

氏 名	山 本 豊 城 やま もと とよ しろ
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	論 医 博 第 7 0 号
学位授与の日付	昭 和 37 年 12 月 18 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	細切法による中枢神経組織の培養

(主 査)
論文調査委員 教授 岡本道雄 教授 堀井五十雄 教授 鈴江 懐

論 文 内 容 の 要 旨

最近、神経細胞の体外組織培養が、多くの研究者達によって試みられ成功しているが、従来の組織片（約 1mm角）を植片とする培養法の場合は、それがおびただしい数の細胞塊であるため、その中に混在している個々の細胞に注目して、それを培養早期に位相差顕微鏡下に観察することは常に困難であった。そこでこれら組織の細胞を trypsin および hyaluronidase または pratinase 等 (Moscona 1952, Amand & Tipton 1954, Cavanaugh 1955, Nakai 1956) を用いて分離し、これを培養することが試みられそれぞれ成功を収めているのであるが、これらの酵素による神経細胞の単離法は、その操作が複雑で時間を要するところから、細胞の死滅を招来することが多く、常に成功するとは限らず、特にこれを哺乳動物の中枢神経組織に適用しても成功し得なかったところから、Okamoto (1957) は諸種哺乳動物の中枢神経組織を機械的に細切し、得られた細胞浮遊液を培養して単離した細胞についてその再生、発育の様相を追求する方法を提唱した。本報告はこの Okamoto の単離培養法 (1957) を用いて、諸種動物の小脳皮質を培養し、その結果を従来の回転培養法による結果 (Pomerat と Costero 1956) と比較検討したものである。

培養に用いた材料は、生後 2 ないし 45 日の犬、猫、家兎、モルモット、ラッテ、山羊、牛と、胎生 4 ないし 20 日の鶏胎、生後 1 ないし 19 日の鶏雛および胎生 3 ないし 8 か月の人胎児で、主に小脳皮質を用いたが、鶏胎の初期のものでは小脳が未発達のため前、中脳胞を用いた。

培養法は、原則的には回転管培養法によった。平滑なスライドガラス上に滴下した Gey 塩類溶液の中に、小脳皮質の組織片を浮遊せしめ、鋭利な刀を用いてこれを細切し、細胞浮遊液を作る。

つぎに 12×50mm 大、厚さ 0.17mm のカバーガラス上に、孵卵 8 日目鶏胎胚搾液と、等量のヘパリン加雄鶏血漿を滴下し、さらに前記の細胞浮遊液を適量添加して三者を混合、慎重かつ迅速にカバーガラスの全面に拡げる。暫時室温に放置後、これを回転管に入れ 37°C の孵卵器中に約 1 時間置き、血漿塊が充分に凝固するのを待ってから、培養液を 2cc 宛注入し、37°C にて毎時 10 回転の回転管培養を行なう。このような材料について著者は 1. Jacobson 染色法、2. Pischinger 染色法、3. Nissl 染色法、4. Bodian 鍍銀染

色法, 5. メチレン青超生体染色等の染色を行ない諸種細胞の一般的發育経過を日を追って記述し, ついで星状膠細胞および神經細胞に関する特殊所見を記載しているが, その要約は次のようである。

1. 諸種動物のうち, 良好な發育を示したのは犬および猫であって, その他の動物は総て發育悪く, この点従来の回転管培養法の成績と同様であった。

2. 単離した諸種細胞のうち, 神經細胞を除く他の諸細胞は, 良く再生, 發育し, 共存している組織小片 (最大直径 0.1~0.5mm) からのものとの間に, 形態上有意の差は認められないが, 後者に比較してややおくれて出現し増殖力も弱いようである。

3. 培養で出現してくる星状膠細胞は, 切片の銀染色標本に見るように, 線維型と原形質型を分け難く, その形態から次のような諸型に命名, 分類した。

第Ⅰ型 紡錘型星状膠細胞

第Ⅱ型 星芒型星状膠細胞

A. 稀突起星芒型星状膠細胞 B. 標準星芒型星状膠細胞 C. 多突起星芒型星状膠細胞

第Ⅲ型 有膜星芒型星状膠細胞

4. 単離した神經細胞, 特に Purkinje 細胞と思われる大型の神經細胞は, そのほとんど総てのものが変性に陥っており, 良好な發育を示すものは認め得なかった。

5. 組織小片からの發育は, 細胞の種類, 發育様式とも 1mm 角の組織を植片とする従来の培養法に見られるものと同様である。

6. 本法では, 組織小片を培養するため, 平坦化の時期が早く, 従来の培養法では神經細胞を, 位相差顕微鏡下に明視できるまでに 2—3 週間を要したものが, 本法では培養 4—7 日で生体観察が可能であり, 諸染色法を用いればそれよりなお早期に染色が可能であり, この点が本法の利点とするところである。

論文審査の結果の要旨

神經組織の組織培養において出現する各種細胞の形態および發育様相の詳細を観察するためには, 各細胞を単離して培養するのが一番よいが, 従来このような単離培養に用いられた trypsin などの酵素を用いる方法は中枢神經組織では, 多量の myelin 物質の存在するためか成功しない。

そこで著者は単に神經組織を Gey の塩類溶液の中で細切して得た神經組織の浮遊液を カバーガラス上に鶏血漿で固定, 回転管培養を行なうことにより単離細胞の培養を行なった。

材料は生後 2~45日の犬, 猫, 家兎, モルモット, ラッテ, 山羊, 牛および鶏胎 (4~20日) 鶏雛, 人胎児 (3~8か月) の小脳である。

神經細胞を完全に単離したときその後發育を示すものはない。組織小片を培養したときその中に含まれる神經細胞は早期から再生を示す。この点従来の方法では比較的後期にならぬと神經細胞の再生を観察できなかったのに比してすぐれている。

神經膠細胞は単離されたものも良好な發育を示す。とくに星状膠細胞はその形態が多彩であって従来銀染色標本では形質性および線維性の二種に分けるのみであったが著者はこれを第Ⅰ型紡錘型星状膠細胞, 第Ⅱ型星芒型星状膠細胞これを, さらにまれに A. 稀突起星芒型膠細胞 B. 標準星芒型星状膠細胞 C. 多突起星芒状膠細胞, 第Ⅲ型有膜星芒状星状膠細胞とした。

このように本研究は学術上有益であり, 医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。