

脾臓組織培養に関する研究

第 2 編

培地の物理化学的条件の影響について

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
 - a) 正常培養
 - b) 種々の滲透圧下に於ける培養
 - i) 低張なる場合
 - ii) 主として高張なる場合
 - c) 種々の温度下に於ける培養
 - d) 種々の水素イオン濃度下に於ける培養

i) 酸性培地の場合

ii) アルカリ性培地の場合

2) 観察方法

第4章 実験成績

- 1) 培地滲透圧の影響について
 - a) 低張なる場合
 - b) 主として高張なる場合
- 2) 培地温度の影響について
- 3) 培地水素イオン濃度の影響について
 - a) 酸性培地の場合
 - b) アルカリ性培地の場合

第5章 総括並びに考按

第6章 結 論

第1章 緒 言

私は第1編に於いて従来臨床応用が殆んどなされていなかった脾臓組織培養に、教室の骨髓臨床組織培養法¹⁾の術式を導入する事により脾臓臨床組織培養法を考案し、従来の Plasma clot culture とその培養成績を比較しても充分実地使用に耐え得る事を確認した。

さて組織培養に於ける培養組織の発育は種々な要素により影響を受けるが、前編で述べた培地の構成成分と並んで培地の物理化学的条件もまた重要な要素である。特に脾臓臨床組織培養法の実際使用に於いてその物理化学的条件による影響について予め知識を持つ事は、添加実験などの例を引用する迄もなく極めて肝要であると思われる。斯様な点から本編に於いては種々の物理化学的条件の中でも最も基礎的な要素であると考えられる培地滲透圧、温度及び水素イオン濃度の脾臓臨床組織培養に及ぼす影響を

観察した。

抑々細細は一種の半透膜である細胞膜により包まれ、外界の滲透圧の変化によつて細胞内外の滲透圧を均一化せんとして細胞構成成分に質的量的な変化を受け、細胞の生活現象に重大な影響を受ける。Jacques Loeb²⁾ の tubularia に関する研究以来、滲透圧の組織培養に及ぼす影響は鶏胎脾、蛙上皮、鶏胎心由来の Fibroblasten を始めとして種々の臓器につき多くの学者³⁾⁻¹²⁾ によつて研究され、特に培地血漿稀釈による組織増生の増大に関して盛んな討論がなされている。

生活現象を営む細胞は複雑な酵素反応を仲介者として新陳代謝を行なっているがこれ等の複雑な化学反応が外界並びに細胞自体の温度に影響される事は明かである。組織培養の温度に及ぼす影響は主として白血球機能につき多くの研究¹¹⁾⁻¹⁷⁾ がなされているが、脾に関するものは比較的少く²⁴⁾⁻²⁷⁾ また系統的研究もなされていない。

次に細胞は一定の水素イオン濃度に於いてのみ良好な発育をとげるものであり、組織培養に於ける組織の発育もまた然りである。古来より培地水素イオン濃度の組織培養に及ぼす影響については Rous¹⁸⁾, Fischer¹⁹⁾, Rumjantzew²⁰⁾ 等により種々の臓器につき研究されているが、脾臓に関しては Krontowski²¹⁾, Krontowski & Bronstein²²⁾, 太田²³⁾ 福光等²⁴⁾²⁵⁾ 等の研究がある。

さて前編でも触れた如く教室では近年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い数々の業績を発表して来たが、それ等の研究の一環として教室津島¹¹⁾ は家兎骨髓体外組織培養に於ける物理化学的条件の影響に関して詳細な系統的研究を行い、また教室高橋¹²⁾ もその際偽好酸球運動能に及ぼす影響につき、主として形態学的な面から詳細な観察を行なった。私もマウス脾にて臨床組織培養を行い津島と同様な観察を行なったので茲に報告する。

第2章 実験材料

1) 脾臓組織片

成熟マウス脾を前編と同様の方法により切り出し培養材料とした。

2) 培養基

マウスにては採血困難の為成熟ラット血清を57°C 30分非働化処理を行なつて後使用した。

3) 発育促進物質

前編の実験の結果に基づき VB₁₂ (100γ/cc) を使用した。

4) 培養器具

平木式臨床組織培養盤 No. 1 を使用した。培養器具は総て乾熱滅菌して使用した。

第3章 実験方法

1) 培養術式

a) 正常培養

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非働化血清1滴を滴下し、更に VB₁₂ 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。

b) 種々の滲透圧下に於ける培養

i) 低張なる場合

血清を滅菌蒸留水にて種々の割合に希釈し、この

希釈血清1滴と VB₁₂ 1滴とを混和して培地となした。蒸留水の割合は全量の1/5, 1/4, 1/3, 2/5, 1/2, 3/5, 2/3, 3/4, 4/5 の9区分である。その他の術式は正常培養と全く同様である。また対照例としては蒸留水に代るにリンゲル氏液を以つてし、蒸留水と同様に9区分の希釈を行なった。

ii) 主として高張なる場合

血清に種々の濃度の食塩水を2:1の割合に加えこの混合血清1滴と VB₁₂ 1滴とを混和して培地となした。食塩水の濃度は0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%の9区分である。その他の術式は正常培養と同様である。

c) 種々の温度下に於ける培養

培地は正常培養と全く同様で孵卵器の温度を各々17°C, 21°C, 25°C, 29°C, 33°C, 35°C, 37°C, 39°C, 41°C, 43°C に保つて培養した。その他の術式は正常培養と全く同様である。

d) 種々の水素イオン濃度下に於ける培養

i) 酸性培地の場合

塩酸 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000 規定液を各々等張として倍量の血清に混じ、この混合血清1滴と VB₁₂ 1滴とを混和して培地となした。対照は生理的食塩水を倍量の血清に混じて使用した。他の術式は正常培養と同様である。

ii) アルカリ性培地の場合

苛性ソーダ 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000 規定液を各々使用し上と同様にした。

2) 観察方法

培養後3, 6及び12時間と経時的に培養標本をとり出し、第1編の実験と同様な方法で各々比較成長価、細胞密度指数並びにリンパ球、好中球遊走速度を測定し比較検討した。

なお対照培養、正常培養に対しては各々培養後12時間の成長係数、密度係数を計算して比較した。

$$\text{成長係数} = \frac{\text{実験組織の比較成長価}}{\text{対照(または正常)組織の比較成長価}}$$

$$\text{密度係数} = \frac{\text{実験組織の密度指数}}{\text{対照(または正常)組織の密度指数}}$$

第4章 実験成績

1) 培地滲透圧の影響について

a) 低張なる場合

第1編で詳述した様な増生帯が出現し経時的に増大を示すが詳細は省略する。

蒸留水希釈の場合比較成長価は第1表に示す如く

第1表 蒸溜水にて稀釈した場合の比較成長面

稀釈量 \ 時間	3	6	12
1/6	3.22	5.93	7.91
1/4	2.51	3.16	4.34
1/3	2.83	3.87	5.00
2/6	2.44	4.50	6.63
1/2	2.83	3.60	6.09
3/6	2.23	4.23	7.27
2/3	2.59	5.21	6.32
3/4	1.79	3.13	4.34
4/6	1.72	2.91	4.05
正常	2.48	5.14	7.31

第2表 リンゲル氏液にて稀釈した場合の比較成長価

稀釈量 \ 時間	3	6	12
1/6	2.92	5.48	7.67
1/4	2.13	2.93	3.94
1/3	2.56	3.25	4.63
2/6	2.40	3.03	4.11
1/2	2.24	3.29	4.47
3/6	2.79	3.71	5.91
2/3	1.89	2.62	3.59
3/4	1.92	2.74	3.50
4/6	1.77	2.43	3.71

濃度に比例して一定の変化を示していないが、蒸溜水濃度 1/6, 3/6 の培養に於いて 12 時間値は高値を示して正常培養にはほぼ近く、3/4 以上の稀釈にては低値を示した。第 5 表に示す如く 12 時間値の対照に対する成長係数に於いては 2/3, 2/6 の培養は各々 1.76, 1.61 と高値を示し、全培養に於いて対照群より良好

第3表 蒸溜水にて稀釈した場合の細胞密度指数

稀釈量 \ 時間	3	6	12
1/6	58	60	74
1/4	45	68	82
1/3	41	56	70
2/6	38	51	68
1/2	34	49	56
3/6	35	44	59
2/3	36	54	66
3/4	52	56	60
4/6	28	33	32
正常	68	75	90

な成績を示している。また経時的に第 1 表と第 2 表を比較してもほぼ同様な結果となつている。

次に細胞密度指数は第 3 表に示す如く概ね蒸溜水稀釈度の増大するにつれ減少を示し、1/4, 1/6 の培養に於いては 12 時間値は各々 82, 74 と高値を示すが正常培養には劣り、また第 4 表の対照群と比較しても全例劣る。第 5 表並びに第 1 図に示す如く密度係数に於いても成長係数と趣きを異にし、成長係数

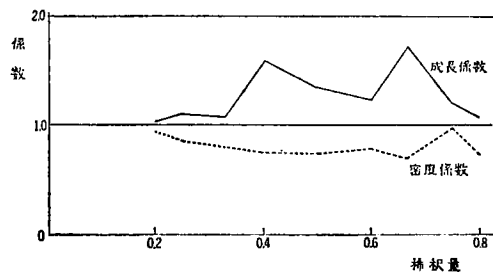
第4表 リンゲル氏液にて稀釈した場合の細胞密度指数

稀釈量 \ 時間	3	6	12
1/6	60	62	79
1/4	65	83	97
1/3	59	68	86
2/6	62	74	91
1/2	46	61	75
3/6	39	58	75
2/3	60	79	94
3/4	38	52	61
4/6	36	40	44

第5表 蒸溜水にて稀釈した場合の対照培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)

稀釈量 \ 係数	成長係数	密度係数
1/6	1.03	0.94
1/4	1.10	0.86
1/3	1.08	0.81
2/6	1.61	0.75
1/2	1.36	0.75
3/6	1.23	0.79
2/3	1.76	0.70
3/4	1.21	0.98
4/6	1.09	0.73

第1図 蒸溜水にて稀釈した場合の対照培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)

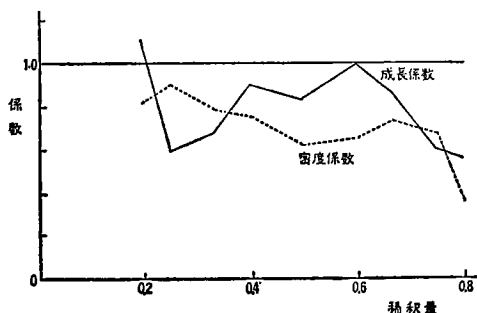


の大なるものは密度係数やや低く、成長係数の小なるものは密度係数がやや高い傾向にあるのが特長的であり、比較成長係の高い場合密度が疎である事を示している。この事実は正常培養との比較に於いても見られる。即ち正常培養に対する12時間値の成長係数並びに密度係数は第6表及び第2図に示す如くであり、正常培養より優れた値を示すのは1/5稀釈の成長係数のみで密度係数は凡て1以下の数値を示し、成長係数と密度係数との相反性も同様に観察された。

第6表 蒸溜水にて稀釈した場合の正常培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)

稀釈量	係数	成長係数	密度係数
1/5		1.08	0.82
1/4		0.59	0.91
1/3		0.68	0.78
2/5		0.90	0.76
1/2		0.83	0.62
3/5		0.99	0.66
2/3		0.86	0.73
3/4		0.59	0.67
4/5		0.55	0.36

第2図 蒸溜水にて稀釈した場合の正常培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)



リンパ球遊走速度は第7表に示す如く1/3, 3/4の蒸溜水稀釈培地に於いては正常よりもやや高値を示すが、リンパ球遊走速度が好中球のそれに比しかなり低い値である為有意差は見られなかつた。その他の稀釈に於いては概ね正常培養より劣つたが、2/5, 3/4の稀釈培地に於いては12時間値がかなりの高値を示した。なお本実験をも含めて以下の実験に於いては1, 2の例外を除き総てリンパ球遊走機能は24時間で消失した。対照群との比較に於いても著明な

第7表 蒸溜水にて稀釈した場合のリンパ球遊走速度 (μ/m)

稀釈量 \ 時間	3	6	12	24
1/5	4.2	3.7	1.8	0
1/4	4.4	4.5	2.1	0
1/3	5.3	4.9	2.7	0
2/5	4.6	3.7	3.2	0
1/2	4.3	2.7	1.9	0
3/5	3.2	2.8	1.7	0
2/3	3.9	3.3	1.9	0
3/4	5.3	5.0	3.3	0
4/5	4.2	3.7	2.2	0
正 常	5.1	3.7	2.4	0

第8表 リンゲル氏液にて稀釈した場合のリンパ球遊走速度 (μ/m)

稀釈量 \ 時間	3	6	12	24
1/5	3.9	3.7	2.0	0
1/4	4.2	3.9	1.8	0
1/3	4.5	3.8	2.8	0
2/5	3.5	3.6	1.7	0
1/2	4.4	4.1	3.2	0
3/5	3.4	2.5	1.6	0
2/3	3.3	3.4	1.8	0
3/4	4.8	3.8	2.5	0
4/5	3.7	2.7	2.5	0

差は見られなかつたが、2/3以上の稀釈に於いては概ね対照より大となつている。

b) 主として高張なる場合

比較成長係は第9表の如くであり、5%食塩水による稀釈にては全く増生を認めず0.9%より高濃度の高張食塩水による稀釈に於いては明らかに正常よ

第9表 食塩水にて稀釈した場合の比較成長係

濃度 \ 時間	3	6	12
5%	0	0	0
4	0.69	1.58	2.15
3	1.19	2.75	4.38
2.5	1.46	3.18	4.75
2	1.78	3.49	5.26
1.5	2.00	3.57	5.32
0.9	2.04	3.81	6.73
0.6	2.15	4.22	7.35
0.3	3.43	6.38	8.64
正 常	2.48	5.14	7.31

り小なる値を示し濃度の上昇と共に比較成長係は減少した。0.3% 低張食塩水による希釈にては蒸留水による希釈血清培地に於けると同様正常より高値を示した。正常培養に対して成長係をとると第11表の如く0.9% 以上の高濃度に於いては1以下である。

第10表 食塩水にて希釈した場合の細胞密度指数

濃度	時間		
	3	6	12
5%	0	0	0
4	23	27	30
3	38	46	53
2.5	23	29	45
2	36	46	53
1.5	40	49	56
0.9	39	45	55
0.6	48	56	59
0.3	49	53	72
正常	68	75	90

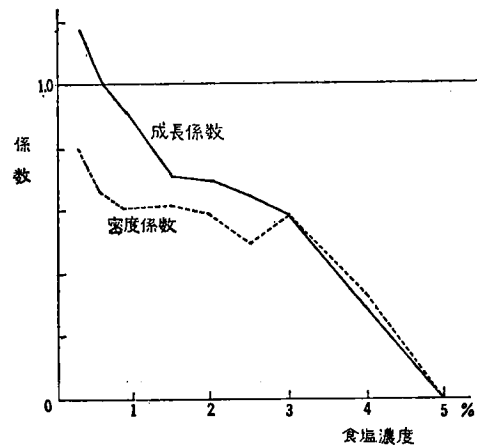
第11表 食塩水にて希釈した場合の正常培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)

濃度	係数	成長係数	密度係数
5%		0	0
4		0.29	0.33
3		0.59	0.59
2.5		0.65	0.50
2		0.71	0.59
1.5		0.72	0.62
0.9		0.92	0.61
0.6		1.00	0.66
0.3		1.18	0.80

次に細胞密度指数は第10表に示す如く全培養に於いて正常より低値を示し一般に高濃度になる程低い。3時間値に於いては成績にかなりのむら認められるが培養の経過につれ高濃度では細胞密度指数が順調に増加しない傾向がある。正常培養に対して密度係数をとると何れも1より低く、第11表に示す如く成長係数と比較しても概ね低値を示すが、高濃度に於いては有意差なく、低濃度に於いては或る程度開きを生じ、蒸留水希釈培地で見られた成長係数と密度係数の相反性程ではないがいくらかそれに近い結果を示した。

リンパ球遊走速度は第12表に示したが高濃度の食

第3図 食塩水にて希釈した場合の正常培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)



塩水にては細胞委縮が見られ、5%にては全く遊走を認めず4%に於いてもその遊走は極めて僅かであった。1.5%以上の高濃度に於いては遊走速度は正常に比し低値を示したが、0.9%に於いては正常よりやや良好で特に6時間値は高値を示した。また低張食塩水に於いて6、12時間値が比較的高値を保ち、蒸留水希釈の場合と同様の所見を呈した。2.5%、3%の高濃度に於いては6時間値が3時間値より高値を示し、1.5%に於いては6時間値と12時間値に大差を認めなかつた。

第12表 食塩水にて希釈した場合のリンパ球遊走速度 (μ/m)

濃度	時間			
	3	6	12	24
5%	0	0	0	0
4	1.0	0.9	0	0
3	1.6	2.5	1.8	0
2.5	2.4	2.8	1.9	0
2	4.1	3.5	1.9	0
1.5	3.5	3.0	2.9	0
0.9	5.2	4.7	2.4	0
0.6	4.8	3.4	3.0	0
0.3	3.2	3.7	3.0	0
正常	5.1	3.7	2.4	0

2) 培地温度の影響について

43°C, 17°C では全く増生を認めなかつた。21°C では培養3時間後に僅かな増生を認めたがその後増生を示さず、41°C にては6時間後迄僅かな増生が見られたがその後増生を認めなかつた。これ等の培

第13表 各温度に於ける比較成長価

温度	時間	3	6	12
43°C		0	0	0
41°C		0.74	0.91	0.91
39°C		2.56	5.27	7.67
37°C		2.48	5.14	7.31
35°C		2.17	4.60	7.29
33°C		1.85	2.75	4.00
29°C		1.08	1.62	2.49
25°C		0.98	1.45	1.99
21°C		0.68	0.68	0.68
17°C		0	0	0

第14表 各温度に於ける細胞密度指数

温度	時間	3	6	12
43°C		0	0	0
41°C		18	14	14
39°C		70	98	128
37°C		68	75	90
35°C		49	71	90
33°C		54	76	92
29°C		45	58	78
25°C		55	62	85
21°C		26	25	20
17°C		0	0	0

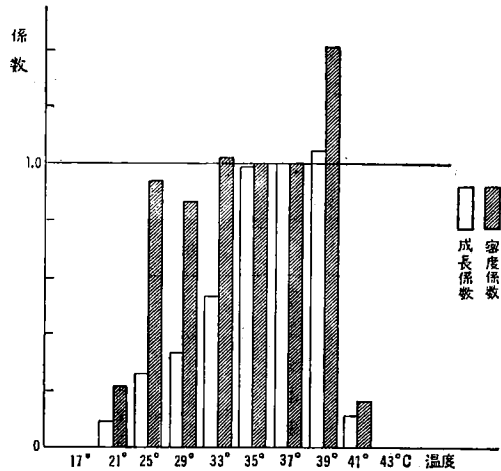
第15表 各温度に於ける 37°C 培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)

温度	係数	成長係数	密度係数
43°C		0	0
41°C		0.12	0.16
39°C		1.04	1.42
37°C		1.00	1.00
35°C		0.99	1.00
33°C		0.54	1.02
29°C		0.34	0.87
25°C		0.27	0.94
21°C		0.09	0.22
17°C		0	0

養に於いては細胞は早期に変性に陥つた。

比較成長価は第13表に示した。全経過を通じて 39°C が最も高値を示したが 37°C との差は僅かであつた。35°C~39°C が比較的良好的な増生を示したが、その他の温度に於いては増生は非常に悪く

第4図 各温度に於ける 37°C 培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)



第16表 各温度に於ける血球遊走速度 (μ/m)

温度	血球種	時間	3	6	12	24
43°C	リンパ球		0	0	0	0
	好中球		0	0	0	0
41°C	リンパ球		0	0	0	0
	好中球		0	0	0	0
39°C	リンパ球		5.3	3.4	0	0
	好中球		14.0	9.2	5.2	0
37°C	リンパ球		5.1	3.7	2.4	0
	好中球		12.0	9.1	7.7	0
35°C	リンパ球		3.6	2.9	2.0	0
	好中球		10.2	9.0	7.0	3.6
33°C	リンパ球		3.6	3.6	2.7	0
	好中球		8.9	9.2	6.8	0
29°C	リンパ球		2.9	1.9	0	0
	好中球		7.4	7.5	6.4	0
25°C	リンパ球		2.1	2.0	0	0
	好中球		7.5	5.0	0	0
21°C	リンパ球		0	0	0	0
	好中球		3.1	0	0	0
17°C	リンパ球		0	0	0	0
	好中球		0	0	0	0

21°C, 41°C では早期に増生を停止した。低温になる程比較成長価は低値を示したが、35°C に於いては3時間値が2.17であつたにも拘わらずその後の増生の伸びは順調で12時間では 37°C とほぼ同値を示

した。

細胞密度指数は第14表の如くである。途中で増生を停止した21°C, 41°Cでは極めて低く経時的にその数を減少した。39°Cが特に高値を示し経時的な密度の増加も良好であった。次いで33°C~37°Cが高値を示したが、比較的低温の33°C, 35°Cの場合37°Cに比し3時間値はかなり劣つたにも拘わらずその後順調に増加し12時間ではほぼ同値を示すに至つた。比較成長価に比して全般的に高い値を示し、第15表の如く37°Cに於ける培養を対照として各々成長係数、密度係数を計算し比較すると成長係数に比し密度係数は明らかに高値を示している。

リンパ球遊走速度は第16表の如くである。増生の極めて悪かつた21°C, 41°Cにてはリンパ球は殆んど静止し、僅かに21°Cに於いて3時間迄好中球の遊走が見られただけであつた。リンパ球遊走速度は37°Cと39°Cに於いて高値を示した。39°Cにては

は3時間でやや低いが、その後は37°Cと大差なく、また好中球遊走機能も24時間では他の培養に於いては凡て失われたにも拘わらず比較的良好的に保たれた。33°Cにおいても6時間値, 12時間値は良好で37°Cとほぼ同値を示した。35°C及び33°Cに於いては24時間に於いても他の培養に比較すると変性顆粒の出現が比較的少なかつた。これより低温の培養では温度が低くなる程遊走速度は低下し、リンパ球は25°C, 29°Cでは39°Cと同様に12時間で遊走を停止した。

3) 培地水素イオン濃度の影響について

a) 酸性培地の場合

比較成長価は第17表に示す如くである。1/1000 Nのみが対照より高値を示すが有意差ではない。塩酸濃度の増加につれて比較成長価は減少する傾向にある。

第17表 各種濃度塩酸添加時の比較成長価

濃度 \ 時間	3	6	12
1/100 N	1.82	2.83	3.78
1/200 N	2.36	3.60	4.34
1/500 N	2.83	3.51	4.34
1/1000 N	3.52	3.87	5.21
対 照	3.22	3.69	5.16

第18表 各種濃度塩酸添加時の細胞密度指数

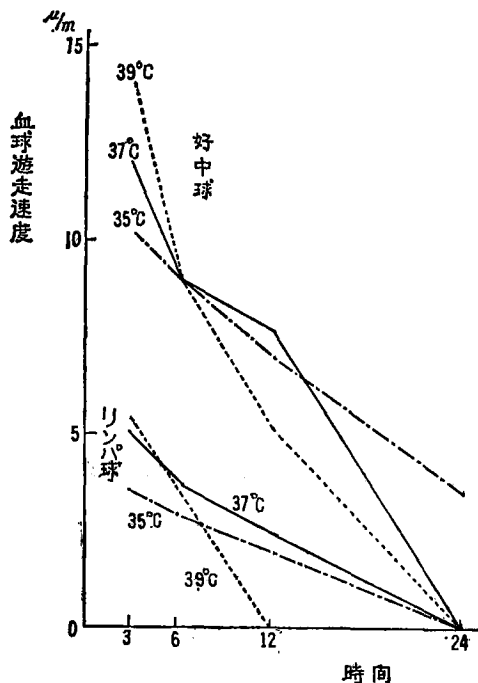
濃度 \ 時間	3	6	12
1/100 N	35	42	44
1/200 N	41	54	59
1/500 N	52	56	63
1/1000 N	44	63	69
対 照	62	69	81

第19表 各種濃度塩酸添加時の対照培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)

濃度 \ 係数	成長係数	密度係数
1/100 N	0.73	0.54
1/200 N	0.84	0.73
1/500 N	0.84	0.78
1/1000 N	1.01	0.85

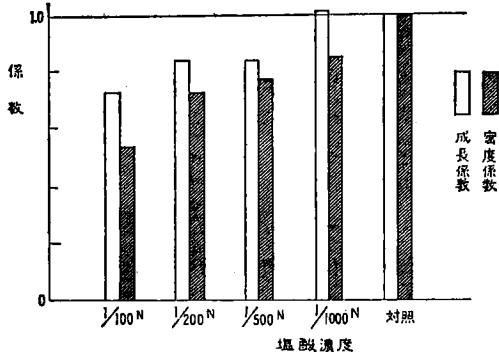
細胞密度指数は第18表に示す如く対照に比して全例が明らかに低値を示し高濃度程減少する。12時間値に於いて対照に対し係数をとると第19表並びに第6図の如く密度係数は成長係数に比し更に低値を示

第5図 培養成績良好な温度に於ける血球遊走速度 (35, 37, 39°C)



12時間で遊走機能は消失し、また好中球遊走速度も3時間値では最高を示すが後次第に鈍化し12時間値では29°C~39°C中で最低となつている。12時間では27°C~37°Cの培養に比し変性顆粒を含んだ細胞が多く出現し変性過程がかなり進んでいる事を示した。これに対し35°Cに於いてはリンパ球遊走速度

第6図 各種濃度塩酸添加時の対照培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)



第20表 各種濃度塩酸添加時のリンパ球遊走速度 (μ/m)

濃度	時間	3	6	12	24
1/100 N	3	3.3	1.9	1.6	0
	6				
	12				
	24				
	対照	4.6	3.5	2.8	0
1/200 N	3	3.8	2.5	1.6	0
	6				
	12				
	24				
1/500 N	3	3.5	2.8	1.8	0
	6				
	12				
	24				
1/1000 N	3	3.3	2.9	1.7	0
	6				
	12				
	24				

す。これは低張培地に於ける結果と近似し、低温培地に於ける結果と相反する。

リンパ球遊走速度は第20表に示す如く全例共に対照より低く高濃度程減少する。即ち 1/1000 N 以上の高濃度の塩酸を添加せる場合総合的に見て総ての培養成績は対照に比し劣っていた。

b) アルカリ性培地の場合

1/200 N には増生を全く認めず 1/500 N でも増生は極めて不良であった。

比較成長係は第21表に示す如く総て対照例より劣り高濃度程低値を示した。1/500 N では6時間より増生を停止した。

第21表 各種濃度苛性ソーダ添加時の比較成長係

濃度	時間	3	6	12
1/200 N	3	0	0	0
1/500 N	3	1.43	1.51	1.51
1/1000 N	3	2.41	2.84	3.87
1/2000 N	3	2.83	3.54	4.67
対照	3	3.22	3.69	5.16

細胞密度指数も第22表に示す如く全例明らかに対照例より低く、経時的に減少し塩酸の場合と同様高濃度程低値を示している、第23表並びに第7図の如

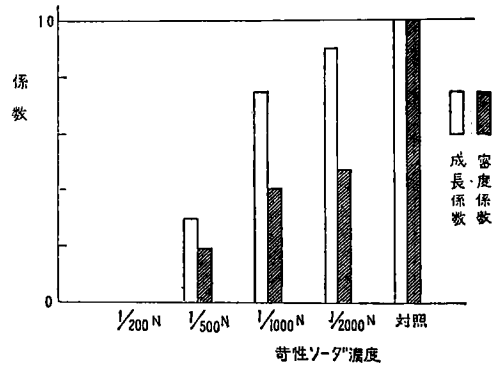
第22表 各種濃度苛性ソーダ添加時の細胞密度指数

濃度	時間	3	6	12
1/200 N	3	0	0	0
1/500 N	3	31	23	15
1/1000 N	3	44	41	32
1/2000 N	3	43	46	38
対照	3	62	69	81

第23表 各種濃度苛性ソーダ添加時の対照培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)

濃度	係数	成長係数	密度係数
1/200 N		0	0
1/500 N		0.29	0.19
1/1000 N		0.75	0.40
1/2000 N		0.91	0.47

第7図 各種濃度苛性ソーダ添加時の対照培養に対する成長係数及び密度係数 (培養後12時間値)



第24表 各種濃度苛性ソーダ添加時のリンパ球遊走速度 (μ/m)

濃度	時間	3	6	12	24
1/200 N	3	0	0	0	0
1/500 N	3	2.3	1.6	0	0
1/1000 N	3	4.3	3.1	1.6	0
1/2000 N	3	3.4	2.8	1.8	0
対照	3	4.6	3.5	2.8	0

く12時間値に於いて係数をとつても全例1より低く塩酸の場合と同様成長係数に比し密度係数の低値が目立つた。

リンパ球遊走速度は第24表に示したが全例対照例

より劣り高濃度程低値を示した。1/500 N では12時間で遊走機能は消失した。

第5章 総括並びに考按

以上を総括すると蒸留水による稀釈血清培地に於ける実験では対照群に対する成長係数(12時間値, 以下同様)は全例1より大きく密度係数はこれに反して全例1より小であつた。成長係数高度の培養にては密度係数が小なる傾向が認められ, 比較成長係数が大きくても密度が疎なる事を示した。これと同じ事が正常培養との比較に於いても見られ, 眞の増生は正常培養, 対照培養に比し良好でない事を示した。リンパ球遊走速度に於いても正常培養より高値を示すものがあつたが有意差なく対照群との比較に於いても特にすぐれた成績は得られなかつた。

食塩水による稀釈血清培地に於ける実験では等張並びに高張食塩水では成長係数は全例1より低く高濃度程低値を示した。密度係数は全例1より低くリンパ球遊走速度も高張食塩水に於いては正常以下であつた。

温度の実験では41°C以上, 21°C以下では増生は極めて悪く, 39°Cで密度係数, 成長係数は最高値を示したが変性過程の進行が早く, 35°C, 33°Cでは逆に変性過程が遅延する傾向が見られた。総合的に見て37°C, 35°Cが良好な成績を示した。

塩酸を添加せる実験に於いては1/1000Nが比較成長係に於いて対照とほぼ同様な値を示すが密度指数, リンパ球遊走速度に於いて明らかに劣り, 高濃度程凡ての成績は低値を示す。

苛性ソーダを添加せる実験に於いては1/200Nでは全く増生を認めず1/500Nにても増生は極めて不良であつた。1/2000Nで比較成長係は対照に僅かに劣るのみであつたが密度指数, リンパ球遊走速度は共に明かに劣つていた。高濃度程総ての成績は低値を示した。以下この結果につき考按を加える。

1902年 Loeb²⁾は低級動物に於いて水の物理化学的条件の影響を観察し, Tubulariaが低張海水中に産卵されるとその成長はかなり亢進すると述べ, 滲透圧の変化に対する生細胞の強い感受性を始めて記載した。1911年 Carrel and Burrows⁶⁾はヒナ及び鶏胎脾を正常血漿中及び滲透圧を種々に変化させた血漿中で培養し高張血漿は脾臓組織の増生を強く抑制するが, 軽度高張血漿に於いては幾らかの増生の活潑化を認め, 軽度の低張血漿は常に増生を促進させ特に2/5の蒸留水濃度では最高の増生を示したと

述べた。また種々の動物, 臓器につき同様の実験を行ない動物のどの組織も恐らくその至適培地を持つていと推論している。1914年 Lambert⁸⁾は Carrel等と同様の方法で鶏胎脾を培養し, その際対照として血清とリンゲル液で各々稀釈された等張血漿培地を用いた。その結果増生の亢進は培地の低張性に起因する刺戟効果であるとする Carrel等の説に反論し, 等調溶液による血漿稀釈は運動性の活潑な細胞の培養に於いては広範囲な細胞移動を起させるが, 運動性の余りない細胞は稀釈によつて殆んど影響を受けないとし, 細胞移動の増大は恐らく稀釈により Plasma clot中の Fibrin量が減少し運動性に対する抵抗が減じる為であろうと述べた。1914年 Ebeling⁷⁾は血漿と鶏胎圧搾液を用いて結合組織を長期にわたつて継代培養し, 低張, 高張何れも最初には細胞増殖を刺戟するが2~3日後より次第に衰え増生にとつて有害であるとし, 等張稀釈の場合が全経過を通じて最も良好な結果を示すと述べた。1919年 Hogue²⁰⁾は Fibroblastenを培養し, 中性紅及びヤーヌス緑染色を用いて細胞構造に就いて詳細な報告を行い, 低張の場合細胞移動が増大するのは稀釈により栄養物が減少し細胞が栄養物を求めて活潑に移動するからであるとした。その他 Ruth⁴⁾は蛙の皮膚損傷に対する蒸留水の影響を観察し, 蛙腹腔内に蒸留水を注射した場合治癒過程が促進され, また皮膚を体外にて培養する時も低張血漿中に於いては治癒が促進されるとした。本邦に於いては内藤¹⁰⁾, 福光²⁴⁾は Carrel等, Ebelingと同様な実験を行ないこれを支持し, 速水・田中⁹⁾はこれに反対している。その他滲透圧の影響に関して Hamburger³⁾, Schade²⁰⁾, 深水³⁰⁾, 小野田³¹⁾及び阪尾・千田³²⁾等の研究があるが主として白血球機能に関連したものである。教室津島¹¹⁾は緒言に於いて述べた如く家兎骨髄体外組織培養に於いて培地滲透圧の影響につき詳細な研究を行い低張の場合増生は促進されるがこれは被刺戟状態であり, 高張の場合に組織増生は抑制されると述べまたロック氏液にて培地稀釈を行なつた場合支持体の1/4稀釈の場合に増生は促進されるがこれは培地粘稠度の関係であるとし, 偽好酸球遊走速度は低張の場合最初刺戟され後急に落ち, 高張の場合最初抑制され後回復の傾向があるとした。

私の低張血清に於ける実験では比較成長係は対照のリンゲル稀釈等張血清に比し全例良好なる結果をもたらしたが, 正常培養に比較すると1/5稀釈がやや優る程度で他はことごとく劣つた。即ち Carrel

and Burrows⁶⁾ 等が指摘せる如き低張培地の刺戟効果は対照培養との比較に於いてのみ認められ、 $1/6$ 稀釈に於いても正常培養との差は Carrel 等の述べる如く明白なものではなく、リンパ球遊走速度も多少劣つた、対照の等張血清に比較して全例比較成長価が良好であつた事は少く共低張性の刺戟効果がかんりの比重をもつて組織増生に作用した結果と考えられ、また等張血清が正常培養より比較成長価が劣り且つ培地が Plasma clot でなく液体培地であると言う点よりすれば、Lambert⁸⁾ の言う低張乃至は等張稀釈により Fibrin 量が減少して運動性がますますする説は私の実験に関する限り首肯し難い。また正常培養に比し比較成長価が余り良好でなかつた点は低張性の刺戟効果よりも非生理的な血清稀釈による何らかの抑制因子の方が優つた為であると考えられ、脾臓臨床組織培養は添加により影響を受け易い事を示唆している。津島と同様密度指数は正常培養、対照培養に比較して何れも低く増生面積に比して密度が疎なる事を示し一種の被刺戟状態であると考えられた。これに関連して正常培養、対照培養に対する成長係数、密度係数が相反性を示した事は興味ある事実である。リンパ球遊走速度は2~3の低張例で大きかつたが正常培養に比して有意差を認めず、諸家の述べる如く真の増生の増大は見られず低張稀釈は培養にとつて好ましい状態ではないと考えられる。Hogue²⁸⁾ は前述の如く低張の際、減少した栄養物を求めて細胞の移動性が活潑化するとし、その際組織片近接部の細胞が早期に変性に陥入ると述べているがそのような所見は見られず、只等張血清に比し培養成績が良好であつた点から栄養不足説を全く否定しざる事は出来ないと考え、高張血清に於ける実験では全例共正常培養に劣つたが、これは諸家の説とほぼ一致する。低張食塩水による稀釈に於いては蒸留水稀釈の場合と同様成長係数が比較的良好で密度係数との相反性を示したが高濃度食塩水に於いては両係数共ほぼ同値を示し、増生面積、細胞密度共に同程度に抑制されていると考えられる。尚津島の記載した低張と高張に於ける血球遊走速度の経時的な変化の差はリンパ球遊走速度が小値を示す為か判然とは認められなかつた。

培養に及ぼす温度の影響については諸家の研究があるが一般に37~38°Cが至適温度として採用されている。Lambert u. Hanes³³⁾ は鶏胎心及び腸管を培養して温度の及ぼす影響を考察したが、それによると増生を示す範囲は26°Cと44°Cとの間であり

運動する期間は高温部よりも低温部の方が長く、最大増生を示す温度として36°C~39°Cをあげている。根本³⁴⁾ は被覆培養法で Fibroblasten を培養し、5, 12, 20, 30, 39 及び45°Cの培養温度に於ける成績を発表したが、20°C以下にては発育を認めず39°Cで最大増生を示し30°Cがこれに次ぎ45°Cが最小値を示したと述べ、また最大生存期間については45°Cで5日、39°C11日、30°C20日、20°C14日、12°C11日、5°C8日としている。福光³⁴⁾²⁶⁾ は鶏胎心、脾及びそれらを継代培養して得た Fibroblasten をびん法により培養し、培地 PH の推移と培養温度との関係を調べている。その結果35, 38, 42°Cに於いては高温度程その比較成長価は大きく PH の変化が急激であるとし、至適温度として心、脾は38°C、Fibroblasten は38~42°Cであつたと述べている。平井²⁶⁾²⁷⁾ は鶏胎心、脾を培養して糖分解、乳酸生成について研究したが、乳酸生成は組織発育と正比例し、40°Cで最高を示し37°C、42°Cがこれに次ぐと述べている。立花³⁵⁾ は鶏胎心組織を42, 45及び50°Cのリングル氏液中にて種々な時間ひたして後培養しその増殖を見たが、42°Cにては2時間半、45°Cでは10分間、50°Cで10分間ひたした場合は増生を見ないと述べている。温度に対する組織の抵抗性に関しては更に深水³⁰⁾ の研究があり、水晶体上皮細胞の培養に際し他の組織と同様に高温(40~50°C)に対しては比較的抵抗弱く低温(4~5°C)に対してははるかに強い抵抗力を有するとしている。教室角南³⁶⁾ の墨粒貪喰能検査及び教室田村³⁶⁾ の染色能実験によると温度に対する細胞の反応性は培養3~6時間後も衰えておらず培養組織の機能低下は殆んど認められないとしている。また前述した教室津島¹¹⁾ は家兎骨髄体外組織培養に於いて培養温度の及ぼす影響を研究し、カレルびん法にて3~37°Cの間を調べ増生を示す最低温度は12°Cであり温度が高い程増生は大であるとした。更に被覆法にて33~41°Cの間を調べたが、40°Cにては増生見られず39°Cにて最大増生が見られるが一般的観察には37°Cが至適であり、偽好酸球遊走速度は高温程最初大であるがその低下は速やかであると述べている。

私の実験に於いては17, 43°Cに於いては全く増生を認めず、21, 41°Cに於いても増生は極めて不良であり培養可能範囲は25~39°Cと考えられる。これは低温界については Lambert u. Hanes の結果とほぼ一致し、津島の成績に比較するとかなり高い

温度になつてゐる。また高温界についても諸家の結果と比較するとかなり低い温度になつており、総合的に判断すると増生可能領域は高温、低温共にやや狭く他の培養法に比較し温度の影響を受け易い事を示唆している。39°Cで密度係数、成長係数(37°C対照)は最高値を示し、なかつて密度指数が高く増生帯が充実せる事を示した。培養初期に於いては血球遊走機能も最高であつたが、その後急速に落ち変性過程が極めて早期に進行し、矢張り高温による一種の被刺戟状態であると解釈される。これ等の結果はほぼ諸家の説と一致するが、増生帯が稠密である点で Plasma clot culture を用いた津島の成績とやや異なる面があり、低張血清に於ける刺戟状態とも趣きを異にしている。即ち培養初期には眞の意味での増生が活潑になり細胞遊走機能も亢進するが、一方 potential energy も急速に消費され早期に変性を招くと考えられる。全経過を通じて観察すると37°Cが最も良好な結果を示し遊走速度も順調に保たれた。この点は津島の成績と一致する。血球遊走速度は3時間値に於いては温度が高い程高値を示したが比較的低温の35、33°Cに於いては遊走機能が長く保たれ変性過程の進行も遅延し特に35°Cに於いては12時間の比較成長値、細胞密度指数は37°Cとほぼ同値を示した。従つて比較的長期の観察には37°Cよりも35°Cが適していると考えられる。また低温に於いては特に密度係数が成長係数に比して高くこれは前述した低張並びに等張血漿に於ける成績と異なつてゐる。即ち低温により増生は抑制されても細胞密度は比較的稠密で見かけよりは眞の増生は良好で低張血清に於けると全く逆である。後述する酸・アルカリ添加による増生抑制に於いても密度係数の方が低く、低温による増生抑制と異なつて居り、深水³⁰⁾の言う如く低温に対する組織の抵抗力が強い点をも考慮に入れると低温に於ける増生抑制は他の場合と多少機序を異にし、特に比較的低温に於いては単に増生を遅延せしめるだけであるように思われる。諸家の研究でも一般に低温である程生存日数が長くなるとされておられ、Lambert⁸⁾は被覆法で培養した組織を種々の温度に置きその生存日数を観察したが、+6°Cが最長としており、小松³⁷⁾は氷室内に骨髓を保存し生存日数は18日であつたと述べ、小野³⁸⁾は血液細胞について観察し、低温程長く0°Cで18日であるとした。なお白血球遊走機能に関しては幾多の報告があるが、Jolly⁴⁰⁾、McCutcheon¹⁷⁾は40°Cで最大速度を示すとし、教室

角南³⁶⁾は37°Cが至適温度であるとし、Commandon⁴²⁾は最大速度を示すのは38°Cであると述べた。杉山・森⁴³⁾は家兎好酸球に於いて最大速度を示す温度は42.5°Cであると、家鶏は39°C、人間は40.5°Cであると述べている。私の実験も大体これ等の成績と一致するが、39°Cにては変性過程の進行が早い為臨床応用には適さないと考えられ培地至適温度は前述の如く35~37°Cが適当と思う。

組織培養に於ける培地 PH の影響に関しては緒言で述べた如く多くの報告があるが、1913年 Rous¹⁸⁾は培養経過中に新陳代謝の為培地に變化が起りその1つとして PH の変動が現われるとし肉腫、結合組織を家鶏血漿にて培養すると培地は組織の増生と共に酸性に變化するとした。更に Krontowski²¹⁾は家兎脾の培養に於いて培養経過と共に糖分解の為糖量が減少し乳酸が発生する為培地 PH は酸性に傾くとした。太田²³⁾は鶏胎心及び脾をカルレルびん法にて培養し培養の経過と共に培地糖量は減少し乳酸が次第に増加すると述べている。平井²⁶⁾も鶏胎心培養で糖分解及び乳酸生成は組織發育に比例しその變化は40°Cに於いて最大で37°C及び42°Cがこれに続くとした。組織培養に於いては滲透圧などの他の物理化学的条件と同様にその至適 PH は各動物、各組織により異なるものであると予想されるが、この点についての研究としては Mendel⁴⁶⁾の報告がある。即ち海狸に異種蛋白を注射しその血清の PH を5.2~6.6に變化させこの血漿で海狸胎児の皮膚組織を培養したが至適 PH は5.8であり7.6では増生は見られないと述べている。仲田⁴⁷⁾も家兎に牛蛋白、牛脂質、蔗糖を経口的に投与して体液をアチドージスとし、また Ca, Na 等を与えてアルカロージスとし、その血漿を用いて正常家兎脾を培養した。また正常家兎血漿でアルカロージス、アチドージスの家兎脾をも培養した、その結果アチドージス血漿に於いては増生が極めて悪く変性現象も早期より起つたが、アルカロージス血漿は増生は極めて良好であつたとし、一方正常血漿でアルカロージス及びアチドージスの脾を培養した場合も前者は良好で後者は悪いと述べた。Lewis and Felton⁵⁰⁾は Locke-Lewis 氏液の PH を4~9.2に変え鶏胎由来の結合組織を培養して至適 PH は7.0であるとした。また PH 5.5~9.0の間に於いて培養は可能であつたと述べている。Fischer¹⁹⁾は血漿と鶏胎圧搾液を用いた培地に Sørensen 緩衝液を加えて PH を

変え、Fibroblasten を培養しているが、その至適 PH は 7.4~7.8 の間にあり酸性よりアルカリ性に対する抵抗が強いとした。Rumjantzew²⁰⁾ は蛙の肝、脾、腎を Ringer-Locke 氏液中に保存し至適 PH は肝は 6.0~8.0、脾は 6.0~7.8、腎は 6.5~7.0 にあるとした。福光²⁴⁾²⁵⁾ は前述の如く鶏胎心、脾及び Fibroblasten を培養し至適 PH は 7.45~7.95 であると述べ、飾石²⁶⁾ は 7.6~8.0 としている。教室津島¹¹⁾ は家兎骨髄体外組織培養に於いてびん法によつて培地 PH の移動を、また被覆法によつて組織増生に及ぼす培地 PH の影響を検索し、培地 PH は当初 7.80 であつたが日と共に酸性となり 6 日目には 7.06 を示し、被覆法による正常培養の場合は PH は 7.45 であるとした。また塩酸添加による酸性培地にては酸度が弱い程増生が良くまた苛性ソーダ添加によるアルカリ性培地にてはアルカリ度が弱い程増生がよいと述べ、偽好酸球遊走速度に於いても同様であるとした。

私の脾臓臨床組織培養に於ける実験では培地 PH の推移を観察する等の複雑な実験を避け、ただ各種濃度の酸、アルカリを加えてその培養に及ぼす影響を観察するとどめた。塩酸添加時の培養成績に於いては比較的高濃度の $1/100$ N でも増生は稍々不良乍ら、培養は可能であつた。 $1/1000$ N にては比較成長価は対照(生理的食塩水添加)とほぼ同様であつたが、密度指数、リンパ球遊走速度は明らかに劣り真の増生は悪い事を示した。これ等の点と高濃度程培養成績が不良であつた等の点で津島の成績と一致する。また全培養で密度係数が成長係数に比して低値であり、これは前述した如く低温による増生抑制の様式と異なり低張稀釈の場合と相通ずる。即ち増生の遅延と言う如き nuance は全く無く真の増生障碍が存する事を物語っている。阪尾・千田³²⁾ は水素イオン濃度と白血球の運動との関係を観察しているが、PH 7.0~7.5 で顆粒分子運動が最も盛んであつたとしている。私の実験に於いてはリンパ球遊走速度は全例対照より劣り高濃度程低値を示し特に 12 時間値が極めて悪く前述の如く真の増生障碍がある事を示している。苛性ソーダ添加実験に於いては更に悪い成績を示し津島の述べる如く高濃度程総ての成績は低値を示した。また津島の実験では $1/500$ N の濃度にてはかなりの増生を認めているが、私の実験にては $1/500$ N に於いては 6 時間で増生を停止しリンパ球遊走機能もほぼ消失して居り脾臓臨床組織培養が一般の培養に比しアルカリの影響を受け易い事を

示唆した。苛性ソーダは塩酸のほぼ培量の稀釈にて実験を行つたが塩酸よりも稍々強く増生の抑制を受けて居りこれは Mendelëeff の成績と一致するが他の諸家の説と合致しない。諸家の培養はカレルびん法または Plasma clot culture を用いており培養術式の違いが斯様な結果を招いたのではないかと考えられ、PH が酸性である VB₁₂ の効果がアルカリにより何らかの抑制を受ける為ではないかと推測される。また教室津島は培地酸性の場合は或る程度遊走能に対する抑制が明らかであつたがアルカリ性の場合には増生の障碍の割合程には遊走は抑制されておらないと述べ、これはアルカリ性の場合の方が障碍が少いとのみは断ぜられずアルカリによる Fibrin 溶解の為抵抗が減少すると言う事も考えに入れねばならないとしているが、液体培地で行つた私の実験では遊走機能の抑制はかなり強く塩酸添加の場合とほぼ同様であつた。次に増生の抑制様式も塩酸添加の場合と同様であり密度係数は成長係数に比し明らかに低値であり、見かけ以上に真の増生が抑制される事を示している。

以上の結果から脾臓臨床組織培養に於いては比較的低温を除き非生理的な物理化学的条件は培養に対し有害であると言う結論に達した。

第 6 章 結 論

1) マウス脾臓臨床組織培養に及ぼす培地滲透圧の影響を観察した。低張の場合は等張稀釈に比較すると比較成長価は大になるが細胞密度は疎でありリンパ球遊走速度には有意の差を認めなかつた。高張の場合は比較成長価、細胞密度指数、リンパ球遊走速度共に正常培養に比し抑制された。

2) マウス脾臓臨床組織培養に及ぼす培養温度の影響を観察し至適温度は 35~37°C であり培養可能範囲は 25~39°C であつた。33, 35°C では変性過程の進行が遅延した。

3) マウス脾臓臨床組織培養に及ぼす培地水素イオン濃度の影響を知る為に各種濃度の塩酸、苛性ソーダを添加して培養した結果、塩酸は $1/100$ N でも増生可能であつたが苛性ソーダは $1/500$ N 以下で培養が可能であつた。 $1/1000$ N 塩酸の比較成長価を除き全例の比較成長価、細胞密度指数、リンパ球遊走速度は何れも対照の生理的食塩水添加例に比し低値を示し、高濃度程顕著であつた。

4) 以上の結果から脾臓臨床組織培養に於いては

比較的低温を除き非生理的な物理化学的条件は増生を抑制乃至は刺戟するがこれは培養にとつて有害である事を知つた。

擧筆するにあたり、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) 小野安三：岡山医学会雑誌，70，11，4025，昭33.
- 2) Loeb, J.: Cited in Journ. exp. Med., 13, 562, 1911.
- 3) Hamburger, H. J.: Physik. chem. Unt. u. Phagozyt., 1911.
- 4) Ruth, E. S.: Journ. exp. Med., 13, 422, 1911.
- 5) Ruth, E. S.: Journ. exp. Med., 13, 559, 1911.
- 6) Carrel, A. & Burrows, M. T.: Journ. exp. Med., 13, 562, 1911.
- 7) Ebeling, A. H.: Journ. exp. Med., 20, 130, 1914.
- 8) Lambert, R. A.: Journ. exp. Med., 19, 398, 1914.
- 9) 速水 猛，田中正：日本病理学会雑誌，2，287，大2.
- 10) 内藤賢次：実験医学雑誌，8，319，大13.
- 11) 津島 充：岡山医学会雑誌，68，8，730，27，昭31.
- 12) 高橋山郎：岡山医学会雑誌，70，9，755，3437，昭33.
- 13) 植本信親：日本病理学会雑誌，18，68，昭3.
- 14) 植本信親：日本微生物学病理学雑誌，23，2357，昭4.
- 15) 植本信親：日本微生物学病理学雑誌，23，2537，昭4.
- 16) 塚本 茂：十全会雑誌，35，571，昭5.
- 17) McCutcheon, M.: Am. Journ. Physiol., 66, 185, 1923.
- 18) Rous, P.: Journ. exp. Med., 18, 183, 1913.
- 19) Fischer, A.: Journ. exp. Med., 34, 447, 1921.
- 20) Rumjantzew, A.: Arch. f. exp. Zellf., 3, 115, 1927.
- 21) Krontowski, A. A.: Arch. f. exp. Zellf., 1, 58, 1925.
- 22) Krontowski, A. A. u. Bronstein, J. A.: Arch. f. exp. Zellf., 3, 32, 1927.
- 23) 太田喜直：日本微生物学病理学雑誌，24，213，昭5.
- 24) 福光廉平：日本微生物学病理学雑誌，23，1945，昭4.
- 25) 福光廉平：日本微生物学病理学雑誌，24，1279，昭5.
- 26) 平井禎三：日本微生物学病理学雑誌，24，1997，昭5.
- 27) 平井禎三：日本微生物学病理学雑誌，25，129，昭6.
- 28) Hogue, M. J.: Journ. exp. Med., 30, 617, 1919.
- 29) Schade, H.: Physik. Chemie in d. inn. Med., 1923.
- 30) 深水重輔：大阪医学会雑誌，28，1573，昭4.
- 31) 小野田外与治：十全会雑誌，37，2796，昭7.
- 32) 阪尾包三郎，千田信行：日本血液学会雑誌，17，217，昭29.
- 33) Lambert, R. A. u. Hanes, F. M.: Virchow's Arch. f. path. Anat.; Physiol. u. f. kl. Med., 221, 89, 1913.
- 34) 根本 衛：Tohoku Journ. exp. Med., 14, 1, 昭4.
- 35) 立花次郎：千葉医学会雑誌，7，175，昭4.
- 36) 大藤真，田村甫，角南宏：東京医事新誌，71，517，昭29.
- 37) 小松周治：日本微生物学病理学雑誌，25，337，昭6.
- 38) 小野醇吉：日本病理学会雑誌，18，92，昭3.
- 39) 小野醇吉：日本外科学会雑誌，29，1210，昭4.
- 40) Jolly, J.: Compt. rend. de la Soc. de Biol., 74, 504, 1913.
- 41) McCutcheon, M.: Am. Journ. Physiol., 66, 180, 1923.
- 42) Commandon, J.: Compt. rend. de la Soc. de Biol., 82, 1305, 1919.
- 43) 杉山繁輝，森喜久男：十全会雑誌，33，1343，昭3.
- 44) 杉山繁輝，森喜久男：日本病理学会雑誌，18，79，昭3.
- 45) 平井禎三：日本微生物学病理学雑誌，24，1719，昭5.

- 46) Mendel'eeff, P.: *Comp. rend. de la Soc. de Biol.*, **88**, 291, 1923.
- 47) 仲田順造: *日新医学*, **22**, 1733, 昭8.
- 48) 仲田順造: *日新医学*, **23**, 49, 昭9.
- 49) 仲田順造: *日新医学*, **24**, 211, 昭10.
- 50) Lewis, M.R. & Felton, L.D.: *Science*, **54**, 636, 1921.
- 51) Lewis, M.R. & Felton, L.D.: *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **33**, 112, 1922.
- 52) 館石叔: *日本医事新報*, 1535, 3756, 昭28.

Studies on the Tissue Culture of Spleen

Part 2. On the Influences of the Physicochemical Conditions of Medium

By

Koichi SHIMAZAKI

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

1) The author observed the influences of osmotic tension upon the clinical tissue culture of mouce's spleen. In the hypotonic medium, although the rate of relative growth was higher than in the isotonic medium, the cell density was lower and in the wandering velocity of lymphocytes no significant difference was shown. In the hypertonic medium the rate of relative growth, the index of cell density and the wandering velocity of lymphocytes were lower than in the normal medium.

2) The author observed the influences of temperature upon the clinical tissue culture of mouce's spleen. The most suitable temperature to culture was from 35°C to 37°C, and the range of temperature in which culture was possible was from 25°C to 39°C. At 33°C and 35°C the progress of degenerative process was delayed.

3) In order to observe the influences of hydrogen ion concentration of media upon the clinical tissue culture of mouce's spleen, the author cultured by adding the various concentration of hydrochloric acid or sodium hydroxide in the medium. In acid medium the growth was possible even by adding 1/100 N hydrochloric acid, and in alkaline medium the culture was possible even by adding less than 1/500 N sodium hydroxide. All the rate of relative growth, the index of cell density and the wandering velocity of lymphocytes, except the rate of relative growth in the medium adding 1/1000 N hydrochloric acid, were lower especially in high concentration of acid or alkali than in the control medium adding physiological salt solution.

4) According to these results in the clinical tissue culture of spleen, except relatively lower temperature, it was shown that unphysiological physicochemical conditions suppressed or stimulated the growth of tissue culture and were harmful to culture.