

日本財団補助金による  
1997年度日中医学協力事業助成報告書

－在留中国人研究者研究助成－

1998年3月10日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 孫英傑

研究機関 信州大学大学院医学研究科 研究指導者 森泉哲次 職名 教授  
所在地 〒390-0802 長野県松本市旭3-1-1 電話 0263-(35)-4600 内線 5167

II. 過去の研究歴

1991年4月1日から1992年3月31日まで1年間、笛川医学奨学金制度研修生として信州大学医学部第2解剖学講座において研修した。

III. 過去の研究実績

Sun Y-J, Komatsu S, Naito A and Watanabe SY: Fine structure of perikaryal myelin sheaths on statoacoustic ganglion cells in 3-day-old chicks. *Tohoku J Exp Med* 180: 307~317, 1996

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等においての口頭発表(学会名・内容)

孫英傑、内藤輝、渡辺真珠：培養鶏胚内耳神経節細胞の核周囲部髓鞘内にみられるミエリン層板の不連続性、不規則性について。第102回日本解剖学会総会、愛知医科大学、1997.3.28.（解剖学雑誌 72: 338, 1997）

(2) 学会誌等に発表した論文 無・有 (○) (雑誌名・論文名)

Sun Y-J, Naito A and Watanabe SY: perikaryal myelination on cultured chick embryo statoacoustic ganglion cells: An electron microscopic study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* (in press)

V. 今後の研究計画および希望

今後は髓鞘形成に必須なミエリン蛋白質やミエリン接着因子に焦点をあて、髓鞘化の初期メカニズムを追求していきたい。また、分離培養やビデオ撮影などの方法を用いて、髓鞘化におけるシュワン細胞の動態を調べていきたい。

V. 研究報告（日本語、又は英語で書いてください。4,000字以上で記載してください。別紙可）

別紙



VII. 指導教官の意見

孫 英傑君は日中医学協会からの研究助成を受け、「培養鶏胚内耳神経節における核周囲部髓鞘化のメカニズムについて」のテーマで研究し、その結果を研究報告（別紙）としてまとめることができました。さらに耳鼻咽喉科領域で一流の国際誌であります「Acta Otolaryngologica」に投稿し、受理されました。ひとえに本人の真面目な研究態度によるものと思われます。研究計画に記載されてあります課題のうち、髓鞘化におけるシュワン細胞の動態につきましては、さらなる今後の研究に委ねざるを得ませんでしたが、髓鞘形成に関するシュワン細胞数につきましては明確な結論を得ることができました（研究報告参考）。また本研究で、髓鞘形成・髓鞘変性に影響を及ぼす様々な環境因子・薬剤の効果を検定する上でのすぐれた *in vitro* スクリーニング系を提供できたことは髓鞘化のメカニズムの解明を進める上で有効であると思われます。最後に、日中医学協会からの研究助成に厚く御礼申し上げます。

平成10年3月10日

信州大学医学部

解剖学第2講座

教授 森 泉 次（蔡）

# 研究報告

## 培養鶏胚内耳神経節細胞における核周囲部髓鞘化のメカニズムについて

### 緒 言

脊椎動物の第8脳神経節細胞は細胞体（核周囲部）にも髓鞘を持つ。この髓鞘は双極性の神経節細胞の核周囲部全体を包み、一つの髓節となるよう形作っている。また、この核周囲部髓鞘は、compact (major dense linea がみられる) な層板だけで構成される軸索部髓鞘とは異なり、compact と未だシュワン細胞細胞質の残る loose な層板により構成されている。

*in vitro* における核周囲部髓鞘形成に関する報告は、これまで Shimizu (1965) による培養鶏胚内耳神経節細胞の観察以外なされていない。Shimizu は、孵卵 12-15 日目のまだ髓鞘形成の始まっていないニワトリ胚の第8脳神経節を長期培養したところ、培養4週以降で核周囲部髓鞘がみられるようになったこと、この核周囲部髓鞘は *in vivo* 生後3日目のものと同じ構造を示すことなどを光顕的な観察から報告している。しかし、光顕では loose な髓鞘層板の観察は難しく、後の *in vivo* における光顕と電顕を用いた観察では、光顕で無髓（1層のシュワン細胞細胞質に被われる）と判定された部位の多くは2層以上の loose な層板により包まれていることが明らかとなった。そこで本研究では、培養下の核周囲部髓鞘形成について透過電顕を用いて観察した。

### 材 料 と 方 法

材料は孵卵 13 日目鶏胚を使用した。鶏胚の内耳神経節を実体顕微鏡下で取り出し、コラーゲンを塗布したカバーグラスに乗せ、CO<sub>2</sub> 3%、湿度 100% (36°C) で培養した。培養液は Eagle's MEM 80%、鶏胚抽出液 10%、馬血清 10% の組成のものを用い、週2回交換した。培養 1, 2, 3, 4, 5, 6 週後に、神経節を 2.5% glutaraldehyde と 1% OsO<sub>4</sub> で各々 30 分固定し、脱水、包埋後、厚さ 0.07-0.1 μm の切片を作製し、透過電顕で観察した。

### 結 果

その結果、培養下では無髓、核周囲部の一部が髓鞘に包まれ残りは無髓の部分的

有髓、全周が髓鞘に包まれた有髓の3種類の神経節細胞が認められた。そこで、培養週数による3種類の神経節細胞（電顕像で核の断面がみられた細胞のみ）の比率の変化を調べた。また培養週数毎に核周囲部髓鞘と軸索部髓鞘の層板の数を数えた。以下は、培養週数ごとに所見を述べる。

#### 1週

155個の神経節細胞を観察したが、全てが無髓であった。軸索も有髓のものはみられなかった。

#### 2週

2層以上のシュワン細胞細胞質により核周囲部の一部が被われた神経節細胞がみられるようになった（本研究ではこのような細胞も部分的有髓に含めた）。神経節細胞170個を観察したところ、無髓は155個（91%）、部分的有髓は15個（9%）であった。

有髓軸索が初めて観察された。髓鞘の層板の数は6から11（ $7.9 \pm 1.9$ 、n=13）層であった。

#### 3週

有髓神経節細胞および核周囲部髓鞘内にcompactな層板が初めてみられるようになった。しかし、compactな層板により全周を被われた神経節細胞は認められなかった。神経節細胞204個を観察したところ、無髓は162個（80%）、部分的有髓は27個（13%）、有髓は15個（7%）であった。また、有髓神経節細胞の核周囲部髓鞘の層板の数は2から9（ $5.1 \pm 1.8$ 、n=14）層であった。

軸索髓鞘の層板の数は9から14（ $11.9 \pm 1.7$ 、n=19）層であった。

#### 4週

全周をcompactな層板に包まれた有髓神経節細胞が初めてみられるようになった。このような有髓神経節細胞の核周囲部髓鞘は、軸索小丘の部位で、末梢神経軸索のparanodeでみられるような髓鞘ポケットを形成して終わっていた。神経節細胞178個を観察したところ、無髓は120個（68%）、部分的有髓は36個（20%）、有髓は22個（12%）であった。有髓神経節細胞の核周囲部髓鞘の層板の数は2から12（ $7.4 \pm 3.2$ 、n=22）層であった。

軸索髓鞘の層板の数は11から26（ $16.6 \pm 3.2$ 、n=38）層であった。

## 5週

144個の神経節細胞を観察したところ、88個（61%）が無髓、40個（28%）が部分的有髓、16個（11%）が有髓であった。有髓神経節細胞の核周囲部髓鞘の層板の数は2から15（ $8.2 \pm 3.9$ 、n=10）層であった。

軸索髓鞘の層板の数は13から26（ $18.4 \pm 3.6$ 、n=16）層であった。

## 6週

130個の神経節細胞を観察したところ、80個（62%）が無髓、34個（26%）が部分的有髓、16個（12%）が有髓となった。有髓神経節細胞の核周囲部髓鞘の層板の数は2から15（ $8.6 \pm 3.7$ 、n=12）層であった。

軸索髓鞘の層板の数は12から26（ $19.6 \pm 4.9$ 、n=12）層となった。

## 考 察

*in vivo* ニワトリ内耳神経節細胞では13日胚（stage39）で軸索に16-17日胚（stage42-43）で核周囲部にcompactな層板がみられるようになり、2021日胚で軸索は2から12層のcompact、核周囲部は2から6層のcompactとlooseな層板（ただし神経節細胞には未だ無髓のものが残っている）、生後3日目では軸索は11から29層のcompact、核周囲部は4から17層のcompactとlooseな層板に包まれるようになる（無髓のものはなくなる）。また、部分的有髓神経節細胞の報告はないことから、髓鞘は核周囲部全周にわたりほぼ一様に形成されることが推定される。

本研究では、培養下の無髓、部分的有髓、有髓の3種類の神経節細胞が示された。無髓および有髓については、*in vivo*でも髓鞘形成開始前と後で認められる。しかし、部分的有髓については*in vivo*では報告されず、培養下独特のものと考えられる。一方、本研究から、培養4週以降で11-12%の細胞が有髓となること、これらの細胞の核周囲部髓鞘はlooseとcompactな層板から構成され、これらの層板の終末は軸索小丘で髓鞘ポケットを形成していることが示された。これらの所見は、*in vivo*のものと一致しており、培養下でも10%以上の細胞に*in vivo*と同じ構造の核周囲部髓鞘が形成されることが明らかとなった。

本研究では、軸索の髓鞘と核周囲部髓鞘のcompactな層板はそれぞれ培養2週以降と3週以降で認められるようになった。また、軸索の髓鞘はcompact、核周囲部髓鞘はlooseとcompactな層板が増加することにより形成された。これらの所見は*in vivo*のものと一致しており、軸索と核周囲部髓鞘は培養下でも*in vivo*と同じ順序・同じ過程で形成されることが分かった。一方、髓鞘層板の数は、軸索では、培

養 4 週以降で 12 から 26 層、核周囲部では培養 5 週以降で 2 から 15 層となり、*in vivo* 生後 3 日目（軸索：11 から 29 層、髓鞘形成開始から 11 日目、核周囲部：4 から 16 層、髓鞘形成開始から 7-8 日目）に相当する数となった。このことは培養下の髓鞘形成は *in vivo* に比べ非常にゆっくりとしたものであることを示している。

## ま と め

「培養鶏胚内耳神経節細胞における核周囲部髓鞘化のメカニズムについて」のテーマで研究し、以下の結論を得た。

1. 培養下で無髓、部分的有髓、有髓の 3 種類の神経節細胞が示された。培養 4 週以降で 11-12% の細胞が有髓となり、これらの細胞の核周囲部髓鞘は軸索小丘で髓鞘ポケットを形成していることが示された。培養下でも 10% 以上の細胞に *in vivo* と同じ構造の核周囲部髓鞘が形成されることが分かった。
2. 軸索部髓鞘の方が核周囲部髓鞘に比べ髓鞘形成が早期に始まった。また、軸索部髓鞘は compact、核周囲部髓鞘は compact と loose な層板により形成されていた。一方、層板の数は各々軸索部髓鞘では培養 4 週で、核周囲部髓鞘は 5 週で *in vivo* 生後 3 日目に相当する数となった。
3. 培養下における内耳神経節細胞の核周囲部髓鞘形成を電顕で詳細に観察し、  
(a) 1 個のシュワン細胞直下に loose と compact の層板からなる明瞭な髓鞘が形成される、(b) しかし 1 個のシュワン細胞だけで核周囲部の全周に髓鞘が形成されることはない、(c) 逆に核周囲部の全周に髓鞘が形成される場合、1 個の神経節細胞のまわりに必ず複数のシュワン細胞が認められるなどの実験結果が得られた。1 個のシュワン細胞でも髓鞘形成はおこるが、核周囲部の全周にわたり髓鞘形成がおこるためには、複数のシュワン細胞の関与が不可欠であると結論された。

以上の研究内容は「Acta Otolaryngologica」に受理され、現在印刷中である。