



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	メダカ咽頭歯・咽頭骨にみられる硬組織間接着界面の形態学的特徴
Author(s)	松村, 馨; 土門, 卓文; 飯田, 順一郎
Citation	北海道歯学雑誌, 35(2), 133-140
Issue Date	2015-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58244
Type	journal article
File Information	35-02-5matsumura.pdf



原 著

メダカ咽頭歯・咽頭骨にみられる硬組織間接着界面の形態学的特徴

松村 馨^{1,2)} 土門 卓文²⁾ 飯田順一郎¹⁾

抄 録：哺乳類における骨接合線やセメント象牙境などの硬組織間接着界面は脱灰標本で過酸化ヨウ素シッフ反応（periodic acid-SCIFF）（PAS）陽性反応を示し、bone sialoprotein, osteopontin, glycosaminoglycansが局在し、これら非膠原性タンパクは硬組織間の接着に関与すると報告されている。骨組織は系統発生学的に硬骨魚類よりみられることから、その骨接合線の構造を理解することは哺乳類におけるその意義を理解する上で重要である。しかしながら、その報告はない。硬骨魚類の歯は骨性結合あるいは歯足骨を介在して骨と線維性結合しているが、そこでの非膠原性タンパクの存在は不明である。本研究はメダカ咽頭骨にみられる骨接合線と咽頭歯・歯足骨界面の構造を明らかにするものである。試料としてメダカ咽頭歯・咽頭骨を用いた。試料は固定、脱灰、パラフィン・樹脂（LR-white）包埋後、前頭方向から切片を作製しHE・PAS・AZAN染色を行い光学顕微鏡で観察した。透過型電子顕微鏡観察には試料を固定、脱灰、LR-white包埋し、前頭方向から超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で観察した。光学顕微鏡では上咽頭歯・歯足骨界面はHE・PAS染色に染まらない線状構造を示し、AZAN染色では膠原線維が観察された。下咽頭歯では上咽頭歯で見られたような歯・歯足骨界面は観察されなかった。骨接合線はHE・PAS・AZAN染色のいずれの染色にも染まらない線状構造として観察された。透過型電子顕微鏡による観察では、上咽頭歯・歯足骨界面には横紋構造をもつ膠原線維が存在し、これら線維の幾つかは歯と歯足骨を構成している基質線維と連続していた。骨接合線は無構造領域として観察され、この領域が骨に面する部には露出した膠原線維が観察された。以上の結果から、メダカの硬組織間接着界面である上咽頭歯・歯足骨界面と骨接合線はPAS陽性物質を含まず、上咽頭歯・歯足骨界面は膠原線維から、骨接合線は無機質から構成されていることが示唆された。

キーワード：メダカ、上咽頭歯・歯足骨界面、骨接合線

緒 言

ヒトやラットなどの哺乳類の骨基質には脱灰標本でヘマトキシリンに染色される骨接合線が存在し、それらは骨間の接着界面として知られている¹⁻⁵⁾。この骨接合線は骨改造時に破骨細胞が吸収した骨吸収面が単核細胞により処理されることにより形成されることが知られている^{6,7)}。口腔領域では骨接合線と類似した構造が固有歯槽骨と支持歯槽骨間、セメント象牙境にも観察されており、これら硬組織間接着界面の特徴として、組織学的にはヘマトキシリン・エオジン（HE）染色でヘマトキシリンに濃染し、過酸化ヨウ素シッフ反応（periodic acid - SCIFF）（PAS）染色で陽性を示すことが知られている。これらHE・PAS染色で陽性を示す物質は免疫組織化学的にbone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), glycosaminoglycans (GAGs) であることが証明されており、これらの非膠原

性タンパクは硬組織間の接着に関与すると報告されている⁸⁻¹¹⁾。

骨組織は系統発生学的に硬骨魚類よりみられることが知られている^{12,13)}。それゆえ、硬骨魚類の骨組織にも哺乳類の骨間にみられる骨接合線は存在するものと思われ、その構造を理解することは哺乳類の骨接合線の意義を理解する上で重要であると考えられる。しかしながら、これまでにその報告はない。硬骨魚類の歯はヒトなどの哺乳類とは異なり、骨と歯の間には歯足骨と呼ばれる硬組織が介在して結合しているが¹⁴⁻¹⁷⁾、この介在部位における非膠原性タンパクの存在については報告がない。以上のことから、硬骨魚類における硬組織間接着界面の特徴についてはよく分かっていない。

硬骨魚類の一種であるメダカは体長が小さく、実験動物として用いる場合、飼育も簡便である¹⁸⁾。メダカは顎歯の他に咽頭部分に歯足骨を介して咽頭骨と結合する多数の

¹⁾〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 歯科矯正学教室（主任：飯田順一郎 教授）

²⁾〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 口腔機能解剖学教室（主任：土門卓文 教授）

咽頭歯を有している。メダカでは上咽頭歯は歯足骨と線維を介在した線維性結合することが知られている¹⁵⁾。メダカは多生歯性であるため咽頭歯の交換は頻繁に生じており¹⁶⁾、そこでは咽頭骨の改変により骨接合線も観察できると思われる。それゆえ、本研究では硬骨魚類の硬組織間接着界面を観察する実験動物としてメダカを用いた。本研究はメダカの咽頭骨にみられる硬組織間接着界面である骨接合線と上咽頭歯・歯足骨界面の構造を観察し、それらの形態学的特徴を明らかにすることを目的とする。

材 料 と 方 法

1) 実験動物

メダカ（ダツ目メダカ科, *Oryzias latipes*) 成魚40匹を用いた (Hokudo Co.Ltd, Sapporo, Japan)。内訳は実体顕微鏡観察1匹、光学顕微鏡観察20匹、電子顕微鏡観察19匹である。メダカは3-アミノ安息香酸エチル・メタンスルホン酸 (MS-222) (SIGMA) の水溶液 (1g/l) 中で麻酔後、断頭し、咽頭骨を含む頭部をその後の試料とした。

2) 実体顕微鏡観察

試料は10%中性ホルマリンで24時間、室温で浸漬固定した。その後、試料から上・下咽頭骨を採取し、実体顕微鏡で観察した。

3) 光学顕微鏡観察

試料は10%中性ホルマリンで24時間、4℃で浸漬固定した。その後、5%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で10日間、4℃で脱灰した。試料は通法に従い上昇エタノール系列で脱水し、パラフィン包埋を行なった。

一部試料は4%パラホルムアルデヒド0.1Mリン酸溶液で24時間、4℃で浸漬固定後、咽頭骨を採取し、5% EDTAで10日間、4℃で脱灰した。採取した咽頭骨は上昇エタノール系列で脱水し、樹脂 (LR-white, LONDON RESIN COMPANY LIMITED) への置換後、室温にて6日間、紫外線照射 (D.S.K ULTRAVIOLET POLYMERIZER MODEL TUV-100) による光重合を行った。

得られた試料は前頭方向から薄切し、パラフィン包埋試料では厚さ4μmの切片を作製し、HE, PAS, AZAN染色を行った。樹脂包埋試料ではウルトラミクロトーム (ultratome® NOVA) にてダイヤモンドナイフ (DIATOME) を用いて厚さ1μmの切片を作製し、PAS, AZAN染色を行った。得られた切片は光学顕微鏡 (NIKON MICROPHOTO-FXA) で観察した。

4) 透過型電子顕微鏡観察

試料は2%パラホルムアルデヒド・1.25%グルタルアルデヒド・0.05Mカコジル酸緩衝溶液 (pH7.4) で24時間、4℃で浸漬固定後、咽頭骨を採取し、5% EDTAで10日間、

4℃で脱灰した。採取した咽頭骨は1%四酸化オスmiumで3時間室温にて後固定後、4%酢酸ウランで20分間ブロック染色した。その後、上昇エタノール系列で脱水し、LR-whiteに包埋した。試料はウルトラミクロトームにて前頭方向から、ダイヤモンドナイフを用いて厚さ0.5μmの準超薄切片と厚さ100nmの超薄切片を作製し、4%酢酸ウラン・クエン酸鉛による二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (JEM1400, 加速電圧80kV) で観察した。

結 果

1) 実体顕微鏡による観察

咽頭骨は肝臓のやや前方で咽頭腔を挟むように上下に存在した (図1)。上咽頭骨は涙滴形状を、下咽頭骨は三角形状を示し、それぞれ左右一対として観察された (図2)。咽頭歯は、咽頭腔面に向かって咽頭腔側を頂点とした円錐形状をしており、これら咽頭歯は咽頭骨表面に対して前頭方向に複数の歯列を形成して配列していた。歯列は上咽頭骨で約10列、下咽頭骨で約6列であった。

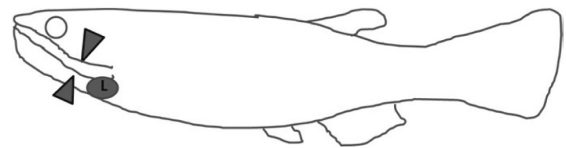


図1 メダカ咽頭骨の位置模式図
肝臓の前方に咽頭腔を上下から挟むように咽頭骨 (矢頭) が存在する。

L: 肝臓

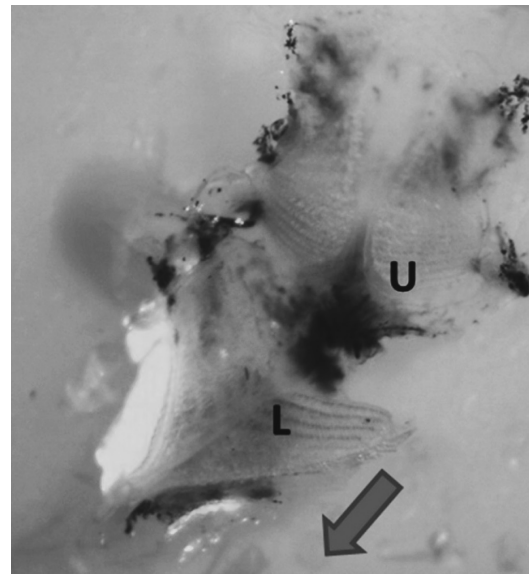


図2 メダカ咽頭骨実体顕微鏡像
咽頭歯は咽頭骨表面に対して前頭方向に複数の歯列を形成して配列している。図は上咽頭骨を反転している。

U: 上咽頭骨, L: 下咽頭骨, ⇨: 口腔側を示す

2) 光学顕微鏡による観察

前頭方向の切片では、左右の咽頭骨は咽頭腔を上下から挟むようにして存在し、上・下咽頭骨とも左右の咽頭骨の間には腺組織が観察された(図3)。上咽頭骨表面には、多数の咽頭歯が観察され、互いに平行に配列していた(図4)。脱灰されたエナメルイドを含む歯の外形は円錐状を示し、歯足骨と連続していた。このような上咽頭歯と歯足骨の間を拡大して観察すると、そこにはHE染色でヘマトキシリンに無染色の線状構造が明瞭に観察された(図5)。このような上咽頭歯・歯足骨界面はパラフィン切片と樹脂切片の両方でPAS染色陰性を示し、無染色の線状構造として観察された(図6、7)。AZAN染色で上咽頭歯・歯足骨界面を観察するとアニリン青に弱く染色される膠原線維が観察された(図8)。歯足骨と咽頭骨の間の境界は認められなかった。

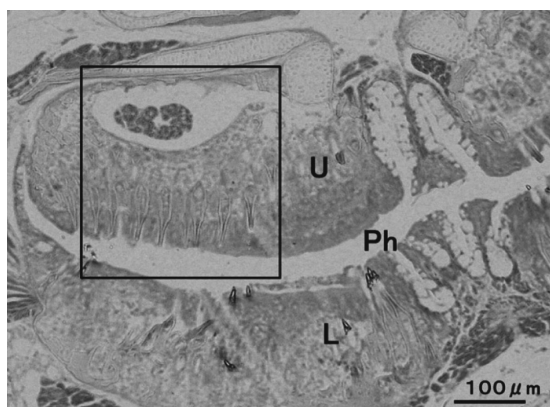


図3 メダカ咽頭部光顕像

咽頭腔をはさんで上咽頭骨・歯と下咽頭骨・歯が存在する。枠内を図4に示す。(パラフィン包埋HE)

Ph: 咽頭腔, U: 上咽頭骨, L: 下咽頭骨

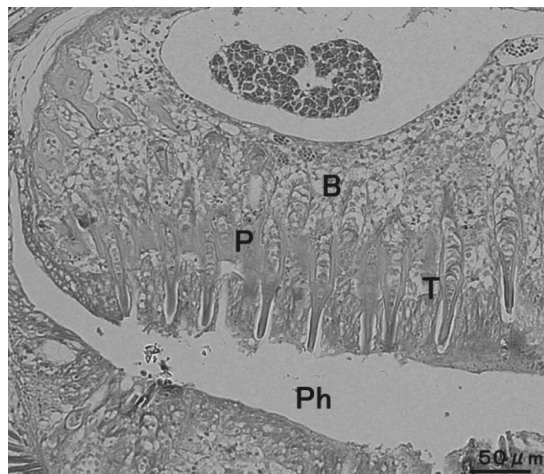


図4 上咽頭骨光顕像

歯足骨と連続する多数の咽頭歯が観察される。歯足骨は咽頭骨と連続している。(パラフィン包埋HE)

Ph: 咽頭腔, B: 咽頭骨, T: 咽頭歯, P: 歯足骨

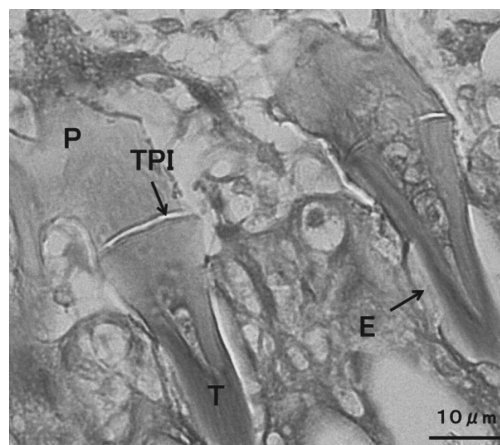


図5 上咽頭歯・歯足骨界面HE染色光顕像

上咽頭歯・歯足骨界面(TPI)はヘマトキシリンに無染色の線状構造を示す。(パラフィン包埋)

T: 咽頭歯, P: 歯足骨, E: エナメルイド消失部分

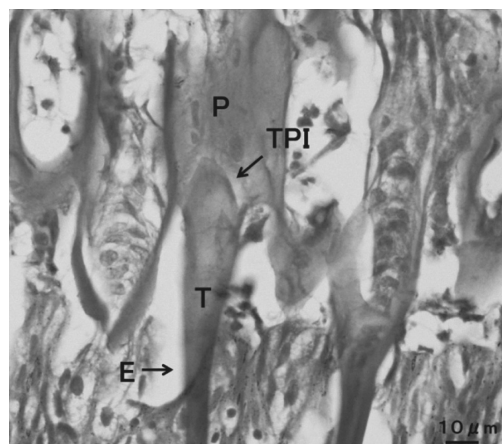


図6 上咽頭歯・歯足骨界面PAS染色光顕像

上咽頭歯・歯足骨界面(TPI)はPAS陰性を示す。(パラフィン包埋)

T: 咽頭歯, P: 歯足骨, E: エナメルイド消失部分

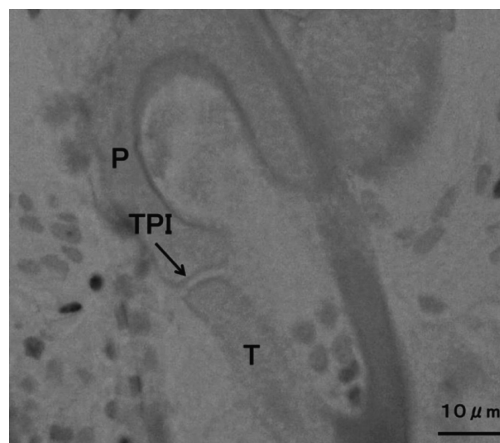


図7 上咽頭歯・歯足骨界面PAS染色光顕像

上咽頭歯・歯足骨界面(TPI)はPAS陰性を示す。(樹脂包埋)

T: 咽頭歯, P: 歯足骨

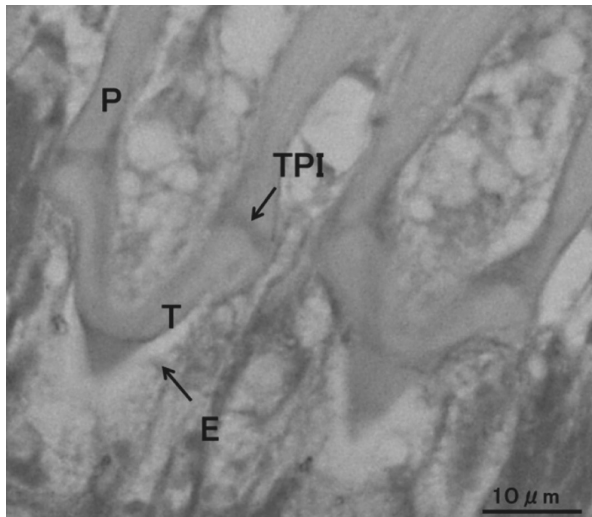


図8 上咽頭歯・歯足骨界面AZAN染色光顕像
上咽頭歯・歯足骨界面 (TPI) には膠原線維が観察される。
(パラフィン包埋)
T: 咽頭歯, P: 歯足骨, E: エナメロイド消失部分

下咽頭骨表面にも多数の咽頭歯が観察され、互いに平行に配列していた(図3)。下咽頭歯・咽頭骨ではPAS染色(パラフィン包埋)(図9)、HE染色, PAS染色(LR-white), AZAN染色(いずれも図示せず)で、上咽頭歯・歯足骨界面に認められたような線状構造は観察されず、咽頭歯と咽頭骨の間には境界は認められなかった。

骨接合線は上・下咽頭骨の基部の骨間に多数観察され、HE染色(図示せず)やPAS染色(図10)、AZAN染色(図11)のいずれの染色にも無染色を示す、複雑な外形を示す線状構造として観察された。

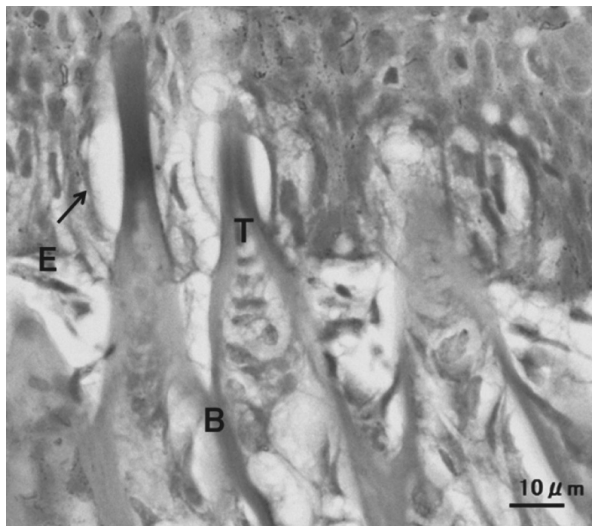


図9 下咽頭歯・咽頭骨PAS染色光顕像
下咽頭歯・咽頭骨間には、上咽頭歯・歯足骨界面のような線状構造は観察されない。(パラフィン包埋)
T: 咽頭歯, B: 咽頭骨, E: エナメロイド消失部分

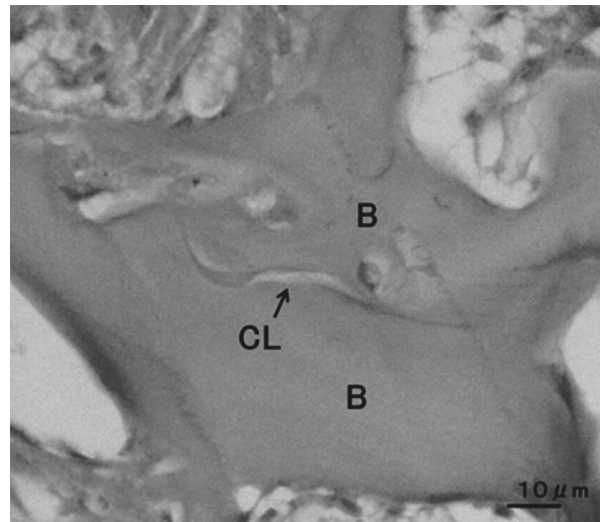


図10 骨接合線PAS染色光顕像
骨接合線 (CL) はPAS陰性を示す。(パラフィン包埋)
B: 下咽頭骨

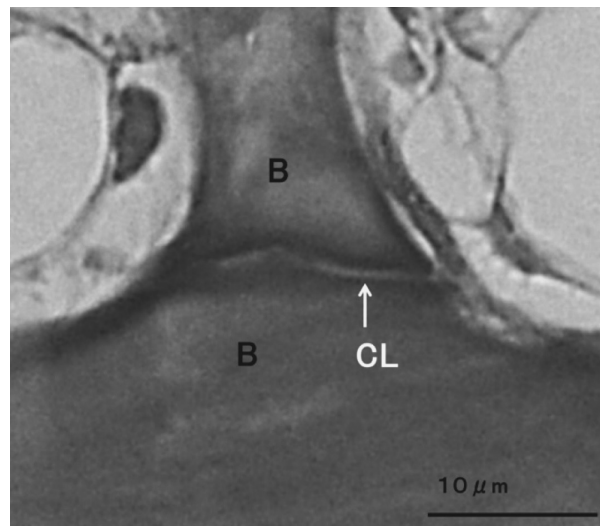


図11 骨接合線AZAN染色光顕像
骨接合線 (CL) はAZAN染色に染まらない。(パラフィン包埋)
B: 下咽頭骨

3) 透過型電子顕微鏡による観察

上咽頭歯・歯足骨界面は弱拡大像では歯と骨を構成する基質線維と区別することができる電子密度の低い構造として観察された(図12)。このような構造を強拡大で観察すると、そこには横紋構造をもつ膠原線維が観察され、これら線維の幾つかは歯と骨を構成している基質線維と連続している像が観察された。

咽頭骨には骨小腔は観察されず、骨は電子密度の一定な組織として観察された。このような骨中で、骨接合線は電子染色されない複雑な外形を示す明るい線状構造として観察された。このような構造を強拡大で観察すると、骨接合線は幅が $0.2 \sim 0.3 \mu\text{m}$ 程度の無構造領域として観察された。

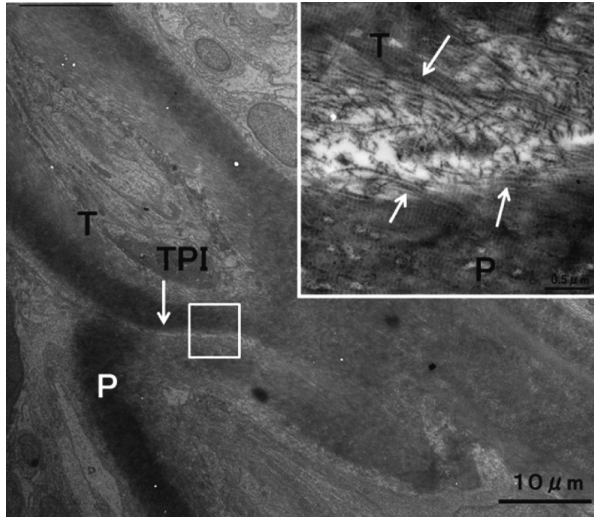


図12 上咽頭歯・歯足骨界面透過型電子顕微鏡像
上咽頭歯・歯足骨界面 (TPI) は電子密度の低い領域として観察される。
枠内拡大像：咽頭歯・歯足骨から連続した膠原線維 (矢印) が認められる。

P：歯足骨，T：咽頭歯

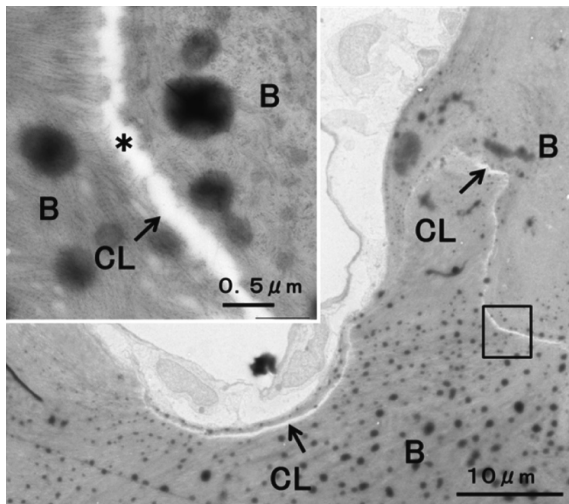


図13 骨接合線透過型電子顕微鏡像
骨接合線は電子密度の低い明るい構造として観察される。
枠内拡大像：骨接合線 (CL) 部分は無構造 (*) であり，そこには骨表面から露出している膠原線維が認められる。

B：咽頭骨

骨接合線が骨基質に面する部位には骨基質を構成する横紋構造をもつ膠原線維が露出した像が認められ，電子密度の高い構造は認められなかった (図13)。

考 察

本研究は脱灰標本を用いてメダカの咽頭歯・歯足骨界面と骨接合線という2つの硬組織間接着界面の特徴を形態学的に明らかにしたものである。光学顕微鏡によるパラフィン包埋切片の観察から，上咽頭歯・歯足骨界面はHE染色

とPAS染色に染まらない線状の無構造領域として観察された。試料作成時の脱パラフィン過程時にPAS陽性物質が流出する可能性は否定できない。このため，本研究では樹脂包埋試料を作成し，そこでもPAS染色を行った。その結果，樹脂包埋切片においても上咽頭歯・歯足骨界面はパラフィン包埋切片と同様にPAS陰性を示した。これらの光学顕微鏡観察による結果は上咽頭歯・歯足骨界面にはPAS陽性物質は存在しないことを示している。AZAN染色を行った光学顕微鏡観察から，上咽頭歯・歯足骨界面にはアニリン青に弱く染色される膠原線維が観察され，透過型電子顕微鏡観察でもこの部分に膠原線維の存在が観察された。これらの結果は上咽頭歯・歯足骨界面には膠原線維が存在していることを示しており，メダカ上咽頭歯と歯足骨は線維を介在した線維性結合しているという過去の報告と一致している^{14, 15)}。本研究では脱灰標本を光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて観察していることから，以上の結果は上咽頭歯・歯足骨界面にはPAS陽性物質は存在せず，この部分は膠原線維で構成されことを示している。

上・下咽頭骨において見られた骨接合線は光学顕微鏡観察からHE染色でヘマトキシリンに染まらず，パラフィン・樹脂包埋切片のPAS染色においてもPAS陰性を示し，AZAN染色では無染色の線状構造として観察された。透過型電子顕微鏡観察では骨接合線は膠原線維等が存在しない無構造の領域として観察された。脱灰標本から得られたこれらの結果から，骨接合線は膠原線維やPAS陽性物質を含まない無機質から構成されていると考えられる。

以上の結果からメダカ上咽頭歯・骨にみられる硬組織間接着界面を模式図で示すと次のような構造をもつと考えられる (図14)。上咽頭歯と歯足骨の界面はPAS陽性物質を含まない膠原線維からなる線維性結合しており，歯足骨は深部の咽頭骨と連続しているが，歯足骨と咽頭骨間の境界

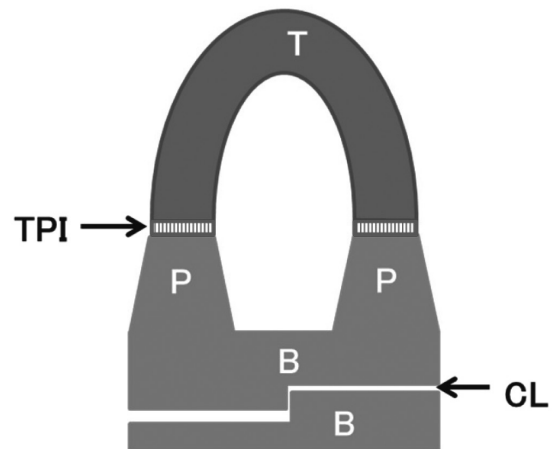


図14 メダカ上咽頭歯・骨にみられる硬組織間接着界面模式図
咽頭歯は歯足骨と界面 (TPI) を介して接し，歯足骨と咽頭骨は連続している。咽頭骨間には接合線 (CL) が観察される。

T：咽頭歯，B：咽頭骨，P：歯足骨

は認められない。深部の咽頭骨間には骨接合線が観察され、この部分は膠原線維やPAS陽性物質を含まない無機質から構成されている。

哺乳類の骨組織にみられる骨接合線は骨改造時に破骨細胞が吸収した骨吸収面が単核細胞により処理され、その上に新たに骨組織が添加されることによって形成されることが知られている^{6,7)}。この哺乳類における骨接合線の形成過程をメダカの骨接合線に当てはめて考えてみると、破骨細胞によって吸収された骨表面は他の細胞によってPAS陽性物質の分泌等の処理は行われず、吸収された状態にある骨表面に無機質が分泌され、次いでその上に骨形成が生じていた可能性を示唆している。この可能性は透過型電子顕微鏡観察からも骨接合線に面する骨基質部分に横紋構造を持つ膠原線維が露出して存在していたことから推測できる。それゆえ、メダカの骨接合線は、哺乳類の骨接合線と比較して単純な形成過程と構造を示しており、これらは系統発生的に古い特徴を示している可能性が考えられる。しかしながら、本研究は2万種を超す硬骨魚類の一種類であるメダカのための観察にすぎず、この可能性について言及するには、さらなる所見が必要と考えられる。

メダカ咽頭骨の骨接合線部分に見られたような膠原線維が露出したままの状態の硬組織上に直接無機質が形成される例として、ヒトなどの哺乳類の歯にみられるエナメル象牙境^{19,20)}があげられる。エナメル象牙境は膠原線維を含む石灰化した外套象牙質面上に無機質であるヒドロキシアパタイトが添加されることによって形成されることが知られている。それゆえ、この構造はメダカの骨接合線部分と非常に類似した構造を示していると考えられる。それゆえ、メダカの骨接合線とエナメル象牙境との間には硬組織の発生に関して何らかの関連性が存在するのではないかと推測は可能であるが、エナメル質は外胚葉性のエナメル芽細胞によって形成され、骨は中胚葉由来の骨芽細胞によって形成されることから²¹⁾、その発生過程は異なることからメダカの骨接合線とエナメル象牙境を単純に比較することは難しいと考えられる。

Yamamoto et al^{22,23)}はラット臼歯のセメント象牙境を観察し、その境界部は組織学的にHE染色でヘマトキシリンに濃染し、またPAS陽性を示し、免疫組織化学的にはBSP, OP, GAGsの非膠原性タンパクが局在していると報告した。Yamamoto et al^{22,23)}はこれらの有機質は象牙質と主線維を埋入する無細胞性セメント質を接着させるための役割をもつと考察している。Yamamoto et al²³⁾と同様の手法を用いてArambawatta et al²⁴⁾はラット臼歯に連続する固有歯槽骨と支持歯槽骨との界面を観察し、その界面にもBSP, OP, GAGsの非膠原性タンパクが局在し、これらの有機質は支持歯槽骨と主線維を埋入する固有歯槽骨を接着させるための役割をもつと報告している。これらの報告からPAS陽性を示す非膠原性タンパクは、哺乳類に

おいて、ある硬組織の上に別な硬組織を形成する際の両者間の有機性の接着機能をもつ物質と考えられる。本研究の結果、メダカ咽頭歯・歯足骨にみられる硬組織間接着界面にはPAS陽性物質は観察されなかった。この結果は、メダカでは硬組織間接着界面には、膠原線維以外の有機性の接着機能をもつ物質は存在していないことを示唆している。硬骨魚類から両生類、爬虫類、そして哺乳類という系統発生において、どの段階で硬組織間接着界面にPAS陽性物質が出現したのかを明らかにすることは哺乳類の硬組織間接着界面の役割を考える上で重要なことである。しかしながら、上述したように、硬骨魚類には2万を超える種が存在しているため、他種では硬組織間接着界面にPAS陽性物質が存在している可能性は否定できない。この解明のためには他の硬骨魚類や両生類、爬虫類における硬組織間接着界面の構造に関するさらなる研究が必要であると考えられる。

結 論

メダカの上咽頭歯・歯足骨界面と骨接合線はPAS陽性物質を含まず、上咽頭歯・歯足骨界面は膠原線維から、骨接合線は無機質から構成されていることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座口腔解剖学教室ならびに歯科矯正学教室の諸先生に心よりお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 藤田尚男, 藤田恒夫: 支持組織. 標準組織学. 194-196, 医学書院, 東京, 1975.
- 2) 小澤英浩, 須田立雄, 高橋栄明: 骨の構造. 骨の科学. 36, 医歯薬出版, 東京, 1985.
- 3) Bloom W, Fawcett DW: A Textbook of Histology, 224-228, WB Saunders, Phila-London-Toronto, 1968.
- 4) Boyde A: Enamel. edited by Berkovitz BKB, Frank RM, Höhling HJ, Moxham BJ, Nalbandian J, Tonge CH: Teeth, 309-473, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, 1989.
- 5) Tran PV, Vignery A, Baron R: An electron-microscopic study of the bone-remodeling sequence in the rat. Cell Tissue Res 225: 283-292, 1982.
- 6) Baron R, Vignery A, Horowitz M: Lymphocytes, Macrophage and the regulation of bone remodeling. edited by Peck W. A., Bone And Mineral Research Annual 2, 175-215, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- 7) Domon T, Suzuki R, Takata K, Yamazaki Y, Takahashi S, Yamamoto T, Wakita M: The nature

- and function of mononuclear cells on the resorbed surfaces of bone in the reversal phase during remodeling. *Ann. Anat* 183 : 103-110, 2001.
- 8) Yamamoto T, Domon T, Takahashi T, Arambawatta AKS, Anjuman KAY, Fukushima S, Wakita M: Determination of two different types of cellular cementogenesis in rat molars: A histological and immunohistochemical study. *Matrix Biol* 24 : 295-305, 2005.
 - 9) Arambawatta AKS, Yamamoto T, Wakita M: An immunohistochemical study of the attachment mechanisms in different kinds of adhesive interfaces in teeth and alveolar bone of the rat. *J Periodontal Res* 4 : 259-65, 2006.
 - 10) McKee MD, Nanci A: Osteopontin: An Interfacial Extracellular Matrix Protein in Mineralized Tissues. *Connect Tissue Res* 35 : 197-205, 1996.
 - 11) McKee MD, Zalzal S, Nanci A: Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: Localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *Anat Rec* 245 : 293-312, 1996.
 - 12) Shellis P: Adaptive radiation of tooth supporting structures. edited by Osborn JW, *Dental Anatomy and Embryology*, 210-215, Blackwell Scientific, Oxford London Edinburgh Boston Melbourne, 1981.
 - 13) 後藤仁敏：緒論。後藤仁敏，大泰司紀之。歯の組織と支持組織，歯の比較解剖学，22-23, 医歯薬出版，東京，1986.
 - 14) 林 善彦：メダカ歯髓細胞の微細構造。歯基雑誌 22 : 443-453, 1980.
 - 15) Nemoto Y, Higuchi K, Baba O, Kudo A, Takano Y: Multinucleate osteoclasts in medaka as evidence of active bone remodeling. *Bone* 40 : 399-408, 2007.
 - 16) Abduweli D, Baba O, Tabata MJ, Higuchi K, Mitani H, Takano Y: Tooth replacement and putative odontogenic stem cell niches in pharyngeal dentition of medaka (*Oryzias latipes*). *Microscopy* 63 : 141-53, 2014.
 - 17) Domon T, Fukui A, Taniguchi Y, Suzuki R, Takahashi S, Yamamoto T, Wakita M: Odontoclasts in the Chinook salmon differ from mammalian odontoclasts by exhibiting a great proportion of cells with high nuclei number. *Anat Embryol* 209 : 119-128, 2004.
 - 18) 山田利恵，土門卓文，井上農夫男，野谷健治：サーモンカルシトニンがメダカ破骨細胞に及ぼす影響。北海道歯誌 33 : 168-174, 2013.
 - 19) 高野吉郎：歯の構造と硬組織形成。脇田 稔，前田健康，山下靖雄，明坂年隆編，口腔・組織発生学，41-42，医歯薬出版，東京，2006.
 - 20) 藤田恒太郎：エナメル象牙境。歯の組織学，72-77，医歯薬出版，東京，1957.
 - 21) 内田隆：エナメル質の発生。脇田 稔，前田健康，山下靖雄，明坂年隆編，口腔組織・発生学，48-49，医歯薬出版，東京，2006.
 - 22) Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Anjuman KAY, Fukushima C, Wakita M: Mineralization process during acellular cementogenesis in rat molars: a histochemical and immunohistochemical study using fresh-frozen sections. *Histochem Cell Biol* 127 : 303-311, 2007.
 - 23) Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Arambawatta AKS, Wakita M: Immunolocalization of proteoglycans and bone-related noncollagenous glycoproteins in developing acellular cementum of rat molars. *Cell Tissue Res* 317 : 299-312, 2004.
 - 24) Arambawatta AKS, Yamamoto T, Wakita M: Immunohistochemical characterization of noncollagenous matrix molecules on the alveolar bone surface at the initial principal fiber attachment in rat molars. *Ann Anat* 187 : 77-87, 2005.

ORIGINAL

Morphological characteristics of adhesion interface between hard tissues
in pharyngeal teeth and bone of Japanese medakaKaoru Matsumura^{1, 2)}, Takanori Domon²⁾ and Junichiro Iida¹⁾

ABSTRACT : The adhesion interface between hard tissues in cement lines of bone in mammals shows a positive reaction in periodic acid-SCHIFF (PAS) staining. In addition, bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and glycosaminoglycans (GAGs) can be detected. It has been reported that such noncollagenous proteins participate in adhesion between hard tissues. Bone tissue phylogenically appears in Teleost fish. Therefore, it is important to understand the characteristics of the adhesion interface between hard tissues in Teleost fish when this significance in mammals is considered. The present study aims to observe the adhesion interface between hard tissues, tooth-pedicle-interface (TPI) in upper pharyngeal bone of Japanese medaka, and to clarify the morphological characteristics. The upper pharyngeal bone and teeth of Japanese medaka was used in this study. For light microscopic (LM) observation specimens were embedded in paraffin or resin (LR-white) after fixation, decalcification and dehydration. Frontal directional slices were made, stained with haematoxylin-eosin (HE), PAS, AZAN, and observed by LM. For transmission electron microscopic (TEM) observation, specimens were embedded in LR-white resin. Ultra thin frontal directional sections were made and were observed by TEM. By LM, TPI was observed as a line-shaped structure without staining of HE and PAS. However, there were collagen fibers with AZAN staining. Cement lines were not stained with HE, PAS or AZAN, and they were observed as lines with irregular contours. By TEM, collagen fibers were observed in TPI and there were some fibers connected to those in the matrix of tooth and pedicle. On cement lines there was no structure and only exposed collagen fiber was observed on the surfaces of bone. These findings suggest that TPI have no PAS-positive materials and are made of collagen fibers. The cement lines are made of only minerals without any collagen fiber or PAS-positive materials.

Key Words : medaka, upper pharyngeal tooth-pedicle-interface, cement line

¹⁾Department of Orthodontics, Division of Oral Functional Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine (Chief : Prof. Junichiro Iida) Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

²⁾Department of Oral Functional Anatomy, Division of Oral Functional Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine (Chief : Prof. Takanori Domon) Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan