

精囊腺組織の体外培養学的研究

第 1 編 基礎実験成績

大阪医科大学皮泌尿教室（泌尿器科主任 石神襄次教授）

中 野 順 道

Studies on the Tissue Culture of the Seminal Vesicle

I. Fundamental Experiments

Jundo NAKANO, M.D.

From the Department of Urology, Osaka Medical College

(Director : Prof. Joji Ishigami, M.D.)

Influence of male sex hormone, female sex hormone, and adrenocortical hormone upon the growth of the tissue of the seminal vesicle in vitro were studied by means of the tissue culture of seminal visicle of guinea-pigs. The results were as follows.

1) In the present study the Carrel's flask method was employed for the tissue culture.

2) The tissues of the seminal visicle of guinea-pigs were definitely grown by the cultivation and they survived for about 25 days.

3) Epithelial cells began to grow 2 to 3 days after cultivation and they reached to the maximum growth and proliferation between 7th to 9th day.

4) Fibroblasts began to grow 4 days after cultivation and they reached to the maximum grows 14th or 15th day.

5) The growth of fibroblasts was not as strong as that of epithelial cells and was apparently inhibited by the latter.

I 緒 言

近時、組織培養法は方法の改良及び術式の進歩と相俟つて著しい発展を遂げるに至り、重要な医学研究法の 1 つとして広くその活用が注目されている。

組織培養法が古く Erdmann(1917) Fischer(1921), Carrel (1925), Bisceglie (1928) 等によつてその基礎が確立されて以来、現在では殆んど総べての組織について培養が試みられ、興味ある業績は広く医学研究の全領域から種々報告されている。我が教室では過去数年来、泌尿生殖器組織の体外培養学的研究に着手し、すでに高木 (1957) は人体睪丸組織、石神等 (19

58) は前立腺組織の体外培養について夫々研究成果の 1 部を発表した。

著者は本研究の 1 端として精囊腺組織の体外培養学的研究をおこない、特に各種内分泌物質の精囊腺に対する in vitro の影響について検索した。

精囊腺組織の体外培養に関する業績は未だ少く、Gaillard et al. (1939) はマウスを用い、Demuth (1940) はラッテによる実験をおこない、また最近本邦では弓削 (1959) が睪丸及び副性器の培養の 1 部として精囊腺組織の体外培養をおこなつた他は本研究についての報告は文献上記載を知らない。まず本編では海狸精囊腺

組織の体外培養における基礎実験成績について述べる。

II 実験材料及び実験方法

1 実験材料

a 実験動物及び供試組織片の作成

実験動物としては成熟雄海猿 (体重 450 g 前後) を主に用い、1 部では幼弱雄海猿 (生後約 3 週、体重 90 g 前後のもの) を使用した。

供試組織片作製は開腹術により海猿精囊腺を剔出し、これを雲母薄板上で約 $1/2 \text{ mm}^2$ の大きさに細切したものを培養に供した。かかる操作は総べて無菌的に行つたことは勿論である。

b 支持体

Heparin 添加鶏血漿を用いた。即ち一昼夜絶食せしめた鶏の血液 5cc に Heparin-Na 溶液 5000 単位を加え、これを 1 分間 3000 回転、17 分間遠心沈澱し血漿を分離した。

c 発育促進物質

鶏胎圧搾液を使用した。即ち 9 日目の孵化鶏卵より無菌的に鶏胎児のみを取り出し、これを圧搾器にかけ粥状とし、その後 1 分間 3000 回転 17 分間遠心沈澱を行い、その上澄液を採取して用いた。次に人血清と生理的食塩水を等量とした混合液に上記の上澄液を 10% の割合に含有せしめ、以つて発育促進物質とした。

2 実験方法

a 培養術式

Carrel 氏壺法によつた。まず最初に直徑 3cm の Carrel 壺の底面に Heparin 添加血漿 1 滴を滴下しこれを円形に薄く伸ばし、この上に供試組織片を静置する。次いで鶏胎圧搾液 1 滴を組織片上に滴下し 3 ~ 4 時間放置し、組織片がガラス面上に固着するを待つて更に上記の発育促進液を約 1.0cc 追加注入する。その後 Carrel 壺はゴム栓を施し、 37.5°C の恒温器内に静置する。以後連日顕微鏡的に培養組織片についてその発育状態を観察した。以上の操作は総べて無菌的に行い、また発育促進物質は 3 日毎に新しく入れ換え、培養条件を一定にすべく心掛けた。

b 観察方法

培養翌日より約 1 ヶ月間に亘り、毎日一定時間に顕微鏡下に発育状態を観察した。また特殊細胞の形態或は分裂像の観察では 1 部に位相差顕微鏡を使用した。観察点は主に培養組織の out-growth であり、またこれらを数的に表現するため反射性顕微鏡描画装置を用い、発育曲線作成に便ならしめた。

III 実験成績

1 発育組織の一般的観察

a 培養後 2 日目の組織群

母組織の 1 部より上皮性細胞が発育し始める。即ち舌状乃至半球状の発育を示すが未だ軽度である (Fig. 1, 2,).

b 培養後 3 日目の組織群

上皮性細胞の発育はやや増大し、舌状乃至帯状の状態から更に複雑な突起を生じてくる。しかし未だ活発な発育状態とは云えない (Fig. 3, 4,).

c 培養後 4 日目の組織群

上皮性細胞は更に発育を続け、舌状乃至帯状の発育像も複雑化し、1 部では鋪石状の発育も認められるが顕著ではない (Fig. 5). またこの時期では上皮性細胞の発育帯に混じて極めて軽微ではあるが線維芽細胞の発生が観察される (Fig. 6, 7,).

d 培養後 5 日目の組織群

上皮性細胞は島嶼状に 1 部遊離するものが認められ (Fig. 8), また線維芽細胞はこの頃より発育がやや目立ち、紡錘形、細長い突起を有し、1 部が索状に連絡するのが認められる (Fig. 9).

e 培養後 6 日目の組織群

上皮性細胞の発育は益々旺盛となり、母組織上に細胞の密な集塊を形成し、更にこれより半球状に発育を示すが、1 部ではこれら細胞の遊走が認められる (Fig. 10, 11,).

f 培養後 7 日目の組織群

母組織の全周囲に亘つて上皮性細胞の密な発育像が認められ、舌状の発育は 1 部では益々増大するが、遊離崩壊するらしい所見も僅かに認め得る (Fig. 12). また線維芽細胞も放射状に本格的な発育を開始する (Fig. 13).

g 培養後 8 日目の組織群

上皮性細胞は更に発育を続け、また線維芽細胞もその長径を増す。1 部では島嶼状に上皮性細胞群が遊走するのが認められる (Fig. 14, 15,).

h 培養後 9 日目の組織群

8 日目に引き続きこの時期では上皮性細胞の増殖は極度に達し、特有な鋪石状発育をとげるもの (Fig. 16, 17,), また索状網工状の発育を示すものが認められ (Fig. 18), 1 部では上皮性細胞は索状に連絡し (Fig. 19), 発育帯周辺部より培地に遊出する円形の上皮性細胞群も認められる (Fig. 20).

i 培養後 10 日目の組織群

上皮性細胞群の発育はやや停滞のきざしを見せ、こ

れに反して線維芽細胞群が増々その特有の發育を示すに至る (Fig. 21, 22, 23.). また上皮性細胞群は小塊を形成し、培地に散布遊走する状態を示す (Fig. 24.). 又この時期になると一部の細胞原形質内に空胞形成等の退行性変化が認められ始める。

j 培養後12日目の組織群

この時期では母組織はやや退縮し、その全周より旺盛な線維芽細胞の發育帯を認めるが上皮性細胞の發育像は認め難い (Fig. 25, 26.).

k 培養後15日目の組織群

母組織は明らかに萎縮し、その全周より放射状の線維芽細胞の發育帯を認める (Fig. 27.). 一応培養組織の増殖が終焉し、漸次萎縮退行期に入つたことが推測される。

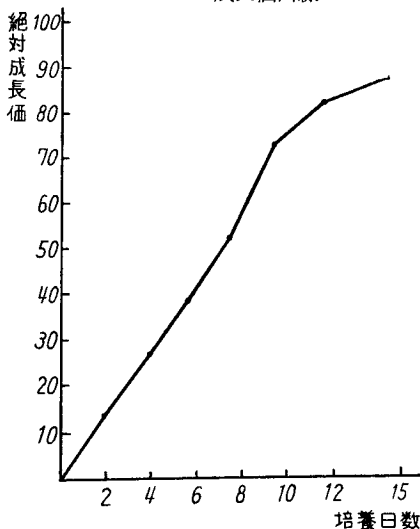
1 培養後20日以後の組織群

20目では放射状に發育した線維芽細胞は隣接細胞との連絡が疎となり、細胞内に空胞形成或は顆粒の出現などを認め、25日ではこれらの退行変性も顕著となり母組織の萎縮もかなり明瞭となる。

2 培養組織の成長価

培養された新生組織については、単に細胞増殖の状態を検するばかりでなく、日を追つて組織の大きさを測定することも極めて重要である。計測法は反射性顕微鏡描画装置を使用した。即ち母組織及び發育帯をグラフ紙上に投影し、發育全面積から培養時の母組織の面積を減じたものを絶対成長価とした。測定をおこなつた日は培養後2日、4日、6日、8日、10日、12日、15日で、成長価は観察カレル壺10ヶの平均値より算出した。この際なるべく誤差を少なくするために培養母組織は略々同大の10ヶを選び、また培養に際しては条件を一定にしたことは云うまでもない。

Tab. 1 成長価曲線



観察各日の絶対成長価の平均値は培養後2日目は14.5, 4日目27.5, 6日目39.0, 8日目52.5, 10日目73.0, 12日目80.5, 15日目83.0であつた。これを曲線に示すと Tab. 1 の如くである。

IV 総括及び考按

以上、海狸精囊腺組織の体外培養における基礎実験成績について述べた。

雄性副性器としての精囊腺は主として男性ホルモンの影響のもとに貯精、分泌及び吸収機能を営むものと云われているが、その正確な機能については未だ不明な点も多い。

精囊腺は解剖学的に3層よりなり、円柱上皮細胞よりなる内層、筋組織よりなる中層及び結合織よりなる外層に分たれる。海狸精囊腺は比較解剖学的に人のそれと最も類似しており、かかる意味で本実験では主に海狸精囊腺を供試材料とした。

以上の実験成績より海狸精囊腺は体外培養により明らかに新生し、且つ培養後約25日間は死滅することなく生存し得ることが証し得られる。またこの際所謂 out-growth の観察ではその發育曲線は略々拋物線を描き、培養後15日前後をピークとして漸次培養組織の退行性変化が認められる。この際新生組織は上皮性細胞及び線維芽細胞の2種類が主であり、以下その發育状態について総括する。

1 上皮性細胞の發育

上皮性細胞は培養後2~3日頃より發育し始め、母組織の周辺より舌状乃至膜状となつて徐々に増大する傾向が認められる。しかしこの頃では發育は一般に緩慢で發育帯も単純である。4~5日頃では發育帯はその長径を増し、且つやや複雑化し、一部では鋪石状、島嶼狀の發育をとげるが未だ極期ではない。最も旺盛な發育を示すのは7~9日で、この時期では母組織の殆んど全周に亘つて上皮性細胞の密な發育帯が認められ、鋪石狀發育をとげるもの、また索狀網工狀の發育を示すもの、更にはまた母組織より島嶼狀に完全に遊離し、そこで密な細胞集団となつて發育するものなどが認められる。特有な所見は、epithelia r sheeth が1つのサーク

ルの周縁を環状に發育増殖を示すことで (Fig. 16, 17, 18,)、この所見は確實とは云えないが、out-growth における1種の腺胞形成を暗示させる。かかる上皮性細胞の環状發育は増殖の最盛期において、また培養諸条件の至適な培地においてのみ認め得るものと考えて良く、嚢状内分泌腺である精囊腺上皮の特異な發育状態として注目すべきであろう。上皮性細胞の形状は円形乃至類円形で且つ略々同形同大である。また培養初期より線状構造は認め難く、所謂 Entdifferenzierung の傾向をおびるものと思推される。

上皮性細胞は10日以後は漸次發育は不活発となり、退行する傾向を示し、細胞群は小塊を形成し、或は個々に培地上に散布遊走する状態となる。同時に母組織も漸次萎縮退行する傾向が認められる。なお退行変性が進むと共に細胞原形質内に脂肪性顆粒、空胞形成などが出現する。

2 線維芽細胞の發育

線維芽細胞は培養後4日目頃より上皮性細胞の發育帯に混じて極めて輕微ではあるが發育し始めるきざしを見せ、日を追つて徐々にその長径を増し、紡錘形、細長な突起を有する様になる。7日目頃より本細胞の發育は活発となり、母組織に対して放射状且つ樹枝状に連絡し、且つ1部は網状となる。發育の最盛期は上皮性細胞の發育増殖が停滯し始める10日以後で14~16日がその極期と云える。20日頃では隣接細胞との連絡がやや疏となり、1部の細胞内に顆粒及び空胞の出現を認め、25日頃では益々退行変性

が強度となり、且つ母組織の退縮も明瞭となる。以上線維芽細胞の發育は培養初期にあつては上皮性細胞のそれ程顯著なものは云い難く、上皮性細胞の發育が旺盛な時期ではその發育は明らかに抑制される所見を呈し、上皮性細胞の發育がやや衰退する傾向をおびる頃より始めて本格的な發育期に入り、上皮性細胞の發育が終了する14~15日頃が最も旺盛な發育を示すことがうかがわれる。このことは精囊腺上皮細胞より分泌される或る種の物質が線維芽細胞増殖に抑制的に作用するものと思推されるが、不明な点も多い。また本培養で觀察される線維芽細胞は、果して精囊腺組織の線維細胞に由来するものか、或は上皮細胞の Entdifferenzierung によるものかは遺憾ながら現在のところ明らかにし得ない。

V 結 語

1 海溟精囊腺組織を Carrel 法により体外培養をおこなつた。

2 海溟精囊腺組織は体外培養において明らかに新生し、また培養後約25日間は死滅することなく生存する。

3 上皮性細胞は培養後2~3日目頃より發育し始め、7~9日が發育増殖の極期である。

4 線維芽細胞は培養後4日目頃より發生し始め、14~15日で最も旺盛な發育を示す。

5 線維芽細胞の發育は上皮性細胞のそれ程顯著ではなく、また上皮性細胞によつて明らかに抑制されることを認めた。

文献：最終編に記載する。



Fig. 1 培養後2日目 (150×)

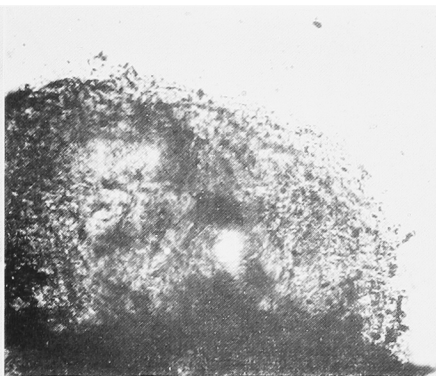


Fig. 2 培養後2日目 (150×)

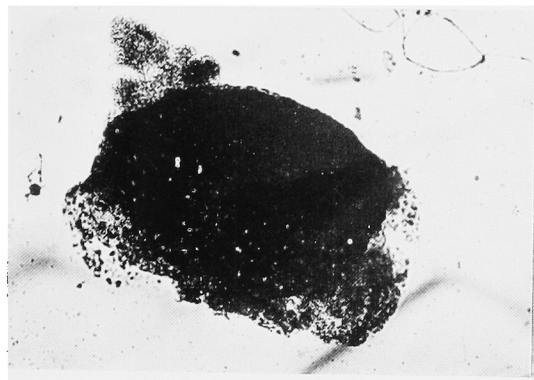


Fig. 3 培養後3日目 (50×)

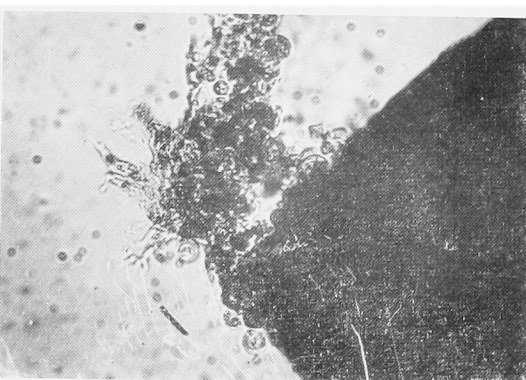


Fig. 4 培養後3日目 (150×)

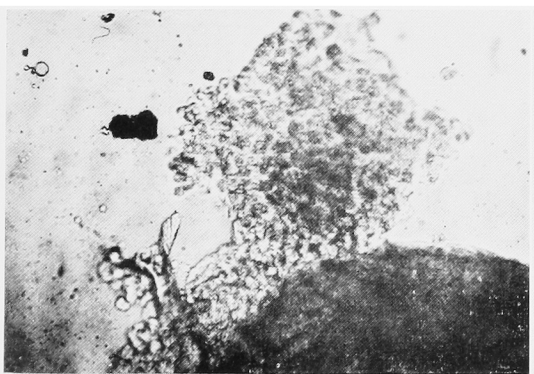


Fig. 5 培養後4日目 (150×)

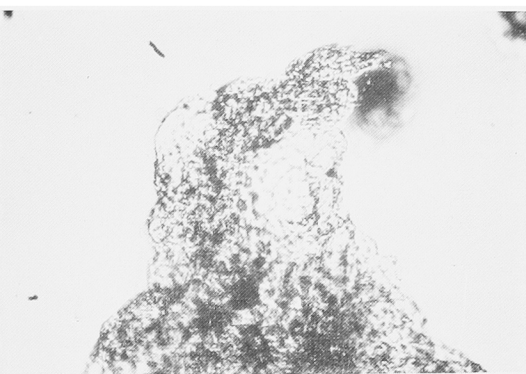


Fig. 6 培養後4日目 (150×)

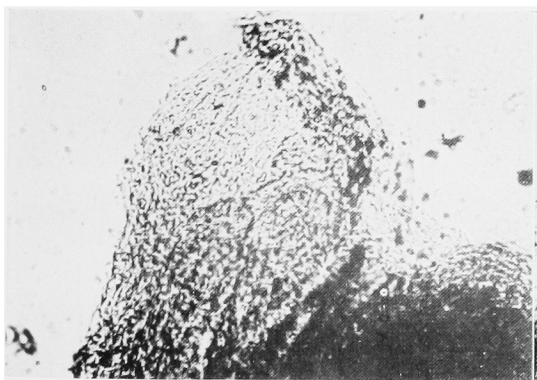


Fig. 7 培養後4日目 (150×)

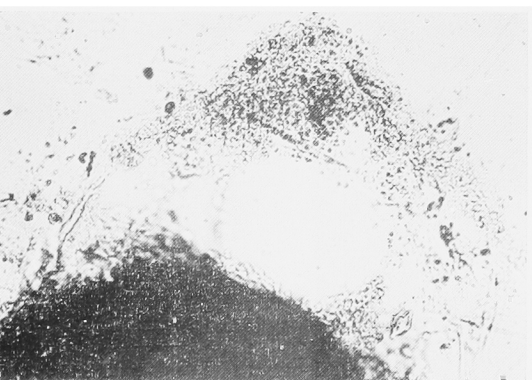


Fig. 8 培養後5日目 (150×)

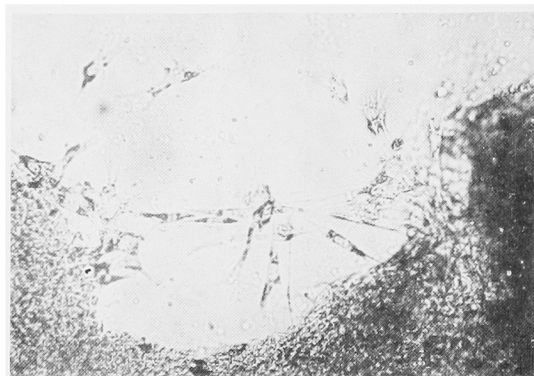


Fig. 9 培養後5日目 (150×)

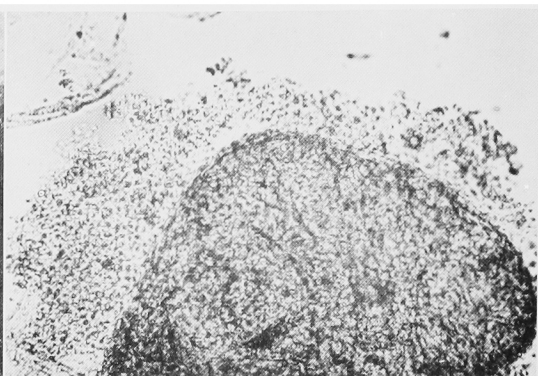


Fig. 10 培養後6日目 (150×)

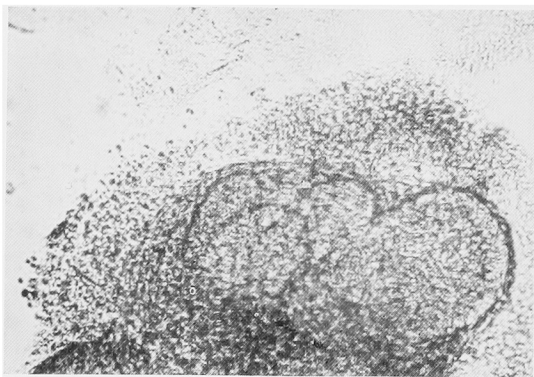


Fig. 11 培養後6日目 (150×)



Fig. 12 培養後7日目 (50×)

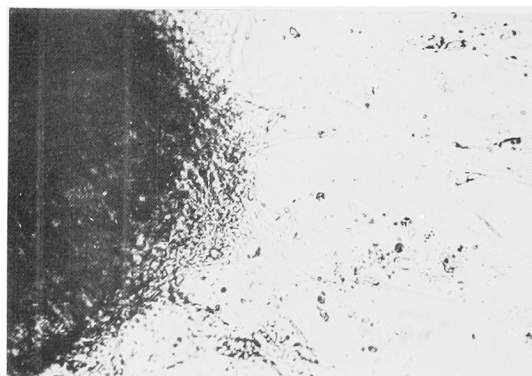


Fig. 13 培養後7日目 (150×)

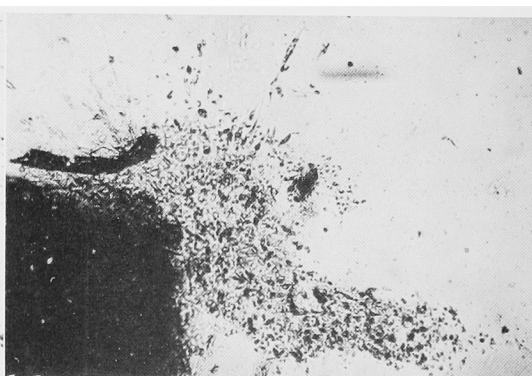


Fig. 14 培養後8日目 (150×)

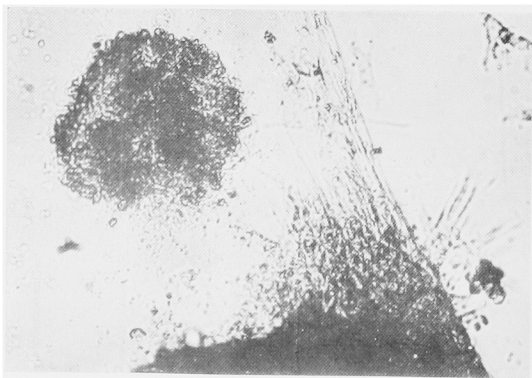


Fig. 15 培養後8日目 (150×)

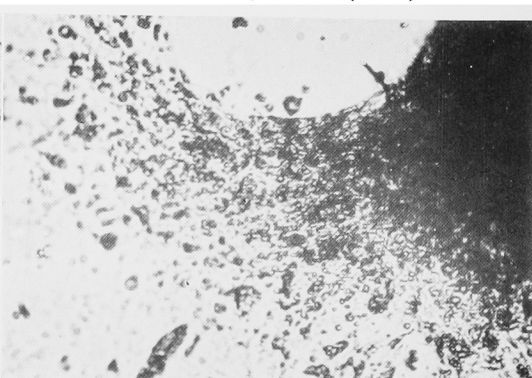


Fig. 16 培養後9日目 (150×)

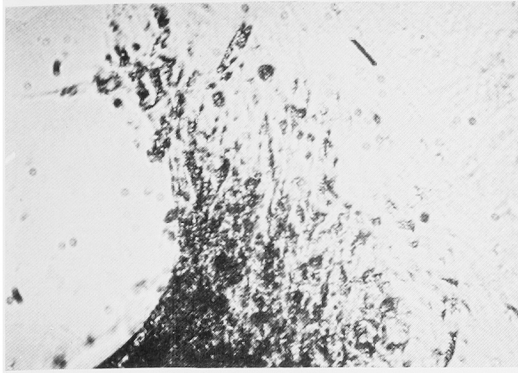


Fig. 17 培養後9日目 (150×)

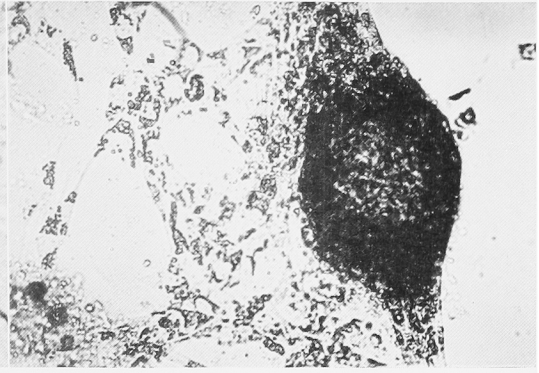


Fig. 18 培養後9日目 (150×)

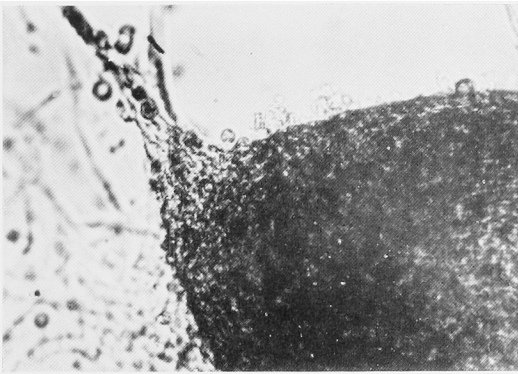


Fig. 19 培養後9日目 (150×)

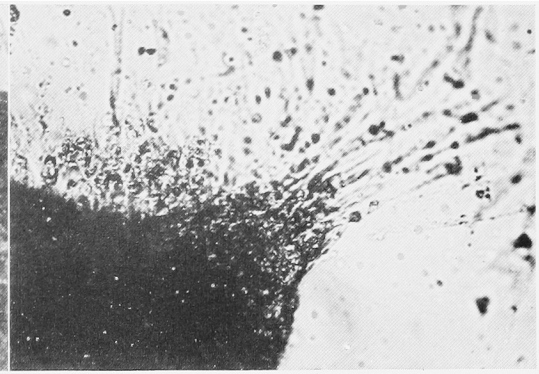


Fig. 20 培養後9日目 (150×)



Fig. 21 培養後10日目 (150×)



Fig. 22 培養後10日目 (150×)

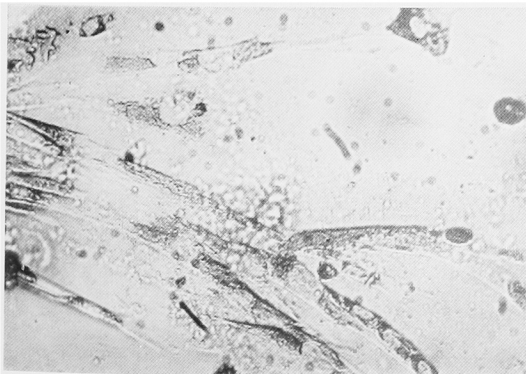


Fig. 23 培養後10日目 (150×)

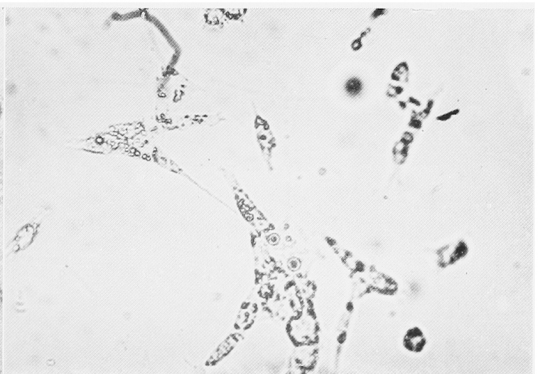


Fig. 24 培養後10日目 (150×)

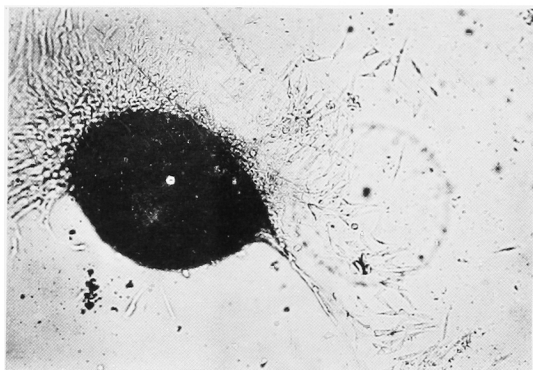


Fig. 25 培養後12日目 (50×)

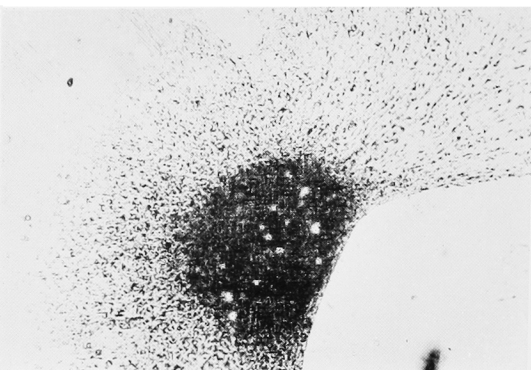


Fig. 26 培養後12日目 (50×)

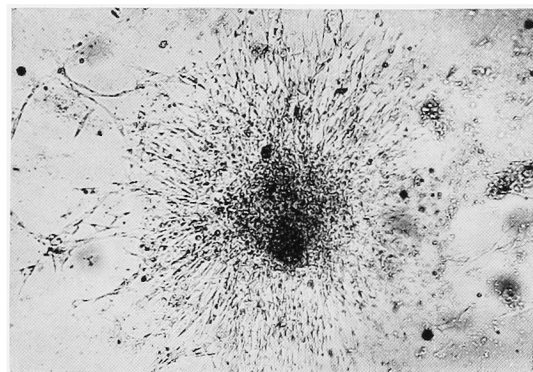


Fig. 27 培養後12日目 (50×)