

培養神経細胞の生存と分化に対する 高濃度カリウムの影響

渡 辺 眞 珠

信州大学医学部第2解剖学教室
(主任: 志水義房教授)

The Effects of Elevated Potassium on the Survival and Differentiation of Neurons in Culture

Shinju WATANABE

*Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Yoshifusa SHIMIZU)*

The effects of elevated potassium (K) medium on the survival and differentiation of neurons in dorsal root ganglia (DRG) and sympathetic ganglia (SG) from chick embryos were studied in explant and dissociated cell cultures.

Elevated (40mM) K improved survival of both DRG and SG neurons. DRG neurons in the high K medium showed cytoplasmic differentiation up to Murray's stage 3, but no further development or myelin formation could be observed in long-term culture.

In SG neurons, the nerve fibers tended to form thick bundles and their catecholamine (CA) fluorescence increased with the number of days of culture in the high K medium. By contrast, CA fluorescence was only faintly observed, except in a few intensely fluorescent cells, in the normal K medium. It was, however, intensified when the medium was changed from normal to high K, and was diminished by changing the medium from high K to normal. From these results, it seems likely that SG neurons continue to differentiate adrenergically in the high K medium, while they become cholinergic in the normal K medium. *Shinshu Med. J.*, 32: 554-566, 1984

(Received for publication August 11, 1984)

Key words: sympathetic ganglion, dorsal root ganglion, tissue culture, potassium, differentiation

交感神経節, 脊髄神経節, 組織培養, カリウム, 分化

I 緒 言

培養液中のカリウム(K)濃度を上昇させると神経細胞の生存率が高くなることから、分離培養されたニワトリ胚、胎児と新生マウス、ならびにヒト胎児の脊髄神経節細胞、新生ラット小脳、ニワトリ胚毛様体神経節細胞、モノアラガイ巨大神経節細胞について報告され

ている¹⁾⁻⁹⁾。しかし、交感神経節細胞についてはこれまでのところ、Phillipson と Sandler¹⁰⁾が組織片培養による結果を報告しているだけで、分離培養を用いた研究はほとんど見られない¹¹⁾。

また培養神経細胞に対する高濃度K培養液のその他の影響については、電気生理学的な変化⁵⁾¹²⁾や、生化学的に酵素活性・蛋白合成等について検索した報告は

あるが⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾、長期間培養して形態的な変化を追跡した研究はまだ見られない。

そこで今回はニワトリ胚脊髄神経節細胞および交感神経節細胞を用い、培養神経細胞の生存と分化に対する高濃度K培養液の影響を形態学的に検索した。特に交感神経節細胞については、培養条件によってアドレナリン作動性にもコリン作動性にもなることが報告されており¹³⁾⁻¹⁸⁾、catecholamine (CA) 合成に対する高濃度K培養液の影響について組織化学的な検討を加えた。

II 材料と方法

A 材料

材料として、ニワトリ胚の脊髄神経節と交感神経節を用いた。脊髄神経節は孵卵10日胚より、交感神経節は孵卵12日ないし13日胚より、それぞれ実体顕微鏡下で摘出した。

B 培養方法

組織片培養と分離培養を併用し、シャーレ内で、コラーゲン塗布カバースリップ上に培養した。分離培養の場合には、0.25%トリプシンで12°C、10分間処理して細胞を分離した¹⁹⁾。細胞濃度は、脊髄神経節細胞では 3.0×10^5 /ml、交感神経節細胞では 2.0×10^5 /mlとした。

用いた培養液は、Eagle MEM (Hanks' base) 70%、馬血清20%、ニワトリ胚抽出液10%の組成で、glucose は500mg/100mlに増量し、penicillinを140u/mlの割合に加えた。K濃度は、40mMでニワトリ胚脊髄神経節細胞の生存率が一番高くなるという報告¹⁾に従って、高濃度K培養液としてはKClを加えて40mMとしたものを用いた。なお対照培養液のK濃度は、5.3mMである。培養液は週2回交換したが、交感神経節の場合は、一部のシャーレで培養1週間後に対照培養液から高濃度K培養液に、あるいは高濃度Kから対照に変えて培養した。

培養シャーレは湿度100%で、3%のCO₂を含む空気下において36°Cに保温した。

C 形態学的観察法

倒立位相差顕微鏡(Nikon, MD型, DLLおよびDM)下で経時的に観察するとともに、神経細胞数を算定して培養後の生存率を算出した。また脊髄神経節細胞については、核周囲部の直径と厚さ、ならびに核の位置を計測した。

生存神経細胞数の算定は、対照と高濃度K培養それ

ぞれについて、脊髄神経節細胞では22シャーレ(4または5シャーレ×5回)ずつ、交感神経節細胞では16シャーレ(3または4シャーレ×5回)ずつを用いて行った。倍率200倍の位相差顕微鏡下で、生存神経細胞と同定される細胞を各シャーレ10視野数えて、その合計を各シャーレの神経細胞数とした。培養開始時、1, 2, 4, 8日に同じシャーレについて数え、各シャーレの培養開始時の神経細胞数を100%として生存率を算出した。

脊髄神経節細胞の核周囲部の計測は、分離培養3, 5, 10, 20, 30日に、対照と高濃度K培養それぞれについて、各150から180個の神経細胞に対して行った。倍率1000倍の位相差顕微鏡下で、micrometerを用いて核周囲部の長径と短径を測り、その平均を直径とした。また核周囲部の上面と底面それぞれにピントを合わせ、微動焦準ハンドルの目盛の差から厚さを算出した。核の位置はHanda²⁰⁾の方法により核が核周囲部の辺縁細胞膜に接している時を10、核周囲部の中心にある時を0とし、その間を10等分して偏位の度合(D)を調べた。

培養後は、10%ホルマリンで24時間、さらに70%アルコールで3時間、80%アルコールで3週間以上固定した。固定した組織は、Nissl染色、Bodian染色を行って観察した。交感神経節細胞に対しては、CAの蛍光組織化学的検出としてFGS法²¹⁾を用い、落射蛍光顕微鏡(Nikon, EF)にて観察した。励起フィルターとしてV(IF 395-425)、吸収フィルターとして470Kを使用した。

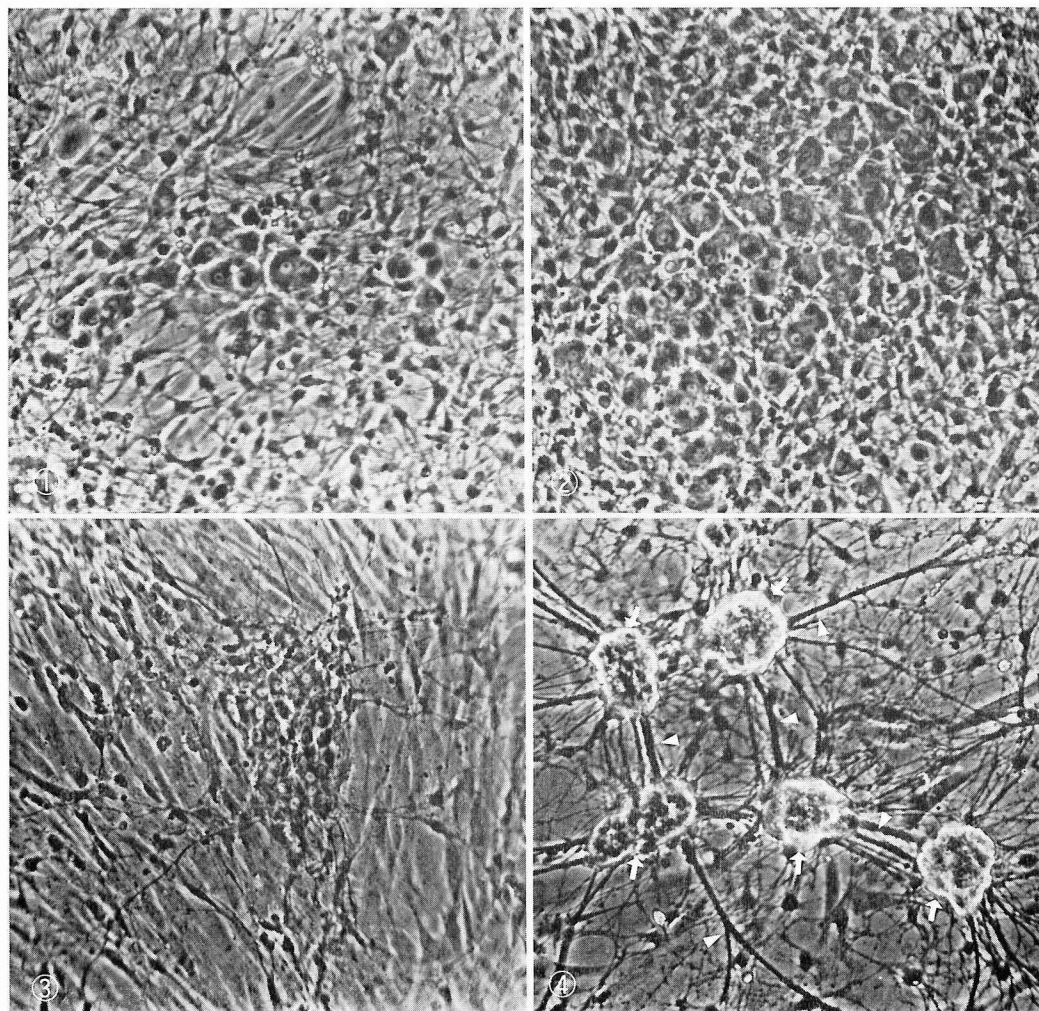
III 結果

A 神経細胞の生存率

高濃度K培養を行うと脊髄神経節細胞、交感神経節細胞ともに、対照培養の場合に比べて生存する神経細胞数が多かった(Figs. 1-4)。細胞数を算定した結果(Figs. 5, 6)では、培養開始時における倍率200倍10視野の神経細胞数の合計は、各シャーレあたり200個から500個であった。対照培養では培養日数に伴って生存神経細胞数は次第に減少したが、高濃度K培養ではわずかな減少しか示さなかった。培養4日以降になると、高濃度Kで培養した場合の神経細胞の生存率は、対照培養に比して有意に高い値を示した(危険率1%)。培養8日における生存率は、脊髄神経節細胞の対照培養では、培養開始時の $49.3 \pm 13.7\%$ であるのに対して、高濃度K培養では $87.1 \pm 16.2\%$ を示した。交感神経節

Control

High K



Figs. 1-4 Phase-contrast photomicrographs of dissociated neurons 5 days in culture. Living neurons are more numerous in the high K medium than in the control medium. Fibroblasts in background are sparse in the high K medium as compared with the control medium. ($\times 150$)

Fig. 1 Dorsal root ganglion (DRG) cells maintained in the control medium.

Fig. 2 DRG cells maintained in the high K medium.

Fig. 3 Sympathetic ganglion (SG) cells maintained in the control medium.

Fig. 4 SG cells maintained in the high K medium. Note the neurons showing compact aggregation (\Rightarrow) and forming thick bundles of nerve fibers (\Rightarrow).

Figs. 7-10 Phase-contrast photomicrographs of DRGs in explant culture.

Figs. 7,8 2 days in culture. Nerve fibers radiate in bundles from the explant of the ganglion (G) preceding outgrowth of fibroblasts. Fig.7: Maintained in the control medium. Fig.8: Maintained in the high K medium. ($\times 75$)

Fig. 9 23 days in the control medium. Myelinated fibers (\Rightarrow) are clearly seen. ($\times 600$)

Fig. 10 30 days in the high K medium. Note the axon thickening (\Rightarrow). No myelinated fibers can be observed. Most of the neurons are in immature form. ($\times 600$)

培養神経細胞に対するKの影響

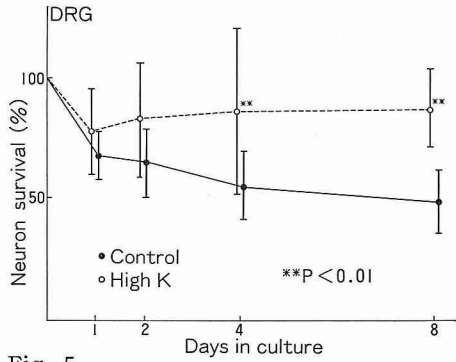


Fig. 5

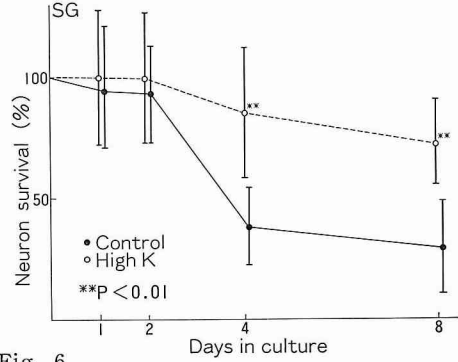


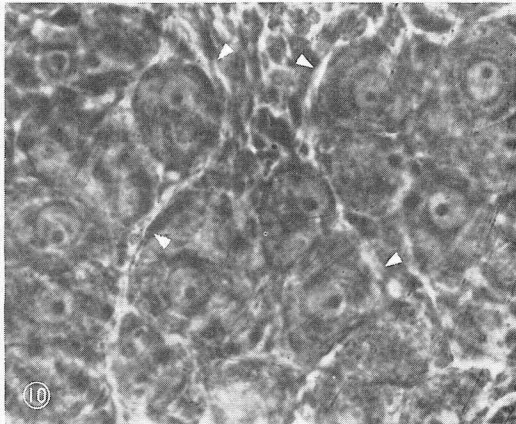
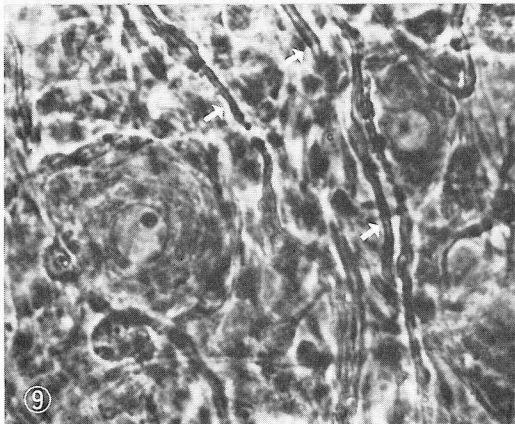
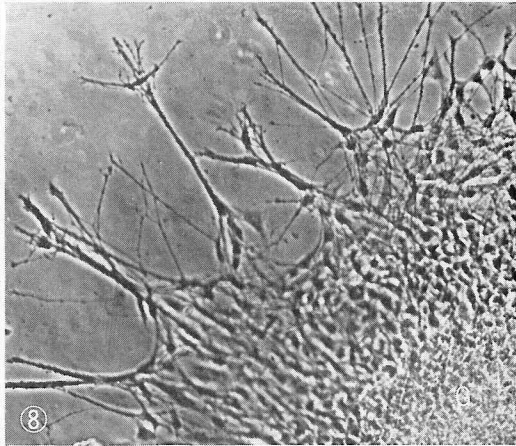
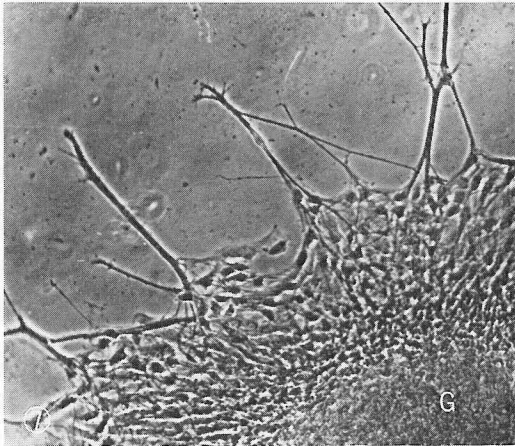
Fig. 6

Figs. 5,6 The effect of potassium on the survival of dissociated neurons in culture. Neuron survival is expressed as the percentage of the initial neuron count. Each point represents the mean percentage \pm SD of neuron counts from 22 (DRG) or 16 (SG) dishes. The high K media (○) produce significantly higher survival as compared with control media (●).

Fig. 5 : DRG cells. Fig. 6 : SG cells.

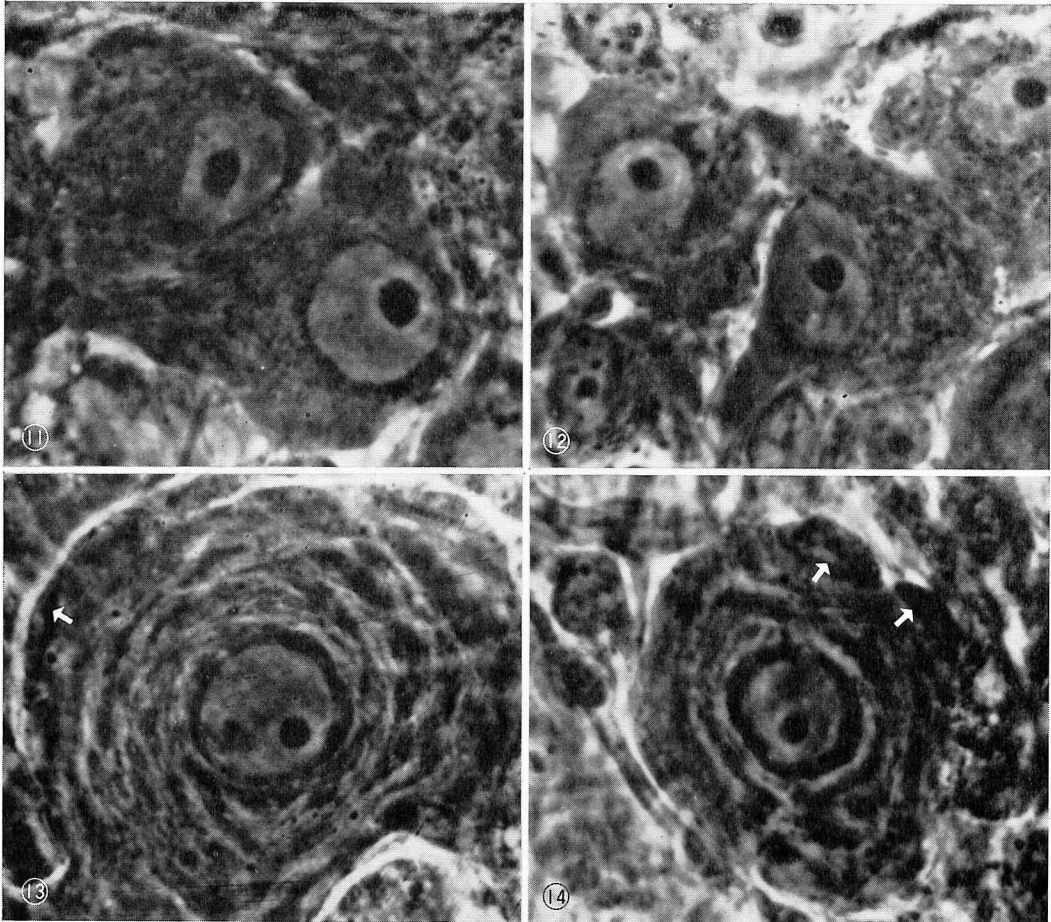
Control

High K



Control

High K



Figs. 11-14 Phase-contrast photomicrographs of the DRG cells. ($\times 1500$)

Figs. 11,12 3 days in culture. The perikarya of the nerve cells are small in size and their cytoplasm is rather homogeneous. The nuclei are eccentric in position. Fig.11 : Maintained in the control medium. Fig.12 : Maintained in the high K medium.

Fig. 13 30 days in the control medium. The neuron has differentiated into mature form. Light spiral channels are clearly seen in the cytoplasm. The nucleus is located centrally. The satellite cells (\Rightarrow) are embedded in the perikaryon.

Fig. 14 30 days in the high K medium. The nucleus is located centrally, but the size of the perikaryon is smaller than that in the control medium. The satellite cells (\Rightarrow) project out from the perikaryon.

細胞でも、対照の生存率は $30.5 \pm 19.9\%$ であったが、高濃度Kでは $73.9 \pm 18.5\%$ の高い生存率を示した。

B 脊髄神経節細胞の分化

1 神経線維

分離培養の場合、対照および高濃度K培養ともに神

経線維は、線維芽細胞を背景として、その上に神経細胞間を結ぶ線維網を形成した (Figs. 1,2)。組織片培養では、対照および高濃度K培養ともに、神経線維は培養3日頃まで、線維束を形成しながら線維芽細胞の遊出に先行して組織片より放射状に伸び出した (Figs.

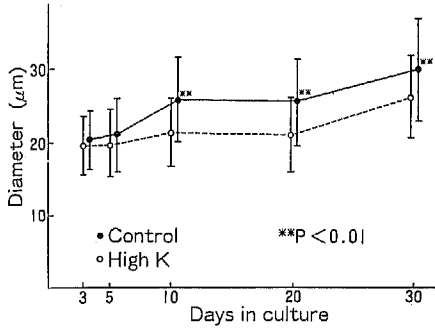


Fig. 15 The effect of potassium on developmental changes in the diameter of the DRG neurons. The diameter increases with days in culture, but more slowly in the high K (○) than in the control (●) media. The difference is significant after 10 days in culture. Each point gives the mean diameter \pm SD measured from 150 to 180 neurons.

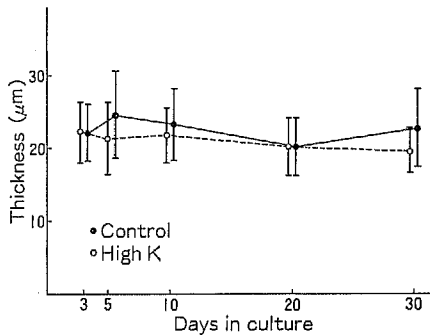


Fig. 16 The thickness of DRG neurons during development. The thickness of perikaryon scarcely changed throughout the culture. The high K media (○) produce no significant difference in the thickness as compared with the control media (●).

7,8). その後は線維芽細胞の広がりによってほぼ同じ範囲まで伸びていった。高濃度K培養では、対照に比して線維芽細胞の遊出が少なく、培養3日以後も線維芽細胞の広がり大きく先行して伸びる神経線維束を認めた例も一部にはあったが、大部分の場合、神経線維の伸び、密度において対照との間に明らかな差を認めなかった。

対照および高濃度K培養ともに、神経線維は培養日数に伴って太さを増し、対照培養では培養2週後頃から髄鞘形成が認められてきた(Fig. 9)。しかし高濃度

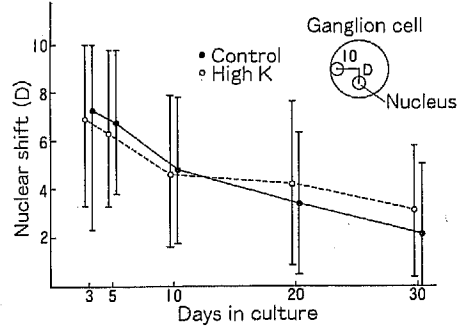


Fig. 17 The nuclear shift of DRG neurons during development. D indicates the distance between the center of the perikaryon and nucleus. A linear shift of the nucleus can be seen from eccentric to central position of the perikaryon with neuronal maturation. No significant difference is observed between the nuclear shift in the control (●) and in the high K (○) media.

K培養では、培養30日になっても、髄鞘形成は見られなかった(Fig. 10)。

2 核周囲部

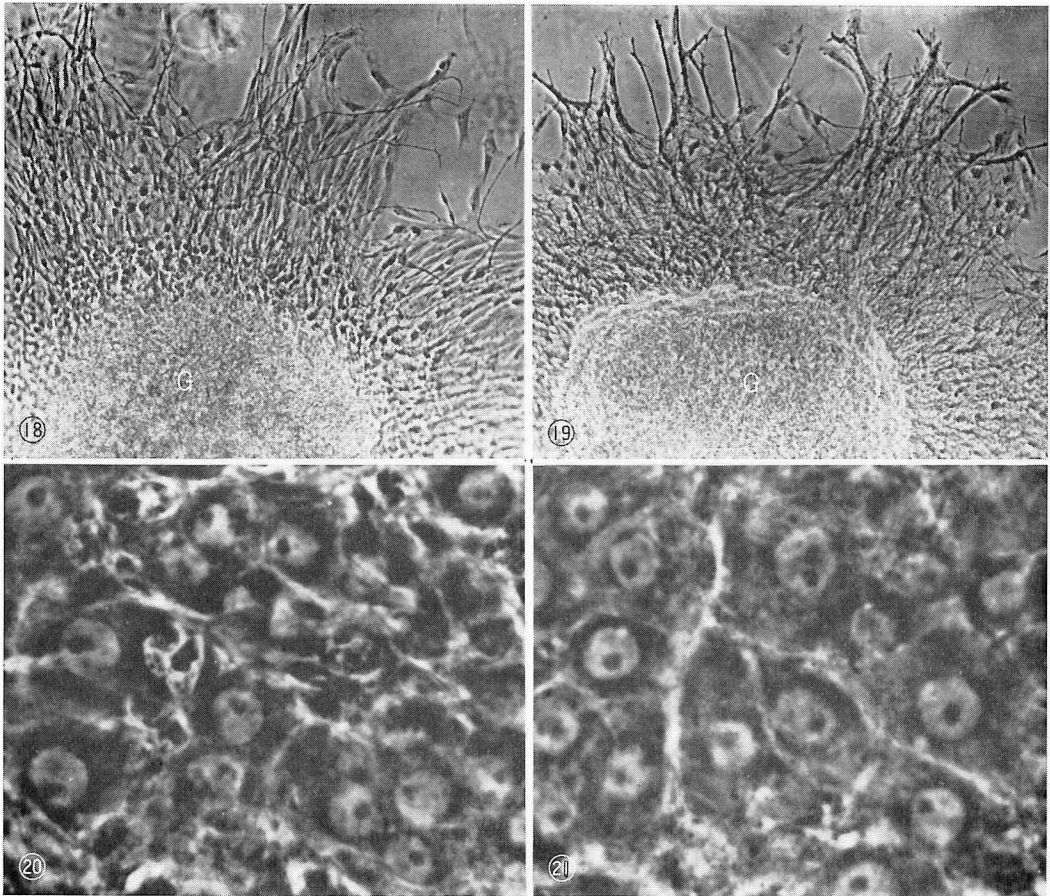
脊髄神経節細胞の核周囲部の分化の程度について見ると、培養1週頃までは、対照と高濃度K培養との間に明らかな差はなかった(Figs. 11, 12)。両条件ともに、核周囲部は小型で、その直径は約15μmから25μm、厚さは約20μmであった。核は細胞膜に接するように著しく偏在し、1個または2個の核小体を持っていた。

対照培養では、その後培養日数に伴って核周囲部の直径が増加し(Fig. 15)、培養30日になると核周囲部の直径は、平均で約30μmになり、50μm以上のものも認められた。しかし、核周囲部の厚さにはほとんど変化が認められなかった(Fig. 16)。また、核はしだいに核周囲部の中央に移動し(Fig. 17)、核小体は1個の場合が多くなった。細胞質内には、位相差顕微鏡下で電顕像の粗面小胞体に相当すると思われる同心円的に走る明るい輪状の構造が認められ、成熟した形態を示すようになった(Fig. 13)。外套細胞は、細胞体に埋めこまれた様に密着していた。すなわち Murray²²⁾の Stage 4に相当する段階までの分化が認められた。

しかし、高濃度K培養では、核は核周囲部の中心に移動したが、培養日数を経ても核周囲部は小型のまま、細胞質内の輪状構造の発達も悪く、未熟な形態を示すものが多かった(Figs. 10, 14)。また外套細胞は、

Control

High K



Figs. 18-21 Phase-contrast photomicrographs of SGs in explant culture.

Fig. 18 2 days in the control medium, Nerve fibers show fine network on the sheet of fibroblasts. ($\times 75$)

Fig. 19 2 days in the high K medium, Nerve fibers are dense and form thick bundles. ($\times 75$)

Figs. 20,21 20 days in culture, No obvious difference can be observed between the nerve cells in the control and in the high K medium, Fig.20 : Maintained in the control medium, Fig.21 : Maintained in the high K medium. ($\times 860$)

Figs. 22-26 CA fluorescence photomicrographs of SG cells in dissociated culture. ($\times 200$)

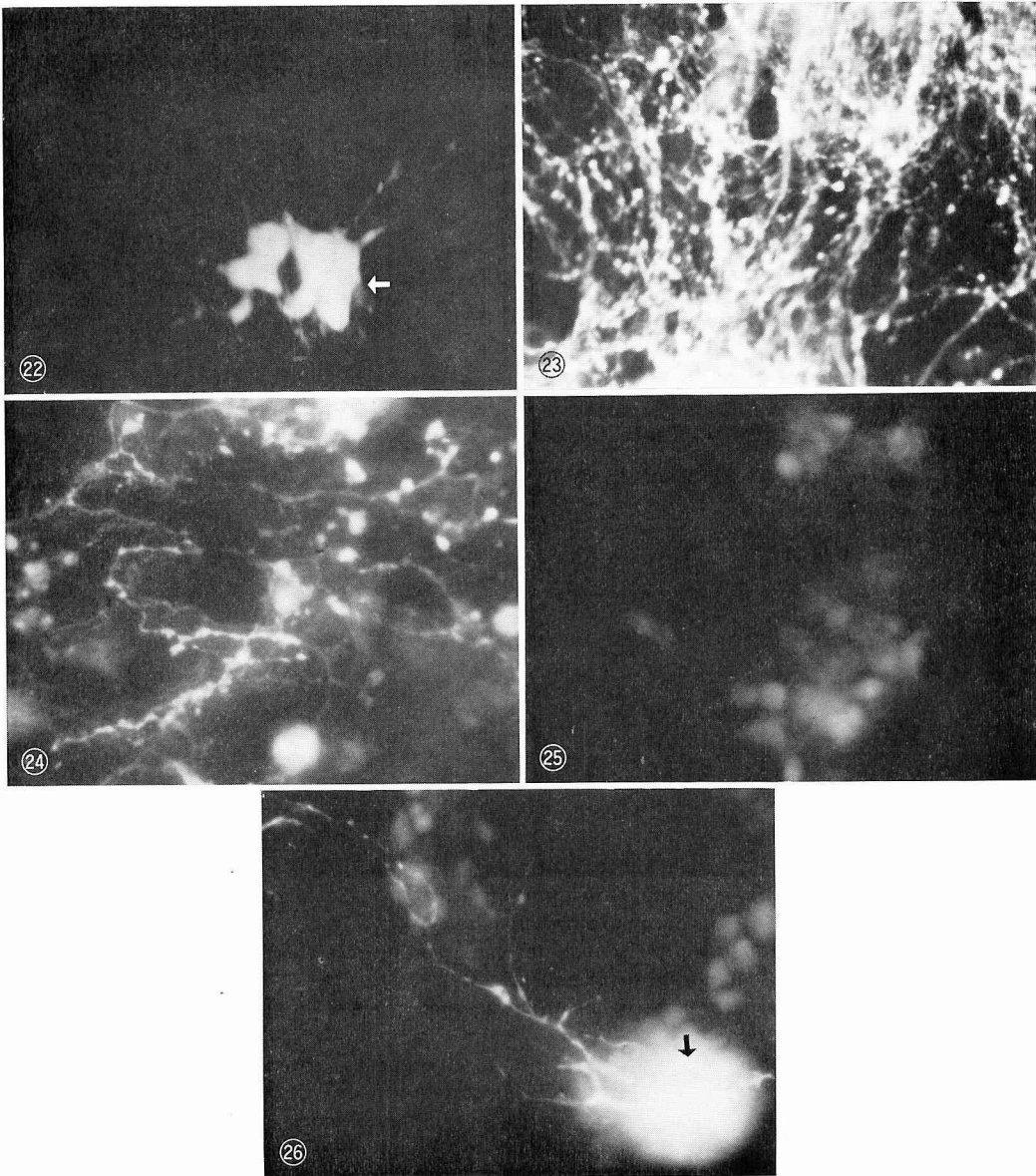
Fig. 22 12 days in the control medium, CA fluorescence is faintly observed except in a few intensely fluorescent cells (\Rightarrow).

Fig. 23 12 days in the high K medium, Nerve fibers with intense fluorescence show dense network.

Fig. 24 7 days in the control medium and then 10 days in the high K medium, Fluorescence of nerve fibers appears.

Fig. 25 7 days in the high K medium and then 10 days in the control medium, Fluorescence of nerve fibers diminishes.

Fig. 26 7 days in the high K medium and then 10 days in the control medium. The arrow (\Rightarrow) indicates a few intensely fluorescent cells with long processes.



核周囲部をとり囲んではいるが、外側に突出した形を示した。すなわち Murray²²⁾の Stage 3 までの分化しか認められなかった。計測した結果では、核周囲部の厚さと核の偏位には対照との間に有意差を認めなかったが、核周囲部の直径は培養10日以降対照に比べて有意に小さい値を示した (Fig. 15)。

C 交感神経節細胞の分化

1 神経線維と核周囲部

対照培養では、分離培養および組織片培養ともに、神経線維は束形成せず、細かな線維網を形成した (Figs. 3, 18)。高濃度K培養では、生存神経細胞数が多く、特に分離培養では細胞が強い aggregation を作るこ

Table 1 The effects of the high K medium on the CA fluorescence of SGs

Experiment	Fluorescent nerve fibers		Intensely fluorescent cells	
	1 week	2 weeks	1 week	2 weeks
Control	—	—	+	+
High K	+	卅	±	±
*Control → High K	—	卅	+	±
*High K → Control	+	—	±	+

* The medium is changed from control to high K, or from high K to control after one week in culture.

とに伴って、神経線維の密度が高く、しかも太い神経束を形成するのが認められた (Figs. 4, 19)。また高濃度K培養では、対照に比べて線維芽細胞が少なかった。培養液を対照から高濃度Kに変えても、神経線維は細かな線維網を示したままであり、高濃度K培養液から対照に変えても高い線維密度と線維束には変化を認めなかった。

培養日数を経ると交感神経節細胞においても、核周囲部が幾分大きくなり、核が核周囲部の中心に移動したが、脊髄神経節細胞に比べるとその変化はわずかであった (Figs. 20, 21)。この点では、対照培養と高濃度K培養との間に明らかな差は認められなかった。

2 CA蛍光染色 (Table 1)

対照培養では、ほとんどの神経細胞は弱い蛍光しか示さず、神経線維には蛍光が認められなかった (Fig. 22)。また培養20日に至っても変化は認められなかった。高濃度K培養では、培養3日頃より強い蛍光を示す線維が認められ、培養日数に伴ってその数は増した。培養10日を過ぎる頃には蛍光を示す線維の密なネットワークが観察された (Fig. 23)。培養液を対照から高濃度Kに変えると神経線維に蛍光が認められるようになり (Fig. 24)、逆に高濃度K培養から対照に変えると蛍光が消失した (Fig. 25)。

また対照培養および高濃度K培養のいずれにおいても、培養初期から細胞体に特に強い蛍光を示す細胞が少数認められた (Fig. 22)。この様な細胞の数は、対照培養でより多かったが、培養日数に伴う変化は認められなかった。しかし培養液を対照から高濃度Kに変えるとこの細胞の数は減少し、高濃度Kから対照に変えると増加する傾向が認められた。この細胞では線維にも強い蛍光が認められたが、その蛍光を示す線維の長さは一般に短かった。しかし培養液を高濃度Kから対照に変えた場合には、長い蛍光線維を有するものが

出現した (Fig. 26)。

IV 考 察

A 生存率

高濃度K培養により、脊髄神経節細胞の生存率が上昇したことは、これまでの報告¹⁾⁻⁵⁾とほぼ一致する。交感神経節細胞については、Phillipson と Sandler¹⁰⁾が組織片培養を用いた連続切片による結果を報告しているが、それによると高濃度K (45mM) で培養した場合の生存率は、培養7日において、対照 (5.3mMK) の約6.6倍である。今回の分離培養を用いた場合の交感神経節細胞の生存率は、高濃度K培養8日で、対照の約2.4倍であった。Phillipson と Sandler¹⁰⁾の報告と今回の結果において見られた生存率の差は培養方法の違いによるものと思われる。

Chalazonitis と Fischbach⁵⁾は、高濃度K培養における神経細胞の生存率の上昇は、神経細胞の変性率が減少することと、前駆細胞が分化することによる神経細胞の増加によってもたらされたものであり、神経細胞の分裂増殖によるものではないとしている。今回の実験において、生存率がわずかに上昇を示す場合があったのは、培養の極く初期には神経細胞と同定し得なかった細胞の中には、前駆細胞も含まれており、これが後になって分化したため神経細胞として算定されるようになったことも原因の1つと考えられる。

Nishi と Berg⁷⁾によるとニワトリ胚毛様体神経節細胞では、高濃度K培養により生存率が上昇するとともに、細胞あたりの choline acetyl-transferase (CAT) 活性、lactate dehydrogenase (LDH) 活性、acetylcholine (Ach) 合成、蛋白合成等も増加する。この高濃度Kによるのと同じようなCAT活性の増加は、Naチャンネルの阻害剤である veratridine を用いて細胞膜を脱分極させた場合にも認められる。一方、

高濃度KによるCAT活性の増加は、Mg や、Ca 拮抗剤である D600 によって、Ca の細胞内流入を遮断すると抑制されるという。また Schubert ら²³⁾によると高濃度KはPC12細胞の粘性性を増加させるが、この作用もCaの細胞内流入を遮断すると阻害される。これらのことより高濃度Kによる細胞膜の脱分極と、それに伴うCaの細胞内流入が、蛋白合成その他の細胞内の物質代謝過程を促進し²⁴⁾、その結果として神経節細胞の生存率を上昇させることが推定される。

B 脊髄神経節細胞の分化

脊髄神経節細胞の対照培養では、培養日数に伴って核周囲部の厚さには変化を認めなかったが、核周囲部の直径が増加し、核の偏位が減少した。また神経線維の髓鞘形成を伴うMurray²²⁾のStage 4までの核周囲部の分化が認められた。以上の結果はHanda²⁰⁾の報告とほぼ一致する。しかし高濃度K培養では、核周囲部の厚さと核の偏位については対照との間に差を認めなかったが、核周囲部の直径の増加は対照に比べて有意に小さく、Murray²²⁾のStage 3までの核周囲部の分化は認められたが、それ以上の分化はなく、また髓鞘形成も認められなかった。

脊髄神経節細胞では、培養日数とともに神経細胞が分化するに従って、静止膜電位が深くなり、Ca成分による活動電位の再分極相に見られるhumpが消失し、活動電位の持続時間も短くなる²⁰⁾²⁴⁾。ChalazonitisとFischbach⁵⁾、Scottら¹²⁾は、高濃度Kで培養すると、このより分化した電気生理学的性質を示す神経細胞が、対照に比べて多くなることを報告しており、このことから高濃度Kが、興奮膜の分化を促進することを示唆している。しかし、この高濃度Kによる興奮膜の分化の促進と、今回の実験では高濃度K培養で一定以下の形態的分化しか認められなかったこととの関係は、今のところ明らかではなく、今後なお検討する必要がある。

C 交感神経節細胞の分化

1 伝達物質の選択

交感神経節細胞は、神経堤からの遊走中にアドレナリン作動性となる信号をその周囲の環境から受けると考えられており、神経節を形成した時点ではすでにCA蛍光を示している¹³⁾¹⁴⁾。

この交感神経節細胞は培養下に置かれるとその培養条件の違いによって、アドレナリン作動性、あるいはコリン作動性のいずれにも分化しうることが報告されている¹³⁾⁻¹⁸⁾²⁵⁾⁻²⁹⁾。交感神経節細胞を、神経細胞以

外の細胞をほとんど取り除いた状態で培養すると、CAが合成され、有芯小胞を持つシナプスが形成される²⁵⁾²⁶⁾。しかし、交感神経節細胞を、骨格筋や心筋、線維芽細胞などの非神経細胞、これらを培養して得たconditioned medium、ニワトリ胚抽出液、人胎盤血清などを加えて培養すると、Achが合成され、神経細胞相互間や、骨格筋、心筋との間にコリン作動性シナプスが形成されてくる¹³⁾⁻¹⁸⁾²⁷⁾²⁸⁾。この場合、同一の神経細胞が、同時にアドレナリン作動性およびコリン作動性双方の伝達物質を有し、両方のシナプス伝達を行う場合があることが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾²⁹⁾。このような現象はすでにアドレナリン作動性を示している神経細胞にも、まだ伝達物質を変更し得る可塑性があり、非神経細胞由来の物質によってコリン作動性に变化するため生じたものと考えられている¹³⁾¹⁴⁾。

ところが成熟生体内では、非神経細胞が多数存在するにもかかわらず、大部分の交感神経節細胞はアドレナリン作動性である¹³⁾。Blackら³⁰⁾³¹⁾は、若いラットやマウスで節前神経の切断やganglion blockerの投与により、交感神経節細胞のノルアドレナリン合成能が低下することを報告している。Walickeら¹¹⁾は、骨格筋や心筋のconditioned mediumを加えて培養されている交感神経節細胞を、Kやveratridineで脱分極させたり、あるいは電気刺激すると、Ach合成が抑制され、CA合成が増強することを示した。そしてこの結果からアドレナリン作動性交感神経節細胞の維持には、中枢からの入力信号が重要な役割を果たしているのではないかと述べている。彼らはさらにこの脱分極による交感神経節細胞の伝達物質の選択にもCaが関与していることを示唆した³²⁾。

今回の実験では、対照培養においてほとんどの神経線維にCA蛍光が認められなかった。このことは、共存する線維芽細胞や培養液中のニワトリ胚抽出液などにより、交感神経節細胞がアドレナリン作動性からコリン作動性に転換した可能性を示している。

一方高濃度K培養では、線維芽細胞やニワトリ胚抽出液の存在にもかかわらず、CA蛍光線維の増加が著明であった。また始め対照培養液で培養しておき、途中で高濃度K培養液に交換すると神経線維にCA蛍光が出現した。さらに培養液を高濃度Kから対照に交換するとCA蛍光が消失した。このことから、高濃度Kによる神経細胞膜の脱分極が、中枢からの興奮性入力による脱分極に代わって、交感神経節細胞にアドレナリン作動性を保持させる作用を持っているのではない

かと考えられる。また高濃度K培養では、交感神経節細胞にコリン作動性を誘導する作用を持つと言われていた線維芽細胞が対照培養に比べて少なかったが、このことも交感神経節細胞のアドレナリン作動性維持に影響していると思われる。

しかし、交感神経節細胞にコリン作動性が誘導されても、CA合成には変化がない場合も報告されている²⁷⁾。今後、高濃度K培養における交感神経節細胞のコリン作動性の変化を追跡する必要があると考えられる。

2 SIF細胞

交感神経節には、いわゆる交感神経細胞より小さく、特に強いCA蛍光を示す small intensely fluorescent (SIF)細胞と呼ばれる細胞が存在する³³⁾。これは、交感神経細胞と副腎髄質細胞の中間的形態を示し、通常突起は短く、細胞内に多数の大きな有芯小胞を持ち、機能的には介在神経細胞あるいは内分泌細胞、receptor細胞とも考えられている。また発生段階においては、glucocorticoidや神経成長因子(NGF)の影響により、副腎髄質細胞、SIF細胞、交感神経細胞は相互に変化し得ることが報告されている。さらにシナプス伝達を阻害するとSIF細胞の形態が変化することも報告されている¹⁴⁾³³⁾。

今回の実験で認められた細胞体に特に強い蛍光を示す細胞は、大きさが他の神経細胞と変わらず、SIF細胞であるか否かは明らかでない。しかし、神経細胞とSIF細胞の移行形の可能性もあり、その移行に高濃度Kが影響していることも考えられ、今後なお検討を進めたい。

V 結 語

ニワトリ胚より得た脊髄神経節細胞および交感神経節細胞を高濃度K培養液を用いて培養し、以下の結果を得た。

- 1 高濃度K培養により、脊髄神経節細胞、交感神経節細胞ともにその生存率が高められた。
- 2 高濃度Kでの長期培養において、脊髄神経節細胞は、MurrayのStage 3程度までは分化するが、それ以上の分化ならびに髄鞘形成は認められなかった。
- 3 交感神経節の高濃度K培養では、線維密度が増すとともに、太い神経束を形成するのが認められた。
- 4 交感神経節細胞の神経線維のCA蛍光は、高濃度K培養では培養日数に伴って増強したが、対照培養ではほとんど蛍光が認められなかった。また培養液を対照から高濃度Kに変えると蛍光が増強し、高濃度Kから対照に変えると減弱した。
- 5 以上の所見より、交感神経節細胞は、対照培養ではコリン作動性に転換するが、高濃度Kではアドレナリン作動性が保たれるものと考えられる。

本論文の要旨は、第7回神経科学学術集会(1984年1月、千葉)および第89回日本解剖学会総会(1984年4月、仙台)において発表した。

稿を終るにあたり、終始御指導を賜りました恩師志水義房教授、半田康延助教授に深く感謝いたします。また御助力いただきました当教室中野知房氏、宮田康夫氏、横内久美子氏に対し、厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Scott, B.S. and Fisher, K.C. : Potassium concentration and number of neurons in cultures of dissociated ganglia. *Exp Neurol*, 27 : 16-22, 1970
- 2) Scott, B.S. and Fisher, K.C. : Effect of choline, high potassium, and low sodium on the number of neurons in cultures of dissociated chick ganglia. *Exp Neurol*, 31 : 183-188, 1971
- 3) Scott, B.S. : Effect of potassium on neuron survival in cultures of dissociated human nervous tissue. *Exp Neurol*, 30 : 297-308, 1971
- 4) Scott, B.S. : The effect of elevated potassium on the time course of neuron survival in cultures of dissociated dorsal root ganglia. *J Cell Physiol*, 91 : 305-316, 1977
- 5) Chalazonitis, A. and Fischbach, G.D. : Elevated potassium induces morphological differentiation of dorsal root ganglionic neurons in dissociated cell culture. *Dev Biol*, 78 : 173-183, 1980
- 6) Lasher, R.S. and Zagon, I.S. : The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res*, 41 : 482-488, 1972
- 7) Nishi, R. and Berg, D.K. : Effects of high K⁺ concentrations on the growth and development of ciliary ganglion neurons in cell culture. *Dev Biol*, 87 : 301-307, 1981

- 8) Bennet, M.R. and White, W. : The survival and development of cholinergic neurons in potassium-enriched media. *Brain Res*, 173 : 549-553, 1979
- 9) Kostenko, M.A., Tretjak, N.N. and Musienko, V.S. : The effect of elevated potassium on the adult mollusc giant neurone survival and neurite formation in culture. *Brain Res*, 236 : 183-192, 1982
- 10) Phillipson, O.T. and Sandler, M. : The influence of nerve growth factor, potassium depolarization and dibutyryl (cyclic) adenosine 3',5'-monophosphate on explant cultures of chick embryo sympathetic ganglia. *Brain Res*, 90 : 273-281, 1975
- 11) Walicke, P.A., Campenot, R.B. and Patterson, P.H. : Determination of transmitter function by neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74 : 5767-5771, 1977
- 12) Scott, B.S., Petit, T.L., Becker, L.E. and Edward, B.A.V. : Electric membrane properties of human DRG neurons in cell culture and the effect of high K medium. *Brain Res*, 178 : 529-544, 1979
- 13) Patterson, P.H. : Environmental determination of autonomic neurotransmitter functions. *Annu Rev Neurosci*, 1 : 1-17, 1978
- 14) Landis, S.C. : Factors which influence the transmitter functions of sympathetic ganglion cells. In : Elfvin, L.G. (ed.), *Autonomic Ganglia*, pp. 453-473, John Wiley and Sons, Chichester, 1983
- 15) 小林高義, 栢沼勝彦, 柳沢信夫, 塚越 廣, 半田康延, 志水義房 : 正常及び筋ジストロフィーチキン培養骨格筋に対する交感神経の影響. *自律神経*, 18 : 160-171, 1981
- 16) Kobayashi, T., Tsukagoshi, H. and Shimizu, Y. : Trophic effects of sympathetic ganglia on normal and dystrophic chicken skeletal muscles in tissue culture. *Exp Neurol*, 77 : 241-253, 1982
- 17) Kobayashi, T., Matsumoto, Y., Tsukagoshi, H. Kayanuma, K. and Hori, S. : Fine structure of synaptic endings between sympathetic axons and skeletal muscle cells and varicosities in the bundles of neurites in tissue culture. *Exp Neurol*, 85 : 187-201, 1984
- 18) 小林高義, 松本容秋, 塚越 廣, 栢沼勝彦, 堀真一郎 : 培養鶏胚骨格筋と交感神経線維及び交感神経束内交感神経線維間の神経-筋, 神経-神経接合部の組織化学的, 電顕的研究. *自律神経* 21, 230-243, 1984
- 19) 志水義房 : 培養下における知覚神経節細胞の形態と電気生理学的機能の変化. *神経進歩*, 26 : 1104-1112, 1982
- 20) Handa, Y. : Morphological and electrophysiological changes in cultured spinal ganglion cells during development. *Tohoku J exp Med*, 121 : 13-25, 1977
- 21) Nakamura, T. : Application of the Faglu method (Furness et al.) for the histochemical demonstration of catecholamine to the cryostat section method. *Acta Histochem Cytochem*, 12 : 182, 1979
- 22) Murray, M.R. : Nervous tissues *in vitro*. In : Willmer, E.N. (ed.), *Cells and Tissues in Culture*, Vol. 2, pp. 373-455, Academic Press, New York, 1965
- 23) Schubert, D., LaCorbiere, M., Whitlock, C. and Stallcup, W. : Alterations in the surface properties of cells responsive to nerve growth factor. *Nature*, 273 : 718-723, 1978
- 24) 半田康延, 志水義房 : 興奮膜の発生と分化 —培養知覚神経節細胞を中心として—. *神経進歩*, 26 : 474-484, 1982
- 25) Mains, R.E. and Patterson, P.H. : Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. I. Establishment of long-term growth in culture and studies of differentiated properties. *J Cell Biol*, 59 : 329-345, 1973
- 26) Rees, R. and Bunge, R.P. : Morphological and cytochemical studies of synapses formed in culture between isolated rat superior cervical ganglion neurons. *J Comp Neurol*, 157 : 1-12, 1974
- 27) Patterson, P.H. and Chun, L.L.Y. : The influence of non-neuronal cells on catecholamine and acetylcholine synthesis and accumulation in cultures of dissociated sympathetic neurons. *Proc*

- Natl Acad Sci USA, 71, 3607-3610, 1974
- 28) O'Lague, P.H., Obata, K., Claude, P., Furshpan, E.J. and Potter, D.D. : Evidence for cholinergic synapses between dissociated rat sympathetic neurons in cell culture. Proc Natl Acad Sci USA, 71 : 3602-3606, 1974
 - 29) Furshpan, E.J., MacLeish, P. R., O'Lague, P.H. and Potter, D.D. : Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures : Evidence for cholinergic, adrenergic and dual-function neurons. Proc Natl Acad Sci USA, 73 : 4225-4229, 1976
 - 30) Black, I.B., Hendry, I.A. and Iversen, L.L. : Trans-synaptic regulation of growth and development of adrenergic neurons in a mouse sympathetic ganglion. Brain Res, 34 : 229-240, 1971
 - 31) Black, I.B. and Geen, S.C. : Trans-synaptic regulation of adrenergic neuron development : Inhibition by ganglionic blockade. Brain Res, 63 : 291-302, 1973
 - 32) Walick, P.A. and Patterson, P.H. : On the role of Ca^{2+} in the transmitter choice made by cultured sympathetic neurons. J Neurosci, 1 : 343-350, 1981
 - 33) Taxi, J., Derer, M. and Domich, A. : Morphology and histophysiology of SIF cells in the autonomic ganglia. In : Elfvin, L. G. (ed.), Autonomic Ganglia, pp.67-95, John Wiley and Sons, Chichester, 1983

(59. 8. 11 受稿)
