原	著
---	---

組織培養による歯胚の生化学的研究 (第1報)

歯胚の培養時における呼吸と解糖および
それらに及ぼす酸素分圧の影響

須 田 立 雄

東京医科歯科大学歯学部生化学教室 (指導 荒谷真平教授)

(昭和38年9月30日受付)

Biochemical Studies of the Tooth Germ in Tissue Culture(I)
Respiration and Glycolysis in Cultivation of Tooth
Germ and the Effect of Oxygen Tension upon Them

Tatsuo Suda

Department of Biochemistry (Director: Professor Shimpei Araya)
School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

緒 言

近年、組織培養法が、医学領域に於ても大変有用な実験法であることが一般に認識されるようになって、各方面で盛んに試みられるようになった。

生体内では、細胞や組織の機能は絶えずほかの細胞や組織の影響を受けているため、組織に何か形態的あるいは機能的変化が起つても、その原因を一義的に決めることはなかなか難しい問題である。したがって、外的な実験条件を簡単にするために、いろいろな *in vitro* の実験法(スライス法・ホモジェネート法)が試みられて来た。しかし、そのいずれも生理的条件とは著しくかけはなれた実験条件で、組織の残生(Survival)を扱っているに過ぎないのに対し、組織培養法では比較的生理的に近い実験条件で、細胞なり組織なりを可成り長時間「生活」させ、その「生活」に伴って起る

生長・発育・分化・代謝等を追求することが出来る。このように、組織培養法は積極的に「生きている」細胞や組織を扱い、しかも人為的に作られた環境のなかで、それらの変化を経時的に追求出来ることから、組織の「生きるための条件」を解析する最も優れた実験法であると言えることが出来る。

一方、歯のような特殊な組織がどのような代謝様式によつて作られてゆくかという問題は、一般生化学の上からも大変興味深い問題であると同時に、またこの問題の解決は「人類が齲蝕にかかりにくい歯を得る」という臨床歯科医学の強い要請に対し、科学的に答えるための強力な土台となるものと思われる。そういう観点から、著者は歯胚の代謝を組織培養によつて研究しようと志したのである。

歯胚を生体からとりだしてガラス容器のなかで培養しようとする試みは、すでに40年近く前弓

倉 (1925)^{1,2)} によつて始められている。しかしその後現在に至る迄, Glasstone³⁻⁵⁾, Szabo⁶⁾, Lefkowitz⁷⁻¹⁰⁾, 新島¹¹⁻¹³⁾, Mellanby¹⁴⁾, Hay¹⁵⁾ 等, 形態発生学 (Morphogenesis) 的な幾つかの報告があるに過ぎない。実験方法として, 組織培養法の優秀性は広く一般に認められていながら, 歯科領域では未だ充分活用されていないのは, 勿論同じ硬組織である骨や軟骨にくらべて歯胚を培養することが非常に難しいためである¹⁶⁾。しかし, その困難を克服してなお充分に活用されていない原因の一つは, 今迄の研究の方向がマウスやラットの胎児の歯胚のような非常に小さな組織を形態学的な興味だけで追う場合が多く, 歯胚の培養を代謝の研究に活用しようとしなかつた点にあると思われる¹⁶⁾。

歯胚の組織培養が代謝の研究に利用されるためには, 「培養の定量的な解析」を進めることが最も必要なことであり, またこの 20~30 年の素晴らしい一般生化学の進歩を土台として, 歯胚の組織培養が歯胚の生化学的研究と結びつかなくてはならない。そのためには,

- (1) なるべく大きな歯胚を培養すること
- (2) 液体培地による培養
- (3) 合成培地の利用
- (4) 分析のマイクロ化
- (5) アイソトープの利用

等の試みや努力が必要である¹⁶⁾。

もし歯胚の培養の定量的な解析が可能になれば歯科領域で最も基本的な問題である「歯の形成」の生理・薬理学的ならびに生化学的実験法として一新生面を開くばかりでなく, 臨床的にも有用な実験法となるに相違ない。

実験方法

実験材料: 培養可能な範囲でなるべく大型の歯胚を用いる意味で, 生後 1~2 日の家兎 (体重 50~70 g) の永久小白歯胚を使用した。生後 1~2 日の家兎は, 断頭放血して殺した後, 頭部を 50 倍希釈のハイアミン液で 1 分間洗い, 手早く上下の顎骨にした。取り出された顎骨はさらに 50 倍

希釈のハイアミン液 (3 分間, この間 2 回洗滌液を変える), 70 % アルコール (10 秒間), 無菌の Hanks 氏塩類溶液 (3 分間, この間 2 回変える) で順次洗った後, 実体顕微鏡下で顎骨の中から無菌的に永久小白歯胚を取り出した。培養に使用した永久小白歯胚は, 上顎第 2 (以下 Pm₂ と略す。直径 1.0~1.2 mm, 乾燥重量 90~100 μ g), 上顎第 3 (Pm₃, 1.6~1.8 mm, 140~150 μ g), 下顎第 1 (Pm₁, 1.2~1.4 mm, 120~130 μ g), 下顎第 2 (Pm₂, 2.2~2.4 mm, 270~320 μ g) の 4 本であつた。図 1 は, 使用した家兎の永久小白歯胚の顎骨内の状態 (図 1-A) およびとり出されたときの状態 (図 1-B) を示している。なお, 対象 (Control) の必要に応じて片側のみを培養し, 他側は Control とした。

培養方法: 予備的にいろいろな培養方法を検討した結果, 定量的解析に便利なように液体培地による Floating Lens Paper 法 (Chen, 1954)¹⁷⁾ および Trowell の培養法 (Trowell, 1959)¹⁸⁾ を採用した。いずれの方法も図 2 に示す如く原理的には大差なく, 液体培地に浮かせたレンズペーパーの上で培養する。Trowell 法の場合は, 大きな沢山の材料を載せても培養体が培地の中へ沈まないように, シリコン処理したステンレス製の金網台の上にレンズペーパーを敷いた。いずれの方法でも各培養皿には 1 ml の培地を入れ, その中で同一歯種の歯胚 3~4 個を培養した。培養気相は図 2 に示す如く Chen 法の場合は空気, Trowell 法の場合は酸素分圧 20 %・50 %・95 % (いずれも 5 % の CO₂ を含む) の 3 種類を用いた。Trowell 法では原法に従つて無菌化されたガスを Flowmeter (bobbin-type, オメガ社) によつて 75 ml/min. の速度で図 2 の A から B へ 30 分間流した。

図 3 は著者の使用した Trowell の培養装置で, 本体は真鍮で出来ており, これに Co-Ni メッキした上, さらにシリコン処理を行つた。

用いられた培地は表 1 に示す如く 3 種類で, CM 1 は典型的な自然培地, CM 2 は合成培地 858¹⁹⁾ に 10 % 血清を加えたもの, CM 3 は純合成培地

図 1

図1-Aは生後2日の家兎のPm1の顎骨内の状態

図1-Bは生後2日の家兎のPm3を顎骨から取り出した状態を示す。

A : Ameloblast, D.P. : Dental Papilla, D.S. : Dental Sac, E.O. : Enamel Organ,
S.R. : Stellate reticulum, O : Odontoblast (ブアン固定, H.E染色 ×100)

CM(液体培地) D(培養皿) LP(レンズペーパー) SG(ステンレス網台)
SR(シリコンゴム) P(孔のあいた仕切り板) TG(培養歯胚)
WG(時計皿) WW(湿った綿) GC(ガス室)

図2 培養法

図3 菌胚を培養中の Trowell の培養装置
1 個の Trowell の装置に 3 個の培養皿が入っている。培養に先立つて、所定のガスを A から B に向って 30 分流す。

表1 培地の組成

Culture Medium	CM 1	CM 2	CM 3
	自然培地	10%血清含む合成培地	純合成培地
家 兎 血 清	50%	10%	—%
11 日 鶏 胚 浸 出 液	5	—	—
Hanks 氏 塩 類 溶 液	45	—	—
合成培地 TC 858	—	90	100
Penicillin-G.K.	50 IU/ml		
Dihydrostreptomycin	0.1 mg/ml		
Phenol Red	0.002 %		

858(Difco 社 U.S.A.)である。家兎の血清は、体重 2.0~2.5 kg の雄の健康な家兎の頸動脈から培養開始数日前に全採血して、2500 rpm で 10 分遠沈して血球成分を除いて血漿とし、さらにフィブリンを除いた血清を 56°C、30 分間非働化し、ザ

イツを通して滅菌したものである。また、鶏胚浸出液(CEE)は 11 日間孵卵した受精卵から無菌的に取り出した鶏胚をユニバーサル・ホモジナイザー(日本精機製)で 2 分間ホモゲナイズした後 3000 rpm で 30 分間遠沈した時の上清である。培地にはいずれも抗生物質として Penicillin-G-K 50単位/ml および Dihydrostreptomycin 0.1 mg/ml を、pH indicator として Phenol Red を 0.002 % 入れてある。なお、培地の Glucose level は必要に応じ 250 mg% にあげた。培地の保存は -20°C の Deep Freezer 中で行った。

培地交換およびガス交換は 48 時間毎に行い、培養は 37.5°C で 144 時間(6 日)迄行つた。

滅菌：血清および glucose 溶液の滅菌はザイツで、Hanks 氏塩類溶液は 120°C で 15 分湿熱滅菌した。レンズペーパー、ステンレス金網台、培養皿(Pyrex)、シリコンゴム、Trowell の培養装置等は 120°C で 2 時間乾熱滅菌を行つたが¹⁸⁾、その他のガラス器具、ゴム類は通法に従つて、乾熱滅菌は 160°C 2 時間、湿熱滅菌は 125°C 30 分行つた。

培養後の菌胚および培地は以下の如く、組織学的および生化学的分析に用いられた。

組織標本の作製：培養した菌胚は Hanks 氏塩類溶液で培地をよく洗い流してブアンの固定液で 2~3 日間固定後、ブタノール脱水、パラフィンで包埋し、6 μ 連続切片を作製し、Haematoxylin-Eosin 染色および Alcian Blue-Chlorantinfastred (Lison) 染色を行つた。

オートラジオグラフィーの作製：一部の培地には 10 μ c/ml の ³⁵SO₄ を加え、ストリップ法によりオートラジオグラフィーを作製した。フィルムは富士フィルムを使用した。

重量測定：培養した菌胚は、必要に応じ Hanks 氏塩類溶液および蒸留水で洗つた後、マイクロバランス(Model M5, メトラー社)で湿性重量を秤量後、110°C で 12 時間乾燥して乾燥重量を測定した。

呼吸活性の測定：培養した菌胚の呼吸活性は、Krebs-Ringer の Phosphate-Buffer(pH 7.4) で良

く洗い Stern-Kirk 型のマイクロ検圧計 (Berkeley 社製, Calif. U.S.A.) で測定した^{20, 21)}。呼吸活性の測定には、全て気相は空気を、炭酸ガス吸収用には 10% の KOH を、Capillary の indicator としては精製したケロシンを用い、37.5°C の恒温槽の中で温度平衡に達する間 10~15 分前 振りを 行つた後、5 分毎に 60 分間酸素消費量を測定した。1 回の測定に要した歯胚は、数にして 3~5 個、乾燥重量 0.5~1.0 mg で充分測定可能であつた。なお、毛細管の Calibration には、Kirk や Volpe の推奨する水銀法を用いた²¹⁾。Calibration は各毛細管につき 3 回行つたが、その再現性はきわめて良かった。

Glucose 消費量の測定：培養前後の培地は、 $\text{ZnSO}_4\text{-Ba(OH)}_2$ で除蛋白後、Somogyi 法²²⁾により Glucose を定量した。すなわち、蒸溜水 6.9 ml に培地 0.1 ml を加え良くかきまぜたものに 5 g/dl の ZnSO_4 液 0.5 ml および 0.3 N の Ba(OH)_2 液 0.5 ml を加えて混和後 (80 倍希釈)、2000 rpm で遠沈・濾過 (No. 131 硫酸バリウム用濾紙) して除蛋白する。この上清 2.0 ml を Folin 管にとつて 2 ml のアルカリ性銅試薬を加え 10 分間充分沸騰している水浴中で加熱後、流水で 5 分間冷却してから 2 ml の Nelson 試薬を加え、良く混和後

蒸溜水で全容を 25 ml に希釈し、660 m μ で比色した。

乳酸生成量の測定：Glucose 定量の際に残つた除蛋白液 1.0 ml を出来るだけ清潔な試験管にとり、20% CuSO_4 液 0.5 ml を加え蒸溜水で全容を 5 ml としさらに Ca(OH)_2 の粉末 (特級) 約 0.5 g を加えてかきまぜる。室温 30 分放置後、遠沈除糖し、その上清につき乳酸を Barker-Summers 法²³⁾によつて測定した。すなわち、上清 1.0 ml に 4% CuSO_4 液を 0.05 ml 加え、氷水中につけて振りながら濃硫酸 (特級) 6.0 ml を徐々に注ぎ、内容物をよく混和して沸騰水浴中に正確に 5 分ひたして後 20°C 以下に冷却し、p-ヒドロキシ・ジフェニル液を 0.1 ml 加え、直ちに 30°C の水浴中に 25 分間ひたし、沸騰水浴中に正確に 90 秒間つけて余分の p-ヒドロキシ・ジフェニルを透明化し、発色した青紫色を 560 m μ で比色した。

結 果

Organ Culture では、一つの独立した器官として、in vitro で生体内と同じように器官全体の形態と機能とを維持させることが必要である。

従来、マウスやラットの胎児の歯胚のような小

図 4

図 4-A 培養前、図 4-B は Floating Lens Paper 法 (気相：空気) で 96 時間培養したもの、(ブアン固定 H.E 染色 $\times 400$)

Pd: Predentin が肥厚している。

O: Odontoblast の配列はやや乱れている。

S.I.: Stratum intermedium, A: Ameloblast

さいものの培養で好結果を得ていた Plasma Clot (固形培地)^{5,10,15)} による家兎の歯胚の培養では、培養体のまわりに活潑な Outgrowth の出現が見られたが、培養体の内部は退化が著しかった。それに対し、液体培地による Floating Lens Paper 法では Outgrowth の出現は殆んど見られなかったが、培養した歯胚の内部は良くその形態を保ちつつ organized した分化を認めた。すなわち、図4は Pm₂ を96時間培養したものであるが、Pre-dentin の厚さから考えて96時間の培養で生体内の2日分に相当する分化を認めた³⁶⁾。96時間培養後もなお分裂細胞が認められるが、象牙芽細胞の配列は可成り乱れており、また Pre-enamel 層の形成も認められなかった。なお、この Floating

図5 生後2日の家兎の永久小臼歯胚の酸素消費
Stern-Kirk 型のマイクロ検圧計で測定、測定時の気相は空気、毛細管の Indicator はケロシンを使用した。尚、1回の測定に同一歯種の歯胚を4個必要とした。いずれの歯種についても60分間は直線的に酸素消費を行っていることがわかる。

Lens Paper 法では、直径約1.0 mm 位(Pm₂)の歯胚では殆んど中心部に退化細胞を認めなかったが、歯胚の大きさが増して Pm₁, Pm₃ になる

図6 各種気相で96時間培養した歯胚 (Pm₃ 直径1.5 mm) の組織学的所見,
6-A: 酸素分圧20%, 6-B: 酸素分圧50%,
6-C: 酸素分圧95%下, CM1で96時間培養,
EO(Enamel Organ), DP(Dental Papilla)
(ブアン固定 H.E 染色 ×100)

と、この方法では培養体の中心部に退化細胞の出現が避けられなかった。著者は、これは培養体の内部への栄養供給の不足と共に酸素の供給が不十分な為ではないかと考え、試みに家兎の歯胚の呼吸活性を測定したところ、想像以上に高い酸素消費($Q_{O_2}=5.50 \mu\text{l/mg dry tissue/hr}$)を行っていることがわかった(図5)。すなわち、図5は生後2日の家兎から全く傷つけずに取に出した培養前の永久小臼歯胚を歯種別に4個ずつ Stern-Kirk のマイクロ検圧計を用いてその酸素消費を測定したものであるが、いずれの歯種についても、 $Q_{O_2}=5.0$ またはそれ以上の呼吸活性を有していることがわかる。

そこで著者は、培養気相の酸素分圧を20%から50%、95%と高めて行くことにより、歯胚の中心部まで充分酸素を供給することを考えた。図6は直径約1.5 mm の Pm3 を20%、50%、95%の各種酸素分圧下で培養した際の所見であるが

空気を気相とした Floating Lens Paper 法では培養困難な大きさの歯胚も、培養気相の酸素分圧を高めることにより培養体の中心部の退化細胞も減少し、充分 organized した形態を維持して行くことがわかった。

図7は、気相の酸素分圧を50%に高めて培養した時の Pm3 の所見を培養前と比較したものであるが、96時間の培養で Pre-dentin 層の形成に関する限り in vivo の発育の2日分に相当する分化を認めた³⁶⁾。図4の空気の気相下の培養に比較して、象牙芽細胞層の形態の維持もはるかに良く、全体としてさらに organized した発育を示している。

図8は、95%の酸素分圧下で48~96時間培養した後の歯胚の呼吸活性を測定したものであるが、自然培地(CM1)による培養では48時間培養後も培養前(図5)と全く同じ呼吸活性を維持し

図7 酸素分圧50%, CM1で96時間培養した Pm3 (図7-B)とその Control (図7-A)

Pd: Predentin の肥厚が見られる。O: Odontblast の配列もよい。

(ブアン固定, H.E 染色, $\times 200$)

図8 培地: CM1, 培養気相: O₂—95%, CO₂—5% で 48—96 時間培養後の歯胚の酸素消費

実線は 48 時間培養後, 点線は 96 時間培養後のものであるが, 48 時間では培養前と全く同程度の呼吸活性を維持しているのに対し, 96 時間では, 培養前及び 48 時間培養後に比し 3 割程度の呼吸活性の低下が認められた。

ており, 96 時間後もなお, 培養前の 7 割程度の呼吸活性を保っていることが知られた。

しかし図 7 でもわかるように, 培養気相の酸素分圧をあげて培養しても Pre-enamel の形成は認められなかつた。従来の Glasstone³⁾, Lefkowitz^{7, 9, 10)}, Hay¹⁵⁾ 等によるマウスやラットの胎児の歯胚の培養でも Pre-enamel を in vitro で形成させることは困難とされて来た。そこで著者は, 培地に 10 μc/ml の ³⁵SO₄ を加えて 48 時間培養した歯胚 (Pm 3) のオートラジオグラフィをとったところ, ³⁵SO₄ は歯乳頭および象牙芽細胞層には活潑にとりこまれたが, 外胚葉性のエナメル髓やエナメル芽細胞層には殆んどとりこまれなかつた (図 9)。In vivo で動物に ³⁵SO₄ を注射すると, 歯乳頭や象牙芽細胞層と同じくエナメル形成中のエ

ナメル芽細胞層にも活潑にとりこまれていること^{24, 25)}を考えると, in vitro では外胚葉性の組織の多糖類の合成が阻害されているため, Pre-enamel の形成が困難なのかも知れない。

培養の定量的解析のためには, 今後, 合成培地の利用がますます必要となつて来るが, 著者は軟骨の培養で好結果を得た²⁶⁾合成培地 858 を用いて 50 %酸素の気相下で培養を試みた。図 10 は, 50 %酸素の気相下で 96 時間培養した Pm 3 を 10 %血清を含む合成培地 (CM 2) を用いた場合と純合成培地 858 (CM 3) を用いた場合とで比較したものであるが, 純合成培地ではやはり 96 時間も経過すると, 全体的に退化が著しく形態の維持も悪い。それに対し, 10 %でも血清が入っていると形態の維持ははるかに改善されており, 自然培地 (CM 1) を用いての培養 (図 7) と比較してもそれ程劣っていない。また, 純合成培地でも 24 時間程度の範囲ならば, 図 11 に見られる如く, 培養後も呼吸活性は培養前と全く同程度に維持されて居り, この程度の時間内ならば培養歯胚は未だ活潑に生活し続けていることが想像される (図 5 参

表2 培養歯胚の Glucose 消費量
mg/mg of dry tissue/48 hrs

培養気相 の 酸素分圧	歯 種	培地の Glucose 濃度	
		120mg%	250mg %
95 %	Pm 3	1.27 (46)	2.14 (2.52) 2.33 (54)
	Pm T	0.95 (1.03) 0.99 (41)	2.09 (1.97) 2.03 (52)
50	Pm 3	1.64 (59)	2.30 (2.98) 2.64 (61)
	Pm T	2.08 (1.37) 1.73 (71)	2.22 (2.55) 2.39 (61)
20	Pm 3	2.77 (100)	4.00 (4.64) 4.32 (100)
	Pm T	2.60 (2.33) 2.42 (100)	4.10 (3.77) 3.94 (100)

(註) CM1 で 48 時間培養

表の数値の内, } のあとの数値は 2 回の実験の平均値である。() 内の数値は 20 %酸素の分圧下での Glucose 消費量を 100 としたときの, 各分圧下での Glucose 消費の比を示す。

図9 CM1 (気相は空気) で48時間培養後の $^{35}\text{SO}_4$ のオートラジオグラフィー (ブアン固定, アルシアンブルー・クロランチンファストレッド染色 $\times 400$)
 培地中には $10 \mu\text{c/ml}$ の $^{35}\text{SO}_4$ を含む,
 図9-Aは銀の粒子に, 図9-Bは標本に焦点を合せた。
 $^{35}\text{SO}_4$ は圧倒的に Dental Papilla 側にとりこまれている。

照)。

著者は以上の組織学的所見から, 気相の酸素分圧を高めることにより比較的大きな歯胚も *in vitro* で生かすことが可能となるのを認めたが, 一方このように酸素分圧を高めることが組織にどんな代謝的な影響を与えているのかを調べるために培養中の歯胚が消費する Glucose 量と生成する乳酸量とを各種酸素分圧下で測定した。表2は, Glucose を $120 \text{ mg}\%$ または $250 \text{ mg}\%$ 含む CM1 で48時間培養する間に消費した Glucose 量を組織の乾燥重量当りの mg 量として表わしたものである。培地中に Glucose を $250 \text{ mg}\%$ 含む場合は, $120 \text{ mg}\%$ の場合に比較していずれの気相下でも $1.4 \sim 2.0$ 倍の Glucose を消費している。また, 培地中の

Glucose 濃度に関係なく, どの菌種についても酸素分圧を高めて行くと Glucose の消費量は著しく減少し, 酸素分圧 95% の場合を規準にとると 50% 酸素の気相下では約 $60 \sim 70\%$, 20% 酸素の気相下では約 $40 \sim 50\%$ に減少している。歯胚の呼吸活性が想像以上に高いことと考え併せると, 低酸素分圧下では酸素不足を多量の Glucose を消費することによって償っているように考えられる。

培養後の培地の pH は酸素分圧が低い程低下して酸性に傾いていたが, これは酸素分圧の低い程多量の乳酸が培地中に蓄積して来ていることを予想させた。表3は各種気相下での Glucose 消費量と乳酸生成量とを示したものであるが, 予想に違わず気相の酸素分圧が低い程多くの乳酸が生成さ

図 10 10-Aは合成培地 858 のみで 96 時間(酸素分圧 50 %)培養したもの。退化が著しい。
10-Bは 10 %血清を含む合成培地 858 で 96 時間(酸素分圧 50 %)培養したもの。
10-Aにくらべ、形態の維持ははるかによい。
(ブアン固定, H.E 染色 ×200)

表 3 培養菌胚の Glucose 消費と乳酸生成

培養気相 の 酸素分圧	菌種	Glucose 消費量	乳酸生 成量	
			Glucose 消費量	
%		μg/mg of dry tissue/hr		%
95	Pm 3	26.5	13.3	49.7
	Pm 1	20.6	$\left. \begin{matrix} 8.0 \\ 12.8 \end{matrix} \right\}$ 10.4	50.5
50	Pm 3	34.2	19.8	58.2
	Pm 1	36.0	$\left. \begin{matrix} 16.1 \\ 21.3 \end{matrix} \right\}$ 18.7	52.0
20	Pm 3	57.7	45.2	78.4
	Pm 1	50.4	$\left. \begin{matrix} 35.5 \\ 42.2 \end{matrix} \right\}$ 42.2	83.8

(註) CM 1 (Glucose 濃度 120 mg%) で 48 時間培養。
Glucose 消費量は表 2 の内、培地の Glucose 濃
度が 120 mg% の場合の単位を直したもの。
乳酸生成量のデータの内、} のあとの数値は、2
回の実験の平均値である。

れて居り、Pm 3 を例にとると、95 %酸素の気相
下では 13.3 μg/mg dry tissue/hr の乳酸生成に対
し、50 %酸素の気相下では 50 %増の 19.8 μg/mg
dry tissue/hr、20 %酸素の気相下では 240 %増の
45.2 μg/mg dry tissue/hr の乳酸を生成してい
る。さらに表 3 から消費された Glucose 量と生成
された乳酸量との比をとつてみると、低酸素分圧
下程 Glucose の消費に見合う乳酸の生成量が多
く、低酸素分圧下では酸素不足の代償として多量
の Glucose を消費しても乳酸になってしまうもの
が多く、好氣的な呼吸が抑制されてエネルギー論
の上からも大変非能率的であると考えられる。こ
の Pasteur 効果の現象は、20 %酸素の分圧下の場
合と 50 %酸素の分圧下とを比較すると極めて著
しい差が認められたが、50 %酸素の場合と 95 %
酸素の場合とでは著しい差はみられなかった。

図 11 合成培地 (TC 858) だけで 24 時間培養後 (気相の酸素分圧 95 %) の菌胚の酸素消費。1 回の測定に P_{m1} 2 個, P_{m2} 2 個, 計 4 個又は P_{m2} 2 個, P_{m3} 2 個, 計 4 個の菌胚を使用した。24 時間程度の範囲ならば合成培地だけでも菌胚の呼吸活性は全く落ちていない。(図 5 参照)。

図 12 は、95 % および 20 % の酸素分圧下で 48 時間培養した後の菌胚の呼吸活性を比較したグラフであるが、やはり低酸素分圧下では約 2 割程度の呼吸活性の低下を認めた。

考 察

従来の Plasma Clot の上 (Glasstone³⁾ Hay¹⁵⁾) または Plasma Clot の中 (Lefkowitz et al^{7,9)}) での菌胚の培養は、マウスやラットの胎児のような小さな菌胚の発育や分化を形態学的に追求するには適している。しかし、著者の用いた生後 1～2 日の家兎の永久小白菌胚のような大型の菌胚の Plasma Clot での培養は、培養体の周囲に fibroblast の outgrowth の著明な出現に反し、菌胚の内部は栄養および酸素の供給の不足のため全く退化するばかりであつたし、また培地交換に際して培養体を全然傷つけないでは植え継ぎが出来ない

図 12 各種酸素分圧下で 48 時間培養後 (培地 CM1) の菌胚の酸素消費
実線は酸素分圧 95 % の気相下で、点線は酸素分圧 20 % の気相下で 48 時間培養した後の酸素消費で、低酸素分圧下では高酸素分圧下に比し 2 割程度の呼吸活性の低下が認められた。

点からも、固形培地による培養は不適當である。その上、培養の定量的な解析のためには液体培地による培養がはるかに望ましい。

著者の用いた液体培地による Floating Lens Paper 法では outgrowth の出現は殆んどなく、培地交換の煩雑さもなく、培養の定量的な解析にも耐え得る方法であつたが、レンズペーパーを液体培地に浮かせるだけなので、多量の培養体を戴せると培養体が培地の中に沈んでしまう欠点がある。その上、培養気相が空気なので、培養体が大きいと必らず培養体の中心部に退化像がみられた。著者の用いた菌胚でも P_{m2} (直径 1.0～1.2 mm) ではかろうじて培養可能であつたが、象牙芽細胞層の形態維持が困難な上、さらに大きな P_{m1} , P_{m3} の菌胚では満足すべき培養は出来なかつた。また、空気を気相とする培養では気相の炭酸ガス含有量 (0.03 %) が低いため、培養時間

の経過に伴って培地中の炭酸ガスが失われて pH が一定しないことも欠点である。その点, Trowell の培養法では気相の酸素分圧を自由に高められると共に, 気相に自由に高濃度の炭酸ガス(5%)を含ませることが出来るので pH の変化が比較的少い。

家兎の永久小白歯胚の呼吸活性は予想以上に高い値を示し, 酸素の必要性を如実に物語っている。各歯種により多少のばらつきを示しているが, 分化の進んだ歯胚(Pm₃, Pm₂)程, 細胞外成分(Pre-dentin)が多いことを考慮すると, いずれの歯種についてもほぼ同じ数値を示していると言うことが出来よう。ここに示されている平均 $Q_{O_2} = 5.50$ という値は, 先に佐々木²⁷⁾が犬の歯胚を Enamel Pulp および Dental Papilla に分けて測定した値 2.63 および 3.56 に比較して相当高いが, 佐々木が犬の歯胚を機械的に Enamel Pulp と Dental Papilla とに分けスライスとして測定したのにくらべ, 著者は家兎の歯胚を全く傷つけずに歯胚全体として測定したこと, および犬と兎の動物の相違(例えば, 脾臓 14.2(兎), 6.6(犬); 肺臓 8.0(兎), 4.9(犬); 肝臓 11.6(兎), 11.7(犬)²⁸⁾などを考えると当然のことと思われる。

Warburg²⁹⁾によれば, 培養体を完全な球体と考え, 培養体の中心部に達する酸素分圧が丁度 0 となる培養体の限界半径を r とすると,

$$r = \sqrt{8CD/A}$$

の式で表わされるという。

但し, r : 限界半径(cm)

C: 培養気相の酸素分圧(気圧)

D: 酸素の拡散恒数。Krough によると
1 cm² の拡散勾配につき 毎分 1.4×10^{-5} cm(38°C)

A: 培養体の酸素消費(ml/ml tissue/min)

今, 著者の用いた歯胚で計算すると, (歯胚の重量の測定から乾燥重量/湿性重量 = $1/6$, 歯胚の比重を 1.2 とする) 空気および 20% 酸素の分圧下では培養出来る限界の直径は 0.9 mm, 50% 酸素の分圧下では 1.4 mm, 95% 酸素の分圧下では 2.0 mm となる。この計算値は著者の培養した家

兎の歯胚の組織学的所見と大略一致する(図 6 参照)。従って, 気相の酸素分圧を高めることにより体積にして, 20% の酸素分圧下の場合に対し, 50% の酸素分圧下では約 4 倍, 95% の酸素分圧下では約 10 倍の容積の培養体が培養可能となる。

このように培養気相の酸素分圧を高めて行くことは, 大きな組織の培養を可能にするばかりでなく, 象牙芽細胞層の形態の維持をも著しく良くした(図 4, 7 参照)。このことは犬の歯胚では Dental Papilla の方が Enamel Pulp にくらべて約 35% 高い呼吸活性を示したとの佐々木の報告²⁷⁾と考え併せると, Predentin 形成中の象牙芽細胞層が相当高い酸素消費を行っていることが予想されて興味深い。

著者の培養でも Pre-enamel の形成は出来なかった。1961 年 Hay¹⁵⁾は胎生 16~18 日のマウスの歯胚を Plasma Clot の上で培養し, 初めて Pre-enamel と思われる層の形成を認めたが, Pre-enamel の形成された頻度は全培養歯胚中 23% と低かった。Hay は Pre-enamel の形成に比較的成功した理由について, 彼女の用いた材料が著しく小さかつたためエナメル芽細胞層に良く栄養が供給されたためと考えているが, 著者は ³⁵SO₄ のオートラジオグラフィーの所見から, in vitro で Pre-enamel の形成が困難な原因の一つとして, 著者の in vitro の条件における外胚葉組織の多糖類合成の阻害を考えているが, この点については今後ともなお, 合成培地やアイソトープを用いての検索に待たねばならない。

著者は, 培養気相の酸素分圧を高めることによって歯胚の Glucose 消費量が著しく抑制されると共に, 乳酸の生成量も減少して Glucose の消費に見合う乳酸生成の比が小さくなり, 解糖が抑制され呼吸が促進されることを見た。この Pasteur 効果の現象をさらに定量的に解析するために, 実際に解糖系および呼吸系で消費された Glucose 量を計算した(表 4)。表 4 は, 表 3 および図 12 で示した実測値(表 4 の(1)(2)(3)欄の数値)から乳酸生成に利用した Glucose 量((4)欄, 1 モルの乳酸

表4 消費した Glucose の解析

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
培養気相 の 酸素分圧	菌 種	消費した全 Glucose 量 $\mu\text{M}/\text{mg}$	乳酸生成量 dry tissue/hr	各気相で 48 hrs 培養後 の Q_{O_2} $\mu\text{l}/\text{mg}$ dry tissue/hr	乳酸生成 (解糖系) で利用した Glucose 量 $\mu\text{M}/\text{mg}$	呼 吸 系 で利用した Glucose 量 dry tissue/hr.	(4)+(5)	$\frac{(5)}{(1)}$	$\frac{(6)}{(1)}$
95 %	Pm <u>3</u>	0.15	0.15	5.25	0.075	0.039	0.114	0.26	0.76
	Pm <u>1</u>	0.12	0.12	5.89	0.06	0.044	0.104	0.37	0.87
20	Pm <u>3</u>	0.32	0.50	4.50	0.25	0.033	0.283	0.10	0.88
	Pm <u>1</u>	0.28	0.47	4.68	0.235	0.035	0.270	0.13	0.96

(註) (1)(2)(3)は実測値。(1)(2)は表3より、(3)は図12より引用
(4)は乳酸生成(解糖系)に利用した Glucose 量で、1モルの乳酸は $\frac{1}{2}$ モルの Glucose に相当するため(2)を2で割って得た。
(5)は呼吸系で利用した Glucose 量で、 $1\mu\text{M}$ の酸素は $22.4\mu\text{l}$ に相当するし、又消費した1モルの酸素は $\frac{1}{6}$ モルの Glucose に相当するので、(3)を22.4で割り、更に6で割って得た。
(6)は実際に解糖系と呼吸系とで消費した Glucose 量。
(7)は消費した全 Glucose の内、呼吸系で消費したものの割合。
(8)は消費した全 Glucose の内、解糖系と呼吸系とで消費したものの割合。

は $\frac{1}{2}$ モルの Glucose に相当するので、(2)欄の数値に $\frac{1}{2}$ を乗じて得た)および呼吸系で利用した Glucose 量((5)欄、 $1\mu\text{M}$ の酸素は $22.4\mu\text{l}$ に相当するし、また消費した1モルの酸素は $\frac{1}{6}$ モルの Glucose に相当するので、(3)欄の数値を22.4で割り、さらに $\frac{1}{6}$ を乗じて得た)を計算した。また(6)欄は、実際に解糖系と呼吸系とで消費した Glucose 量((4)+(5))、(7)欄は消費した全 Glucose の内、呼吸系で消費したものの割合((5)/(1))である。つまり、95%の酸素分圧下で培養した菌胚は、消費した全 Glucose 量の内26~37%をTCAサイクルで利用したのに対し、20%の低酸素分圧下で培養した菌胚は、消費した全 Glucose 量の内やつと10%程度しか呼吸系で利用しなかったことになる。TCA回路の1サイクルで1個のピルビン酸から15個のATPが生ずること、しかもGlucose1分子から2分子のピルビン酸を生ずることからGlucose1分子当り30個のATPが出来ることになり、これを解糖時にはGlucose1分子当り3個しかATPが出来ないことと比較すると、培養気相の酸素分圧を高めることによつて菌胚がいかにか能率よくGlucoseを消費しているかがわかる。なお、表5の(8)欄の数値

は消費した全 Glucose の内、解糖系および呼吸系で消費したものの割合((6)/(1))を示すが、いずれも1.0よりは小さく、残りのGlucoseは恐らく乳酸からグリコーゲンへ再合成されたものと考えられる。

著者の実験(表2)で、培地のGlucose濃度を120mg%から250mg%に高めることにより、菌胚のGlucose消費量が2倍近く増加した。培地のGlucose濃度が高いと、通常、組織の呼吸が抑制され逆に解糖が促進される。この現象は一般にinverse Pasteur 効果とかCrabtree 効果^{20,31)}とか呼ばれている。著者は未だGlucose濃度が250mg%における解糖と呼吸との関係を確認していないのはつきりしたことは言えないが、Glucose濃度を高めることによつてGlucose消費が増したことはやはりCrabtree 効果の現われかも知れない。

合成培地858に血清を10%加えることにより培養菌胚の形態の維持を著しく改善し得たことは、未だ市販されている合成培地が不完全なことは、更に菌胚の組織や細胞の栄養要求が大変複雑なことを示している。しかし合成培地(CM3)での培養後の菌胚の呼吸活性の測定から、24時間程度の

表5 各種 In Vitro 実験条件下での Glucose 消費の比較

材 料	Glucose 消費量 $\mu\text{g}/\text{mg dry tissue}/\text{hr.}$	In Vitro 実験条件	報 告 者
頭 蓋 骨 (ラ ッ ト)	0.94	Krebs Ringer, Air	Kenny ³²⁾ (1961)
メ タ フ ィ ー ゼ (ラ ッ ト)	0.8 1.3	Aerobic } Krebs Ringer Anaerobic }	Vaes Nichols ³³⁾ (1962)
軟 骨 胚 (鶏 胚)	112	馬血清 10 % Krebs Ringer 90 %, Air	Fell et al ³⁴⁾ (1961)
歯 胚 Enamel Pulp Dental Papilla (牛)	3.8 7.0	} Krebs Ringer } Anaerobic	Araya Sasaki ³⁵⁾ (1962)
歯 胚 全 体 (家 兎)	50.4~ 57.7	} 家兎血清 50 % C.E.E. 5 % Hanks. B.S.S. 45 % O ₂ -20%, CO ₂ -5%, N ₂ -75%	Suda (1963)

範囲ならば充分、合成培地も利用出来ると考えられる。

組織培養という条件は、他の in vitro の実験条件と比較して組織をより長時間生活させることが出来るだけでなく、一定時間内にもより活潑に組織の代謝が行われていることは当然予想される。先に、荒谷と佐々木³⁵⁾は生後約1年の牛の歯胚のスライス、Glucose を最も多く消費すると思われる嫌氣的条件下における Krebs Ringer の重炭酸塩緩衝液中で incubate し、Enamel Pulp の Glucose 消費量を $3.8 \mu\text{g}/\text{mg dry tissue}/\text{hr.}$ 、Dental Papilla のそれを 7.0 と報告したが(表5)。これに対し組織培養の条件下では20%酸素の分圧下でも $50.4 \sim 57.7 \mu\text{g}/\text{mg dry tissue}/\text{hr.}$ と約10倍高い細胞活性を示している。このことは動物の相違・動物の年齢の違いを考慮してもなお、通常の in vitro の実験条件に比較して組織培養の条件がいかに生理的条件に近いかを如実に示すものである。今後、合成培地の利用・分析のミクロ化を含めて培養の定量的な解析を進めることにより、生理的条件にさらに近い組織培養法が他の in vitro の実験法では識別出来ない組織の代謝の微細な変化を解明して行く可能性が充分期待される。

総 括

(1) 歯胚の培養の定量的解析を目的として、生後1～2日の家兎の永久小白歯胚を液体培地で培

養した。

(2) 空気を気相とする Floating Lens Paper 法では、直径1.0 mm 位(Pm₂)の歯胚迄は培養出来たが、それ以上大きな歯胚は必ず培養体の中心部に退化を生じた。

(3) 家兎の永久小白歯胚の呼吸活性は $\text{QO}_2 = 5.50$ と想像以上に高い値を示した。

(4) Trowell の培養装置を用い、培養気相の酸素分圧を高めて行くことにより、さらに大きい歯胚の培養が可能になった。

(5) Pre-dentin の厚さから判断して、4日間の培養で生体内の2日分に相当する分化を認めた。しかし Pre-enamel の形成は認められなかった。

(6) in vitro では、Dental Papilla および象牙芽細胞は培地中の $^{35}\text{SO}_4$ を活潑に取り込んだのに対し、Enamel Pulp およびエナメル芽細胞は殆んど取り込まなかった。

(7) 純合成培地 TC 858 での培養では、96時間も経過すると退化が著しかったが、10%血清を加えると形態の維持ははるかに改善された。

(8) 合成培地 TC 858 のみの培養でも、24時間程度ならば呼吸活性は全く落ちていない。

(9) 培養気相の酸素分圧を高めることによって歯胚の Glucose 消費量が著しく抑制されると共に、乳酸の生成量も減少して著しい Pasteur 効果が観察された。

(10) 組織培養の条件下では、他の in vitro

の実験条件にくらべて、はるかに細胞の代謝活性が高まっていることが Glucose の利用の比較からも想像される。

(本研究は、佐藤温重氏(本学・硬研・生理薬理)及び田中邦男氏(現在、教育大・動物)との協同研究の一部であり、その詳細なる報告は、既に Archives of Oral Biology 誌に投稿中である。)

稿を終るにあたり、組織培養の技術を手にとつて教えられ、その後も協同研究者として本研究を支えて下さつた佐藤温重氏及び田中邦男氏に厚く感謝致します。また、終始御懇篤なる御指導と御校閲とをいただいた荒谷真平教授に深く感謝すると共に、この協同研究をこころよくお許し下さつた硬組織研究施設の岡田正弘教授及び麻生田亮教授に厚く感謝致します。また、佐々木哲助教授を始め生化学教室の方々、硬組織研究施設及び薬理学教室の方々にも厚く御礼申し上げます。尚、ここに使用した Trowell の培養装置は本学電気工作室の御協力により製作したもので、厚く御礼致します。

文 献

- 1) 弓倉繁家：家兎切歯の体外培養について、口病誌, 1: 62, 1928 (昭2)。
- 2) Yumikura, S.: Auspflanzungsversuche mit Schneidezäknen (Kaninchen) Virchow's Archiv. f. Pathol. Anat. u. Physiol., 254: 17, 1925.
- 3) Glasstone, S.: The development of the tooth germs in vitro. J. Anat., 70: 260, 1936.
- 4) Glasstone, S.: A comparative study of the development in vivo and in vitro of rat and rabbit molars. Roy. Soc. London Proc. ser. B, 126: 315, 1938.
- 5) Glasstone, S.: The development of halved tooth germs. J. Anat., 86: 12, 1952.
- 6) Szabo, G.: Studies on the cultivation of teeth "in vitro" J. Anat., 88: 32, 1954.
- 7) Lefkowitz, W., Mardfin D.F., Bodecker, C. F.: Cultivation of rat molar tooth germs in Carrel Flasks. (I) J. dent. Res., 33: 189, 1954.
- 8) Lefkowitz, W.: The cultivation of tooth germs in an embryo extract free medium. J. dent. Res., 35: 440, 1956.
- 9) Lefkowitz, W., Mardfin, D. F., Bodecker, C. F.: In vitro cultivation of rat molar tooth germs. (II) J. dent. Res., 35: 523, 1956.
- 10) Lefkowitz, W., Swayne, P.: Normal development of tooth buds cultured in vitro. J. Dent Res., 37: 1100, 1958.
- 11) Niizima, M.: Enamel epithelium in tissue culture. The Am. J. Anat., 99: 351, 1956.
- 12) Niizima, M.: Outgrowth of dentinal fibers observed in tissue culture. Z. Zellforsch., 46: 121, 1957.
- 13) Niizima, M.: Dental Papilla in tissue cultue. J. dent. Res., 37: 767, 1958.
- 14) Mellanby, M., Holloway, P. J.: The effect of vitamin A on the growth of tooth germs in tissue culture. J. dent. Res., 35: 960, 1956.
- 15) Hay, M. F.: The development in vivo and in vitro of the lower incisor and molars of the mouse. Arch. Oral Biol., 3: 86, 1961.
- 16) 須田立雄：歯胚の組織培養，口病誌，29: 192, 1962.
- 17) Chen, J. M.: The cultivation in fluid medium of organized liver, pancreas and other tissues of foetal rats. Exp. Cell Res., 7: 518, 1954.
- 18) Trowell, O. A.: The culture of mature organs in a synthetic medium. Exp. Cell Res., 16: 118, 1959.
- 19) Healy, G. M., Fisher, D. C., Parker, R. C.: Nutrition of animal cells in tissue culture. (X). Synthetix medium No. 858, Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 89: 71, 1955.
- 20) Wenneslaed, R., Senter, A. D., Eiler, J. J.: Modification of the microrespirometer. Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 100: 510, 1959.
- 21) Volpe, A. R., Manhold, J. H.: Microrespirometer technique for study of human gingival tissue. J. dent. Res., 41: 420, 1962.
- 22) 化学の領域：増刊 34, 生化学領域に於ける光電比色法, 各論 2, 南江堂, 1958, p. 27.
- 23) 化学の領域：増刊 33, 生化学領域に於ける光電比色法, 各論 1, 南江堂, 1958, p. 105.
- 24) Bélanger, L. F.: Autoradiographic studies of the formation of the organic matrix of cartilage, bone and the tissues of teeth. Chiba Foundation Symposium on Bone Structure and Metabolism, London, 1956, p. 75.
- 25) Bélanger, L. F.: Autoradiographic detection of radiosulfate incorporation by the growing enamel of rats and hamsters. J. dent. Res., 34: 20, 1955.
- 26) Biggers, J. D., Webb, M., Parker, R. C., Healy, G.M.: Cultivation of embryonic chick bones on chemically defined media. Nature, 18: 825, 1957.
- 27) Sasaki, S.: Studies on the respiration of the tooth germ. J. Biochem., 46: 269, 1949.
- 28) Krebs, H. A.: Biochim. Biophys. Acta, 4: 249, 1950.

- 29) 化学の領域：増刊 13, ワールブルグ検圧計, 南江堂, 1954, p. 114.
- 30) Crabtree, H.G. : Biochem. J., 23 : 536, 1929.
- 31) Broda, E., Rücker, W., Suschny, O., Abdel-Tawab, G. A., Kellner, G. : Production of carbon dioxide and lactic acid from radioactive glucose by tissue in culture. Exp. Cell Res., 23 : 555, 1961.
- 32) Kenny, A. D., Goldhaber, P., Draskoczy, P. R. : Citric acid production by bone. The Parathyroides, 1961, p. 275.
- 33) Vaes, G. M., Nichols, G. : Oxygen tension and the control of bone cell metabolism. Nature, 193 : 379, 1962.
- 34) Dingle, J.T., Lucy, J.A., Fell, H.B. : Studies on the mode of action of excess of vitamin A. (I) Effect of excess of vitamin A on the metabolism and composition of embryonic chick-limb cartilage grown in organ culture. Biochem. J., 79, 497, 1961.
- 35) Araya, S., Sasaki, S. : Glycolytic activity of tooth germ. International Ass. for Dent. Res. 10 th general Meeting of Japan Division. 1962
- 36) 佐藤温重, 須田立雄, 田中邦男 : 未発表.