

浮遊培養による鶏胚神経網膜の再構築と増殖因子の影響

高 島 まゆみ

岡山大学医学部眼科学教室

要 約

単離した神経網膜細胞の浮遊培養を浮遊培養用マルチプレートを用いて行い、形成された立体構築を2か月間にわたり観察した。得られた細胞塊は部分的に網膜の構造を模倣しており、細胞塊内では視細胞、ミュラー細胞の形成やシナプスの形成がみられた。免疫組織化学染色においては細胞塊内に抗ロドプシン抗体陽性細胞がみられ、培養開始時点の神経網膜に比べて分化していた。培養を長期間にわたり行った場合、細胞塊内に抗クリスタリン抗体陽性細胞が増加し、水晶体上皮細胞への分化の転化が疑われた。また、細胞塊の形および分化に対する増殖因子(塩基性線維芽細胞増殖因子、上皮増殖因子、神経増殖因子)の影響や、網膜色素上皮細胞との混合培養の影響についても検討したところ、増殖因子および網膜色素上皮細胞は、網膜神経細胞の神経突起の成長を軽度ながら促進し、上皮増殖因子は、視細胞におけるロドプシンの生成を促進していた。この培養方法は、種々の因子の網膜の分化および分化の転化に対する影響について検討する一つの方法となり得る。(日眼会誌 101: 30-39, 1997)

増殖因子)の影響や、網膜色素上皮細胞との混合培養の影響についても検討したところ、増殖因子および網膜色素上皮細胞は、網膜神経細胞の神経突起の成長を軽度ながら促進し、上皮増殖因子は、視細胞におけるロドプシンの生成を促進していた。この培養方法は、種々の因子の網膜の分化および分化の転化に対する影響について検討する一つの方法となり得る。(日眼会誌 101: 30-39, 1997)

キーワード：神経網膜細胞、浮遊培養、増殖因子、網膜色素上皮細胞、クリスタリン

Reconstruction of the Neuroretina from Embryonic Chick Retinal Cells in Floating Culture and the Effect of Growth Factors

Mayumi Takabatake

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

Abstract

We observed the three dimensional structure of cellular aggregates formed from chick retinal cells in a floating culture system for 2 months. The aggregated cells partially mimicked the structure of the retina and showed differentiation of photoreceptor cells and Müller cells with numerous synapses. Immunohistochemical studies showed the number of anti-rhodopsin positive cells increasing over time. In the long-term culture, increasing anti-crystalline positive cells appeared late in the culture, indicative of differentiation of lens epithelial cells. Nerve, epidermal, and basic fibroblast growth factors, and co-culture with retinal pigment epithelial cells

stimulated to some degree the growth of dendrites in retinal cellular aggregates. Epidermal growth factor, in particular, promoted the production of rhodopsin in photoreceptor cells. Retinal cellular aggregates in a floating culture system could be used to examine the effect of various factors on differentiation of the neuroretina. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 30-39, 1997)

Key words: Neuroretina, Floating culture, Growth factor, Retinal pigment epithelial cell, Crystalline

I 緒 言

細胞を浮遊培養すると一般に細胞塊が形成され、通常の付着培養に比べて細胞間相互作用により立体的に複雑な構築が形成される。また、細胞塊を長期間培養することも可能であり、形成された細胞塊内では細胞がより分化

した機能を持つ可能性があるといわれている¹⁾。したがって、浮遊培養法は付着培養法に比べて、*in vivo*に近い *in vitro* 実験系として期待されている。

網膜の細胞培養系においては、Mosconaら^{2)~5)}をはじめとして多数の研究者により振盪培養による浮遊培養が試みられており、約2週間の培養期間で得られた細胞塊

別刷請求先：700 岡山県岡山市鹿田町2-5-1 岡山大学医学部眼科学教室 高島まゆみ
(平成8年5月20日受付、平成8年7月25日改訂受理)

Reprint requests to: Mayumi Takabatake, M.D. Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama-shi, Okayama-ken 700, Japan
(Received May 20, 1996 and accepted in revised form July 25, 1996)

の分化形態および網膜の再構築の可能性について検討されている。本研究では、単離した神経網膜細胞の浮遊培養を浮遊培養用マルチプレートを用いて行い、形成された立体構築を観察し、2か月間にわたり培養することにより、その細胞構築にどのような変化がみられるかにつき検討した。また、その分化に対する増殖因子の影響や、網膜色素上皮細胞との混合培養の結果を免疫組織化学法を用いて検討したので報告する。

II 実験方法

1. 神経網膜単離細胞浮遊液の作製

孵卵7.5日目の鶏胚から摘出した眼球を赤道部で切断し、硝子体を除去した後⁶⁾、眼杯裂の部分で切除し神経網膜を剥離摘出した。剥離した網膜を0.02%トリプシン-1 mM EDTA 混液(Life Technologies, Inc., NY, 米国)中で15分間静置した。上清を捨て、10%ウシ胎児血清(FCS: Biocell Laboratories, Inc., CA, 米国)添加ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM: 日水)を加えてピペティングし、毎分800回転(70 G)で5分間遠沈した。同様の操作を2回繰り返す。上清を捨て、10% FCS 添加 DMEM 中に約 5×10^6 個/ml の濃度になる単離細胞浮遊液を作製し、浮遊培養用24穴マルチプレート(スミロン)に分注した。トリパンブルー染色抑制試験で浮遊細胞は95%以上の生存率を保っていることを確認した。

2. 増殖因子の添加および網膜色素上皮細胞との混合培養

培養液には10% FCS 添加 DMEM を用い、5% CO₂、37°Cの条件下で2か月間にわたり培養した。培養液中に塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF: human FGF-basic, recombinant, RSD systems, MN, 米国)を200 ng/ml の濃度で、上皮増殖因子(EGF: human EGF, recombinant, RSD systems, MN, 米国)および神経増殖因子(NGF: mouse beta nerve growth factor, Austral Biologicals, CA, 米国)をそれぞれ100 ng/ml の濃度で添加し、その影響についても観察した。また、孵卵7.5日目の鶏胚の眼球から上述のごとく神経網膜を除去し、残った眼球を4分割し網膜色素上皮を剥離した。得られた網膜色素上皮を神経網膜と同様の方法で単離し、約 3×10^6 個/ml の濃度で神経網膜の単離細胞浮遊液に加え、その影響について検討した。培地は2~3日毎に培養液上清を半量交換した。

3. 細胞塊の固定および観察

経時的観察は位相差顕微鏡で行った。細胞塊は培養開始後2, 5, 7日, 2週, 4週, 8週目に採取し、3.7%ホルマリン・0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)で固定し、パラフィン包埋の後切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色して光学顕微鏡で観察した。また、2, 4, 8週目に2.5%グルタルアルデヒド・0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)で前固定し、さらに2%オスミウム酸・0.1 M リン

酸緩衝液(pH 7.4)で2時間後固定し、エポキシ樹脂に包埋した後、超薄切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色して透過型電子顕微鏡で観察した。

4. 免疫組織化学染色

パラフィン包埋切片をキシレンで脱パラフィンの後、アルコール系列で水層に戻し、免疫組織化学染色に使用した。0.3% H₂O₂と30分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を除いた後、切片を5%ヤギ血清と30分間反応させた。一次抗体には抗 α -Bクリスタリン抗体(rabbit antibody to alpha B crystallin: SeroTec, LTD, Oxford, England, 2,000倍希釈)、抗ロドプシン抗体(rabbit anti(bovine)rhodopsin: LSL Co., LTD, 2,000倍希釈)、抗塩基性線維芽細胞増殖因子受容体抗体(anti-chicken-FGF receptor, rabbit: Upstate Biotechnology Inc., NY, 米国, 1,000倍希釈)を用い、37°Cで90分間反応させた。その後、0.05% Tween-20(Bio-Rad Laboratories, CA, 米国)を含む0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)による10分間洗浄を3回繰り返した。二次抗体としてはビオチン標識抗ウサギ IgG(Vector Laboratories, CA, 米国)を用い、37°Cで60分間反応させた。同様に洗浄した後、avidin and biotinylated horseradish peroxidase macromolecular complex (Vectastain ABC キット, Vector Laboratories, CA, 米国)と30分間反応させ、再び洗浄した。そして、ペルオキシダーゼ基質溶液(0.1% diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.02% H₂O₂)と30分間発色反応させ、水道水で5分間洗浄した。対比染色は1%メチルグリーンで30分間行った。

一次抗体の濃度は、孵卵7.5日目の鶏胚眼および生後1日目の鶏眼のパラフィン包埋切片を使用して、それぞれ背景染色の生じない濃度とし、希釈濃度を決定した。

III 結果

1. 位相差顕微鏡による観察

1) 神経網膜単独での培養

浮遊培養用マルチプレートに分注後、培養液中に浮遊していた個々の細胞は経時的に集まり、12時間後には細胞塊となった。細胞塊は互いに融合して次第に大きくなり、24時間後から48時間後には種々の大きさの膜状の塊を形成した。培養開始後3日目には細胞塊内にロゼットが形成され、この頃から多数の死細胞と思われる単離細胞が細胞塊の周囲から脱落し、細胞塊は縮小した。細胞塊はある程度まで縮小すると、以後縮小することなく、培養開始後4週間目頃から今度は軽度ながら増大していった(図1a~f)。

2) 増殖因子添加下での培養

細胞の凝集による細胞塊の形成に対して、増殖因子添加による影響はみられなかった。また、細胞塊の増大およびその周辺で脱落してゆく細胞数に対する影響もみられ

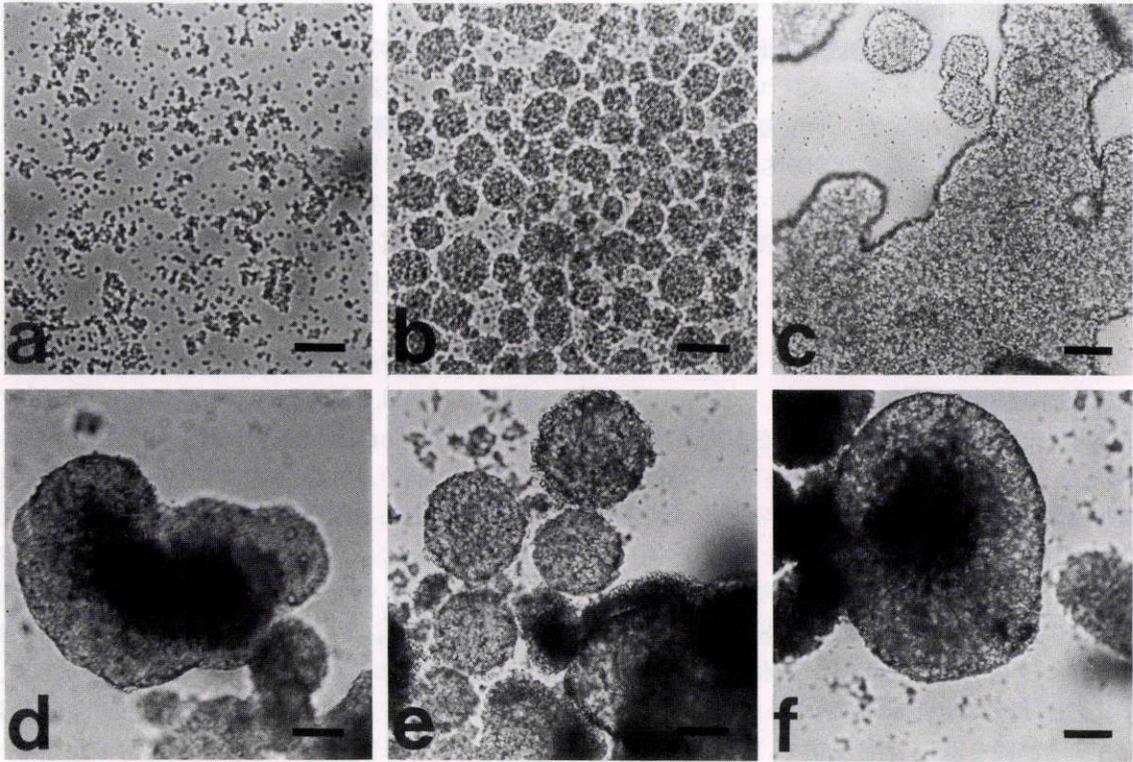


図1 神経網膜細胞の浮遊培養における細胞塊の形成過程(位相差顕微鏡).

a: 培養6時間, b: 培養12時間, c: 培養2日, d: 培養3日, e: 培養4週, f: 培養8週, バーは100 μm . 細胞塊は培養12時間目には形成され, その後互いに融合し, 縮小していったが, 培養4週頃より軽度増大していった. 培養3日目にロゼットが形成された.

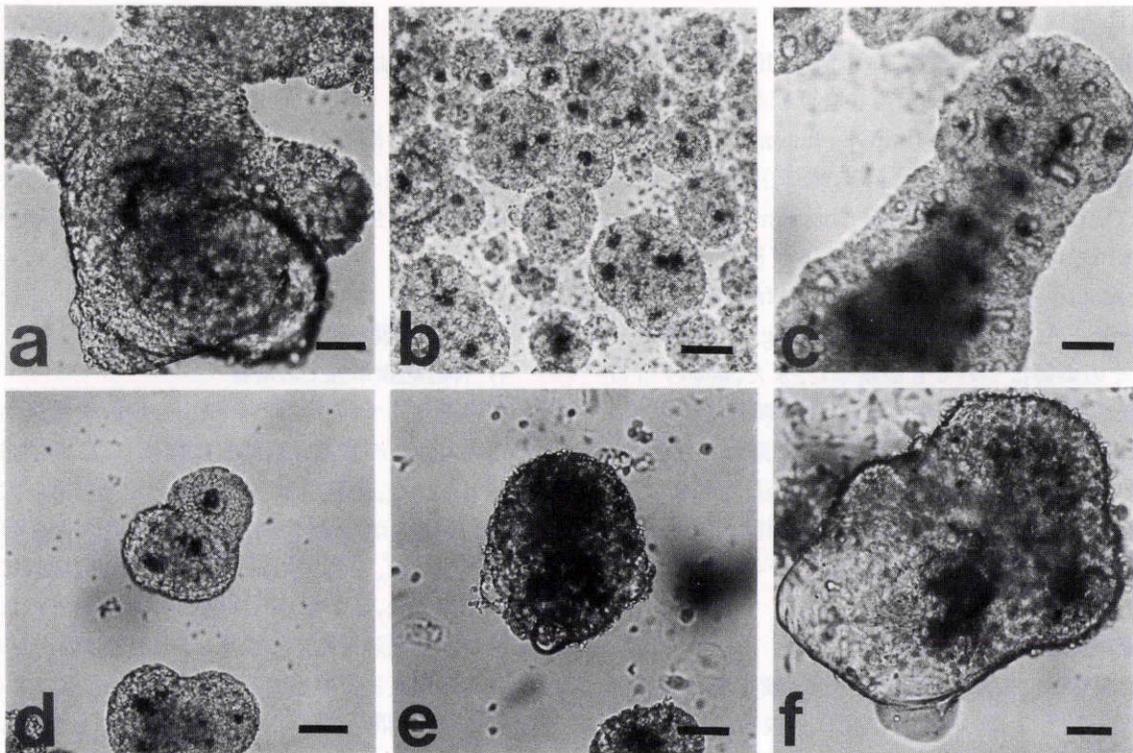


図2 増殖因子存在下および網膜色素上皮細胞との混合培養における細胞塊の形成(位相差顕微鏡).

a: b-FGF 存在下, 培養8週. b: 網膜色素上皮細胞存在下, 培養24時間. c: b-FGF および網膜色素上皮細胞存在下, 培養7日, 多数のロゼットが形成された. d: EGF および網膜色素上皮細胞存在下, 培養7日, 網膜色素上皮細胞の周囲にロゼットが形成された. e: 網膜色素上皮細胞存在下, 培養8週. f: b-FGF および網膜色素上皮細胞存在下, 培養8週, 透明な半球状の膨隆が形成された. バーは100 μm

なかった。培養開始後4～8週目にかけてb-FGFを添加した場合、それぞれの細胞塊が増大し、一部には細胞塊同士で接着、融合するものもみられた(図2a)。一方、EGF、NGFを添加した場合には、細胞塊はあまり増大しなかった。

3) 網膜色素上皮細胞との混合培養

単離網膜細胞が細胞塊を形成する際、網膜色素上皮細胞のまわりに神経網膜細胞が集合し凝集しているのが観察された(図2b)。脱落してゆく細胞数に対する混合培養の影響はみられなかった。ロゼットの形成は、神経網膜のみの培養に比べやや多くみられ、b-FGF、EGFを加えた場合においてその傾向が強かった(図2c, d)。網膜色素上皮細胞の混合に加えて、b-FGFを添加した場合、培養開始後4週間目頃から細胞塊は著明に拡大した(図2e, f)。

2. 光学顕微鏡による観察

1) 神経網膜単独での培養

集合した細胞塊内に、培養開始2日目頃には一部ロゼット形成がみられた。その後、細胞塊の最外層には2～3層の細胞質の少ない細胞が位置し、細胞塊内では核の密度の高い部分と核の密度の低い網状構造の部分とに分かれた。5日目にははっきりとしたロゼットが形成され、2週目には細胞の配列が層状構造を示す部分が見られた。所々に細胞核の濃縮像もみられた。その後は細胞塊の最外層にみられていた細胞質の少ない細胞が脱落してゆき、細胞塊内の核密度も減少してエオジン好性の胞体

部分が増加し、層構造が不明瞭となった(図3a～d)。

2) 増殖因子添加下での培養

b-FGF、EGF、NGFのいずれを添加した場合にも、細胞塊内の層状構造の形成に対して大きな影響はみられなかった(図4a)。培養4～8週目においては、増殖因子非添加の場合と同様に層構造が不明瞭となったが、最外層にみられていた細胞の脱落はb-FGFを添加した場合に顕著にみられた(図4b)。

3) 網膜色素上皮細胞との混合培養

部分的に網膜色素上皮細胞を中心にした網膜細胞による層状構造の形成がみられた(図4c)。培養4～8週目において層構造が不明瞭となったが、網膜色素上皮に加えてb-FGFを添加した場合、楕円形の核を有する紡錘形の細胞が重層し、水晶体様の構造が形成されていた(図4d)。

3. 透過型電子顕微鏡による観察

1) 神経網膜単独での培養

培養開始後2週目に光学顕微鏡でみられた網状構造の部分には、神経突起の集合であると考えられる多数の細胞突起が存在し、その突起間にはデスモゾーム様の結合や、結合型シナプスと思われる部分もみられ、神経網膜に特徴的なシナプスリボンもみられた。一方、ロゼット形成部の内腔付近においては、電子密度の高い細胞間結合部により形成される外境界膜がみられ、細胞質内に油滴や、成熟した鶏の網膜視細胞内節やミューラー細胞末端などにみられるミトコンドリアの集積(エリブソイド)を有する

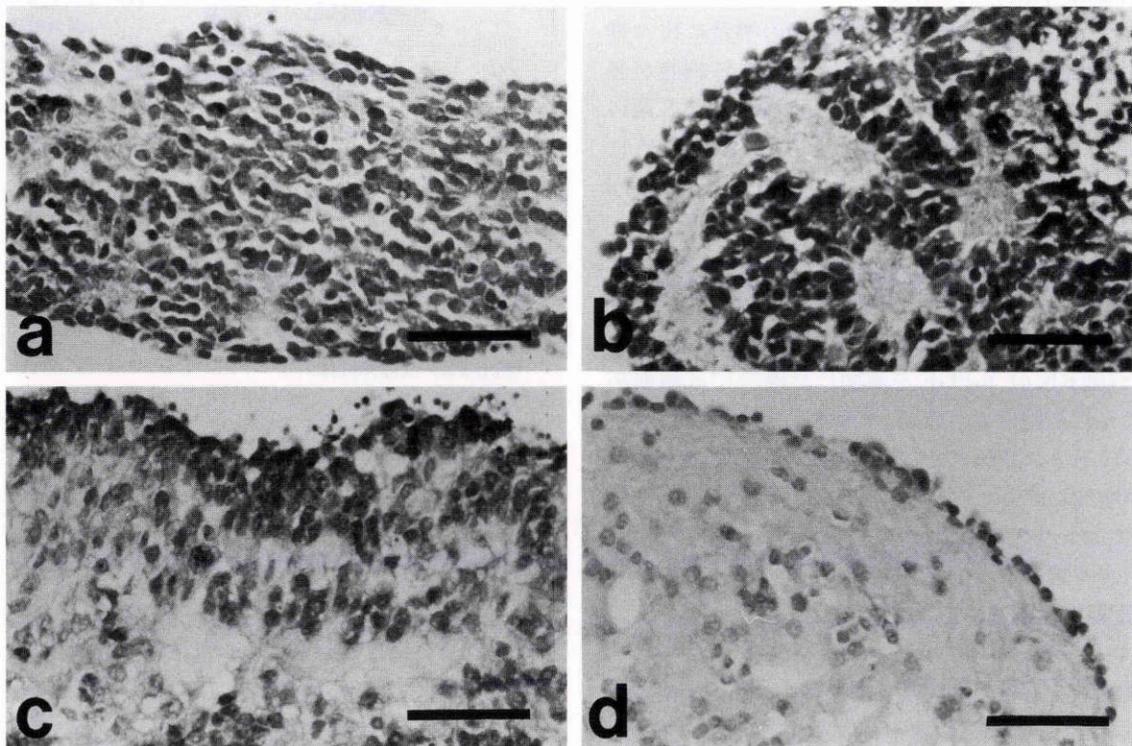


図3 神経網膜細胞培養の浮遊培養における細胞塊の構築(ヘマトキシリン・エオジン染色)。

a: 培養2日, ロゼット形成が始まる。b: 培養5日, ロゼットが形成される。c: 培養2週, 層状構造がみられる。d: 培養8週, バーは50 μ m

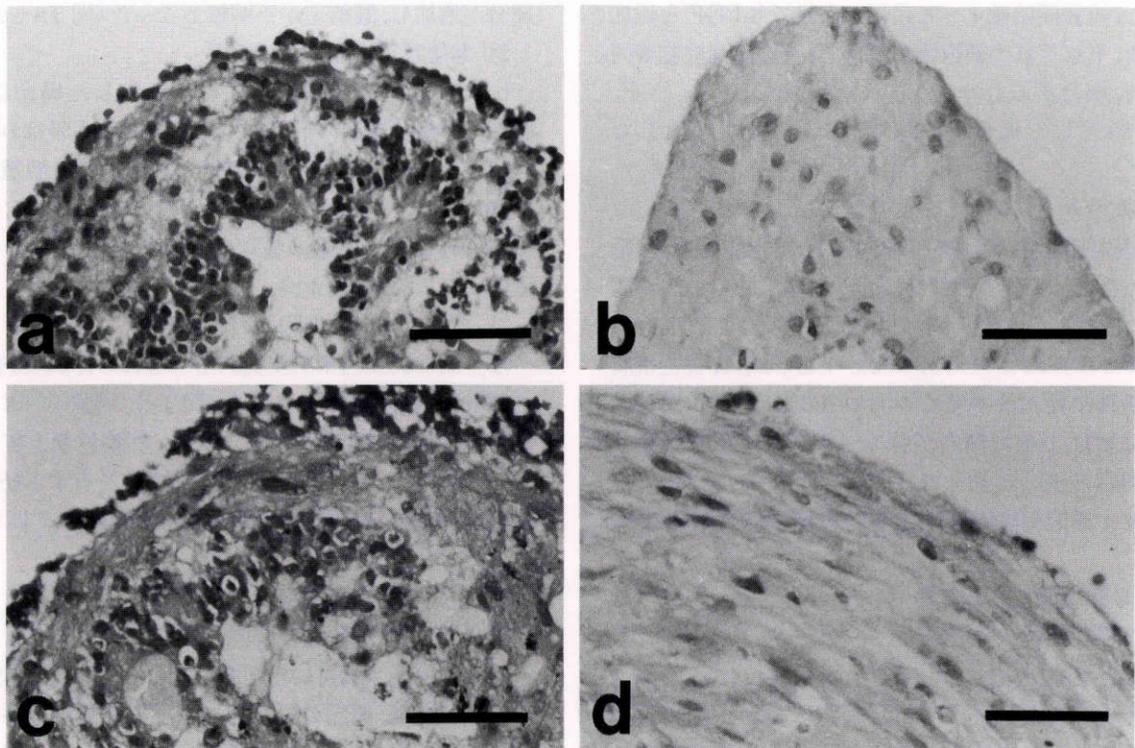


図4 増殖因子存在下および網膜色素上皮細胞との混合培養における細胞塊の構築(ヘマトキシリン・エオジン染色).
 a: EGF 存在下, 培養 4 週, b: b-FGF 存在下, 培養 8 週, c: 網膜色素上皮細胞存在下, 培養 4 週, d: b-FGF および網膜色素上皮細胞存在下, 培養 8 週, 水晶体上皮様細胞がみられる. バーは 50 μm

細胞もみられた. また, 同部には視細胞の繊毛および結合繊毛, 基底小体もみられた(図 5 a~d).

2) 増殖因子添加下での培養

b-FGF, EGF を添加した場合, 非添加の場合に比べ神経突起がやや発達し, ミュラー細胞と思われる細胞が多くみられた. また, b-FGF 添加の場合, 培養開始後 8 週目には, 細胞形質が中等度の電子密度を示す均質な物質に満たされた水晶体線維様の細胞が増加していた(図 6 a).

3) 網膜色素上皮細胞との混合培養

培養開始後 4 週目に粗面小胞体に富んだ細胞が増加し, 単独培養に比べ神経突起が発達し, シナプスリボンもみられた(図 6 b, c). b-FGF を添加した場合には粗面小胞体に富んだ細胞はみられず, 水晶体上皮細胞と思われる小型のミトコンドリアと微細顆粒状の物質に満たされた細胞が増加していた(図 6 d). また, EGF を添加した場合, ミトコンドリアの集積(エリプソイド)を細胞質に有する細胞が多数みられた(図 6 e).

4. 免疫組織化学法による検討(表 1)

1) 抗ロドプシン抗体

培養開始後 2 週目の細胞塊において, ロゼット腔の辺縁部に局限して, また細胞塊中に散在性に抗ロドプシン抗体陽性細胞がみられた(図 7 a, b). 培養開始後 4 週目には, EGF を添加した場合にのみ抗ロドプシン抗体陽性細胞が増加していた. しかし, 他の増殖因子を添加した細

表 1 抗ロドプシン抗体, 抗クリスタリン抗体および抗 b-FGF 受容体抗体陽性細胞の出現

添加因子	神経網膜細胞のみの培養				網膜色素上皮細胞との混合培養		
	無	b-FGF	EGF	NGF	無	b-FGF	EGF
〈抗ロドプシン抗体〉							
2 週目	+	+	+	+	+	+	+
4 週目	+	+	++	+	+	+	±
8 週目	+	NT	NT	±	±	±	NT
〈抗クリスタリン抗体〉							
2 週目	+	+	+	+	+	+	+
4 週目	+	+	+	-	++	++	-~±
8 週目	+	++	NT	+	++	+++	NT
〈抗 b-FGF 受容体抗体〉							
2 週目	-	-	+	-	+	++	+

++: 陽性細胞多数あり, +: 陽性細胞あり, ±: 陽性細胞はっきりしない, -: 陽性細胞なし, NT: 未検査
 DMEM; Dulbecco's modified Eagle medium. b-FGF; basic-fibroblast growth factor. EGF; Epidermal growth factor. NGF; Nerve growth factor

胞塊においては抗ロドプシン抗体陽性細胞はむしろ減少していた.

2) 抗クリスタリン抗体

培養開始後 2 週目の細胞塊において, 全体に淡く抗クリスタリン抗体陽性部分がみられた(図 7 c). 培養開始後 4 週目から, b-FGF を添加した場合, および網膜色素上

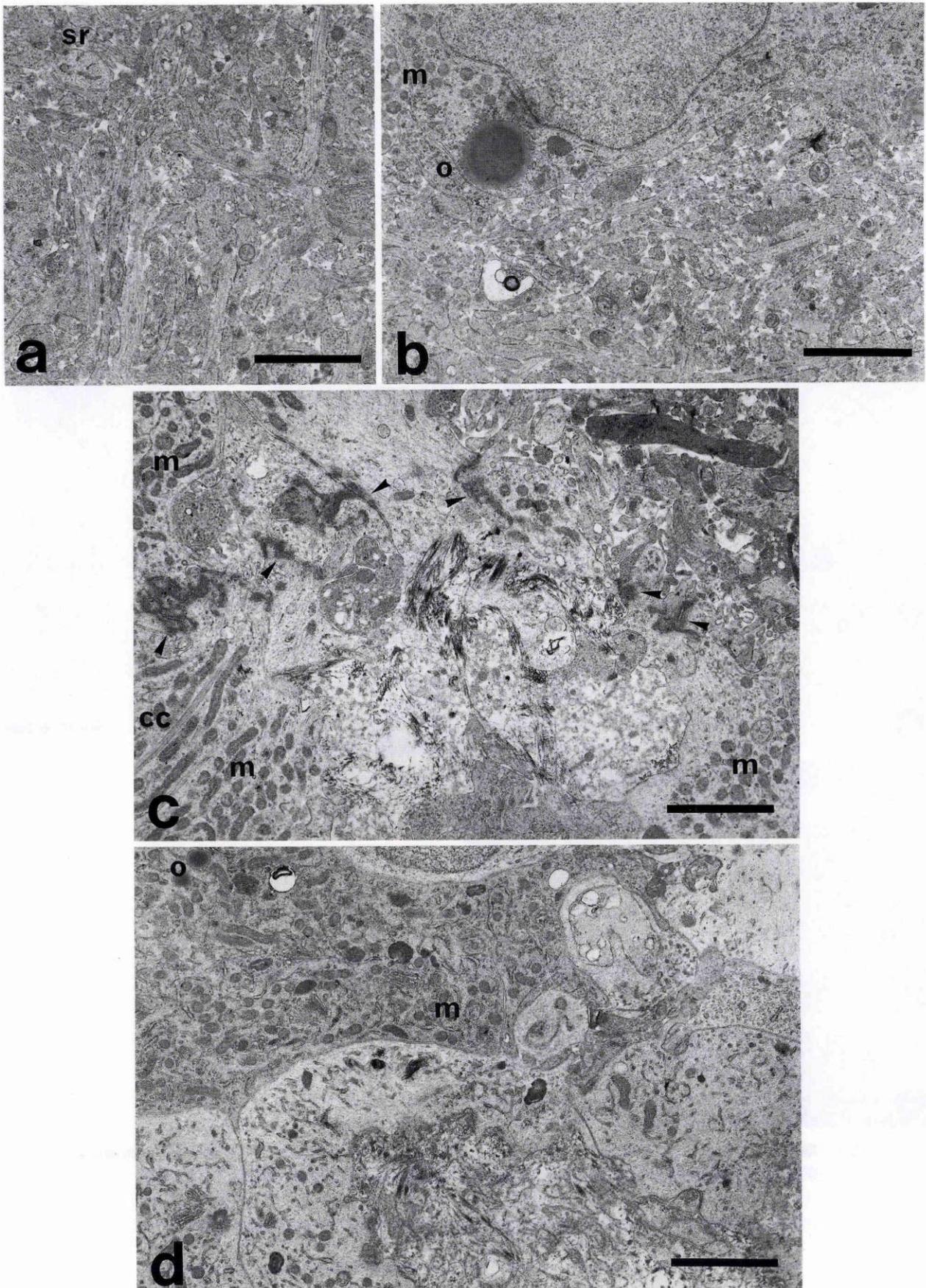


図5 透過型電子顕微鏡による神経網膜細胞塊の観察。

a～c: 培養2週, d: 培養4週, sr: シナプスリボン, 矢印: 接着帯(外境界膜), cc: 結合繊毛, m: ミトコンドリア, o: 油滴, バーは2 μ m

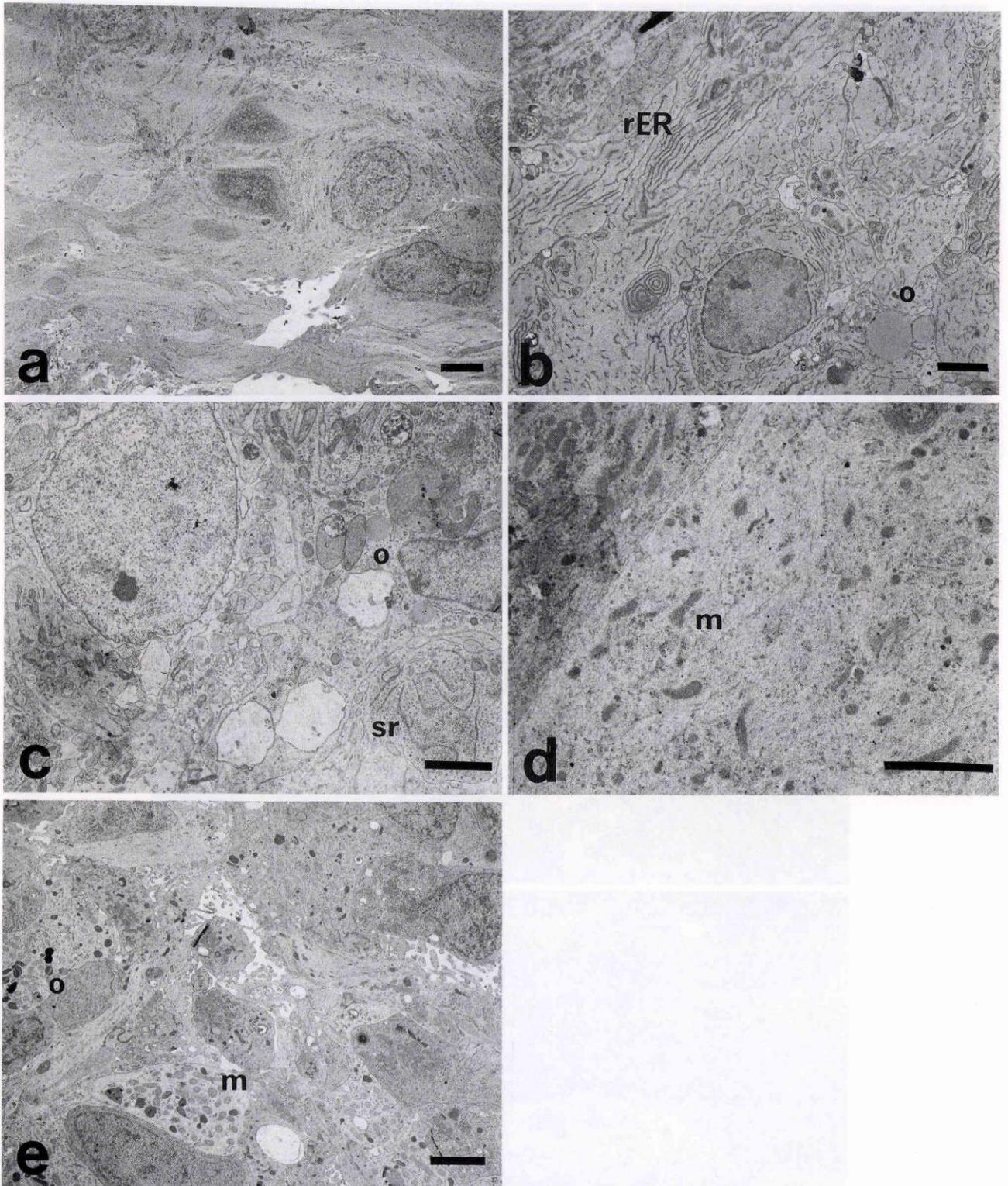


図6 増殖因子存在下および網膜色素上皮細胞との混合培養における細胞塊の構築(透過型電子顕微鏡による観察)。

a: b-FGF 存在下における水晶体様構造の形成. b, c: 網膜色素上皮細胞との混合培養. d: b-FGF および網膜色素上皮細胞存在下. e: EGF および網膜色素上皮細胞存在下. いずれも培養4週. sr: シナプスリボン, m: ミトコンドリア, o: 油滴, rER: 粗面小胞体, バーは2 μ m

皮細胞と混合培養した場合に, その抗クリスタリン抗体陽性部分は増加していた(図7d). さらに, b-FGF 添加下で網膜色素上皮細胞と混合培養した場合には, 培養開始後8週目に細胞塊の大部分が抗クリスタリン抗体陽性物

質で占められていた(図7e).

3) 抗 b-FGF 受容体抗体

培養開始後2週目の切片において, EGF を添加した場合および網膜色素上皮細胞を混合培養した場合に, 抗-

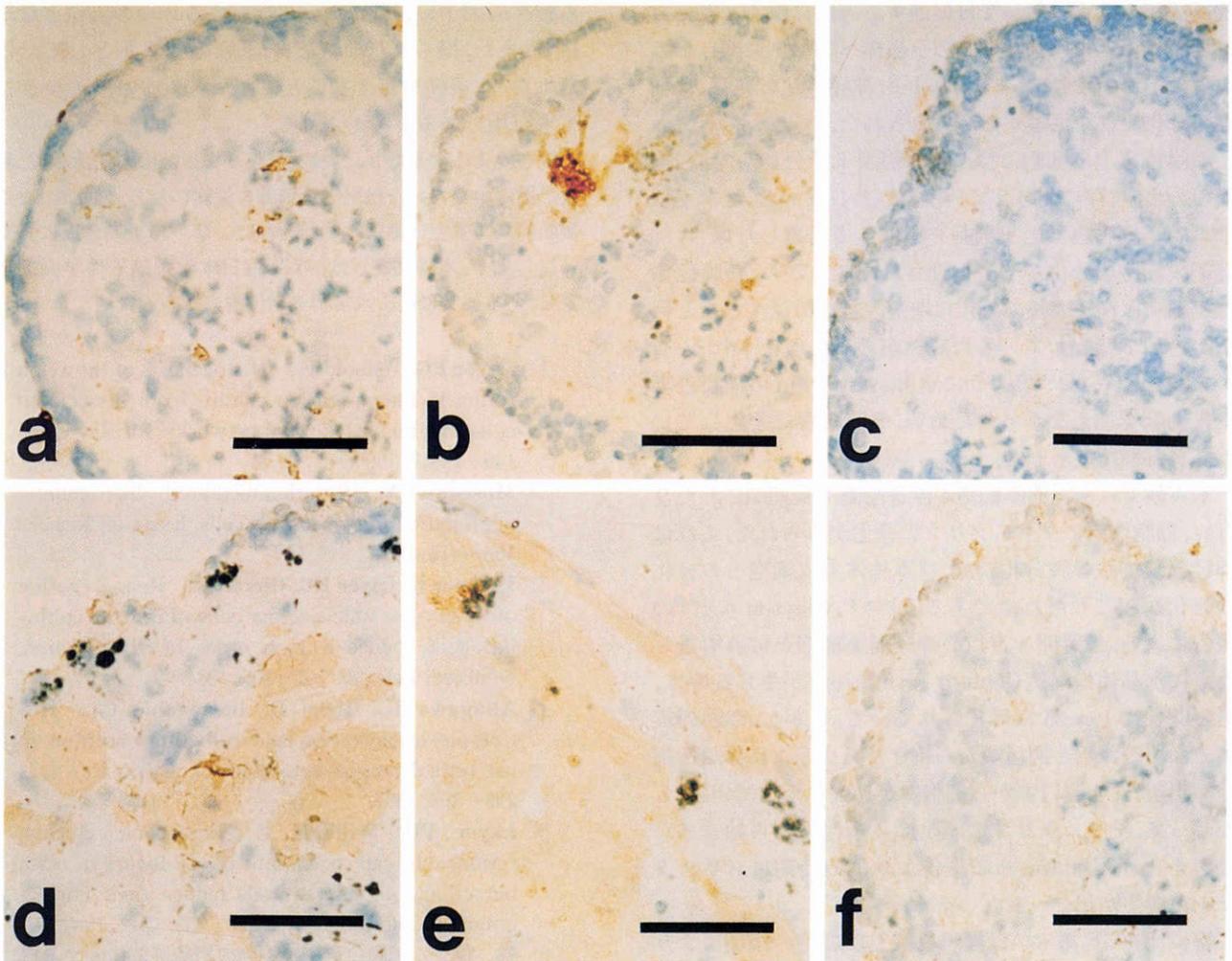


図7 免疫組織化学.

a: 抗ロドプシン抗体, 散在性に陽性細胞がみられる. b: 抗ロドプシン抗体, EGF および網膜色素上皮細胞存在下, ロゼット腔内に陽性細胞がみられる. c: 抗クリスタリン抗体, びまん性に淡く陽性細胞がみられる. d: 抗クリスタリン抗体, 網膜色素上皮細胞存在下, 塊状に陽性細胞が集合してみられる. e: 抗クリスタリン抗体, b-FGF および網膜色素上皮細胞存在下, 水晶体様に層状に陽性細胞がみられる. f: 抗b-FGF 受容体抗体, b-FGF および網膜色素上皮細胞存在下, 淡く陽性細胞がみられる. a, b, c, f: 培養2週, d, e: 培養8週, バーは50 μm

FGF 受容体抗体陽性部分が細胞塊全体に淡くみられた. 網膜色素上皮細胞を混合培養し, さらに, b-FGF を添加した場合には, 陽性部分の染まり方が強かった(図7f).

IV 考 按

単離した神経網膜の細胞がいったん細胞塊を形成した後に, 3日目頃から多数の細胞が脱落していった. これは細胞塊を形成して行く過程において細胞間の何らかの相互作用により, 不要な細胞が選別(sorting out)されていったものと考えられる. また, 細胞塊内で所々にみられた核の濃縮像はアポトーシス(apoptosis)の像であると考えられ, こうした選択的な細胞死が生じて神経網膜の構造を模倣する rosetted spheroid¹³⁾が形成されたと考えられる.

本実験で使用した孵卵7.5日目の鶏胚眼の後極部神経

網膜では既に視神経細胞層が形成され, 内網状層が出現してきているが, 網状層でのシナプス形成, 視細胞, ミュラー細胞などはまだみられない⁷⁾. 今回, 単離神経網膜細胞の浮遊培養によって得られた細胞塊においては, 神経網膜を模倣する層状構造の形成, シナプス形成, 視細胞, ミュラー細胞の形成がみられ, また, ロドプシンの産生もみられたことから, 細胞塊内で網膜細胞の分化が起こっていることが示された.

増殖因子のうち, b-FGF は神経網膜の分化と再生および脱分化, そして視細胞の生存, ミュラー細胞の増殖に関与するといわれている⁸⁾⁹⁾. また, NGF は神経節細胞とミュラー細胞に影響を与え, 神経の発達と維持に関与し神経細胞の細胞死にも関与しているといわれている⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾. 本実験においては, b-FGF や NGF は網膜神経細胞の細胞死に関しては大きな影響を与えないものの,

神経突起の発育に対しては促進する方向に働くと考えられ、特に b-FGF は神経網膜の水晶体への転化に関与していることが示された。また、EGF も神経突起の発育、視細胞の分化発育を促進すると考えられた。

網膜色素上皮細胞は種々の増殖因子を分泌し、神経網膜の分化、生存に関与しているといわれている¹²⁾。本実験において網膜色素上皮細胞を添加して培養した場合、神経網膜細胞の分化がやや促進されたことから、網膜色素上皮細胞は神経網膜の分化に増殖因子を分泌するなど何らかの形で関与している可能性があると考えられる。しかし、Layer Ⅰ³⁾⁵⁾¹³⁾のように ciliary margin の網膜色素上皮細胞を加えなかったためか、その影響は予想していたよりも軽度であった。

本実験では神経網膜細胞の浮遊培養を長期間にわたり行い、細胞塊内にクリスタリンの産生がみられた。これは神経網膜細胞の脱分化、および水晶体上皮細胞への分化の転化が起こったためであろう^{14)~16)}。Clayton ら¹⁷⁾¹⁸⁾の報告によると、孵卵 8 日目の神経網膜細胞を付着培養した際に水晶体様構造 (lentoid formation) が生じるのは、培養開始後 19~25 日目とされている。しかし、今回の実験では培養開始 2 週目頃から抗クリスタリン抗体陽性細胞が出現し、4 週目頃から細胞塊が拡大してきている。したがって、クリスタリンの産生は 2 週目頃から始まったと考えられ、Clayton らの報告より早い時期にクリスタリンの産生が起こったといえる。

特に、b-FGF あるいは網膜色素上皮細胞の添加によりクリスタリンの産生が促進され、さらに、その両者の添加により水晶体様の構造が形成されたことから、これらの因子が共同して神経網膜細胞の脱分化および水晶体上皮細胞への分化の転化に影響を与えている可能性がある¹⁴⁾¹⁹⁾。他方、網膜色素上皮細胞から水晶体上皮細胞への分化の転化を b-FGF が促進するという報告¹⁴⁾もあるので、本実験で、培養に添加した網膜色素上皮細胞が b-FGF の存在下で、水晶体上皮細胞に転化したとも考えられる (筒井康子、論文執筆中)。また、b-FGF 存在下で、神経網膜細胞と網膜色素上皮細胞を混合培養した際に、細胞塊内に抗 b-FGF 受容体抗体陽性部分が顕著にみられた。これは、b-FGF 受容体の出現が水晶体上皮細胞への分化の転化に関与していることを示していると考えられる。

振盪培養においては巨大な細胞塊が形成されるが、中心部壊死に陥る可能性がある。我々の方法では得られた細胞塊は小さく、部分的に神経網膜を模倣する構造がみられ、長期間の培養にたえることができた。しかし、神経網膜の変性もしくは異形成と考えられる構造の部分もあり、完全には正常な神経網膜を再構築するには至らなかった。今後、網膜が正常に分化するような条件や因子を採す必要がある。

この培養方法は、網膜の分化および分化の転化に対す

る種々の因子の影響について検討する一つの方法となり得る。また、得られた細胞塊は、網膜のモデルとしてだけでなく、条件を変えることにより水晶体のモデルとしても有用であると考えられる。

稿を終えるに当たり、ご校閲を賜りました松尾信彦教授、直接ご指導いただいた松尾俊彦講師に深謝いたします。また、ご援助頂いた教室の細田 彰、光岡健之、進 輝子の諸氏に感謝いたします。本論文要旨は、第 34 回日本網膜硝子体学会で発表した。本論文は岡山大学審査学位論文である。

文 献

- 1) Layer PG, Wilbold E: Histogenesis of the avian retina in reaggregation culture from dissociated cells to laminar neuronal networks. *Int Rev Cytol* 146: 1-47, 1993.
- 2) Moscona A: Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. *Exp Cell Res* 22: 455-475, 1961.
- 3) Vollmer G, Layer PG, Gierer A: Reaggregation of embryonic chick retina cells: Pigment epithelial cells induce a high order of stratification. *Neurosci Lett* 48: 161-196, 1984.
- 4) Akagawa K, Hicks D, Barnstable CJ: Histiotypic organization and cell differentiation in rat retinal reaggregate cultures. *Brain Res* 437: 298-308, 1987.
- 5) Layer PG, Wilbold E: Embryonic chicken retinal cells can regenerate all cell layers *in vitro*, but ciliary pigmented cells induce their correct polarity. *Cell Tissue Res* 258: 233-242, 1989.
- 6) 林 倫子: 網膜色素上皮細胞の組織培養に関する研究. *日眼会誌* 81: 692-700, 1977.
- 7) 藤沢 肇: 網膜の組織発生. 山田英智, 他(編): 人体組織学, 第 7 巻, 感覚器, 第 1 版, 朝倉書店, 東京, 179-297, 1984.
- 8) Park CM, Hollenberg MJ: Growth factor-induced retinal regeneration *in vivo*. *Int Rev Cytol* 146: 49-74, 1993.
- 9) 島田ひろき, 吉竹佳乃, 西川克三: FGF とそのファミリー. *細胞* 27: 341-344, 1995.
- 10) 山村康子, 井川洋二: サイトカインと免疫応答ーアポトーシス. *臨床免疫* 27: 383-388, 1995.
- 11) 池内俊彦: サイトカインとそのレセプター: 成長因子 NGF ファミリー. *臨床免疫* 27: 277-285, 1995.
- 12) Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, Johnson LV, Bok D: Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* 15: 4992-5003, 1995.
- 13) Wolburg H, Wilbold E, Layer PG: Muller glia endfeet, a basal lamina and the polarity of retinal layers form properly *in vitro* only in the presence of marginal pigmented epithelium. *Cell Tissue Res* 264: 437-451, 1991.
- 14) 阿形清和, 江口吾朗: 分化転換の分子機構. *実験医学* 9: 686-691, 1991.
- 15) 恒松康彦: 眼領域の組織培養. 水晶体の分化. *眼科* 28: 113-118, 1986.

- 16) **De Pomerai DI, Clayton RM**: Influence of embryonic stage on the transdifferentiation of chick neural retina cells in culture. *J Embryol Exp Morphol* 47: 179—193, 1978.
 - 17) **Takagi S, Kondoh H, Nomura K, Okada TS**: Lentoid genesis from neural retina cells in culture is affected by interactive relationships between different cell types. *J Embryol Exp Morphol* 73: 97—109, 1983.
 - 18) **Clayton TS, Thomson I, De Pomerai DI**: Relationship between crystallin mRNA expression in retina cells and their capacity to re-differentiate into lens cells. *Nature* 282: 628—629, 1979.
 - 19) **大内淑代, 野地澄晴**: 眼の発性運命と分化方向の決定機構—レンズ誘導実験からの示唆. *実験医学* 12: 53—58, 1994.
-