

脾臓組織培養に関する研究

第 1 編

培養法の簡易化について

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木潔教授)

島 崎 孝 一

(昭和42年3月17日受稿)

内 容 目 次

第1章 緒 言

第2章 実験材料

- 1) 脾臓組織片
- 2) 培 養 基
- 3) 発育促進物質
- 4) 培養器具

第3章 実験方法

- 1) 培養術式
- 2) 観察方法

第4章 実験成績

- 1) 血清非働化の影響について
- 2) 発育促進物質について
- 3) Plasma clot culture との比較
- 4) 正常マウス脾臓臨床組織培養に於ける増生帯構成細胞の経時的変化について

第5章 総括並びに考按

第6章 結 論

第1章 緒 言

古来迷宮の臓器の名を以つて呼ばれて来た脾臓の解剖, 病態生理に関し, 近年多方面より新見解が加えられつつあるとは言え, なお他臓器に比し著しくその解明の遅れた感は免れない。

抑々脾は骨髓, 淋巴腺と並び網内系の中核をなし, 脾腫が各種網内系腫瘍はもとより多くの血液疾患と直接間接に密接な関連を有する事は衆知の如くである。

ところで教室では先年来骨髓組織培養による広範なる基礎的並びに臨床的研究を行ない数々の業績を発表して来たが, 近年は培養術式を可及的に簡易化した我々の所謂「臨床培養法」を広く routine work として用いることにより, 白血病を始めとする各種血液疾患の診断, 治療効果の判定, 予後の判断等に極めて大きな臨床的意義を見出している。そこで著者は脾についても同様な方法を適用することにより, 血液疾患の診断をより一層適確ならしめ, また腹腔鏡の適用による脾生検の安全なる実施と相まって各種脾腫の解明に資するところ極めて大であろうと考えた。

しかるに脾は骨髓と共に同じく網内系を形成する

とは言え組織学的に大なる相違をなすものであり, 骨髓に於いて用いられている培養術式をそのまま脾に適用出来るや否やは不明である。そこで先ず本編に於いて脾組織培養法を簡易化し臨床応用に供する為の方法論に関し基礎的事項を検討する事にした。

抑々組織培養に於ける培養組織の発育は種々の要因により影響を受けるが中でも培地の構成成分に左右されること極めて大である。そこで培養基については血清非働化の影響を観察し, 発育促進物質については市販で入手し易い 2, 3 の薬物をえらんで比較検討し, 以つて至適培地を見出さんとした。更にかくして得られた「脾臓臨床培養法」を従来の Plasma clot culture と比較し実地使用に耐え得るや否やを検討した。以下その成績について述べる。

第2章 実験材料

1) 脾臓組織片

血清非働化並びに発育促進物質についての実験では成熟せるマウス, 家兎及びラッテ脾を無菌的に剔出し, リンゲル氏液中でグレーフェー刀にて被膜を充分除去した後約 0.5~1.0mm の組織片として切り出し, これを培養材料とした。

Plasma clot culture との比較実験では同一の成熟

マウスの脾臓の同一箇所より得た組織片を前記の実験と同様にして使用した。

2) 培養基

家兎脾の培養には家兎血清を、ラッテではラッテ血清を、またマウスにては採血困難の為ラッテ血清を使用した。何れも成熟せる健全動物より採血した。これ等を57°C 30分非働化処理し、同処理を行わないものと比較検討した。

Plasma clot culture に於いては正常ラッテのヘパリン加血漿を使用した。

3) 発育促進物質

鶏胎圧搾液に代るものとして入手し易い市販の葉酸及びVB₁₂、更に核酸(RNA)について検討した。VB₁₂及び葉酸としてはそれぞれChocola B₁₂(シアノコバラミン 100γ/cc), Foliamin (15 mg/cc)を使用し、核酸は酵母より抽出したRNAのNa₂塩をリンゲル氏溶液に溶解しSeitzにて濾過し0.5%溶液として使用した。

Plasma clot culture に於いては鶏胎圧搾液を使用した。

4) 培養器具

平木式臨床組織培養盤 No. 1 を使用し、また位相差顕微鏡観察の目的で厚さ0.9mmの良質載物硝子上にカバーガラスを貼布し陥凹部を作れるものを使用した。

Plasma clot culture に於いては凹窩載物硝子を使用した。培養器具はすべて乾熱滅菌して使用した。

第3章 実験方法

1) 培養術式

平木式臨床組織培養盤 No. 1 の陥凹部中央にツベルクリン注射器にて血清1滴を滴下し、更にVB₁₂、葉酸、核酸の何れか1滴を添加両者をよく混和し、その中央に脾組織片を置きカバーガラスをかけパラフィンにて封入し、カバーガラス面を下にして37°C 孵卵器に入れる。

Plasma clot culture に於いてはアルコール処置後、乾熱滅菌した大型カバーガラスの中央にヘパリン加血漿1滴を滴下し、硝子棒を用いて直径約15mmの円型に拡げその中央部に脾組織片を置く。次いで鶏胎圧搾液を1滴滴下する。一方凹窩載物硝子の凹窩の周囲に滅菌ワセリンを盛り、培養を終ったカバーガラスの上に逆に置き円形培地が凹窩中央に位する様に培地が凝固する迄そのまま孵卵器中に入れ、凝固完了後両ガラス間をパラフィンにて充分に密封

する。次いで37°Cの孵卵器中にて培養する。

2) 観察方法

培養後3, 6, 9, 12及び24時間と経時的に培養標本を取り出し、37°Cに保った顕微鏡加温装置中に顕微鏡を入れAbbe氏描画装置をつけてその原組織及び増生帯を描画し、その面積をプランメーターで測定した。新生増生帯面積の原組織面積に対する比率を比較成長価とした。また顕微鏡(接眼5×, 対物100×, 油浸)を用いて増生帯周辺部、中間部、中心部の夫々1視野内の細胞数を算定してその和を密度指数とした。次に顕微鏡(接眼10×, 対物100×, 油浸)にてAbbeの描画器を使用し増生帯中間部で5ヶ以上のリンパ球につき細胞中心部の移動を30秒毎に2分間追跡して描画し、1細胞の1分間の平均移動距離を測定しリンパ球遊走速度とした。また必要に応じて同様にして好中球遊走速度をも測定した。増生帯構成細胞の経時的変化の観察は位相差顕微鏡を使用した。

第4章 実験成績

1) 血清非働化の影響について

血清はこれを57°C, 30分加温して非働化処理したもの、及び対照として無処理のものを使用した。血清1滴にVB₁₂(シアノコバラミン 100γ/cc)1滴を加えたものを培地とし、マウス及び家兎脾について両者を比較検討した。

第1表の如く比較成長価はマウスで培養24時間で非働化群5.38, 無処理群3.97, 家兎で非働化群14.7, 無処理群13.5を示した。24時間値のみならず培養全経過を通じて非働化群の方が良好な増生を示し、特にマウスでその差が大きかった。

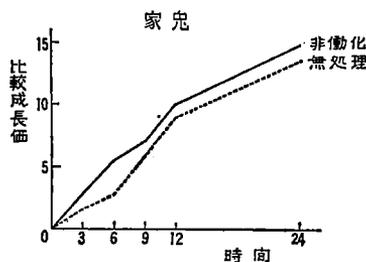
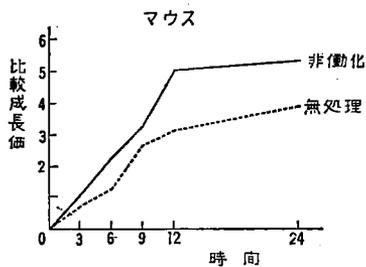
また第2表の如く細胞密度指数はマウスで培養12時間に非働化群106, 無処理群86, 家兎で非働化群93, 無処理群79を示し、6時間値と共に何れも非働化群の方が高値を示している。

次に増生帯主要構成細胞であるリンパ球の遊走速度はマウスで培養6時間にて非働化群5.1μ/m, 無処理群4.3μ/m, 家兎で非働化群9.9μ/m, 無処理群8.2μ/mで軽度乍ら非働化群が高値を示した。12時間値でも同様な結果を示している。また非働化群の方が増生帯構成細胞の変性過程がやや遅延する傾向にあり、培養48~72時間にてなお遊走細胞の残存が見られた。

以上の成績より以下の全実験に於いては総て非働化血清を使用した。

第1表 各種血清を用いた場合の比較成長価

動物	血清	時間				
		3	6	9	12	24
マウス	非働化	1.02	2.20	3.25	5.05	5.38
	無処理	0.76	1.30	2.69	3.10	3.97
家兎	非働化	2.80	5.48	7.08	9.90	14.70
	無処理	1.52	2.73	5.90	8.90	13.50



第2表 各種血清を用いた場合の細胞密度指数とリンパ球遊走速度

細胞密度指数				リンパ球遊走速度 (μ/m)			
動物	血清	時間		動物	血清	時間	
		6	12			6	12
マウス	非働化	97	106	マウス	非働化	5.1	3.8
	無処理	80	86		無処理	4.3	3.0
家兎	非働化	89	93	家兎	非働化	9.9	6.4
	無処理	72	79		無処理	8.2	4.8

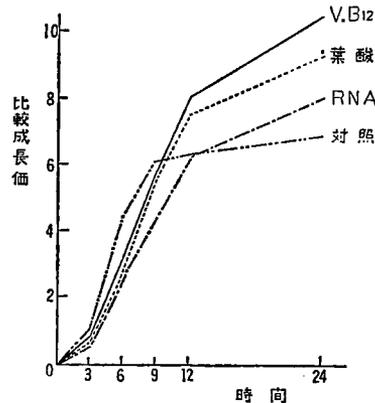
2) 発育促進物質について

発育促進物質として VB₁₂, 葉酸及び核酸 (RNA) の三者を撰択し, マウス, 家兎及びラッテについて各々培養し結果を比較検討した。なお対照として血清1滴にリンゲル氏溶液1滴を加えたものを培地として実験を行った。

先ずマウスに於いて比較成長価は第3表の如く培養初期に於いては対照群が最も高値を示すが, 9時間を過ぎてからは増生の速度が鈍化し24時間値では対照群が最も低値を示す。培養12~24時間に至ると VB₁₂ が最も良好な成績を示し, 葉酸がこれに次ぐ。

第3表 各種発育促進物質を用いた場合の比較成長価 (マウス)

添加物	時間				
	3	6	9	12	24
V. B ₁₂	0.80	3.16	5.80	8.00	10.52
葉酸	0.60	2.90	5.71	7.52	9.32
RNA	0.58	2.65	4.40	6.25	8.02
対照	1.16	4.44	6.13	6.30	6.90



第4表 各種発育促進物質を用いた場合の細胞密度指数とリンパ球遊走速度 (マウス)

細胞密度指数				リンパ球遊走速度 (μ/m)			
添加物	時間	時間		添加物	時間	時間	
		6	12			6	12
V. B ₁₂	6	97	106	V. B ₁₂	6	5.1	3.8
		73	79			葉酸	4.3
葉酸	12	57	68	RNA	6	3.8	3.0
		43	45			対照	4.5

次に細胞密度指数は第4表の如くで6時間値, 12時間値共に VB₁₂ が最良の成績を示し, 対照群の2倍以上の数値を示した。次いで比較成長価と同様葉酸がこれに次いでいる。

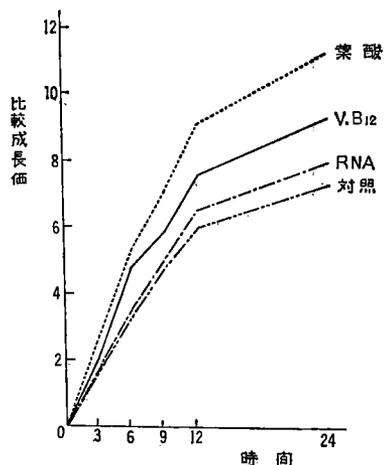
リンパ球遊走速度についても VB₁₂ が高値を示し, 12時間値に於いては対照群が最も低値を示している。

家兎の培養成績はマウスのそれと多少の相違を示した。即ち第5表の如く比較成長価に於いては全経過を通じて葉酸が最も良好な増生を示し, 培養開始後12時間迄では VB₁₂ がこれに次いた。

細胞密度指数, リンパ球遊走速度については第6表の如くで何れも対照群が低値を示し VB₁₂, 葉酸が比較的に高値を示したが, VB₁₂, 葉酸の間に有意の差は見られなかった。

第5表 各種発育促進物質を用いた場合の比較成長価 (家兔)

時間 添加物	3	6	9	12	24
V.B ₁₂	2.10	4.73	5.78	7.55	9.20
葉酸	2.80	5.28	7.00	9.10	11.20
RNA	1.73	3.52	5.05	6.50	7.90
対照	1.69	3.32	4.74	5.90	7.25



第6表 各種発育促進物質を用いた場合の細胞密度指数とリンパ球遊走速度 (家兔)

細胞密度指数			リンパ球遊走速度 (μ/m)		
時間 添加物	6	12	時間 添加物	6	12
V. B ₁₂	90	98	V. B ₁₂	9.9	6.4
葉酸	87	94	葉酸	9.7	5.8
RNA	86	88	RNA	9.2	6.0
対照	63	60	対照	9.1	4.2

ラッテについても同様の検索を行つたがマウスの場合とほぼ同様な結果を得た。

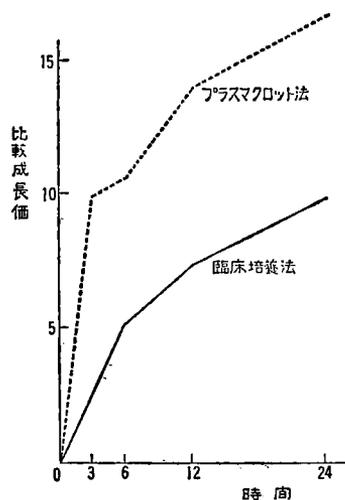
3) Plasma clot culture との比較

前記の実験の結果に基き脾臓臨床組織培養法の培地としては非働化血清1滴と VB₁₂ (100γ/cc) 1滴とを混和せるものが適当と考え、本法と従来の Plasma clot culture を用いて同一マウス脾を培養しその結果を比較検討した。

第7表の如く比較成長価に於いては臨床培養法はかなり劣り特に3時間値に於いて低値である。然しその後は Plasma clot culture の経過と平行して順調に伸びており、12時間より24時間に至る間も増生

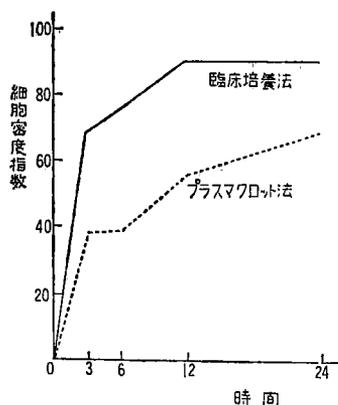
第7表 臨床培養法とプラスマクロット法の比較成長価

時間 培養法	3	6	12	24
臨床培養法	2.48	5.14	7.31	9.90
プラスマクロット法	9.88	10.60	13.92	16.69



第8表 臨床培養法とプラスマクロット法の細胞密度指数

時間 培養法	3	6	12	24
臨床培養法	68	75	90	91
プラスマクロット法	38	39	56	69



面積はかなり拡大している。

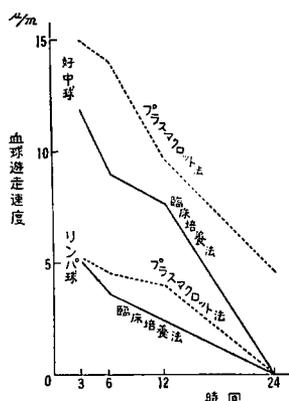
これに対して、第8表に示す如く細胞密度指数は

Plasma clot culture に比し明かに高値を示しているが、12時間以後は殆んど増加していない。一方 Plasma clot culture に於いては12時間以後も細胞密度指数は順調な伸びを見せている。

第9表に示す如く、リンパ球遊走速度に於いては

第9表 臨床培養法とプラスマクロット法の血球遊走速度(μ/m)

培養法	時間 細胞	時間			
		3	6	12	24
臨床培養法	リンパ球	5.1	3.7	2.4	0
	好中球	12.0	9.1	7.7	0
プラスマクロット法	リンパ球	5.2	4.5	3.9	0
	好中球	15.0	14.2	9.8	4.6



Plasma clot culture がややすぐれ、特に12時間値に於いて差があるが3時間値に於いては殆んど差がなく、両者共に24時間で遊走機能が消失している点も同じである。即ち12時間値を除いては有意の差は見られなかった。また好中球遊走機能も Plasma clot culture がややすぐれ24時間でもなおかなり遊走機能が残存したが、臨床培養法では24時間で遊走機能は消失した。然し両培養法に於ける好中球遊走速度を示すグラフはほぼ平行している。24時間では臨床培養法に於いては辺縁部の成熟リンパ球、好中球に変性顆粒の出現を認め変性過程の進行が見られたが、Plasma clot culture に於いては変性はやや軽度であった。

4) 正常マウス脾臓臨床組織培養に於ける増生帯構成細胞の経時的変化について

健常成熟マウス脾を前述の臨床組織培養法で培養した場合の経時的培養所見は次の如くである。

培養30分~1時間頃より原組織周辺に成熟リンパ球の出現を認め、2~3時間で中心部が密で辺縁部に行くに従い疎な増生帯を形成し、逐次増大する。

細胞構成の変遷は従来の培養法に近似した傾向を示すが、初め12時間頃迄は成熟リンパ球が大部分を占め(70~80%)、次いで成熟好中球が多く(15~20%)、また少数の単球が見られる(3~5%)。好酸球も見られるが極めて少数である。幼若リンパ球は原組織周辺に少数見られるが、骨髓系幼若細胞、巨核球は殆んど見られない。細網細胞の出現は9~12時間頃に既に見られる。24時間では中心部から中間部にはなお活潑な細胞を認めるが、辺縁部では成熟リンパ球、好中球共に変性顆粒の出現を認め、遊走機能が低下し次第に変性過程が進行する。この頃中心部に少数の、我々の分類による細網細胞II型及びIII型を認める。48時間では原組織より放射状に線維芽細胞が出現して来るが、細網細胞と共に著明な増生を見る事なく変性が高度になり、生体観察はほぼ困難になる。

第5章 総括並びに考按

1907年 Harrison¹⁾ が蛙リンパ液を用いて蛙の神経線維の培養に成功して以来組織培養法は次々と改良され、1910年 Carrel and Burrows²⁾ は凝固メジウムを培地支持体とし、1914年 Ebeling³⁾ は鶏胎圧搾液と血漿を用いて Fibroblasten の長期の培養に成功した。また1915年 Lewis⁴⁾ はロック氏液に鶏胎圧搾液、デキストローズを加えた培地を提案し、Cracium⁵⁾ が Howell and Holt⁶⁾ の発見した Heparin を組織培養の血漿分離に導入し組織培養を簡易化した。以来組織培養は Carrel⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾, Erdmann¹¹⁾¹²⁾¹³⁾, Champy¹⁴⁾, Fischer¹⁵⁾¹⁶⁾, 木村¹⁷⁾ 等により細菌学、生理学、病理学、生物学、薬理学等の各部門に広く応用される様になり、1949年 Enders, Weller, Robbins¹⁸⁾ が人胎臓器を培養しポリオウイルスの増殖に成功して今日の隆盛を見るに至った。

固形培地として血漿、寒天、ゼラチン等が、また液体培地としてブイオン、ロック氏液等が使用せられ、発育促進物質として各種臓器エキス、糖類、ビタミン類等が使用せられ実際上はこれ等に更に修飾が加えられて複雑化しているのが現況である。

近年教室に於いては骨髓体外組織培養法を大きく取り上げ、被覆、液体、瓶及びローラーチューブ法を駆使し、基礎的、系統的研究を行い更に臨床面にこれを応用して各種血液疾患患者骨髓の生体観察により既に幾多の新知見を得ている¹⁹⁾³⁶⁾。特に白血病及び再生不良性貧血の正確な診断には極めて優れた検査法であると云える。然し乍ら臨床最上最も応用

範囲の広い Plasma clot culture ですらヘパリン加血漿、鶏胎搾液等の入手困難な材料と習熟せる手技を必要とし、臨床応用は困難であつた。この点から教室小野³⁷⁾は骨髓組織培養の簡易化を試み、培地として血清並びに市販 VB₁₂ (100 γ /cc) を、培養器として市販の平木式臨床組織培養盤 No. 1 を使用する骨髓臨床組織培養法を考案して、各種血液疾患患者骨髓を培養しその臨床的有用性を確認した。また教室大龜³⁸⁾は骨髓臨床組織培養法を用いて健康人並びに各種血液疾患患者骨髓を培養し墨粒貪喰能、生体染色の面から好中球機能を検討し、小野³⁷⁾と同様にその有用性を強調している。

抑々脾の組織培養に関しては殊に胎生期、幼若期のものでは比較的容易であつた為古くより幾多の研究があるが詳細な形態的研究に欠ける面があつた。1911年 Carrel and Burrows³⁹⁾はヒナ及び鶏胎脾を正常血漿中並びに滲透圧を種々に変化させた血漿中で培養しその増生に及ぼす滲透圧の影響を観察した。また Robert and Lambert⁴⁰⁾は同年前者と同様な方法で鶏胎脾を培養し培地に異物 (Lycopodium spores) を添加して生ずる異物巨大細胞について考察した。1912年 Hayami and Tanaka⁴¹⁾は鶏脾及び鶏肉腫を培養して滲透圧の影響を調べ、1914年 Lambert⁴²⁾は鶏胎脾を血漿で培養し、その際血漿を血清、リンゲル氏液で稀釈した培地を対照として用いた。1923年 Rioch⁴³⁾はヒナ脾臓を培養して遊走細胞を解剖学的に観察し、Fazzari⁴⁴⁾は1926年鶏胎並びに成熟家鶏脾を培養して細胞学的に比較検討し、Erdmann 等⁴⁵⁾も同年ラッテ脾を各時期別に培養して細胞学的考察を行つている。1929年 Fischer und Doljanski⁴⁶⁾は脾間質細胞の培養について報告し、同年服部⁴⁷⁾は鶏胎脾を培養して細胞種の検討を行い、血球細胞、脾髓細胞並びに大型紡錘状細胞について報告している。1931年 Huzella⁴⁸⁾は鶏胎脾培養を映画撮影により観察し、遊走細胞並びに形態不定の大型細胞について言及している。1939年 Stieve⁴⁹⁾は初めて成人脾の培養を行い、培養後短時間でリンパ球様の小型並びに中型細胞が遊出し大型リンパ球、好中球、好酸球、単球も認められ、著明なアメーバ様運動、リンパ球の Mitose が観察されたと述べている。また教室木畑⁵⁷⁾は雑系マウス脾をローラーチューブ培養法で培養し、脾細網細胞について、生体染色、墨粒貪喰能試験、位相差顕微鏡、螢光培養法等を駆使して詳細なる系統的研究を行い、更に教室半沢⁵⁸⁾は人並びに各種動物につき

脾臓組織培養を行ない、脾内巨核球につき詳細な細胞学的研究を行なつた。その他脾組織培養に関しては倉重⁵⁰⁾、船山⁵¹⁾等の研究があるが、その多くは生理学的或は実験病理学的、細菌学的研究に応用されたものであり、臨床応用の面では全く不毛の場であつた。

そこで私は前述した骨髓臨床組織培養法にならぬ脾臓組織培養の簡易化を試み、骨髓臨床培養法が脾臓にも適用し得るや否やを知る為本実験を行つた。以下実験に対して考按を加える。

血清非働化処理により血清中の非特異性蛋白が除去され非働化血清を用いた場合その培養成績が安定性を示す事は既に知られているが、非働化血清と無処理血清を用いて各種動物の脾臓培養を行なつた結果、比較成長価、細胞密度指数、リンパ球遊走速度の総ての培養成績に於いて非働化血清が優れている事を示した。また非働化群の方が増生帯構成細胞の変性過程がやや遅延する傾向にあり、この点からも臨床応用にとつて有利である。

発育促進物質として VB₁₂、葉酸、核酸の三者をとり上げ、各々培養を行つた所、マウス脾の培養に於いては VB₁₂ が比較的優れた増生を示し、家兎脾に於いては葉酸、VB₁₂ が対照群に比しやや優れた増生を示したが、葉酸、VB₁₂ の間には有意の差は認められなかつた。またラッテに於いてはマウスとほぼ同様な成績を示し、VB₁₂ が優れていた。以上の点より動物の種類によりそれぞれ適正な培地構成には幾分の相違があるように思われた。小野³⁷⁾は人骨髓組織の臨床培養法に於いて培地の発育促進物質として各々 VB₁₂、葉酸を使用して比較検討したが、PH の低い VB₁₂ 溶液は血清の緩衝作用により、速かに培地 PH は血清 PH に近づき組織片に障害を与えないが、葉酸と血清を培地とした場合には培地 PH は著しく塩基性に傾き組織増生は不良であつたと述べている。このような機序に加えて動物の種類による適性培地の相違がかかる結果をもたらしたものと考えられ、純粋な薬理作用以外に物理化学的な影響もかなり存すると思われる。

VB₁₂ については1948年 Rickes⁵²⁾が結晶型でとり出して以来主として悪性貧血に関して多数の報告がある。組織培養法を用いた研究では Callender⁵³⁾、Thompson⁵⁴⁾、Franco⁵⁵⁾等の研究があり悪性貧血患者に於いて VB₁₂ 及び胃液の添加にて巨大赤芽球が正常赤芽球になる事をそれぞれ観察し、教室大藤⁵⁶⁾は家兎骨髓培養の添加実験で VB₁₂ は赤血球成熟作

用はそのままの形で骨髓に働らくものであるとし、また白血球系増血作用も認めている。教室小野³⁷⁾は前記の骨髓臨床培養の実験に於いて血清に各種濃度の VB₁₂ を加えて培養した結果、100γ/cc に於いて比較成長価、細胞密度指数、好中球遊走速度は共に高値を示し細胞の変性過程も遅延したと述べ、VB₁₂ の白血球系増血作用を確認している。斯くの如く VB₁₂ は赤血球系のみならず白血球系に対しても増血作用を有しているが、その他に多くの生化学的作用を持つている。即ち VB₁₂ は生体内の核酸合成に不可欠のものであり、また葉酸、コリン、メチオニンの共軛する transmethylation cycle に関与する事が確実となつた。最近アミノ酸代謝と VB₁₂ の興味ある関係が明かにされ酵素の活性化との関連性が重要視されている。従つて脾臓細胞に対しても骨髓系細胞に対すると同様に何等かの生化学的效果を期待し得るものと考えらる。

以上の結果より私は骨髓臨床組織培養法が脾臓に於いても適用可能である事を知り、更に培地として非働化血清と市販 VB₁₂ (100γ/cc) を使用した培養法が最も培養成績が良好である点から本法を脾臓臨床組織培養法と呼び、従来の Plasma clot culture とその培養成績につき比較検討を行なつた。同一のマウス脾につき培養を行なつた結果、臨床培養法は比較成長価に於いて劣り細胞密度指数に於いて高値を示し、リンパ球遊走速度ではやや劣つたが大差を認めなかつた。Plasma clot culture では比較成長価が大であり、また立体的な細胞移動を示す為に当然細胞密度指数は低くなると考えられるが、想像以上に臨床培養法が高値を示した事は注目に値する。ま

た臨床培養法に於いては変性過程の進行がやや早く、総合的に比較すると Plasma clot culture にやや劣るが、培養の簡易化に伴つて多少の培養成績の低下は当然であり、充分実用の任に耐え得る事を知つた。

第6章 結 論

1) 脾臓組織培養法の簡易化に関して、主としてマウス脾、家兎脾、ラット脾を用いて培養し血清並びに発育促進物質の影響について検討した。

2) 非働化血清と無処理血清を用いて培養を行なつたところ総ての培養成績に於いて非働化血清が優れている事を示した。

3) 発育促進物質として市販の VB₁₂、葉酸、核酸の三者をとり上げ、各々培養を行なつたところマウス脾、ラット脾の培養に於いては VB₁₂ が比較的優れた増生を示し、家兎脾に於いては葉酸、VB₁₂ がやや優れた増生を示したが両者の間に有意差を認めなかつた。

4) 以上の結果から平木式臨床組織培養盤 No. 1 を用い、培地として非働化血清、VB₁₂ (100γ/cc) を使用して脾臓を培養する方法を脾臓臨床組織培養法と呼び、従来の Plasma clot culture とその培養成績について比較検討した。その結果脾臓臨床組織培養法は培養成績に於いて Plasma clot culture にやや劣るが、充分実用の任に耐え得る事を知つた。

擱筆するにあたり、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師平木教授、並びに直接御教示を受けた喜多島講師に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Harrison, R. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 4, 140, 1907.
- 2) Carrel, A. et Burrows, M. T.: Compt. rend. de la Soc. de Biol., 69, 299, 1910.
- 3) Ebeling, A. H.: Jour. exp. Med., 20, 130, 1914.
- 4) Lewis, M. R. & Felton, L. D.: Science, 54, 636, 1921.
- 5) Cracium, E. C.: Arch. f. exp. Zellforsch., 2, 295, 1926.
- 6) Howell, W. H. & Holt, E.: Am. Journ. Physiol., 47, 328, 1918.
- 7) Carrel, A. et Burrows, M. T.: Compt. rend. de la Soc. de Biol., 69, 299, 1910.
- 8) Carrel, A., Burrows, M. T.: J. A. M. A., 55, 1379, 1910.
- 9) Carrel, A. & Ebeling, A. H.: Journ. exp. Med., 34, 317, 1921.
- 10) Carrel, A., Ebeling, A. H.: Journ. exp. Med., 36, 365, 1922.
- 11) Erdmann, R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 15, 96, 1917.
- 12) Erdmann, R.: Am. J. Anat., 22, 73, 1917.
- 13) Erdmann, R.: Praktikum der Gewebepflege oder Explantation besonders der Gewebe-

- züchtung, 1922.
- 14) Champy, C.: Arch. Zool. Exp. Gen., 53, 42, 1913.
 - 15) Fischer, A.: J. Exp. Med., 35, 367, 1922.
 - 16) Fischer, A.: Gewebezüchtung, München, 1930.
 - 17) 木村廉: 組織培養, 共立出版, 昭30.
 - 18) Enders, J. F., Weller, T. H. & Robbins, F. C.: Science, 109, 85, 1949.
 - 19) 平木潔: 岡山医学会雑誌, 67, 2, 昭30.
 - 20) 平木潔: 綜合臨床, 5, 7, 232, 昭31.
 - 21) 平木潔: 日本医事新報, 1667, 3, 昭31.
 - 22) 平木潔・大藤真: 最新医学, 10, 1582, 昭30.
 - 23) 平木潔・大藤真: 日本医事新報, 1628, 6, 昭30.
 - 24) 平木潔・大藤真: 日血会誌, 19, 406, 昭31.
 - 25) 平木潔・大藤真・角南宏・嘉村淳太: 日血会誌, 19, 406, 昭31.
 - 26) 岩崎一郎: 岡山医学会雑誌, 68, 9, 1315, 昭31.
 - 27) 川野嘉彦: 日血会誌, 20, 3, 321, 昭32.
 - 28) 沼本徹郎: 日血会誌, 20, 3, 256, 昭32.
 - 29) 大藤真: 最新医学, 10, 2462, 昭30, 11, 423, 65, 2, 昭31.
 - 30) 大藤真・亙理善治: 東京医事新誌, 71, 8, 18, 昭29.
 - 31) 大藤真・田村甫・角南宏: 東京医事新誌, 71, 9, 13, 昭29.
 - 32) 小野安三・大亀学: 日血会誌, 19, 1, 昭31.
 - 33) 角南宏: 岡山医学会雑誌, 68, 8, 1169, 昭31.
 - 34) 津島充: 岡山医学会雑誌, 68, 8, 1, 昭31.
 - 35) 宇治鉄也: 日血会誌, 20, 3, 361, 昭32.
 - 36) 山本伸郎: 岡山医学会雑誌, 68, 7, 7, 753, 昭31.
 - 37) 小野安三: 岡山医学会雑誌, 70, 11, 4025, 昭33.
 - 38) 大亀学: 岡山医学会雑誌, 71, 4, 1, 1379, 昭34.
 - 39) Carrel, A. & Burrows, M. T.: Journ. exp. Med., 13, 562, 1911.
 - 40) Robert, A. & Lambert, M. D.: Journ. exp. Med., 13, 510, 1911.
 - 41) Hayami, T. & Tanaka, M.: Soc. path. Jap. Acta., 2, 287, 1912.
 - 42) Lambert, R. A.: Journ. exp. Med., 19, 398, 1914.
 - 43) Riocch, D.: Anat. Rec., 25, 41, 1923.
 - 44) Fazzari, J.: Arch. exper. Zellforsch., 2, 307, 1926.
 - 45) Erdmann, Rh. et al.: Arch. exper. Zellforsch., 2, 361, 1926.
 - 46) Fischer, A. u. Dolschansky, L.: Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organ., 116, 123, 1929.
 - 47) 服部銈三: 日本微生物病理誌, 24, 127, 1929.
 - 48) Huzella, T.: Arch. exper. Zellforsch., 11, 170, 1931.
 - 49) Stieve, H.: Arch. exper. Zellforsch., 22, 109, 1939.
 - 50) 倉重芳嗣: 実験医学会誌, 14, 1234, 1930.
 - 51) 船山道忠: 日本薬物学雑誌, 22, 65, 1936.
 - 52) Rickes, E. L., Brink, N. G., Wood, T. R.: Science, 107, 396, 1948.
 - 53) Callender, S. T. & Lajtha, L. G.: Blood, 6, 1234, 1951.
 - 54) Thompson, R. B.: Blood, 7, 522, 1952.
 - 55) Franco: zit. u. Goldek, H.: Spezielle Therapied. Blutkrankheiten, 1955.
 - 56) 大藤真: 東京医事新誌, 72, 611, 昭30.
 - 57) 木畑正義: 未刊
 - 58) 半沢敦正: 岡山医学会雑誌, 75, 877, 昭38.

Studies on the Tissue Culture of Spleen

Part 1. On The Simplification of the Splenic Tissue Culture

By

Koichi SHIMAZAKI

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

1) On the simplification of the splenic tissue culture, the author studied the influences of the various serums and growth promoting substances upon the splenic tissue culture of mice, rabbits and rats.

2) Culturing these spleens with the unactivated serum or untreated serum, the author concluded that the splenic culture with the unactivated serum was superior to the latter in all data of cultures.

3) Culturing these spleens by adding vitamin B₁₂, folic acid or nucleic acid, which were on the market, for the growth promoting substances, both in mice and rats the cultures adding vitamin B₁₂ showed comparatively excellent growth, and in rabbits the cultures adding folic acid or vitamin B₁₂ showed somewhat good growth, between which significant difference was not shown.

4) On the basis of these results we called the following method the clinical tissue culture method of the spleen, in which the spleen was cultured in the medium composed of unactivated serum and vitamin B₁₂ (100 τ /c.c.) using the Hiraki's tissue culture slide No. 1, and then the data using this tissue culture method was compared with those obtained by the conventional plasma clot culture method. These results showed that, although this method was slightly inferior to the plasma clot culture method in the data of cultures, it was sufficiently fit for clinical application.
