

氏 名 まつ や ゆたか
松 谷 豊

授 与 学 位 医 学 博 士

学位授与年月日 昭和40年3月5日

学位授与の根拠法規 学位規則第5条第2項

最 終 学 歴 昭和33年3月 東北大学大学院農学研究科修士課程修了

学 位 論 文 題 目 少数細胞接種のための無血清培地成分の基礎的検討
I 少数L細胞接種のための無血清培地
II 無血清培地中の有効成分の代置およびL細胞の継代培養

論文審査委員 東北大学教授 山 根 績

東北大学教授 石 田 名 香 雄

東北大学教授 佐 藤 春 郎

論 文 内 容 要 旨

イーグルらは13種のアミノ酸、8種のビタミン、6種のイオン、グルコースに5~10%の血清を加えた培地に、動物の種をとわず殆どどの培養細胞系が増殖でき、しかも培地成分の種類および濃度はほぼ同じで十分であることを報告しているが、その際少数の細胞からは培養できないので、多数の細胞を接種しなければならない。このことは微生物の栄養要求の多様性と対象的な現象である。最近イーグルの報告によれば少数の細胞を培養するときは、更に特定の物質を必要とすることがわかった。その物質は細胞自身が僅かに合成しうる物質ではあるが、その合成できる量を上廻つて培地中に流出される物質と考えられた。しかしその流出を防ぐため予め培地中に特定の物質を加えることにより、少数の細胞からでも細胞が増殖できるようになつた。一方ごく僅かの細胞系では無蛋白培地でも生育できたが、それは培地に長い間細胞を馴養させた結果であり一種の変異株といえる。しかも多数の細胞(1万個/ml以上)を接種しなければならない。しかし多くの細胞系は一様に血清(蛋白)を要求している。それ故血清を加えた培地に培養してきた細胞を、血清を除いた培地に培養すると殆ど生存できない。特に接種細胞数が少ない程細胞の生存は困難になる。

本実験では、無血清環境下で、できる限り少数の細胞でも増殖できる培地成分を選定した。すなわちまず血清に代る成分を他に広く求めて、それを培地に添加し、それによる細胞の増殖対応により培地条件を検討した。その結果細胞を単細胞のレベルから増殖させることができる無血清培地を作成することができた。又その培地成分中組成の不明な物質はその有効成分の解明につとめ、次いで無血清培地に細胞を継代培養することができた。

実験に用いた細胞系はLマウス皮下線維芽細胞であり、樹立以来20年以上生体外で培養されてきた。基礎培地は血清を除いたイーグル培地(28種成分)を用いた。接種細胞数は培地条件が補強されるに従つて減少させ、ついに「単細胞培養」のレベルまで減少させることができた。その際特定の無血清培地に細胞が馴養するのを避けるため、接種細胞は血清培地に培養した細胞を用いた。培養容器は小型シャーレを用い、5%炭酸ガス・空気恒温器に接種細胞数に応じて10~14日間培地を交換せずに培養した。培養後細胞数を算定して細胞増殖率から培養条件について検討を加えた。

種々検討の結果、基礎培地成分の外に、新たに牛アルブミン(300mg)、インシュリン(64単位)、セリン(10mg)、焦性ブドウ酸塩(110mg)、グルタミン酸(75mg)、プロタミン(0.5mg)或いは塩化第二鉄(3mg)、バクト・ペプトン(300mg)或いはラクトアルブミン水解物(500mg-何れも1見当りの濃度)をそれぞれ加えた無血清培地を作成することができた。その間、ラクトアルブミン水解物の著しい有効性はプロタミン或いは塩化第二

鉄が存在するときのみ示された。又そのラクトアルブミン水解物はバクト・ペプトンより少々活性度が劣ることが判明した。又その培地成分中、組成の不明な牛アルブミンについて有効成分を同定することを試みた。アルブミンの有効性については、すでにハムがハムスター子宮細胞を用いて、アルブミン活性がリノール酸カリノレン酸で置き換わられたことを明らかにしている。しかしL細胞では置き換えることができなかった。アルブミンの作用はそれら生育因子を含んでいることの他に、単層培養している細胞シートから接種細胞液をつくる際に用いたトリプシンの蛋白分解による細胞傷害を阻止する作用に関与していると思われた。アルブミンを含まぬ培地に、前記接種細胞を培養すると細胞の生育が著しく抑制された。それ故無血清培地に細胞を継代培養するときは、機械的に細胞をガラス容器面より脱離させる方法を採用することが望ましい。かくしてL細胞を培養できる無血清培地を作成することができた。これまでの殆んどは無血清培地は多数の細胞からのみ培養できたのに比べ、この培地は単細胞のレベルで培養しても細胞のコロニー形成がみられた。即ち無血清培地でのコロニー出現率は50~60%であり、又世代時間は1.6~1.9日であった。なお血清を20%の割合で加えた培地での成績は、それぞれ90%、1.4日であった。これによつて培地中の血清は、それら有効成分を培地に添加することによりかなり置き換えることができた。

次にその無血清培地にL細胞を継代培養できるかどうかについて検討した。実験には培養瓶中の培地に少数の細胞を接種して継代培養をおこない、本年1月現在まで30余代継代することができた。しかしこの間細胞の形態や増殖率、更にペプトンに対する要求性にも変化を生じた。このことはL細胞が無血清培地へ馴養される過程と考えられる。

審査結果の要旨

培養細胞の栄養要求を研究するに当り、培地 ml 当り 10,000 以下の少数細胞接種条件で培地成分の添加及び省略効果を検討することが最も適確かつ鋭敏であることは最近多くの研究者により認められている。著者は種々の細胞に常用培地として適用出来る無血清培地作製の前段階として、L株細胞（マウス皮下線維芽細胞由来）を血清を含む変法 Eagle 培地に培養増殖せしめたものを種細胞として、少数細胞接種条件で、同細胞の要求する培地成分を仔細に探索した。無血清培地作製のための基礎成分として、血清を除いた Eagle 培地を使用した。その成分のみでは L 細胞は増殖できないので、L 細胞の生育促進に有効な物質を広く検索して、その有効性を少数細胞培養の成績より判定した。その結果、同成分の他に、新たにセリン、グルタミン酸、焦性ブドウ酸塩、インシュリン、プロタミン或いは塩化第二鉄、更に未知有効成分を含むバクトーペプトン或いはラクトアルブミン水解物、及び血清成分の一種である牛アルブミンを加えた無血清培地を作製することができた。この為、ラクトアルブミン水解物の著しい生育促進はプロタミン添加条件下においてのみ見出された。そのラクトアルブミン水解物よりバクトーペプトンの活性度が稍々まざっていた。又牛アルブミンの作用は、細胞を接種する際用いたトリプシンの細胞傷害を阻止するのに有効であると考えられた。

かくして、この無血清培地に少数 L 細胞を増殖させることに成功した。更に単細胞レベルで培養して、細胞コロニーを形成させることができた。このことは、従来の無血清培地は多数細胞を用いないと細胞の増殖がみられなかつたことに比べると特長的なことである。上記培地は種細胞として血清加培地に培養した細胞を用いての成績であつたので、この培地に L 細胞を継代培養できるか否かについて検討した。その結果、少数 L 細胞を同培地に長期継代培養することができた。その為、L 細胞が同培地に馴養化する現象がみられた。同培地は L 細胞の長期培養にも適用できることが明らかになつた。

かくして、今後同培地を基本として、他の細胞系の培養に適した無血清培地を作製する基礎的資料が得られたと考えられる。

よつて、本論文は学位授与に値するものと認める。