- 日本細菌学会雑誌, **10**(1), 88-89, 1955(Jan.).
- 2) KATO, S., HAGIWARA, K., and KAMAHORA, J. : The mechanism of the growth of ectromelia virus propagated in the ascites tumor cells. I. Study on the inclusion bodies of ectromelia virus. Med. J. Osaka Univ., **6**(1), 39-50, 1955 (March).
 - 3) 萩原喜一：悪性腫瘍を宿主とする ectromelia virus の封入体に関する研究, ウイルス **5**(2), 111-118, 1955 (June).
 - 4) 萩原喜一：腹水癌細胞を宿主とするエクトロメリア・ウイルスの増殖周期に関する研究, ウイルス, **6**(1), 23-40, 1956 (Feb.).
 - 5) 萩原喜一, 亀山達：エクトロメリア・ウイルス感染 sarcoma 180 腹水細胞の形態的観察, 大阪医学会, 1956年3月22日.
 - 6) 古沢英一, 稲森啓三, 萩原喜一：エールリッヒ腹水癌の孵化雞卵漿尿膜への移植実験, 日本病理学会会誌 (地方会号), **43**, 109-110, 1954.
 - 7) 萩原喜一, 亀山達, 豊島久真男：肝細胞に於けるエクトロメリア・ウイルスの封入体に就て, 大阪医学会, 1956年3月22日.
 - 8) 萩原喜一：エクトロメリア・ウイルスのA型封入体の形態, ウイルス, **7**(5), 356-357, 1957.
 - 9) KAMAHORA, J., KATO, S., BABA, E., and HAGIWARA, K. : Studies on the inclusion bodies of fowlpox virus. Med. J. Osaka Univ., **6**(3), 745-754, 1955.
 - 10) 加藤四郎, 萩原喜一, 馬場英三, 佐藤洋太郎, 釜洞醇太郎：Fowlpox virus の新封入体に関する研究, ウイルス, **5**(4), 318-324, 1955.
 - 11) TANIGUCHI, T., KAMAHORA, J., KATO, S., and HAGIWARA, K. : Pathology in monkeys experimentally infected with measles virus. Med. J. Osaka Univ., **5** (2-3), 367-396, 1954.
 - 12) CROUSE, H. V., CORIELL, L. L., BLANK, H., and SCOTT, T. F. McN. : Cytochemical studies on the intranuclear inclusion of herpes simplex. J. Immunol., **65**, 119-128, 1950.
 - 13) 萩原喜一, 桶谷純也：マウス肝細胞内のエクトロメリア・ウイルス封入体, ウイルス, **8**(6), 524-525, 1958.

細胞培養培地に関する 2, 3 の検討

五 明 功*

ISAO GOMYO : STUDIES ON SEVERAL MEDIA FOR CELL CULTURE

[受稿 3月15日 1959]

細胞培養に用いられる培地組成は研究室により各様であつて、最近の文献より HeLa 細胞¹⁾ L 細胞²⁾ の発育及び維持培地組成^{3)~16)} について検討したが、殆んど、そこには一定の趨性がみとめられず、唯可成り広く合成培地が用いられる様になっている。発育培地としては、Scherer¹⁵⁾, Eagle^{11)~13)}, Parker の Medium 199, Puck's Complete Medium¹⁴⁾¹⁶⁾ 等の合成培地が用いられ、塩類溶液としては、Hanks が最も多く、Earle, Gey 等も小数用いられている。維持培地としては、合成培地として Scherer's Maintenance Solution¹⁵⁾, Medium 199 が広く用いられ、塩類溶液とし

ては Earle が多い。吾国では、HeLa 細胞, L 細胞の培地として Dulbecco の YLE 培地又はその変法^{17)~19)} が好んで用いられている。一般に YLE 培地の滅菌は濾過操作によつて行っているが、高压滅菌可能で、且大量保存も可能な Melnick の Melnick-Hanks Medium²⁰⁾, Melnick-Earle Medium について、従前吾々が用いていた YLE 培地との比較検討を HeLa 細胞, L 細胞について行い、同時にその構成成分たる、Yeast extract, Lactalbumin, 葡萄糖等の効果を判定した。

実験材料及び実験方法

* 京都大学ウイルス研究所物理部 (主任 東 昇 教授)

実 験 材 料

A) 実験に使用した培養容器

大型角瓶 (50×100×50mm), 小型角瓶 (30×50×30mm) を使用した。

B) 細胞

HeLa 細胞¹⁾ は当研究室で, YLE により115代継代を重ねたもの。

L細胞²⁾ は同様に YLE により88代継代を重ねたものである。

C) 細胞培養液組成

1) 0.5% Lactalbumin-Hanks Solution²⁰⁾ (Melnick Hanks Medium. 以下 M-H と略す)。

NaCl	8.0	} A	(g/l)
KCl	0.4		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1	} B	
CaCl ₂	0.14		
Na ₂ HPO ₄	0.06	} D	
KH ₂ PO ₄	0.06		
Glucose	1.0		

Phenol red (0.5%) 20mg

Lactalbumin hydrolysate (N. B. C.) 5.0

NaHCO₃ (7.5%) 0.525 (1.05gを含むのを2× M-H)

{ Penicillin 200μ/ml, Streptomycin 200γ/ml,
{ Mycostatin 100μ/ml, M-E, YLEにも同量加。

Melnick はこれに2~10%に仔牛血清を加えることを推めているが, これは本来猿腎細胞に用られたもので, 吾々は血清量の検討の結果, こゝでは, 発育培地としては, HeLa細胞には20%, L細胞には10%に牛血清を使用し, 維持培地には共に2%に牛血清を加えた。(以下 M-E, YLE も同様)

2) 0.5% Lactalbumin-Earle Solution (Melnick-Earle Medium. 以下 M-E と略す。)

NaCl	6.8	} A	(g/l)
KCl	0.4		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2		
CaCl ₂	0.2	} B	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.125		
Glucose	1.0	} C	

Phenol red (0.5%) 20mg

Lactalbumin hydrolysate 5.0

NaHCO₃ (7.5%) 2.25

M-H, M-Eとも Phenol red迄を各々 864ml, 854ml

の再蒸溜水にとかし, 5% Lactalbumin 100ml と別に高圧滅菌 (10 lbs 10分) し, 冷却後混合 (3日以内に), 7.5% NaHCO₃ (濾過滅菌) を7ml (M-H), 14ml (2× M-H), 30ml (M-E) を加える。

5% Lactalbumin 水溶液は0.1N-NaOHで中性とし高圧滅菌する。

3) YLE培地

NaCl	7.18	(g/l)
KCl	0.4	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	
CaCl ₂	0.2	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.162	
Glucose	4.5	
Phenol red	15mg	
Lactalbumin hydrolysate	5.0	
Yeast extract dehydrolysate (Difco)	1.0	
NaHCO ₃	1.1~(2.2)	

これに抗生物質を加え, Seitz EK 濾過器で濾過滅菌する。

D) 牛血清

採血後, 一夜冷蔵庫保存後分離した牛血清を3000rpm 30分遠心後, 上清を Seitz EK 濾過器で滅菌し, 培養細胞の増殖に異常を認めないことを確めた後使用した。

E) Phosphate Buffered Saline (P. B. S.)

CaCl₂, MgCl₂ を含まないものをPBSAとする。

F) E. D. T. A. 液 (Ethylendiamine tetraacetic acid) 0.02%水溶液とし10 lbs 10分高圧滅菌して使用する。

G) Tryptose Phosphate Broth (Difco)¹¹⁾²¹⁾

(以下 T. P. B.)

Bacto-Tryptose	20	}
Bacto-Dextrose	2	
Sodium chloride	5	
Disodium phosphate	2.5	

よりなる。T.P.B. 29.5g に再蒸溜水を加えて1lとし, 15 lbs 10分(121°C) 高圧滅菌して使用する。終末pHは7.3である。尚 T. P. B. は久留米大学 神田幸重助教授 (現 京大助教授) より分与されたものである。こゝに記して謝意を表する。

H) pH標準液²²⁾

Sørensen 磷酸緩衝液を用い, pH測定器で正確に6.0, 6.2, ..., 7.8, 8.0 の11系列を作り, Phenol red を20mg/l 及び15mg/lの割に加え標示薬とし, クロロホ

pHの調整には7.5%NaHCO₃, 及び 0.2%HClを用いた。

大型角瓶の4～5日培養のHeLa細胞又はL細胞を用い、旧細胞培養液を棄て、PBSA液で洗い、37°Cの0.02% E. D. T. A. 液5mlを加え、37°Cに10分乃至20分静置し、器壁より細胞を剝離させる。この細胞浮游液を遠沈管にうつし、ピペットで充分に細胞を分散させ、800 rpm 5分遠沈後上清を除き、その沈渣に細胞培養液を加え充分に均等な細胞浮游液を作り、血球計算盤で計数の上、必要な細胞数迄稀釈する。得られた細胞浮游液を大型角瓶には10ml 小型角瓶には4 ml 宛分注し、37°Cで静置培養を行う。尚維持培養液として、発育培養液と異種の培養液を用いて、その効果をみる場合は、37°C PBSで特に5回洗つて発育培養液による影響を可及的に少なくする様に努めた。

培養液の検討に際しては、外見上細胞層の状態、培養液のpH、細胞脱落による混濁等の他、光学顕微鏡下で直接細胞の形態学的変化、細胞単一層の形成の時期、細胞層の充実の程度、細胞老化の現れる時期、細胞脱落による細胞間隙の出現など細胞数以外の因子に観察の主眼をおいた。従つて結果は總体的な表現として次の10段階によつて記載した。即ち一、土、十、卅、卅、卅、卅、卅、卅、卅、で、土は接種細胞中器壁に附着せずに脱落するものを多数にみとめる場合、少数の細胞が器壁に附着している程度、+数の増加は細胞数の増加を示す。卅は細胞単一層の形成を意味し、又細胞の老化にともない脱落細胞を認めるも尚光学顕微鏡下細胞間隙を認めないものも卅で示し、細胞残存の程度を卅以下一迄の記号で現した。卅以上は細胞層の充実の程度を示す。一実験サンプルには少なくとも2本以上の培養瓶を用いて、その平均値で現した。細胞形態の観察にはカバースリップ法を用いギムザ染色、ヘマトキシリン-エオジン染色を行つたものを用いた。

HeLa細胞, 及びL細胞を用いて接種細胞数 7×10^4 /ml, 2.0×10^5 /ml の場合, M-H, M-E, YLEの変化をみた。 7×10^4 /ml の場合, HeLa細胞ではM-Hで5日, M-Eは6~7日, YLEは7日で細胞単一層を与え, 2.0×10^5 /ml の場合はM-Hで2日, M-E, YLEでは3日で細胞単一層を与えた。 発育培地としてはM-Hが最も優れ, M-E, YLEの順になる。 即ちM-Hは細胞接種の際, 細胞の器壁への附着良く, 細胞ののびも良く, 早期より増殖を開始する。 細胞単一層の形成も早く, 円形細胞, 紡錘形細胞の殆んどない均一にのびきつた細胞層を与える。

細胞維持期間はYLEが最も優れ、M-H、M-Eは劣り両者には殆んど差がない。培養液を交換することなしに放置した場合、HeLa 細胞では接種細胞数 $7 \times 10^4/\text{ml}$ では、M-Hで4～5日、M-Eで5日、YLEで6～7日、 $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ では、早く細胞単一層を与えられるため維持期間はM-H、M-Eは6～7日、YLEでは10日前後であった。維持培地として、M-H、M-E、YLEを用いた際は、M-H、M-Eは5～6日、YLEでは9日であつて細胞層の充実の程度も良好である。

L細胞維持期間は、放置した場合、 $7 \times 10^4/\text{ml}$ ではM-H, M-Eで4~5日, YLEで14日前後, $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ では, M-H, M-Eで5~6日, YLEで18日間, 細胞層維持された。維持培地としてM-H, M-E, YLEを用いた場合も、傾向はHeLa細胞の場合に似て、M-H, M-Eでは5~6日間、細胞層が維持し得たのみであつた。

尚M-H, M-Eで培養する場合, 単一層の形成が
れる時は, 4~5日目に培養液をかえると1~2日
で良好な細胞単一層を与える.

第1表 M-H, M-E, YLE の比較 (HeLa細胞)

接種細胞数 $7 \times 10^4/\text{ml}$

[illegible]

接種細胞数 $2.0 \times 10^5/\text{ml}$

[illegible]

第2表 M-H, M-E, YLE の比較 (L細胞)

接種細胞数 $7 \times 10^4/\text{ml}$

[illegible]

接種細胞数 $2.0 \times 10^5/\text{ml}$

[illegible]

第3表 維持培地としてのM-H, M-E, YLE の比較 (HeLa細胞)

接種細胞数 $7 \times 10^4/\text{ml}$

↓維持培地にかえる

[illegible]

接種細胞数 $7 \times 10^4/\text{ml}$

[illegible]

単一層を形成したHeLa細胞及びL細胞を、M-H又はM-Eで4日毎に培地の半量宛交換することにより、HeLa細胞は2週間、L細胞では約3週間細胞層を健康な状態に維持し得た。

3) 光学顕微鏡的所見

これらM-H, M-E, YLEを発育培養液として用いた場合の細胞の形態学的推移によつて、三者を比較すれば、HeLa細胞では、接種細胞数 $7 \times 10^4/\text{ml}$ の場合、最初の2～3日間迄に著明な差が認められ、以後細胞の増殖にともなつて其の差は不明となる。細胞分裂の認められる36時間前後の処見を中心と述べると、

a) YLEの場合

散在性に細胞存在し、集団をなしている所殆んどなく、大勢を占めるのは紡錘形細胞で、円形細胞も可成り多く、多角形細胞は少ない。核濃縮像を伴つた萎縮細胞も多く、これらは死亡しているものと考えられる。36時間後には核分裂像を認めない。

b) M-Hの場合

円形細胞なく、大多数の細胞は多角形をとり、少数の紡錘形細胞を混ずる。数個乃至拾数個の多角細胞互に接して細胞集団を形成し、分裂像を多数にみとめ6時間以前に増殖が始まつていることを示している。

c) M-Eの場合

前兩者の中間型をとり、円形細胞殆んどなく多角形細胞と紡錘形細胞相半して存在する。核分裂像を認めるがM-Hより少ない。

細胞接種後2～3日にいたれば、円形細胞、紡錘細胞次第に減少し、多角形細胞で占められ三者の間には形態学的差がみとめられなくなる。尚一般にM-H, M-Eで培養した場合、細胞は大きく、細胞質の染色性弱く、早期より空胞像を多数にみとめる。

以上述べた傾向はL細胞の場合も同様であつて、特にYLEで接種細胞数の少ない場合は核濃縮像を伴つた萎縮細胞像多く、円形細胞も多く、細胞突起を出して肥大発育するのもおこれる。又巨大多核細胞の出現頻度が増すのも特徴的である。

(B) 植え継ぎの問題

細胞の継代の可否を検するため、当研究室でYLE継代のHeLa細胞128代、L細胞88代を用い、M-Hで4～5日毎に植え継ぎし、HeLa細胞15代、L細胞14代にわたり観察したが、

1) HeLa細胞15代、L細胞14代のM-Hによる継代は可能であり 2) その間、全く異常を認めず、3) 各代の細胞層維持期間は4～6日で1～2日の長短があつたが、継代により維持期間の延長又は短縮の傾向は認めなかつた。

次に前述したM-H, M-E, YLEとの間にみられる相違はYeast extract, 葡萄糖, pH等が関係すると考えられ、同時にLactalbumin, T.P.B.についても検討を行つた。

(C) Yeast extract の効果

HeLa細胞、L細胞について、Hanks及びEarle塩類溶液に牛血清を加えたもの、又はM-H及びM-Eに牛血清を加えたものを対照群とし、これに0.1%にYeast extractを加えることによつて、Yeast extractの効果をみた。対照群の細胞単一層の形成は、 $7 \times 10^4/\text{ml}$ の接種細胞数の場合、M-Hで4日、Hanks, Earleで5～6日を要したのに対し、0.1%Yeast extract加群では、単一層の形成に7日、又はそれ以上を要した。

一般にYeast extractを発育培養液に加えることにより、器壁への細胞附着を妨げ、細胞は萎縮円形化し、コントラストの強い細胞として認められる。細胞

第4表 Yeast extract, Lactalbumin の効果 (HeLa細胞)

接種細胞数 $7 \times 10^4/\text{ml}$

日数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
発育培地 Hanks' B. S. S.* + 20% Bovine Serum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" + 0.1% Yeast extract (濾過滅菌)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" + 0.1% Yeast extract (高压滅菌)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" + 0.5% Lactalbumin (高压滅菌)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Hanks' Balanced salt solution.

第5表 維持培地に於けるpHの影響 (HeLa 細胞)

接種細胞数 7×10 ⁴ /ml			維持培地にかえる															
発育培地	維持培地及び 初 発 pH	(日 数)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
M-H	M-H	7.9					≡	≡	pH 7.9	≡	pH 7.8	≡	+	pH 7.5	±	±	—	pH 7.4
		7.6					≡	≡	7.6	≡	7.6	≡	+	7.3	±	±	—	7.3
		7.3	+	+	+	≡	≡	≡	7.4	≡	7.4	≡	≡	7.3	±	±	±	—
		7.0					≡	≡	7.2	≡	7.0	≡	≡	6.9	±	±	±	—
		6.7					≡	≡	7.0	≡	6.8	≡	≡	6.6	±	±	±	±
		6.4					≡	≡	6.7	≡	6.6	≡	≡	6.4	±	±	±	—
M-H	M-E	7.9					≡	≡	7.9	≡	7.9	≡	+	7.6	±	±	±	—
		7.6					≡	≡	7.7	≡	7.7	≡	+	7.4	±	—		7.5
		7.3	+	+	+	≡	≡	≡	7.5	≡	7.5	≡	≡	7.3	±	±	±	—
		7.0					≡	≡	7.3	≡	7.1	≡	≡	7.1	±	±	±	±
		6.7					≡	≡	7.2	≡	7.0	≡	≡	7.0	±	±	±	±
		6.4					≡	≡	7.0	≡	6.9	≡	≡	6.8	±	±	±	—

ののびが悪く、紡錘形化、多角形化及び細胞分裂像の出現もおくれ、当然細胞単一層の形成もおくれる。吾々は仮に、これを細胞増殖阻害効果と呼んでいるが、この効果は接種細胞数が少ない場合、特にL細胞で著明である。接種細胞数が多い場合 ($1.5 \times 10^5/\text{ml} \sim 2.0 \times 10^5/\text{ml}$) は、この効果は殆んど問題にならなくなる。既に認められている様にYeast extractには細胞維持効果があり、吾々の実験でも0.1%にYeast extractを加えることにより、2～3日間長く細胞層を維持し得ている。尚Yeast extractはSeitz EK濾過器で濾過滅菌したものを使用し、高压滅菌 (10 lbs 10分) したものとを比較したが第4表の如く、殆んど両者に差がなく、強いて云えば、濾過滅菌した場合に、Yeast extract の特性、即ち細胞増殖阻害効果及び維持効果が強く認められる様であるが、殆んど問題にならない。以上の点からして発育培養液、特に接種細胞数の少ない場合はYeast extractは好ましくないと考えられる。

(D) Lactalbumin hydrolysate (LA) の効果

HeLa 細胞を用いて、Hanks 塩類溶液に20%に牛血清を加えたものを対照とし、これに0.5%にLAを加えた場合(第4表)、対照群は接種細胞数 $7 \times 10^4/\text{ml}$ の場合、5～6日で多少細胞間隙はあるが、ほぼ細胞単一層を形成し6～7日間この状態に保たれる。

LAを加えた場合は、細胞ののび、増殖ともに良く4～5日で均一な、大形の典型的上皮細胞構造を呈する細胞よりなる良好な単一層を与える。細胞の維持日数は5日迄で、対照群に比して、細胞の維持効果は疑問であり、反つてLAを加えることによって細胞の伸び、増殖は促されるが、早期より空胞変性が現れ、老化して脱落する。

(E) 葡萄糖の影響¹⁶⁾

M-Hを基礎培養液とし(葡萄糖0.1g%を含む)これに葡萄糖を加えて、0.1g%より0.5g%迄について検討をしたが、葡萄糖の増加にともなつて細胞の増殖、細胞層の充実は良好となるが、細胞の大きさは一般に小形となる。又促進された糖代謝産物のためにpHは

急速に酸性側に傾き、細胞維持には不適な状態となり比較的速かに細胞は老化変性して脱落する。M-H, M-Eが YLE に比して酸性となりにくいのは、この葡萄糖含量が少ないことにも起因していると考えられる。

(F) pH の影響

発育培養液として M-H が優れているので、M-H を用いて、HeLa 細胞単一層を作り、維持培養液として、M-H, M-E を用い、pH の細胞の維持に与える影響を見た。(第5表)検討した pH は 6.4 より 7.9 迄の 6 段階で、2% HCl, 7.5% NaHCO₃ で培養液を所定の pH とした。

M-H で維持した場合、細胞維持日数は pH 7.9, 7.6 で共に 4 日, 7.3, 6.4 で 6 日, 7.0 で 6~7 日, 6.7 で 7 日であった。

M-E で維持した場合は、細胞層維持日数は pH 7.9 で 4 日, 7.6 で 5 日, 7.4 で 5~6 日, 7.0, 6.7, 6.3 で 6 日であった。

HeLa 細胞は pH に対して、可成りの巾をもつて適応性があると考えられ、pH 7.3~6.4 の範囲では特に大差なく、pH 7.6~7.9 では細胞の維持には好ましくな

い状態と考えられる。

維持培地として、M-H と M-E を比較してみても、特に M-E が優れていることはなく、強いて云えば細胞層の充実が M-E が良く、やや早めに細胞の老化変性が現れる。

又表の如く、所定の pH の維持培養液で 37°C 静置培養したが、M-H, M-E ともにアルカリ側にもどる傾向があり、又日数を経ても YLE に比して酸性に傾きにくく、この傾向は M-E に著明である。接種細胞数を多くし、培養液の pH の調整又は培養液の交換することなく、放置した場合でも pH は 6.4~6.3 以下になることなく、それ以前に細胞は老化して脱落する。M-E では pH 6.6~6.5 以下とはなりにくい。この原因の一つは葡萄糖の含量少なく、糖代謝が制限されているためであろう。YLE では pH 6.2 前後になつても、細胞層が維持されていることがある。

(G) Tryptose Phosphate Broth (T.P.B.) の効果^{21) 11)}

以上 M-H, M-E のいずれを用いても、維持培地として HeLa 細胞を維持しうるのは最高 6 日前後で、M-H, M-E で得られた良好な細胞層を維持する目的で T.P.B.

第6表 Tryptose Phosphate Broth の効果

接種細胞数 7×10^4 /ml

↓維持培地にかえる

細胞	維持培地	(日数)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
HeLa 細胞	M-H	発育培地 M-H						冊	冊	冊	冊	冊	冊	+	±	—			
	+ 2 % S*							冊	冊	冊	冊	冊	冊	+	—				
	+ 10 % T.P.B.							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	+	—			
	+ 20 % "							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	+	—			
	M-H		+	+	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	+	+	+	—	
	+ 2 % S + 5 % T.P.B.							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	+ 10 % "							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	+ 15 % "							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
L 細胞	M-H	発育培地 M-H						冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	+ 2 % S							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	+ 10 % T.P.B.							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	+ 20 % "							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	M-H		+	+	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	+ 2 % S + 5 % T.P.B.							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	+ 10 % "							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	+ 15 % "							冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

* S: 牛血清

を用いた。M-Hで発育させたHeLa細胞及びL細胞に維持培養液として、2%牛血清加M-H及びM-Eに、5, 10, 15, 20, 25%にT.P.B.を加えた場合の効果をみた。(第6表)

1) HeLa細胞では細胞層維持期間は、対照群の3～4日に対して、T.P.B.加群では最高5日迄で、僅かに1～2日の差があるのみで、この場合特に効果があるとは云えない。

2) L細胞では細胞層維持期間は、対照群の5～6日に対して、T.P.B.加群では最高9日迄でその差は2～3日で、やや延長している。2%牛血清加M-Hと2%牛血清の代りに10%, 20%にT.P.B.を加えた場合とには殆んど差が認められない。形態学的にはT.P.B.加群は、培養液交換後、細胞の円形傾向を認めるも間もなく回復して、以後大差なし。M-H, T.P.B.のみで、牛血清を含まない場合は細胞層の充実が悪く、細胞は萎縮した感じを与える。HeLa細胞, L細胞についてこれまで当研究室で使用していたYLEとM-H, M-Eとの比較検討の結果から、一般にM-Hは発育培地として優れ、早期に良好な細胞単一層を与えるが、細胞層はある程度の充実を示すのみで、早期に老化変性脱落する。

考 察

M-H, M-E培養の細胞、特にHeLa細胞は、かなり早期より細胞に多数の空胞形成が認められ、YLEに比して速かに老化変性を示すからM-H, M-Eは、HeLa細胞, L細胞培地として充分とはいえない。YLEは細胞維持という点で優れた良好な培地とされるが、一般に発育培地としては、Yeast extractの細胞増殖阻害効果からして問題があろう。M-H又はYeast extractを含まない培地を用いて細胞単一層を得、維持培地として、YLE又はYeast extractを含む培地を用いるが良いと考えられる。

又M-H, M-Eは細胞増殖後も、YLEに比して酸性になりにくく、細胞維持に特に不適でないpHでも、早期細胞老化を来すのは、単に培地の緩衝能の強さによるのみでなく、糖代謝が制限されているためでもある。

HeLa細胞, L細胞の栄養要求量には可成りの差がありEagle¹³⁾は、HeLa細胞はL細胞に比して約2倍量のアミノ酸、ビタミンを要し、血清蛋白は3～4倍量を必要としているが、吾々の実験でも両者には可成りの差があり、YLEでのL細胞の長期維持は可能で

あるが、M-H, M-Eに対するHeLa, L細胞の態度は酷似し、長期維持はやや困難である。

Ginsberg²¹⁾はHeLa細胞で、Scherer's Maintenance Solution, ChickenserumにT.P.B.を15～25%に併用して細胞の維持増殖に好結果を得ている。Marston, Wenner, Dubes¹¹⁾もT.P.B.を用いているが、いずれも合成培地との併用である。吾々がM-HとT.P.B.との併用ではHeLa細胞では好結果を得られず、L細胞では効果をみとめた。

結 論

HeLa細胞及びL細胞を用い、M-H, M-E, YLEについて比較検討を行い、同時にYeast extract, Lactalbumin, 葡萄糖, pH, Tryptose Phosphate Brothの効果影響をみた。

1) 発育培地としてM-Hが最も優れ、良好な細胞層を与える。M-Eこれに次ぎ、YLEが最も劣る。

2) 細胞維持期間はYLEが最も優れ、M-H, M-Eには大差なく、共にYLEに劣る。

3) YLE継代のHeLa細胞, L細胞をM-Hで4～5日間隔で移植を行つたが、HeLa細胞15代, L細胞の14代継代の間に何等異常を認めず、継代可能であつた。

4) Yeast extractは細胞増殖阻害効果、細胞維持効果がある。発育培地には好ましくない。

5) Lactalbuminは細胞の増殖、伸びを良くするが、細胞維持効果は疑問である。

6) 葡萄糖は細胞の増殖及び細胞層の充実度を促すが、培養液のpHを速かに酸性側に移行させる。

7) 維持培養液のpH: HeLa細胞はpHに対して可成りの適応性を示す。pH 7.6以上は好ましくない。

8) T.P.B.: 合成培地とことなり、M-H, M-Eとの併用では、細胞維持効果は、HeLa細胞には殆んど認められず、L細胞では2～3日の維持延長を認めた。

終りに、この研究を筆者にすすめられた東教授の御指導に深謝し、併せて、第7回京大ウイルス研究所集談会における本研究発表の際寄せられた諸先生の御発言に謝意を表する次第である。

文 献

- 1) Scherer, W. F., Syverton, J. T., and Gey, G. O.: Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human

- malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid. *J. Exp. Med.*, **97**, 695-710, 1953.
- 2) Stanford, K. K., W. R. and Likely, G.D.: The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **9**, 229-246, 1948.
 - 3) Darnell, J. E.: Adsorption and maturation of poliovirus in singly and multiply infected HeLa cells. *J. Exp. Med.*, **107**, 633-642, 1958.
 - 4) Gifford, G. E., and Syverton, J. T.: Replication of poliovirus in primate cell cultures maintained under aerobic conditions. *Virology*, **4**, 216-223, 1957.
 - 5) Girardi, A. J., Harsison McMichael, Jr., and Wernener Henle.: The use of HeLa cells in suspension for the quantitative study of virus propagation. *Virology*, **2**, 532-544, 1956.
 - 6) Samuel Baron, Richard, J. Low.: New maintenance medium for cell culture. *Science*, **123**, 3315, 89, 1958.
 - 7) Dunnebacke, T. H., and Reaume, M. B.: Correlation of the yield of poliovirus with the size of isolated tissue cultured cells. *Virology*, **6**, 8-13, 1958.
 - 8) Alison Newton, and M. G. P. Stoker.: Changes in nucleic acid content of HeLa cells infected with herpes virus. *Virology*, **5**, 549-560, 1958.
 - 9) Bader, J. P., and Morgan, H. R.: Latent viral infection of cells in tissue culture. VI. Role of amino acids, glutamin, and glucose in psittacosis virus propagation in L cells. *J. Exp. Med.*, **103**, 617-630, 1958.
 - 10) Vogt, M., and Dulbecco, R.: Properties of a HeLa cell culture with increased resistance to poliomyelitis. *Virology*, **5**, 425-434, 1958.
 - 11) Dubes, G. R., and Wenner, H. A.: Virulence of poliovirus in relation to variant characteristic distinguishable on cells in vitro. *Virology*, **4**, 275-296, 1957.
 - 12) Charles, C., Shepard, W. D.: A comparison of the growth of selected Mycobacteria in HeLa, monkey kidney and human amnion cells in tissue culture. *J. Exp. Med.*, **107**, 237-246, 1958.
 - 13) Harry Eagle.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, **122**, 3168, 501-504, 1955.
 - 14) Alexander, H. E., Gerhard Koch, Mountain, I. M., and Damme, O. V.: Infectivity of RNA from poliovirus in human cell monolayers. *J. Exp. Med.*, **103**, 493-506, 1958.
 - 15) William, F., Scherer, M. D.: The Utilization of a pure strain of mammalian cells (Earle) for the cultivation of virus in vitro. *Am. J. Path.*, **29**, 113-138, 1953.
 - 16) Puck, T. T., Cieciura, S. J., and Fisher, H. W.: Clonal growth in vitro of human cells with fibroblastic morphology. *J. Exp. Med.*, **106**, 145-158, 1957.
 - 17) 東 昇: エクトロメリア・ウイルスの増殖発育並に感染様式に関する電子顕微鏡的研究. *ウイルス* **8**, 16-17, 1958.
 - 18) 鈴木弘三: 昭和31年度愛媛県下に流行した急性炭白髄炎患者からのウイルス分離とその型. *ウイルス* **8**, 421-428, 1958.
 - 19) 佐藤喜象: アデノウイルスに関する研究. *ウイルス* **9**, 35-43, 1959.
 - 20) Black, F. L., and Melnick, J. L.: Micro-epidemiology of poliomyelitis and herpes B infections spread of the viruses within tissue cultures. *J. Imm.*, **74**, 236-242, 1955.
 - 21) Ginsberg, H. S., Eli Gold, and Jordan, S. W.: Tryptose phosphate broth as supplementary factor for maintenance of HeLa cell tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **89**, 66-71, 1955.
 - 22) Lipton, M. M., and Steigman, A. J.: A simplified colorimetric test for poliomyelitis virus and antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **88**, 114-118, 1955.

第1図 HeLa細胞 M-H培養36時間後、接種細胞数 7×10^4 /ml. 円形細胞殆んどなく、コントラストの弱い、充分に伸びた多角形細胞が大勢を占め紡錘形細胞を小数認める。(350×)

第4図 L細胞 M-H培養36時間後、接種細胞数 7×10^4 /ml. 円形細胞殆んどなく、細胞は良く伸びている。(350×)

第2図 HeLa細胞 M-E培養36時間後、接種細胞数 7×10^4 /ml. 多角形細胞、紡錘形細胞増加し、円形細胞も可成り認める。(350×)

第5図 L細胞 M-E培養36時間後、接種細胞数 7×10^4 /ml. コントラストの強い円形細胞多数あるも、細胞突起を出して伸びがかけているものが多い。(350×)

第3図 HeLa細胞 YLE培養36時間後、接種細胞数 7×10^4 /ml. コントラストの強い円形細胞、紡錘細胞多く、多角形細胞は少ない。(350×)

第6図 L細胞 YLE培養36時間、接種細胞数 7×10^4 /ml. 細胞はコントラストの強い円形細胞が主勢を占める。細胞数が非常に少ないのは、萎縮変性を来して器壁より脱落したためである。(350×)