

組織培養による Bashford's Carcinoma の研究

第 1 編

回転培養に於ける Bashford's Carcinoma の組織増生
様式並びに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)

水 津 昭

〔昭和34年7月15日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒 言	第1節 組織増生の経過並びに増生様式
第2章 実験材料並びに実験方法	第2節 各種培養液組成に於ける増生様式並びに増生度の比較
第1節 実験材料	I) 血清の種類による比較 (家鶏, 家兎, ラッテ)
I) 培養組織	II) 非働化家鶏血清の濃度による比較
II) 血 清	III) 鶏胎圧搾液の濃度による比較
III) 鶏胎圧搾液	IV) その他の培養液に就いて
IV) 人工培養液	第4章 総括並びに考按
第2節 実験方法	第5章 結 論
I) 培養方法	
II) 観察方法	
第3章 実験成績	

第1章 緒 言

組織培養法の研究は Harrison¹⁾ が1907年蛙の淋巴内でその神経線維が成長するのを発見して以来, 多くの先学のためみない努力によつて行われ, 次第に改良を加えられて来た。即ち Maximow²⁾ の double coverslip 法, Carrel³⁾ のカレル瓶法, Maitland-Maitland²⁰⁾ の静置法, Carrel²⁾ により創案され Gey¹¹⁾ によつて実用化された回転培養法等が次々と発表され, 今や組織培養は個々の生きた細胞を体外に取出して直接にその形態並びに機能を観察し得ることにより, 細胞生理の研究に偉大なる寄与をなしつつある。特に最近癌研究に於ける組織培養の応用は目覚ましいものがある。抑々腫瘍組織の体外培養は1910年 Carrel & Burrow¹⁾ が Rous 家鶏肉腫, Jensen ラッテ肉腫等を培養したのに初まり, 相継で人及び動物の癌組織の体外培養特に長期継代培養並びに株化が試みられている。即ち Fischer¹⁰⁾ は Erlich のマウス癌を用いて恒久培養に成功し,

Gey¹²⁾ は人の子宮頸部癌から HeLa 株細胞を樹立した。殊に HeLa 株は Earle²⁰⁾ 等がマウスの正常皮下組織から線維芽細胞の純培養を行つて樹立した L 株細胞と共に, ガラス面で増殖させることが出来, 且つトリプシン処理により均等な細胞浮游液となり得る利点を有するので, この培養株を使つての個々の生きた癌細胞の形態並びに機能の観察や抗癌剤, 抗癌血清の効果判定試験等に目覚ましい成果を挙げつつある。本邦に於ても篠崎³⁸⁾ は被覆法を用いて Brown-Pearce 家兎癌の培養を行い, その組織増生様式, 生体染色, 発育促進物質等の検討を行つている。又勝田はラッテ腹水肝癌細胞の液体培養による吾邦最初の株化に成功し, これを用いて培養液組成の検討を行つている。

本編に於ては長期継代培養に便利で最近専ら用いられている回転培養法により, Bashford 癌の培養を試みた。抑々 Bashford 癌は1907年マウス乳腺に自然発生し, 後に London 王立癌研究会が可移植性固形マウス癌として確立したもので, 本癌の組織

培養に就いては既に1924年に Lumsden¹⁹⁾ が被覆法にて培養を行い紫外線の影響に就いて検討を行つているのに初まり、1931年には Pybus²⁷⁾ が、1932年には Ludford¹⁸⁾ が夫々同方法で培養を行い培養液中の發育促進物質並びに發育抑制物質の検討や組織増生様式、生体染色、出現細胞の形態等の観察を行つている。私は一歩進めて長期の観察に有利な回転培養法を用いて本癌の培養を行い増生様式並びに増生度を観察し、癌細胞の増生に有利な培養条件殊に培養液の組成を検索し、いささか新知見を得たので茲に報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験材料

I) 培養組織： 実験に使用した Bashford 癌は木村³⁶⁾ や和合⁴⁴⁾ の言つているように、比較的容易に移植が可能である固形癌であつて、その癌組織片を得るために凡そ15日毎に雑系マウスへ累代移植を行つた。即ち背部皮下に拇指頭大の固形癌腫瘍を有するマウスを撲殺して腫瘍を摘出し、シャーレ内で鉗にて細切粥状とし、これにリングル氏液を注入混和した後に注射筒内に吸引し、この懸濁液を 0.5 cc づつ体重 8 g 前後のマウスの背部皮下に接種した。多くの場合、移植後約1週間で皮下に比較的境界判然たる小豆大の腫瘤を触れ、漸次腫大しつつ3週間前後で拇指頭大以上に及ぶ境界判然たる腫瘍を形成するに至る。しかしマウスは何れも元気で被毛も光沢を失わず、瘦削することも少い。私の接種成功率は通算して80.6%であつた。培養に当つては移植後2週間前後でやや硬く、潰瘍形成のない中指乃至拇指頭大の腫瘍を有するマウスをその都度撲殺して用いた。腫瘍が拇指頭大以上となり、時日を経過して硬度柔軟或は仮性波動を呈するものは、腫瘍実質細胞の大部分が出血、軟化、壊死を来し囊腫様の状態を呈していることが多く、かかるものは勿論培養には適さない。従つて培養組織片は剖面が淡紅白色半透明の感ある光沢を有する部分を選択することが必要であつてこの選択は腫瘍の採取時期と共に培養成績を左右する大きな因子である。勿論、以上の操作は後述する培養操作と共に絶対無菌的であることが必要である。

II) 血清： 採血に用いる家鶏、家兎、ラッテは予め12~24時間絶食させておく。鶏は雄成鶏の翼静脈より採血し、家兎及びラッテは必臍穿刺によつて採血した、これ等は直に或は血餅収縮をまつて3,000

回転20分間遠心沈澱して血清を分離し、ワ氏試験管に分注、氷室に保存し、1~3日の内に使用した。血清の非働化は 56°C に保つた水槽中で30分間加温する方法を用いた。

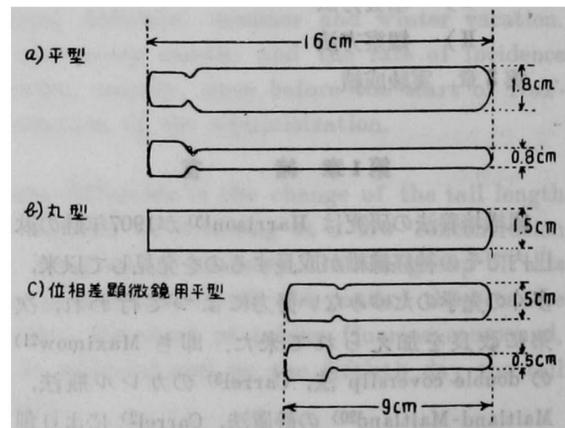
III) 鶏胎搾液： 入卵後 8~9 日目の鶏胎児を塩類溶液（リングル氏液）中に取り出して洗滌し、搾器にかけて粥状としてワ氏試験管に分注し、直ちに或は1昼夜氷室に放置後、遠心沈澱して上澄を1~2日の内に使用した。以下鶏胎搾液を C. E. E. と略称する。

IV) 人工培養液： 市販の人プラズマ並びに T. C. メヂウム No. 199 を用いた。

第2節 実験方法

I) 培養方法： Carrel により創案され Gey によつて実用化された回転培養法を用いた。即ち恒温器内におさめられ5°の傾斜を保つた回転ドラムに培養試験管をはめ込んだままゆつくり回転させる方法で、これにより培養管の内壁に移植された組織片が培養液と空気に一定時間づつ交互に接し得ようになり、培養液の攪拌と細胞の成長に極めて好適となるものである。培養管としては第1図の如き W ゴム

第1図 各種培養管



栓付の長さ 16 cm の平型硬質硝子試験管及び長さ 9 cm の位相差顕微鏡用平型小試験管を用いた。之等培養管やピペット、シャーレ、ワ氏試験管、注射器等のガラス器具は水洗乾燥後クロム硫酸中に1~2時間或は更に24時間浸した後取出し十分に流水中にて洗滌、1昼夜流水中に放置、更に蒸留水で洗つて乾燥後 120°C 2時間乾熱滅菌して用いた。W ゴム栓、メス、ピンセット、鉗等は30分以上煮沸消毒して用い、培養中必要に応じ火焰滅菌も行つた。実験に当つては、摘出した腫瘍組織はシャーレに移して培養室に持ち来り、7%重曹水にて pH 7.6 に調

整せるハンク氏液にて洗滌，これをグレーフエ刀にて凡そ1×1耗に細切し，その組織片を直接培養管壁に1cm間隔で3個移植した．組織片が凡そ30分後やや乾燥してガラス壁に密着した時これに7%重曹水にてpH7.6に調製せる培養液を各々1.5cc注入し，Wゴム栓にて密封し5°に傾斜せる回転ドラムに挿入，1時間12回転，37°Cに保ちつつ培養を行った．培養は各種組成の培地を同時に調整し，1個の腫瘍より撰採採取した培養組織片を用いて同時培養を行った．なお，位相差顕微鏡用平型小試験管には組織片1個を植え培養液は0.3ccを用いた．培養液は途中交換することなくそのままの状態を観察した．

II) 観察方法： 増生細胞の種類や増生帯の様相は，培養第1日目より9日目前後まで順を追って平型培養管を回転ドラムより取出し，37°Cに保つた顕微鏡保温箱内で明視野400×で観察し，観察終れば再び回転ドラム内に納めた．増生面積の測定にはアツペの描画器を用い，培養組織の輪廓を紙面上に24時間毎に描いて行き，後でプランメーターで面積を測定した．又比較成長価は培養後の面積から最初の面積を減じたもの即ち絶対成長価を更に最初の面積で割って算出した．又別に培養管内の細胞核数を培養日数を追って測定し，各培養液に於ける細胞の増生度を比較した．即ち，まず培養管を回転ドラムより取出し，培養液を捨て，リングル氏液で一度軽く洗滌した後，白金耳にて機械的に増生帯及び原組織を剝離し，次いで0.3%のDisodium ethylenediaminetetra acetate (EDTA) 液約5ccを加え，30分間37°Cの恒温槽中に入れてよく振盪して細胞の浮游液とする．次いでこの浮游液を目盛りスピッツグラスに移し，1,000回転5分間遠沈し，細胞沈渣0.5ccを残して上澄を捨て，これに蒸留水1,000cc，枸橼酸21g，クリスタル紫500mg，フォルマリン原液約10滴なる組成の枸橼酸溶液4ccを加えて，再び37°Cの恒温槽中に入れて30分間よく振盪した後，1,000回転10分間遠沈する．次いで残りが正確に1ccとなるように上澄をピペットにて取去る．残つた1ccの液をピペットで静かに且つ十分に攪拌し，均等な細胞浮游液としてBürkerの計算盤に移し，全区劃内の核数を数え，これを9で割って10,000倍し，一培養管当りの細胞核数を算出した．

又位相差用平型小試験管を用いて培養したもので16耗映画撮影(20秒1駒)を行い，細胞増生の様相

を観察した．

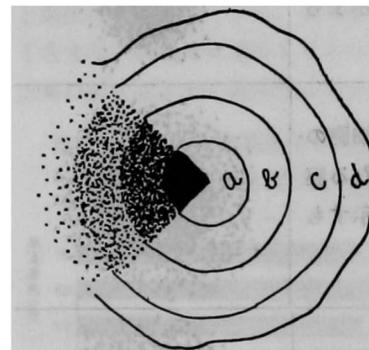
第3章 実験成績

第1節 組織増生の経過並びに増生様式

組織増生様式並びに増生面積は数種の異なる組成の培養液で同時に夫々3回培養し，合計27片の組織片に就いて測定し，それを比較した．

培養経過日数による組織増生の推移を見るに全般的に培養24~48時間では線維芽細胞が原組織周辺より放射状に突出し，組織球が少数遊出しているのが認められる．次いで癌細胞は培養3日目頃より原組織辺縁より突起状，或は膜状，或は網眼状に増生し始め，培養5~6日目に最も強く増生し，7~8日目頃まで増生を続け，それ以後は培養液の交換をしなければ増生を停止して漸次変性に陥入る．以上の如くして完成した組織増生帯は第2図の模型図に示

第2図 増生帯模型図



- a. 原組織
- b. 中心部
- c. 中間部
- d. 周辺部

す如く3つの部分に区別される．即ち原組織に最も近く数層の厚い癌細胞よりなる中心部，一層に広がる癌細胞のシートよりなる中間部，孤立散在せる癌細胞及び少数の線維芽細胞，組織球よりなる周辺部に分たれる．又癌細胞，線維芽細胞，組織球の出現する割合及びその増生度を観察しが結果，増生様式を次の6型に分類し得た(第3図並びに写真1~6)．

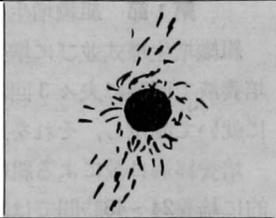
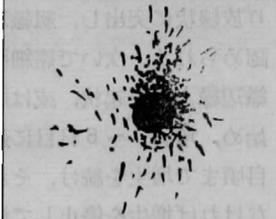
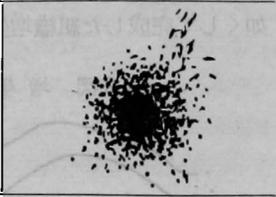
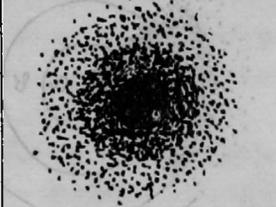
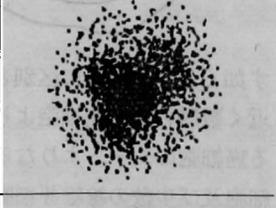
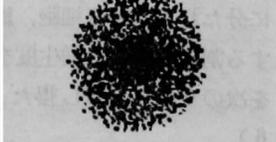
I型： 線維芽細胞及び組織球が散在性に原組織の周囲から發育するのみで腫瘍細胞の増生を見ないもの．

II型： 主として線維芽細胞と組織球が増生し一部に癌細胞を認めるもの．

III型： 主として癌細胞よりなる狭い膜様増生を示し，その間に少数の線維芽細胞と組織球が混在するもの．

IV型： 殆んど癌細胞のみが旺盛なる膜様増生を示すもの．

第3図 増生様式の分類

型	増生様式	
I	繊維芽細胞と組織球のみが増生せるもの。	
II	主として繊維芽細胞と組織球が増生し一部に癌細胞を認めるもの。	
III	主として癌細胞よりなる狭い模様増生を示すもの。	
IV	殆んど癌細胞のみが旺盛なる膜様増生を示すもの。	
V	IV型に似るが中間部増生帯が網状を示すもの。	
VI	主として中心部増生帯のみよりなるもの。	

V型： IV型に似るが、中間部増生帯が網眼状となるもの。

VI型： 主として中心部増生帯よりなるもの。

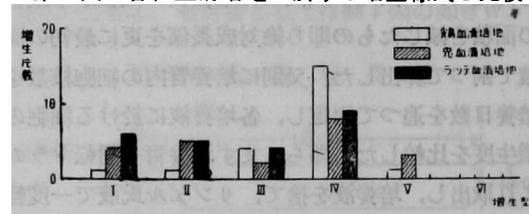
而して以後の培養には殆んど癌細胞のみが旺盛なる増生を示すIV～V型を得る目標とした。又原組織より培養経過時間に従つて遊出増生を示す状況は、別に位相差顕微鏡用平型小試験管にて培養せる組織片を用いて16枚映画に撮影し、その増生の模様を詳細に検討した。これによると原組織周辺にまず現われた繊維芽細胞及び組織球は活潑な胞体の伸縮運動

を行いつつ次第に周辺に向つて移動し、一方中心部増生帯にて著しい分裂増殖を示す癌細胞は溶岩流の如く周辺部の繊維芽細胞、組織球を押し出し、周辺部に向つて移動して行くのが認められた。培養液のpHは培養日数と共に酸性に傾き、それに伴つて培養液の色調も淡黄紅色より黄色に変わる。この変化は細胞増生の旺盛なものほど早く且つ強い。最終pHは6.6前後を示すに至る。一般に癌細胞はpH7.0～7.4の弱アルカリ性の培養液によく増生するがpHに対する適応範囲は比較的広い。培養温度は37°Cが最適であつて、40°Cになると培養初期はよく増生を示すが後急速に変性に陥入る。一般に癌細胞は38°Cを界とし高温よりも低温によく耐え得る。

第2節 各種培養液組成に於ける増生様式並びに増生度の比較

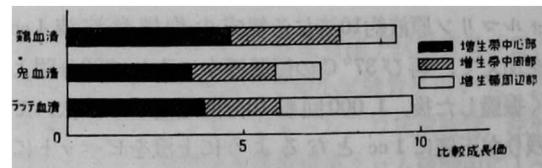
I) 血清の種類による比較： 家鶏、家兎、ラットの非働化しない血清各々30%、バンク氏液65%、CEE 5%の培養液に於ける増生様式を比較するに第4図の如く、家鶏血清培地に於いて最も高率にIV

第4図 各種血清培地に於ける増生様式の比較



型を示し、ラット血清培地では培養短時間にして繊維芽細胞の遊出増生が見られ、且つ癌細胞増生帯中に比較的多く混在しているのが見られた。従つてラット血清培地では逆にI、II、III型を示す率が高かつた。家兎血清培地では増生途中よりV型に近い増生を示すものが比較的が多かつた。又第5図に示す如

第5図 各種血清培地に於ける比較成長価

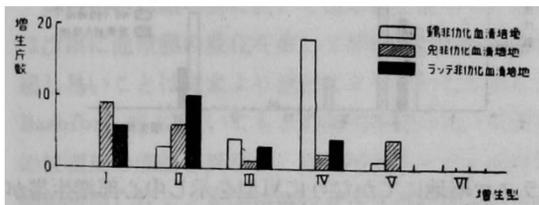


く、IV型及びV型に於ける比較成長価は培養8日目で家兎血清培地がやや劣つて居るが、家鶏血清及びラット血清培地では殆んど大差無かつた。しかしラット血清培地では繊維芽細胞の出現、増生面積が大で周辺部増生帯が広いのに反し、家鶏血清培地では癌細胞のシートよりなる中間部が広かつた。

次に家鶏、家兎、ラット各血清を非働化したもの

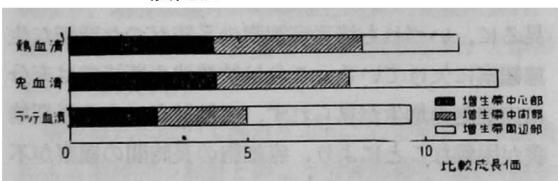
を夫々30%, ハンク氏液65%, CEE 5%なる培養液に於いて増生様式を比較するに、第6図の如く非

第6図 各種非働化血清培地に於ける増生様式の比較



働化家鶏血清培地で圧倒的に高率にIV型及びV型を示し、家兎並にラットの夫れはI型及びII型を示す率が高かつた。この場合も非働化家兎血清培地ではV型に近い増生を示すものが比較的多かつた。又培養8日目に於けるIV型及びV型の比較成長価は第7図の如く各血清のそれと比較してラット血清では殆

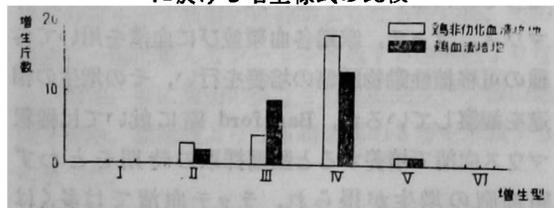
第7図 各種非働化血清培地に於ける比較成長価



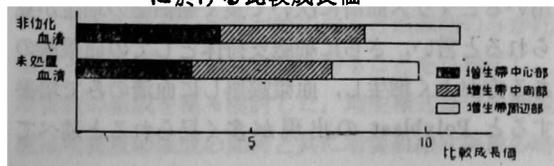
んど同じであるが家鶏及び家兎血清では非働化した培地の方が大なる価を示した。又各非働化培地の間ではラット血清がやや劣り次いで家鶏、家兎血清の順で増生面積が大であつた。しかし非働化ラット及び家兎血清培地では周辺部増生帯が広く、これに反し非働化家鶏血清培地では中間部増生帯が最も広かつた。

次に家鶏血清と非働化家鶏血清培地に於ける増生様式並びに増生度を比較するに、第8図及び第9図

第8図 家鶏血清及び非働化家鶏血清培地に於ける増生様式の比較



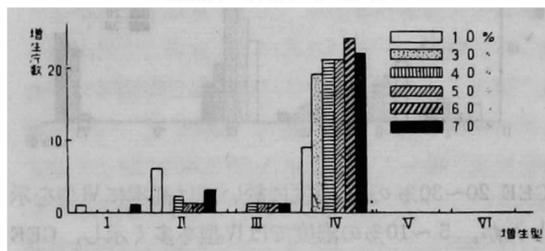
第9図 家鶏血清及び非働化家鶏血清培地に於ける比較成長価



の如く非働化家鶏血清培地の方が常に良くIV型増生を示し、且つ増生面積も大であつた。

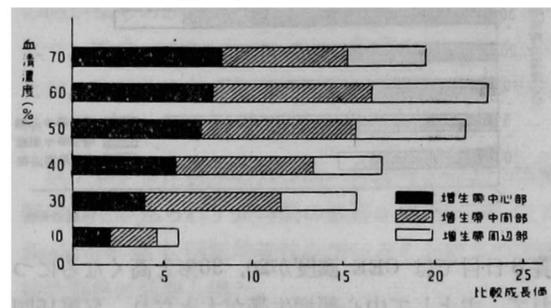
II) 非働化家鶏血清の濃度による比較: CEEを5%に一定して非働化家鶏血清の濃度を種々に交えて培養すると第10図の如く増生様式は血清濃度30~70%の間では濃度差による影響は殆んどなく、い

第10図 非働化家鶏血清の濃度別培地に於ける増生様式の比較 (鶏胎圧搾液5%培地)



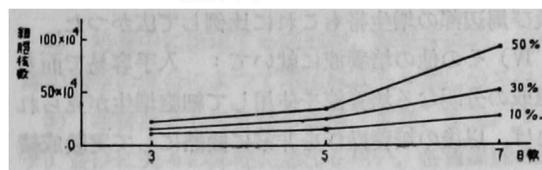
づれもIV型を示した。しかし血清濃度が10%となると増生は極めて悪くなり、II型が増加し、血清を全く含まない培地では増生を示さなかつた。増生面積は第11図に示す如く濃度差による影響が強く、血清

第11図 非働化家鶏血清の濃度別比較成長価 (鶏胎圧搾液5%培地)



濃度が増加するにつれて特に中心部増生帯が広くなり、これに伴つて中間部及び周辺部増生帯も広くなるが、血清濃度70%では中心部に比して中間部及び周辺部の増生帯の巾は狭い。結局血清濃度50~60%, ハンク氏液35~45%, CEE 5%の培養液にて最も大なる増生を示した。又12図の如く培養日数を追つて培養管内の細胞核数を算定し細胞の増生度を比較するに、比較成長価の増大に伴つて細胞核数も増加を

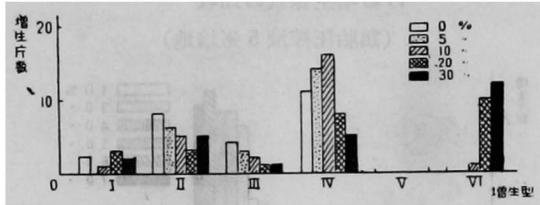
第12図 非働化家鶏血清濃度別培地に於ける核数増加の比較



示し、且つ血清濃度の増加するにつれて細胞核数も増加を示した。

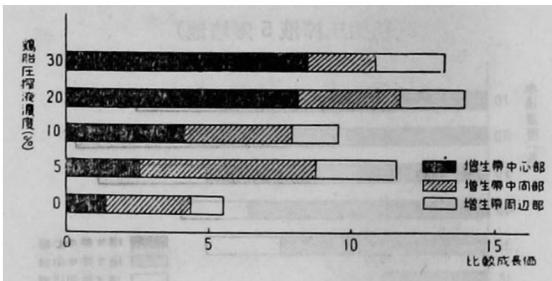
Ⅲ) 鶏胎圧搾液の濃度による比較：次に非働化家鶏血清を30%に一定して CEE の濃度を種々に変えて培養すると、第13図に示す如く、増生様式は

第13図 鶏胎圧搾液の濃度別培地に於ける増生様式の比較 (非働化家鶏血清30%培地)



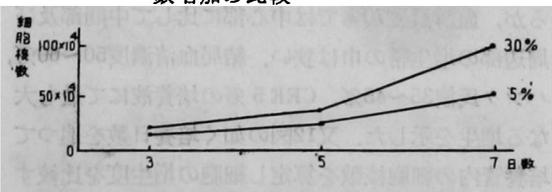
CEE 20~30%の高濃度に於いては高率にVI型を示したが、5~10%の濃度ではIV型を多く示し、CEE を含まない培養液では前述の血清を含まない培養液と異なり、細胞増生は常に見られⅡ~Ⅲ型を示す率が比較的多かつた。次に増生面積は第14図の如く培

第14図 鶏胎圧搾液の濃度別比較成長価 (非働化家鶏血清30%培地)



養8日目では CEE 濃度が20, 30%と高くなるにつれて、主として中心部増生帯が大となり、又第15図

第15図 鶏胎圧搾液濃度別培地に於ける核数増加の比較

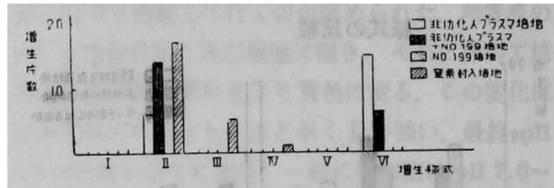


の如く細胞核数も夫れに伴つて増加したが、中間部増生帯は狭くVI型増生に似る。これに反して CEE 濃度5%では中間部増生帯が最も広く、且つ中心部及び周辺部の増生帯もこれに比例して広がった。

Ⅳ) その他の培養液に就いて：入手容易で而も組成の分明なる培養液を使用して細胞増生が見られれば、以後の培養操作を非常に簡略にして実験成績

も統一出来るので人プラズマ, T. C. medium No. 199 を使用して培養を行つたが第16図の如く非働化人プ

第16図 其他の培養液に於ける増生様式の比較



ラズマ培地にてかなりVI型を示し中心部増生帯が広がつたが、他は見るべき増生を示さず T. C. medium No. 199 単独では全く増生を見なかつた。又非働化家鶏血清培地を用いた培養管に窒素を封入して培養を行うに、無酸素状態では原組織周辺に若干の癌細胞が散在性に増生する像を示すにすぎなかつた。

第4章 総括並びに考按

Bashford 癌の組織培養に就いての従来文献を見るに、いずれも培養癌細胞の系統だつた詳細な生態観察に欠けている。これは被覆法や瓶法では十分に癌細胞の増生が見られず、又植継ぎによる長期培養が困難なことから、癌細胞の長時間の観察が不可能であつたためと思われる。茲に Bashford 癌を用いた組織培養に関する二、三の文献を挙げると、先づ Lumsden¹⁸⁾ (1924) が被覆法にて培養を行い、その増生細胞を通じて正常組織と悪性腫瘍組織の増生に於ける紫外線の影響に就いて検討しているの始まり、Pybus²⁷⁾ (1931) は Lumsden と同様な培養法により Bashford 癌の培養を行つて培養条件を検討し、培養材料としては發育途上にある腫瘍組織を使用した方が良好な増生を示し、マウス胎児圧搾液及び睾丸圧搾液の添加が増生に促進的に働き、55°C 30分間加温した培養液の方が増生をより良好ならしめたといつている。又 Ludford¹⁸⁾ (1932) はマウス、ラッテ、家鶏各血漿並びに血清を用いて各種の可移植性動物腫瘍の培養を行い、その増生の相違を観察しているが、Bashford 癌に就いては稀釈マウス血清で培養すると腫瘍採取の時期をとわず癌細胞の増生が得られ、ラッテ血清では多くは Polyblast が出現すると言つている。又家鶏血清を用いるとマウス血清に次いで良く癌細胞の増生が見られると言ひ、さらに細胞支持体としての血漿膜のある方がよく増生し、血漿膜無しに血清のみで培養すると Polyblast の出現が多く見られると述べて

いる。私は従来の短時間の観察より一歩進めて近來長期継代培養に専ら用いられている回転培養法により Bashford 癌の培養を行い、まず最初に常に癌細胞のみが増生を示す如き培養液組成を検討した。

抑々癌の組織培養に於いて血漿膜を使用した場合は次第に血漿膜の液化を来して癌細胞の剝離脱落を起し易いことは従来より諸家により言われて来たが Bashford 癌に就いてもこの事実を認めた。又従来の被覆法の成績と異なり、回転培養法によれば血漿膜を使用しなくとも癌細胞はガラス面に密着して膜状或は網眼状の増生を示すことを認めた。

次に血清の種類による癌細胞、線維芽細胞、組織球の増生度を見るに、私の実験成績ではラッテ血清培地による培養の場合は Ludford の指摘した如く、他の血清培地のそれに比して線維芽細胞の出現時間が速く、且つ増生度も大で形態も大型で紡錘形のものが多かつたが、彼の成績と異なり可成りの癌細胞の増生を見た。これは被覆法による短時間の培養と異なり、培養組織片が培養液と空気に交互にふれ、細胞の増生に極めて好適な回転培養法を用いた事によると思われる。

増生様式に就いて検討するに、この場合も被覆法による短時間の観察と異なり培養組織を培養日数を追つて長時間観察しえた。殊に位相差用小型培養管を用いての16mm映画撮影により従来全く観察出来ていなかった組織増生の様相を眼前に捉えることに成功した。即ち培養初期は原組織周辺に線維芽細胞、組織球が遊出増生し、活潑な胞体の伸縮運動をしながら周辺部へ向つて位置移動を行つているのが認められ、次いで培養2～3日目に至ると原組織周辺の癌細胞は旺盛な分裂を示し溶岩流の如く層をなして周辺部に向つて増生して来る。その結果線維芽細胞、組織球は押し出されて周辺部に散在するようになり、かくして増生組織片は上述した如く原組織周辺で旺盛な分裂を示す数層の癌細胞よりなる中心部、その周辺に一層に並んでシートを形成する癌細胞よりなる中間部、更に周辺部の孤立せる癌細胞及び少数の線維芽細胞、組織球よりなる周辺部の3層を形成するに至つた。

更に癌細胞、線維芽細胞及び組織球の出現する度合及びその増生度を観察することにより増生様式をI～VI型に分類しえたが特に殆んど癌細胞のみが旺盛なる膜様増生を示すIV型を得ることを目標とし、培養液の組成を種々検討した。増生様式並びに増生度は培養液の組成の如何と共に培養組織片採取の時

期及び部位にも相当左右されることが多く、従つて各種培養液に就いての増生様式の比較は、出来得る限り数多く同時培養を認めてその平均値を比較することが必要であつた。実験に使用した培地に就いて見るに最も増生度が大きかつ細胞観察並びに長期継代培養に適する培養液の組成は非働化家鶏血清50～60%、ハンク氏液35～45%、CEE 5%であつた。而して血清を含まない培地では細胞増生が見られず、血清を多少でも加えたものでは、たとえCEE無しでも細胞増生が見られた。この場合血清のどの部分が細胞増生に役立つているかは多くの議論があるが、血清が細胞増生に不可欠のものであることは疑う余地がない。又 Pybus が指摘していると同様に私の実験でも56°C30分間の加温による非働化血清培地は普通血清培地よりも増生度が大きであつた。これは採取直後の血清よりも、氷室に2～3日間放置した血清を使用した方が概して良好な増生を示すことからしても、血清中に含まれる発育抑制因子が56°C30分間の加温操作により破壊されたと見ることが隠当と思われる。

さて培養液は何時如何なる場所でも容易に入手出来、その調製が簡単で大量出来且つ経費も少く組成の明かなものが理想である。私はこの意味で人プラスマ、T.C. medium No. 199 を用いて培養を試みたが、非働化家鶏血清ほどの良好な成績は得られなかつた。

以上要するに従来の被覆法、瓶法等では抑々癌細胞の増生が見られず長時間の観察が困難であつた Bashford 癌も回転培養法を用いることによつて比較的容易に培養し得た。

第5章 結 論

回転培養法により Bashford 癌の培養を行い、培養液組成、増生様式を種々検討し、更に増生の経過を16mm映画に撮影して次の結論を得た。

1) 培養1～2日後原組織周辺よりまず線維芽細胞、組織球の増生並びに遊出を認め、次いで3日目頃より癌細胞の膜様乃至網眼状の増生を来し培養5～6日目まで最もよく増生し、培養7～8日目まで増生を示すが培養液の交換を行なわなければ、それ以後は変性し始める。

2) 培養中に出現する癌細胞、線維芽細胞、組織球の増生の度合によつて増生様式を6型に分ち得た。

3) 培養液として各種の血清(家鶏、家兎、ラッテ)並びに夫々の非働化血清を用い、各種組成の培

養液を検討した結果非働化家鶏血清50~60%, ハンク氏液35~45%, CEE 5%なる培養液で最も良く増生を示した。

つた恩師平木教授並びに角南講師に深甚の謝意を表す。

(本論文の要旨は第17回日本癌学会総会並びに第4回組織培養学会に於いて発表した)

(文献は巻末に一括掲載する)

擧筆するに当り御懇篤なる御指導と御校閲を賜わ

Studies on Bashford's Carcinoma by Tissue Culture

Part 1. Studies on the tissue growth pattern and the composition of the medium in the roller-tube tissue of Bashford's carcinoma.

By

Akira Suizu

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

By means of roller-tube tissue culture of Bashford's carcinoma the author studied the composition of the medium and the tissue growth pattern and also took pictures of the growing tissue by a 16-mm movie camera; and obtained the following results.

1. One to two days after the start of culture fibroblasts and histiocytes grow and wander out from the explant, and then from the third day or thereabout the cancer cells grow like membrane or meshes, growing most actively during the 5th to 6th day of culture. The tissue growth continues up to the 7th-8th day but thereafter cells begin to degenerate unless the medium is replaced with a fresh one.

2. By the degree of the growth of cancer cells, fibroblasts and histiocytes, that appear during the tissue culture, the growth pattern can be divided into six types. Namely, type 1, showing fibroblasts and histiocytes growing out of the explant scatteringly but showing no cancer cell growth;

type 2, showing mainly the growth of fibroblasts and histiocytes and a few cancer cells;

type 3, showing a narrow membranous growth consisted mainly of cancer cells with a few fibroblasts and histiocytes mixed scatteringly among them;

type 4, showing the membranous vigorous growth consisted mainly of practically all cancer cells;

type 5, showing the growth almost identical with that of type 4, except the middle zone of the growth area is of meshworks; and type 6, consisted mainly of the central growth zone.

3. As the result of study on the appropriate combination for the culture medium with the use of various sera (chicken, rabbits and rats) and their inactivated sera, it has been found that the medium composed of 50—60 per cent of inactivated chicken serum, 35—45 per cent of Hank's solution, and 5 per cent of chick embryo extract is the most suitable one for the tissue growth.

水津論文附图

写真1～6. Bashford 癌組織の増生様式 (I型よりVI型を示す) HE 染色 ×100.

