原 著

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

名 和 橙 黄 雄 石 関 清 人
坂 倉 康 則 立 花 民 子

岩手医科大学歯学部 口腔解剖学第二講座*

〔受付：昭和55年3月17日〕

抄録：胎生18日マウスの下顎臼歯歯胚を摘出しミリポアフィルター上に貼布して培養を行った。培養初期のものでは内エナメル上皮は立方形、歯乳頭の間葉細胞は紡錘形といずれも未分化な形態を呈し、両者の間には直線的な基底膜がみられるが基底膜より放散する細線維の少ないのがこの時期の特徴である。培養日数の増加とともに内エナメル上皮は急速に丈を増して高円柱状へと移行していくがこの時期に一致して基底膜より放散する細線維が増加し、同時に紡錘形の間葉細胞も立方形へと分化の進展がみられてくる。このような細線維は基底膜の消失とともに不明瞭になってくるが最終的には基質形成への置換の可能性が推測される。

基底膜と細線維は細胞の分化誘導に十分関与している可能性が考えられるが、両細胞間を隔てる距離も分化誘導の重要な要素とみることができる。

緒 言

歯胚の分化は歯胚を構成する上皮性成分と間葉性成分の相互作用 (epithelial-mesenchymal interaction) によって行われることが知られている。この相互間の分化誘導の情報は上皮と間葉の間に存在する基底膜を介して交換されることになり、この基底膜が歯胚の分化あるいは基質形成等に関与している可能性が推測され Orban (1944)¹⁾ がすでにその可能性を示唆していた。

その後、電子顕微鏡の発達にともなって基底膜の構造が明らかにされ Takuma (1967)²⁾ のヒト歯胚の報告によると基底膜は明帯と暗帯とから成り、内エナメル上皮分化とともに消失するといわれる。このような基底膜の構造は上皮と結合組織

間にみられる一般的な構造物として知られているが、基底膜直下に存在する無周期性の細線維構造物の詳細についてはあまり知られていないのが現状である。

一方、上皮と間葉の相互作用による分化誘導機構は一般に epithelial-mesenchymal system と呼ばれ、歯胚特有の現象ではなく Grobstein (1953)³⁾ の唾液腺、Zwilling (1952)⁴⁾ の肢芽、Saxén 等 (1968)⁵⁾、Lehtonen 等 (1975)⁶⁾ の腎臓などに関する報告がみられる。研究材料としてみるならば、歯胚は上皮と間葉の分離が比較的容易であり組織培養には好適の材料で培養歯胚による epithelial-mesenchymal interaction の研究がいくつか報告されている^{7,8,9)}。これらの研究によって基底膜と歯胚の分化あるいは基質形成との関連が一部明ら

Ultrastructural studies of cultured mouse tooth germs, with special reference to basal lamina and fine fibrils on the cell differentiation

Tokio NAWA, Kiyoto ISHIZEKI and Yasunori SAKAKURA (The Second Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

* 盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Jap. J. oral Biol., 22 : 357-365, 1980.

かになりつつあるが、歯胚の機能分化に関する基底膜の本態、とくに無周期性細線維の本態については依然として未解決である。

我々はこの点に注目し、歯胚分化における基底膜と無周期細線維の存在理由、機能等の解明に取り組んできたがその過程の一部で得られた結果に若干の考察を試みてみた。

材料および方法

胎生18日マウス (BALB/c) の下顎臼歯 (M1) を実体顕微鏡下で無菌的に摘出しカナマイシン含有ハンクス液に数分間浸漬後、新鮮ハンクス液で洗浄し歯胚全体をミリポアフィルター上(HAWP)に貼付しフラットシャーレーに入れて静置培養を行った。

培養液は Ham's F 12 (Flow Lab.) 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%の気相で培養を行った。

培養液は2日毎に交換し、培養後1, 4, 7, 11日に試料の付いたフィルターを取り出して固定した。

固定は2.5%グルタルアルデヒド (カコジル酸緩衝液, pH 7.4) で1時間前固定を行い、1%オスミウム酸 (同上緩衝液) で1時間の後固定を行った。固定した試料はアルコール上昇列で脱水し、QY-1を通して Epon 812に包埋した。

電顕観察前に1 μ の厚切り切片を作製しトルイジン・ブルー染色を施して検鏡し、切片上にみられた歯乳頭を髄室角から Cervical loop までを三等分し中 $\frac{1}{3}$ を観察部位としてトリミングを行い、薄切標本は酢酸ウランと酢酸鉛の二重染色を施して日本電子100B型電子顕微鏡で観察を行った。

結 果

図1は未培養の厚切りトルイジン・ブルー染色標本の光顕像であるが、胎生18日では象牙芽細胞の分化は明確でなく、したがって象牙質基質形成はみられない。マウス臼歯発生については Cohn (1957)¹⁰⁾の詳細な報告があり、M1の歯胚形成の

開始は胎生14日、象牙質基質分泌は胎生20日、エナメル質形成は生後1~2日といわれている。図1の正方形枠内は以後の観察の同部位を示している。

図2は培養24時間後の電顕像であるが歯胚の内エナメル上皮は立方形を呈し遠心端は直線的でそれに沿って走る基底膜が歯乳頭との間に形成されている。基底膜直下に存在する歯乳頭の間葉細胞は未分化な紡錘形を呈している。内エナメル上皮、間葉細胞ともに細胞小器官に乏しく形態的には未分化な状態を呈している。

図3は図2の拡大であるが基底膜は40~60nmの明帯の間隙をもって内エナメル上皮と境する25~45nmの暗帯から成る。この時期の特徴は基底膜から放射する無周期性の細線維が少なく、内エナメル上皮と間葉細胞とがきわめて接近していることである。

培養4日になると内エナメル上皮は急速に細胞の丈を増し、核も長楕円形になり細胞体は高円柱状を呈して前エナメル芽細胞への分化の進展がみられてくる。一方、歯乳頭の間葉細胞も紡錘形から立方形へと分化の進展がみられる。このように形態的にみて、細胞分化の方向が著明になる時期に一致して基底膜から歯乳頭側に向って放射する無周期性細線維の著しい増加がみられる (図4)。

図5は培養4日目の基底膜部の拡大であるが内エナメル上皮と間葉細胞は基底膜を介して750~900nmの間隙で接し、その間は基底膜より放散する網状の細線維によって占められている。細線維の増加の時期にほぼ一致して内エナメル上皮遠心端に不規則な細胞突起が出現しエナメル芽細胞への分化の進展がみられてくる。

培養7日になると細胞の分化は一段と進み、とくに前象牙芽細胞の分化が著しく多数の突起を基質分泌間隙部に伸し、同時にコラーゲンの分泌が間隙部にみられてくる。

ところが一部には培養状態に関係なく図6と7にみられるような現象がしばしばみられた。すなわち、図6にみられたごとく、内エナメル上皮の分化が進み基底膜から多数の細線維の放散がみられながら対向する間葉細胞は依然として紡錘形の未分化な形態を保持しコラーゲンの分泌の少ない場

合と図7のごとく基底膜より放散する細線維が少なくにも拘らず対向する間葉細胞の分化が著明でコラーゲン分泌の多い場合とがみられた。内エナメル上皮と間葉細胞の隔りをみてみると図6の場合は図7の約20倍であった。

基底膜より放散する細線維に関してのいくつかの報告によると、この細線維はコラーゲン線維の形成とともに増量の傾向を示し、基底膜の消失とともに不明になるので象牙質基質形成とのなんらかの関係が推測されている^{2,11,12)}。しかしながら現在のところこの細線維の増量と消失の意義については不明である。

図8は培養11日目のものであるが、この時期になると象牙芽細胞によるコラーゲン基質分泌が一段と進み、それにもなって基底膜は不明瞭になってくるが細線維は一部残存し電子密度を増してコラーゲン基質ないしはエナメル基質形成に関与している可能性が考えられる。

epithelial-mesenchymal system になんらかの役割を果していると考えられる基底膜の形成については上皮由来と間葉由来の二説があるがPierce等(1964)²⁴⁾の報告以来、上皮由来の可能性が支持される趨勢にある。

図9はミリポアフィルター (THWP) 上に歯胚の上皮性成分を反対側に間葉性成分を貼布して培養を試みた例であるが、上皮細胞とフィルターとの接面に約60nmの基底膜様の構造が認められ、歯胚の基底膜は上皮由来の可能性を支持する所見がみられた。

考 察

組織培養は胚葉器官の発生学的研究に広く応用され、特に epithelial-mesenchymal system 機構解明の有効な手段として利用されている。この方面の研究で歯胚に関してはKoch(1972)¹³⁾、Kollar(1972)¹⁴⁾、Slavkin等(1977)¹⁵⁾の詳細な報告がみられる。

Slavkin等(1968)¹⁶⁾はウサギ切歯歯胚をトリプシン処理により細胞成分をばらばらに分離して受精卵の漿尿膜上に上皮、間葉、両者混合の三種類の培養を行い、その結果上皮と間葉の単独培養では歯胚の形成はおこらず、両者の混合培養ではじ

めて歯胚形成がみられ、この時両細胞間にPAS陽性の基底膜が形成されたと報告している。同時にこの基底膜が基質形成にともなって消失していくことが知られてきた^{12,17,18,19)}。

基底膜消失の時期に関してはTakuma²⁾は石灰化開始の時点、江川(1970)²⁰⁾は少なくとも象牙前質形成以後と報告している。近年、Slavkin等(1976)²¹⁾はマウス切歯の歯胚発生で基底膜は heterotypic cell-cell contact 直前、あるいは上皮細胞の分化に先だって消失するとし、Sorgente等(1977)²²⁾によると基底膜の消失は直下に出現する間葉由来の基質小胞の作用によるもので、基底膜の消失が上皮細胞分化の引金になるといわれる。

このように細胞の分化と密接な関連を有する基底膜の由来については先にのべたように間葉由来²³⁾と上皮由来²⁴⁾とするものがあるがThesleff等(1978, 1979)^{25,26)}のマウス臼歯歯胚の培養、Alquier等(1979)²⁷⁾のブタ甲状腺の培養の結果では上皮由来を支持するものであり、我々の結果も同様の結論である。Thesleff等^{25,26)}の報告によると象牙芽細胞の分化には基底膜が必要であり、基底膜と間葉細胞の接触が象牙芽細胞分化の引金となり、両者の接触を仲介するものが fibronectin であるとされている。このように基底膜が歯胚分化に関与している可能性が十分に考えられるが基底膜と細胞分化に関する報告は意外に少なく、特に基底膜より放散する無周期性細線維に関しての報告はほとんどみられていないのが現状である。

本研究に示されたごとく、上皮細胞と間葉細胞の未分化な時期には細線維が少なく内エナメル上皮の高円柱化にともなってこの細線維が増加し同時に紡錘形の間葉細胞も立方形へと象牙芽細胞への分化の進展がみられてくる。歯胚にみられる細線維の増加と基底膜消失にともなう細線維の不明瞭化の傾向は他の組織にはみられない歯胚特有の現象とみることができる。

この細線維の運命については象牙質基質への置換²⁾、エナメル芽細胞による摂取消化²⁸⁾等が推測されているが我々の得た知見では細線維の消失は基底膜の消失よりも遅れ、象牙質基質への置換の可能性が十分に考えられる。しかしながらエナメル基質形成との関連を十分に払拭することができ

ずこの点に関しては今後の課題にしていきたい。

Slavkin 等¹⁵⁾の報告によるとこの細線維はコラーゲン感受性があり前象牙芽細胞の分化に先立って内エナメル上皮によって形成され、隣接する間葉細胞に対してコラーゲンの分泌を指示する鋳型として働くといわれる。一方、Sanders (1979)²⁹⁾は鶏胚の胚盤にみられる基底膜の形成を観察し hyaluronic acid 処理で基底膜に乱れが生じその中に酵素抵抗性の細線維がみられ、これがコラーゲンの前駆物質ではないかと論じている。この細線維が我々の観察している無周期性細線維と同一のものであるかどうかは検討の必要があると考えている。

図7にみられた所見は Slavkin 等¹⁵⁾の細線維がコラーゲン分泌指示の鋳型になるという見解と矛盾するように思われるが、Koch⁸⁾のミリポアフィルターを用いた実験によると両側に貼布した細胞の分化はフィルターの厚さに影響され、厚さが70 μ を越えると細胞の分化が阻害されるという結果からみて内エナメル上皮と間葉細胞間の距離が分化誘導の一つの条件とみられ、図7の場合もこの範疇の結果ではないかと考えている。

いずれにしても歯胚分化については未解決の問題が多く、基底膜と細線維の機能についてはいまだ憶測の域を脱しえないが、両者が協同して歯胚構成細胞の分化誘導あるいは基質形成になんらか

の役割を果している可能性が十分に考えられる。

結 論

胎生18日マウス歯胚を培養し、内エナメル上皮と間葉との間に形成される基底膜とそれに付随する細線維の存在意義を歯胚分化の観点から検討した。

1. 培養初期の内エナメル上皮と間葉細胞はともに形態的には未分化な状態を呈している。基底膜は内エナメル上皮遠心端に沿って直線的に配列しているが基底膜より放散する細線維のきわめて少ないのがこの時期の特徴である。

2. 内エナメル上皮の高円柱化にともなって細線維が増加し、同時に紡錘形の間葉細胞も立方形になり分化の進展がみられてくる。

3. 細線維は基底膜の消失にともなって配列が乱れ不明瞭になってくるが、最終的には基質形成への置換の可能性が考えられる。

4. 基底膜は上皮由来の可能性が大である。

5. 細線維は細胞の分化誘導に十分関与している可能性が考えられるが、上皮細胞と間葉細胞間の距離も分化誘導の要素とみることができる。

本論文の要旨の一部は第21回歯科基礎医学会総会（昭和54年8月26日、札幌）において発表した。

Summary: Lower first molar from 18-day-old mouse embryos were used. After one-day cultivation, both inner epithelia and mesenchymal cells were regarded as undifferentiated appearance and then matrix deposition did not see intermatrix space. The existence of basal lamina was confirmed, but the fine fibrils perpendicular to basal lamina was not recognized in this stage.

However, these fine fibrils had a tendency to increase together with the time of cultivation and the transformation of inner enamel epithelia. Ultimately, it would seem that fine fibrils were included in matrix formation.

Basal lamina and fine fibrils seem to be a prerequisite for epithelial-mesenchymal interaction. Similarly, the distance between basal lamina and mesenchymal cells suggest to play a significant role for epithelial-mesenchymal interaction.

文 献

- 1) ORBAN, B.: Oral histology and embryology. 119, C. V. Mosby Co., St. LOUIS, 1944.
- 2) TAKUMA, S.: Ultrastructure of dentinogenesis. In "Structural and chemical organization of teeth, Vol. 1.", edited by Miles, A. E. W., 325-370, Academic Press, New York, 1967.
- 3) GROBSTEIN, B.: Epithelio-mesenchymal specificity in the morphogenesis of mouse submandibular rudiment *in vitro*. *J. Exp.*

- Zool.*, 124 : 383-413, 1953.
- 4) ZWILLING, E.: Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. II. Experimental limb duplication. *J. Exp. Zool.*, 132 : 173, 1956.
- 5) SAXÉN, L., KOSKIMIES, O., LAHTI, A., MIETTIEEN, H., RAPOLA, J. and WARTIOVAARA, J.: Differentiation of kidney mesenchyme in an experimental model system. In "Advance in morphogenesis" edited by ABERCROMBIE, M., BRACHET, J. and KING, T. J., 251, Academic Press, New York, 1968.
- 6) LEHTONEN, E., WARTIOVAARA, J., NORDLING, S. and SAXÉN, L.: Demonstration of cytoplasmic processes in Millipore filters permitting kidney tubule induction. *J. Embryol. exp. Morphol.* 33 : 187-203, 1975.
- 7) KOCH, W. E.: *In vitro* development of tooth rudiments of embryonic mice. *Anat. Rec.* 152 : 513-524, 1965.
- 8) KOCH, W. E.: *In vitro* differentiation of tooth rudiments of embryonic mice. I. Transfilter interaction of embryonic incisor tissues. *J. Exptl. Zool.* 165 : 155-170, 1967.
- 9) WIGGLENSWORTH, D. J.: Formation and mineralization of enamel and dentine by rat tooth germs *in vitro*. *Exp. Cell. Res.* 49 : 211-215, 1968.
- 10) COHN, S. A.: Development of the molar teeth in the albino mice. *Amer. J. Anat.* 101 : 295-359, 1957.
- 11) NOBEL, H. W., CARMICHAEL, A. F. and RANKINE, D. M.: Electron microscopy of human developing dentine. *Arch. oral Biol.* 7 : 395-399, 1962.
- 12) REITH, E. J.: The early stage of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *J. Ultrastruct. Res.* 17 : 503-526, 1967.
- 13) KOCH, W. E.: Tissue interactions *in vitro* odontogenesis. In "Developmental aspects of oral biology" edited by SLAVKIN, H. C. and BEVETTA, L. A. 151-164, Academic Press, New York, 1972.
- 14) KOLLAR, E.: Histogenetic aspects of dermal-epidermal interactions. In "Developmental aspects of oral biology" edited by SLAVKIN, H. C. and BAVETTA, L. A. 125-149, Academic Press, New York. 1972.
- 15) 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. 29-46, Raven Press, New York, 1977.
- 16) SLAVKIN, H. C., BEIERLE, J. and BAVETTA, L. A.: Odontogenesis: Cell-cell interactions *in vitro*. *Nature*. 217 : 269-270, 1968.
- 17) 橋本 巖: ラットの歯胚における基底膜について. 口病誌, 26 : 905-915, 1959.
- 18) 桐野忠大: 歯胚の発生機構. 口病誌, 22 : 203-205, 1955.
- 19) PANNESSE, E.: Observations on the ultra-structure of the enamel organ. III. Internal and external enamel epithelium. *J. Ultrastruct. Res.* 6 : 186-204, 1962.
- 20) 江川都夫: ヒトほうろう器の電子顕微鏡的研究. 歯科学報, 70 : 803-836, 1976.
- 21) SLAVKIN, H. C. and BRINGAS, Jr. P.: Epithelial-mesenchyme interactions during odontogenesis. IV. Morphological evidence for direct heterotypic cell-cell contacts. *Develop. Biol.* 50 : 428-442, 1976.
- 22) SORGENTE, N., BROWNELL, A. G. and SLAVKIN, H. C.: Basal lamina degradation: The identification of mammalian-like collagenase activity in mesenchymal derived matrix vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 74 : 448-454, 1977.
- 23) GOEL, S. C. and JURAND, A.: Electron microscopic observations on the basal lamina of chick limb buds after trypsin and EDTA treatment. *J. Cell Sci.* 3 : 373-380, 1968.
- 24) PIERCE, Jr. G. P., BEALS, T. F., RAM, J. S. and MIDGLEY, Jr. A. R.: Basement membranes IV. Epithelial origin and immunologic cross reactions. *Amer. J. path.* 45 : 929-961, 1964.
- 25) THESLEFF, I., LEHTONEN, E. and SAXÉN, L.: Basement membrane formation in transfilter tooth culture and its relation to odontoblast differentiation. *Differentiation*. 10 : 71-79, 1978.
- 26) THESLEFF, I., STENMAN, S., VAHERI, A. and TIMPL, R.: Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Develop. Biol.* 70 : 116-126, 1979.
- 27) ALQUILIER, C., FAYET, G., HOVSEPIAN, 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.
- 28) 山 清: ヒトほうろう芽細胞の超微細構造. 歯科学報, 71 : 1531-1574, 1971.
- 29) SANDERS, E. J.: Development of the basal lamina and extracellular materials in the early chick embryo. *Cell. Tissue Res.* 198 : 527-539, 1979.

- Fig. 1 Light micrograph of un-cultured tooth germ derived from 18-day-old mouse embryo. Matrix secretion did not see in this stage. Squar frame indicates the observed position of following results. $\times 600$
dc: dental sac, oe: outer enamel epithelium, ie: inner enamel epithelium, dp: dental papilla.
- Fig. 2 Electron micrograph after one day cultivation. From the viewpoint of scanty cell organelle, both cuboid inner enamel epithelia and spindle-shaped mesenchymal cells were regarded as undifferentiated appearance. Arrow indicates the basal lamina. $\times 4,600$
ie: inner enamel epithelium, dpc: dental papillar cell
- Fig. 3 High magnification of Fig. 2. Basal lamina (arrow) composed of dense lamina and lucent lamina. Notice that basal lamina have scarcely any fine fibrils. $\times 16,000$
ie: inner enamel epithelium, dpc: dental papillar cell
- Fig. 4 Electron micrograph after 4-day cultivation. Both high columnar enamel epithelia and cuboid mesenchymal cells were more differentiable than the Fig. 2 stage. Notice the many fine fibrils perpendicular to basal lamina (arrow). $\times 4,500$
pa: pre-ameloblast, po: pre-odontoblast
- Fig. 5 High magnification after 4-day cultivation. Notice that intermatrix space was occupied with the fine fibrils. $\times 45,000$
pa: pre-ameloblast, bl: basal lamina, mf: fine fibrils.
- Fig. 6 The distal part of pre-ameloblasts after 7-day cultivation was more irregular and many fine fibrils streamed away perpendicularly to basal lamina. Although the pre-ameloblast was in more advanced stage, mesenchymal cells were undifferentiated appearance as yet. $\times 8,100$
pa: pre-ameloblast, mf: fine fibrils, dpc: dental papillar cell
- Fig. 7 Electron micrograph after 7-day cultivation. On the contrary of Fig. 6, although the pre-odontoblast secreted collagen matrix, basal lamina had scarcely any fine fibrils. $\times 23,000$
pa: pre-ameloblast, po: pre-odontoblast, bl: basal lamina, co: collagen fiber
- Fig. 8 Electron micrograph after 11-day cultivation. It indicated that fine fibrils were included in matrix formation. $\times 20,000$
ab: ameloblast, dm: dental matrix
- Fig. 9 Electron micrograph of dental epithelium and mesenchyme cultivated with interposed filter. Basement-like membrane was formed between the filter and epithelial cells. $\times 16,000$
mfl: Millipore filter