

【 44 】

氏名	齊藤多久馬 さいとうたくま
学位の種類	理学博士
学位記番号	論理博第158号
学位授与の日付	昭和41年9月27日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	<b>Experimental Studies on the Newt Forelimb Regeneration</b> (イモリの前肢再生に関する実験的研究)
論文調査委員	(主査) 教授 市川 衛 教授 中村健児 教授 加藤幹太

論 文 内 容 の 要 旨

イモリの肢の再生過程は、次の3つに区分することができる。肢を切断して、その切り株にまず起こる変化は「脱分化」である。これは主として切断面にある筋肉と骨組織が形態的・化学的にそれぞれの組織特異性を失う過程で、この過程を終えた細胞は胚期状態に戻ったものと考えられている。次の過程はこうして未分化の状態にもどった細胞や皮膚に由来する細胞が、切断面にいわゆる「再生芽」という細胞集塊をつくる過程である。最後の過程は再生芽の中に再び筋肉細胞や骨細胞が分化してくる「再分化」の過程である。

イモリの肢の再生に関する研究は多いが、以上の3つの過程に分けて、各過程に起こる変化を組織化学的乃至分子生物学的に調べたものはあまりない。こうした研究方法が新しいためであるが、申請者の論文はこの新しい方法を用いて、イモリの肢の再生という一見陳腐な現象に対し、より深い洞察を試みたものである。

主論文3部のうち、第1部では、タンパク質の分解と合成に関与するアミノペプチダーゼの活性の変化を調べている。まず、再生体をふくむ切断部位の凍結切片を  $-12.5^{\circ}\text{C}$  のクリオスタットの中で作製し、スライド上で乾燥させ、Nachlas らの開発した方法で酵素活性を測定しているが、それによると  $10\sim 14^{\circ}\text{C}$  で再生を起こさせた場合、切断後20日まではこの酵素の活性は全く認められず、30日たってはじめて骨の周辺部の骨細胞の一部と骨膜細胞の一部にだけ僅かにこの酵素の活性が現われはじめています。更に10日後になると、活性を示す細胞の数がふえて、ほとんどすべての周辺の骨細胞と骨膜細胞に認められるようになる。このときはちょうど骨の切断面に、顕微鏡でみて形態的な退化の認められるときである。切断後110日で骨の退化は止るが、これまでに遊離された骨細胞は形成過程にある再生芽の方へつきつきに移行している。この移行中の細胞には高い活性が認められる。一方、再生芽は、切断後30日から50日くらいのあいだに旧組織から脱分化によって遊離した繊維芽細胞様の形態をした細胞が集まって形成される。これらの細胞の起源はいろいろで骨細胞・骨膜細胞・筋細胞のほか、その部位に元来あった結合織由来の細

胞や真皮由来の細胞もある。形態的にその由来を確かめることが不可能であるばかりでなく、組織化学的にもそれぞれの特異性を失っている。こうした細胞集塊の中心部を占めるものが、やがて退化した骨に帽子をかぶせるような形で密集して、前軟骨を形成する。この前軟骨細胞、ことに周縁部にあるものにアミノペプチダーゼの活性が高い。筋肉からは切断後70日くらいから筋細胞質をもつ細胞が芽出して念珠状にならぶが、この列の先端に近いもの、つまり脱分化の進んだものほど活性が高い。

第2部では、エステラーゼの活性を第1部と同じように脱分化から一応の組織形成が完了する120日までに亘って調べていると同時に、同位酵素の変動を Merkert らの開発した澱粉ゲル電気泳動法で調べている。

エステラーゼの活性は、アミノペプチダーゼの場合と異なり、再生体の上皮細胞でも正常の場合と同じような強い活性を示すし、筋肉由来の念珠状にならんだ細胞列では、先端にあるものほど弱い。しかし、前軟骨状態の密集塊では再びしだいにこの酵素の活性が高まる。神経は切断部位から延びてくる組織であるが、この酵素活性は、切り株の中にある部分が強く、再生体の中にある部分は弱い。一般にいて、再生体のエステラーゼ活性は正常肢のそれより弱い。

次に、エステラーゼの分子種を調べてみると、正常肢全体でも、皮膚や筋肉にわけて測定しても、RE-1、RE-2、RE-3の3種が存在するのに、再生体ではRE-2だけが存在して、RE-1とRE-3を検出することはできない。再生体でこの酵素活性が弱いのも、これが原因しているかも知れないという。再生体を電顕で調べてみると、エステラーゼが存在する場所と考えられている粗面ERが著しく減少していることと活性の弱いこととはよく符号している。

第3部では、再生体の分化の過程を、軟骨を例にとり、コンドロイチンサルヘートへの $S^{35}$ の取り込みによって調べている。この物質は軟骨に特異的な存在であるから、この存在が証明されたら、その細胞なり組織は軟骨への分化を行なったといえる。調べたところによると、切断後48~50日の再生体では、まだ僅かの細胞が少し $S^{35}$ の取り込みを示す銀粒子をもつだけで、トルイジン青でコンドロイチンサルヘートの存在を染別できるほどにはなっていない。58~63日の再生体になってはじめて、つまり外形的には肘の形成が認められ、内部形態的には上膊骨・橈骨・尺骨の形が細胞集団の形から予想されるようになってはじめて、本格的な強い $S^{35}$ の取り込みが予定軟骨細胞に認められる。更に詳しくいうと、前軟骨細胞では細胞質の中にそれが認められ、軟骨細胞ではじめてその周囲の基質に認められる。このことは $S^{35}$ と結びつくコンドロイチンサルヘートかこれに近い物質が細胞内で合成されて基質に放出されることを示唆する。一方、この時期の再生体をトルイジン青で染色してみると、この色素でメタクロマジーを起こす部位と銀粒子の存在する部位、つまり $S^{35}$ の存在するところとは完全に一致する。このことは $S^{35}$ がコンドロイチンサルヘートかそれに近い高分子の物質に取り込まれたことを示す。ヒアルロニダーゼで前処理を施すと銀粒子は全く無くなるが、アミラーゼや生理食塩水で処理しても銀粒子の分布にほとんど変化をもたらさない。このことも $S^{35}$ がコンドロイチンサルヘートと結び付いたことを証明している。要するに形態的にみて前軟骨細胞といわれているときに、すでに軟骨細胞としての代謝系が働いていることを証明したもので、大変意義の深い論文である。

参考論文その1は、主論文の資料となったものであるが、その2は、昆虫の変態時における7種類の酵

素活性の変動をいろいろの組織について、組織化学的に観察したものである。その3は、発生中のニワトリ肝とラットの再生肝におけるエステラーゼ同位酵素の変動を述べたものである。発生中には古い分子種を失って新しい分子種を生ずるが、再生中には分子種に入れかわりはない。ただ活性度に変化を生ずるものがあることを見ている面白い論文である。その4は、発生中に入れかわる分子種、つまり、isozymeの変化と系統発生上の各成体に存在する isozyme の変化とを腎臓のエステラーゼについて比較したもので、極めて興味深いものである。

### 論文審査の結果の要旨

有尾両生類の肢はたやすく再生するので、これに関する研究はすでに前世紀の後葉にはじまる。したがって、論文数もひじょうに多い。しかし、そのほとんどすべてのものは、傷口と再生芽の方向、再生と神経との関係、再生芽の細胞起源と形態形成能、再生と外的環境などに関するもので、肢の切断付近の細胞に起こるいわゆる「脱分化」や「再分化」を組織化学的に研究した報告は少ない。これは組織化学的研究方法の確立が、比較的最近であることによる。申請者の研究は、この新しい技術を駆使して行なったものである。

主論文は3部からなる。第1部では、前肢切断後の切り株細胞に起こるアミノペプチダーゼの活性の変化を調べ、第2部では、同じ部位におけるエステラーゼの挙動を述べ、第3部では、 $S^{35}$  をトレーサーとして、再分化の過程において組織特異的物質が形成される様相を軟骨について論じている。

イモリの肢の再生は欧米産のものにくらべて比較的緩慢で、再生芽が形成されるまでに60日ほどを要するが(10~14°C)、20日まではアミノペプチダーゼの活性はまだ認められない。30日たったものではじめて検出される。まず、骨膜細胞や上膊骨周辺の骨細胞に出現し、のち10日ほどのうちに漸次中心部の骨細胞にも見られるようになるが、このときは、組織学的にみて上膊骨の切断部に退化現象が現われるときである。つまり、脱分化の過程で、アミノペプチダーゼは強い活性を示すようになる。筋肉細胞でもしだいに活性が高まり、これが次の再分化の過程まで続く。しかし、傷口を被う上皮細胞では、どの過程においても全く活性が検出されない。

一方、エステラーゼの活性は、正常ではどの組織でも強いが、それが再生過程でも保たれるのは上皮細胞だけで、筋細胞では脱分化の進んだものほど弱まる。また、再生芽をつくる細胞における活性は一般に弱い、この再生芽の中に軟骨への再分化がはじまると、その細胞には活性が再びしだいに強くなる。しかし、細胞内の基質や再生芽の中に延びつつある神経繊維にはいつまでも弱い活性しか認められない。再生芽の真皮細胞もまた弱い活性を示すに過ぎない。

澱粉ゲル電気泳動法で再生芽中のエステラーゼの分子種を調べているが、それによると筋肉や皮膚では正常で3種あるのに対し、1種しか検出されていない。このことが上に述べた再生芽の弱いエステラーゼ活性に関係しているだろうと想像している。

再生芽の中には、再分化の結果、組織特異的物質として、筋肉にアクトミオシン、軟骨にコンドロイチンサルヘートが合成される。申請者は後者の検出を  $S^{35}$  を用いて行ない、いつ軟骨細胞が特異的分化をするかを調べている。それによると、切断後38日まではまだ全く  $S^{35}$  を取り込む細胞はない。約50日して少

し取り込む細胞が現われ、60日前後で本格的な取り込みがみられるようになる。すなわち、形態的に上膊骨・橈骨・尺骨の区別ができるころの前軟骨細胞が、実は軟骨細胞としての特異性をもつときであることを証明している。S<sup>35</sup> の取り込みは前軟骨では細胞質に認められるが、軟骨に分化した場合には、細胞間基質の方にその存在が証明される。また、同時に行なった組織染色の結果や酵素処理による消化の実験結果から、S<sup>35</sup> がコンドロイチンサルヘートに取り込まれたことを確認している。この結果は再分化を実証したものとして価値の高いものである。

参考論文4編はいずれも再生・変態あるいは発生中の酵素活性の挙動を調べた興味深い研究で、申請者が組織化学的技術を十分に駆使し得る実力をそなえていることを示している。

要するに、主論文、参考論文ともにいずれもすぐれた研究であって、発生学や実験形態学に貢献するところが多い。

よって、申請者齋藤多久馬の論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。