

組織培養によるマウス臼歯歯胚の 基底膜再生について

名和 橙黄雄 石関 清人 坂倉 康則
飯田 就一

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座* (主任: 名和橙黄雄教授)

[受付: 1982年9月16日]

抄録: 基底膜を機械的に除去するために、生後3日のマウス下顎臼歯歯胚の象牙前質を顕微鏡下で摘出した。基底膜除去後のエナメル器と歯乳頭を再接着させて培養を行い、基底膜再生の経過を電子顕微鏡で観察した。

基底膜の再生は培養5日目にみられたが、基底膜再生に先立って無周期性細線維が培養時間とともにエナメル芽細胞表面に著しく増加してくる。この結果は、無周期性細線維が基底膜再生に関与している可能性を示唆している。

緒 言

歯胚は外胚葉成分と中胚葉成分から構成され、エナメル器と歯乳頭間には明瞭な基底膜が存在して両組織を隔てている。両組織間には相互作用による分化誘導機構が存在し、分化誘導の情報は基底膜を介して交換されることになる。しかしながら、歯胚の基底膜の形成と機能に関しては、いまだ十分に解明されていないのが現状である。現在では基底膜は上皮由来とする報告が主流を占めている^{1,7)}。基底膜の再生には上皮と間葉の両成分が必要であるとする報告が大多数であるが、Osman and Ruch(1980)¹⁾は上皮単独で基底膜が再生されることを初めて報告した。いずれの報告も基底膜の除去は酵素等によって行ったものであるが、今回、我々は機械的に基底膜を除去し、分離したエナメル器と歯乳頭を再接着し、培養下における基底膜の再生過程を経日的に観察したので、その結果を報告する。

材 料 と 方 法

生後3日の新生仔マウス(BALB/c)の下顎臼歯(M1)を顕微鏡下で無菌的に摘出しカナマイシン含有培養液に数分間浸漬後、新鮮培養液に移し、以後の操作は歯胚の乾燥を防ぐためにすべて培養液中で行った。

生後3日の臼歯歯胚は未萌出であるがすでに数個の咬頭を有し、薄層の象牙前質が形成されているので顕微鏡下でこの象牙前質を摘出した。象牙前質摘出後、分離したエナメル器と歯乳頭を再接着させ、培養液で溶かした1.5%寒天中に埋入した。歯胚の埋没した寒天の薄片をステンレスグリッド上に移し、寒天表面と同じ高さまで培養液を加えて培養を開始した。

培養液はダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬)に10%仔牛血清(Flow Lab.), Ascorbic acid (150 μ g/ml), ペニシリン(100単位/ml), ストレプトマイシン(100 γ /ml)を添加して用いた。炭酸ガス培養器で37°C, CO₂ 5%, N₂ 45

Regeneration of basal lamina of mouse molar tooth germs *in vitro*.

Tokio NAWA, Kiyoto ISHIZEKI, Yasunori SAKAKURA and Shuichi IIDA

(Department of Oral Anatmy, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 7: 203-209, 1982

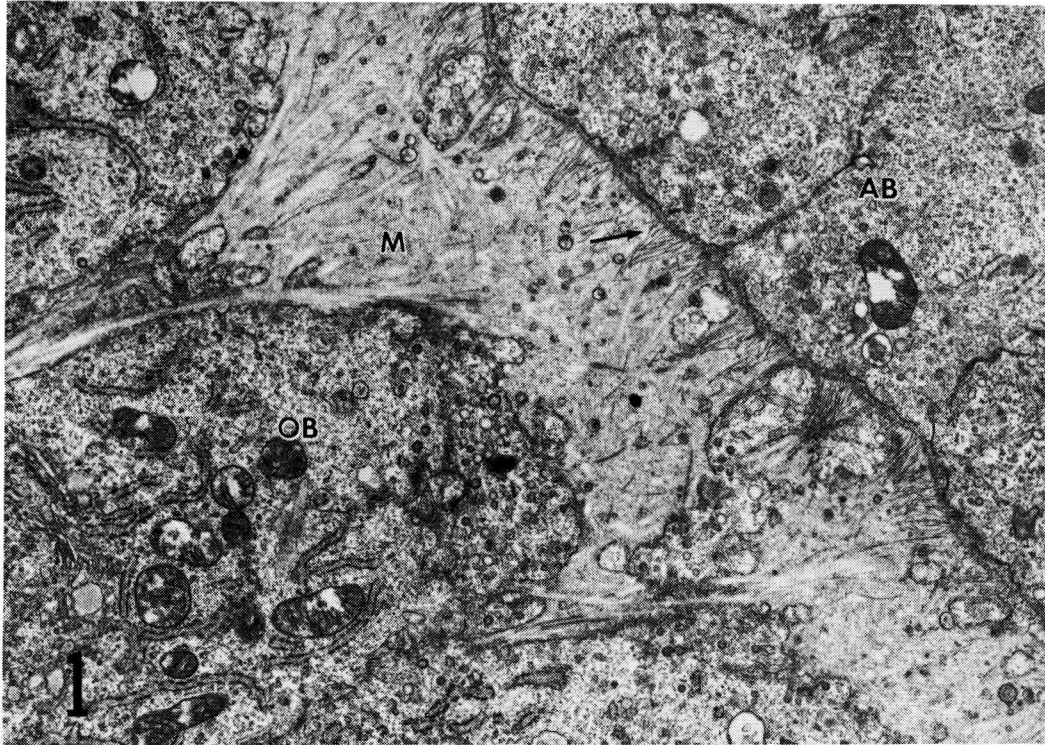


図1 生後3日マウス歯胚の電顕像

基質 (M) には多量のコラーゲン線維と基質小胞がみられる。エナメル芽細胞 (AB) 表面には基底膜があり、基底膜に付随する無周期性細線維 (矢印) が基質に向かって放散している。OB: 象牙芽細胞 ×11,000

%, O₂ 50%の気相で培養を行った。培養は6日間行い、経日的に試料を取り出して固定を行った。

固定は2.5%グルタルアルデヒド(カコジル酸緩衝液 pH7.4)で1時間前固定, 1%オスミウム酸(同上緩衝液)で1時間の後固定を行った。固定した試料は通常のごとくアルコール上昇列で脱水し, Epon 812に包埋した。試料の一部は基底膜が完全に除去されたことを確認するために, 培養することなく直ちに固定, 包埋を行った。超薄切片は酢酸ウラン, クエン酸鉛の二重染色を行い, 日本電子100B型電子顕微鏡で観察した。

結 果

図1に未処理, 未培養歯胚の歯頸側1/3の電顕像を示した。基質領域には多数のコラーゲン線

維が分泌され, 基質小胞も認められるが石灰化像はみられない。エナメル芽細胞の遠位部には基底膜が存在し, それに付随する多数の細線維が明瞭に認められる。この部位の基質が機械的に除去されるので以後の観察は歯頸側1/3に相当する部位を中心に行った。図2は象牙前質除去後直ちに固定した標本の電顕像である。エナメル芽細胞の遠位部には基底膜は認められない。細胞表面には胞状の突起がみられるが, 酵素処理の場合も同様の構造がみられるので, 特に機械的除去による細胞損傷とは思われない。図3は培養24時間後のものであるが, この時期の特徴はエナメル芽細胞遠位部にマイクロフィラメントの束が出現してくることである。いまのところ, このマイクロフィラメントがその後の基底膜再生に関与するという確証は得られていない。図4は培養48時間の像であるが, エナメル

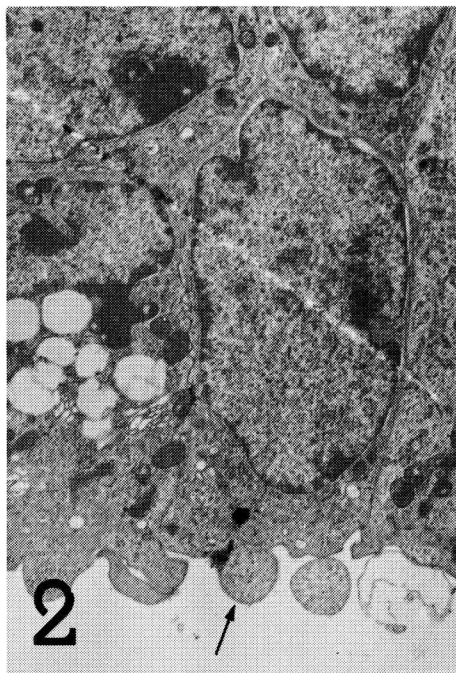


図2 象牙前質を除去し直ちに固定を行ったエナメル芽細胞像
エナメル芽細胞遠位部には多数の胞状の細胞質突起がみられるが、細胞表面(矢印)には基底膜はみられない。 ×5,400



図3 培養24時間の電顕像
細胞表面に沿って平行に走るマイクロフィラメント(矢印)がエナメル芽細胞(AB)内に出現してくる。
OB:象牙芽細胞 ×21,000

芽細胞遠位部に多数の無構造物質と細線維様構造がみられた。しかしながら、この無構造様物質が基底膜再生に関与しているかどうかは現時点では定かではない。図5は培養72時間後の像であるが、基質には多数の太いコラーゲン線維がみられ、エナメル芽細胞遠位部表面には細線維の出現が認められた。構造的にみてコラーゲン線維とは明らかに異なるこれらの細線維は培養時間とともに著しく増加してくる。図6は培養96時間後のものであるが、無周期性の細線維が増加し、エナメル芽細胞表面に塊状に認められてくる。図7は培養120時間後の像を示したが、細線維の横断像に混在して、再生した基底膜が認められる。

考 察

歯胚の分化には上皮性成分と間葉成分が必要であり、一般に epithelial-mesenchymal sys-

tem として知られているが、この機能の一つとして両組織間に存在する基底膜が重要な働きをしていると考えられている。

Thesleff (1978) ら⁶⁾はマウス歯胚を酵素処理によって上皮と間葉に分離し、両者間にフィルターを挿んで培養した結果、上皮下に基底膜が再生され基底膜と間葉細胞が接触することによって象牙芽細胞に分化すると報告した。同様の結果が Meyer (1977, 1981) ら⁸⁾⁹⁾, Osman and Ruch (1981)¹⁰⁾によって報告されている。しかし、一部には歯胚の分化誘導には必ずしも両組織の接触が必要ではないとする報告もみられる¹¹⁾。

Karcher-Djuricic (1978) ら¹²⁾は発生時期の異なるエナメル器と歯乳頭の組み合わせ実験で、基底膜は象牙芽細胞の分化を誘導するが、それは特定の時期の上皮によって分泌された基底膜によって行われると指摘した。また Kollar

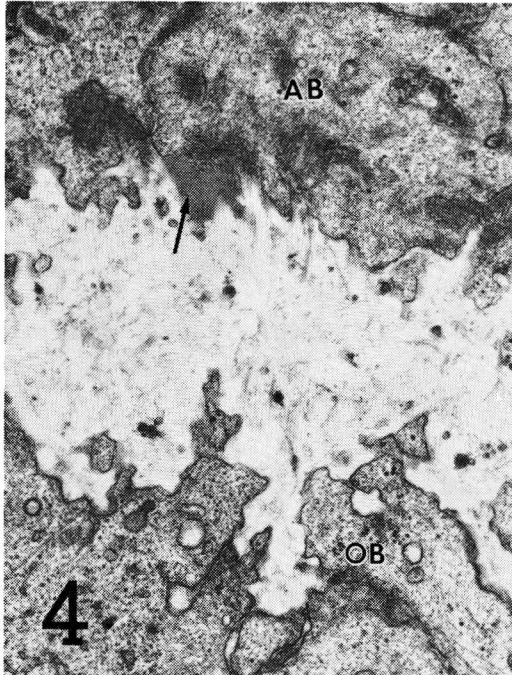


図4 培養48時間の電顕像

エナメル芽細胞 (A B) 遠位部に無構造様物質の沈着 (矢印) と細線維様構造物がみられる。

O B : 象牙芽細胞 ×19,000

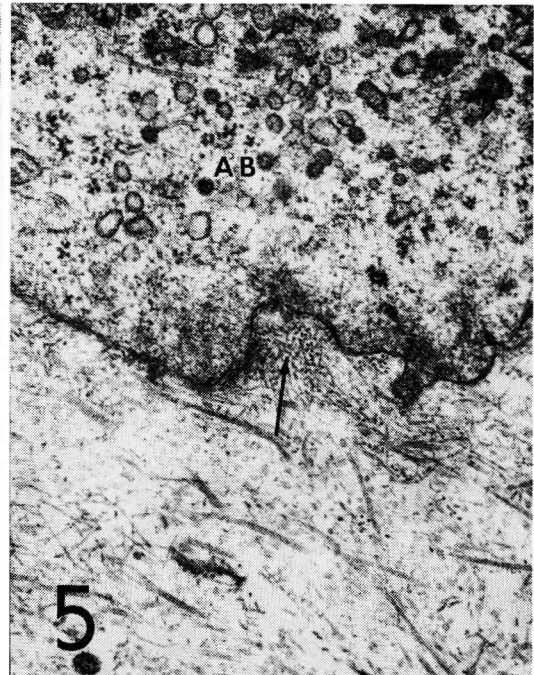


図5 培養72時間の電顕像

エナメル芽細胞 (A B) 遠位部に付着した細線維 (矢印) が増加してくる。基質には多量のコラーゲン線維がみられる。×27,000

(1972)¹³⁾は各種のエナメル器と歯乳頭の組み合わせ実験で、歯胚の形は歯乳頭によって決定されることを実証し、細胞の配列に基底膜が関与している可能性を示唆した。

上皮一問葉の誘導関係にみられる基底膜の役割については歯胚の他に肢芽¹⁴⁾、乳腺¹⁵⁾、顎下腺¹⁶⁾、甲状腺¹⁷⁾、腎臓¹⁸⁾などでも報告されている。

基底膜の機能に関しては腎臓の場合は疾病との関係から、かなりの報告がみられるが歯胚についてはあまり進展していないのが現状である。Ekblom (1980) ら¹⁸⁾は腎尿細管の初期発生には基底膜の laminin が関与し、この laminin が細胞の接着性を増加させる結果、間葉細胞の集合が生じて尿細管が誘導されると報告している。また尿細管の分化誘導期には基底膜の laminin の他に type IV コラーゲン、basement membrane proteoglycan が著明なることを報告している¹⁹⁾。また Gutaman (1982) ら²⁰⁾は

ヒト糸球体と胎盤の基底膜から type IV コラーゲンを抽出し、このコラーゲンが培養細胞の接着と伸展を増加させ細胞の認識などに関与する可能性を示唆した。

歯胚の基底膜の機能に関しては Thesleff と Hay の報告がある。Thesleff (1978, 1981, 1982) ら²¹⁻²³⁾は glycosaminoglycans や glycoproteins の合成阻害剤である diazo-oxo-nor-leucine を培養歯胚に添加すると象牙芽細胞の分化が阻害される事から、基底膜あるいは間葉細胞表面の glycosaminoglycans や glycoproteins が象牙芽細胞分化の重要因子であり、さらに type IV コラーゲン、laminin, basement membrane proteoglycan, fibronectin の分布を観察し、これらの物質が、象牙芽細胞の分化、基質の分泌に深く関与している可能性を示唆した。また Hay (1978)²⁴⁾によると基底膜は上皮直下に間葉細胞が移動する時の基質として働き、一種の濾過機構として細胞内環境のコントロー

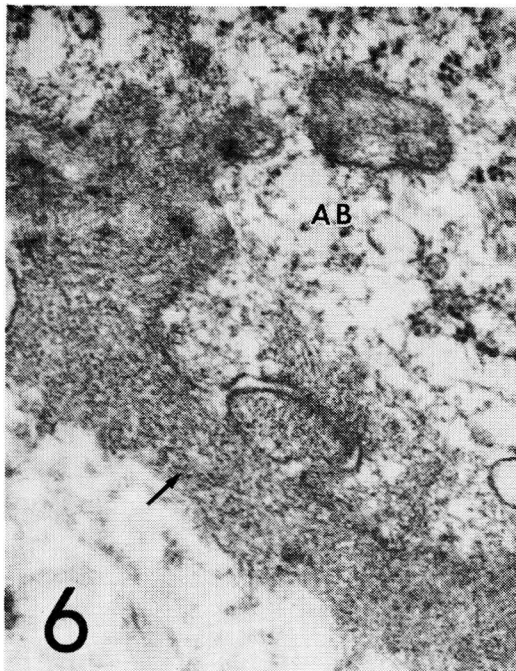


図6 培養96時間の電顕像

エナメル芽細胞 (AB) 遠位部に多量の細線維 (矢印) が出現し、塊状に付着している。
×43,000

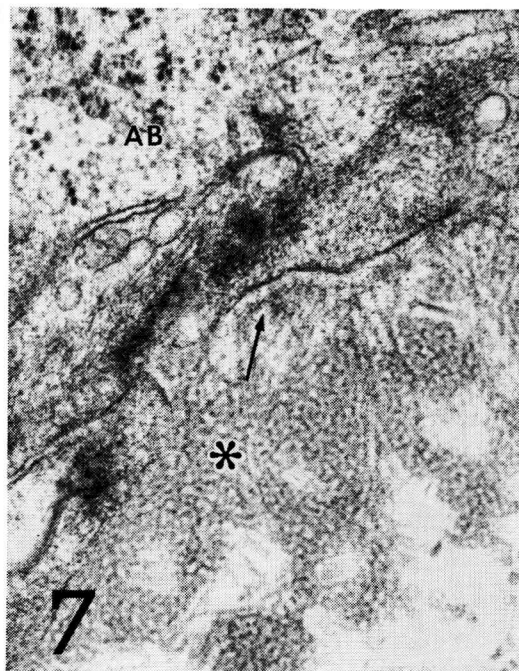


図7

細線維の付随した基底膜 (矢印) の再生がエナメル芽細胞 (AB) 遠位部にみられ、その周囲には細線維の横断像 (*) がみられる。
×38,000

ルとしての機構を有すると報告している。

上記のごとく基底膜の機能については徐々に解明されつつあるが、歯胚の基底膜は膜に付随する長い無周期性細線維を有すること、また石灰化の進行にともなって基底膜が消失することなど、他の組織の基底膜とは若干様相が異なっている。基底膜の機能を解明する一つの試みとして基底膜再生の研究も重要な課題といえる。

酵素消化法による基底膜の再生に関する報告によると Banerjee²⁾の顎下腺では2時間、Karcher-Djuricic¹²⁾の歯胚の報告では18時間、Thesleff⁹⁾のフィルターを挿んだ歯胚の実験では4日間で再生される。いずれの報告でも基底膜の再生は上皮あるいは間葉単独培養ではみられず、両組織の共存が必要であるとされている。

最近になって Osman¹¹⁾は歯胚上皮を寒天あるいは plasma clot 上で3日間培養し、上皮単独で基底膜が再生されたと報告している。し

かしながら上皮単独培養で基底膜が再生されたとする研究は Osman¹¹⁾ら以外には成功していないので彼らの報告は極めて稀な成功例といえる。いずれにしてもこの報告は基底膜の由来について決着をつけたことになる。Osman¹¹⁾らは基底膜再生の過程で基質に面する上皮の細胞質中に図2に示すマイクロフィラメント束の出現を報告し、この線維束は基底膜形成には無関係で、剝離刺激によって生じた上皮細胞の胞状突起を平坦にさせるために働くと推察している。

本研究の場合は基底膜再生に5日間を要したが、これは実験方法の違いもあるが、生後3日というかなり分化の進んだ歯胚を用いたことに起因するものと考えられる。上述の報告者らと大きく異なる所見は基底膜に付随する無周期性の細線維が最初に出現してくることである。この細線維は歯胚発生の過程できわめて長くなり基質分泌域の大半を占めることがある²⁵⁾。今回の基底膜再生の過程では、先ずこの細線維が上

皮直下に形成され、それが時間とともに増加を示し、同時に基質コラーゲンの増加、基底膜の再生がみられたことは非常に興味深い現象である。この細線維の機能については全く不明であるが、Sanders⁷⁾はコラーゲンの前駆体、Orams (1978)²⁶⁾は複雑な epithelial-mesenchymal system の一要因、Slavkin (1977)²⁷⁾らはこの細線維は前象牙芽細胞分化に先立って内エナメル上皮によって形成され、間葉細胞に対してコラーゲン分泌を指示する鋳型として働くと記載

している。

無周期細線維の本態については不明であるが基底膜との関係から epithelial-mesenchymal system の一要因をなす可能性が十分に考えられ、本研究で示した結果はその可能性に一つの示唆を与える事になり、今後の研究発展に期待が寄せられる。

本研究の一部は第22回歯科基礎医学会総会(松戸市, 昭和55年10月4日)に於いて発表した。

Abstract : The tooth germs of first mandibular molar from 3-day-old mouse were used. In order to eradicate the basal lamina, the predentin of tooth germs were mechanically removed. After the separation of tooth components, the recombined epithelial and mesodermal components were incubated in a humidified incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, 45% N₂ and 50% O₂. A daily change of regeneration of new basal lamina was observed by electron microscope.

The non-periodic fine fibrils which were deposited on the epithelial cell surface increased as the time of cultivation prior to formation of new basal lamina. The new basal lamina deposited at five days after the cultivation. These results suggest that non-periodic fine fibrils have a close association with the regeneration of basal lamina.

文 献

- 1) Osman, M. and Ruch, J. V. : Secretion of basal lamina by trypsin-isolated embryonic mouse molar epithelia cultured in vitro. *Develop. Biol.* 75 : 467-470, 1980.
- 2) Banerjee, S. D., Cohn, R. H. and Bernfield, M. R. : Basal lamina of embryonic salivary epithelia. Production by the epithelium and role in maintaining lobular morphology. *J. Cell Biol.* 73 : 445-464, 1977.
- 3) Hay, E. D. and Revel, J. P. : Autoradiographic study of the origin of the basement lamella in *Ambystoma*. *Develop. Biol.* 7 : 152-168, 1963.
- 4) Kollar, E. J. and Baird, G. R. : The influence of the dental papilla on the development of tooth shape in embryonic mouse tooth germs. *J. Embryol. exp. Morphol.* 21 : 131-148, 1969.
- 5) Koch, W. E. : In vitro differentiation of tooth rudiments of embryonic mice. I. Transfilter interaction of embryonic incisor tissue. *J. Exp. Zool.* 165 : 155-170, 1967.
- 6) Thesleff, I., Lehtonen, E. and Saxén, L. : Basement membrane formation in transfilter tooth culture and its relation to odontoblasts differentiation. *Differentiation*. 10 : 71-79, 1978.
- 7) Sanders, E. J. : Development of the basal lamina and extracellular materials in the early chick embryo. *Cell Tissue Res.* 198 : 527-537, 1979.
- 8) Meyer, J. M., Fabre, M., Staubli, A. and Ruch, J. V. : Relation cellulaires au cours de l'odontogenese. *J. Biol. Buccale.* 5 : 107-119, 1977.
- 9) Meyer, J. M. Staubli, A. and Ruch, J. V. : Ruthenium red staining and tannic acid fixation of dental basement membrane. *Cell Tissue Res.* 220 : 589-597, 1981.
- 10) Osman, M. and Ruch, J. V. : Behavior of odontoblasts and basal lamina of trypsin or EDTA-isolated mouse dental papillae in short culture. *J. dent. Res.* 60 : 1015-1027, 1981.
- 11) Wolters, J. M. L. and Van Mullem, R. J. : Electron microscopy of epithelio-mesenchyme intercellular communication in trans-filter culture of rat tooth germs. *Archs. oral Biol.* 22 : 705-709, 1977.
- 12) Karcher-Djuricic, V., Osman, M., Meyer, J. M., Staubli, A. and Ruch, J. V. : Basement membrane reconstitution and cytodifferentiation of odontoblasts in isochronal and heterochronal reassociations of enamel organs and pulps. *J. Biol. Buccale.* 6 : 257-265, 1978.
- 13) Kollar, E. J. : Histogenetic aspects of dermal

- epidermal interaction. In "Developmental Aspects of Oral Biology" edited by Slavkin, H. C. and Bavetta, L. A., Academic Press, New York, 125-149, 1972.
- 14) Gumpel-Pinot, M. : Ectoderm-mesoderm interaction in relation to limb-bud chondrogenesis in the chick embryo : transfilter cultures and ultrastructural studies. *J. Embryol. exp. Morphol.* 65 : 73-87, 1981.
 - 15) Wicha, M. S., Liotta, L. A., Vonderhaar, B. K. and Kidwell, W. R. : Effects of inhibition of basement membrane collagen deposition on rat mammary gland development. *Develop. Biol.* 80 : 253-266, 1980.
 - 16) Bernfield, M. R. and Banerjee, S. D. : The basal lamina in epithelial-mesenchymal morphogenetic interactions. In "Biology and Chemistry of Basement Membranes" edited by Kefalides, N. A., Academic Press, New York, 137-148, 1976.
 - 17) Alquier, C., Fayet, G., Housepian, S. and Michel-Béchet, M. : Biosynthesis of the basal lamina as a result of interaction between thyroid and mesenchymal cells in culture. *Cell Tissue Res.* 200 : 69-81, 1979.
 - 18) Ekblom, P., Alitalo, K., Vaheri, A., Timpl, R. and Saxén, L. : Induction of a basement membrane glycoprotein in embryonic kidney possible role of laminin in morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Scis. USA.* 77 : 485-489, 1980.
 - 19) Ekblom, P. : Formation of basement membranes in the embryonic kidney : An immunohistochemical study. *J. Cell Biol.* 91 : 1-10, 1981.
 - 20) Gutaman, N., Lanson, M., Gerflaux, J., Chany-Fournier, F., Muh, J. P. and Chany, C. : Chemical characterization and biological effect of collagenous fractions extracted from human glomerular basement membrane and fetal tissue. *Cell Biology International Reports.* 6 : 579-589, 1982.
 - 21) Thesleff, I. : Role of the basement membrane in odontoblast differentiation. *J. Biol. Buccale.* 6 : 241-249, 1978.
 - 22) Hurmerinta, K. and Thesleff, I. : Diazo-oxo-norleucine (DON)-induced alterations in the matrix of mouse tooth germ. *Cell Differentiation.* 11 : 107-113, 1982.
 - 23) Thesleff, I., Barrach, H. J., Foidart, J. M., Vaheri, A., Pratt, R. M. and Martin, G. R. : Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Develop. Biol.* 81 : 182-192, 1981.
 - 24) Hay, E. D. : Role of basement membranes in development and differentiation. In "Biology and Chemistry of Basement Membrane" edited by Kefalides, N. A., Academic Press, New York, 119-136, 1978.
 - 25) 名和橙黄雄, 石関清人, 坂倉康則, 立花民子 : 培養マウス歯胚の微細構造 : 基底膜ならびにそれに付随する微細線維と細胞分化の関係について, 歯科基礎誌, 22 : 357-365, 1980.
 - 26) Orams, H. J. : The ultrastructure of tissues at the epithelial-mesenchymal interface in developing rat incisors. *Archs. oral Biol.* 23 : 39-44, 1978.
 - 27) Slavkin, H. C., Trump, G. N., Brownell, A. and Sorgente, N. : Epithelial-mesenchymal interactions : mesenchymal specificity. In "Cell and Tissue Interactions" edited by Lash, J. W. and Burger, M. M., Raven Press, New York, 29-46, 1977.