

単一細胞に分離した人間胎児の組織再形成 (予報)

中西宥・加藤旌夫・岩崎民子・沖垣達¹⁾

千葉市放射線医学総合研究所遺伝研究部・生物研究部

昭和 38 年 3 月 20日受領

最近高等脊椎動物の胚組織や器官原基を単一細胞に分離して旋回培養をすると、同一種類の細胞が再結合してもとの器官組織構造を形成することが明らかになった (Moscona, 1961a, b, c, 1962, Steinberg, 1962a, b, c, d; 黒田, 1962; Nakanishi *et al.*, 1963)。しかし、これらの研究はいずれもニワトリあるいはハツカネズミの胚を用いており、人類の胎児を材料としての研究はない。著者らは、人工妊娠中絶による 2—5 カ月の人間胎児の組織を単一細胞に分離して、旋回培養を行い、組織再形成能についての細胞学的研究を行いつつある。ここでは単一細胞の分離方法、旋回培養法、および軟骨組織の形成について予報的に報告する。

第1表 培養液の組成

Hanks 氏緩衝塩類溶液	1 l
ラクトアルブミン水解物	5 g
酵母抽出物	1 g
グルコース	4.5g
重炭酸ソーダ	0.8g
ペニシリン	100,000 単位
ストレプトマイシン	100mg
フェノールレッド	0.02g
牛血清	200ml

方法と結果

2カ月の胎児を Rinaldini 氏液で数回洗い体の表面に附着している血液を除いてから、少量の 0.2% トリプシン溶液 (Rinaldini 氏液に溶解) とともに時計皿に入れて、ハサミで細切する。細切片に約10倍量のトリプシン溶液を加えて 37°C に加温し、マグネティックスターラーで攪拌する。30分後これに等量の培養液を加え、内径 1.5 mm の注射針をつけた 20 ml の注射器で約20回くりかえし強く吸っては押し出し、組織を単一細胞に分離する。遠心後 (3000 rpm, 15分), 3 回培養液で洗いトリプシン溶液を除

く。最後に培養液 1 ml あたり 10^7 個の細胞を含む細胞浮游液を作り、10 ml のエーレンマイヤーフラスコに 1.5 ml ずつ分注した。培養液は Horikawa (1961) および Nakanishi *et al.* (1963) の処方による (第1表)。

旋回培養器は、組織固定用振盪器 (サクラ精機製 VS—2 型) を利用したもので、37°C の恒温器中で水平載物台が毎分60回転、 $\frac{3}{4}$ インチ偏心の水平旋回運動をする。この上に細胞浮游液を分注したフラスコをのせて旋回すると、細胞は液の求心運動により、フラスコの底の中心部に集まる。約2時間後には、無数の小さな細胞の集合体 (clusters) を作る。これらの集合体は、時間の経過とともにその大きさを増し、24時間後には約 50 個の直径 0.1—1.0 mm (平均 0.3 mm) の細胞の凝集塊 (cell-aggregates) となる。約 5×10^6 個の細胞は単一細胞に分離したまま培養液中に浮游している。

凝集塊をブアン氏液で固定して厚さ 7 μ のパラフ



第1図 人間胎児からの分離細胞が再結合して形成した軟骨組織 (×500)。

1) 現住所: 東京都三鷹市国際基督教大学生物学教室。

イン切片を作り、メイヤー氏ヘマラム染色およびマロリー氏の三重染色を行いその内部構造を観察した。凝集塊は同一種類の細胞が選択的に集合して組織化した数種の細胞群からなる。特に顕著なのは、軟骨細胞が軟骨基質の中に埋まっている硝子様軟骨組織である(第1図)。軟骨細胞は大型の球型の核をもち、細胞質中には大きな空胞がある。軟骨基質は用いた染色法では無構造である。この細胞群は数層の扁平な細胞によって囲まれ、まわりの組織から明瞭に区別される。

考 察

Moscona (1961a, 1962), Steinberg (1962a, b, c, d) はニワトリあるいはハツカネズミの二種の組織または器官原基を, Nakanishi *et al.* (1963) はニワトリの頭部を除いた全身を単一細胞に分離後混合して、旋回培養を行い、それぞれ同一の種類の細胞が選択的に集合して (selective sorting out of cells), もとの器官組織構造を形成することを報告している。本実験においても、人間胎児から分離した細胞が選択的に集合して組織を再形成することが明らかになった。しかし、組織再形成の機構については不明の点が多く、いまだ定説はない。著者らは、人間その他の動物の細胞を用いて、細胞の構成要素とその機能、例えば核 (DNA合成) とか蛋白合成に選択的に働く薬物で処理して、細胞の組織再形成の機構を細胞学的に解明するべく実験を進めつつある。

要 約

2カ月の人間胎児を単一細胞に分離して、旋回培養を行い組織の再形成を観察した。トリプシン溶液処理により培養液 1ml あたり 10^7 個の細胞を含む細胞浮遊液を作り、10ml のエーレンマイヤーフラスコに 1.5ml ずつ分注した。これを 37°C 、毎分 60 回転、 $\frac{3}{4}$ インチ偏心で水平に旋回すると、24 時間後に約 50 個の直径 0.1—1.0mm の細胞の凝集塊が形成された。パラフィン切片を作り、その内部構造を観察した。凝集塊は数種の組織化した細胞群からなるが、特に顕著なのは硝子様軟骨組織である。

謝 辞

有益な御助言を頂いた仲尾善雄部長に深く感謝の意を表す。原稿の御校閲を賜った北海道大学牧野佐二郎教授に対し深甚の謝意を表す。

文 献

- HORIKAWA, M. (1961) Biochemical and genetical studies on variants of the mouse strain L cells in cell culture. *Jap. J. Genet.* 36: 319-336.
- 黒田行昭 (1962) 単層培養された軟骨細胞の組織再形成能および分化能の変化. *遺伝学雑誌* 37: 396.
- MOSCONA, A. (1961a) Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. *Exptl. Cell Res.* 22: 455-475.
- (1961b) Effect of temperature on adhesion to glass and histogenetic cohesion of dissociated cells. *Nature* 190: 408-409.
- (1961c) How cells associate. *Scient. Amer.* 205: 142-162.
- (1962) Analysis of cell recombinations in experimental synthesis of tissues *in vitro*. *J. Cellular Comp. Physiol., Suppl.* 1: 65-80.
- NAKANISHI, Y. H., H. KATO, T. IWASAKI AND T. OKIGAKI (1963) Effects of gamma-irradiation on the histogenetic aggregation of dissociated cells from chick embryos (preliminary report). *Proc. Japan Acad.* 39: 236-239.
- STEINBERG, M. S. (1962a) The role of temperature in the control of aggregation of dissociated embryonic cells. *Exptl. Cell Res.* 28: 1-10.
- (1962b) On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells, I. Population kinetics, differential adhesiveness, and the absence of directed migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 48: 1577-1582.
- (1962c) Mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells, II. Time course of events. *Science* 137: 762-763.
- (1962d) On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells, III. Free energy relations and the reorganization of fused heteronomic tissue fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 48: 1769-1782.

ABSTRACT. NAKANISHI, Y. H., H. KATO, T. IWASAKI AND T. OKIGAKI. (Divisions of Genetics, and Biology, National Institute of Radiological Sciences, Chiba) Histogenetic Aggregation of Dissociated Cells from a Human Foetus (Preliminary Report). *Zool. Mag.* 72: 115—117. (1963).

This paper describes briefly the methods and

results of a rotation-mediated cultivation of dissociated human embryonic cells. The whole body of a two-month male human foetus was cut into shreds with scissors. The shreds were suspended in a 0.2% trypsin solution, approximately 10 times in volume, and stirred at 37°C for 30 minutes. Then an equal amount of culture medium was added to the tissue suspension thus obtained. The tissue was dispersed into single cells by flushing them briskly, use being made of a 20ml syringe fitted with a needle (1.5mm inner diameter). After having been centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes, the sediments were washed with three changes of the culture medium, and finally re-suspended in the medium, with adjustment to 10^7 cells per ml. The culture medium used for cultivation was prepared after Horikawa's formula (1961). One and a half ml of the cell suspension thus prepared were transferred to 10 ml Erlenmeyer flasks in each. The flasks were horizontally rotated on a platform of a gyratory shaker with a $\frac{3}{4}$ inch eccentric rotary motion at a constant speed of 60 rpm at 37°C. After 1 to 2 hours of cultivation, numerous small clusters

of cells appeared in flask cultures. With the lapse of time those clusters increased in size by accretion of free cells. By 24 hours, about 50 rounded or oblong aggregates of cells with bumpy surface, 0.1 to 1.0 mm in diameter being 0.3 mm on the average, were present in each flask. In addition, about 5×10^6 cells per ml always remained discreted being free in the medium. It was seen in paraffin sections through the cell-aggregates that there were certain histotypic groups of cells. Those groups were formed by a selective sorting out of cells according to their specific type. Among those groups of cells, a group of cartilaginous cells forming hyaline cartilage was most remarkable and clearly identifiable in nature. Cells with large-sized vacuoles were dispersed in the interstitial substance. This tissue was sharply demarcated from the surrounding tissues by several layers of flattened cells. It is thus evident that the results of the present experiments with dissociated cells from a human foetus supplement similar features reported by Moscona (1961a, 1962) and by Steinberg (1962 b, c, d) in chick embryos. (Received March 20, 1963).