

氏 名	恒 松 康 彦 つね まつ やす ひこ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 459 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 動 物 学 専 攻
学位論文題目	正常および先天性白内障 マウス 水晶体上皮細胞の In Vitro における増殖と分化について

論文調査委員 (主査) 教授 岡田 節 人 教授 加藤 幹 太 教授 米田 満 樹

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の眼の水晶体は、形態的に極めて特徴的な、水晶体繊維とよばれる細長い細胞から成り立っている。その分子組成をみても、水晶体のもつタンパク質の殆んどがクリスタリンとよばれる、水晶体以外の体内のどの組織・器官にも含まれない特異な分子種から成っている。このような形態上、分子組成上の際立った特徴がどのようにして分化してくるか、またどのような機構で動物の一生のあいだよく維持されるかは、古くから研究されてきた。この論文で研究された先天性白内障は、この問題に直接関係のある重要な課題の一つである。

白内障はヒトでは高令者に極めて高頻度にみられる眼科的疾患で、その症状は多岐にわたり成因の追究は眼科学上重要な問題となっている。マウスでは先天性に白内障を呈する系統が遺伝的に分離されている。この系統のマウスでは水晶体にさまざまな生理的異常が発生し、また水晶体にはかならず「にごり」が生じてくる。

申請者の研究は、このような先天性白内障の成因を細胞レベルで検討しようとしたものである。特に先天性白内障を呈するマウスの細胞の増殖能力、水晶体繊維構造の分化能、クリスタリン合成能力の面について、細胞そのものが正常マウスと異なった性質をもつか否かを研究した。このような研究のための理想的な方法は、問題になっている細胞だけを動物体から切り離して試験管内で培養し、その増殖・分化を見ることである。

水晶体は水晶体繊維と水晶体上皮とからなっている。前者は完全に分化した細胞であって、増殖能力を欠いている。後者は生体内では分裂能力をもった、いわゆる未分化細胞であってこれから前者へ分化しようという段階にある。それで、本研究では、正常マウスと先天性白内障マウスのそれぞれから水晶体上皮の細胞だけを取り出して試験管内に培養したときにみられる増殖・分化を調べたのである。

培養された水晶体上皮細胞は、培養基質の上に広がり単層のシートとなって増殖を行なう。培養後約 20 日間にわたって増殖の程度を正常と先天性白内障の細胞について比べたが、両者ともコンフルエンス

トな状態と達するまでの増殖は活発であって差はみられない。培養20日頃になると、培養細胞中に際立って球形の構造体が作られてくる。この点も、正常、先天性白内障ともに同じであった。

次に、クローン細胞培養を行なっている。これは、ごく少数の細胞を培養し、単一個の細胞からの増殖と分化を見る方法であって、細胞のもつ自律的な増殖分化能の検定のためには最も秀れた手段であるといえる。その結果、クローン形成可能な細胞の頻度、作られたクローンのうちで球状の構造体を作ったものの頻度は、正常、先天性白内障においても殆んど違いはなかった。

作られた球形の構造体が、*in vitro* で分化した水晶体繊維ではないだろうか、ということを検定するために蛍光抗体法による観察を行なった。水晶体に特異的なタンパクをクリスタリンと呼ぶが、これには、 α —、 β —、 γ —の3つのグループが区別される。マウスでいうと、このうち、 α —、 β —は水晶体上皮にも存在するが、 γ —クリスタリンは、水晶体繊維にだけ存在するタンパクである。それで、マウスの水晶体繊維から γ —クリスタリンを精製し、これをヒツジに注射して抗 γ —クリスタリン血清を得た。この抗血清をフルオレスセインと結合させて、培養細胞を染色し、蛍光けんび鏡による観察を行なった。すると、球形の構造体は強い蛍光を示し、これが γ —クリスタリンを含んだ、水晶体繊維にあたる分化した構造であることを示した。

培養した細胞の分化は、超薄切片による電子けんび鏡観察によって形態的にも詳しく調べられている。球形の構造体は明らかに超微細構造的にも水晶体繊維と同定される細胞からなっている。しかし重要な事実、正常マウス細胞の培養に生じたものと、先天性白内障マウス細胞の培養に生じたもので、著しい違いのあることである。即ち、後者では細胞内の空胞化が著しく進行していたのである。

以上の実験結果から、水晶体上皮の増殖、 γ —クリスタリン合成能力の獲得、という面では先天的白内障による影響は受けていない。しかし、白内障細胞において作られた球形構造体の空胞化の著しいことから、白内障に特徴的な含水量の増大、繊維の膨潤化という方向への変化は、すでに上皮細胞の段階でまわっている、と推論された。

論文審査の結果の要旨

未分化の細胞を *in vitro* に培養すると、さかんに増殖は行なわれるが、分化を可能ならしめる条件を確立することは困難であるとされている。水晶体上皮細胞についていうと、1925年以来培養が試みられてきたが、最初に増殖・分化を可能ならしめたのは1971年の岡田・江口らによるニワトリを用いた研究である。従って、この論文は哺乳類動物を用いて水晶体上皮細胞の *in vitro* での増殖・分化に成功した最初の報告であって、この点で、まず価値のあるものである。

この論文では、改良された細胞培養法を駆使して、白内障という医学上の大きな課題に、細胞生物学、発生生物学のアプローチを行なって、先天的白内障細胞の性質をある程度明らかにすることによく成功している。結論の評価をきめる重要な点は、培養で分化してくる球状の構造体なるものの本性を同定することである。この点について、この論文では免疫学的方法と、電子けんび鏡による方法とが広汎に駆使されている。これらの方法の駆使は充分な吟味を必要とするものであるが、この論文では、著者の配慮がよく示されていて、技術的に高いレベルにあり信頼のおけるものであることが判る。

この論文では、古くからの医学上の問題の解決に細胞生物学・発生生物学のアプローチが有効であること、一方、これらの生物学の研究に医学上の課題の導入が発展的な意義をもつことが示されていて、内容は広い。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。