

人胎児諸組織の培養とそのアデノウイルス 12型に対する感受性の比較的研究

I.

人胎児諸組織の培養方法と出現細胞に関する研究

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上 栄教授）
指導：矢部芳郎講師
岡山大学医学部産科婦人科学教室（主任：橋本 清教授）

大学院 森 山 雍 方
学 生

〔昭和39年10月17日受稿〕

緒 言

組織培養を培養細胞の種類から大別すると初代細胞培養と継代株細胞培養に大別される。継代株細胞としては多数のものが報告され、又実際に広く多方面で利用されている。然し継代株細胞は、その諸性質に於て、分離当初とはかなり異なつたものとなつており、この点は実験目的によつては非常な欠点となる。初代培養では、その細胞自体の性質は、一応大体動物体内におけると略々同様に保たれていると考えられ、これは継代株にない極めてすぐれた点である。小実験動物の組織の初代培養に関してはその組織の入手等に関して格別の困難さはないであろうが霊長類或は人間の組織の入手は必ずしも容易ではない。然し、初代培養には前述の如く継代株細胞では補えない極めてすぐれた利点があるので、実験目的によつては種々の困難にも抱らず初代培養を行なう。ウイルス学の分野においても特に人間由来のウイルスでは人間細胞に対しては感受性を示すが動物細胞には感受性がないか或はあつても極めてよいもの等があり、従つて人間由来の細胞が要求される。この様なときに継代株細胞の中に適当なものが見出せない場合、初代培養が必要となつて来る。かかる目的の為に人胎児緒組織の初代培養を利用した実験の報告はあるが、その方法、或は出現細胞を組織別に比較検討した報告は極めて少ない¹⁾²⁾。

一般にアデノウイルスは増殖のおそいウイルスとされているが、その中でも12型と18型とは特に増殖が遅い³⁾⁴⁾。現在までのところ HeLa⁵⁾、KB⁶⁾等の細胞が主としてこれらのウイルスの実験に使用されて来ており、これらの細胞に優るものとしては人胎児腎細胞のみが知られている⁷⁾。著者は人胎児の諸

組織を各組織別に培養し、その出現細胞の形態、増殖態度、継代能等を比較検討するとともに、アデノウイルス12型に対する感受性をも比較検討した。以下第1編においては主として人胎児組織の培養に関して記述する。

実験材料および方法

供試組織

1. 妊娠約4ヶ月の胎児（♀）の肺、肝、腎および筋肉と皮膚。
2. 妊娠7カ月の胎児（♂）の筋肉と皮膚。

培養に使用した溶液類

1. 磷酸緩衝食塩水。Dulbeccoの磷酸緩衝食塩水⁸⁾から CaCl_2 及び MgCl_2 を除いたものを高圧滅菌して使用した。以下 PBS (Phosphate-buffered Saline) と略す。
2. トリプシン。Difco 製トリプシン（1：250）を0.25%の割合にPBSに溶解し、ペニシリンとストレプトマイシンをそれぞれ終濃度200単位/ccおよび2007/ccとなる如く添加し、Seitz 濾過器により濾過滅菌したものを使用した。
3. YLE液。DulbeccoのYLE液⁹⁾にphenol redを0.001%の割に加え、ペニシリンとストレプトマイシンをそれぞれ終濃度200単位/ccおよび2007/ccとなる如く添加し、Seitz 濾過器により濾過滅菌したものを使用した。
4. 牛血清。新鮮牛血より血清を遠心分離し、Seitz 濾過器により濾過滅菌した後56°C、30分加熱により非働化し-20°Cに凍結保存したものを使用した。尚使用前の再非働化は行なわれなかつた。

培養方法

手術室において摘出された材料を直ちに冷却した

PBSに浸し約2時間冷蔵庫に保存した後以下の如く処理した。尚以下の処理はすべて無菌室内において無菌操作のもとに行なわれた。

1. 胎児の肺、肝、腎、筋肉および皮膚の組織培養。前記の妊娠約4ヶ月の胎児をPBSで3回洗浄し血液その他の附着物を出来る限り除いた後肺、肝、腎、筋肉および皮膚の各組織を無菌的に別々にシャーレに取出した。尚筋肉と皮膚とは分けることなく一つにして処理した。これらの各組織を数個の組織片に切断してPBSで2回洗浄し血液成分を出来る限り除いた後、更に直鉗で直径1~2mmの大きさに細切した。細切した組織片を各組織別に100ccの三角フラスコに移し、各フラスコにトリプシンを約30cc宛加え孵卵器(36.5°C)に1時間30分放置した後取り出し、手で強く振盪し、数分間静置した後、未消化の組織片以外をスピッツグラスに移し、500~700rpmで3分間遠沈し、上清を捨て、沈渣として集められた細胞を1cc当り 2×10^5 個となる如く培養液に浮游させた後、試験管当り1ccずつ分注し、36.5°Cの孵卵器中に静置し、以後毎日観察した。培養液にはYLEと牛血清とを80:20の割合に混和したものを使用した。尚培養液の液換えは培養液のpHに従って4~5日置きに行なわれた。

2. 妊娠7カ月の胎児(♂)の筋肉と皮膚の組織培養。前記の妊娠4ヶ月胎児の筋肉と皮膚の培養の場合と同様に行なわれた。

3. 継代培養。旧培養液を取除き、一度試験管当り1ccのPBSで洗滌した後、トリプシン1ccを加え、孵卵器に放置し、細胞が剥脱した後取出して、遠沈管に集めて遠沈して細胞を集め、細胞数が約 2×10^5 個/ccになるように培養液(YLE 80, 牛血清20)に浮游させ、試験管当り1ccずつ分注し、36.5°Cで培養した。

尚培養細胞の観察はすべて生標本について行なわれた。

実 験 結 果

I. 初代培養

1. 4カ月胎児組織

1) 腎細胞

培養1日目に着生の認められたのは殆んどすべて上皮形細胞のみであつたが、培養2日目より上皮形細胞とともに線維芽形細胞も次第に強く増殖して来始めた。培養5日目には良好な細胞シートを形成したが、上皮形細胞と線維芽形細胞とが略々同量に認

められ線維芽形細胞が上皮形細胞の島状集団を網の目状に取囲むという所見を呈していた。尚線維芽形細胞はその後も更に増強し、培養8日目には全細胞の約80%を占めるに至つた(図1, 2)。

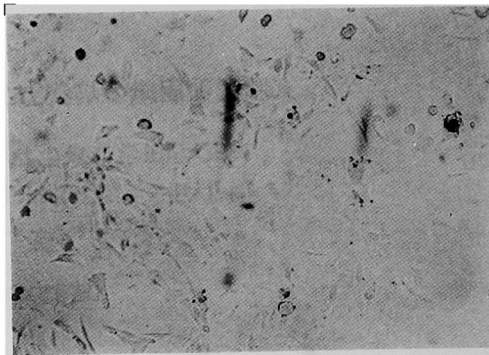


図 1. 4カ月胎児腎細胞。培養2日目。多数の上皮形細胞と少数の線維芽形細胞の着生をみる。

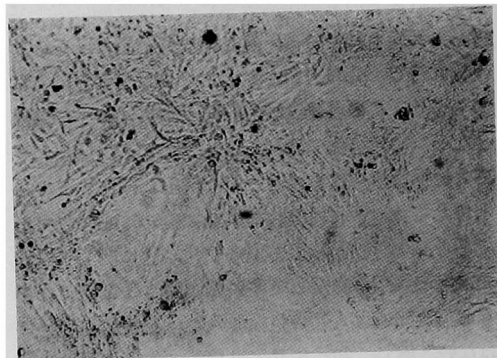


図 2. 同上。培養5日目。線維芽形細胞が強く増殖し、上皮形細胞を網の目状にとりかこむ。

2) 肺細胞

培養1日目に線維芽形細胞の良好な着生を認めた。細胞は以後良好な増殖を示し、培養5日目には整然と排列した線維芽形細胞のシートを形成した(図3)。

3) 肝細胞

培養1日目に線維芽形細胞および少数の上皮形細胞の着生を認めた。然し細胞の着生は肺あるいは腎のものに比し極めて低率であつた。又着生した細胞の増殖も他の組織のものに比し劣るように思われた。殊に上皮形のもの増殖は弱く、増殖の良好な線維芽形細胞に次第におおわれ、培養13日目には殆んど線維芽形細胞のみよりなるシートを形成した(図4)。

4) 筋皮細胞

培養1日目に線維芽形細胞の良好な着生を認めた。

細胞の増殖は極めて良好で、培養5日目には整然と並んだ線維芽形細胞のシートを形成した(図5)。

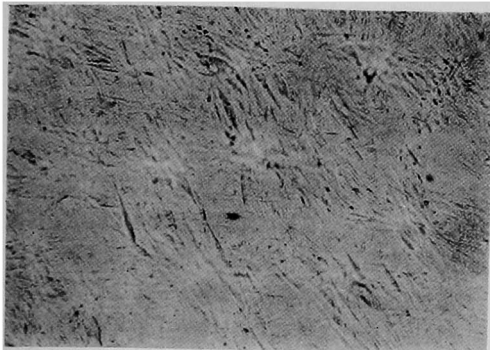


図3. 4カ月胎児肺細胞、培養5日目、整然と並んだ線維芽形細胞のシートを形成す。

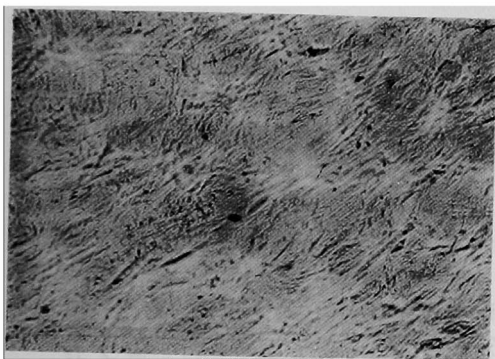


図4. 4カ月胎児肝細胞、培養13日目、整然と並んだ線維芽形細胞のシートを形成す。

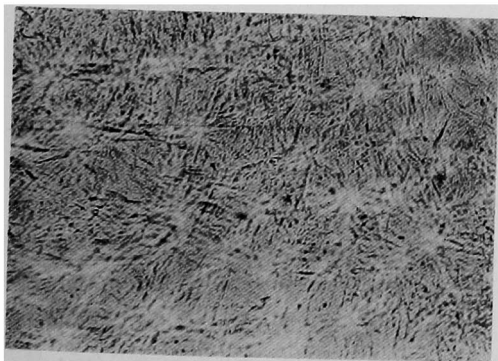


図5. 4カ月胎児筋皮細胞、培養5日目、整然と並んだ線維芽形細胞のシートを形成す。

2. 7カ月胎児の筋皮細胞

培養1日目に線維芽形細胞の良好な着生を認めた。

然し細胞の増殖は前述の4カ月胎児の筋皮細胞のものより遅く、培養10日目に漸く整然と列んだ線維芽形細胞のシートを形成した。

II. 継代培養

前記の諸種培養細胞のうち4カ月胎児の腎細胞、肺細胞、筋皮細胞および7カ月胎児の筋皮細胞がそれぞれ継代培養された。

1. 4カ月胎児腎細胞の継代培養

前記4カ月胎児の腎細胞は初代培養の5日目にシートを形成したので8日目にトリプシン処理により第二代へ継代培養を行なった(方法の項参照)。尚細胞はトリプシン処理により容易にガラス面から剝離した。

継代培養1日目に細胞はかなりの着生率を示したが、その大部分は上皮形細胞であり、継代前に全細胞の約80%を占めていた線維芽形細胞は第二代では極く少数(全着生細胞の約1%程度)であつた。細胞の増殖も、初代のものに比し上皮形、線維芽形の両細胞ともかなり遅く、培養14日目に漸くやや粗なシートを形成した。形成されたシートもその大部分は上皮形細胞であり、線維芽形細胞は小部分(全シートの約3~5%)を占めるに過ぎなかつた。

培養15日目に更に第三代目の継代が、同じくトリプシン処理により行なわれた。培養1日目に極く少数の上皮形細胞のみの着生を認めたが、以後の細胞の増殖は極めて遅く、1週間経過した後も極く僅かの増殖をみたのみであつた。更に2週間液換えを行なつて培養し観察を続けたがそれ以上の細胞の増殖は全くみられず、逆に変性脱落が少数ではあるが認められだしたので、以後の継代は行なわれなかつた。

2. 4カ月胎児肺細胞の継代培養

前記4カ月胎児の肺細胞は初代培養5日目に整然と排列した線維芽形細胞のシートを形成したので8日目に第二代の継代培養を行なった。継代はトリプシン処理により行なわれたが、細胞はトリプシン処理により容易に剝脱し、格別の困難は認められなかつた。

継代培養1日目に線維芽形細胞の良好な着生を認めた。細胞の増殖も良好で培養7日目には第一代と同様の整然と排列した線維芽形細胞のシートを形成した。

培養10日目に同じくトリプシン処理により第三代の継代培養を行なった。培養1日目に線維芽形細胞の良好な着生を認めたが、以後の細胞の増殖速度は

第二代のものに比し可成り劣るようであり、培養14日目に漸く線維芽形細胞のやや粗なシートを形成した。更に液換えを行なつて培養を継続したが、それ以上の細胞増殖は認められなかつたので以後の継代培養は行なわれなかつた。

3. 4 月胎児筋皮細胞の継代培養

前記4月胎児の筋皮細胞は初代培養の5日目には整然と排列した線維芽形細胞のシートを形成したので、7日目にトリプシン処理により第二代継代培養を行なつた。尚細胞はトリプシン処理により容易に剝脱した。

継代培養1日目に線維芽形細胞の良好な着生を認め、細胞の増殖は極めて良好で7日目には密に並んだ線維芽形細胞のシートを形成した。

培養9日目に第三代の継代培養を行なつた。培養1日目に線維芽形細胞の良好な着生を認め、細胞の増殖も第二代目と略々同程度に良好で、培養10日目には整然と列んだ線維芽形細胞のシートを形成した。従つて第三代継代培養の12日目に第四代の継代培養を行なつた。

第四代の培養1日目には線維芽形細胞の着生を認めたが、着生率も、或は又以後の細胞増殖も第三代目までのものに比し可成り低下しており、培養21日*

*目に漸くやや粗な細胞シートを形成した。然し更に液換えを行なつて培養を継続してもそれ以上の著明な細胞増殖は認められなかつたので以後の継代は行なわれなかつた。

4. 7 月胎児筋皮細胞の継代培養

前記の如く7月胎児の筋皮細胞は初代培養の10日目に線維芽形細胞のシートを形成したので、培養12日目にトリプシン処理により第二代の継代培養を行なつた。培養1日目に線維芽形細胞の着生を認めたが、着生率も、或は又以後の増殖も可成り低く、培養21日目に漸くやや粗な細胞シートを形成した。更に液換えを行なつて観察したがそれ以上の細胞増殖は殆んど認められなかつたので、以後の継代は行なわれなかつた。

総括および考按

現在の実験においては腎、肝、肺および筋肉と皮膚の4種類の組織の試験管内培養が試みられ、その何れもが、前記の如き極めて簡単な方法により容易に培養された。試験管内培養において出現した細胞の形態と継代状態を表1に纏めた。即ち腎および肝の組織培養においては上皮形および線維芽形の両細胞が出現し、肺および筋皮のものにおいては線維芽

表 1. 胎児組織の培養における出現細胞の形態と増殖度

胎 児 年 令	臓 器	初 代		第 2 代		第 3 代		第 4 代	
		細胞形	増殖	細胞形	増殖	細胞形	増殖	細胞形	増殖
4 月	腎	上 皮 形 線維芽形	++ ++	上 皮 形 線維芽形	++ ±	上 皮 形	±		
	肝	上 皮 形 線維芽形	± +						
	肺	線維芽形	++	線維芽形	++	線維芽形	+		
	筋 皮	線維芽形	++	線維芽形	++	線維芽形	++	線維芽形	+
7 月	筋 皮	線維芽形	++	線維芽形	+				

形細胞のみが出現した。腎と肝では上皮形および線維芽形の両細胞が出現したが、その出現様式は可成り異なっており、腎では上皮形細胞が線維芽形細胞よりも多く出現し、肝では逆に上皮形細胞は僅少で大部分は線維芽形細胞であつた。又腎細胞の初代培養において増生して来た線維芽形細胞が第二代目の継代において著明に減少したことは、肺あるいは筋皮組織の培養における線維芽形細胞の場合と著しく異なるところであつた。即ち肺あるいは筋皮組織の

培養で出現した線維芽形細胞は容易に第二代乃至第三代へ継代された。著者の実験において、胎児の細胞は少なくとも現在試みられた4つの組織では、その種類の如何を問わず、継代培養を続けると、遅かれ早かれすべて分裂増殖の能力を失なつていつた。又筋皮細胞について4月月のものと7月月のものについて比較してみると、何れにおいても線維芽形細胞のみの増殖がみられたが、4月月のものでは7月月のものに比し細胞の着生および増殖が良好であり、

又継代培養においても4カ月のものでは第四代目までよく継代されたのに対し7カ月のものでは二代の継代培養でその増殖が著しく減弱した。

これらの知見は組織あるいは細胞の成熟および老化ということと対比して極めて興味深い知見である。

人胎児肺細胞の培養に関しては他にも報告があり、それらでは細胞は現在の実験におけるよりも遙かに長く継代されている¹⁰⁾。その原因としてはいろいろの実験条件の差があろうが、最も大きいものは培養液であろう。現在の実験では YLE を使用したが、他の報告では Eagle 氏液が使用されており、Eagle 氏液が YLE よりも優れた培養液であることは既に報告されている¹¹⁾。

結 論

4カ月人胎児の腎、肺、肝および筋肉と皮膚を各組織別にトリプシン処理し試験管内で培養した。腎

および肝の組織からは上皮形および線維芽の両細胞が、又肺および筋皮の各組織からは線維芽形細胞が増殖した。腎、肺および筋肉と皮膚の培養について継代培養を行なったところ、腎および肺細胞は第三代で、筋皮細胞は第四代でそれぞれ増殖が殆んど停止した。尚腎細胞の第二代目では線維芽形細胞は著しく減少した。

7カ月胎児の筋肉と皮膚を同様に培養したものは4カ月のものと同様線維芽形細胞が増殖したが、4カ月のものに比し細胞の増殖が弱く、又二代の継代で増殖が殆んど停止した。

稿を終えるにあたり終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師村上栄教授、橋本清教授並びに矢部講師に深甚の謝意を表します。

文

1. Henle, G., and Deinhardt, F.: The establishment of strains of human cells in tissue culture. *J. Immunol.*, **79**, 54~59, 1957.
2. Chang, R. S.: Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **89**, 362~364, 1955.
3. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Hartley, J. W., Ward, T. G., and Parrott, R. H.: Studies of the adenoidal-pharyngeal conjunctival (APC) group of viruses. *Am. J. Hyg.*, **61**, 197~218, 1955.
4. Rosen, L., Hovis, J. F., and Bell, J. A.: Observation on some little-known adenoviruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **111**, 166~171, 1962.
5. Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium.

献

- Cancer Res.*, **12**, 264~265, 1952.
6. Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain K. B. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **89**, 362~364, 1955.
7. Rafajko, R. R.: Antibody response in rabbits to Adenovirus type 12. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **113**, 238~240, 1963.
8. Merchant, D. J., Kahn, R. H., and Murphy, W. H. Jr.: Handbook of cell and organ culture. Burgess Publishing Co., p. 162.
9. 伝染病研究所学会編: 細菌学実習提要, 全訂改版(昭和33年), 丸善K. K., p. 421~422.
10. Ashkenazi, A., and Melnick, J. L.: Tumorigenicity of simian papovavirus SV40 and of virus-transformed cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, **30**, 1227~1266, 1963.
11. Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, **122**, 501~504, 1955.

Studies on Tissue Culture of Human Embryonic Tissues
and Their Susceptibility to Adenovirus Type 12
Part I. Studies on Tissue Culture of Human Embryonic Tissues

By

Yasukata Moriyama

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Sakae Murakami and Dr. Yoshiro Yabe)

Department of Obstetrics and Gynecology Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hashimoto)

Each of the kidney, the lung, the liver and the mixture of the skin and the muscle of a four-month-old human embryo were separately minced, trypsinized and cultured in test tubes.

In the cultures of the kidney and of the liver, both the epithelioid and fibroblastic cells proliferated. In the cultures of the lung and of the skin-muscle, only fibroblastic cells proliferated. Upon successive culture passages, cells of the kidney and the lung ceased the multiplication almost completely at the third passage and the cells of the skin-muscle did so at the fourth passage. The fibroblastic cells of the kidney which proliferated vigorously in the primary culture, decreased markedly at the second culture passage.

The skin and muscle of a seven-month-old human embryo was treated and cultured by the same method as that of four-month-old embryo. Similarly fibroblastic cells proliferated, but the cell multiplication was much weaker than in those of the four-month-old embryo and ceased to multiply almost completely at the second culture passage.
