

### 3. 改良無血清合成培地を用いたマウス小脳培養系

#### b. 立体的な小脳培養（プルキンエ細胞樹状突起の特異的な方向性は 何によって規定されているか？）

永田 功、木村-黒田純子（東京都神経科学総合研究所、脳構造）

マウスの小脳皮質は魚類からヒトまで数種類のニューロンで構成される比較的単純な繰り返し構造が密に詰まった、“柔らかい結晶”とも言える組織構築をしている。プルキンエ細胞や主な抑制性介在ニューロンは分子層を構成する顆粒細胞無随軸索の3次元的な束である平行線維に対して3次元的に直交し、顆粒細胞の上向軸索は2次元的に直交している。培養の当初は、「プルキンエ細胞の樹状突起は2次元的な分散培養でも皮質中の樹状突起に似たフラットな構造が形成されるのだから立体的に再現するのも簡単だろう」と気軽に考えて、マウス小脳の解離細胞を3次元ゲル内で分散培養したが、樹状突起は線維束に対して3次元的には直交しなかった。そこで、改めて下記のように2次元的な分散培養から始めてオーガノティピックな微小組織片培養へと段階的に立体的になるように試みた。その結果、プルキンエ細胞の樹状突起は薄い線維束に対しては2次元的に直交し、3次元な線維束が形成された部位でのみ3次元的に直交することが判明した。いずれの培養も、基礎培地には DMEM/F-12 を用いインシュリン、トランスフェリン、NaSe、T4、アルブミン、NGFなどを加えた無血清合成培地を用いた。しかし、いまだに生体と同様な一枚の平らで広い面積をもつ樹状突起を立体的に培養することには成功していない。その理由として、小脳特有なバグマングリアの配列や平行線維（厚みのある線維束）がプルキンエ細胞樹状突起の発達に時間的・空間的に共役して形成される必要性があるからではないかと思われる。小脳は単純であるが、培養でそれを完全に再現しようとするとは結構“手ごわい”脳組織である。

- 1、マウス小脳の分散単層培養（生後 0-1 日）
- 2、微小組織片培養の線維束上で解離した小脳細胞を共培養
- 3、ラミニンを含む 3 次元ゲルでの分散培養（生後 0-1 日）
- 4、Organotypic slice culture（生後 7 日）
- 5、Microexplant culture（生後 7 日）
- 6、“Organotypic microexplant culture”（生後 7 日）