

氏 名	武 内 重 二 たけ うち じゅう じ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	論 医 博 第 564 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 5 月 23 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	頭蓋内腫瘍の培養条件

論文調査委員 (主 査) 教授 翠 川 修 教授 伊 藤 鉄 夫 教授 半 田 肇

論 文 内 容 の 要 旨

頭蓋内腫瘍細胞の培養のための諸種の条件の検討を行った。

腫瘍片よりの細胞の収集法に関しては、処理液として 0.1% trypsin—0.02% EDTA 液（溶媒は Ca 及び Mg 不含 PBS）が効率がよく、これを腫瘍片に15分間、3～6回作用させれば細胞をほぼ完全に収集し得、得られた細胞に細胞破壊は認められず、細胞活性度も良好であった。

細胞培養液は YLE, Eagle MEM, TC 199 等の合成培養液に細胞活性度に関して著明な差が認められなかった。

しかし加える牛血清の量は細胞の発育・増殖に大きな影響を及ぼした。細胞の培養ガラス面への附着には30%濃度牛血清がよく、次いで20%、10%の順であり、その後の発育・増殖には20%濃度牛血清が至適で、次いで10%、30%の順であった。

以上の如く腫瘍片に 0.1% trypsin—0.02% EDTA 液を処理して腫瘍細胞を収集し、初培養液として 30%牛血清加合成培養液（YLE, Eagle MEM 等）を、次培養液として20%牛血清加合成培養液を用うれば良好な細胞を培養し得た。しかし神経膠腫細胞の増殖率は同一培養条件下に於ける L 細胞, VERO 細胞, 新生ネズミの心或いは肝細胞等にくらべ悪く、合成培養液は神経膠腫細胞に対する栄養的欠陥があるのではないかと考えられた。牛胎児脳（胎生約 200 日）中にかかる因子を求めて、牛胎児脳水抽出物を作り、これを培養液中に添加した。牛胎児脳水抽出物は神経膠腫細胞の培養ガラス面への附着・発育を促進したが増殖率は増加しなかった。

神経膠腫細胞は培養初期に於ては形態学的に典型的な形態をとりその同定はかなり容易であった。しかし培養が大体30日をこえるとくに悪性神経膠腫細胞に於ては細胞が線維芽細胞様の形態をとるようになり、そうした細胞は線維芽細胞との鑑別が困難となった。神経膠に対する Cajal, Weigert, Alzheimer—Mallory 等の特殊染色又は結合織に対する van Gieson 染色を試みたが線維芽細胞様形態をとるものはもはや特異的に染まらず同定できなかった。それで神経組織に特異的である S—100 蛋白を用いて同定する

ことを試みた。

まず S—100 蛋白を牛脳より Moore の方法を改良して容易にかつ変性なく抽出精製した。それを用いてウサギ抗血清を作り FITC をラベルした。これを用いての免疫蛍光抗体法により 1) S—100 蛋白は神経膠腫細胞中の細胞質内にあり核内には認められない。2) 長期培養した神経膠腫細胞質内にも認められる。3) 神経膠腫細胞が線維芽細胞様形態をとってもその細胞質内に認められる。4) 核周囲細胞質内にとくに高い濃度に存在する等の所見を得た。従ってこの方法により高い信頼度で神経膠腫細胞を同定することが出来た。

論文審査の結果の要旨

頭蓋内腫瘍細胞の培養のための 諸種の 条件の検討を行った。腫瘍片よりの細胞の収集法に関しては、0.1% trypsin-0.02% EDTA 液（溶媒は Ca 及び Hg 不含の PBS）を15分毎に数回処理して、細胞をほぼ完全に収集し得た。この処理による細胞破壊は認められず、細胞の活性度も良好であった。培養液は YLE, Eagle MEM その他の合成培養液に 著明な差はみられなかったが、加える牛血清の量は細胞の発育、増殖に大きな影響を及ぼし、10~20%濃度牛血清が至適であった。

神経膠細胞、神経膠腫細胞の培養下における同定は形態学的に典型的なものは容易であったが、線維芽細胞様の形態をとるものはその同定が困難であった。それは Cajal, Weigert, Alzheimer-Mallory, van Gieson などの神経系あるいは結合組織に対する特殊染色を用いても同様であった。神経組織に特異的である Moore の S—100 蛋白を Moore の方法を改良して変性なく容易に抽出精製して、それを用いてウサギ抗血清を作り、FITC をラベルした。これを用いての免疫蛍光抗体法による神経膠、神経膠腫細胞同定の試みは上記の染色法にくらべて信頼度が高かった。

以上の研究は頭蓋内腫瘍細胞の培養諸条件を明らかにすると共に、神経膠、神経膠腫細胞同定の試みを行ったもので、この方面の研究に寄与するところが多い。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。