

10) 培養筋細胞の変性と再生

小 沢 鎧二郎*

ニワトリの血清中には、ニワトリの筋芽細胞の分裂を促す物質（以下MTと省略）が存在する。血清MT活性値は、発生成長に従って変動し、筋細胞の分裂や成長の時期に一致して高値を示す。さらに血清MT活性値は、成鶏においてもかなりな高値を示す^{1), 2)}。

一方、筋を構成する細胞のうち、分裂能を持つものは筋芽細胞に限られ、筋管細胞・筋細胞は、融合や蛋白等の細胞内物質の蓄積によって成長する。筋芽細胞は正常鶏では、胚および孵化直後の幼若雛に限られる。従ってMTがより分化の進んだ筋管、筋細胞にも作用を持っているか否かが問題となる。

また生物活性物質が、生理的に働いているか否かの一つの基準として、その物質の欠乏症が存在し、その物質の投与によってその欠乏症状の改善を見るという条件を挙げることができる。しかしMT欠乏症はまだ発見されていない。

この論文では、培養系においてMTがクレアチンキナーゼ（CPK）活性の蓄積に関与していること、および筋管細胞の変性を防いでいることを報告する。筋管細胞はMT欠乏状態では変性壊死に陥るが、MTを附加することによって“治癒”する。なお一部は別に報告した³⁾。

材料と方法

培養筋細胞は、先に報告したように12日鶏胚胸筋よりコラゲナーゼ処理によって単細胞

を得た⁴⁾。約 3×10^5 ヶの細胞をファルコンの30mmシャーレに播いて37°C 5%CO₂をおぎなった空气中で培養した。培養液の組成はEagleのminimum essential medium 85% 馬血清15%を加えたもの2.5mlにMT 0.1mlを加えたものである。MT濃度は10 μ g/ml MT標品の精製法は先に発表した方法¹⁾を修飾したもので、別途に発表する。

初め培養はMT存在下で4日間培養しその後適当日数だけMTを除いた液で培養した。場合によっては再びMTを加えて培養を行った。

CPK測定：Nodaらの法の変法で別に報告した⁵⁾。

結 果

1) MTのCPK蓄積に対する効果

同じ条件で作った培養を四日間MT存在下で培養した後、一群の細胞はMT非存在下で、また他群の細胞はMT存在下で培養を続けた。そしてその必要な時期に各群から細胞を集めてそこに含まれるCPK活性を測った。図1に示す結果は各点が4枚の培養皿から得られた値の平均を示す。

MTが存在している場合はCPK活性は急速に増加し、日が経って来るとその増加率は大巾に減少した。一方MT非存在下の群ではMTをぬいた翌日には既にCPK活性の上昇の傾向が抑えられ、その後もわずかに上昇をみたにとどまった。以下に示すようにMT非存在下では細胞は変性して培養皿から離れて数としても減少するが、少くとも顕微鏡下で

*東京医科歯科大学難治疾患研究所実験薬理

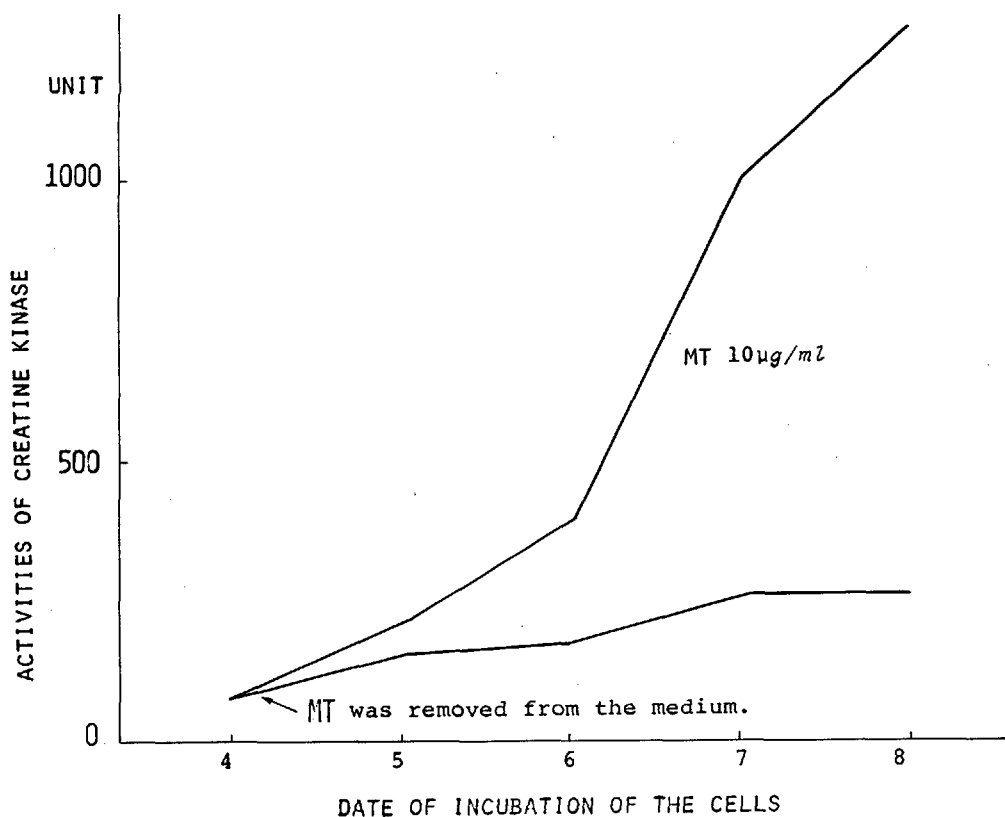


図1

縦軸：培養皿に含まれるCPK活性（4枚の平均値）。単位の計算はOzawa⁵⁾による。

横軸：培養の日数。3×10⁵ケの細胞をMT10µg/ml存在下で培養を行い、4日目に培養液を交換。以後一方の群はMT10µg/ml存在、非存在下で培養し各日に培養をとめたもの。

観察した限り、わずかの減少は否定できないが上記のCPK活性の差にみ合うような大きな細胞数の減少は認められなかった。

2) MT非存在下における筋管細胞の変化

MT存在下で培養を継続すると、筋芽細胞の増殖、筋管細胞の形成および成長がみられる。

MT存在下で筋管細胞の形成をみた後、培養液中からMTを除いて培養を続けると、二三日中に大きな筋管細胞の変性が起って来た。一つの培養皿の中の筋管細胞の変化は、細胞によって程度の違い、変形の様相の違いなど

まちまちであり、変性を起すに要する時間も違っていた（図2、図3、図4）。

筋管細胞は偏平化して細胞の中が広がった。この際細胞縁は正常のようにスムーズな曲線ではなく、鋸の歯のようにギザギザになったり、時には数は少いがこの変化が強調されて長い角を出したようになった（図4）。偏平化よりもこうした突出が目立つ場合も少くなかった。

細胞の内部構造の変化として、横紋の消失、核の配置部位の変化（図2）、空胞の出現、本態不明の多数の黒斑点の出現（図3）等

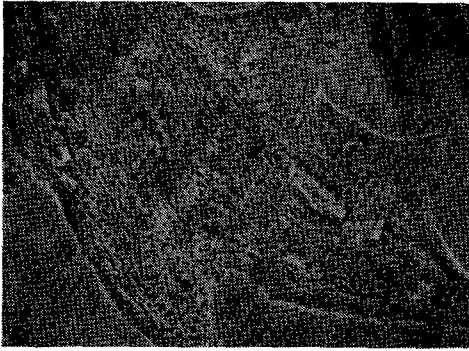


図2

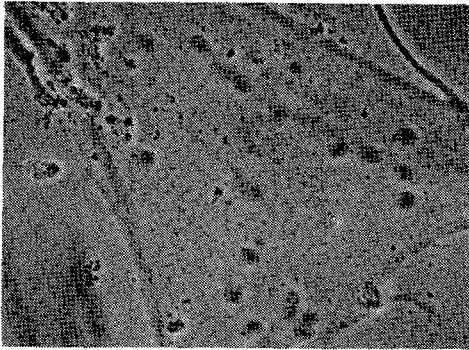


図3

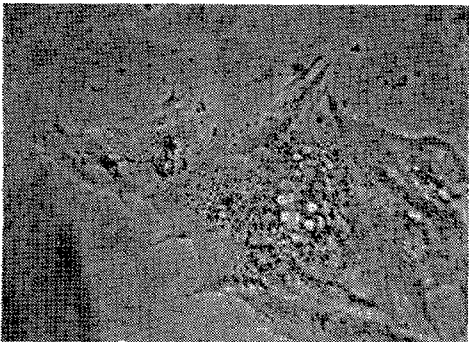


図4

図2, 図3, 図4 変性した細胞

3×10^5 個の細胞をMT $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で4日培養し、以後MTなしで6日間培養したもの。これらの写真は同じシャーレから得られた。(260×)

がみられた。一ケの細胞内でもきれいに横紋が残っている部分と全く消失した部分とが隣り合って存在していることもあった。空胞は小さなものが数多くみられることや、比較的大きなものが少数みられることなどさまざまであった。

時間が経つにつれ筋管細胞の破壊は進み、ある細胞は分断されて、ある細胞はそのままそっくり培養皿から離れて浮んで来た。

筋芽細胞や小さくて細いまだ発達の悪い筋管細胞はこれに反して比較的正常の形を呈していた。

3) MTを再び加えた際の細胞の変化

上記の筋芽細胞及び大小の筋管細胞をMT存在下で培養を続けると、数日後には少数ながら比較的正常な形態を示す大きな筋管細胞が再び現れた(図5)。変性してもまだ浮遊するに至っていない筋管細胞もみられた。

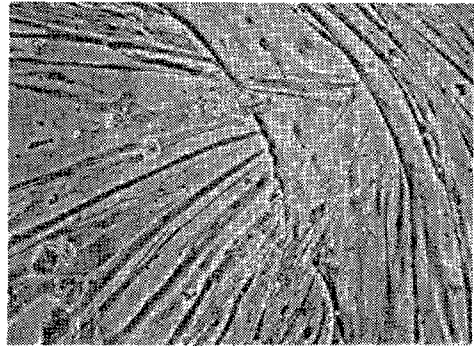


図5 “再生”した細胞

2.5×10^5 個の細胞をMT $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で4日、MT非存在下で4日、更にMT存在下で6日培養したもの。(130×)

また確実には判断できないがもしかして変性の中で進行がとまり“Defektheilung”かと思われるような像も観察された。

MTを加えてから数日間の連続観察を行ったところ、わずかではあるが筋芽細胞の分裂増殖の像(clone culture 様のコロニー形成)や、筋管細胞の形成、また小さくて細い筋管

細胞の成長などがみられた。

別の実験で筋管細胞形成後二三日MT欠乏状態に置いて、この段階ではまだ変性が起っていない標品でも、MTを加えて更に数日培養すると激しい変性が起って来ることが観察された。

考 按

CPKの活性の蓄積が、培養系の場合には殆んどが筋管細胞によって行われるというのは確立された事実である⁶⁾。従ってMTを除くとCPK蓄積が抑えられるということは、MTが筋管細胞へ作用しているという考えを支持している。さらにMTを除くと筋管細胞は変性を受けることはこの考えを更に強く支持するものと考えられる。初めに述べたように血清MT活性は成鶏でも高い。筋管細胞は、正常では成鶏には存在しないのでこの生理的な意味を説明することはできないにしても、MTが筋芽細胞ばかりでなく筋管細胞にも有効であり、分化の進んだ方がよりMT欠乏に敏感であることは、筋細胞に対するMTの作用を調べる際の大きな足がかりとなる。

前述の如くある物質の欠乏による変性、その投与による“治癒”ということは、その物質が生理的に働いていると考える根拠となる。

今回の実験は *in vitro* の系にすぎないが、この基準への足がかりであると考えられよう。

総 括

筋培養系において、MTは筋芽細胞だけでなく、筋管細胞にも作用した。MTは筋管細胞のCPK蓄積をうながし、変性を防御した。MTは変性した筋管細胞を含む培養系に働いて、比較的正常な大きな筋管細胞を出現させた。

文 献

- 1) E.Ozawa & K.Kohama : Proc. Japan Acad. 49 : 852. 1973.
- 2) K.Kohama & E.Ozawa: Proc. Japan Acad. 49 : 857. 1973.
- 3) E.Ozawa : Proc. Japan Acad. 53 : B. 130. 1977.
- 4) K.Kohama & E.Ozawa: Devel. Growth Differ. 19 : 139. 1977.
- 5) E.Ozawa: Devel. Growth Differ. 印刷中.
- 6) A. Shainberg, et al.: Dev. Biol. 25 : 1. 1971.
- 7) I. Otsuki & E.Ozawa: Cell Struct. Funct. 2 : 367. 1977.

 **検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用 
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

ニワトリの血清中には,ニワトリの筋芽細胞の分裂を促す物質(以下 MT と省略)が存在する.血清 MT 活性値は,発生成長に従って変動し,筋細胞の分裂や成長の時期に一致して高値を示す・さらに血清 MT 活性値は,成鶏においてもかなりの高値を示す 1),2).

一方,筋を構成する細胞のうち,分裂能を持つものは筋芽細胞に限られ,筋管細胞・筋細胞は,融合や蛋白等の細胞内物質の蓄積によって成長する.筋芽細胞は正常鶏では,胚および孵化直後の幼若雛に限られる.従って MT がより分化の進んだ筋管,筋細胞にも作用を持っているか否かが問題となる.

また生物活性物質が,生理的に働いているか否かの一つの基準として,その物質の欠乏症が存在し,その物質の投与によってその欠乏症状の改善を見ることが出来る.しかし MT 欠乏症はまだ発見されていない.