

高野 吉郎

— 総 説 —

エナメル質石灰化とその調節因子

高野 吉郎

新潟大学歯学部口腔解剖学第二講座

Enamel Calcification and its Regulatory Factors

Yoshiro Takano

Department of Oral Anatomy II, Niigata University School of Dentistry

はじめに

歯のエナメル質は歯冠表面をおおう石灰化組織で、水晶に匹敵する硬度を示すが、それ自体は線維性の補強材料をもたないためにへき解しやすい脆弱な構造体である。しかし脊椎動物の多くの歯でそうであるように、エナメル質は厚い象牙質に裏打ちされた形で存在することにより、歯が鋭利な切断器として、あるいは耐磨耗性に優れた強力な破砕器として機能することを可能にしている。

歯は脊椎動物にはじめて出現するが、種による歯の多様性は顕著で、中にはエナメル質を持たない歯もみられる。その意味ではエナメル質は歯に必須ではないということになるが、しかしこれはあくまで歯の定義上の問題であり、たとえばヒトの歯にとってエナメル質が必須でないということにはならない。我々人類の歯にエナメル質が必須の要素であることは自明であるが、エナメル質は生体の他の硬組織とことなり、一旦その実質が欠損するともはや再生しない（表層の軽度の脱灰程度は唾液中に存在するカルシウムにより再石灰化はする）。したがってエ

ナメル質が欠損した場合には通常人工物で被覆するいわゆる歯の修復治療がほどこされる。

一般に生体硬組織の石灰化は、その形成細胞の厳密な制御のもとに進行するといわれる。しかし石灰化現象そのものは細胞外基質中における物理化学的法則に従った結晶の析出／沈殿現象とみなすべきであり、細胞はそのために必要な素材を産生し、あるいは輸送して局所に提供するにすぎないと見ることもできる。このようなとらえ方は、硬組織の中でもとりわけ、規則的に配列した一層の上皮細胞(エナメル芽細胞)で囲まれた一種の閉鎖空間で進行するエナメル質の石灰化現象を解析するなかで殊に鮮明に浮かび上がってくる。しかも完成したエナメル質は、ほぼアパタイト結晶のみからなる非生活組織である。このような点を考慮すると、エナメル質の有機成分の組成と性状があきらかにされエナメル質形成細胞の機能が具体的に解明されるならば、一旦失われたエナメル質を歯科臨床の場で窩洞内に析出させ、完全に近い歯質の回復をもたらすことも将来的には必ずしも不可能でないように思われる。

近年、エナメル質の形成機構解明のための取

り組みが多角的に展開されている。形態学的立場からは主に細胞機能や物質輸送路の検討がすすめられ、生化学的立場からはエナメル蛋白の組成はもちろんのこと、エナメル蛋白をコードする遺伝子座までもが突きとめられている。また無機相に関しては結晶学の立場から *in vitro* のアプローチも意欲的に続けられており、整然と排列する巨大なエナメル質結晶形成の謎がエナメル蛋白とのかかわりから解き明かされようとしている。

本稿では著者らが着目してきたエナメル質の特異な石灰化現象について、とりわけエナメル質の初期石灰化とその後の基質形成期に見られる諸現象について、最近の知見をもとに解説する。

エナメル質初期石灰化

1. 象牙質形成がエナメル質形成に先行する

歯の原基すなわち歯胚は、口腔粘膜上皮由来のエナメル器と、主に神経堤 (neural crest) 由来の外胚葉性間葉を主体とする歯乳頭、それに両者を取り巻く線維性の歯小嚢で構成される。歯の硬組織はエナメル器と歯乳頭の界面 (interface)、すなわち将来のエナメル・象牙境にそって形成がはじまるが、ヒトを含む哺乳動物の歯胚においては必ずエナメル質に先だて象牙質が形成される点が注目される。

歯胚の上皮/間葉界面に最初に形成される象牙質は外套象牙質の薄層で、ここでは基質小胞によって初期石灰化が誘導され、さらに基質小胞内に生じた結晶を核としてその後の膠原線維に沿った石灰化が進行するものと考えられている¹⁻⁷⁾。外套象牙質の形成野は、それを取りかこむ細胞層 (内エナメル上皮層と象牙芽細胞層) の細胞間接着装置の発達が不十分で、細胞間をさまざまな物質がかなり自由に通過できるものと考えられている^{8,9)}。したがって外套象牙質形成野ではカルシウムなどのミネラルの添加調節をはじめとする初期石灰化の調節を両細胞層がおこなっているとは考えにくく、基質小胞の役割の重要性が理解される。

一方、エナメル質の石灰化の様式は基質小胞なしに開始される点で、外套象牙質の場合とはおおきくことなる。エナメル質の石灰化のもう一つの特徴は、形成直後から軽度ながら基質が石灰化することである。このためにエナメル質表層にはその形成期間を通じて象牙前質や類骨に相当する未石灰化層をみることがない¹⁰⁾。この現象については二つの解釈が可能である。すなわちエナメル質の形成野 (最表層) では新たに添加された基質中に次々と微細な結晶が析出するとの見方と、新たな基質の添加に呼応して既存のエナメル質結晶が細胞直下まで伸長するため、とする見方である (図1, 2)。

2. エナメル質結晶は象牙質結晶の伸びだしか?

エナメル質結晶が極めて長大であり、エナメル・象牙境付近からほぼ垂直にエナメル芽細胞に向けて伸び出すように見えることから、エナメル質結晶が象牙質の石灰化したコラーゲンの結晶から伸びだして出来る可能性が従来から指摘されている¹¹⁾。近年, Arsenault and Robinson

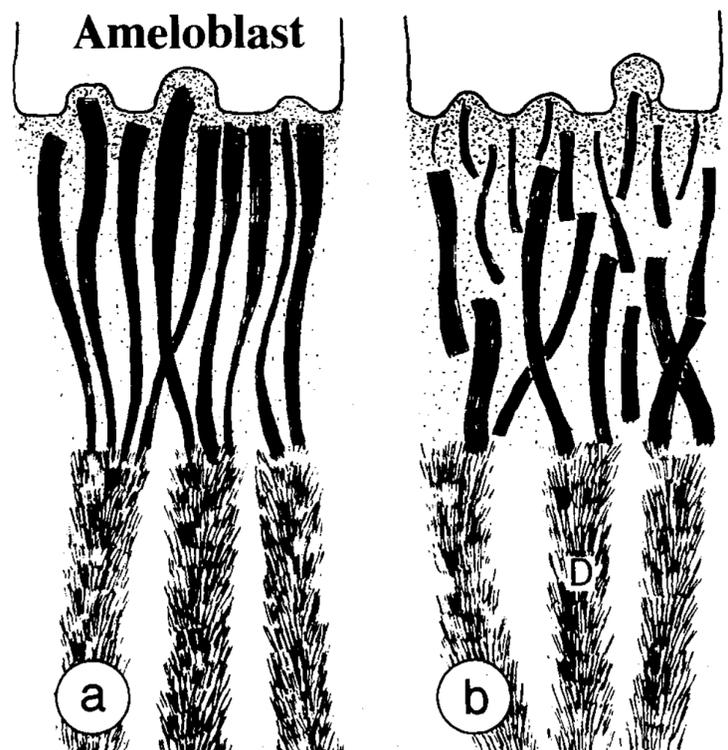


図1 エナメル質の初期結晶形成機構に関する二つの仮説 a: エナメル質結晶 (大型リボン状) はコラーゲン線維にそった石灰化象牙質 (D) の結晶の伸び出しとする説。b: エナメル質初期結晶はエナメル基質の中で独立した結晶として析出し、象牙質結晶との連続性は結晶成長の結果として生ずるとの説。

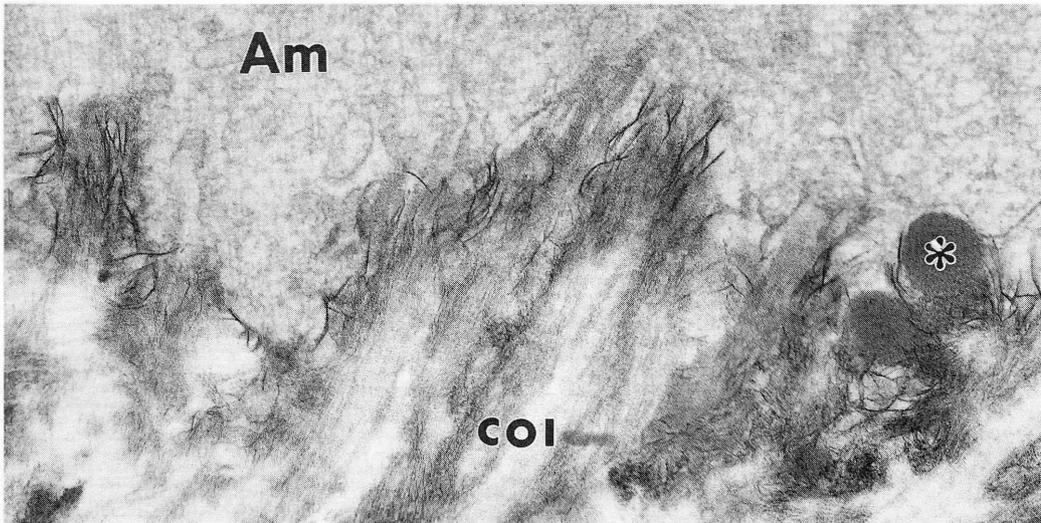


図2 石灰化した象牙質のコラーゲン線維(col)の先端部に形成された初期エナメル質結晶の沈着像。大型で電子密度の高いエナメル質初期結晶があたかも微細な象牙質結晶から伸びだしているようにも見える。ラット切歯の非脱灰、無染色切片。象牙質の結晶の大部分は薄切時に水に溶失しているために明るく見える。* stippled material ×50,000

(1989)¹²⁾ は、制限視野暗視野電顕観察法 (selected area dark field electron microscopy) と呼ばれる空間分解能の高い方法でエナメル・象牙境を検索し、実際に象牙質結晶とエナメル質結晶に連続性が認められるとして、エナメル質結晶が象牙質結晶の延長であるとの考えを改めて提唱している。すなわち、象牙質の石灰化が膠原線維に沿ってエナメル・象牙境に達すると、象牙質のアパタイト結晶はエナメル質基質中へと伸長を開始するが、結晶はそこで膠原線維などによる束縛から開放されるために大型なものに変化すると述べている。

象牙質結晶とエナメル質結晶に連続性があるという事実は、上記の仮説の根拠として説得力はあるが、エナメル質結晶が象牙質結晶を核に形成されるということを実証しているわけではない。Beertsen et al. (1985)¹³⁾はラットに一定量のHEBPを投与すると、一本の切歯の中に正常な石灰化象牙質が形成されるところと、象牙質の基質は形成されるものの石灰化が起きないところが混在するようになることを報告している。興味深いことに、石灰化象牙質の形成がみられた部位ではエナメル質も正常に形成さ

れ、石灰化も進行するのに対し、後者ではエナメル質の石灰化を問題とする以前に、エナメル質の基質形成そのものがおきないことが示されている(図3)。Beertsenら¹³⁾のこの報告は、象牙質が石灰化することがエナメル質の石灰化の開始条件かどうかは別として、少なくともエナメル質の基質形成の開始条件となっていることを示唆するきわめて重要な事実である。象牙質

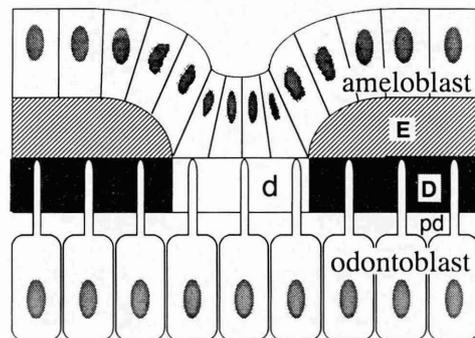


図3 HEBP投与実験¹³⁾の結果を示す模式図。HEBPをラットに投与すると、象牙質に基質は形成されるものの石灰化が起きない領域(d)が生ずる。この図は象牙質が石灰化しない場所ではエナメル質の基質形成が生じないことを示している。E, 石灰化したエナメル質, D, 石灰化した象牙質, pd, 象牙前質

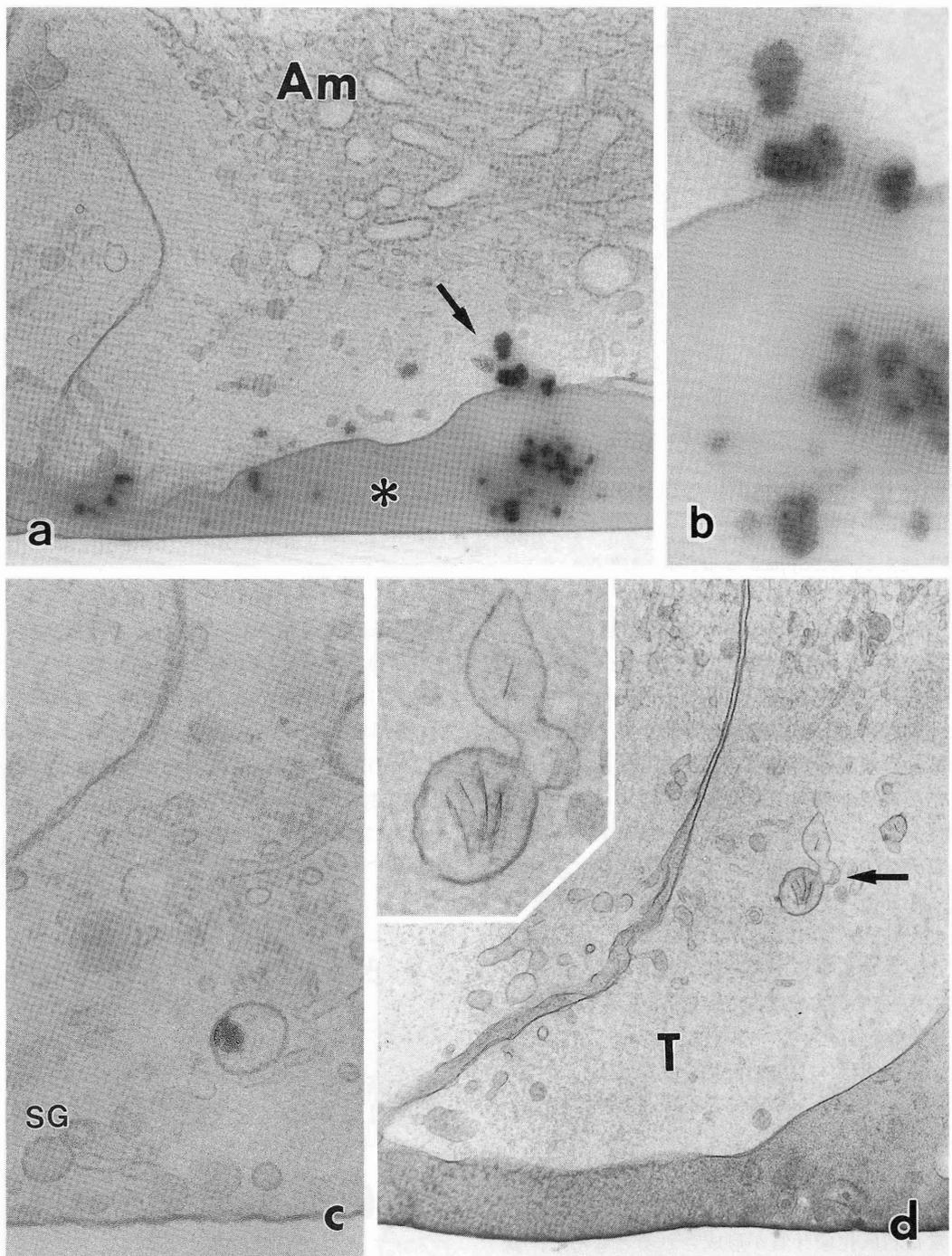


図4 a: エナメル質から剝離した後、圧着法で急速凍結/凍結置換した基質形成初期期のエナメル芽細胞遠位端。無水的に作成した無染色切片の電顕像。顆粒状、微細結晶状の電子密構造物の開口分泌を思わせる像(矢印)が見られる。中等度の電子密度を持つ細胞外基質様物質(*)中にも電子密顆粒を認める。Am, エナメル芽細胞 $\times 26,000$ b: 電子密構造物の拡大像。 $\times 74,000$

の石灰化がエナメル質の石灰化の開始にとって不可欠な前提条件となっているかどうか、についてはこの実験結果からは判定出来ない。しかし、象牙質が石灰化しないために（結晶の核がないために）エナメル質が未石灰化の状態とどまるような現象は、in vivo では現実には起きないとは言えそうである。もし象牙質が石灰化しない部位にもエナメル質の基質が形成され、それが未石灰化のまま留まるような現象が見られるならば、Arsenault らの象牙質結晶からの伸びだし説がほぼ確証されたこととなるが、HEBP 投与実験の結果は、むしろエナメル質と象牙質の結晶の連続性が偶然の産物である可能性を十分に残していると受け取ることもできる。

一方で、エナメル質結晶が象牙質結晶から独立して析出することを積極的に支持する所見も乏しいが、著者らの研究グループはその可能性を示唆する実験データを既に報告している¹⁴⁾。図4はラット切歯のエナメル器を新鮮な状態でエナメル質表面から剝離し、ただちに急速凍結／凍結置換して透過電顕で観察した形成期初期のエナメル芽細胞の透過電顕像である。ここではエナメル芽細胞の分泌極付近の小管状胞状構造の中に電子密な顆粒状の沈着物が認められ、さらにエナメル質の初期結晶に類似した微細結晶状の構造が観察される。このようなミネラルの沈殿がいわゆる分泌顆粒内には決してみられない点は注目に値する。これらの電子密構造は水に触れると容易に溶失するため、通常の標本作製で観察することはできない非常に不安定なものであるが、X線分析の結果はこれらの電子密な構造物に高濃度の磷とカルシウムが含まれることを示している。凍結置換試料に認められたこのような所見は、エナメル芽細胞内に in vivo でミネラルの沈殿が生じているということを示唆しているのではなく、形成期初期のエ

ナメル芽細胞の小管状胞状構造に、分泌直後の基質内に結晶の析出を誘導するなんらかの物質が含まれていることを示唆するものと解釈される。通常のエナメル基質の分泌と同期してエナメル質最表層の分泌野に石灰化を誘導する未知の物質が分泌されている可能性はおおいにあるといえよう。

3. 歯胚の上皮／間葉界面におけるカルシウム結合野

エナメル芽細胞には細胞質内に幾種類かのカルシウム結合蛋白(Ca-BP)が局在することが証明されており、細胞機能の調整やカルシウムの制御などに重要な働きをしていると考えられている¹⁵⁻²²⁾。我々は近年、組織を高濃度のカルシウムを含む溶液で還流し、高カルシウム環境下におかれた組織内に in situ で実際にカルシウムの沈殿が生ずるか否かを探っている²³⁾。そして出現する沈殿の局在性を目安として、石灰

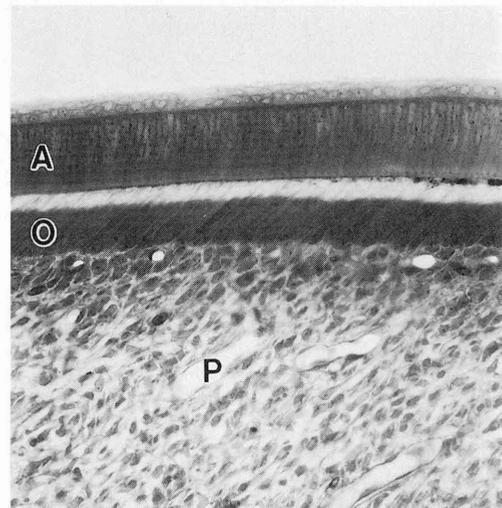


図5 高濃度カルシウム液で処理したラット切歯上皮／間葉界面のGBHA染色像。対比染色なし。すべての細胞要素がCa-GBHAの赤い反応を示している。A, エナメル芽細胞層, O, 象牙芽細胞層, P, 歯髄 ×200

図4 c: エナメル芽細胞遠位端部の小胞中に見られた電子密顆粒。いわゆるエナメル質基質を含むの分泌顆粒(SG)中にミネラルの沈着は見られない。×52,000 d: エナメル芽細胞遠位端部の管状胞状構造中に現われたエナメル質結晶様構造(矢印)。T, エナメル質から引き抜かれたトームス突起 ×23,000 Inset: 矢印部の拡大像 ×64,000

化に関連すると思われる組織・細胞内のカルシウム結合野の同定を試行しているが、最近の研究で、ラット切歯の初期石灰化領域一円に、既知のどのCa-BPの局在パターンとも一致しないカルシウム結合野の存在を示唆する所見を得ている²⁴⁾。

図5は実際にラットを30mMのCaCl₂を含む等張液で心臓から5分間灌流し、その後通常の電顕試料作製法にしたがって固定、脱水し、樹脂包埋を行ったラット切歯形成端付近の光顕像である。固定液、脱水液のすべてに30mMのCaCl₂が添加されている点が通常と異なるが、エナメル芽細胞層や歯髄組織に形態の異常はなら認められない。組織化学的にカルシウムを検出する方法には多くの種類があるが、溶性、難溶性カルシウムをともに染めだすことの出来る簡便な方法に一種のキレート剤であるglyoxal bis (2-hydroxyanil) を用いたGBHA

法²⁵⁻²⁷⁾がある。これはGBHAがカルシウムと結合してCa-GBHAの赤色の沈殿を生ずることを利用した方法で、光顕レベルで組織内のカルシウムの分布を広く把握するのに最適な方法である。また、電顕用樹脂に包埋した試料に應用できることからGBHA染色した切片の隣接切片を電顕観察し、反応野の微細構造を比較検討することも可能である¹⁴⁾。図5は5 μ の厚切り切片の実際のGBHA染色像で、写真のコントラストはCa-GBHAの赤い発色によるものである。エナメル器と歯髄のほとんどの細胞要素が赤く発色しており、組織全域に高濃度のカルシウムが浸透していることが伺われる。このブロックから無水的に電顕切片を作成し、形成端付近の上皮/間葉界面を観察すると、微細形態には変化はなく、ただ、未石灰化の外套象牙質の基質とそれに対応する内エナメル上皮、前エナメル芽細胞層に特異的に電子密顆粒の沈着

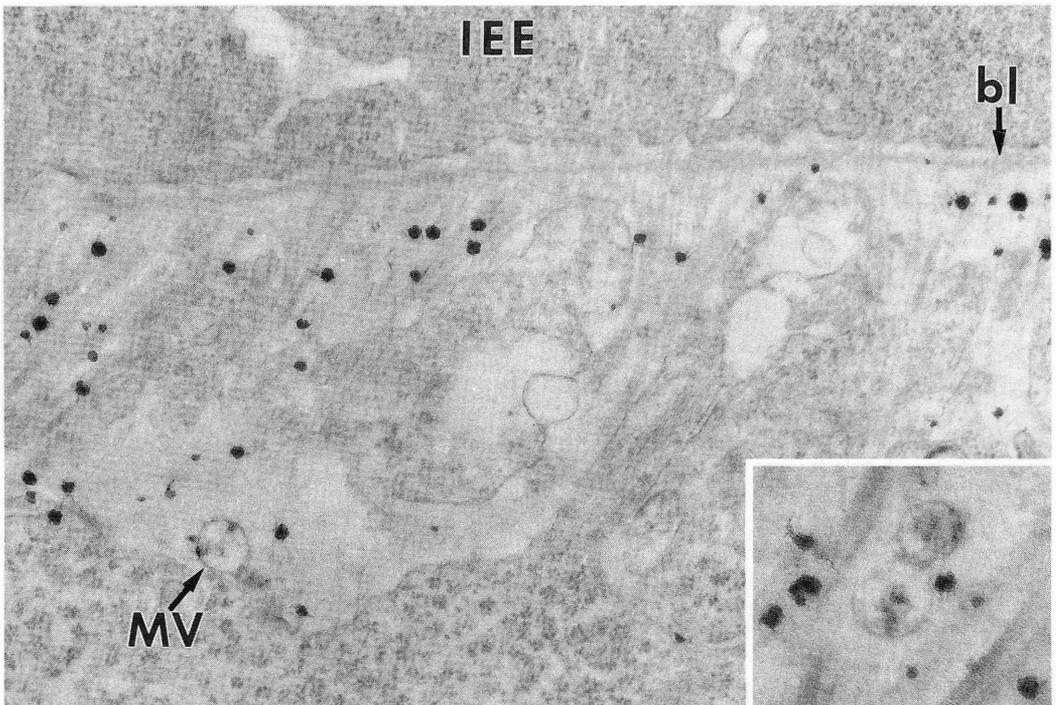


図6 図5同様に処理したラット切歯の上皮/間葉界面に現われた電子密顆粒を示す透過電顕像。切片は無水的に作成。対比染色なし。IEE, 内エナメル上皮, bl, 基底板, MV, 基質小胞 $\times 28,000$ Inset: 基質小胞と電子密顆粒の拡大像。基質小胞内部にもわずかに高電子密度構造を認めるが、小胞外のものは明らかに異なる。 $\times 47,000$

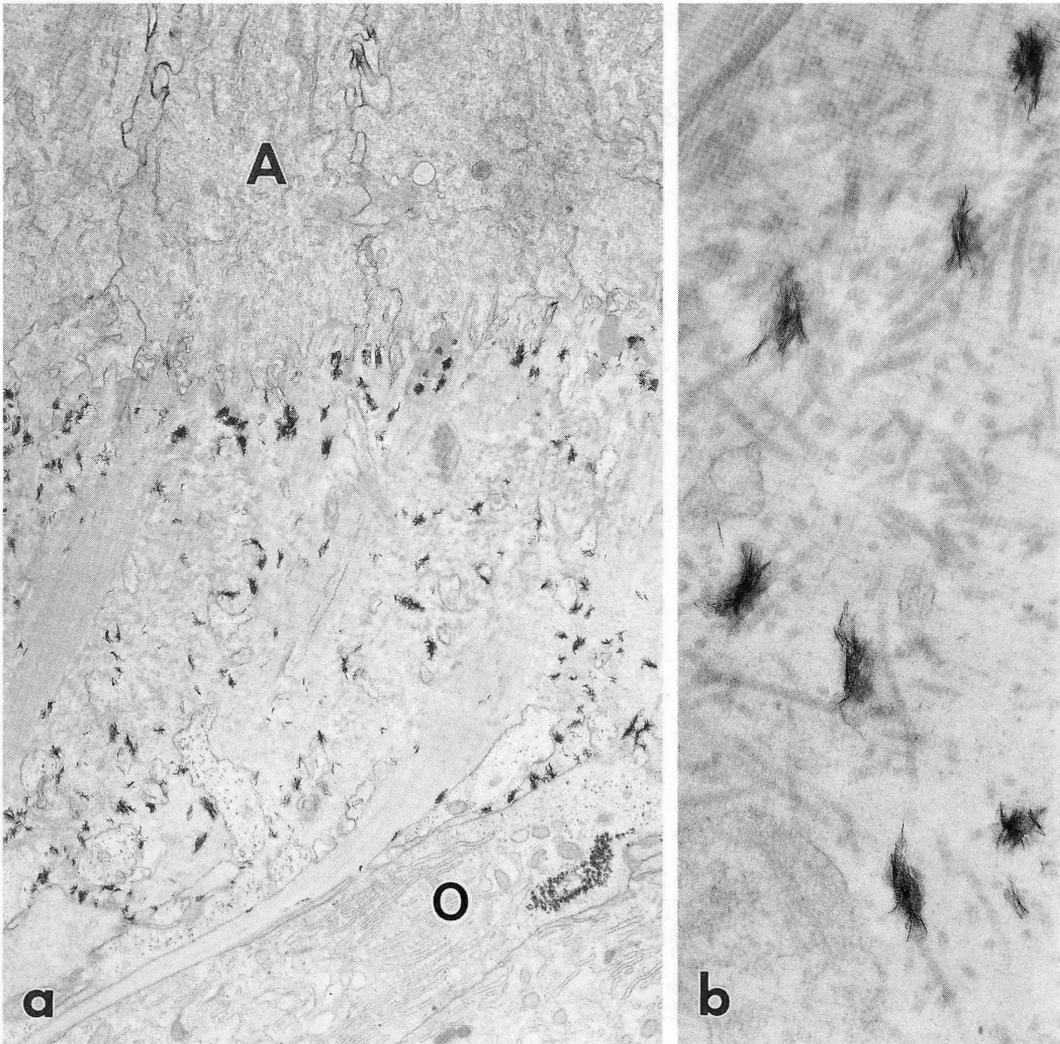


図7 a: 図6よりもやや分化が進んだ上皮/間葉界面。厚い外套象牙質基質全域に多数の針状結晶様構造が散在している。電子密顆粒様構造は見られない。A, 前エナメル芽細胞, O: 象牙芽細胞 ×6,400
b: 結晶様構造の拡大像。針状構造の集塊が点在している様子がわかる。対比染色なし。×34,000

が生じているのが確認された(図6)。注目すべき点はこれらの沈着物が上皮/間葉間葉界面の幼若な領域では顆粒状を呈していたのが、外套象牙質の生理的石灰化開始部位に近づくに従ってエナメル質の初期結晶や図4に示したエナメル芽細胞の小管状胞状構造内に認められた結晶様構造と類似の形態の特徴を呈するようになったことである(図7)。上皮/間葉界面の線維性基質内に現われたこれら沈着物は、外套象牙質

の石灰化が開始する頃には完全に消失していたが、一方で前エナメル芽細胞層の細胞間隙に現われた結晶様構造は、その後エナメル質の基質形成が始まるまで沈着が認められた(図8)。図9にこうした一連の人工的なミネラルの沈着現象を模式的に整理して示した。

興味深いことに、少なくともラット切歯ではこのような人工的なミネラルの沈着は歯胚の上皮/間葉界面の中でも、将来エナメル質が形成

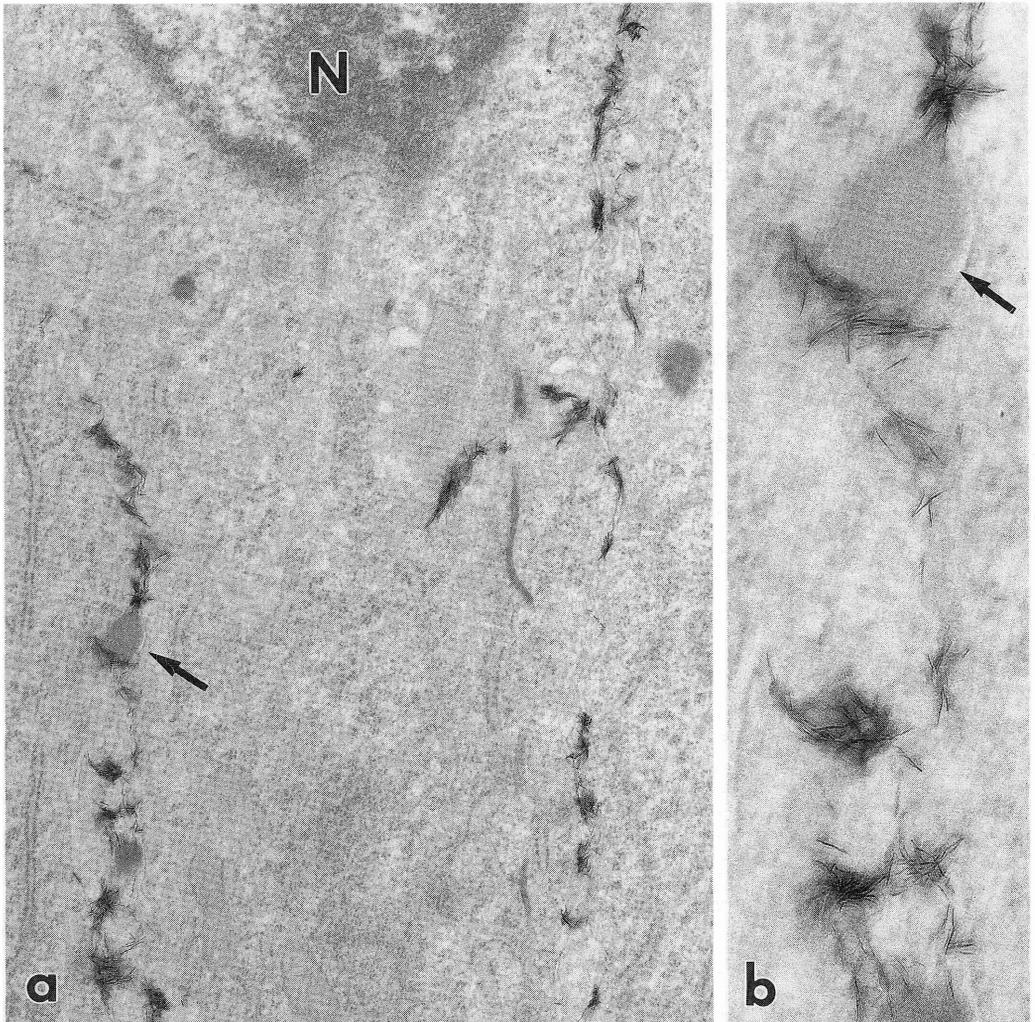


図8 a: 図7に対応する前エナメル芽細胞の細胞間隙に認められた結晶様電子密構造。N, 核, 矢印, stippled material $\times 20,000$ b: 結晶様構造の拡大像。矢印は a で示した stippled material。 $\times 77,000$

される歯冠相当部 (enamel-related portion)²⁸⁾ だけに限られており、セメント質が形成される歯根相当部 (cementum-related portion)²⁸⁾ には全く認められない。つまりラット切歯では、高カルシウム環境下で顆粒状や結晶様のミネラルの沈着をきたすなんらかの未知の物質が enamel-related portion の上皮/間葉界面に特異的に局在しているのである。Enamel-related portion と cementum-related portion とでは初期石灰化部の内エナメル上皮や、象牙芽細胞の Ca-ATPase 活性の局在性に大きな違いが

みられること^{29,30)}、象牙質の非コラーゲン性基質の組成が両部位で異なること^{31,32)}が報告されており、双方の象牙質石灰化の仕組みは必ずしも同一でない可能性がある。したがって断定は難しいが、この未知のミネラル沈着誘導物質が象牙質の石灰化にとって不可欠な要素である可能性は少なく、むしろエナメル質の石灰化(初期結晶沈着)の誘導との関係が伺われる。

石灰化開始以前の外套象牙質の基質上には、各所に非線維性の基質の小塊が散在している。同様な非線維性物質は象牙芽細胞や内エナメル

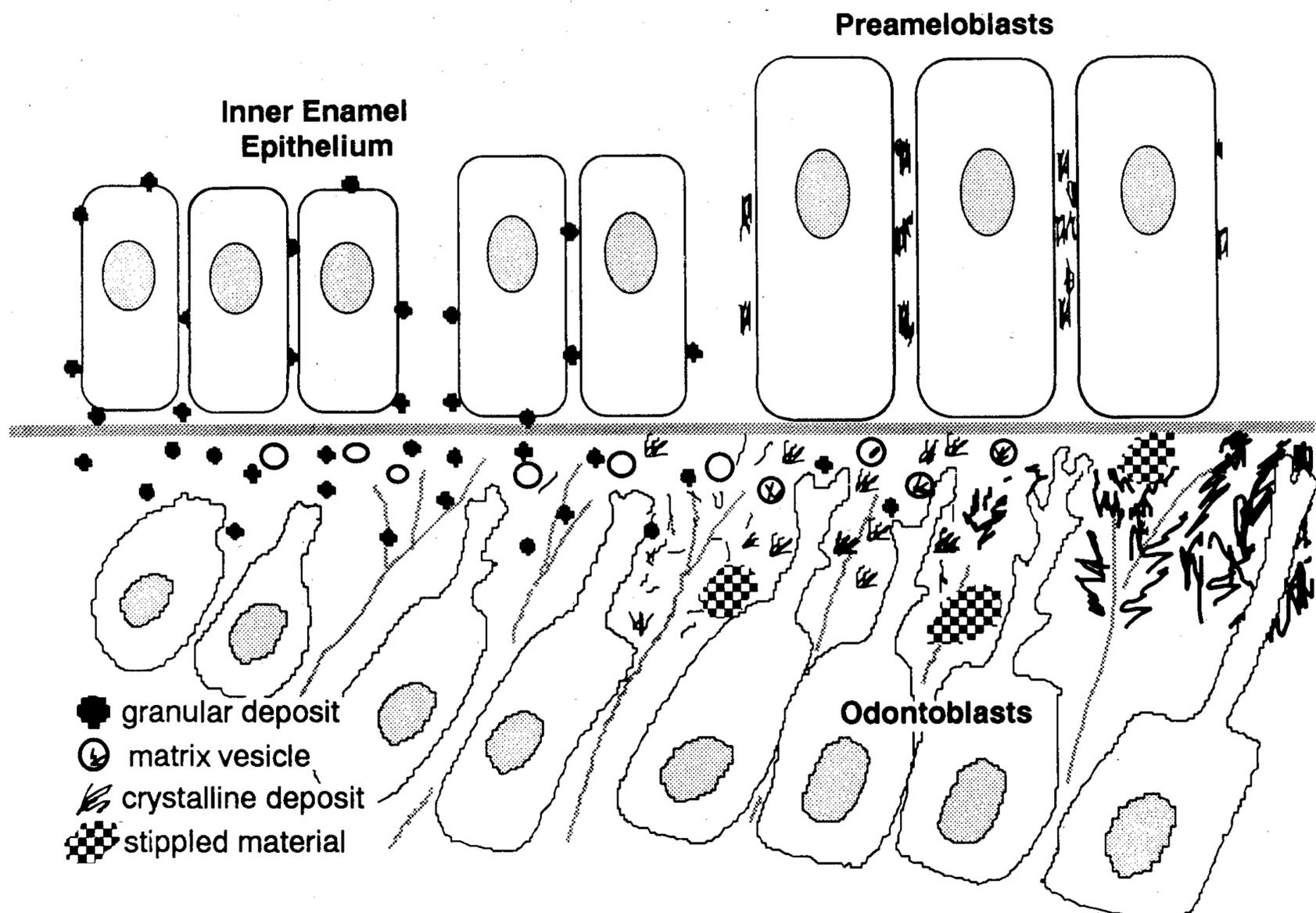


図9 高濃度カルシウム環境下でラット切歯上皮/間葉界面に生じたミネラル沈着パターンを示す模式図²⁴⁾。図右端が外套象牙質の石灰化開始部

上皮, それに前エナメル芽細胞の細胞間隙にもみられ, その透過電顕像から stippled material³³⁾, coarse textured material, あるいは fine textured material³⁴⁾ などと呼ばれている。エナメル芽細胞が分化の早い段階から比較的活発な蛋白合成, 分泌能を発揮していることは, エナメル蛋白の放射性前駆物質を用いたオートラジオグラフィ³⁵⁾によって知られているが, これら非線維性の細胞外基質はアメロジェニンやエナメリンの免疫染色に陽性であることが最近の研究であきらかとなり³⁶⁻⁴⁰⁾, いずれも内エナメル上皮や前エナメル芽細胞から産生されたエナメル基質様の物質であることが確認されている (stippled material ならびに類似の細胞外基質の詳細に関しては小澤の優れた総説⁴¹⁾があるのでそれを参照されたい)。これまで述べてきた未知のミネラル沈着誘導物質も恐らく内エナメル上皮や前エナメル芽細胞に由来すると考えられ

るが, 実験的な高カルシウム環境下でみられた顆粒状, 結晶様の電子密構造の析出が, これらのエナメル基質様物質とは無関係に生じていた点は注目される。おそらくエナメル芽細胞はエナメル質の初期石灰化に関係するなんらかの物質を, いわゆる分泌顆粒とは別経路でエナメル質側に分泌しているのであろう。図4の所見はそのような分泌経路の存在を示唆しているようにも思われる。

上皮/間葉界面の線維性基質やエナメル芽細胞層の細胞間隙に認められたミネラルの沈着は, 未知のエナメル質石灰化誘導物質が stippled material 同様, 極性が定まらぬまま内エナメル上皮や前エナメル芽細胞から放出されたことを反映している可能性がある。おそらくエナメル質の形成開始期までには通常の場合と同様に, この物質の分泌局性も定まって石灰化象牙質上にエナメル基質とカップリング

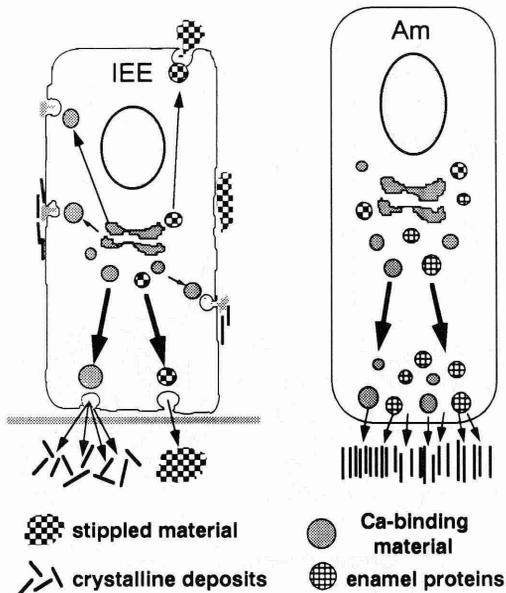


図10 ラット切歯エナメル質形成領域の上皮/間葉界面におけるエナメル基質と結晶形成誘導物質(仮)の関係を示す仮想図²⁹⁾。詳細は本文に記載。IEE, 内エナメル上皮, Am 基質形成直後のエナメル芽細胞

したかたちで分泌されるようになり、エナメル質形成表面ですみやかな結晶析出が可能となる条件が確立されるのではないかと想像される。エナメル基質の主要部分を占める非線維性の特殊な蛋白であるアメロジェニン⁴²⁾にはアパタイト結晶の結晶成長を抑制する作用があるといわれ⁴³⁾、エナメル質形成野にこのような結晶析出誘導因子が共存することは理にかなったものと思われる。図10はこのような仮説を模式化して示したものである。

結晶成長とカルシウム制御

1. 二段階説 (Two-step theory) の落とし穴

基質形成の開始と同時にエナメル質が軽度石灰化することはすでに詳しく述べた。その後エナメル質が最終的な厚さに達するまでの期間を基質形成期と呼ぶが、一般にエナメル質の石灰化度はこの基質形成期を通じて低く抑えられ、エナメル質の急速な結晶成長はその後の成熟期に入り、大量の基質が脱却されたのちによ

うやく起こると説明されている。これはエナメル質の形成過程を基質形成期と、それに引き続く成熟期の二つに分けるいわゆる二段階説 (two-step theory)⁴⁴⁻⁴⁶⁾ に基づいた見方で、他の中胚葉由来の硬組織の石灰化とエナメル質の石灰化の違いを端的にあらわしている。しかし、二段階説ではエナメル質の石灰化の様相は必ずしも正確に表現されていない。たとえばラット切歯エナメル質の形成過程は二段階説で最も説明しやすい対象の一つであるが、形成期エナメル質の結晶サイズは表層から深層に向かうにつれて明らかに大型化しており⁴⁷⁾、特にエナメル/象牙境付近のエナメル質結晶の大型化と石灰化度の高まりは形成の早期から著しい。また、形成期から成熟の進行方向、すなわち切縁や咬頭方向に向けてのエナメル質のミネラル含量の増加についてみると、成熟期に入ると急勾配にはなるものの、成熟期の比較的早い時期にみら

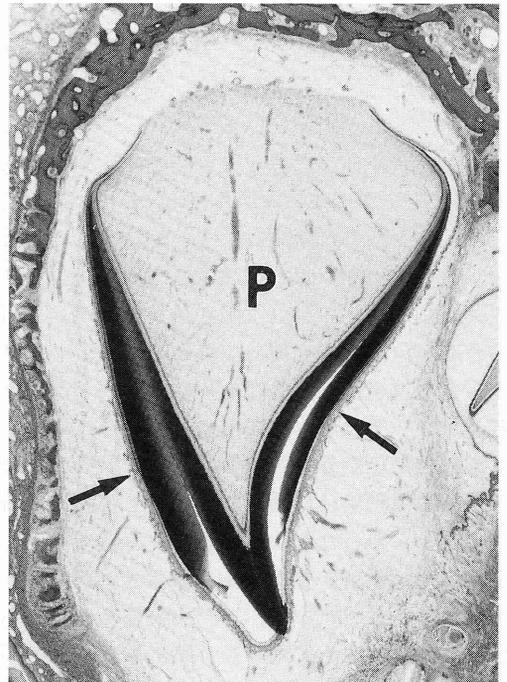


図11 歯冠形成期のヒト上顎乳中切歯歯胚の光顕像。矢印は形成期エナメル芽細胞から成熟期エナメル芽細胞への移行部を示す。右矢印部(舌側)では深層のエナメル質が既に脱灰により溶失しているのがわかる。P, 歯髓 ×12

れる基質の急激な脱却の前後でも石灰化度の上昇カーブに特に変化はない^{48,49)}。エナメル質内では表層から深層へ、そして歯頸側から咬頭切縁側へ向けての二つの時間軸に添って結晶成長が積算して進行していると考えらるべきである^{47,50-52)}。

エナメル質形成の二段階説ではこうしたエナメル質の表層から深層への厚さ方向の時間軸が考慮されていない。このため、ヒトの歯のようにエナメル質が厚く、しかもゆっくりと形成される場合には、エナメル質表層で基質の形成が進行しているにもかかわらず、エナメル・象牙境付近のエナメル質は既に酸で溶失するまでに無機相、有機相の「成熟」が進んでいる場合が普通で、二段階説ではおおきな矛盾が生まれる(図13)。ただし我々が通常実験に用いるラットなどゲッ歯類の歯では、エナメル質が薄くしかも形成速度が早いため二段階説の矛盾はさほど問題にならない。このため、現状ではその利便性から二段階説にのっとりた表現が用いられる

場合が多い。

一方、基質の性状を別としてエナメル芽細胞に目を向けてみると、この細胞は基質形成期間を通じて細胞遠位端に特徴的な細胞質突起(トームス突起)を有し、発達した粗面小胞体とゴルジ装置など、蛋白合成細胞の特徴を備えた背の高い円柱状を呈すが、基質形成を終えると典型的な電解質輸送型の細胞へと急激に形態変化をする⁵³⁾。エナメル質の形成段階に応じたエナメル芽細胞のこうした形態の変化は歯種を問わず共通しており、この点でエナメル芽細胞の形態と機能を論ずる上で二段階説は合理的である。形成期のエナメル質、成熟期のエナメル質、といった表現は、それぞれ形成期エナメル芽細胞、成熟期エナメル芽細胞に対応したエナメル質、と読み替えることで、ある程度混乱は解消される。

2. カルシウムの流入とエナメル芽細胞

エナメル質へのカルシウムの取り込みの様相

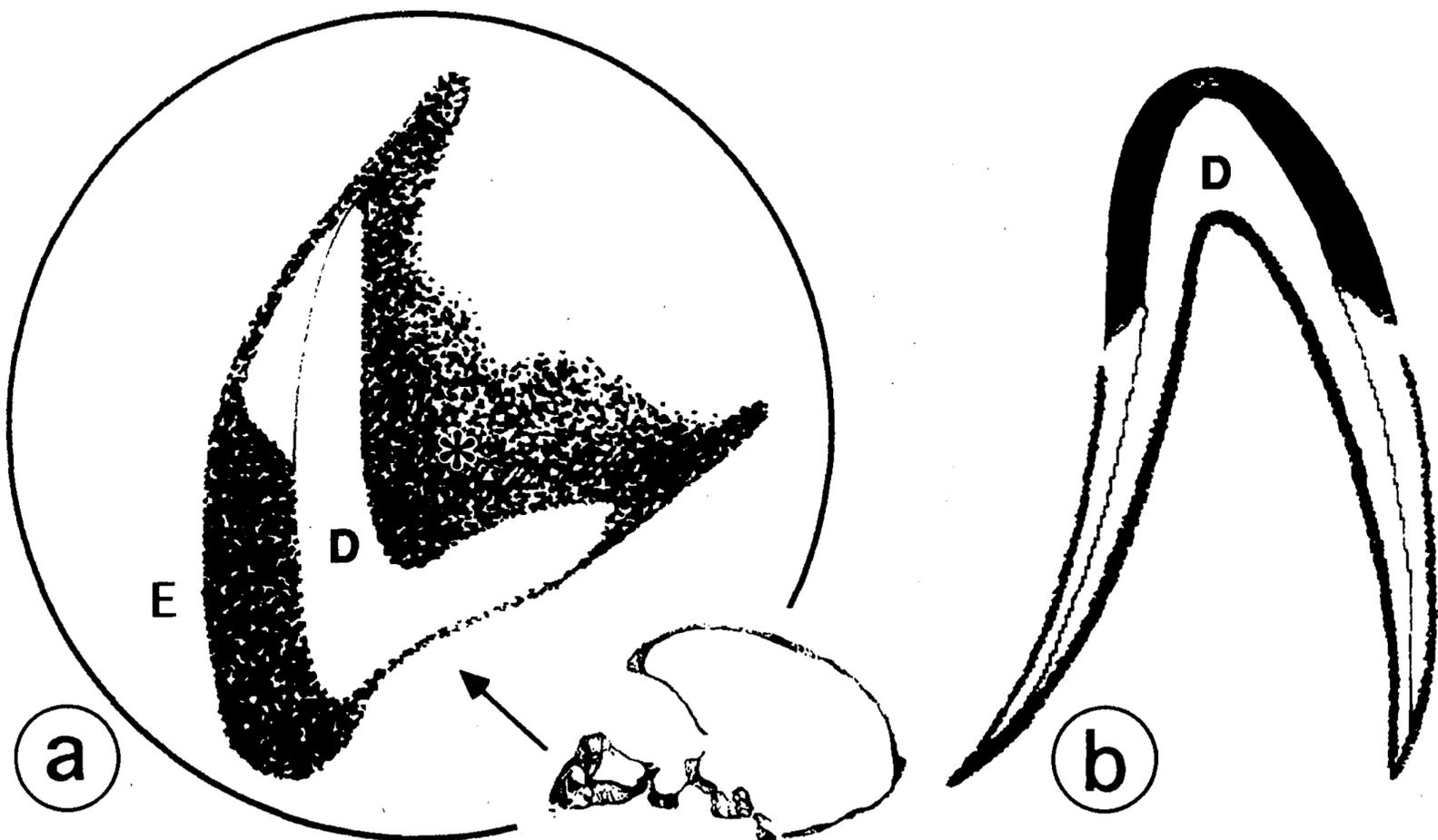


図12 エナメル質に添加されたカルシウムは基質形成期ではエナメル質表層に留まり、成熟期では全層に拡散する。研磨標本をX線フィルムに感光させた⁴⁵Caオートラジオグラム。a: サルの頭蓋矢条断面と上顎切歯歯胚部の拡大(アイソトープ投与後7日目) *斜め切りとなった象牙前質の標識。b: イヌ犬歯歯胚(アイソトープ投与後4日目)。a: Yen and Shaw (1963)⁶⁴⁾, b: Engfeldt et al. (1954)⁶⁵⁾を改変の上、転記。エナメル・象牙境に仮想線を付記した。E, エナメル質, D, 象牙質

を明らかにすることを目的に、多くの ^{45}Ca オートラジオグラフィーが試みられてきた⁵⁴⁻⁶³。 ^{45}Ca オートラジオグラフィーで信頼性の高い結果を得るためには、水に易溶性のカルシウムを流失移動することなく組織内にとどめておくことが要求されるが、この試料作成上の技術的困難さからか、諸家の報告に一致がみられず、歯胚内のカルシウムの動態に関しては未だに不明な点が多く残されている。これは ^{45}Ca の β 線のエネルギーが高いためにアイソトープの局在性に関してはあまり高精度の解析が望めないのに加え、アイソトープの使用規制等により、ほとんどの実験がラットなどエナメル質の薄い小動物の歯を対照とせざるを得ないことも一因

となっている。

このような状況のもと、著者は過去の ^{45}Ca オートラジオグラフィー関連文献を精査する中でエナメル質以外の組織を主たる対照とした先人の論文^{64,65}の中に、我々の疑問を解消するに足る明瞭な ^{45}Ca オートラジオグラフィーの所見を見いだした。図12はそれらの所見を原図から著者が転記したものであるが、アカゲサルの永久前歯歯胚と犬の永久犬歯歯胚のエナメル質に、形成期と成熟期におけるエナメル質へのカルシウムの添加パターンの違いが明瞭に現われている。サルやイヌを用いての *in vivo* のオートラジオグラフィーは、現在ほとんど実施不可能な状況であることから、過去の文献から発掘

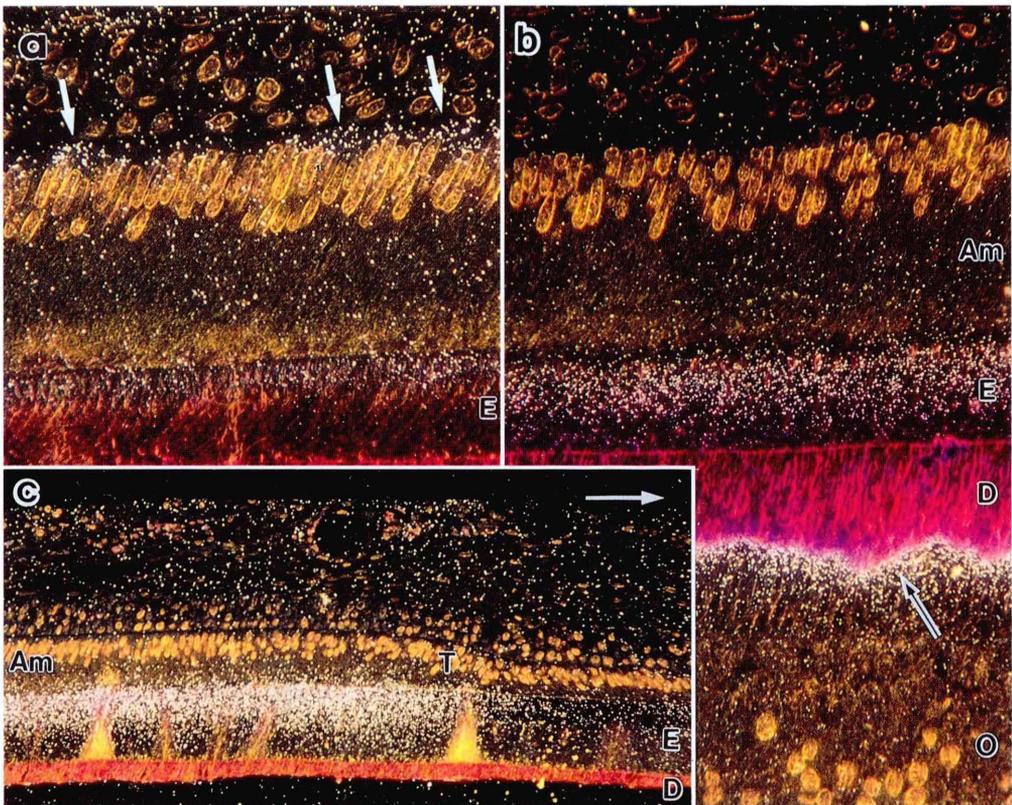


図13 ラット切歯エナメル芽細胞層を通過するカルシウムの動きを示す ^{45}Ca オートラジオグラム暗視野像⁶⁷。 ^{45}Ca の放射活性を示す銀粒子が白く輝いて見える。a: 静注後30秒。エナメル芽細胞の核近位細胞質に強い放射活性を認める(矢印)。E, エナメル質 $\times 350$ b: 静注後10分。エナメル芽細胞(Am)の放射活性はほぼ消失し、エナメル質(E)上で強い。矢印は象牙質(D)の石灰化前線上の標識。O: 象牙芽細胞 $\times 350$ c: 静注後60分。形成期エナメル芽細胞(Am)直下のエナメル質は表層1/2が強く標識されている。移行期(T)にはエナメル質の標識は見られなくなる。矢印は歯の萌出方向を示す。 $\times 90$

Time-related Changes in Relative
Grain Density of ^{45}Ca
in Rat Incisor Enamel Organ

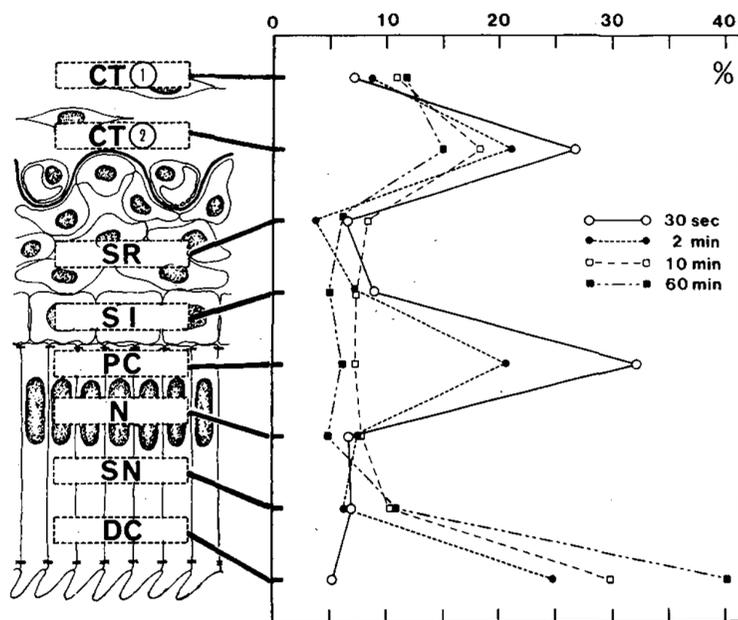


図14 図13の所見に基づいたエナメル器各部の ^{45}Ca の放射活性の時間的推移。カルシウムはエナメル芽細胞の核近位部細胞質(PC)に一時的に留まり、細胞遠位端部(DC)へと送られる様子が伺われる。Takano et al. (1990)⁶⁷⁾を改変。

されたこれらの所見は極めて貴重である。そしてここで特に注目すべき点は、イヌの所見はアイソトープ投与後4日後のものであり、サルにいたってはアイソトープ投与後実に丸7日間経過した後の所見であることである。エナメル質へ取り込まれたカルシウムが形成期エナメル質表層に長期にわたって留まり、そして成熟期になると大量のカルシウムが速やかに厚いエナメル質全層に拡散するようになることを、これらの所見はみごとに示している。

このように、ここ30年来研究者の間で盛んに議論されてきたエナメル質へのカルシウムの取り込みパターンについて、少なくともその一部に関しては、そのはるか以前に解答が示されていたことになる。しかし、いかに ^{45}Ca オートラジオグラフィーに方法論上の制約があるにせよ、最も頻繁に用いられる実験材料であるラットの歯胚において、同様な現象の有無を確認することは、エナメル質形成機構を解明するうえで不可避である。著者らは良好な細胞形態の保存と可溶性物質の移動流失の抑止が期待される急速凍結・凍結置換法が ^{45}Ca オートラジオグラフィーのための試料作成法として理想的である

と判断し、急速凍結・凍結置換したラット切歯、臼歯の準超薄切片に半乾燥乳剤膜を貼付する方法⁶⁶⁾で無水的な ^{45}Ca オートラジオグラフィーを試みた^{67,68)}。その結果、従来困難であったラット切歯、臼歯エナメル質へのカルシウムの流入経路について時間経過に従った詳細な解析が可能となり、形成期エナメル芽細胞層に秒単位でカルシウムが通過する急速なカルシウムの通過経路と、恐らく分単位でカルシウムが通過するゆっくりとした細胞内カルシウム輸送路の2つの経路があることを示唆する結果を得ることが出来た(図13, 14)。前者の急速な通過経路が果たして細胞外拡散経路の存在を示唆するものか、Reith (1983)⁶⁹⁾の提唱する細胞膜を構成する磷脂質の流動にともなうカルシウム輸送路の存在を示唆するものか、あるいは細胞質に存在するCa-BPが関与したエナメル質側へのCaポンプによる急速な汲み出し機構⁷⁰⁾の存在を意味するのか、結論は出ていない。

Kawamoto and Shimizu (1994)⁷¹⁾は ^{45}Ca を投与したラットの新鮮凍結乾燥切片を用いて ^{45}Ca と ^{32}P の無水的オートラジオグラフィーを行い、更に切片をマイクロディセクションして計測領域を部位ごとに収集し、実際にシンチレーターにかける方法で、取り込まれたアイソトープの定量化を行っている。その結果、形成期のエナメル質に取り込まれる量の約6.7倍量の ^{45}Ca が成熟期のruffle-ended ameloblast (RA)の領域のエナメル質に取り込まれることを明かにして、成熟期のエナメル芽細胞による能動的なカルシウム輸送を支持している。更にRA部ではエナメル質に取り込まれた $^{45}\text{Ca}/^{32}\text{P}$ 値が血液の $^{45}\text{Ca}/^{32}\text{P}$ 値に比べて有意に高いことが判明して、RA部ではカルシウムがエナメル芽細胞内でなんらかの修飾を受け、細胞経路で輸送されていることを一層強く裏付けている。これに対して形成期では、エナメル質の $^{45}\text{Ca}/^{32}\text{P}$ 値と血清の $^{45}\text{Ca}/^{32}\text{P}$ 値との間に有意差が認められないとして、形成期エナメル芽細胞層においては細胞内輸送路の存在を支持する根拠はないと指摘している。しかし形成期エナ

メル芽細胞の生物活性を抑制したり、エナメル芽細胞層を機械的に破壊した場合には、形成期のエナメル質に取り込まれるカルシウム量が大幅に増加することが *in vitro*⁶⁰⁾ や *in situ* の滲流実験^{72,73)} で確認されており、少なくとも形成期エナメル芽細胞層がエナメル質形成面へのカルシウムの流入量を規制していることは事実である。

3. ⁴⁵Ca オートラジオグラフィーで見るカルシウムの動態とエナメル蛋白

エナメル芽細胞層を介して形成期エナメル質表層に添加されたカルシウムがエナメル質表層に長期にわたって留まる現象(図12)は、一見すると象牙質で ⁴⁵Ca の強い標識が石灰化前線にだけ限局してみられ、既に石灰化している基質上にほとんど現われない現象(図13b)と似ている感がある。しかしエナメル質の場合にはいずれ成熟期に入るとカルシウムが速やかに、しかも大量に全層に拡散するようになる点(図12)を考慮すると、両組織におけるカルシウムの動態は、質的に全く異なった現象と考えるべきであろう。

形成期のエナメル質表層にカルシウムが留まる現象を解析する上で、著者は作業仮説としての二つの可能性を提示してきた。まず第一は、エナメル質最表層の基質形成面は形成期を通じて一貫して結晶の析出、あるいは伸長がみられる場であることから、エナメル質表層におけるカルシウムの滞留は、エナメル芽細胞層を介して添加されるカルシウムのほぼ全量が結晶の析出と成長に費やされるためとみなすもの。もう一つの可能性は、エナメル蛋白にカルシウムの拡散を抑制するなんらかの物理化学的特性が備わっていることを想定するものである。つまりカルシウム拡散抑制因子である多量のエナメル蛋白が存在する基質形成期ではカルシウムの拡散が起きにくく、成熟期に至ると基質が脱却され、拡散抑制因子が除かれるためにカルシウムが急速に深層まで拡散するようになる、との考えである。この第二の仮説は第一の仮説にのっ

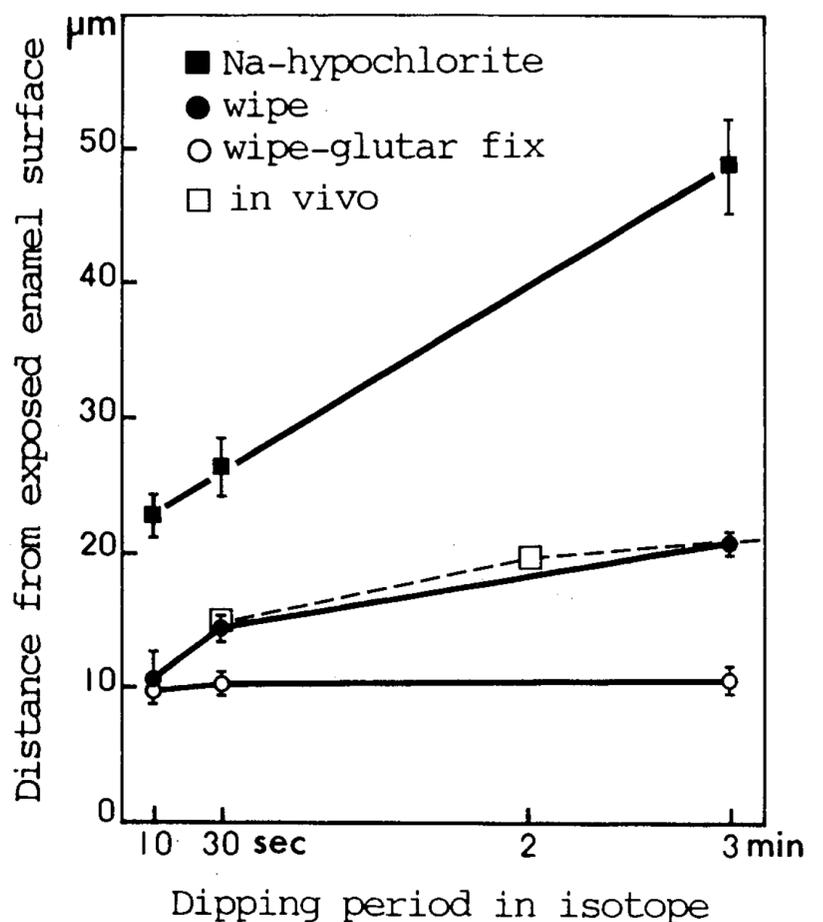


図15 露出したラット切歯の形成期エナメル質における表層から深層への⁴⁵Caの拡散速度を示す⁷⁴⁾。エナメル芽細胞層がない場合でも拡散速度は *in vivo* の値と変わらないことがわかる。詳細は本文参照

とった結晶形成にとっても好都合であり、双方の仮説に本質的な違いは無いように思われるかもしれない。しかし、エナメル芽細胞のカルシウム制御の有無に関してこれら二つの仮説は全く異なった前提に立っている。すなわち、前者ではエナメル質結晶の析出や伸長に必要な十分量のカルシウムがエナメル芽細胞の厳密な制御のもとに添加されることが前提であり、一方後者ではエナメル芽細胞によるカルシウムの流入の制御の有無にかかわらず、エナメル質内でのカルシウムの動態が局所におけるエナメル蛋白の濃度で決定されるとの見方を基本としているのである。

図15はこの二つの仮説を検証する目的で行った⁴⁵Ca オートラジオグラフィーの結果で、形成期エナメル質表層から深層へ向けての *in vivo* でのカルシウムの拡散速度と、エナメル芽細胞層を剝離してエナメル質表面を露出した場合の *in vitro* におけるカルシウムの表層からの拡散速度を比較したものである⁷⁴⁾。この結果はエナ

メル芽細胞層の有無にかかわらず，形成期のエナメル質におけるカルシウムの表層から深層への拡散速度が一定であることを示しており，更にエナメル蛋白を人為的に除くことで拡散速度が直線的に上昇するようになることを示している。これらの結果は第二の仮説，すなわち形成期のエナメル質ではエナメル蛋白がカルシウムの拡散抑制因子として働き，成熟期の全層へのカルシウムのすみやかな拡散はこの抑制因子が除かれたことを反映している可能性が高いことを示している。この実験ではエナメル質を化学固定してエナメル蛋白を架橋，不動化した場合にはエナメル質表層からのカルシウムの拡散がほとんど起きないことも明かにされており，エナメル蛋白のなんらかの物理化学的特性がカルシウムの拡散を制御していることが明確に示されている。

エナメル蛋白の大部分を占めるアメロジェニンは，本来ゲル状を呈し，低温や加圧により可逆的にゾル化する物理化学的特性を持つ^{42,75)}ことが知られる。また，幼若エナメル質，成熟エナメル質ともに基質中にセリンプロテアーゼの存在が知られ⁷⁶⁻⁸¹⁾，アメロジェニンは分泌直後からエナメルプロテアーゼの作用で分解，低分子化され，易動化してそれ自体エナメル質全層に拡散するという際だった特徴を持つ。他の硬組織の基質成分にはみられないアメロジェニンのこうした特異な物理化学的性状や基質内における動態が，カルシウムの拡散を制御し，かつエナメル蛋白自身の脱却を可能にして，結果的にエナメル質結晶が他に例のない整然とした排列をとる巨大なアパタイト結晶へと成長することを可能にしているのであろう。形成期エナメル芽細胞はエナメル質形成野への過量のカルシウムの流入を阻止しつつ，アメロジェニンやエナメルリンなどの既知のエナメル質基質を産生し，同時にまだその実体が捉えられていない何らかの石灰化誘導物質を産生していることが推察される。

以上，本稿は著者らの研究によって最近その存在が確認されつつある未知の石灰化誘導物質

に関する話題を中心に，エナメル質の基質形成期とりわけ初期石灰化にまつわる問題点について解説した。

エナメル質は基質形成に引き続く長い成熟の過程を経て完成するが，エナメル芽細胞は成熟化の過程で形態的にも，機能的にも極めて興味深い周期的変化をくり返し，これに呼応してエナメル質の基質性状にも特異な周期的変化が生じていることがわかってきた。近年の多角的なエナメル質研究の進展により，こうしたエナメル質成熟化に伴う諸現象の生物学的意義も含め，ダイナミックなエナメル質形成の全容が急速に明かにされつつある。本稿では紙面の制約により成熟化に関わる記載を割愛したが，巻末に著者の総説を含むエナメル質成熟化に関する文献リストを付記したので参照されたい。

文 献

- 1) Bernard, G. W. : Ultrastructural observation of initial calcification of dentin and enamel. *J. Ultrastruct. Res.*, 41 : 1-17, 1972.
- 2) Eisenmann, G. and Glick, P. L. : Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. *J. Ultrastruct. Res.*, 41 : 18-28, 1972.
- 3) Katchburian, E. : Membrane-bound bodies as initiators of mineralization of dentine. *J. Anat.*, 116 : 285-302, 1973.
- 4) Larsson, A. : Studies on dentinogenesis in the rat. Ultrastructural observations on early dentin formation with special reference to "dentinal globules" and alkaline phosphatase activity. *Z. Anat. Entw-Gesch.*, 142 : 103-115, 1973.
- 5) 小澤英浩 : 硬組織の超微細構造と石灰化。骨代謝, 8 : 227-265, 1975.
- 6) 小澤英浩 : 硬組織石灰化とその微細構造—象牙質石灰化中心に—。歯界展望, 50 : 223-234, 1977.
- 7) Ozawa, H., Yamada, M. and Yamamoto, T. : Ultrastructural observations on the location of lead and calcium in the miner-

- alizing dentine of rat incisors. Proceedings of the Third International Conference on Matrix Vesicles, Montelucio, Spolete, June 7-11, pp. 179-187, 1981.
- 8) Sasaki, T., Higashi, S., Tachikawa, T. and Yoshiki, S.: Formation of tight junctions in differentiating and secretory ameloblasts of rat molar tooth germs. *Archs Oral Biol.*, 27: 1059-1068, 1982.
 - 9) Semba, T.: Morphological aspects of fluid flow in the dentine (in Japanese). *Annals of Kagoshima University Dental School*, 2: 1-9, 1982.
 - 10) Warshawsky, H.: The teeth. In: *Histology, Cell and Tissue Biology*. Vth edition. L. Weiss ed. The Macmillan Press, London, Basingstoke, pp. 607-657, 1983.
 - 11) Eastoe, J. E.: Enamel protein chemistry-past, present and future. *J. Dent. Res.*, 58 (B): 753-763, 1979.
 - 12) Arsenault, A. L. and Robinson, B. W.: The dentino-enamel junction: a structural and microanalytical study of early mineralization. *Calcif. Tissue Int.*, 45: 111-121, 1989.
 - 13) Beertsen, W., Niehof, A. and Everts, V.: Effects of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the formation of dentin and the periodontal attachment apparatus in the mouse. *Am. J. Anat.*, 174: 83-103, 1985.
 - 14) Takano, Y., Yamamoto, T., Domon, T. and Wakita, M.: Histochemical, Ultrastructural, and electron microprobe analytical studies on the localization of calcium in rat incisor ameloblasts at early stage amelogenesis. *Anat. Rec.*, 228: 123-131, 1990.
 - 15) Taylor, A. N.: Tooth formation and the 28,000 Dalton vitamin D-dependent calcium-binding protein. An immunocytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.*, 32: 159-164, 1984.
 - 16) Taylor, A. N., Gleason, G. W. and Lankford, G. L.: Rat intestinal vitamin D-dependent calcium binding protein: immunocytochemical localization in incisor ameloblasts. *J. Dent. Res.*, 63: 94-97, 1984.
 - 17) Sasaki, T. and Garant, P. R.: Calmodulin in rat incisor secretory ameloblasts as revealed by protein A-gold immunocytochemistry. *Calcif. Tissue Int.*, 40: 294-297, 1987.
 - 18) Sasaki, T., Colflesh, D. E. and Garant, P. R.: Calcium transport by a Calmodulin-regulated Ca-ATPase in the enamel organ. *Adv. Dent. Res.*, 1(2): 213-226, 1987.
 - 19) Fukae, M., Tanabe, T. and Shimizu, M.: Calcium-binding proteins in the formative cells of the porcine enamel organ. *Jpn. J. Oral Biol.* 32: 203-207, 1990.
 - 20) Berdal, A., Balmain, N., Brehier, A., Hotton, D., Cuisinier-Gleizes, P. and Mathieu H.: Immunological characterization, developmental pattern and vitamin-D-dependency of calbindin D-28K in rat teeth ameloblasts. *Differentiation*. 40: 27-35, 1989.
 - 21) Berdal, A., Nanci, A., Smith, C. E., Ahluwalia, J. P., Thomasset, M., Cuisinier-Gleizes, P. and Mathieu, H.: Differential expression of Calbindin-D 28 kDa in rat incisor ameloblasts throughout enamel development. *Anat. Rec.*, 230: 149-163, 1991.
 - 22) Berdal, A., Hotton, D., Kamyab, S., Cuisinier-Gleizes, P. and Mathieu, H.: Subcellular co-localizations of two vitamin D-dependent proteins in rat ameloblasts. *Archs Oral Biol.*, 36: 715-725, 1991.

- 23) Takano, Y. : Histochemical demonstration and microanalysis of possible calcium binding sites in the enamel organ of rat incisors. *Scanning Microscopy*, 6 : 773-784, 1992.
- 24) Takano, Y., Hanaizumi, Y. and Ohshima, H. : Occurrence of amorphous and crystalline mineral deposits at the epithelial-mesenchymal interface of calcium-loaded rat incisors : an implication of novel calcium binding domains. *Connect. Tiss. Res.*, in press.
- 25) Kashiwa, H. K. and House, C. M. : The glyoxal bis (2-hydroxyanil) method modified for localizing insoluble salts. *Stain Technol.* 39 : 359-367, 1964.
- 26) Takano, Y., Matsuo, S., Wakisaka, S., Ichikawa, H., Nishikawa, S. and Akai, M. : A histochemical demonstration of calcium in the maturation stage enamel organ of rat incisors. *Arch. Histol. Cytol.* 51 : 241-248, 1988.
- 27) 高野吉郎, 江尻貞一, 小澤英浩 : カルシウム。「無機物と色素」小川和朗, 中根一穂, 三島 豊, 水平敏知, 鈴木庸之(編), 朝倉書店, pp. 144-149, 1994.
- 28) Beertsen, W., Niehof, A. and Everts, V. : Effects of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on the formation of dentin and the periodontal attachment apparatus in the mouse. *Am. J. Anat.*, 174 : 83-103, 1985.
- 29) 鈴木章則 : ラット切歯の舌側象牙質形成に関する微細構造学的ならびに細胞化学的研究. *歯基礎誌*, 27 : 215-252, 1985.
- 30) Takano, Y., Ozawa, H. and Crenshaw, M. A. : Ca-ATPase and ALPase activities at the initial calcification sites of dentin and enamel in the rat incisor. *Cell Tissue Res.*, 243 : 91-99, 1986.
- 31) Takagi, Y., Nagai, H. and Sasaki, S. : Difference in noncollagenous matrix composition between crown and root dentin of bovine incisor. *Calcif. Tissue Int.*, 42 : 97-103, 1988.
- 32) Steinfort, J., Bos, T. van den, and Beertsen, W. : Differences between enamel-related and cementum-related dentin in the rat incisor with special emphasis on the phosphoproteins. *J. Biol. Chem.*, 264 : 840-2845, 1989.
- 33) Reith, E. J. : The early stage of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *J. Ultrastruct. Res.*, 17 : 503-526, 1967.
- 34) Kallenbach, E. : Electron microscopy of the differentiating rat incisor ameloblasts. *J. Ultrastruct. Res.*, 35 : 508-531, 1971.
- 35) Warshawsky, H. and Vugman, I : A comparison of the protein synthetic activity of presecretory and secretory ameloblasts in rat incisors. *Anat. Rec.*, 188 : 143-172, 1977.
- 36) Inage T., Shimokawa, H., Teranishi, Y., Iwase, T., Toda, Y. and Moro, I. : Immunocytochemical demonstration of amelogenins and enamelins secreted by ameloblasts during the secretory and maturation stage. *Arc. Histol. Cytol.*, 52 : 213-229, 1989.
- 37) Nanci, A., Ahluwalia, J. P., Pompura, J. R. and Smith, C. E. : Biosynthesis and secretion of enamel proteins in the rat incisor. *Anat. Rec.*, 224 : 277-291, 1989.
- 38) Uchida, T. Tanabe, T., Fukae, M. and Shimizu, M. : Immunocytochemical and immunochemical detection of a 32 kDa nonamelogenin and related proteins in porcine tooth germs. *Arch. Histol. Cytol.*, 54 : 527-538, 1991.
- 39) Nanci, A., McKee, M. D. and Smith, C. E. : Immunolocalization of enamel pro-

- teins during amelogenesis in the cat. *Anat. Rec.*, 233 : 335-349, 1992.
- 40) Nanci, A. and Smith C. E. : Development and calcification of enamel. In: *Calcification in Biological Systems*. E. Bonucci ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 314-343, 1992.
- 41) 小澤英浩 : エナメル芽細胞の微細構造学的特徴と機能. 「エナメル質, その形成, 構造, 組成と進化」須賀昭一 (編), クインテッセンス出版, pp. 50-75, 1987.
- 42) Eastoe, J. E. : The changing nature of developing dental enamel. *British Dent. J.*, 121: 451, 1966.
- 43) 土井 豊 : エナメルタンパクなどのアパタイト結晶の成長と発育に及ぼす影響. 「エナメル質, その形成, 構造, 組成と進化」須賀昭一 (編), クインテッセンス出版, pp. 202-211, 1987.
- 44) Diamond, M. and Weinmann, J. P. : *The Enamel of Human Teeth*. Columbia University Press, New York, 1940.
- 45) Marsland, E. A. : A histological investigation of amelogenesis in rats. I. Matrix formation. *Brit. Dent. J.*, 91 : 252-261, 1951.
- 46) Marsland, E. A. : A histological investigation of amelogenesis in rats. II. Maturation. *Brit. Dent. J.*, 92 : 109-119, 1952.
- 47) Glick, P. L. : Patterns of enamel maturation. *J. Dent. Res.*, 58(B) : 883-892, 1979.
- 48) Hiller, C. R., Robinson, C., and Weatherell, J. A. : Variations in the composition of developing rat incisor enamel. *Calcif. Tiss. Res.*, 18 : 1-12, 1975.
- 49) Robinson, C., Fuchs, P., Deutsch, D. and Weatherell, J. A. : Four chemically distinct stages in developing enamel from bovine incisor teeth. *Caries Res.*, 12 : 1-11, 1978.
- 50) Crabb, H. S. M. and Darling, A. I. : The pattern of Progressive Mineralization in Human Dental Enamel. Pergamon Press, Oxford, 1962.
- 51) Allan, J. H. : Maturation of enamel. In *Structure and Chemical Organization of Teeth*, ed. Miles, A., pp. 467-494, Academic Press, New York, 1967.
- 52) Sharawy, M. and Yaeger, J. A. : Enamel. In *Orban's Oral Histology and Embryology*, ed. Bhaskar, S. N., 10th ed., pp. 45-99, 1986.
- 53) Warshawsky, H. and Smith, C. E. : Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *Anat. Rec.*, 179 : 423-446, 1974.
- 54) Bélanger, L. F. : The mineralization of rat enamel in the light of Ca^{45} autoradiography and microincineration. *J. Dent. Res.* 36 : 595-601, 1957.
- 55) Hammarström, L. : Different localization of tetracycline and simultaneously injected radiocalcium in developing enamel. *Calcif. Tissue Res.*, 1 : 229-242, 1967.
- 56) Suga, S., Murayama, Y. and Musashi, T. : A study of the mineralization process in the developing enamel of guinea pig. *Archs Oral Biol.*, 15 : 597-612, 1970.
- 57) Hammarström, L. : Distribution in developing rat enamel of simultaneously injected fluoride and calcium. *Scand. J. Dent. Res.*, 79 : 369-376, 1971.
- 58) Munhoz, C. O. G. and Leblond, C. P. : Deposition of calcium phosphate into dentin and enamel as shown by radioautography of sections of incisor teeth following injection of ^{45}Ca into rats. *Calcif. Tissue Res.*, 15 : 221-235, 1974.
- 59) Nagai, N. and Frank, R. M. : Transfert du ^{45}Ca par autoradiographie en microscopie electronique au cours de l'amelogenese. *Calcif. Tissue Res.*, 19 : 211-221,

- 1975.
- 60) Bawden, J. W. and Wennberg, A.: In vitro study of cellular influence on ^{45}Ca uptake in developing rat enamel. *J. Dent. Res.*, 56: 313-319, 1977.
- 61) Wennberg, A. and Bawden, J. W.: Comparison of ^{33}P with ^{45}Ca distribution in developing rat molar enamel in vivo and in vitro. *J. Dent. Res.*, 57: 111-117, 1978.
- 62) Takano, Y., Crenshaw, M. A. and Reith, E. J.: Correlation of ^{45}Ca incorporation with maturation ameloblast morphology in the rat incisor. *Calcif. Tissue Int.*, 34: 211-213, 1982.
- 63) Uchida, T., Mckee, M. D. and Warshawsky, H.: A radioautographic study of the effects of vinblastine on the fate of injected ^{45}Ca and ^{125}I -insulin in the rat incisor. *Archs Oral Biol.*, 32: 433-437, 1987.
- 64) Yen, PK.-J. and Shaw, J. H.: Studies of the skull sutures of the rhesus monkey by comparison of the topographic sampling technique, autoradiography and vital staining. *Archs Oral Biol.*, 8: 349-362, 1963.
- 65) Engfeldt, B., Bergman, G. and Hammarlund-Essler, E.: Studies on mineralized dental tissues. I. A microradiographic and autoradiographic investigation of teeth and tooth germs of normal dogs. *Exp. Cell Res.*, 7: 381-382, 1954.
- 66) Kawamoto, T. and Shimizu, M.: A method for preparing whole-body sections suitable for autoradiographic, histological and histochemical studies. *Stain Technol.*, 61: 169-183, 1986.
- 67) Takano, Y., Hanawa, M., Yamamoto, T., Domon, T., Fujinami, H., Hanaizumi, Y. and Wakita, M.: Time-related changes in the distribution of ^{45}Ca in the developing enamel of rat incisors as revealed by radioautography. *J. Biol. Buccale*, 18: 135-147, 1990.
- 68) Hanawa, M., Takano, Y. and Wakita, M.: An autoradiographic study of calcium movement in the enamel organ of rat molar tooth germs. *Archs oral Biol.*, 35: 899-906, 1990.
- 69) Reith, E. J.: A model for transcellular transport of calcium based on membrane fluidity and movement of calcium carriers within the more fluid microdomains of the plasma membrane. *Calcif. Tissue Int.*, 35: 129-134, 1983.
- 70) Bawden, J. W.: Calcium transport during mineralization. *J. Anat.* 224: 226-233, 1989.
- 71) Kawamoto, T. and Shimizu, M.: Changes of the ratio of calcium to phosphate transported into the mineralizing enamel, dentin and bone. *Jpn. J. Oral Biol.*, 36: 365-382, 1994.
- 72) Takano, Y., Matsuo, S., Wakisaka, S., Ichikawa, H., Nishikawa, S. and Akai, M.: The influence of vanadate on calcium uptake in the maturing enamel of rat incisor. *J. Dent. Res.*, 66: 1702-1707, 1987.
- 73) Takano, Y., Matsuo, S., Wakisaka, S., Ichikawa, H., Nishikawa, S., Itotagawa, T. and Akai, M.: Vascular perfusion studies of the influence of levamisole on calcium influx into the maturing enamel of rat incisors. *J. Osaka Univ. Dent. Sch.*, 27: 51-64, 1987.
- 74) Takano, Y., Crenshaw, M. A. and Bawden, J. W.: Calcium movement in vivo and in vitro in secretory-stage enamel of rat incisors. *Archs Oral Biol.*, 37: 377-383, 1992.
- 75) Nikiforuk, G. and Simmons, N. S.:

- Purification and properties of protein from embryonic bovine enamel. *J. Dent. Res.*, 44: 1119-1122, 1965.
- 76) Suga, S.: Histochemical observation of proteolytic enzyme activity in the developing dental hard tissues of the rat. *Archs Oral Biol.*, 15: 555-558, 1970.
- 77) Shimizu, M., Tanabe, T. and Fukae, M.: Proteolytic enzyme in porcine immature enamel. *J. Dent. Res.*, 58(B): 782-788, 1979.
- 78) Crenshaw, M. A. and Bawden, J. W.: Proteolytic activity in embryonic bovine secretory enamel. In *Tooth Enamel IV*, eds. Fearnhead, R. W. and Suga, S., pp. 109-113, 1984.
- 79) Overall, C. M. and Limeback, H.: Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. Amelogeninolytic serine proteinases are associated with enamel maturation in pig. *Biochemical J.*, 256: 965-972, 1988.
- 80) Carter, J., Smillie, A. C. and Shepherd, M. G.: Purification and properties of the protease from developing porcine dental enamel. *Archs Oral Biol.*, 34: 195-202, 1989.
- 81) DenBesten, P. K. and Heffernan, J. M.: Separation by polyacrylamide gel electrophoresis of multiple proteases in rat and bovine enamel. *Archs Oral Biol.*, 34: 399-404, 1989.
- Takano, Y.: Histochemical aspects of calcium regulation by the enamel forming cells during matrix formation and maturation. *Acta Anatomica Nipponica*, 69: 106-122, 1994.
- Sasaki, T.: Cell biology of tooth enamel formation. *Monographs in Oral Science*, Vol. 14, Myers, M. ed., Karger, Basel, 1990.
- Nanci, A. and Smith, C. E.: Development and calcification of enamel. In *Calcification in Biological Systems*, ed. Bonnucci, E., pp. 314-343, CRC Press, Boca Raton, FL., 1992.
- Boyde, A.: Enamel. In *Teeth*, eds. Oksche, A. and Vollrath, L., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, pp. 309-472, 1989.
- Höhling, H. J.: Special aspects of biomineralization of dental tissues. In *Teeth*, eds. Oksche, A. and Vollrath, L., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, pp. 475-524, 1989.
- Proceedings of the Third International Symposium on Tooth Enamel. *J. Dent. Res.*, 58(B), 1979.
- Tooth Enamel IV. Proceedings of the Fourth International Symposium on the Composition, Properties and Fundamental Structure of Tooth Enamel. eds. Fearnhead, R. W. and Suga, S., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984.
- Tooth Enamel V. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Composition, Properties and Fundamental Structure of Tooth Enamel and related Tissues. ed. Fearnhead, R. W., Florence Publishers, Tsurumi, 1989.

エナメル質成熟化関連文献

高野吉郎：成熟期エナメル芽細胞の形態変化と機能変化。「エナメル質，その形成，構造，組成と進化」須賀昭一（編），クインテッセンス出版，pp. 92-106, 1987.