

—総説—

歯の損傷後の歯髄修復過程と象牙質・歯髄複合体の生物学的特性

大 島 勇 人

新潟大学 大学院医歯学総合研究科
顎顔面再建学講座 硬組織形態学分野

Repair Responses of Dental Pulp to Tooth Injury and Biological Properties of Dentin-pulp Complex

Hayato OHSIMA

*Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue,
Department of Tissue Regeneration and Reconstruction,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Niigata, Japan*

平成16年11月22日受付 12月9日受理

キーワード：窩洞形成，歯髄，クラスII組織適合抗原，免疫組織化学，象牙芽細胞，再生，歯の再植

Key words: Dental Cavity Preparation, Dental Pulp, Histocompatibility Antigens Class II, Immunohistochemistry, Odontoblasts, Regeneration, Tooth Replantation

Abstract: Regeneration—the creation of a new tissue after the original one has been lost—is the fundamental biological capability in an organism. Numerous organs are considered to contain stem cells referred to as adult stem cells, even in the adult. Adult stem cells can give rise to a limited set of adult tissue types. In the field of clinical dentistry, it is well-known that the dentin-pulp complex is capable of repair after tooth injuries such as tooth replantation/transplantation or restorative procedures including cavity preparation. This phenomenon may indicate that dental pulp stem cells exist in the pulp tissue of the matured tooth. However, the exact origin of the cells responsible for secretion of reparative dentin matrix has not been clearly identified. The existence of the dental pulp stem cells in the human wisdom or deciduous teeth, which has been reported by the recent studies, would be informative for the regenerative treatment of teeth. This review focuses on the repair responses of dental pulp to tooth injury and the possible role of antigen-presenting cells and heat shock proteins (HSPs) in the reparative processes. Moreover, attention is focused on adult stem cells in the pulp tissue.

HSPs are expressed in normal various cells as well as under stressful conditions, although they were first discovered under the latter conditions. These proteins have been reported to possess different functions including molecular chaperones or a general mediator of inflammation. Our recent studies have demonstrated that the intense HSP-25-immunoreactivity is found in the differentiated odontoblasts. Tooth injuries such as cavity preparation or tooth replantation cause the degeneration of the odontoblast layer to result in the loss of HSP-25-immunoreactions in the suffered dental pulp. Numerous class II major histocompatibility complex (MHC)-positive cells appeared temporarily along the pulp-dentin border after these injuries. Subsequently, newly differentiated odontoblasts acquire an HSP-25-immunoreactivity. These findings indicate that the time course of changes in the expression of HSP-25-immunoreactivity reflects the degeneration/regeneration process of odontoblasts and that the temporal appearance of the class II MHC-positive cells at the pulp-dentin border is suggestive of their participation in odontoblast differentiation as well as in initial defense reactions during the pulpal regeneration process. Thus, it is important to recognize that a variety of cellular signaling from these components may be present in the extracellular milieu at sites of injury in the pulp tissue.

抄録：生物のもつ最も生命らしい現象の一つに再生がある。私たちのからだは、外傷や切断などの物理的損傷に対しての治癒能力を備えており、その傷を受けた場所に応じて修復し、元通りに再生する。このような再生現象において、細胞が作り出されるかなめの部分には組織幹細胞が存在する。歯科領域においても再生現象が知られており、窩洞形成や歯の再植・移植等の歯の損傷に対して、歯髄は再生能力を有している。しかしながら、歯髄組織再生に必要な組織幹細胞の存在は臨床経験から推察されているものの実験によっては実証されていないのが現状であり、再生の場が大きく失われると再生が期待できない場合が多い。最近、ヒトの智歯や脱落乳歯から歯髄幹細胞を同定したという報告が相次ぎ、歯髄の再生医療は手の届きそうな段階まできたかの印象を受ける。本稿では、これまで私たちが明らかにした研究データを基盤に、歯の損傷後の歯髄修復過程における抗原提示細胞とストレスタンパク質の役割について概説し、歯髄における組織幹細胞の存在と役割についても言及する。

ストレスタンパク質（熱ショックタンパク質）heat shock protein (HSP) とは、生物が高温などのストレスにさらされた時に一時的に合成が誘発されるタンパク質で、ストレスによる損傷からの自身の防御と修復に関与するが、炎症反応を活性化することも知られている。このようなストレスタンパク質のうち低分子量のHSP-25が象牙芽細胞に高濃度に存在している。窩洞形成・歯の再植後の歯髄修復過程においても、再生象牙芽細胞がHSP-25発現を示すことが明らかになっており、歯髄間葉細胞の象牙芽細胞への最終分化にストレスタンパク質が重要な役割を果たすとともに、変性した象牙芽細胞から漏出したストレスタンパク質が免疫反応に影響を与えていることが推測された。一方、このような歯髄修復過程において、歯髄・象牙質界面にクラスⅡ主要組織適合複合体 (major histocompatibility complex: MHC) 分子をもつ抗原提示細胞が一過性に出現することも明らかになっている。ストレスタンパク質と抗原提示細胞の相互作用が歯髄侵襲後の迅速な象牙芽細胞分化に一役を担っているのかもしれない。歯髄の再生過程は、上皮組織が存在しない環境下で、象牙質を含む細胞外基質、免疫担当細胞の遊走、象牙芽細胞の変性という3つの側面から現象を捉える必要がある。

はじめに

エナメル質の下に隠された象牙質、そして象牙質で囲まれた歯髄の特性については十分に理解されていないのが現状である。歯の主体をなす象牙質は、象牙細工の材料として知られている様に細かい加工もできる適度な硬さと緻密さをもって、生体で最も硬いエナメル質を縁の下から支えている。そして、象牙質を造るのは象牙芽細胞であり、歯が磨り減ったり、う蝕や治療で削られたりすると、外から見えない場所（歯髄）で象牙芽細胞が再び象牙質を造ることは臨床経験上良く知られた事実である。

歯科医師は日常茶飯事に高速のエアタービンを用いて窩洞形成を行っている。エナメル質は歯の萌出後にはその形成細胞であるエナメル芽細胞を欠くため、組織修復能力のない組織であるが、その内部にある象牙質と歯髄は高い組織修復能力を有し、なかでも歯髄は歯の栄養や知覚などのさまざまな機能をもっている。歯科医師が生業の一つとしている窩洞形成は言い換えると象牙質や歯髄に傷害を与えていることにほかならない。

一方、歯の再植・移植は外傷などに起因する歯の脱臼後の処置、歯の欠損を補う処置として歯科臨床で一般的に行われている治療法であるが、その後の歯髄の治癒過程についての理解は乏しいように思われる。根尖孔の開いた根未完成歯であれば、再植・移植後にも歯髄が再生することが報告されており¹⁾、再植・移植に引き続く歯

髄の治癒過程、ひいては歯髄の特性の理解は臨床上非常に重要なことである。再植というのは、意図的、偶発的にかかわらず、一度歯槽窩から脱離した歯を再びもとの歯槽窩（抜歯窩）に戻す行為といえる。歯に及んだ損傷程度により歯髄や歯周組織の治癒経過は影響を受けるが、再植時には根尖（もしくは髄床底に存在する髄管）で血管と神経が切断されるため、健全な歯を再植したとしても歯髄は大きなダメージを受けることが想像できる。本題に入る前に、まず象牙質・歯髄複合体の概念、そして象牙芽細胞分化のメカニズムについて述べる。

象牙質・歯髄複合体とは？

象牙質と歯髄は共に歯乳頭に由来する間葉組織であり、象牙芽細胞は歯髄に存在する。この歯乳頭細胞は、歯根膜・セメント質・歯槽骨などの歯周組織細胞に分化すると考えられている歯小囊細胞と共に、脳や脊髄などの中枢神経の原基（神経管という）が造られる時に、上皮から間葉（注：細胞間隙が広く、中胚葉に由来する組織）にこぼれ落ちた細胞群（神経堤細胞という）で、歯のできる領域（第1鰓弓）に遊走し、将来歯胚ができる領域の上皮細胞（口腔粘膜上皮が増殖してできた歯胚上皮）の誘導により象牙芽細胞に分化すると考えられている。象牙質を顕微鏡で観察すると、そこには無数の象牙細管と呼ばれる管状構造物が存在する。象牙芽細胞はその細胞突起を象牙細管中に伸ばしているの、ひとたび象牙質に侵襲が加わると象牙細管が口腔内に露出するこ

となり、象牙細管もしくは象牙芽細胞突起を通して歯髄が影響を受け、引き続き歯髄炎が惹起される。このように、象牙質と歯髄は、発生学的・構造的・機能的に互いに密接な関係を持つことから、象牙質・歯髄複合体として、これらを1つのユニットとして捉えることが肝要である。

象牙質は膠原線維（コラーゲン線維）を主成分とする基質に磷酸カルシウムのハイドロキシアパタイト結晶が沈着したもので、成分から見ると骨の一種として単純に理解できそうであるが、象牙質は骨とは似て非なる組織である。一番の大きな違いは、骨はいったん造られたのち、絶えず吸収と形成を繰り返しながら新しい骨に置き換わる（リモデリング）のに対し、象牙質は一度造られるとリモデリングされることがない。さらに、骨の場合は形成細胞である骨芽細胞がみずからつくった骨に埋め込まれ骨細胞となり、その後の骨をつくるのは他の細胞に任せてしまう。一方、象牙芽細胞はその細胞突起（トームスの線維ともいう）を象牙質に埋め込むだけで、細胞の本体は常に象牙質の外にあり、この突起がこの象牙細管の中を走っている。このように、象牙質と骨との違いを演出しているのが象牙芽細胞の存在であり、造られた象牙質に無数の象牙細管をもつことが象牙質の特徴であるといえよう。従って、歯の損傷後に歯髄内で造られる硬組織が象牙質なのか骨なのかを見極めることは、歯髄の治癒過程の理解に極めて重要であり、骨の特性がリモデリングを受けるということは、アンキローシスが起こるメカニズムを解明する手がかりになると考えられる。

一方、疎性結合組織である歯髄は硬組織である象牙質に囲まれ、外界とは根尖孔で交通するという一種の閉鎖空間に近い特殊な環境におかれている。このことにより、歯髄は各種の外來刺激により炎症が惹起されると内圧の増加をきたしやすく、重篤な歯髄炎に移行しやすいという特徴がある。歯髄は低応諾性（注：low complianceの日本語訳。炎症の原因が取り除かれても速やかに炎症が消退せず、歯髄の治癒が長引くという意味）の組織であるといわれる所以はここにある²⁾。

象牙芽細胞分化のメカニズム

象牙芽細胞の分化は、鐘状期歯胚の将来咬頭頂になる部位から開始する。歯の初期発生と同じように、象牙質形成は上皮間葉相互作用により進行する。すなわち最後の細胞分裂を終えた基底膜近くの歯乳頭細胞が成長因子の受容体を発現するようになると、基底膜にトラップされていた内エナメル上皮細胞から分泌されたある種のシグナル（成長因子）を受け取って象牙芽細胞に分化すると考えられている。しかしながら、現在のところ象牙芽細胞の最終分化を誘導する決定因子は明らかになってい

ない³⁾。

円柱形を呈する象牙芽細胞はゴルジ装置や粗面小胞体を発達させ、細胞遠位端（基底膜側）に細かい複数の細胞突起をもつようになる。象牙芽細胞は、基質（コラーゲン線維性および非コラーゲン線維性タンパク質）を分泌すると同時に細胞層を維持しながら歯髄内方に後退すると、互いに押し合いへし合い丈の異なる細胞で多列上皮様の細胞層を構成するようになる（図1）^{4, 5)}。この時期の象牙芽細胞は1本の太い細胞突起を発達させるが、ある時期になると分泌の勢いが急に衰え、細胞層の丈も減少し、その後も一生涯象牙質（注：最初に造られる象牙質を第一象牙質といい、咬合を開始したのちにゆっくり造られる象牙質を第二象牙質という）を造り続けるという。

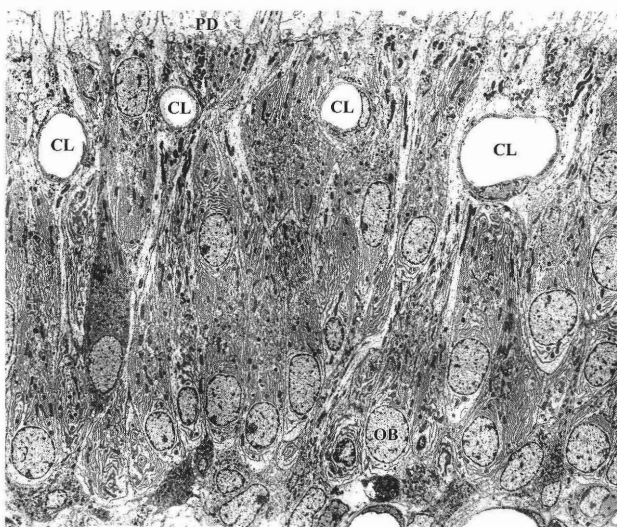


図1. 活発に象牙質を形成している時期のラット切歯象牙芽細胞層の電顕写真（Springer-Verlag社の許可を得て転載⁴⁾）。象牙芽細胞層は様々な丈の象牙芽細胞（OB）で構成されており、多列上皮様を示す。象牙芽細胞層内の象牙前質（PD）近傍には有窓性毛細血管（CL）が位置する。

窩洞形成に対する象牙芽細胞の反応

歯を削った後に歯髄で象牙質が形成されることは良く知られた事実であったが、歯を削った後に象牙芽細胞がどのような損傷を受けるのか？損傷を受けた象牙芽細胞の運命はどうなるのか？など象牙質が造られるメカニズムについては不明な点が多かった。そこで、個体差がほとんどなく再現性のある結果を得ることができるネズミ（ラット）を使った動物実験系を確立して歯を削った後の歯髄反応において細胞に何が起こるかを調べた⁶⁾。

エアタービンで象牙質を切削すると、象牙細管または象牙芽細胞の突起を介して、象牙芽細胞の傷害を引き起

こす。(窩洞形成後に仮封をせず開放しておく) 私たちの動物実験では、象牙質の厚さ約1/2を切削すると傷害野の象牙芽細胞は完全に破壊されバラバラになり、滲出性病変により破壊された象牙芽細胞は歯髄内方へと押しやられる⁶⁾。その後、6時間以内に象牙芽細胞は変性し、マクロファージや好中球により処理される(図2)⁷⁾。

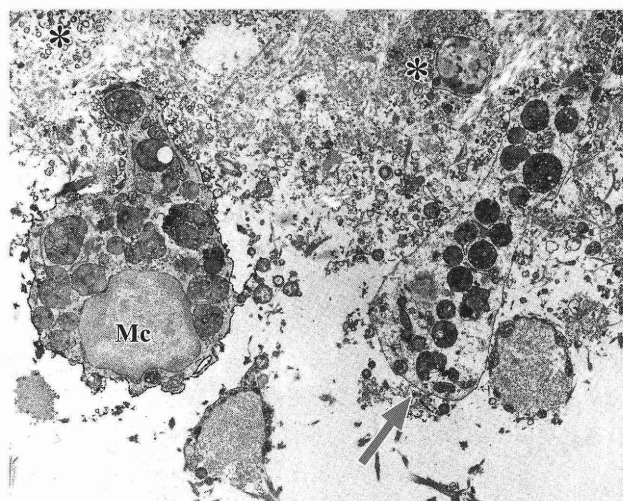


図2. ラット臼歯窩洞形成6時間後の歯髄・象牙質界面のOX6⁺免疫電顕写真(WILEY-LISS社の許可を得て転載⁷⁾)。変性した象牙芽細胞の残骸(*)が象牙細管内に見られ、歯髄・象牙質界面には、抗原提示能のあるマクロファージ(Mc)とないもの(矢印)が存在する。[†]: OX6抗体はクラスII MHC分子を認識する。

窩洞形成後に象牙芽細胞が変性・処理された後の歯髄では、間葉細胞が新たな象牙芽細胞に分化することになる⁶⁾。新たに分化した象牙芽細胞は通常の象牙質形成の際の象牙芽細胞とほぼ同じ細胞学的特徴をもつが、多列上皮様の配列はしない。これは通常の象牙質形成に比し象牙質形成速度が遅いことと、象牙芽細胞の数が少ない事に起因すると考えられる。

正常歯髄における抗原提示細胞の分布および微細構造

臓器移植の際の組織適合性に重要な役割を果たすのが主要組織適合複合体(major histocompatibility complex: MHC)分子であり、MHCはクラスIとクラスIIに大別される。クラスI MHC分子は体のすべての細胞に発現しているのに対し、クラスII MHC分子はマクロファージやBリンパ球などの限られた細胞にしか発現しない。なお、外来の異物に対する特異的な防御反応において重要な役割を果たすのがTリンパ球とBリンパ球である。抗原ペプチドとMHC分子の複合体を細胞の表面

に発現している細胞を抗原提示細胞というが、Tリンパ球は細胞膜上に提示されたこの複合体を認識する。抗原提示細胞は、体のリンパ組織および非リンパ組織に広く分布しており、体内への外来抗原の侵入に速やかに反応し、Tリンパ球に抗原提示することで生体防御に極めて重要な役割を果たす^{8, 9)}。抗原提示細胞にはBリンパ球を除くと貪食(注: 食べ込みphagocytosisのこと)能をもつマクロファージと樹枝状の形態をした貪食能をもたない樹状細胞dendritic cellsに区別されている。マクロファージは抗原提示能をもつものともたないものがあり、もっぱら死んだ細胞等の処理に携わるのに対し、樹状細胞はプロフェッショナルな抗原提示細胞であると考えられている。これまでの免疫組織化学的研究により、抗原提示細胞が正常歯髄にも広く分布することが明らかになっているが¹⁰⁻¹³⁾、これら抗原提示細胞は全歯髄細胞中で約8%を占めるといい、樹状細胞の数はマクロファージに比し多いと言われている¹⁴⁾。

象牙芽細胞層内に位置する抗原提示細胞は樹枝状を示し、細い突起を四方に伸ばしている。これら歯髄の抗原提示細胞は外来刺激に対する初期免疫応答に重要な働きをすると考えられているが¹⁵⁾、正常歯髄において何故抗原提示細胞が象牙芽細胞層内に位置するかについては不明であり、その細胞学的特徴についても不明であった。常生歯(注: 一生涯萌出し続ける歯であるため、1本の歯で象牙質形成のすべてのステージを見ることが出来る)であるラットの切歯を用いて、象牙質形成における抗原提示細胞と象牙芽細胞との相関について詳しく調べてみると¹³⁾、象牙芽細胞層内に位置する樹状細胞は必ず象牙芽細胞層内の有窓性毛細血管に付随していた(図3)。象牙芽細胞層内に存在する時期は活発に象牙質が形成されている時期で⁴⁾、有窓性毛細血管を通して多量のアミノ酸、栄養物質、ミネラルなどが象牙芽細胞層内に入ってくることになる。この部位には生体に有害な物質が血行性に進入してくる可能性が考えられ、樹状細胞があたかも外来抗原の進入を待ちかまえているように見える。

これら樹状細胞は細胞内に特徴的な多胞小体をもつことから、活発な飲み込みpinocytosisを行っており、この細胞が防御細胞として機能しているものと思われる(図3)。第一象牙質形成の終了したラット臼歯歯髄では、樹状細胞は象牙芽細胞下層に位置しており、細胞突起を象牙芽細胞間に伸ばしているだけである¹⁶⁾(図4)。興味深いことに、ヒト歯髄において樹状細胞は象牙前質中にも存在し、しかも複数の象牙芽細胞突起に接触している¹⁷⁾。これらの細胞も他の部位の樹状細胞と同じ細胞学的特徴をもっていることから、象牙前質中に埋め込まれた死んだ細胞にはみえない。このことはヒトでは樹状細胞が象牙芽細胞の損傷をいち早く感受できるよう象牙前質内に

配置していると考えることができるが、樹状細胞と象牙芽細胞との密接な位置関係はこの細胞が象牙芽細胞の恒常性や機能などに関与する可能性を示唆している。

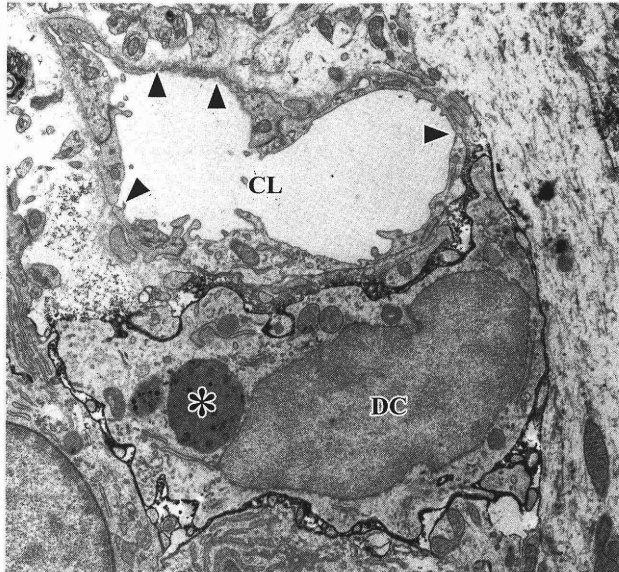


図3. 活発に象牙質を形成している時期のラット切歯象牙芽細胞層のOX6免疫電顕写真 (Arch. Histol. Cytol.の許可を得て転載¹³⁾). 象牙細胞層内毛細血管(CL)は多数の窓(矢じり)をもち、それにかみつくように樹状細胞(DC)が存在する。樹状細胞は特徴的な多胞小体(*)をもつ。

窩洞形成後の抗原提示細胞の反応

私たちはラット臼歯窩洞形成後の歯髄を微細構造学的に検討し、象牙質切削後初期に象牙細管深くに突起を伸ばす不規則な形態をした正体不明の細胞が歯髄・象牙質界面に存在することを報告した⁶⁾。この細胞の本態は長い間不明であったが、私たちの免疫組織化学的研究^{7, 16, 18)}により、この正体不明の細胞はクラスII MHC分子をもつ樹状細胞であることがわかった(図4, 5)。この実験モデルでは、窩洞形成前には樹状細胞は象牙芽細胞下層に位置しており、細胞突起を象牙芽細胞間に伸ばしている。窩洞形成直後に滲出性変化が惹起されると樹状細胞は象牙芽細胞と共に歯髄内方に押しやられ、形成6時間後には、マクロファージや好中球が歯髄・象牙質界面に集まる。12時間後には滲出性変化がほぼ消滅し、樹状細胞が歯髄・象牙質界面に集積し、その細胞突起を象牙細管内に深く侵入させる。象牙質切削後6時間で象牙芽細胞は変性・壊死し、マクロファージにより処理されることから⁷⁾(図2)、象牙質が切削を受けた部位は口腔内と歯髄が露出した象牙細管を介して交通することとなる。この際、象牙細管深くに突起を侵入させる樹状細胞

が、露出した象牙細管経由の外來刺激に対する歯髄防御細胞として機能していると考えられた。しかし、実験的に感染させた歯髄治療過程において、膿瘍形成など歯髄が治癒に向かわない場合には歯髄・象牙質界面には樹状細胞は出現しないことから¹⁹⁾、この現象は歯髄の治療過程に一過性に現れる興味深い現象であることが分かる。この後、歯髄の修復に伴い、歯髄・象牙質界面の樹状細胞はその数を減じ、窩洞形成3日後には新たに分化した象牙芽細胞下に位置するようになる。このことは、上皮細胞が存在しない系における新たな象牙芽細胞への分化に樹状細胞が関与している可能性も示唆している。

私たちの最近の研究により、YAGレーザーによる窩洞形成において興味深い知見を得た²⁰⁾。上記の実験と同じようにCrTmEr:YAGレーザーでラット臼歯に窩洞形成を施し仮封をせずに放置すると、窩洞形成12時間後にはエアタービンによる窩洞形成同様、歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現し、その細胞突起を象牙細管中に伸ばすことが分かった。しかし、24時間後には歯髄・象牙質界面から樹状細胞は姿を消し、代わって好中球が集積することが明らかになった(図6)。YAGレーザーによる歯の切削は、エアタービンの場合に窩底面に形成されるsmear layerを欠くことが報告されており²¹⁻²³⁾、容易に象牙細管経由の歯髄内細菌感染が惹起される様である。実際、私たちの実験系でも象牙細管中の口腔細菌の存在を明らかにしている²⁰⁾。この現象は、樹状細胞と好中球の炎症における役割の違いを示しているが、エアタービンによる窩洞形成ではsmear layerにより象牙細管がシールされており、歯髄・象牙質界面の樹状細胞が露出した象牙細管経由の外來刺激に対する防御細胞として機能しているという私たちの仮説は再考が必要であることを示している。また、レーザーによる切削を受け口腔内に露出した象牙細管は容易に細菌の侵入を許すことから、レーザーによる窩洞形成を施した場合はエアタービン以上に仮封を厳密に行う必要があると言える。

歯の再植後の歯髄治療過程と抗原提示細胞の反応

象牙質の修復に関して、歯が磨り減ったり、う蝕や治療で削られたりして局所的に形成される不規則な象牙質を第三象牙質と呼ぶ。そして反応の開始の原因となる外來刺激の強さの程度により、さらに反応象牙質と修復象牙質に分類される²⁾。反応象牙質が、適度な刺激に反応して、生き残った象牙芽細胞によって形成されるのに対し、修復象牙質は、損傷部位の象牙芽細胞の死後、新しく分化した象牙芽細胞により形成される。歯の再植もまた象牙芽細胞に対して致命的な損傷を与える訳だが、私たちが確立したラット臼歯を用いた歯の再植実験の結果^{18, 24, 25)}を以下に示す(図7)。

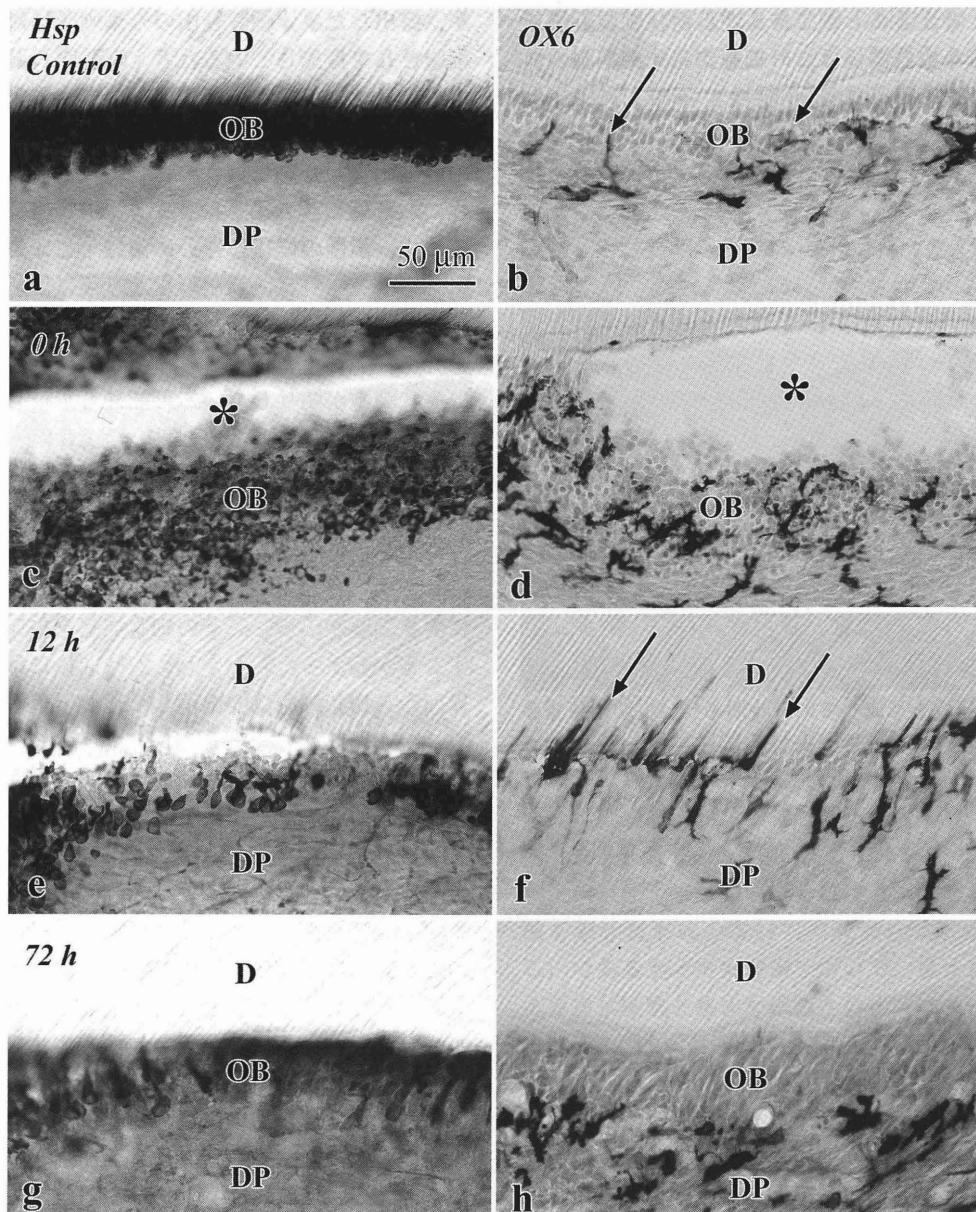


図4. ラット臼歯窩洞形成後の歯髄・象牙質界面の経時的な変化. HSP-25 (a, c, e, g) とOX6免疫染色 (b, d, f, h) (Oxford University Press社の許可を得て転載¹⁰⁾). HSP-25タンパク質を高濃度にもつ象牙芽細胞 (a) は窩洞形成によりバラバラになり (c), 12時間後には歯髄・象牙質界面から姿を消すが, その下層にはHSP-25陽性細胞が残存する (e). 窩洞形成72時間後には, 歯髄・象牙質界面にHSP-25陽性の再生象牙芽細胞が配列する (g). 一方, 抗原提示細胞は象牙芽細胞下層に位置しており, その細胞突起を象牙芽細胞間に伸ばしている (矢印) (b). 窩洞形成は歯髄・象牙質界面に滲出性変化を惹起するが, 抗原提示細胞は歯髄内方にシフトする (d). 窩洞形成12時間後には, 歯髄・象牙質界面に抗原提示細胞が集まり, 細胞突起を象牙細管内に伸ばす (矢印) が, 72時間後に再生象牙芽細胞が配列すると, 象牙芽細胞下層に位置するようになる. D: 象牙質, DP: 歯髄, OB: 象牙芽細胞, *: 人工的に強調された滲出性変化

歯の再植後の歯髄治癒過程を考える場合に重要なことは、「再植後に象牙芽細胞がどうなるか」ということである。歯が削られる場合は、損傷が象牙質まで及ぶと、象牙細管を通して間接的、もしくは象牙芽細胞の突起が直接損傷を受ける。歯の再植後の歯髄では、根尖で神経と血管が切断されるので、歯髄内の血行が遮断されることになる。血行の遮断は歯髄細胞への酸素供給が低下し、

象牙芽細胞は酸素不足で死んでいくことになる。低酸素状態を強いられた象牙芽細胞が生き残るか否かは、血行回復までの時間にかかっているが、抜歯から歯の再植までにかかった時間や歯髄の機械的な傷害程度により左右される。髄床底部では（髄管を通して）早期に血行が回復し象牙芽細胞が生き残る割合が高いようで、血行の回復に時間がかかる髄角部では多くの象牙芽細胞は死んで

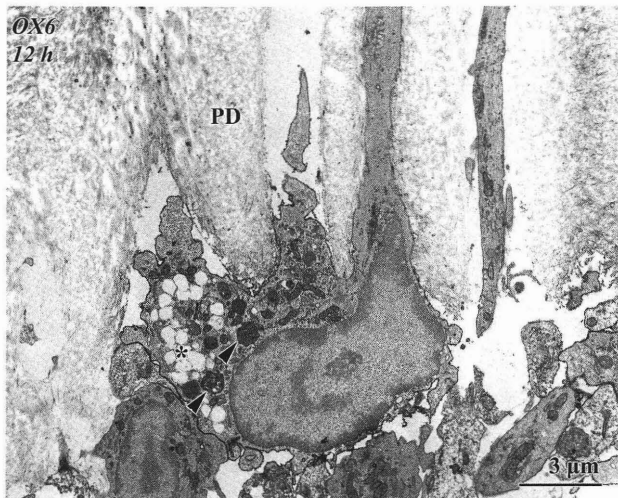


図5. ラット臼歯窩洞形成12時間後の歯髄・象牙質界面のOX6免疫電顕写真(WILEY-LISS社の許可を得て転載⁷⁾). 歯髄・象牙質界面に集まり細胞突起を象牙細管内に伸ばす抗原提示細胞は、多胞小体(矢じり)や空胞(*)をもつ。PD:象牙前質

しまうようである^{24, 25)}。

象牙芽細胞が死んでしまうと、死んだ象牙芽細胞に代わり歯髄間葉細胞が新しい象牙芽細胞に分化する。低酸素状態により象牙芽細胞が死滅すると、マクロファージや好中球による変性細胞の除去が行われる。そして、局所の掃除が終わると歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現し、その細胞突起を象牙細管の中に深く侵入させ、新しく分化した象牙芽細胞が配列すると、その後歯髄・象牙質界面から姿を消す。この現象は窩洞形成の場合と同様、歯の損傷後の歯髄治癒過程に一過性に起こる興味深い現象であると言える^{18, 24)}。

歯髄の発生とストレスタンパク質

酵母や大腸菌から哺乳動物細胞に至るまで、生物が高温など危険な環境に曝されると生合成が著しく促進される一群のタンパク質が存在する。「熱ショックタンパク質 heat shock protein (HSP)」(注:熱ショック以外のストレスにも応答するのでストレスタンパク質ともいう)と命名されているこのタンパク質は、ストレスによる損傷からの自身の防御と修復に関与することが知られている²⁶⁻²⁸⁾。私たちの最近の研究により、分化した象牙芽細胞がこのストレスタンパク質の一つ(HSP-25)をもつことが明らかになった²⁹⁻³¹⁾。

ラット切歯を用いて、エナメル質形成および象牙質形成の各ステージにおけるHSP-25発現について検索してみると、象牙芽細胞とエナメル芽細胞が特異的に同タンパク質を発現していることが明らかとなった²⁹⁾。エナメル質形成におけるHSP-25発現については本稿の主題で

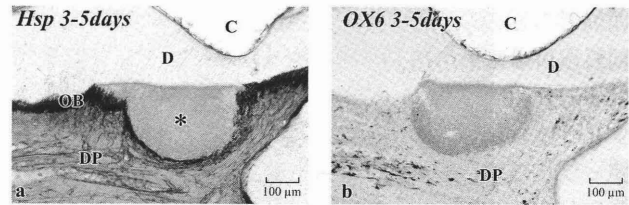


図6. ラット臼歯YAGレーザーによる窩洞形成3~5日の歯髄のHSP-25(a)とOX6免疫染色(b)(Springer-Verlag社の許可を得て転載²⁰⁾). 切削を受けた象牙質に対応して歯髄内に膿瘍形成(*)が惹起されており、その周囲をHSP-25陽性細胞が取り囲んでいるが(a), 歯髄・象牙質界面から抗原提示細胞は姿を消す(b). C:窩洞, D:象牙質, DP:歯髄, OB:象牙芽細胞

はないので詳細は省略するが、象牙質形成過程において、象牙芽細胞は分化の進行と共にHSP-25強陽性を示すようになったのに対し、歯髄間葉細胞は一過性にHSP-25発現が見られたのみであった。また、HSP-25強陽性を示すエナメル芽細胞と象牙芽細胞の共通点は、アクチンフィラメントを発達させていること、細胞層を維持し後退しながら基質を分泌することである。このことはHSP-25発現がエナメル質形成ならびに象牙質形成における形成細胞移動時の細胞配列の維持に関与すると推測された。

つぎに生後1日から100日までのラット臼歯を用いて、有根歯の歯髄におけるHSP-25の分布を検索してみると、さらに面白いデータを得た³¹⁾。歯髄間葉細胞が一過性にHSP-25陽性を示すこと、象牙芽細胞が分化の進行と共にHSP-25強陽性を示すようになることはラット切歯のデータと同じ結果であったが、象牙芽細胞の分泌活性が低下する8週以降においても歯冠部象牙芽細胞は持続してHSP-25強陽性を示した。一方、髓床底部及び歯根部については、歯根形成期に歯髄全体が一過性にHSP-25陽性を示し、その後象牙芽細胞を含め陽性反応は減弱したが、生後100日になるとすべての象牙芽細胞がHSP-25強陽性を示した(図4)。以上の様に、HSP-25発現は象牙芽細胞の分化に密接に関与することが明らかとなったが、必ずしも細胞の分泌活性とは一致しなかった。歯冠部と歯根部においての象牙芽細胞のHSP-25発現の違いは、時期により歯冠部と歯根部で象牙芽細胞の分化程度、機能発現に差があることに起因すると考えられた。

窩洞形成とストレスタンパク質

窩洞形成後の歯髄修復過程におけるHSP-25発現^{7, 18, 32)}について紹介する(図4)。窩洞形成は傷害を受けた象牙芽細胞と象牙前質間に滲出性変化を惹起することは上述の通りである。傷害を受けた象牙芽細胞の中には

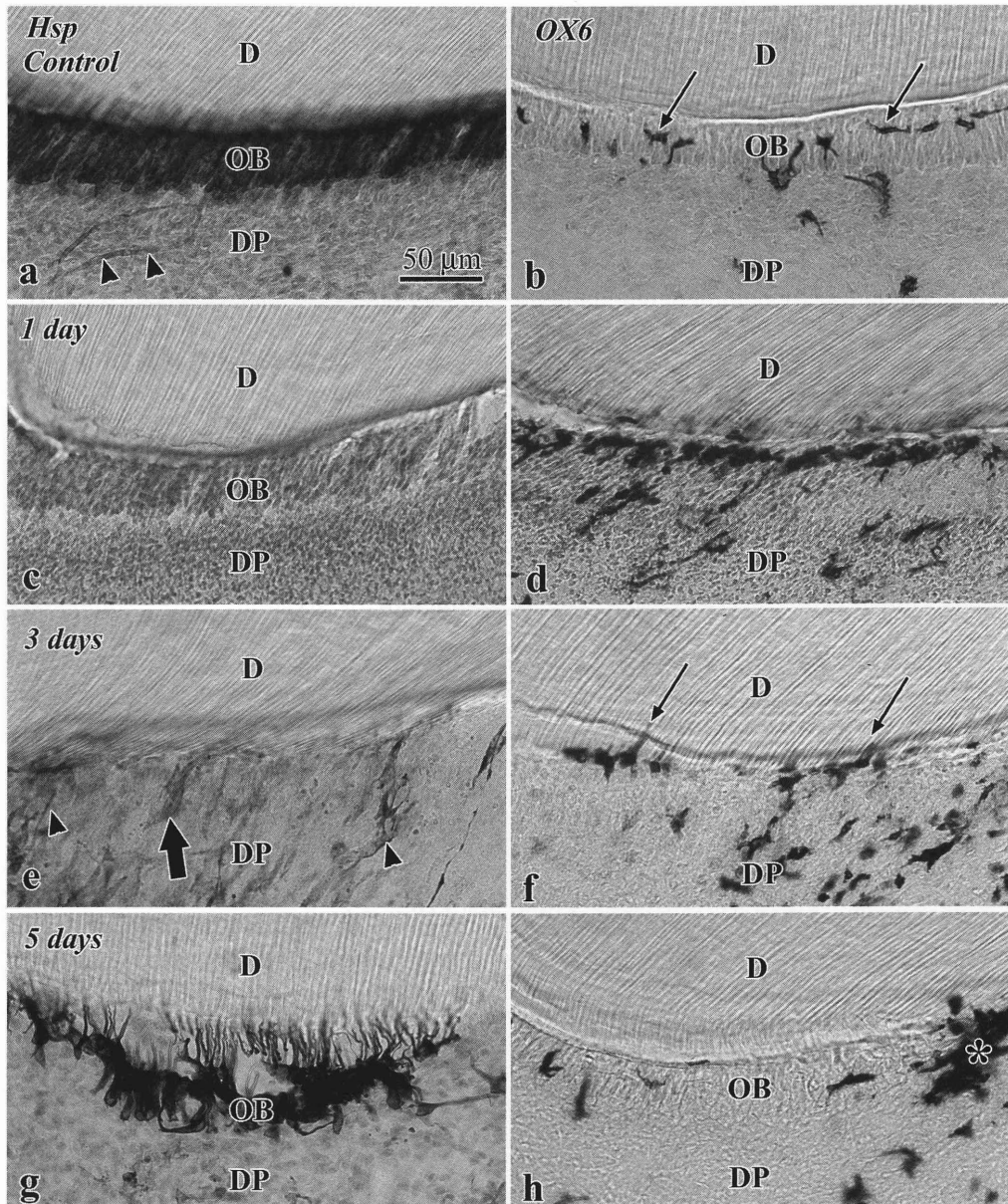


図7. ラット白歯再植後の歯髄・象牙質界面の経時的な変化. HSP-25 (a, c, e, g) とOX6免疫染色 (b, d, f, h) (Oxford University Press社の許可を得て転載¹⁸⁾). HSP-25タンパク質を高濃度にもつ象牙芽細胞 (a) は再植後に免疫活性を失い (c), 3日後には歯髄・象牙質界面から姿を消すが, HSP-25弱陽性細胞が近傍に位置する (太い矢印) (e). 再植5日後には, 歯髄・象牙質界面に複数の突起をもつHSP-25陽性の再生象牙芽細胞が配列する (g). 一方, 抗原提示細胞は象牙芽細胞層内に位置しており (矢印) (b), 再植1日後には歯髄・象牙質界面に抗原提示細胞 (マクロファージ) が集積する (d). 3日後には, 歯髄・象牙質界面に再び抗原提示細胞 (樹状細胞) が集まり, 細胞突起を象牙細管の中に伸ばす (矢印) が (f), 5日後に再生象牙芽細胞が配列すると, 一部 (*) を除いて歯髄・象牙質界面から姿を消す (h). D: 象牙質, DP: 歯髄, OB: 象牙芽細胞, 矢じり: HSP-25陽性の神経要素

HSP-25免疫陽性を持続しているものが存在したが, 12時間後までに歯髄・象牙質界面のHSP-25免疫反応は消失した。しかしながら, 傷害を受けた部位の歯髄・象牙質界面から離れている部位では, 明らかな細胞突起をもたない円形の細胞がHSP-25免疫陽性を維持していた。この陽性細胞の存在は細胞極性が失われているものの窩洞形成後も象牙芽細胞が生存していることを意味する

と思われ, 72時間後には, 新しく分化した象牙芽細胞が歯髄・象牙質界面に配列し, HSP-25免疫陽性を示した。以上の様に, 窩洞形成においてHSP-25免疫反応が歯髄の再生過程における象牙芽細胞の動態を観察するのに優れたマーカーとして利用できることが明らかになった。窩洞形成12時間後において, 細胞突起をもたないHSP-25免疫陽性細胞が滲出性変化の部位の周囲に残存してい

ることは興味深い(図4)。この事実、ほとんどの象牙芽細胞は窩洞形成により傷害を受けるが、あるものは変性とマクロファージによる貪食を逃れ生存していることを示している。

歯の再植とストレスタンパク質

歯の再植後の歯髄におけるHSP-25タンパク質をみてみると^{18, 25)}, HSP-25タンパク質をもつ象牙芽細胞は再植後の血行の遮断により、1日後にはHSP-25を失い、血行が回復する再植5日後までに、複数の突起をもつHSP-25陽性細胞が歯髄・象牙質界面に配列し、その後多量の修復象牙質形成が見られた(図7)。このように、

HSP-25タンパク質が再植後の再生象牙芽細胞に特異的に発現することが示され、窩洞形成後の歯髄修復過程同様、歯髄間葉細胞の象牙芽細胞への最終分化にHSP-25タンパク質が重要な役割を果たすことが示されたと言えよう。このようにストレスタンパク質を見ることで一度死んだ細胞が新しい細胞で置き換わるイベントを目で見て確認できるのである。すなわち、このタンパク質を追うことで象牙芽細胞の運命と再生現象を捉えることが可能になった。

最近、ストレスタンパク質の炎症反応における新たな機能が注目を浴びている³³⁾。腫瘍細胞への低酸素、放射線、化学療法によるストレスは細胞内HSPタンパク質の増加を促し、腫瘍細胞の死はHSPタンパク質の細胞外への流出をきたし、周囲の多形核白血球を活性化し抗原提示細胞の遊走を惹起する。したがって、象牙芽細胞における高濃度のHSP-25タンパク質は、象牙芽細胞の破壊後に迅速な抗原提示細胞の遊走を促し、歯髄の治療に重要な役割を担っているのかもしれない。窩洞形成や歯の再植後の歯髄再生過程において、歯髄・象牙質界面に樹状細胞が一過性に出現することから、HSP-25タンパク質と抗原提示細胞の相互作用が歯髄侵襲後の迅速な象牙芽細胞分化に一役を担っているのかもしれない。言い換えれば、高濃度のHSP-25タンパク質をもった象牙芽細胞を備えた歯髄は免疫防御機能が高い組織だと言えるであろう(図8)。

象牙質・歯髄複合体の再生能力とその条件

ラットを用いた動物実験モデルにより歯の再植後の歯髄治療過程を検索すると、歯髄内に第三象牙質が形成される場合に加え歯髄が骨組織に置換する場合があります。後者の治療経過を辿る場合が多い²⁴⁾。現在両者の治療機転を規定するメカニズムは明らかになっていないが、局所に存在する細胞の分化能と再生の場が重要であると予想される。すなわち、歯髄内硬組織を造る細胞の由来と分化能、細胞の分化に影響を与える局所の微小環境が重要になる。微小環境は、象牙質や歯髄結合組織内のコラーゲン線維などの細胞外マトリックスに加え、細胞によって分泌されるシグナルによって規定されると考えられる。

歯髄内硬組織を造る細胞の由来については、二つの可能性が考えられる。私たちの実験モデルでは、歯の再植後5日で髄角部まで(髄床底部では3日で)血行と神経が回復する^{24, 25)}。この事実、再生血管と神経と共に歯周組織細胞が歯髄内に侵入する可能性があることを示している。再植前には歯髄には髄角部を除いてほとんど観察されなかった(歯根膜には存在している)PAS陽性細胞(注:PAS反応はグリコーゲンなどの多糖類を染め出

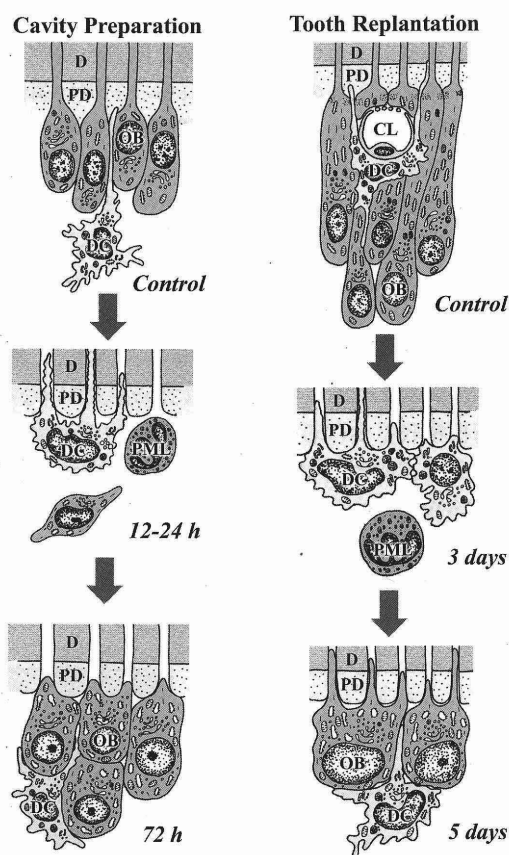


図8. ラット臼歯窩洞形成(左列)と再植後(右列)の歯髄・象牙質界面の象牙芽細胞と樹状細胞との相互関係を示す模式図(Oxford University Press社の許可を得て転載¹⁸⁾)。歯の損傷後の時間経過は異なるが、窩洞形成と歯の再植後に同じ変化が見られる。歯の損傷後にHSP-25陽性を示す象牙芽細胞(OB)が変性し、マクロファージにより除去されると、歯髄・象牙質界面に一過性に樹状細胞が出現しその細胞突起を象牙細管内に伸ばす。その2日後にHSP-25陽性の再生象牙芽細胞が歯髄・象牙質界面に配列すると、樹状細胞は象牙芽細胞下層に位置するようになる。CL:毛細血管、D:象牙質、DC:樹状細胞、PD:象牙前質、PML:好中球

す染色方法である)が歯の再植後に歯髄内に多数観察されることは、歯周組織細胞の歯髄内への侵入を示唆していると言えよう²⁴⁾。胎生期の膜性骨化過程(注:頭部の多くの骨は、その形成過程で軟骨の支柱をもたず、結合組織から直接骨ができる膜性骨化という様式をとる)では、グリコゲンを多量にもった間葉細胞が骨芽細胞に分化することが示されている³⁴⁾ので、このようなPAS陽性の細胞が骨形成に関わっているのかもしれない。

二つ目の可能性としては、歯髄細胞に骨形成能があるという考えである。実際、歯髄細胞の多分化能が報告されているが^{35, 36)}、もともと由来の異なる間葉細胞が混ざり合った複合組織が歯髄であるという考えを支持する結果が報告されている³⁷⁾。私たちの予備実験においても、ネズミ(マウス)の歯を抜いて、歯冠部だけを軟組織に移植すると、歯髄内には象牙質に加え、骨形成が確認できた(図9)。興味深いことに、既存の象牙質に連続して象牙質が造られているが、象牙質から離れた部位では骨が形成されている。この事実は、象牙芽細胞の分化には、基底膜や象牙質などの細胞外マトリックスの足場が必要であることを示していると言えよう。

以上の二つの仮説のうち、二つ目の可能性が高いと著者は考えているが、その場合には歯髄に象牙芽細胞と骨芽細胞に分化する能力のある二つの細胞群が混在するか、両者への多分化能をもつ一つの細胞群が存在するかどうかの可能性があると考えられる。歯の切削などの損傷が歯髄に及び象牙芽細胞がバラバラになると、局所で新しい象牙芽細胞が供給され修復象牙質形成が惹起される。この場合の歯髄では、骨芽細胞への分化を抑制する何らかのメカニズムが働いているのかもしれない。一方、

歯の再植の場合は、歯髄が広範な損傷を受けるために象牙芽細胞と骨芽細胞に分化する能力のある二つの細胞群のバランス、もしくは両者の分化をコントロールしているシグナルのバランスが崩れ、場合によっては歯髄が完全に骨に置換してしまう場合も起こりうると考えられよう。

歯の再植とアンキローシス

炎症性細胞のマーカーを用いて歯の再植後の歯髄における治癒過程を観察すると興味深い現象がみられた。それは、歯髄内に炎症反応が停滞すると骨形成が惹起され歯髄が骨組織に置換したものは、歯根吸収やアンキローシスを起こしやすいということである²⁴⁾。アンキローシスという現象は、歯が「歯としてのidentity」を失ったために周囲の歯槽骨と一体化した状態であると考えられる。実際、標本によっては、歯冠部を除き、歯が周囲の歯槽骨と一体化したものも観察される。一方、歯髄内に象牙質が形成される場合は、象牙質の部分的吸収を受けたとしてもアンキローシスを起こすことはない。歯髄内に象牙芽細胞が存在することが「歯としてのidentity」であると仮定すると、アンキローシスという現象を捉えやすい(但し、抜髄をした歯の場合には、歯としてのidentityを失うが、生体にとっては為害作用のない歯根膜付インプラントの様な存在となる)。また、乳歯の歯根吸収メカニズムについても十分にわかっていないが、乳歯が歯根吸収を受ける前には象牙芽細胞が消失してしまう³⁸⁾ことも、『歯髄内に象牙芽細胞が存在することが「歯としてのidentity」である』という仮説を支持する事実ではないだろうか。

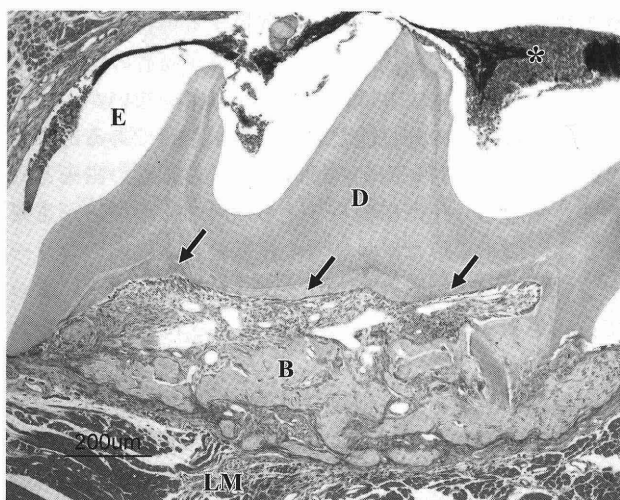


図9. マウス臼歯歯冠部を舌下部に移植(他家移植)して2週後のH-E染色像。既存の象牙質(D)に連続して第三象牙質(矢印)が形成されているが、象牙質から離れた部位では骨組織(B)が形成されている。E:エナメル質スペース, LM:舌筋, *:炎症性細胞

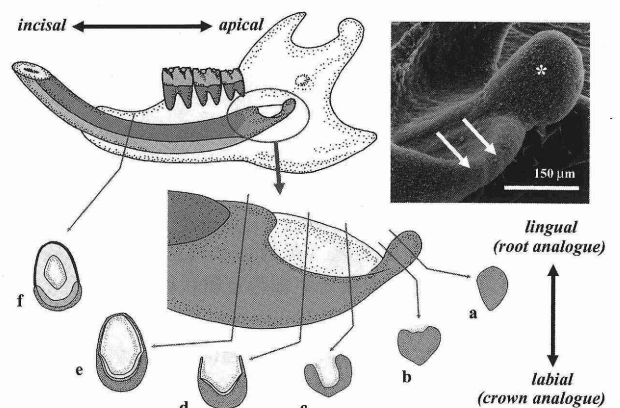


図10. 齧歯類切歯のapical budを示す模式図と走査電顕写真(右上)(ELSEVIER社の許可を得て転載⁴³⁾)。apical bud (*)はヒトが頭をもたげている様な形態をしており、その腕にあたるのがcervical loopである(矢印)。apical budの横断切片をつくると臼歯の蕾状期(a)、帽状期(b)、鐘状期(c)歯胚と同じ形態変化を示す。

組織幹細胞の存在と役割

謝 辞

生体で見られる再生現象において、細胞が作り出されるかなめの部分には組織幹細胞（注：成体の組織に存在する幹細胞でadult stem cellのこと。以下単に「幹細胞」と呼ぶ）が存在する。しかしながら、象牙質・歯髄複合体の再生に必要な幹細胞の存在は臨床経験から推察されているものの実験によっては実証されていないのが現状である。最近、ヒトの智歯や脱落乳歯から歯髄組織幹細胞を同定したという報告が相次いだ^{35, 36)}、幹細胞が歯髄に存在することについては確証は得られていない。既に述べた様に、歯髄細胞は象牙芽細胞と骨芽細胞の少なくとも二つの細胞群への分化能力がある可能性が高いが、これらの細胞が歯髄のどこに存在するのか？多分化能があるのか否か？は十分に分かっていない。今後の研究の進展が期待される。

さて、歯の発生研究では、ラットやマウスなどのネズミの切歯が好んで用いられている。これは、ネズミの切歯が常生歯だからである。最近この一生涯歯が生え続けるメカニズムについて分子生物学的な解明が進み、ネズミの切歯の形成端（注：切縁と反対側の根っこに相当する部分をこう呼ぶ）に幹細胞が存在することが明らかになった³⁹⁾。私たちのからだは見かけ上変化がないようでも、からだの至る所で細胞をつくっている場所がある。例えば皮膚や小腸の上皮細胞は常に新しい細胞に置き換わっているという⁴⁰⁾。このような再生現象が起こっているかなめの場所には次々と細胞を生み出す幹細胞が存在し、この幹細胞はニッチェ（注：ある成長因子などのシグナルによる幹細胞維持に必要な微小環境をニッチェという）によって維持されている。このネズミの形成端apical endをよく見ると、通常は歯の造られる時にしか見られない歯胚tooth budが恒久的に維持されていることが明らかとなり、私たちはこの領域をapical budと呼ぶことを提唱している（図10）⁴¹⁻⁴³⁾。歯の再生医療の具現化のためには、象牙質・歯髄複合体の発生および再生過程における幹細胞の動態を含めた形態形成・組織修復機構のいっそうの解明が必要になるが、私たちがより単純な歯の再生モデルとして常生歯を研究対象とし、apical budの維持・分化機構を解明することは、歯の再生医療具現化に向けての有効な最初のステップであり、この分子機構の解明こそが歯の再生医療に有益な情報を与えることになるであろう。今後は形態学者としての基盤を大切にすると共に、機能を直接調べることの出来る実験系をも確立し、歯の幹細胞研究など、歯の再生医療に繋がる研究に発展させていきたいと考えている。

稿を終えるにあたり、これら一連の研究の遂行のためにご指導頂いた故小林茂夫名誉教授、吉田重光教授（北海道大学）、高野吉郎教授（東京医科歯科大学）、前田健康教授、佐藤 修博士、さらに多大な協力を得た新潟大学 大学院医歯学総合研究科 硬組織形態学分野ならびに顎顔面解剖学分野教室員、大学院生、関係諸兄・諸姉に感謝の意を表す。これらの研究の一部は平成6～16年度科学研究費補助金（0677157, 0771601, 08771563, 10671696, 12671735, 14571727, 16390523）、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業および平成13年度新潟大学プロジェクト研究推進経費（学際的研究）の補助を受けた。

- 1) Andreasen, J. O., Borum, M. K., Jacobsen, H. L. and Andreasen, F. M.: Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing. *Endod. Dent. Traumatol.*, 11: 59-68, 1995.
- 2) Hargreaves, K. M. and Goodis, H. E.: Seltzer and Bender's dental pulp., p. 1-500, Quintessence, Chicago, 2002.
- 3) Berkovitz, B. K. B., Holland, G. R. and Moxham, B. J.: Oral anatomy, embryology and histology. 3rd ed., p. 1-378, Mosby, Edinburgh, 2002.
- 4) Ohshima, H. and Yoshida, S.: The relationship between odontoblasts and pulp capillaries in the process of enamel- and cementum-related dentin formation in rat incisors. *Cell Tissue Res.*, 268: 51-63, 1992.
- 5) Yoshida, S. and Ohshima, H.: Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblasts. *Anat. Rec.*, 245: 313-326, 1996.
- 6) Ohshima, H.: Ultrastructural changes in odontoblasts and pulp capillaries following cavity preparation in rat molars. *Arch. Histol. Cytol.*, 53: 423-438, 1990.
- 7) Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K., Takeuchi, K., Hoshino, M., Takano, Y. and Maeda, T.: Pulpal regeneration after cavity preparation, with special reference to close spatio-relationships between odontoblasts and immunocompetent cells. *Microsc. Res. Tech.*, 60: 483-490, 2003.

- 8) Steinman, R. M.: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 271-296, 1991.
- 9) Thery, C. and Amigorena, S.: The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 13: 45-51, 2001.
- 10) Jontell, M., Gunraj, M. N. and Bergenholtz, G.: Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J. Dent. Res.*, 66: 1149-1153, 1987.
- 11) Jontell, M., Bergenholtz, G., Scheynius, A. and Ambrose, W.: Dendritic cells and macrophages expressing class II antigens in the normal rat incisor pulp. *J. Dent. Res.*, 67: 1263-1266, 1988.
- 12) Okiji, T., Kawashima, N., Kosaka, T., Matsumoto, A., Kobayashi, C. and Suda, H.: An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. *J. Dent. Res.*, 71: 1196-1202, 1992.
- 13) Ohshima, H., Kawahara, I., Maeda T. and Takano Y.: The relationship between odontoblasts and immunocompetent cells during dentinogenesis in rat incisors: An immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody. *Arch. Histol. Cytol.*, 57: 435-447, 1994.
- 14) Nanci, A.: Ten Cate's Oral histology. Development, structure, and formation, 6th ed., p. 1-445, Mosby, St. Louis, 2003.
- 15) Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U. and Bergenholtz, G.: Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 9: 179-200, 1998.
- 16) Ohshima, H., Sato, O., Kawahara, I., Maeda, T. and Takano, Y.: Responses of immunocompetent cells to cavity preparation in rat molars: An immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody. *Connect. Tissue Res.*, 32: 303-311, 1995.
- 17) Ohshima, H., Maeda, T. and Takano Y.: The distribution and ultrastructure of class II MHC-positive cells in human dental pulp. *Cell Tissue Res.*, 295: 151-158, 1999.
- 18) Nakakura-Ohshima, K., Watanabe, J., Kenmotsu, S. and Ohshima, H.: Possible role of immunocompetent cells and the expression of heat shock protein-25 in the process of pulpal regeneration after tooth injury in rat molars. *J. Electron Microsc.*, 52: 581-591, 2003.
- 19) 大島勇人, 佐藤拓一, 高橋信博, 野村修一, 大島邦子, 監物新一, 川岸恵理子, 楯 泰昌: 高齢者歯髓の免疫防御機構に関する研究. 大和証券ヘルス財団の助成による研究業績集 第27集, p. 98-103, 財団法人大和証券ヘルス財団, 2004.
- 20) Suzuki, T., Nomura, S., Maeda, T. and Ohshima, H.: An immunocytochemical study of pulpal responses to cavity preparation by laser ablation in rat molars by using antibodies to heat shock protein (Hsp) 25 and class II MHC antigen. *Cell Tissue Res.*, 315: 311-319, 2004.
- 21) Hossain, M., Nakamura, Y., Yamada, Y., Suzuki, N., Murakami, Y. and Matsumoto, K.: Analysis of surface roughness of enamel and dentin after Er,Cr:YSGG laser irradiation. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 19: 297-303, 2001.
- 22) Takeda, F. H., Harashima, T., Eto, J. N., Kimura, Y. and Matsumoto, K.: Effect of Er:YAG laser treatment on the root canal walls of human teeth: an SEM study. *Endod. Dent. Traumatol.*, 14: 270-273, 1998.
- 23) Yamada, Y., Hossain, M., Nakamura, Y., Suzuki, N. and Matsumoto, K.: Comparison between the removal effect of mechanical, Nd:YAG, and Er:YAG laser systems in carious dentin. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 19: 239-243, 2001.
- 24) Shimizu, A., Nakakura-Ohshima, K., Noda, T., Maeda, T. and Ohshima, H.: Responses of immunocompetent cells in the dental pulp to replantation during the regeneration process in rat molars. *Cell Tissue Res.*, 302: 221-233, 2000.
- 25) Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K., Yamamoto, H. and Maeda, T.: Alteration in the expression of heat shock protein (HSP) 25-immunoreactivity in the dental pulp of rat molars following tooth replantation. *Arch. Histol. Cytol.*, 64: 425-437, 2001.
- 26) Ciocca, D. R., Oesterreich, S., Chamness, G. C., McGuire, W. L. and Fuqua, S. A. W.: Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 1558-1570, 1993.
- 27) Welsh, M. J. and Gaestel, M.: Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 851: 28-35, 1998.
- 28) Arrigo, A. P. and Prévile, X.: Role of Hsp 27 and related proteins. In *Handbook of experi-*

- mental pharmacology, Vol. 136, Stress proteins, Chap. 5, ed. Latchman, D. S., p. 101-132, Springer, Berlin - New York, 1999.
- 29) Ohshima, H., Ajima, H., Kawano, Y., Nozawa-Inoue, K., Wakisaka, S. and Maeda, T.: Transient expression of heat shock protein (HSP) 25 in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat incisor. *Arch. Histol. Cytol.*, 63: 381-395, 2000.
 - 30) Otsuka, Y., Nakakura-Ohshima, K., Noda, T., Maeda, T. and Ohshima, H.: Possible role of heat shock protein (Hsp) 25 in the enamel organ during amelogenesis in the rat molar. *Arch. Histol. Cytol.*, 64: 369-378, 2001.
 - 31) Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K. and Maeda, T.: Expression of heat-shock protein 25 immunoreactivity in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat molar. *Connect. Tissue Res.*, 43: 220-223, 2002.
 - 32) Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K., Yamamoto, H. and Maeda, T.: Responses of odontoblasts to cavity preparation in rat molars as demonstrated by immunocytochemistry for heat shock protein (HSP) 25. *Arch. Histol. Cytol.*, 64: 493-501, 2001.
 - 33) Wells, A. D. and Malkovsky, M.: Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol. Today*, 21: 129-132, 2000.
 - 34) Ohshima, H., Wartiovaara, J. and Thesleff, I.: Developmental regulation and ultrastructure of glycogen deposits during murine tooth morphogenesis. *Cell Tissue Res.*, 297: 271-281, 1999.
 - 35) Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G. and Shi, S.: Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.*, 81: 531-535, 2002.
 - 36) Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G. and Shi, S.: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 5807-5812, 2003.
 - 37) Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P. Jr., Han, J., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P. and Sucov, H. M.: Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127: 1671-1679, 2000.
 - 38) Kannari, N., Ohshima, H., Maeda, T., Noda, T. and Takano, Y.: Class II MHC antigen-expressing cells in the pulp tissue of human deciduous teeth prior to shedding. *Arch. Histol. Cytol.*, 61: 1-15, 1998.
 - 39) Harada, H., Kettunen, P., Jung, H. S., Mustonen, T., Wang, Y. A. and Thesleff, I.: Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signalling. *J. Cell Biol.*, 147: 105-120, 1999.
 - 40) Gilbert, F. S.: *Developmental Biology*, 7th ed., p. 1-838, Sinauer Associates, Inc., Sunderland - Massachusetts, 2003.
 - 41) Ohshima, H., Kenmotsu, S. and Harada, H.: Use of the term apical bud to refer to the apical end of the continuously growing tooth. *Arch. Comp. Biol. Tooth Enamel*, 8: 45-49, 2003.
 - 42) Harada, H. and Ohshima, H.: New perspectives on tooth development and dental stem cell niche. *Arch. Histol. Cytol.*, 67: 1-11, 2004.
 - 43) Ohshima, H., Nakasone, N., Hashimoto, E., Sakai, H., Nakakura-Ohshima, K. and Harada, H.: The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Arch. Oral Biol.*, 2004 in press.