

人胎盤細胞の継代培養について (特に人胎盤細胞の内分泌機能研究への 応用に関する一考察)

The subcultivation of primary cultures of human
placental cells for application to the research of
their hormone-secreting function

東北大学医学部産科婦人科学教室 (主任 九嶋 勝司教授)

大学院学生 五 十 嵐 彰 Akira IGARASHI

内 容 目 次

- I 緒 言
- II 実験材料並びに実験方法
 - 1) 材 料
 - 2) 実験方法
 - 3) 植継ぎの方法
 - 4) 培 地
- III 実験成績
- IV 考 按
- V 結 論

I 緒 言

胎盤の諸機能の解明に組織培養法を使用せんとする試みは古くから行われ、1907 年、R. Harrison¹⁾ が、はじめてカエルの神経線維の培養に成功してから数年後の 1915 年には既に Fornero²⁾ が海狸の胎盤を培養し、結合織母細胞と巨大細胞の発育するのを認めたと報告している。

その後、動物胎盤ばかりでなく、人胎盤についても数多くの培養報告及び組織培養を使用せる実験報告がなされて来た。しかしながら組織培養の発達史を眺めるに、その技術的な面でも、応用の面でも第 2 次大戦前の組織培養は一種の行詰りに陥っていた。その行詰りを打開し、組織培養の発達をうながしたものとしては、抗生物質、抗カビ剤等の出現に依る無菌操作の簡易化、細胞の生化学的研究の進歩に伴う培地の改良等をあげる事が出来る。更に細胞浮游液培養法の発明は細胞成長の度合を非常に厳密に定量する事を可能ならしめ、ここに於て組織培養ははじめて細胞のレベルに於て研究を進めうる事

になった。今日では、その培養に使用するはじめの材料は組織であるがその培養の完成された状態は、むしろ、細胞培養と呼んだ方が正鵠を得ている。本論文の標題に胎盤細胞なる語を用いたのも以上の趣旨に他ならぬ。

以上の如き発達せる今日の組織培養法から見ると、今日迄発表された胎盤の組織培養の報告の中には再検討を要するものもある。

今回筆者は、人胎盤の機能解明に供すべく人胎盤細胞の培養を行った。

II 実験材料並びに実験方法

1) 材 料

人工妊娠中絶術に依つて摘出した臨床診断が妊娠 2 カ月及び 3 カ月の人胎盤 5 例を材料とした。

2) 培養方法

人工妊娠中絶時に、出来るだけ無菌的に採取した材料を Hanks 液 (ペニシリン 10 万単位/l, ストマイ 50mg/l を含む。以下同じ。) に入れ、冷蔵庫に保存した。次に滅菌シャーレに Hanks 液をとり、この中で材料を数回洗滌し、赤血球、脂肪などを除去した。この処置をしてから材料を 50cc. 容の丸底遠沈管にうつし、Hanks 液約 20c.c. を加え、材料を浮遊させながら長柄のクーパーで適当に細切した。この丸底遠沈管を 5~10 分間静置し、その上清を 80-mesh で濾過し、その濾液 (F) を保存した。上清を除いた沈渣物に、更にもう一度 Hanks 液を加えて攪拌し、それを非常にゆつくり遠心し (1000 RPM 以下) その上清を捨てた。この操作を 3~4 回行い、之に依つて肉眼的には赤血球、脂肪等は非常に少なくなつた。この沈渣物に 0.25% のトリプシン溶液約 30c.c.

を加え少し攪拌し、それを magnetic stirrer にうつし 37°C で bar を回転させた。回転させながら 15～30 分間隔でその内容物を 1c.c. 位ずつ採取し、血球計算盤で細胞数を計算し、細胞数が $20 \times 10^4/\text{c.c.}$ 以上になるまで回転を継続した。細胞数が、 $20 \sim 30 \times 10^4/\text{c.c.}$ 以上になったら直ちに bar の回転を止め、内容物を 80-mesh で濾過し、その濾液を直ちに遠心管にうつし、1000RPM 以下の速度で約 5 分間遠心した。遠心後、その上清を捨て去り、その沈渣に Hanks 液を適当量加え、その中に更に前の濾液 (F) を加えた。それを攪拌して遠心し、上清を捨てた。この操作を 2～3 回くり返し、分離細胞の洗滌を行った。

上清を捨てて後の洗滌せる細胞については、細胞数を $20 \sim 30 \times 10^4/\text{c.c.}$ 位に培地で調整して 37°C で培養した。

3) 植継ぎの方法

primary culture にあつては植継ぎは成功しにくいので、筆者は位相差顕微鏡で細胞の生育状態を観察し、状態が良好な時期を選んで之を行つた。方法は、日常株化細胞の植継ぎに用いる方法と同じである。而して筆者は 0.05% のトリプシン溶液を使用した。

尚、植継ぎの際に、細胞数はかなり増加していたが、之を多くの培養容器に分注することはしなかつた。継代に成功する事を第一の目的としたからである。

第 1 表 培養経過

	妊娠 月数	培養 日数	植継ぎ の回数	使用する 培地	培養経過 (○印とその中の数字は植継ぎの日及びその回数なり)
CASE I	3	14	1	VLE 70% + CS 30%	
CASE II	2	17	1	VLE 70% + CS 30%	
CASE III	3	33	3	VLE 70% + CS 30%	
CASE IV	3	34	2	LD or YLD + 80% CS 20%	
CASE V	2	13	1	LD or YLD + 80% CS 20%	

4) 培地

培地用塩類溶液としては、LD³⁾, YLD, VLE の 3 つを用いた。而して VLE とは YLE の Y、即ち yeast-extract を Eagle 培地⁴⁾の中の vitamine-group で置かえた塩類溶液である。血清としては、人臍帯血清を inactivate したものをを用いた。(尚、塩類溶液と血清の

割合については第 1 表参照のこと)。

III 実験成績 (第 1 表参照)

今回筆者は 5 例の人胎盤について、その培養及び植継ぎを試みたが、培養日数は最長で 34 日間、最短で 13 日間であつた。しかし、之等の培養日数はいずれも細胞の死亡せる日を以て云つておらず、細胞の生育状態が悪くなつて、細胞の染色観察をせんがため、培養を中断した日を以て計算した。従つて、その後の長期間培養は望めなかつたとしてももう数日位の生育は可能であつたと思われる。植継ぎについては最高 3 回成功した。

培養後 5 日間は出来るだけ静置し、顕微鏡に依る観察も最少限度にとどめた。培養 3 日目頃から、かなり多数の細胞がガラス面にはりついて来た。培養 5 日目になると細胞質がのび出しているのが認められた。最初の培地交換は、培養開始後 6 日目に行つた。その際古い培地は直ちに捨てず、その培地を遠心し、沈渣物をもう一度培養容器の中に加えた。即ち、生きる可能性ある細胞を出来るだけ救うためである。しかし 6 日目迄にガラス面にはりつかない細胞が、その後ははりついたかどうかは疑問である。

培養 6 日目に第 1 回の培地交換を行つた後は、原則として 2～3 日の間隔で培地交換を行つたが、培養 10 日過ぎになると細胞の生育が盛んなため、毎日又は隔日に培地の交換を行つた。即ち、細胞の位相差顕微鏡に依る観察所見と、培地の pH を参考として適時行つた。

IV 考 按

R. Harrison (1907)¹⁾ が couer-glass. 法を用いてカエルの神経線維の培養に成功して以来、組織培養法として、多くの方法が考察され試みられて来た。そして之等の方法が組織培養に貢献して来た事は少なくない。しかし、生きた培養細胞の形態の観察等には充分と考えられる之等従来の方法も、細胞成長の度合を正確に把握し、量的にとらえ、それを基礎として細胞の機能的な面を研究しようとする目的のためには不十分な方法である。

即ち、ここで云う従来の方法とは、緒言でも触れた如く、細胞浮游液培養法が發明される以前の諸方法を指しているのであるが、研究目的に依つては之等の方法の 1 つ 1 つ、又はその組合せが必要であり、又之等の方法に依らねばならない研究もある。事実、発達せる現在の組織培養に於ても之等従来の方法が日常利用せられている。

しかし細胞浮游液培養法以前の培養法には多くの技術

的制限があり、特に、細胞成長の度合測定に於て難点があり、そのため組織培養は行詰つていた。

1951年、Earle 一派⁵⁾⁶⁾が citric acid 使用に依る所謂 replicate tissue culture method⁶⁾を発表して以来、組織培養法ははじめて、細胞のレベルで実験をすすめる事が出来る所謂細胞培養の時代に入つたわけである。その後本邦では、勝田一派 (1954)⁷⁾が Earle の方法をより簡略化し、一步前進させた simplified replicate tissue culture method を発表している。その後、所謂細胞浮游液培養法については種々の改良がなされているが、今回筆者の用いた方法は Moscona (1952)⁸⁾、Dulbecco (1952)⁹⁾等の tpypsin使用の方法を踏襲したJ. Paul¹⁰⁾の云う disaggregated fresh tissue technique である。

この様に改良され進歩した組織培養法で従来の胎盤培養の報告を考察した場合はどうか。培養せる胎盤細胞の観察には以上の如き進歩せる方法を必ずしも必要とはせぬが、胎盤細胞を培養し、その細胞を胎盤細胞の機能解明に用いようとする実験には、前述の所謂細胞浮游液培養法が有力な方法である。

現在迄数多くの胎盤培養の報告^{11)~22)}がなされているが、その大部分は培養せる胎盤細胞の観察所見を報告したものである。そしてこの限りでは従来の方法で充分であつたとも云える。しかし胎盤を培養し、それを胎盤機能の解明、とくに内分泌機能の解明に供せんとした永山 (昭12)²³⁾、Gey (1938)²⁴⁾、Jones (1943)²⁵⁾、Stewart (1948)²⁶⁾、Waltz (1954)²⁷⁾等の報告は、その用いた方法、特に成長度判定法に於て今日の発達せる組織培養法から見て再検討の予地がある。即ち、上記の5人は各々の実験で胎盤の内分泌機能に関する彼等なりの結論を出してはいるが、彼等の用いた成長度判定法を見ると、永山²³⁾は特に成長度判定を行つては居らず又他の Gey²⁴⁾、Jones²⁵⁾、Stewart²⁶⁾も之を行つて居ない。彼等は「はりつけ法」を用いて人胎盤を培養し、その培養液の中に証明されたホルモンを以つて結論を出している。又、Waltz²⁷⁾は perforated cellophane を基質に使用して人胎状奇胎を培養し、彼等なりの観察所見を基礎として成長度判定をなし、それを用いて結論を出してはいるが之も現在の細胞浮游液培養法から見れば古い方法である。従つて之等5人の結論は、現在の進歩せる細胞浮游液培養法に依つて再検討する事が必要である。

現在の細胞浮游液培養法をもつて、人胎盤の内分泌機能解明なる問題を考えた場合には、その実験階梯として次の諸段階が考えられる。即ち、1) 前述せる培養方法

で胎盤細胞を培養し、2) その培養が可能な事を確認し、3) 培養細胞が成長する事を判定し、4) 更に培養細胞を同定してその目指す細胞 (例えば Synzytium 細胞、Langhans 細胞) を 5) 分離し、6) 之等一種の細胞を培養し、7) その培養液についてホルモンの定性定量を行う。この考えから見ても前述の5人の報告は多くの点で厳密性を欠いている。

Thiede (1960)²⁸⁾ 及び Soma (1961)²⁹⁾はこの点に着目し、この進歩せる細胞浮游液培養法を人胎盤の培養に使用してその実験成績を報告している。即ち、Thiede は人胎盤を trypsin で処理し、胎盤細胞を浮游状態にしそれを roller-tube 法で培養し、その培養細胞を組織化学的に染色して培養細胞の同定について論じている。又、Soma も Thiede と同じ方法を用いて人胎盤細胞を最高 25 日間培養し、その培養細胞を用いて細胞同定及び胎盤の内分泌機能の解明について論じている。

今回筆者は同様な方法を用いて人胎盤細胞を培養したが、roller-tube 法では大量培養を行う上に難点があるので TD-40 型の培養瓶で静置培養し、更に前述せる第3段階としての培養細胞の成長度判定のためには植継ぎが必要なので植継ぎ (=継代) を試みた。即ち、筆者は Thiede、Soma と同じ原理で人胎盤細胞を最高 34 日間静置培養した。この方法に依れば、TD-40 型の如き大型の培養瓶の使用が可能である。更に筆者は、全例につき植継ぎに成功し、最高は3回であつた。従つて、今後人胎盤細胞の培養を行つた際には、その培養細胞の成長

第 1 図： 培養せる人胎盤細胞の位相差顕微鏡による観察所見



の程度を細胞数で量的に表現しうると信ずる。勿論、現在の様に多種類の細胞が混合している状態では、それを継代して細胞の増加云々と云つても、どの種類の細胞が増加したのか不明であるが、人胎盤の培養細胞の同定法

が確立され、更に目指す細胞を micromanipulator 等に依つて取出す事が可能になれば、第 1 表の Case III の如く 3 回の継代に耐え、33 日間培養が出来た以上、一種の細胞につきその成長の様子を細胞数で表現出来る筈である。しかし、人胎盤細胞の培養に際しては第 1 図で示せる如き多核細胞や多核の巨大細胞が多く出現しているので 1 核で 1 細胞ありと算定する citric acid 使用の細胞数算定法は使用出来ず細胞そのものを直接算定する事になるが、之等の多核細胞やその他出現した巨大細胞をどの様に扱うかと云う疑問も残る。しかしながら、3 回の継代に耐えて 33 日間培養細胞が生きたと云う事は今後の胎盤細胞の機能研究に大きな力となる事と信ずる。それは、現在迄に発表せられている様な培地で、あまりにも長期間体外培養すると培養細胞は in vivo に於ける細胞と異なつた細胞に変化してしまう事が指摘せられて居り³⁰⁾³¹⁾ 約 1 カ月間生体内と同じ性格で培養が可能になれば充分であると考えからである、Eagle (1959)³²⁾ が細胞培養の栄養代謝に関して試みた考察の中で、「細胞培養を健全に保持し、1 世代の平均時間を 18~24 時間でなく 7 日とする様な生理的保持液の発明が望ましい」と述べているのを見ても、1 カ月間培養が可能であれば、次は細胞の性格を in vivo に於けると同様に保持出来る培地が発明されればよいと思われる。

以上の様な意味に於て、今回筆者が人胎盤から得た浮游細胞を静置培養法使用に依り、5 例につきすべて継代培養し、最高³⁴日間培養した事は、今後の人胎盤細胞の機能研究に益する所があると信ずる。

V 結 論

1) 臨床診断が妊娠 2~3 カ月の人胎盤 5 例につき、それ等を trypsin で処理し、得られた細胞を静置培養した。

2) すべての例について継代を試み、最高は 3 回の植継ぎに成功した。

3) 最高 34 日間培養した。

4) 以上の結果から、細胞培養法利用に依る人胎盤の特定細胞の機能、特に内分泌機能研究の可能性について論じた。

参考文献

- 1) *Harrison, R.*: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 4, 140, 1907. 2) *Fornero, A.*: Pathologica 7, 346, 1915. 3) *Takaoka, T.*: Japan. Jour. Exp. Med. 28, 381, 1958. 4) *Eagle, H.*: Sci. 130, 432, 1959. 5) *Sanford, K.K., Earle, W.R.*, et al.: J. Nat. Cancer Inst. 11, 773, 1951. 6) *Evans, V.J.*, Earle, W.R., et al.: J. Nat. Cancer Inst. 11, 907, 1951. 7) *Katsuta, H.* et al.: Japan. Journ. Exp. Med. 24 (3), 125, 1954. 8) *Moscona, A.* Exp. Cell Res. 3, 535, 1952. 9) *Dulbecco, R.*: Proc. Nat. Acad. Sci., 38, 744, 1952. 10) *Paul, J.*: Cell & Tissue Culture, Livingstone Ltd. 1960. 11) *Zondek, B. & Wolff, E.*: Zbl. f. Gy. 40, 2193, 1924. 12) *Neumann.*: Bcht. ges. Gy. & Geb., H. 1/2 1925. 13) *Guggisberg, H.*, Neuweiler, W. Zbl. f. Gy. 22, 1437, 1926. 14) *Mayer, A., & Heim, K.*: Zbl. f. Gy. 50, 2688, 1926. 15) *Heim, K.*: Zbl. f. Gy. 11, 654, 1927. 16) *Friedheim, E.A.H.*: Soc. biol. Compt. rend. 98, 123, 1928. 17) *Ulesco-Stroganowa.*: Arch. f. Gy. 138, 52, 1929. 18) *Caffier, P.*: Zbl. f. Gy. 38, 2410, 1929. 19) *Sannicandro, G.*: Biol. Abstr., No. 5561, 1936. 20) *Sengupta, B.*: Arch. Exp. Zellfor., 17, 281, 1936. 21) 松本幸次郎: 名古屋医誌 78 (2), 453, (1959). 22) 永山在広: 長崎医誌 15, 2702, (昭 12) 23) 永山在広: 長崎医誌 15, 2708, (昭 12) 24) *Gey, G.O.*: Sci. 88, 306, 1938. 25) *Jones, G.E.S.*, Gey, G.O. Bull. Johns Hopkins Hospit. 72, 26, 1943. 26) *Stewart, H.L.*: J. Clin. Endocrinol. 8, 175, 1948. 27) *Waltz, H.K.*: J. Nat. Cancer Inst. 14, 1173, 1954. 28) *Thiede, A.H.*: Am. J. Obst. & Gynec. 79 (4), 636, 1960. 29) *Soma, H.* et al.: Obst. & Gynec. 18, 704, 1961. 30) *Earle, W.R.*: J. Nat. Cancer Inst. 4, 165, 1943. 31) *Sanford, K.K., Earle, W.R.* et al.: J. Nat. Cancer Inst. 11, 351, 1950. 32) 長木大三: 北里メデイカルニュース No. 80, 30, (昭 36) より引用。

(No. 1587 昭 38・2・4 受付)