

二重寒天培地を用いたシュワン細胞の単離培養に関する実験的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 浜岡, 寛士 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8061

二重寒天培地を用いたシュワン細胞の単離培養に関する実験的研究

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 野村 進教授)

浜 岡 寛 士

(昭和63年8月31日受付)

シュワン細胞の単離培養は技術的に困難で、未だ完全なものは見当たらない。その最大の原因は培養系への線維芽細胞の混入である。本研究は二重寒天培地を用いて線維芽細胞を分離し、シュワン細胞の単離培養系を得ることを目的とした。方法はウィスター系のラットの坐骨神経を用いて組織片培養を行った。培養細胞を採取し単離細胞浮遊液を作成した。これを Human Tumor Clonogenic Assay に準じて二重寒天の上層に播種し培養を行った。その結果、軟寒天内に形成されたコロニーを採取し、再び単層培養系へ移行させると小型で紡錘形を呈しリボン状に連なるシュワン細胞の形態学的特徴を有した細胞が観察された。電子顕微鏡にて観察するとコロニーを形成した細胞はほぼ同一の形態を示し、胞体内、特に核周囲にゴルジ装置、ミトコンドリアが多く見られ、粗面小胞体、リボソームも散見されるという過去に報告されている培養シュワン細胞の電顕的特徴と合致する所見が得られた。更に特徴的な所見として1)細胞接合部のデスモゾーム様構造、2)胞体内に豊富にかつ集簇性に存在する中間径フィラメントが挙げられた。しかし、基底膜は存在しなかった。S-100 蛋白を用いた免疫蛍光抗体法にて、コロニーより採取し再び単離培養系へ移行させた細胞はすべて陽性を示した。以上の所見よりコロニーを形成した細胞はシュワン細胞であると結論した。以上より本法は線維芽細胞を全く含んでいないシュワン細胞の単離培養系を得ることが可能な方法であると考えられた。

Key Words Schwann cell, cultivation, purification, double soft agar

シュワン細胞は末梢神経の支持組織として働く重要な細胞である。in vivo でのシュワン細胞の形態および機能に関しては数多くの報告がある¹⁾⁻⁶⁾が、in vitro での報告は少ない⁷⁾⁻⁹⁾。その大きな理由は神経線維の培養では、その構成細胞であるシュワン細胞のみならず線維芽細胞が混合して増殖するためシュワン細胞の単離培養を行うことが困難である点にある。これまでに線維芽細胞の混入を防止する目的で種々の試みがなされて来た。即ち、cytosine arabinoside, fluorodeoxyuridine 等の代謝拮抗剤を作用させ線維芽細胞を選択的に除去する試み¹⁰⁾、線維芽細胞の表面抗体を用いて線維芽細胞を除去する試み¹¹⁾、無血清培地を用いて線維芽細胞の発育を抑制する試

み¹²⁾等である。しかし、これらの方法では完全には線維芽細胞を除去できないことや、使用する薬剤がシュワン細胞自体に対しても細胞毒性がある等の問題を有していた。

他方、現在、抗癌剤感受性検査法の一つとして脚光を浴びている Human Tumor Clonogenic Assay¹³⁾では、二重寒天培地を用いて腫瘍細胞の単離培養を行っている。即ち、腫瘍細胞の中心である stem cells は軟寒天内で分裂、増殖を繰り返しコロニーを形成するが、線維芽細胞は軟寒天内において増殖せず、コロニー形成には関与しない¹⁴⁾ことが明らかになっている。そこでシュワン細胞は腫瘍細胞と異なるが、本法を応用することにより線維芽細胞を除

Abbreviations: CMRL-1066, Connaught Medical Research Laboratory Media-1066; DEAE-dextran, diethylaminoethyl-dextran; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; HE, hematoxyline and eosine; HI,

去してシュワン細胞の単離培養が得られないかを実験的に確かめた。

材料および方法

I. 材料の採取

実験材料として生後3～5日目のウイスター系ラットの坐骨神経を使用した。ラットを腹臥位に固定し無菌的に皮切後、大腿四頭筋および大腿二頭筋の間より侵入し、坐骨神経を展開した。その上で坐骨結節部より脛骨神経分岐部まで(約1.5cm)を採取し、100単位/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン (penicillin streptomycin solution, Gibco, Grand Island, N. Y.) を含む培養液 [McCoy's 5A (Gibco) wash] の中に静置した。

II. 組織片培養 (explant culture)

採取した坐骨神経片を McCoy's 5A wash 液 (+1%PS) 内でできるだけすみやかに無菌的にハサミで細切し組織片を作成した。これをプラスチックフラスコ (#25100, Corning Glass Works, Corning, N. Y.) 内で 15%heat-inactivated (HI) fetal calf serum (FCS) を含む Rosewell Park Memorial Institute Media-1640 (RPMI-1640) 培養液を用いて 37℃のもとで培養し、3日目毎に培養液の交換を行った。また、Lab-Tek チャンバースライド #4801 (三光純薬, 東京) 内で同様に培養を行い中性緩衝液ホルマリンで固定し、hematoxyline and eosin (HE) 染色を行った (図1)。

III. 単離細胞浮遊液の作成

組織片培養を約2週間行いプラスチックフラスコがコンフルエントとなったことを確認して単離細胞浮遊液を作成した。即ち、phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後、0.025% trypsin+0.02% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 液にて37℃、30分間処理した。

IV. 二重寒天培地の作成

1. Base layer の作成

McCoy's 5A 培養液 500ml に HI-FCS 50ml, HI馬血清 (Gibco) 25ml, ピルビン酸ナトリウム (2.2%) 5ml, L-セリン (21mg/ml) 1ml, L-グルタミン (200mM) 5ml と PS 5ml を加えて enriched McCoy's 5A 培養液を作製した。さらにこの 40ml に tryptic soy broth (3%, Difco, Detroit, MI) 10ml, L-アスパラギン (6.6mg/ml) 0.6ml, diethyl-amino-

ethyl (DEAE) ーデキストラン (50mg/ml, Pharmacia, Uppsala, Sweden) 0.3ml を加え plating medium を作成した。これに 3% bacto agar (Difco) を混合して最終濃度0.5%の軟寒天となるように調整し、その 1ml を base layer として 35mm 6穴マルチウエルディッシュ #3046 (Falcon Plastics, Oxnard, C. A.) の各ディッシュに分注した。

1) Sciatic nerve from 3-5 days rats



2) Explant culture



3) Single cell suspension



4) Double agar culture



5) Colony forming



6) Single cell suspension



7) Secondary culture

Fig.1. Flow diagram of steps in purification of Schwann cells. 1) Sciatic nerves were obtained from 3-5 days old rats. The explants were prepared by cutting sciatic nerves. 2) The explants were cultured in RPMI-1640 medium with 15% fetal calf serum (FCS) for 7 days. 3) The single cell suspension was harvested by trypsin and EDTA. 4) The cells were plated in 35mm Petri dishes. The dishes were incubated at 37℃ in 7-7.5% CO₂ humidified air for 5-6 weeks. 5) The colonies were formed. 6) The colonies were obtained from agar by using Pasteur pipette under inverted microscope. The colony forming cells were harvested as a single cell suspension by trypsin and EDTA. 7) The cells were cultured as secondary culture in RPMI-1640 with 15% FCS.

heat-inactivated; PBS, phosphate buffer saline; PS, penicillin-streptomycin; RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute Media-1640.

2. Plating layer の作成

培養液 CMRL 1066 (Gibco) 500ml に HI 馬血清 75ml, 塩化カルシウム (100mM) 20ml, インスリン (100U/ml) 10ml, ビタミンC (30mM) 5ml, L-グルタミン (200mM) 10ml, PS 5ml を加えて enriched CMRL 1066 培養液を作成した。さらにこの 40ml につき L-アスパラギン (6.6mg/ml) 0.6ml, DEAE-デキストラン (50mg/ml) 0.3ml, 2-メルカプトエタノール (0.5×10^{-3} M) 0.4ml を加えて double enriched CMRL 1066 培養液を作成した。次いでこの double enriched CMRL 1066 培養液 5.4ml に 3% bacto agar 0.6ml を加え 0.3% の軟寒天を作成した。そして上述した単離細胞浮遊液が軟寒天中に 5×10^5 個/ml の細胞密度となる様に調整した。これを先に作成しておいた base layer の上に重層させて plating layer とした (図 2)。

V. 二重寒天培地の培養

以上の如く作製した二重寒天培地を 37°C 水蒸気飽和状態で 7.0~7.5% CO₂ を含んだ培養器で培養し、以後経時的に倒立顕微鏡にて観察を行った。

VI. コロニー形成細胞の単層培養系への移行 (Secondary culture)

二重寒天培地で培養後 5~6 週で軟寒天内にコロニーの形成が認められた。そこでコロニーを倒立顕微鏡視下にパスツールピペットを用いて採取し Trypsin-EDTA 液にて 37°C 30 分間処理した。こうして得られた単離細胞をプラスチックフラスコ内で RPMI-1640 培養液 (15% HI-FCS+10% PS) を用いて secondary culture として培養し、以後これを倒立

顕微鏡にて経時的に観察した。また、一部の細胞はチャンバースライド内で同様に培養を行い 10% 中性緩衝液ホルマリンで固定し、HE 染色を施した。

VII. コロニー形成細胞の電子顕微鏡観察

コロニーを軟寒天ごと鋭利なカミソリにて切離し取り出した。これを 2.5% グルタルアルデヒド (カコディル酸緩衝液にて pH 7.4 に調整) にて前固定した後 20% 4 酸化オスミウム (カコディル酸緩衝液にて pH 7.4 に調整) にて後固定を行った。次いでエタノール上昇系列にて脱水後、酸化プロピレンにて置換しエポキシ樹脂にて包埋した。包埋された試料はダイヤモンドナイフを用い LKB-Ultratome で超薄切片を作成し、酢酸ウランール、クエン酸鉛の二重染色を行った後、日立電子顕微鏡を用いて観察した。

VIII. Secondary culture の S-100 蛋白を用いた免疫組織学的観察

チャンバースライド上の secondary culture の細胞を PBS で 3 回洗浄した後、1% パラホルムアルデヒドで室温、20 分間固定した。PBS で洗浄後アセトンで 4°C、7 分間固定した。次いで間接蛍光抗体法を行った。非特異的反応を抑制するために 10% に希釈した正常ヤギ血清 (Dako-immunoglobulins a/s, Denmark) を 20°C、2 時間作用させた。PBS で 3 回洗浄後、一次抗体として抗 S-100 蛋白ウサギ IgG (Dako Corporation, Santa Barbara, CA) を加え 37°C、1 時間作用させた。PBS で 3 回洗浄後 FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG (Cappel Laboratories Inc., Cochranville, PA) を加え 37°C、1 時間作用させた。PBS で 3 回洗浄した後、90% グリセリンで封

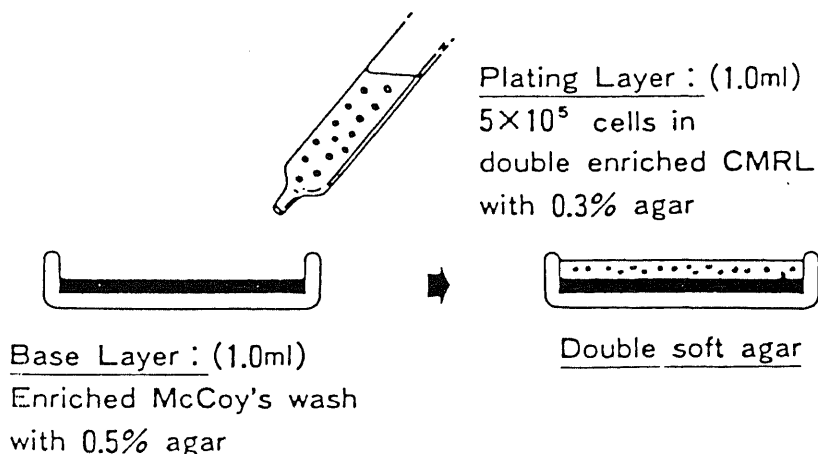


Fig. 2. Components of double soft agar for colony forming of the Schwann cells.

入し、蛍光顕微鏡 (Olympus, AH2, オリンパス社, 東京) で観察を行った。

成 績

I. Explant culture の観察

1. 倒立顕微鏡による観察

培養後2～3日目に組織片はプラスチックフラスコの壁面に定着し、その組織片より2種類の細胞が出現してきた。一つは小型の紡錘形の細胞で、比較的小さい楕円形の胞体と胞体に比して小さな核と双

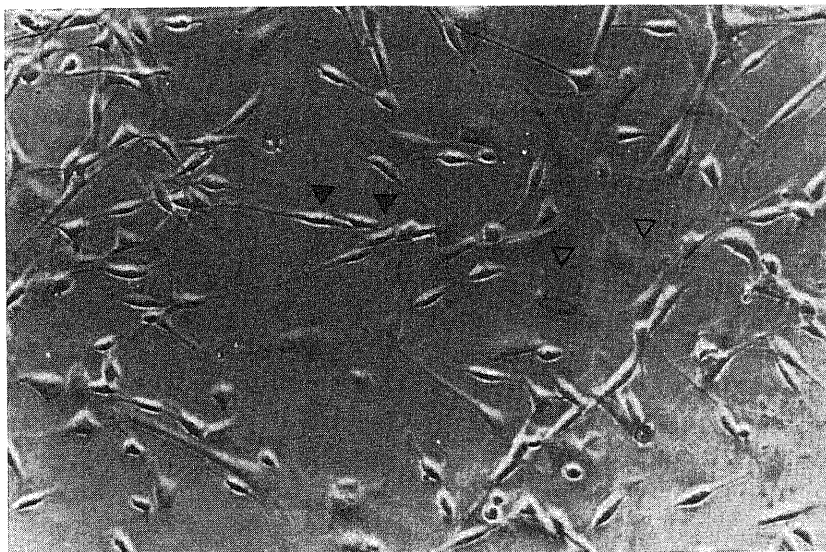


Fig. 3. Phase contrast micrograph of explant culture for 7 days. Small bipolar shaped Schwann cells (▼) and large flattened fibroblasts (▽) were shown.

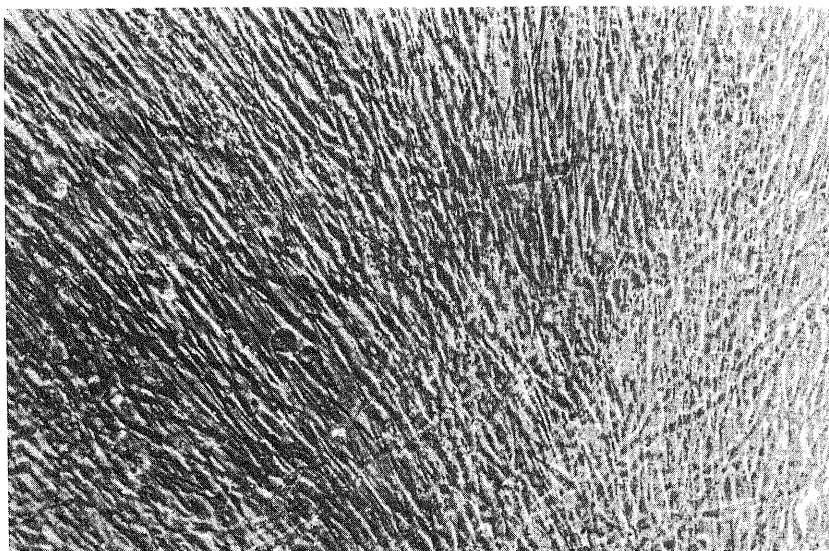


Fig. 4. Phase contrast micrograph of explant culture for 14 days, showing an exclusive growth of fibroblasts.

極性の細胞突起を有していた。それらの細胞はその長軸方向に連なる傾向を示し、シュワン細胞であると考えられた。もう一つの細胞は比較的大型で多形性を示し、胞体に比して比較的大きな核を有しており、線維芽細胞であると考えられた（図3）。培養後1週間までは両方の細胞がほぼ同じ割合で見られた

が、以後培養を続行すると線維芽細胞がシュワン細胞より優位な発育を示し、ついには線維芽細胞がシートを形成し、倒立顕微鏡視にてはシュワン細胞はほとんど同定が不能になった（図4）。

2. 光学顕微鏡による観察

HE染色では倒立顕微鏡による観察と同様に楕円

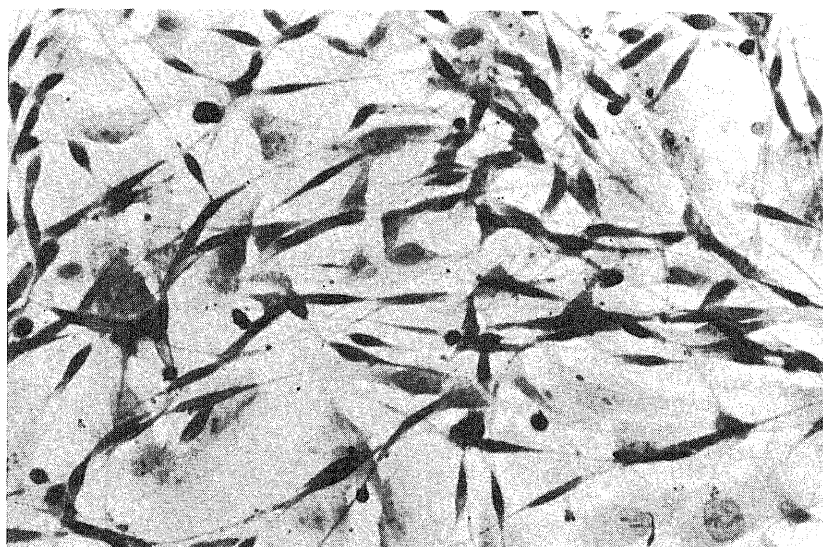


Fig. 5. Light micrograph of explant culture for 7 days. Schwann cells and fibroblasts were shown. Hematoxylin-eosin stain, $\times 150$.

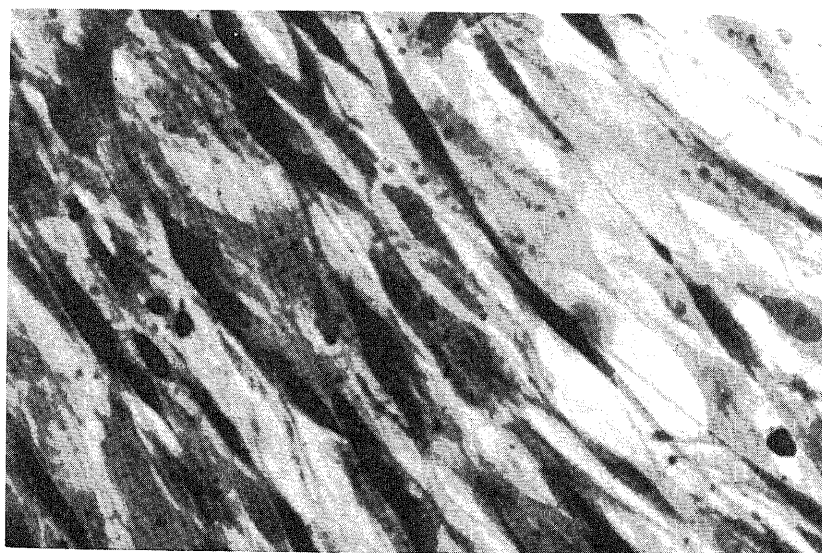


Fig. 6. Light micrograph of explant culture for 14 days. Schwann cells could be identified on the network of fibroblasts. Hematoxylin-eosin stain, $\times 400$.

形の胞体と胞体に比して小さな核と長い双極性の細胞突起を有するシュワン細胞と考えられる細胞と、大型で多形性で比較的大きな核を有する線維芽細胞と考えられる細胞が認められた (図5)。シュワン細胞はその長軸方向に連なり紐状配列を形成し、線維芽細胞は網工を形成した。培養を続行すると倒立顕微鏡視ではシュワン細胞の同定が困難であったが、光学顕微鏡視では上述した特徴を有するシュワン細胞をシート状に配列する線維芽細胞から区別することが可能であった (図6)。

II. 二重寒天培地の観察

二重寒天培地の上面に播種された直後の細胞は球状の形態を呈し、単離細胞が分散された状態で存在した。培養後3日目頃よりそれらの細胞の中で分裂を開始する細胞が見られ始めた。その後次第に分裂を続け培養後2～3週で顕微鏡視にて細胞集団を容易に同定できる程度まで増殖した (図7)。培養後5～6週で50個以上の細胞集団であるコロニーを形成するまでに至るものから途中で増殖を停止し50個以下の細胞集団である細胞集塊 (クラスター) の状態となるものまで種々の形態を示した。コロニーを倒立顕微鏡にて観察すると軟寒天層中に存在するコロニーは塊状 (globe-shaped) を呈していた。また、軟寒天の表面付近のコロニーは小さな塊状の細胞集団を中心として単層の細胞が同心円状の拡がりを出すキノコ型 (mush room-shaped) を呈するものも見られた。コロニーを形成している個々の細胞はほぼ

均一の大ききで円形もしくは楕円形の細胞よりなっていた (図8)。

III. Secondary culture の観察

1. 倒立顕微鏡による観察

Secondary culture 後1日を経過した頃より plastic flask の壁面に付着し始める細胞が見られ、それらの細胞は次第に増加した。これらの細胞はほぼ均一の大ききであった。胞体は球形又は小楕円形で短い双極性の細胞突起を持つものもあった。胞体の中央部に比較的小型の核を有していた。線維芽細胞のような多形性を呈し胞体に比して核のしめる割合が大きい大型の細胞は見られなかった (図9)。培養を続行するとそれらの細胞は次第に細胞突起が伸長し胞体は長楕円形もしくは紡錘形となり、胞体の中央部に円形ないしは長楕円形の比較的小きな核を有する形態を呈してきた。又これらの細胞は培養後5日目頃より長軸方向に連なり、いわゆる紐状配列を形成した (図10)。この形態学的特徴はシュワン細胞に特有のものと考えられた。しかしこの細胞群は線維芽細胞のような旺盛な増殖能を示さず、安定した状態で約2か月間存在したが、その間に明らかな分裂像は認めなかった。

2. 光学顕微鏡による観察

HE 染色では長楕円形もしくは紡錘形の比較的小型の細胞がその長軸方向に連なり紐状配列を呈していた。個々の細胞を見ると、紡錘形で均一に染色される緻密な胞体と双極性の長い細胞突起を有してい

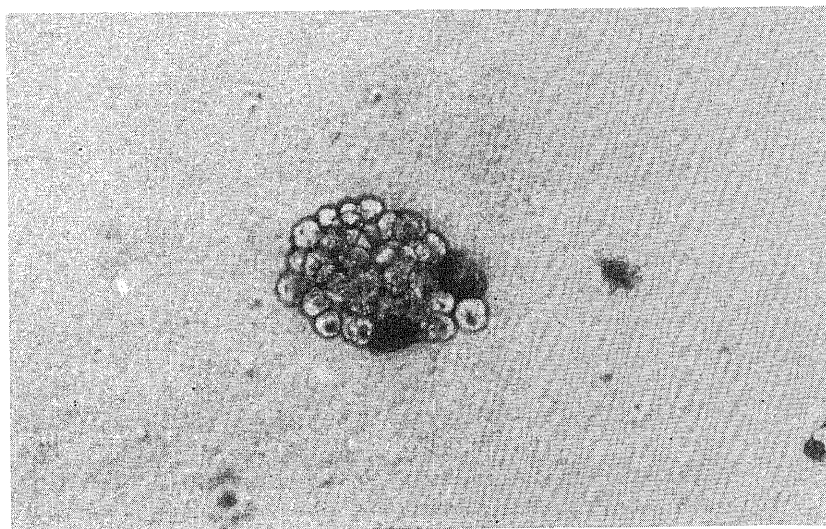


Fig. 7. Phase contrast micrograph of double soft agar for 16 days. Schwann cells were growing in the agar.

た。胞体内には胞体に比して小さく、均一に染色される長楕円形の核を有し、核内には1~3個の核小体を有していた。又、明らかな核分裂像は見られなかった(図11)。

IV. 電子顕微鏡による観察

コロニーを形成した細胞群はほぼ均一の形態を呈し、細胞同志が密着して存在していた。基底膜は見られず、細胞膜は平坦で偽足様突起は認められな

かった(図12)。細胞の接合部で向い合った細胞膜に物質が沈着し、膜が厚く見えるデスモゾーム様構造を呈する部位も認められた(図13)。ミトコンドリアは胞体全域で比較的多数見られ、特に核周辺部に多く見られた。粗面小胞体、ゴルジ装置も核周辺部を中心として見られたが、その発育はさほど良好ではなかった。ライソゾームは散見される程度であった。胞体内には中間径フィラメント(intermediate

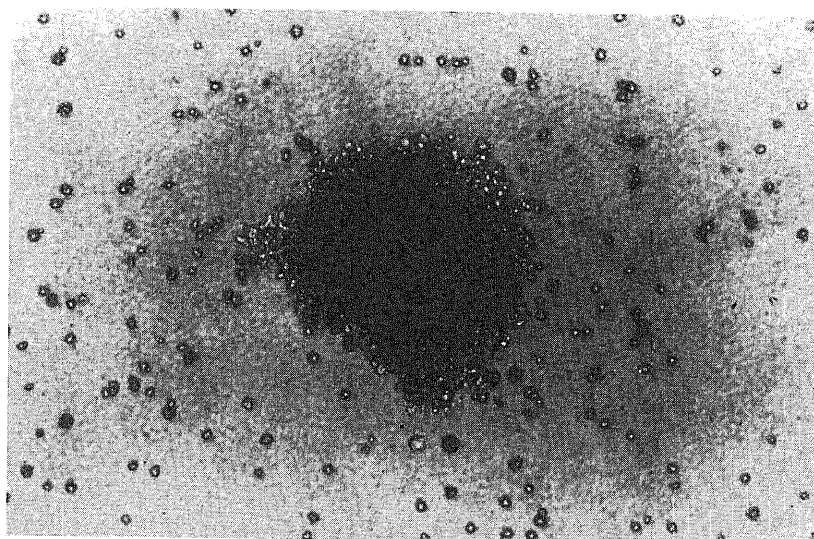


Fig. 8. Phase contrast micrograph of double soft agar for 5 weeks, showing Schwann cells forming a colony.

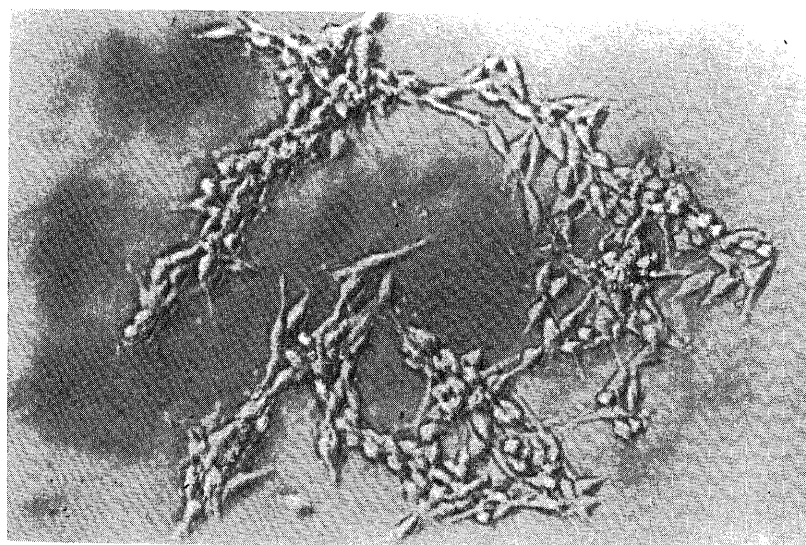


Fig. 9. Phase contrast micrograph of the secondary culture for 1 day. Small round or bipolar shaped cells were shown.

filament) が豊富にかつ集簇性に存在していた (図 14). 核は円形もしくは卵円形の形態を呈し, 核膜は滑らかで辺縁の不整は見られなかった. 1 個または 2 個の核小体が存在し, 濃染される異染色質は核膜周囲に存在し, 淡明な真正染色質は中央部に存在していた.

以上より今回コロニーを形成した細胞の特徴的所

見として 1) 細胞接合部のデスモゾーム様構造, 2) 胞体内に豊富にかつ集簇性に存在する中間径フィラメントが挙げられた.

V. S-100 蛋白を用いた蛍光抗体法による観察

Secondary culture のすべての細胞が S-100 蛋白を用いた蛍光抗体法にて強い蛍光を発した. 蛍光は胞体の全域および細胞突起に均等に認められたが,

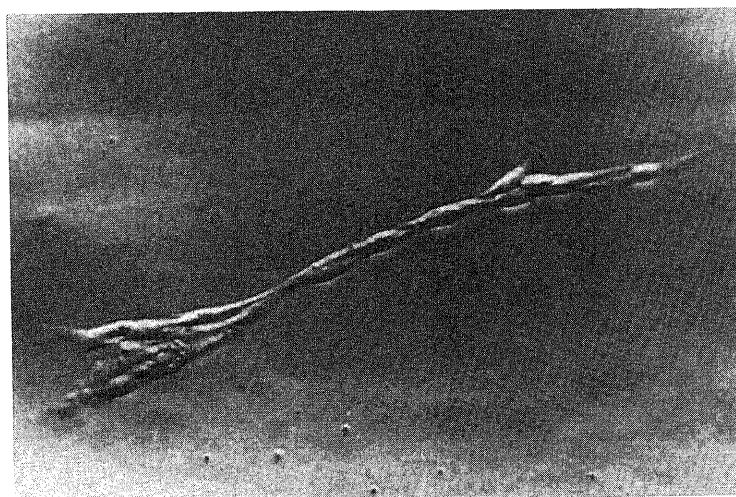


Fig.10. Phase contrast micrograph of secondary culture for 5 days. Small, bipolar shaped cells were arranged in a ribbon-like syncytium. Fibroblasts were not observed.

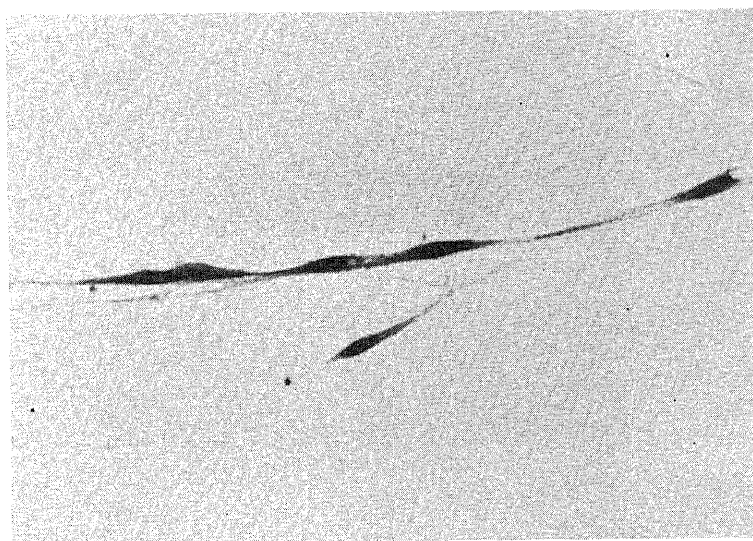


Fig.11. Light micrograph of secondary culture for 5 days. Bipolar shaped cells were shown. Himatoxylin-eosin stain, $\times 300$.

核は蛍光を発しなかった (図15)。

考 察

シュワン細胞の性質、機能に関する研究は古くから行われ数多くの知見が得られている。しかし、そ

れらは *in vivo* でなされたものが大部分である¹¹⁻¹³。シュワン細胞独自の機能、シュワン細胞と軸索との相互関係を知るためには他の細胞成分即ち、線維芽細胞やマクロファージなどの影響を排した *in vitro* の状態での観察が必要となってくる。*in vitro* での

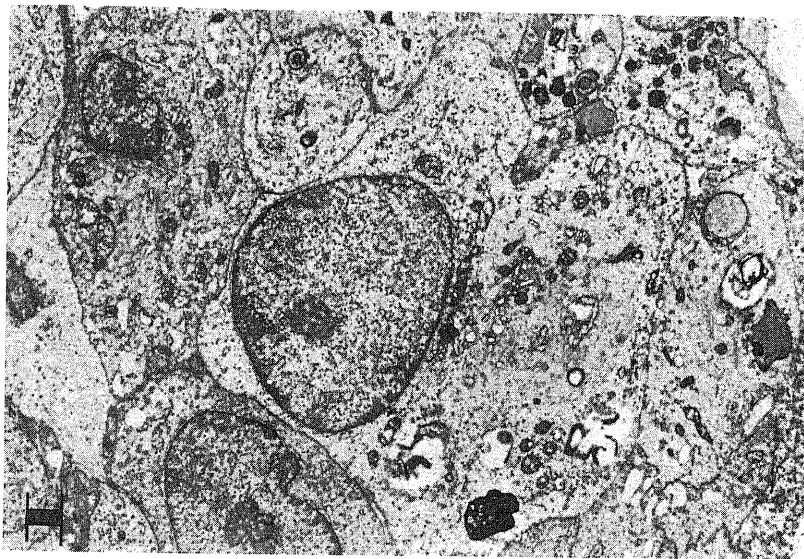


Fig.12. Electron micrograph of the colony forming cells. $\times 4,500$. Bar represents $1\mu\text{m}$.



Fig.13. Electron micrograph of colony forming cells. Desmosome-like structure (arrows) were shown at intercellular junction. $\times 18,000$. Bar represents $1\mu\text{m}$.

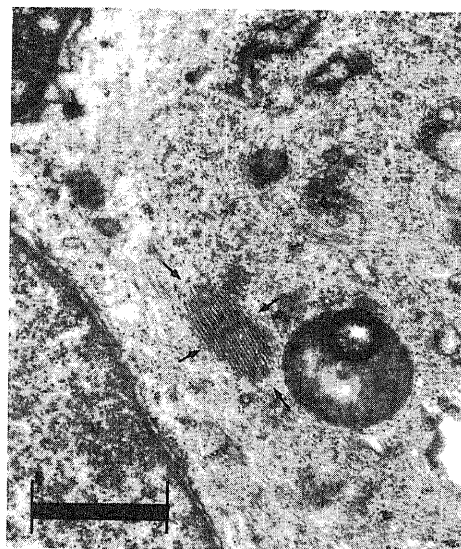


Fig.14. Electron micrograph of colony forming cells. Rich and packed intermediate filaments (arrows) were shown in the cytoplasm. $\times 18,000$. Bar represents $1\mu\text{m}$.

シュワン細胞に関する研究は1907年の Harrison¹⁸⁾を始めとし、以後散見されるが⁷⁻⁹⁾、in vivo での研究に比して立ち遅れていると言わざるをえない。その最大の理由としては、神経線維の培養では2種の細胞が増殖することである。即ち、培養系への線維芽細胞の混入が避けられないためシュワン細胞の単離培養および培養系を安定した状態で維持することが困難であることが挙げられる。そのために今日までにシュワン細胞の単離培養系を得るために数多くの試みがなされてきている。Wood¹⁰⁾は線維芽細胞の細胞回転がシュワン細胞に比して速いことに着目して cytosine arabinoside, fluorodeoxyuridine などの代謝拮抗剤を線維芽細胞に選択的に作用させることにより線維芽細胞を除去することを試みた。Brookes¹¹⁾は線維芽細胞の表面抗原 (Thy1-1) に注目し、その表面抗体とその抗血清を利用して線維芽細胞を除去する免疫学的方法を行った。Skaper¹²⁾は無血清培地では線維芽細胞の発育が抑制されることを利用して無血清培地を用いた培養を行った。Kreider¹³⁾は polylysine に対するシュワン細胞と線維芽細胞の接着能の差を利用してシュワン細胞の単離を試みた。しかし、これらの方法は使用する薬剤がシュワン細胞自体に対して細胞毒性を有していることや、使用する薬剤が高価で、繰り返し大量に使用しにくい等の問題点がある。さらに根本的な問題点はこれらの方法ではシュワン細胞の純培養系が得られず、得られた培養系の中にはわずかではあるが線維芽細胞

が混入していることである。本実験の図4に示したごとく線維芽細胞はシュワン細胞より細胞回転が速いために培養を続行していくにつれ線維芽細胞の占める割合が次第に大きくなり相対的にシュワン細胞の占める割合が小さくなっていく。これを防ぐためには当初より線維芽細胞を全く含んでいない培養系を作成することが望ましい。

組織培養における寒天の使用は古くは1910年代までさかのぼることができる¹⁷⁾。しかし、二重寒天培地においてコロニーを形成させる試みは Sanders¹⁸⁾が最初である。その後 Pluznik¹⁹⁾ Bradley²⁰⁾により正常血球細胞や骨髓細胞のコロニー形成細胞の培養法が確立された。さらにその後 Hamburger¹³⁾はヒト骨髓腫中のコロニー形成細胞の培養法を確立し、human tumor colony forming assay として発表した。この様に二重寒天培地は主に悪性腫瘍細胞に対して用いられてきたが、血球細胞以外の正常細胞への応用はこれまでに Horwitz²¹⁾が軟骨細胞の培養に用いた報告があるのみである。従来、軟寒天内でコロニーを形成するのは悪性腫瘍細胞、形質転換細胞、浮遊状態で増殖可能な細胞だけであると考えられてきた²²⁾。軟寒天内でコロニーを形成することの説明として stem cell の概念がある²³⁾。細胞再生系 (cell renewal system) は stem cell, transit cell, post-mitotic cell の3つのコンパートメントに大別される。Stem cell は生体の一生を通じて自己再生 (self-renewal) を行いうる細胞として、transit cell

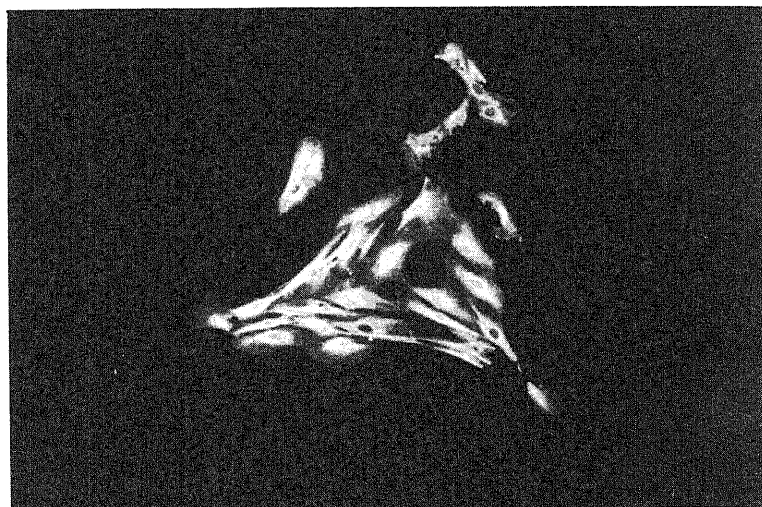


Fig.15. Immunofluorescent staining of the secondary culture cells with antibody to S-100 protein. All cells were positive.

は細胞再生系において細胞数を維持するために増殖と分化を行う細胞として、post-mitotic cell は transit cell から分化し、組織での機能を果たし、いずれは死滅する細胞として定義されている。そして軟寒天内でコロニーを形成するのは stem cell であると考えられている。従来、stem cell は造血組織の細胞や悪性腫瘍細胞で認められてきた概念であったが、最近では正常組織も stem cell を有することが確認されている²⁹⁾。

二重寒天においては、上層に播種された細胞のうち、clonogenic cell は軟寒天内で増殖し、コロニーを形成するが、線維芽細胞は軟寒天内で増殖せずコロニー形成には関与しないことが明らかとなっている¹⁹⁾。従って二重寒天培地を用いれば線維芽細胞を分離したシュワン細胞の集団 (pure population) を得る可能性がある。さらに、この中から単一のコロニーを選んで採取し再び単層培養系に移行させれば、線維芽細胞を全く含まない純粋なシュワン細胞の培養系を得ることができるかもしれないと考えて実験を行った。

培養シュワン細胞の光顕的特徴について Murray ら²⁰⁾は双極性の長く緻密な胞体と円形の核を有し、それらの細胞がその長軸方向に連続して合胞体を形成することを挙げている。その後も諸家により培養シュワン細胞の形態について述べられてきたが、概ね Murray らの報告と同様である。二重寒天培地において形成されたコロニーを再び単層培養系に移行させて増殖しはじめた細胞はほぼ同一の形態を呈しており同一種類の細胞であると考えられた。これらの細胞は小型の楕円形の胞体と円形もしくは楕円形の核を有し、双極性の長い細胞突起を形成し、それらが紐状に連なり合胞体を形成していた。この所見は先に述べた培養シュワン細胞の形態学的特徴を備えており、コロニーより得られた細胞がシュワン細胞であることが強く示唆された。更に重要なことはこの培養系に線維芽細胞と考えられる細胞の混入は全く見られなかったことである。

培養シュワン細胞の電子顕微鏡所見として Dubois-Dalcq ら²⁰⁾はゴルジ装置、粗面小胞体、リボソームの良好な発育と胞体内の中間径フィラメントの存在を挙げ、Odenwald ら²¹⁾はそれに加えてミトコンドリアが豊富に存在することを挙げている。二重寒天培地において形成されたコロニーの電子顕微鏡による観察では、ゴルジ装置、ミトコンドリアが豊富に存在し、特に核周囲に多く見られた。また、粗面小胞体、リボソームも散見された。これらの所見は

Dubois-Dalcq, Odenwald らが記載した培養シュワン細胞の電子顕微鏡所見と一致するものであった。更に特徴的な所見として、細胞接合部におけるデスモゾーム様構造の存在と胞体内に豊富にかつ集簇性に中間径フィラメントが観察されたことが挙げられる。これらは中枢神経での星状膠細胞や末梢神経系でのシュワン細胞の様に神経系の支持細胞として働く細胞に共通して見られる所見である²⁰⁾。特にデスモゾーム様構造は in vivo でのシュワン細胞の観察で見られた所見²⁰⁾であり、これまでの in vitro での観察では見られなかった。これまでのシュワン細胞の培養は単層培養で行われていたために細胞同志の接触が少ないため見られなかったが、コロニーでは細胞同志が密着して存在するためデスモゾーム様構造が見られたものと考えた。以上の結果よりコロニーを形成した細胞はシュワン細胞であると考えられた。

もちろん上記の結論の裏付けとしてコロニーを形成する可能性のある他の細胞即ち、マクロファージ、リンパ球などの造血器系の幼若細胞であることも一応考慮しなければならない。又、線維芽細胞が混入していないことを確認しなければならない。一般に電子顕微鏡観察における特徴的な所見としてマクロファージでは細胞質内のライソゾームの豊富な発育、陥凹のある核、細胞表面の偽足様突起などが挙げられ²⁰⁾、線維芽細胞では細胞質内の粗面小胞体やゴルジ装置の良好な発育が挙げられる³⁰⁾。今回コロニーを形成した細胞にはこれらの所見は認められなかった。従ってコロニーを形成した細胞が造血器系の幼若細胞由来であることや線維芽細胞が混入している可能性は否定された。

しかし、コロニーを形成した細胞においてはシュワン細胞の特徴的な所見の一つである基底膜が欠如していた。その理由としては以下のことが考えられる。即ち、基底膜にはいくつかの機能が存在するが、その一つとして自己と他の結合組織性の medium とを区別する膜としての機能がある³⁰⁾。コロニーの様な単一細胞の集団においては異った細胞成分がないため自己を識別する必要が生じず、このため基底膜の形成がされなかったものと考えたい。

S-100 蛋白は1965年 Moore³⁰⁾により牛脳より抽出された可溶性酸性蛋白である。この蛋白は神経組織に広く分布し、末梢神経系ではシュワン細胞に、中枢神経系では星状膠細胞、突起細胞に存在する。当初、S-100 蛋白は神経特異蛋白と考えられていたが、皮膚の Langerhans 細胞³⁰⁾、軟骨細胞³⁰⁾、リンパ節の interdigitating 細胞にも存在することが証明さ

れ、その神経特異性については否定されている。しかし、本研究において培養を行ったのは末梢神経組織であり、他の組織が混入している可能性はない。S-100 蛋白は末梢神経組織においてはシュワン細胞に特異性を有していることを考えれば、本研究において S-100 蛋白に対して陽性を示した細胞はシュワン細胞であると考えられる。従ってコロニーより採取した secondary culture の細胞はシュワン細胞であると考えられた。

結 論

新生児ラットの坐骨神経を材料としてシュワン細胞の単離培養系を得る目的で、二重寒天培地を用いて線維芽細胞を除去することを試み以下の成績を得た。

1. 新生児ラットの組織片培養より得たシュワン細胞および線維芽細胞よりなる単離細胞浮遊液を二重寒天培地の上層に播種した。培養後 5～6 週で軟寒天内にコロニーの形成が認められた。

2. コロニーを形成した細胞を再び単層培養系に移行させると、紡錘形の胞体および長い双極性の細胞突起を有し紐状に連なるシュワン細胞の形態学的特徴を有した細胞が観察され、線維芽細胞の如き多形性を示す細胞は見られなくなった。

3. 得られたコロニーを電子顕微鏡にて観察するとコロニーを形成している細胞はほぼ同一の形態を呈した。胞体内にゴルジ装置、ミトコンドリアが豊富に存在し、粗面小胞体、リボソームも散見され過去に報告された培養シュワン細胞の電子顕微鏡所見と一致するものであった。更に特徴的な所見として細胞接合部のデスモゾーム様構造と胞体内の豊富でかつ集簇性に存在する中間径フィラメントの存在が挙げられた。しかし、基底膜は見られなかった。

4. S-100 蛋白を用いた免疫蛍光抗体法により secondary culture の細胞はすべて陽性を示した。

5. 以上よりコロニーを形成した細胞はシュワン細胞であると結論した。

6. 二重寒天培地を経てシュワン細胞の単離培養系を得る試みは従来の方法に比して線維芽細胞を全く含まない pure population を得ることが可能な方法であると考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師野村進教授ならびに本学第一病理学教室中西功夫教授に深甚の謝意を表します。また、終始御指導を賜った整形外科

学教室富田勝郎助教授に深謝いたします。また、本研究に御協力頂いた本学第一病理学教室小田恵夫博士、整形外科教室池田和夫先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第 1 回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した。

本研究の一部は昭和 59 年、60 年度文部省科学研究費補助金 63570696 号の援助を受けたことを感謝いたします。

文 献

- 1) Aguayo, A. J., Charron, L. & Bray, G. M.: Potential of Schwann cell from unmyelinated nerve to produce myeline: a quantitative ultrastructural and radiographic study. *J. Neurocytol.*, 5, 565-573 (1976).
- 2) Gamble, H. J. & Breathanach, A. S.: An electronmicroscopic study of human foetal peripheral nerve. *J. Anat.*, 102, 573-584 (1965).
- 3) Ochoa, J. & Vial, J. D.: Behaviour of peripheral nerve structures in chronic neuropathies with special reference to the Schwann cell. *J. Anat.*, 102, 95-111 (1967).
- 4) Webster, H. deF.: The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves. *J. Cell Biol.*, 48, 348-367 (1971).
- 5) Bradley, W. G. & Asbury, A. K.: Duration of synthesis phase in neurilemma cells in mouse sciatic nerve during degeneration. *Expl. Neurol.*, 26, 275-282 (1970).
- 6) Morris, J. H., Hudson, A. R. & Weddell, G.: A study of degeneration and regeneration in devided rat sciatic nerve based on electron microscopy I. The traumatic degeneration of myelin in the proximal stump of the devided nerve. *Z. Zellforsch.*, 12476-102 (1972).
- 7) Murray, M. R. & Stout, A. P.: Characteristic of human Schwann cells in vitro. *Anat. Rec.*, 84, 275-294 (1942).
- 8) Cravioto, H. & Lockwood, R.: The behavior of normal peripheral nerrve in tissue culture. *Z. Zellforsch.*, 90, 186-201 (1968).
- 9) Nelson, P. G.: Nerve and muscle cells in culture. *Physiol. Rev.*, 55, 1-61 (1975).
- 10) Wood, P. M.: Separation of functional Schwann cells and neurons from normal peripheral nerve tissue. *Brain Research*, 115, 361-375 (1976).

- 11) Brockes, J. P., Fields, K. L. & Raff, M. C.: Studies on cultured Schwann cells. I. Establishment of purified population from culture of peripheral nerve. *Brain Reserch*, **165**, 105-118 (1979).
- 12) Skaper, S. D., Manthorpe, M. & Varon, R. A.: Survival, proliferation and morphological specialization of mouse Schwann cells in a serum free fully defined medium. *J. Neurocytol.*, **9**, 693-697 (1980).
- 13) Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, **197**, 461-463 (1977).
- 14) Bouck, N. & DiMagarca, G.: Evaluation of chemical clonogenicity by in vitro neoplastic transplantation. In W. B. Jakoby. & I. H. Pastan (eds.) *Methods in Enzymatology*. Vol. LVIII (cell culture) 296-302, Academic Press, New York, 1979.
- 15) Harrison, R. G.: Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.*, **1**, 116-118 (1907).
- 16) Kreider, B. Q., Messing, A., Doam, H., Kim, S. U., Lisak, R. P. & Pleasure, D. E.: Enrichment of Schwann cell culture from neonatal rat sciatic nerve by differential adhesion. *Brain Reserch*, **207**, 433-444 (1981).
- 17) Fischer, A.: *Gewebenzuchtung, Handbuch der Biologie der Gewebenzellen in vitro*, p.15, Rudolph Muller & Steincke, Munich. 1930.
- 18) Sanders, F. K. & Burford, B. O.: Ascites tumors from BHK-21 cells transformed in vitro by polyoma virus. *Nature*, **201**, 786-789 (1964).
- 19) Pluznik, D. H. & Sachs, L.: The indication of clones of normal mast cells by substrate from conditioned medium. *Exp. Cell Res.*, **43**, 553-563 (1965).
- 20) Bradley, T. R. & Metcalf, D.: The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol.*, **44**, 287-300 (1966).
- 21) Horwitz, A. L. & Dorfman, A.: The growth of cartilage cells in soft agar and liquid suspension. *J. Cell Biol.*, **45**, 434-438 (1970).
- 22) 黒木登志夫, 後藤正義: 寒天を用いたコロニー培養法. 組織培養 (中井準之助, 山根續, 山田正篤, 井上幸重, 堀川正克編), 第1版, 99-108頁, 朝倉書店, 東京, 1976.
- 23) Lajtha, L. G.: Stem Cell Concepts. *Differentiation*, **14**, 23-34 (1979).
- 24) 西塚泰章: 幹細胞, 代謝, **20**, 1653-1662 (1983).
- 25) Murray, M. R. & Stout, A. P.: Schwann cell versus fibroblast as the origine of the specific nerve sheath tumor, *Amer. J. Path.* **16**, 41-60 (1940).
- 26) Dubois-Dalcq, M., Rentier, B., Baron, A., van Evercooren, N. & Bunge, B. W.: Structure and behavior of rat primary and secondary Schwann cells in vitro. *Exp. Cell Res.*, **131**, 283-297 (1981).
- 27) Odenwald, W. F. & Askanas, V.: Ultrastructural and cytochemical characteristics of cultured rat Schwann cells. *Acta Neuropathol.*, **54**, 135-142 (1981).
- 28) 石川春律: ニューログリア, 図説細胞骨格 (石川春律編), 第1版90-95頁, 講談社サイエンティフィック社, 東京, 1985.
- 29) Dolapchieva, S. & Lierse, W.: On some aspect of Schwann-sheath development and the possible role of their desmosome-like structures. *Anat. Embryol.*, **147**, 213-224 (1975).
- 30) 梶川欽一郎: 組織球, 結合組織 (梶川欽一郎編), 第1版, 65-102頁, 金原出版株式会社, 東京, (1984).
- 31) 梶川欽一郎: 線維芽細胞, 結合組織 (梶川欽一郎編), 第1版, 19-63頁, 金原出版株式会社, 東京, (1984).
- 32) 井手千束, 遠山稿三郎, 横田玲子: 細胞の棲み分けと基底膜, *ミクロスコピア*, **1**, 9-14 (1984).
- 33) Moore, B. W.: A soluble protein characteristics of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 739-744 (1965).
- 34) 中島孝: 神経組織特異蛋白 (S-100 蛋白ならびに NSE 蛋白) による腫瘍の免疫組織化学的検索とその診断への応用, 病理と臨床, **1**, 115-124 (1983).
- 35) Stefansson, K., Wollmann, R. L., Moore, B. W. & Arnason, B. G. W.: S-100 protein in human chondrocytes. *Nature*, **295**, 63-64 (1982).
- 36) Takahashi, K., Yamaguchi, H., Ishizeki, J., Nakazima, T. & Nakazato, Y.: Immunohistochemical immunoelectron microscopic localization of S-100 protein in the interdigitating reticul-

um cells of the human lymph node. Virchows
Arch (Cell Pathol.) 37, 125-135 (1981).

Experimental Studies on the Purification of Schwann Cells by Using Double Soft Agar Culture Hiroshi Hamaoka, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., 97, 869—882 (1988)

Key words: Schwann cell, cultivation, purification, double soft agar

Abstract

No adequate method for purifying Schwann cells has yet been established in the culture system, because of a frequent contamination with fibroblasts. The purpose of this experiment was to isolate pure Schwann cells. Double agar suspension culture was utilized to eliminate fibroblasts. Sciatic nerves obtained from rats were cultured as an explant culture. Cells wandering from the explant were harvested as a single cell suspension. Then they were seeded on double soft agar according to Human Tumor Clonogenic Assay. The cells picked up from the colonies formed in the agar were seeded on monolayer culture as a secondary culture. The cells grown in the secondary culture were small, bi-polar in shape and were arranged in a ribbon-like syncytium. Electron microscopy revealed that the colony-forming cells were uniform in shape, rich with Golgi apparatus and mitochondria particularly in the perinuclear region of the cytoplasm. Scattered granular endoplasmic reticulum and ribosomes were also observed. These findings are consistent with the previously reported electronmicroscopic characteristics of cultured Schwann cells. Other characteristic findings were desmosome-like structures at the intercellular junction and rich, packed intermediate filaments in the cytoplasm. However, no basement membrane was found. All secondary cultured cells were positively stained with immunofluorescent antibody against S-100 protein. From these results, it is concluded that the colony-forming cells were Schwann cells. This method is useful to obtain a purified population of Schwann cells.