

人白血球の試験管内簡易培養法について

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

俵 寿 太 郎
寺 坂 隆
坂 野 才 藏
西 井 怜
柴 田 醇

〔昭和 39 年 8 月 5 日受稿〕

最近微生物の研究に際し、各種動物諸臓器の試験管内培養細胞が使われるようになり、特にウイルス学研究分野の組織培養においては、材料の入手容易なる細胞を用いることが何よりも望まれるわけである。その一つとして人の白血球を培養し、これをウイルスの実験に供することも行われている。ただこの場合、血中から白血球のみを選出して後これを培養するという一般的方法は、動物諸臓器の組織培養よりも技術的に幾分困難なものである。

最近 TOKUDA 等 (1962)¹⁾ は牛の白血球を比較的容易に培養し得ることを報告しているが、吾々はこの方法を人の白血球培養に応用し、尚多少の工夫を加えることにより、実験に供し得るものであると思われる成績を得たので報告する次第である。

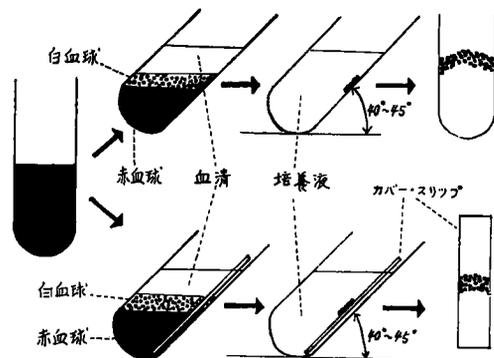
実験材料及び方法

材料の血液は健康人の正中静脈から採血した。即ち血液を TOKUDA 等の方法に従い、PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS) HEPARIN を 0.1% に加えた液の 1/10 量を加えて採血し、更に抗生物質として 1 万単位の PENICILLIN と 10 mg の STREPTOMYCIN を 100 ml の血液に含まれるように加えた。ついで血液中の細胞と血清とは遠心分離することなしに、全血を培養試験管 (13×100 mm) に無菌的に 0.5 ml または 1.0 ml 宛を分注した。各培養試験管は、ゴム栓をした後水平に対して 40~45 度の角度に傾けて 37°C で培養した。数日間培養後白血球が多数管壁に固着した時、血清と赤血球を捨て滅菌 PBS で 2~3 回洗滌して新しい培養液を加えた。

つぎに培養細胞を染色標本として観察するには、まづ試験管中の培養液を捨て、管壁に固着増殖した

白血球を食塩水で洗滌後エーテル・アルコールで固定してヘマトキシリン・エオジン染色を行うか、又はメタノールで固定後ギムザ染色を施して観察し、更に詳細にわたる観察の為には、滅菌したカバースリップ (6×18mm) を血液分注前に試験管中に入れてから培養し、後それを取り出してギムザ染色又はヘマトキシリン・エオジン染色を行つて顕微鏡下に観察した。この培養順序は模式的には下図の如くなる。

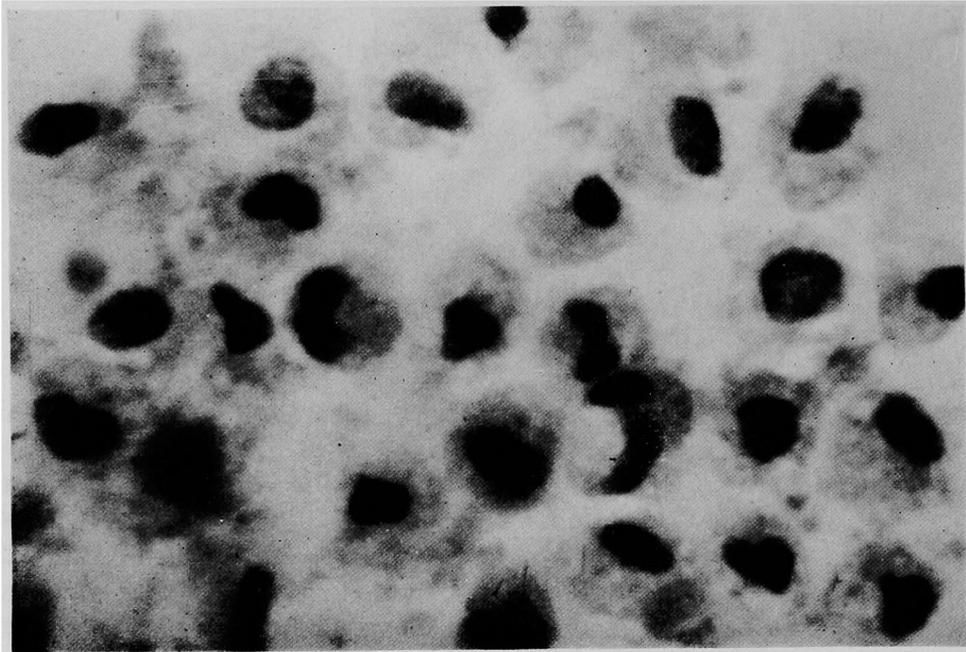
図1. 培養方法の模式図



結 果

数十本の試験管に全血を分注培養後、経時的に染色観察した結果、培養 6 時間で赤血球は沈澱して上部の血清と完全に分離し、両者の境界面が試験管壁と接した部分に、いわゆる BUFFY COAT が形成された。そしてこの部分には少数の細胞が散在するが、多くは POLYMORPHONUCLEAR CELLS で MONONUCLEAR CELLS も少しみられ、PBS で洗滌しても尚管壁に固着していた。培養 12 時間では試験管中 BUFFY COAT の部分に、更に多くの細胞

写真1. 培養5日の白血球（ヘマトキシリン・エオジン染色）



が固着しているが、これ等は赤血球沈澱後形成されたものであり、肉眼でも白く細長い半月状の環として認めることが出来た。

培養24時間では管壁に固着した多くの細胞は、**BUFFY COAT**の周囲に集つて存在するのがみられ、**MONONUCLEAR**及び**POLYMORPHONUCLEAR CELLS**の数は凡そ同数であつた。これ等の細胞は培養約3日頃から急に大きくなり、細胞質部の存在がはつきりしてくるが、その後も次第に大きくなり、培養5日頃には形が丸くなつて写真1の如き形態を呈してきた。

この培養3日～5日頃には細胞数も最高に達し、ウイルスの感染実験に用いるのに最適の時期であると思われた。この時期は全血を培養液と交換するのにも良い時期であるわけで、以後の培養について人血清と牛血清とを用いて比較観察した結果、人血清の方が優れていて高濃度血清において細胞の増殖がみられたが、牛血清ではわづかに細胞の生存を維持した程度で、増殖を期待することは出来なかつた。血清稀釈を**YLE**液で行い、培養3日後に於ける結果を表わしたものが表1である。即ち、人血清を50%に含んだ**YLE**液の場合に於てのみ細胞の増殖がみられた。尚これら増殖細胞の継代は甚だ困難で今後の研究を要する点であつた。

表1. 血清別にみた細胞の影響

| 血清 | 5 % | 20 % | 50 % |
|--------------|-----|------|------|
| YLE 液 | | | |
| 人血清加 | — | — | + |
| YLE | | | |
| 牛血清加 | — | — | ± |
| YLE | | | |

+……細胞増殖 ±……細胞維持 —……細胞死

総括ならびに考察

白血球を試験管内で培養しようとする試みは **CARREL** 及び **BURROWS (1910)²⁾** により、被覆培養法で猫の骨髓を用いて行われたのに始まり、その後多数の学者により多種類の動物骨髓が同じ目的のために用いられてきた。そして液体培養法に関しては **OSGOOD** 及び **BROWNLEE (1936—1937)³⁾⁴⁾** の人骨髓細胞の培養法を行つた報告が最初のものである。その後種々の改良を加えた報告が多数行われているが、鶏白血球の培養に際し **BUFFY COAT** を利用する方法が **CARREL** 等 (1922)⁵⁾ により報告されて以来、この方法が屢々実験に採用されるようになってきた。然し乍らこの方法においても、白血球のみを赤血球から分離することは困難であつたため、**ALBUMIN-FLOATATION** や **PHYTOHEM-AGGLUTININ** を用いること等の改良が加えられて

きた。更に最近 TOKUDA 等(1962)¹⁾は牛痘ウイルスの研究において、牛白血球を簡単に培養し、巨大細胞及び封入体形成をもたらすことに成功した。ところが、この方法によつて人の白血球の培養を行ったという報告には未だ接していない。

吾々の行つた実験結果では、人の血液をそのまま試験管中にて斜面培養することにより、白血球層と管壁との接触面に白血球発育帯即ち BUFFY COAT を作り、白血球の分離培養を簡単に行うことが出来た。つまり HEPARIN 加全血液を試験管中に 0.5~1.0ml 宛分注し、40~45度の角度の傾斜を保つて 37°C で培養を続けるときは、3日~5日後に多数白血球の増殖しているのをみることが出来た。この時期に血液を捨て 2~3回 PBS で洗滌すれば、赤血球を完全に除くことが出来、新しい培養液に替

えて細胞を培養又は維持することにより、各種ウイルスの感染実験に使うことが出来る。又ウイレミアで白血球中にウイルスを有している疾患では、これらからウイルスの分離を試みる目的の為に、特に適している方法であると考えられる。

但しこの実験に対して、尚考慮し改良すべき点がないわけでもない。即ち培養に用いる血清は、人血清が他よりも優れているけれども、各種ウイルス抗原に対して抗体をもたない人血清を得ることが困難であることの為、ウイルス感染実験には、おのづから使用するウイルスの種類が限定されること、更にこの細胞の継代が目下のところ困難であること等、今後の研究を必要とするのである。

稿を終るにあたり、終始御指導を賜つた村上栄教授に対し、心より感謝の意を表す次第である。

文 献

- 1) Tokuda, G., Fukusho, K., Morimoto, T., and Watanabe, M.: Studies on rinderpest virus in bovine leukocyte culture, Nat. Inst. Animal Health Quartely. 2, 189—200, 1962.
- 2) Carrel, A., and Burrows, M. T.: Cultivation of adult tissues and organs outside the body. J. A. M. A. 55, 1379, 1910.
- 3) Osgood, E. E. and Brownlee, I. : Culture of human bone marrow, a simple method for multiple cultures. J. A. M. A. 107, 123, 1936.
- 4) Osgood, E. E., and Brownlee, I.: Culture of human marrow, details of a simple method. J. A. M. A. 108, 1793, 1937.
- 5) Carrel, A. and Eberling: Pure cultures of large mononuclear leucocytes. J. Exp. Med. 36, 365—377, 1922.

Studies on a simple method for leucocyte culture.

by

Jutarō Tawara
Takashi Terasaka
Saizo Sakano
Satoru Nishii
Jun Shibata

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Professor Sakae Murakami)

The normal healthy human blood was heparinized with one-tenth volume of 0.1 per cent heparin solution. Ten thousand units of penicillin and 10 mg of streptomycin were added to each 100 ml of the blood. The whole blood was distributed into culture tubes in amounts of 0.5 ml or 1.0 ml.

The tubes were rubber-stoppered, inclined at 40~45 degrees against the level, and incubated in static state at 37°C. A few days after incubation, the plasma and free blood cells in tubes were discarded and washed with PBS twice. Then fresh culture medium was placed into the tubes to maintain a number of cells remained adhered on the wall.