

原 著

マウス胎仔頭蓋冠由来細胞系の樹立について

名 和 橙黄雄 小山田 勇 樹* 船 木 康 博**
 坂 倉 康 則 飯 田 就 一 原 田 順 男
 広 田 萬 貴 子

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)

岩手医科大学歯学部保存学第一講座* (指導: 久保田稔教授)

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座** (主任: 関山三郎教授)

〔受付: 1986年9月4日〕

抄録: マウス胎仔 (BALB/c—同腹) の頭蓋冠を培養して継代可能な細胞系 MC840106を樹立した。染色体のモードは68本で, 核型はアクロセントリックなマウス特有の染色体からなるが, 1本のみ大型のメタセントリックな染色体を所有している。しかしながら, いまのところ明瞭な石灰化能は認められない。

Key words: establishment, cell line, mouse calvaria, tissue culture.

Gey(1952)¹⁾らによってHeLa cellが樹立されて以来, 数多くの細胞株が作られているが, 各々の研究目的に合致した細胞株の樹立は未だに困難であるのが現状である。Moscona and Moscona(1952)²⁾によるin vitroにおけるニワトリ肢芽の骨形成の報告が行われて以来, 骨形成能を有する細胞株の樹立が多くの人達によって試みられてきた。近年になってKodama(1981)³⁾ら, Sudo(1983)⁴⁾らによって骨形成能を有する細胞株が報告された。我々も今回, 骨由来の細胞系を樹立したのでその経過と性状について報告する。

材 料 と 方 法

胎生18日のマウスの胎仔(BALB/c—同腹 6

匹)の頭蓋冠を無菌的に摘出し, シャーレーの培養液中に移して, ピンセットで可能な限り骨表面の骨膜を剥離して除去した。6匹の同腹仔マウスから得られた頭蓋冠を50mlの遠沈管に移し, 少量の培養液を添加して, 柄の長い外科用のハサミ(メツエンバーム反剪刀)を用いて骨を可能な限り細切した。

遠沈管に10mlの培養液を添加し, 2mlの駒込ピペットで強く数回, 吸引噴射を繰り返して骨細片を洗浄する。濁った上澄は捨て, 新鮮な培養液を適当量加えて細切した骨片を90mmプラスチックシャーレー10個に均等になるように分注して培養を開始した。

培養液はダルベッコ変法イーグル培地(ニッスイ)に仔牛血清10%, アスコルビン酸150 μg

Establishment of a cell line derived from the fetal mouse calvaria.

Tokio NAWA, Yuuki OYAMADA*, Yasuhiro FUNAKI**, Yasunori SAKAKURA, Shuichi IDA, Yorio HARADA and Makiko HIROTA.

(Department of Oral Anatomy, Operative Dentistry* and Oral Surgery II**, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1-3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 11: 169-174, 1986

／ml, カナマイシン60mg／lを添加して用いた。培養は37°C, 炭酸ガス培養器で行い, 培養液は週2回定期的に交換した。

骨細片の周囲から細胞が遊走分裂してシャーレーにはほぼ一杯になったところで, 初めて継代培養を行った。5代目までの継代はトリプシン0.05%+EDTA 0.01%の混合液で細胞分散を行い, 炭酸ガス培養器で継代した。

5代目以降は閉鎖系で培養を行い, 継代は20mlロック基注射器にルンバル針(太)を付け, 培養液を培養瓶壁に数回強く噴射することによって細胞を分散して継代を行った。

染色体分析: 培養72時間後にコルセミッド0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し, 12時間後に固定して染色体標本作製した。染色体はIBAS (Zeiss) を用いて分析した。

成長曲線: トリプシン0.05%+EDTA 0.01%混合液で細胞を分散し, 遠沈したのち新鮮培養液を添加し, 血球計算板で算出して90mmプラスチックシャーレー12個に各々 1×10^4 個の細胞を植え継いだ。培養3, 5, 7, 9日後にトリプシン・EDTA混合液で細胞を分散し, 血球計算板で細胞数を計算した。

形態観察: 顕微鏡的には短冊型カバーグラスを入れて培養を行い, 経時的にカバーグラスを取り出してメタノール固定を行い, May-Grünwald Giemsa 染色を行って観察した。

電顕的には単層に増殖した細胞を先端にゴムの付いたラバー棒(ラバークリーナー)で剝離し, 1500回転5分間遠沈する。上澄を捨て2.5%グルタルアルデヒド(pH7.4カコシル酸緩衝液)を静かに遠沈管に注入し, ペレットの状態を1

時間固定する。さらに1%オスミウム酸で1時間, 後固定したのち, ペレット状の細胞塊を崩さないように脱水し, 通常的手法でエボンに包埋した。

結 果

細胞系樹立経過: 初代培養は1984年1月6日に始めた。培養3日頃から, 骨細片の周囲に細胞の遊走が出現してきた。培養17日にシャーレーにはほぼ一杯に細胞増殖したところで, 第1回目の継代を行った。トリプシンとEDTA混合液を用いて10個のシャーレーの細胞を分離分散し, 150白金メッシュを通して骨片を除去して遠沈する。これに適当量の新鮮培養液を加えてシャーレー5個に均等に継代した。継代5代目までは細胞の増殖が極めて緩慢なため継代は炭酸ガス培養器(開放型)で行い, 培養液の交換のみを定期的に行った。

6代目以降は週1回ないし2回の継代が可能になったのでTD型培養瓶に移し, 閉鎖型で培養を行った。8代目(239日)以降は週2回の継代が必要になり, この時点でほぼ細胞系の樹立が可能になった(図1)。

染色体分析: 染色体分析は継代可能になった14代目に行った。標本はギームザ染色を行い, 核型と染色体数はIBASの画像解析装置で自動的に行った。マウスの染色体は40本であり, すべてアクロセントリックであるので, 他種の動物と容易に区別することができる⁵⁾。

MC840106細胞の染色体のモードは68本で約66%の細胞がこの領域にある。正常の染色体数と比較すると異倍数性で本細胞系は3~4倍体

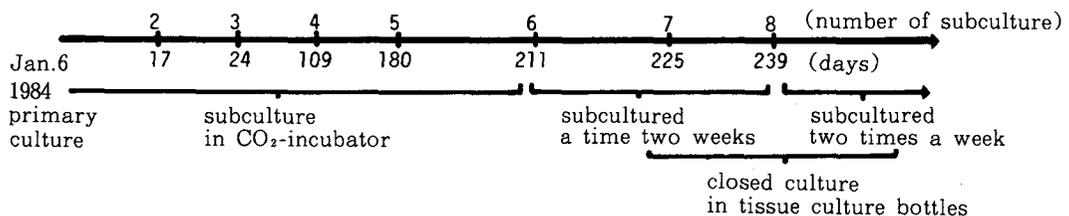


Fig. 1 : Process of MC840106 cell line establishment.

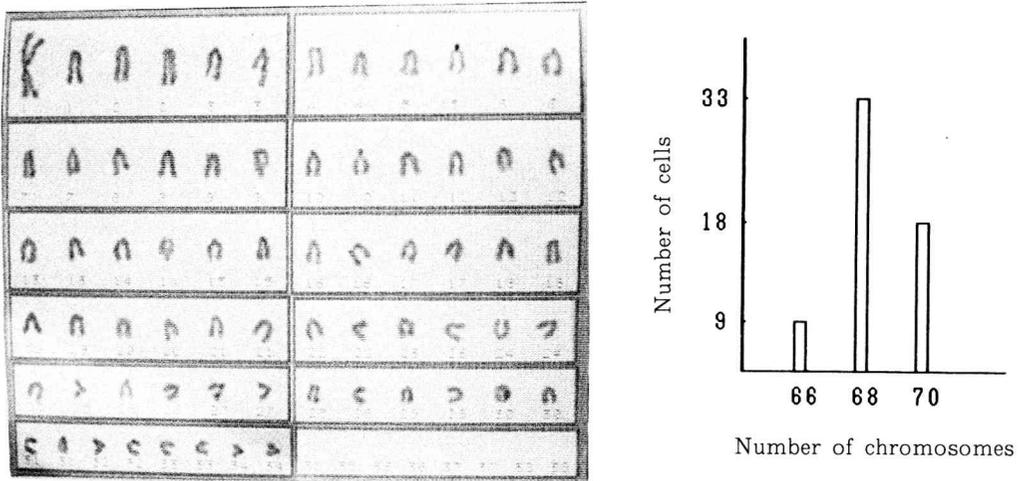


Fig. 2 : Chromosome analysis of MC840106 cell line.
 Its modal number was 68 which was 66% in this cell population.
 Note a large metacentric chromosome.

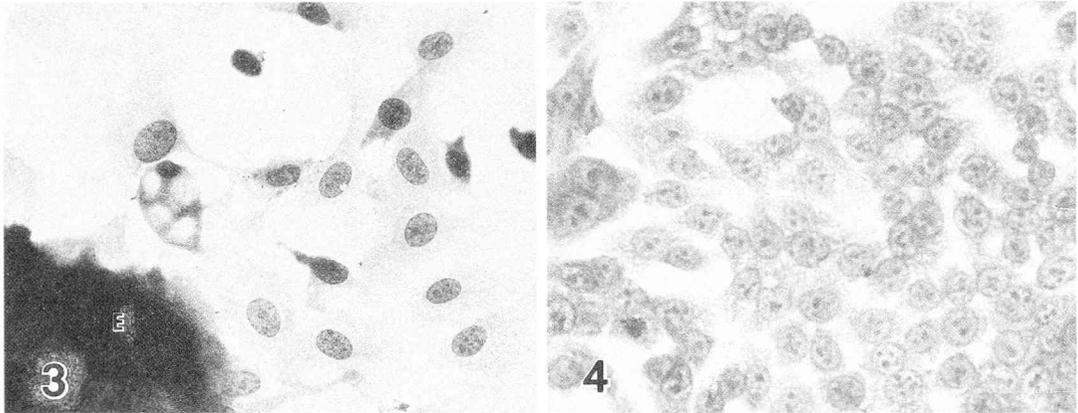


Fig. 3 : The primary culture of MC840106 cell line.
 The cells which had a spherical or oval nucleus contained one or two nucleolus migrated from bone fragments (E) represent morphologically polygonal appearance.

Fig. 4 : MC840106 cell line after the 80th transfer generation.
 The cells grew as monolayer showing a paving stone-like appearance in morphology.

になっている。核型では大型のメタセントリックの染色体を1本所有しているのが特徴である(図2)。

形態観察：初代培養の骨細片から遊走する細胞は大型の円型ないし楕円型の核を有する多角形の細胞である。核は1～2個の核小体を持っている(図3)。その外に紡錘形をした典型的な線

維芽細胞の遊走もみられる。

初代培養時にはシャーレー1個あたり多量の細胞を播いたので3代目までは比較的細胞の増殖は大であるが、3代目以降は細胞の増殖が緩慢になり、定期的に培養液の交換のみを続けた。培養後、約半年を経過した6代頃から細胞の増殖が増大し、週1～2回の継代が可能になって

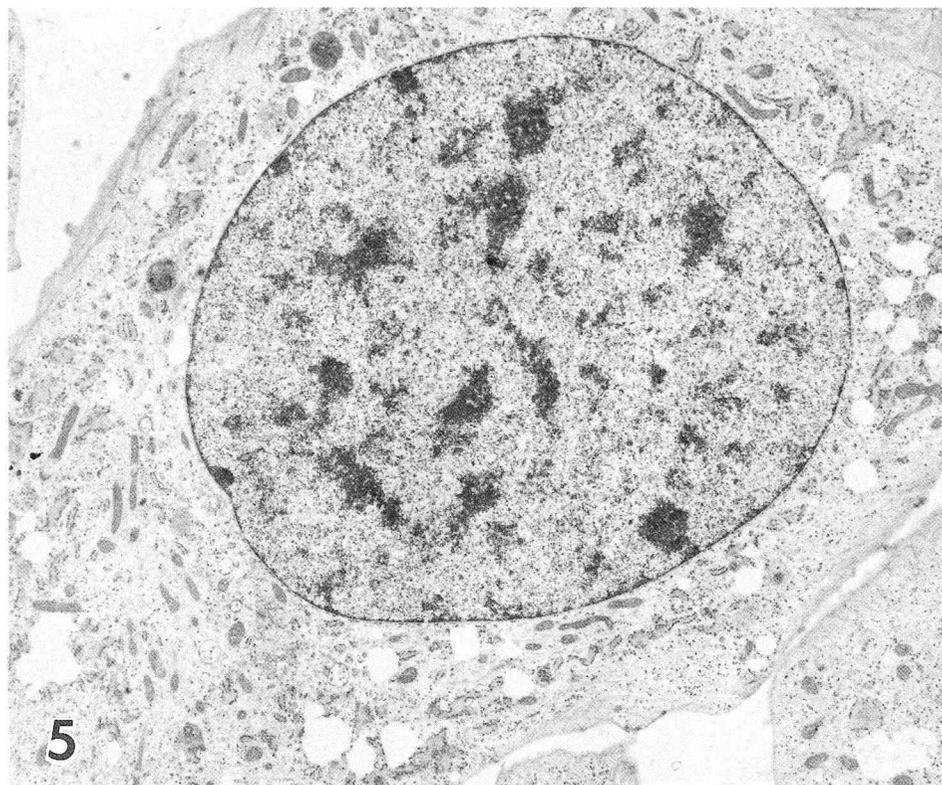


Fig. 5 : Electron micrograph of MC840106 cell line after 20th transfer generation.
The cells contained a spherical nucleus and abundant intracellular organella. $\times 4900$.

きた。この時点の細胞は2個ないし数個の核小体をもつ球形の核からなり、細胞は敷石状の配列を示す(図4)。

電顕的には球形の核を有するものが多く、細胞質には粗面小胞体、ミトコンドリアなどの豊富な細胞小器官がみられた(図5)。

図6は旋回培養の結果の電顕写真であるが、石灰化物にきわめて類似した基質の形成がみられた。この物質の本態については、正確に確かめていないのでいまのところ不明である。

初代培養と比較すると、今回の樹立細胞系は形態的にも染色体数からみてもかなり異なっている。増殖能を獲得した時点でMC840106細胞系に形質転換が生じたものと思われる。しかしながら本細胞系は染色体の核型からみてマ

ウス特有の性質は継続されていると思われる。成長曲線：90mmプラスチックシャーレー12個に 1×10^4 個の細胞を均等に播き、培養後3, 5, 7, 9日後にシャーレー3個あたりの細胞数を数え、1個あたりの平均細胞数を計測した。

その結果、培養3日では $(7.30 \pm 0.45) \times 10^4$ 、5日では $(34.20 \pm 4.75) \times 10^4$ 、7日では $(101.70 \pm 7.76) \times 10^4$ 、9日では $(59.98 \pm 10.03) \times 10^4$ 個であった。この結果は図7に示した。培養7日でシャーレー一杯に細胞が増殖し、それ以降はシャーレー面から脱落して変性に陥るものが多いので細胞数は減少する。本細胞系の倍加時間はおおよそ24時間と推定される。



Fig. 6 : Electron micrograph of MC840106 cell line by the rotation culture after 20th transfer generation. Arrow heads indicated the matrix bone resemblance to mineralized tissues. $\times 5300$.

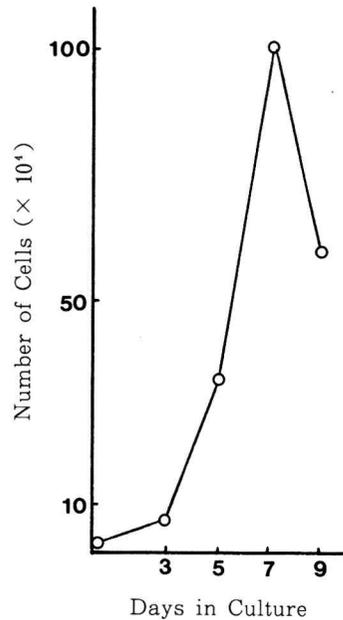


Fig. 7 : Growth of MC840106 cell line. (Inoculum 1×10^4 cells per plate)

考 察

骨組織から継代可能な骨芽細胞を分離して、これを材料にして骨形成機構を解明しようという試みが多くの研究者によってなされてきた。しかしながら骨組織が heterogenous な組織から成り立っているために、骨形成能を十分に保持した単一の細胞系を樹立することはきわめて難しい。

William(1980)⁶⁾らは成体ラットの頭蓋冠から樹立した細胞株を用いて *in vitro* で石灰化を報告した。しかしながらこの細胞系は継代とともに PTH, PGE₂ に対する応答性は減少していくようである。また、電顕的に骨形成の形態を示しているがコラーゲン質との関係が不明確である。

Kodama(1981)³⁾ら, Sudo(1983)⁴⁾らは新生仔マウスの頭蓋冠より分離, クローン化した骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞株が *in vitro* で石灰化することを報告した。この細胞は $6 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度に達すると, 細胞の増殖がいったん停止したようになり, その後数層に重なり合うように増殖を続け結節状に厚く盛り上がってくる。

培養30日頃からこの結節中央部のコラーゲン原線維上に膜性様の骨化が生じてくる。線維上に沈着した結晶成分はカルシウムとリンとから成り, その比はヒドロキシアパタイトに極めて近値していると報告している。この細胞株は現在も依然として石灰化能を保持しており, *in vitro* で石灰化能を有する唯一の細胞株と思われる。

今回、我々が樹立したMC840106細胞系は静置培養では明瞭な石灰化能はみられない。この細胞系を旋回培養に移すと一部に石灰化様の構造が認められた(図6)。しかしながら、この石灰化構造物が真の石灰化を示しているのかどうかについては、今後の検討が必要であると考えている。

今回樹立した細胞系については、クローニングを行って石灰化能を有する細胞株の樹立が可能であるか、あるいはホルモン応答性など、今後に残された課題があり、これらの点に関して

はこれから検討していきたいと考えている。

ま と め

1. マウス胎仔頭蓋冠より継代可能な細胞系を分離した。
2. 樹立した細胞系の染色体はモード68本で、核型はアクロセントリックなマウス特有の染色体からなるが、1本のみ大型のメタセントリックな染色体を有している。
3. 現時点では明瞭な石灰化能は認められない。

Abstract : A new cell line (MC840106) was established from the fetal mouse calvaria. It grew as monolayers. The modal chromosome number of MC840106 cells was 68, which was 66% of the total population of these cells.

The karyotypes of these cells consisted of typical acrocentric chromosomes and only one large metacentric chromosome.

文 献

- 1) Gey, G.O., Coffman, W.D. and Kubicek, G.D. : Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12:264-265, 1952.
- 2) Moscona, A. and Moscona, H. : The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J. Anat.* 86:287-301, 1952.
- 3) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.* 23:899-901, 1981.
- 4) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. : *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96:191-198, 1983.
- 5) Leavan, A., Hsu, T. C. and Stich, H.F. : Idiogram of the mouse. *Hereditas.* 48:676-687, 1962.
- 6) William, D.C., Boder, G.B., Toomey, R. E., Paul, D.C., Hillman, Jr.C.C., King, K. L., Van Frank, R.M. and Johnston, Jr.C. C. : Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. *Calcif. Tissue Int.* 30:233-246, 1980.