

## エナメル質組織進化と細胞学的背景

小澤幸重\*

## Cytological background of evolution of enamel structure

KOZAWA, Yukishige\*

## Abstarct

The aim of this work is to clarify the developmental mechanisms of the enamel structures (histogenesis) on the phylogeny, which is realized by the cytological and the histological background. On the animal evolution, the tooth developmental mechanism is essentially to analyze for to clarify the calcification, because the tooth enamel composed of about 95% over inorganic matrix, and the tooth morphology is based on the calcification.

On the enamel evolution, Hunter-Schreger band develops from a simple island patter to complex patterns with every species has own individuality. The enamel prism arrangement and course also evolve from a simple to complex types along with the phylogeny. These prism courses in Schreger bands are classified into 5 types (two of convergence and three of divergence) by 150 species of fossil and recent animal enamels. This phenomenon suggests the enamel structures are formed by the grouping ameloblast and the cell mobility. The author proposes the mobility, as the hypothesis of ameloblast 'Grouping and Dancing'. These mobilities are prove by the tooth development and the immunohistochemistry on next points; 1) The correlation between the ameloblasts and the enamel crystals (calcification), 2) The direct relationship between the ameloblast and the enamel structure, 3) The origin and development of Ameloblast 'Grouping and Dancing', 4) Is there Ameloblast 'Grouping and Dancing'.

1) Calcification. The enamel crystal seeds and develops in enamelines, which forms the nano-tube (Nano-space theory). The tube arranges almost perpendicular against the cell membrane of Tomes process with the affinity. Thus the crystal orientation is decided. The organic matrix of enamel is dissolved and the crystal growing space increases and regulates the crystal form.

2) Relationship between ameloblasts and enamel structures. It is observed both the enamel and the ameloblast as double layer in the thick (about 50 or more) and almost tangential sections against the enamel and the ameloblast. Each ameloblast group corresponds to a zone of Schreger bands on the developing enamel. Those grouped ameloblasts is a part of clusters of the enamel organ from the outer enamel epithelium to the ameloblast. It suggests the whole enamel organ harmonically moves with 'Grouping and Dancing'.

3) The development of 'Grouping and Dancing'. The initial group arises in the early developing inner enamel epithelium. The stratum intermedium cells develop on these mass of the inner enamel epithelium cell (ameloblasts) and connects to the outer enamel epithelium cell groups through newly developed enamel cords. These show the group is associated with other cells of whole enamel organ, which has the harmonical mobility with 'Grouping and Dancing'.

---

2007年2月28日受付, 2007年6月11日受理

\*〒271-8587 千葉県松戸市栄町西2-870-1 日本大学松戸歯学部 組織・発生・解剖学講座

Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1, Sakaecho-nishi, Matsudo-shi, 271-8587, Japan. E-mail: kozawa.yukishige@nihon-u.ac.jp

4) 'Grouping and Dancing'. The anti-actin reaction is clearly provides the ameloblast groups which corresponds to zone of Schreger bands. Some cell masses have no-reaction against the anti-actin. The anti-actin reaction cell groups differents from anti-Keratin reacted cell groups on the enamel organ. There are also no reacted cell groups against the keratin. These suggest the keratin and the actin alternately and rhythmically changes the reaction in the enamel organ. Tubulin reacts all ameloblast layer avoid of some ameloblasts and Tomes processes. This also suggests the ameloblast plays the periodical and rhythmical secretion. Desmoplakin reaction shows from the stratum intermedium side of the ameloblast layer to the outer enamel epithelium. It shows these areas softly fixes from the enamel organ mobility.

It is concludes that the ameloblast have 'Grouping and Dancing' to form enamel structure, under rhythmical moves and functions of whole enamel organ along with the development of tooth germ. 'Grouping and Dancing' is associated with the grouping to form cell masses of which swelling movement of dancing to form the Hunter-Schreger bands, and the torsional movement of the ameloblast and Tomes process forms the spiral enamel prism. The torsional movement always changes the size, the direction and the form of Tomes processes and develops the changeable enamel prisms.

This phenomenon shows the whole enamel organ moves rhythmically along with the tooth development. Under those mobility of the enamel organ, which separates many groups from the outer enamel epithelium to the ameloblast, the 'group' forms the band of Hunter-Schreger by the swelling movement of 'Dancing'. The distal part of ameloblast and its Tomes process show the 'Torsion' movement changing the size and the form, which results the spiral course and various form of the enamel prism, because the area from outer enamel epithelium to the basal side of ameloblast is softly fixed by the desmosome. The author proposes these mobility calls Ameloblast 'Grouping and Dancing'.

Key words : evolution, amelogenesis, enamel organ, enamel structure, immunohistochemistry

## 緒言

歯は、脊椎動物の石灰化機構進化の上で避けることのできない組織である。脊椎動物に特有の歯は、エナメル質、象牙質（歯髄）とその周囲組織である歯足骨・セメント質・歯槽骨（歯周組織）という石灰化硬組織よりなり、それぞれが特有の由来と性状を持つ。つまり外胚葉性のエナメル質と、中胚葉性の象牙質と歯足骨・セメント質・歯槽骨は、有機基質も結晶の形態もそれぞれの組成も異なる。セメント質は骨にもっとも近い組織構造と組成を持つが、エナメル質は体の中でもっとも無機質に富み外胚葉性の有機基質を持つ。このような歯の進化は石灰化機構の進化として、脊椎動物においてもっとも複雑に特殊化したものの一つであり脊椎動物の進化に果たした役割は大きいと考えることができる。

外胚葉由来のエナメル質は、石灰化に伴って有機基質が脱却され殆ど無機成分のみとなる。動物によってその成分比は異なるが、有機基質が脱却されつつ石灰化する点に、そしてその機構にエナメル質形成の特徴がある。進化した動物の生理的現象として骨の改造現象などで吸収と脱却はあるが、特別な例外（魚類のエ

ナメロイドなど）を除くと発生過程で吸収脱却が行われるエナメル質は特異的である。しかし基本的な石灰化機構（結晶形成と組織形成）は、エナメル質と他の硬組織で殆ど同じといえる。それ故、もっとも特殊化した形質（進化の要素が含まれているため）から進化を俯瞰し、分析するために、エナメル質の形成の詳細を検討し、更に他の組織を反省する。

これまで組織や構造の進化は数多く報告されてきた。しかし細胞学的ないし組織学的な背景（細胞とその集合つまり組織による構造の形成機構）はあまり論じられてない。その原因は古生物と解剖学（発生学、組織学を含む）の乖離にあると考えられる。特に近年は最先端の研究が要求されることから、遺伝子や細胞の因子（原因）が直接に進化形態（結果）と結びつけられることが多い。しかし遺伝子や細胞の因子（原因）はいろいろな細胞や組織を通して形態に実現（結果）される。遺伝因子や細胞の因子の解明の飛躍的發展はすばらしいものであるが、形態の形成（実現つまり結果）は、その過程（細胞・組織の形成機構）無くしてあり得ない。経過の立証を欠かすことは、遺伝子や細胞の因子（原因）がかりに形態の原因であったと

しても、あくまでも推定の域を出ないことになる。このような点から形態進化を支える、または土台となる細胞組織による形成機構を検討する必要がある。

筆者はこれまで、歯、歯系 (Dentition) の形成機構を、おもに 1) 石灰化機構、2) 組織とその形成機構、3) 歯の形の形成機構、4) 歯式 (歯数と歯種) の成立機構に大きく分け、更にその進化過程について検討を加えてきた (小澤, 2003)。その結果、歯系は周期性 (Rhythm) を持った細胞の集団化と動き (Grouping and Dancing) によって形成されるという結論に達した。

以上の四点は相互に密接な関連があるが、特に本論の主題であるエナメル質形成の細胞・組織の分化は、「Grouping and Dancing」と「石灰化機構」の二点が土台となっている。換言すれば、動物の (歯の) 石灰化機構は組織構造と一体のものであり同時に進化してきたものである。それ故、石灰化の結果としての組織構造の進化を支える細胞学的な背景を検討するためには、Grouping and Dancing という結論 (仮説) に至る理由と結晶形成と結晶の集合化と配向の制御機構とを概略する必要がある。

さて、エナメル質には研究上での最大の弱点がある。エナメル質組織と細胞・組織の直接的関係の立証という点を克服しなければならないというものである。エナメル質の研究は、エナメル質が高度に石灰化した組織であるために、細胞と組織とが別々に研究され両者の結論が結びつけられる。つまり、両者の直接的関係は推定の域を出ないことになる。この傾向は技術的な問題も重なっているため、細胞レベルよりも組織レベルにおいて顕著である。そのためにエナメル質の有機基質のみを残す桐野式脱灰法 (桐野, 1958) などが考案された。本論もこの問題点を十分に克服しているとは言えないが、幸運にも、組織構造が複雑で細胞の動きが捉えやすく、さらに比較的有機基質に富むというゾウのエナメル質組織発生の標本を研究する機会に恵まれ、エナメル質組織と細胞・組織の直接的な関連と Grouping and Dancing の分化の一端を明らかにすることが出来た、と考えている。その副次的なものとしてエナメル索や中間層というエナメル器の構造の意味の一側面も明らかにすることが出来た。

そこで本論は、はじめにエナメル質組織の前提となる結晶形成 (石灰化)、エナメル質組進化と Grouping and Dancing の仮説とを概括し、次に組織進化を支える細胞学的組織学的な面を 1) エナメル質構造と細胞・組織の直接的関係の立証、2) エナメル芽細胞の Grouping and Dancing の分化、3) Grouping and Dancing の免疫組織学を用いた立証、の 3 点から論ずる。

よって本論の項目は次の通りとなる (直接的関係と Grouping and Dancing の分化はゾウの歯胚の分化であるために同じ項目に入れる)。

## 1. 材料と方法

### 2. 検討

#### 1) エナメル質の石灰化機構

#### 2) エナメル質組織進化と仮説

#### 3) エナメル質組織と組織発生

(1) 無小柱エナメル質組織発生にみる Grouping and Dancing

(2) Grouping and Dancing の分化およびエナメル質構造と細胞・組織の直接的な関係

(3) 免疫組織化学による Grouping and Dancing の立証

### 3. 展望

## 1. 材料と方法

歯化石および現生約150種類 (小澤, 2006)

歯胚 (詳細は各項目に記述する)

ワニの歯胚 (ミシシッピーワニ, メガネカイマン)

インドゾウの歯胚: 東京医科歯科大学に所蔵されていた未石灰化白歯, 直径約2.5cm (小澤, 1978), 井尻氏より託された石灰化白歯歯胚, 直径約8cm, 咬板数13枚. ヘマトキシリン・エオシン (H・E) 重染色およびマッソン・ゴールドナー染色。

イヌの歯胚 生後約一ヶ月幼犬, H・E 重染色と共に, 細胞骨格, 細胞運動, 細胞接着, 細胞分泌に関与するアクチン, サイトケラチン14, デスモプラキン, チュプリンなどの免疫組織化学を行った。

### 2. 検討

#### 1) エナメル質の石灰化機構

エナメル質組織を作る結晶形成は、種結晶 (結晶核) の形成、結晶の成長、結晶の配向の決定、結晶のグループの形成とに大まかに区分できる。このうち結晶のグループの形成はエナメル質の組織構造となるため組織発生で議論する。よってエナメル芽細胞とエナメル質結晶の関係および種結晶形成から結晶の配向の決定までの要点を列記する。

(1) エナメル芽細胞がエナメル質形成に関与する点は次の通りである。(Fig.1)

① 種結晶形成のための有機基質の分泌とイオンの輸送: エナメル芽細胞は、エナメル質結晶形成に関する有機基質として総称エナメルタンパクを合成し分

泌すると共に分解物を吸収脱却する。さらに結晶形成の構成要素となるイオンや原子を輸送する。

- ② トームスの突起の分泌面の形態はエナメル小柱の断面とほぼ一致する。
- ③ トームスの突起の分泌面にほぼ垂直方向にエナメル質結晶が配列する。
- ④ エナメル質形成初期はトームスの突起との関係が未発達なため結晶の配向が複雑となる。

(2) エナメル質の石灰化，結晶形成について主要な点をまとめると次の通りである。(Fig.2)

- ① エナメルタンパクは，大部分を占めるアメロゲニン(20-50kD)，巨大分子だがわずかなエナメルリン(156kD)，小柱鞘や小柱の横紋(一日に一本形成されるという)に局在するシースプロテイン(アメロプラスチン)(13-17kD)，これらを分解するプロテイナーゼの4つである(Uchida *et al.*, 2003)。
- ② アメロゲニンは大量に分泌されエナメル質の嵩(容積)をつくる。同時にエナメル小柱や小柱間質，成長線などの構造も形成するようである。エナメルリンはC端が細胞膜に親和性があり，N端はシースプロテインに親和性がある。シースプロテイン(アメロプラスチン)は周期的に分泌されるため横紋ないし小柱鞘に局在するようである。
- ③ 分泌されたアメロゲニンが分解酵素によって溶解脱却された空隙に，エナメルリンの疎水部がイオンを捕捉し，さらに細いチューブ(ナノチューブ)を形成し，なかにイオンを濃縮する。これが先駆的結晶であり，綿飴とその芯のような形態をなす。(小澤，2004)。

\*ナノチューブの中で水なども結晶化する。

- ④ 結晶核形成：捕捉されたイオン(先駆的結晶)はナノチューブの中で濃縮し，エネルギーが最小で安定する平衡状態に近づく結晶化現象により種結晶(結晶核)となる。種結晶は，エナメルリンのナノチューブの中で凝集されいわゆるヨレヨレの撚り糸状の構造(Höling, 1989)となる。アモルファスの状態である。

\*結晶形成には種結晶形成が最大の課題である。

\*この際に炭酸塩，Mgが重要な働きをする(Kakei *et al.*, 2004)。

\*ナノスペース説(Höling, 1989；桂，1999；小澤ほか，2004)

\*有機基質のナノチューブは，プロトンの影響から結晶形成を保護することになる。

\*貝類におけるCompartment theory(中原，1988)も同じ原理と推定される。

- ⑤ 結晶のC軸の決定：エナメルリンは一端(C端

末)をエナメル芽細胞の細胞膜に付着し(親和性がある)，他端は体液の流れに乗って伸びてゆきシースプロテインに着く。故にエナメルリンのナノチューブ(ナノスペースを持つ)は細胞膜にほぼ垂直方向になり，そのなかで結晶核から結晶が成長するため結晶のおおまかなC軸が細胞膜にほぼ垂直な方向に決定する。

エナメル質形成開始時，形成初期の結晶(エナメル質深層)は不規則な配向を示す。これはエナメル芽細胞の分泌面にトームスの突起が未発達で複雑な凹凸をすること，免疫組織化学的にもエナメルリンが細胞膜との親和性を示さないなど，未発達な分化時期であるためと推論できる。

\*比較解剖学的に無小柱エナメル質のエナメルリンは膜への親和性を示さない。

- ⑥ 有機基質は分解・溶解されてアメロゲニン中の空隙は大きくなり，エナメルリンも急速に分解され成長空隙が広がるため結晶が成長する。
- ⑦ リボン状結晶：撚糸状の構造(種結晶)はイオンが濃縮し有機基質のあちこちに原子が整然と配列する小さな結晶の状態を経て，ヨレヨレのリボン状結晶となる。リボン状の結晶は有機基質の中にアパタイトの原子配列が部分的に存在するアモルファス状態，つまりアモルファス結晶と考えられる。リボン状結晶に癒合や分離が諸処に観察されるのは，結晶核が癒合する状態と考えられる。(小澤ほか，2004)
- ⑧ 板状結晶：有機基質が溶解され脱却され結晶成長のスペースが拡大すると，リボン状結晶は相互に癒合するとともに表面にイオンが吸着して，原子配列がより厚くなり板状結晶へと成長する。板状結晶の結晶表面や端でも新しい結晶核が付け加わるとともに結晶相互に癒合して結晶成長する。これはひげ結晶成長やエピタキシー成長と推定される。
- ⑨ 結晶成長と成熟結晶：エナメルリンに捕捉された原子やイオンは濃縮され(先駆的結晶)，エネルギーの平衡状態，つまり結晶核へと成長する。結晶核はイオンの吸着や相互に癒合することによりリボン状結晶となる。ここまでは有機基質に富むアモルファス状と推定される。次にひげ結晶成長やエピタキシー成長によってアモルファス結晶から板状結晶へと成長する。板状結晶が同様の原理で成長して六角柱状へ，更に大型の結晶となるとともに結晶が癒合して多角柱状の結晶となり成熟結晶となる。
- ⑩ 結晶形態の制御：結晶の形は，エナメルリンやアメロゲニンの脱却による空間の広さに依存すると考えられる。ヒトの結晶は六角柱状と言われているが実際の観察では不規則な多角形である(一條，1995；

小澤ほか, 2004).

一方, ラットなどのエナメル質結晶は六角柱状, ウシなどでは平板状であると報告されている (Travis, 1968). 以上の結晶成長から見ると, これらの結晶形態はヒトの結晶に比較すると成長の過程 (未成熟) であると考えられる. ヒトのエナメル質が動物の中では非常に硬く (有機基質が他の動物より非常に少ない), 有機基質の脱却による結晶成長が進み不規則多角形 (成熟結晶) となったものと推定できる.

- ⑪ こう考えると象牙質や骨の膠原繊維間の空隙に結晶ができる, という桂 (Katsura and Ono, 1998; 桂, 1999) や Höling (1989) の説 (ナノスペース説) が正しいという結論に達する.

\* トロポコラーゲンの配列がずれるために生ずる空隙 (ギャップ) は存在しない. もし存在しても狭く, 結晶核が形成することができない (桂, 1999).

\* 生体中はどこでも石灰化が起り得るが, その基本がこの様なものと考えられる.

- (3) むろん問題は山積しているが, 結晶形成, 結晶の配向, 組織形成 (エナメル小柱の形態など) が以上により大まかに矛盾なく説明できる.

問題点としては, エナメル蛋白の起源, 深層エナメル質結晶の不規則的配向とエナメリンの親和性の発現, 周期性の制御, 種特異性の問題などなどである. これ等に対して現在キチン質やクチクラ, ホヤやナメクジウオの外皮の問題を検討している.

## 2) エナメル質組織進化と仮説

形態学的研究によって, 1本のエナメル小柱はほぼ1個のエナメル芽細胞によって形成されることが明らかとなっている. つまり, エナメル小柱の走行や配列, 横断形, 総合状態等々と論じる時は, エナメル小柱をエナメル芽細胞に読みかえてもよい. それ故に, エナメル質の起源と構造をエナメル小柱とその集合体であるシュレーゲル条の形態とを分類し, 系統的に配列することによって, その構造を造り出す組織細胞の動態を推定し, 仮説を導くことが可能となる. ここでは, エナメル質進化の基盤となる次の6点を論ずる.

- (1) エナメル質の起源, 無小柱エナメル質と Grouping and Dancing の起源
- (2) エナメル小柱の起源とシュレーゲル条の分化
- (3) エナメル小柱とシュレーゲル条の発達
- (4) エナメル質組織の分類と系統発生
- (5) エナメル小柱の変化
- (6) エナメル質組織進化からの仮説

- (1) エナメル質の起源, 無小柱エナメル質と Grouping and Dancing の起源

外胚葉性由来のエナメル芽細胞から分泌されるアメロゲンなどのエナメル蛋白を基質とするエナメル質の起源は魚類の歯のエナメロイド周辺に形成される襟足 (カラー) エナメル質 collar enamel に求めることができる. これは非常に薄いものであるが, 有機質の失われた化石では確認が困難である.

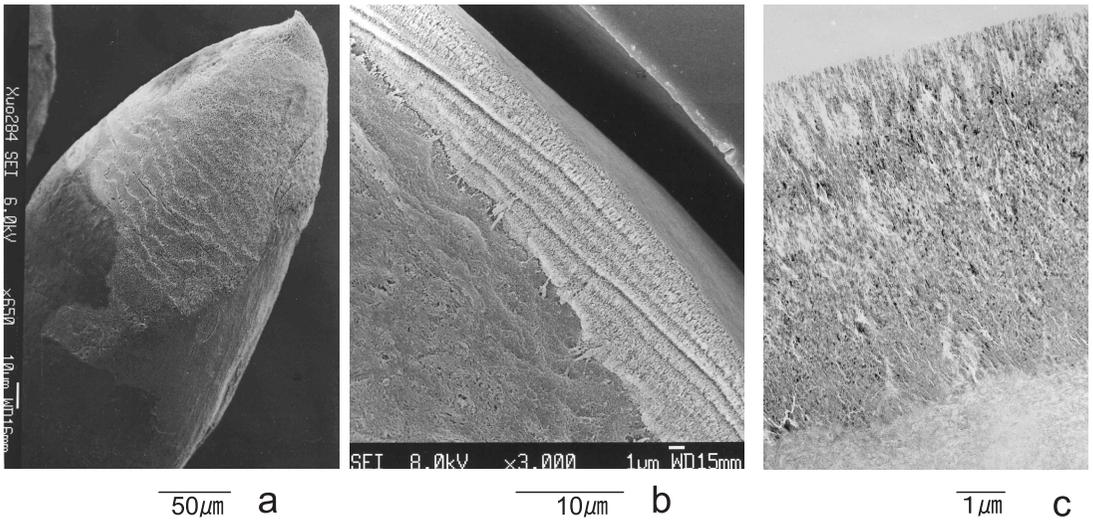
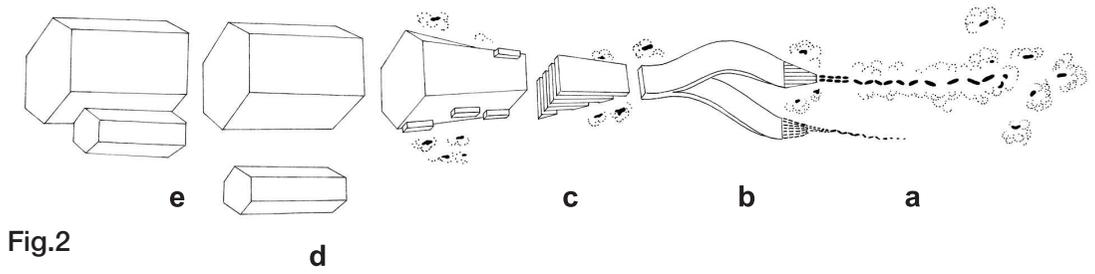
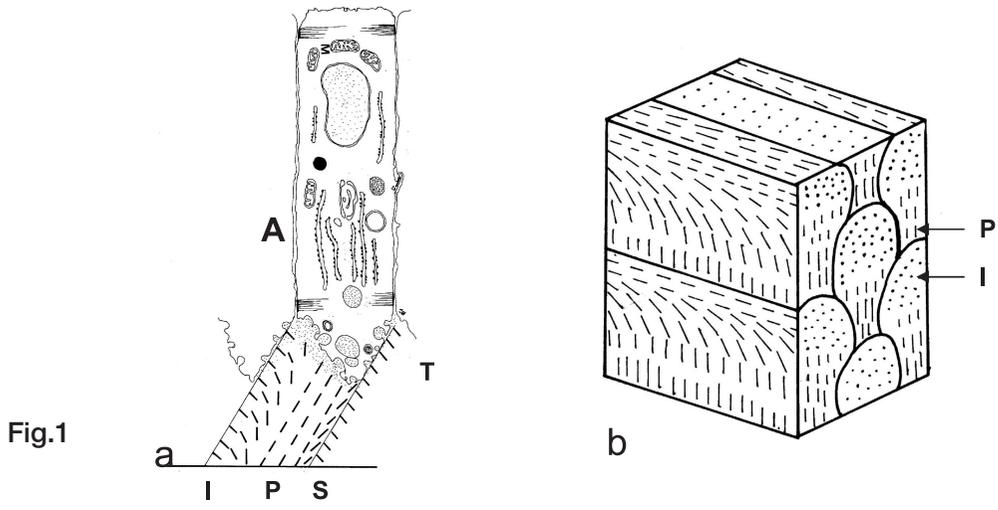
両生類のエナメル質は厚さがせいぜい数十  $\mu\text{m}$  であり, 歯の頂上を覆う歯冠エナメル質として最も原始的なものである (千坂, 2004) (Figs.3a-c). このエナメル質は薄く単純であるが構造をもつ. エナメル細管や有機基質のある裂溝が認められ, 結晶の一定の配向集団があり, 原始的な結晶集団の結晶単位 (crystal unit) を形成する. エナメル質の表面に周波条なども認められ周期的形成を示している.

爬虫類のエナメル質は両生類に比較して飛躍的に厚いエナメル質となり, 200-400 $\mu\text{m}$  に達する種類もある. ほとんどがエナメル細管をもつ細管エナメル質である. 大きさには変異が大きいが, 裂溝によって境される結晶の配向が結晶単位として認められる.

*Pyutosaurus* では歯冠の長軸方向の裂溝に沿って結晶単位が認められ, 一方 *Mosasaurus* では様々な大きさと形の結晶単位があるが, エナメル質の途中から出現したり消えたりし一定しない (Torii, 1998) (Figs.4a, b). 爬虫類のエナメル質の結晶単位は, 大きさ, 形, 結晶単位の方が様々で多様な形態を示す. 結晶単位の中では一定の結晶の配向性の変化がある. つまり結晶単位は, 個々のエナメル芽細胞によって形成される大きさのものと, エナメル芽細胞の集団によって形成されるものがある, と考えられる. 以上のような結晶単位から一つのエナメル芽細胞の動きを推定すると, 一つの結晶単位を形成することもあれば, 次々と結晶単位を横断しながらエナメル質を形成しつつエナメル質表面まで達する動き (運動, Dancing) など3つのタイプ (放散型, 収斂型, 出戻り型) が推定できる (Fig.4c). このようなエナメル芽細胞の集合と動きが哺乳類のエナメル芽細胞の Grouping and Dancing の起源と推定できる.

- (2) 小柱エナメル質の起源とシュレーゲル条の分化 (Fig.5)

爬虫類の中でミシシッピーワニのエナメル質には結晶単位とともに, 所々に小さな直径1-2 $\mu\text{m}$  のエナメル小柱が形成される (Fig.5). 原始的哺乳類と考えられる多丘歯類でも同様である (小澤, 2006). *Uromastix* では小型のエナメル小柱が形成される細管エナメル質である (Cooper and Poole, 1973). つま



り、原始的な哺乳類のエナメル質は無小柱・細管エナメル質であるが、所々にエナメル小柱が認められる。このようなことから、無小柱エナメル質から偽エナメル小柱 (pseudoprisum) を経て小柱エナメル質が進化したと仮定するより (Moss, 1969), 無小柱エナメル質の中に点々とエナメル小柱が出現し、エナメル小柱が増えて小柱エナメル質に進化した、と推定できよう。

小柱エナメル質になると結晶集団 (エナメル小柱) が一定の大きさとなりエナメル芽細胞の太さとほぼ一致するため、細胞の動きがより明確に反映される。

### (3) エナメル小柱とシュレーゲル条の発達

哺乳類ではエナメル細管が退化すると共にエナメル小柱が多様に発達する、という一般的な傾向がある。エナメル質が厚く発達する哺乳類では、比較的エナメル小柱の走行、配列は複雑になる。しかしマナティーなどでは厚いエナメル質 (2-3mm) を持つが円形のエナメル小柱が緩く彎曲して走行する比較的単純な組織でありシュレーゲル条が認められない。このような例外も多い。エナメル小柱の太さは大きいもので7-8 μm (現生のゾウ、セイウチなど)、小さなもので1-2 μm (爬虫類や原始的哺乳類、デスマスチルス、有蹄類の大半など) である。ちなみに多くの動物は約5 μm であり、エナメル芽細胞の太さにほぼ一致する (小澤, 2006)。哺乳類の進化とともにエナメル小柱の形態 (断面) 形、配列走行も多様となる。一般的には複雑に走行するエナメル小柱は小型となる。これも

大まかな傾向であり、エナメル小柱形態の発達と、集団化は動物の種類によって様々である。

エナメル小柱は集合 (Grouping) し、集合内のエナメル小柱の走行はほぼ同様の走行 (Dancing) をするが、集団間の走行の違いによってシュレーゲル条という縞模様を形成する。エナメル小柱の太さや断面の形、走行や彎曲が変化するため、シュレーゲル条の形はエナメル質の層によって異なり (Stefen and Rensberger, 1995; Stefen, 1997; 小澤, 2006), 組織発生が常に変化してエナメル質を形成することを示している。

シュレーゲル条の形は、どのような動物でもエナメル質の深層ではほぼ島状、中層~表層では種によって特徴的な型となる。Desmostylus や長鼻類の系統発生に於けるシュレーゲル条のエナメル質の層における変化を比較すると、種特有の形質はエナメル質の深層、つまり、エナメル質形成初期に現れ、エナメル質全体に波及して種の特徴となる (Kozawa and Suzuki, 1995)。

### (4) エナメル質組織の分類と系統発生

様々な変化はあるが、エナメル質の組織・構造は大体次のように分類することができる。

#### ① シュレーゲル条の型 (エナメル芽細胞の集団の型 Grouping) (Fig.6a)

シュレーゲル条は、無小柱エナメル質と、細管エナメル質を持つ原始的哺乳類のほとんどにはない。最も原始的で単純なシュレーゲル条は、パリテリウ

Fig.1

a: The relationship between the enamel prism and the ameloblast.

The crystallites of the enamel prism and the interprismatic enamel dependents to the secretion and absorption cell membrane of Tomes process.

b: The crystal orientation on the typical keyhole pattern of human enamel prism, modified from Meckel, A.H. and Griebstein, W.J. (1965). The crystal orientation gradually changes from the enamel prism (body) to the inter prismatic enamel (tail). The body depends to the secretion surface of Tomes process.

A: ameloblast, T: Tomes process, I: interprismatic enamel, P: enamel prism, S: prism sheath

Fig.2 Schema of crystal growth

The enamel crystal grows from the dot structure (a) to the polygon rod pattern (e).

a. The precursor of enamel crystal arises in the enamelin tube as the dot structure.

b. The precursor ions accumulate and grow to the ribbon-like amorphous crystal, which fuses to each other.

c. The plate-like crystal.

d. The Hexagonal rod crystal.

e. The mature crystal forms hexagonal rod crystals, which fuses and increases the size to form the irregular rod pattern.

(modified from Kozawa *et al.*, 2004)

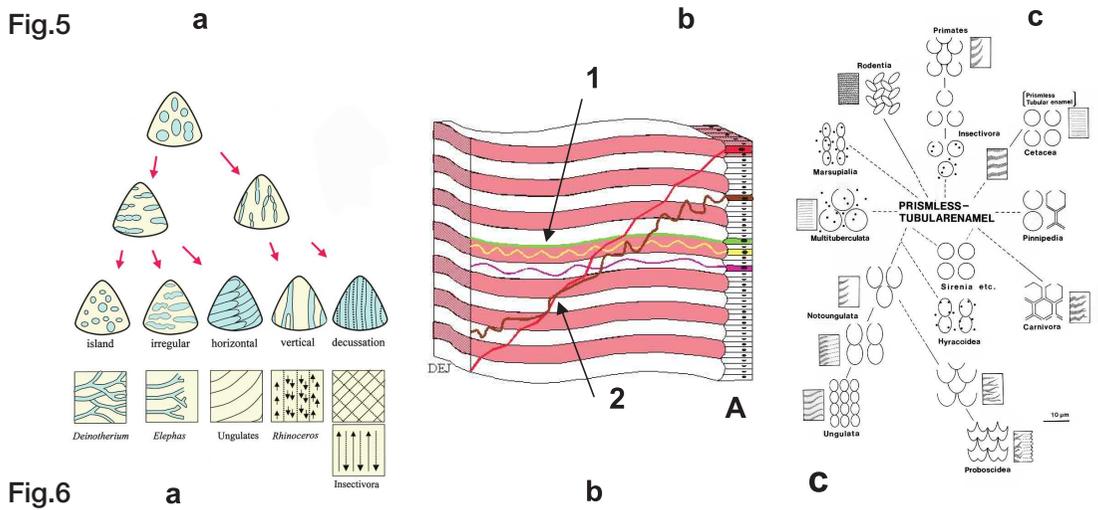
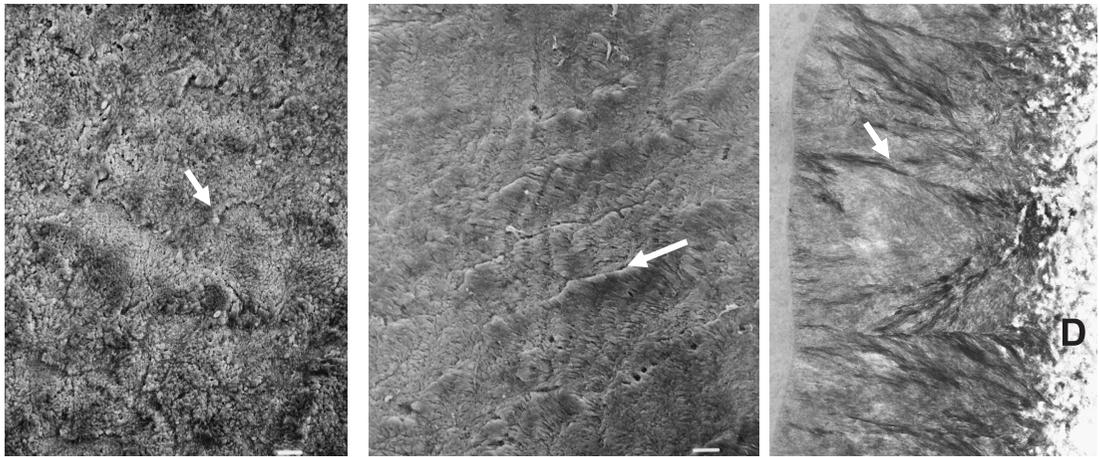
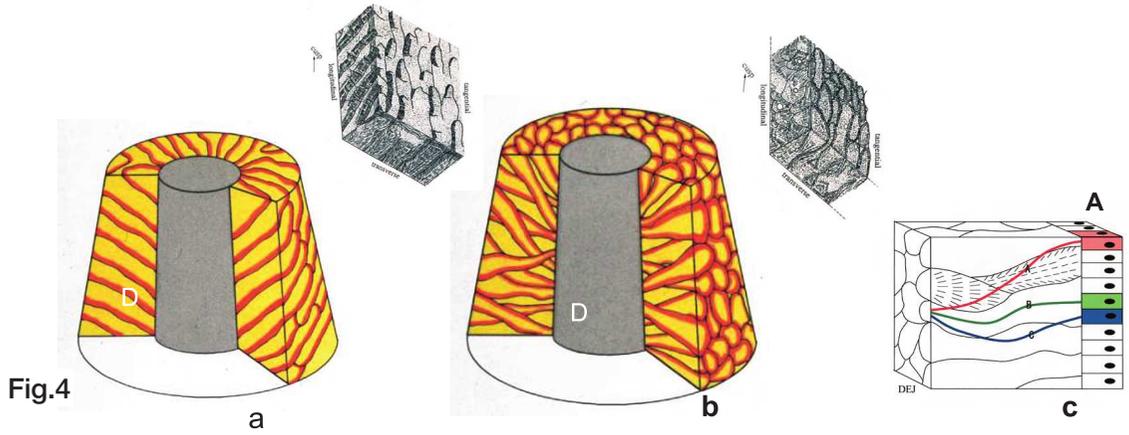
Fig.3 Amphibian enamel

a. The perikymata of amphibia *Xenopus laevis*.

b. The incremental lines, the crystal unit and the fissure of *Xenopus* enamel by SEM.

c. The crystal unit and the fissure of *Xenopus* enamel by TEM.

(Chisaka, 2004)



ム Barythelium に認められる。エナメル質内のあちこちに島状 (Island type) にエナメル小柱の集団が現れるものである。この集団は、歯冠の横方向あるいは縦方向の集団へと発達する。前者を水平型 (Horizontal type)、後者を垂直型 (Vertical type) と呼ぶ。長鼻類のダイノテリウム *Dinothelium* は、島が小型となり交錯した配列を示すと共に、放散型のエナメル小柱を持つ。即ち、島状の進化したものである。しかし、他の長鼻類は水平型へと進化した。サイの仲間には垂直型であるが、垂直の中の各帯では水平方向型のシュレーゲル条を有する特殊な動物である。ラットなど切歯類の多くは、エナメル小柱が交叉しつ一つ一列となつて配列する交叉型 (Decussation type) を示す。

② エナメル小柱の走行型、(エナメル芽細胞の移動の型 Dancing) (Fig.6b)

個々のエナメル質の走行及びシュレーゲル条との関係は次のような型に分類される。シュレーゲル条は、横断帯と縦断帯から構成される。エナメル小柱 (エナメル芽細胞) は一般原則として横断帯では湾曲が激しく、縦断型は動きが少ない。

収斂型 (Convergence type) : イヌなど (食肉類の多く) では、各帯を構成するエナメル小柱は同じであり、変化しない。各帯の境界には、動きの少ない一列のエナメル小柱が配列する。

放散型 (Divergence type) : 哺乳類、とくに植物食の有蹄類などでは、エナメル小柱 (エナメル芽細胞) は縦断帯と横断帯を貫き、横切るような動きを

する。これには二つの型がある。

a. 規則型 : デスマスチルス類 *Desmostylus* に代表される有蹄類特有の型であり、厚いエナメル質内を美しく S 字状を描くシュレーゲル条の両帯を横切ってエナメル小柱 (エナメル芽細胞) は移動する。ひとつのエナメル小柱 (エナメル芽細胞) は動きの緩やかな時に縦断帯を形成し、動きが激しい時に横断帯を形成する。即ちシュレーゲル条はエナメル芽細胞の周期的な動きの変化によって形成される。

b. 不規則型 (Irregular type) : ゾウ (長鼻類) など、シュレーゲル条が不規則な場合に多い。エナメル小柱 (エナメル芽細胞) は動きが激しい時と、ゆるやかな時をくり返してシュレーゲル条を形成するが、両時期の周期、間隔が不規則な場合である。

上記の点から哺乳類のエナメル質の発達の傾向を再度まとめると次の如くなる。

- a) 有袋類や食虫類などでは細管エナメル質を持つが、進化した哺乳類では細管が短くなりエナメル紡錘となる傾向があり、無細管小柱エナメル質となる。
- b) 細管エナメル質のエナメル小柱はエナメル細管が消失するエナメル質表面に近くなると全体が急に彎曲する。
- c) シュレーゲル条は歯冠エナメル質の所々にエナメル小柱の集団として出現する (島型)。
- d) 島状のシュレーゲル条は広がり (癒合や拡大による) 縞模様を示すように進化する (水平型)。

Fig.4 Reptilian crystal unit

- a. The crystal unit of *Phytosaurus* and the crystal orientation.
  - b. The crystal unit of *Mosasauros* and the crystal orientation.
  - c. Three types of the ameloblasts running course in the reptilian enamel ; grouping and dancing. The pattern of ameloblast dancing calcifies into three, A : cross over the fissure, and transverses to other crystal unit, B : run in a crystal unit, and C : cross over the fissure and return.
- A : ameloblast, DEJ : dentino-enamel junction  
(a, b : Torii, 1998, c : Kozawa, 2003)

Fig.5 The crystal unit and fissure on *Alligator mississippiensis* enamel

- a. Enamel prisms (arrow) are observed here and there.
  - b. The crystal arrangement suddenly changes at the fissures (gaps, arrow), which is the border of crystal unit by SEM.
  - c. The crystal unit is bordered by the fissure (arrow) by TEM.
- D : dentine (Kozawa *et al.*, 1999)

Fig.6 The phylogeny and patterns of enamel structures

- a. The evolution of the Schreger patterns.
  - b. The running pattern of enamel prisms. 1 shows three types of convergence patterns. 2 shows regular and irregular of divergence pattern. The stripes mean the dia- and para zone of Schreger bands.
- DEJ : dentino-enamel junction, A : ameloblast
- c. The phylogeny of enamel structures.
- (a, b : Kozawa, 2003, c : Kozawa, 2006)

- e) 鳥状のまま複雑に進化するタイプもある(複雑型)(ダイノテリウム系統)。
- f) 植物食動物のシュレーゲル条は水平型できれいなS字状の彎曲を示すことが多い。エナメル質が厚く発達する動物ではより顕著である。
- g) 食肉類は角張った曲がり方のシュレーゲル条が多い。
- h) 長鼻類やウマ類はエナメル質内層では不規則型、外側では水平型に変わる。
- i) シュレーゲル条はエナメル質が厚くなるに従い層ごとの型が異なる。  
たとえばイヌは内層では鳥状から始まり水平型となり、エナメル質表層ではジグザグ型となる。
- j) エナメル質の層による変化は、系統発生を反映する。そして種の特徴は、発生学的にエナメル質深層に出現し、エナメル質全体に及ぶ。つまり新形質は形成初期に現れることを示している。
- k) 齧歯類はラット、マウスでは交叉型だが他の種類では非常に複雑な多様性を示す。
- l) エナメル小柱は、太さ、断面の形、ねじれ(Torsional motion)などの変化がある。

(5) エナメル小柱の形態変化(断面形、大きさ、配列、走行)(Fig.6c)

① エナメル小柱の配列

- a. 斜めの配列(階段状配列)はアーチ型ないし弧門形(オタマジャクシ形, シャモジ形), 角張った(一部六角形)で直径約5 $\mu\text{m}$ くらいが多い, 霊長類や長鼻類など植物食のバクなどにも認められる。オタマジャクシの尾に当たるところが小柱間質(小柱間エナメル質)となる。
- b. 平行配列するのは主に楕円形のエナメル小柱で, 直径2-3 $\mu\text{m}$ , 植物食の有蹄類に動物に多い。小柱間エナメル質は平行なエナメル小柱の畝を挟むシート状を呈する。
- c. 交叉配列は直径約2-4 $\mu\text{m}$ で齧歯類に特有である。小柱間エナメル質はエナメル小柱の間を埋める。
- d. 不規則配列は円形や様々な形で直径1 $\mu\text{m}$ から7ないし8 $\mu\text{m}$ になることもある。円形のエナメル小柱の間を埋めるのが小柱間エナメル質である。細管エナメル質やシュレーゲル条が無い動物に多い。以上が一般的な特徴である。

円形のエナメル小柱も斜めの配列や平衡配列をすることがある。歯冠の部位やエナメル小柱の彎曲の具合によるものである。そのためこのような配列が比較的安定した形質を示すのはエナメル質の中層領域であり種の特徴的形質が現れることが

多い(Boyde, 1965)。

② エナメル小柱の大きさ, 形と配列, シュレーゲル条の形態との関連。

- a. 楕円形で小型円形3ミクロン以下のエナメル小柱はわずかにS字状を描く明瞭なシュレーゲル条の有蹄類に多い型であり, 平行配列する。
- b. 角張ったエナメル小柱は食肉類に多く, 角張った曲線を描くシュレーゲル条に多い。
- c. 半円形, 弧門形(オタマジャクシ形, シャモジ形)のエナメル小柱は霊長類などに多く, 咬頭頂に凹彎する独特のシュレーゲル条に多い。
- d. 結晶配列はエナメル小柱がその長軸方向, 小柱間エナメル質はエナメル小柱に対してほぼ斜めから垂直方向となる。また同じ方向となることもある。それ故結晶配列は, オタマジャクシ形の尾とエナメル小柱の間は徐々に移行するが, 平行配列の場合は両者で明瞭に別れる。

e. エナメル質の表面近くになるとエナメル小柱はどの種類もほぼ円形, 大型(6-7 $\mu\text{m}$ )又は極端な小型(1-2 $\mu\text{m}$ )となり, エナメル質の表面にほぼ垂直にエナメル小柱が配列し, エナメル小柱も小柱間エナメル質も結晶配列がエナメル質の表面に対してほぼ垂直方向に配列する。この領域は光学顕微鏡的にエナメル小柱が認められないことがあり, 無小柱エナメル質と呼ばれることがある。

③ エナメル小柱の大きさと配列, エナメル芽細胞の形態

エナメル芽細胞の大きさを比較した論文は少ない(Skobe *et al.*, 1981)が, ほぼどのような動物に於いてもエナメル芽細胞は成熟期には太さが約5 $\mu\text{m}$ である。半円形, オタマジャクシ形のエナメル小柱のエナメル芽細胞は約5 $\mu\text{m}$ 長さが40-50 $\mu\text{m}$ である。小型のエナメル小柱で規則的配列を示す有蹄類や齧歯類では太さは変わらないが丈が60-70 $\mu\text{m}$ になる。現生の長鼻類のエナメル芽細胞の太さは7-8 $\mu\text{m}$ で約50 $\mu\text{m}$ の長さをもつ。このようなエナメル小柱の配列とシュレーゲル条の型を系統的にまとめると Fig.6c の如くなる。

\*以上のことからデスマスティルスは植物食で細長いエナメル芽細胞をもつという姿が浮かび上がる。2 $\mu\text{m}$ 弱のエナメル小柱が平行配列しS字状のシュレーゲル条と厚いエナメル質, 複雑な咬頭に発達するのは植物食以外無いからである。植物食の動物ではこれ以外の形態を持つ動物もいるが, この形態を持つ動物で植物食以外の例外はいない。この特徴は植物食の動物(有蹄類の一部)の種特異性というべき特徴である。歯学的ないし

組織学的にこの事実が覆る時改めてデスマスチルスの食性が問題となるであろう。

#### (6) エナメル質組織進化からの仮説 (Fig.7)

(1)~(5)の事実から次のような仮説を引き出すことができる。

- ① エナメル芽細胞は周期的に機能と形態を変える (Rhythm)。
- ② エナメル芽細胞は撓れ、彎曲などの運動をしつつエナメル質を形成する (Torsional motion)。
- ③ エナメル芽細胞は集合を作る (Grouping)。
- ④ エナメル芽細胞はグループで運動をする (Dancing)。
- ⑤ 種の特徴となる新形質はエナメル質組織発生の初期 (エナメル質の深層) に現れ、エナメル質全体に波及する。

エナメル芽細胞が集団となつてうねるような動きを仮説として提案したのは Osborn (1968; 1970) である。彼は、少しずつエナメル質を研磨してエナメル小柱の走向配列の二次元復元図をつくりあげ、この仮説を提案したものである。本論もほぼ同様の結論に達している。つまりエナメル芽細胞は個別にも集合状態でもそれぞれの動きを示しつつエナメル質を形成するのである。これを証明するためには一つにはエナメル芽細胞の集合とエナメル質のシュレーゲル条が一致すること、エナメル質組織発生において細胞が集合し運動することの2点を明らかにする必要がある。筆者は以上の Rhythm, Torsional motion, Grouping と Dancing をまとめて 'Grouping and Dancing' と呼ぶことにしている (Kozawa *et al.*, 1999)。

#### 3) エナメル質組織と組織発生

##### (1) ワニのエナメル質組織発生にみる Grouping and Dancing の起源

材料はミシシッピーワニ (*Alligator mississippiensis*) とメガネカイマン (*Caiman crocodilus*) を用いた。顎骨のまま10%ホルマリン溶液 (PH7.4リン酸緩衝液) にて固定したのち10%ギ酸脱灰し十分に水洗、脱水してパラフィン包埋し薄切、ヘマトキシリン・エオジン重染色を施した試料を光学顕微鏡で観察した。電子顕微鏡用の試料は2%グルタルアルデヒド (PH7.0カコジル酸緩衝液) を用いて固定後 EDTA にて脱灰し、緩衝液で洗浄後脱水、エポキシ樹脂包埋して超薄切片をつくり観察したものである。

ワニのエナメル質は一部エナメル小柱があるが殆ど無小柱エナメル質であり、そこにエナメル芽細胞の Grouping and Dancing が認められるかどうかの問題である。

エナメル質形成初期の *A. mississippiensis* および *C. crocodillus* の歯胚でエナメル質組織発生を観察すると、エナメル質形成はヨレヨレのリボン状結晶が象牙質の表面の所々に沈着することから始まる (Kozawa *et al.*, 1999; 2001a) (Figs.8a, b)。島状に沈着したエナメル質塊が成長し (Fig.8c) エナメル質全体が水平になる程度形成される時期になると、結晶は形成面つまりエナメル芽細胞の平滑な分泌面に向かってほぼ垂直配列するが、個々の結晶は必ずしも規則的配列ではない (Fig.8d)。

エナメル質がある程度厚くなると、エナメル質形成面は緩いカーブを描き、成長線と一致する。これはある程度成長速度の同じエナメル芽細胞が結晶集団を形成することを示すものである。つまり、結晶が一定程度まとまりのある集団 (結晶単位) となり集団の境界においては結晶の配向が急激に変化する裂溝となる。エナメル芽細胞の集団と結晶単位はほぼ対応しているが、必ずしも裂溝の位置で細胞が境されるわけではない。裂溝を跨ぐ細胞もある (Fig.8e)。

これは結晶単位がある程度の集合 (Grouping) のエナメル芽細胞によって形成されること、エナメル芽細胞が比較的自由に動くこと、つまり仮説で示したエナメル芽細胞の3タイプの動きの可能性を示しているものと考えられる。しかし、これではまだ不十分であり、エナメル小柱のような細胞に対応する構造がない無小柱エナメル質のエナメル芽細胞の動き、Grouping and Dancing を十分に証明するためにはさらにデータを重ねる必要がある。

##### (2) Grouping and Dancing の分化およびエナメル質構造と細胞・組織の直接的な関係

エナメル質組織発生の形態学的研究に於ける最大の障害はエナメル質が高度 (ヒトの永久歯では約96%が無機質) に石灰化している点である。硬組織を研究する時には軟組織を除去せねばならず、軟組織を研究する場合には脱灰して無機質を除去しなければならない。そのうえエナメル質では無機質が極少量のため、無機質を除去すると有機成分が溶失するか構造を失うため、組織学的研究は更に困難を伴う。それでも細胞レベルでは、非脱灰の標本を薄切する技術を研鑽して何とかクリアすることができるが、これまでの組織レベルの研究は、極論するならば、軟組織と硬組織を別々に研究し、両者を組み合わせたうえに於ける推定という域を出ていない。

エナメル質のエナメル芽細胞とエナメル小柱の対応関係は2の(1)エナメル質の石灰化機構で記した如く、これまでの研究 (Wakita and Kobayashi, 1983) でほぼ確立されてきていると考えられるが、組織学レベ

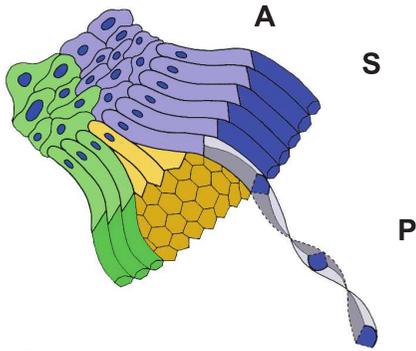


Fig.7

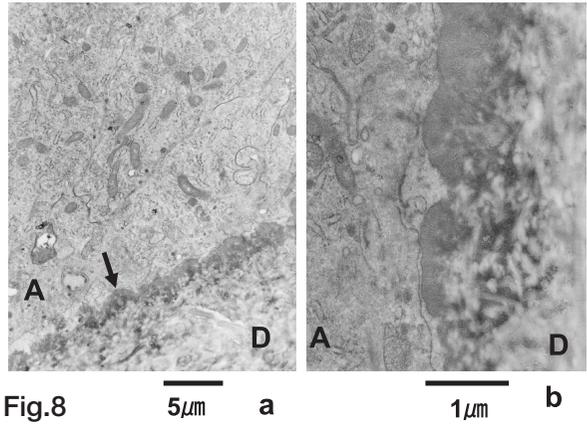


Fig.8

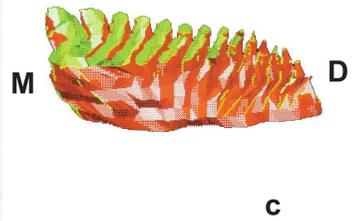
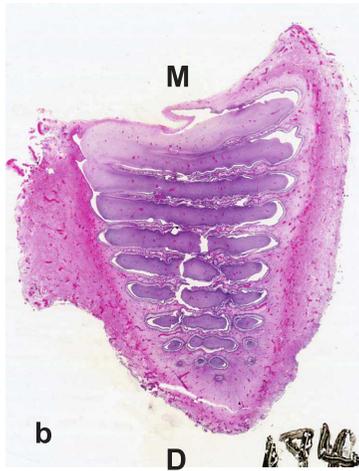
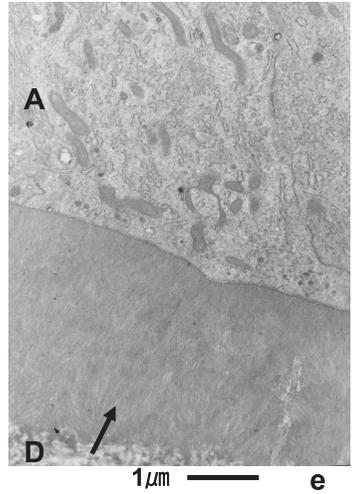
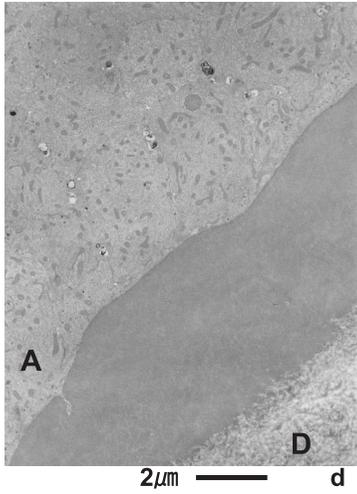
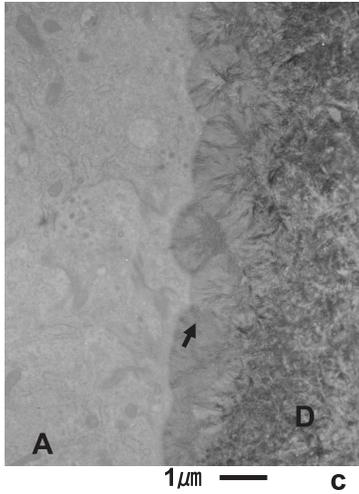


Fig.9

ルのシュレーゲル条とそれを形成する細胞集団の直接的対応の立証がなされていない。本論もこれを乗り越えているわけではないが、先達の残した素晴らしい標本によってある程度硬組織と軟組織の統一を克服することができた。素晴らしいという意味は、エナメル質、象牙質、セメント質、歯髄、歯周組織という硬度も組織も異なる歯に於いて数十 $\mu\text{m}$ という厚さで湾曲、皺などが無い、しかも数センチ台の大きさの切片標本と作り得る技術による切片という意味である。現在ではこのような標本作製できる技術はまず世界的にもあり得ない状況である。この観察の結果を以下に述べる。

### ① 試料

本研究にはインドゾウの臼歯1個と2種類の歯胚を用いた。

#### 臼歯試料

臼歯からエナメル質の水平面、矢状面、接線面の研磨面をつくった。ダイヤモンドペーストで鏡面仕上げをし、0.5% HCl で30秒エッチングした。水洗し、乾燥させ Au を蒸着し、光顕と SEM で観察した。

#### 歯胚試料1 (Fig.9)

石灰化前の2個のインドゾウ臼歯歯胚を用いた(小澤, 1978)。この試料は長さ約2.5cmで内外エナメル上皮の褶曲による16枚の咬板状構造を持つ。この形態は三次元復元され(Kozawa, 2001b; Yokota, 2006)、咬板状構造の数から第3臼歯と推定されたものである。歯胚は8 $\mu\text{m}$ の連続切片にし、ヘマトキシリン・エオジン(H・E)重染色とマッソン・ゴールドナー染色を施した。

#### 歯胚試料2 (Fig.10)

歯冠長さ8cm、高さ5cmの13の咬頭を持つインドゾウ臼歯歯胚の矢状断切片である。切片の厚さは約50 $\mu\text{m}$ 、ヘマトキシリン・エオジン重染色された切片である。咬板数から第2臼歯と推定される(Ijiri *et al.*, 1949; Tasumi, 1964)。歯胚の咬板は、近心側11の咬板でエナメル質、象牙質が石灰化していた。12番目の咬板は象牙質のみ石灰化し、13番目は石灰化前であった。

### ② エナメル質の構造からの Grouping and Dancing 様式の推定

研磨面：水平型と矢状断面及び接線断面において観察すると、シュレーゲル条は内層では不規則型だが、中～外層ではやや規則的に水平型に変化することが確認できる(Fig.11)。接線断面では、シュレーゲル条はエナメル象牙境近くではエナメル小柱が渦を巻き、不規則な大きさと形の島状となる。エナメル質中層になるとシュレーゲル条はより不規則になるが、外層では規則的な水平の帯状の型となる。エナメル質の表層は歯冠セメント質の発達によって凸凹となる。

以上の構造等から、エナメル芽細胞の Grouping and Dancing は、小さな渦巻状として動き、シュレーゲル条の帯を形成するものと推定できる。とくにエナメル象牙境近くでは島状のエナメル小柱を形成するようにエナメル芽細胞が渦巻状に配列し動くものと推定される。

### ③ Grouping and Dancing の分化 試料1

エナメル器は、内外エナメル上皮が褶曲して咬板状(咬板とよぶ)の形態を示す(Fig.9)。咬板構造は16

Fig.7 The Hypothesis of ameloblast 'Grouping and Dancing'

The ameloblast forms groups and its motion of the dancing develops Schreger bands. The torsional motion forms spiral rotation of enamel prisms. The Tomes process changes rhythmical the shape, resulting always changes the shape of enamel prism size and form.

A : ameloblast, S : grouped enamel prism, Schreger band, P : enamel prism

Fig.8 Development of alligator crystal unit

- Initial crystal units deposit on the dentine surface as the island form (arrow).
- The crystallites arrange irregular in the initial crystal unit.
- The crystal unit develops in various sizes. The fissure (arrow) borders crystal units.
- The enamel surface shows slightly smooth at the later developed stage.
- The fissure (arrow) independent to the boundary of ameloblasts.

(b : Kozawa *et al.*, 2001a, c : Kozawa *et al.*, 1999)

Fig.9 Sample 1 of Indian elephant molar tooth germ

- A sagittal section has about 16 of lamella like structures.
- A horizontal section shows the lamella arises as the digital like forms.
- 3-D reconstruction of Sample 1.

M : medial, D : distal (a, c : Yokota, 2006)



Fig.10 5cm

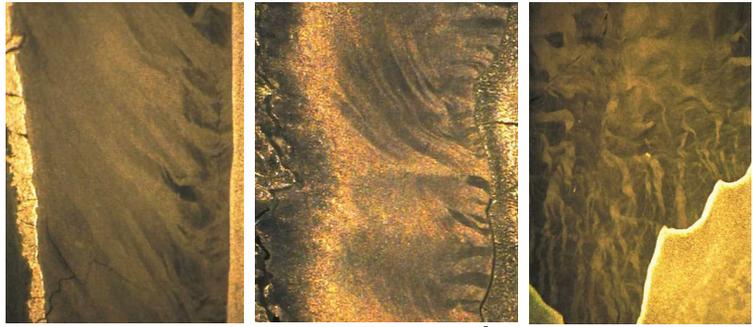


Fig.11 a b c

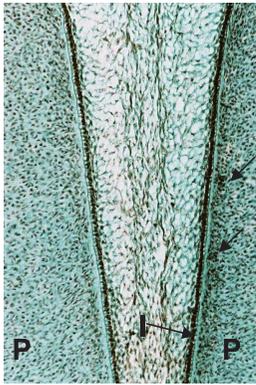
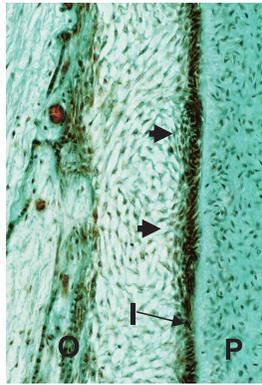


Fig.12 a



b

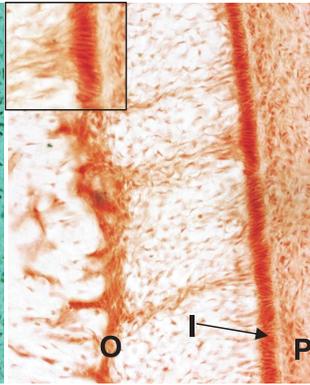


Fig.13

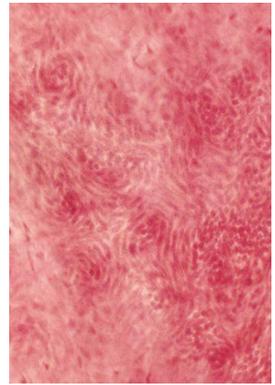


Fig.14

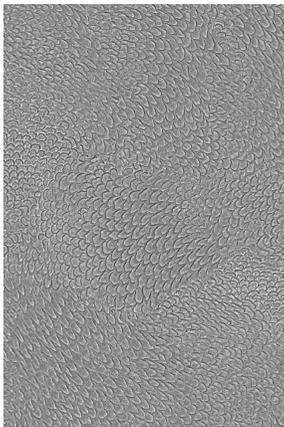


Fig.15 50µm

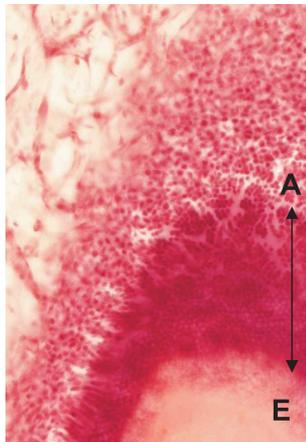
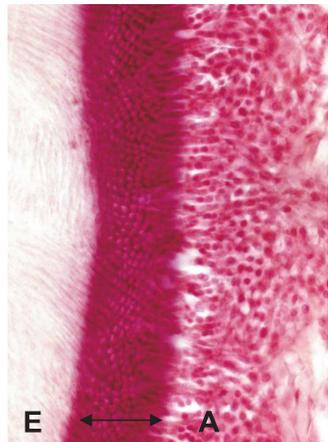


Fig.16 a



b

枚あり、第3臼歯を示すものである。エナメル器は星状網と中間層を持つ時期であるが、咬板の谷の底（下部）ではより未分化で、頂き（上部）では分化が進んでいる。内・外エナメル上皮細胞は咬板の上部ではやや円柱形だが、他の部位は立方形で核が細胞質の中央に位置し、まだ未分化な支配の状態である。

遠位の咬板の谷底近くの歯乳頭細胞は内エナメル上皮下において部分的に集積し塊を形成する (Fig.12 a)。同様の領域で未分化な立方形の内エナメル上皮細胞は一列となって配列するが、細胞のいくつかは集合をつくり様々な向きをもつ位置配列を示すことが認められる。歯乳頭細胞の塊はこの領域では確認できないため、分化が進むと消失するものと推定される。咬板の中央領域においては、方向の違う配列をする内エナメル上皮細胞の集合の外側に中間層細胞が集積した集合を示す。これは接線面切片でより明瞭に確認される (Fig.12b)。

分化がより進んだ領域では、中間層細胞の集積が大きくなり、エナメル索がエナメル髓の中に出現し、やがて外エナメル上皮に達するエナメル索となる。エナメル髓の細胞もまた集団化し全体として異なる方向に位置、配列する (Fig.12b)。

以上は、細胞の集団化が歯乳頭の細胞に出現し、次

に内エナメル上皮が集団化して、中間層、エナメル索と連携が拡大し、最終的には外エナメル上皮～内エナメル上皮の集団化となることを示している。様々な大きさのエナメル芽細胞のグループはエナメル索によって外エナメル上皮と連携し、エナメル器としての集団となっていることを示すものである。この集団化現象は未分化な時期に、しかも歯乳頭領域に萌芽するものと推定される。この分化によって中間層とエナメル索が Grouping and Dancing に関与することも明らかとなった。

④ エナメル質構造と細胞組織の直接的な関係 試料2  
遠心の未石灰化領域では、内エナメル上皮の集団が中間層と密に連繋し、エナメル索を介して外エナメル上皮まで結びついている (Fig.13)。よってエナメル芽細胞の方向と中間層細胞の強い連結状態があることが推定される (Fig.13の囲み)。

このような分化時期のエナメル芽細胞の接線断面を観察するとエナメル芽細胞が様々な大きさの渦巻状の集合となって配列する (Fig.14)。これはまだ未石灰化の時期であるが石灰化した深層エナメル質の島状のエナメル小柱の配列と一致している (Fig.15)。この配列と同様の状態の所見を Boyde (1969) は、形成

Fig.10 Sample 2 of Indian molar tooth germ (Yokota, 2006)

Fig.11 Ground surface of Indian molar enamel

- a. Sagittal surface
- b. Horizontal surface
- c. Tangential surface  
(Right side is the dentine)

Fig.12 Development of 'Grouping' in Sample 1

- a. Clusters (arrow) of the dental papilla cells are observed just under the inner enamel epithelium.
- b. Stratum intermedium cells accumulate on the groups of inner enamel epithelium cells (arrow heads).  
P: dental papilla, I: inner enamel epithelium, O: outer enamel epithelium  
(a: Yokota, 2006)

Fig.13 The groups of inner enamel epithelium cells relates to the outer enamel epithelium through the enamel cord and stratum intermedium cells. A square shows a cluster of stratum intermedium cells and the enamel cord closely relates with the inner enamel epithelium (ameloblast).

P: dental papilla, I: inner enamel epithelium, O: outer enamel epithelium

Fig.14 The arrangement of inner enamel epithelium cells (ameloblasts) shows the swirling shape similar to the enamel prisms in Schreger band (Fig.15).

Fig.15 Tangential surface of the Indian molar enamel

The swirling of enamel prisms in the inner enamel layer of Sample 2 (Yokota, 2006)

Fig.16 Relationship between the groups of ameloblast (enamel organ) and Schreger bands

It is possible to observe both the enamel (E) and the enamel organ (ameloblast, A) of double layers (arrow zone) in a specimen, because it is almost tangential against the enamel and the ameloblast about 50 or more thick section.

- a. Ameloblasts (A) and enamel organ cells (the stratum intermedium and the outer enamel epithelium) forms clusters on the developing enamel (arrow).
- b. Each of Schreger band in the enamel (E) pores into a group of the arranged enamel prisms (arrow, Double zone), which is also the aggregation of Tomes processes of ameloblasts (A) in a part of clustered cells in the enamel organ. Thus, the group of ameloblast (enamel organ) corresponds to the Schreger band to each other is proven with observations in this section.  
E: enamel, A: ameloblast

中のエナメル質表面に形成されるトームス突起の小窩の向きから推定している。以上は Grouping のみではなく Dancing も未石灰化の内エナメル上皮ないしエナメル芽細胞で起こることを示すとともに、エナメル索、中間層細胞がこのような動きに関与していることを示すものである。

エナメル質の基質形成が開始すると、有機質が多いため脱灰してもエナメル質基質が残りエナメル小柱とその集合であるシュレーゲル条の形態が認められる (Fig.16)。その表面 (エナメル質形成面) で、エナメル芽細胞は様々な集合をつくる。分化が進んだためエナメル髓の細胞空隙が失われ、集合は外エナメル上皮から中間層、エナメル芽細胞まで細胞同士が密着する。この外エナメル上皮から中間層、エナメル芽細胞、つまりエナメル器を形成する細胞は様々な大きさの集合をなすことが認められる (Fig.16a)。本標本は約50 $\mu$ m 近い厚切りの切片であるため、エナメル質基質とエナメル器が斜断されている領域では、同時に二層となった両者を観察することができる。このような観察領域ではエナメル芽細胞集団がシュレーゲル条と一致する。つまり、エナメル器の各細胞集団はシュレーゲル条の帯と一致している (Fig.16b)。

以上は、シュレーゲル条はエナメル芽細胞の動きのみによって形成されるものではなく、エナメル器全体の動態によってエナメル芽細胞の Grouping and Dancing が生ずることを示している。

### (3) 免疫組織化学による Grouping and Dancing の立証

免疫組織学的染色の抗体は、エナメル芽細胞が集団を形成するための接着要因、エナメル小柱の形を造りだすためのエナメル芽細胞やトームスの突起の形態を維持する要因、エナメル芽細胞の分泌、吸収機構に関与する要因、エナメル小柱の変化に富む配列や走向を生み出すためにエナメル芽細胞が運動するための要因などを考慮して選んだものである。さらに比較的普遍的に使われ安定した染色が期待できる抗体でもあるアクチン、ケラチン、チュブリン、デスモプラキニンに対する抗体を用いて検討した。

#### ① 材料と方法

生後約1ヶ月、体重1.2kgの幼犬 (*Canis familiaris*) 3頭 (日本大学松戸歯学部動物倫理委員会 承認番号 第ECA-02-0004号) を用い、エーテル吸入麻酔後、ネブタールの腹腔麻酔下において、4%パラホルムアルデヒド固定液 (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4) による灌流固定を行ったものである。固定後、臼歯歯胚を摘出し、同固定液にて4℃で一晩後固定を施し、10%EDTA-2Na 溶液 (pH7.4, 4℃) で約3ヶ

月間脱灰したものである。試料の一部はアルコール系列で脱水後、パラフィン包埋し、厚さ4 $\mu$ mの切片を作製してヘマトキシリン・エオジン (H・E) 重染色及び各種免疫組織学的染色を施したものである。

#### ② 免疫組織学的染色

作製した切片を脱パラし、水洗後、抗原賦活処理として、クエン酸緩衝液 (pH6.0) にてマイクロウェーブ処理 (95℃, 10分) を施した。水洗、PBS洗浄後、3%過酸化水素水にて内因性パーオキシダーゼのブロッキングを10分行い、PBS洗浄後、10%ヤギ血清で非特異反応のブロッキングを10分行った。一次抗体は mouse monoclonal antibody Keratin 14 Ab-1 (Clone LL002) (1:100希釈, Neo Markers Inc., CA, USA), rabbit polyclonal antibody P・E・N-Cadherin (1:500希釈, TaKaRa BIOMEDICALS, Tokyo) をそれぞれ60分反応させた。PBS洗浄後、二次抗体に ENVISION+ポリマー試薬/パーオキシダーゼ標識 (マウス一次抗体用, ウサギ一次抗体用) (ダコ・サイトメーション株式会社, 東京) をそれぞれ60分反応させた。PBS洗浄後、DABにて発色、核染色を施し、封入後観察した。

#### 蛍光抗体法による免疫組織学的染色

試料を凍結し、クリオスタットで厚さ20 $\mu$ mの臼歯歯冠の縦断切片及び接線断面の切片を作製した。切片を乾燥・水洗後、PBSで洗浄し、0.1%triton X-100処理を10分間、PBSで洗浄後、1%ウシ血清アルブミン (BSA) 処理を10分施した。抗体は mouse monoclonal antibody Keratin14Ab-1 (Clone LL002) (1:200希釈, Neo Markers Inc., CA, USA), mouse monoclonal antibody tubulin ab-4 (Clones DM1A+DM1B) (1:100希釈, Neo Markers Inc., CA, USA), mouse monoclonal antibody Desmoplakin1&2 (ready to use, PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany) を用い、二次抗体は FITC 標識抗マウスイムノグロブリン・ウサギポリクローナル抗体 (ダコ・サイトメーション株式会社, 東京) を用いた。また、抗keratin抗体との二重染色および抗actin抗体による単染色にはF-actinに特異的に結合する rodamine-labeled phalloidin (1:200希釈, Molecular Probes Inc., OR, USA) を用い、暗所にて60分反応後、PBSで洗浄、封入した。

陽性コントロールには、上皮から筋組織までを含む舌組織、陰性コントロールには各一次抗体のかわりに抗体希釈液を用いた。その後、蛍光顕微鏡 (PROVIS AX80, OLYMPUS 社, 東京) で観察、顕微鏡用デジタル CCD カメラシステム (ORCA-ER-SET, 浜松ホ

トニクス株式会社, 浜松) を用いて撮影した。

### ③ 結果と検討

#### シュレーゲル条とエナメル芽細胞の集団の一致

アクチンはエナメル芽細胞周辺部に反応するため厚い標本では細胞の方向がある程度分かる。エナメル器の縦断面において斜めに切断されたエナメル芽細胞のアクチンを観察すると水平方向の集団が認められる (Fig.17a)。イヌの臼歯エナメル質の典型的なシュレーゲル条 (Fig.17b) に比較してやや規則性は少ないが、それでも明らかにシュレーゲル条の集団配列形態を示している。この不規則性はエナメル質の深層～中層領域 (比較的不規則なシュレーゲル条の領域) のエナメル芽細胞であることによると推定できる。しかし、エナメル芽細胞の一部はアクチンの反応が弱い、認められない (Fig.17c)。

#### エナメル芽細胞の集団の深層から表層への変化とシュレーゲル条との一致

エナメル器を接線方向に切断すると、深層領域から表層近くまでの領域を形成しているエナメル芽細胞が一括して観察することができる (Fig.18a)。アクチンをこの方法で観察すると深層領域ではある程度のエナメル芽細胞の集団が所々に認められるのみである。これが中層に近くなるとやや水平の集団となり、さらに表層近くに至るとジグザグな集合となる。この形態は完成エナメル質のシュレーゲル条の深層から表層への変化とよく一致する (Figs.18b, c)。

つまりエナメル質組織発生過程でエナメル芽細胞が集団化し、集団の形態が島状から水平方向の集団へさらにジグザグへと変化する。この変化は、Stephan and Rensberger (1995), Stefen (1997) によって明らかにされているハイエナのエナメル質のシュレーゲル条と一致するため、イヌ科の特徴とも考えられる。

#### アクチンの局在のと細胞運動の違い、周期性、トームス突起との関係

アクチンの分布はエナメル器全体に陽性ではなく、反応しない細胞集団も認められる。細胞体が反応しない場合もあり、トームス突起が反応しない集団もある (Figs.16a, c, 19)。HE 染色で観察すると固定が不十分で脱落壊死を起こした細胞は殆ど認められないためアクチンの反応は細胞集団によって変化するものと考えられる (Fig.20)。トームス突起のアクチン反応は細胞膜の周囲に反応するものと中心部に反応が現れるものと、反応のないものとに分かれる。これはアクチンが運動と共に細胞接着、分泌に関与していることを

示すものである (Figs.17, 19)。

ケラチンの局在の陽性と陰性の領域とトームス突起の形態と細胞の配列、細胞運動の違い、周期性

ケラチンの反応は当初 (エナメル髓がある領域では) 外エナメル上皮に局在するが、分化が進みエナメル質形成が始まりエナメル髓がなくなり外エナメル上皮とエナメル芽細胞が中間層を介して一体となると比較的エナメル器全体 (全層) に認められる (Fig.19 a)。トームス突起の形態は角張ったやや六角形をなして平衡に配列する。これはエナメル小柱の断面形態と配列にほぼ一致する。つまり、ケラチンの作用の一つには、エナメル器の外形、トームス突起の形を含む細胞の外形維持に働いているものと考えられる。

ここに用いたケラチン14は表皮の基底層など比較的分化の進んでいない領域に反応するものであり、エナメル器のケラチンは分化の低い細胞のままのようである。つまりこのケラチンは、形を維持するが、ある程度柔らかな可動性のある組織を形成する、というものである。分化途中のエナメル器は柔らかくある程度の可動性がある組織である。それだからこそ大きく発生分化するものと考えられる。

#### アクチンとケラチンの局在の違いと細胞機能の周期性

基質形成期になると、エナメル芽細胞、中間層、外エナメル上皮は細胞相互が密着する。外エナメル上皮細胞は部分的に立方形となりエナメル器から突出する (Fig.19)。

HE 染色によってエナメル器の接線断面を観察すると、中間層細胞が集団をなして各集団ごとに水平方向へ互い違いの配列をしている (Fig.20)。この集団は外エナメル上皮の突出部位と一致するものとしいないものがある。つまりエナメル器が外エナメル上皮からエナメル芽細胞まで一体となって集団を形成し運動することを推定させる形態である。Wakita *et al.* (1990) がこれを報告したが誰も感心を示さなかったものである。

ケラチンとアクチンを二重染色すると、アクチンが陽性な細胞集団とケラチンの陽性な細胞集団、両者が混在する領域に分かれる (Fig.19c)。外エナメル上皮が突出した部分は主にケラチンに反応を示す細胞群である。これはアクチンが細胞の運動を示すものであるならば、動きが少ない細胞 (ケラチン陽性細胞) と動く細胞 (アクチン陽性細胞) とがあることを示す。両者が混在することはアクチンとケラチンが周期的に変化することを示す。すなわち運動に周期性があることを示す。



Fig.17

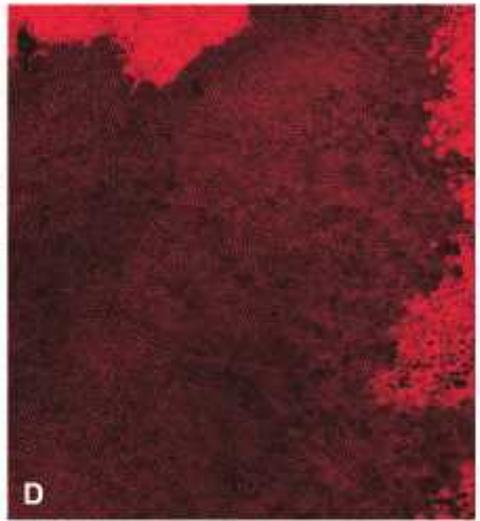
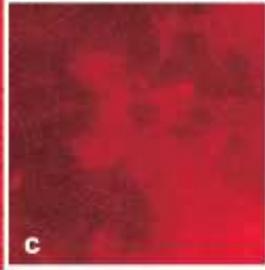
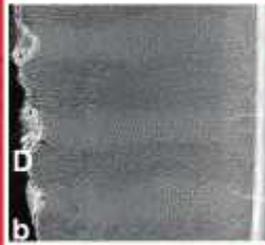


Fig.18 a

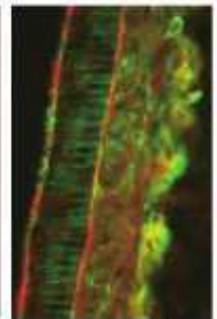
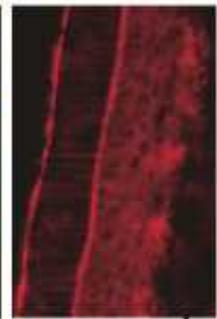
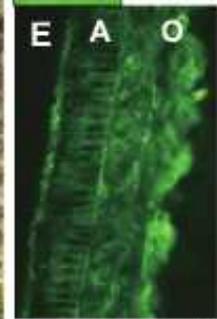
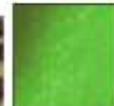


Fig.19

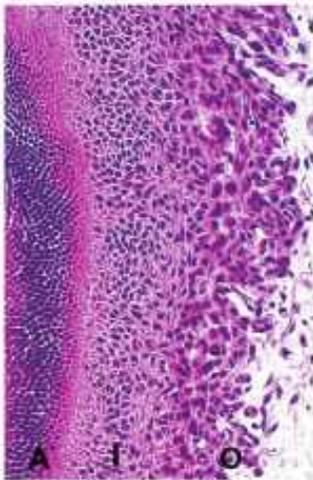


Fig.20

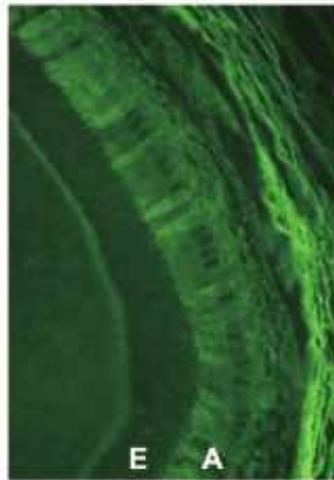


Fig.21

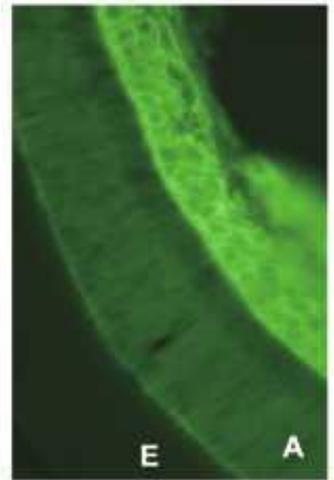


Fig.22

デスマブラキンの中間層から外エナメル上皮までの細胞接着 (Fig.21)

デスマブラキンはエナメル芽細胞をのぞき中間層細胞から外エナメル上皮にまんべんなく反応が現れている。これはエナメル芽細胞の中間層側の細胞膜から中間層, 外エナメル上皮にかけてのデスマゾームの発達が電子顕微鏡的に確認された結果とよく一致する (大見謝・岩佐, 2002)。つまり, この領域の細胞間の結合が強いことを示す。別の見方をすればエナメル芽細胞は中間層側とは結合が強く, そこから先の領域は比較的自由に動き得ることを示している。つまり, 中間層側の細胞膜を基点として細胞体同士は離れたりまた接触したりとの動きが可能であることを示している。

チュブリン (Fig.22)

反応する細胞でも分泌側と中間層側の閉鎖堤の各領域は反応しない。つまり微細管の局在と一致する (大見謝・岩佐, 2002)。トームス突起も反応するものとししないものが認められる。つまり, チュブリンは分泌に関与すること, また分泌に周期があることをも示している。これは細胞学的に周期的にトームス突起内の細胞小器官が変化する結果とも一致する。(小澤, 1996)

以上の結果から次のことが明らかとなる。

a. シュレーゲル条とアクチンの反応集団が一致する

ことは, エナメル芽細胞の細胞集団 (Grouping) がシュレーゲル条を形成する。

- b. 細胞集団はエナメル質組織発生過程で変化する。
- c. ケラチンとアクチンの反応はエナメル芽細胞のみならず中間層から外エナメル上皮までの集合である。つまりエナメル器全体に集合 Grouping と動き Dancing がある。
- d. アクチンの反応のない細胞集団が認められること, アクチンとケラチンの反応領域が異なることは両者の発現に周期性があること, つまり動きがある集団とないか少ない集団があることを示す。
- e. デスマブラキンの反応は外エナメル上皮から中間層細胞, エナメル芽細胞の中間層側の細胞膜までの一体となった結合を示す。つまり, エナメル芽細胞は中間層側の細胞膜以外の遠位側は可動性がある。
- f. ケラチンはある程度の可動性があるエナメル器全体やエナメル芽細胞などの形態維持に働く。
- g. トームス突起のアクチンやケラチンの反応は, トームス突起がエナメル小柱の形と関与すること周期的に変化することを示す。
- h. トームス突起のチュブリンやアクチンの反応はトームス突起の形態変化のみではなく分泌周期などもしめす。
- i. エナメル芽細胞の細胞体とトームス突起の動き Torsional motion はエナメル小柱の捻れ太さの違い, 分泌周期性は成長線に関与する。

Fig.17 Anti-actin reaction of Sagittal section of the ameloblast layer and Schreger bands in the dog tooth germ

- a. The arrangement of ameloblast cell bodies(A) show similar to the Schreger bands(b). Some Tomes processes do not show anti-actin reaction (arrows).
- b. Schreger bands by SEM.  
(b: Kikuti *et al.*, 2002)
- c. Some ameloblasts has not the anti-actin reaction.

Fig.18 Histogenesis of Schreger band

- a. The ameloblast group pattern changes from island to horizontal and zigzag types in the Sagittal section of ameloblasts.(Anti-actin reaction)
- b. Developing enamel shows the same group transitional pattern as a.
- c. The pattern of Schreger band changes from island (inner enamel layer), horizontal (middle enamel layer) and zigzag (outer enamel layer) types in the mature enamel same as the ameloblast groups(a).  
D: Dentine side

Fig.19 Localization of Anti-actin and Anti-keratin(Cytokeratin 14) on the Sagittal section

- a. Anti-keratin reaction, and square shows Tomes process on tangential face.
- b. Anti-actin reaction
- c. Double staining of Anti-actin and Anti-keratin. These differentiate localization shows the rhythmic changing, which suggests the periodic movement of the enamel organ and ameloblast groups.  
(Yokota *et al.*, 2005)

Fig.20 Tangential section of the enamel organ staining by H・E

The enamel organ associates many clusters of cells from the outer enamel epithelium to the stratum intermedium. There are no cell debris suggesting the no reaction of Actin and Keratin.

Fig.21 Anti-tubulin reaction

Some ameloblast does not show Anti-tubulin reactions, suggesting rhythmic secretion by the ameloblasts.

Fig.22 Anti-desmoplakin reaction

The desmoplakin reaction localizes from the outer enamel epithelium to the base of ameloblast. This area fixes by the desmosome.

#### ④ 結論

以上の点から次の点が結論される。

- a. 外エナメル上皮を支点とするエナメル器全体の律動的で周期的な動きの基に、エナメル芽細胞の集合と集団の動き即ち Grouping が行なわれシュレーゲル条を形成する。
- b. Grouping に基づいたエナメル芽細胞とトームスの突起の周期的動き、即ち Dancing と Torsional motion とによってエナメル小柱の彎曲やねじれる走向、配列が形成される。
- c. 基質形成期初期にはエナメル髓が広く、Grouping と Dancing の周期性も不規則であり、島状のシュレーゲル条を形成するが、基質形成期にはエナメル髓の細胞間隙が少なくなり、規則的な周期性が明確となって帯状のシュレーゲル条を形成する。
- d. 以上の Grouping と Dancing は、わずか十数  $\mu\text{m}$  の未分化な歯胚が cm 単位の歯へ、100倍から 10,000倍へと成長する、という視野に立って理解されるものである。

#### 3. 展望

エナメル芽細胞の Dancing の仮説は Osborn (1968; 1970) によるものである。彼はエナメル質を丁寧に少しずつ研磨して克明にエナメル小柱の走行を追い三次元的な復元によって、エナメル芽細胞にエナメル質を形成するエナメル小柱集団のうねりを造りだす動き Dancing があると提案した。しかしこれは現実的仮説ではなく ideal なものである、と言う意見がほとんどのエナメル質研究者のものであったと言っても過言ではない。しかし、本論ではむしろエナメル器全体の動きに制御されたエナメル芽細胞の Grouping and Dancing がエナメル質組織形成に存在することをある程度証明できたと考えている。

ideal と考えた根拠にはエナメル質に対する固定観念があると考えられる。つまり、規則的なエナメル小柱は規則的な分泌吸収によって作られエナメル芽細胞がグニャグニャと動くことは考えられない、というものであろうか。しかし、ヒトの歯胚は当初十数  $\mu\text{m}$  以下の大きさから 1 センチもの歯冠になるのである。容積はじつに 1000 倍位の大きさになる。これはエナメル芽細胞が固定されていると仮定するにはあまりにも大きな成長である。細胞の何倍もの厚いエナメル質を形成する動きなのである。エナメル芽細胞とエナメル質を研究しているときのような成長分化の基本を見失うと思われるが、どうだろう。ゾウの臼歯になると実に 10000 万倍もの大きさに成長するため、動きが明瞭に観察されるのは当然の理屈といえる。このような標

本を観察の機会を得たという幸運もあり今回の結果を得ることが出来たものである。

しかし問題はまだ山積して、やっと山のアプローチにたどり着いたというのが実感である。この研究に関するならばまだ十分に運動を立証し尽くしていない。一番手っとり早いのはエナメル質組織形成の運動自体を観察することであり最終的にはそこまで行かなければならない。運動を起す要因、集団を形成する制御機構や分化機構等々も解明しなければならない。まだまだ道は遠い。このような細胞の集合による石灰化機構がエナメル質を形成するのである。なぜ集合形態が種によって異なるのか、エナメル質の層（発生時期）によって異なるのかという疑問は、進化の点から観るならば、そのような一定の傾向をもったものが種を構成する、と考えている。むろん種による特徴（種特異性）の要因、変異の原因は解明されなければならないが、進化というものを考えると多様性（変異性）と一定の形質を選択し（自然選択）種類が生き延びている、と考えたい。むろん定向進化を否定するものではなく、また平行進化もネオテニーも否定するものではない。

歯に於ける進化の基礎となるものが石灰化機構であり、当初に掲げた 4 点の原点でもある。つまり歯に於ける石灰化機構は、歯の組織、形、歯式（歯種）に深くつながっている、ということであり、常に相互に関与させつつ検討する必要がある。そのように考察すると歯の石灰化、歯系（Dentition）の形成は遺伝子の中に Fate Gene（予定あるいは運命遺伝子？）的なものを仮定しなければならない。運命というかとえられたものという印象が強いが、時限遺伝子のように、あるいはドミノ式に次から次へと一定の細胞が発現して歯を形成する制御機構を持った遺伝子のことである。

（この名前は発生予定域 Fate Map より借用したものである。）この遺伝子の制御機構と変異のかねあいで現れた多様性を選択するかによって進化する、と考えられる。

進化に関して歯の石灰化機構から見えてくるものは、定向進化の例はダイノテリウム類のエナメル質に認めることが出来、ネオテニーの現象はウマ類やデスマスチルス類のエナメル質組織発生の分化初期に新形質が現れやがて種の特徴になることが示されている。いまの立場はこれらが否定されるべきものではなく、多様性の一つであり、多様性が進化の本質であるというものである。進化もまた多様であってよいだろう。一つの原則にまとめ上げるにはあまりに危険すぎる。たとえば発生・変化・発展・消滅という進化の原則に挙げている動物は果たして普遍的だろうか。むしろ系統樹の側枝として消えていった生物が圧倒的に多いの

である。側枝が普遍的だといえるだろう。その意味でも上記の進化の原則は非常に狭い意味での進化の原則である（法則の限界が非常に狭い）と言わざるを得ない。このような観点からも石灰化を検討する必要がある。

#### 謝辞

本論を進めるにあたり化石研究会で発表する機会を与えていただいた佐俣哲郎氏とスタッフの皆さん、資料の供与をいただいた故井尻正二氏と長鼻類団体グループその他の諸氏、ワニの研究を支えてくださっている Ruth, M. Elsey 氏 (Rockefeller Wildlife Refuge), そして成果の一部は当教室のスタッフと大学院生のものである。本研究は以上の方々のご厚意とご指導によるものである。最近の10年間は日本大学松戸歯学部 of 文部科学省平成10年度学術フロンティア推進事業、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業、文部科学省平成15年度学術フロンティア推進事業（継続分）、日本学術振興会科学研究費助成金（基盤研究(C)(2)No. 16591840）によるものである。ここに厚く深謝する次第である。

#### 引用文献

Boyde, A. (1965) The structure of developing mammalian dental enamel. In: Stack, M.V. and Fearnhead, R. W. (eds.) *Tooth Enamel*, pp.163-167, John Wright & Sons Ltd., Bristol.

Boyde, A. (1969) Electron microscopic observations relating to the nature and development of prism decussation in mammalian dental enamel. *Bull. Group Int. Rech. Sci. Stomatol. Odontol.* **12**, 151-207.

千坂英輝 (2004) 両生類アフリカツメガエルにおけるエナメル質の形成と構造に関する研究－歯冠エナメル質形成の比較研究－. *日大口腔科学* **30**, 45-75.

Cooper, J.S. and Poole, D.F.G. (1973) The dentition and dental tissues of the agamid lizard. *Uromastix. J. Zool. London* **169**, 85-100.

Höling, H.J. (1989) Special aspects of biomineralization of dental tissues. In: Berkovitz, B.S.K. Boyde, A. Frank, R.M. et al. (eds.) *Teeth, Handbook of Microscopic Anatomy*, vol. 6, pp.495-524, Springer-Verlag, London.

一條 尚 (1995) 歯と骨の結晶構造, 医歯薬出版, 東京.

Ijiri, S., Sukanuma, O. and Kawai, N. (1949) Anatomical illustration of the elephant's head-especially, on the anatomy of *Os sacculi dentis*-. *Bull. Tokyo Sci. Mus.* **24**, 1-7.

Takei, M., Nakahara, H., Kumegawa, M., Mishima, H. and Kozawa, Y. (2004) Ultrastructural study on the lattice images of calcium phosphate minerals in fossil tooth. In: Kobayashi, I. and Ozawa, H. (eds.) *Biomenerallization (BIOM 2001) : formation, diversity evolution and application Proceedings of 8th International Symposium on Biomineralization*, pp.364-368, Tokai Univ. Press, Kanagawa.

Katsura, N. and Ono, T. (1998) A novel helical filament model of hen tendon collagen fibril. In: Ninomiya, Y. (ed.) *Extracellular Matrix-Cellular Interaction : Molecules to Diseases*, 1st, pp.185-202, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.

桂 暢彦 (1999) コラーゲン性石灰化初期機構の新しい視点. *歯基礎医学会誌* **41**, 1-10.

菊池 亮・鈴木久仁博 (2002) イヌ臼歯歯胚におけるエナメル芽細胞とハンター・シュレーゲルの条紋. *日大口腔科学* **28**, 236-246.

桐野忠大 (1958) エナメル質の脱灰法. *口腔病学会誌* **25**, 243-259.

小澤幸重 (1978) 長鼻類の歯のエナメル質の比較組織学. *口腔病学会誌* **45**, 585-606.

Kozawa, Y. and Suzuki, K. (1995) Appearance of new characteristic features of tooth structure in the evolution of teeth of equoidea and proboscoidea. *Aspects of dental biology, paleontology, anthropology and evolution*. 27-31.

小澤幸重 (1996) 系統発生から見た歯の成長線. *細胞* **28**, 88-92.

Kozawa, Y., Torii, S., Mishima, H., Iwasa, Y., Suzuki, K., Sasagawa, I. and Ferguson, M.W.J. (1999) The origin of dancing and grouping of ameloblasts to form enamel prisms and Hunter-Schreger Bands in reptiles and primitive Mammalia. In: Mayhall, J.T. and Heikkinen, T. (eds.) *Dental Morphology* **98**, pp. 273-280, Oulu University Press, Oulu.

Kozawa, Y. and Suzuki, K. (2001 a) A histological study of enamel structure from the point of view of evolution. In: Brook, A. (ed.) *Dental Morphology 2001*, pp.69-73, Sheffield Academic Press, Sheffield.

Kozawa, Y., Mishima, H., Suzuki, K. and Ferguson, M.W.J. (2001 b) Dental formula of elephant by the development of tooth germ. In: Cavarretta, G., Gioia, P. and Mussi, M. (eds.) *The World of Elephants*, pp.639-642, Consiglio Nazionale Delle Ricerche, Roma.

小澤幸重 (2003) Development of mammalian dentition and cytological base of enamel development. *エナメル質比較発生学懇話会記録* **8**, 107-127.

- 小澤幸重・大久保厚司・老沼博一・千坂英輝・本田知久・横田ルミ・岩佐由香・鈴木久仁博・山本 仁・寒河江登志朗 (2004) エナメル質結晶形成に関する研究. 再生歯誌 **2**, 138-158.
- 小澤幸重 (2006) エナメル質比較組織ノート. わかば出版, 東京.
- Meckel, A.H. and Griebstein, W.J. (1965) Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. *Arch. Oral Biol.* **10**, 775-783.
- Moss, M.L. (1969) Evolution of mammalian dental enamel. *American Museum Novitates* **23600**, 1-39.
- 中原 皓 (1988) 軟体動物の殻体形成と石灰化. 大森昌衛, 須賀昭一, 後藤仁敏編, 海洋生物の石灰化と系統進化, 87-96頁, 東海大学出版会, 東京.
- 大見謝健・岩佐由香 (2002) エナメル芽細胞の接着形態. 日大口腔科学 **28**, 206-212.
- Osborn, J.W. (1968) Directions and interrelationships of enamel prisms from the sides of human teeth. *J. Dent. Res.* **47**, 223-232.
- Osborn, J.W. (1970) The mechanism of ameloblast movement: a hypothesis. *Calcif. Tissue. Res.* **5**, 344-359.
- Skobe, Z., Prostack, K. and Stern, D. (1981) Ultrastructure of secretory ameloblast in a Monkey *Macaca mulatta*. *Arch. oral Biol.* **26**, 1075-1090.
- Stefen, C. and Rensberger, J.M. (1995) Special features of hyaenid enamel. In: Radlanski, R.J. and Renz, H. (eds.) *Proceedings of the 10th International Symposium on Dental Morphology*, pp.230-236, Marketing-Services, Berlin.
- Stefen, C. (1997) Differentiations in Hunter-Schreger Bands of Carnivores. In: Koenigswald, W.V. and Sander, P.M. (eds.) *Tooth Enamel Microstructure*, pp.123-135, A.A. Balkema, Rotterdam.
- Tasumi, M. (1964) The cheek teeth of a young Indian elephant. *Extrait De Mammalia* **28**, 381-396.
- Torii, S. (1998) Origin of enamel prisms and Hunter-Schreger Bands in reptilian enamel. *Connect. Tissue Res.* **38**, 45-51.
- Travis, D.F. (1968) Comparative and organization of inorganic crystals and organic matrices of mineralized tissues. In: Philip, P. (ed.) *Biology of mouth, Publication No 89 of the American Association for the Advancement of Science*, pp.237-297, Washington D.C.
- Uchida, T., Karukaya, E., Hiyama, S., Satoda, T. and Hayashida, K. (2003) Expression and functional significance of enamel proteins in amelogenesis. *Archives of Comparative Biology of Tooth Enamel* **8**, 13-15.
- Wakita, M. and Kobayashi, S. (1983) The three dimensional structure of Tomes' processes and the development of the microstructural organization of tooth enamel. In: Suga, S. (ed.) *Mechanisms of Tooth Enamel Formation*, pp.65-89, Quintessence Publishing Co., Inc., Tokyo.
- Wakita, M., Fujinami, H., Hanaizumi, Y., Domon, T. and Takano, Y. (1990) Studies on ameloblast movement during amelogenesis. *J. Dent. Res.* **69**, 1057.
- 横田ルミ・花泉好訓・鈴木久仁博・千坂英輝・山本 仁・寒河江登志朗・平賀 努・小澤幸重 (2005) エナメル質構造を形成するエナメル芽細胞の集合と動きに関する免疫組織学的研究. 日大口腔科学 **31**, 77-94.
- Yokota, R. (2006) On the developmental process of "ameloblast grouping and dancing" in the formation of Hunter-Schreger bands in Indian elephant molar tooth germs. *J. Oral Biosci.* **48**, 42-53.