細胞レベルに於ける生体材料の検索

第2報：間葉系株細胞浮遊液の粒度分布ならびに
細胞浮遊液静置時間が細胞数自動計測に
およぼす影響についての検討

永原 国央 兼松 宣武

木村 泰之 柴田 寛一

岐阜歯科大学口腔外科第2講座（主任：柴田寛一教授）

〔受付：昭和57年8月6日〕

Cytotoxic examination of biomaterials by tissue culture 2: Studies on size distribution of cell particles in mesenchymal cell strains using a particle size distribution analyzer

Kuniteru Nagahara, Nobutake Kanematu, Yasuyuki Kimura
and Kan-ichi Shibata

2nd Department of Oral Surgery, Gifu College of Dentistry
(Chief: Prof. Kan-ichi Shibata)

[Accepted for publication: August 6, 1982]

Key words: biomaterial / size distribution / mesenchymal cell / particle size distribution analyzer

Abstract: Recently, biomaterials are being widely used in the clinical field due to progress in their development. In toxic substances of biomaterials (the tissue culture) is profitable parts, and measurement of cell count is necessary. For measurement of cell count, the electric cell counter has been used in our laboratory.

The basic study on measurement of cell count was performed with automatic blood cell counter with a particle size distribution analyzer. The materials were L-cells and V₇₉-cells subcultured within 4-days.

The results obtained are as follows; 1) The distribution of L-cell particles ranged from maximum 3200 μ^3 to minimum 350 μ^3 , mean value 1729.1 μ^3 , and peak value 1000 μ^3 . However, V₇₉-cell particles ranged from maximum 2700 μ^3 to minimum 200 μ^3 , mean value 1365.3 μ^3 and peak value 550 μ^3 . 2) As the cell suspension medium was kept over one minute, cell count numbers decreased due to cell precipitation. Therefore, the cell count should be done within one minute. 3) Error in the cell count increased when the cell number in the medium decreased below 2.0×10^3 cells/ml in the L-cell and 2.0×10^4 cells/ml in the V₇₉-cell.

緒 言

近年, *in vivo* の複雑な反応を単純化した実験系として, 組織培養法はあらゆる分野において発展して来た。それと同時に, 生体臓器のあらゆる細胞が培養されている。

この組織培養法において, 細胞数を測定することは不可欠なもので, また正確さを要求されるものである。

従来から, その方法としていろいろなものが報告されているが^{1,2)}, 最も一般的なものとして, Bürker-Türk 型血球計算板, あるいは, Neubauer 血算板³⁾を用いて細胞数の算定が行なわれている。この方法で, トリパン青とかエリスロシン B⁴⁾, あるいは, エオジン Y⁵⁾を用いることにより, 生細胞を算定することが可能である。しかし, 一検体を測定するために要する時間は多大で, 実験の進行にも影響する。

1956年, Harris⁶⁾は, ニワトリ胚骨格筋線維芽細胞, プタ腎細胞の細胞数の算定に, はじめて電気式細胞数算定器を使用している。それ以後, 自動血球計算器を培養細胞数の算定に用いた報告もいくつかある^{7,8)}。しかし, 細胞の絶対数を測定するには, 視算値との間に差があるようである。

また, 培養細胞は, その発育過程において微妙にその大きさを変化させる。その変化が, 実験結果に重要な影響をおよぼすことも少なくない。しかしながら, この細胞の容積に関する実験および報告は少なく^{9,10)}, その方法にも無理な点があるようである。1981年, 野沢ら¹¹⁾は, ヒト上皮性ならびに非上皮性悪性腫瘍由来株を用い培養日数による細胞容積の経日的変化などを, 東亜医用電子株式会社の粒度分布記録装置 (particle size distribution analyzer: PDA) を使用し測定した報告を行なっている。

そこで, 今回我々も, 生体材料の細胞毒性および遺伝毒性の検索に際して, 細胞数を自動計測を行なうために, 本実験系に頻用されている L 株細胞ならびに V₇₉ 細胞を選び, その容積の粒度分布等, 細胞自動計測を行うための基礎的検討を行い若干の知見を得たので, ここに報告する。

実験材料ならびに方法

1. 電気式細胞算定器

自動血球計数装置 CC-108 (東亜医用電子株式会社製) は, 赤血球および白血球計数用として開発された装置で, 大量の血球を自動的かつ敏速に測定できる装置であり, 一般的に普及しているものである。

CC-108の原理は, 希釈液中に浮遊している血球等の粒体が検出器の細孔を通過する時に生ずる抵抗変化を検出し, この変化に比例した電圧が検出器に発生し, それを増幅して送るようになっている。この抵抗および電圧の変化は検出器を通過する粒体の体積が大きくなるにつれて高くなる。

2. 粒度分布記録装置

培養細胞容積の測定装置として 東亜医用電子株式会社の粒度分布記録装置 (particle size distribution analyzer) PDA-400を用いた。

PDA-400は CC-108と接続することにより, 細胞血球等の粒度分布を測定するために開発されたもので microcomputer による data 演算処理機能, 最大20検体の粒度分布の記憶, 粒度分布曲線の経時変化の測定の監視および記憶などの新技術により, 粒度分布曲線の解析が正確かつ迅速に測定できる装置である¹²⁾。

3. 培養細胞

今回, 我々が用いた細胞は, 現在の数ある株細胞のうち最も歴史の長い C3H 雄マウス皮下組織由来の L 株細胞¹³⁾と, 雄チャイニーズハムスター肺由来の V₇₉ 細胞¹⁴⁾を使用した。

培養細胞の増殖条件をそろえるために10cm プラスティックシャーレに, 通法通り pus way して一定数の細胞をそろえ, 成牛血清を10%の割合いで含有の Eagle の MEM (日水製薬) を用いて, 5% CO₂ 気相のもと37°C で4日間培養した。

4. 測定方法

細胞粒子の大きさを実測値と等しくするために, 10 μ ラテックス粒子を指標とし CC-108の感度調整と PDA-400の full scale を調節し, 粒度分析値を合わせた。

測定に際しては, プラスティックシャーレ内の培養液を捨て, PBS (－) にて2回洗浄した後,

Fig. 1 Size distribution curve and its analysis of L-cells and V₇₉-cells.

0.05% Trypsin+0.02% EDTA により細胞分散を行ない，それを集めて，1000rpm 10分間遠心器にかけ，細胞を沈澱させ，Eagle の MEM 培養液にて希釈し，10回 pipetting して細胞を十分に単離，以下の目的にて測定を行った。

1) L 株細胞，V₇₉ 細胞の粒度分布の状態

count 400から600位において，粒度分布曲線の描記および解析を行いその状態を検索した。

2) 測定の時間的誤差

細胞の浮遊液を調整した直後よりの経過時間に伴う細胞 count 数の変化および粒度分布の変化ならびにその解析を行った。

3) 細胞数による誤差

最初の細胞浮遊液を原液とし，正確に3倍，9倍，27倍，81倍，243倍，729倍とEagleのMEM培養液（血清不含）を用いて希釈し，そのcount数の直線的変化がどこまで正確に続くかという検討を行なった。

結 果

1. L 株細胞，V₇₉ 細胞の状態

L 株細胞の粒度分布 (variation of size distribution) においては，最多粒子体積 (Peak Value : PV) は1000 μ^3 であり，平均粒子体積 (Mean : MEA) は1729.1 μ^3 である。なお，L株細胞浮遊液には最大粒子体積 (Max. Particle : MAP) 3200

Fig. 2 Time course change of count numbers in cell suspension medium (cell count on immediately after=100%)

μ^3 から最小粒子体積 (Min. Particle : MIP) 350 μ^3 までの大きさの細胞が存在するものと思われる。

V₇₉ 細胞の粒度分布においては，PV は550 μ^3 であり，MEA は1365.3 μ^3 である。なお MAP は2700 μ^3 で，MIP は200 μ^3 であった (FIG. 1)。

2. 測定時間による誤差

pipetting 直後から1分後までのcount数はほとんど変化はないが，それ以後は時間の経過とともにcount数は減少している。

この測定に使用したL株細胞のPVは1000 μ^3 で，V₇₉細胞のPVは550 μ^3 であったが，L株細胞の場合はpipetting直後のcount数を100%と

Fig. 3 Time course change of size distribution curve and its analysis (left side is L-cells, right side is V₇₉-cells)

No. 1 : immediately after No. 2 : 15min. after No. 3 : 30min. after

したら、15分後で69%、30分後で37%と減少している。V₇₉細胞の場合は、15分後で95%、30分後で92%と減少しており、減少率はL株細胞の場合よりも少ない。

粒度分布曲線 (size distribution curve) の解析結果において、count 数と同様に両細胞株の、最大粒子体積 (Max. Paitclre : MAP), 分布幅 (Distri Width : DW), 半値幅 (half-Width : H-W), 平均体積 (Mean : MEA), 総体積 (Total Volume : TV), 面積中央値 (Median : MED), 粒子幅中央値 (Midrange : MID), 総面積 (Total Area : TA), 容積比 (Volume : V) も経時的に減少している (FIG. 2, 3)。

3. 細胞数による誤差

Fig. 4 がその結果を示したものであるが、両グラフのBは原液の count 数を3倍から順次希釈した場合の計算値であり、Aは実測値である。

L株細胞の場合は81倍希釈まで直線の変化であり、計算値との誤差は少ない。

V₇₉細胞の場合は3倍希釈まで直線の変化で、それ以後は計算値より離れて行き誤差がひどくな

るのを示している。

また、L株細胞では 2.0×10^3 cells/ml (count 10) 以下、V₇₉細胞では 2.0×10^4 cells/ml (count 100) 以下では解析値に誤差が現れる。

考 察

近年、組織培養法においても自動血球計算装置を用いて細胞数の算定を行うようになって来ている。1956年 Harris⁶⁾の報告によると、細胞数の相対的な値を問題とするような場合には十分使用できるが、細胞数の絶対値という点では問題があるようである。また、1979年野沢ら⁷⁾は、培養細胞に適した測定レンジにすることにより、視算値との誤差を少なくすることができると述べている。

細胞の容積に関する報告としては、1981年野沢ら¹¹⁾は、粒度分布記録装置 (particle size distribution analyzer : PDA) を使用し、その細胞に適した至適 full scale 値をあわせて測定する必要があると述べている。

今回、我々は自動血球計算装置 CC-108に150μの検出器をつけ粒度分布記録装置 PDA-400を使

Fig. 4 Effect of dilution times to cell count numbers in cell suspension medium.
A : actual survey value B : calculation value

用し、 10μ ラテックスを指標として解析の単位および数値を実際値として測定を行い、間葉系の培養細胞株であるL株細胞とV₇₉細胞を使用し、測定に際する基礎的検討を行った。

測定時の細胞数は多いほど粒度分布の解析においては誤差が少なく、L株細胞とV₇₉細胞を比較すると、L株細胞の方が希釈に対しての測定誤差が少ない。その理由は、V₇₉細胞に比べてL株細胞の容積が大きいため、ゴミ等との鑑別が比較的容易であり、ひいては細胞数が少なくても正確に計測出来るものと思われる。

その他で測定に際しての重要な点は、検出器の細孔が最下点よりも約10mm 上方にあるために、pipetting 後すみやかに測定を行わなければ細胞浮遊液中の細胞が沈降するために、count 数が減少して来る。

今回は、比較的大きなL株細胞と小さなV₇₉細胞の2種類の間葉系の培養細胞を使用し、その両者を比較検討した。その結果、細胞の大きさによる測定誤差のちがいが現れたが、大きさのみではなく細胞の性質にも左右されるものでもあるかもしれない。尚、これらの点については今後検討が必要であると思われる。

結 論

今回、我々は組織培養法において通常使用されている間葉系の細胞株である、L株細胞とV₇₉細胞を使用し、東亜医用電子株式会社製の自動血球計数装置CC-108と粒度分布記録装置PDA-400にて、培養細胞の細胞数測定時の誤差を少なくするための基礎的検討を行なった結果、下記の如く結論を得た。

1. L株細胞の場合、最多粒子体積が $1000\mu^3$ で、最大粒子体積 $3200\mu^3$ 、最小粒子体積 $350\mu^3$ であった。V₇₉細胞の場合、最多粒子体積が $550.0\mu^3$ で、最大粒子体積 $2700\mu^3$ 、最小粒子体積 $200\mu^3$ であった。

2. pipetting 後1分以内に測定するか、測定前によくpipettingを行うことが必要である。

3. count 数はL株細胞の場合 $10(2.0 \times 10^3 \text{ cells/ml})$ 以上、V₇₉細胞の場合 $100(2.0 \times 10^4 \text{ cells/ml})$ 以上必要であり、それ以下では解析結果に信頼性が無くなる。

稿を終るにあたり、種々御協力を戴いた東亜医用電子株式会社、第一営業部市場開拓プロジェクト主任、深井久詞氏に深謝いたします。なお、本研究は宮田研究奨励金の援助を受けました。あわせて深謝いたします。

抄録：最近、生体材料は、臨床においてあらゆる部門で使用されている。これら生体材料の為害性を検索するため、組織培養は有益な手段として利用されている。その中でも、細胞株を用いて細胞の増殖を指標に

その為害性を検索する方法があるが、この場合、細胞浮遊液中の多数の細胞数の算定が必要となって来る。

我々は、この細胞数の算定に電気式細胞数算定装置を用いる試みを行っている。今回は、東亜医用株式会社製の自動血球計算装置 CC-108に粒度分布記録装置 PDA-400を接続し、自動血球計算装置を用いて、細胞数の算定を行うための基礎的検討を行った。

継代培養後4日目のL株細胞ならびに V₇₉ 細胞の間葉系の株細胞について検索を行った結果、L株細胞の場合、最多粒子体積1000 μ^3 で、最大3200 μ^3 、最小350 μ^3 までの細胞が存在する。V₇₉細胞の場合は、最多粒子体積550 μ^3 で、最大2700 μ^3 、最小200 μ^3 までの細胞が存在する。また、計測は細胞浮遊液を pipetting 後1分以内に測定することが望ましい、count 数はL株細胞の場合10 (2.0×10^3 cells/ml) 以上、V₇₉細胞の場合100 (2.0×10^4 cells/ml) 以上にしておくことが望ましいという事になった。

文 献

- 1) Packer, L., 妹尾左知丸他監訳：細胞生長の支配因子，細胞生理学実習，初版，p 155-168，朝倉書店，東京，1975.
- 2) 堀田 進，大山昭夫：細胞の増殖度の測定法と生死の判別，組織培養—基本と実際—（木村廉編），初版，p 155-173，永井書店，大阪，1976.
- 3) Wasley, G. D., May, J. W., 山田正篤監訳：細胞数計算，動物組織培養技術，初版，P. 159-160，講談社サイエンティフィック，東京，1974.
- 4) Phillips, H. J., Terryberry, J. E.: Counting actively metabolizing tissue culture cell. Expt. Cell Res. **13** : 341-347, 1957.
- 5) Hanks, J. H., Wallace, J. H.: Determination of cell viability. Proc. Soc. Expt. Biol. and Med. **98** : 188-192, 1958.
- 6) Harris, M.: Growth measurements on monolayer culture with on electric cell counter. Cancer Res. **19** : 1020-1024, 1959.
- 7) 野沢志朗，多田和代，塚崎克己，宇田川康博，鈴木キクエ：自動血球計数装置（CC-108）による培養細胞の測定に関する基礎的検討（第1報），Sysmex Journal, **2** : 46-54, 1979.
- 8) 林 正好，松本英彬，岡田徳弘：細胞数計数装置，組織培養，**7** : 542-545, 1981.
- 9) 黒田行昭：細胞の大きさ測定法，動物組織培養法，初版，P 246-283，共立出版，東京，1974.
- 10) Kugler, R. J., Merchant, D. J.: Growth of tissue cells in suspension. Univ. Michigan Med. Cent. J. **24** : 200-212, 1958.
- 11) 野沢志朗，塚崎克己，宇田川康博，太田博明，栗原操寿，多田和代：培養細胞の容積に関する研究，組織培養，**7** : 28-35, 1981.
- 12) 林 正好，松本英彬，岡田徳弘：粒度分布記録装置 PDA-400 System の紹介，Sysmex Journal. **4** : 3-9, 1981.
- 13) 大野忠夫：L株，組織培養，**6** : 85-91, 1980.
- 14) 黒木登志夫：V₇₉ 細胞，組織培養，**7** : 14-19, 1981.