歯乳頭の細胞で、連続的な細胞の分化が観察できた（図9a）。分化初期の前エナメル芽細胞はcalbindin D28k陰性であるが、石灰化を開始した象牙質に面する前エナメル芽細胞の細胞質遠位部にcalbindin D28k陽性反応が認められ、初期の分泌期エナメル芽細胞は細胞質全体にcalbindin D28k陽性反応を示した（図9b）。近心咬頭のエナメル芽細胞は核が局在化しており、薄いエナメル質基質を分泌していた（図9c）。この時期のEFA細胞の多くは核の局在化を示さなかったが、一部に核が局在化した細胞が存在した（図9c）。エナメル芽細胞、EFA細胞はともに強いcalbindin D28k陽性反応を示し、それらに接する中間層細胞は弱いcalbindin D28k陽性反応を示した（図9d）。生後5日齢では、EFA細胞は核の局在化を示さず細胞高径は低かった。EFA細胞と象牙質の間には薄い基質が認められ（図10a）、エナメル芽細胞、EFA細胞、および中間層細胞は全て強いcalbindin D28k陽性反応を示した（図10b）。生後7日齢では、全てのエナメル芽細胞は成熟期あるいは移行期に分化しており（図11a）、エナメル芽細胞、EFA細胞、および中間層細胞は全てcalbindin D28k陽性反応を示し、EFA細胞のcalbindin D28k様免疫反応は、隣接するエナメル芽細胞よりも強かった（図11b）。

生後10日齢では、歯頸部から咬頭にかけて強いcalbindin D28k陽性反応を示す部位と弱い反応を示す部位が交互に観察された（図12a）。後期の分泌期エナメル芽細胞と移行期のエナメル芽細胞は、隣接する初期の成熟期エナメル芽細胞よりも弱い陽性反応を示した（図12b, c）。また、成熟期エナメル芽細胞および隣接するEFA細胞にはcalbindin D28k陽性のものと陰性のものが存在した（図12d-g）。

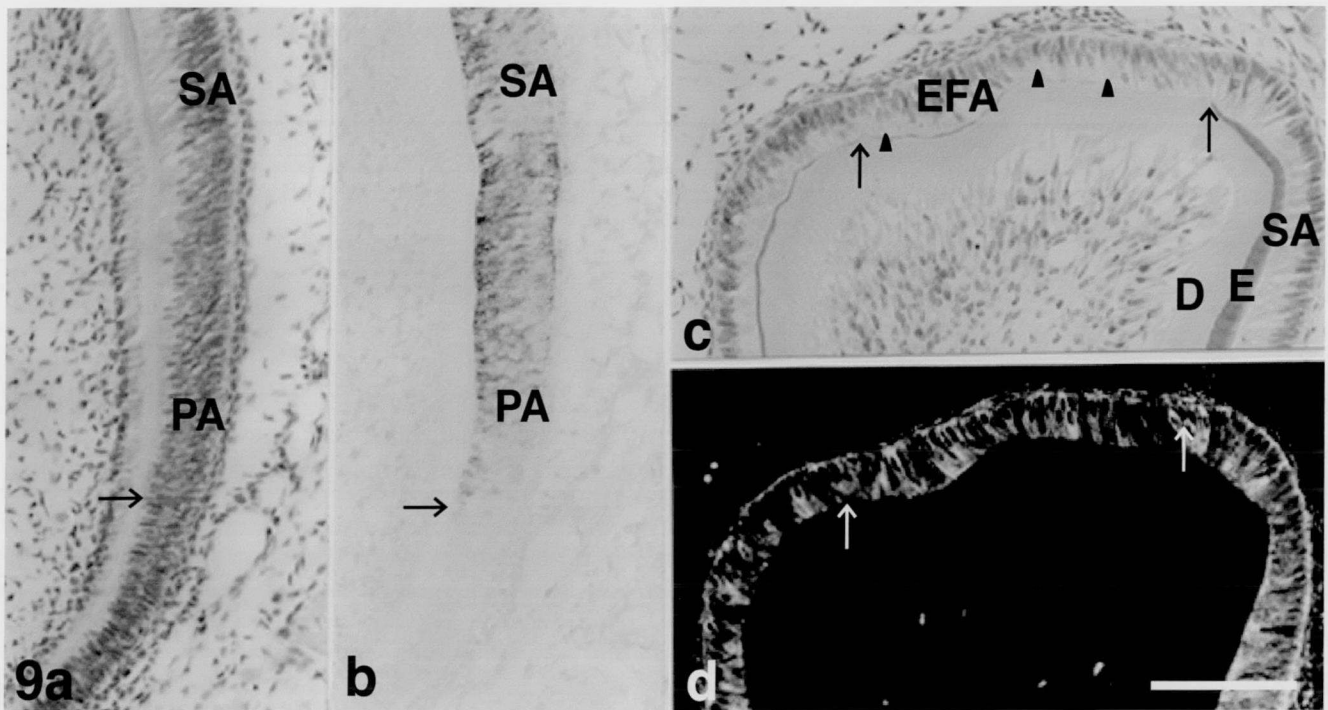


図9 生後3日齢ラット上顎第一臼歯の近心歯頸部 (a, b) および近心咬頭 (c, d) の組織像 (a, c) およびcalbindin D28k (CB) 陽性反応 (b, d) の分布。

- a. 歯頸部では、歯乳頭および内エナメル上皮の細胞に連続的な細胞の分化が認められる。PA, 前エナメル芽細胞; SA, 分泌期エナメル芽細胞。HE染色。
- b. 図9aの隣接切片。石灰化を開始した象牙質に面する前エナメル芽細胞 (矢印) の遠心端にCB陽性反応が最初に認められる。分泌期エナメル芽細胞は細胞質全体にCB様免疫反応を認める。ABC法。
- c. エナメル芽細胞は伸張し、核の局在化を認める。さらに象牙質 (D) との間に薄いエナメル基質 (E) を認める。また、多くのEFA細胞に核の局在は認めないが、一部の細胞 (矢頭) では核が局在化している。EFA細胞と象牙質との間にはヘマトキシリン好性な構造物を認める。矢印の間に示された部分がEFAである。HE染色。
- d. 一部の分泌期エナメル芽細胞およびEFA細胞はともにCB陽性である。間接蛍光抗体法。

図9c, dは同一切片。スケールバー, 100  $\mu\text{m}$ 。全て同じ拡大率である。



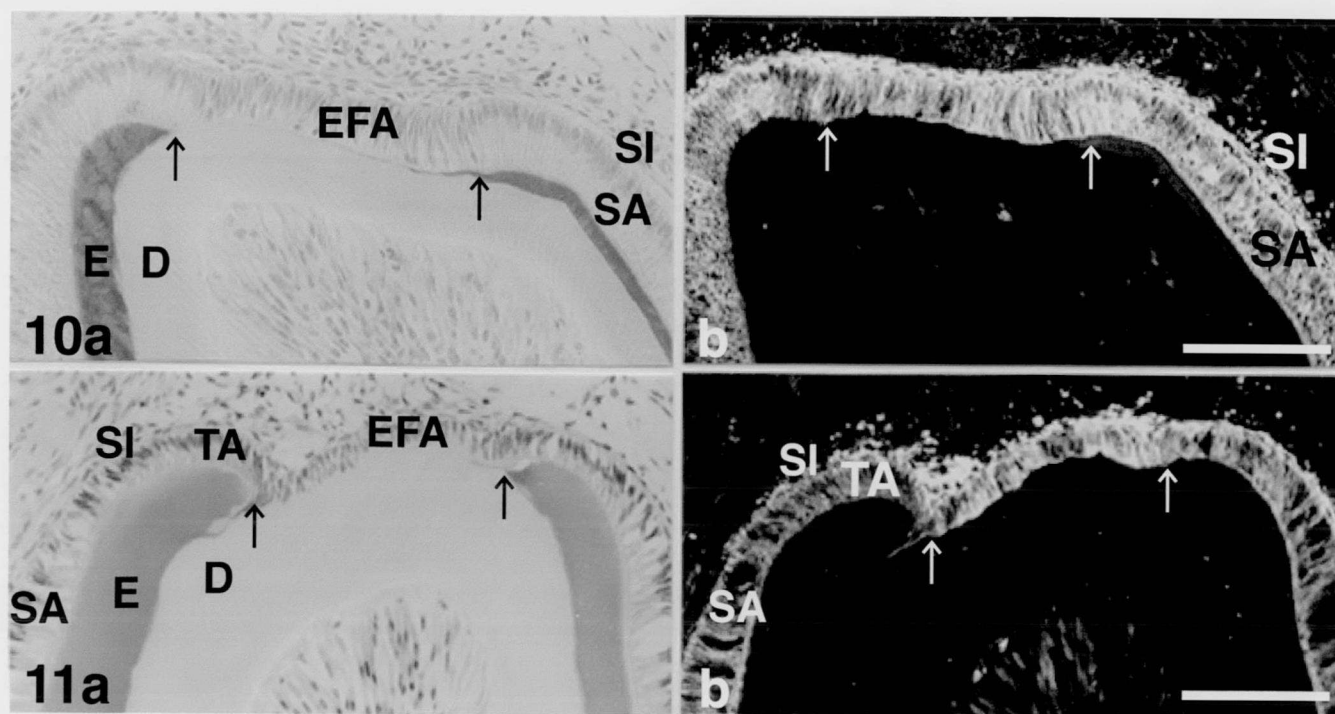


図10 生後5日齢ラット第一臼歯近心咬頭の組織像 (a) およびcalbindin D28k (CB) 陽性反応 (b) の分布.

- a. EFA細胞は細胞高径が低く核の局在化を示さない. EFA細胞と象牙質 (D) との間に、部分的にヘマトキシリン好性な構造物を認める. EFAは矢印の間に示された部分である. HE染色.
- b. 全ての分泌期エナメル芽細胞 (SA), EFA細胞および中間層細胞 (SI) にcalbindin D28k陽性反応を認める. 間接蛍光抗体法.

図10a, bは同一切片. スケールバー, 100  $\mu$ m.

図11 生後7日齢ラット第一臼歯近心咬頭の組織像 (a) およびcalbindin D28k (CB) 陽性反応 (b) の分布. .

- a. 多くのエナメル芽細胞は分泌期 (SA) であるが、咬頭頂ではすでに移行期 (TA) に分化している. 隣接するEFA細胞 (矢印の間に示す) は細胞高径が低く核の局在化を示さない. HE染色.
- b. 全てのエナメル芽細胞, EFA細胞および中間層細胞 (SI) にcalbindin D28k(CB)陽性反応を認める. EFA細胞は隣接するエナメル芽細胞よりも強いCB陽性反応を示す. 間接蛍光抗体法.

図11a, bは同一切片. スケールバー, 100  $\mu$ m.

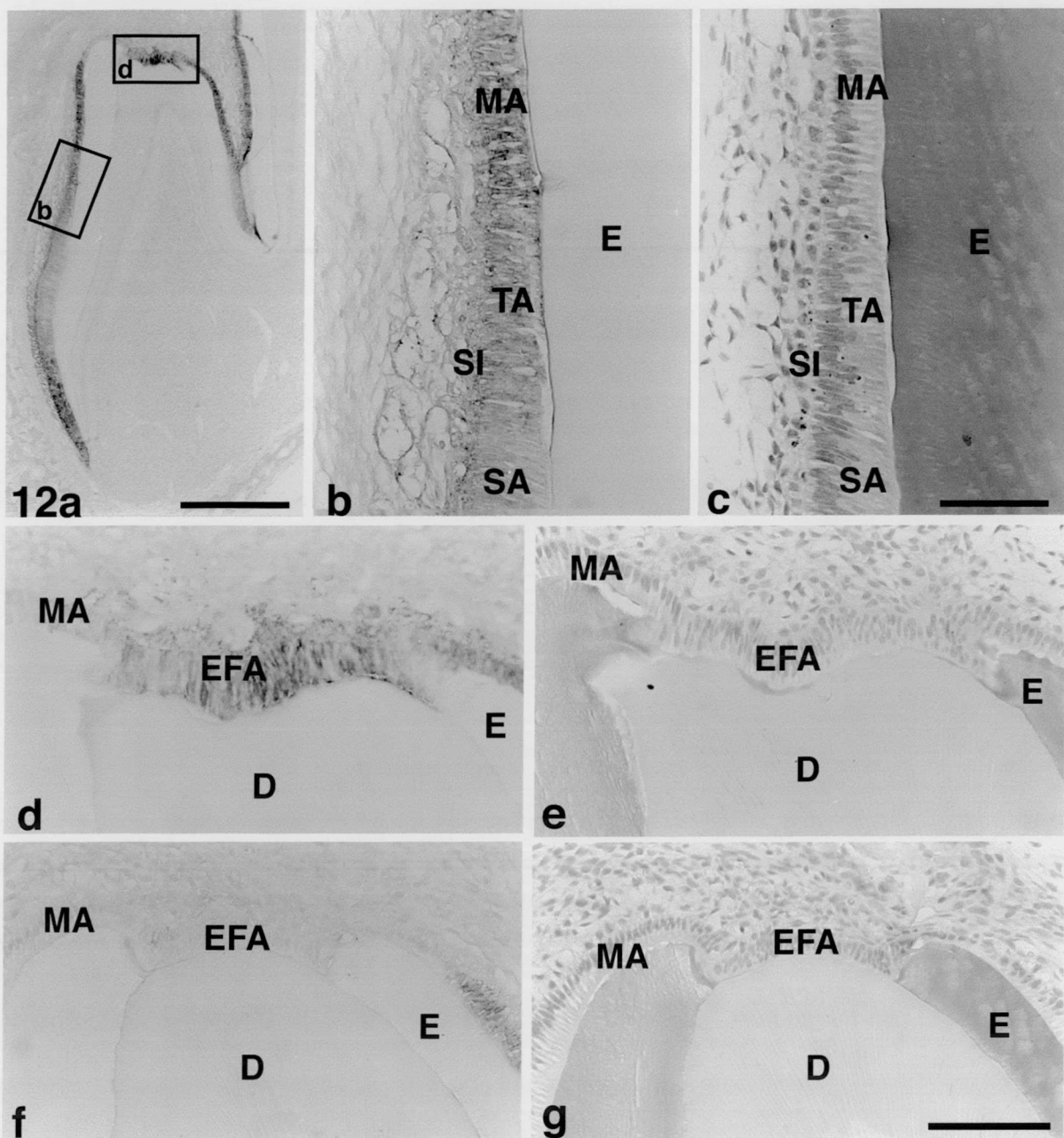


図12 生後10日齢のラット上顎第一臼歯の組織像 (c, e, g) およびcalbindin D28k (CB) 陽性反応 (a, b, d, f) の分布。

- a. 近心咬頭。歯頸部から咬頭頂にかけてcalbindin D28k(CB)陽性反応の強い部分と弱い部分が交互に存在する。ABC法。
  - b. 図12aのbox部の拡大像。分泌期エナメル芽細胞 (SA) の後期および移行期のエナメル芽細胞 (TA) は成熟期エナメル芽細胞 (MA) と比べて弱いCB陽性反応を示す。E, エナメル質; SI, 中間層細胞。ABC法。
  - c. 図12bの隣接切片。HE染色。
  - d. 図12aのbox部の拡大像。いくつかのEFA細胞および成熟期エナメル芽細胞 (MA) はCB陽性反応を示す。D, 象牙質; E, エナメル質。ABC法。
  - e. 図12dの隣接切片。EFA細胞は核の局在化を認めない。HE染色。
  - f. 図12aと同一切片で観察した遠心咬頭。EFA細胞およびいくつかの成熟期エナメル芽細胞 (MA) はCB陰性である。ABC法。
  - g. 図12f の隣接切片。EFA細胞は細胞高径が低く、核の局在化を認めない。HE染色。
- スケールバー, 図12a 200  $\mu$ m, 図12g 100  $\mu$ m, 図12b-fは図12gと同じ拡大率である。

生後14日齢では、近心あるいは中心咬頭の咬頭頂のエナメル芽細胞は隣接する上皮細胞とともに縮合エナメル上皮を形成するのが観察できた（図13a, c）．全ての縮合エナメル上皮は強いcalbindin D28k陽性反応を示していた（図13b, d）．それに対し、多くのEFA細胞はcalbindin D28k陽性反応を示したが、一部に陽性反応の弱いものが存在していた（図13d）．EFA細胞と象牙質の間には、ヘマトキシリン好性の薄い基質が存在していた．

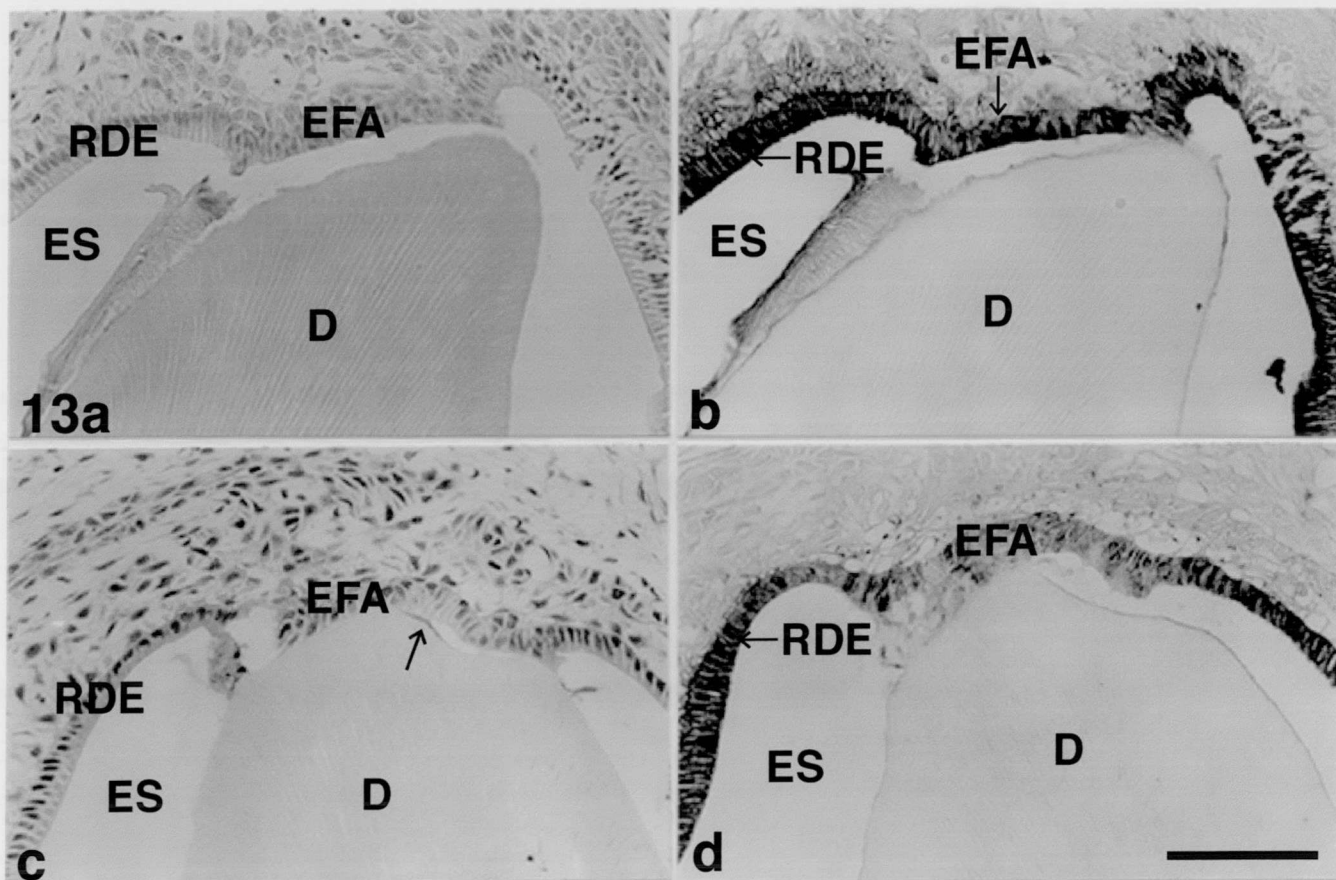


図13 生後14日齢ラット上顎第一臼歯の咬頭の組織像（a, c）およびcalbindin D28k（CB）陽性反応（b, d）の分布．

- 近心咬頭．エナメル芽細胞層は隣接する上皮層と退縮エナメル上皮（RDE）を形成している．ES，エナメルスペース；D，象牙質．HE染色．
  - 図13aの隣接切片．全ての退縮エナメル上皮の細胞およびEFA細胞はcalbindin D28k(CB)陽性である．ABC法．
  - 図13aと同じ切片で観察した中心咬頭．EFA細胞と象牙質との間にヘマトキシリン好性の基質層を認める（矢印）．ES，エナメルスペース；D，象牙質．HE染色．
  - 図13cの隣接切片．退縮エナメル上皮（RDE）の細胞は強いCB陽性反応を示すが、EFA細胞は弱いCB陽性反応を示すのみである．ABC法．
- スケールバー，100  $\mu$ m，全て同じ拡大率である．

上顎第一臼歯は生後17日齢頃より萌出し始め、退縮エナメル上皮は口腔粘膜と結合し接合上皮を構成する。萌出直後では（生後21日齢）接合上皮の表層の細胞のほとんどがcalbindin D28k陽性反応を示していたが（図14a），生後28日齢ではその一部の細胞がcalbindin D28k陽性反応を示すのみとなり（図14b），成獣では（生後56日齢）接合上皮にはcalbindin D28k陽性細胞は認められなかった（図14c）。

図15に、歯牙形成過程及び萌出後の内エナメル上皮由来の細胞におけるcalbindin D28kの分布の変化をまとめた。

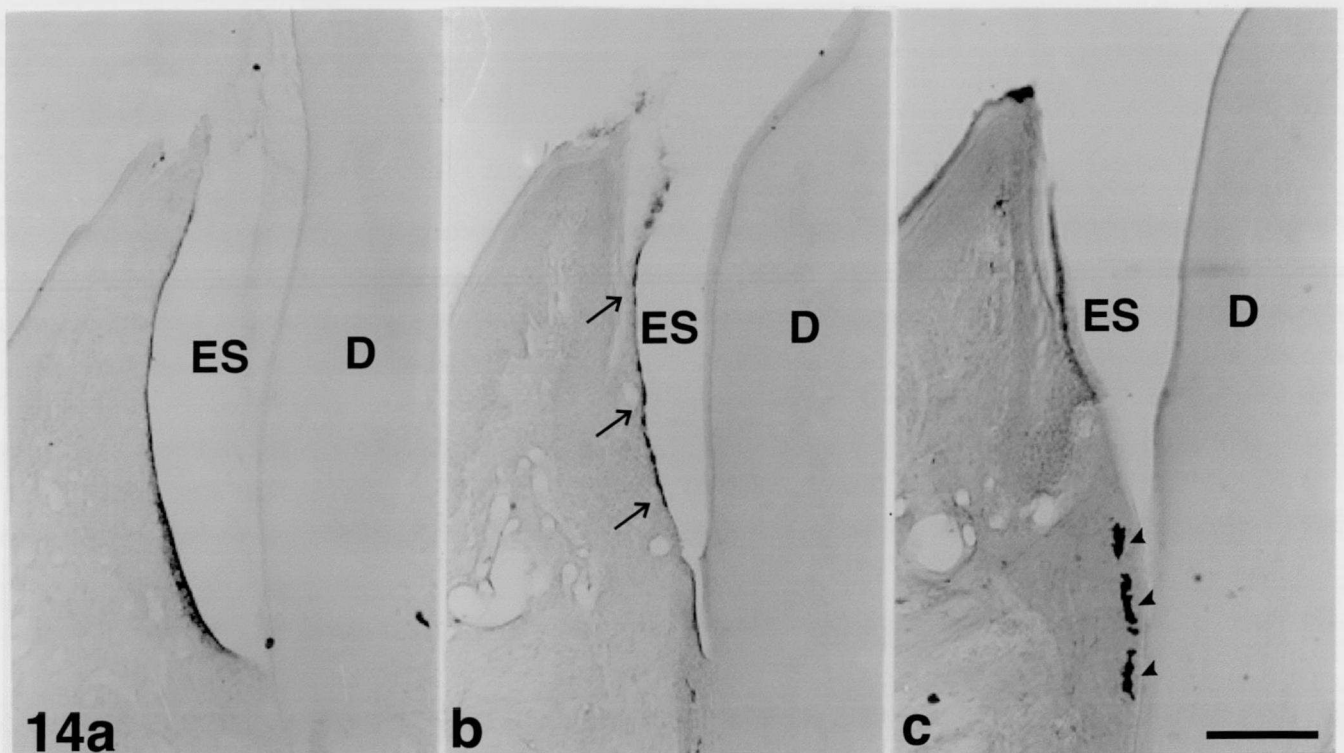


図14 生後21日齢（a），28日齢（b）および56日齢（c）のラット第一臼歯の歯肉内縁上皮におけるcalbindin D28k(CB)陽性反応の分布。

- 生後21日齢の接合上皮の細胞は強いCB陽性反応を示す。
  - 生後28日齢の接合上皮では平らなCB陽性細胞が散在する（矢印）。
  - 生後56日齢の接合上皮にはCB陽性細胞は認められない。歯頸部の歯根膜にCB陽性反応を示す細胞集団を認める（矢頭）。ES，エナメルスペース；D，象牙質。ABC法。
- スケールバー，200  $\mu$ m，全て同じ拡大率である。



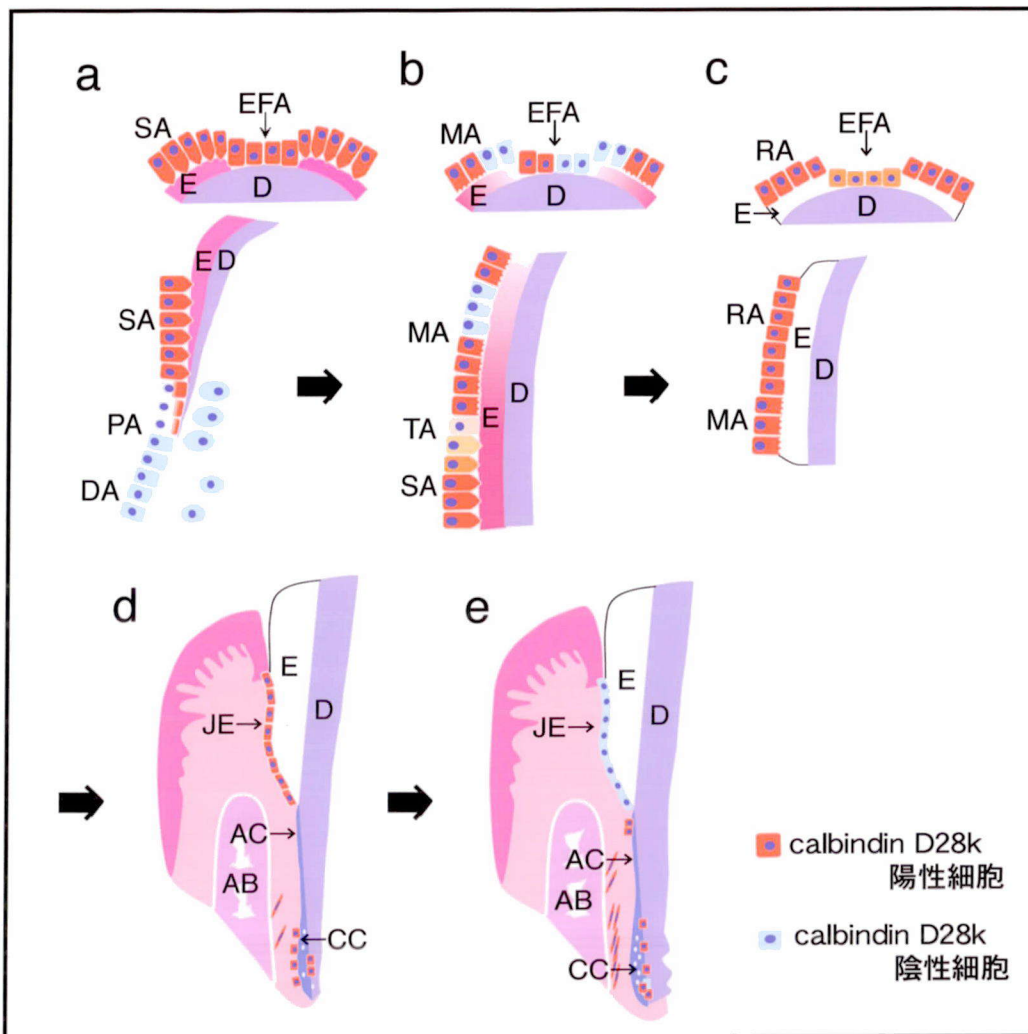


図15 歯冠形成過程および歯牙萌出後の、内エナメル上皮由来細胞におけるcalbindin D28kの分布の変化。

- 分化期 (DA) のエナメル芽細胞はcalbindin D28k陰性であった。前分泌期のエナメル芽細胞 (PA) 後期よりcalbindin D28k陽性反応は認められ始め、分泌期エナメル芽細胞 (SA) は細胞質全体が強いcalbindin D28k陽性反応を示した。また、分泌期エナメル芽細胞に隣接するEFA細胞は全て、calbindin D28k陽性反応を示した。
- 分泌期エナメル芽細胞 (SA) の後期および移行期のエナメル芽細胞 (TA) では、calbindin D28k陽性反応は弱くなったが、成熟期エナメル芽細胞 (MA) は再び、強いcalbindin D28k陽性反応を示した。しかし、成熟期エナメル芽細胞では、calbindin D28k陽性なもの、陰性なものが交互に出現した。さらに、成熟期エナメル芽細胞に隣接するEFA細胞にも、calbindin D28k陽性なもの、陰性なものが存在した。
- 縮合エナメル上皮 (RA) は全て強いcalbindin D28k陽性反応を示したが、隣接するEFA細胞ではcalbindin D28k陽性反応は徐々に弱まっていった。
- 歯牙萌出直後では、接合上皮 (JE) の表層の細胞は全てがcalbindin D28k陽性反応を示した。
- 接合上皮の細胞のcalbindin D28k陽性反応は経日的に弱まり、成獣においては認められなかった。

AB, 歯槽骨; AC, 無細胞セメント質; CC, 有細胞セメント質; D, 象牙質; E, エナメル質

## 考察

本研究において、HERSに関連する上皮系細胞のマーカーとしてモノクローナル抗ケラチン（clone K8,13）抗体を用いたが、以前よりこの抗体は広範囲のサイトケラチン（1, 5-8, 10, 11, 15）を認識することが報告されている（Gigi-Leitner et al., 1986）。またHERSに関連する上皮系細胞はサイトケラチン 5を発現することが報告されており（Gao et al., 1988），本研究で用いた抗ケラチン抗体はHERSに関連する上皮系細胞を染色すると思われる。従来よりケラチン抗体を用いた免疫組織化学的研究では、しばしばアルコール固定した試料が用いられてきた。今回、パラホルムアルデヒドを用いて固定した試料により予備実験を行った結果、どの上皮組織にもケラチン様免疫反応はほとんど認められなかった。そこで、抗原の腑活化処理（Cattaretti et al., 1992）を行った後に抗ケラチン抗体による免疫染色を行ったところ、エナメル芽細胞やHERSの細胞など上皮系細胞に強いケラチン様免疫反応を認めた。また、この抗原腑活化処理の後でもcalbindin D28kに対する免疫反応には影響がないことが確認された。よって今回の実験では、パラホルムアルデヒドで固定された試料を用いてパラフィン切片を作製し、抗原腑活化処理の後、抗ケラチン抗体と抗calbindin D28k抗体を用いて蛍光二重染色を行った。

ラット成獣の根分岐部付近のcalbindin D28k陽性細胞は、電顕的所見より、陥凹した核と豊富なトノフィラメントを有し細胞小器官に乏しいことが示されたが、これは以前より報告されているマラッセの上皮遺残の超微構造に類似している（Hamamoto et al., 1989）。さらに、マラッセの上皮遺残は、ラット臼歯において根分岐部や歯頸部に多く分布するのに対し、根尖部付近には少ないことが知られているが、これは、今回示したcalbindin D28k陽性細胞の分布様式と類似する。これらのことより、根分岐部付近に認められるcalbindin D28k陽性細胞はマラッセの上皮遺残であることが示唆された。また、ラット臼歯の歯根形成時に、歯根象牙質と有細胞セメント質との間の中間セメント質にヘルトヴィッヒ上皮鞘由来の細胞が取り込まれることが、電顕的（Lester 1969），あるいは免疫組織化学的研

究 (Altati et al. 1996) により明らかにされている。本研究において、中間セメント質に認められたcalbindin D28k陽性細胞は、その微細構造から上皮系細胞であることが示唆され、これらの細胞はヘルトヴィッヒ上皮鞘由来であると考えられる。

腸管や腎などカルシウム輸送機能を有する組織においては、calbindin D28kはカルシウムイオンの運搬や恒常性の維持に関与していると考えられている (Christakos et al. 1988)。しかし近年、calbindin D28k様免疫反応はニューロンなどカルシウム輸送機能を有しない細胞においても認められており (Andressen et al. 1993)、calbindin D28kは種々の刺激に対してニューロンを保護する働きを有することが報告されている (Freund et al., 1990; Mattson et al., 1991, 1995; Heitzmann et al., 1992; Rami et al., 1992)。従って、calbindin D28kは、マラッセの上皮遺残や中間セメント質の細胞などの、ヘルトヴィッヒ上皮鞘由来の細胞においても、細胞の生存維持に関与している可能性が考えられる。マラッセの上皮遺残が、今回示した超微構造からもわかるように細胞活性が低いにも関わらず、長期間存在し続けることはこの仮説を支持している。一方、マラッセの上皮遺残はエナメル基質タンパク質の一つであるamelogeninを産生し、さらに石灰化物を形成する能力を有することが報告されている (Hamamoto et al., 1996)。このことから、calbindin D28kはマラッセの上皮遺残においても、エナメル芽細胞と同様に石灰化に関与している可能性も否定できない。

以前より免疫組織化学的研究によって、歯槽骨内にcalbindin D28k陽性の細胞を認めることが報告されており (Christakos and Norman, 1975; Celio et al., 1984)、また近年、*in situ* hybridization 法によって、歯槽骨中の骨芽細胞や骨細胞にcalbindin D28kのmRNAが発現することが明かとなっている (Berdal et al., 1984)。今回の所見では、歯槽骨側の歯根膜にcalbindin D28k陽性の細胞を認めたが、歯槽骨の骨細胞はcalbindin D28k陰性であった。ラット臼歯は通常生理的に遠心移動を行っており、もし、歯根膜中の骨芽細胞がcalbindin D28k陽性反応を示すのであれば、全ての歯根で近心側に強いcalbindin D28k陽性反応が示されることが考えられるが、

今回の結果では、近心根では遠心側に、遠心根では近心側に強いcalbindin D28k陽性反応を認めた。このことは骨芽細胞はcalbindin D28k陰性であることを示唆している。

今回の結果から、歯牙萌出以前の歯根膜にはcalbindin D28k陽性細胞は認められず、萌出し、咬合を開始した時期に始めて歯根膜線維芽細胞はcalbindin D28k陽性反応を示すこと、さらに、calbindin D28k陽性細胞の数およびcalbindin D28k陽性反応の強さは、その後経日的に増加することが明かとなった。歯根膜は咬合力や歯の生理的移動などの刺激を受けているので、線維芽細胞は常に活性の高い状態にあり、歯根膜のコラーゲン線維は非常にターンオーバーのサイクルが早いことが知られている (Skougar et al., 1970; Sodek and Ferrier, 1988)。このことから、calbindin D28kは歯根膜線維芽細胞のカルシウム濃度を調節することにより、咬合力による刺激に対する細胞の維持に関与していることが考えられる。この推察は、ラット臼歯の歯間部に顎間ゴムを挿入することにより矯正力を与えると、一過性に圧迫側における歯根膜のcalbindin D28k陽性反応を示す線維芽細胞の数が増加すること (Youn et al., 1999) からも裏付けられる。

象牙芽細胞にcalbindin D28kが局在するか否かに関しては意見が分かれている。いくつかの報告では、ラット臼歯および切歯の象牙芽細胞はcalbindin D28k陰性であるとしている (Taylor, 1984; Taylor et al., 1984; Elms and Taylor, 1987; Hotton et al., 1995)。しかし、Berdalら (1993,1996) はラット切歯の象牙芽細胞にcalbindin D28k陽性反応を示し、また、Magloireら (1988) およびBailleul-Forestierら (1996) はヒト象牙芽細胞がcalbindin D28k陽性であることを報告している。今回の研究では、ラット成獣の歯髄においては象牙芽細胞はcalbindin D28k陰性であったが、歯根形成初期の前象牙芽細胞および象牙芽細胞の一部はcalbindin D28k陽性であった。象牙芽細胞の細胞膜にはカルシウム輸送チャネル、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ エキスチェンジャー、Ca-ATPaseが存在することが知られている (Linde and Lundgren, 1995)。さらに近年、前象牙芽細胞もまたカルシウムチャネルを有していることから、前



象牙芽細胞はカルシウム輸送に関与していることが示唆されている (Seux et al., 1994) . それゆえ、歯根象牙質形成初期において、calbindin D28kが前象牙芽細胞や象牙芽細胞の細胞内カルシウム濃度の調節に関与していると考えられる。

齧歯類の臼歯咬頭頂付近に存在するenamel-free areaでは、萌出後には象牙質はエナメル質に覆われていないが、発生段階においては内エナメル上皮由来の細胞であるEFA細胞が象牙質に隣接して存在する。このEFA細胞の発生段階における形態変化に関して意見が分かれている。すなわち、EFA細胞は分泌期のエナメル芽細胞様、あるいは成熟期のエナメル芽細胞様に形態変化するという報告がある (Sakakura et al., 1989; Yamamoto et al., 1998) . 一方で、EFA細胞は発生の全段階を通じて前分化期エナメル芽細胞様で、核の局在化や細胞高径の伸張を示さないという報告もある (Inai et al., 1992) . 今回の研究では、分泌期エナメル芽細胞に隣接するEFA細胞の一部は、核の局在化を示し、さらに、細胞高径のわずかな伸張を示した。しかし、分泌期の後期以降ではEFA細胞は核の局在化を示さなかった。また、EFA細胞は全ての発生段階で、隣接するエナメル芽細胞とは明らかに細胞形態が異なっていた。成熟期の初期において、すでにEFA細胞と象牙質の間にはエナメル基質様の薄い基質層が認められるが、その後、この層の厚さには変化は見られなかった。以上の所見より、発生段階の初期にはEFA細胞は基質タンパク質を分泌するが、すぐに分泌機能を喪失するものと考えられる。

エナメル芽細胞におけるcalbindin D28kの分布の変化に関しては以前より多くの報告がある (Taylor, 1984; Taylor et al., 1984; Elms and Taylor, 1987; Berdal et al., 1989, 1991a, b; Bailleul - Forestier et al., 1996) . 今回の研究では、エナメル芽細胞の分化に伴うcalbindin D28kの陽性反応の変化は以前の報告とほぼ一致していた。しかし、これまでの報告では分泌期エナメル芽細胞は常に強いcalbindin D28k陽性反応を示していたのに対し、今回の結果では、分泌期の後期から移行期にかけてのエナメル芽細胞でcalbindin D28k陽性反応が弱くなっていた。Hotton ら (1995) は *in situ* hybridization法によって、ラット切歯の前分泌期エナメル芽細胞は強い

calbindin D28kのmRNAを発現するが、分泌期エナメル芽細胞に分化するとシグナルが急激に減少することを報告している。この所見は、今回示したcalbindin D28kの分布の所見と一致する。

今回の研究では、分泌期エナメル芽細胞に隣接する全てのEFA細胞と、成熟期エナメル芽細胞に隣接するEFA細胞の多くがcalbindin D28k陽性であった。EFA細胞におけるcalbindin D28kの局在に関する報告は少ないが、Berdal ら（1989）はラットのEFA細胞はcalbindin D28k陰性であると報告している。彼らの結果と今回の結果の違いは、固定法や使用している抗体の違いに起因するのかもしれない。EFA細胞は基質を分泌する機能を早期に喪失することが考えられるが、隣接する分泌期エナメル芽細胞とほぼ同様のcalbindin D28kの分布様式を示していた。このことから、calbindin D28kは基質の分泌には直接的には関与しておらず、前分泌期エナメル芽細胞および隣接するEFA細胞が、分泌期エナメル芽細胞および分泌期エナメル芽細胞様の細胞に分化する際に何らかの機能を有している可能性が考えられる。また、成熟期エナメル芽細胞では、calbindin D28k陽性反応はruffle-ended ameloblast に強く認められ、smooth-ended ameloblastでは弱いことが知られている（Berdal et al., 1991）。このことより、calbindin D28kは成熟期エナメル芽細胞において、基質の石灰化あるいは細胞の形態変化に関与していることが示唆されている。一方、Yamamoto ら（1998）は、EFA細胞はエナメル芽細胞と同様にアルカリフォスファターゼ活性を有すること、さらに、EFA基質内に石灰化構造物を認めることを報告している。今回の結果から、EFA細胞は隣接する成熟期のエナメル芽細胞と類似したcalbindin D28kの分布様式を示すことがわかった。従って、成熟期エナメル芽細胞に隣接するEFA細胞は、EFA基質の石灰化などの成熟期エナメル芽細胞と同様の細胞特性を有していることが示唆された。

今回の研究で、保護期のエナメル芽細胞および初期の接合上皮がcalbindin D28k陽性であることがわかった。保護期ではエナメル芽細胞はヘミデスモゾームを形成し、エナメル質表面と接着し始める（Eisenmann, 1998）。また、虹彩の上

皮細胞より分離した細胞に $\text{Ca}^{2+}$ を添加するとヘミデスモゾームの形成が促進することが報告されており (Trinkaus-Randall and Gipson, 1984), ヘミデスモゾーム形成には $\text{Ca}^{2+}$ が重要な働きをしていると考えられる。今回の結果から、ヘミデスモゾーム形成の初期の段階では、保護期のエナメル芽細胞および接合上皮の細胞に calbindin D28k陽性反応を認めたが、その数は日齢が進むにしたがい減少していった。以上のことから、calbindin D28kは保護期のエナメル芽細胞においては、細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を調節することを通してヘミデスモゾーム形成に関与しており、歯肉内縁上皮でのヘミデスモゾームの維持には直接的には関与していないことが示唆された。

以上の所見より、歯牙形成過程において、calbindin D28kはエナメル芽細胞や象牙芽細胞など石灰化に関与する細胞のみならず、マラッセの上皮遺残などの細胞活性の低い細胞の維持や、歯根膜線維芽細胞などでの種々の刺激に対する細胞の保護といった、様々な機能を有していることが示唆された。

## 結論

本研究では、歯冠および歯根形成過程におけるcalbindin D28kの分布の変化を形態学的に詳細に検索した。

その結果、1) 歯牙形成過程においてcalbindin D28kは、石灰化能を有するエナメル芽細胞のみならず、石灰化能を有しないマラッセの上皮遺残、歯根膜線維芽細胞、歯肉内縁上皮などにも分布する。2) calbindin D28k陽性反応を示すマラッセの上皮遺残および中間セメント質の細胞は、その超微構造から細胞活性が低いことが示唆され、calbindin D28kは、これらの細胞の維持に関与している。3) 臼歯歯根膜でのcalbindin D28k陽性線維芽細胞は咬合開始時期より増加することから、calbindin D28kは咬合による機械的刺激に対する細胞の反応と関連する。4) calbindin D28kは、退縮エナメル上皮におけるヘミデスモゾーム形成に関与してい

る． 5) EFA細胞はエナメル芽細胞と同様のcalbindin D28kの分布を示すことから、calbindin D28kは石灰化のみならず細胞の分化に関連している、ことが示唆された．

以上のことから、calbindin D28kは歯牙形成過程において、石灰化に関与する細胞のみならずマラッセの上皮遺残などの細胞活性の低い細胞の維持や、歯根膜線維芽細胞などでの種々の刺激に対する細胞の保護といった、様々な機能を有していることが示唆された．

## 謝辞

稿を終えるにあたり，研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導と御教示を賜りました，大阪大学歯学部小児歯科学講座 祖父江鎮雄 教授，大嶋 隆 助教授，口腔解剖学第一講座 栗栖浩二郎 教授，ならびに脇坂 聡 助教授に衷心より御礼申し上げます．また，本研究に対し多くの御援助，御協力を頂いた大阪大学歯学部小児歯科学講座および口腔解剖学第一講座の皆様方に感謝致します．

## 文献

- Addison WHF, Appleton JL (1921) On the development of the ameloblasts of the albino rat, with special references to enamel-free area. *Anat Rec* 21: 43
- Alati I, Lundmark C, Hammarström L (1996) The localization of epithelial root sheath cells during cementum formation in rat molars. *J periodont Res* 31: 433-440
- Andressen C, Blücke I, Celio MR (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 271: 181-208
- Bailleul-Forestier I, Davideau JL, Papagerakis P, Noble I, Nessmann C, Peuchmaur M, Berdal A (1996) Immunolocalization of vitamin D receptor and calbindin-D 28k in human tooth germ. *Pediatr Res* 39: 636-642
- Baimbridge KG, Miller JJ, Parkes CO (1982) Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res* 239: 519-525
- Berdal A, Balmain N, Brehier A, Hotton D, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H (1989) Immunological characterization, development pattern and vitamin-D-dependency of calbindin D-28k in rat teeth ameloblasts. *Differentiation* 40: 27-35
- Berdal A, Nanci A, Smith CE, Ahluwalia JP, Thomasset M, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H (1991a) Differential expression of calbindin-D 28kDa in rat incisor ameloblast throughout enamel development. *Anat Rec* 230: 149-163
- Berdal A, Hotton D, Kamyab S, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H (1991b) Subcellular co-localization and co-variations of two vitamin D-dependent proteins in rat ameloblasts. *Arch Oral Biol* 36: 715-725
- Berdal A, Hotton D, Pike JW, Mathieu H, Dupret J-M (1993) Cell- and stage-specific expression of vitamin D receptor and calbindin genes in rat incisor: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Dev Biol* 155: 172-179
- Berdal A, Hotton D, Staffar JL, Thomasset M, Nanci A (1996) Calbindin-D9k and calbindin-D28k expression in rat mineralized tissues in vivo. *J Bone Mineral Res* 11: 768-779
- Berdderman PJ, Wasserman RH (1974) Chemical composition, affinity for calcium and some related properties of the vitamin D-dependent calcium-binding protein. *Biochemistry* 13: 1687-1694
- Bosshardt DD, Nanci A (1997) Immunodetection of enamel- and cementum-related (bone) proteins at the enamel-free areas and cervical protein of the tooth in rat molars *J Bone Miner Res* 12: 367-379

- Bosshardt DD, Nanci A (1998) Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 46: 135-142
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchorow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168: 357-363
- Celio MR, Norman AW, Heizmann CW (1984) Vitamin D-dependent calcium-binding-protein and parvalbumin occur in bones and teeth. *Calcif Tissue Int* 36: 129-130
- Celio MR, (1990) Calbindin D28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35: 375-475
- Christakos S, Norman AW (1975) Vitamin D-induced calcium binding protein in bone tissue. *Science* 202: 70-71
- Christakos S, Gabrielides C, Rhoten WB (1989) Vitamin D-induced calcium binding protein: chemistry, distribution, functional conditions, and molecular biology. *Endocr Rev* 10: 3-26
- Cohn SA (1957) Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am J Anat* 101: 295-319
- Eisenmann DR (1998) Amelogenesis In: Ten Cate AR (ed) *Oral Histology - Development, Structure, and Function* (5th edn), Mosby, St. Louis, MO, USA, pp. 197-217
- Elms TN, Taylor AN (1987) Calbindin-D28k localization in rat molars during odontogenesis. *J Dent Res* 66 1431-1434
- Freund TF, Buzaki G, Leon A, Baimbridge KG, Somogyi P (1990) Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia. *Exp Brain Res* 83: 55-66
- Gao Z, Mackenzie IC, Williams DM, Crchley AT, Leigh I, Lane EB (1988) Pattern of keratin-expression in rests of Malassez and periapical lesions. *J Oral Pathol* 17: 178-185
- Garcia-Segura LM, Baetens D, Roth J, Norman AW, Orci L (1984) Immunohistochemical mapping of calcium-binding protein immunoreactivity in rat central nervous system. *Brain Res* 296: 75-86
- Gaunt WA (1956) The development of enamel and dentin on the molars of the mouse, with an account of the enamel-free areas. *Acta Anat* 28: 111-134
- Gigi-Leitner O, Geiger B, Czernobilsky B (1986) Cytokeratin in squamous metaplasia of the human uterine cervix. *Differentiation* 31: 191-205

- Gross M, Kumar R (1990) Physiology and biochemistry of vitamin D-dependent calcium binding proteins. *Am J physiol* 259: F195-F209
- Hamamoto Y, Nakajima T, Ozawa H (1989) Ultrastructural and histochemical study on the morphogenesis of epithelial rests of Malassez. *Arch Histol Cytol* 52: 61-70
- Hamamoto Y, Nakajima T, Ozawa H, Uchida T (1996) Production of amelogenin by enamel epithelium of Hertwig's root sheath. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 81: 703-709
- Heitzmann CW, Braun K (1992) Change in  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 15: 259-264
- Hotton D, Davideau JL, Berdal A (1995) In situ hybridization of calbindin-D28k transcripts in undecalcified sections of the rat continuously erupting incisor. *Connect Tissue Res* 32: 137-143
- Inai T, Nagata K, Kukita T, Kurisu K (1992) Demonstration of amelogenin in the enamel-free cusps of rat molar tooth germs: immunofluorescent and immunoelectron microscopic studies. *Anat. Rec.* 233: 588-596
- Lester KS (1969) The incorporation of epithelial cells by cementum. *J Ultrastruc Res* 27: 63-87
- Linde A, Lundgren T (1995) From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Dev Biol* 392: 213-222
- Magloire H, Jeffre A, Azerad J, Lawson DEM (1988) Localization of 28kDa calbindin in human odontoblasts. *Cell Tissue Res* 254: 341-348
- Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos SB (1991) Evidence of calcium-reducing and excito-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 6: 41-51
- Mattson MP, Cheng B, Baldwin SA, Smith-Swintosky VL, Keller J, Geddes JW, Scheff SW, Christakos S (1995) Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response. *J Neurosci Res* 42: 357-370
- Nakamura N, Bringas PJ, Slavkin HC (1991) Inner enamel epithelia synthesize and secrete enamel proteins during mouse molar occlusal "enamel-free area" development. *J Craniofac Genet Dev Biol* 11: 96-104
- Rami A, Rabie A, Thomasset M, Kriegstein J (1992) Calbindin-D28k and ischemic damage of pyramidal cells in rat hippocampus. *J Neurosci Res* 31: 89-95
- Roth J, Thorens B, Hunziker W, Norman AW, Orci L (1981) Vitamin D-dependent calcium-binding protein: immunocytochemical localization in chick kidney. *Science* 214: 197-



199.

- Roth J, Brown D, Norman AW, Orci L (1982) Localization of the vitamin D-dependent calcium-binding protein in mammalian kidney. *Am J Physiol* 243: F243-F252
- Sakakura Y, Fujiwara N, Nawa T. (1989) Epithelial cytodifferentiation and extracellular matrix formation in enamel-free areas of the occlusal cusp during development of mouse molars: Light and electron microscopic studies. *Am J Anat* 184: 287-293
- Seux D, Joffre A, Fosse M, Magloire H (1994) Immunohistochemical localization of L-type calcium channels in the developing first molar of the rat during odontoblast differentiation. *Arch Oral Biol* 39: 167-170
- Skougaard MR, Levy B, Simpson J (1970) Collagen metabolism in skin and periodontal membrane of the marmoset. *Scand J Dent Res* 78: 256-262
- Sodek J, Ferrier JM (1988) Collagen remodeling in rat periodontal tissues: compensation for precursor reutilization confirms rapid turnover of collagen. *Collagen Rel Res* 8: 11-21
- Taylor AN, McIntosh JE, Bourdeau JR (1982) Immunocytochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein in renal tubules of rabbit, rat and chick. *Kidney Int* 21: 765-777
- Taylor AN (1984) Tooth formation and the 28000-dalton vitamin D-dependent calcium-binding protein: an immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem* 32: 159-164
- Taylor AN, Gleason WA, Lankford GL (1984) Rat intestinal vitamin D-dependent calcium-binding protein: immunocytochemical localization in incisor ameloblasts. *J Dent Res* 63: 94-97
- Trinkaus-Randall V and Gipson IK (1984) Role of calcium and calmodulin in hemidesmosome formation in vitro. *J Cell Biol* 98: 1565-1571
- Wassermann RH, Taylor AN (1966) Vitamin D3 induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 152: 791-793
- Webb PP, Moxham BJ, Benjamin M, Ralphs JR (1996) Changing expression of intermediate filaments in fibroblasts and cementoblasts of the developing periodontal ligament of the rat molar tooth. *J Anat* 188: 529-539
- Yamamoto H, Sasaki J, Matumura J, Nomura T, Sato EF, Shimokawa H, Ishizeki K, Nawa T (1997) Characterization of the inner enamel epithelium in the enamel-free area based on the ability to secrete enamel protein demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Acta Anat* 160: 232-238
- Yamamoto H, Ishizeki K, Sasaki J, Nawa T (1998) Ultrastructural and histochemical changes and apoptosis of inner enamel epithelium in rat enamel-free area. *J Craniofac Genet Dev Biol* 18: 44-50

- Youn SH, Maeda T, Kurisu K, Wakisaka S (1999) Alteration in the expression level of calbindin D28k in the periodontal ligament of the rat molar during experimental tooth movement. *Arch Histol Cytol* 62: 139-147
- Zhou XY, Dempster DW, Marion SL, Pike JW, Haussler MR, Clemens TL (1986) Bone vitamin D-dependent calcium-binding protein is localized in chondrocytes of growth-plate cartilage. *Calcif Tissue Int* 38: 244-247