

岡山医学会雑誌

第75卷 11, 12 合併号 (第828, 829号)

昭和38年12月30日発行

511.36 : 578.085.23

肝臓組織培養に関する研究

第1編

廻転培養法による家兎肝臓の至適培養液の組成に就いて

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

浅野 健夫

[昭和38年10月8日受稿]

内 容 目 次

第1章 緒言	II) 観察方法
第2章 実験材料並びに実験方法	第3章 実験成績
第1節 実験材料	第1節 培養液水素イオン濃度の変化
1) 培養組織	第2節 培養液組成の比較成長価に及ぼす影響
2) 鶏胎児圧搾液	1) 鶏胎児圧搾液濃度
3) 鶏血漿	2) 血清の種類
4) 血清及び腹水	3) 血清濃度
5) 培養液	第3節 増生帯内出現肝細胞に及ぼす影響
第2節 実験方法	1) 鶏胎児圧搾液濃度
I) 培養方法	2) 血清の種類
1) 平角型培養管培養法	3) 血清濃度
2) 短冊型カバーグラス培養法	第4章 総括並びに考按
3) 丸型培養管管壁培養法	第5章 結語

第1章 緒言

組織を生体外に於いて培養せんと企図したのはかなり古く、1907年 Harrison¹⁾ が蛙胎児の神経組織を培養したのに端を発し、1910年には Carrel & Burrows²⁾ が成熟哺乳動物の組織培養に成功している。爾来、組織培養法は多くの改良が加えられると共に、諸種の組織に就き各種の方面より研究され、

医学並びに生物学の進歩に大いなる貢献をなした。次に肝臓の組織培養に関する文献を纏ぐると、1911年既に Lewis & Lewis³⁾ は鶏胎児肝臓組織を用いて塩類溶液中での培養を試み、更に Walton⁴⁾ は成熟家兎肝臓組織の培養に於いて諸臓器エキスの発育に及ぼす影響を検索している。次いで Lynch⁵⁾ は鶏胎児肝臓組織を Lock-Lewis 氏液に培養し、肝細胞並びに遊走細胞に就いて観察し、Carrel & Ebeling⁶⁾

は鶏胎児肝臓組織の培養に於いて種々なる年令の家鶏血漿が組織の發育に及ぼす影響に就いて述べている。又 Maximow⁷⁾ は成熟家兎肝臓の組織培養に於いて Kupffer 氏細胞の出現を報告し、Heaton は鶏胎児肝臓組織の培養に鶏胎児圧搾液を添加する事により發育は良好なりと述べている。更に最近に至り、Carrel⁸⁾ に依り創案され、Gey⁹⁾ によつて改良され実用化された廻転培養法を初めとする培養法の著しい進歩に依り Chang¹⁰⁾ の人肝臓組織の長期継代培養という輝かしい業績や、Evans 等¹¹⁾、Hobbs 等¹²⁾ のマウス肝臓組織より培養株の樹立という目覚ましい發展が相次いでいる。一方本邦に於ける肝臓の組織培養の歴史もかなり古く、1923年 Akamatsu¹³⁾ は家兎肝臓の摘出直後のものと氷室内に貯蔵した組織を比較培養し、Mitsuda¹⁴⁾ は家兎肝臓組織に於ける胆管形成及び肝細胞内色素の生成に就いて述べ、村尾は鶏胎児肝臓組織を成熟家鶏甲状腺及び鶏胎児肝臓組織と鶏胎児心臓組織との併置培養を行なつてゐる。更に1943年に道又¹⁵⁾ は鶏胎児肝臓組織の發育に及ぼす鶏胎児蒸溜水浸出液或いは成熟家鶏の肝臓並びにその他の諸臓器蒸溜水浸出液の影響に就いて詳細に報告している。然しながら、本邦に於けるそれらはすべて cover slip 法による培養であつて、長期間の観察は行なわれてなく、僅かに勝田等¹⁶⁾ が細胞浮游液培養法によつて鶏胎児肝臓組織の培養を行ない、培養液組成の検討を行なつてゐるに過ぎない。

本編に於いては長期間の培養に適した廻転培養法により成熟家兎肝臓組織の培養を試み發育促進物質として広く使用されている鶏胎児圧搾液、血清及び腹水に就いて検討し、最適な組成を有する培養液を決定し得たので報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験材料

1) 培養組織：体重 2kg 内外の白色成熟家兎を用い、正中線にて開腹し無菌的に切除した肝臓組織を Hanks 氏液中にてよく洗い、Graefé 氏刀で 1mm³ 大に可及的同等大正方形になる様細切した小片を使用した。尚、肝被膜の培養を避けるため、被膜に近い部を切除して使用した。

2) 鶏胎児圧搾液：9日目の孵化鶏卵より無菌的に胎児を取出し Hanks 氏液で十分清洗した後、圧搾器で粥状液となし、1昼夜冷蔵庫に保存後3000回転20分間遠沈し、上清を鶏胎児圧搾液として使用し

た。以下鶏胎児圧搾液を CEE と略称する。

3) 鶏血漿：採血前1昼夜絶食させておいた成熟雄鶏の翼静脈より、予め 0.1% ヘパリンを吸引せる注射器を用いて採血し、3000回転15分間の遠沈を行ない、上清を滅菌試験管に採取し 冷蔵保存する。4°C の冷蔵庫では約2週間の保存に耐える。

4) 血清及び腹水：人血清は空腹時健康人肘静脈より採血し、家兎血清は1昼夜絶食せしめた家兎より心臓穿刺により採血し3000回転15分間遠沈した上清を更に 56°C の水槽中で30分間非働化して使用した。馬血清も同様にして採取非働化して用いた。腹水はわれわれの教室に入院中の癌性腹膜炎患者の腹水を無菌的に採取し、3000回転15分間遠沈後上清を用いた。

5) 培養液：培養液は Hanks 氏液、CEE 及び血清又は腹水を各種の割合で使用直前に混合して作製し、pH 7.6 にフェノールレッドを指示薬として7%重曹水で調整した。又感染予防のためペニシリン 100単位/cc を加えて用いた。

第2節 実験方法

1) 培養方法：Carrel により創案され Gey によつて実用化された廻転培養法を用いた。即ち培養管の管壁に移植された組織片が培養液と空気に交互に接し得るように 5° の傾斜を保つて1時間12回転する恒温器内の回転ドラムに培養管を挿入して培養した。又実験の目的により、平角型培養管培養法、短冊型カバーガラス培養法或いは丸型培養管管壁培養法を使い分けて用いた。

1) 平角型培養管培養法：

増生の様式を観察する目的で使用した。一方の管壁の中央にヘパリン加鶏血漿を先曲ピペットで1滴滴下し、それより下方に十分に広げる。下端より 2cm 離れた部より 1cm 間隔で組織片を3ヶ置き、CEE を1滴宛滴下して混和する。血漿の凝固を待つて培養液 2cc を加える。これにゴム製 W 栓をして廻転ドラムに挿入する。操作の途中細菌感染を予防するため培養管は必ず横にしたままで栓をとつて操作するようにした。以下の培養法においても同様の注意を払つた。

2) 短冊型カバーガラス培養法

染色或いは位相差顕微鏡による細胞の形態学的観察のために本法は最も適している。12×60cm の短冊型カバーガラスにマントー注射器に吸引したヘパリン加鶏血漿を 1/3 針にて3滴略々等間隔に滴下し、それぞれに組織片1ヶ、CEE 1滴宛を加えて混和

する。血漿が凝固するのを待つて培養管に収め培養液を 2cc 宛加える。W 栓をして廻転ドラムに挿入する。

3) 丸型培養管管壁培養法

肝細胞の核数を算定するには、血漿膜が EDTA による細胞の分離を妨げるため血漿を使用出来ない。そこで Hanb 氏液中で細切した組織片を滅菌シャーレに入れた家兎血清中に移し、よく清洗後管底より約 2cm はなして 5 枚の組織片を約 1cm 間隔で管壁に附着せしめる。室温に放置し組織片が半ば乾燥しかけた頃、培養液を 2cc 宛加える。この時培養液の加え方が早すぎると組織片は脱落し、遅すぎれば組織片が障害されて増殖不良となり、培養液を加える時機に熟練を要する。W 栓をして廻転ドラムに挿入する。

II) 観察方法

増生面積の計測には 37°C の顕微鏡保温箱内で Abbe の描画器を用いて平角型培養管における培養組織の輪廓を倍率 40 倍で逐日的に描画し、その面積をプランメーターで計測した。次いで培養前後の差、即ち絶対成長価の原面積に対する比率を求め、これを比較成長価とした。増殖肝細胞の測定には平角型培養管を使用し増生組織内のすべての肝細胞数を数え、(一)より(卅)に分けて記載した。

肝細胞の核数算定には丸型培養管管壁培養法を用いた。先づ培養液を十分に排除後 1 管当り 0.3% Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 液 5cc を加え、ラバークリーナーにて十分に管壁に増殖した細胞を剥離する。37°C にて 1 時間十分に振盪した後目盛付スピッツグラスに移し、1000 回転 5 分遠沈し正確に 0.5cc 残して上清をすてる。これに 4cc の crystal violet 溶液 (蒸留水 1,000cc, 枸橼酸 21g, クリスタル紫 500mg, フォルマリン原液 10 滴) を加え 30 分間 37°C の恒温槽中に入れる。更に 1,000 回転 5 分遠沈して正確に 1cc 残す。十分に攪拌して均等な細胞浮游液とした後 Bürker Türk 計算盤の全区劃で円型或いは楕円型に濃染した肝細胞の核を数え、これを 9 で割り 10,000 倍すると 1 管当りの核数が得られる。この際線維芽細胞等の核は淡染することから容易に鑑別可能である。

細胞の観察には短冊型カバーグラス培養法を使用した。位相差鏡検には厚さ 0.7mm のスライドグラスにカバーグラスの両端が載るように熔融パラフィンで枕を作りカバーグラスの組織面を下にして載せ、その間隙に培養液を流し込み周囲をパラフィンで封

じて観察する。染色標本にするには、適時カバーグラスを取出し、ハンクス氏液で洗った後無水アルコールで 2~3 分間固定後ヘマトキシリン-エオジン染色を行なった。

第 3 章 実験成績

第 1 節 培養液水素イオン濃度の変化

培養液の水素イオン濃度は培養の経過と共に酸性に傾き、それに伴つて培養液の色調は赤色より次第に淡黄紅色、更に黄色へと褪色する。この変化は培養組織の発育増殖との間に密接な関係があると考えられる。即ち家兎血清を 20% とし、CEE を 2.5%, 10%, 20% の各濃度に調整した培養液を用いて培養し、その pH を逐日的に測定すると、CEE の濃度に略々平行して低下した。7 日目における pH は 6.90~7.10 に達するが、培養液を最初より pH 6.6~7.0 に調整する場合は細胞の増殖は全くみられず、又 pH 7.8 以上の場合にも増殖はみられなかつた (表 1)。

表 1. 培養液水素イオン濃度の変化

CEE 濃度 \ 日数	0	4	7	10
2.5%	7.60	7.35	7.10	7.00
5.0%	7.60	7.25	7.00	6.90
10.0%	7.60	7.00	6.90	6.70
20.0%	7.60	7.00	6.85	6.65

(4 例平均)

第 2 節 培養液組成の比較成長価に及ぼす影響

1) CEE 濃度

家兎血清を 20% に一定し CEE 濃度を種々に変えて培養し、時間の経過による比較成長価の推移を観察すると、CEE を全く含まない培養液では増生帯の変化は全く認められなかつた。CEE 2.5% 含有の培養液では僅かに増生帯の拡大が認められたが、5% の CEE 添加により比較成長価は急速に大となり、10 日目に 6.8 に達する。更に 10% 及び 20% と CEE の濃度を濃くすると、10% では 4 日目 0.55, 7 日目 2.8, 10 日目 8.55, 20% では 0.85, 3.4, 12.5 と略々 CEE の濃度に比例して比較成長価が大となること が認められた (表 2, 図 1)。

2) 血清の種類

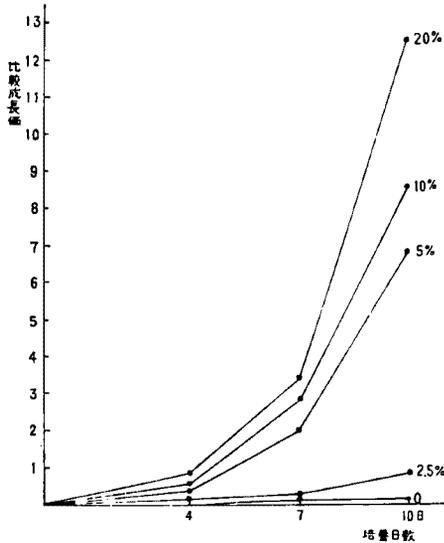
培養液の組成として各種血清或いは腹水を使用し、それらの比較成長価に及ぼす影響を観察した。即ち

表 2. CEE 濃度の比較成長価に及ぼす影響

CEE濃度 \ 日数	4	7	10
0	0	0.10	0.10
2.5%	0.13	0.24	0.80
5.0%	0.35	2.00	6.80
10.0%	0.55	2.80	8.55
20.0%	0.85	3.40	12.50

(4例平均)

図 1. CEE 濃度の比較成長価に及ぼす影響



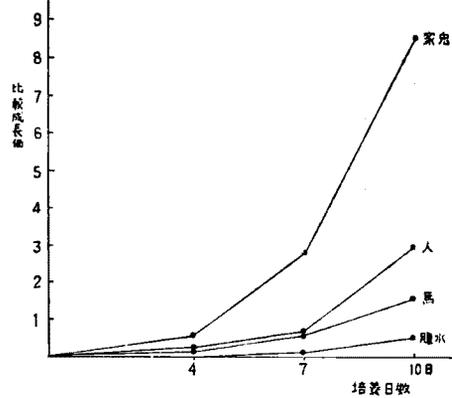
家兎、人及び馬の血清或いは癌性腹膜炎患者の腹水を20%, CEE 10%, Hanks 氏液70%の組成の各種培養液の比較成長価を培養後4日目, 7日目, 10日目と逐日的に比較検討した。家兎血清を使用した培養液では0.55, 2.8, 8.55とかなり増生帯の拡大が認められるが、人血清では家兎血清の3分の1の比較成長価を示すに止まる。馬血清では家兎血清の6分の1に過ぎず、腹水を使用した場合は増生帯の拡大は殆んど認められなかつた(表3, 図2)。

表 3. 血清種類の比較成長価に及ぼす影響

血清種類 \ 日数	4	7	10
家 兎	0.55	2.80	8.55
人	0.20	0.70	2.95
馬	0.10	0.55	1.55
腹 水	0	0.10	0.50

(4例平均)

図 2. 血清種類の比較成長価に及ぼす影響



3) 血清濃度

CEEを10%に一定にし家兎血清を各種に変えた培養液により比較成長価の時間的推移の変化を比較観察した。家兎血清を添加せず CEE 及び Hanks 氏液のみよりなる培養液では全く増生は認められなかつたに拘らず、10%添加によつて著しい増生面積の拡大が認められ、血清濃度の増加に伴つて比較成長価も大となつた。特に家兎血清50%, CEE 10%, Hanks 氏液40%の組成を有する培養液では既に4日目より比較成長価4.70と極めて著しい増生を示した(表4, 図3)。

表 4. 血清濃度の比較成長価に及ぼす影響

血清濃度 \ 日数	4	7	10
0	0	0	0.05
10%	0.20	1.85	5.60
20%	0.55	2.80	8.55
30%	0.90	3.65	9.90
40%	1.05	5.65	10.60
50%	4.70	10.05	13.35

(4例平均)

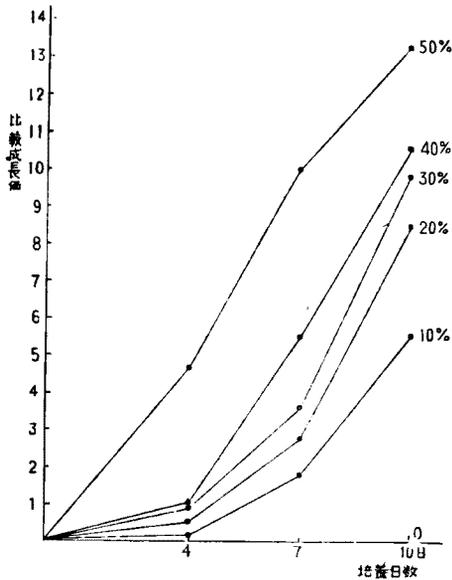
第3節 増生帯内出現肝細胞に及ぼす影響

各種の組成を有する培養液を用いて培養し、細胞が互いに重なり合わずガラス板上に一層に拡つた増生帯中に出現した肝細胞数を算定し、肝細胞を全く認めなかつたものを(-), 1~20ケ(+), 51~100ケ(++) , 101~150ケ(++), 151~200ケ(+++), 201~250ケ(+++), 251~(++++))と記載することとした。

1) CEE 濃度

家兎血清を20%に一定して、CEE濃度を種々に変え、肝細胞が増生帯中に出現するまでの時間及び出

図3. 血清濃度の比較成長価に及ぼす影響



現の状況を経目的に観察した。CEE を全く含まない培養液では培養10日目に到るも遂に肝細胞の出現をみなかつた。2.5%では7日目に僅かに出現する例もあるが、肝細胞の出現は極めて少ない。5%では4日目に出現し、出現肝細胞数もやや増加する。10%では3日目に既に肝細胞が出現し、極めて多数の肝細胞を観察し得た。一方20%に濃度が高まると、肝細胞の出現までの日数が延び、出現個数も減少することが認められた(表5)。

表5. 肝細胞増殖に及ぼす CEE 濃度の影響

CEE 濃度	日数	1	2	3	4	7	10
0		-	-	-	-	-	-
2.5%		-	-	-	-	±	+
5.0%		-	-	-	±	+	++
10.0%		-	-	±	+	++	+++
20.0%		-	-	-	-	±	+

(4例平均)

2) 血清の種類

血清の種類が肝細胞の増殖に及ぼす影響を比較するため、CEE 10%, Hanks 氏液70%及び家兎, 人, 馬の各種血清又は腹水20%を組成とする培養液を使用した。腹水では増生帯中に肝細胞が全く認められ

ず、馬血清では10日目に僅かに認められるにすぎなかつた。人血清では7日目に肝細胞の出現をみたが、数は少なく同種血清たる家兎血清では3日目に既に肝細胞の出現が認められ、極めて著しい肝細胞の出現をみた(表6)。

表6. 肝細胞増殖に及ぼす血清種類の影響

血清種類	日数	1	2	3	4	7	10
家兎		-	-	±	+	++	+++
人		-	-	-	-	±	+
馬		-	-	-	-	-	±
腹水		-	-	-	-	-	-

(4例平均)

3) 血清濃度

家兎血清の濃度が肝細胞の増殖に及ぼす影響をみるために、各種の濃度に血清を含む培養液を用いて、肝細胞が増生帯中に出現する時期並びに数を経目的に観察し、併せて核数算定による肝細胞の増殖を各種濃度について比較検討した。

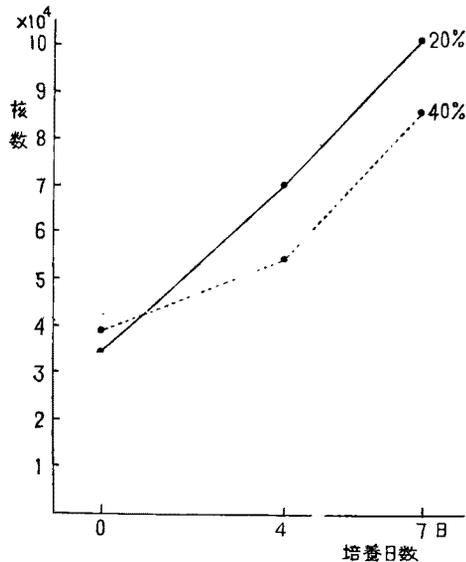
無血清培養液では10日に至るも肝細胞は全く出現しないが、10%添加により僅かに出現するのがみられる。更に20%及び30%にすると、3日目に既に肝細胞が認められ、特に20%では7日目より10日目にかけて急速に増加する。一方血清濃度を40%, 50%と高くするに従つて、肝細胞の出現時期はおくれ、数も減少して高濃度は肝細胞の増殖にむしろ抑制的に作用する如き感を与える。これらについて核数算定を行なうと、20%で核数が最もよく増加し、増生帯中出現肝細胞数と略々平行した関係を有することが認められた(表7, 図4)。

表7. 肝細胞増殖に及ぼす血清濃度の影響

血清濃度	日数	1	2	3	4	7	10
0		-	-	-	-	-	-
10%		-	-	-	±	+	++
20%		-	-	±	+	++	+++
30%		-	-	±	+	++	+++
40%		-	-	-	±	+	++
50%		-	-	-	-	±	+

(4例平均)

図4. 血清濃度の核数増加に及ぼす影響



第4章 総括並びに考按

廻転培養法により家兎肝臓組織培養を行ない、培養液としての鶏胎児圧搾液、血清或いは腹水の種類及び濃度による影響を比較成長価並びに肝細胞出現率について観察した。

その実験結果を総括すると、

1) 家兎血清を20%とし、CEEを2.5, 5, 10, 20%の各濃度に含む培養液で、培養日数による培養液のpHの変化を観察すると、CEEの濃度に略々比例して逐日的にpHは低下した。

2) CEEの濃度を0, 2.5, 5, 10, 20%とすると、比較成長価は濃度に比例して大となるが、増生帯中に出現する肝細胞は10%において最大であり、高濃度ではFibroblastenが大部分を占める。これよりCEEは10%が至適濃度であるといえる。

3) 家兎、健康人及び馬血清或いは癌性腹膜炎患者腹水を比較すると、家兎血清が比較成長価、肝細胞増加率の両者に対し特に好結果が得られ、家兎肝臓の培養には家兎血清が最適であるといえる。

4) 家兎血清の濃度による影響を0, 10, 20, 30, 40, 50%の各濃度で観察すると、比較成長価は濃度に比例して大となるが、増生帯内に出現する肝細胞は20%が最大であり、これは核数算定による血清濃度の影響と全く一致している。

以上の結果より成熟家兎肝臓の組織培養にはCEE 10%, 家兎血清20%, Hanks氏液70%を組成とする培養液が最適であるといえる。

さて、組織培養の進歩と共に培養液に関しても数多くの研究が現在迄になされてきた。先づ Roux¹⁷⁾により始めて培養経過中における培養液のpHは培養組織細胞の代謝による酸性物質の生成によることが明らかにされたが、私の実験した家兎肝臓の培養においても培養経過と共に培養液中のpHは酸性に傾き、しかもその酸性への移行速度はCEE濃度に比例して増加した比較成長価に正比例することが認められた。この事実は鶏胎児心臓と脾の組織培養において起始pHの如何に拘らず組織の発育につれて培地の酸性度は増加し、その移動速度は組織発育の程度に正比例するという福光¹⁸⁾¹⁹⁾の成績と極めてよく一致している。

次に培養液の組成に関しては最近人工合成培養液の使用も試みられているが、それらの多くは特別の組織にのみ有効であり、又高価でもあつて肝臓組織培養の臨床応用を目的とする私の実験には適当でない。従つて入手が容易且安価であり、従来広く用いられているCEE、血清、腹水及び塩類溶液を使用して各種の実験を行なつた。

組織培養における発育促進物質として重要な意義を有するCEEに関しては、最近Kutsky²⁰⁾、勝田等²¹⁾²²⁾によりその本態究明の努力もなされているが、培養液としては1912年Carrel²³⁾によりFibroblastenの増殖に始めて用いられた。彼は次いで1913年²⁴⁾にCEE及び成熟動物の各種臓器、Rous肉腫圧搾液のFibroblastenに対する影響について比較検討し、CEEの最も有利なことを述べている。

次にCEEの濃度に関してはCarrel²⁴⁾²⁵⁾はFibroblastenの培養においてCEE5%と50%を含む培養液で組織の生存期間に差はないが、増生面積は明らかに後者が大であつたという。又Carrel & Ebeling²⁶⁾はCEEを0~80%の濃度でFibroblastenの培養を行ない、増生面積は濃度を増すにつれて大となるが、40%に達した後はそれ以上の濃度に加えても増生面積の増大がみられなかつたと述べ、更に彼等²⁷⁾はCEEを2.5%, 33.3%, 66.6%の濃度で単球を培養し、2.5%では細胞の増生が少なく、又66.6%では増生は盛んであり細胞密度は最大となるが短時間で死滅し、結局33.3%が最適濃度でこの場合細胞が良好な状態に保たれることを観察した。又大田²⁸⁾は鶏胎児心臓組織の培養におけるCEE濃度の増生面積に及ぼす影響を観察し、比較成長価は濃度に比例して大となると述べている。更に西村²⁹⁾も家兎白血球の培養において比較成長価はCEEの

濃度に比例して大であり、発育促進作用は濃度に比例するものであることを認めている。

家兎肝臓を培養した私の成績においても比較成長価は CEE の濃度に正比例して増大し、上記の諸家の成績とよく一致している。然しながら、肝細胞の増殖という面より CEE 濃度を検討すると、高濃度の 20% より 10% において肝細胞の盛んな増殖が認められた。このことは、従来の多くの成績が Fibroblasten の培養によつて得られたものであり、種々の細胞を含む肝組織の培養においては CEE の高濃度を含む培養液では Fibroblasten の余りに旺盛な増殖のため、肝細胞の増殖が寧ろ抑制されるという事も肝細胞の増殖が少ない一因であろうと推測される。

かくの如く CEE の至適濃度が従来の報告よりもかなり低いことに関して Gey³⁰⁾ も多くの組織培養に推奨出来るのは 5~35% であり、更に又殆んどどの組織の持続培養に適しているのは 10~15% であると述べている。事実 Chang¹⁰⁾ は迴転培養法による各種人組織の培養に CEE 濃度を 5% として成功し、Imagawa³¹⁾ 等もマウス乳癌の培養に 5% を使用している。勝田等¹⁶⁾ は鶏胎児肝臓の肝細胞浮游液培養でも CEE 10% が至適濃度であり、CEE なき時は 4 日以後細胞数は減少すると述べ、Hobbs 等¹²⁾ は新生児マウス肝臓の培養に CEE 20% を使用している。又教室菅野³²⁾ は家兎骨髓を迴転培養するときは比較成長価は CEE の濃度に比例して増大するが、15% において偽好酸球の遊走速度が最も良好であり、且つ最も長く生存し退行性変性も最小で培養液としての濃度に最適であると述べている。

次に血清ではその種類及び濃度等により培養組織に及ぼす影響が異つてくる。即ち Carrel & Burrow³³⁾ は鶏胎児組織培養において異種血清も同種血清と同様に培養液として使用し得ると述べているが、私の実験においては家兎肝臓に対しては同種血清たる家兎血清を用いて最も良い結果が得られた。この点に就いて Ingebrügsten³⁴⁾ は海猿骨髓組織の培養において増生面積は自家血清を用いた場合に最大となり、次いで同種血清、異種血清の順であり、更に異種血清としては家兎血清が最も優れ、マウス、犬、人、猫、山羊の順に良好であると述べ、Ludford³⁵⁾ はマウス自然発生乳癌より確立せられた Bashford 癌ではマウス血清で最も良く癌細胞の増生が得られ、家兎血清がこれに次ぎ、ラッテ血清では多くは Polyblast が出現するという。更に Chang¹⁰⁾ は人組織

の培養において他種動物の血清が不適當であることはいうまでもなく、人血清においてさえ、その血清を得る個体によつて細胞の増殖に対しむしろ抑制的に作用することもあるという。

又 Fischer³⁶⁾ により家鶏の Fibroblasten の培養に用いられてその増殖に成功した腹水は、癌性腹膜炎患者腹水を使用した私の実験では肝細胞及び Fibroblasten に対して殆んど増殖効果が認められなかつた。然し岡本³⁷⁾ は鶏胎児心臓及び脾臓組織のカレル瓶培養において滲出液、濾出液共に培養液として使用し得ることを認め、更に三木³⁸⁾ は末梢白血球に対する腹水、血清の影響を検討して、これ等により白血球の変性は遅延するが滲出液より濾出液の方が一層有効であり、又血清は濾出液よりも更に変性を遅延せしめるといふ。その他 Pomerat 等³⁹⁾ は諸種病的体液細胞の迴転培養に 50% の腹水含有培養液を用い、又灰白髄炎ウイルスの培養には Scherer 等⁴⁰⁾ は 50%、山田⁴¹⁾ は 30% の腹水含有培養液を用いている。教室菅野³²⁾ も家兎骨髓の迴転培養で血清にはかなり劣るが 30% の濃度で代用し得ると述べている。

血清の濃度による影響に就いては Carrel & Ebeling⁶⁾ は鶏胎児の Fibroblasten の培養において、成年令以上の家鶏血清はその濃度の増加に従つて増殖抑制作用を増強するという。即ち生後 6 週間及び 3 カ月の家鶏血清は濃度の増加によりそれぞれの比較成長価に大差は認められぬが、生後 3 年の血清においては濃度 50% のときの増生面積は 10% の場合の 66% であり、又 9 年のものでは濃度 50% のときは 10% の場合の 46% であると述べている。又彼等⁴²⁾ は同じ組織の培養において異種血清である 2 年以下の犬、猫血清でも 20% の濃度以下では対照とした家鶏血清と大差ないが、それより高い濃度では対照より増生が劣るという。

一方、鶏の単球培養を行なつて血清の濃度による影響を観察した Baker⁴³⁾ は一定濃度までは血清濃度を増すに従いその増生面積が増加し、一部の血清では 100% に至るまで続くが、多くのものでは 25% において増生は徐々に減り、細胞の活性は良く保たれ繊細な細胞構造を呈するのに反し、50% では急速に増殖はするが、細胞は大きくなり、且大きな顆粒や脂肪顆粒が出現するという。又 Chang¹⁰⁾ は迴転培養法による諸種人組織の培養において、無血清培養液では細胞の増殖は認められないが、人血清 20% 含有の培養液で好結果が得られると述べ、勝田等¹⁶⁾

も鶏胎児肝臓の細胞浮游液培養により馬血清の濃度を比較して20%が至適濃度であることを認めている。

さて廻転培養法により家兎肝臓を培養した私の実験では、無血清培養液では殆んど細胞増殖は認められず、血清の濃度の増加に従つて比較成長価は大となり、Carrel & Ebeling⁶⁾ のいう如き抑制作用が血清にあるとは考えられない。然し血清濃度の影響を肝細胞の増殖のみに限定して観察すると、高濃度よりもむしろ低濃度の20%の濃度に家兎血清を含む培養液が最も優れており、この濃度は異つた動物或いは培養法を用いて肝臓を培養した Chang¹⁰⁾ 及び勝田等¹⁶⁾ の成績と全く一致している。

この他、Gey³⁰⁾ はウイルスの培養に40%、肉腫細胞の培養には35%を用い、Earle はウイルスに40%を使用している。又 Imagawa³¹⁾ はマウス乳癌の培養に健康海猿血清を34%の濃度に使用し、Hobbs 等¹²⁾ は新生児マウス肝臓の培養を馬血清を40%を含む培養液を用いて成功している。

以上の如く培養組織、目的及び実験方法等により多少の相違があるが、それぞれに培養効果の最もよい一定の至適濃度があり、それらは概していえば比較的低濃度のものである。

第5章 結語

廻転培養法により家兎肝臓の組織培養を行ない、培養液の水素イオン濃度の変化並びに培養液としての各種血清、腹水及び鶏胎児肝液の最適濃度を決定した。

1) 培養液の水素イオン濃度は培養日数の経過と共に酸性に傾くが、その酸性への移行速度は細胞の増殖と略々平行した。

2) 鶏胎児肝液の増殖に及ぼす影響を観察すると、比較成長価は濃度に正比例して大となるが、肝細胞の増殖に対しては10%が最も優れ、20%では Fibroblasten の盛んな増殖のために肝細胞の増殖はむしろ抑制された。従つて本培養において肝細胞の観察を目的とする培養液組成としての鶏胎児肝液の濃度は10%が最適であつた。

3) 培養液の組成として各種の血清(家兎、人、馬)並びに癌患者腹水を検討し、比較成長価及び肝細胞の増殖の両者に対して家兎血清が最も優れ、次いで人血清、馬血清、腹水の順であることが認められた。

4) 家兎血清濃度の増加に正比例して比較成長価は急激に大となるが、肝細胞の増殖には20%が最適の濃度であり、それ以上の濃度では肝細胞の増殖は反つて少なく、又 Fibroblasten の増殖が極めて旺盛なため、肝細胞の観察には不適當であつた。

5) 以上より家兎肝臓の組織培養には、鶏胎児肝液10%、家兎血清20%、Hanks 氏液70%を組成とする培養液が最適であると考えられる。

擧げするに当り御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師平木潔教授並びに角南宏講師に深甚の謝意を表す。

(本論文の要旨は第44回日本消化機病学会総会に於いて発表した)。

参 考 文 献

- 1) Harrison, R. G., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 4: 140, 1907.
- 2) Carrel, A., and M. T. Burrow, J. A. M. A., 55: 1379, 1910.
- 3) Lewis, M. R., and W. H. Lewis, J. A. M. A., 56: 1795, 1911.
- 4) Walton, A. J., J. Exp. Med., 20: 554, 1914.
- 5) Lynch, R. S., Am. J. Anat., 29: 281, 1921.
- 6) Carrel, A., and A. H. Ebeling, J. Exp. Med., 34: 599, 1921.
- 7) Maximow, A., Klin. Wschr., 4: 1486, 1925.
- 8) Carrel, A., Berl. Klin. Wschr., 50: 1097, 1913.
- 9) Gey, G. O., Am. J. Cancer, 17: 752, 1933.
- 10) Chang, R. S., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 87: 440, 1954.
- 11) Evans, V. J., W. R. Earle, E. P. Wilson, H. K. Waltz, and C. J. Mackey, J. Nat. Cancer Inst., 12: 1245, 1952.
- 12) Hobbs, G. L., K. K. Sanford, V. J. Evans, and W. R. Earle, J. Nat. Cancer Inst., 18: 701, 1957.
- 13) Aksmatsu, N., Virchow's Arch., 240: 308, 1923.
- 14) Mitsuda, T., Virchow's Arch., 242: 310, 1923, ibid, 248: 91, 1924.
- 15) 道又喜四郎, 実験医学雑誌, 27: 847, 昭18.
- 16) 勝田 甫他, 東京医事新誌, 73: 325, 昭30.

- 17) Rous, P., *J. Exp. Med.*, 18: 183, 1913.
 18) 福光廉平, 日微病誌, 23: 1945, 昭4.
 19) 福光廉平, 日微病誌, 24: 427, 昭5.
 20) Kutsky, K. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 83: 390, 1953.
 21) 勝田 甫他, 東京医事新誌, 72: 526, 昭30.
 22) 勝田 甫他, 癌, 46: 382, 昭30.
 23) Carrel, A., *J. Exp. Med.*, 15: 516, 1912.
 24) Carrel, A., *J. Exp. Med.*, 17: 14, 1913.
 25) Carrel, A., *J. Exp. Med.*, 38: 521, 1923.
 26) Carrel, A., and A. H. Ebeling, *J. Exp. Med.*, 34: 317, 1921.
 27) Carrel, A., and A. H. Ebeling, *J. Exp. Med.*, 36: 365, 1922.
 28) 大田喜直, 日微病誌, 24: 337, 昭5.
 29) 西村三津子, 日薬誌, 43: 57, 昭22.
 30) Gey, G. O., M. K. Gey, *Am. J. Cancer*, 27: 45, 1936.
 31) Imagawa, D. T., J. T. Syverton, and J. J. Bittner, *Cancer Res.*, 14: 8, 1954.
 32) 菅野 卓, 岡山医誌, 71: 1373, 昭34.
 33) Carrel, A., and M. T. Burrow, *J. Exp. Med.*, 14: 244, 1911.
 34) Ingebringsten, R., *J. Exp. Med.*, 15: 397, 1912.
 35) Ludford, R. J., *Roy. Soc. London Proc., sei. B.*, 112: 250, 1933.
 36) Fisher, A., *Arch. Exp. Zellforsch.*, 2: 303, 1929.
 37) 岡本政一, 京都府立医誌, 26: 213, 昭15.
 38) 三木清春, 内科室函, 2: 242, 昭30.
 39) Pomerat, C. M., W. W. Norwinski, and G. G. Rose, *Texas Rep. Biol. Med.*, 8: 521, 1950.
 40) Scherer, W. F., J. A. Syverton, and G. O. Gey, *J. Exp. Med.*, 97: 695, 1953.
 41) 山田尚達, 日本臨床, 13: 269, 昭30.
 42) Carrel, A., and A. H. Ebeling, *J. Exp. Med.*, 35: 17, 1922.
 43) Baker, L. E., *J. Exp. Med.*, 58: 575, 1933.
 44) Gey, G. O., and F. B. Bang, *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 65: 393, 1939.

Studies on Tissue Culture of Liver

Part 1. On the Composition of Culture Medium in the Roller Tube Method of Rabbit Liver

Kenwo Asano

Dept. of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Dr. Kiyoshi Hiraki)

The author has conducted tissue culture of rabbit liver by roller tube method. The pH changes in culture media were estimated. The rise of hydrogen ion concentration in the course of culture was parallel to the rate of cell increase.

The most appropriate medium has been a fluid medium consisting of 70 % Hank's solution, 20 % rabbit serum and 10 % chick embryo extract. Without chick embryo extract the cells found to grow do not easily grow out, but in its high concentration fibroblasts grow very well. Among the various sera rabbit serum is the most accelerative to the growth of liver cells. Human serum is second and horse serum worse in promoting activity. The ascites with stomach cancer almost dose not show promoting activity to liver cells. In addition of small amount of rabbit serum to the medium liver cells exhibit an excellent growth, but the more the serum becomes concentrated, the more fibroblasts grow.