

同一培養器中における両生類と魚類の 同時組織培養について

宇都宮泰明・宇都宮妙子

On Simultaneous Tissue Culture of Amphibian and Fish in the
same Rose Chamber.

Yasuaki UTSUNOMIYA and Taeko UTSUNOMIYA

*Department of Food Chemistry and Technology, Faculty of Fisheries and Animal
Husbandry, Hiroshima University, Fukuyama*

(Fig. 1, Table 1, Plates 2)

動物の組織培養が鳥類を用いて始められ、哺乳類、昆虫類等にも及び各方面の分野に多大の貢献をしているが、魚類や両生類の組織培養は余り行われていない。

KEN WOLF¹⁾らはトリプシン処理後エジマス (*Salmo gairdneri*) やウシガエル (*Rana catesbiana*) 等の培養を行なっている。L. WILLIAM CLEM²⁾らは同じくトリプシン処理後 yellow-striped grunt (*Haemulon flavolineatum*), black angelfish (*Pomacanthus sp.*) 等数種の海産魚の組織培養を行なっている。J. BOSS^{3), 4)}はイモリ (*Triturus cristatus*) の肺、心、軟骨その他の組織を培養し有糸分裂を観察している。T. SETO⁵⁾らは両生類の組織の培養について述べている。しかし魚類、両生類は組織を無菌的に取り出すことの困難と、培養液の研究の不足等のため、それらの組織培養は他の動物と比較してかなり困難である。

著者らは種類の異なる二種の動物の組織間の比較や、相互影響を見るために同一培養器の中に1例として両生類と魚類の組織の培養を試み、一応の成功を得たので以下に述べる。

実験材料と方法

材料には福山市内で採集したフナ (*Carassius carassius*) の体腔膜 (peritoneum) と、同じく福山市郊外のイモリ (*Triturus pyrrhogaster*) の肺 (lung) の組織を用いた。これらの組織を無菌的に取り出すためにフナもイモリも生きたまま70%のエタノール中を約5秒間泳がせた後、蒸留水で洗い、両者の場合とも直ちに延髄部を切断し、フナの場合には更にその後、鱗をとり去ってもう一度70%エタノールで殺菌した。

取り出した組織は約1mm平方に細切し、これらを塩類液 (後述のものA+B+C) にペニシリンGカリウムを加えた液中で数回、液を交換しながら洗滌した後培養に用いた。

培養器には組織の生育状態の位相差顕微鏡による観察に便利のため Fig. 1. のような Rose chamber を用い、1つの chamber の中に上述のイモリの肺とフナの体腔膜の組織片をそれぞれ2個づつ入れ、組織片の固定には凝固血漿を用いず、市販のセロファンか又は VISKING の SEAMLESS CELLULOSE TUBE を切り開いたものを用いた。

培養液には Table 1 に示すものを用い、この液 1 ml につき5000単位になるようにペニシリンGカリウムを加えた、培養器は25°Cの恒温箱に入れ光を遮断した。

Table 1. Composition of medium

Eagle's basal medium modified by replacing the salts with following amounts per liter;	
A. NaCl	5.150 gm.
KCl	0.075 "
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.204 "
CaCl ₂	0.045 "
B. Na ₂ HPO ₄	0.030 "
KH ₂ PO ₄	0.0375 "
C. NaHCO ₃	1.0 "
D. Lactalbumin hydrolysate	5.0 gm.

Growth medium was made up as follows;

85%	above medium
5%	chick embryo extract
10%	calf serum.

The pH was adjusted at 7.6 by one or two drops of 1N NaOH or 5% CO₂.

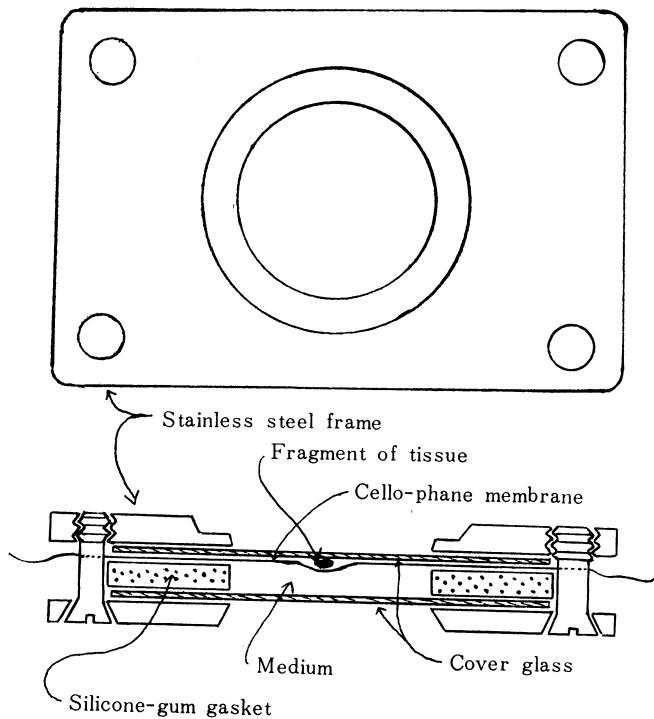


Fig. 1 Rose chamber (life-size)

実験結果および考察

培養1日～2日後に原組織片からの遊走細胞が見られるようになり3日～4日と次第に増加すると共に両組織ともそれぞれ単層のシート状に拡がってくる。しかし培養の際の無菌操作に失敗した chamber では、この頃になると菌或いはカビの増殖により次第に細胞の変異をおこし、やがて死滅に到った。

一般にフナの場合シート状に拡がった細胞群は上皮性細胞と線維細胞性のものと互いに混ざることなくそれぞれ別のシートを形成し両シートの境界は明瞭であった。

5日～6日頃になるとますます細胞のシートは拡がり、イモリの組織ではしばしば分裂像も見られるようになる。又一部の上皮性細胞には繊毛を生じて盛んに運動して液流を生じているのが見られ、7日～8日頃になるとフナの明るくシート状に並んだ細胞の上に黒い多数の色素を有する色素胞と思われる細胞が単独で出現する。後にこれは連なって出現してくる。又グアニンと思われる長方形の結晶を有する細胞が出現する場合もある。

培養に成功した chamber は大部分が2週間位まで次第に増殖してゆくが、その後は増殖は次第ににぶり、細胞中に空胞を生じたり、又イモリの場合では多核巨大細胞を生じたりして次第に変性に傾くようになった。

著者らは、この培養方法でフナおよびイモリの単独組織培養を予備実験として行ない、それぞれ良好な結果を得ているが、両組織を同一培養器内で培養した結果と比較して、検鏡結果だけでは明瞭な差は得られなかった。しかし培養期間が約2週間と短かいので、トリプシン前処理をし、より長期間培養をして見ないと単独培養との差は云々できないであろう。

イモリの場合、個々の細胞も大きく、又細胞分裂に要する時間も長いのでしばしば分裂像を観察できたが、フナの場合は分裂像を見つけることはかなり困難であった。しかしシート状に拡がった量を見ても、そのシートが上皮性細胞のものと同様に線維細胞性からのものと明瞭に分かれて拡がってくることから見ても、又初期に見られなかった、イモリの場合の繊毛細胞、フナの場合の色素細胞、グアニンを有する細胞の出現等を総合して考察すると、シート状の拡がり、単なる原組織からの細胞の遊走 (migration) によるだけではなく、細胞の分裂増殖による結果であると断定しても誤りではないであろう。

種類の異なる動物の組織間の比較や、相互影響を研究する手段の一つとして、この研究で行なった培養を使用することができると思われる。

文 献

- 1) KEN, WOLF, and DUNBAR, C. E.: *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine*, **95**, 455-458 (1957).
- 2) WILLIAM, CLEM, L., MOEWUS, LISETTE, and MICHAEL, SIGEL, M.: *Proceedings of the Society for experimental biology and Medicine*, **108**, 762-766 (1961).
- 3) BOSS, J.: *Exptl. Cell Research*, **7**, 215-231 (1954).
- 4) BOSS, J.: *Exptl. Cell Research*, **7**, 443-456 (1954).
- 5) SETO, T.: *Methods in Cell Physiology*, **3**, 75-94 (1968).

SUMMARY

Two kinds of tissues obtained from a newt lung and a clucian carp peritoneum were cultured in the same chamber.

When medium modified from Eagle's basal medium was employed, the culture was successful. Although the culture period was relatively short, there were no remarkable differences in appearance of growth, between each one of both tissues in the same chamber and tissues cultured separately.

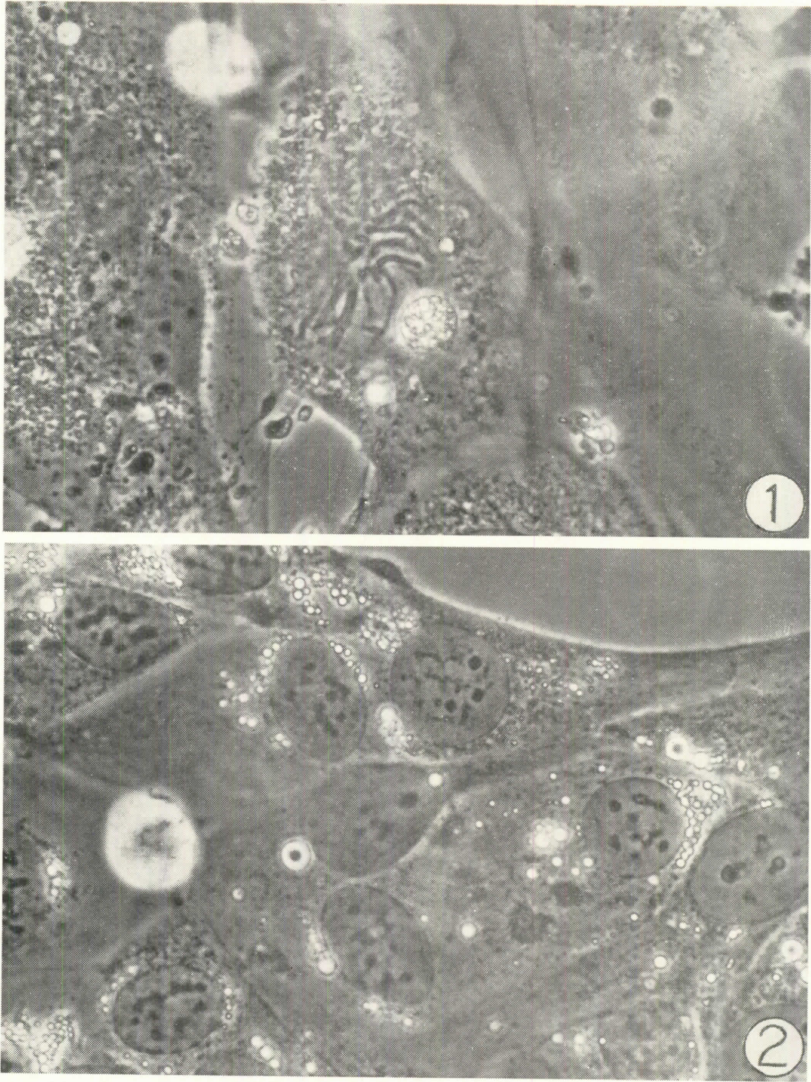


Plate 1 Epithelium-like outgrowth from a fragment of lung tissue of a newt (*Triturus pyrrhogaster*), 7-day culture in the Rose chamber. $\times 600$, phase-contrast microscopy.

Fig. 1 A mitotic cell is observed.

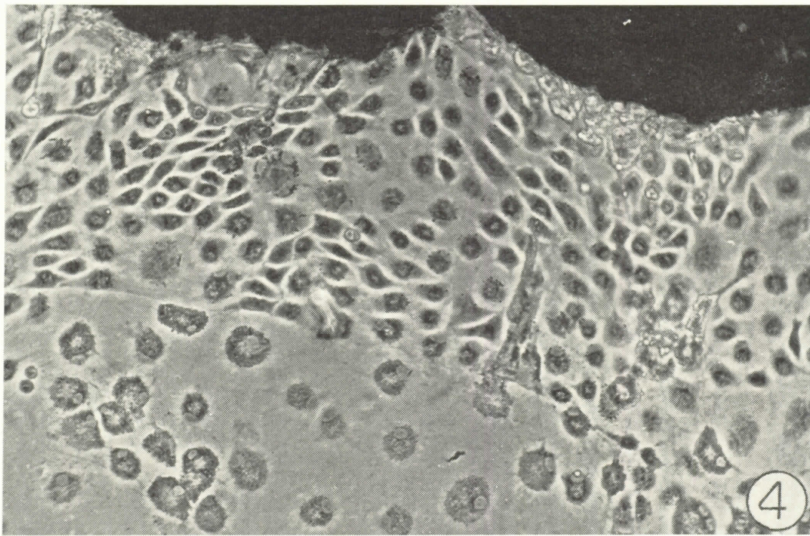
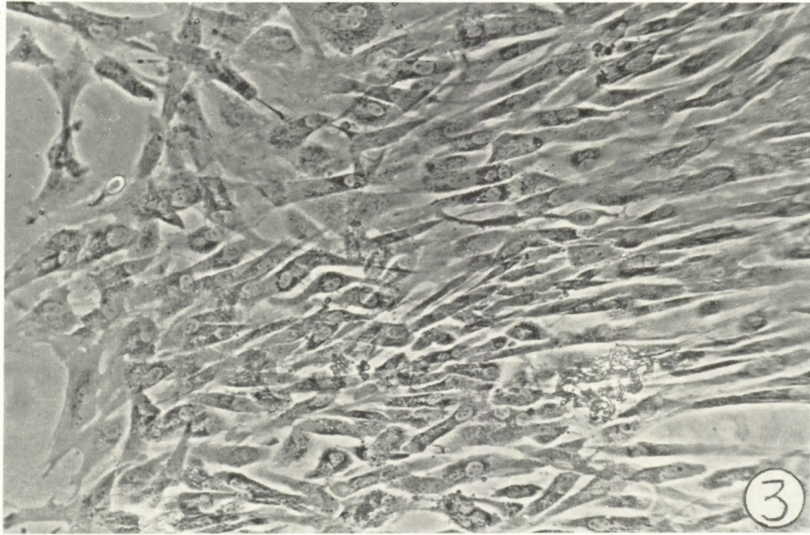


Plate 2 Outgrowth from a fragment of peritoneum of a clucian carp (*Carassius carassius*), 7-day culture in the Rose chamber. $\times 600$, phase-contrast microscopy.

Fig. 3 Fibroblast-like cells outgrowth.

Fig. 4 Fibroblast-like cells and epithelium-like cells.