616.381-003.217-006.3：578.085.23

吉田肉腫細胞の組織培養による形態学的研究

第　1　編

細　胞　浮　游　液　培　養　法　の　検　討

岡山大学医学部平木内科（主任：平木　潔教授）

柴　田　凡　夫

〔昭和36年12月31日受稿〕

内　容　目　次

第1章　緒　　言
第2章　研究材料及び研究方法
第3章　研究成績
　Ⅰ．細胞固定培養法
　Ⅱ．細胞浮游液培養法
　　A．ローラーチユーブ法の培養液の検討
　　B．ローラーチユーブ法の中，最高の成績を得た方法の手技及び，培養経過
第4章　総括並びに考按
第5章　結　　語

第1章　緒　　言

生体組織の体外培養を60年前に Roux が試みて以来，組織培養に関する研究は Harrison[20]（1907），Fischer（1948）[12]，Carrel（1912, 1913, 1923, 1929）[7]，等を先達とする多数の人々のたゆみない努力により幾多の輝かしい業績がもたらされながら，推し進められて来た．特にここ10年の間に，細胞生理の研究，Virus の培養，癌研究の分野の要請により急速に盛んになつて来たのは周知の通りである．

今日利用される方法は主として，Coverslip 法（Harrison）[20]，懸滴法（Maximow）[39]，Carrel 瓶法（Carrel）[7]，Roller Tube 法（Gey）[16]，時計皿法（Fell）[11]，であるが，多くの研究者はこれらの長短を取捨選択して，自己の研究に適した変法を用いている．

細胞の附着面，支持体或いは培養液について種々の考案があり，本邦では木村[32]，勝田[29]等が詳細な検討を行なつている．

以上の如き培養法をもつて癌組織或いは癌細胞を培養する事により，現今組織培養法は，免疫学，細胞形態学，化学療法，治療，発癌，細胞生化学等，癌の本態究明の一つの有力な手段として，あらゆる面に応用されつつある．併しながら，腫瘍細胞の培養に基く形態学的観察には未だ確実なものは見られない．それは従来多くの人々が腫瘍組織を培養し鏡検して来たからに外ならない．腫瘍組織を個々の細胞として，即ち単離細胞として位相差顕微鏡にて観察するのが細胞形態学的には理想的である筈である．また，この外に細胞単離浮游培養には，大石[49]も述べている如く，細胞数を正確に把握し，また細胞を分類し得る利点がある．実際には，腫瘍細胞単離浮游培養は従来より非常に困難とされており，未だその充分なる方法論的解明は行なわれていない．

さて，この単離腫瘍細胞として好都合なものは云う迄もなく腹水腫瘍細胞であろう．即ち腹水腫瘍細胞を培養材料として，単離細胞浮游培養法を用い研究するならば，腫瘍形態学に貢献する所大ならんと考えられる．

然るに前述の如く，方法論的問題に障碍があり，この方面の研究には満足すべきものがなかつた．癌研究に一般に良く用いられる吉田肉腫の培養については，て螺良[59]，飛岡[68]，森脇[40]，藤浪[13]，金[33]，北村[34]，三井[45]，古閑[36]，は Carrel 瓶法，Coverslip 法，懸滴法により吉田肉腫組織の培養を行なつており，田中館[69]は Roller Tube 法による吉田肉腫組織を培養しているが細胞の単離培養は行なつていず，勿論充分な位相差顕微鏡観察は行なつていない．一方三井[45]，桜井[58]は吉田肉腫単離細胞の浮游静置培養を行ない，殊に桜井は培養については輝やかしい成果を上げているが，位相差顕微鏡観察を行なつていない．従つて吉田肉腫細胞の培養時に於ける微細構造の変化に関する記載はとぼしい．

吉田[76]，広野[22]，熱海[6]，今木[25]，螺良[59]，牧野[41]，尾持[52]，小祝[38]，永田[46]，等は吉田肉腫細胞を位相差顕微鏡で特に好んで分裂を観察しているが，超生体観察であつて，培養したわけではない．

この様に充分に位相差顕微鏡観察に適した培養法は検討されていなかつた．

そこで私は腫瘍細胞の培養に基く形態学的観察を行なうために，これに適する吉田肉腫腹水細胞の細胞浮游液培養法について種々の方法論的検討を行ない，漸く所期の目的に達する一定の方法を得るに到つたのでここに報告する．

第2章 研究材料及び研究方法

1. 研究材料

岐阜系雑種ラッテ（100～150 g）腹腔に吉田肉腫腹水 0.5 cc を移植し，4～5日目の腹水を穿刺し，研究に供した．

2. 研究方法

1) 培養方法： 後述の研究成績の項で詳述する．

2) 検査方法： 吉田肉腫細胞の浮游する培養液を適宜に取出し pH を pH 試験紙で測定し，白血球用メランジュールとビュルケルチュルクの計算盤を用い細胞数を測定し，Hagedorn-Jensen 氏法により糖定量を行なつた．

また，0.9～1.0 mm の厚さの良質載物硝子上に培養液1滴を置き被覆硝子で覆い，周囲をパラフィンで封入し，位相差顕微鏡でレンズは DM，BM，DLL を用い 1000 X で観察し，吉田肉腫細胞数，活性度の分類及び微細構造その他の変化により，培養法の適否を検討した．

なお，活性度の分類に就いては，私は第1表の如く分裂像乃至細胞微細構造に基いて，M，I，II，III，IV，Vの6度に分類した．

表1 培養吉田肉腫腹水腫瘍細胞活性度表

M	分裂像
I	核腎形，核小体明瞭，胞体清明，顆粒殆ど無し
II	リポイド顆粒増加
III	核小体稍々不明瞭，ゴルヂー野軽度空胞化
IV	更に変性高度となり膨化或は萎縮像
V	崩壊像

第3章 研究成績

次の如き培養法を行ない，種々の培養液を用い，結果を比較検討し，本実験に適する培養法及び培養液を決定したのであるが，最後に，最良の結果を得た方法に就いてその手技を述べる．

I. 細胞固定（プラズマクロツトによる）培養法

海野氏載物硝子法： 培養後約24時間にして変性に陥り，位相差顕微鏡観察不適当のため放棄した．

カレル瓶法： 瓶底にデッキグラスを置きその上にプラズマクロットを置いた．

ローラーチューブ法： たんざく型硝子上にプラズマクロットを置いた．

カレル瓶法，ローラーチューブ法共にかろうじて位相差顕微鏡 1000 X で観察可能であるために一応検討を続けた．

本法ではデッキ硝子或いはたんざく型硝子上に吉田肉腫細胞を附着せしめて培養液にひたして培養するわけである．即ちデッキ硝子或いはたんざく型硝子上に健康人，ラッテ，家兎ヘパリン加血漿，吉田肉腫腹水，孵化9日目の雞胎圧搾液の順に 1/2 ツベルクリン針にて各1滴づつ滴下し，暫時放置し，プラズマクロットの完成するを待ちカレル瓶中或いはローラーチューブ内におさめ，液体培地を加え培養を行なつたが，24～48時間で細胞は殆んど流失した．健康雞ヘパリン加血漿は前3者血漿に比較して流失の程度少なく，最高約6日間観察し得た．なお，この流失を防ぐために，強力ミノファーゲンC（0.01～0.05/cc）を培養液に添加し用いたが望むべき効果は認められなかつた．また観察の度毎に1ケ若しくはそれ以上の標本を不潔にし培養を打切らねばならないのが致命的缺陥であり，以後の検討を放棄した．

II. 細胞浮游液培養法

カレル瓶静置法：

ローラーチューブ法：

両者共に 2 cc の培養液に1滴の吉田肉腫腹水を混和し，培養したものである．適宜この腫瘍細胞を含む培養液の数滴を取出し位相差顕微鏡観察，その他の検査に供する事が出来，而もなお，培養を続ける事が出来る．唯カレル瓶静置法に於いては，細胞が底にかたまり，観察，細胞数算定にやや不便のため，以後主としてローラーチューブによる細胞浮游液培養法を本実験に採用する事にした．

A．ローラーチューブ法の培養液の検討

1) 健康人，馬，ラッテの血清をハンクス氏液と色々の割合に混合して用いた．ラッテ血清が僅かに勝るも大差なく混合比は血清：ハンクス氏液3：7，4：6で細胞の膨化，或いは萎縮が最も少なかつた．本研究には均質な血清を多量に必要とするために馬血清（非動化）を使用する事にした．

2) 吉田腫瘍腹水上澄は培養液に加えても殆んど効果は認められない．上澄そのもの2cc に腫瘍細胞を含む腹水1滴を加え培養したが，矢張り腫瘍細胞は速に変性に陥る．

3) ビタミン B_1 (10～100 γ/cc)，B_2 (5～50 γ/cc)，B_6 (10～100 γ/cc)，C (0.1～1 mg/cc)，B_{12} (0.1～10 γ/cc)，を同時に，若しくは各々単独に添加したが，認むべき効果なく，唯ビタミン B_{12} に於いてピクノーゼの起り難くなるのを知つた．

4) 乾燥酵母抽出リボ核酸（ミノファーゲン製薬，以後 R. N. A. と記載する）は0.03～0.1%に於いて培養細胞の形態観察可能時間を延長せしめた．

5) グロンサン (0.1～1 mg/cc) には促進作用よりむしろ抑制作用を認めた．αパントテン酸カルシューム (0.1～1 mg/cc) 及びビタミンH (0.5～5 γ/cc) には少なくとも抑制作用は認められなかつたが著明な発育促進作用も認められなかつた．

以上により培養液としてはハンクス氏液，馬血清を6：4の比で混合し，それに R. N. A. 0.1%，ビタミン B_{12} 1 γ/cc を加える事とした．しかしながら，

6) この培養液を用いた時，培養後24時間迄 Lag Phase が観察される．そこで Lag Phase を除くために，上記培養液に次の如き前処置を施した．即ちこの培養液に約1/10量の吉田肉腫腹水（腫瘍細胞を含む）を加えて混和し，或いは同腹水に含まれる腫瘍細胞のみを培養液に加え，混和し，24時間氷室に保存し上澄を培養液として用う．この前処置を行なつた培養液を用い，培養すれば腫瘍細胞は萎縮に陥る事なく，腹水採取直後と略々同様の形態を持続する．だがこれだけでは分裂像は甚だ少ない．

そこで，

7) 前処置を行なつた培養液3量に孵化9日目雞胎圧搾液1量を加えると，良好な成績を示し多数の分裂像が観察される様になつた．

前処置を行なわぬ培養液と前処置を行なつた培養液との比較は表2，表3に於いて明らかである．表2の前処置を行なつた培養液と雞胎圧搾液との混合液では，培養1日後に於いて，細胞数倍近く増加し分裂像の数も増し活性度も培養開始時よりむしろ良くなつている．培養2日後には急激な細胞数の減少と活性度の悪化を示しているが，これは適合した培養液であるために，細胞の急速な増殖が起り，従つてそれだけ急速な環境の悪化を来たしたためと考えられる．

表2　前処置培養液と雞胎圧搾液

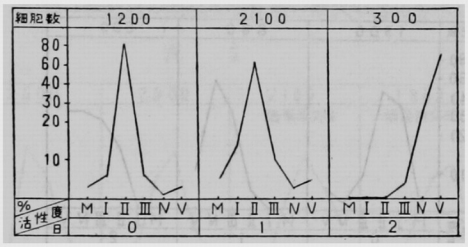


表3　非前処置培養液と雞胎圧搾液

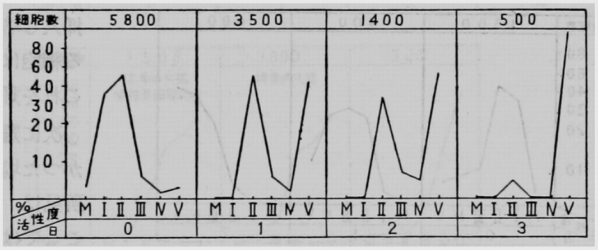
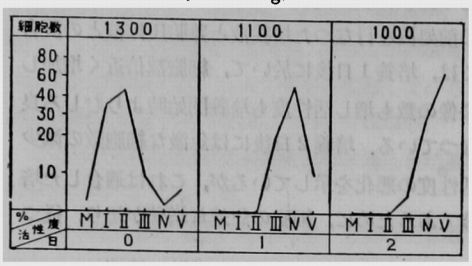


表3の前処置を行なわなかつた培養液と雞胎圧搾液との混合液に於いては，培養1日後細胞数は減少し，また活性度の良いものと全く悪いものとに細胞が2分されているのに気付く．Lag Phase に耐えて元気を取戻したものが左の山であり，元気を取戻さなかつたものが右の山現わされている．2日後培養液の交換を行なつたが，再度の Lag Phase のために細胞数激減し，活性度の良い生き残つた細胞は寥々たる状態になつている．

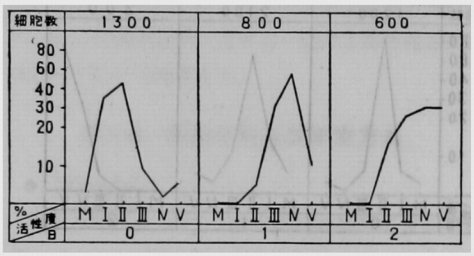
従つて以後の研究には前処置を行なつた培養液と雞胎圧搾液との混合液を培養液として用いた．次に，

8) ぶどう糖濃度は如何なる影響があり，またどの濃度が最も適当かを吟味するため培養液をぶどう糖濃度 450 mg，250 mg，150 mg，50 mg/dl に調整し検討した．表4に於いて，細胞数より見れば① の 450 mg/dl が最も良い様であるが，活性度は非常に悪い．培養1日後形態的には細胞はピクノー

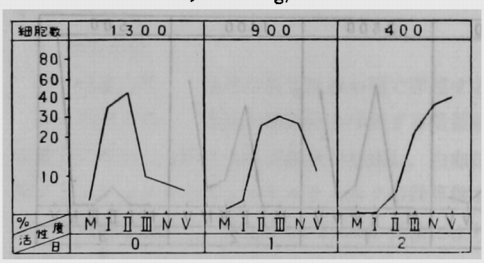
表4　1) 450 mg/dl



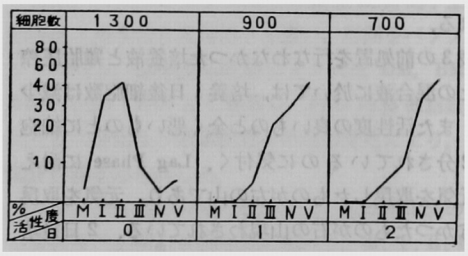
2) 250 mg/dl



3) 150 mg/dl



4) 50 mg/dl



ゼに陥入つている．即ち核，胞体共に萎縮し，核小体明瞭なるも核膜やや不明瞭，変性顆粒が核の反対側の胞体表面に多数密集している．培養2日後には，細胞は更に萎縮し核小体も不明瞭となり変性顆粒胞体内に充満している．従つて細胞数の多いのは，細胞が萎縮してしまつて崩壊しなかつた事に原因がある．② 250 mg/dl に於いて培養1日後は核及び胞体にやや膨化の傾向があり，① 450 mg/dl に見られる変性顆粒が少数認められるが，これらを除けば略々正常培養細胞の形態を示している．培養2日後はぶどう糖が消費され適当な濃度に下つたために，活性度の少しの回復を見ている．③ 150 mg/dl，に於いて培養1日後は形態全く正常であり，活性度も最も良かつた．④ 50 mg/dl に於いては形態上の特異所見なく，活性度は ③ 150 mg/dl に比較して悪かつた．培養1日後に好結果を示した ③ 150 mg/dl は培養2日後にはぶどう糖消費により濃度低下を来たしたために，② の 250 mg/dl，培養2日目後の所見の方が良い．

以上より培養液のぶどう糖濃度は 150 mg/dl に維持するのが良いと推論される．

9) 以上により培養液を作成し，調整し，吉田肉腫細胞を加え，浮游培養を行なつたが，なお充分な結果を得る事は出来なかつた．併しこれに，難胎線維芽細胞を次の方法で同一培養液中に培養した場合，これ迄に比較して飛躍的好結果を得るに到つた．

その方法とは，たんざく型載物硝子上に1～2ケの少量の難胎圧挫組織をのせ，難ヘパリン加血漿を各々1滴，滴下し凝固させたものを同一培養液中に挿入し培養するものであり，これにより増生して来る細胞は殆んど全部線維芽細胞であるために，以後これを難胎線維芽細胞の培養と述べる事にする．

次に難胎線維芽細胞を同時培養した場合と，しなかつた場合の比較検討であるが，同時培養の場合の所見は，次の項 B，及び第2編に同じであるので，ここでは省略し，同時培養しない場合の所見を比較しながら概略述べる事にする．

この場合，同時培養に比し，培養液 pH は早期に低下し，細胞の生存し得ないと考えられる pH 6.6～pH 6.2 に到るので，Tris Buffer（石津製薬）を用いる，及び頻回に培養液交換を行う（培養液に前処置を行なつているので LagPhase は問題にならない），の2方法により pH の低下防止を行なつた．

その結果は全般的に活性度の悪化が早急に起り，分裂像は観察されても非常に数が少なく，また形態上でも線維芽細胞同時培養と比較して胞体のピクノーゼの傾向が強く，また後者に於いてはみられない処の印環細胞（腹水単球様細胞にみられる様な）の出現が見られた．

要するに線維芽細胞を用いぬ時は pH を調整しても，線維芽細胞を用いた時より，明らかに細胞増生が悪く，従つて線維芽細胞の同時培養は pH を調整するのみの意義ではなく，根本的に腫瘍細胞の増生を促進し得るものである事が明らかになつた．

以上により，以後の培養には必ず難胎圧挫組織少量を，同時に培養する事とした．

10) A.T.P. (0.001～0.01 cc/cc) を培養液に添加した場合，1日後では非常な発育促進作用が認められるが2日後では殆んどの細胞が活性度（表1）Ⅳ, Ⅴ度であつた．

11) pHは7.4～7.2が適当でありpH 7.0になると活性度は急激に低下し，pH 6.8では殆んどの細胞が変性に陥り，pH 6.6では最早，生きた細胞は認められない．

12) 難胎圧搾液と難胎滲出液の比較．前者は孵化9日目の難胎児をFischerの圧搾器或いは20 cc注射器で圧出して得た粥状物を毎分3000廻転で30分遠沈したその上澄であり，後者は上澄を取去つた沈渣に，取去つた難胎圧搾液だけの量のハンクス氏液を加え，混和し氷室に保存し2日目，4日目に取り出し，これを毎分8000廻転30分遠沈した上澄である．いずれを使用して培養しても結果に於いて差を認めなかつた．

B．ローラーチューブ法の中，最良の成績を示した方法の手技及び培養経過．かくの如く私は液体培地を中心に種々の培養方法を検討したが，次に最良の成績を示した細胞浮游液培養法の手技をやや詳しく述べる．

培養液は前述の如く，ハンクス氏液60 cc，馬血清40 cc，これにR. N. A. 0.1 g，V. B_{12} 100 γを加え，更に腫瘍細胞を含む吉田肉腫腹水10 ccを加え混和し，24時間氷室に保存し，これを毎分3000廻転15分遠沈し上澄をザイツ濾過器で濾液1.5 ccに難胎圧搾液若しくは滲出液を0.5 ccを加え，ローラーチューブ1本あたり2 ccとした．これに腫瘍細胞を含む吉田肉腫腹水を1～1/2滴1/2注射針にて滴下し細胞数1000～3000/mm^3とした．

更に同一ローラーチューブ内に難胎圧挫組織を培養する．即ちたんざく型載物硝子の一端に1～2ケの少量の孵化9日目の難胎圧挫粥状物を置き，その上に健康雞ヘパリン加血漿をツベルクリン針にて1滴滴下し，37°C 孵卵器内に約30分静置し血漿の凝固をはかり，ローラーチューブ内に挿入する．最後にローラーチューブにダブル栓を施して，1時間10廻転 37°C のローラーチューブ培養器内に収めた．

液体培地交換は2日目毎に行なつた．即ち腫瘍細胞を含む液体培地を毎分1000廻転5分間遠沈し，上澄を捨て，新しい液体培地を加え混和する．

難胎圧搾組織交換は6日目毎に行ない，新しい組織と交換した．

培養液組成は表6，その手技は表7の如くである．この培養法による細胞数及び活性度については表5の如くである．

培養開始時分裂像の見られなかつたものが培養一日後で4%観察され，細胞数やや増加している．その後は細胞数の漸減と活性度の漸次の悪化を示して

表　5

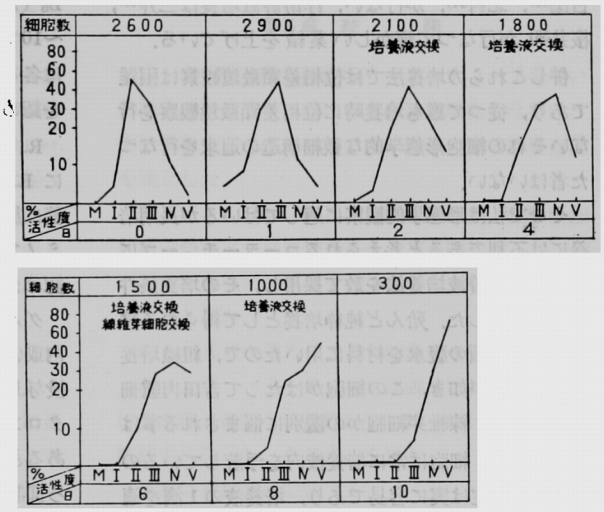
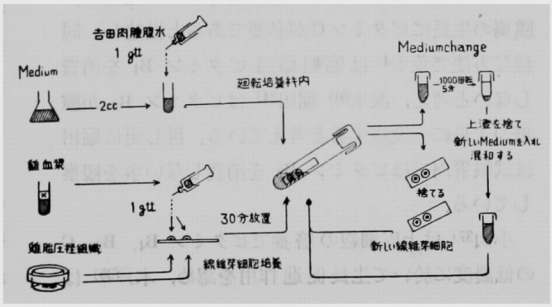


表　6

使用培養液の組成	
Hanks 氏 液	44%
C. E. E （難胎圧搾液）	19%
馬 血 清	29%
吉田肉腫腹水	8%
R. N. A.	0.8 mg/cc
V. B_{12}	0.8 γ/cc

表7　腫瘍細胞浮游培養術式



いるが，6日後にも表には示されていないが2‰の分裂像を観察している．10日後に到り甚だしい細胞数の減少と活性度の悪化を示したので，ラッテ腹腔中にこの腫瘍細胞を含む培養液を注入し，培養を打切つたが復元は成功した．この外に12日迄観察して復元し，7日目より腹水と吉田肉腫細胞の出現を見，11日目のラッの腫瘍死を見ている．

第4章 総括並びに考按

吉田肉腫の体外培養に関しては，組織培養を螺良[59]，飛岡[68]，金[33]，森脇[40]，三井[45]，田中館[69]，古閑[36]，北村[34]，が行ない，浮游静置培養は三井[45]，桜井[58]が行なつて輝かしい業績を上げている．

併しこれらの培養法では位相差顕微鏡観察は困難であり，従つて誰も培養時に位相差顕微鏡観察を行ないそれの細胞形態学的な微細構造の追求を行なつた者はいない．

そこで私は形態学的観察に適してはいるが長期培養には不利であると考えられるローラーチューブによる細胞浮游液培養法を敢て採用し，その培養条件を色々検討した．殆んど純粋培養として得られる移植4～5日頃の腹水を材料に用いたので，組織培養時に於けるが如き，この細胞がはたして吉田肉腫細胞か或いは，線維芽細胞かの鑑別に悩まされる事はなかつたし，細胞は常に培養液内を浮游しているので細胞数算定は実に容易であり，培養液の1滴を適宜位相差顕微鏡観察する事により全く容易に細胞の活性度を分類する事が出来た．又少数の吉田肉腫細胞以外の腹水細胞は一見して鑑別可能のため除外するを得た．

そして細胞数は減少しなくても全細胞が萎縮していたり，細胞数が減少していても活性度よく活潑に分裂を行なつていたりするので，培養の動向は細胞数と形態即ち活性度を綜合しなければ充分でない事を知つた．

諸種ビタミンについては柴田[65]が吉田皮下腫瘍ラッテの臓器のビタミンCを経過を追つて定量し，腫瘍の生長にビタミンCが必要であると推論し，同様な方法で荒木[4]は癌組織はビタミン B_1 を消費しないと考え，沢木[60]堀田[24]はビタミン B_2 が腫瘍の生長に一役演ずると考えている．併し更に堀田は試験管内ではビタミン B_2 を消費しない事を観察している．

小山[37]は上皮細胞の培養でビタミン B_1，B_2，Cの低濃度に於いて生長促進作用を認め，木戸[35]は内藤系マウス癌の培養でビタミン A，B_1，B_2 は一定濃度では成長を促進するが，ビタミン C，D は正常組織の培養には発育促進作用あるも，癌に対してその作用はないと述べている．又腫瘍組織以外では大藤[50]は骨髄体外培養にビタミン B_1，B_2，B_{12}，葉酸を用いその好影響あるを見ており，木村[32]は難胎組織培養にビタミン B_1，B_2 を用い，一定濃度で発育を促進するのを観察している．渡辺[73]は難胎心の線維芽細胞の培養にはビタミン A，B_1，B_2，B_6，B_{12}，C，K，P を用い効果なしとしている．私はビタミン B_1 (10～100 γ/cc)，B_2 (5～50 γ/cc)，B_6 (10～100 γ/cc)，C (0.1～1.0 mg/cc)，B_{12} (0.1～10 γ/cc)，吉田腹水腫瘍細胞の培養に同時に或いは各々単独に添加し，ビタミン B_{12} のみに良効果を認めた．

R. N. A. に関しては古閑[36]，織田[53]は培養液に R. N. A. を用いているが，渡辺[73]は前述の培養に於いて R. N. A. の効果を認めていない．私はミノファーゲン製薬の R. N. A. を用いて良効果を認めた．

グルクロン酸は小川[54]が吉田肉腫ラッテの腹腔内或いは筋肉内に注射し十数時間後どちらの方法で投与しても同様に腫瘍の発育を促進するから，グルクロン酸の吉田肉腫に対する作用は直接的なものであると結論しているが，私は培養時に添加してむしろ抑制作用（細胞障碍）を認め，少なくとも本剤の直接的促進作用は認め得なかつた．

Lag Phase に関しては，Earle[9]がL 株マウス線維芽細胞浮游静置培養に於いて18～24時間の，高野[70]，山田[77]等は Hela 株細胞を用いて12時間以内の Lag Phase を観察しており，古閑[36]は吉田肉腫培養で24時間の Lag Phase を認めている．相沢[2]は家兎血清中に吉田肉腫抵抗性物質の存在を考え，これは吉田肉腫細胞に吸着され，或いは加熱非動化により消失するとしている．更に相沢はこの事実を他の諸種の血清に於いて試みている．また，浮游培養に於いて一定数以下の細胞数では細胞は死滅し培養は成功しないと多くの研究者が述べているが，これと Lag Phase の原因が一元的に培養液中の吉田肉腫抵抗物質にあるのではないかと考え，前処置として培養前に一定数の肉腫細胞を加え，24時間氷室に保存し，該物質の吸着をはかつた．吸着が充分に行なわれたと考えられる場合，Lag Phase は認められず，また培養細胞数も之を少なくすればする程反

つて培養時間延長に好結果をもたらし，更に細胞数が少ないために培養液中養分の消費される事少なく培養液交換を頻繁に行なう必要なく，これを最高6日目に行なつても差支えのない事を認めた．

ぶどう糖濃度に関しては古閑[36]は200 mg/dlの培養液を用いているが，私は吉田肉腫に於いても150 mg/dlが適当である事を認めた．

吉田肉腫培養に対する他組織同時培養は古閑[36]，森脇[40]，飛岡[68]，桜井[58]，田中館[69]が主に雞胎心を用いて好結果を得ているが，私は雞胎圧挫組織を用いて充分好結果の得られる事を知つた．勿論両者共に増生して来る細胞は殆んど全て線維芽細胞であつて，本質的には同一と考えられるものである．

またこれの作用機転としては副次的には培養液pHの正常維持が考えられるが，一方対照の雞胎圧挫組織を用いなかつた例に於いてはTris Buffer，培養液の頻回交換によつてpH低下を阻止した場合にもなお，且つ雞胎圧挫組織を用いた例に比較して細胞活性度の悪化が早くみられているので，矢張り雞胎圧挫組織は本質的に吉田肉腫細胞の代謝促進に重要な役割を演じているものと推断出来る．

A.T.P.に関しては第1日目に於いては非常な好結果を得，第2日目は殆んど全細胞が変性に陥入つたのを観察したが，発育しすぎて，すみやかな培養液中の養分の消失，環境の悪化を来たしたものと考えられる．これと同様の結果は第3編に於いて述べるX線照射肝抽出脂酸添加の対照実験として行なつたX線非照射肝抽出脂酸添加時に見られた．なお，A.T.P.は少なくとも第1日目には非常に好影響を与えたのであるから，更に濃度の吟味を重さねるならば，前記私の最良の培養液に加えて益する適当の濃度をみつける事は充分可能と思われる．

以上要するに私は吉田肉腫細胞のローラーチューブ浮游培養の培養液並びに培養手技を種々の角度より検討した結果，私の今日迄吟味した範囲内では一応次の構成の培養液並びに培養手技が，該細胞の長期培養に最も優れている事が明らかになつた．即ち培養液に就いてはHanks氏液44%，C.E.E. 19%，馬血清29%，R.N.A. 0.8 mg/cc，V. B_{12} 0.8 γ/cc，吉田肉腫腹水8%（これは前処置のため，加えられたものである）であり，培養手技に就いては前記培養液2 cc中に吉田肉腫腹水1滴を混じ，腫瘍細胞を浮游せしめ，雞胎圧挫組織少量を同時に固定培養し，廻転培培養機内にて培養したものであり図解すれば表6，表7の如くである．

第5章　結　　語

1）吉田腹水腫瘍細胞のローラーチューブを用いた細胞浮游液培養に就いて方法論的研究を行ない，細胞微細構造追求の目的に添い得る一定の培養方法を確立した．

2）ビタミ B_{12}，R.N.A. 雞胎圧搾液，雞胎圧挫組織同時培養が好影響を与える事を認めた．

3）培養液に前処置を行なう事によりLag Phaseを阻止し得た．

4）培養液中適当なぶどう糖濃度を定めた．

5）上記ローラーチューブ浮游液培養法により吉田腹水腫瘍細胞を培養観察し，10～12日後にラッテ腹腔内に復元し，その成功を見た．

文献は最終編に記載する．

（本論旨は第16回日本癌学総会にて発表した．）

終りに臨み終始御懇篤なる御指導並びに御校閲載いた恩師平木教授並びに大藤助教授に深甚の謝意を表す．

Morphological Studies on Yoshida Sarcoma Cells by Tissue Culture

Part 1. Tissue Culture Technique by Cell-suspension in the Fluid Medium

By

Tuneo SHIBATA

Department of Internal Medicine Okayama Universiy Medical School
(Director: Prof. Kiyoshi HIRAKI)

In the first paper, the results of experiments are presented, in which an attempt was made to develope methods of cytoloyical observation and tissue culture techniques suitable for the morphological studies on Yoshida sarcoma cells in tissue culture.

In the present experiments it was established that the method of cell-suspension culture was the most suitable one for such studies. Advantages of this method of tissue culture are as follows: 1) It enables us to observe minute cell structures by phase-contrast microscopy; 2) it is easy to count cell number; 3) it is possible to evaluate cellular activity; and 4) it enables us to take out cells in culture easily and to conduct various cytological studies, such as routine staining, peroxidase reaction, supra-vital staining and carbon particle phagocytosis of these cells.

Next, conditions of the medium necessary for the the survival and growth of Yoshida sarcoma cells were investigated. It was found that the suitable conditions of the medium were, pH 7.2-7.4, glucose solution at the concentration of 150 mg/dl, 44% Hank's solution, 19% chick embryo extract, 29% horse serum, 8% Yoshida sarcoma ascites (extract), 0.8 mg/ml RNA, and 0.87/ml vitamin B_{12}.

The pretreatment of the medium with Yoshida sarcoma cells eliminated the problem of lag phase, and also an addition of a small portion of crushed chick embryo tissue (containing fibroblasts) improved the cellular growth. In order to keep cells floating, roller tubes were placed in an incubator kept at 37 C.

Yoshida sarcoma cells cultured in such a medium under the conditions afore-mentioned increased in number at an early stage but later their population decreased gradually. Observation was possible for a certain period of time, the maximum being 12 days.