

Roller tube 法による骨髓組織培養の吟味

第 2 編

鶏胎児圧搾液による影響について

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

菅 野 卓

〔昭和34年1月5日受稿〕

目 次

- I. 緒 言
- II. 実験材料
- III. 実験方法
 - 1. 培養方法
 - 2. 観察方法
- IV. 実験成績

- 1. 鶏胎児圧搾液の濃度による比較
- 2. 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の濃度による比較
- 3. 鶏胎児圧搾液及び鶏胎児第一次稀釈圧搾液の比較
- V. 総括並に考按
- VI. 結 論

I. 緒 言

Harrison⁷⁷⁾ が蛙の神経細胞を培養して培養基の淋巴が凝固性を有する時、特に発育が良好であるのに注目して以来、Burrows⁵⁶⁾、Carrel & Ebeling⁵⁸⁾ 等により凝固血漿の発育に対する作用が研究せられてきた。併し血漿のみでは到底組織の生命を長く維持出来ぬ事は、1913年 Carrel⁵¹⁾ の認めた所であり、彼は血漿は単なる支持体に過ぎずとして、組織の発育促進物質を他より求めんとした。即ち彼は種々の臓器エキスをを用いて鶏胎児 Fibroblasten の発育促進作用を比較し、鶏胎エキスが最も発育促進作用の強い事を証明した。

その後更に Carrel & Ebeling⁵⁸⁾ は鶏胎児エキスを添加する事により Fibroblasten を無制限に増殖培養せしめ得る事を報告している。爾來発育促進物質の探究は、Carrel, Fischer 一派により進められ他の臓器エキス、更に人工栄養液等が研究されつつある。本邦に於ても、石橋、高島⁴⁾、渋谷²⁸⁾、大田⁷⁾、榊原²²⁾、小松²¹⁾、勝木¹⁴⁾、隠明寺⁵⁶⁾、西林²⁰⁾、河島¹⁸⁾、藤井³⁷⁾、宮下⁸⁰⁾ 等多くの学者により種々の臓器エキス即ち、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉、甲状腺、胸腺、副腎、睪丸、卵巢、骨髓エキス、骨髓多糖体等に就いての研究があるが、今日尙胎児エキスが広く使用されている。その性状に関しては、Fischer, Carrel, Baker⁵⁵⁾ 等の物理化学的検索があり、更に最

近その本態に関して Kutsky⁸³⁾、勝田¹⁶⁾、¹⁷⁾ 等の研究がある。

更に鶏胎児圧搾液の濃度に関しては、先に述べた Carrel⁵¹⁾ は Fibroblasten の培養に於て Ringer 氏液で稀釈した鶏胎児エキスは、稀釈せぬものに比して増生の悪い事を報じ、又 Carrel & Ebeling⁶²⁾ は白血球の培養で鶏胎児エキスの濃度は増生面積とは正比例の関係にあるも、或濃度以上では細胞は反つて早く死滅すると云い、Willmer & Jacoby¹⁰⁴⁾ は鶏胎児骨膜及び心臓 Fibroblasten の培養で、種々の濃度の鶏胎児エキスに就いて細胞分裂係数を比較している。又大田⁷⁾、西村⁸⁰⁾ も鶏胎児エキスの種々の濃度を比較検討している。その他 Earle⁶⁶⁾、Scherer¹⁰⁰⁾、Albrink⁴⁴⁾、Gey⁷⁸⁾、⁷⁴⁾ 等も各自の培養に夫々の濃度を使用している。

ローラーチューブ法に於て牛、豚胎児エキスも使用されているが、主として鶏胎児エキスが用いられており、又その濃度に関しては培養目的、及び培養組織により各人種々の濃度を使用している。

私は前編に於てローラーチューブ法による家兔骨髓組織培養に対する数種の塩類溶液につき検討した。本編に於ては、同一培養に対する鶏胎児圧搾液の種類及び濃度について吟味したのでその成績を報告する。

II. 実験材料

- 1. 培養組織

体重 1.3~1.5kg の幼若健常家 兎大腿骨骨髓組織を使用した。

2. 培養管及び短冊型カバーガラス

培養管には長さ150mm, 口径 16mm の硬質ガラス管を使用し, 短冊型カバーガラスには厚さ0.13~0.17 mm, 大きさ12×60mm のものを使用した。

3. 緩衝塩類溶液

Hanks 氏液を用いた。

4. 血 漿

6ヶ月の雄鶏ヘパリン加血漿を用いた。

5. 鶏胎児圧搾液

第1編既述の9日目鶏胎児圧搾液と鶏胎児第一次稀釈圧搾液を使用した。尚この際, 等量加える塩類溶液には Hanks 氏液を用いた。

6. 組織培養液

i 鶏胎児圧搾液の場合には, これを5, 10, 15, 20%の割合に含有する Hanks 氏液を用いた。

ii 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の場合には, これを10, 20, 30, 40%の割合に含有する Hanks 氏液を使用した。

尚何れの場合も penicillin 100u/cc を加え, 1.4%滅菌重曹水で pH を7.6に調整した。

■. 実験方法

1. 培養方法

前編同様に滅菌した短冊型カバーガラス上に組織を植え, 之を培養管内に挿入固定して, 前述の種々の濃度の培養液 2 cc を入れ, 二重ゴム栓を施して回転ドラムに挿入した。

2. 観察方法

前編同様の方法で比較成長価, 偽好酸球遊走速度, 及び偽好酸球顆粒出現率を観察した。

(実験材料並に実験方法は前編で詳述した為, ここでは簡単に記載した。)

IV. 実験成績

1. 鶏胎児圧搾液の濃度による比較

9日目鶏胎児圧搾液を5, 10, 15, 20%の割合に含有する Hanks 氏液で pH を7.6に調整し, 各管に2 cc 入れて培養を行った。

比較成長価 (第1, 2表, 第1図)

No.35に於ては, 24, 48, 72時間と時間が経過するに従い, 5%では夫々5.26, 5.99, 7.12, 10%では6.24, 7.79, 8.80, 15%では6.82, 8.77, 9.87, 20%では8.87, 10.5, 11.63であり, 各時間に於てその濃

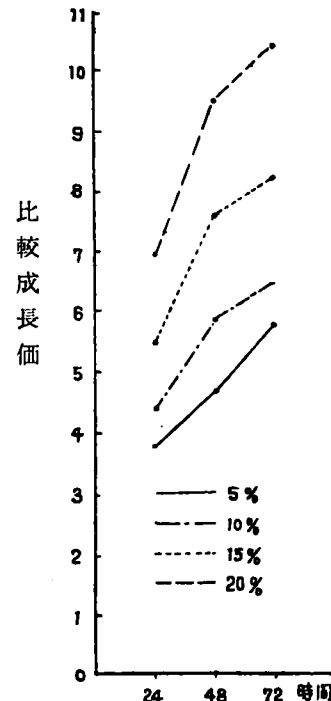
第1表 鶏胎児圧搾液の各濃度に於ける比較成長価

実番 験号	時 間	濃 度			
		5 %	10%	15%	20%
No.35	24	5.26	6.24	6.82	8.87
	48	5.99	7.79	8.77	10.50
	72	7.12	8.80	9.87	11.63
No.37	24	2.0	2.45	3.5	4.43
	48	2.85	3.18	4.66	8.57
	72	3.05	3.36	5.33	9.26
No.42	24	4.06	4.5	6.09	7.34
	48	5.35	6.66	9.33	9.56
	72	7.14	7.25	9.50	10.42

第2表 鶏胎児圧搾液の各濃度に於ける比較成長価 (3例平均)

時 間	濃 度			
	5 %	10%	15%	20%
24	3.77	4.40	5.47	6.88
48	4.73	5.88	7.55	9.54
72	5.77	6.47	8.23	10.44

第1図 鶏胎児圧搾液の各濃度に於ける比較成長価 (3例平均)



度に比例して増大している。No.37, No.42に於ても同様の結果を示している。

72時間以後に於ては, 血漿培地の液化融解を来すものがある。之は原組織の近くの一部分に始まり, 次第に

互に融合して大となり、増生面積は正確に測定出来にくくなる。又液化傾向は濃度に比例して現われる様である。

偽好酸球遊走速度 (第3, 4表)

No.35に於ては、初期には濃度により特に著明な差は認められないが、72時間以後に於ては15%がやや高値を示しており、5%では120時間後に細胞の遊走は見られない。又72時間後に於て、各濃度共24時間値より却つて促進を示している。之は細胞が培養液に順応した為ではないかと考えられる。No.37に於ても、72時間迄は各濃度共大差が見られないが、20%では96時間以後は遊走細胞は認められない。併し10,15%では120時間後も良好な値を示している。No.42に於ては、時間を経過するにつれて遊走速度の低下せるものが、低、高濃度に見られる。之は細胞機能の減退せる事を

第3表 鶏胎児圧搾液の各濃度に於ける偽好酸球遊走速度 (単位 μ/m)

実験号	時間	濃度			
		5%	10%	15%	20%
No.35	24	6.56	8.35	5.06	7.53
	48	9.7	9.24	8.04	7.91
	72	13.5	10.8	11.7	10.8
	96	5.06	7.59	10.4	8.3
	120	0	5.63	6.91	5.43
No.37	24	14.0	7.85	9.46	7.72
	48	9.69	5.7	5.34	5.38
	72	5.70	5.07	4.03	5.11
	96	5.07	4.44	4.43	0
	120	1.9	3.16	3.8	0
No.42	24	7.4	7.5	8.2	8.5
	48	8.15	9.3	12.6	9.6
	72	6.24	8.95	9.5	7.85
	96	0	2.53	7.15	0
	120	0	0	4.03	0

第4表 鶏胎児圧搾液の各濃度に於ける偽好酸球遊走速度 (3例平均) (単位 μ/m)

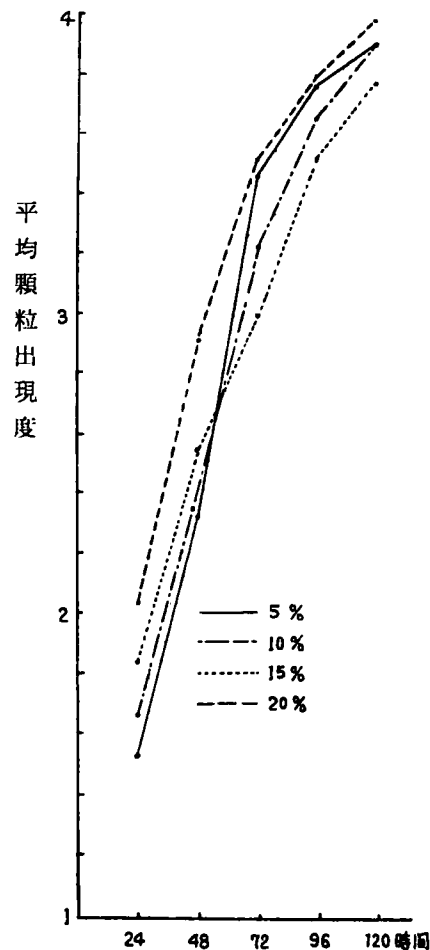
時間	濃度	濃度			
		5%	10%	15%	20%
24		9.32	7.90	7.57	7.92
48		9.18	8.08	8.66	7.63
72		8.48	8.27	8.41	7.92
96		3.38	4.85	7.33	2.80
120		0.6	2.93	4.91	1.81

示し、その濃度は培養液として適当でない。併し15%に於ては、各時間で最良値を示し且つ120時間に到る迄初期のものと余り変らぬ値を保っており、この濃度が適していると考えられる。

偽好酸球顆粒出現率及び平均顆粒出現度 (第5, 6表, 第2図)

偽好酸球顆粒出現率ではNo.35に於ては、24時間後に逆行性顆粒の全く現われないものは5, 10, 15, 20%に於て夫々43.5%, 41.2%, 38.3%, 28.6%であり濃度に反比例しているが、時間を経過するにつれて何れも次第に逆行性顆粒が出現し(+)の方に偏移している。併し15%ではこの変化が最も少い。No.37, No.42に於ても(+)の方に偏移する率は低、高濃度に於て高い。平均顆粒出現度でみるに、No.35では24時間後に5, 10, 15, 20%で夫々1.782, 1.843, 1.784, 1.859であり、5%が最も低値を示すが、48時間後では10%が低値を示し、72時間以後に於ては15%が2.25(72時間), 3.488(96時間), 3.576(120時間)と最

第2図 鶏胎児圧搾液の各濃度に於ける平均顆粒出現度 (3例平均)



第 5 表 鶏胎児圧搾液の各濃度に於ける偽好酸球顆粒出現率及び平均顆粒出現度

実験 番号	濃 度 時間	5 %			10 %			15 %			20 %											
		-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+									
No. 35	24	43.5	34.8	21.7	0	1.782	41.2	42.9	14.3	1.6	1.843	38.3	45	16.7	0	1.784	28.6	57.1	14.3	0	1.859	
	48	27.8	31.5	16.7	24	2.369	33.3	46.7	16.7	3.3	1.900	29.5	39.2	25.4	5.9	2.127	9.9	22	9.9	58.2	3.159	
	72	13.2	39.6	47.2		3.34	7.5	32.5	32.5	27.5	2.8	14.3	46.4	39.3	0	2.25	2.6	10.3	25.6	61.5	3.46	
	96	7.3	14.7	78		3.707	6.9	27.6	65.5		3.586	13.4	24.4	62.2		3.488	3	14.9	82.1		3.791	
	120	2.7	13.5	83.8		3.811	4.6	10.1	86.3		3.847	9.1	24.2	66.7		3.576			100		4.0	
No. 37	24	85.2	14.8	0	0	1.148	73.1	23.1	3.8	0	1.307	65	31.7	3.3	0	1.383	67.6	20.6	11.8	0	1.442	
	48	22.8	33.4	25	18.8	2.398	12.6	37.0	31.8	18.6	2.564	14.3	37.1	31.5	17.1	2.514	16.6	33.4	22.2	27.8	2.612	
	72	14.1	85.9		100	3.859	28.6	71.4			3.714	8.8	11.8	79.4		3.706			4	96	3.96	
	96	100			100	4.0	8.3	91.7			3.917	14.3	85.7			3.857			100		4.0	
	120	100			100	4.0			100		4.0	5.4	94.6			3.946			100		4.0	
No. 42	24	66.6	0	33.4	0	1.668	40.4	45.2	8.0	6.4	1.804	30	10	56	4	2.34	28.9	62.2	8.9		2.8	
	48	34.0	20.4	34.0	11.6	2.232	15.3	29.1	25	30.6	2.759	6.2	24.7	33.3	35.8	2.987	2.8	15.7	61.1	20.4	2.991	
	72	26.3	29.9	43.8		3.175	28.6	29.2	42.2		3.136	2.9	29.4	28	39.7	3.045			31.8	26.4	41.8	3.1
	96	19.5	14.6	65.9		3.564	15.1	25.8	59.1		3.44	28.8	20.2	50.9		3.221	12.5	17.3	70.2		3.577	
	120	12.3	87.7			3.877	13.5	86.5			3.865	21.7	78.3			3.783			4.7	95.3	3.953	

第 6 表 鶏胎児圧搾液の各濃度に於ける偽好酸球顆粒出現率及び平均顆粒出現度 (3例平均)

濃 度 時間	5 %			10 %			15 %			20 %											
	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+									
24	65.1	16.5	18.4	0	1.533	51.6	37.1	8.7	2.6	1.663	34.4	28.9	25.4	1.3	1.836	32.1	35.6	29.4	2.9	2.034	
48	28.2	28.4	25.3	18.1	2.333	20.4	37.6	24.5	17.5	2.408	16.7	33.6	30.1	19.6	2.543	9.8	23.7	31.1	35.4	2.921	
72	13.2	27.9	58.9		3.458	2.5	20.4	30.1	47.0	3.217	14.1	19.7	66.2		3.000	0.9	14.0	18.7	66.4	3.507	
96	8.9	9.8	81.3		3.757	7.3	20.6	72.1		3.646	5.7	28.2	26.4	39.7	3.522			5.2	10.7	84.1	3.789
120	0.9	8.6	90.5		3.896	1.5	7.8	90.9		3.904	3.0	17.1	79.9					1.6	98.4		3.984

も低い。又No.37, No.42に於ても72時間以後は15%が最低値を示している。

出現細胞は24時間後に於ては、殆んど偽好酸球であり、単球、リンパ球も少数見られ、又中心部には幼若細胞も認められる。時間を経過するに従い偽好酸球は扁平となり且膨大化し、又単球は次第に増加する。又48~72時間頃より Fibroblasten が原組織周辺に出現し放射状に拡がり互に突起を出して網を作る。併し培養各時間に於ける出現細胞には鶏胎児圧搾液濃度による差はみとめられなかつた。

以上を小括するに、比較成長価は濃度に正比例して増加するが、偽好酸球遊走速度は初期に於ては濃度により特に著明な差は見られず、96時間以後に於ては15%が最もよく且長期間遊走能力を保持している。更に平均顆粒出現度に於ても72時間以後に於て、15%が最も低く退行性顆粒及び空泡等の出現は少く、細胞は長く美麗な状態を保っている。以上より培養液としての鶏胎児圧搾液の濃度は15%が最適と考えられる。

2. 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の濃度による比較

鶏胎児第一次稀釈圧搾液を10, 20, 30, 40%の割合に含む Hanks 氏液を用い pH を7.6に調整して使用した。

比較成長価 (第7, 8表, 第3図)

No.38, No.39, No.41の各例に於て10, 20, 30, 40

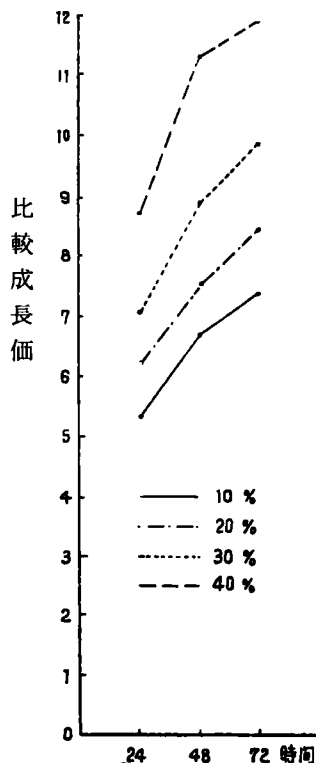
第7表 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の各濃度に於ける比較成長価

実番 験号	濃度 時間	10 %	20 %	30 %	40 %
		No. 24	5.23	6.65	6.87
38	48	7.25	8.01	8.45	10.5
	72	8.05	8.53	9.81	10.63
	No. 24	6.4	7.25	8.82	9.81
39	48	7.54	9.34	11.20	14.15
	72	8.37	9.93	12.0	14.70
	No. 24	4.17	4.7	5.46	7.41
41	48	5.33	6.05	7.05	9.23
	72	5.63	6.73	7.85	10.14

第8表 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の各濃度に於ける比較成長価 (3例平均)

濃度 時間	10 %	20 %	30 %	40 %
24	5.3	6.2	7.05	8.68
48	6.71	7.5	8.90	11.29
72	7.35	8.49	9.89	11.89

第3図 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の各濃度に於ける比較成長価 (3例平均)



%の順に濃度に正比例して大となつている。併し72時間で已に培地が液化するものもあり、又増生帯周辺の細胞は変性が強く破壊されたものも見られ96時間後では増生帯は却つて減少を示すものがあり、増生面積の測定は不確実となる為96時間以後は行わなかつた。

偽好酸球遊走速度 (第9, 10表)

No.38に於ては24時間後には各濃度で大差なく、48時間後では低、高濃度に於て一時的な亢進を見るも次第に或は急速に減少している。併し20%に於ては時間を経過するも相当の遊走能力を保持しており、10%が之に次いでいる。之はその培養液が細胞に適合している為、長くその機能を保持していると考えられる。No.39, No.41に於ても、20%では120時間後迄良好な遊走速度を維持しており、この濃度が培養液として適当である事を示している。

偽好酸球顆粒出現率及び平均顆粒出現度 (第11, 12表, 第4図)

偽好酸球顆粒出現率ではNo.38に於ては、24時間後に10%の濃度にて(一)が70.8%となり、他の濃度に比し最大値を示し、又濃度に反比例して減少している。併し時間を経過するに従い各濃度共退行性顆粒及び空泡のある細胞が増加し、120時間後では20%を除き高度の変性を示す。

第9表 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の各濃度に於ける偽好酸球遊走速度 (単位 μ/m)

実番 験号	濃度 時間	10 %	20 %	30 %	40 %
		No. 38	24	9.8	7.28
	48	14.75	9.18	6.01	14.7
	72	9.74	8.86	3.16	1.9
	96	4.75	8.7	1.58	0
	120	4.12	5.26	0	0
No. 39	24	5.07	4.05	5.57	6.02
	48	6.52	6.96	6.65	6.02
	72	3.24	4.43	2.14	0
	96	0	4.12	0	0
	120	0	3.48	0	0
No. 41	24	9.3	10.01	7.66	6.9
	48	8.16	6.17	8.73	8.48
	72	6.7	5.64	5.06	4.58
	96	5.64	4.59	2.32	2.21
	120	4.27	4.34	1.94	1.42

第10表 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の各濃度に於ける偽好酸球遊走速度 (3例平均) (単位 μ/m)

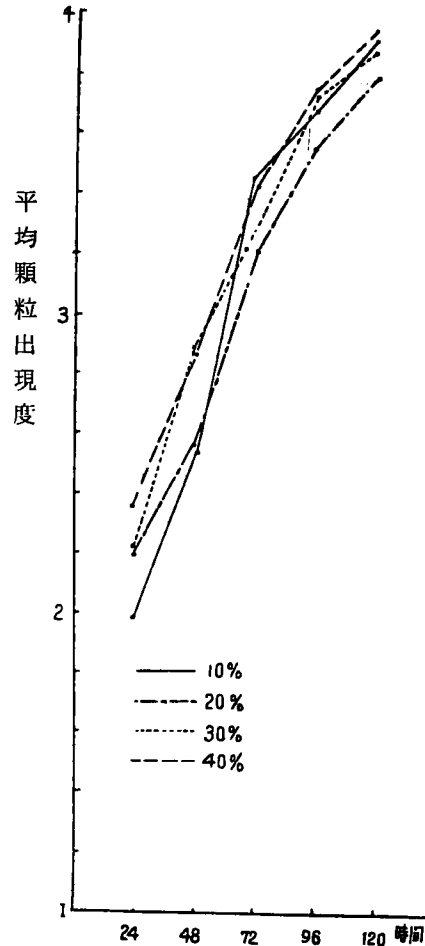
濃度 時間	10 %	20 %	30 %	40 %
24	8.06	7.11	7.22	6.73
48	9.81	7.44	7.13	9.73
72	6.56	6.32	3.46	2.16
96	3.46	5.80	1.30	0.74
120	2.79	4.36	0.65	0.47

平均顆粒出現度で比較するに、No.38に於ては24、48時間後に10%では夫々1.438、1.869と最小値を示し、又濃度に比例して高値を示す。併し72時間以後では20%が3.089 (72時間)、3.456 (96時間)、3.84(120時間)、と最小値を示している。

No.39に於ても略々同様の結果を示し、No.41では48時間以後に於ては20%が最低値を示している。

以上を小括するに、比較成長価は鶏胎児圧搾液と同様に濃度に正比例して増大するが、偽好酸球遊走速度は低濃度に於て長く良好な値を示し、特に20%に於ては各例共に良好な遊走能力を保持しており、この濃度の培養液が細胞に適合していると考えられる。又退行性顆粒出現度も48、72時間以後に於ては、20%が最も少く、細胞が良好な状態に保たれている事を示している。以上より培養液としての鶏胎児第一次稀釈圧搾液の濃度は20%が最適と考えられる。

第4図 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の各濃度に於ける平均顆粒出現度 (3例平均)



3. 鶏胎児圧搾液と鶏胎児第一次稀釈圧搾液との比較

前述の実験結果より鶏胎児圧搾液は15%、鶏胎児第一次稀釈圧搾液では20%が最も優れている。そこでこの両者の優劣を決する為比較検討した。

比較成長価 (第13, 14表, 第5図)

表13, 14, 図5にて明らかな如く各例に於て鶏胎児圧搾液の方が優れている。

偽好酸球遊走速度 (第15, 16表)

24時間後に於ては両者に著明な差を認めないが、72, 120時間後では各例共に鶏胎児圧搾液の方が優れている。

偽好酸球顆粒出現率及び平均顆粒出現度 (第17, 18表, 第6図)

偽好酸球顆粒出現率ではNo.44に於ては、24時間後に鶏胎児圧搾液は (-) が19.5%, (±) が31.7%, (+) が48.8%であり、鶏胎児第一次稀釈圧搾液では (-) が14.3%, (±) が32.2%, (+) が53.5%で

第11表 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の各濃度に於ける偽好酸球顆粒出現率及び平均顆粒出現度

実験 番号	濃 度 時間	10 %			20 %			30 %			40 %			平均顆粒 出現度							
		-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+								
No. 38	24	70.8	14.6	14.6	0	1.438	51	13.2	35.8	0	1.848	46	20.7	33.3	0	1.873	35	0	65	0	2.30
	48	36.8	39.5	23.7	0	1.869	18.2	36.9	44.9	0	2.267	3.8	36.7	29.1	30.4	2.861	10	35	30	25	2.70
	72	15	34.3	50.7		3.357	33.3	24.5	42.2		3.083	30.6	25	44.4		3.138	21.8	26.1	52.1		3.303
	96	8	26	66		3.52	16.9	20.8	62.4		3.456	17.7	82.3			3.823	14	86			3.86
	120			100		4.0	4.8	6.4	88.8		3.84	100				4.0	1.1	98.9			3.989
No. 39	24	22.9	33.3	39.6	4.2	2.251	22.3	41.7	27.7	8.3	2.220	21.7	36.3	42	0	2.203	14.3	28.6	57.1	0	2.428
	48	6.3	41.8	40.6	11.3	2.569	11.6	51.2	25.6	11.6	2.372	13.6	29.6	43.2	13.6	2.568	16.4	23.1	40.5	20	2.641
	72	29.4	20.6	50		3.206	3.4	23.3	40	33.3	3.032	21.6	44.3	34.1		3.125	1.1	16.1	23.2	59.6	3.413
	96	10	20	70		3.600	1.2	10	20	68.8	3.564	4.6	24.5	70.9		3.663	3.2	24.2	72.6		3.694
	120		19.8	80.2		3.802	6.2	21.9	71.9		3.657	3.9	19.2	76.8		3.729	15	85			3.825
No. 41	24	18.2	40.9	40.9	0	2.227	13.0	28.3	54.4	4.3	2.50	6.9	34.5	55.1	24.4	2.553	17.9	30.8	51.3	0	2.334
	48	26.7	33.3	40		3.133	36.8	22.1	41.1		3.043	20	36.7	43.3		3.233	21.2	33.3	45.5		3.243
	72	3.2	16.1	80.7		3.775	10.1	31.2	58.7		3.486	11.2	21.5	67.3		3.561	10.5	23.3	66.2		3.557
	96		12.1	87.9		3.879	38.5	61.5		3.615	35.7	64.3				3.643	3.6	25.0	71.4		3.678
	120		8.4	91.6		3.916	14.7	85.3		3.853	12.3	87.7				3.877	100				4.0

第12表 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の各濃度に於ける偽好酸球顆粒出現率及び平均顆粒出現度 (3例平均)

濃 度 時間	10 %			20 %			30 %			40 %			平均顆粒 出現度								
	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+									
24	37.3	29.6	31.7	1.4	1.972	28.8	27.7	39.3	4.2	2.189	24.7	30.5	43.5	1.3	2.209	22.4	19.8	57.8			2.354
48	14.4	36	32.5	17.1	2.524	9.9	41.7	30.8	17.6	2.561	5.8	28.8	36.3	29.1	2.887	8.8	26.4	34.6	30.2		2.861
72	15.9	23.7	60.4		3.446	1.1	22.2	31.9	44.8	3.202	21.1	30.3	48.6		3.275	0.4	16.1	24.2	59.3		3.424
96	6.0	19.4	74.6		3.666	0.4	6.9	26.4	64.3	3.545	1.6	25.9	72.5		3.709	2.3	21.1	76.6			3.744
120		9.4	90.6		3.906	3.7	14.3	82		3.783	1.3	10.5	88.2		3.869	5.4	94.6				3.938

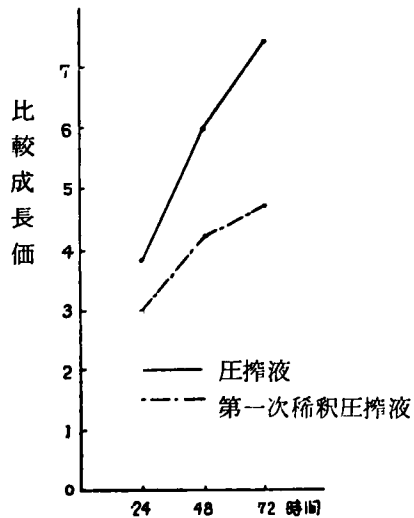
第13表 比較成長価
(鶏胎児圧搾液, 第一次稀釈圧搾液の比較)

実験番号	時間	種類	圧搾液	第一次稀釈圧搾液
No.44	24		4.61	3.7
	48		5.39	4.90
	72		5.5	5.27
No.45	24		4.06	3.24
	28		5.74	4.35
	72		5.85	5.12
No.46	24		3.48	2.21
	48		6.08	3.77
	72		7.42	4.12
No.47	24		3.0	2.9
	48		6.78	3.95
	72		10.7	4.16

第14表 比較成長価 (4例平均)
(鶏胎児圧搾液, 第一次稀釈圧搾液の比較)

時間	種類	圧搾液	第一次稀釈圧搾液
24		3.79	3.01
48		6.0	4.24
72		7.37	4.67

第5図 比較成長価 (4例平均)
(鶏胎児圧搾液, 第一次稀釈圧搾液の比較)



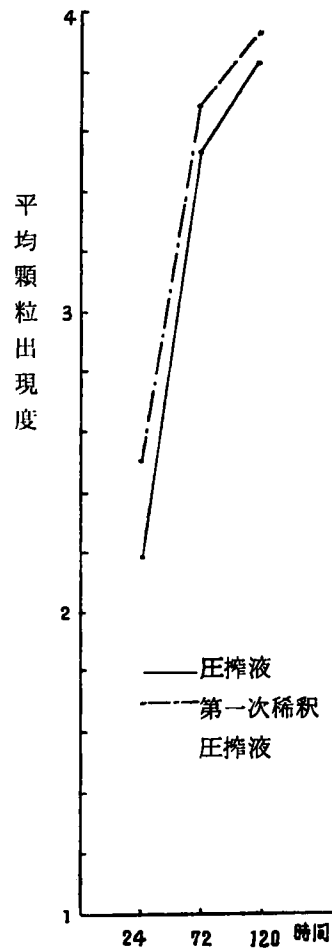
第15表 偽好酸球遊走速度
(鶏胎児圧搾液, 第一次稀釈圧搾液の比較)
(単位 μ/m)

実験番号	時間	種類	圧搾液	第一次稀釈圧搾液	実験番号	時間	種類	圧搾液	第一次稀釈圧搾液
No.44	24		6.33	6.26	No.46	24		6.52	7.2
	72		5.38	5.38		72		5.38	3.42
	120		5.06	2.98		120		4.73	0
No.45	24		8.98	7.97	No.47	24		6.96	3.61
	72		6.54	3.15		72		8.41	5.31
	120		1.26	0		120		4.3	1.27

第16表 偽好酸球遊走速度 (4例平均)
(鶏胎児圧搾液, 第一次稀釈圧搾液の比較)
(単位 μ/m)

時間	種類	圧搾液	第一次稀釈圧搾液
24		7.20	6.26
72		6.43	4.32
120		3.84	1.06

第6図 平均顆粒出現度 (4例平均)
(鶏胎児圧搾液, 第一次稀釈圧搾液の比較)



第 17 表 偽好酸球顆粒出現率及び平均顆粒出現度 (鶏胎児圧搾液, 第一次稀釈圧搾液の比較)

実験番号	種類 時間	圧 搾 液					第 一 次 稀 釈 圧 搾 液				
		-	±	+	++	平均顆粒 出現度	-	±	+	++	平均顆粒 出現度
No.44	24	19.5	31.7	48.8	0	2.293	14.3	32.2	53.5	0	2.392
	72		16	20	64	3.48	1.1	8.8	20.9	69.2	3.582
	120		2.9	9.7	87.4	3.845		1.3	2.6	96.1	3.948
No.45	24	24.2	36.4	36.4	3.0	2.182	11.1	29.8	40.6	18.5	2.665
	72		4.0	12.0	84	3.8		8.6	91.4		3.914
	120			17.9	82.1	3.821				100	4.0
No.46	24	22.6	29	41.9	6.5	2.323	13.8	31.1	20.6	34.5	2.758
	72	2.5	15	30	52.5	3.325		18.8	21.8	59.4	3.406
	120		2.9	14.7	82.4	3.795		2.2	13.4	84.4	3.822
No.47	24	35	40	25	0	1.9	22.2	55.6	22.2	0	2.000
	72	3.6	5.4	23.2	67.8	3.552			16.0	84	3.840
	120			9.6	90.4	3.904			2.0	98	3.98

第 18 表 偽好酸球顆粒出現率及び平均顆粒出現度 (4 例平均)
(鶏胎児圧搾液, 第一次稀釈度圧搾液の比較)

種類 時間	圧 搾 液					第 一 次 稀 釈 圧 搾 液				
	-	±	+	++	平均顆粒 出現度	-	±	+	++	平均顆粒 出現度
24	25.3	34.3	38.0	2.4	2.175	15.4	37.2	34.2	13.2	2.454
72	1.5	10.1	21.3	67.1	3.539	0.3	6.9	16.8	76.0	3.686
120		1.5	13.0	85.5	3.841		0.9	4.5	94.6	3.938

あり後者が(++)の方に偏しており, 48時間以後に於ても同様な傾向を示し, 退行性顆粒出現は鶏胎児第一次稀釈圧搾液に於て強い事が明らかである。平均顆粒出現度で見ると, No.44に於ては, 24, 72, 120時間で鶏胎児圧搾液は夫々2.293 (24時間), 3.48 (72時間), 3.845 (120時間)であり, 鶏胎児第一次稀釈圧搾液では2.392 (24時間), 3.582 (72時間), 3.948 (120時間)であり, 前者が低値を示している。No.45, No.46, No.47に於ても同様の結果を示し鶏胎児圧搾液が優れている。

以上より比較成長価, 偽好酸球遊走速度及び退行性顆粒出現度の各面よりみて, 明らかに15%の鶏胎児圧搾液が優れており, この方が本培養培養液として適している事が明らかである。

V. 総括並に考按

ローラーチューブ法により家兎骨髓組織培養を行い, 培養液としての鶏胎児圧搾液の種類及び濃度による影響を, 比較成長価, 偽好酸球遊走速度及び退行性

顆粒出現状態について観察した。

その実験結果を総括するに

1) 鶏胎児圧搾液の5, 10, 15, 20%を含む培養液で観察するに, 比較成長価はその濃度に正比例して大であり, 偽好酸球遊走速度は初期には著明な差はないが, 96時間以後に於ては15%が良く, 且長期間遊走能を保有している。又退行性顆粒出現状態も初期には低濃度に於て少いが, 48~72時間以後は15%が最低値を示し, 細胞の状態も美麗に保存されている。これ等より鶏胎児圧搾液では15%が最適であると云える。

2) 鶏胎児第一次稀釈圧搾液の10, 20, 30, 40%では, 比較成長価は鶏胎児圧搾液と同様に濃度に正比例して増大する。併し偽好酸球遊走速度は, 20%に於て長く良値を保っており, 退行性顆粒出現も24時間後には10%が少いが, 48~72時間以後に於ては20%が最も少い。之等より, 第一次稀釈圧搾液では, 20%が最適であると考えられる。

3) 15%鶏胎児圧搾液と20%第一次稀釈圧搾液とでは, 比較成長価, 偽好酸球遊走速度及び退行性顆粒出

現の各面に於て、15%の鶏胎児圧搾液が優れている事を示している。

以上より鶏胎児圧搾液の15%を含む培養液が最も適当である。

さて組織培養に於ける発育促進物の研究は古くより行われ、Carrel & Ebeling³⁸⁾、Fischer, Carrel & Baker⁴⁷⁾等により、又本邦に於ても石橋、高島⁴⁾、渋谷²³⁾、大田⁷⁾、榊原²²⁾、小松²¹⁾、西林²⁹⁾、藤井³⁷⁾、宮下³⁹⁾等多くの学者により、胎児エキスの他に脾、肝、腎、筋肉、骨髓エキス、骨髓多糖体等の研究が行われ、更に最近 Kutsky³³⁾、勝田¹⁶⁾、17)等により、鶏胎児エキスの本態に関する研究もありやがて人工的なものも出来るであろうことが期待されている。併し現在未だ胎児エキスに代るべきものは見られず、専ら鶏胎児圧搾液が使用されており、ローラーチューブ法に於ても牛、豚胎児エキスも使用されているが、主として鶏胎児エキスが使用されている現状である。

鶏胎児圧搾液は、1912年 Carrel⁵⁰⁾が結締組織の培養に初めて使用し、次いで1913年⁵¹⁾同一組織に対し6~20日の鶏胎児圧搾液及び成育動物の脾臓、腎臓、筋肉、甲状腺、ラウス型肉腫エキスの影響を調べ、鶏胎児圧搾液が最も優れているが、成鶏脾臓、ラウス型肉腫エキスの作用も、殆んど之と類似して優れていると述べている。又鶏胎児圧搾液の性質として、その発育促進作用は56°Cの加熱により減退し、70°Cでは消失し、又 Berkefeld 濾過器を通す事により減少し、Chamberland 濾過器を通す事により完全に消失すると云う。又清水²⁴⁾は、之を氷室、室温、孵卵器中に放置してその優劣を論じ、氷室保存では48時間迄は作用が殆んど変りないが、その他の場合には、すべて作用は減弱或は消失すると云う。併し村上、蔡⁴⁰⁾は特殊な方法で乾燥することにより、取扱を便利ならしめると共に発育促進作用を長期間保有せしめ得たと述べている。

次に鶏胎児圧搾液の濃度に関しては、Carrel⁵¹⁾、54)はFibroblastenの培養に於て、Ringer氏液で稀釈した鶏胎児圧搾液は、稀釈せぬものに比し増生面積は小であり、5%と50%の鶏胎児圧搾液を含む培養液では組織の生存期間は略々同様であるが、増生面積は明かに後者が大であると云い、又大田⁷⁾は鶏胎児心臓組織をカレル瓶を用いて種々の濃度の鶏胎児圧搾液で培養し、その増生面積を測定して、比較成長価は濃度に正比例して大であると述べ、更に西村³⁰⁾も家鶏白血球を10, 20, 30, 40, 50%の鶏胎児圧搾液で培養して、比較成長価は濃度に正比例して大であり、発育促進作用は濃度に比例すると述べている。

以上の如く鶏胎児圧搾液は濃度を増すに従い、その増生面積を増大せしめるので増生面積のみより考えれば、濃度を100%にしたものが最もよいと思われるが、私の実験に於ては細胞の変性度は必ずしも或濃度以上では之と比例せぬと考えられる。

之に就いて、Carrel & Ebeling⁵⁸⁾は鶏胎児圧搾液の0~80%の濃度でFibroblastenを培養し、0より10%迄の濃度の増加は、10%より80%迄の増加よりも細胞の活性により大きな変化を与える事を認めている。即ち彼等は増生面積は濃度を増すにつれて大となるが、40%の濃度に達した後はそれ以上加えても増大は見られなかつたと述べ、又彼等⁶²⁾は、血液単球を2.5%, 33.3%, 66.6%の濃度の鶏胎児圧搾液で培養し、2.5%の時は細胞の増生少く、1~2代で死滅し、又66.6%では増生は盛んであり細胞密度は最大であるが、短時間に死滅し、33.3%では細胞の状態は良好に保たれる事を認め、結局低濃度よりも高濃度に於ては、細胞密度は大であるが退行性変化は早く現われ、死滅する迄の期間は短いので最適濃度は30%のあたりであると云っている。

又 Willmer & Jacoby¹⁰⁴⁾は、鶏胎児骨膜及び心臓のFibroblastenを培養して鶏胎児圧搾液による影響を検討しており、骨膜Fibroblastenでは培養全体より見れば15%が最適であり、それ以上濃度を増す事により効果は増強されず、又心臓Fibroblastenでは40%のものは15%よりも増生面積は大であるが、細胞分裂係数は15%と大差ないと述べ、更に骨膜Fibroblastenの比較成長価は心臓のそれより著明に大きく、培地の液化は骨膜では20%以上で起り心臓では60%で起り、液化と比較成長価の間に相関々係がある様だと述べている。

勝田⁸¹⁾は鶏胎児心臓Fibroblastenの浮游液培養で4, 8, 12, 16, 20%の濃度で鶏胎児圧搾液の比較を行い、細胞数を算定する事により、1週間後では8%が最良であつたと述べている。

斯くの如く鶏胎児圧搾液の濃度に関し、細胞の分裂及び細胞の状態の良否を含めて論ずる場合には必ずしも濃度に比例せず、又培養組織の種類により、更に培養方法により最適濃度は異つている。即ちGey & Bang⁷⁸⁾はローラーチューブ法によりウイルスの培養に10%を、Schibata¹⁰¹⁾はFibroblastenのカレル瓶培養に30%の鶏胎児圧搾液及び鶏胎児第一次稀釈圧搾液を、Albrink & Wallace⁴⁴⁾は同一培養に20%を、又Young, Ward & Salk¹⁰⁸⁾は急性灰白髄炎ウイルスのローラーチューブ培養に20, 10% (50%鶏

胎児圧搾液)を、山田⁴¹⁾は同一培養に5, 10%を、Rachmilewitz & Rosin^{96) 97)}は家兎骨髓培養の固形培地に14%を最適として加えている。

又 Gey⁷⁴⁾は胎児エキスに就いて、多くの組織培養に推賞出来るのは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%であり、多数の研究家が推賞しているものより幾分低いと報じている。

さて私の実験に於ても、比較成長価は濃度に略々正比例して増大するが、之のみで培養液の適否を論ずる事は適切でなく、この為退行性変化としての顆粒出現及び細胞機能の一面を示す遊走速度をも併せ考え、之等により比較検討した。即ち之等を総合して考えれば、鶏胎児圧搾液は或濃度以上では退行性変化が促進され、変性度が増大する。之は Carrel⁶²⁾の云う如く余りにも増生が密である為かも知れぬが、圧搾液そのものとしても却つて組織に有害になるものと考えられ、又一面高濃度に於ては液化が早期に起るので、血漿の補給を頻回にせねばならず、何れにしても或濃度以上では培養液としては適当でないと考えられる。

又鶏胎児第一次稀釈圧搾液に関しては、Willmer 等¹⁰⁴⁾も培養効果が低いと云っているが、私の実験に於ても鶏胎児圧搾液との比較では明らかに劣り、培養液に用いるには鶏胎児圧搾液の方が優れている。併し場合によつては鶏胎児圧搾液の代用として、鶏胎児第一次稀釈圧搾液を本培養に使用する事は出来る。

VI. 結 論

ローラーチューブ法による、家兎骨髓組織培養に於ける鶏胎児圧搾液及び鶏胎児第一次稀釈圧搾液の各最適濃度を決定し、且両者を比較検討した。

1. 鶏胎児圧搾液では、比較成長価は濃度に正比例して大となるが、15%の濃度に於て、退行性変化は最も少く、又偽好酸球遊走速度も良好であり、且遊走保有期間も最も長く、本培養に於ける培養液としての鶏胎児圧搾液の濃度は15%が最適である。

2. 鶏胎児第一次稀釈圧搾液も鶏胎児圧搾液と略々同様の傾向を示し、比較成長価は濃度に比例して増大するが、20%の濃度に於て偽好酸球遊走速度は良値を示し、退行性変化も少く、鶏胎児第一次稀釈圧搾液の濃度は20%が最適である。

3. 15%鶏胎児圧搾液と20%鶏胎児第一次稀釈圧搾液の比較では、前者が比較成長価、偽好酸球遊走速度及び退行性顆粒出現度の各面に於て優れており、結局家兎骨髓のローラーチューブ培養には、15%の鶏胎児圧搾液を含む培養液が最適と考えられる。

擱筆するに当り終始御懇篤なる御指導御校閲を賜つた恩師平木教授並に大藤助教授に深甚なる謝意を表します。

(本論文の要旨は昭和32年第19回日本血液学会総会に於て発表した。)

(文 献 後 掲)

Studies on the Bone-Marrow Tissue Culture by the Roller-Tube Method.

Part 2. The Effects of Chick-Embryo Extracts on the Tissue Culture.

Takashi Sugano

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

In the rabbit bone-marrow tissue culture by the roller-tube method, the author determined the optimal concentration in the medium of both the chick-embryo extracts and the first diluted solution from the sediment of the chick-embryo from which extracts was taken, and compared the effects of these two solutions on tissue culture.

1. As for the chick-embryo extracts, the relative tissue growth rate increases in a direct proportion to the concentration of the extracts in the medium, and at the concentration of 15 per cent, the wandering velocity of pseudoeosinophils is better, and the duration of wandering capacity is longest as well as the regressive degeneration of cells is least ; and therefore, the chick-embryo extracts at the concentration of 15 per cent is the optimal concentration for the medium of this bone-marrow tissue culture.

2. The first diluted solution from the sediment of the chick-embryo from which extracts taken likewise affects the tissue culture almost in the same way as the chick-embryo extracts ; namely, the relative tissue growth rate increases in a direct proportion to the concentration, and at the concentration of 20 per cent the wandering velocity of pseudoeosinophils is better and also the regressive degeneration is least. Therefore, the optimal concentration in the medium of the first diluted solution from the sediment is at 20 per cent.

3. As for the comparative effects of the 15% chick-embryo extracts against the 20% diluted solution from the sediment, the former surpasses the latter in every respects, namely, in the relative tissue growth rate, the wandering velocity of pseudoeosinophils and the lowness in the appearance of regressively degenerated granules. Consequently it is thought that the 15% chick-embryo extracts is the most suitable culture medium for the rabbit bone-marrow tissue culture by the roller-tube method.
