

細胞培養に於ける Methocillin の至適添加量について

東北大学医学部産科婦人科学教室（主任 九嶋勝司教授）

五十嵐 彰 多田 和弘
鬼怒川 博久 佐藤 祥男

概要 抗生物質の出現は、組織培養及び細胞培養の普及発展に貢献して来たが、今日、臨床面に於けると同様に、組織及び細胞培養に於ても耐性菌の出現が問題視されている。

著者等は、（1）すべての耐性ブドウ球菌に有効である。（2）他の抗生物質との間に交叉耐性がない。（3）耐性菌を作る事が殆んどない等の諸点で注目を集めている、新たに開発された合成ペニシリン Methocillin について、その組織及び細胞培養の培地内に対する至適添加量を知る目的で実験を行った。

培養細胞としては HeLa 細胞を用いた。次に細胞数の算定には、neutral red を用いて超生体染色を行い、Methocillin の添加量 0, 10, 100, 1,000, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ の5段階について、その細胞数の変化を追跡した。

その結果、Methocillin を組織及び細胞培養の培地に添加する際には50 $\mu\text{g/ml}$ が至適添加量である事を知った。

緒 言

抗生物質の出現に伴う無菌操作の簡易化は、組織培養の普及発展に大いに貢献して来た。特に、細胞培養法の出現は、その多くを抗生物質の出現に負っている。今日では、組織及び細胞培養は、抗生物質をぬきにしては考えられぬ。

抗生物質を雑菌感染予防の目的で、組織及び細胞培養の培地に加えた場合、組織細胞に対し比較的無害である抗生物質も、一定量以上では明らかに之等組織細胞に対して障害を示す。従つて、培地内に抗生物質を添加する際には、使用せんとする抗生物質の細胞に対する毒性の許容量を、正確に把握して使用する事が必要である。

一方、Penicillin（以下 Pc.）に始まる各種抗生物質の開発に伴ない、之等各抗生物質に対する耐性菌の出現は、治療上の大きな問題となつてゐるが、之等耐性菌の出現は組織及び細胞培養にとつても重大問題である。

先に我々は、以上の様な耐性菌の問題解決に資すべく、細胞培養に於ける Kanamycin（以下 KM）の至適添加量を知る目的で、HeLa 細胞を用いて実験を行い報告したが、今回、同様趣旨の実験を、合成ペニシリン Methocillin（以下 Mc）について行つた。

実験材料並びに方法

1) 実験材料

培養細胞としては HeLa 細胞を使用した。培地としては、bovine serum (20%) + LD (80%) を使用した。

Mc. は、明治製菓株式会社から供与されたものを使用した。

2) 実験方法

HeLa 細胞の培養容器としては、目盛付普通短試を用いた（培地は既報¹⁰⁾）。

培地内に添加する Mc. については、0, 10, 100, 1,000, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ の5段階に分け、各々の濃度の培地内で HeLa 細胞を培養し、培養2日目、4日目、7日目に細胞数算定を行つた。

細胞数算定に当つては、各々の添加量の場合について、短試3本の細胞数をかぞえ、その平均値を以つてその培養日の細胞数とした。

尚培養開始時には、各短試につき、HeLa 細胞 2×10^4 を含む培地 1.5ml を注入した。即ち、培養開始時の細胞数は 2×10^4 であつた。

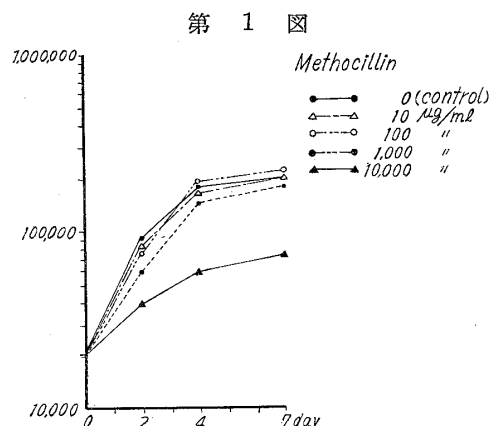
細胞数算定法としては、neutral red 使用に依る超生体染色法を使用した。即ち、培養開始時には細胞数 2×10^4 を各短試に注入したが、その後の細胞数の変化を知る目的で、培養2日、4日、7日目に各々細胞数算定を行つた。その場合、まず培地を捨て、その後 trypsin 溶液 1.5ml を加え HeLa 細胞をガラス壁から落す。細胞が遊離したら、同量の neutral red (phosphate buffered sol. に溶解。濃度 5,000 倍。) をこの trypsin 溶液の上に加重する。この結果、生きている HeLa 細胞は、1,000 倍の濃度の neutral red で染色された事にな

る。この染色せる HeLa 細胞を、3本の短試につき計算し、その平均値を以つてその培養日の細胞数とした。

尚、培地の交換は隔日に行つた。

実験成績

既述の如く、我々は Mc. をその添加濃度で5段階にわけて培地内に注入し、HeLa 細胞の数的変化を指標として、その至適添加量を知るべく実験を行つた。その結果は第1図に示す如くである。



前述の如く、培養開始時の細胞数は $2 \times 10^4/1.5\text{ml}$ であった。

今、各々の添加量の場合についてその培養経過を概説する。

Mc. 0, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ の場合：

Mc. 0 $\mu\text{g/ml}$, 即ち培地内に Mc を添加しない場合には細胞数の増加も非常に良好であつた。又、細胞の“のび”も良好であつた。

Mc. 10 μg , 100 $\mu\text{g/ml}$ の場合も 0 $\mu\text{g/ml}$ の場合と同様に、細胞数の増加及び細胞の“のび”が良好であつた。しかし、10 $\mu\text{g/ml}$ の場合は、0 $\mu\text{g/ml}$ の場合に比して細胞数の増加がやや悪いのが目立つた。一方、100 $\mu\text{g/ml}$ の場合は、0 $\mu\text{g/ml}$ の場合に比して、培養4日目以後の細胞数の増加がより良好であるのは注目される。

Mc. 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の場合：

この場合には前3者に比して明かに細胞数の増加は悪かつた。しかし細胞の“のび”は特に悪いと云う事はなかつた。

Mc. 10,000 $\mu\text{g/ml}$ の場合：

この場合には、以上述べた場合に比して、第1図からも明かな如く細胞数の増加も悪く、又、細胞の“のび”も悪かつた。

総括並びに考按

抗生物質の出現する前までは、絶対無菌的に細胞培養

を継代する事は殆んど不可能と思われていた。従つて Carrel⁴⁾ が、30年間に亘つて鶏胚組織を無菌的に継代し続けられたのは例外中の例外であると考えられた。しかし、抗生物質の出現は之等従来の通念を根本的に変えさせた。緒言でも触れた如く、今日の組織及び細胞培養は抗生物質なしでは考えられぬ。

以上の如く、今日抗生物質は、組織及び細胞培養に於て日常使用せられており、我々も組織及び細胞培養の培地や塩類溶液に Streptomycin (以下 SM.) と Pc. を併用添加する方法を用いている。即ち、SM. 25~50 $\mu\text{g/ml}$, Pc. 50~100単位/ml をその添加量としている。SM. Pc. に関しては、その添加量は以上の値が至適であると見做されている。しかし、抗生物質の添加量決定は、あくまでも厳密な実験をその基礎としなければならぬ。それは、緒言でも触れた如く、抗生物質を細菌感染予防の目的で組織及び細胞培養の培地に加えた場合、組織細胞に対して比較的無害である抗生物質も、一定量以上では明かに障害を示す事が知られており、又抗生物質のあるものは、その有効量に近い量で既に細胞に対し毒性があると云われているからである。

Pc. にはじまる抗生物質の出現以来、多くの人々が、之等抗生物質の培地内至適添加量決定の実験報告を行っている。しかし、抗生物質の培地内至適添加量決定に関する実験は、以前は、培養組織の面積増加を測定して検討されたものが多く、その実験成績は屢々相反する事がある。細胞培養が可能な今日では、当然再検討すべき成績であろう。Oishi (1954)⁵⁾ は、之等先人の実験法の不備を取除いた方法を用いて実験報告を行つている。即ち、彼は simplified replicate tissue culture method⁶⁾ を用いて、Pc., SM., Aureomycin, Terramycin, Chloromycetin, PAS, INAH, Thioacetazon 等広範な抗生物質及び化学療法剤につき、その培地内至適添加量決定の実験を行つている。今回の我々の実験も原理は之と同じである。

一方、抗生物質の出現に伴う耐性菌発生の問題は、治療面に於けると同様、細胞培養に於ても大きな問題であり、之等耐性菌に依つて培地が汚染された場合には、当然之等耐性菌に有効な抗生物質が必要となる。先に我々は、以上の如き問題解決に資すべく、広範な抗菌スペクトルを持ち、且つブドウ球菌、大腸菌に対する耐性獲得や、他剤との交叉耐性を示す事が少ない等の諸点で注目を集めている Kanamycin (以下 KM.) につき、HeLa 細胞の細胞数変化を指標として、その培地内至適添

昭和39年1月1日

五十嵐 他

3-3

第2図 抗菌スペクトラム

病原分類 抗生物質	グラム陽性菌		グラム陰性菌		抗酸菌	放線菌	真菌	ウイルス	リネア	スピロヘータ
	球菌	桿菌	球菌	桿菌						
連鎖球菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
肺炎球菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
破傷風菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
白喉菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
百日咳菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
大腸菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
変形菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
赤痢菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
コレラ菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
傷寒菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
腸チフス菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
副傷寒菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
鼠疫菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
炭疽菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
結核菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
放線菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
真菌	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
ウイルス	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
リネア	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
スピロヘータ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Kanamycin	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Penicillin	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

加量決定の実験を行い、その値として50 μ g/ml が至適¹⁾ある事を報告したが、今回我々は、同様趣旨の実験を合成ペニシリン Methocillin につき行つた。

抗生物質の最初に現われた Pc は、耐性ブドウ球菌の問題及びその副作用等のために一時はその価値を失なつたかの如く思われたが、種々研究改良の結果、すぐれた製品が出現している。今回明治製菓株式会社より市販された Mc. は、その特長として、(1)すべての耐性ブドウ球菌に有効である^{7)~11)}。(2)他の抗生物質との間に交叉耐性がない。(3)殺菌的に作用する⁷⁾⁸⁾⁹⁾。(4)耐性菌を作る可能性が殆んどない⁸⁾⁹⁾。(5)ペニシリナーゼに対してもすこぶる安定である等の長所を有している。又その適応症は、従来のペニシリンの適応症のすべてに有効である(第2図参照)。

今回我々は、このような特長を有する Mc. につき HeLa 細胞の細胞数変化を指標として、その培地内至適添加量決定の実験を行い、その値として10 μ g/ml ~ 100 μ g/ml が至適量である事を知つた(第1図参照)。4日以後の細胞数増加の模様からみれば、100 μ g/ml が至適量であるとも考えられるが、3日迄は control より細胞数増加は少ない点から考えて50 μ g/ml が至適添加量であろう。

以上我々は、細胞培養に於ける耐性菌感染の問題解決に資すべく Mc. について実験を行い、その至適添加量は50 μ g/ml である事を知つたが、この事は今後の組織及び細胞培養に於て大いに意義を有する事と思われる。なぜならば、Rothblat, G.H. et al (1960)¹²⁾ 及び Klieneberger-Nobel, E (1949)¹⁴⁾ も指摘して居る如く、株

化細胞の培養に於て、Pc. の如き抗生物質を日常使用していると、P.P.L.O 及び濾過性細菌の L-form を作るので、常に Pc. を栄養液に加えていると、之等細菌の潜在的感染が起る事が知られているからである。この事は又、日常我々が培地や塩類溶液の滅菌に用いる濾過の操作は無意味となる事をも意味している。この点、今回開発された Mc. は、耐性菌を作る事が殆んどないと云われており、今後の組織及び細胞培養に有意義であると思われる。又、すべての耐性ブドウ球菌に有効である事は、之等耐性菌の抑制滅菌に意義を有するものであろう。

結 論

先に我々は、KMについて、HeLa 細胞の細胞数変化を指標として、その培地内至適添加量決定の実験を行つたが、今回同様趣旨の実験を合成ペニシリン Mc. について行つた。その結果、細胞培養の培地内に対する Mc. の至適添加量は50 μ g/ml である事を知つた。

(終りに、Methocillin を供与された明治製菓株式会社の御好意に対し感謝の意を表する。)

参考文献

- 1) Merchant, J.D. et al.: Handbook of cell & organ culture Burgess publ. comp. U.S.A. 1960.
- 2) Paul, J.: Cell & Tissue Culture Livingstone Ltd. 1960.
- 3) 長木大三: 北里メディカルニュース, No. 79, 4 (昭35).
- 4) Carrel, A.: J. Exp. Med. 15, 516, 1912: 17, 14, 1913: 38, 407, 1923.
- 5) Oishi, Y.: Japan. J. Exp. Med. 24 (3), 169 1954.
- 6) Katsuta, H. et al.: Japan. J. Exp. Med. 24 (3), 1, 1954.
- 7) Rolinson, G.N. et al.: Lancet ii, 564, 1960.
- 8) Stewart, G.T. et al.: Brit. Med. J. 3rd. Sept. 1960, 694.
- 9) Elek, S.D. et al.: Lancet ii, 569, 1960.
- 10) Knox, R.: Brit. Med. J. 3rd. Sept. 1960, 690.
- 11) Thompson, R.E. et al.: Brit. Med. J. 3rd, Sept. 1960, 708.
- 12) Rothblat, G.H. et al.: Proc Soc. Exp. Biol. Med. 100, 87, 1959.
- 13) 勝田甫: 組織培養法, 納谷書店, 1955.
- 14) Klieneberger-Nobel, E.: J. Gen. Microbiol. 3, 434, 1949.
- 15) 日産婦誌に掲載予定。

(No. 1643 昭38・9・2 受付)