塗抹標本作成における細胞数の定量的検討

山 本 伸 一 池 田 米 繁

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF SMEAR PREPARATION ON COVER SLIP IN IMMUNOFLOUORESCENT PROCEDURE.

Shinichi YAMAMOTO and Yoneshige IKEDA

Department of Bacteriology
School of Medicine, Tohoku University, Sendai.

〔受付：4月19日，1968年〕

総 括

L細胞の浮遊培養の一定量を取りカバースリップ上へ塗抹し標本を作った場合、標本中の細胞数を計測した結果は、もとの培養中の細胞数の代表値とみなしうるかどうか、さらには、この標本に蛍光抗体染色の操作を施した場合細胞の損失があるかどうか、カバースリップ上のどこの視野でも感染細胞と非感染細胞の分布は同じであるかどうかを検討し、次の結果を得た。

(1) 浮遊細胞をカバースリップへ移した場合、塗抹標本上の細胞の計測値は母集団の浮遊培養の代表値とみなし得る。

(2) 蛍光抗体法で用いられる固定、洗滌などの操作を行なっても有意の細胞数の減少はきたさない。

(3) カバースリップ上においては感染細胞と非感染細胞の分布の比率はどの視野でも同率である。

序 文

浮遊状態で培養した細胞の一定量を塗抹標本とした場合、はたして定量的に細胞をスライドガラスの面上に移しかえ、浮遊培養状態の細胞集団の代表として検索し得るか否かはわれわれの長い間の疑問であつた。例えば浮遊状態のL細胞に Vesicular stomatitis virus (VSV) を感染させ、一定量の細胞を含む浮遊液をカバースリップへ塗抹し、蛍光抗体染色を行なつて観察するという日常の作業において、固定、洗滌等の操作の際に、選択的にある特定の一部の細胞が脱落するようであれば、最終

的にウイルス感染の割合を求めても意味がない。そこで VSV 感染L細胞について、細胞の遠心、再浮遊から始めて最後の蛍光抗体染色（直接法および補体法）を施す迄、数え得る総細胞数を指標に塗抹標本を作製するという技術の定量的な検討を行なつた。

材料と方法

1) 非感染L細胞：浮遊培養L細胞は、京大ウイルス研多村憲博士から分与されたもので、同氏の方法により当教室で浮遊状態で継代培養したものである。培養液としては0.1%の Yeast extract, 0.5%の Lactalbumin hydrolysate を含む Earle's solution (YLE) に牛血清 10%, ペニシリン 100 u/ml, ストレプトマイシン 100 µg/ml. を加えたものである。細胞は三角コルベンに入れてマグネチックスターラーで攪拌培養し、培養液の添加により 20 万～100 万/ml の濃度に保つた。

2) ウイルスおよび感染L細胞：使用したウイルスは Vesicular stomatitis virus (VSV) のインディアナ株をニワトリ胎児繊維芽細胞で継代したもので、同細胞に対する感染価は $10^{7.8}$ PFU/ml. である。これを YLE に 2% 加熱馬血清を加えた維持液 (MS) で希釈し細胞当り 1 PFU で感染させる。感染細胞は、VSV 感染 4 時間のもので、この時期では細胞の破壊はまだみられないが、ウイルス抗原は蛍光抗体法で充分確認できる。

3) カバースリップ (図1)：われわれが蛍光抗体法で常用 (石田ら, 1961; 石田ら, 1962) している 6 mm × 36 mm のカバースリップの一端を焼いて曲げ、中性洗剤で 30 分煮沸し、流水で 12 時間洗滌、アルコールで 2 回洗滌、最後にアセトンで洗滌乾燥した。細胞を塗抹

図1 タバースリップ

できる有効面積は $(6 \times 33) \text{ mm}^2$ であり、図1 (b) のごとく塗抹した。

4) 細胞数の計測：浮遊状態の細胞数計測には Bürker-Türk 血球計算板を用い、カバーズリップに塗抹後の計測にはオリンパス EH 型顕微鏡の対物レンズ40倍接眼レンズ10倍を用いた。蛍光抗原の観察には、パーマレー工業製光源 (AHL 250) およびフィルターと普通の光学顕微鏡であるオリンパス FDET_r 型を使用、細胞数計測にも対物レンズ40倍、接眼レンズ10倍を用いた。

5) 蛍光抗体： 5×10^7 PFU の VSV を4週間の間に8回静注して兎を免疫して抗血清を作り、すでに記載(石田ら, 1961)している方法にしたがつて蛍光抗体を作製した。F/P 比は 4×10^{-3} で、染色には10倍で使用した。また固定にはわれわれが現在常用し蛍光抗体での染色性に影響を与えず、しかも特異性が失なわれないという四塩化炭素固定、室温40分を用いた。

成 績

I) 浮遊細胞数の計測：きれいな塗抹標本および蛍光抗体染色標本を得るためには、培養液を遠心により除く必要がある。したがってまず、非感染L細胞を卓上遠心器で2,500 rpm. 3分間遠心して、0.01 M, pH 7.2 の Phosphate buffered saline (PBS) で再浮遊し、遠心前後の細胞数を検討した。

(a) 浮遊培養中の細胞数計測：約100 ml の非感染L細胞(細胞数約 $8 \times 10^5/\text{ml}$)をよく攪拌しながら、その中間層からすばやく1 ml づつを1 ml のピペットで3本の試験管にとり、各試験管毎に毛細管で2回のサンプリングを行ない、それぞれについて5回計測した。

(b) 浮遊細胞の遠心後の細胞数計測：(a)と同様に細胞を目盛付スピッツグラスへ1 ml づつ3本に分注し、それぞれの浮遊液を上述の方法で遠心した後、上清を捨

表1 非感染L細胞の遠心前と後の細胞数

試験管番号	1		2		3		平均細胞数	標準偏差
サンプリング回数	I	II	I	II	I	II		
資料	78	79	80	86	88	96	86*	±9
	85	94	90	77	84	76		
	95	88	81	91	94	91		
	93	95	88	85	83	58		
	98	92	91	91	70	77		
遠心後	94	94	95	73	75	92	83	±8
	72	79	90	98	84	76		
	84	80	83	89	89	91		
	64	88	82	94	89	70		
	69	72	81	71	84	80		

*単位： 10^4 個/ml.

表2 VSV 感染L細胞の遠心前と後の細胞数

試験管番号	1		2		3		平均細胞数	標準偏差
サンプリング回数	I	II	I	II	I	II		
資料	54	45	51	55	55	57	56*	±6
	65	51	61	53	56	55		
	56	51	58	53	56	62		
	76	63	49	59	57	50		
	52	53	72	55	68	48		
遠心後	47	61	62	47	60	50	54	±5
	47	53	49	59	57	45		
	55	52	55	54	52	57		
	51	60	56	55	56	56		
	45	47	52	61	48	66		
	49	45	63	60	59	49		
	64	53	53	59	49	54		

*単位： 10^4 個/ml.

て、沈渣に PBS を遠心前と同量迄正確に加え良く攪拌してから計測した。その結果は表1に示したように上記遠心条件では、細胞数の減少は認められず、また標準偏差も比較的小さい。

(c) VSV 感染L細胞についての検討：細胞培養液を MS に変え、細胞数を任意の濃度に調整してウイルスの接種を行ない、その4時間後に (a) および (b) と全く同様にして遠心前後の細胞数を検討した。表2により明らかなごとく、感染細胞においても、洗浄前後の細胞の減少は認められなかった。

II) 塗抹標本の細胞分布：上記操作で洗浄、再浮遊した非感染L細胞を良く攪拌し、0.1 ml のピペットを用

いて、0.05 ml をすばやく、しかも正確に図1に示すカバースリップへ滴下して均等に塗抹し、37°C、90分保ち完全に乾燥させた。この際絶対動かさずしかも水平に保って乾燥させる事が大切である。また塗抹の際にはピペット先端の目盛は用いない。以上のような注意を守る限り、次のような実験結果が得られた。図1のカバースリップを前述の倍率の顕微鏡で調べると、長軸には72視野、短軸には13視野存在した。細胞数計測の際には視野同志が重ならないように注意するのはもちろんである。計測には3枚のカバースリップを用い、その平均値を計測値とした。

(a) 長軸方向の細胞分布：図1に示すようにカバースリップのa端よりb端に向って任意の間隔をおいて適当な長軸部位を選び、短軸全視野(13視野)の細胞数を各々計測、長軸に沿つての細胞分布の状態を検討した。その結果は図2により明らかなごとく、a端より6

図2 長軸方向の細胞分布

* 短軸全視野の細胞数合計

視野目から短軸全視野の細胞数の合計はほぼ同じと考えられる。ゆえに、末端から5視野までを除けば、長軸に沿つての細胞分布は均一であると考えられる。

(b) 短軸方向の細胞分布：短軸の分布は、辺縁部と中心部とは著しい差が認められた。辺縁から他側の辺縁までの各13視野について、長軸方向にほぼ均等に分布していると考えられる部分の長軸a端から第10、20、30、40、50、60視野目の細胞数を短軸のそれぞれの視野番号について順次合計したのが図3である。これより、短軸においては中央部を中心として辺縁へ向って減少する漸減型の分布を示している。以上(a)と(b)の結果から短軸に沿つての細胞数の変動は大きい、長軸方向にはほぼ均一の分布を示すことがわかった。

III) 細胞数の推定：ここで得られた細胞分布から塗抹標本上の全細胞数を推定した。まずこのカバースリップの細胞塗抹面積は(33×6) mm²である。使用した顕微鏡1視野の直径は、実測してみると9/20 mmとなるので、1視野の面積は(9/40)²π mm²である。次に1視野

図3 短軸方向の細胞分布

* 長軸6視野の細胞数合計

あたりの細胞の平均数を計算した。図2のごとく末端から6視野目より中央に向って長軸方向には、細胞はほとんど均等に分布しているので、この部分の平均数を計算するために、a端から長軸に沿って第6、8、10、20、30、40、50、60視野目における短軸全視野の細胞数をそれぞれ計測し、これを総計して視野数で割る。これを3枚のカバースリップについて行ない、1視野の平均細胞数を計算すると32.9個となる。この計算では、図3における短軸方向の各視野の分布も平均されたことになる。さて、長軸の末端aから5視野目までの合計した細胞数は直線的に増加しているし、b端での分布も同じと考えられるので、両端5視野目迄の細胞数を合計すれば、カバースリップ中央部の長軸5視野と短軸13視野に分布する総細胞数と同じとなる。したがってカバースリップ上の総細胞数は、長軸全体の長さ33 mmから5視野分の長さ、すなわち(9/20×5) mmを除いた面積に存在する理論的視野数に1視野平均の細胞数32.9個を乗ずることにより算出される。すなわち33 mmから(9/20×5) mmを引いた部分に存在する理論的視野数は6×(33-9/20×5)÷(9/40)πであるから、これに32.9を乗ずればよい。すなわちカバースリップ上の総細胞数は38,185個となる。ところで実際にカバースリップへ塗抹した細胞数は表1の遠心後の細胞の0.05 mlで、表1の平均数から計算すると41,367個となる。この数と先に計算で得られた細胞数を比較すると、カバースリップ上では7.7%の減少となつている。しかし実際の細胞数の計測(表1)からこの減少率は有意のものでなく、浮遊状態の細胞をカバースリップ上へ定量的に移し得たといひ得る。

IV) 固定および蛍光抗体染色の細胞数におよぼす影響：次にわれわれが日常行なっている固定および蛍光抗体染色操作中の細胞脱落の有無について検討した。このため上記非感染L細胞塗抹標本を37°Cで90分間完全に乾燥させた後、

1) 四塩化炭素で室温30分固定し、その前後の細胞

数を計測した。次に

2) PBS をカバースリップ全面がひたるように滴下し、37°C、30分間湿潤状態で放置後PBSで10分間マグネチックスターラーを用いて洗滌し細胞数を計測した。(これは蛍光抗体染色直接法に相当する)

3) さらに2)と同操作を繰り返し、細胞数を計測する。(これは蛍光抗体染色間接法または補体法に相当する)。以上の操作をカバースリップ3枚について行ない、長軸 a 端から第10、20、30、40、50、60視野目の6縦列の各短軸全視野の細胞数を合計し、1縦列の平均値を比較したのが図4である。この結果、四塩化炭素30分

図4 非感染細胞における固定前後および蛍光染色操作による細胞数の変動

図5 VSV 感染細胞における固定前後および蛍光染色操作による細胞数の変動

固定によっても、直接法および間接法の蛍光抗体染色の時と同じ操作を行なった場合にも細胞の脱落による細胞数の変動はなかった。

次に VSV 感染細胞について固定および蛍光抗体染色操作中に細胞が脱落するかどうかを検討したのが図5である。これより感染細胞についても非感染細胞と全く同じことがいえる。

V) カバースリップ上の感染および非感染細胞の分布：前述の結果、固定および蛍光抗体染色操作中には感染細胞も非感染細胞も脱落しないことが明らかとなつ

表3 カバースリップ上の感染細胞の分布

短軸視野番号		長軸視野番号					
		10	20	30	40	50	60
短軸視野番号	4	67/209 (32.1)	87/221 (39.4)	75/214 (35.0)	80/229 (34.9)	73/214 (34.1)	77/220 (35.0)
	7	87/252 (34.5)	96/280 (34.3)	90/252 (35.7)	87/254 (34.3)	99/292 (33.9)	94/277 (33.9)
	10	73/212 (34.4)	79/231 (34.2)	78/230 (33.9)	78/229 (34.1)	88/247 (35.6)	108/316 (34.2)

感染細胞数(個)/全細胞数(個)

カッコ内は感染細胞の%

た。しかしカバースリップ上において、これら感染細胞と非感染細胞の分布が各視野でまちまちであれば、ある視野の数値を全体の代表値として表現することはできない。そこで無作為にある視野を抽出し感染細胞と非感染細胞の割合を検討した。すなわち長軸 a 端から第10、20、30、40、50、60視野目の短軸方向第4、7、10視野目を選んで6枚のカバースリップ上の感染および非感染細胞の割合を計測したのが表3である。この結果から細胞数の安定しているカバースリップの中心部を選び、ある程度の細胞を数えればこれを全体の感染・非感染細胞の割合の代表値としてもよいといえる。

考 察

一般にウイルスの増殖過程や抗原合成の過程を追跡したり、infectious center の定量的解析、生化学的実験、さらには薬剤の作用等に関する実験を行なう場合、均一な感染系を得る必要があるのはいうまでもない。この意味で浮遊細胞培養の系を用いるのが理想的といえよう。この際、細胞の数を数えたり、特に感染細胞数を定量的に知ることがしばしば必要になる。浮遊状態にある細胞を血球計算板で数え、単位体積当りの細胞数を知ることとは比較的容易なことである。一方 monolayer culture の細胞数を知るためには、一度それを浮遊状態にして数えるのが普通であるが、この方法では相当の細胞の損失のあることが知られている。それゆえにカバースリップ上の monolayer culture をそのまま直接数える試みもなされている(Gorsky, 1967)。また逆に浮遊状態にある細胞の一定量を取り、塗抹標本とした場合に、全部の細胞を損失なくスライドガラスあるいはカバースリップ上へ移しうるかどう、また塗抹された細胞の一部を数えることによつて、もとの浮遊細胞の母集団となし得るかどうかについても疑問がある。われわれはこの点を明らかにするために実験を行なった。さらにこの標本に蛍光抗体染色などの手技を施す場合、固定および2~3回の洗滌という操作が入る。この途中の過程での細胞の脱落の可能性についても定量的に検討する必要がある。まず浮遊

状態の細胞数と、細胞を洗う目的で 2,500 rpm. 3 分間遠心しふたたび元量にもどして再浮遊させた細胞数を比較したが、この操作によつては細胞数の減少は認められない。次にこれをカバースリップ上に塗抹した場合、浮遊細胞の損失なく移しうるかどうかを検討した。われわれの条件は、6×33 mm のカバースリップの上に浮遊細胞を 0.05 ml のせ絶対動かすことなく水平に保ち 90 分放置して完全に乾燥させた。こうして細胞数を計測すると、カバースリップの短軸方向では中心部に頂点を有する対称的な細胞分布を示し、長軸方向では末端より 5 視野目までを除き均等な分布を示した。ついでカバースリップ上の総細胞数と塗抹した浮遊細胞数を比較すると、有意の損失なく全部の細胞がカバースリップ上に移されることがわかった。このことは、浮遊状態にある細胞は実験的に 100 % カバースリップ上に移しかえられ、その細胞数はもとの浮遊細胞母集団の代表と見なし得るということである。さらにわれわれが現在行なっている四塩化炭素固定および蛍光抗体染色の過程においても非分裂期、分裂期の如何にかかわらず有意の細胞脱落を認めなかつた。また感染細胞と非感染細胞の割合は、カバースリップ上のどの視野をとつても同じで感染細胞は平等に分布している。したがつてわれわれの方法にしたがう限り浮遊細胞にウイルスを感染させ、これを塗抹し蛍光抗体染色を施せば正確にどれ程の細胞が感染しているかを知ることができる。これは蛍光抗体法に限らず、浮遊細胞を塗抹して各種染色を施し、それを観察してこれの浮遊培養中の事象を推定する定量的な実験に広く応用されるものと考えらる。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲をた

まわつた石田名香雄教授に深甚の謝意を捧げるとともに、つねに御指導、御協力をいただいた本間守男博士、宮本勉博士、戸沢秀樹博士、葉田野玲博士に感謝致します。また実験の補助をしていただいた小林ヒロ子嬢に感謝致します。

Summary

Propriety of immunofluorescent procedures for the cells on a cover slip obtained from the VSV infected L cells in suspension was examined in qualitative and quantitative manner.

The cell number could be quantitatively recovered from the whole cover slip when transferred from the mother culture. The fixation, staining and washing procedures as used routinely in immunofluorescent study had no influence on cell number of the cover slip. Although the distribution of cell number varied from one microscopic field to another, there was no difference in proportion of the infected to the uninfected cells by means of the immunofluorescent staining.

These observations may give a warrant for the usual cover slip method, where only a portion of the cells in the mother culture is to be examined, that the cell population on the whole cover slip can be a representative of the mother culture.

文 献

- 1) 石田名香雄, 日沼頼夫, 太田玲(1961): 蛍光抗体法の実際(I)—補体法を中心として—, 臨床病理, 9, 470-475.
- 2) 石田名香雄, 日沼頼夫, 宮本勉(1962): 蛍光抗体法の実際(II)—補体法を中心として—, 臨床病理, 10, 60-66.
- 3) Gorsky, B. T. (1967): A method for counting cells in monolayer tissue culture, Vop. Virus., No. 1, 107-110,