胎生期ラット下顎切歯胚の発達に伴う 形態変化について

中 間 孝 子 和 田 薫 仙 波 輝 彦

鹿児島大学歯学部口腔解剖学教室（主任：仙波輝彦教授）

〔受付：昭和58年3月20日〕

Morphologic changes following the development of lower incisal tooth germs of rat fetus

Takako Nakama, Kaoru Wada and Teruhiko Semba

Department of Oral Anatomy, Kagoshima University Dental School

(Chief: Prof. Teruhiko Semba)

[Accepted for publication: March 20, 1983]

Key words: rat tooth germ / lower incisor / three dimensional development

Abstract: Using Wistar rats from 14 days to 20 days in gestation, we observed the three dimensional growth rate of the lower incisor tooth, through measurement by microphotographs and wax reconstruction of the tooth germs.

The average Crown-rump length increased 10.1 mm in a 14-day fetus to 37.8 mm in 20 days. The rate of the antero-posterior length growth of the lower incisor increased $223.0 \mu\text{m}$ in a 15-day fetus to $3240.0 \mu\text{m}$ in 20 days. The crescentic enamel organ was nearly formed completely at 18 days of gestation.

緒 言

現在、我々はラットを使って、培養下での歯牙形成の観察を行なっている。この研究を進めるにあたっては、発生途上のラット胎仔より、特定の発達段階にある歯胚を損傷なくすみやかに摘出することが必要である。また、培養下での歯牙形成の進行を観察するためには、生体内での正常な歯牙の発育過程を正確に把握しておかねばならない。

ところで、ラット歯胚の発生に関しては、Addison & Appleton¹⁾, Schuur & Massler²⁾, Nagaiら³⁾による報告がある。しかし、それらはすべて組織切片による二次元的観察にとどまっている。そこで本研究は、胎生期下顎切歯の正常発生における経時的変化、並びに下顎内に占める位置変化

を明らかにする目的で、光顕連続切片の写真を用い、歯胚の大きさを計測するとともに、下顎内における歯胚の位置の確認を行なった。さらにまた、ワックス板によって復構模型を作製して、歯胚の発育過程における三次元的形態の変化を調べた。その結果、発生初期の下顎内における、口腔上皮、歯堤、唇溝堤との関連をふくめた切歯胚の形態変化の過程を明らかにすることができた。

実験材料および方法

実験には、Wistar系ラットを使用した。未交尾雌を前日に交配ケージで雄と同居させ、翌日午前8時に陰栓を確認した。胎齢の決定は、陰栓確認日を0日とした。胎仔はすべて午後2時において摘出した。胎生14日から20日までの胎仔全93頭を、各胎齢ごとに取り、頭尾長と湿体重（体表面の羊水を含むため、厳密な意味での体重ではない）を

(FRONTAL)

(SAGITTAL)

Fig. 1 Schematic drawing of demonstrating the points of measurement. the distance from the tip of mandible to the anterior end (a) and the posterior end (b) of the tooth germ: the distance from the median line to the median end (c) and the lateral end (d) of the tooth germ: the distance from the oral surface to the superior end (e) and the inferior end (f) of the tooth germ

計測した後、断頭して下顎を摘出した。10%中性ホルマリンで固定し、アルコール脱水後、Sorval Embedding Medium にて包埋した。脱灰は行なわなかった。各胎齢ごとに、前頭断および矢状断の3 μ m 連続切片を作り、H.E 染色した。

1) 下顎における切歯胚の位置の計測:

下顎内での歯胚の位置を観察するため、前頭断切片にて正中線から歯胚内側縁までと、外側縁までの距離を計測した。また矢状断切片では、下顎先端から切歯先端までと、後端までの距離をそれぞれ計測した。口腔上皮面からの深さは、両切片による計測値の平均から算出した。その方法の具体例を Fig. 1 に示した。下顎先端から切歯先端までの距離 a、切歯後端までの距離を b とし、正中線から切歯内側縁までを c、外側縁までを d と

Table 1 Crown-rump length and wet weight in each gestation age

gestation age (days)	length (mm)	weight (mg)
14	10.1 $\pm$ 0.5	186.1 $\pm$ 22.1
15	13.2 $\pm$ 0.2	314.1 $\pm$ 21.0
16	16.2 $\pm$ 0.5	542.2 $\pm$ 56.1
17	19.8 $\pm$ 0.6	928.6 $\pm$ 37.5
18	24.0 $\pm$ 0.6	1494.0 $\pm$ 129.7
19	30.0 $\pm$ 1.0	2364.7 $\pm$ 189.1
20	37.8 $\pm$ 1.4	4009.3 $\pm$ 179.4

Fig. 2 Growth curves of crown-rump length and wet weight of rat fetuses

して計測した。さらに、口腔上皮表面から切歯上縁および下縁までの深さ e と f は、前頭断、矢状断切片からそれぞれ計測した。以上の計測はすべて前頭断、矢状断の連続切片において、エナメル器が最大の大きさを示す切片を使って行なった。

2) 胎生期ラット切歯胚の大きさの計測:

前頭断連続切片のうち、切歯外エナメル上皮が最大である切片の写真計測と、矢状断連続切片における切片数から、切歯胚の歯胚幅を決定した。また同様に、矢状断歯胚最大切片および前頭断連続切片数から、切歯長軸方向の歯胚長を測った。切歯胚の高さは、前頭断、矢状断の両切片におけ

Table 2 Location of tooth germs in fetal mandibles

gestation age (days)	from to	tip of mandible		oral surface		median line	
		anterior end (μm)	posterior end (μm)	superior end (μm)	inferior end (μm)	medial end (μm)	lateral end (μm)
15		526	749	42	206	125	282
16		671	1063	102	388	146	434
17		900	1760	192	578	260	634
18		932	2504	251	694	337	762
19		940	3210	406	968	486	958
20		1006	4246	546	1250	688	1302

る最大値を平均して算出した。

3) 復構模型の作製：

下顎の包埋ブロックに、基準線として、切歯胚に近接する3つの切断面（前頭断方向に1面、矢状断方向に2面）を互いに垂直になるよう作り、矢状断にて連続切片を作製した。得られた連続切片の写真を、胎生14～19日は総合倍率87.5倍、胎生20日では52倍になるよう引きのぼし、口腔上皮、唇溝堤、エナメル上皮の形状を、ワックス板にトレースした。各ワックス板を切り抜き、基準線に従って重ねて模型を構築した。

結 果

1) 胎生期ラットの全身成長：

頭尾長および湿体重の変化は Table 1 に示す通りである。数値は同腹胎仔12～14頭の平均とその偏差である。Fig. 2 に胎齢に伴う成長を表わすグラフを示している。胎生14日以後出生直前までのラットの観察個体群では、頭尾長、湿体重ともになだらかな増加曲線に従っている。胎生16日以後の成長は非常に著しい。

2) 下顎切歯胚の顎内における位置変化：

ラット切歯は胎生15日で蕾状期を呈する。この時期以後について、先にのべた方法により、下顎内における切歯胚の位置を計測した。その結果は、Table 2 である。Fig. 3 は Table 2 の値に基づいて切歯胚の前後への伸びをグラフ化したものである。胎生17日を過ぎると、下顎先端から切歯前端までの距離はほぼ一定となる。切歯胚はおもに下顎後方に向かって伸び続け、前方への伸びはまだ観察されない。Fig. 4 は、口腔上皮表面からの切

Fig. 3 Location of anterior and posterior ends of the tooth germ from the tip of mandible

歯胚の深さにおける位置変化を示し、また Fig. 5 は、正中線からの切歯胚の距離の増大を示すグラフである。前者は、主に切歯胚の高さの増加に従う変化であり、発生が進むとともに切歯胚は下顎内に深く位置することがわかる。後者は、左右幅の増大に伴う変化を表わしている。切歯胚は、顎の成長に伴い、正中から離れる方向へ伸長していくことがわかる。

3) 下顎切歯胚の大きさと形態変化：

切歯胚を以下の三方向から計測し、切片計測値を Table 3 に、その大きさの変化を Fig. 6 に示

Fig. 4 Location of superior and inferior ends of the tooth germ from the oral surface

Fig. 5 Location of median and lateral ends of the tooth germ from the median line

した。まず、切歯長軸方向にエナメル器の切歯前端部から後端部までの最大長、次に歯胚口腔側上縁から下縁までの最大高、そして正中側内側縁から頬側外側縁までの最大幅を、切片写真を使って計測した。得られた値を、前頭断および矢状断連続切片の切片枚数加算による値と平均して、切歯胚の歯胚長、歯胚高、歯胚幅を決定した。その値が Table 3 である。ラット切歯胚は、その高さ、幅の増大に較べて、前後方向への伸びが著るしい。特に、胎生16日後は、Fig. 3 から示されるように、後方への伸長が顕著である。

ラット下顎切歯胚は、胎生14日では口腔上皮にわずかに肥厚がみられるのみである。胎生15日で、蕾状期を呈し歯乳頭に多くの血管がみられるようになる¹⁻⁴⁾。胎生16日では鐘状期となり、矢状断で観察すると、唇側エナメル上皮の下顎後方への伸びがみられ、齧歯類特有の三日月形の形態を取りはじめていることがわかる。胎生17日になると、切歯端の形成が観察され、19日で切歯端部に象牙前質の形成をみとめた。切歯端部歯乳頭内の骨様象牙質は、胎生20日で明確にみとめられた^{1,3,5-7)} (Fig. 7-13)。

- 4) 下顎切歯胚の三次元的形態の観察：
(復構模型より (Fig. 14))

蕾状期（胎生15日）では、切歯胚は左右幅においてわずかに大きく、ほぼ球状である。歯堤は、歯胚中央よりわずかに正中側によっている。胎生16日では、エナメル器は頬側により大きくふくらみ、かつその唇側上皮は、下顎後方に向って伸びはじめている。胎生17日で、切歯端が形成され、歯髓腔の形態が明瞭となってくる。歯堤は正中側に偏り、唇側エナメル上皮の後方への伸長に伴い、唇溝堤も長く深くなる。胎生18日になると、歯髓腔はより深くなり、齧歯類切歯としての特徴である三日月形の形態がさらに明確になる。エナメル上皮の舌側へのふくらみが顕著で、そのため全体が湾曲をはじめ。胎生19日、20日では湾曲がさらに進み apical pore は頬側上方に向って開孔する。そのため、切歯後部の U-shaped parts が形成される。胎生15日から20日までの、口腔上皮、唇溝堤をふくむ切歯胚の復構模型を Fig. 14 に示した。また Table 3 に、切歯胚の切片計測値と、模型からの実測値をあわせて示してある。模型の実測値は、切片計測値に較べて大きくなっている。

考 察

胎生期ラットの発生、成長についてはいくつかの報告があり^{8,9)}、特に胎齢と頭尾長の相関につ

Table 3 Three dimensional size of tooth germs

gestation age (days)		antero-posterior length (μm) (tooth length)	superio-inferior length (μm) (tooth height)	medio-lateral length (μm) (tooth width)
15	S	223	164	157
	M	227	223	234
16	S	392	286	288
	M	455	395	353
17	S	860	386	374
	M	903	479	446
18	S	1572	443	425
	M	1669	606	480
19	S	2270	562	472
	M	2480	686	543
20	S	3240	704	614
	M	3423	808	946

S : size from sections ; M : size from model

Fig. 6 Growth curves of the size of tooth germs

いては、Edwards⁹⁾により報告されている。この報告では、胎生13.5日から21.5日まで、各胎齢ごとに14頭の同腹胎仔中、最大の個体と最小の個体の頭尾長を計測したグラフが示されている。数値は記載されていない。そして、ラット胎仔の胎齢と頭尾長の間には、はっきりした相関はなく、検索

個体の数をふやすことによって、その数値のばらつきは大きくなるであろうと述べられている。しかしながら、今回我々が行なったように、同腹胎仔すべての頭尾長および湿体重を計測して、その平均値ならびに標準偏差をもって比較すると、ラット胎仔は明らかな成長曲線を示しながらその大きさを増すと考えられる。したがって、その両者の間には相関関係が認められる。しかし、相関係数の算出等を行なうためには、Edwards⁹⁾も述べているように、数頭の妊娠雌を使い、試料の数をふやすことが必要であろう。

我々の研究においても、胎生14日に、平均頭尾長10.1mm (同腹仔14頭) という胎仔群の中で、最大頭尾長11.3mm, 最小10.0mm という大きい差を認めた。胎生15日における二腹仔24頭の間の個体間最大差は3.5mm にもなっていた。胎生16日になると、同腹胎仔間でも頭尾長最大差2.1mmを観察した。本研究における歯胚の計測は、頭尾長が平均値にある胎仔を選んで行なっているが、以上のような同腹胎仔間での発生段階の進度の個体差、ならびに同一胎齢における時間レベルの発生差は、培養系などに移して研究を行なう場合、十分留意されるべき点であろう。

ラット切歯胚の発生における二次元的形態変化、ならびにエナメル芽細胞、象牙芽細胞の分化時期に関しては、Addison & Appleton¹⁾ほか^{2, 3, 6, 7)}

Fig. 7 to 13 Photomicrographs of sections of the widest (a), and the longest (b) tooth germ in serial sections at various developmental stage

- Fig. 7 14 days in gestation age ×50
 Fig. 8 15 days in gestation age ×50
 Fig. 9 16 days in gestation age ×50
 Fig. 10 17 days in gestation age ×50
 Fig. 11 18 days in gestation age ×32
 Fig. 12 19 days in gestation age ×29
 Fig. 13 20 days in gestation age ×21

による報告がある。また、Hay⁶⁾、Kollar¹⁰⁾らは、マウスについて詳述している。これらの報告によれば、胎生20日前後において、齧歯類下顎切歯先端部に石灰質の沈着が開始するのが確認されてい

る。今回の我々の研究では、胎生19日で切歯先端に象牙前質の沈着を認めた。胎生20日では、歯乳頭の切歯端内部に、骨様の石灰質の沈着が明瞭に認められ、osteodentineの形成が確認された^{1,3,5-7)}。

Fig. 14 Photograph showing the reconstructed models of incisal tooth germ in each gestation age

切歯胚の計測と、復構模型によって、胎生16日において、エナメル上皮は下顎内へ陥入の後、頬舌方向へふくらみ、それとともに唇側において下顎後方へ向って、すでに伸長を開始することがわかった。胎生17日では、エナメル上皮は頬側および後方へさらに伸び、それによって歯乳頭が深くなり、齧歯類切歯特有の三日月形の形態を示しは

じめていた。胎生18日になると、主に切歯後方において舌側へのふくらみが顕著になり、そのため切歯全体が湾曲しはじめる。切歯後端のエナメル上皮は口腔側へ向けて立ちあがり、apical poreの形成が明らかになる。胎生19日以後は、切歯胚はほぼ完全な三日月形となり、口腔上皮につながる歯堤は細くなる。

前述のように、齧歯類切歯は継続萌出歯であり、特有の三日月形形態のために、胎生期の歯牙形成は、左右幅、上下高の発育に較べて長軸方向への伸長が顕著である。それは、胎仔の頭尾長の変化の度合に相関し、胎生15日以後急速な成長を示す。胎生18日には、ほぼ完全な三日月形を示すにいたる。

組織培養による歯牙形態形成および石灰化等の研究を行なうには、以上述べたような歯胚の経時的発生段階と、その巨視的形態の変化を把握しておくことは重要であろう。ある頭尾長および湿体重をもつ胎生期ラットが、発生日齢においてどの時点に位置しているかは、Table 1およびFig. 2によって知ることができる。また、目的とする発生段階にある歯胚が、下顎内部においてどの位置に、どの程度の大きさで存在するかを、本研究により示したFig.やTableから知れば、歯胚の摘出を損傷なくすみやかに行なうことは容易であると考ええる。

ラット歯胚の発生を、復構模型作製により観察した例は少ない^{11,12)}。本研究における模型の実測値は、52倍、87.5倍にして作製した模型をノギスを使って計測し、再び μm 単位に換算したものである。そのため、計測の誤差と、トレースの際の誤差が重なって、切片計測値に較べて大きくなっている。しかし、切片による二次元的観察に加

え、さらに模型による立体的考察を行なえば、歯胚の湾曲度、発生過程における三次元的大きさの増加方向、口腔上皮および歯堤との位置関係などを知らずして、有力な手がかりを得ることができる。なお、胎生期ラット臼歯についても、その三次元的発育を、復構模型によって検討中である。

結 論

胎生期ラット切歯胚の発達を組織培養に移して研究するための基礎資料を得る目的で、その正常発生を三次元的に観察した。結果は以下の通りである。

1. 胎生14日から胎生20日までのラットの頭尾長は、同腹胎仔の平均10.1mmから37.8mmまで成長した。また平均湿体重は、186.1mgから4009.3mgに増加した。どちらも傾きのゆるやかな成長曲線を描いて変化した。

2. ラット切歯胚は、胎生15日で蕾状期を呈し、その歯胚長は約223 μm 、高さ約164 μm 、幅約157 μm であった。胎生16日までは鐘状期となり、胎生17日では、特有の三日月形を示しはじめる。胎生20日では、歯胚長約3240 μm 、高さ約704 μm 、幅約614 μm となり、前後への伸びが特に著しい。

3. 復構模型により、切歯胚は胎生18日で湾曲をはじめ、胎生19日には、成体にほぼ近い齧歯類切歯の形状を示すことがわかった。

抄録：Wistar系ラットを使って、胎生14日から20日までの胎仔の発育と、それに伴う下顎切歯胚の三次元的発達を、連続切片写真による計測ならびにワックス板を使った復構模型によって検索した。

上記の胎生期間に、ラット胎仔の平均頭尾長は、10.1mmから37.8mmまでゆるやかな曲線を描いて増加した。また、下顎切歯胚の長軸方向の長さは、胎生15日で223.0 μm であったが、胎生20日では3240.0 μm であり、急速な伸長が観察された。切歯胚の三日月形の形態は、胎生18日でほぼ完成することがわかった。

文 献

- 1) Addison, W. H. F. and Appleton, P. L.: The structure and growth of the incisor teeth of the albino rat. *J. Morphology* 26: 43-96, 1921.
- 2) Schour, I. and Massler, M.: The teeth. in *The Rat in Laboratory Investigation*. (editor: Farris, E. J. and Graffin, J. O.), p. 104-165, Hafner Press, New York, 1949.
- 3) Nagai, H., Kambara, K., Sudo, H. and Yokoyama, S.: Development and growth of the tooth germs of rats. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 53(5): 279-290, 1976.
- 4) Hay, F. M.: The development in vivo and in vitro of the lower incisor and molars of the mouse. *Archs. Oral Biol.* 3: 86-109, 1961.
- 5) Mellanby, H.: The development of teeth in the albino rat. *Br. Dent. J.* 66: 76-86, 1939.
- 6) Takuma, S., Kurahashi, Y. and Tsuboi, Y.: Electron microscopy of the osteodentine in rat incisors. in *Dentin and Pulp*. (editor: Symons, N. B. B.), p. 169-195, Univ. of Dundee, Dundee, 1968.

- 7) Akisaka, T., Nishimori, T., Shiba, T., Hosoi, M., Imanishi, I. and Inoue, H. : Initial formation of the osteodentine in mouse incisor teeth : An electron microscopic study. *J. Hiroshima Univ. Dent. Soc.* **12** : 190-195, 1980.
- 8) Christie, G. A. : Developmental stages in somite and post-somite rat embryos, based on external appearance, and including some features of the macroscopic development of the oral cavity. *J. Morphology* **114** : 263-286, 1964.
- 9) Edwards, J. A. : The external development of the rabbit and rat embryo. *Teratology* **3** : 239-263, 1968.
- 10) Kollar, E. J. and Baird, G. R. : Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. I. Reorganization of the dental epithelium during tooth-germ reconstruction. *Embryol. Exp. Morphol.* **24** : 159-171, 1970.
- 11) Glasstone, S. : The development of tooth germs in tissue culture. in *Cell and Tissue in Culture-Method, Biology and Physiology*. (editor : Willmer, R. M.) 2, chap. 6, p. 273-283, Acad. Press, London, 1965.
- 12) Michaeli, Y. and Greulich, R. C. : A three dimensional representation of the odontogenic epithelium of the rat incisor. *Anat. Rec.* **174** : 389-398, 1972.