ラット切歯歯髓細胞の培養条件に関する研究

春日井昇平 佐藤温重* 小椋秀亮

東京医科歯科大学歯学部歯科薬理学教室 (主任教授: 小椋秀亮)

*東京医科歯科大学歯学部第2理工学教室 (主任教授: 佐藤温重)

〔受付: 昭和59年9月20日〕

A study on the optimal medium for culturing of rat incisal pulp cells

Shohei Kasugai, Atsushige Sato* Hideaki Ogura

*Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University*

(Director: Prof. Hideaki Ogura)

**Department of Dental Technology, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University*

Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo 113

(Director: Prof. Atsushige Sato)

〔Accepted for publication: September 20, 1984〕

Key words: dental pulp cells / culture condition / chemically defined medium / serum concentration

Abstract: The present study was carried out to establish the culture condition, namely, which chemically defined medium (F 12, Eagle's basal medium, minimum essential medium, Dulbecco's modified Eagle's medium, RPMI 1640, 199), what kind of serum (calf serum, fetal calf serum) and which concentration of the serum are the most adequate to increase rat incisal pulp cells. The area occupied by outgrowth cells and maximum cell density were measured by using the explant culture technique. Following subculture, cell counting estimation was performed in some cases. The present results suggest that minimum essential medium supplemented with 15 per cent of fetal calf serum is the most adequate to increase of the incisal pulp cells in culture.

緒 言

歯髓細胞の培養は、歯髓組織の生物学的特性、とくに歯髓細胞の象牙芽細胞への分化をめぐる研究にとって有用な手段の一つと考えられる。歯髓片を培養器の底面に置くと多数の細胞が歯髓片より遊出してくることが報告されている¹⁻¹⁴⁾。また、歯髓組織をタンパク分解酵素を用いて分散して、その細胞を培養する方法も広く行われている¹⁵⁻²⁰⁾。近年培養技術の進歩とともに、多くの種類の合成培地が考案され、市販の合成培地に血清を加えた培地を使用することによりほとんどの組織細胞の初代培養が可能となっている。歯髓細胞の培

養は前述の如く多数報告されているが、培地、血清等の培養条件に関する報告は少ない¹⁵⁻¹⁷⁾。われわれは以前よりラット切歯歯髓を用いて歯髓細胞に関する研究を進めて来たが^{13,14)}、今回ラット切歯歯髓細胞の培養条件に関する検討を行ったので、その結果を報告する。

材料および方法

実験には生後7週齢平均体重180gの雄性Wistar系ラットを用いた。

歯髓片の摘出および培養は下記の方法により行った。

エーテル麻酔下で断頭屠殺後両側の上顎切歯を摘出し稀ヨードチンキにて消毒した。歯胚部の硬

Fig. 1 The explant was dissected out from the same region of the upper incisal pulp in rat.

組織を鋭利なピンセットにて除き、滅菌ガーゼにて歯髓を注意深くひきぬいた。歯髓を streptomycin 200 μ g/ml, penicillin G 200IU/ml を含む滅菌 Hanks 平衡塩類溶液にて洗い、実体顕微鏡下で Fig. 1 に示される一定部位より歯髓片を切り出した。培養用プラスチックフラスコ (Falcon, 25cm² Flask) の底面に 4 個の歯髓片を置き 5 ml の各種培地を加えた。各培地とも streptomycin 100 μ g/ml, penicillin G 100IU/ml を添加し、適量の NaHCO₃ を加えたのち、実験 I, II においては 1 % CO₂ 99% 空気の気相下で、また実験 III においては密栓したのち、37°C において pH 7.4 に保った。実験 I, II において培養 3 日に半液交換し、その後 3 日毎に全液交換を行った。

(実験 I) 各種血清濃度が歯髓片からの遊出細胞に及ぼす影響

培地は F12 (日水) を使用し、各種濃度 (v/v %) の血清を添加した。すなわち牛胎児血清 (Flow Laboratories, Lot No. 29101839, 以下 FCS と略す) については 2, 5, 10, 15, 20% 添加、牛血清 (Flow Laboratories, Lot No. 29131813, 以下 CS と略す) は 5, 10, 15, 20% 添加、及び血清無添加培地を使用した。遊出細胞の出現時期、及び遊出細胞の形態は位相差顕微鏡下で観察した。培養開始より 20 日後に各歯髓片からの遊出細胞の周囲を位相差顕微鏡に連動したペンタグラフにより写しとり、プランメーターにより遊出細胞の占める面積を測定した。

(実験 II) 15% FCS 添加各種培地、及びニワトリ胚抽出液 (chick embryo extract, 以下 CEE と略す) 添加が歯髓片からの遊出細胞に及ぼす影響

F12, Eagle's basal medium (BME), Minimum essential medium (MEM), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI 1640, 199 (いずれも日水製) に FCS 15% 添加した培地を使用した。また通法により CEE を作製し²¹⁾, F12 に FCS 15%, CEE 5% を添加した培地も用いた。位相差顕微鏡下に遊出細胞を観察するとともに、実験 I と同様に培養 20 日後に遊出細胞の占める面積を測定した。また遊出細胞のもっとも細胞密度の高いと思われる部位 3 ケ所において位相差顕微鏡下で細胞密度を計測し、その最高値をもって最高細胞密度とした。

(実験 III) MEM 及び DMEM に添加する FCS の最適濃度を求める実験

FCS 15% 添加 MEM, または FCS 15% 添加 DMEM を用いて、初代培養を 30 日間行った。その後、Ca, Mg-free phosphate buffered solution にて遊出細胞を洗い、0.5% trypsin (Difco, 1 : 250), 0.02% EDTA · 2 Na (和光) を含む 4°C の Ca, Mg-free phosphate buffered solution を 5 分間作用させた。その後 trypsin EDTA 液を除き、次いで FCS 15% 添加 MEM または FCS 15% 添加 DMEM を加え pipetting を行い細胞を dish より分離した。そして遠沈管にうつし、1500 rpm にて遠沈し、細胞数が 10⁴/ml となるように MEM または DMEM にて希釈したのち、試験管に 250 μ l づつ分注した (2,500 cells/tube)。その後、FCS 5, 10, 15, 20% 添加 MEM または DMEM を 1 ml 加え密栓して培養を行った。培地の交換は 2 日毎に行い、培養 10 日後に crystal violet 染色を施し細胞数を計測した²¹⁾。

実験結果

(実験 I) 各種血清濃度が歯髓片からの遊出細胞に及ぼす影響について

無血清培地 (F12 培地単独) では遊出細胞の出現は認められなかった。また、Fig. 2, 3 に示されるごとく FCS, CS とともに濃度が下がると培養開始より遊出細胞出現までの時間が延長した。しかし、位相差顕微鏡下において血清の濃度による遊出細胞の形態変化は認められなかった。培養初期に出現する細胞は突起を持った線維芽細胞様形態

Fig. 2 Outgrowth percentage of the explants. Concentrations of calf serum were indicated in parentheses.

Fig. 3 Outgrowth percentage of the explants. Concentrations of fetal calf serum were indicated in parentheses.

Fig. 4 The outgrowth cells from the pulp explant (P) after 10 days in culture under phase contrast microscope.

Fig. 5 The area of the outgrowth cells from the pulp explant after 20 days in culture. The culture medium was F12 supplemented with various concentrations of calf serum (●) or fetal calf serum (○). Each point and bar represents the mean $\pm$ SD ($n=8$). *Significantly different each other ($p<0.005$).

Fig. 6 The area of the outgrowth cells from the pulp explant and maximum cell density after 20 days in culture. Various chemically defined media supplemented with 15 per cent of fetal calf serum were used. Each column and bar represents the mean $\pm$ SD ($n=8$). The area of the outgrowth cells was maximum in DMEM or MEM and not significantly different each other ($p>0.5$).

を示す細胞であるが、細胞密度が増加するにつれて多角形で核が大きく、原形質顆粒を多数含む上皮細胞様形態を示すようになった (Fig. 4)。培養20日後の遊出細胞が占める面積を比較すると、

Fig. 7 Relation between number of cells and concentration of fetal calf serum. Following subculture with trypsin-EDTA solution, 2,500 cells were inoculated and after 10 days cells were counted. Culture medium was MEM (●) or DMEM (○) supplemented with various concentrations of fetal calf serum. Each point and bar represents the mean $\pm$ SD ($n=4$).

同一濃度においては FCS の方が CS より面積が大きく、FCS, CS とともに15%において最大面積を示した (Fig. 5)。

(実験Ⅱ) 15% FCS 添加各種培地、及び CEE 添加が歯髓片からの遊出細胞に及ぼす影響

15% FCS 添加において培地の種類にかかわらず培養2日後にすべての歯髓片から遊出細胞が出現した。また CEE 添加の場合も同様に培養2日後に遊出細胞が出現した。培地の種類によって遊出細胞の形態的差異は認められなかった。

Fig. 6 に示したように、培養20日後に遊出細胞の占める面積は DMEM, MEM が最も大きく両者の間には有意な差が認められなかった ($P > 0.5$)。また細胞密度についても DMEM, MEM 両者の間に有意な差は認められなかった。一方、F12について CEE の影響を調べたところ、CEE 添加により著明な細胞密度の上昇現象が観察された。

(実験Ⅲ) MEM, DMEM に添加する FCS の最適濃度について

Fig. 7 に示したように、MEM, DMEM とともに FCS の添加濃度を増すにつれて10日間培養後の細胞数は増すが、15%でほぼ極大に達することが

確かめられた。FCS 15%添加において MEM, DMEM 両者間に有意な差は認められなかった。

考察および結論

実験Ⅰより無血清培地 (F12単独) では歯髓片から細胞が遊出せず、遊出するには血清が必要であることが示された (Fig. 2, 3)。このことは血清中に Fibronectin と呼ばれる²²⁾ 細胞の移動 (migration)²³⁾、付着伸展 (attachment and spreading)²⁴⁾ に必要な高分子タンパクが含まれていることにより説明できるのではないかと考えられる。その他にも、血清中には細胞増殖に必要な未知の成分が含まれており、近年血小板由来成長因子²⁵⁾その他の各種の成長因子、および多くの種類のホルモン²⁶⁾の存在が確かめられている。歯髓細胞に関してもある種の成長因子による増殖に及ぼす影響について報告されている¹⁹⁾。しかし特殊な例を除き、一般に初代培養において細胞を増殖させる場合には、血清を加えた合成培地を用いなくてはならないのが現状である²⁷⁾。さらに極論すれば、現在市販されている培地そのものは細胞を増殖させる能力を欠いており、むしろ培地に添加されている血清が細胞を増殖させていると見なすべきで、在来の培地はその補助的役割を果すに過ぎないとも言える²⁸⁾。今回の研究は、培養下において歯髓細胞の増殖に最も適切な条件を決定する目的で、諸種の細胞増殖因子が含まれている血清と合成培地の組合せについて検索を行った。

本研究においては、培養20日後の遊出細胞の占める面積を指標として、歯髓細胞の増殖に及ぼす培地の種類、血清の影響を検索したが、この面積測定による方法は簡便ではあるが、必ずしも最良の評価法とはいえない点がある。それは、細胞数が増加しなくとも、細胞密度が粗となることにより遊出細胞の占める面積が増加する可能性があるからである²¹⁾。そこで実験Ⅱにおいては、遊出細胞の占める面積を測定すると同時に最高細胞密度を測定し、両測定結果を総合して評価することを試みた。その結果、合成培地と FCS 15%の組み合わせでは、MEM, DMEM が最も歯髓細胞の増殖に対して良い結果を示した (Fig. 6)。CEE は古くから培養液に添加され用いられているが、こ

れは著明な細胞密度の上昇を引き起こすことから推定して (Fig. 6), 細胞の増殖にとって有効な成分を含んでいるものと考えられる。今回は, MEM または DMEM に FCS を 15% 添加し, さらに CEE を加えた組合せについての実験は行わなかったが, 血清のみの添加でも充分な細胞増殖が期待できる結果が得られた。したがって, 今後の培養手段を簡略化する意味からも, 血清と CEE の組合せを検討することは省略することにした。

われわれは以前 F12 培地を用いて実験を行って来たが¹³⁻¹⁵⁾, これ以外の培地として, BME^{10,11)}, MEM^{5,16,17)}, 199^{8,9,16)}, NCTC 109⁶⁾, Puck's N 16¹⁶⁾, McCoy's 5A¹⁶⁾ 等も用いられている。また最近では DMEM に FCS を添加した培地が用いら

れる傾向にある^{12,18-20)}。今回の実験においては, 面積測定法だけでなく, 細胞数算定法による測定結果でも FCS 15% を添加した場合 MEM, DMEM の両者の間に差は認められなかった (Fig. 7)。DMEM は MEM に含まれるアミノ酸を約 2 倍, ビタミン類を約 4 倍量にし, さらに非必須アミノ酸が加えられている²⁹⁾。その結果, DMEM は溶液のまま長期保存すると培地の成分が析出することがある³⁰⁾。これらの諸点を考慮すると, ラット切歯歯髄細胞の培養には MEM に FCS を 15% 添加した培地が最も利用価値が高いものと考えられる。

謝辞: 本研究は文部省科学研究費 (No. 58440070) の補助を受けた。また本研究の要旨は第 16 回口腔組織培養研究会において発表した。

抄録: 本研究は, ラット切歯歯髄細胞の培養にとって最も適する培地を決定する目的で行われた。用いた合成培地は F12, Eagle's basal medium (BME), minimum essential medium (MEM), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI 1640, 199 であり, 血清は牛血清 (CS) と牛胎児血清 (FCS) を用いた。歯髄片から遊出した細胞の占める面積を測定する方法, および細胞数の算定法により評価した。その結果, ラット切歯歯髄細胞の培養にとって, MEM に FCS を 15% 添加した培地が最も適していることが示唆された。

文 献

- 1) Pinkerton, H. and Boyle, P.: Cultivation in vitro of tissues from enamel organ and dental pulp. J. Dent. Res. 15 : 221, 1935.
- 2) Szabo, G.: Studies on the cultivation of teeth *in vitro*. J. Anat. 88 : 31-44, 1954.
- 3) Niizima, M. and Cattoni, M.: Dental papilla in tissue culture. J. Dent. Res. 37 : 767-779, 1958.
- 4) Zussman, W. V. and Ioachim, H. L.: Growth of odontoblasts *in vitro*. Lab. Invest. 13 : 371-377, 1964.
- 5) 池尻 茂, 中島嘉助: ヒトおよびマウスの歯髄と象牙芽細胞の培養に関する研究. 九州歯会誌 22 : 32-36, 1968.
- 6) Pourtois, M.: Étude de la différenciation des odontoblastes en culture *in vitro*. Arch. Biol. 77 : 107-137, 1966.
- 7) Vidic, B., Chen, R. and Taylor, J. J.: Functional behavior and structural modification of pulpal fibroblasts cultured *in vitro*. Arch. Anat. Hist. Embr. Norm. et Exp. 55 : 51-73, 1972.
- 8) 内海順夫, 武田鈴子: 歯髄組織 (細胞) の *in vitro* における動態. 城歯大紀要 1 : 85-88, 1972.
- 9) Kawahara, H., Imanishi, Y. and Nishida, T.: A new cell strain derived from human dental pulp. 国際歯科ジャーナル. 4 : 767-768, 1976.
- 10) Magloire, H. and Joffre, A.: Fine structural observations of calcium storage in human dental pulp cells in primary culture. J. Biol. Buccale. 7 : 307-320, 1979.
- 11) Magloire, H., Joffre, A., Grimaud, J. A., Herbage, D., Couble, M. L., Chavrier, C. and Dumont, J.: Synthesis of type I collagen by human odontoblast-like cells in explant culture: Light and electron microscope immunotyping. Cell. Mol. Biol. 27 : 429-435, 1981.
- 12) Prime, S. S. and Reade, P. C.: The separation and culture of cell populations from bovine molar tooth germs. Archs. Oral Biol. 25 : 187-193, 1980.
- 13) 小椋秀亮, 春日井昇平, 佐藤温重: ³H-thymidine autoradiography を応用した *in vitro* におけるラット切歯歯髄細胞の動態に関する研究. 歯基礎誌 23 : 211, 1981.
- 14) Kasugai, S.: Autoradiographic study using ³H-thymidine on rat incisal pulp cells *in*

- vitro*. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. **30** : 9-15, 1983.
- 15) 佐藤温重, 小沢和子 : 家兎切歯歯胚由来細胞の培養に関する研究 I, 歯科基礎誌 **17** : 188-193, 1975.
 - 16) Miller, W. A., Everett, M. M. and Cramer, J. F. : Growth of bovine pulp cells in monolayer culture. J. Endodon. **12** : 385-389, 1976.
 - 17) 堀越 勝, 名倉英明, 木村義孝, 小山弘治, 伊藤秀夫 : ラット胎児の歯胚由来細胞 (RTG) の樹立. 口病誌 **46** : 211-219, 1979.
 - 18) Gotoh, Y., Saito, S. and Sato, A. : Synthesis of procollagen by odontogenic cells of rabbit tooth germs. Biochim. Biophys. Acta **587** : 253-262, 1979.
 - 19) Steidler, N. E. and Reade, P. C. : Epidermal growth factor and proliferation of odontogenic cells in culture. J. Dent. Res. **60** : 1977-1982, 1981.
 - 20) Shuttleworth, C. A., Berry, L. and Wilson, N. : Collagen synthesized in rabbit dental pulp fibroblast cultures. Archs. Oral Biol. **25** : 201-205, 1980.
 - 21) 黒田行昭, 動物組織培養法, 共立出版, 東京, 1974.
 - 22) Yamada, K. M. and Olden, K. : Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature **275** : 179-184, 1978.
 - 23) Bürk, R. R. : A factor from a transformed cell line that affects cell migration. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **70** : 369-372, 1973.
 - 24) Grinnell, F. : Cell spreading factor. Exp. Cell Res. **102** : 51-62, 1976.
 - 25) Antoniades, H. N. and Scher, C. D. : Radioimmunoassay of a human serum growth factor for Balb/c-3 T 3 cells: derivation from platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74** : 1973-1977, 1977.
 - 26) Hayashi, I., Larner, J. and Sato, G. : Hormonal growth control of cells in culture. *In Vitro*. **14** : 23-30, 1978.
 - 27) Adams, R. L. P. : Cell Culture for Biochemists. Elsevier, Amsterdam. 1980.
 - 28) 山根 績 : 組織培養培地の生産化, 組織培養 **7** : 275-277, 1981.
 - 29) 中家 茂 : 組織培養培地の製造と各種培地の特色. 組織培養 **7** : 293-295, 1981.
 - 30) 小林信人, 高瀬譲治 : 組織培養用培地の動向について. 組織培養 **7** : 278-280, 1981.