

氏 名 (本 籍) はん た や のぶ
半 田 康 延

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 7 8 8 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 5 1 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 專 門 課 程 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博 士 課 程) 内 科 学 系 專 攻

学 位 論 文 題 目 Morphological and electrophysical changes of
cultured spina ganglion cells during
development
(培 養 脊 髓 神 經 節 細 胞 の 分 化 過 程 に 於 け る 形
態 学 的 及 び 電 氣 生 理 学 的 変 化)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 板 原 克 哉 教 授 滝 島 任

教 授 田 崎 京 二

論文内容要旨

培養神経細胞の分化過程における形態学的変化については、多くの研究者により詳細な研究が為され、既に確立した知見が得られている。一方、この形態学的な分化に伴って機能的にも何らかの変化が起きていると推定されているが、今の所この点に関する研究報告はほとんど見当たらない状態である。本研究ではこの点を解明する目的の為、鶏胎脊髄神経節の分離培養細胞を用いて、その細胞に微小電極を直視下に刺入し、脊髄神経節細胞の分化過程に於ける変化を形態と電気生理学的機能の面より同時に検索した。

〔培養法〕

10日目鶏胎の脊髄神経節を約120個採取し、37℃の0.06%トリプシン液中に約5分間浸す。これを Ca^{++} - Mg^{++} freeのRinaldini液で3回洗い、ついで培養液中加入し、先端の細かいピペットで脊髄神経節が完全に分離しない程度に静かにpipettingする。そして最終的に細胞数が1cc当たり約30万個になるよう調整する。これをシャーレ内のCollagen coated coverslip上にばらまき、約8時間静置後培養液を加え、 CO_2 3%、空気97%の水蒸気飽和混合気内にて37℃で培養する。培養液は3日毎に交換する。培養液の組成は、Fetal calf serum 30%、Calf serum 30%、Eagle's MEM 30%、chick embryo extract 10%及びPenicillin 200 \bar{u} /ccである。

〔生理的実験法〕

倒立位相差顕微鏡のステージ上に培養細胞の入ったプラスチックシャーレを置き、培養液の温度を35℃～37℃に保つため周囲に温水を循環させた。顕微鏡の対物レンズは形態の所見を厳密に得るため100倍の油浸レンズを用いた。微小電極はglass-capillaryにglass-fiberを入れてpullerで引き、既座に3M-KClで満たしたものを用いた。電極抵抗は約10M Ω である。測定回路は、1本の電極で刺激と記録を同時に行うためブリッジ回路を用いた。神経細胞のpassive及びactiveな性質を定量的に比較する為、電極を刺入して静止電位が1分以上安定した後、-60mvに電位を固定し、それより過分極性及び脱分極に刺激電流を細胞内に通電した。

〔結果〕

鶏胎脊髄神経節の分離培養細胞の分化過程は、従来の組織片培養の場合と同様、形態学的に4期に分類することができる。第1期(培養第1週)は培養操作により細胞が脱分化している時期

である。胞体直径約 15μ と小さく、核が胞体辺縁部に偏在し、又 Nissl Body が辺縁にのみ認められる所謂 chromatolytic state を呈する。第 2 期 (第 2 週) になると細胞は再分化の徴候を示すようになる。即ち胞体は徐々に大きくなり、核は胞体中心部に向って移動しはじめ、Nissl Body は胞体内への侵入を開始する。第 3 期 (3, 4 週) は成熟期への移行期で、胞体の大型化、核の中心への移動、Nissl Body の細胞内分布がより著明となる。この時期に軸索に髄鞘形成が開始される。培養第 5 週以降の第 4 期はいわゆる成熟期で、胞体は直径約 50μ で、核は胞体のほぼ中心部に位置し、Nissl Body は細胞内に均等に分布し in vivo の成熟脊髄神経節細胞と同様の所見を呈する。髄鞘もこの時期にほぼ完成する。

脊髄神経節細胞の生理学的な性質はこの形態学的変化にほぼ平行して変化する。第 1 期では、静止電位が平均で約 -20mv と浅く、実効膜抵抗は各培養時期で最小の値を示す。この時期の細胞は大部分興奮性を示さず、脱分極性電流に対し passive あるいは local な response を示すのみである。ただ -40mv の深い静止電位を持った 2 個の活動電位の発生を見た。第 2 期になると静止電位は平均 -40mv と深くなり実効膜抵抗も著明に増加する。これに伴って 80% 以上の細胞が overshoot を伴った活動電位を発生するのが認められた。これ以降培養が進むにつれ静止電位はさらに深く、実効膜抵抗はさらに大きくなる傾向が認められた。又活動電位の overshoot, after potential 及び全振幅の増加、閾値の低下、maximum rate of rise 及び Duration の短縮が分化の進展に伴って認められた。これらの passive 及び active な膜の性質は、培養第 2 期に於いてその変化が最も著明であり、又第 4 期の成熟期の生理学的性質は、in situ の成熟脊髄神経節細胞の性質に非常に近い値を示した。又 500msec の持続性脱分極に対し、第 2 期までの細胞は単発性の活動電位しか発生しないが、第 3 期以降は反復性に活動電位を発生した。この反復性興奮の出現時期は、髄鞘形成の時期に一致する。

〔 結 果 〕

以上の結果、培養脊髄神経節細胞の生理的機能変化は、形態学的分化の経過と密接に関連する事が判明した。殊に、反復性興奮の出現時期が髄鞘形成の時期に一致する事、又形態学的に脊髄神経節細胞が再分化を開始する時期、即ち Nissl Body が胞体内に分布し始める時期に、生理学的諸性質が著明に変化し完全な興奮性を示すようになる事等は、これらの形態学的所見と生理学的性質の間に強い関連があることを示唆しており、脊髄神経節細胞の機能的分化の重要な factor であると思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

培養神経細胞の分化過程での形態的变化については既に確立された知見が得られているが、本論文では、鶏胎の脊髄神経節細胞の形態的变化を5週以上にわたり追跡し、微小電極を挿入した細胞の電気生理学的機能を形態と対比して検討した知見を述べている。

第1期(1週)では直径 10μ 、核は偏在し、静止電位 $-20mV$ 、実効膜抵抗は小さい。脱分極電流に対してはpassiveあるいは局所的反応を示すにすぎない。第2期(2週)では核およびNissle体は中心方向に移行しはじめて、静止電位 $-40mV$ 、実効膜抵抗は著増するが、それら細胞の80%にovershootを伴った活動電位が発生するのが認められた。第3期(3~4週)では分化過程が終り、軸索に髄鞘形成がはじまっているが、静止電流は更に深く、実効膜抵抗も更に大きくなり、 $500msec$ の持続性脱分極電流を流すと反復性に活動電位が発生するようになった。第4期(5週以後)以後では形態的には成熟期に入り、活動電位のovershoot, after potentialおよび全振巾の増加、閾値の低下、maximum rate of rise and durationの短縮が、形態分化の進展に伴って認められた。

これらの実験結果は、反復性興奮の出現時期が髄鞘形成の時期に一致し、Nissle体が胞体内に分布しはじめる再分化開始期に生理学的諸性質が変化して完全な興奮性を示すようになるなどの形態と機能との関連を明確に証明したものであり、また神経疾患モデルとしての幾多の病的実験動物に応用できる可能性をも示唆している。

よって十分学位論文に値するものであると考える。