

鶏胚脳培養細胞に及ぼすビリルビンの影響について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8641

鶏胚脳培養細胞に及ぼすビリルビンの影響について

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山本信二郎教授)

嶋 田 修 美

本論文の要旨は第13回, 第14回神経病理学会および第31回日本脳神経外科学会で発表した。

クモ膜下出血,あるいは脳室に穿破する脳内出血に見られる重篤な症状は,出血自体の場所占拠性障害の他に,二次的に発生する脳偏位あるいは頭蓋内圧亢進によるものが多い^{1)~4)}。クモ膜下腔に出た血液は,通常無菌性の髄膜炎を起し⁵⁾,脳腫脹を生ずると共に,髄液の過剰貯留を来して頭蓋内圧亢進の主要な原因をなす^{6) 7)}。髄液系内に出血が起ると,赤血球は溶血し,オキシヘモグロビンから,最終的にはビリルビンとなる。出血後のキサントクロミーの原因は,ビリルビンが大部分を占め⁸⁾,特にビリルビンの量が症状を左右すると主張する者もある⁵⁾。藤井⁹⁾は,頭蓋内圧亢進を指標として,一定量の血液に含有される量の,赤血球,血球 ghost,ヘモグロビン,オキシヘモグロビン,ヘミンならびにビリルビンを各々単独にクモ膜下腔に注入し,このうちビリルビンによる反応が最も著明であることを証明した。ビリルビンの細胞毒性については従来,主として核黄疽の面から研究が進められている^{10)~13)}。今回著者は,頭蓋内および髄液系内出血の面からビリルビンの影響を検索する為, *in vitro* で脳細胞,特にグリア細胞に対するビリルビンの有害作用を検索した。問題として取上げられたのは,ビリルビン負荷による培養細胞の形態,酵素活性ならびに代謝の変化である。

I 実験方法

受精後12日目の鶏胚脳を用いた。解剖顕微鏡を用いて脳組織を無菌的に取出し,0.5~1.0mm³に細断し,トリプシンやEDTAによる消化処理を行なうことなく,細片を約20回ピペッティングを施した。この操作によって細胞はほとんど1個1個に分離される。このものを1,000rpm3分間遠心し,上澄み液を捨て,その沈渣に20%仔牛血清添加イーグル199培養液を加え,ガラス瓶

による単層培養を行った。培養液は3日に1回の頻度で交換し,培養14日を経た初代培養細胞を用いた。又或群では培養瓶底においたカバーガラスに細胞を付着させ,これを適宜取出して,組織学的ならびに組織化学的検索に用いた。ビリルビン溶液をつくるためには Silberberg の方法¹³⁾により,まず0.1N NaOHに20mg/mlの濃度に溶かし,0.1N HClにてpH 7.6に調整し,このものをpH 7.5の培養液に添加して種々の濃度の液を作製した。液がpH 7.0近くになるとビリルビンは結晶化して沈澱し,細胞に機械的損傷を与える可能性がある。培地のビリルビン濃度を10~50mg/dlとし,8時間ないし24時間にわたって観察した。培養細胞の母体となる鶏胚脳をホルマリン固定,パラフィン包埋し,一般染色をおこなった。培養細胞については,コントロール群と共にビリルビン負荷後,細胞を位相差顕微鏡により経時的に観察,写真撮影をおこなった。カバーガラスには付着せしめた細胞をHE, Bodian 鍍銀,PTAH,ニッスル染色などおこなった。

電子顕微鏡用には培養瓶を燐酸緩衝液にて洗滌後,ゴムブラシにより細胞を瓶底より剝離し,直ちに1000rpm 5分間遠心してペレットを作製し,燐酸緩衝液にて24℃,1~2時間固定した。エタノール系列による脱水後, Luft の原法¹⁴⁾に従い,エポキシ樹脂包埋,ガラスナイフを用い,Porter-Blum ultramicrotomeで超薄切片作製し,酢酸ウラニール,鉛の二重染色し,日立HUII-DS型電子顕微鏡で観察した。なお超薄切片作製に際し,約0.5μの厚さに切片を作り,1% toluidine blueにて染色し,電顕所見の裏付けとした。

組織化学的検索には超生体染色法を用いた物質を対象とした。TCA回路系酵素としてコハク酸脱水酵素(SD),その後の電子伝達系の酵素として,NA DH₂ diaphorase,チトクロームオキシダーゼを,嫌気性

Effects of bilirubin on cultured chicken embryonal brain cells. Osami Shimada, Department of Neurosurgery (Director: Prof. S. Yamamoto), School of Medicine, Kanazawa University.

解糖系酵素として乳酸脱水素酵素 (LDH) の酵素活性反応などである。培養瓶より培養細胞のついているカバーグラスを取出し、Hank の緩衝塩類溶液にて洗滌、固定せず直接後述の基質液に入れ、37°C 1~2 時間作用させた。次いで指定緩衝液にて洗浄し、10% 中性ホルマリンで約 1 時間固定し、水洗後グリセリンゼリーに封入、検鏡、写真撮影した。酵素組織化学から見た酵素活性は外的条件に影響を受けやすいので、培養条件、染色条件をなるべく一定にし、常に各酵素阻害剤を加え、対照と比較検討し、出来るだけ早く写真撮影をおこなった。ビリルビン負荷試験は 20mg/dl を 8 時間作用させたものについて酵素染色した。上記組織化学検索に用いた基質液は次の如くである。

コハク酸脱水素酵素

小川和朗と岡本道雄の方法¹⁵⁾

0.1% TNBT (0.1M 磷酸緩衝液 pH7.6 に溶解)

0.1M コハク酸ナトリウム液 (緩衝液に溶解)

0.1M 磷酸緩衝液 pH7.6

蒸留水

以上を各液等量を混合。

NADH₂ diaphorase

Ogawa-Barnett の方法¹⁶⁾

250mg % TNBT 0.3ml

1% NADH₂ 0.3ml

0.1M 磷酸緩衝液 pH7.6 1.0 ml

再蒸留水 0.25ml

テトクロームオキシダーゼ

Nachlas-Crawford-Goldstein-Seligman の方法¹⁷⁾

4-Amino-1-N,N-dimethyl naphthylamine (2mg/ml) 4.0ml

L-Naphthol (1mg/1ml) 4.0ml

0.1M 磷酸緩衝液 (pH7.4) 3.0ml

Cytochrome C (5mg/ml) 3.0ml

Catalase (30mg/ml) 1.0ml

乳酸脱水素酵素 (LDH)

Barka-Anderson の方法¹⁸⁾

0.1M DL-乳酸ナトリウム 0.1ml

NAD (4mg/ml) 0.1ml

0.1M KCN 0.1ml

0.05M 塩化マグネシウム 0.1ml

0.06M 磷酸緩衝液 (pH7.4) 0.25ml

250mg % TNBT 0.25ml

培養液による代謝の検索には TD フラスコを用いた。各濃度にビリルビンを添加した培養液 15ml につけて 2 時間毎に 8 時間まで、それぞれ培養液中の乳酸、糖、酸素および pH を測定した。乳酸測定は Boehringer

社のキットによる酵素法であり、日立分光光度計 No.139

II 結 果

I. 形態的变化

1) 光顕所見

を用いた。糖測定には Boehringer 社のキットによるグルコースオキシダーゼ法¹⁹⁾を用いた。酸素および pH 測定には Astrup 血液ガス分析装置を用いて測定した。

本実験による培養細胞を位相差顕微鏡で観察すると、初期には光を強く屈折する円形の細胞として見られる。これらの細胞はガラス瓶に定着しはじめ、約 12 時間で扁平な紡錘状の形をとり、次第に突起も発育してくる。培養 7 日目になると、写真 1 のごとく 20μ 前後の大きな細胞体と、3~4 本の比較的短い突起を持った、いわゆる Protoplasmic なアストロサイトが見られる。その核は大部分が 1 個の円形ないし、長円形であり、その中に核小体が 1 個ないし 2 個みられる。また細胞体の中には核の周辺部に光学的密度の高い顆粒が見られる。その他アストロサイトに接して、少数のオリゴデンドログリアが見られ、このものは、大きさが 3μ 内外で、光学的密度が高いが、乏しい細胞質をもち、かつ、細胞質は周囲を Halo でとりかこまれている。その細胞の突起は細く、2~4 本が細胞からまっすぐのびている。その他、位相差顕微鏡、あるいは HE 染色のみでは、アストロサイトとの鑑別が困難な少数の線維芽細胞も見られる。なお、神経細胞で増殖生存したものは見られなかった。培養 14 日目ではアストロサイトは優勢となり、突起も数を増し、長さを増し、複雑な胞体を示し扁平化して膜様の形を呈する。これに対しオリゴデンドログリアは減少あるいは消失する。(写真 2, 3)。

培養 1 カ月をすぎるとアストロサイトは、Protoplasmic なものが次第に減少し、これに対して fibrous なものが優勢となってくる。写真 4 は培養 4 カ月目のもので核の大きさに比し、胞体が小さく長く複雑な網目状を示した線維性の突起となってくる。本実験では培養 14 日目のものを用い、ビリルビンを負荷の実験に供した。

ビリルビン 10mg/dl 濃度の培地 2 時間で、膜様突起の収縮がはじまり、細胞質は膨化する。一時細胞内顆粒は増加し、4 時間後では顆粒は粗大化する。6 時間をすぎると核の偏在化が見られ、細胞内顆粒は徐々に光学的密度を弱め、数も減少する。また細胞内の液胞変性もわずかに見られるようになる。PTAH 染色にてグリア線維を見るとコントロール群に比べて線維の断裂ないし消失が見られた。写真 5 はコントロールで、写真 6 はビリルビン 10mg/dl 8 時間負荷の PTAH 染

色である。細胞の液胞変性および膨化とグリア線維の減少が見られる。写真7はPAS染色コントロールであり、写真8はビリルビン10mg/dl 8時間負荷したものであり、コントロールに比べて、比較的大きな原形質に富む細胞質の中にグリコーゲン顆粒と思われるPAS陽性顆粒が認められる。ビリルビンの濃度を20mg/dl, 40mg/dlと増加させてゆくと、上記の変化はますます著明となり、50mg/dlに達すると培養液内に、ビリルビンの結晶を生じた。

2) 電顕所見

コントロール群の培養14日目ではグリア細胞の核、核膜、ミトコンドリアが見られる(写真9)。ビリルビン20mg/dl 8時間負荷するとミトコンドリアの膨化、クリスタの不鮮明化が見られ、グリコーゲン顆粒の出現も見られた。

3) 酵素組織化学的検査

A. コハク酸脱水素酵素

培養14日目のグリア細胞では(写真11),核周辺部の細胞質と突起が比較的良好に染まり核は白く抜けたようになる。これは核を除く細胞質および突起に酵素活性があることを示す。ビリルビン20mg/dl 8時間負荷すると(写真12),核周辺部の染色性は特にコントロールとの差は見られないのに対し、突起部に酵素活性の減少が認められる。

B. NADH₂ diaphorase

コントロールでは(写真13),胞体の核周辺部および突起が比較的良好に染まり、核は白く抜けたようになっている。これは核を除く細胞質および突起に酵素活性があることを示す。ビリルビン20mg/dl 8時間負荷すると(写真14),細胞体および突起部の酵素活性が共に低下することが認められる。

C. チトクロームオキシダーゼ

コントロールでは(写真15),核を除く細胞質に活性が見られ、突起部の活性は弱い。ビリルビン20mg/dl 8時間負荷すると細胞質における活性が一様に低下することが認められる。

D. 乳酸脱水素酵素

コントロールでは(写真17),核周辺部の細胞質内に酵素活性が見られる。ビリルビン20mg/dlを8時間負荷すると(写真18),胞体の酵素活性が高くなり、それは特に、核周辺部の細胞質内に著しい。

II. 乳酸産生, 糖消費, 酸素消費およびpHの変化

1) 乳酸産生

図1は、14日の培養液にビリルビンを10, 20, 40および50mg/dlの濃度に加えた場合の乳酸の生産量を示す。2時間で乳酸生産量はコントロールでは1mg/dlであ

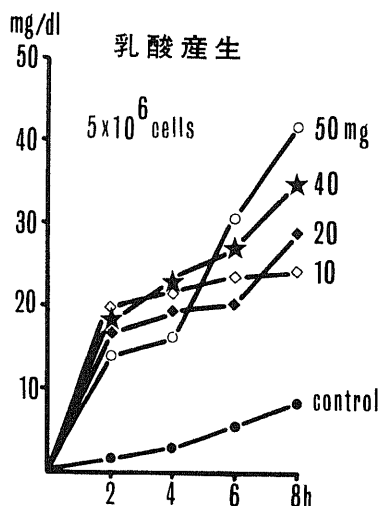


図1 乳酸産生

14日の培養液にビリルビン10, 20, 40および50mg/dlの濃度に加えた場合の乳酸の生産量を示す。

るのに対し、ビリルビン負荷群では15~20mg/dlである。ビリルビン濃度と生産される乳酸量の間には必ずしも厳密な比例関係はなく、特に最初の2時間以内の乳酸量はビリルビンの各濃度ともほぼ近い乳酸量を生じ、8時間値でビリルビンの濃度が高いほど乳酸産生が大きくなり、コントロールでは8mg/dlであるのに対し、50mg/dlのビリルビン濃度のものでは42mg/dlとなる。

2) 糖消費

図2は培養液にビリルビン10, 20, 30および50mg/dlの濃度に加えた場合の糖消費を示す。ビリルビン濃度と消費する糖にはほぼ比例関係が見られる。2時間で培養液中の糖消費はコントロールで5mg/dlであるのに対し、ビリルビン負荷群では10~20mg/dlである。殊にビリルビン50mg/dl負荷群の糖消費は、2時間値20mg/dl, 8時間値40mg/dlで、いずれもコントロール群の4倍の値を示す。

3) 酸素消費

図3は培養液にビリルビン10, 20, 40および50mg/dlを加えた場合の酸素消費を示す。2時間で酸素消費はコントロールで65μmol/dlであるのに対し、ビリルビン負荷群では25~60μmol/dlである。コントロール群およびビリルビン負荷群とも2時間値が最も多く酸素を消費し、2時間以降急に酸素消費は減少しており、特にビリルビン40mg/dl, 50mg/dl負荷群では酸素消費量が特に減少しており、コントロール8時間値が96μmol/dlに対してそれぞれ50μmol/dlおよび45μmol/dlとなる。

4) pH の変化

図4はビリルビン50mg/dl負荷におけるpHの変化を示す。培養液の最初のpHは7.5であり、コントロール群では培養液中の緩衝作用が効いているため、8時間でも数値に殆んど変化を示さない。これに対し、ビリルビン50mg/dl負荷群では次第にpHを減じ、8時間でpH 7.4以下となる。

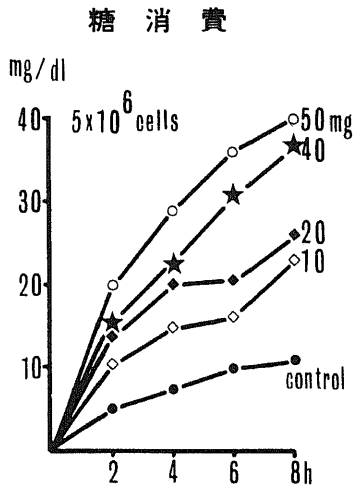


図2 糖消費

培養液にビリルビン10, 20, 30および50mg/dlの濃度に加えた場合の糖消費を示す。

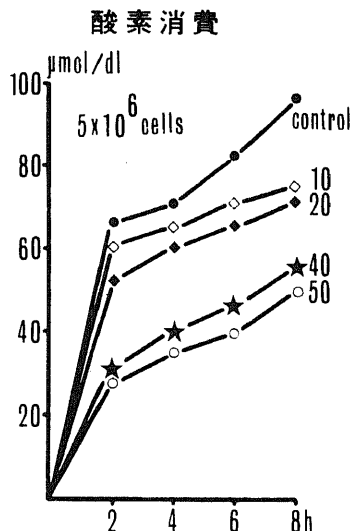


図3 酸素消費

培養液にビリルビン10, 20, 40, 50mg/dlを加えた場合の酸素消費を示す。

考 按

クモ膜下出血、脳内出血および脳室内出血の臨床像は、出血による単なる機械的圧迫、あるいは脳の局在性損傷よりは、むしろ二次的頭蓋内圧亢進^{1)~4)}、脳偏位、血管攣縮³⁾²⁰⁾²¹⁾、その他代謝障害²²⁾²³⁾などによる脳機能の障害によるものが大きい。一旦血管外に出た血液成分およびその分解産物は脳に対して物理的のみならず、化学的な有害物質として作用する⁵⁾⁸⁾⁹⁾。Barrow⁸⁾に依ると髄液系内に出た血球は溶血し、まずオキシヘモグロビンが生じ、このものは2~3日に最高値に達し、その後、徐々に減少する。ビリルビンは出血後2~3日で出現し、約2~3週間髄液中に残存し、キサントクロミーの主成分となる。ヘモグロビン分解によって生ずる鉄成分は、ヘモジデリンに含まれて脳組織に沈着する²⁴⁾。Jackson⁵⁾は髄液系内出血の場合、その予後は、髄液中のビリルビン量が多い程悪いとした。

生体内におけるビリルビンの代謝に関する通説では、血管内赤血球は、Kupfer細胞を中心とする網内系で破壊されて、まず、ビリベルジゲンが生産され、このものが還元されてビリルビンになる²⁵⁾²⁶⁾。Tenhunenら²⁷⁾²⁸⁾はヘムの分解に heme oxygenase が関係し、それらは脾のマイクロゾームに広く分布し、ビリルビン産生に大きな役割を果たしていることを示した。髄液系内出血後に見られる髄液中のビリルビンは血清中の

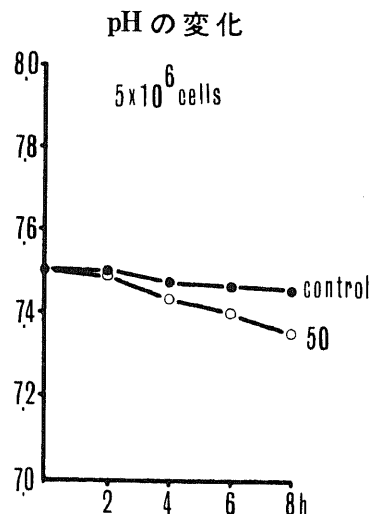


図4 pHの変化

ビリルビン50mg/dl負荷における培養液 pH の変化を示す。

ビリルビンが浸出したものとは考えられず、髄膜系を中心とする網内系で産生されるものと推定されていた。⁵⁾⁽⁸⁾ Roost ら²⁹⁾⁽³⁰⁾ は *in vitro* で、髄液中にヘモグロビンを incubate してもビリルビンは産生されないのに、生体の髄液系内に赤血球やヘモグロビンを注入すると、ビリルビンが産生され、同時に、クモ膜や脈絡膜における heme oxygenase 活性の著明な上昇が見られることから、クモ膜や脈絡膜にビリルビン産生能があることを主張した。髄液中のビリルビンには、2種類があげられ³¹⁾、一つは、波長が 425 ~ 430 μ に吸収スペクトルの平均値を有する短波群で、グルクロニール抱合型のいわゆる直接型ビリルビンであり、他は、450 ~ 460 μ に平均値を有する長波群で、間接型ビリルビンである。核黄疽の際に問題になるのは血液脳関門を通過しやすいことが条件となり、しかもこのものは水に不溶性の分子量の小さな遊離型間接ビリルビンである^{11)(32)~34)}。これに対し、髄液系内のビリルビンは直接神経系に作用しうることから分子量の大小にかかわらず影響を与えうるものと推定される。

脳動脈破裂によるクモ膜下出血において、最も著明な現象は出血発作後、一旦下降した頭蓋内圧が或時間を過ぎてから再び上昇することである³⁾。この二次的頭蓋内圧亢進には、脳浮腫、ならびに血管拡張による脳腫脹^{1)(~4)(35)} の他に、髄液の貯溜⁶⁾⁽⁷⁾⁽³⁶⁾ などがあげられ、この現象のためには、神経細胞より、脳の支持組織の関与が大きいと考えられる。本実験で検索の対象としたのは、主に、グリア細胞であるが、髄液系内出血における神経障害の一端を解明するものと云える。

本実験で用いた鶏胚脳は、受精後12日目のものである。この時期は、脳発生第2期、ニューロブラスト、あるいは、第3期のグリオブラストの発生を終了し、ニューロンとグリアが分化しはじめる時期^{37)~40)} である。培養法は、ガラス板による単層培養であるため、ニューロンの長期生存は困難で、ほとんどの細胞はグリア系細胞⁴¹⁾⁽⁴²⁾ である。特に多いのはアストログリアで、オリゴデンドログリアも見られたが、量的には非常に少ない。前者は殊に血液脳関門の重要な構成因子をなして、脳の代謝に最も関係が深く、病的状態で最も活躍する細胞である^{43)~46)}。また、アストログリアとの鑑別が困難な線維芽細胞がかなり入りこんでいるものと思われる。

培養液にビリルビンを添加すると、10mg/dl の濃度で、2時間目に細胞突起の収縮と、細胞質の膨化が見られ、6時間後では、核の偏在化も現われ、PTAH 染色では線維の断裂が見られる。ビリルビンの濃度の上昇とともに、細胞の変化も著しくなる。Kikuchi⁴⁷⁾

は 0.1 ~ 3 mg/dl のビリルビン濃度では、Hela 細胞の培養では形態的に何らの変化もなかったとしている。一方、Ritis ら⁴⁸⁾ は Hela 細胞を 5 ~ 10% 仔牛血清を添加した培地で、ビリルビン 6 mg/dl 負荷した結果、24時間後より、細胞の空胞化並びに萎縮を見、72時間後より、細胞破壊を見た。Silberberg ら¹²⁾ はラット新生児の小脳をカバースリップ法で培養し、これに、ビリルビンやその他血液分解産物を負荷すると、ビリルビン 5 mg/dl の濃度で 3 ~ 4 時間後にニューロンの核は偏在化し、6時間後にミエリン鞘の断裂、7 ~ 8 時間後には、グリアの膨化を見、これに対し、1 mg/dl の濃度ではほとんど変化を見なかった。また、彼は電顕的検索によって、5 mg/dl 12時間でミトコンドリアの膨化を見ている。本実験では、ビリルビン 20 mg/dl 8時間でグリア細胞の核膜の融解、ミトコンドリアの膨化クリスタの不鮮明化およびグリコーゲン顆粒の出現が見られた。

培養細胞では、細胞質が極度に扁平化する傾向が強いので、酵素組織化学的検索に好適なものである⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾。本実験では、コハク酸脱水素酵素、NADH₂-diaphorase、チトクロームオキシダーゼおよび乳酸脱水素酵素の酵素活性を調べたが、これらは、すべてミトコンドリア内に存在するとされている酵素群である¹⁶⁾⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾。乳酸脱水素酵素は、ミトコンドリアのマトリックスに存在して、soluble enzyme に属し、分画遠沈法では上澄液中に存在し、その他のものは、ミトコンドリアのクリスタを含む膜系に存在する¹⁶⁾⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾。本実験のビリルビン負荷群とコントロール群を比較すると、ビリルビン負荷群では、乳酸脱水素酵素活性がコントロール群に比し上昇しているのに対し、その他の酵素では活性はすべて低下していた。培養液中の乳酸産生、酸素消費量、および pH の変化を見ると、ビリルビン負荷群では乳酸の上昇、酸素消費の減少、pH の低下があり、それらはビリルビン濃度と平行する。これらの事実は培養細胞の糖代謝において、ビリルビン負荷により嫌氣的代謝が盛んとなり、好氣的代謝が低下することを示す⁵¹⁾。ビリルビンによる細胞呼吸、もしくは、酸化的磷酸化の阻害については、Zetterstrom ら⁵²⁾ は白ネズミの肝臓ミトコンドリアを遠沈分離して、ビリルビンを作用させ、ビリルビン濃度 3×10^{-4} モルで、酸化的磷酸化が完全に抑制され、同時に呼吸も抑制されることを見た。この際ビリルビンは電子伝達系と ATP 生成系との脱共役因子として作用し、ミトコンドリアから DPN およびチトクローム C を遊離するためと解されている。Day⁵³⁾ はビリルビンはラット小脳の組織呼吸を抑制し、これはチトクローム C によって

可逆的に改善されるとしている。Chanceら⁵⁴⁾はビリルビンによって、succinate oxydase 系および酸化的燐酸化に影響を与えるとしている。Cougarら⁵⁵⁾は浮遊培養したマウスの fibroblast を用い、ビリルビン 1×10^{-4} モルにて乳酸産生は57%に上昇し、 25×10^{-5} モルをこえと酸素消費は著明に減少し、これを境に乳酸の上昇が見られることを示した。核黄疸の際には分子量の小さな間接型の遊離ビリルビンが新生児大脳の基底核神経細胞に入りこみ、これを破壊するために起るとされている^{11) 32) ~34)}。

本実験の電顕所見においてビリルビン影響下のグリア細胞にミトコンドリアの膨化変性やグリコーゲン顆粒が認められる事実は細胞の呼吸機能が障害されることに対する形態学的裏づけといえる^{16) 49) ~51) 55) 56)}。また、酵素組織化学的検索から TCA サイクル系の酵素活性低下を見これに対し嫌気性解糖系の酵素活性上昇を見た。これらの事実は、ビリルビン負荷によってグリア細胞の機能低下を来し、細胞呼吸が抑制され、これに対し、嫌気的解糖が亢進し、その結果、乳酸産生が促進されたと解釈できる^{22) 23) 51)}。

髄液系内出血の際、直接に血液成分の影響をうけるのは、血管、髄膜、クモ膜、および脈絡膜などの間葉系組織である^{5) 8) 9) 36) 58)}。しかし、クモ膜下出血の際、脳皮質の比較的、深部にまでヘモジデリンの沈着がみられる事実²⁴⁾より、血液物質が脳の支持組織としてのグリア系細胞のみならず神経細胞への直接影響も少なくないと云えよう。

結 論

頭蓋内出血、および髄液系内出血における重篤な症状を起す要因として著者は、血液成分、特に、その分解産物としてのビリルビンの脳細胞に対する影響に着目した。

受精後12日目の鶏胚脳細胞を単層培養し、培養14日目にビリルビンを $10 \sim 50 \text{ mg/dl}$ の濃度に添加してその影響を検索した。

1. 培養により増殖する細胞の種類は大部分がアストログリアであり、一部オリゴデンドログリアならびに、線維芽細胞である。

2. 濃度 10 mg/dl 2時間後で、細胞突起の収縮ならびに細胞質の膨化変性を生じ、ビリルビンの濃度ならびに作用時間を増す程、その変化は著明となる。

3. 電顕所見では、ビリルビン 20 mg/dl 8時間負荷にて、ミトコンドリアの膨化、クリスタの不鮮明化を主とするミトコンドリアの変性およびグリコーゲン顆粒が見られる。

4. 酵素組織化学的検索では、ビリルビン負荷によってコハク酸脱水素酵素活性、 NADH_2 diaphorase 活性ならびにチトクロームオキシダーゼ活性などの低下を見るのに対し、乳酸脱水素酵素活性の上昇が見られる。

5. 化学定量的にはビリルビン負荷群では、培養細胞の乳酸産生の増加、酸素消費の低下および培養液中の pH の低下が見られる。

6. 以上の事実は、ビリルビン負荷によって、細胞の形態学的変化と共に、好気性解糖が抑制され、嫌気性解糖が亢進することを示す。

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲を賜った恩師山本信二郎教授に謹んで深謝の意を捧げます。また、終始ご親切なご助言をいただいた教室の伊藤治英講師、本学皮膚科大槻典男先生に心から感謝の意を表します。また、本研究遂行に際しご協力を頂きました第三解剖学教室および、脳神経外科学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 山本信二郎, 林 実: 脳神経外傷, 3, 227 (1971).
- 2) 山本信二郎, 林 実, 山本鉄郎: 脳神経, 23, 259 (1971).
- 3) Nornes, H. & Magnaes, B.: J. Neurosurg., 36, 537 (1972).
- 4) 林 実, 丸川 忍, 藤井博之, 北野哲男, 古林秀則, 山本信二郎: 脳神経, 27, 1007 (1975).
- 5) Jackson, I. J.: Arch. Neur. Psych., 62, 572 (1949).
- 6) Ellington, E. & Margolis, G.: J. Neurosurg., 30, 651 (1969).
- 7) McQueen, J. D. & Jelsma, L. F.: Arch. Neurol., 16, 508 (1967).
- 8) Barrows, L. J., Hunter, F. T. & Banker, B. Q.: Brain, 78, 59 (1955).
- 9) 藤井博之: 十全医会誌, 発表予定.
- 10) Blank, W. A. & Johnson, L.: J. Neuropath. & Exp. Neurol., 18, 165 (1959).
- 11) Shutta, H. S. & Johnson, L.: Neuropath. & Exp. Neurol., 26, 572 (1967).
- 12) Silberberg, D. H. & Shutta, H. S.: J. Neuropath. & Exp. Neurol., 26, 572 (1967).
- 13) Silberberg, D. H., Johnson, L. & Ritter, L.: Pediatr., 77, 386 (1970).
- 14) Luft, J. L.: J. Biochem. Cytol., 9, 409 (1961).

- 15) 小川和朗, 岡本道雄 : 解剖誌, 35, 431 (1960)
- 16) Ogawa, K. & Barnett, R. J. : J. Ultrast. Res., 12, 188 (1965).
- 17) Nachlas, M. M., Crawford, D. T., Goldstein, J. P. & Seligman, A. M. : J. Histochem., 6, 145 (1968).
- 18) Barka, T. & Anderson, P. J. : Histochemistry, Theory, Practice and Bibliography, p.312, New York, Hoeber Medical Division, Harper and Row Publisher, 1963.
- 19) 金井 泉・金井正光 : 臨床検査法提要, 改訂増補25版, VII-51頁, 東京, 金原出版, 1969.
- 20) Allcock, J. M. & Drake, C. G. : J. Neurosurg., 22, 21 (1965).
- 21) Simeone, F. S. : Stroke, 3, 449 (1972).
- 22) Granholm, L. : Scand. J. Clin. Lab. Invest., 23, 361 (1969).
- 23) Olensen, J. : Acta Neurol. Scand., 46, 141 (1970).
- 24) 武谷止孝 : 神経病理学入門, 第1版, 195頁, 東京, 医学書院, 1970.
- 25) 吳 建・坂本恒雄 : 内科書, 下巻, 195頁, 東京, 南山堂, 1965.
- 26) 中島 修・山藤靖展 : 日本臨床, 9, 1836 (1972).
- 27) Tenhunen, R., Marren, H. S. & Schmid, R. : Biochemistry, 61, 748 (1968).
- 28) Tenhunen, R., Mar H. S. & Schmid, R. : J. Lab. Clin. Med., 75, 410 (1970).
- 29) Roost, K. T., Pimstone, N. R., Diamond, I. et al. : Neurology, 21, 425 (1971).
- 30) Roost, K. T., Pimstone, N. R., Diamond, I. & Schmid, R. : Neurology, 22, 973 (1972).
- 31) Kjellin, K. G. : J. Neurol. Sci., 13, 161 (1971).
- 32) Diamond, I. & Schmid, R. : Clin. Invest., 45, 678 (1966).
- 33) 蒲生逸夫 : 小児科学, 82頁, 東京, 南山堂, 1965.
- 34) 齊藤 脩・村田文也 : 小児科, 12, 347 (1971).
- 35) Cushing, H. : Am. J. Med. Sci., 125, 1017 (1903).
- 36) Hammes, E. M. : Arch. Neurol. & Psychiatry, 52, 505 (1944).
- 37) 藤田哲也 : 神経進歩, 7, 117 (1963).
- 38) 藤田哲也 : 神経進歩, 16, 18 (1972).
- 39) 藤田哲也 : 神経進歩, 16, 351 (1972).
- 40) 藤田哲也 : 神経進歩, 16, 388 (1972).
- 41) 中沢準之助 : 神経進歩, 6, 21 (1962).
- 42) 中沢恒幸 : 神経進歩, 6, 2 (1962).
- 43) 中沢恒幸・富永 淳・原 洋二・笠原俊彦 : 神経進歩, 7, 799 (1963).
- 44) 中沢恒幸 : 神経進歩, 7, 799 (1963).
- 45) 笠原俊彦 : 精神誌, 65, 1044 (1963).
- 46) 富永 淳 : 精神誌, 69, 770 (1967).
- 47) Kikuchi, K. : Jap. J. Exp. Med., 31, 71 (1961).
- 48) Ritis, F. D., Paradisi, F. & Mario, G. : Path. Microbiol., 37, 37 (1971).
- 49) 小川和朗 : 生体の科学, 12, 106 (1961).
- 50) 小川和朗 : 生体の科学, 12, 154 (1961).
- 51) 堀 正治 : 脳神経, 21, 1113 (1969).
- 52) Zetterstrom, R. & Ernster, L. : Nature, 15, 1335 (1956).
- 53) Aay, R. L. : Am. J. Med. Sci., 125, 1017 (1903).
- 54) Chance, B. & Hollunger, G. : J. Biol. Chem., 278, 418 (1963).
- 55) Cowger, M. L., Igo, R. P. & Labbe, R. F. : Biochemistry, 4, 2763 (1965).
- 56) 小田琢三 : 医学のあゆみ, 76, 380 (1971).
- 57) Friede, R. : Zbl. Allg. Path. Anat., 92, 65 (1954).
- 58) Dajong, R. N. : Neurology, 21, 425 (1971).

写真説明

写真1. 鶏胚脳 培養7日目
位相差顕微鏡 ×400

細胞の大部分は20μ前後の大きな細胞体と3~4本の比較的短かな突起を持った Protoplasmic なアストロサイトである。その他に細胞体の大きさが3μ内外で細胞質に乏しいオリゴデンドログリアがみられる。

写真2. 鶏胚脳 培養14日目 H-E染色 ×400

数個の比較的長く枝分れた突起を持ち、扁平化して membraneous な形の細胞体を有したアストロサイトのみが増殖し、オリゴデンドログリアは見られない。

写真3. 鶏胚脳 培養14日目 Bodion 染色 ×400

核小体1~2個有した核と、よく発達した線維を有するアストロサイトの特徴を示す。

写真4. 鶏胚脳 培養4ヶ月目 H-E染色 ×200

胞体が小さく fibrous となり、長く複雑に網目状を呈した線維状の突起を有するアストロサイト。

写真5. 鶏胚脳 培養14日目

P T A H染色 ×400 コントロール

よく発達したグリア線維を示す。

写真6. 鶏胚脳 培養14日目

P T A H染色 ×400 ビリルビン10mg/dl 8時間負荷。

細胞の液胞変性および膨化、ならびにグリア線維の減少がみられる。

写真7. 鶏胚脳 培養14日目

P A S染色 ×800 コントロール

P A S陽性物質は胞体の中に少ない。

写真8. 鶏胚脳 培養14日目

P A S染色 ×800

ビリルビン10mg/dl 8時間負荷

細胞内に P A S 陽性のグリコーゲン顆粒と思われる顆粒が見られる。

写真9. 鶏胚脳 培養14日目

電顕 ×11200 コントロール

グリア細胞の核、核膜および豊富なミトコンドリアが見られる。

写真10. 鶏胚脳 培養14日目

電顕 ×11200

ビリルビン20mg/dl 8時間負荷

ミトコンドリアの膨化、クリスタの不鮮明化およびグリコーゲン顆粒の出現が見られる。

写真11. 鶏胚脳 培養14日目

コハク酸脱水素酵素活性反応 ×400

コントロール

核を除く核周辺部の細胞質および突起部にホルマザ

ンの沈着が見られ、活性があるのがみられる。

写真12. 鶏胚脳 培養14日目

コハク酸脱水素酵素活性 ×400

ビリルビン20mg/dl 8時間負荷

細胞質および突起部におけるホルマザン沈着が少く、この部位の酵素活性低下が認められる。

写真13. 鶏胚脳 培養14日目

NADH₂ diaphorase 活性 コントロール ×400

核を除く細胞質および突起部に酵素活性が認められる。

写真14. 鶏胚脳 培養14日目

NADH₂ diaphorase 活性 ×400

ビリルビン20mg/dl 8時間負荷

細胞質に酵素活性低下が認められる。

写真15. 鶏胚脳 培養14日目

チトクロームオキシダーゼ活性 ×400

コントロール

核を除く細胞質に活性が見られ突起部の酵素活性は弱い。

写真16. 鶏胚脳 培養14日目

チトクロームオキシダーゼ活性 ×400

ビリルビン20mg/dl 8時間負荷

細胞質における酵素活性が一様に低下しているのが認められる。

写真17. 鶏胚脳 培養14日目

L D H活性 コントロール ×400

核を除く細胞質内に酵素活性がみられる。

写真18. 鶏胚脳 培養14日目

L D H活性 ×400

ビリルビン20mg/dl 8時間負荷

核周辺部の細胞質内に活性上昇が強くみられる。

Abstract

Effects of bilirubin on the brain were assessed in the culture of brain tissues of chicken embryo which were taken on the 12th day after fertilization. A certain dose of drug was administrated on the cell monolayers cultured for 14 days. Cells proliferated with culture were mostly astroglia and partially oligodendroglia and fibroblasts. Changes in cells and culture medium by administrating bilirubin were as follows:

1) Contraction of cellular processes and swelling degeneration of cytoplasm occurred two hours after with an administration of 10mg/dl of bilirubin. The greater was the concentration and the longer the duration of administration of drug, the more remarkable became the changes.

2) Electromicroscopic studies showed changes in mitochondria characterized by the indistinctness of crista, and an increase of glycogen granules in cytoplasm.

- 3) Histochemical studies revealed a decrease in activities of succinic dehydrogenase and NADH₂ diaphorase activity, and an increase in those of lactic dehydrogenase.
 - 4) An increase in production of lactic acid, a decrease in consumption of oxygen and a fall of pH were produced in the culture medium.
-

