成熟ラット切歯根端部の器官培養

加賀山 学 金田 一孝二

秋田 博敏 高橋 則男

東北大学歯学部口腔解剖学第2講座

〔受付：昭和56年7月24日〕

Enamel organs of adult rat incisors in organ culture

Kagayama M., Kindaichi, K., Akita, H. and Takahashi, N.

*Department of Anatomy, Tohoku University School of Dentistry
4-1 Seiryochō, Sendai 980*

[Accepted for publication July 24, 1981]

Key words: amelogenesis / organ culture / circumfusion system / adult rat incisor

Abstract: Enamel organs of adult rat incisors containing both undifferentiated and secretory ameloblasts, were cultivated by two different methods of organ culture; a modified Trowell's method and a circumfusion system. In the former, explants were placed on the medium-gas interface and supported by a small piece of lens paper on a stainless steel grid in a culture dish. They were cultivated in Trowell's T-8 medium supplemented with 10 mM HEPES buffer gassed with 95% air and 5% CO₂. Enamel, secretory ameloblasts and cells of stratum intermedium were present in the explants for periods up to 7 days. Tomes's processes of the ameloblasts were very short and only proximal parts of processes were observed. No further survival of ameloblasts were seen with this method.

The other method was a circumfusion system originally reported by Rose with some modifications. Instead of cellophane dialysis membrane, Nuclepore filter (0.2 μ) was used as a membrane separating the explant and perfusing medium. The system contained only four chambers. The medium consisted of No. 199 supplemented with 15% calf serum and 10 mM HEPES buffer. Using this circumfusion system, enamel and secretory ameloblasts remained even on the 21th day in culture, which was the longest period in this study. The ameloblasts had typical Tomes's processes. The cells of the stratum intermedium invariably faced the filter and often showed cytoplasmic processes in the holes of the filter.

緒 言

歯胚の培養に関する研究は数多く、細胞分化における上皮と間葉との相互作用、歯胚および歯の組織から遊出する細胞の特性、および培養による歯胚の形態形成能などいくつかの重要な知見が得られている^{2,9,10)}。

歯胚の器官培養では未分化な胎児の組織を材料とし、より分化した器官への分化過程を *in vitro* で得て、その形態形成能や分化の機構を明らかにしようとするものであるが、多くの報告^{1,3,4,13,15)}ではエナメル芽細胞の到達可能な最高分化点はエナメル基質形成の初期にあたり、石灰化の有無については一般に困難であるとされている。

一方器官培養の利用法として、すでに分化した

組織を *in vitro* で維持し、その組織の機能の解明に役立てようとする立場がある¹⁴⁾が、歯の組織についての検討はあまりなされていない。著者らは *in vitro* での分泌期エナメル芽細胞の形態および機能の維持の試みとして、成熟ラット切歯の根端部の器官培養を行い、多少の知見を得たので報告する。

材料と方法

培養材料として体重150~250gの成熟ラットの顎切歯根端部を用いた。ペントバルビタールによる麻酔下で、カニューレを左心室から大動脈に挿入し、Hanks液で灌流脱血の後下顎を摘出した。その後下顎を70%エタノールに約1分間浸潤しHanks液で洗滌し、骨組織を取り去って切歯を露出し、根端部より約2mmの長さに切断して培養組織片とした。

器官培養法として、静置法および灌流法を用いた。静置法では50mm径のシャーレを用い、その中に下方からステンレス製の金網台、レンズペーパー、および組織片の順に重ね、組織片が培地でぬれる程度に培地を加えた。培地はHEPES緩衝液(10mM)を加えたTrowell¹⁴⁾のT-8を用い、95%空気5%CO₂の気相で培養し、培地を2日に1度交換して1週~3週培養した。

灌流法はRose⁸⁾のcircumfusion systemに類似の方法を用いたが、以下の点の改変を試みた。Sykes and Moore¹²⁾のチャンバー(*Belco社、外径32mm)を用い、下から順にplastic cover slip (Thermanox, Lux Scientific Corporation)、組織片、Nuclepore filter (厚さ25 μ , 孔径0.2 μ , Nuclepore Corporation)、シリコンガasket、およびplastic cover slipと重ね、その周囲をチャンバー金具で封じた。シリコンガasketで出来る空間に注射針を介して培地を入れ、定流ポンプにより1個のチャンバーにつき1~2ml/minで灌流した。通常は4個のチャンバーが並列に2個の培地ビンに接続された。その他、装置の保温、炭酸ガスの供給はRose⁸⁾の方法に順じ、15%子牛血清を加え、HEPES緩衝液(10mM)で強化し

たNo. 199培地⁷⁾を用いて1週~3週培養を続した。培地は7日に1度、その半量(240ml)を交換した。

多くの場合培養組織はレンズペーパーまたはNuclepore filterに付着したので、そのままの状態で以下の処理を行った。組織片は磷酸緩衝液でpH 7.4に調製した2%グルタルアルデヒドで前固定、1%四酸化オスミウムで後固定の後、エタノール系列で脱水し、酸化プロピレンを経由してEPONに包埋された。その後約1 μ m厚の切片を作製して、これをトルイジン青で染色して光線顕微鏡で観察し、さらに超薄切片を作製して、酢酸ウラニルと鉛の電子染色の後、電子顕微鏡で観察した。

結 果

静置培養

培養期間4日~7日では、分泌期のエナメル質とエナメル芽細胞の形態維持が可能であった(Fig. 1, 2, 5)。エナメル芽細胞は背が高く、エナメル質とエナメル芽細胞との境は不規則に波立っており、ラット切歯に特有の長いTomes突起は消失していた。エナメル芽細胞の背の高さは不均一で、細胞質はトルイジン青に濃染する傾向が著明である。

電子顕微鏡による観察では、エナメル芽細胞のエナメル質側に明瞭なterminal webを認めた。Terminal webよりエナメル質側の細胞質が電顕的Tomes突起とされるが、*in vivo*で通常見られる小型の分泌顆粒や小胞はきわめて少い。部分的に三角形の断面を示すTomes突起がエナメル質に突出していた(Fig. 5)。その他のエナメル芽細胞の細胞質には、ミトコンドリア、粗面小胞体、多数の脂肪滴、および少数の小型顆粒を含み、核は細胞死の徴しとされる濃縮傾向を示さず、明瞭な核小体を持つ。中間層細胞はほぼ正常に近く、隣接細胞間に多数の微絨毛様突起を示し、細胞質にはミトコンドリアと脂肪滴が認められた(Fig. 6)。エナメル質では針状結晶の分布が疎で、無構造で電子密な基質に富む領域が、エナメル芽細胞に近接して認められる(Fig. 5)。静置培養2週および3週ではエナメル質およびエナメル芽細胞を

* Belco Biological Glassware and Equipment, Vineland, N. J.

認めず、組織は一部に未分化な上皮性細胞の小集団を含み、その他の部位は未分化な結合組織で充たされていた (Fig. 3)。

灌流培養

灌流培養法では培養2週および3週においても分泌期に相当するエナメル芽細胞の維持が可能であった。エナメル芽細胞は背の低い円柱状を呈し、Tomes 突起に類似の細胞質突起を出している (Fig. 4, 7, 9)。培養2週の組織では *in vivo* における分泌期とほぼ類似の構造が観察された。すなわち Tomes 突起は内部に少数の小型顆粒、小型小胞およびミトコンドリアを含み、エナメル質は針状結晶と結晶間を埋める基質、および *stippled material* を認める (Fig. 7)。一方培養3週の組織では Tomes 突起は小型顆粒をほとんど含まず、ミトコンドリアや粗面小胞体が集積する部分と、小器官をほとんど含まない部分とから成り、エナメル質では基質および *stippled material* が消失していた (Fig. 9)。

その他のエナメル芽細胞の細胞質および中間層細胞は培養2週および3週で相違を認めなかった。すなわち前者にはミトコンドリア、粗面小胞体、小型のゴルジ装置および脂肪滴を認め、核の位置は様々で、Tomes 突起直下に位置することもある。中間層細胞は、隔膜に用いた Nucleopore filter に必ず接して認められ、それ以外の方向に組立てられた組織ではエナメル芽細胞の形態維持が困難であった。隣接する中間層細胞間には少数の微絨毛様突起が見られ、また Nucleopore filter の孔の中にも細長い小突起をのばしていた (Fig. 8)。さらに Nucleopore filter に接して一層の扁平な上皮様細胞が遊出していた (Fig. 4)。

考 察

歯の組織培養は種々の方法でなされてきたが、エナメル質の *in vitro* での形成は困難とされている^{2,9,10)}。*in vitro* でのエナメル質形成の試みは主として胎児の歯胚を用いた器官培養で行なわれ^{1,3,4,13,15)} エナメル質形成に必要な条件として酸素濃度、pH の安定性、胎児の血清または組織抽出物、およびアスコルビン酸などの重要性が指摘されている。胎児の歯胚の器官培養は細胞分化の

機序の解明にきわめて重要な研究方法であるが、培養により到達できる最高分化点はエナメル質形成の初期とされており、分泌期エナメル芽細胞の *in vitro* 実験法として不足の点が多い。その不足をおぎなう一つの試みとして、すでに分泌期に分化したエナメル芽細胞を含む成熟ラット切歯の根端部の器官培養が検討された。ラットの切歯は根端部にエナメル芽細胞の増殖部を含み、切端側へ移動するにともない、分泌期および成熟期に変化する。各々の機能相におけるエナメル芽細胞を *in vitro* で維持できれば、エナメル質形成の機序解明にきわめて有効であると考えられる。

成熟ラット切歯の組織培養は Zussman ら¹⁶⁾ の分離培養に関する報告を見るのみで、器官培養についての報告は見られない。Zussman ら¹⁶⁾ は成熟ラット切歯のエナメル芽細胞を切り出し、これを凝固血漿上で培養して、主としてそこから遊出する細胞を観察している。組織は凝固血漿が溶解する8~10日目に細胞変性を認め、ついには *necrosis* に至ると報告している。

今回の実験では歯髓組織を含むラット切歯根端部を切り出し、2種の器官培養法が試みられた。静置法は Trowell¹⁴⁾ の器官培養の変法として広く用いられ、歯胚の器官培養でもそれに類似の方法が数多く発表され、その有用性が認められている^{4,13,15)}。胎児性歯胚では培地は、MEM, BGJ 6などに胎児の組織抽出物および胎児血清を加えて使われているが、本実験では成熟動物の組織の形態維持に有効とされる Trowell¹⁴⁾ の T-8 培地を基本とし、これに緩衝系を強化した培地を用いた。その結果7日間、エナメル質に接する上皮性細胞の維持が可能であった。上皮性細胞は *in vivo* における分泌期エナメル芽細胞と比べて、背の高さが一様でない、長い Tomes 突起が見られない、分泌顆粒が少いなどの相違があるが、少数ながら小型分泌顆粒が見られる事および分泌期のエナメル質とほぼ同じ形態を示すエナメル質に接する事から分泌期に相当するエナメル芽細胞と考えられる。

エナメル芽細胞は *in vivo* においても分泌期から一部の細胞死を含む移行期を経て成熟期に進む⁶⁾。オートラジオグラフィーによる研究では分

泌期の期間は約7日間とされている¹¹⁾が、今回維持された期間はその日数にほぼ等しい。しかし器官培養で維持されたエナメル芽細胞の基質形成機能および石灰化機能の有無については今後の研究課題として残されている。

灌流培養法は Rose⁸⁾により発表された方法で、胎生組織の分化を発現させ、長期間の維持が可能で、また培養期間中、位相差顕微鏡で観察可能という特徴を有している。しかしその原法によると装置の準備およびチャンパーの組立てに熟練を要するので、本実験では組立てが容易な Sykes and Moore¹²⁾型のチャンパーを利用し、またチャンパーの数を少くして装置全体の組立てが短時間で出来る様に配慮した。また予備の実験では Rose⁸⁾の方法に従い、組織と灌流培地との間の隔膜として cellophane 膜を用いたが、組織の形態維持が困難であったので、これを Nuclepore filter におきかえた結果、組織の維持が可能となった。Kumegawa ら⁵⁾は cellophane 膜よりも大きい孔径を有する cellulose acetate および reconstructed cellulose がより良い培養結果を示す事を報告している。今回用いた膜は透析膜ではなく、 0.2μ 径の孔を有するフィルターなので Rose⁸⁾が指摘する組織産生物を組織周囲に維持する透析膜の役割は、少なくとも成熟動物の組織を用いた場合には必ずしも組織の形態維持に重要でないものと考えられる。

灌流培養では静置培養に比べてより長期間の維持が可能で、さらに Tomes 突起に類似の構造さ

え維持された。中間層細胞に相当する上皮性細胞が、隔膜として用いた filter に必ず接して認められ、またそのように組立てられた組織片でのみエナメル芽細胞の維持が可能であったが、これは *in vivo* における分泌期の中間層周囲に、密な毛細血管網が発達する事と関連し、この時期の組織代謝が活発である事が考えられる。

培養に用いられた組織は未分化な細胞増殖部分および分泌期エナメル芽細胞を含む領域の両者が含まれるので、灌流培養法で維持されたエナメル芽細胞の由来は2通りの由来が考えられるが、その点については従来用いられて来た胎児の歯胚での検討が必要である。しかし灌流培養法は成熟動物組織の形態維持に必要とされる酸素および栄養の保給に有利であり、また組織を圧迫することにより未分化組織への逆もどり現象が抑制されることが考えられ、今後エナメル質形成の *in vitro* 実験系として有効な手段である事が示唆された。

結 論

ラット切歯根端部の器官培養により、分泌期エナメル芽細胞の形態維持が可能であり、とくに灌流培養法はその分化構造を長期間維持することが示された。

(追記) 本論文の要旨は第22回歯科基礎医学会総会(1980年10月・松戸)において発表した。また本研究の一部は文部省科学研究費、昭和55年度一般研究C00557415の補助による。

抄録：分泌期エナメル芽細胞を含むラット切歯根端部の器官培養を行い、エナメル芽細胞の形態維持について検討した。

Trowell の T-8 培地を用いた静置培養法では、培養7日までエナメル芽細胞、エナメル質および中間層細胞を認めた。Tomes 突起は *in vivo* のそれに比べて短く、突起の起始部のみが残存した。

灌流培養法は Rose の circumfusion system にほぼ準じたが、組織片と灌流培地(子牛血清を加えた Medium 199)との隔膜に Nuclepore filter を用いて良い結果が得られた。培養期間14日および21日で Tomes 突起を有するエナメル芽細胞、エナメル質および中間層細胞の維持が可能であった。この事は灌流培養法が分泌期エナメル芽細胞の長期間 *in vitro* 実験系として有効な手段である事を示唆している。

文 献

- 1) GLASSTONE, S.: The development of tooth germs *in vitro*, *J. Anat.* (London), 70: 260-266, 1958.

- 2) GLASSTONE, S.: The development of tooth germs in tissue culture, in "Cells and Tissues in Culture, Methods Biology and Physiology." Vol. 2 (ed. by Willmer, E. N.), p. 273-283, Academic Press, London

- and New York, 1965.
- 3) 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.
 - 4) KOCH, W. E.: *In vitro* development of tooth rudiments of embryonic mice, *Anat. Rec.*, **152** : 513-524, 1965.
 - 5) KUMEGAWA, M., NAKAMURA, Y. and YAMADA, T.: Studies on the effect of selective membrane filtration on the differentiation of tissue culture, *J. Cell Biol.*, **62** : 908-911, 1974.
 - 6) MOE, H.: Physiological cell death of secretory ameloblasts in the rat incisor, *Cell Tissue Res.*, **197** : 443-451, 1979.
 - 7) MORGAN, J. F., MORTON, H. J. and PARKER, R. C.: Nutrition of animal cells in tissue culture, I. Initial studies on a synthetic medium, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73** : 1-8, 1950.
 - 8) ROSE, G. G.: The circumfusion system for multipurpose culture chambers. I. Introduction to the mechanics, techniques, and basic results of a 12-chamber (*in vitro*) closed circulatory system, *J. Cell Biol.*, **32** : 89-112, 1967.
 - 9) 佐藤温重：歯の組織培養，硬組織研究（荒谷真平他編）p. 20-31, 医歯薬出版・東京. 1969.
 - 10) SLAVKIN, H. C.: Amelogenesis *in vitro*. *J. Dent. Res.*, **58**(B) : 735-739, 1979.
 - 11) SMITH, C. E. and WARSHAWSKY, H.: Cellular renewal in the enamel organ and odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using ³H-Thymidine. *Anat. Rec.*, **183** : 523-562, 1975.
 - 12) SYKES, J. A. and MOORE, E. B.: A simple tissue culture chamber. *Texas Rep. Biol. Med.*, **18** : 288-297, 1960.
 - 13) THESLEFF, I.: Differentiation of odontogenic tissue in organ culture. *Scand. J. Dent. Res.*, **84** : 353-356, 1976.
 - 14) TROWELL, O. A.: The cultivation of mature organs in synthetic medium. *Exp. Cell Res.*, **16** : 118-147, 1959.
 - 15) WIGGLESWORTH, D. J.: Formation and mineralisation of enamel and dentine by rat tooth germs *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, **49** : 211-215, 1968.
 - 16) ZUSSMAN, W. V. and IOACHIM, H. I.: Growth of ameloblasts *in vitro*. II. Dental tissue culture studies. *Lab. Invest.*, **13** : 887-893, 1964.

Explanation of Figures

- Fig. 1 The explant cultivated for 4 days in T-8. Thin layer of ameloblasts remains (upper left of the micrograph), and a small enamel organ is formed at lateral part of the explant. $\times 40$
- Fig. 2 The explant cultivated for 7 days in T-8. Enamel and ameloblasts are seen, but Tome's processes are not obvious in this section. $\times 100$
- Fig. 3 The explant cultivated for 14 days in T-8. There is no ameloblasts nor enamel in the explant. $\times 40$
- Fig. 4 The explant cultivated for 21 days in a circumfusion system. Thin layers of enamel and ameloblasts can be observed in the area facing to the filter (arrowheads). $\times 100$
- Fig. 5 Section showing Tome's processes of ameloblasts cultivated for 7 days in T-8. Tome's processes are very short and cell organelles are scarce in them. $\times 6,000$
- Fig. 6 Cells of stratum intermedium cultivated for 7 days in T-8. Cytoplasmic processes are seen between the neighbouring cells. $\times 6,000$
- Fig. 7 Tome's processes of the ameloblasts cultivated for 14 days in a circumfusion system. A few secretory granules can be seen in Tome's processes. Enamel consists of ribbon-shaped crystals and electron dense matrix as immature enamel *in vivo*. Clumps of stippled material (arrowheads) are seen at base of the processes, $\times 10,000$
- Fig. 8 Section through the cells of stratum intermedium after 14 days cultivation in a circumfusion system. Cytoplasmic processes of the cell are few between the neighbouring cells. Holes of the filter often contain cytoplasmic processes of the cell. (arrowheads). $\times 10,000$
- Fig. 9 Tome's processes of ameloblasts cultivated for 21 days in a circumfusion system. Enamel consists of ribbon-shaped crystals. Note the absence of matrix in the enamel. $\times 15,000$