

# 修士学位論文

## 論文題名

マウス胚性幹細胞に対するアルコールの影響

Effects of alcohol on mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells

平成 24 年 1 月 6 日 提出

首都大学東京大学院

人間健康科学研究科 博士前期課程 人間健康科学専攻

フロンティアヘルスサイエンス学域

学修番号：10898604

氏名：小松 城光

(指導教員名： 井上 順雄 )

## [要旨]

脳神経系が正常に発達していく上で、神経幹細胞の増殖と分化が正常に進められていくことが、正常な中枢神経系が構築されるために極めて重要である。発達期の脳内には、増殖能と分化能を有している神経幹細胞が存在している。この神経幹細胞が神経細胞やアストロサイトなどの中枢神経系を構成する細胞を産生していることから、神経幹細胞への悪影響は、出生後の脳の構築異常や障害を引き起こす原因となることが考えられる。一般的に飲用に用いられているアルコールは、母体を通じて胎児に影響を与えることによって、小頭症や胎児性アルコール症候群などの発達神経毒性を示す。特に、胎児性アルコール症候群においては、胎児期に母体の飲酒によりアルコールに曝露することによる、顔面異常・中枢神経機能障害・発育遅延の症状がみられる。これらより、アルコールは胎生期の神経幹細胞の増殖や分化などに重大な影響を与えられと考えられるが、これまで十分な研究は行われていない。そこで、本研究では、マウス胚性幹細胞(ES細胞)から Neural stem sphere(NSS)法によって調整した均質な神経幹細胞を用いて、神経幹細胞に対するエタノールの影響を検討した。

まず、培養液中に最終濃度 1,3,10,30,55,100mM のエタノールを添加し、5日間培養する事によって、神経幹細胞に対するエタノールの影響を確認し、増殖曲線の作成と形態の確認を行った。その結果、30mM以下の濃度では無添加の細胞と増殖速度は同じであったが、55mM,100mMでは増殖速度が低下した。また細胞の形態も突起が長く伸びた細胞へと変化した。次にエタノールの暴露時間の違いによる影響を検討した。最終濃度 100mM のエタノールを 1時間添加すると、無添加の細胞に比べて緩やかではあるが細胞増殖が認められた。しかし、3時間以上添加すると細胞の増殖が強く抑えられ、それ以上の添加時間でも増殖曲線に変化はなかった。

これらの結果から、神経幹細胞へのエタノール添加によって、ある一定の濃度や暴露時間を超えると細胞の増殖が抑えられることが明らかになった。また神経幹細胞の形態変化から、正常な神経幹細胞が維持されないことが判明した。これらの結果より、妊娠時におけるある一定の濃度を超えるアルコールの摂取は、神経幹細胞に強い悪影響を与え、胎児への神経系の悪影響を引き起こす一因になる可能性がある。

キーワード：胚性幹細胞、神経幹細胞、アルコール、細胞増殖

[Abstract]

When cerebral nerve system develops normally, it is extremely important that an increase and the differentiation of the nerve trunk cell are pushed forward normally so that the normal central nervous system is built. The alcohol used for drinking generally shows the development neurotoxicity such as microcephalia or the fetal alcohol syndrome (FAS) by affecting a fetus through a mother's body. It is thought that the alcohol has a serious influence on an increase or the differentiation of the nerve trunk cell of the developing in the womb period than these, but it is not studied enough till now. Therefore, in this study, I used the homogeneous nerve trunk cell which adjusted it by Neural stem sphere (NSS) method from a mouse embryonic stem cell (an embryonic stem cell) and examined influence of the alcohol for the nerve trunk cell.

At first, I added ethanol of final concentration 1,3,10,30,55,100mM in culture fluid and confirmed influence of the ethanol on nerve trunk cell by culturing it five days and confirmed making and the form of the increase curve. As a result, the increase speed was the same as an additive-free cell by the density less than 30mM, but increase speed deteriorated in 55mM,100mM. In addition, the form of the cell changed to the cell that a projection was prolonged for a long time. I examined influence by the difference of the revelation time for alcohol next. It was gentle, but cell proliferation was accepted in comparison with the additive-free cell when I added ethanol of final concentration 100mM for one hour. However, the increase of the cell was strongly suppressed when I added it more than three hours, and shaved it, and there was not the change in an increase curve even in addition time more than it.

Key words: Embryonic stem cells, Neural stem cells, Alcohol, Cell proliferation

## 【緒言】

アルコールは最も身近な毒物のひとつである。アルコールは広く一般に飲用されており、世の中になくってはならない存在である。その一方で、妊娠中の女性がアルコールを摂取することは胎児にとって非常に危険なこととされている。このことはほとんどの酒類に記載されていることだが、どのようにしてアルコールが胎児へ悪影響を与えるかは現在のところ詳しく分かってはいない。妊娠中のアルコール摂取によって、胎児が小頭症や胎児性アルコール症候群などを引き起こすことが広く知られている。胎児はアルコールを分解する能力をもたず、母体がアルコールを摂取することで、胎盤を通じてアルコールにさらされることになる。また、胎生期には脳内で神経幹細胞をはじめとした神経系の細胞が活発に増殖する。この神経系細胞の増殖をアルコールが阻害し、小頭症や胎児性アルコール症候群<sup>1)</sup>などの発達神経障害を引き起こすのではないかと考えられている。発達期の脳内での神経系細胞へのアルコールの影響は、マウスへの経口投与による胎児への影響を検討したものの<sup>2)</sup>や細胞周期に対して影響を与える報告<sup>3)</sup>などがある。しかし、神経幹細胞がアルコールによってどのような影響を受けるかという報告は数少ない。これは、生体から神経幹細胞を単離して取り出すことが難しいためであり、取り出すことができたとしても神経幹細胞としての性質を維持させることが難しかったという背景がある。そこで、*in vitro*での研究を可能にするために、井上らによって様々な神経幹細胞の培養法や分化誘導法が開発<sup>4)9)</sup>された。その一つであるNSS法を用いて胚性幹細胞(ES細胞)から神経幹細胞のみを単離して研究を行うことが可能になった。

本研究では、アルコールの毒性を培養神経系細胞のレベルで検討するために、マウスES細胞からNSS法によって分化誘導・調製した均質な神経幹細胞の増殖に対するエタノールの影響を検討する。エタノールの濃度変化によって細胞増殖に影響が出るのか、またエタノールに曝露する時間によっても細胞増殖に影響が出るのかについて検討を行う。前者には、エタノールの濃度によって神経幹細胞へどのような影響の違いが確認されるかを調べる目的がある。この実験は、例えば妊娠している女性がエタノールを摂取すると、濃度依存的に胎児への影響が出るかを調べるための基礎を目指している。後者には、高いエタノール濃度を添加し、時間依存的に神経幹細胞へ与える影響がどのように変化するかを調べるという目的がある。

## [方法]

### 1. 試薬の調製

#### 1.1. マウス胚性線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) 用培養液

ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium; DMEM) (Invitrogen, 11965-092) に, ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum; FBS) (第一化学薬品) を 10 %, ペニシリンストレプトマイシン (Penicillin-streptomycin; PC-ST) (100×) (Sigma) を 1 % の濃度で添加し, 4℃で保存した。MEF 用培養液 500 ml 調製のため, DMEM 450 ml に, FBS を 50 ml, PC-ST を 5 ml 添加した。

#### 1.2. リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) (-)(10×)(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free)

リン酸一カリウム 1.0 g, リン酸二ナトリウム十二水和物 14.5 g, 塩化カリウム 1.0 g, 塩化ナトリウム 40.0 g (和光純薬工業) を, 滅菌超純水 500 ml に溶解し, 攪拌機で攪拌後, オートクレーブ滅菌した。オートクレーブ滅菌後は, 室温で保存した。使用する際には, 滅菌超純水で 10 倍に希釈して使用した。

#### 1.3. 0.25 % Trypsin/0.02 % EDTA 溶液

2.5 % Trypsin (10×) liquid (Invitrogen) を PBS(-) で 10 倍に希釈し, Trypsin の濃度を 0.25 % とした。この溶液に 2 % EDTA · 2Na (同仁化学研究所) 溶液を 1/100 量添加し (最終濃度 0.02 %), 4℃で保存した。

#### 1.4. 1 mg/ml マイトマイシン C (Mitomycin C) 溶液

Mitomycin C (和光純薬工業) 10 mg を, 滅菌超純水 10 ml に溶解し (最終濃度 1 mg/ml), 0.22 μm フィルター (Millipore) で濾過滅菌し, 分注して -80℃ で凍結保存した。

#### 1.5. 0.1 %ゼラチン (Gelatin) 溶液

Gelatin (Sigma) 100 mg を, 超純水 100 ml と混合し, オートクレーブで滅菌溶解させた。溶解後は, 室温で保存した。

#### 1.6. 100 mM 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol; 2-ME) 溶液

14.3 mM 2-ME (Sigma) 70 μl を滅菌超純水 10 ml に溶解し, 0.22 μm フィルターで濾過滅菌し, 分注して -80℃ で凍結保存した。

#### 1.7. マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 用培養液

DMEM (Invitrogen, 11995-065) に, 白血病阻害因子 (Leukemia inhibitory factor; LIF; ESGRO™) (Chemicon International) を 1000 U/ml, KSR (Knockout Serum Replacement) (Invitrogen) を 15 %, NEAA (Nonessential amino acid) (100×) (Sigma) を 1 %, 2-ME (Sigma) を 100 μM, PC-ST (100×) を 1 % の濃度で添加し, 4℃で保存した。ES 細胞用培養液調製のため, DMEM 85 ml に LIF (1×10<sup>5</sup>U) を 100 μl, KSR を

15 ml, NEAA を 1 ml, 100 mM 2-ME を 100  $\mu$ l, PC-ST (100 $\times$ ) を 1 ml 添加した。

#### 1.8. 20 $\mu$ g/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF) (FGF-2) 溶液

Leiboviz's L-15 medium (Invitrogen) に, ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA) (Albumin, Bovine, Fraction V, Powder) (生化学工業) を加え, 1 mg/ml BSA Leiboviz's L-15 medium を調製し, 0.22  $\mu$ m フィルターで濾過滅菌した。この溶液に, FGF-2 (Recombinant Human FGF basic;157 aa) (R&D SYSTEMS) を添加し濃度 20  $\mu$ g/ml とし, 分注して-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

#### 1.9. マウス ES 細胞由来神経幹細胞用培養液

Neurobasal medium (Invitrogen, 21103-049) に, B-27 supplement (Invitrogen) を 2%, L-Glutamine (Sigma) を 2 mM, PC-ST(100 $\times$ ) を 1% 添加した (Neurobasal B-27)。培養液として使用する際に, 20  $\mu$ g/ml FGF-2 を添加して, 濃度 20 ng/ml として使用した。神経幹細胞培養液 100ml 調製のため, Neurobasal medium 100ml に B-27 supplement を 2ml, L-Glutamine を 1ml, PC-ST (100 $\times$ ) を 1ml 添加した。

#### 1.10. 99.5%エタノール(和光純薬工業)

開封後 1ml ずつ分注し、保存。

## 2. 細胞培養

### 2.1. マウス胚性線維芽細胞 (MEF) の調製と Feeder 細胞の調製

#### 2.1.1 マウス胚性線維芽細胞 (MEF) の調製

13~14 日目の妊娠マウス (C57BL/6 マウス) を解剖し, 無菌的に子宮から胎仔を取り出した。ガラスシャーレの上で胎仔の頭部, 四肢, 尾及び臓器を除去し, 体幹部を細かく組織片として, 0.25% Trypsin 溶液で処理し MEF を調製した。調製した MEF は, MEF 用培養液で分散し, 100mm 細胞培養ディッシュ (Falcon) に播種し, 2 日に一度 MEF 培養液の交換をし, コンフルエント (2~3 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/dish) まで増殖させた。

#### 2.1.2 Feeder 細胞の調製 (Mitomycin C 処理)

コンフルエントに増殖した細胞培養ディッシュの MEF 培養液に, 1 mg/ml Mitomycin C を最終濃度 10  $\mu$ g/ml となるように 50  $\mu$ l 添加し, CO<sub>2</sub> インキュベータで 37 $^{\circ}$ C, 90 分間処理した。Mitomycin C 処理後, 0.25% Trypsin/0.02% EDTA 溶液で処理し細胞を剥離して, -80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

### 2.2. マウス ES 細胞由来神経幹細胞の調製

Neural Stem Sphere (NSS) 法によりマウス ES 細胞から神経系細胞へ分化誘導し神経幹細胞を調製した。

#### 2.2.1. マウス ES 細胞の培養

60mm 細胞培養ディッシュ (Falcon) に 0.1 % Gelatin 溶液を入れ, CO<sub>2</sub> インキュベータで 37°C, 約 30 分間処理しゼラチンコートした。Mitomycin C 処理し凍結保存しておいた MEF を MEF 培養液で分散し, Feeder 細胞として  $1.0 \times 10^6$  cells/dish で播種した。翌日, MEF 培養液を除きマウス ES 細胞用培養液を入れ, MEF 細胞の上にマウス ES 細胞 (129/SV 系統マウス由来) を  $1 \times 10^3$  cells/dish で播種した。Feeder 細胞上の ES 細胞は増殖し, ES 細胞のコロニーの直径が 300~500  $\mu\text{m}$  になるまで 7~9 日間培養した。

#### 2.2.2. ES 細胞コロニーから NSS の形成

ガスバーナーで先端を尖らせたガラスキャピラリーを用いて, 実体顕微鏡 NK-541 (Nikon) 下で培養ディッシュから形成した ES 細胞のコロニーを剥離した。剥離した ES 細胞のコロニーを 35 mm 浮遊細胞培養ディッシュ (住友ベークライト) へ移し, アストロサイト条件培地中 (Astrocyte-conditioned medium, ACM) (住友ベークライト) で 4 日間浮遊培養した。4 日後, 神経幹細胞を含む細胞集合球体 Neural Stem Sphere (NSS) が形成した。

#### 2.2.3. NSS からの神経幹細胞の遊走と神経幹細胞の調製

35mm 細胞培養ディッシュ (Falcon) にマトリゲルマトリクス (BD Biosciences) を入れて, CO<sub>2</sub> インキュベータで 37°C, 約 60 分間処理しマトリゲルコートした。マトリゲルコートした培養ディッシュに NSS を実体顕微鏡下で移し, 神経幹細胞用培養液 (20 ng/ml FGF-2 を含む) 中で 5 日間接着培養し, NSS の周囲から神経幹細胞を遊走させた。その後, ガラスキャピラリーを用いて NSS を細胞培養ディッシュから除去し, 神経幹細胞を 0.25 % Trypsin/0.02 % EDTA により処理し剥離し, -80°C で凍結保存した。

### 2.3. 神経幹細胞の培養

#### 2.3.1. 神経幹細胞の増殖

35mm 細胞培養ディッシュを CO<sub>2</sub> インキュベータで 37°C, 約 60 分間処理しマトリゲルコートし, NSS 法で分化誘導したマウス ES 細胞由来神経幹細胞を  $2.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種し, 神経幹細胞用培養液中で単層培養した。播種の 1 日後から本実験に使用した。

#### 2.3.2. 神経幹細胞に対する濃度別エタノール添加

条件は, 対照群 (Control 群) とエタノール濃度を変化させそれぞれ最終濃度が 1mM, 3mM, 10mM, 30mM, 55mM, 100mM になるように添加した。エタノールは, CO<sub>2</sub> インキュベータで 37°C, 1 日間おいた神経幹細胞用培養液に添加し, 最終濃度がそれぞれの条件になるように調整した。ディッシュの液体培地を添加済みのものと交換し, エタノールを神経幹細胞に与えた。エタノールの蒸発を防ぐため, パラフィルム (American National Can) でディッシュを密閉し, ディッシュ内の濃度変化が起こらないようにした (図 1)。ま



た2日後にも同様の作業を行った。

### 2.3.3 神経幹細胞に対する時間別エタノール添加

条件は、対照群（Control 群）とエタノール濃度 100mM を 1 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間添加するものとした。2.3.1 で培養した神経幹細胞に、CO<sub>2</sub> インキュベータで 37℃、1 日間おいた神経幹細胞用培養液にエタノールを添加し、最終濃度が 100mM になるように調整した。ディッシュの培養液をエタノール添加済みの培養液と交換し、エタノールの蒸発を防ぐためにパラフィルムでディッシュを密閉した。それぞれ規程の時間が経過したら、エタノール入りの培養液をエタノールが入っていない培養液と交換し、4 日間培養を行った。

### 3. 細胞の形態観察と細胞数の計測

Control 群および濃度別、時間別にエタノールに曝露させた神経幹細胞を、位相差顕微鏡 ECLIPSE TE300 (Nikon) で 1 日目から 5 日目まで毎日観察し、細胞培養ディッシュ毎に無作為に選択した 5 点をデジタルカメラ (FUJIFILM) で写真撮影した。撮影した写真上の細胞数を計測し、細胞数の平均値を求めた。また、血球計算盤 (Erma) の写真から撮影した写真 1 枚あたりの面積を算出し、その面積より 1 cm<sup>2</sup> あたりの細胞数 (cells/cm<sup>2</sup>) を算出した。1 条件につき 3 枚の細胞培養ディッシュで影響を検討し、各細胞培養ディッシュの平均値および標準偏差 (SD) を算出した。



## [結果]

### 1.細胞の形態観察

Control 群および濃度別、時間別にエタノールを添加した神経幹細胞について、位相差顕微鏡によって 1 日目から 5 日目まで形態観察を行った。Control 群および 30mM 以下の濃度群の神経幹細胞は短い複数の突起を持つ多角形の細胞体である神経幹細胞の形態的特徴を維持していた。しかし、55mM、100mM の濃度群では細胞の突起が二方向に長く伸びた形態を示した(図 2)。また時間群でも 1 時間以上エタノールに曝露させた神経幹細胞は同様に突起が二方向に長く伸びた形態を示した(図 3)。

### 2.細胞数の計測

横軸を培養日数、縦軸を単位面積辺りの細胞数 (cells/cm<sup>2</sup>) を対数にとって細胞数の変化を増殖曲線で示した。Control 群および濃度群の 1mM,3mM,10mM,30mM において、神経幹細胞数は直線的に増加した。55mM では死細胞が多く見られるようになり、細胞増殖がそれ以下の濃度のものに比べて緩やかになった。100mM ではさらに死細胞が増え、細胞増殖は抑制された(図 4)。時間群では 1 時間曝露させたものは、死細胞が見られるようになり、細胞増殖が Control 群に比べて緩やかになった。3 時間以上曝露させたものは死細胞がさらに増え、細胞増殖も抑制された。(図 5)

## [考察]

本研究において、エタノール添加濃度が 30mM 以下の神経幹細胞は、エタノールの影響を受けることなく、5 日目まで安定して増殖した。55mM, 100mM の濃度ではエタノールの影響を受けて死細胞が増え細胞増殖が抑制され、細胞の形態が変化した。このことからエタノールはある濃度までは神経幹細胞に影響を与えないが、一定の濃度を超えると神経幹細胞に悪影響を与えることが分かった。しかし、細胞の形態や増殖速度が変化しない低濃度のエタノール曝露でも、細胞に全く影響が無いかは現時点では分からない。遺伝子発現が変化して別の細胞になっている可能性も考えられる。

また 100mM のエタノールを 1 時間添加した細胞は、Control 群よりも細胞増殖が抑制され、死細胞がみられるようになり、3 時間以上曝露した細胞は、より細胞増殖の抑制と死細胞の増加がみられた。このことから、高濃度のエタノールは短時間の曝露でも神経幹細胞に影響を与え、その後エタノールを取り除いても神経幹細胞は添加前と同じ状態には戻らないことがわかり、高濃度のアルコールが曝露時間に関わらず神経幹細胞に影響を与えることが示唆された。

今後の課題としては、遺伝子発現解析や蛍光免疫染色などの解析を行い、エタノールに曝露された神経幹細胞がその性質を保っているのか、または違う細胞に変化しているのかを検討することが必要となる。また細胞死と細胞抑制がどのように行われているかも明らかにする必要がある。エタノールの他にも、エタノールの代謝物であるアセトアルデヒドによる神経幹細胞への影響を検討する必要がある。エタノールだけではなくアセトアルデヒドも、胎盤を通じて母体から胎児へ影響を与えることが分かっているからである。また本研究では、マウスに対してアルコールの影響を検討したが、霊長類でも検討することが、アルコールが胎児に与える影響を研究していく上で重要になると考える。ヒト ES 細胞由来の細胞を用いてこの実験をすることは倫理的に難しいが、ヒト iPS 細胞による神経幹細胞への一方向的な分化が安定して可能になれば、今回私が使用したマウスの細胞の実験系を用いてヒト神経幹細胞に対するアルコールの影響を検討することができるようになる。

[参考文献]

- 1) Walloch JE, Burger PH, Kornhuber J.: [What is Known About the Outcome as Adults for Children with Fetal Alcohol Syndrome (FAS)/Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD)?]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2011: Epub ahead of print
- 2) Long L, Li Y, Wang YD, He QY, Li M, Cai XD, et al. : The preventive effect of oral EGCG in a fetal alcohol spectrum disorder mouse model. *Alcohol Clin Exp Res.*, 34(11):1929-36, 2010.
- 3) Anthony B, Zhou FC, Ogawa T, Goodlett CR, Ruiz J. Anthony B, Zhou FC, Ogawa T, Goodlett CR, Ruiz J. : Alcohol exposure alters cell cycle and apoptotic events during early neurulation. *Alcohol Alcohol*, 43(3):261-73, 2008.
- 4) Nakayama T, Inoue N: Neural stem sphere method: Induction of neural stem cells and neurons by astrocyte derived factors in ES cells in vitro. *Methods Mol. Biol.*, 330: 1-13, 2006.
- 5) Ravin R, Hoepfner DJ, Munno DM, Carmel L, Sullivan J, Levitt DL, et al.: Potency and Fate Specification in CNS Stem Cell Populations In Vitro. *Cell Stem Cell*, 3: 670-680, 2008.
- 6) Nakayama T, Momoki-Soga T, Inoue N: Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res*, 46: 241-249, 2003.
- 7) Nakayama T, Sai T, Otsu M, Momoki-Soga T, Inoue N: Astrocytogenesis of ES-Cell-derived neural stem cells: default differentiation. *Neuroreport*, 17:1519-1523, 2006.
- 8) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, et al.: Spatiotemporal Recapitulation of Central Nervous System Development by Murine Embryonic Stem Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells*, 26: 3086-3098, 2008.
- 9) Reynolds BA, Weiss S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052): 1707-1710, 1992.

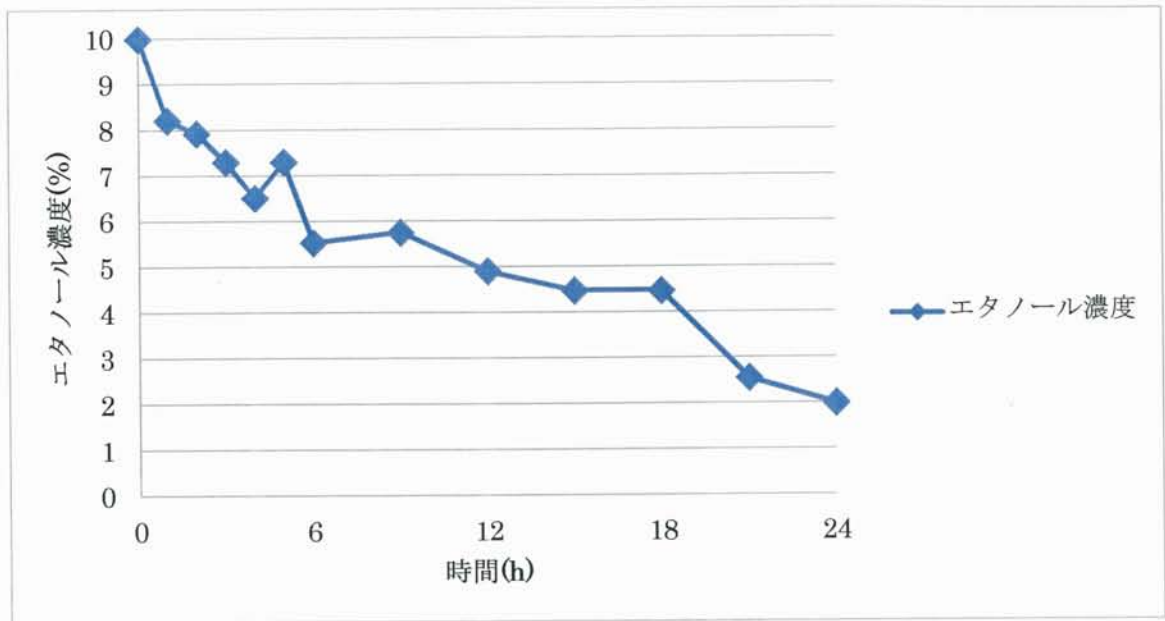


図 1. 10%エタノールを純水に溶かしてディッシュに入れ、37°C, CO<sub>2</sub>インキュベータで静置した。測定にはクロマトグラフィーを用いた。エタノールの蒸発による濃度変化を防ぐため、パラフィルムによってディッシュを密閉して神経幹細胞へのエタノール添加実験を行った。

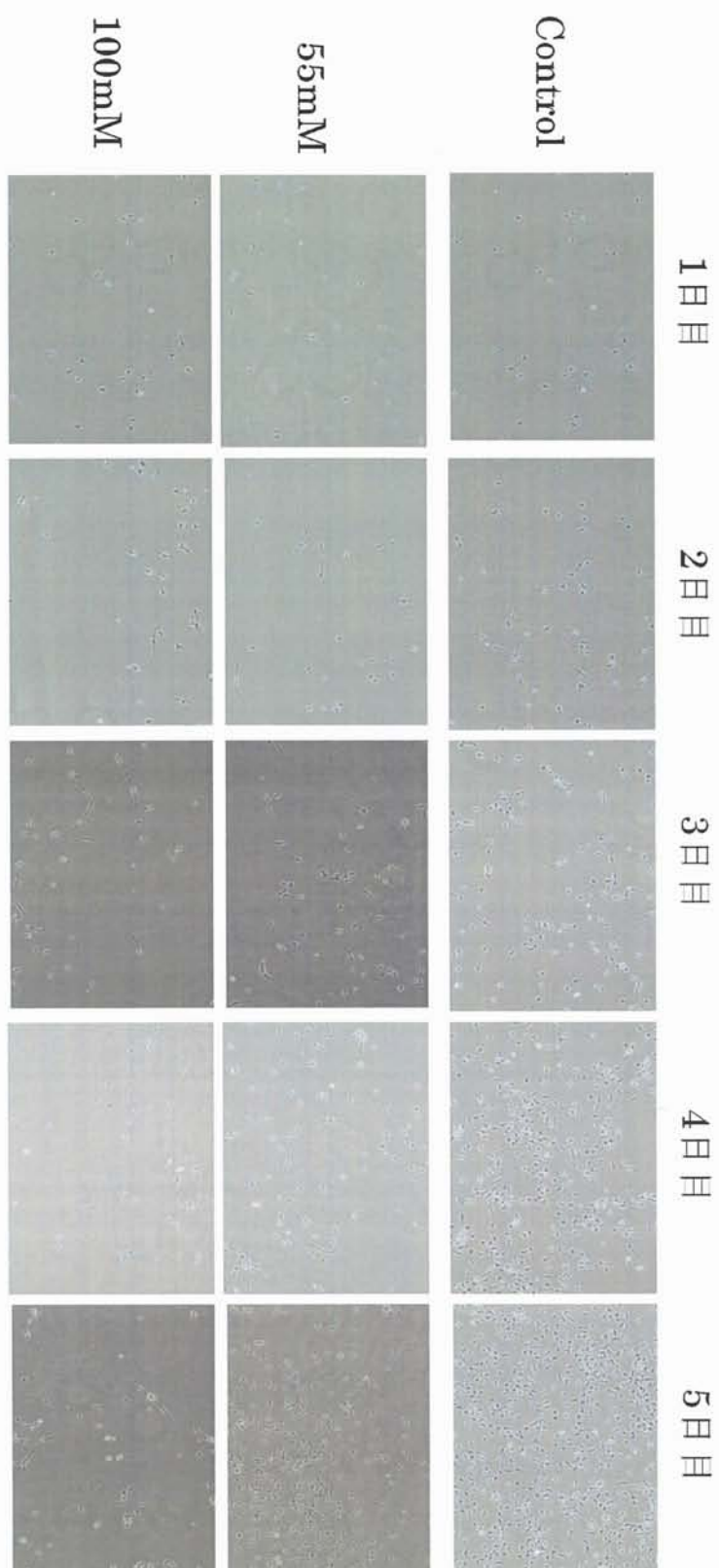


図2. コントロール,55mM,100mMの神経幹細胞。55mMと100mMには死細胞と形態異常の細胞が目立ち、細胞増殖が抑制されていることが分かる。



図 3. 100mM のエタノールを添加し、5 日間培養した神経幹細胞。細胞の突起が長く二方向に伸び、死細胞が多く発生し細胞増殖が抑えられている。

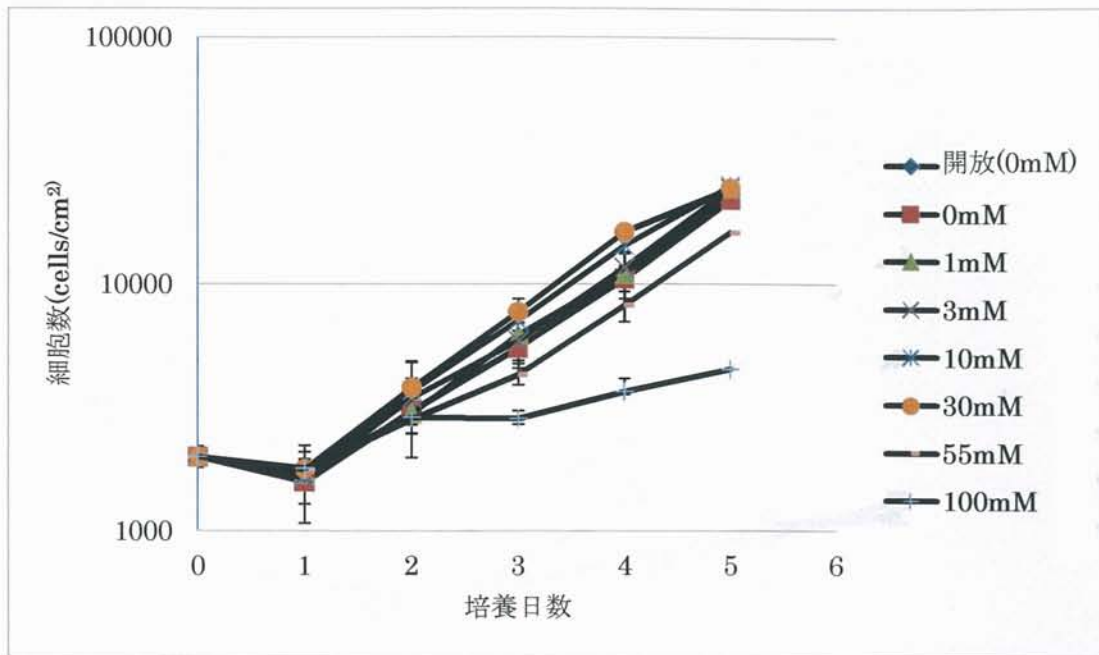


図 4. 添加するエタノール濃度を変化させた神経幹細胞の増殖曲線。30mM 以下の濃度では細胞増殖に影響はないが、55mM では細胞増殖が少し抑制され、100mM では細胞増殖が強く抑制されていることがわかる。



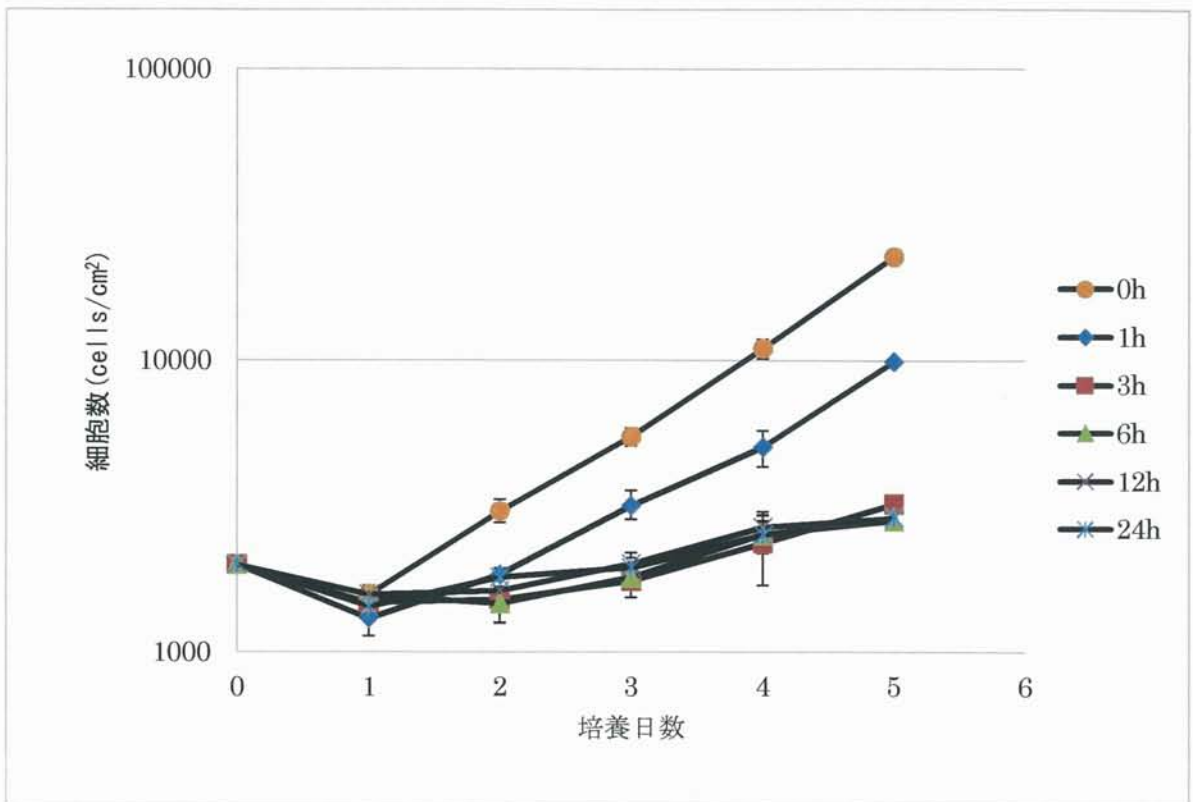


図 5. エタノール添加時間を変化させた神経幹細胞の増殖曲線。1 時間添加した細胞の増殖がコントロールに比べて抑制され、3 時間以上添加した細胞ではほとんど細胞増殖が進まなかった。

【謝辞】二年間懇切丁寧なご指導をしていただきました井上順雄教授には大変感謝しております。笠井久隆名誉教授には、研究をする上での適切なアドバイスをいただきましたことを大変感謝しております。杏林大学医学部大津昌弘助教授には、実験に関する多くのご指導をいただきましたことを大変感謝しております。

前年度修了生の上田理沙さんと新屋冬美さん、客員研究員の村上拓治さん、博士後期課程の西尾里志さんと大森啓之さんと磯野真由さん、博士前期課程の吉江拓也さんと鈴木さんと小野瀬敦子さんと笈慎吾さんには様々な手助けをしていただきました。心より感謝を申し上げます。

私の研究成果が微力ながらも社会に貢献できることを祈りつつ、この論文を締めたいと思います。