

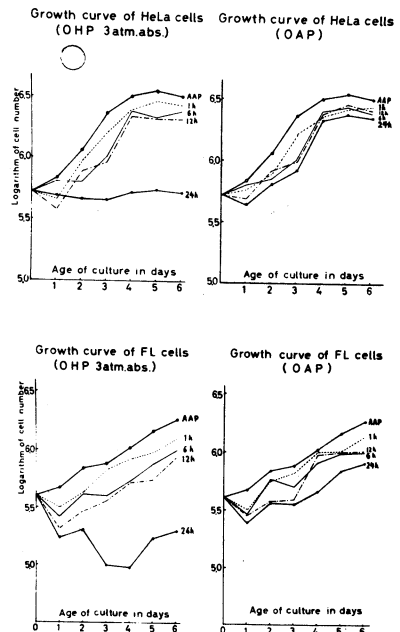
B-20 高気圧酸素環境の組織培養下における  
細胞増殖におよぼす影響。

名古屋大学、橋本外科、○須野多一、服部龍夫、森 澄、長田卓二、武市 暁、  
岡田達郎、紀 菱 毅、窪田博行、柳原欣作。

高気圧酸素環境(OHP)の悪性腫瘍におよぼす影響の検討の一環として癌細胞自身  
に対しておこす影響、すなわちOHPの細胞レベルにおける解析を目的として組織  
培養下での細胞増殖について検討したので報告する。

実験方法: HeLa, FL細胞のmonolayer cultureと吉田肉腫腹水細胞のprimary replicate  
tissue culture。HeLa, FLには calf serum 10%を含むYLE, LHを、吉田肉腫には、  
Eagle's MEMに20% calf serum, L-serine (0.2 mM), Pyruvic acid (1 mM) を加えた  
ものをそれぞれ growth mediumとして用いた。加圧ならびに加圧ガスの条件から、  
OHP(3絶対気圧純酸素)、OAP(大気圧純酸素)、AHP(3絶対気圧、空気)、AAP(大気圧、空気)  
の4群を観察の対象とし、このうち前三者を実験群、AAPを対照群とした。観察は6  
日間までとし、その間24時間毎にクリスタル紫クエン酸液による核数計算を行ない  
細胞増殖を追求し、2日、4日目は位相差顕微鏡とカバースリップHE染色標本によ  
る形態学的観察を加えた。酸素欠置期間のpH controlorにはTHAM (tris-hydroxymethyl  
aminomethane) を5 mM ~ 10 mM 濃度として用いた。すなわちHeLa, FLの場合酸素欠  
置期間中は実験群と同様に対照群もLH-tris mediumを用い、酸素欠置終了後は両者共  
NaHCO<sub>3</sub>を含むYLE mediumに交換してCO<sub>2</sub> incubatorに移し、以後はmedium changeを行わ  
ずに観察した。吉田肉腫の場合、MEM-tris mediumによるcell suspensionを90x150mm  
の小試験管に各1 mlずつ加え、孔あきAluminium foilにて試験管を覆いOHP欠置を行  
ない、終了後はNaHCO<sub>3</sub>を含むMEM growth mediumを1 ml追加、ゴム栓にて密封し37°C  
incubator内にて静置培養をつづけた。

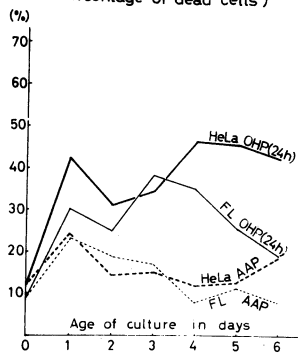
実験結果: 各 material 3 T を選り標準偏差検定  
して平均値を求めてplotした。Fig. 1. は酸素欠置期  
間により1, 6, 12, 24時間の4群に分け、極込み直后  
にOHP, OAP欠置した場合のHeLa growth curveを示し  
Fig. 2. は同様な実験のFL growth curveを示す。HeLaで  
は対照群は5日目でmaximum  $3.4 \times 10^6$ /dishに達し、  
monolayerとなすのに対し、OAP群ではlag phase  
の延長が認められとくにOHP 24時間群で著明であ  
り、maximum sizeも  $2.39 \times 10^6$ /dishと対照に比して  
低い。OHP群においての欠置時間による差は更に  
明瞭で、ことにOHP 24時間群では欠置後もひきつ  
づき増殖の抑制が持続され、増殖が認められず、  
OAP 24時間群と著明な差を示した。FLではHeLaと  
同様な傾向を示すかOHP 24時間群で観察の続羊も  
増殖の傾向がみられたのでさらに詳しく両者の



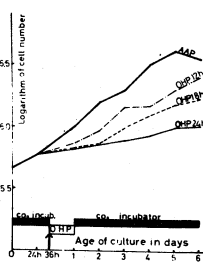
OHP 24時間群を分析するため、0.05% Eosin-Hanks 液を用いて viable cell count を行った。(Fig. 3)。dead cell の百分率は HeLa では対照群に比して終始高率を示したのに対して FL では OHP 処置後3日目より順次下降を示し viable cell の増殖を認めた。更に植込み後36時間を至て、附着増殖(ているもの)に対して12,18,24時間夫々 OHP 処置した場合の結果を Fig. 4 に示す。HeLa, FL 共大抵同様の傾向でこの場合、OHP 処置後の増殖抑制効果は植込み直後のものに対して低く、OHP 24時間処置後も増殖が認められた。更に AHP 24時間処置群の増殖を追求して OHP の影響と比較すると、Fig. 5 の如く、HeLa, FL 共に AHP においてはその後の増殖抑制は認められず、OHP 24時間群と著明な差が認められた。明らかに malignancy を有する細胞に対しての OHP の影響をみるために、吉田肉腫腹水細胞を用いて検討した。L-serine, pyruvic acid を含む MEM medium によって、その primary culture の良好な増殖率を得、さらに in vitro 4日目の culture を retransplantation することによって明らかに malignancy を有していることを究明し得た。OHP 24時間処置による細胞増殖は Fig. 6 に示す如く全くみられず、順次細胞数の減少を認め、又位相差顕微鏡下においても細胞破壊産物や、顆粒を多く含むもの、膨化した細胞等も多数認められた。以上の実験結果をまとめてみると、実験群では lag が延長し処置時間の延長はこの傾向を増大する。OHP 群と OAP 群(共に24時間処置)を比較すると、OAP 群は以後増殖するか OHP 群は増殖かみられず、植込み36時間後の附着増殖しはじめたものに対するよりも、浮游細胞すなわち植込み直後のものに対する OHP の影響の方がより大である。AHP 24時間処置による細胞増殖抑制効果は OHP のそれに対してはるかに小さい。HeLa, FL の間には cell line による若干の差異が認められ、HeLa に対する OHP 効果の方がやや強い傾向にあり、さらにこの二者に比して吉田肉腫に対する増殖抑制効果は、はるかに大であった。

以上組織培養下において、HeLa, FL, 吉田肉腫の細胞増殖を追求して OHP の細胞レベルにおける影響を検討した。

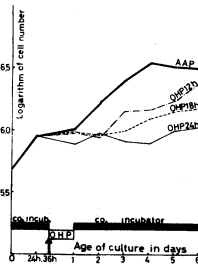
Viability of HeLa & FL  
(Percentage of dead cells)



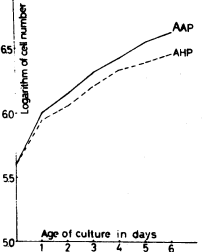
Growth curve of HeLa cells  
OHP 3atm. abs. after attached



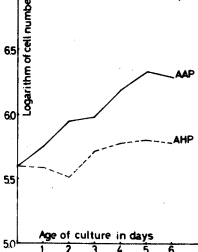
Growth curve of FL cells  
OHP 3atm. abs. after attached



Growth curve of FL cells  
(AHP 24h, 3atm. abs.)



Growth curve of HeLa cells  
(AHP 24h, 3atm. abs.)



Growth curve of Yoshida sarcoma cells  
(OHP 24h, 3atm. abs.)

