

人羊膜上皮細胞の組織培養法による栄養学的研究

昭和34年3月13日 受付

信州大学医学部小児科学教室(主任: 山田教授)

今 泉 雪 恵

Nutritional Studies of Human Amnion Cells in Tissue Culture

Yukie Imaizumi

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Chief: Prof. N. Yamada)

I 緒 言

複雑な有機体である生体についてその栄養要求を詳細に解析することは困難であるが、細胞が *in vitro* で増殖するに必要な栄養に関する研究は、その一端を窺い知る手段として、医学の分野のみならず広く生物学の基礎的な問題を解決する有用性を持つので、組織培養法によせられる期待は大きい。

1951年, Earle 等は同型実験 (replicate culture) のできる組織培養法^①を案出し、低張クエン酸処置による細胞核数算定法^②を用いて培養細胞の正確な増殖評価をなし得る定期的な方法を確認した。

而してその栄養学的応用は, Eagle^{③④⑤}(1955) により, Earle 等^⑥がマウスの皮下組織から取出した L 細胞と Gey 等^⑦が人の子宮頸癌から分離した HeLa 細胞について合成培地を使用した大規模な実験がなされ、また本邦においても勝田等が、創案した方法^{⑧⑨}を用いて主として雞胚心組織についてその栄養要求を追求する研究を進めているが、人の正常細胞で、しかも特殊な栄養要求を持つに至る可能性のある長期間の継代培養を経た細胞ではなく、人体からとり出したままの新鮮な細胞によるかかる研究は見当らない。

ここに著者は, Zitcer 等^⑩(1955) がポリオ・ウイルスの大量培養に利用した人羊膜上皮細胞に着目し、遠藤^⑪、勝田^{⑧⑨⑫}、山田^{⑬⑭}等の業績を参考として、新鮮な人羊膜上皮細胞 (以下 HAC と略記) の組織培養を行い、培養液組成の如何が HAC の増殖に及ぼす影響を詳細に検討しうる実験方法を確立したので報告する。

また本法により、培養液中の血清の濃度が HAC の増殖に及ぼす影響、培養液の滲透圧が HAC の増殖に及ぼす影響、ならびに HAC の増殖に必要なカリウム量及びグルコース量等の問題につき若干の実験を行ったので併せて報告する。

II 実験方法

(1) 実験材料及び器具

人羊膜: 主として正常分娩の羊膜

トリプシン: Difco (1: 250)

Lactalbumin hydrolysate: Nutritional Biochemicals

人血清: 健康成人女子血清を使用

培養瓶:

母培養用: 大型角瓶 4×5.5×10cm

TD40

本実験用: 小型角瓶 1.8×1.8×4cm

ビベット:

分注用: 1cc 駒込ビベット^⑬

雑用: 2cc, 5cc 駒込ビベット

遠心沈澱管:

核数算定用: 1.5×9cm (約13cc)

底が円錐で 0.5 及び 1.0cc の目盛つき^⑭

雑用: 50cc 目盛つき

白金網: 80メッシュ, 150メッシュ

分注用コルベン: 50cc なす型

血球計算盤: TATAI Eosinophil counter
Bürker 型

(2) 母培養

培養条件:

培養液	Lactalbumin hyd. (LA)	0.5g
	人血清	20cc
	Hanks 液	80cc
	ペニシリン	200u/cc
	ストレプトマイシン	100r/cc
	pH 7.3 (7.2~7.4)	

大型角瓶又は TD40 を用いる。

静置法

37°C

培養液の更新を行う。

培養手技:

人羊膜は胎盤娩出後速かに無菌的に絨毛膜から剥し、ペニシリン 200u/cc 及びストレプトマイシン 100r

/cc を含有する（以下塩類溶液及び培養液にはすべて両者を含む）滅菌（以下略）Hanks 液の中に入れる。

人羊膜を数 cm 四方に切り、Hanks 液を数回換えて十分に洗う（以下の培養規模では全羊膜の $1/8 \sim 1/2$ を使用すれば充分である）。

これを 0.25% にトリプシンを含む pH7.2 に調製した Rinardini 液^⑥ (NaHCO_3 を減量) 50cc に入れ 20~25°C に 4~6 時間放置する。

トリプシン液が潤滑した頃を見計り、容器を手で約 30 秒間ゆるやかに振る。これにより細胞は数個~数 10 個の塊となつて液中に浮遊してくる。

液を白金網 (80 メッシュ) で濾過し、50cc 遠心沈澱管に入れ 800 回転で 10 分間遠心沈澱して上清をすてる。Hanks 液 50cc を加え再び細胞を浮遊させ 800 回転 5 分間遠心沈澱して上清をすてる。

得られた沈渣に上記の培養液 40~50cc (沈渣の 100~200 倍に相当する) を加え均等な細胞浮遊液を作り、大型角瓶又は TD40 の 3~4 本に分注して密栓し、37°C の孵卵器内で静置培養する。

以上の方法で培養に成功すると、生活力のある細胞は普通 12 時間で底のガラス面に附着し 24 時間で増殖を開始する。

48 時間後に全培養液を更新し（ガラス面に附着しない細胞は同時にすてられる）、以後 pH の低下に応じて培養液の更新を行うが、2~10 日で培養瓶の底の全面を 1 層の上皮性細胞が被うようになる（写真 1）。

人羊膜の選択について：

増殖力旺盛な細胞を得る為には羊膜を選ぶことが最も大切な出発点となる。肉眼的には薄く透明で緊張の強いものがよい。このようなものは生のまま顕微鏡で観察すると、細胞の境界が明瞭で美しく原形質内に光線屈折力の強い微細な顆粒を僅か認めるが、しからざるものは多数の大きな顆粒に満ちて、空胞形成があり、細胞境界さえ全く認め得ない場合すらある。未熟児の羊膜はトリプシン処理も容易で細胞の増殖も非常によい。過熟児の羊膜は概して厚くトリプシン処理が困難である。中期人工妊娠中絶により得られた羊膜は短時間のトリプシン処理により豊富な細胞が得られ、母培養の増殖も旺盛であるが、細胞が小型のため形態学的観察にも不便であり、又正常分娩羊膜と同条件では植継ぎに成功しない。母体の妊娠中毒症、分娩経過の遷延、早期破水、児の假死、胎糞による黄染等のあつた羊膜の培養成績は一般に不良である。感染の予想される羊膜は使用を避けるのは勿論である。

本学産婦人科における入院分娩では 5~10 回に 1 回位の割合に、増殖が盛んでこの実験に適する羊膜が得ら

れた。

(3) 本実験

培養条件：後記のように実験の目的に応じて任意組成の培養液を用いた。

pH 7.2~7.3

小型角瓶 1 管宛 1cc の細胞浮遊液を用いた。

細胞数の目標は $5 \sim 10 \times 10^4 / \text{cc}$

静置法

37°C

培養液の更新を行わない。

培養本数：

細胞核数算定は接種時、3 日、5 日、7 日、9 日後の 5 回にわたつて毎回 3 本宛につき行うので予備 1 本を加え、1 系列 16 本立とする。

植継ぎの手技：

細胞シートを形成した母培養を選び、培養液をすて、Hanks 液で細胞面を 1 回洗い、pH を 7.2 にととのえた 0.25% トリプシン-Hanks 液 10cc を加えて 37°C に置く。20~40 分間で液面を動かすことにより細胞シートがガラス面から離れるようになるが、それから尚 5 分間 37°C に静置した後に、培養瓶を軽く手で数秒間振盪すると、トリプシンの作用により細胞の結合がはなされてほぼ均等な細胞浮遊液ができる。これを静かに 50cc 遠心沈澱管に移し、800 回転で 10 分間遠心沈澱を行い上清をすて去り、50cc の新しい Hanks 液に再び浮遊させて白金網 (150 メッシュ) で濾過する。濾液の一部をとり Bürker 型血球計算盤で細胞の総数を概算しておく。再度 800 回転で 5 分間遠心沈澱し上清をすてる。この沈渣に少量の培養液を加え濃い細胞浮遊液を作り、この一定量を実験せんとする各種の培養液を入れたなす型コルベン中に加え、前記のように $5 \sim 10 \times 10^4 / \text{cc}$ の細胞を含む各種の実験用細胞浮遊液を調製する。コルベンを手でゆるやかに廻しながら、分注用ピペットを用いて、それぞれの組成の培養液につき（即ち各系列につき）小型角瓶 16 本宛に正確に 1cc ずつ分注し密栓する。接種時の核数算定の為の 3 本を無作為的に取り、残りの 13 本を 37°C に静置培養する。

細胞核数算定法：

0.1M クエン酸クリスタル紫溶液

蒸留水 1000cc

クエン酸 21g

クリスタル紫 500mg

フォルマリン原液 約 10 滴

接種時、3 日、5 日、7 日、9 日後に静置した各培養系列から 3 本宛を無作為的に持ち来り、上記の溶液を

5cc 宛加えて 37°C に 1 時間以上静置する。瓶を手で極めて強く 3 分間振盪し、更に 1 時間以上 37°C に静置する。この内容をそれぞれ核数算定用の遠心洗滌管にうつすのであるが、その際新しく上記溶液を追加して細胞の残らないようにピペットを使用して何回も洗いこむ（クエン酸の作用と振盪が不足する時はガラス壁に一部の細胞核が残るから注意を要する）。1500 回転で 15 分間遠心洗滌してから、ピペットを用いて静かに上清を吸い上げ正確に 1.0cc を残して核数算定に供する。

残り 1.0cc をピペットで充分攪拌し、一部をとり TATAI Eosinophil counter に載せ、その全室中の細胞核数を数え 100 倍すれば各培養瓶内容の 1cc の細胞核数が求められる。この際、生きている細胞の核の実数を数えるのであるから、クリスタル紫で均等に染まる核のみを数え、崩れかけたり濃縮したりした核は除外する。

かくの如くして各系列で毎回 3 本ずつの核数を算定しその算術平均をもとめ接種時より、3日、5日、7日、9日後と日を追って増殖曲線を書く。

(4) 培養条件を決定する基礎となった 2, 3 の経験

(i) 培養液の pH について

当初、組織培養で一般に慣用される pH 7.6 程度の培養液を使用した。細胞の増殖は思わしくなかった。ところが後述するように、培養液の pH の低下は比較的緩徐であつたので、接種時の pH を 7.2 附近に一定したところ培養成績が良好となつた。

(ii) 培養液の更新を行わなかつた点について

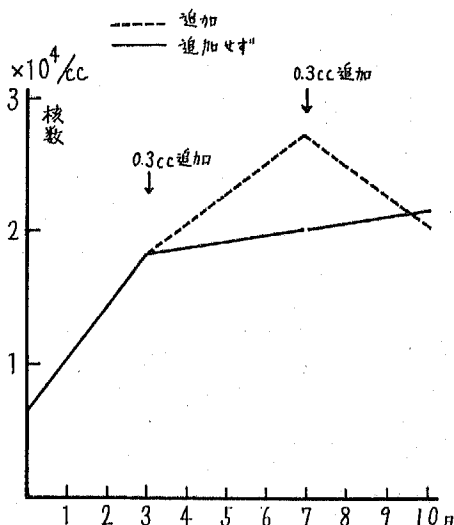
実験にそのまま遠心洗滌を行い得ない小型角瓶を使用したので、全液交換法を採用することは接種細胞の一部が液とともに取去られる危険があり実施が困難であつた。そこで培養期間中に新しい栄養分を補給する意味で少量の培養液の追加を試み対照群と比較した。この実験に使用した培養液の組成は母培養の場合と同じである。

第 1 群は 1.0cc の液量のまま観察し、第 2 群は 3 日及び 7 日後に 0.3cc 宛培養液の追加を行つた。図 1 に示したように、第 2 群においては第 1 回目の追加により増殖は良好になつたが第 2 回目の追加では細胞核数は却つて対照を下廻る結果となつたので、培養液の追加というような煩わしい操作を採用しないことにした。

(iii) 培養液の組成について

前記の母培養に用いた培養液の組成は Zitter 等^⑩の最初の報告に準じたものであるが、継代培養におけ

図 1 培養液の追加による影響



る Fogh 等^⑩の知見では更に 0.1% の Yeast extract (Difco) を加えているので両者を比較した。その結果 Yeast extract を加えると確かに増殖は良好となるが、本研究の性質上支障ないかぎり単純な組成としたいので Yeast extract を加えずに実験することにした。

Ⅲ 培養液中の血清濃度が HAC の増殖に及ぼす影響

附 培養液の pH についての検討

組織培養法における培養液の基本的組成である胎児エキス、血清及び塩類溶液の 3 者のうち、HAC の増殖には胎児エキスを必要としない事実^⑩は化学的に既知の成分のみで細胞の増殖をさせたいという純合成増地使用の理想に近づいたものではあるが、将来各種の微量の栄養分についての追求を行いたい時、培養液の血清に由来する成分が実験の障害となり得る可能性があるので考慮の余地がある。

然しながら一面 Eagle^③が多年の努力によつて L 細胞及び HeLa 細胞について結論づけた至適量の各種アミノ酸、ビタミン、糖質、電解質を培養液に加えても尚、これら両細胞の増殖を支えるには少量の血清又は透析血清を補足する必要があるという事実からも、血清は細胞の増殖に必要な不明の有用成分乃至因子をもつものと推測されるのでその重要性につき検討した。

(1) 実験 A:

LA	0.5g	
人血清) 100 cc
Hanks 液		

の組成で人血清（日立蛋白計により測定した蛋白量 7.3g/dl）を 40, 30, 20, 10, 5, 0%（従つて Hanks 液 60, 70, 80, 90, 95, 100%）に含むようにした血清濃度の異なる 6 種の培養液を調製して HAC の増殖を比較した。

先ず細胞数 $10^5/\text{cc}$ 程度を用いて実験を行つた成績は表 1, 図 2, 写真 2, 3, 4, 5, 6 に示すように, 人血清を全く含まない培養液によつては, 顕微鏡観察で細胞の増殖は全く認められなかつたのみならず, 多数の細胞がガラス面から脱落し, 細胞核数も漸次減少していったが, 血清を含む培養液によつては図 2 に示した増殖曲線に一致して増殖の量的相違が顕微鏡的にも鮮やかに観察できた。即ち培養液に血清を 30% に含有する時最も良好な増殖を示すが, 20% でも実験可能な充分な増殖を認めた。40% の場合ははじめ 20% の場合を下廻る核数を示したが培養日数の進むにつれ維持力を發揮している。5% の時は増殖は僅少ではあつたが細胞の生存は支え得るものと思われた。

次に同様の実験を細胞数 $10^4/\text{cc}$ 程度について行つた。成績は図 3 に示したように, 3 日後の核数は 30% > 20% > 40% > 10% > 5% であつたが, 7 日後には 30% > 40% > 20% > 10% > 5% となり前実験と概ね同じ傾向を認めた。

(2) 実験 B:

培養液の改良を企図して, 図 4 に示すような種々の

組成の培養液を試作して比較した。

図 2 培養液中の血清の濃度による影響 (1)

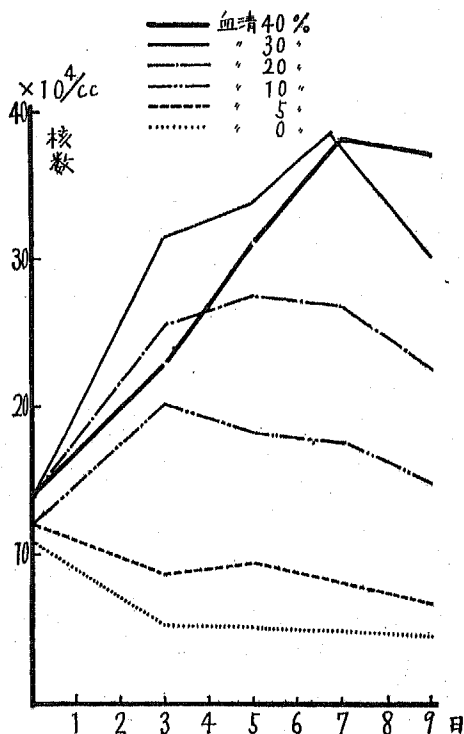


表 1 培養液中の血清の濃度による影響

培養液	組	成	平均核数及び (pH)				
			接種時	3 日	5 日	7 日	9 日
1	LA	0.5g	149.000	229.200	311.200	383.300	372.300
	HS	40cc	(7.2)	(7.4)	(7.1)	(6.9)	(6.4)
2	LA	0.5g	142.000	315.800	339.800	386.100	301.860
	HS	30cc	(7.2)	(7.3)	(7.1)	(6.9)	(6.4)
3	LA	0.5g	144.500	255.400	276.000	268.300	224.700
	HS	20cc	(7.2)	(7.2)	(7.1)	(6.9)	(6.2)
4	LA	0.5g	123.000	201.100	182.000	175.800	148.400
	HS	10cc	(7.2)	(7.1)	(7.1)	(6.9)	(6.2)
5	LA	0.5g	120.000	87.800	94.500	80.600	66.500
	HS	5cc	(7.2)	(7.0)	(6.8)	(6.8)	(6.2)
6	LA	0.5g	100.800	52.500	51.100	49.600	46.000
	HS	0	(7.2)	(7.0)	(7.0)	(6.9)	(6.2)

(LA: Lactalbumin hyd., HS: 人血清, H: Hanks 液)

図3 培養液中の血清の濃度による影響 (2)

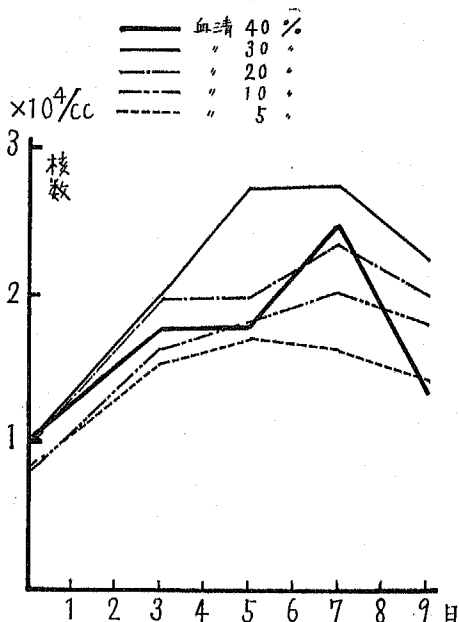
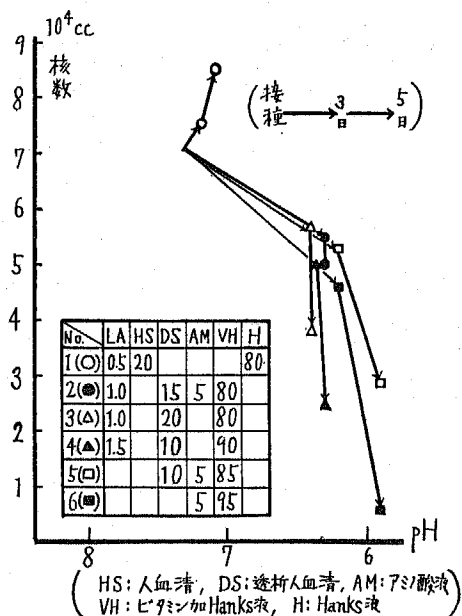


図4 試作した各培養液における細胞核数とpHの推移



透析人血清: 人血清を透析用セロファン筒に入れ、1夜水道流水中に置き次いで蒸留水中に置いて透析した。

ビタミン加 Hanks 液: Eagle[®]の基準により、 10^{-9} g/cc のビオチン、コリン、葉酸、ニコチン酸、パ

ントテン酸、ピリドキサル、サイアミン及び 10^{-7} g/cc のリボフラビンを加えるべく充分な量を市販の溶液を材料として Hanks 液に加えた。

アミノ酸液: 市販の牛乳カゼイン水解物 5% を含有する静脈用注射液をそのまま使用した。

これらを材料として試作した各培養液2~6の組成は図4の通りである。

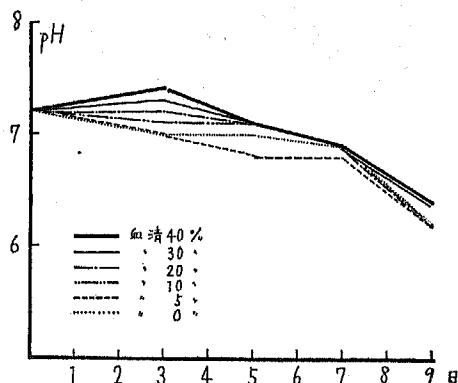
培養成績は図4に示したが、血清を含む対照の培養液1では細胞の増殖は順調であつた。透析血清を含む培養液2, 3, 4, 5でも2>3, 4, 5の順で少数の細胞の増殖が顕微鏡検査により観察されたが、増殖した細胞は黄色を帯び原形質は網目のように見え変性が高度であつた。核数算定の際も均等に染まる核は少なかつた。pHの低下も揃つて急速であつた。

(3) 培養液の pH についての検討

培養液の pH は東洋濾紙水素イオン濃度比色法により測定した。実験経過中の pH は核数算定のためクエン酸クリスタル紫溶液を加えるに先立ち測定した。

実験Aに於ける pH の推移を図5に記した。培養液の血清濃度が高いものほど3日後の pH は高い。殊に血清を40%, 30%に含有する系列では期待されたところの pH の低下を認めず却つて上昇している。これは細胞増殖による pH の低下に対する血清の緩衝作用と、保存により血清 pH が上昇するという事実⁽¹⁷⁾によるものと考えられる。血清を20%に含有する培養液は細胞増殖も良好であるのみならず、pH の変動の少ない点においても充分実験に適するものと考えられた。

図5 血清濃度の異なる各培養液における pH の推移



血清濃度の如何にかかわらず、7日以降は急速に pH が低下するのは、その時期における細胞核数の減少の傾向と共に、培養液更新を行わないこの実験の期

間の限界を示唆しているものと考えらる。

実験Bで試作培養液を使用した際の急速な pH の低下は、血清と透析血清との優劣の他、組織培養用の製品でないところの市販アミノ酸液或はビタミン製品を使用したことによるものと考えられる。

IV 培養液の滲透圧が HAC の増殖に及ぼす影響

健康人体液の滲透圧の変動は極めて少ないが、各種の病的状態においては、水分電解質代謝の障害から体液組成の攪乱が起り滲透圧の変動を来す危険が充分に考えられる。かかる時組織細胞はその物質代謝過程に大きな影響をうけることは想像に難くない。

以下 HAC の増殖に及ぼす培養液の滲透圧の影響を検索した。

実験：

培養液の組成は LA 0.5g, 人血清 20cc, Hanks 液 80cc とし、Hanks 液中の NaCl 量を 16g/L, 12g/L, 10g/L, 8g/L, 6g/L, 4g/L の 6 段階として（本来の Hanks 液では 8g/L）、NaCl の量的相違のみで他の成分は同じ 6 種の滲透圧の培養液を作った。

各培養液についてその滲透圧を知るため、ザイツ濾過器で濾過しペニシリン及びストレプトマイシンを加えた使用直前の最終段階における培養液の氷点降下度（当教室改良の Beckmann 微量液氷点測定装置⁽¹⁾による）を測定した。

実験成績は表 2, 図 6, 写真 7, 8, 9, 10, 11, 12 の通りである。NaCl 16g/L の Hanks 液を使用した氷点降下度 0.930°C の高張性培養液では、顕微鏡観察で

も細胞の増殖を欠き、細胞体は円く濃縮してガラス壁から次第に脱落した。NaCl 4g/L の Hanks 液を使用した氷点降下度 0.445°C の低張性培養液では増殖曲線の示すように細胞核数の増加は僅かにすぎず、又 NaCl 6g/L の Hanks 液を用いたものとともに顕微鏡的所見では細胞の輪郭が淡く弱々しい印象を与えた。

図 6 培養液の滲透圧による影響

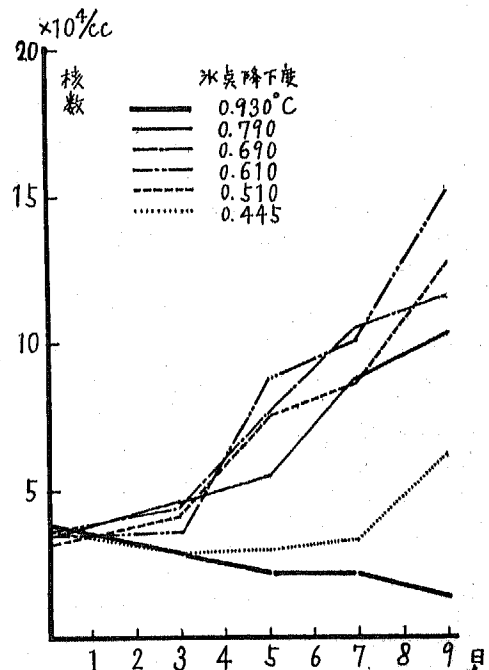


表 2 培養液の滲透圧による影響

培養液	組 成	氷点降下度 °C	平均核数及び (pH)				
			接種時	3 日	5 日	7 日	9 日
1	LA 0.5g, HS 20cc H (NaCl 16g/L) 80cc	0.930	37.800 (7.3)	28.600 (7.4)	21.600 (7.6)	21.800 (6.4)	13.400 (6.4)
2	H (NaCl 12g/L)	0.790	34.800 (7.3)	45.000 (7.4)	54.600 (7.1)	86.900 (6.2)	102.500 (6.2)
3	H (NaCl 10g/L)	0.690	36.300 (7.3)	44.900 (7.3)	75.500 (7.1)	105.600 (6.2)	115.500 (6.2)
4	H (NaCl 8g/L)	0.610	35.100 (7.3)	35.400 (7.3)	88.000 (7.1)	100.700 (6.2)	150.500 (6.2)
5	H (NaCl 6g/L)	0.510	32.000 (7.3)	41.400 (7.3)	74.800 (7.1)	85.400 (6.2)	125.900 (6.2)
6	H (NaCl 4g/L)	0.445	35.600 (7.3)	28.700 (7.3)	29.600 (7.1)	32.600 (6.2)	61.600 (6.2)

(LA: Lactalbumin hyd., HS: 人血清, H: Hanks 液)

NaCl 6g/L~12g/L の Hanks 液を用いた氷点降下度 0.510~0.790°C の各培養液によつては増殖曲線には著しい差が見られなかつた。

なお6日後の顕微鏡的所見では(写真13, 14)氷点降下度 0.445°C の低張性培養液では細胞体は著明に膨大し空胞形成が著しかつたが、氷点降下度 0.790°C の稍高張性の培養液では特に細胞体の濃縮傾向もなく空胞形成も僅かで維持は良好であつた。

V HAC の増殖に必要なカリウム量の検討

カリウム (K) は生体内において無機質或は有機化化合物として主として細胞内に存し、細胞の重用な構成成分をなしている。また K 代謝と窒素代謝とは密接な関係があり、新しい細胞が蛋白同化により形成される際には K は欠くべからざる成分である。

以下 K 量を異にする数種の培養液をつくり、培養液中の K 量の如何が HAC の増殖に及ぼす影響を観察し、K の要求量を検討した。

実験:

Hanks 液中の KH_2PO_4 の代りに NaH_2PO_4 を加え、且つ KCl を含まない Hanks 液(本来の Hanks 液には 0.4g/L 含有)を作り、これに KCl を種々の割合 (KCl: 0.8g/L, 0.4g/L, 0.2g/L, 0.1g/L, 0.05g/L, 0) に加えて、LA 0.5g, 人血清 20cc, Hanks 液 80cc の組成で K 量の異なる 6 種の培養液を調製した。

K 量の測定は、濾過操作後の最終段階の各培養液について Lange 型 flame photometer によつて測定した。

実験成績は表 3, 図 7, 写真 15, 16, 17, 18, 19, 20 の通りである。

KCl を全く含まない Hanks 液を用いた培養液は K 量 1.2 mEq/L であつたが、図 7 の増殖曲線と写真 15 に明らかなように他の 5 系列に比して細胞の増殖は甚だ劣つていた。

図 7 培養液中の K 量の相違による影響

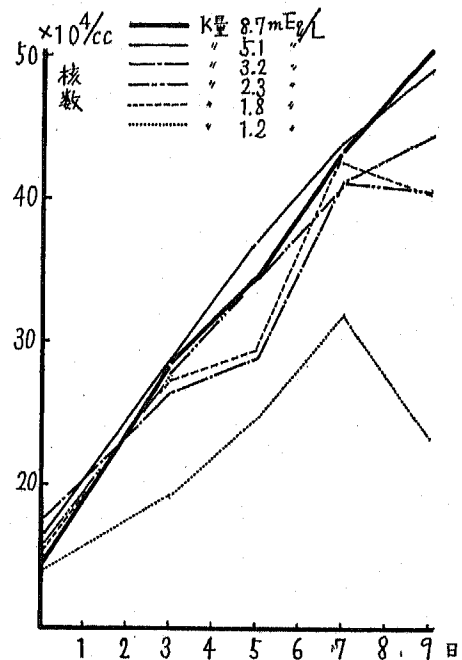


表 3 培養液中の K 量の相違による影響

培養液	組 成	K 量 mEq/L	平均核数及び (pH)				
			接種時	3 日	5 日	7 日	9 日
1	LA 0.5g, HS 20cc H (KCl 0.8g/L) 80cc	8.7	144,200 (7.2)	285,800 (7.2)	346,200 (7.1)	433,600 (7.1)	501,600 (6.4)
2	H (KCl 0.4g/L)	5.1	169,300 (7.2)	279,100 (7.2)	371,300 (7.1)	438,000 (7.0)	489,800 (6.2)
3	H (KCl 0.2g/L)	3.2	178,400 (7.2)	264,000 (7.2)	288,000 (7.1)	411,700 (7.1)	444,200 (6.2)
4	H (KCl 0.1g/L)	2.3	155,700 (7.2)	270,300 (7.2)	344,500 (7.1)	412,000 (7.1)	406,800 (6.4)
5	H (KCl 0.05g/L)	1.8	149,800 (7.2)	277,400 (7.2)	296,600 (7.1)	426,900 (7.1)	403,600 (6.2)
6	H (KCl 0)	1.2	139,600 (7.2)	191,900 (7.2)	246,900 (7.1)	319,000 (7.1)	233,000 (6.2)

(LA: Lactalbumin hyd., HS: 人血清, H: Hanks 液)

KCl 0.8g/L を含む Hanks 液を用いた K 量 8.7 mEq/L の培養液においても正常 K 量の培養液とほぼ等しい増殖を認めた。

同様の実験を異なる人羊膜を用いて行つた結果でも K 量 1.1mEq/L の培養液では細胞増殖が極めて不良であつた。

これらの成績から HAC の増殖には培養液中に最少 1mEq/L 程度の K を必要とするものと考えてよいであろう。又培養液中の K 量が 2mEq/L 程度存すれば充分な増殖を開始する。人血清の正常 K 量のほぼ 2 倍に相当する 8mEq/L 程度の K 量では細胞の増殖という点のみから見れば何らの悪影響なく良好な増殖が見られた。

V HAC の増殖に必要なグルコース量の検討

グルコースは血液中に遊離の形で存在するは勿論、組織中にも微量に存し、人体の活性に最も重要な糖である。細胞が増殖する際にエネルギー源となるはいうまでもなく、組織培養においても欠くべからざる培養液成分である。

そこでグルコース量の異なる 5 種の培養液を用いて HAC の増殖を比較観察した。

実験：

培養液は LA 0.5g, 人血清 20cc, Hanks 液 80cc の組成で、Hanks 液中のグルコース量を 300mg/dl, 100mg/dl, 50mg/dl, 25mg/dl, 0 の 5 段階にした。

実験に使用した人血清の糖量は Hagedorn-Jensen 法で 81mg/dl であつたので上記各培養液中のグルコース量の計算値は 256mg/dl, 96mg/dl, 56mg/dl, 36mg/dl, 16mg/dl となる。

実験成績は表 4, 図 8, 写真 21, 22, 23, 24, 25 の

通りである。図 8 に明らかなように各系列ともほぼ平行的な増殖曲線を画いたが、培養 7 日以後においては Hanks 液にグルコースを全く加えなかつたものにおいては細胞数の維持が不良のようであつた。Hanks 液に全くグルコースを含まないところの最終的のグルコース量の計算値 16mg/dl の培養液では、本来の Hanks 液 (グルコース 100mg/dl 含有) を使用した場合における増殖に及ばなかつたことは写真 21, 24 によ

図 8 培養液中のグルコース量の相違による影響

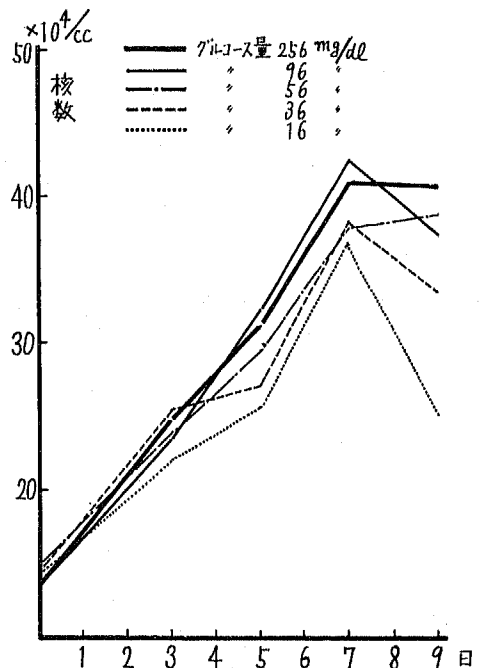


表 4 培養液中のグルコース量の相違による影響

培養液	組 成	グルコース量 (計算値) mg/dl	平均核数及び (pH)				
			接種時	3 日	5 日	7 日	9 日
1	LA 0.5g, HS 20cc H (グルコース 300mg/dl) 80cc	256	136.400 (7.2)	247.000 (7.2)	311.100 (7.0)	409.400 (7.0)	408.400 (6.4)
2	H (グルコース 100mg/dl)	96	136.800 (7.2)	234.000 (7.2)	321.600 (7.0)	425.600 (7.0)	375.200 (6.2)
3	H (グルコース 50mg/dl)	56	152.500 (7.2)	239.100 (7.2)	295.300 (7.0)	379.000 (7.0)	388.400 (6.2)
4	H (グルコース 25mg/dl)	36	149.200 (7.2)	254.200 (7.2)	270.200 (7.1)	383.000 (7.0)	336.400 (6.4)
5	H (グルコース 0)	16	146.000 (7.2)	221.000 (7.2)	256.800 (7.2)	368.000 (7.1)	251.900 (6.2)

(LA: Lactalbumin hyd., HS: 人血清, H: Hanks 液)

母培養 (48時間後), 培養液中の血清の濃度による影響 (72時間後)

写真 1 母 培 養

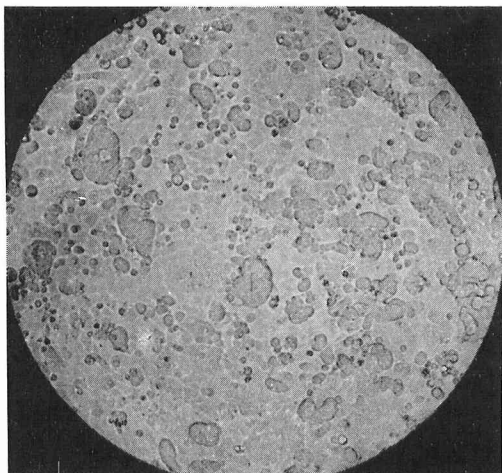


写真 4 血 清 20 %

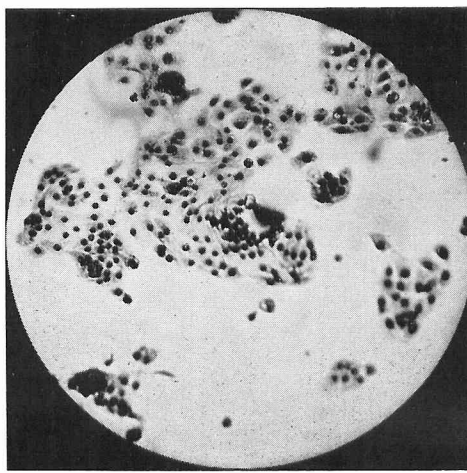


写真 2 血 清 40 %

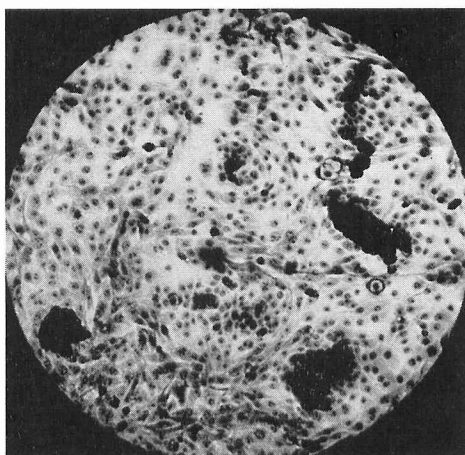


写真 5 血 清 10 %

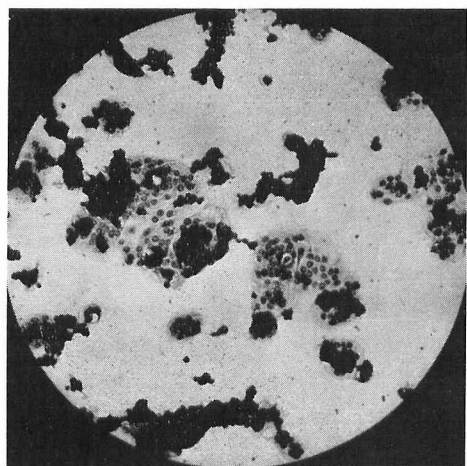


写真 3 血 清 30 %

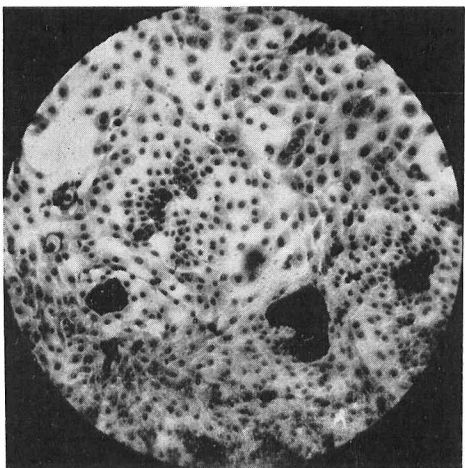
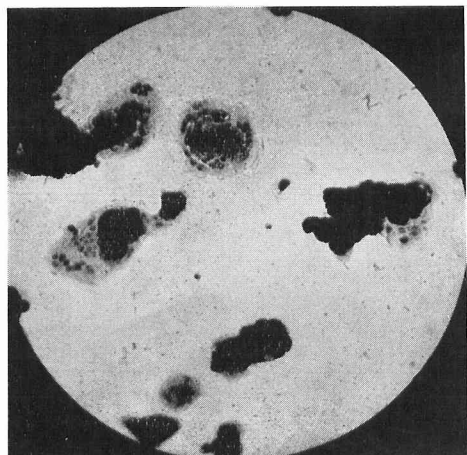


写真 6 血 清 5 %



(2~6 Giemsa 染色)

培養液の滲透圧による影響 (72時間後)

写真 7 氷点降下度 0.445°C

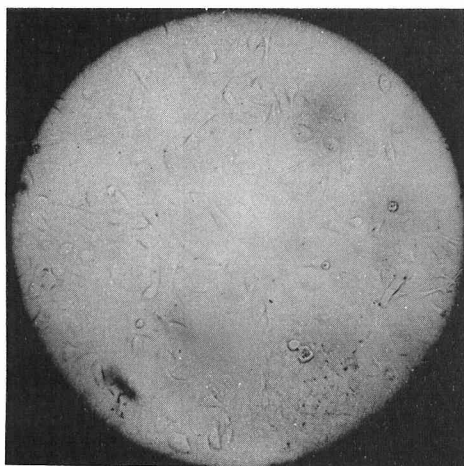


写真10 氷点降下度 0.690°C

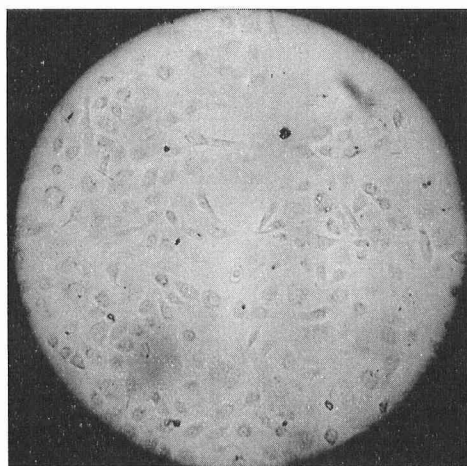


写真 8 氷点降下度 0.510°C

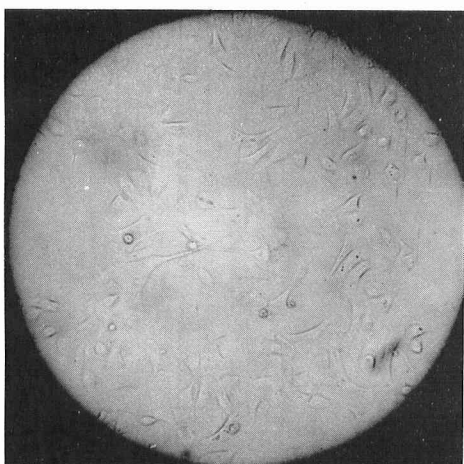


写真11 氷点降下度 0.790°C

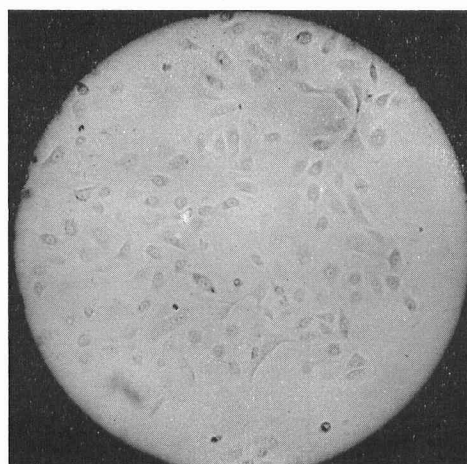


写真 9 氷点降下度 0.610°C

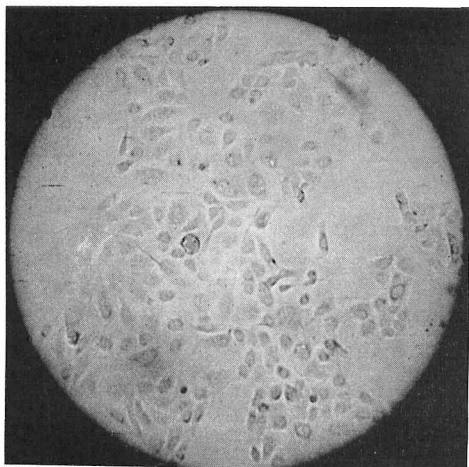
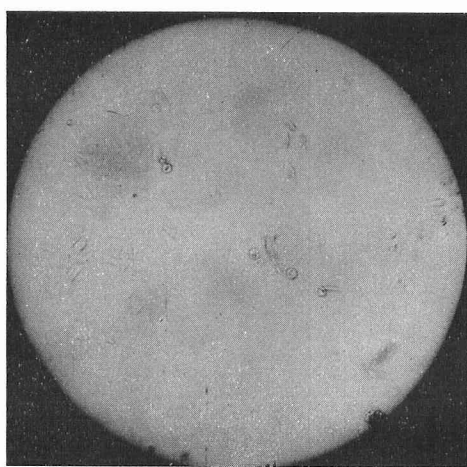


写真12 氷点降下度 0.930°C



培養液の滲透圧による影響 (6日後)

写真 13 氷点降下度 0.445°C

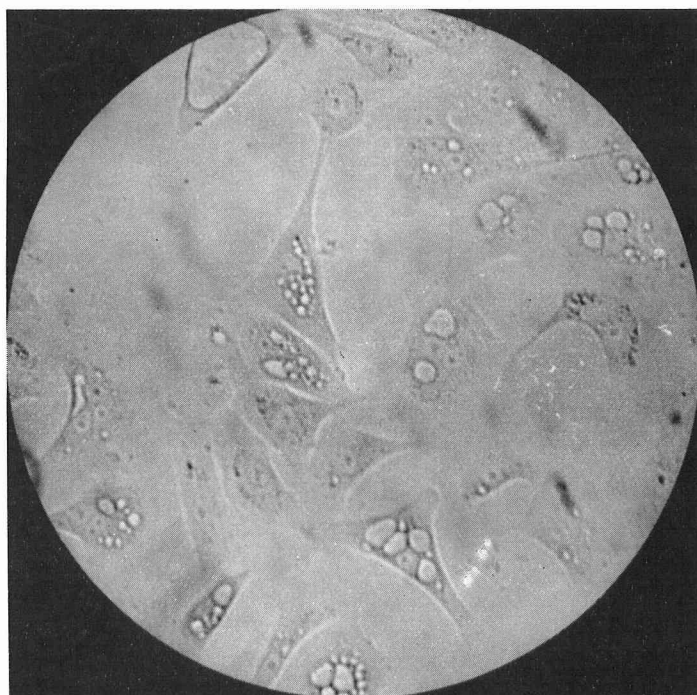
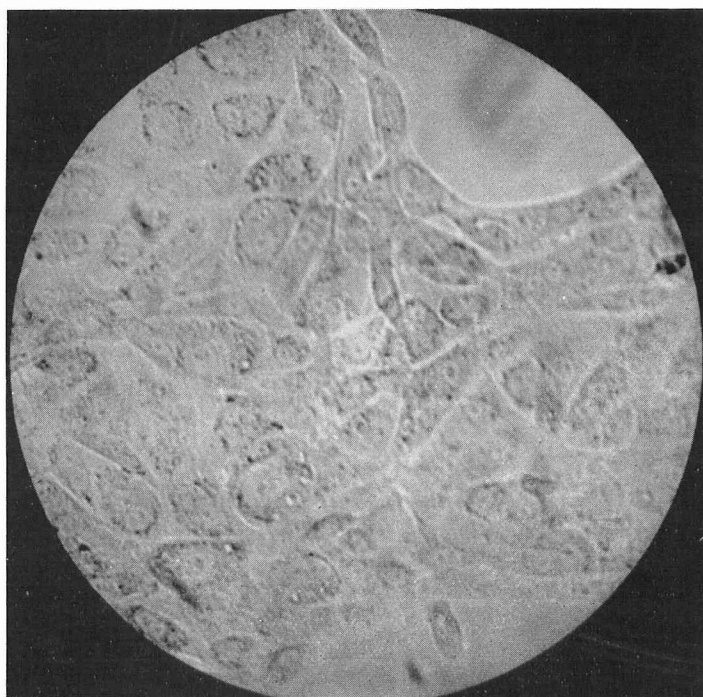


写真 14 氷点降下度 0.790°C



培養液中のK量による影響 (48時間後)

写真15 K 量 1.2 mEq/L

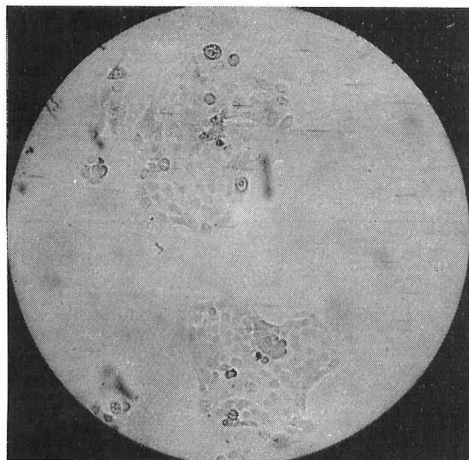


写真18 K 量 3.2 mEq/L

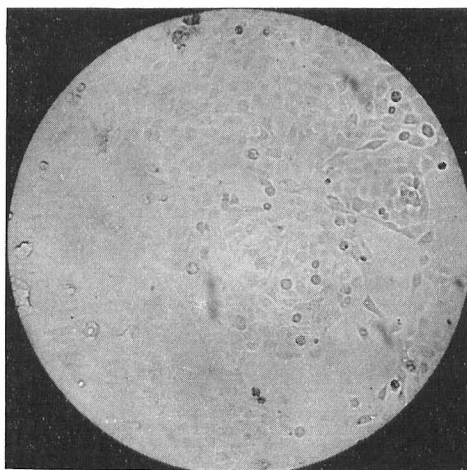


写真16 K 量 1.8 mEq/L

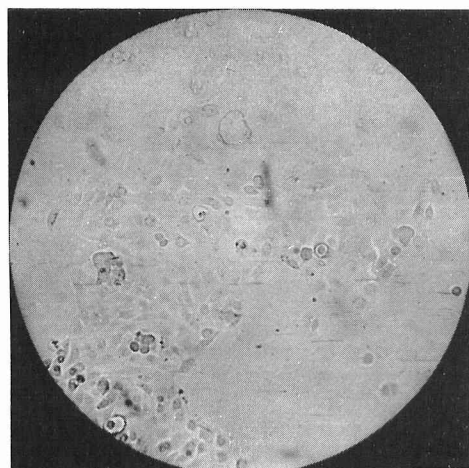


写真19 K 量 5.1 mEq/L

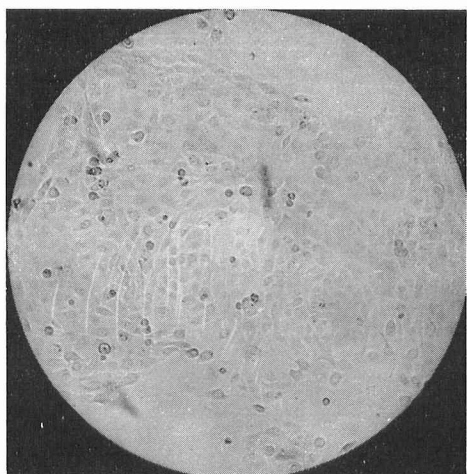


写真17 K 量 2.3 mEq/L

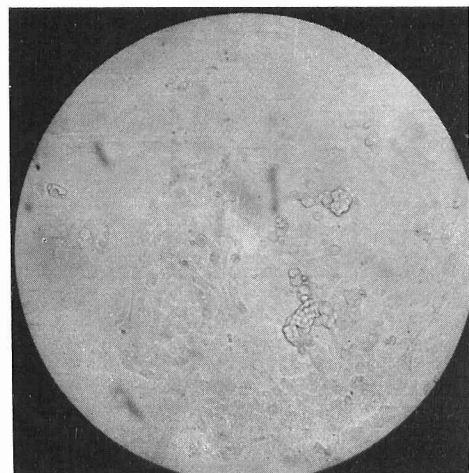
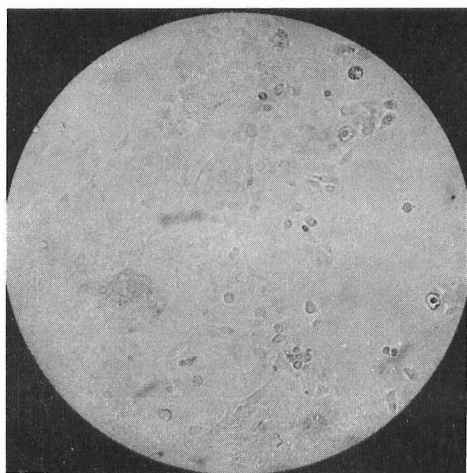


写真20 K 量 8.7 mEq/L



培養液中のグルコース量による影響(48時間後)

写真21 グルコース量 16mg/dl

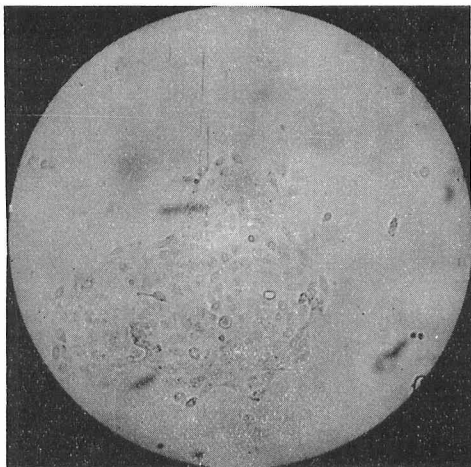


写真24 グルコース量 96mg/dl

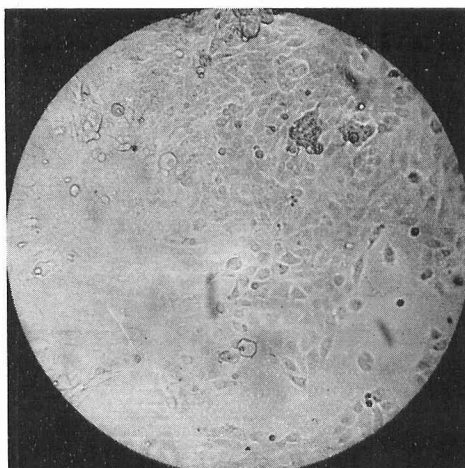


写真22 グルコース量 36mg/dl

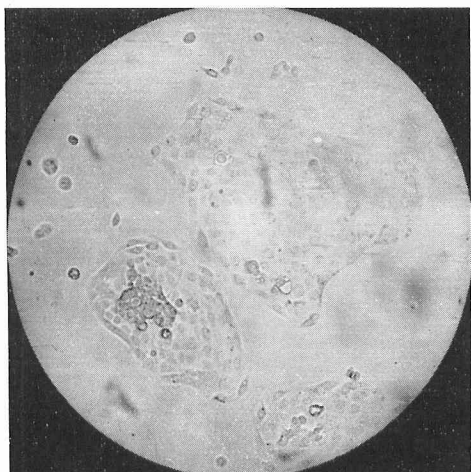


写真25 グルコース量 256mg/dl

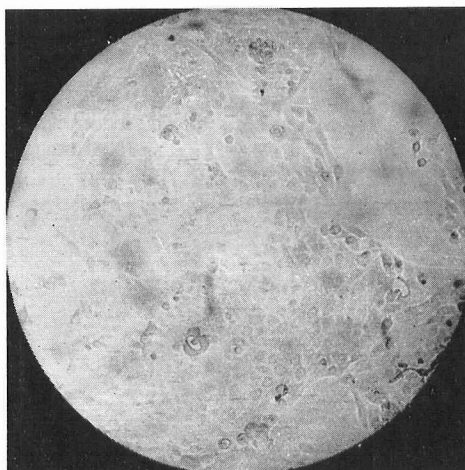
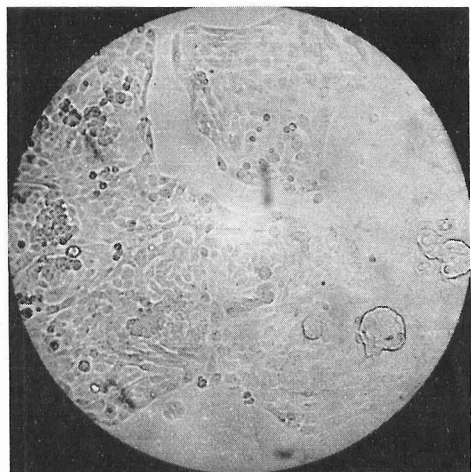


写真23 グルコース量 56mg/dl



り明らかである。しかしながら増殖を欠如する最低線は血清を20%含有する培養液では実験不能なところの16mg/dl 以下にあるものと思われる。Hanks 液のグルコース量を300mg/dl としても100mg/dl との間に増殖の相違を認めなかつた。

VII 総括並びに考按

細胞の増殖と栄養との関係を追求する時、従来の組織培養法、例えば Roller tube 法や懸滴法では、1) 凝固血漿(固相)と培養液(液相)の2相の中で培養が行われ、細胞の支持体であるところの前者は胎児エキス、血漿等からなるため培養液の組成のみを問題として増殖を批判し難い。2) 培養液として塩類溶液及び血清の他、成分が常に一定でない胎児エキスのごとき生体由来する材料を必要とし多数の未知の因子が関与する。3) 組織片を構成する細胞が単一でないので増殖能力が一定しない。4) 接種量の規定が困難である。5) 増殖の判定は主として植片の面積増大度を比較してなされるが、面積の増大は細胞の移住と真の増殖との和である上、その中の細胞の密度の表現も不能である。……等の欠点を有し、一般に大まかな実験成績が得られたに過ぎなかつた。

しかしこれらの欠点は、10年来の組織培養法の輝かしい進歩により著しく改善された。即ち Earle 等^⑥がマウスの皮下組織に由来する線維芽細胞を悪性化させたものの中から1個だけの細胞を取出して継代培養に成功したところのL細胞は、凝固血漿その他の支持体なしにガラス面で増殖でき、且つトリプシン処理で均等の細胞浮游液となるので実験に必要な培養管全部にはほぼ同数の細胞を入れることができる等の利点を有するが、更に低張クエン酸処理により核数算定を行うと培養管の中の細胞の増減の状態を正確に把握することが可能となつたのである。^{①③} また Gey 等^⑦が人の子宮頸癌から分離し継代した HeLa 細胞も L 細胞と同様の利点を有し増殖の観測に適しているので癌研究、ウイルス学的研究のみならず栄養学的研究^{③④⑥}にも重用されている。

然しながら、人体についてその栄養要求を解析したいという終局の目的からすれば、異種動物起源或は悪性腫瘍由来の細胞よりも、人正常細胞の組織培養による実験が望まれ、しかも in vitro の生活に適応した細胞は栄養要求が変異する可能性が充分考えられるので、継代培養を経た細胞を用いて実験することも好ましくない。

もともと Zitcer 等^⑩の HAC 培養法はウイルス増殖を目的としてはじめられたものではあるが、1層の上皮性細胞からなり他の卵膜組織からたやすく剥離で

きる人羊膜は、トリプシン処理が容易で単一の細胞のみからなる大量の細胞浮游液を得られ、またその細胞はガラス面で増殖し、1層の細胞シートを形成する点は形態学的観察にも便利であつて、殊に培養液としても胎児エキスを必要としない等、上述の2細胞系同様にこの種の実験に適したものといえる。材料が豊富な点も大きな魅力である。ただ考慮されるべきは、ウイルス研究の目的には培養細胞がウイルスの増殖を支え、或は培養した細胞のうち限られた一部のもののみでも発育しさえすればウイルスの細胞変性作用の観察に事欠かないが、栄養に関係する研究のごとく細胞増殖を問題とする組織培養のためには、接種した細胞の大部分が生存し、核数算定法で日を追つて増殖を追求する時少なくとも上昇する増殖曲線を畫けないようでは実験に支障を生ずる点である。Fogh 等^⑪は HAC の継代培養に関する論文の中に継代に成功した FL 株について増殖曲線を畫いているが、30回の継代を行つたもので培養液の更新を行わずに1週間に8~10倍に増殖している。そして増殖の速度については6回目継代以後増殖が旺盛になつたがそれまでは緩慢であつたことを述べている。また名生^⑫も継代可能な1細胞株を得たが、初代細胞の増殖は非常に緩慢で細胞は殆んど変性脱落し、3週後に20数個の細胞集団を形成したのみであつたが、継代により増殖が漸次急速になつたという。このように HAC の増殖は継代により in vitro の生活に適応するまでは、同じ上皮性細胞である HeLa 細胞が1週間で 10^3 倍に達する^{⑬⑭}増殖力に及ぶべくもないが、癌組織に由来する細胞の自律的増殖に比較して劣るのは当然であらう。

著者はこれら継代培養を経た HAC では、その栄養要求にも変異が起つている可能性のあることを考慮し、毎回新鮮な HAC を用いて実験を行つたが、母培養を行うにあたり変性徴候の少ない羊膜を選べば HAC は母培養に次ぐ第2代の培養で1週間に3~4倍の増殖をみるようになったが、これは Fogh、名生の成績と比較しても遜色のないもので、実験は充分可能であつた。

人羊膜のトリプシン処理の方法は、Zitcer 等^⑩は magnetic stirrer を用いて羊膜を入れたトリプシン液を攪拌し遊離した細胞を20分毎に集めており、名生^⑫もこれにならつて継代可能な1株を得た。Takemoto^⑮は同様に magnetic stirrer を使用したが20分毎に上清を取ることなく、6~14時間持続的に振盪を行い、長時間のトリプシン消化と機械的操作による破壊をまぬがれた生活力の強い細胞を得て培養を行つている。継代可能な株を得るためにはこのような強い障害作用

を加えて生活力の低い細胞を淘汰するのは好ましい方法であろう。著者は Weinstein^⑧, 遠藤^⑨にならつて, magnetic stirrer を使用することなく, 人羊膜を入れたトリブシン溶液を普通のガラス容器に入れたまま 20~25°C に放置して数時間のトリブシン消化を加え, 後, 手でゆるやかに容器を振ることにより細胞浮游液を作った。これは細胞に機械的操作による障害を与えることが少なく, 最も簡単な方法であるので頻繁に母培養を行う必要のある実験目的に適したものである。

著者は各種の実験を行うかたわら, Weinstein^⑧, 遠藤^⑨の方法によりトリブシン処理を行つた HAC の数株について継代培養を試みたが, 最も長かつたもので 6 代で増殖力が弱く植殖が不能となつた。継代を目的とするならば Takemoto 等^⑩の方法が好ましいのであろうが, 著者の実験とは離れて考慮すべき別の問題である。

HAC の核数算定のためのクエン酸処理は線維芽細胞に用いられる^{⑧⑨⑩}ように振盪器による加温振盪を加えなくても, HeLa 細胞で行われる^⑩ようにクエン酸クリスタル紫溶液を加えて 37°C に加温の後培養瓶を手でつかみ強く振盪すれば核はガラス壁から離れるので, これを算定することができた。しかし加温も振盪も HeLa 細胞より長く強く行う必要がある。

実験に用いる細胞数は HAC に関する従来の研究では 5×10^4 /cc がおよその目標にされている^{⑧⑨}が, 著者は 10^5 /cc 以上の細胞数で行つた実験でも比較的増殖がよかつたので $5 \sim 10 \times 10^4$ /cc を目標にした。時には母培養から充分な細胞数が得られなかつた為止むなく 10^4 /cc 程度で実験を行つたが, 充分な細胞数を用いた時よりも増殖がおとるよう思われた。

培養液の pH については, 著者の初期の経験で pH 7.6 で培養した成績はかんばしくなかつたが, 同様に Fogh 等^⑩も pH 7.5 で接種すると 1 日後に pH は増大し細胞の代謝産物により再び pH が 7.5 に下がるまでは細胞の増殖が見られなかつたので低い pH を採用したと云つてゐる。

血清濃度の異なる培養液を用いて増殖の相違と pH の推移を観察したが, 20% の血清を含む基本的な培養液では細胞の増殖も優れ, pH の変動も少なかつた。血清の濃度の高い培養液では細胞の増殖が著明であるにかかわらず pH が初期に却つて一時上昇した。これは前記のように細胞の増殖による pH の低下に対する血清の緩衝作用と, 保存により血清 pH が上昇するという事実^⑪によるものであろう。血清を含まない培養液または少量含む培養液では細胞の増殖を欠いて代謝産

物の蓄積は僅かであらうと思われたのに pH が低下した。

培養液の血清濃度については 30% が最も良好な増殖をもたらした。Zitcer 等^⑩は 40% よりも 20% がよいと述べているが, 培養液の更新を行わない著者の実験方法では 40% の方が目を追うに従い増殖が良好となつたのは, 血清に由来する各種アミノ酸, ビタミン等の絶対量の相違によるものであろうか。血清を含まない培養液では増殖は欠如したのみでなく接種した細胞は次第に変性脱落した。Fogh 等^⑩も血清なしでは増殖を欠き, 2~4% の血清をおこなつたとき増殖が 1~2 日のうちに始まることを記している。組織培養における培養液の血清蛋白の機能は充分解明せられていないが, Eagle^⑫によると細胞の増殖に必要な各種アミノ酸, ビタミン等を充分に含ませた増養液を使用しても, L 細胞の増殖を支えるには培養液の 1/5000 に相当する血清蛋白を要し, 最大の増殖をもたらすには 1/1500 を要するといひ, HeLa 細胞にはその 3~4 倍が必要であるという。著者の HAC についての実験では 5% の血清を含む培養液でも増殖は僅かであつたが細胞の生存を支え得た。これは血清蛋白量から概算すると培養液中にほぼ 1/300 に相当する血清蛋白を含有することになる。これは Eagle の L, HeLa 両細胞における血清蛋白必要量をはるかに上回る量であるが, 著者の実験ではもともとアミノ酸源, ビタミン源の意味をも持たせて使用している血清であるから比較は困難である。

組織培養法において, 培養液の滲透圧は多少高張性或は低張性に傾いても培養成績に大きな影響はないものと一般に信じられて来たがくわしい検討を行つた報告は少ないようである。

著者の実験では氷点降下度 0.930°C を示した高張性培養液では細胞体は濃縮し変性脱落し, 又 0.445°C を示した低張性培養液では増殖が僅かであつたが, 0.510~0.790°C の各段階では殆んど大差なく増殖した。即ち HAC の滲透圧に対する抵抗は比較的大きく, 培養液が稍低張性のもの(氷点降下度 0.510°C) から相当高張性のもの(氷点降下度 0.790°C) までの滲透圧の或程度の変動は細胞の代謝過程に大きな影響を与えないものと思われた。

山田等^⑬は HeLa 細胞について培養液の滲透圧の影響を観察しているが, それによると培養液の滲透圧を NaCl 溶液に換算して, NaCl 量 0.83~1.28% に相当する培養液では HeLa 細胞の増殖に大した差がないが, 0.72% の低張性では増殖が稍おとり, 1.48~1.68% に相当する高張性培養液では増殖曲線が下降してい

る。最大の増殖を示したものは 0.92% であったという。即ち著者の HAC における実験とはほぼ同じ傾向を示したものと見える。

Rosenbluth 等²⁴⁾は L 細胞の滲透圧抵抗を検索している。即ち L 細胞の一定量を等張 (100%) から種々にうすめた低張 Hanks 液に入れ、30分後その上清を取り、更にそれぞれに蒸留水を加えて2時間後に完全な細胞の融解をおこさせた後の上清をとり、比濁して細胞融解の程度を検したが、13%の低張 Hanks 液以下0迄の間で細胞融解がおこるのをみとめ、Wintrobe²⁵⁾による赤血球抵抗がほぼ50%であるに比べて線維芽細胞の滲透圧抵抗は強大であることを記している。

また Rosenbluth は L 細胞を鏡検しながら蒸留水を加えると個々の細胞は迅速に従前の直径の3~4倍に膨大し約3分の後細胞膜がやぶれて縮少するのを見ているが、著者の実験でも氷点降下度 0.445°C の培養液においては、6日後の写真観察で見られるように(写真13)細胞体が著明な膨大を来したのと比べて興味深い。

著者の実験による HAC の増殖に必要な K 量は 1 mEq/L 程度であり、Eagle⁹⁾の L 細胞及び HeLa 細胞のそれとはほぼ一致している。人血清の K 量と等しい 5.1 mEq/L の K 量を含む時増殖が良好であったのは当然であるが、その2倍量に近い 8.7 mEq/L を含むものにおいても、細胞の増殖という点のみから見れば何等障害を来すことなく良好な増殖を示したことは、蛋白合成により細胞が形成されるとき充分な K を供給することが欠くべからざる条件であることを物語り、K 代謝と窒素代謝との密接な関係をうらづけるものである。

培養液のグルコース量については、HAC の増殖を全く欠く量は 20% の血清含有培養液では実験不能の 16mg/dl 以下にあるようで、グルコース量の計算値 256mg/dl と 96mg/dl との間には増殖曲線に大差はなく、96mg/dl 以下の各段階でもこの実験の範囲内では著しい相違を認めなかったが、7日以後においては 16mg/dl の場合には細胞の維持が不良のようであった。

以上 HAC の組織培養法に細胞核数算定法を応用して行つた基礎的な実験に多少の考按を加えた。

組織培養法における細胞増殖の測定法は、最近、細胞核数算定の他、組織呼吸、ヘマトクリット管による容積測定、アイソトープの摂取、DNA (desoxyribonucleic acid) 濃度、蛋白濃度、TPP (total purines and pyrimidines) 濃度、等について検討が加えられている²⁶⁾。細胞核数算定法はこれらすべての評価法と

比較してもゆるぎない位置をしめているが、これらの測定成績を組合せることにより一層立体的な増殖評価の方法が確立されるものと考えられ今後の発展がのぞまれる。

VIII 結 語

(1) 人正常細胞の組織培養法により細胞の増殖に必要な栄養に関する研究を行う目的をもつて、新鮮な人羊膜細胞 (HAC) の培養を行い、細胞核数算定法を応用して増殖を追求することができたので、その実験方法を記述した。

(2) HAC の増殖には培養液に血清を必要とし、血清量 5% を含有すれば増殖は僅かであるが細胞の生存を支え得、30%含有する時最もよく増殖したが、20%含有の培養液で増殖は充分である。

(3) HAC の増殖に対し滲透圧の影響は比較的少なく、氷点降下度 0.510~0.790°C の範囲ではほとんど増殖に相違を認めない。0.930°C の高張性培養液においては細胞は濃縮し変性脱落し、また 0.445°C の低張性培養液では細胞は極度に膨大し増殖はわずかにすぎなかった。

(4) HAC の増殖に必要な培養液中の K 量及びグルコース量につき検討した成績を述べた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導並びに御鞭撻を賜り、御校閲を頂いた山田教授に心から謝意を捧げる。また実験手技の御教示と御助言をいただいた東京大学伝染病研究所遠藤元繁、勝田甫両博士、ならびに人羊膜入手に御協力下さった本学産科婦人科学教室の諸氏に深謝する。

なお本研究は文部省科学試験研究費補助金により行われたものである。

本稿の要旨は第3回中部日本小児科学会(昭和33年10月)において発表した。

文 献

- ①Evans, V. J., Earle, W. R., Sanford, K. K., Shannon, J. E. Jr., & Waltz, H. K.: J. Nat. Cancer Inst., 11: 907, 1951.
- ②Sanford, K. K., Earle, W. R., Evans, V. J., Waltz, H. K., & Shannon, J. E.: J. Nat. Cancer Inst., 11: 773, 1951.
- ③Eagle, H.: Science, 122: 501, 1955.
- ④Eagle, H.: J. Exp. Med., 102: 37, 1955.
- ⑤Eagle, H.: J. Exp. Med., 102: 595, 1955.
- ⑥Sanford, K. K., Earle, W. R., & Likely, G. D.: J. Nat. Cancer Inst., 9: 229, 1948.
- ⑦Scherer, W. F., Syverton, J. T., & Gey, G. O.: J. Exp. Med., 97: 695, 1953.
- ⑧Katsuta, H., Takaoka, T.,

- Oishi, Y., Baba, T., & Chang, K. C.: Japan J. Exp. Med., 24: 125, 1954. ⑨Katsuta, H., Takaoka, T., & Oishi, Y.: Japan J. Exp. Med., 27: 19, 1957. ⑩Zitcer, E. M., Fogh, J., & Dunnebacke, T. H.: Science, 122: 30, 1955.
- ⑪遠藤元繁他: 第5回日本ウイルス学会総会演説抄録, 1957. ⑫勝田甫: 組織培養法, 納屋書店, 東京, 1955. ⑬Takano, K., Yamada, M., & Yaginuma, K.: Jap. J. M. Sc. & Biol., 9: 17, 1956.
- ⑭Yamada, M., & Takano, K.: Jap. J. M. Sc. & Biol., 9: 27, 1956. ⑮Rinaldini, L. M.: Nature, 173: 1134, 1954. ⑯Fogh, J. & Lund, R. O.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 94: 532, 1957.
- ⑰青木美典: 日本小児科学会雑誌, 62: 824, 1958.
- ⑱赤羽太郎: 日本小児科学会雑誌, 62: 555, 1958.
- ⑲名生美喜雄: 日本小児科学会雑誌, 62: 942, 1958.
- ⑳Takemoto, K. K. & Lerner, A. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 94: 179, 1957. ㉑Weinstein, H. J., Alexander, C., Yoshihara, G. M., & Kirby, W. M. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 92: 535, 1956. ㉒Frankel, J. W., & West, M. K.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 97: 741, 1958.
- ㉓Yamada, M., Yaginuma, K., & Takano, K.: Jap. J. M. Sc. & Biol., 9: 243, 1956.
- ㉔Rosenbluth, J., & Pappas, G. D.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 98: 38, 1958. ㉕Wintrobe, M. M., Clinical Hematol., 3rd Ed. p162, 1952.
- ㉖McIntire, F. C., & Smith, M. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 98: 76, 1958.