

ラット象牙質におけるストロンチウムによる 石灰化障害線の周期性

三島 弘 幸*

緒 言

象牙質は活動期と休止期が交互にリズムカルに続くことで形成され、この現象は成長線として象牙質の組織に現われる (Ten Cate, 1989)。ラットなどの齧歯類において、切歯の象牙質は一日約16 μ mの間隔で成長線が形成されるといわれている (Schour, 1953)。このような象牙質の成長線に見られる周期性の成因をさぐるために、本研究は実験的にラットにストロンチウム (Sr) を投与し、切歯の象牙質に石灰化障害線を作り出すことによって、障害線に見られる周期性と正常な成長線との対比から、成長線の成因の解明を試みたものである。

Sr, フッ素, 鉛などの元素を投与した場合、それぞれの元素に対応した石灰化障害線が出現することはよく知られており、古くから研究されてきた (Irving & Weinmann, 1948, Appleton, 1988; 1992)。Sr はカルシウム (Ca) と同じアルカリ土類金属に属する元素であることから、化学的にも、また生物学的にも Ca と類似の反応を示す。このことから、Sr は組織内の Ca の輸送機構を検索するのに適していると指摘されている (Krefting *et al.*, 1993)。LeGeros (1991) は Sr²⁺ が Hydroxyapatite の結晶の中で Ca²⁺ の位置に置換することを実験的に示した。Marie *et al.*, (1985) や Grynpsas & Marie (1990) は動物に少量の Sr を投与すると、生体内でも骨の apatite 結晶の中で、Sr が Ca と置き換わることを報告している。齶蝕においても、Sr が有用な効果があることが知られている (Curzon & Spector, 1981)。

実験に使用したラットの切歯に関しては、エナメル質が覆う唇側象牙質とセメント質が覆う舌側象牙質に、構造的な違いがあることが知られている (Ohshima & Yoshida, 1992, Mishima *et al.*, 1988; 1991, Steinfort, *et al.* 1989; 1990)。その違いの一つは、唇側象牙質では球状石灰化が卓越し、舌側象牙質では板状石灰化が卓越する点である (Mishima *et al.*,

1991)。また、Sr を投与した場合に、石灰化障害線が唇側象牙質と舌側象牙質ではその出現様相が異なることが知られている (Ogawa *et al.*, 1981, Appleton, 1993)。石灰化球が形成される球状石灰化において、石灰化障害線がどのようにして形成されるかは、問題の多いところである (Appleton, 1992)。

本研究では、これらの問題をふまえて、ラットに塩化ストロンチウム (SrCl₂) を多量投与することによって、切歯象牙質に生じる人工的な障害線の出現の様相を、まず唇側象牙質についてのみ、経時的に観察したものである。

材料と方法

体重150~250gのWistar 系雄性ラット21匹に pH 7.4に調整した SrCl₂ の20g/dl 水溶液を500mg/kg の割合で腹腔内に投与し、投与後1時間、6時間、12時間、24時間、2日、5日、7日で経時的にネブタール麻酔下で屠殺し、上顎切歯を抜去し、直ちに10%中性ホルマリンで固定した。固定後、10%蟻酸ホルマリンにて脱灰し、通法に従い、脱水後、パラフィン包埋した。これを切歯の縦断方向に薄切して、約4 μ mの切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 重染色を施し、唇側象牙質の切端側から中間側を光学顕微鏡で観察した。

一部の切歯は Buehler 社製 Isomet 硬組織切断器ダイヤモンドソーを用いて縦断方向に半切し、切断面を砥石にて研磨し、最終的に粒子径0.25 μ mのダイヤモンド・ペーストを用いて仕上げ、超音波洗浄し、臨界点乾燥後、カーボン蒸着を施して、日本電子社製走査型電子顕微鏡 T-200 に装着してあるエネルギー分散型分析装置 (SEM-EDS) JED2000 で石灰化障害線を分析し、元素分布を調べた。

結 果

Sr を投与した実験群について、以下に時間をおっ

て、H-E 重染色による組織像の変化を、象牙芽細胞、象牙前質、石灰化象牙質に分けて記述する。

投与後1時間(図1)において、象牙芽細胞、象牙前質や石灰化象牙質ともに対照群との違いは見られず、象牙芽細胞の高さは約23 μm であり、象牙前質の幅は約10 μm であった。

投与後6時間(図2)において、象牙芽細胞の高さは約18 μm とやや低くなり、象牙前質の幅はやや広がっていた。石灰化象牙質には変化は認められなかった。

投与後12時間(図3)においては、象牙芽細胞の高さは約21 μm である。象牙前質の幅は広がり、象牙芽細胞に接する側の層がヘマトキシリンにやや濃染していた(矢印)。石灰化象牙質には変化はなかった。

投与後24時間(図4)では、象牙芽細胞の高さは約19 μm である。象牙芽細胞付近に血管の増生が観察され、象牙芽細胞の配列にやや乱れが生じていた。象牙前質は、ほぼ3層に区分され、象牙芽細胞に接する側の層(約2 μm)はヘマトキシリンに淡染し、その中間(約10 μm)ではヘマトキシリンに濃染し、石灰化象牙質に接する側の層(約20 μm)はヘマトキシリンに淡染していた。石灰化象牙質には変化はなかった。

投与後2日(図5)では、象牙芽細胞の高さは約20 μm である。象牙前質の厚さは約15 μm であった。石灰化象牙質にSrによる石灰化障害線が見られ、象牙前質側にヘマトキシリンにやや濃染する層(約10 μm)が観察され、その表層側にヘマトキシリンに淡染する層(約20 μm)が観察された。淡染層と正常な象牙質の境界は波状を呈していた。

投与後5日(図6)および7日においては同様の組織像が見られた。すなわち、象牙芽細胞の高さは平均20 μm であり、象牙前質は平均10 μm であった。石灰化象牙質には、3層からなる石灰化障害線が認められた。つまり、表層側に幅10 μm のヘマトキシリン淡染層(1)、中央に幅10 μm のヘマトキシリン濃染層(2)、そして歯髄側に幅10 μm のヘマトキシリン淡染層(3)である。

次に5日目以降に見られた象牙質の石灰化障害線をSEM-EDS分析により、CaとPの元素分布濃度像を示す。組織像に見られる3層構造に一致し、CaとPの濃度が低い2層(図7の矢印)と、両者に挟まれた、2層よりは濃度が高い(正常な象牙質よりは濃度が若干低い)層が観察された。また、象牙前質側の層ではCaの濃度がPの濃度より一層低い像を呈していた。さらに、点分析においてこれら3層ではSrは検出され、正常な象牙質ではSrは検出されなかった。

考 察

本実験の結果をまとめると、Srを投与後、まず12時間から24時間にかけて、象牙前質中に染色性の異常な

どが生じる。投与後2日目以降からは、石灰化した象牙質中に石灰化障害線が現れる。この石灰化障害線は3層構造をもち、2層の低石灰化層と、この間に挟在するやや石灰化が悪い層からなり、前者の2層はH-E重染色に淡染し介在層は濃染する。

まず、ヘマトキシリンの染色性について考察すると、本実験から石灰化障害線に強弱の2種類の低石灰化層が認められたが、このうちヘマトキシリンにもっとも強く染色されたのは中間の石灰化度を示す部位であり、このことは脱灰切片におけるヘマトキシリンの染色性が石灰化度を反映していない、と結論される。これは、平山(1983)の見解を支持するものである。

本実験におけるSEM-EDS分析結果について検討すると、Irving & Weinmann(1948)が主張するところの、Srによる高石灰化層は観察されなかった。この結果はAppleton(1993)の観察と一致している。

次に、Srの投与により石灰化障害線が生じる機構を、経時的な組織像の変化から考察すると、以下のように考えられる。Srの投与により、まず象牙芽細胞に影響を与え、象牙芽細胞の正常な機能を阻害する。その後、象牙芽細胞が回復するまでに約12時間の時間を要する。この間の象牙芽細胞の異常の反映として、象牙前質中にヘマトキシリン濃染層が形成される。

一方、Srは象牙芽細胞の石灰化前線にも直接に影響を与え、石灰化の進行を止めることから、組織像の上では象牙前質の拡大をもたらす。さらに時間を経た象牙質の組織中には、この影響された領域として石灰化障害線のうち、表層側のヘマトキシリン淡染層を形成するものと考えられる。

やがて、象牙質の石灰化前線はSrの直接的影響がなくなり石灰化度を増してくるが、有機基質はちょうど象牙芽細胞の機能障害によって作られた異常帯に相当し、ここに組織構造の上では象牙質の石灰化障害線のうち、ヘマトキシリン濃染層を形成する(Sr投与後12時間から投与後24時間)。

Sr投与後、24時間から36時間にはSrによる腎臓障害が生じる(三島、未公表)。これが体内のカルシウム代謝の異常を招き、その影響の結果として石灰化障害線のうち、象牙前質側の低石灰化層であるヘマトキシリン淡染層を形成するものと考えられる。

以上の点をまとめると、Sr投与による象牙質の石灰化障害線の3層構造は、表層の低石灰化層がSr投与による直接的な石灰化前線への影響によるものであり、中間のやや低石灰化を示す層は象牙芽細胞の障害から生じた有機基質の乱れによるものと見られ、深層側の低石灰化層は腎臓障害によるカルシウム代謝の異常を反映したものと考えられる。

上記の推測を裏づけるものの一つとして、Krefting

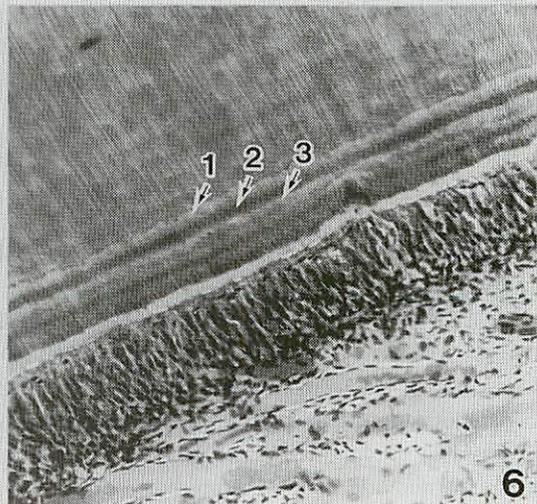
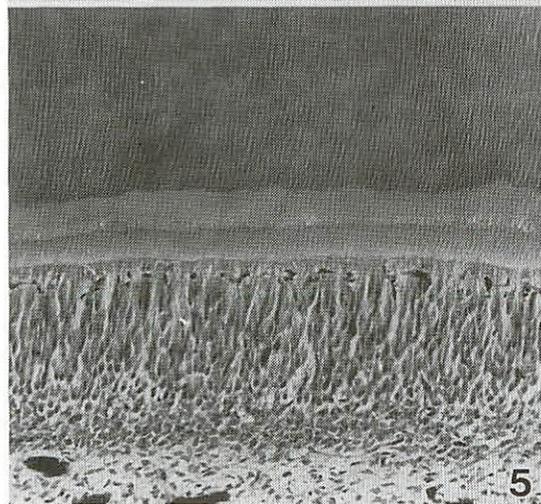
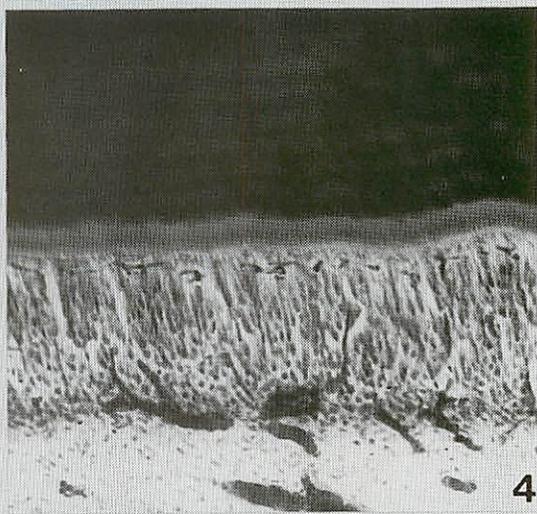
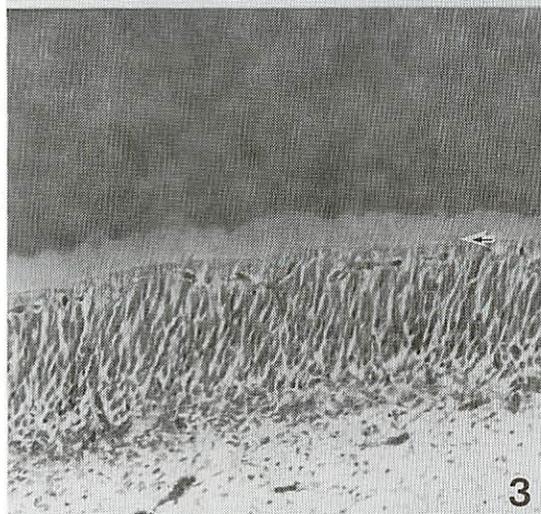
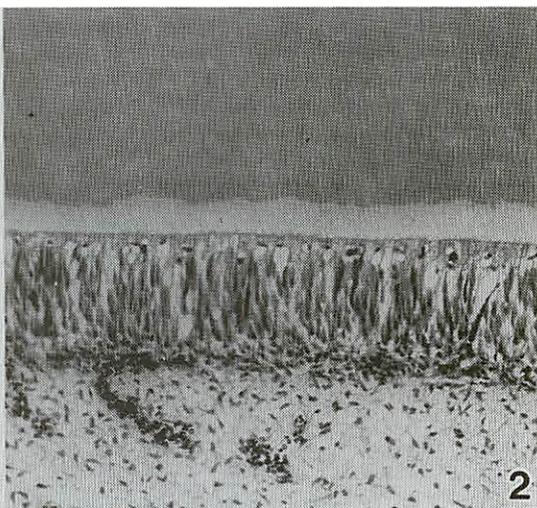
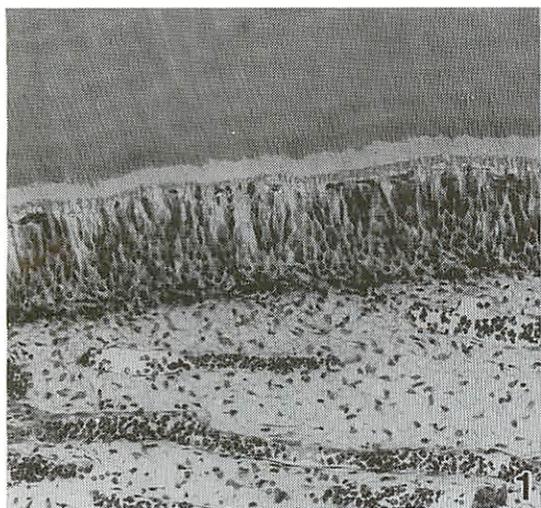
et al., (1993) は、実験的に Sr を投与すると、投与後10分で血中の Sr 濃度が最高に達し、20分後に脛骨の骨端軟骨において、Sr の濃度が最高に達するという。これにより、骨端軟骨と同様に、象牙芽細胞層においても投与後の早い時期に Sr が最高値に達するものと想像される。

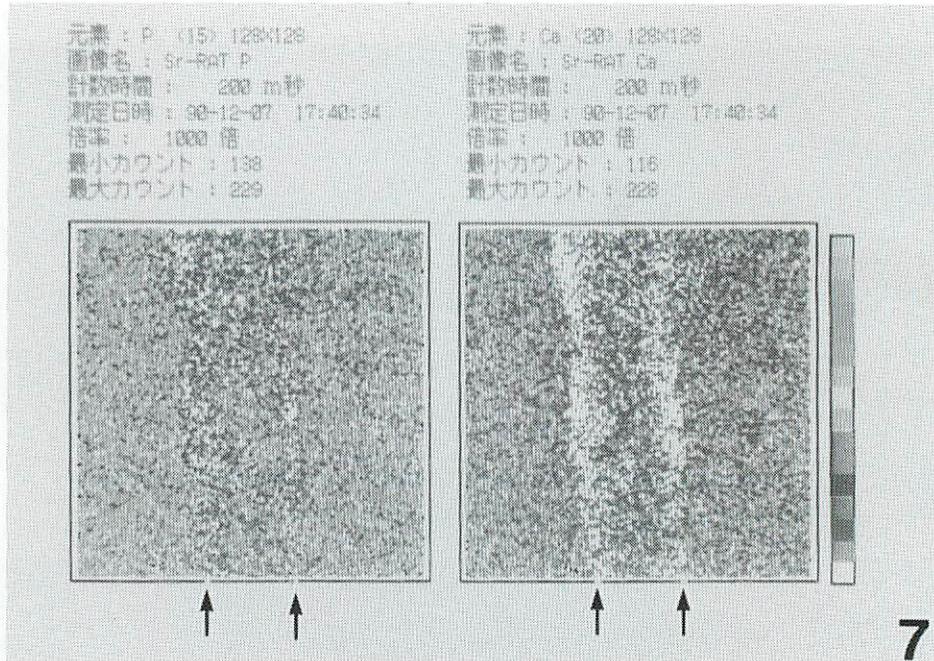
最後に、正常なラット切歯の象牙質の成長線と、本実験の Sr による障害線の関係を検討してみる。正常な象牙質の成長は、一日の昼夜のカルシウム代謝の相違を反映して、間隔が約16 μ m の暗帯と明帯からなる成長線が形成される (Okada and Miura, 1940; Schour, 1953; 篠田・小椋, 1977; 篠田, 1984)。この間隔と Sr による石灰化障害線の3層構造のそれぞれの層の厚さが10~20 μ m の値である点、および各層を形成した時間が約12時間である点は、よく一致している。この両者の背景には、全身的なカルシウムの代謝リズム、象牙芽細胞の代謝リズムなどが関与しているものと考えられる。この点は、今後さらに詳細な検討を加える必要がある。

稿を終えるにあたり、ご助言頂いた鶴見大学歯学部の小寺春人会員、ならびに日頃からご指導、ご援助を頂いている、日本大学松戸歯学部の第2解剖学教室の諸氏には深謝致します。

文 献

- Appleton, J. (1988) The ultrastructure of dentine from rat incisors following exposure to sodium fluoride and potassium pyroantimonate staining. *Scanning Microsc.*, 2, 2045-2054.
- Appleton, J. (1992) Dentinogenesis and the calciotraumatic response to the injection of lead or fluoride ions. *Scanning Microsc.*, 6, 1073-1081.
- Appleton, J. (1993) The structure of dentine after the injection of strontium chloride by backscattered electron imaging in the scanning electron microscope. *Archs oral Biol.*, 38, 1-4.
- Curzon, M. E. J. and Spector, P.C. (1981) Strontium in human dental enamel. Skoryna, S. C. (ed), in: Handbook of stable strontium, Plenum, New York, pp. 581-591.
- Grynopas, M.D. and Marie, P.J. (1990) Effects of low doses of strontium on bone quantity in rats. *Bone*, 11, 313-319.
- 平山勝憲 (1983) ストロチウムによる象牙質石灰化阻害反応に関する研究. 日大口腔科学, 9, 503-512.
- Irving, J.T. and Weimann, J.P. (1948) Experimental studies in calcification IV. Response of dentin of rat incisor to injection of strontium. *J. Dent. Res.*, 27, 669-680.
- Krefting, E.-R. (1993) Strontium, A tracer to study the transport of calcium in mineralizing tissues by electron probe microanalysis. *Scanning Microsc.*, 7, 203-207.
- LeGeros, R.Z. (1991) Calcium phosphate in oral biology and medicine. Karger, Basel, pp. 82-107.
- Marie, P.J., Garba, M.T., Hott, M. and Miravet, L. (1985) Effect of low doses of stable strontium on bone metabolism in rats. *Miner. Electrolyte. Metab.*, 11, 5-13.
- Mishima, H., Sakae, T., Kozawa, Y. and Hirai, G. (1988) Structural variation in labial dentin and lingual dentin in the rat incisor. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, 30, 1-10.
- Mishima, H., Kozawa, Y. and Sakae, T. (1991) Two pattern of calcification in rat and rabbit incisor dentin. Suga, S., Nakahara, H. (eds.) in: Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems, Springer-Verlag, Tokyo, pp. 223-227.
- Okada, M. und Mimura, T. (1940) Zur Physiologie und Pharmarlogie der Hartgewebe. III. Über die Genese der rhythmischen Streifenbildung der harten Zahngewebe. *Jap. J. Med Sc.*, IV. *Pharmacol.*, 13.
- Ogawa, Y., Ishida, T. and Yagi, T. (1981) Ultramicroscopy of hypomineralized responses in rat incisor dentine to injected strontium. *Archs oral Biol.*, 26, 229-236.
- Ohshima, H. and Yoshida, S. (1992) 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.
- Schour, I. (1953) Noyes' oral histology and embryology. Ler & Febiger, Philadelphia, pp. 389-399.
- 篠田 寿・小椋秀亮 (1977) 齧歯目動物の切歯象牙質内に見られる日周期性縞模様に関する基礎的研究. 歯基礎誌, 19, 481-489.
- 篠田 寿 (1984) 歯に記録される生体リズム. 現代化学, 162: 34-40.
- Steinfort, J.T., van den Bos, T. and Beertsen, W. (1989) Differences between enamel-related and cementum-related dentin in the rat incisor





図版の説明

- 図1 ストロンチウム投与後1時間。原倍率×200。
- 図2 ストロンチウム投与後6時間。原倍率×200。
- 図3 ストロンチウム投与後12時間。原倍率×200。
矢印：象牙芽細胞近くにややヘマトキシリンに染まる領域が見られる。
- 図4 ストロンチウム投与後24時間。原倍率×200。
- 図5 ストロンチウム投与後2日。原倍率×200。
- 図6 ストロンチウム投与後5日。原倍率×200。

1：表層側のヘマトキシリン淡染層，2：中層のヘマトキシリン濃染層，3：歯髄側のヘマトキシリン淡染層。

- 図7 ストロンチウム投与後5日の元素マッピング像。原倍率×1000。
左図はPのマッピング像を示し，右図はCaのマッピング像を示す。図の左側は表層側であり，右側は歯髄側を示す。矢印は低石灰化層。

with special emphasis on the phosphoproteins. *J. Bio. Chem.*, 264, 2840-2845.
Steinfors, J., Deblauwe, B.M. and Beertsen (1990) The inorganic components of cementum- and enamel-related dentin in the rat incisor. *J.*

Dent. Res., 69, 1287-1292.
Ten Cate, A.R. (1989) Oral histology : development, structure, and function. The C.V. Mosby Company, St. Louis, pp. 157-196.
(1994年5月20日受理)

Abstract

Rats were given strontium chloride (SrCl₂) intraperitoneally with the dose of 500 mg/kg. The upper incisors were removed after injection of strontium. These incisors were studied using light microscopy and scanning electron microscopy-energy dispersive spectroscopy analysis (SEM-EDS) to investigate the calciotraumatic lines of strontium on the rat incisor labial dentin. The calciotraumatic response was observed in predentin from 12 hours to 24 hours after injection of strontium. At 5 days, three layers of calciotraumatic lines were present in the labial dentin. The external layer is hypomineralized dentin, the intermediated layer is relatively hypermineralized dentin and the internal layer is hypomineralized dentin. It is assumed that the calciotraumatic lines of strontium were formed at the interval of 12 hours.