

2) 神経・筋組織培養による細胞膜電位の 發育分化過程に関する基礎的研究

板原 克哉*

研究協力者 佐藤 元* 半田 康延*

培養神経細胞の分化過程に於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何らかの変化が機能的にも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がほとんど見当たらない状態である。その為、DMP chick を用いた培養による病態生理学的研究を行う前に、正常 chick の培養神経細胞の機能的分化に関する研究をその基礎として行う必要がある。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刺入し(図1)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。



図1 培養10日目脊髄神経節細胞及び自発性活動電位
右上 微小電極
1000倍位相差像

培養法

10日目鶏胎の脊髄神経節を約120個採取し、37°Cの0.06% Trypsin 液中に約5分間浸す。これを Ca⁺-Mg⁺ free の Rinaldini 液で3回洗い、ついで培養液中に入れ、先端の細いピペットで脊髄神経節が partially に分離する程度に柔らかく pipetting する。この時、細

表1 培養液組成

Fetal calf serum	30%
Calf serum	30%
Eagle's MEM	30%
Chick embryo extract	10%
Penicillin	200u/cc.

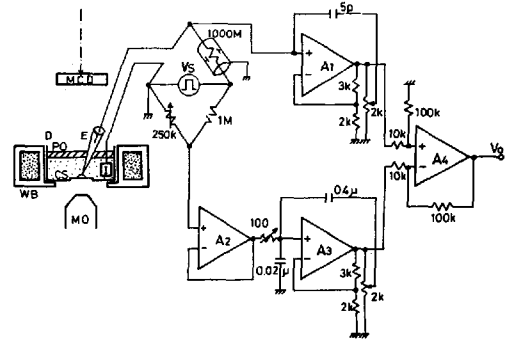


図2 Block diagram of experimental arrangement

A₁₋₄ : Operational Amplifier, D : プラスティックシャーレ, E : ガラス電極, CS : カバーズリップ, I : 不関電極, PO : パラフィンオイル, MCD : 位相差コンデンサー, MO : 対物レンズ, WB : 温水循環器, Vs : 刺激電流, Vo : 出力

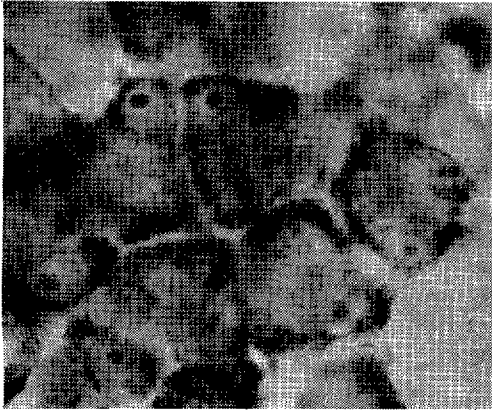
* 東北大学医学部脳神経内科

胞数が1 cc当り約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、CO₂ 3%，空気97%の水蒸気飽和混合気内で37°Cで培養する。培養液は3日毎に交換する。培養液組成は表1に示す。

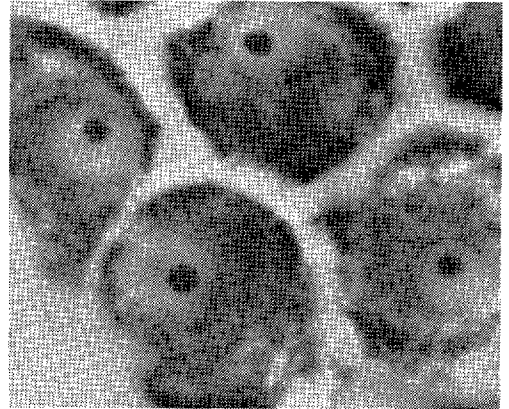
生理的実験法

電気生理学的実験の Block diagram を図2に示す。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、十分な量の培養液を入れ、その上に蒸発を防ぐ目的でパラフィンオイルを入れた。又培養液の温度を35~37°Cに保つため周囲に温

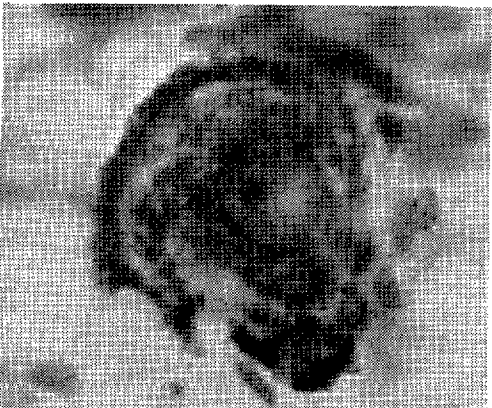
水を循環させた。顕微鏡の対物レンズは形態的所見を厳密に得るため100倍の油浸レンズを用いた。微小電極は glass-capillary に glass-fiber を入れて puller で引き、即座に3 M KClで満たしたものをを用いた。電極抵抗は約10MΩである。測定回路は、1本の電極で刺激と記録を同時に行うためブリッジ回路を用いた。この装置を用いて神経細胞の passive 及び active な性質を定量的に比較するため、電極を刺入して静止電位が1分以上安定した後、-60mVに電位を固定し、それより過分極性及び脱分極性に刺激電流を細胞内に通電した。これにより得られた電位変化はシンクロスコープでモニターデータレコーダに



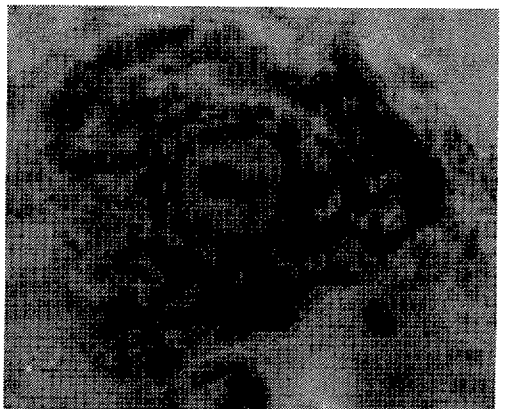
a) stage 1 2日目



b) stage 2 8日目



c) stage 3 22日目



d) stage 4 41日目

図3 各培養期に於ける脊髄神経節細胞

(Nissl 染色) ×1000

記録した。

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。図3は各ステージに於けるニッスル染色での脊髄神経節細胞を示す。第1期（培養第1週：図3-a）は培養操作により細胞が脱分化している時期である。胞体直径は 20μ 以下で小さく、核が胞体辺縁部に偏在し、又 Nissl Body が辺縁のみに見られる所謂 chromatolytic state を呈する。第2期（第2週：図3-b）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：図3-c）は成熟期への移行期で、胞体の

大形化、核の中心への移動、及び、Nissl Body の細胞内分布がより著明となる培養第5週以降の第4期はいわゆる成熟期で（図3-d）、胞体は約 50μ に達し、核は胞体のほぼ中心部に位置し、そして 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。髄鞘は第3期頃より形成され始め、第4期にほぼ完成する（図4）。

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は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（図5）実効膜抵抗は各培養時期で最小の値を示す（図6）。この時期の細胞は大部分興奮性を示さず、脱分極電流に対し passive あるいは local な response を示すのみである（図11-a）。た

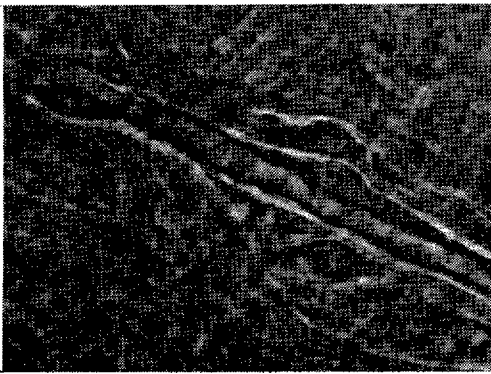


図4 | 髄鞘 培養26日目

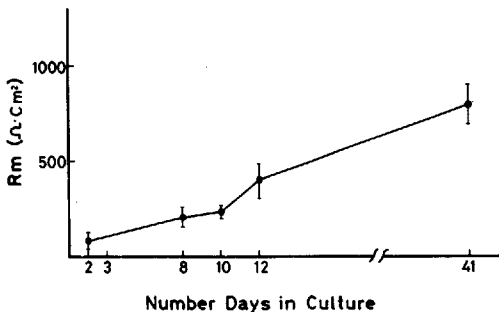


図6 培養経過中の実効膜抵抗

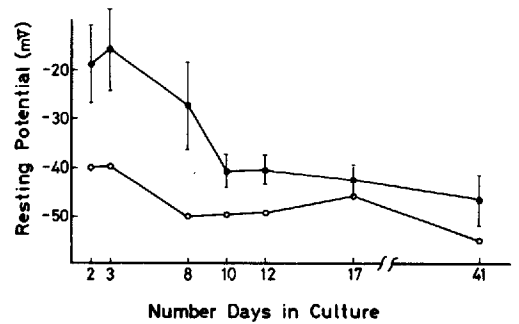


図5 培養経過中の静止電位

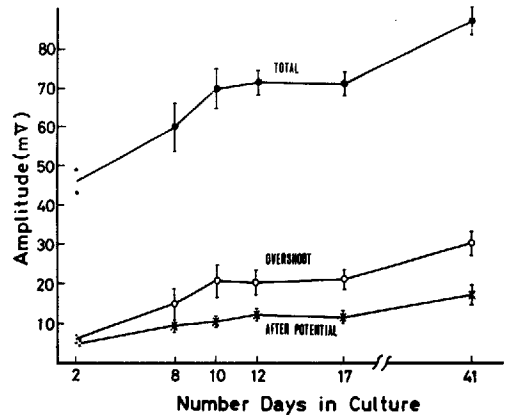


図7 培養経過中の活動電位の振幅

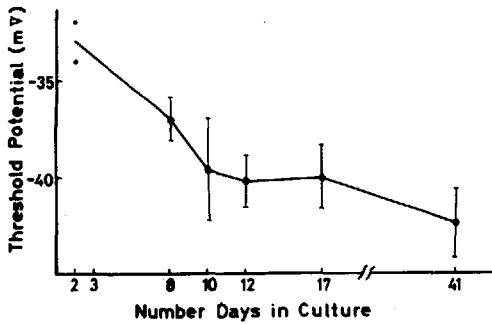
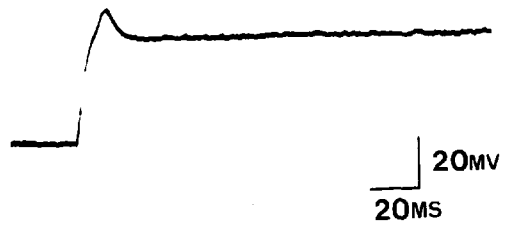


図8 培養経過中の閾値電位



a) 培養2日目

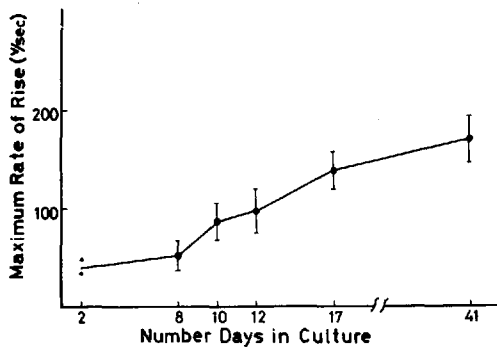
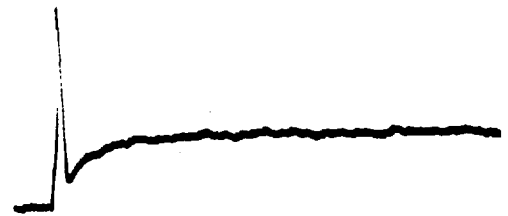


図9 培養経過中の Maximum rate of rise



b) 培養12日目

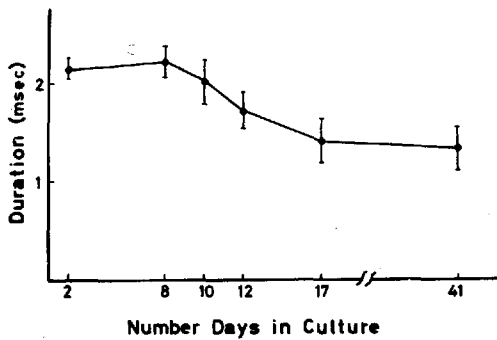
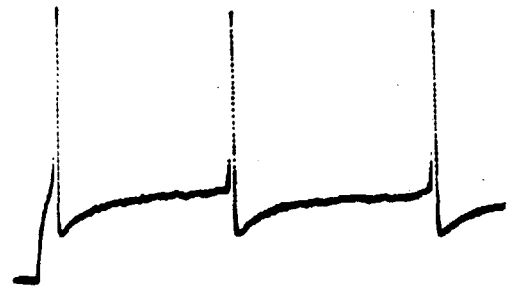


図10 培養経過中の活動電位の Duration



c) 培養41日目

図11 持続性脱分極による反応

だ -40mV の深い静止電位を持った2個の細胞で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(図5), 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 action potential 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

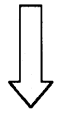
深く, 実効膜抵抗はさらに大きくなる傾向が認められた(図5, 6)。又活動電位の overshoot, after potential 及び全振幅の増加(図7), 閾値の低下(図8), maximum rate of rise(図9)及び Duration(図10)の短縮が分化の進展に伴って認められた。これらの passive 及び active な膜の性質は培養第2期に於いてその変化が最も著明であり, 又第4期の成熟期の生理学的性質は, in situ の

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にのみ action potential を発生するが(図11-⑥)、それ以降は反復性に action potential を発生した(図11-⑦)。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 論

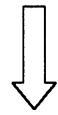
以上の結果、培養脊髄神経節細胞の生理的機能変化は、形態学的分化の経過と密接に関連する事が判明した。殊に、反復性興奮の時期が髄鞘形成の時期に一致する事、又形態学

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。今後、これらの基礎的 Data をさらに積み重ね、さらに DMP chick embryo の神経、筋を培養しその病態生理に関する研究を行う事により DMP の本態の解明がさらに進むものと思われる。



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



培養神経細胞の分化過程に於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何らかの変化が機能的にも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がほとんど見当たらない状態である。その為、DMP chick を用いた培養による病態生理学的研究を行う前に、正常 chick の培養神経細胞の機能的分化に関する研究をその基礎として行う必要がある。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刺入し(図 1)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。