



Angiogenesis and haemopoiesis in the rat visceral yolk sac under different oxygen concentrations in vitro

大崎, 登志子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1988-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0703

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000703>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	おおさき としこ (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第562号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和63年3月31日
学位論文題目	ANGIOGENESIS AND HAEMOPOIESIS IN THE RAT VISCERAL YOLK SAC UNDER DIFFERENT OXYGEN CONCENTRATIONS IN VITRO (種々の酸素濃度下で培養したラット卵黄囊における血管及び 血球の発生)
審査委員	主査 教授 中井久夫 教授 溝口史郎 教授 住野公昭

論文内容の要旨

緒言

妊娠9.5および10.5日のラットの全胎仔(胎仔+卵黄囊)は、1~2日の培養期間中、母体内にほぼ相当した発育を遂げる。この間ラットにおいては神経管や体節の形成、胎仔循環の開始などの発生学上重要な現象が起こる。卵黄囊は血島が最初に出現する場所であり、胎仔の血球細胞は全てこの卵黄囊の血島から由来する。またラットにおいては、卵黄囊は胎仔栄養の吸収の場所であり、吸収された栄養は卵黄囊の血管を経由して胎仔に運ばれることから、卵黄囊における血管や血球の発生は、胎仔の発育にとって極めて重要な意味を持っている。全胎仔培養に使用される混合ガスの酸素濃度は、胎仔の発生段階により異なっており、経験的に9.5~10.5日では5%、10.5~11.5日では20%、それ以降では95%の酸素が至適濃度とされている。事実、それよりも高あるいは低酸素下では、胎仔の発育は著しく抑制される。しかし、全胎仔培養に広く用いられるこれらの酸素濃度が卵黄囊における血管や血球の発生に及ぼす影響については、これまで殆ど調べられていない。本実験では、妊娠9.5および10.5日のラットの全胎仔を、5%、20%あるいは95%の酸素下で培養し、卵黄囊における血管や血球の発生に対する酸素濃度の影響を光顕と電顕で観察した。

材料及び方法

雌雄のWistar系ラットを一夜同室させ、雌の膣スメアに精子を確認した日の正午を妊娠0.5日

とした。妊娠9.5および10.5日のラットから子宮を剔出し、ハンクス液の中で子宮の筋層と脱落膜を除去し、さらにReichert膜を開いて全胎仔を取り出した。雄ラットの血清を培養液とし、5%、20%、95%酸素下で1~2日回転培養した。培養終了後、卵黄囊の外観を観察した後、卵黄囊のみを採取した。なお対照群として、妊娠9.5、10.5および11.5日の胎仔の卵黄囊を用いた。光顕用にはこれらの卵黄囊を10%ホルマリンで固定し、アルコール脱水後パラフィンに包埋し、厚さ5 μ の連続切片を作製してH-E染色を施した。電顕用には、卵黄囊を2%パラホルムアルデヒドと1%グルタルアルデヒドの混液で1時間固定し、オスミウム酸による後固定の後、アルコール脱水を経てエポキシ系樹脂に包埋し、超薄切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色した。

結 果

肉眼所見：妊娠9.5日から1日目5%または20%酸素下で24培養した全胎仔の卵黄囊の、特に胎盤側（反子宮間膜側）部に多数の血島が観察された。これは妊娠10.5日の卵黄囊における所見とほぼ同じであった。しかし妊娠9.5日の全胎仔を95%酸素下で1日培養すると、卵黄囊における血島形成は認められなかった。妊娠9.5日の全胎仔を、5%酸素下で2日間、または1日目5%、2日目20%の酸素下で培養した場合、あるいは10.5%日の全胎仔を5%または20%の酸素下で1日培養すると、卵黄囊表面にはよく発達した血管網が形成され、スムーズな血流が観察された。これは妊娠11.5日の胎仔の卵黄囊の所見と同じであった。一方、妊娠9.5日の全胎仔を1日目20%、2日目95%の酸素下で培養した場合、あるいは10.5日の全胎仔を95%酸素下で1日培養した場合には、卵黄囊における血管形成は胎盤側部に限局しており、血流は観察されなかった。

光顕および電顕所見：妊娠9.5日のラット胎仔においては卵黄囊の中胚葉層にいくつかの小細胞塊が観察された。これらを構成する細胞は円形で、丸くて明るい核と、塩基性好性の細胞質を持っていた。電顕的には、細胞質はポリゾームで満たされており、短い粗面小胞体や小さいミトコンドリア、未発達のゴルジ装置を含んでいた。妊娠9.5日から5%または20%酸素下で1日培養した全胎仔では、卵黄囊の胎盤側部に血島が観察された。血島の辺縁部に位置する細胞（血管内皮細胞）は紡錘形で楕円形の核をもち、中央部に位置する細胞（血球細胞）は円形で、丸い大きな核を持っていた。血球細胞の核や細胞質は電子密度が高く、後者は多くのポリゾームやリボゾームを含んでいた。散在性に分布するミトコンドリアの多くは、はっきりとしたクリスタを備えていたが、軽度膨化したミトコンドリアも少数ながら認められた。一方、卵黄囊の胎仔側（子宮間膜側）部には、血島に分化する前の小細胞塊が多数観察された。しかし妊娠9.5日から95%酸素下で1日培養した全胎仔の卵黄囊には血島はほとんど認められず、多数の中胚葉細胞は濃染した核を持ち、細胞質は種々の大きさの顆粒を含んでいた。電顕的には、多くのファゴゾームと膨化したミトコンドリアが特徴的であった。

妊娠9.5日から2日間5%酸素下で、あるいは1日目5%、2日目20%の酸素下で培養した全胎仔や、10.5日から20%酸素下で1日培養した全胎仔においては、卵黄囊全体に、広い管腔を持つ血管が観察され、その内に多数の血球細胞が認められた。血管内皮細胞は扁平で、長楕円形の核

と、明るく狭い細胞質を持っていた。血球細胞は円形で、濃染する丸い核と暗調な細胞質を持っていた。電顕観察では、高電子密度の細胞質にリボゾームが散在性に分布し、少数のミトコンドリアが観察されたが、そのいくつかは高度に膨化していた。これに対して、妊娠9.5から1日目20%、2日目95%酸素下で培養した全胎仔や、妊娠10.5日から1日目95%酸素下で培養した全胎仔の卵黄嚢には、胎盤側部のみに内腔の狭い血管が観察され、血球細胞も少なかった。これらの血球細胞の核は小さく暗調で、細胞質も濃染していた。電顕観察では、高電子密度の細胞質に少数のリボゾームが散在し、いくつかのファゴライソゾームが観察された。またほとんどのミトコンドリアが高度に膨化していた。

考 察

ラットの卵黄嚢における血管形成や血球の発生は、妊娠9.5日頃まず胎盤を取り巻く部分に始まり、胎仔側部へと進んで行く。そして10.5~11日頃血液循環が始まる。本実験の結果は、この間の血管や血球の分化が卵黄嚢全体で一様ではなく、胎盤側部の方が胎仔側部よりも進んでいること示している。

妊娠ラットの子宮内で、胎仔を取り巻く環境の酸素分圧は40~90mmHgぐらいであろうと推測されている。本培養系における5%、20%、95%酸素下での血清中の酸素分圧はおよそ60mmHg、150mmHg、680mmHgであるから、5%酸素下で母体内とほぼ同じ、20%酸素下ではやや高く、95%酸素下では著しく高いことになる。本実験において、妊娠9.5日と10.5日のラット全胎仔を5%あるいは20%酸素下で培養した場合、卵黄嚢における血管形成や血球分化は母体内とほとんど同じであった。しかし妊娠9.5日全胎仔を95%酸素下で培養すると、卵黄嚢における血島形成は著しく障害され、また10.5日の全胎仔を95%酸素下で培養すると、卵黄嚢における血管形成は胎盤側部のみ観察された。このことは、高酸素は血管や血球発生の初期過程で、特に未分化な細胞に対して強い障害を与える事を示唆している。

細胞の変性は、発生の過程で普遍的に見られる現象である。核濃縮、細胞質の電子密度の増加、ミトコンドリアの膨化、ポリゾームの消失などは、変性細胞の特徴的所見で、これらは核の機能低下によるものであると考えられている。正常な赤血球分化の過程でも、これと全く同じ形態変化が観察されることから、我々は、赤血球の分化過程は一種の細胞変性の過程であろうと考えている。高酸素によって引き起こされる細胞変性のメカニズムは未だ十分には解明されていないが、我々は別の実験で、胎仔内組織に高酸素に当てると細胞質に多くのファゴゾームが形成されるが、核の機能低下による細胞変性像はほとんど観察されないことを示した。しかし本実験において、卵黄嚢の血球細胞に高酸素を当てると、ファゴゾームの形成のならず、対照群に比べて核濃縮やミトコンドリアの膨化などの変化が著明であった。このことは、高酸素は血球細胞に対しては、ライソゾーム刺激による細胞変性のみならず、核の機能低下による細胞変性（すなわち赤血球の分化）の過程を促進する可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

ラットの発生においては、胚葉の形成が始まる妊娠9.5日から11.5日にかけて、重要な事件が相次いで起こり、胎仔形成の基礎ができあがる。特に、卵黄囊表面に血島が出現する。胎仔の血球細胞は全てこの血島に由来し、胎仔の栄養は卵黄囊において吸収され、その血管によって胎仔に供給されるのであるから、卵黄囊における血球及び血管の形成は、胎仔のその後の発育にとって死活の問題である。この時期の胎仔をとりまく環境の酸素濃度と卵黄囊の血管発生の関係については、殆ど研究がない。本研究は、この点を明らかにすべく、妊娠9.5日及び10.5日のラットを用い、種々の酸素濃度下で培養し、卵黄囊の血球及び血管の発生を、光顕、電顕によって観察したものである。

方 法

ウィスター系ラットを用い、妊娠9.5日及び10.5日のラットより全胎仔をとりだし、Newらの方法に従って1-2日培養した。培養環境中の酸素濃度は、5%、20%、95%とし、培養終了後、卵黄囊を含む全胎仔を採取した。対照として、母体内で発育した妊娠9.5、10.5日、11.5日のラット全胎仔を用いた。

卵黄囊はホルマリン固定後、パラフィンに包埋し、H-E染色にて光顕で観察した。電顕用には、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド混液で固定後、オスミウム酸後固定し、型のごとく包埋、薄切、染色し、観察した。

結 果

肉眼的には、妊娠9.5日より、1-2日間5%および20%酸素下で培養した胎仔においては、同じ妊娠日数のin vivoの胎仔と、ほぼ同程度の血島や血管形成がみられたが、95%酸素下の一日培養や、一日目2%、二日目95%酸素下の培養では、血島や血管の形成は、著しく抑制されていた。

in vivoの妊娠9.5日ラット胎仔では、明るい円形の核と、塩基好性の細胞質をもつ細胞の塊が卵黄囊中胚葉の中に出現し、これが血島へと分化するが、まず反子宮膜側に生じ、やがて子宮間膜側部に及ぶ。しかし、95%酸素下で一日培養すると、血島への分化が著明に抑制され、中胚葉細胞は、濃染した核と、種々の大きさの顆粒を含むなどの変性像を示す。電顕的には、多くのファゴライゾームと膨化したミトコンドリアが認められた。

妊娠9.5日の胎仔を二日間5%、及び一日目5%二日間20%酸素下で培養すると、広い管腔をもち中に多数の血球をもつ血管が卵黄囊全体に観察されたが、一日目20%二日目95%酸素下で培養すると、血管形成は反間膜側に局限され、血球細胞も著しく少数であった。電顕的には、高電子密度の細胞質に、少数のリボゾームと、いくつかのファゴライゾームがみられ、ミトコンドリアは、高度に膨化していた。

考 察

ラット卵黄囊における血球形成と血管発生は妊娠9.5日頃始まるが、それは反間膜側に始まり、次いで間膜側に及ぶことが本実験から明らかになった。次に、95%酸素の培養環境における酸素分圧は、測定の結果、子宮内のそれに比べて著しく高いものであった。そして、95%酸素下で培養すると、血島及び血管形成の著明な抑制がおこった。このことは、高酸素は、発生の初期の段階では、特に未分化な細胞に対して、強い抑制的ないし障害的影響を与えることを示すものである。一方発生の過程は、正常でも細胞の変性を広範に伴うものであるが、そのうち核濃縮、ミトコンドリアの膨化、ポリゾームの消失等は、核の機能低下によるものと考えられている。本実験でみられた赤血球芽細胞における核濃縮やミトコンドリアの膨化等の変性所見は、必ずしも高酸素によるライソゾームの活性化による変性とみなされるものではなく、むしろこれらの細胞が高酸素に触れることにより、核の機能低下が起こり、無核化及び無ミトコンドリア化という赤血球の特異性の完成が促進された結果であるとみなすべき可能性を示すものである。

以上本研究は、ラットの卵黄囊における血球および血管の発生という、胎仔発育に死活の重要性を持つ現象について、妊娠9.5日から妊娠11.5日という、至適酸素濃度の激変する時期において、酸素濃度の影響を系統的に研究したものであり従来ほとんど行われていなかった、胎仔培養の微細形態観察に動的記述と、赤血球形成における合目的的意義について、重要な知見を得たものとして、価値ある業績であると認める。よって本研究は、医学博士の学位を得る資格があると認める。