

走査電子顕微鏡による培養歯胚の観察

名 和 橙黄雄 石 関 清 人 立 花 民 子

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座*

〔受付：1978年10月11日〕

抄録：生後3日～5日マウスの下顎臼歯歯胚を摘出し，器官培養と一部は上皮性組織と間葉性組織に分離しフィルターの上側に貼布して培養を試みた。

器官培養の場合はエナメル芽細胞の変性はきわめて早期に現われた。一方象牙芽細胞の変性はエナメル芽細胞より遅れて現われ，象牙前質に相当する部位はコラーゲン様の網状構造からなり，象牙芽細胞の微細な突起との絡み合いがみられ，象牙芽細胞と象牙質基質形成との直接的関連がうかがわれた。しかしながら培養以前に形成されていた基質にどの程度培養によって基質が添加されたかは，本実験では不明で，少なくとも培養による既存基質の石灰化の促進は認められなかった。フィルター培養の場合は器官培養に比較してエナメル芽細胞は長期間生存するが細胞の丈がきわめて高いのが特徴的で，分泌様の形態もみられたが，基質形成は認められなかった。

動物組織の体外培養の歴史のなかで最初の足跡を残したのは Harrison (1907)¹⁾ で，その後組織培養の技術的改良も加わって，組織培養の研究は飛躍的に発展し，現在では組織学，細胞学，腫瘍学，遺伝学等への応用には著しいものがある。

一方，口腔領域における組織培養の先駆的な仕事は我が国の Mitsuda (1923)²⁾，Yumikura (1925)³⁾ によって行われたが，当時の興味を中心はやはり歯胚の分化にあったと思われる。歯胚を培養して歯を形成させるという最初の試みは Pinkerton and Boyle (1935)⁴⁾ によるネコ歯胚を用いたものであり，その後，有名な Glasstone (1936)⁵⁾ のラット歯胚の研究等がみられる。しかしながら，当時の研究の主流は歯胚の移植実験であり，Szabo (1954)⁶⁾ が初めて液体培地を用いてマウス歯胚の培養を行っている。組織培養による pre-enamel, pre-dentine の報告は Hay (1961)⁷⁾ によるものが

最初であるが，その後の基質形成に関する報告は数も少なく，in vitro における石灰化の報告はほとんどみられないのが現状である。

我々も歯胚の培養を行って，特に細胞の分化を中心に研究を進めてきたが歯胚構成細胞の変性がきわめて速く，基質形成を確認するに至らなかった。それらの一連の経過を走査電子顕微鏡で観察したので報告する。

材料及び方法

生後3～5日目の新生仔マウス（雌雄の別なく）の下顎を解剖顕微鏡下で摘出し，ハンクス液（0.6mg/ml，カナマイシン含有）でよく洗浄後，未萌出臼歯（M1）を取り出し歯胚全体をカバーガラス上に貼付して器官培養を行い，一部は上皮性組織と間葉性組織を分離しミリポア・フィルター（HAWP）の上下に貼布して培養を行った。標本はシャーレーに入れ，仔牛血清10%を含むイーグルMEM（ニッサン）を加え

Scanning electron microscopic observations on the tooth germs in tissue culture

Tokio NAWA, Kiyoto ISHIZEKI and Tamiko TACHIBANA (Department of Oral Anatomy, Iwate Medical University School of Dentistry, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 3 : 237-245, 1978

て炭酸ガス培養を行った。培養3日～3週後に標本をハンクス液で十分に洗浄，2.5%グルタルアルデヒド (cacodylate buffer, pH 7.4) で1時間固定，1%オスミウス酸で1時間の後固定を行った。固定後カバーガラスはダイヤモンドペンで電顕用試料台の大きさに切断した。標本はアルコールで脱水，酢酸イソアミルを通して，炭酸ガスで臨界点乾燥を行った。イオンスパッタリング装置で金蒸着を施したのち，日立HSM-2B型走査電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. エナメル芽細胞

In vitro におけるエナメル芽細胞の形態変性は早いものでは培養3日目に出現した。細胞変性の特徴としては長円柱形細胞の短縮化がまず最初に出現し，培養一週間で図1のごとく，細胞体が著しく短縮し，長い細胞突起をエナメル側に出して，あたかも精子様の形態を示す例もみられたが大多数のエナメル芽細胞は細胞体が球形になり，エナメル質のトームス窩に落

ちこんだようになって変性に落ちいる。図2はその例で一部はすでに変性して培養液中に遊離したものと思われる。エナメル芽細胞は上記のごとく比較的早期に変性を示したが，長期間生存した例では逆にエナメル芽細胞の丈が非常に高くなっているのが特徴的であった。図3-4がその例で，細胞の丈がきわめて高くエナメル質側に突起を出して植立し，細胞表面には多数の微細な突起と小型の胞状突起がみられ，あたかも分泌を想定させるかのごとき像を呈するが，分泌形態なのか，変性像なのか，詳細なことは目下の所不明である。図5は培養18日目の歯根側の割断像である。エナメル芽細胞が象牙質に接している部位で，エナメル芽細胞は比較的原型に近い形態を保持し，象牙質面に多数の突起を出し，それに混在して針状の構造物らしきものがみられるが，エナメル質基質の分泌物か，割断の際の混入か，この図からは明確ではない。

2. エナメル質表面

図6A-Dは生後5日マウス培養18日目でエ

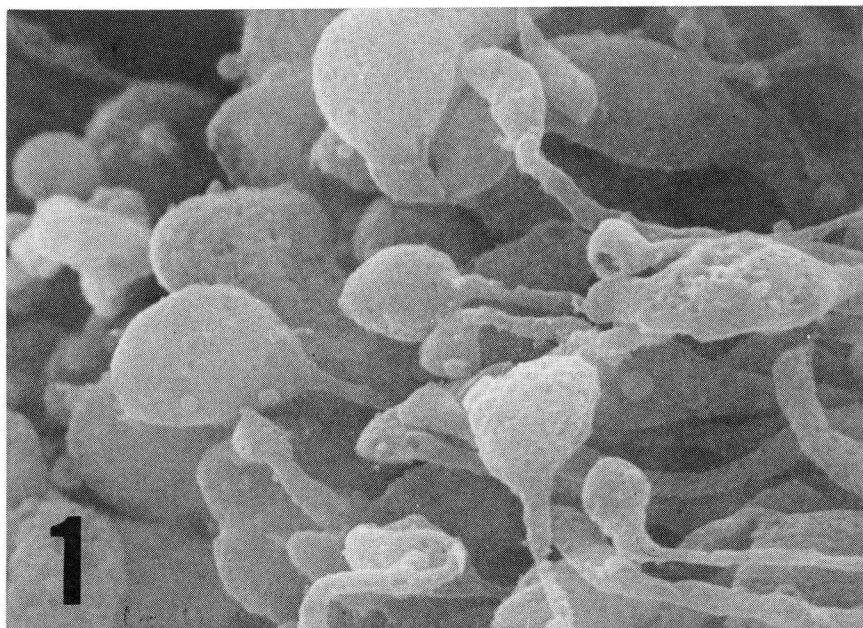


図1 生後3日マウス，培養7日。×4,000
エナメル芽細胞の胞体は著しく短縮し，細長い突起を出して，あたかも精子様の形態となってエナメル側に植立している。

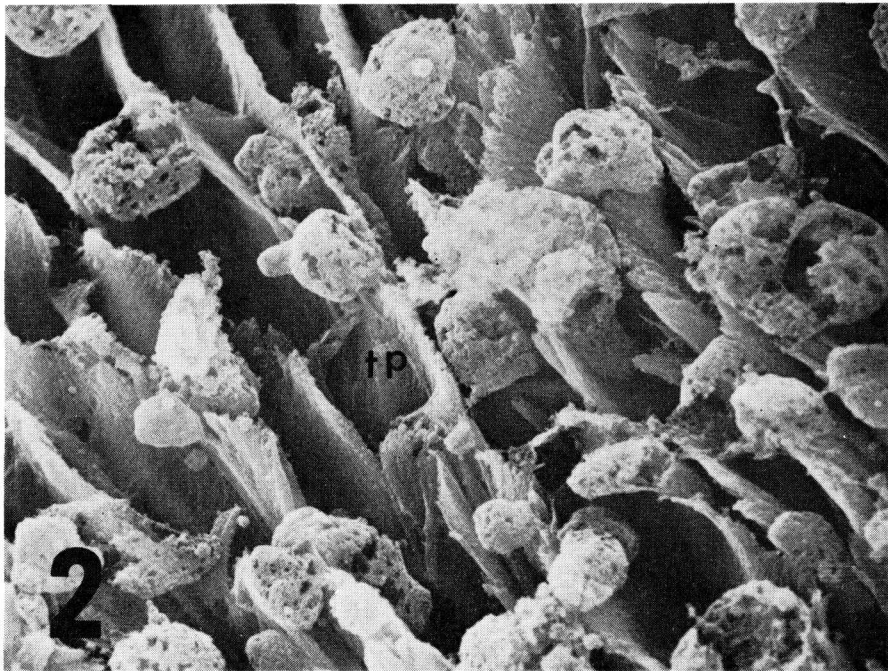


図2 生後3日マウス. 培養14日. $\times 4,000$
エナメル芽細胞は小型球形に変性し, トームス突起窩 (tp) に落ちこんでいる。

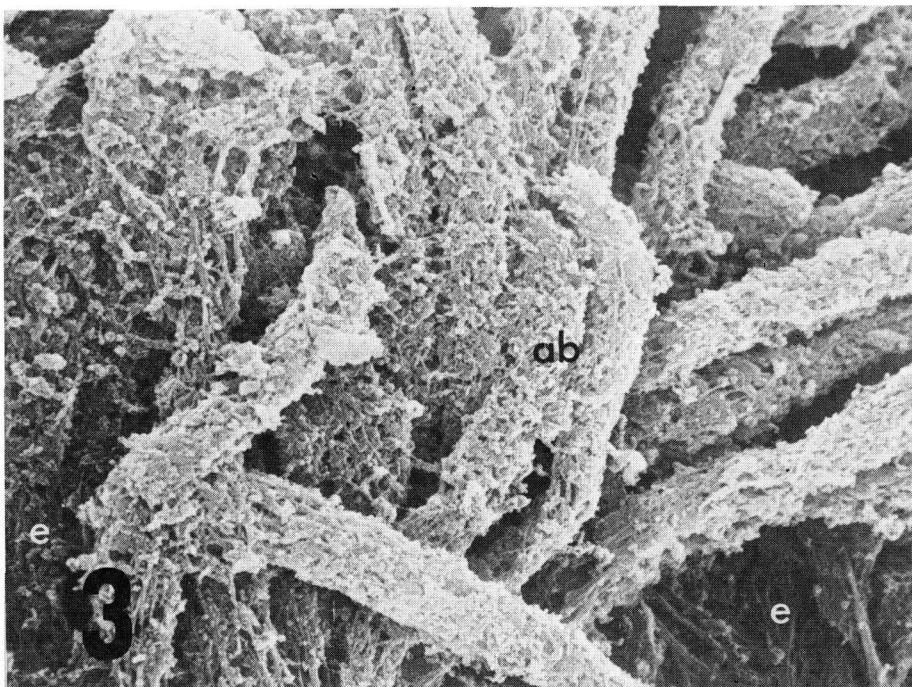


図3 生後3日マウス. 培養7日. $\times 4,000$
培養7日目で比較的エナメル芽細胞 (ab) の原型を保持している例であるが, 細胞の丈が高くなっているのが特徴である。e : エナメル側

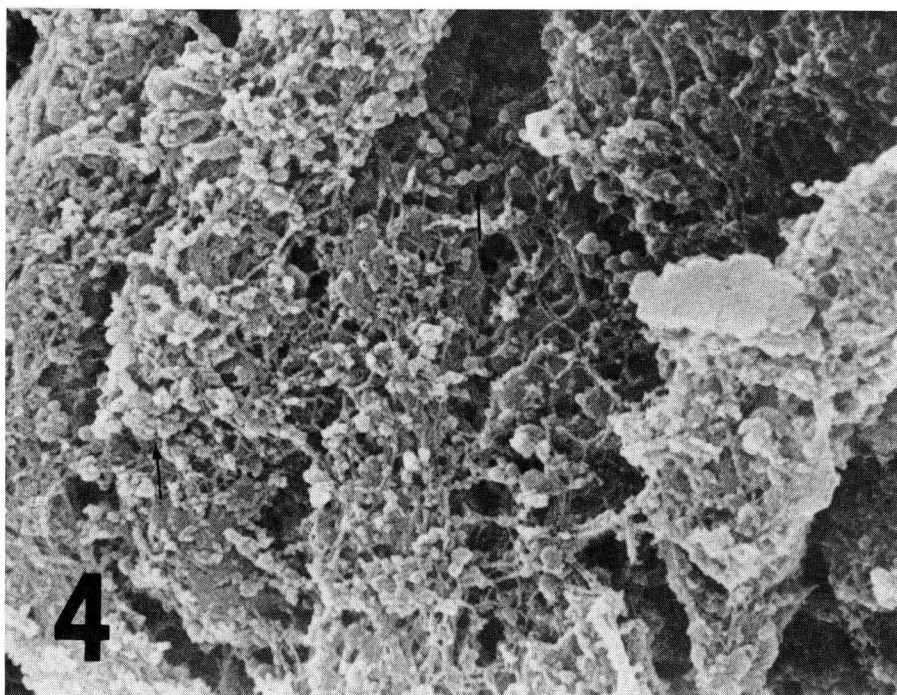


図4 図3の強拡大. $\times 10,000$
 エナメル芽細胞表面は微細な突起と胞状の突起(矢印)からなり, 分泌を想定させるかのごとき構造を示す。

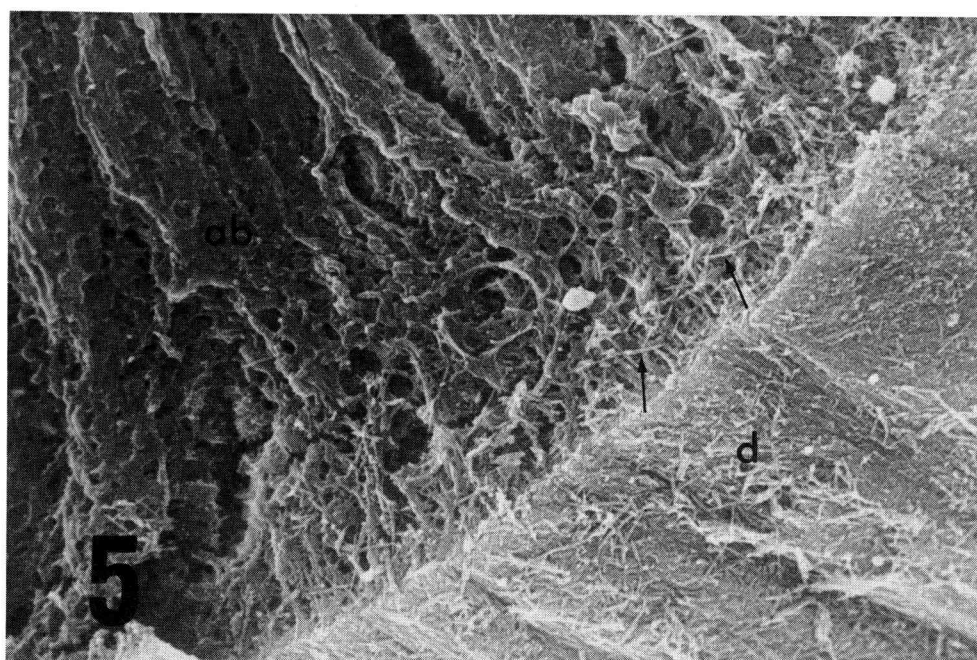


図5 生後3日マウス, 培養18日. $\times 4,000$
 エナメル芽細胞(ab)が象牙質(d)に接している部位の断面で, エナメル芽細胞は多数の突起を象牙質側に出し, その中に針状の構造物(矢印)らしきものが混在してみられる。

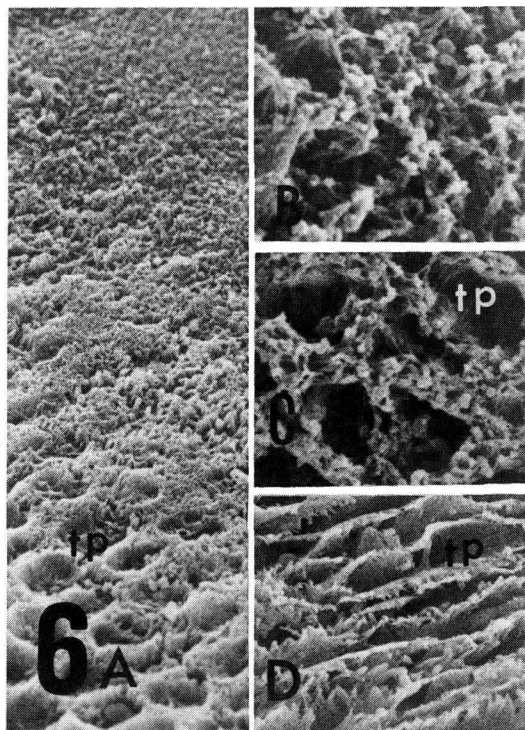


図6 生後5日マウス. 培養18日

- A : トームス突起窩 (tp) の形成が始まった部位を示し, 上部は歯根側, 下方は咬頭側。
×2,000
- B : 歯根側の強拡大で表面は線維状をなしている。
×4,000
- C : トームス突起窩 (tp) の形成初期でBより進んだ状態を示す。
×4,000
- D : 咬頭側でトームス突起窩 (tp) は層状構造をなし, Cに比較して石灰化が進んでいるように思われる。
×2,000

ナメル芽細胞は除去してある。図6 Aはトームス突起窩の形成が始まった部位を示し, 図の上方はエナメル芽細胞が象牙質に接する部位と思われトームス突起窩は認められず表面は凸状で線維状の構造をなしている (図6 B)。生後5日のマウスではエナメル側象牙質の石灰化はかなり進行しているので, この線維状構造はエナメル質基質分泌の初期を示しているのではないかと考えている。基質分泌の進行にともなってトームス突起窩が形成され (図6 C), さらに図6 Dの部位ではエナメル質の層状構造がみられ石灰化の進行を思わせる。しかしながら, 培養以前にすでに一部エナメル質基質形成が行わ

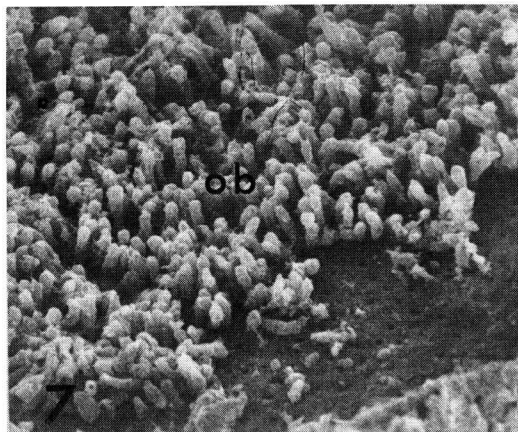


図7 生後5日マウス. 培養7日. ×400
象牙芽細胞 (ob) はエナメル芽細胞に比較して変性が少なく, 細胞表面は平滑である。

れているので, 培養によってどの程度の基質形成が追加されたか, 本研究では明らかではなく, 培養期間を通して上記構造の石灰化の進行はほとんど認められなかった。

3. 象牙質

器官培養の場合, 象牙芽細胞はエナメル芽細胞に比較して細胞変性の時期はかなり遅れる。図7は培養一週間の状態であるが, 短円柱形の象牙芽細胞が多数植立しているのがみられ, 細胞表面はエナメル芽細胞に比較して平滑である。図8 Aは図7の強拡大であるが象牙質は網状線維構造からなり, それらが象牙細管を取巻いている。図8 Bはその断面で象牙質は網状線維構造からなり, おそらくこの部位は象牙前質かと思われる。一部にこの網状の線維と象牙芽細胞の細かい突起が互いに絡み合っている構造がみられ, 基質分泌の最先端部に相当する部位と思われる。

図9は同様部位の培養18日目のものであるが, 一部に横紋様の構造がみられ, 培養一週間の構造とほとんどかわらず石灰化の進行は認められない。

4. ミリポア・フィルターによる培養

上皮性組織と間葉性組織とを分離し, フィルターの両側に各々の組織を貼布して培養した場合, エナメル芽細胞は器官培養に比較して長期

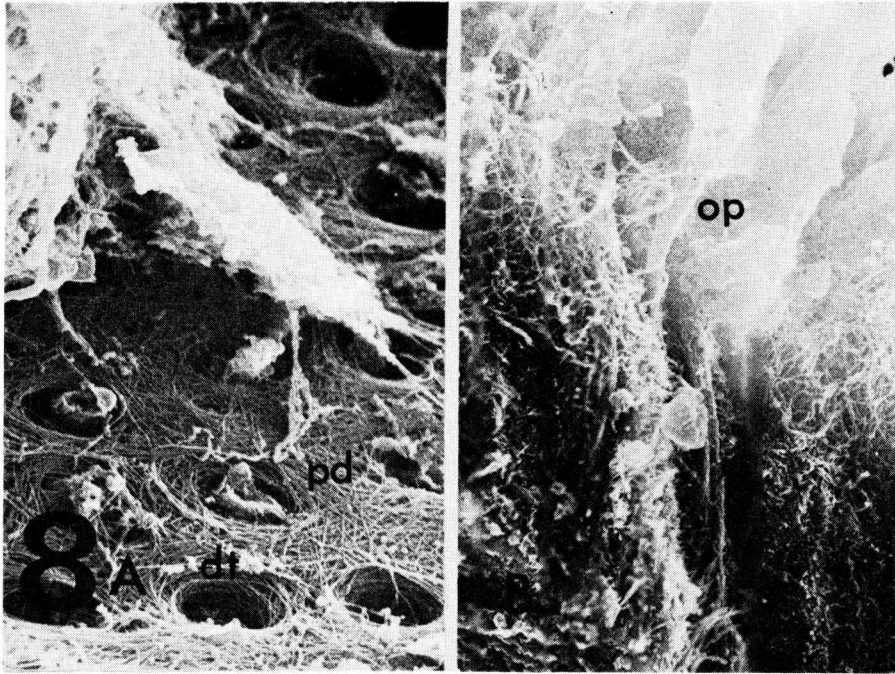


図8 A : 図7の強拡大で象牙芽細胞の植立している象牙質表面(象牙前質pd)は線維の網状構造からなり、それらが象牙細管(dt)を囲んでいる。
×4,000
B : 図Aの切断面で象牙芽細胞の突起(op)と基質線維構造との絡み合いがみられる。
×2,000

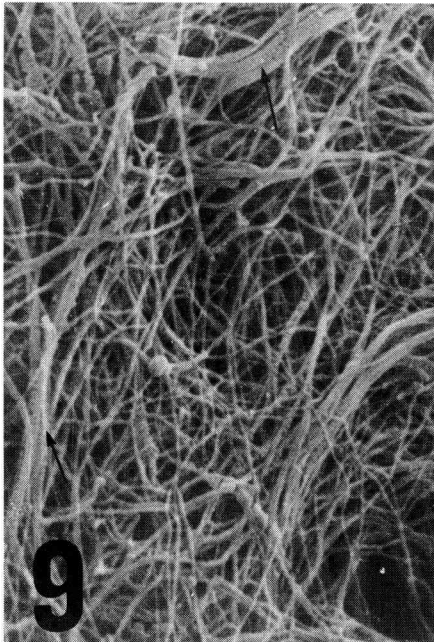


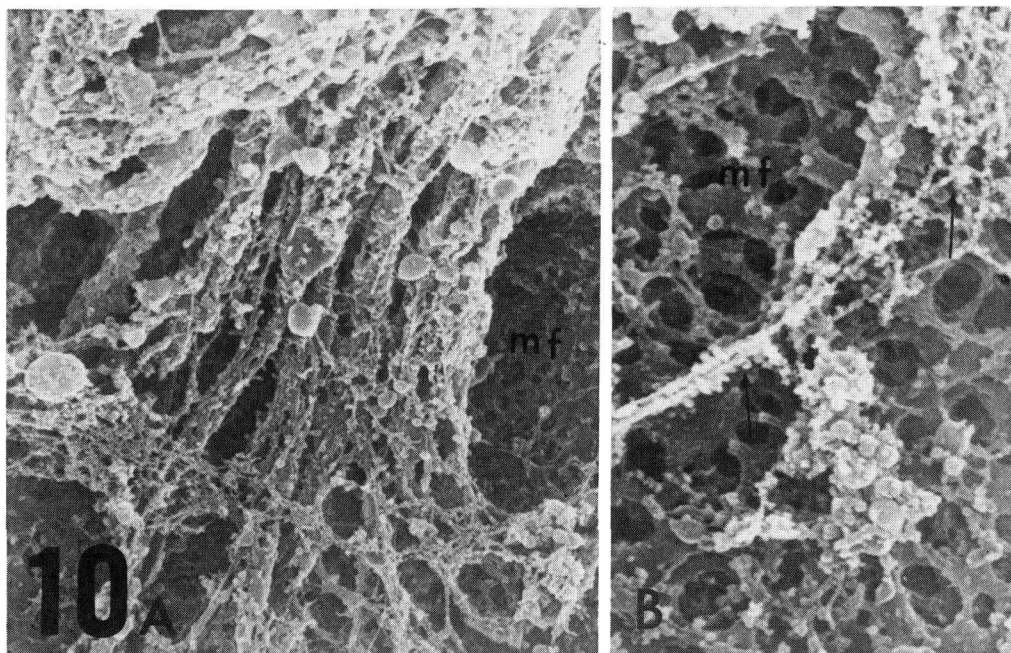
図9 図8と同様部位の培養18日目のものであるが石灰化の進行は認められず、線維構造の一部に横紋がみられる(矢印)。×10,000

間生存した。細胞の形態は器官培養と基本的には同じで、細胞の丈がきわめて高く、フィルター上に突起を出し、細胞表面には多数の突起と小型胞状突起が認められる(図10A)。

図10Bはフィルター上の細胞突起の強拡大を示すが、エナメル芽細胞の細長い突起上に微細な多数の胞状突起がみられ分泌を想定させるが培養二週間後においても分泌物らしき沈着物を確認するに至っていない。

考 察

液体培地を用いた Szabo (1954) のマウス歯胚培養の報告に次いで Lefkowitz ら (1954)⁸⁾ はマウス臼歯歯胚をカレル瓶で培養し、歯胚組織周囲からの遊走細胞について報告している。歯胚組織からのエナメル芽細胞の遊走については Niizima (1956)⁹⁾ の位相差顕微鏡映画による報告があり、さらに Nawa ら (1978)¹⁰⁾ の走査電子顕微鏡による遊走過程の詳細な報告がみ



A 図10 上皮性組織と間葉性組織をフィルターを境にして培養した例
A : エナメル芽細胞は多数の突起をフィルター上 (mf) に出し, 細胞表面は図3と同様であるが細胞の丈は著しく高くなっている。培養18日。
 ×4,000
B : Aの強拡大で, エナメル芽細胞の突起表面には多数の胞状突起 (矢印) がみられ, 分泌を想定させるが, 基質分泌らしきものは確認されない。
 ×10,000

られる。

一方, 培養による基質形成については Hay (1961) の報告以後は Koch (1965)¹¹⁾ がマウス胎仔切歯歯胚で Wiggelesworth (1968)¹²⁾, Wiggelesworth and Hayward (1973)¹³⁾ がラット胎仔切歯歯胚で象牙質, エナメル質両基質形成と石灰化について報告している。これらの歯胚培養による基質形成の研究と並行して, 歯胚構成成分の上皮性と間葉性組織とを分離して培養を行い, 両者間の相互関係を解明せんとする試みがなされてきた。

Koch (1967)¹⁴⁾ はマウス胎仔切歯歯胚をトリプシンとパンクレアチンで上皮性と間葉性組織に分離し, 別々に培養すると両者ともに分化しないが, フィルターを境にして再接着することにより両組織はエナメル芽細胞と象牙芽細胞に分化し, 基質形成も行われたと報告している。このようにエナメル芽細胞と象牙芽細胞の分化

には両組織の相互作用が必要であり, Koller (1970)¹⁵⁾ によると分化の誘導作用は間葉性組織側に存在し, Wolters (1978)¹⁶⁾ は間葉性組織の分泌物であるコラーゲンの存在が誘導作用に重要であることを報告している。しかしながら, 先に述べたように歯胚の培養に関する研究は培養全体の研究からみて非常に遅々としていて, 特に *in vitro* における pre-enamel, pre-dentine の形成等に関する報告はきわめて少なく, その結果も形態学的にみて不完全なものが多いのが現状である。

組織培養による歯胚の分化あるいは基質形成のいずれの研究においても, 細胞成分をいかにして正常な状態で長期間培養を継続するかが最大の課題であり, 我々の報告を待つまでもなく, 現時点では歯胚の長期的培養は不可能で, たまたま長期培養ができてはいても早晚細胞変性は免れ難く, この点で歯胚の培養は一つの壁につ

きあっていると思われる。近年 Levenson (1976)¹⁷⁾ が ascorbic acid 添加培養例で長期間の歯胚形態保持を報告し、ある意味で一つの手懸りを投げかけた。今回の我々の研究における結果が培養法自体に存在するのかどうか目下の所、明らかではないが、今後いろいろと検討しなければならない問題が多数存在し、これからの研究の進行が楽しみであると同時に、この方面での研究発展を期待してやまない。

結 論

- 1 器官培養ではエナメル芽細胞の変性はきわめて早期に出現するが、象牙芽細胞ではかなり遅れて変性が始まる。
- 2 象牙前質に相当する部位はコラーゲン様の

網状構造からなり、象牙芽細胞の突起との絡み合いがみられ、象牙質基質形成との直接的関連がみられた。しかしながら線維構造の一部が培養によって追加されたという直接的証明は得られず、大多数は培養以前に形成されたものと思われ、培養期間を通じて線維構造の石灰化の進行はみられなかった。

3 上皮性組織と間葉性組織をフィルターを境として培養した場合は、エナメル芽細胞は器官培養に比較して長期間生存したが基質形成は認められなかった。

(本論文の要旨は、昭和53年10月7日、日本解剖学会第24回東北・北海道連合地方会一郡山一において発表した)

Abstract : First molar tooth germs were dissected from mandibles of 3- and 5-day-old infant mice. Freshly dissected tooth rudiment were cultivated by means of organ culture and transfilter method. In organ culture, ameloblasts degenerated in early stage, but the degeneration of odontoblasts appeared in late stage as compared with that of ameloblasts. During organ culture, we could not recognize a progressive calcification of dental matrices which had been deposited prior to cultivation or newly deposited dental matrices.

On the other hand, in transfilter experiments ameloblasts survived for a long time as it compared with organ culture. The fine structure of ameloblasts attached onto a membrane filter presented an secretory like appearance. However, a secretion of enamel matrix was not observed up to date.

文 献

- 1) Harrison, R. G. : Observations of the living developing nerve fibers, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 4 : 140-143, 1907
- 2) Mitsuda, T. : Über die Beziehungen zwischen Epith- und Bindegewebe bei Transplantation und Explantation, *Virchows Archiv.* 242 : 310-344, 1923
- 3) Yumikura, S. : Auspflanzungsversuche mit Schneidezähnen (Kaninchen), *Virchows Archiv.* 254 : 17-55, 1925
- 4) Pinkerton, H. and Boyle, P. E. : Cultivation *in vitro* of tissue removed from the enamel organ and dental pulp, *J. dent. Res.* 15 : 221, 1935
- 5) Glasstone, S. : The development of tooth germs *in vitro*, *J. Anat.* 70 : 260-266, 1936
- 6) Szabo, G. : Studies on the cultivation of tooth "*in vitro*", *J. Anat.* 88 : 32, 44 1954
- 7) Hay, M. F. : The development *in vivo* and *in vitro* of the lower incisor and molars of the mouse, *Arch. oral Biol.* 3 : 86-109, 1961
- 8) Lefkowitz, M., Mardfin, D. F. and Bodecker, D. F. : Cultivation of rat molar tooth germs in Carrel flasks, *J. dent. Res.* 33 : 189-200, 1954
- 9) Niizima, M. : Enamel epithelium in tissue culture, *Amer. J. Anat.* 99 : 351-389, 1956
- 10) Nawa, T., Ishizeki, K. and Tachibana, T. : Scanning electron microscopic observations of tooth germ in tissue culture with special reference to the migration of epithelial cells, *Arch. histol. jap.* 41 : 157-165, 1978
- 11) Koch, W. E. : *In vitro* development of tooth rudiments of embryonic mice, *Anat. Rec.* 152 : 513-524, 1965
- 12) Wigglesworth, D. J. : Formation and mineralization of enamel and dentine by rat tooth germs *in vitro*, *Exp. Cell Res.* 49 :

211-215, 1968

- 13) Wigglesworth, D. J. and Hayward, A. F. : The ultrastructure of dentinogenesis and amelogenesis in rat molar tooth germs grown as organ cultures *in vitro*, *Z. Zellforsch.* 138 : 171-186, 1973
 - 14) Koch, W. E. : *In vitro* differentiation of tooth rudiments of embryonic mice. 1. Transfilter interaction of embryonic incisor tissues, *J. Exp. Zool.* 165 : 155-170, 1967
 - 15) Koller, E. J. and Baird, G. R. : Tissue interactions in embryonic mouse tooth germ
- II. The inductive role of the dental papilla, *J. Embryol. exp. Morphol.* 24 : 173-186, 1970
- 16) Wolters, J. M. L. : The transfilter transmission of [H^3]-proline labelled material in cultured rat tooth germs, *Arch. oral Biol.* 23 : 51-55, 1978
 - 17) Levenson, G. E. : Effect of ascorbic acid deficiency on mouse second molar tooth germs cultivated *in vitro*, *J. Embryol. exp. Morphol.* 36. 73-85, 1976