

氏名・(本籍)	たけ　うち　たく　じ 竹　内　拓　司
学位の種類	理　学　博　士
学位記番号	理　博　第　7　2　号
学位授与年月日	昭和40年6月16日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和33年3月 東北大学大学院理学研究科修士課程修了
学位論文題目	<i>In vitro</i> studies of "pigment spread" in the mouse (組織培養によるハツカネズミに おける色素伝播の研究)
論文審査委員	(主査) 教授 元 村 勲　教授 青 木 廉 教授 加 藤 陸奥雄

論　文　目　次

緒　　論

第1部　ハツカネズミ新生児の皮膚における色素細胞の観察

序　　論

材料と方法

観察結果

論　　議

要　　約

第2部　メラノーマ細胞と共に培養された"白子"と"小眼白"の皮膚における色素伝播

序　　論

材料と方法

観察結果

論　　議

要　　約

第3部　メラノーマの細胞分画と共に培養された"白子"の皮膚における色素伝播

序　　論

材料と方法

観察結果

論　　議

要　　約

考　　察

文　　献

附　　図

## 論 文 内 容 要 旨

「色素伝播」とは斑入りの皮膚を持つたハツカネズミその他の動物において、有色部周囲の白色部の皮膚に、又白色部に移植された有色皮膚の周囲に見られる有色部の拡大である。この色素伝播現象に関して、従来二つの仮説が提出されていた。その1つは、色素伝播は白色部の皮膚に存在するメラニン未形成色素細胞からのメラニン形成色素細胞への転換であるとし、他は移植された黒色部皮膚に由来する色素細胞の無色部皮膚への移動であると主張している。

この研究においては、メラニン形成色素細胞としてS91メラノーマ細胞を用い、無色皮膚として「白子」と「小眼白」の新生児皮膚を用いて、組織培養した皮膚に色素伝播を起さしめ、その機転を解明する試みがなされた。

なお実験的研究に先立つて、有色のハツカネズミで、その新生児皮膚における色素細胞の行動を観察した。

### 第1部 ハツカネズミ新生児の皮膚における色素細胞の観察

#### 1. 組織学的観察結果

出生直後のハツカネズミ皮膚(黒)では、極く少数の色素細胞が真皮と毛嚢に認められた。生後1日の個体の皮膚では、色素細胞は真皮、毛嚢以外に外皮の基底層および外皮からの陥入である外根鞘において観察された。これらの細胞はメラニンを含み、ドーパ反応陽性であった。生後4日の皮膚では、多数の色素細胞が毛嚢内に存在しており、外皮と外根鞘には色素を欠くが、ドーパ反応陽性である細胞が観察された。生後7日の皮膚では色素細胞は毛嚢と真皮にのみ見られた。

ハツカネズミの成体の皮膚では耳と尾を除いて、外皮の基底層に色素細胞が認められないことが知られているが、生後1日の皮膚では外皮の基底層および外根鞘に色素細胞の存在することが発見された。これらの細胞は毛嚢への移行状態にあるものと思われる。

#### 2. 新生児皮膚の組織培養

ハツカネズミ新生児の皮膚をプラズマ・クロット法で培養し、4日後および7日後に固定して観察した。培養された組織片では毛包の数が増加し、その毛嚢には色素細胞が多数認められた。色素細胞はこの培養条件下で生体内にある場合と大差なく分化すると思われる。従つて色素細胞を用いる実験的研究にこの培養方法が適していると考えられる。

### 第2部 メラノーマ細胞と培養された「白子」と「小眼白」の皮膚における色素伝播

#### 1. 「白子」と「小眼白」の皮膚とメラノーマ細胞の接触状態での培養

プラズマ・クロット法で「白子」と「小眼白」の新生児皮膚が、その真皮側でメラノーマ細胞と直接接触する状態で培養された。その間2組織間では排除は行なわれず、接触が保たれ、多くの例で培養後に伸展した皮膚がメラノーマを被覆していた。それらの培養皮膚片では、真皮、外皮および毛嚢内にメラニン色素を持つ細胞が観察された。毛包の数に対するその内部のメラニンを持つ細胞の出現率は「小眼白」よりも「白子」において有意に高かった。一方皮膚のみを培養した対照群では「白子」にも「小眼白」にもメラニン色素を持つ細胞は見出されなかつた。

#### 2. 「白子」と「小眼白」の皮膚とフィルターによつて隔離されたメラノーマ細胞との培養

「白子」と「小眼白」の皮膚片がメラノーマ細胞とミリポア・フィルターによつて隔離された状態で培養された。これらの培養皮膚片では、メラニン色素を持つ細胞は「白子」、「小眼白」両者の毛嚢と真皮に認められた。

メラニン色素を含む細胞の毛包の数に対する出現頻度は前記の直接接状態での培養の場合の頻度と有意の差はなかつた。この実験に使用したミリポア・フィルターの厚さは25ミクロン(±5ミクロン)、孔の径は0.45ミクロン(±0.02ミクロン)であつて細胞の通過は考えられない。従つてこの実験で“白子”および“小眼白”の培養された皮膚に見られたメラニン色素を持つ細胞は元來その皮膚に存在したメラニン非形成細胞にメラニン色素が出現したものと思われる。

### 第3部 メラノーマの細胞分画と共に培養された“白子”と“小眼白”の皮膚における色素伝播

#### 1. 遠心操作による分画との培養結果

遠心操作によつてメラノーマ・ホモチエネートの細胞質部分を3分画に分別し、又核部分から核酸分画(蛋白を含む)を抽出し、それらの分画を“白子”および“小眼白”の皮膚片の培養液に加えた。それらのうち11,500 rpm (15,900 g) 20分遠心による沈渣(分画1)と共に培養した“白子”の皮膚で、メラニン色素が真皮および毛嚢の細胞内に、又毛の中に認められた。真皮には又ドーバ反応陽性の紡錘形細胞が多数見られた。チロシナーゼ活性測定の結果、4分画のうち分画1で最も酵素活性が高かつた。

#### 2. 蔗糖密度勾配法による分画との培養結果

前記分画1は蔗糖密度勾配法によつて、更に3分画に分別された。それらのうち最も下位にある分画が培養液に加えられた場合、培養された“白子”の皮膚の毛嚢内にメラニン色素を持つ細胞が見出された。又真皮にはメラニン色素は欠くが、ドーバ反応陽性の細胞が認められた。他方チロシナーゼ活性測定の結果、この分画にのみ酵素活性が認められた。

以上の結果から、この実験に見られた色素伝播はメラニン色素は含まないが、活性のチロシナーゼを保持する、メラニン色素粒の前駆体“メラノソーム”が“白子”のチロシナーゼを欠く色素細胞に伝達されて色素形成が起つた結果によるものと思われる。

以上次の様に要約される。

- 1) ハツカネズミの皮膚では出生後1週間の間に色素細胞の旺盛な分化が見られた。
- 2) プラズマ・クロット法によつて培養されたハツカネズミの皮膚では、生体にある場合とは変らない色素細胞の分化が観察された。
- 3) メラノーマと接触状態で培養された“白子”と“小眼白”の皮膚に色素を持つた細胞が観察された。
- 4) メラノーマとミリポア・フィルターによつて隔離された状態で培養された“白子”および“小眼白”の皮膚に同様メラニンを含む細胞が認められた。
- 5) メラノーマ・ホモチエネートの細胞分画のうち、チロシナーゼ活性の高い分画と共に培養した“白子”の皮膚で、毛嚢および毛にメラニン色素粒が見られた。
- 6) この実験で観察された色素伝播は“白子”のチロシナーゼ活性を欠く色素細胞がメラニンの前駆体“メラノソーム”をとり込んだことによつて起つたと思われる。

## 論 文 審 査 要 旨

提出論文は組織培養によるハツカネズミにおける色素伝播の研究と題する英文一篇で内容は3部から成り、何れも東北大学理科報告第4集に受理ずみのものである。

動物の皮膚の黒色素発現の機構については主として2つの異つた見解があり、ひとつはメラニン未形成色素細胞がメラニン形成色素細胞へ転換するものであるとし、他は移植された黒色部皮膚に由来する色素細胞が白色の皮膚へ移動するものとの主張である。竹内拓司はこの問題を組織培養法を用いて検討した。

まず、ハツカネズミの新生児の皮膚を組織学的並びに組織化学的に検討して色素発現の経過及びその検出方法を確定したのち、新生児皮膚の組織培養を行った。種々の組織培養法を試みた結果、プラズマ・クロツト法が最適であることを認めたので以下の実験はこの方法によつて行つた。

まず、色素形成の見られない系統として白子および小眼白を選びその新生児の皮膚を用い、黒色素の形体の著しいものとしては、シロネズミの悪性腫瘍のひとつであるメラノーマを用いた。これらの皮膚片とメラノーマの薄片を接触させて培養すると、白子ならびに小眼白の皮膚内に新たにメラニン色素をもつ細胞が出現した。このことは前述の2つの仮説の何れも成立するから、色素細胞の出現が細胞移動によるか、物質によるかを確かめるため皮膚片とメラノーマ細胞との間をミリポア・フィルターによつて隔ててみると、前と同様に皮膚片内に色素細胞があらわれた。この事は色素細胞の移動ではなく、何かの物質によつてメラニン非形成細胞にメラニン色素が出現したものと解釈される。

次にメラノーマの細胞のホモジェネートの分画を遠心分離によつて分けて、白子および小眼白の皮膚の培養液に加えてメラニンの出現を可検した。結果は、核蛋白にはメラニン形体の作用が見られなかつた。核蛋白を除いた部分では遠心分離により3層が得られたが、最下部の分画に作用がみられた。

更にこの分画を蔗糖密度勾配法によつて3分画に分けたが、そのうち最も下部の分画にメラニン形成の作用がみられた。チロシナーゼ活性測定の結果は活性陽性の分画のみにメラニン形成の作用がみられた。竹内は、活性のチロシナーゼを保持するメラニン色素粒の前駆体メラノソームが、白子のチロシナーゼを欠く色素細胞に伝達されて色素形体が起つたものと結論している。

この結果は、白子または小眼白の皮膚にメラニンが形成されるのは、メラニン細胞の移動によるのではなく、チロシナーゼ活性の物質が浸透することによることを明らかにしたものであるが、更に遺伝学的にも興味ある問題を提起している。即ち、同じく白色の皮膚をもつハツカネズミでも同様の処理によつて白子と小眼白を比較すると、白子の方がメラニンが現れやすいと言うことである。これは明らかに遺伝的要素を考えられるべきであり、将来、興味ある問題である。

参考論文は10篇あるが、発生学に関するもの、弗素中毒に関するもの、法医学に対する生物学的方法の応用に関するもの、人類の集団遺伝に関するものなどを含み、何れも独創性ある論文であり、竹内の学力の広さを示している。

よつて審査員は、竹内拓司提出の論文は理学博士を受けるに充分の学力を示すものと判定した。