

軟骨細胞の組織培養に関する研究

第 I 編 小軟骨細胞の組織培養

京都大学医学部整形外科科学教室 (主任 近藤鋭矢教授)

鶴 海 寛 治

〔原稿受付 昭和33年 8 月15日〕

TISSUE CULTURE STUDIES OF CARTILAGE CELLS

CHAPTER I.

TISSUE CULTURE OF SMALL CARTILAGE CELLS

by

KANJI TURUMI

From the Orthopaedic Division, Kyoto University Medical School
(Director; Prof. Dr. EISHI KONDO)

Up to the recent times, the pure culture of cartilage cells had been considered as extremely difficult or impossible. From the cartilage tissue which was digested by the action of an enzyme, however, pure cartilage cells were developed fairly rapidly in vitro.

Use was made of 9 to 12 day chick embryos in their maxilla, scleral cartilage, and lower part of the tibia.

The materials teased into tiny fragments were digested in trypsin solution for 40 to 50 minutes and then embedded in a plasma clot. On that occasion, both single and double cover glass methods were employed.

Cartilage cells in the clot develop and enlarge rapidly to form spindles which have a close resemblance to fibroblasts in their shape. When India ink is added, cartilage cells take up the dye. Hence, they are differentiated from fibroblasts.

Mitosis was observed, but no amitosis.

With regard to the development of cartilage cells, the higher the degree of digestion of the ground substance of cartilage the better the results obtained.

The failures which have appeared in the common method are due to the merging of cartilage cells with the hard ground substance.

Experiments in the common method were undertaken with success in 2~10%, on the other hand, with the cartilage tissue which was digested in trypsin solution, the experiments were also undertaken with success in 90 to 100%.

内 容 目 次

緒 言

第1章 普通培養法

〔I〕 実験材料及び実験方法

〔II〕 観察方法

〔Ⅲ〕 実験成績

第2章 トリプシンで消化した軟骨組織の培養

第1項 長時間消化した軟骨組織の培養

〔Ⅰ〕 実験材料及び実験方法

〔Ⅱ〕 観察方法

〔Ⅲ〕 実験成績

- i) 培養軟骨細胞の形態
- ii) 培養軟骨細胞の発育及び増殖

緒 言

軟骨細胞の形態、機能に関する従来の研究は多くは組織学的研究法に拠っているが、組織は生体内では極めて複雑な全身、局所の綜合作用を蒙つて居り、且つ軟骨は環境に対する変化の発現が比較的緩徐である為、生体内の観察によつて軟骨細胞の性状を分析、説明する事は必ずしも容易ではない。

之に対して組織培養法は硝子器内の特殊環境下に細胞を發育させるものであるから、その所見を直ちに生体に当嵌める事は適当でないが、細胞を生態に於て観察し、之に諸条件を単純化し、且つ適当に撰択して与え得る利点があり、生体の複雑な現象を分析する上には極めて優秀な方法である。

軟骨組織の組織培養は1910年Carrel and Burrowsにより試みられ、Demuthは鶏胚腓骨を培養してその生長を観察した。1928年H. B. Fellは鶏胚脚軟骨を培養してその生長及び骨形成について詳細な報告をしている。其の後 H. B. Fell and Robison, Niven, Studitsky 及び Roulet は脚軟骨、下顎骨、前頭骨を培養し、又近年我が国に於ても中川、立岩、吉沢等により鶏胚脚軟骨の培養が行われているが、之等の研究はいづれも軟骨組織を培養し、器官として生長、分化させる方法であつて、軟骨細胞の培養を意図したものではない。

Dolschanski, H. B. Fell, A. Fischer, 一ノ瀬等は軟骨膜よりChondrioblastenを培養し、軟骨の形成される事を認めているが、軟骨細胞を培養したものとは云い難い。

1952年Moscona and Mosconaは孵化4日目の鶏胚脚原基の細胞を培養し、固形培地上と液体培地中では培養細胞の形態に相異がある事を報告しているが、孵化4日目の鶏胚脚原基の細胞は未分化中胚葉細胞と前軟骨細胞から成つて居るものであるから、完成した軟骨細胞を培養したものではない。

iii) 墨汁食作用及び生体染色所見

iv) 培養軟骨細胞の変性及び壊死

第2項 短時間消化した軟骨組織の培養

〔Ⅰ〕 実験材料及び実験方法

〔Ⅱ〕 実験成績

総括及び考察

結 語

軟骨細胞の培養に関しては A. Fischer 及び A. Fischer und Demuthの報告があるのみである。

1922年 A. Fischerは鶏胚鞏膜軟骨を培養して軟骨細胞の純培養に成功した。氏は孵化15日～18日目の鶏胚鞏膜軟骨を培養して、軟骨細胞は血漿膜表面にのみ増殖、生長する事を認めている。又 A. Fischer und Demuthは鶏胚脚軟骨より軟骨細胞を培養し、培養軟骨細胞は線維芽細胞に似た形態を呈する事を観察している。

以上が軟骨に関する組織培養の歴史の大略であるが、従来の研究は主に軟骨組織の分化、骨・軟骨形成の問題に集中して居り、軟骨細胞の純培養に関しては A. Fischer, A. Fischer und Demuthの報告以来今日迄その追試さえ見当らず、従つて培養軟骨細胞の性状に関しても疑問の点が少くない。

著者は軟骨細胞の性状を解明する為の1手段として A. Fischer 及び A. Fischer und Demuthの実験を追試し、軟骨細胞の純培養を得んとしたが之は極めて困難であつた。而てこの難培養性は軟骨基質に原因する事が分つたので、トリプシンで予め軟骨基質を軟化すれば軟骨細胞は極めて容易に培養出来る事を知つた。

本編に於ては小軟骨細胞の普通培養法による成績と共に著者のトリプシンで消化した軟骨組織の培養についてその方法並びに所見を報告するものである。

第1章 普通培養法

〔Ⅰ〕 実験材料及び実験方法

組織培養の手技に関しては、木村廉著「組織培養」及び勝田甫著「組織培養法」の記載に従つたので詳細は省略し、必要と思われる2, 3の事項についてのみ記述する。

1) 培養液

塩類溶液; pH 7.8に調製した Tyrode 液を使用した。

支持体；凝固血漿を用いた。之に要するヘパリン血漿は生後6ヶ月～18ヶ月の健康な雄鶏の翼静脈より採取した。ヘパリンは和光製薬工業社製の Heparin-Na を Ringer 液にて1000倍に稀釈溶解し、1cc宛アンプルに分注、1気圧下20分間高压滅菌した後氷室に保存し、採血量の $\frac{1}{15}$ ～ $\frac{1}{20}$ 量を使用した。鶏胚圧搾液は孵化7日～9日目の鶏胚を Fischer-木村式圧搾器で圧搾、2500回転、20分間以上遠心沈澱しその上澄液を使用した。圧搾液は氷室中に保存したが、4日以上経たものは用いなかた。

2) 培養組織

培養した主な組織は鶏胚の上顎骨、鞏膜軟骨、脛骨踝部である。(Fig. 1.)

上顎骨は孵化9日～10日目の鶏胚より、鞏膜軟骨は孵化12日～20日目の鶏胚より、脛骨踝部は孵化12日目の鶏胚より採取した

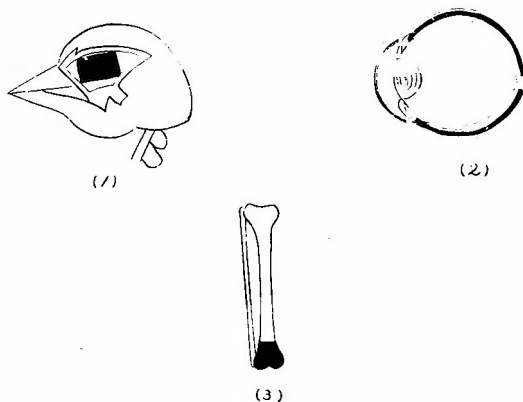


Fig. 1 培養組織採取部位 (■部)

(1) 上顎骨 (2) 鞏膜軟骨 (3) 脛骨踝部

採取法；鞏膜軟骨、脛骨踝部に就ては第2章に詳述するので省略し、茲では上顎骨の採取法のみを述べる。

鶏胚上顎骨は眼窩内壁を構成し、前方は嘴についでいる。先ず両側眼球を剔出すれば嘴につづく上顎骨が現われるから、之を上下、前後の連絡を切り破損せぬ様に取り出す。培養に使用するのは眼球に接する上顎中央の平滑な部分のみである。中央平滑部を取り巻くや、硬い肥厚部には軟部が固着しその分離が困難であるから刀で切り捨てる。この切り捨て範囲が不十分であると軟部が残存し、又この部の軟部を強いて分離しやうとすれば組織が破損し使用出来なくなる事があるから充分な範囲に互つて切り捨てなければならぬ。

次に残った中央平滑部を針で押え、グレーフェ刀の

背及び刃を用いてその表面を撫でる様に静かに慎重に擦り軟部を除去する。之を両面に互り丹念に行つて軟部を完全に取り除く。この操作は培養の純、不純を決するもので最も重要な手技であるが、刀に力を入れ過ると組織の破損、傷害を来すし、余りに軽に行うと軟部が残るので相当の熟練を要する。軟部が完全に分離したならば、組織を型の如く細切し培養組織片とする。その大きさは1mm×1mm以下とする。

3) 培養方法

単一及び二重カバーガラス培養法；単一カバーガラス培養法では18×32mm、二重カバーガラス培養法では18mm×18mmのカバーガラス上に培養した。二重カバーガラス培養法では48時間毎に養液を追加した。即ち培養カバーガラスを Tyrode 液中に5分間浸めて培地を洗滌した後濾紙に立てかけて水を切り、之に血漿少量($\frac{1}{2}$ ～ $\frac{1}{3}$ 滴)と50%鶏胚圧搾液1滴を加える。圧搾液のみの添加は液が流れ易く操作がむづかしいので、培地の融解程度は顧慮せず全てに血漿と圧搾液を追加した。培養はいつでも上向き(inverted position)で行つた。

Carrel瓶培養法；D 3.5の Carrel 瓶を用いた。

固形成分は $\left\{ \begin{array}{l} \text{血漿} \quad 0.3\text{cc} \\ \text{20\%鶏胚圧搾液} \quad 0.6\text{cc} \end{array} \right.$

液状成分は20%鶏胚圧搾液0.6ccとし、1個の瓶に3組織片を培養した。

試験管内短冊培養法；カバーガラス培養法は観察及び永久標本の作成に便利であるが培養成績は不良である。瓶法は培養成績より良好であるが、永久標本の作成に難しいので、瓶法の長所をとり而も永久標本の作成に便利な様に意図して行つたものである。長さ11cm、径1.3cmの短試験管と長さ4.3cm、巾0.8cmに切つた短冊型カバーガラスを用意する。この短冊カバーガラス上に血漿及び50%鶏胚圧搾液を各1滴々下し混和し乍ら0.5×1.0cmの楕円形に拡げ、この中に組織片1個を静置する。同様にして1カバーガラスに3～4個の組織片を植え、血漿が充分凝固した後上記試験管中に上向きになる様に入れ、管壁に沿つて静かに20%鶏胚圧搾液1ccを注ぎ込んだ後密栓し、養液が充分カバーガラスを浸す様に出来るだけ水平位に近く静置して培養する。

いずれの方法に於ても組織片は血漿膜中に置き、培養温度は38℃とした。

〔Ⅱ〕 観察方法

生態に就ては24時間毎に観察した。染色標本は Car-

noy 液又は2% Ringer-Formol 液で固定し、ヘマトキシリン単染色又はヘマトキシリン-エオジン2重染色を施した。

〔Ⅲ〕 実験成績

i) 上顎骨の培養所見

a) カバーガラス培養法

培養24時間目の所見；母組織内の軟骨細胞は肥大し、橢円形乃至短紡錘形となり、周辺部の軟骨細胞中には更に肥大した橢円形、短紡錘形のものや、蝌蚪状に短い原形質突起を出しているものもある。胞体内には光を屈折する小顆粒が多数出現し、未培養の細胞に較べて暗く見える。染色標本に於ては胞体、核とも未培養細胞に較べてヘマトキシリンに濃く染り、核は円形で染色顆粒に富み、比較的明瞭な1個、時に2個の核小体を有する。又時に胞体内に空泡を見る事もある。組織外への放射状の細胞游出は見られない。唯蝌蚪状、短紡錘形、又は紡錘形の細胞数個が母組織辺縁に平行密着して游出しているのが見られる。この游出細胞は光を屈折する顆粒に富み、胞体は分岐せず、線維芽細胞より短かく且つ太い。染色標本では胞体、核ともにヘマトキシリンに強く染り、核は多くは円形、時に短橢円形で染色顆粒に富み明瞭な1個、時に2個の核小体を認める。この游出細胞は母組織辺縁部の軟骨細胞と生態に於ても、染色標本に於ても極めて似た形態、染色態度を示すから組織内軟骨細胞の游出したものと考えられる。

軟部の附着している組織片からは已に旺盛な線維芽細胞の發育を見る。線維芽細胞は広く、長く、菲薄で、橢円形の核内に特有な形の核小体2個を有し、ヘマトキシリンの染り方も弱いので上記の游出細胞とは区別する事が出来る。純粋の軟骨組織からはこの時期には未だ放射状の細胞游出は見られない。従つて培養24時間目に已に盛んな紡錘細胞の發育を見るものは線維芽細胞である。

培養48時間目の所見；母組織より放射状に細胞が發育し始める。母組織近傍の細胞は培養24時間目に游出する軟骨細胞に似て胞体内に顆粒を有し、太く、短かく、ヘマトキシリンに濃く染るが、生長帯周辺部のものは互に突起をもつて連絡し、幅広く、核は橢円形で2個の核小体を有し、ヘマトキシリンの染りも淡く、線維芽細胞に似た所見を呈している。生長帯の面積は細胞の發育良好なものに於ても鶏胚心組織の培養12時間目の大きさに匹敵する程度である。

培養72時間目の所見；細胞の發育は旺盛となる。細

胞は紡錘形で、顆粒少く、生態では明るく見える。細胞は菲薄で幅が広く、核は橢円形で中に不正円形の核小体1個～2個を有し、ヘマトキシリンの染り方は淡く、細胞間は細い原形質突起を以て繋がり、その形態、染色態度、配列共に線維芽細胞に酷似した状態となる。(Fig. 4 (A), (B)) 細胞の發育良好なものでは培養開始時4角形であつた母組織片は円味を帯び游出細胞部との境界は不鮮明となり、基質はヘマトキシリンに染り難くなる。

培養96時間目の所見；細胞の發育は益々旺盛である。細胞の形態学的所見は培養72時間目のものと同一である。

カバーガラス培養法に於ては培養組織片総数の2～3%に旺盛な軟骨細胞の發育をみたに過ぎず、大多数の組織片は何等の細胞も發育しないまま、で死滅する。

この成績は他種細胞の培養成績に較べれば極めて不良で、軟骨細胞の培養は困難なものである事を示している。

b) Carrel 瓶培養法

培養所見はカバーガラス培養法と略々同様で、培養24時間目には数個の紡錘細胞の游出を見るに過ぎないが、培養48時間目頃より細胞の發育は旺盛となり、培養1週間目迄は液状成分の更新を行わずとも増殖しつづける。培養細胞の形態学的所見はカバーガラス培養法に於けると同一である。

瓶法では培養組織片総数の10%に軟骨細胞の發育をみる事が出来、カバーガラス培養法に比しやゝ良好な成績を得る事が出来た。

c) 試験管内短冊培養法

細胞の發育状態、形態学的所見は前記2法と異る所はない。培養組織片総数の約6%に細胞の發育を見、カバーガラス培養法に較べればやゝ良好な成績であつたが、この方法の最大の欠点は培地の液化が起る事である。細胞の發育したものでは殆んど全て培養48～72時間目には培地が融解し、細胞間の連絡が切れて發育は停止し、終には母組織が養液中に剝離、浮游する状態となる。同一カバーガラス上に鶏胚心組織片を培養してみると、この程度の時間では培地の融解は著明ではなく、線維芽細胞はよく發育をつづけている。

ii) 鞏膜軟骨の培養所見

いづれの方法を用いても軟骨細胞の發育はみられなかつた。A. Fischer に従ひ血漿膜表面にも培養してみたが、軟骨細胞は發育しなかつた。培養組織片には所々に円形の細胞壊死部を生じ、之が次第に拡がつて

終には組織片全体の壊死を招き何等の細胞も發育しなかつた。

iii) 脛骨踝部の培養所見

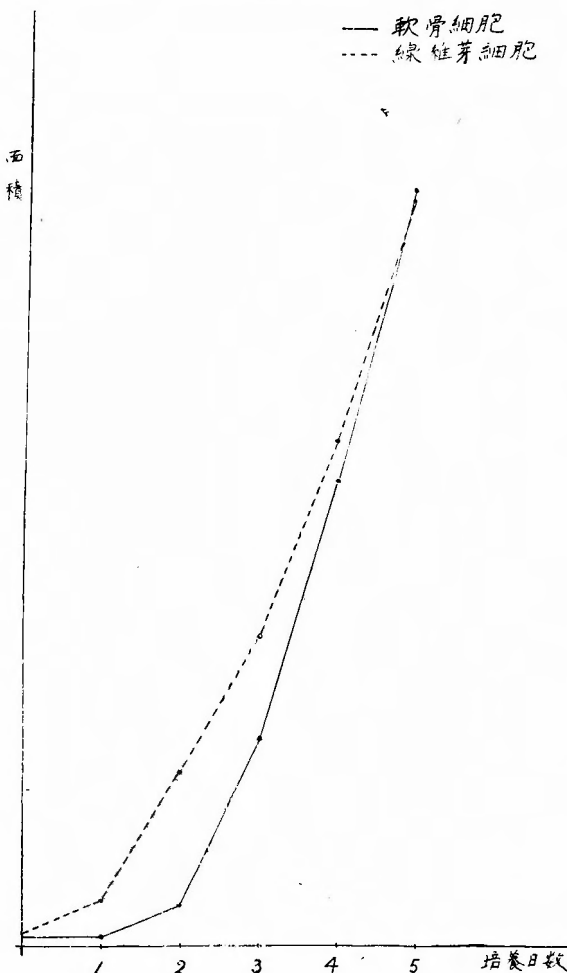
培養12~24時間目に比較的旺盛な紡錘細胞の發育をみる。その形態は線維芽細胞と全く同一のものや、やゝ太く短いものもみられるが、組織片の切口からは發育せず、踝部外縁から先ず發育し始める。培養細胞の形態は種々の条件によつて多少の変異をみるものであるから形態のみを以て細胞の由來を断ずる事は危険であるが、第2章で詳述する如く、トリプシンで消化した純粹の脛骨踝部軟骨の培養では軟骨細胞は組織の最も薄い切口の部分から發育し始め、踝部外縁の如き組織の厚い部分からの發育は遅れ、又時には軟骨細胞の發育をみない事もあるから、普通培養法に於てかゝる

早期に軟骨細胞が好んで組織の最も厚い踝部外縁から發育するとは考えられない。従つて之は附着軟部から發育した線維芽細胞で軟骨細胞ではない。即ち脛骨踝部は單なる機械的操作のみを以てしては軟部の完全分離は不可能で線維芽細胞の混入は避け難い。

iv) 培養軟骨細胞の生長

上記の如くして Carrel 瓶に培養した上顎骨中生長良好なものの10個の生長価平均値を曲線に描けばFig. 2の如くである。点線は同時に培養した鶏胚心組織から發育した線維芽細胞の生長曲線である。いづれも初代培養で継代培養をしたものではない。又液状成分も更新していない。軟骨細胞の生長曲線は培養48時間目以後は急峻な上昇を示している。

Fig. 2 軟骨細胞の生長曲線



第2章 トリプシンで消化した軟骨組織の培養

第1項 長時間消化した軟骨組織の培養

〔I〕 実験材料及び実験方法

1) 培養液

第1章に記した通りである。

2) 培養組織

培養した軟骨組織は鶏胚上顎骨、鞏膜軟骨、及び脛骨踝部である。(Fig. 1)

採取法

上顎骨；孵化8日目以下の鶏胚のものは軟弱過ぎて操作がむづかしく、孵化12日目以上のものでは硬過ぎ、又中心部に化骨点を見る事があるので、孵化9日~11日目の鶏胚より採取したが、軟部分離及びトリプシン消化の容易な点から孵化10日目鶏胚の上顎骨が最も好適である。採取手技については第1章に詳述した通りである。

鞏膜軟骨；孵化9日~12日目の鶏胚より採取したが、採取手技、トリプシン消化の点から孵化10日目及び11日目のものが最適であつた。

眼球を出来るだけ周囲組織をつけぬ様に取り出し、前額面で半切し、前半部眼球のみを使用する。後半部眼球の軟骨は薄く、軟弱である上に附着軟部が多いので操作がむづかしい。先ず前半部眼球の内容を掻き出した後、眼球壁を矢状軸で切り、数個の3角形の組織片とする。角膜はつけたまゝにしておき針で角膜を押え乍ら網膜の一端をピンセットで摘み、破らない様に静かに網膜を引き剥す。次に鞏膜も同様にして丁寧に剥す。いづれも千切れて残らない様に1枚として剥ぎ取る事

が必要である。次に角膜及び之につゞく鞏膜軟骨の小部分を切り捨てる。かくて透明な薄板状の純粹軟骨組織を得る事が出来る。之をトリブシンの消化が容易になるように細切する。従つて普通培養法に於ける如き精密な細切は必要でなく、多少の大小不同を顧慮する必要はない。

脛骨踝部；先ずアキレス腱を切断する。この際足関節囊も切れているから足関節を背屈すれば容易に脱臼し脛骨下端が露出する。

次に中足部をピンセットで掴み、軟部を中枢側に引き剥して脛骨を取り出す。踝部に附着している軟部を出来るだけ剝離した後、踝直上部で切断し踝部を2～3個に切つて用いる。

3) トリブシン消化の要領

トリブシンは持田製薬製トリブシリンを使用した。本品は1アンプル中に10,000ヘモグロビン単位のトリブシリンを納れている。溶媒は之に附属しているSörensen液に150倍重曹水を加えpH7.8としたものを用い、溶液1cc当り2,000ヘモグロビン単位のトリブシンを含有する如く調製した。

i) 上顎骨及び鞏膜軟骨の消化；トリブシン溶液を容れた遠心沈澱管に上記の如く細切した組織片を移し、管口を密栓して37°Cの恒温器内に置く。10分毎に攪拌して組織の分解を促進する。30分位経つとトリブシン溶液は少しく混濁して来、組織片は次第に微細な屑片に分解して来るが更に10分～20分間消化をつゞけ出来るだけ小さな組織屑片に分解する。消化開始後40分～50分したならば之を遠心沈澱し、上澄を捨て、沈渣にTyrode液を加え攪拌、洗滌し、再び遠心沈澱する。この操作を3回繰り返して充分洗滌した後上澄を捨て沈渣に極く少量のTyrode液を加え、攪拌し、沈澱した組織屑片を之に浮遊せしめる。次に最後に加えたTyrode液と等量の鶏胚圧搾液を加え軟骨組織屑片の浮遊した50%鶏胚圧搾液とする。培養に際してはカバーガラス上にヘパリン血漿1滴を滴下し、之に上の如くして得た組織屑片浮遊圧搾液1滴を加え、静かに混和し乍ら径1cm～1.5cmの円に拡げ、カバーガラス培養とする。

ii) 脛骨踝部；上顎骨、鞏膜軟骨のトリブシン消化の目的は軟骨基質を軟化する事にあるが、脛骨踝部に於てはこの他に機械的操作によつてなお除去し得なかつた残存軟部を融解脱落させて純粹の軟骨組織を得る事にある。前述の如くして得た踝部をトリブシン溶液を容れた短試験管に移し、37°Cの恒温器中で40分～50

分間消化する。この間5分～10分毎に攪拌して消化を促進する。10分～15分すれば軟部は粘液様に融解し攪拌すれば容易に脱落する様になるが、完全を期するため更に30分～40分間消化をつゞけると軟部及び辺縁部軟骨の1部は脱落し純粹の軟骨塊を得る事が出来る。次に試験管内容をシャーレに移し、軟骨塊を掬い上げTyrode液を更えて数回洗滌した後、グレーフェ刀で更に数個の組織片に細切し培養組織片とする。

4) 培養方法

単一及び二重カバーガラス培養法を用い、血漿膜中に上向き(inverted position)で培養した。培養温度は38°Cとし、二重カバーガラス培養法では第1章で述べた如く48時間毎に培地を追加した。

〔Ⅱ〕 観察方法

培養後12時間毎に観察した。

上顎骨、鞏膜軟骨に於ては軟骨細胞の形態変化を逐次追跡する為には大きな組織片や、反対に組織が全く崩壊して軟骨細胞がバラバラに浮遊している状態のものは特定の細胞を追跡する際紛れ易く、不適当であるから、細胞数が少く、個々の細胞を明瞭に識別出来る微小組織屑片か、又は組織屑片中目標をつけ易い部分の少数細胞を観察の対象とした。

固定標本はCarnoy固定後ヘマトキシリン染色、又はヘマトキシリンーエオジン二重染色を施し、1部はメチルアルコール固定後ギムザ染色を施した。

〔Ⅲ〕 実験成績

i) 培養軟骨細胞の形態

a) 上顎骨及び鞏膜軟骨の培養所見；上顎骨と鞏膜軟骨の培養所見は殆んど同じであるから一括して記載する。

未培養時所見；軟骨細胞は殆んど1層に並び、細胞間隙は広く、細胞は種々の大きさの群落を作っている。軟骨基質はヘマトキシリン染色性を失ひ恰も消失しているかの如く見えるが、細胞は群落を作り、やゝ大きな組織片では未消化時の形そのまゝを示し、又中には紐状に並んだ細胞群落を形成しているものもあるから基質はヘマトキシリン染色性を失つてもなお残存し、細胞を結合しているものと考えられる。生態では軟骨細胞は円形で一様に透明である。染色標本では大きな核と少量の胞体を有し胞体には顆粒を認めない。核は胞体よりヘマトキシリンに濃染し大小の顆粒に富み1～2個の核小体を有する。核内に顆粒の多いものでは核小体は不明瞭である。上顎骨の軟骨細胞は同一個体の鞏膜軟骨細胞より大きいが構造上には差異を認めな

い。(Fig. 5, Fig. 6)

培養12時間目の所見；軟骨細胞は肥大し橢円形又は長橢円形となる。生態では細胞内に光を屈折する小顆粒が多数出現し細胞は暗く見える。細胞は柵状に並び一方向に伸びる傾向を示している。染色標本では胞体は著るしく増幅し、細胞の肥大は主として胞体の肥大によつてゐる。胞体は未培養細胞に比べヘマトキシリンに濃く染り微細な網状構造を示す。核は円形乃至短橢円形でヘマトキシリンによく染り、中に多数の顆粒と大きく明瞭な核小体1~2個を有する。各細胞は孤立し、細胞間の原形質連絡は見られない。(Fig. 7, Fig. 8.)

培養24時間目の所見；細胞は著るしく肥大し次第に細長くなり、殆んど細胞は橢円形乃至紡錘形を呈し、群落周辺部の細胞には線維芽細胞様の形態を示すものも見られる。橢円細胞には光を屈折する小顆粒を多数認めるが紡錘細胞にはかゝる顆粒は見られず明るい。細胞はなお柵状に配列しているものが多い。染色標本では胞体、核ともに肥大し、ヘマトキシリンの染り方は細胞の肥大しているもの程弱くなる傾向がみられる。核は円形乃至橢円形で顆粒に富み、核小体は1~2個で大きく明瞭である。紡錘細胞は相互に原形質突起により連絡している。(Fig. 9, Fig. 10)

この時期に於てはヘマトキシリン染色性の良好な事、核はなお円形に近く、細胞は太く短かい点から軟骨細胞と線維芽細胞を区別する事は不可能ではない。

培養48時間目の所見；細胞の発育は甚だ旺盛で、細胞は紡錘形、柳葉状となり、顆粒はなく一様に明るい。細胞は放射状に配列しもはや柵状の配列は見られず、相互に原形質突起を以て連絡している。染色標本ではヘマトキシリンに淡染し、胞体、核内には微細な顆粒を認める。核は橢円形で1個乃至2個の核小体を有するが、核小体2個のものが圧倒的に多い。核小体は不正円形、短棒状を呈し明瞭である。生長帯には間接核分裂像がみられる。(Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13)

要するに細胞の形態、配列、染色態度ともに線維芽細胞に酷似した所見でこの時期に於ては軟骨細胞と線維芽細胞を識別する事は甚だ困難である。

培養72時間目の所見；細胞の発育は益々旺盛であるが、その形態学的所見は培養48時間目のものと異ならない。

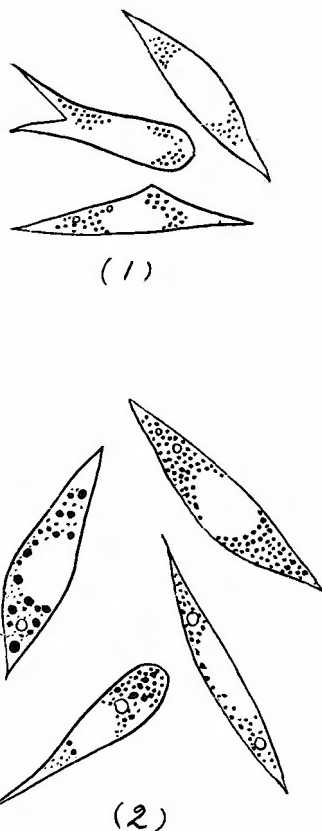
b) 脛骨踝部の培養所見；軟骨細胞の発育は母組織周辺で基質の染色性が失われ、細胞間隙がやゝ疎になつてゐる部分から始まる。培養12時間目にはこの部分

の細胞は肥大し中には橢円形を呈するものもみられる。培養24時間目には細胞は橢円形乃至紡錘形となり組織外に放射状に発育し始める。踝部外縁の基質が未処置のものと同様に濃くヘマトキシリンに染る厚い部分からは未だ細胞の游出をみない。培養48時間目に至ると母組織全周から紡錘状の細胞が発育し始め、培養72時間目には細胞の発育は益々旺盛となる。軟骨細胞の形態変化の過程は上顎骨、鞏膜軟骨の場合と全く同一で、培養72時間目に至れば軟骨細胞は線維芽細胞と区別し難い形態を示すに至る。(Fig. 14)

かくの如くトリプシンで軟化させた軟骨組織を培養すれば軟骨細胞は凝固血漿中で旺盛に発育し、上顎骨、鞏膜軟骨、脛骨踝部のいずれも培養組織片の殆んど全てに旺盛な軟骨細胞の発育をみる事が出来た。第1章に述べた普通培養法に較べれば培養成績は著るしく良好である。

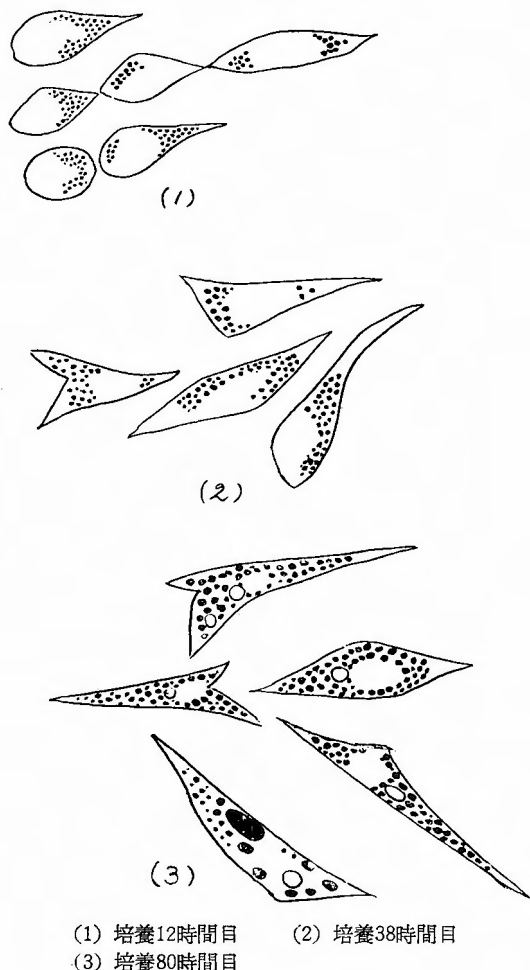
ii) 培養軟骨細胞の増殖

Fig. 3 (A) 墨汁食作用



(1) 墨汁添加38時間目 (2) 墨汁添加54時間目

Fig. 3 (B) 中性紅生体染色



細胞の發育旺盛な培養48時間～72時間目の標本にはしばしば間接核分裂像を認める。分裂中の細胞は円形で厚く透明に見え孤在している。染色標本では細胞は一樣にヘマトキシリンに濃染する。胞体には顆粒をみない。Fig. 15 は間接核分裂各期の細胞を示したものである。直接核分裂像は認められなかつた。

iii) 墨汁食作用及び生体染色所見

使用した培養軟骨細胞はトリプシンで消化した軟骨組織から前述の如くして培養した上顎骨、鞏膜軟骨細胞である。対照として同一培地上に鶏胚心組織片を併置し線維芽細胞を培養した。

(a) 墨汁食作用；墨汁は古梅園製紅花墨をRinger液を用いて1分間123往復、16分間磨り、濾紙で3回濾した後高圧滅菌し、その極く少量の原液を血漿膜表

面に滴下して観察した。墨汁添加の時期は細胞が或る程度發育した時期を選んだ。

培養18時間目に添加したものでは添加後6時間(培養24時間)目迄は細胞に変化を認めない。添加後18時間(培養36時間)目には軟骨細胞の原形質突起内及び核周辺に微細な墨汁顆粒が出現する。この墨汁顆粒は大きさは均一で、円形、色調濃く明瞭である。時間の経過とともに墨汁顆粒は増大し、添加後30時間(培養48時間)目には顆粒は数を増し大きくなり多少大小不同となるが、円形、色調明瞭で原形質突起及び核近傍に存在している。添加後48時間(培養72時間)目には墨汁顆粒は益々増大し、大きさは不均一であるが、円形、色調明瞭で原形質突起内及び核周辺部に密集し、中には大多數の顆粒で充満し、核以外の部分は真黒に見えるものもある。(Fig. 3(A)) 対照の心組織から發育した線維芽細胞では多くのものは墨汁顆粒を認めないが、稀に添加後18時間目頃から細胞内に微細な墨汁顆粒を認める事がある。然しその顆粒は極めて少く、甚だ微細で、色調淡く褐色調を帯び輪廓は不鮮明で軟骨細胞の墨汁顆粒とは明らかに異つており、培養の経過とともに増大する事もない。

(b) 中性紅生体染色所見；終量0.01%となる割合に中性紅を加えた血漿膜中に軟骨細胞を培養し観察した。

培養1時間目には円形の細胞辺縁に近く数個の微細な淡い橙黄色の顆粒を認める。培養12時間目には円形細胞では核周辺に核を取り巻く如く、楕円形・宝珠形細胞では核近傍より原形質突起内に多數の微細、均等な染色顆粒を見、殊に原形質突起の伸びている方向に多く集つて見られる。培養38時間～48時間目には顆粒は核周囲、原形質突起内にあつてその数及び大きさを増し、大きさはやゝ不均一となる。培養64時間目には顆粒は益々大きくなり且つ不均一で、胞体は色素顆粒で充満した状態となり、顆粒の色調は褐色を帯びてくる。培養80時間目に至れば細胞は核以外殆んど全体顆粒で満ち、中には数個の顆粒が癒合した如き大滴状のものも見られ、大小不同が甚しく、褐色調が強くなる。

(Fig. 3(B)) 細胞の変性が進むと顆粒は大き及び数を減じ、色調も淡くなり、死滅細胞には色素顆粒をみない。

(c) Janus Green B 生体染色所見；終量0.001%となる割合に J. G. B. を培地に添加した場合は軟骨細胞は全て死滅した。これ以下の濃度では染り方が極めて薄く、明瞭な所見は得られなかつた。

(d) Lithium Carmine生体染色所見；終量0.01%となる割合に Lithium Carmine を添加した血漿膜中に軟骨細胞を培養して観察した。

培養48時間目迄は軟骨細胞には異常を認めず、Carmine 顆粒も出現しない。培養72時間目には多くの細胞には変化なく、又 Carmine 顆粒も出現しないが一部の細胞は核、胞体とも一様に淡紅色に染まっている。このような細胞は以後發育しないから死滅したものと考えられる。生存細胞を更に培養しつづけても軟骨細胞内に Carmine 顆粒は出現しなかつた。

iv) 培養軟骨細胞の変性、壊死

軟骨細胞の変性過程は胞体内に大小の空泡を生じ、之が漸次増大して終には突起を失い円形となり死滅する事は線維芽細胞の場合と同じである。カバーガラス培養法では培地の追加、更新を行わず培養をつづけると培養72時間目頃より空泡を有する細胞が現われ始めるが線維芽細胞の培養に較べその数は遙かに少い。即ち変性の始まる時期は線維芽細胞に較べ遅れる様である。發育良好な細胞では培養48時間以内に胞体に空泡を見る事はなかつた。薬物を添加したものや、培養条件が不適と思われるもので已に培養12時間～24時間目と云う早期に胞体内に大きな空泡を生じているものを見る事があるが、かゝる細胞群落では以後全く細胞發育がみられないから変性壊死したものと考えられる。又時に培養早期に一旦紡錘状となつていた細胞が空泡を生ずる事なく、数時間の間に突起を失つて円形となるものがあり、染色標本でみると胞体はエオジンに濃染し、核は馬鈴薯状を呈してヘマトキシリンに濃染し顆粒、核小体は認められない。かゝるものも以後細胞の増殖は認められないから死滅細胞と考えられ、生体染色の実験中にしばしば経験した。

第2項 短時間消化した軟骨組織の培養

上述の長時間消化法は軟骨細胞の形態学的觀察には便利であるが、組織は大小の屑片に細分し、組織からの軟骨細胞の脱落も一様でなく、又組織片によつてその軟化程度にも差異が有るので生長計測の目的には不適当である。茲に記載するのは、組織の大きさも変わらず、組織から軟骨細胞は脱落せず、組織の軟化も各片略々均一で、而も細胞の發育が良好な様に短時間トリプシンで消化した軟骨組織を培養する方法である。

〔I〕 実験材料及び実験方法

孵化10日目の鶏胚上顎骨を使用した。採取法は第1章に記した通りで、1mm×1mm以下の組織片とする。この組織片をトリプシン溶液を入れたシャーレに移

し、10分間37°Cの恒温器内に静置する。振盪はしない。10分経つと組織は少しく軟化し、ガラス壁に一寸粘着する様になる。之をTyrode液を更え3回洗滌した後普通法と同様に培養する。組織片を掬うと粘液滴状となる様なものは消化し過ぎて組織が1部崩潰している事が多い。10分間程度の消化では組織の変形もなく、細胞の脱落もなく、基質が少しく軟化しているに過ぎない。

〔II〕 実験成績

24時間目の細胞游出が普通培養法に較べやゝ旺盛である他、細胞の形態、生長は普通培養法と大差はない。本法では培養組織片の90～100%に軟骨細胞の發育をみる事が出来た。

総括及び考察

〔I〕 培養材料について

或る種の細胞の純培養を得るには二つの方法がある。即ち種々な細胞種の混合する組織片を培養し、継代培養によつて生活力の強い細胞種のみ淘汰する方法と、目的の細胞のみからなる組織片を培養する方法である。軟骨細胞の培養が不純となるのは線維芽細胞の混入によるものであるが、線維芽細胞は生活力の強い細胞であるから淘汰法によつて除去する事は不可能である。従つて軟骨細胞の純培養を得るには純粋の軟骨組織より得る方法を選ばなければならない。軟骨は体の各所に豊富に存在しているが、この目的には純軟骨組織が容易に得られ、而も軟骨細胞の發育が良好なものを撰ばなければならない。A. Fischer und Demuthは脚軟骨から軟骨細胞を培養しているが、純培養を得る事は甚だ難かしいと述べている。著者は四肢及び軀幹骨中、大腿骨、脛骨及び上腕骨の各関節部、趾骨、胸骨、肩甲骨、骨盤骨、脊椎骨を撰び培養してみたが、いずれも機械的操作のみでは軟部の完全分離は不可能で、線維芽細胞の混入を避け得なかつた。即ち之等の部分からは機械的軟部分離のみを以てしては軟骨細胞の純培養を得る事は出来ない。唯脛骨踝部は附着している軟部が比較的少いので、機械的分離にトリプシン消化を加えれば、純粋の軟骨組織を得る事が出来、且つ軟骨細胞が豊富であるから好個な純培養の材料となり得る。上顎骨中央部は軟部が疎に附着している為、機械的操作のみで純粋の軟骨組織を得る事が出来、軟骨細胞の發育も良好であり、軟骨細胞は大きいから觀察にも便利であるが、1個体より採取し得る材料は少い。鞏膜軟骨は鳥類、魚類に特有の軟骨で

A. Fischer が初めて軟骨細胞の純培養を得たものであるが、著者の追試では普通培養法では細胞の発育を見る事が出来なかつた。然し軟部の分離は最も容易であり、材料も豊富に得られトリプシン消化を行えば純培養の良い材料となり得る。

要するに普通培養法では上顎骨が最適の培養材料であり、トリプシンで消化した後培養するならば脛骨踝部、上顎骨、鞏膜軟骨のいずれも純培養の材料として使用し得る。

〔Ⅱ〕 培養方法について

A. Fischer は鞏膜軟骨の培養に於て組織片を血漿膜中に置くと軟骨細胞の游出は見られないが、血漿膜表面に培養すれば軟骨細胞は旺盛に発育し、一旦血漿膜表面に発育した軟骨細胞は血漿膜中に移植してもよく発育をつづけると述べている。氏はこの事実について、軟骨細胞が組織外に游出する為には先ず軟骨基質が弛緩する事が必要であつて、凝固血漿中では培地の硬さに妨げられて軟骨基質の弛緩が起り難いが、血漿膜表面に於ては基質の弛緩を妨げるものがない為に容易に基質が弛緩するからであると説明している。一般に表面培養を好む細胞はその所在に由来する性質のもの、例えば上皮細胞の如きものか、或は酸素を多量に要する細胞かであつて、前記の A. Fischer の成績をみると一見軟骨細胞にも表面培養を好む性質が有るかの如く思われるが、著者の実験に於ては凝固血漿中に埋没した組織から旺盛な軟骨細胞の発育をみる事が出来た。従つて軟骨細胞には表面培養を好む性質は無いと考えられる。トリプシンで消化し、基質の軟化している軟骨組織を培養するならば血漿膜中でよく軟骨細胞を発育させる事が出来、A. Fischer の如く敢えて表面培養を行う必要は認められない。

〔Ⅲ〕 普通培養法に於ける軟骨細胞の難培養性と軟骨基質

著者は諸種の軟骨を培養してみたが、普通培養法によつて軟骨細胞の発育をみたのは、上顎骨のみで而も培養組織片数の2~10%に過ぎず、軟骨細胞の培養は極めて困難である事を知つた。この普通培養法に於ける軟骨細胞の難培養性は何に因るものであろうか。

先ず次の様な原因が想像されるであろう。即ち (1) 一般に分化度の高い細胞は培養し難いと云われているが、軟骨細胞は組織培養が困難な程度迄分化した細胞なのではないか？ (2) 材料を採取する動物、又は材料の成熟程度が不適当なのではないか？ (3) 軟骨細胞は生活力が弱く、実験操作中に容易に死滅するもの

ではないか？

と云う事である。然し著者はトリプシンで消化した軟骨組織を用いての実験に於て、孵化9日~12日目の鶏胚の軟骨を用い、2~4時間の実験操作後に於て軟骨細胞は極めて旺盛に発育する事を証明したのであるから、之等の3項目は原因としては完全に否定されるわけである。

以上の他の原因として、軟骨組織は硬い基質を有しており、軟骨細胞はこの基質中に埋没した状態にあると云う軟骨特有の組織構造が考えられるであろう。

A. Fischer は鞏膜軟骨の培養に於て軟骨細胞は軟骨基質が弛緩した間隙を縫つて組織外に游出する事を観察している。著者は上顎骨の普通培養に於て軟骨細胞の発育しない組織片や、細胞の発育が不良な組織片に於ては母組織の形は培養開始時と変わらず、基質はいつまでもよくヘマトキシリンに染るが、軟骨細胞の発育良好なものでは母組織片は4角形より漸次円形に変じ、基質はヘマトキシリン染色性を失い、細胞間隙が広くなり、基質の弛緩を思わせる像を呈する事を経験した。トリプシンにより組織片を10分~15分間消化したものでは組織の構造には変化なく軽度の基質軟化をみるのみであるが、軟骨細胞の発育は著るしく良好であつた。長時間消化した組織に於ては基質の軟化は更に進んでいるわけであるが、軟骨細胞の発育は一層旺盛であつた。又トリプシンで消化した脛骨踝部に於ては組織の軟化度の強い部位から細胞が発育し始め、軟化度の弱い部位からの細胞発育は遅れるものである。之等の事実から軟骨細胞の発育と基質の軟化程度の間には密接な関係があり、基質の強く軟化しているものほど軟骨細胞の発育は良好である事が分る。即ち普通培養法における軟骨細胞の難培養性は軟骨基質の硬さに由来するものである事が分る。硬い基質中に埋没して居る軟骨細胞には養液の供給も困難であり、細胞の游出にも大きな抵抗があると考えられ、基質が軟化すれば細胞への養液供給も容易且つ豊富となり、細胞游出も容易で、軟骨細胞の発育に好適な状態となるものである。

〔Ⅳ〕 軟骨細胞の潜伏期及び変形に要する時間

母組織から細胞が発育し始める迄の時間を潜伏期と云い、線維芽細胞では12~24時間と云われている。A. Fischer は鞏膜軟骨片を2~3回置替えた後軟骨細胞が旺盛に発育し始めると云つてゐるが、潜伏期に関する明瞭な記載はない。著者は上顎骨の普通培養に於て、毎常培養開始後24~48時間の間に軟骨細胞の放射状の

發育をみたから軟骨細胞の潜伏期は24~48時間と云う事が出来よう。

培養軟骨細胞は終極に於ては線維芽細胞様の紡錘細胞となるものであるが、組織内の円形細胞から終極形に変形する迄に要する時間は基質の状態に関係がある。即ち基質から脱落した浮游軟骨細胞の中には培養12時間目に已に終極形に変じているものを見、培養24時間目には全て終極形となつてゐる。トリプシンにより長時間消化したものでは辺縁部の軟化の進んでいる部位では已に12時間後に紡錘細胞となつており、時間とともにその数を増し、小群落では培養48時間目には全て終極形を呈している。然し消化度の低い組織片では紡錘細胞の出現するのに24~48時間を要する。即ち基質の軟化の著るしいものほど終極形に至る時間は短かい。恐らく細胞への養液供給の関係によるものである。

〔V〕 培養軟骨細胞の發育及び培地液化現象

培養軟骨細胞の生長速度について報告した者はないが、著者の普通培養法に於ける成績では軟骨細胞の生長曲線は線維芽細胞のものとはやゝ異つた形を示し培養48時間目以後の曲線は急峻な上昇を示している。これは一旦軟骨細胞が組織外に游出すれば極めて旺盛に増殖する事を示すもので、生長帯にしばしば核分裂像を見る事も之を裏書きする所見である。

一般に培養細胞が増殖する際は多少とも培地の液化、融解を伴うものであるが、正常な細胞では著るしくないものである。軟骨細胞の培養に於て培地の液化がおこる事については記載したものがないが、著者は試験管内短冊培養法に於ては殆んど全例に、又 Carrel 瓶培養法に於てもしばしば著明な培地の融解、液化を経験した。然しカバーガラス培養法では培地の液化を見る事は稀であつたから、軟骨細胞に特有の性質と云うよりも培養法に深い関係があるものと考えられる。培地の液化は細胞の産生する酵素、酸等によると云われており、線維芽細胞其他の細胞でも發育が極めて旺盛な時には培地の液化をみる事がある。軟骨細胞の發育は前述の如く急激に旺盛となり、殊に瓶法、試験管内短冊法ではカバーガラス法より細胞の發育は一層旺盛である上に培地が軟かいためその液化を招来し易いものであろう。即ち軟骨細胞の培養時にみる培地の液化は軟骨細胞に個有な物質の産生によるものではなく、發育が急激に旺盛となるために起るものと考えられる。

〔VI〕 培養軟骨細胞の形態

軟骨細胞を培養すれば終極に於て線維芽細胞様の紡錘細胞となる事は A. Fischer, A. Fischer und Demuth 及び Stoehr の記載している所である。即ち A. Fischer は鞏膜軟骨を培養し早期に游出する細胞は大きな核と少量の胞体を有し、小淋巴球に似ているが、漸次肥大して大きな核と豊富な胞体を有する紡錘細胞となると云い、氏の論文には円形乃至蠟蚪状の細胞、及び豊富な胞体と橢円形の核を有する紡錘細胞が示されている。A. Fischer und Demuth は脚軟骨の培養に於て、母組織周辺には組織内軟骨細胞に似た形の細胞をみるが、生長帯周辺部に近づくにつれて紡錘細胞が増し、この紡錘細胞は線維芽細胞より太く、短かいと述べている

著者は上顎骨の普通培養に於て初期に游出する細胞は紡錘形であるが線維芽細胞に較べやゝ太く、短かく核も円形である事を認めたが、培養日数の経過したものでは、その形態学的所見は線維芽細胞に酷似した所見であつた。

線維芽細胞も培養条件により形態に或る程度の変異を見るもので、培養早期に游出する軟骨細胞と似た形態のものもあり、単に細胞の長短、剛硬程度の相異を以てしては両者を明確に区別する事は難かしい。著者の実験に於ては普通培養法の如何なる時期の軟骨細胞も、唯1個のみを持ち来つては線維芽細胞と明確に区別しうる形態上の特徴は無かつた。

この様に未培養の組織内軟骨細胞の形態と、培養基上に發育した細胞の形態が甚しく異り、而も線維芽細胞と区別し難い形態を呈するとなれば、果して培養基上に發育した細胞が軟骨細胞であるか、又軟骨細胞ならば如何なる過程をたどつて変形するものであるかを明らかにしておかなければならない。現在までの報告でこの点について詳細な検討を行つたものはなく、A. Fischer もこの点については一言も触れて居らない。

普通培養法の如く細胞の密集した大集団である組織片をそのまま用いては個々の細胞の変化を逐次追求する事は不可能である。著者はこの目的にトリプシンで消化した組織を使用した。トリプシンで軟骨組織を消化し、極めて微細な組織屑片とすれば、細胞数も少く基質の軟化により細胞の配列は疎となり、未培養時已に個々の細胞を明瞭に識別する事が出来るので特定の細胞を時間を追つて追跡する事は極めて容易である。著者は長時間トリプシンで消化した軟骨組織を培養し、円形の軟骨細胞が培養の経過と共に漸次肥大して紡錘形となる過程を詳細に観察し、軟骨細胞を培養す

れば終極に於ては線維芽細胞に酷似した形態となる事を確認する事が出来た。

形態の似た細胞を区別する為に組織化学的染色法を用いる事も一手段と考えるが、軟骨細胞については現在キメ手となるべき化学的染色法は知られて居らず、又培養軟骨細胞が組織内軟骨細胞と同一成分を有するか否かも全く未知の問題である。著者は糖原、アルカリ・フォスファターゼ、ビタミン C、及びメタクロマジー反応につき 2, 3 の組織化学的染色法を試みてみたが、現在組織切片に用いられている方法をそのまゝ使用したのでは血漿膜の濁濁、収縮、或は共染が甚しく到底使用し得るものは無かつた。培養軟骨細胞の組織化学的染色法は今後の研究に待つべき問題で、現在細胞の識別に用い得るものは無い様である。

軟骨細胞の特徴として、A. Fischer は好塩基性なる事を挙げている。著者の実験に於ては培養初期に游出する紡錘細胞及びトリプシン消化組織の培養の際未だ楕円形細胞の階程にある軟骨細胞はヘマトキシリンに濃染し、好塩基性である事を認めたが、細胞が肥大し終極形に近づくにつれてヘマトキシリンの染り方は淡くなり、終には線維芽細胞と同様の染色態度に至る事を認めた。即ち培養軟骨細胞の好塩基性は一時的なもので、細胞が終生有する性質では無いと考えられる。

又 A. Fischer 及び A. Fischer und Demuth は培養軟骨細胞はしばしば空泡を有すると云い特異な所見としている。著者の実験に於ては發育良好な軟骨細胞には空泡の形成は見られなかつた。古い培養では細胞内に大小の空泡を認めるが、之は全ての細胞の変性過程に見られる現象であつて軟骨細胞に特有な所見ではない。又培養初期に空泡を形成したものでは細胞の發育は全く停止し、母組織内の軟骨細胞に空泡を形成すれば細胞の游出が全く見られない所から、これは変性死滅した軟骨細胞と考えられる。之等の点から培養軟骨細胞に於ける空泡の形成は変性の徴候に過ぎず、軟骨細胞に特徴的な所見とは云い難い。

一般に培養細胞に空泡を生ずる時には先ず胞体内に小顆粒が出現し、之を基にして空泡が発生するもので、胞体内の小顆粒発生は変性の初徴である事が多い。軟骨細胞では培養初期に細胞内に多数の小顆粒が出現するが、細胞が肥大すると共に消失するものであるからこの顆粒は細胞の生長と関係あるものと考えられ、空泡の前段階たるものとは異なるものと考えられる。

〔VII〕 培養軟骨細胞は線維芽細胞と同じものであるか？

Champy は全ての組織細胞は一定期間培養すれば何れも共通な原始型に復帰すると云う氏の所謂 Entdifferenzierung 説を唱えたが、多くの人々は之を否定し培養細胞は永く固有の性状を保つ事を証明している。軟骨細胞を培養すれば終極に於ては線維芽細胞と区別し難い形態を呈するに至るが、両者が同じものか否か、即ち軟骨細胞は線維芽細胞に復元するか否かは興味ある問題であると思う。

著者は軟骨細胞と線維芽細胞の比較に生体染色を応用した。その結果中性紅生体染色では両者の所見に異なる所はなかつたが、墨汁食作用の点に於ては明かに相異がある事が分つた。培養軟骨細胞の食作用に関する報告は皆無であるが、著者の実験では軟骨細胞には明らかな食作用を認める事が出来た。線維芽細胞に墨汁食作用の無い事は周知の通りで、著者の実験に於ても同様の所見であつた。従つて墨汁食作用の有無は軟骨細胞と線維芽細胞の大きな相異点であつて、形態上差異は無くてもこの点からみて明らかに異なる細胞である事が分る。従来文献に軟骨細胞を培養すれば線維芽細胞に復帰すると記載したものを見るが、之は形態の相似を以て細胞の機能も同一とみなした早計な論であつて、軟骨細胞は培養によつて線維芽細胞となるものではない。

又軟骨細胞にはカルミン食作用はない。この点組織球形細胞とも異なるものである。

〔VIII〕 培養組織片の採取部位によつて軟骨細胞の培養所見に差異があるか？

Fazzari は線維芽細胞も臓器を異にすれば形態に相異があると云つてゐる。然し培養細胞の形態は培地の厚薄、温度の高低等種々の条件によつて相当異つてくるものであるから、形態の変化を直ちに採取臓器の相異によると結論する事に反対する人もある。軟骨細胞の培養に於ては採取部位が異つても、又終生軟骨に止まるものと、将来骨化する軟骨との間にも培養所見、細胞の形態に差異はみられなかつた。

〔IX〕 軟骨基質の形成

培養軟骨細胞に軟骨基質形成能力が有るか否かは興味ある問題であるが、A. Fischer は鞏膜軟骨細胞を月余に及び培養したが、軟骨基質は形成されなかつたと述べてゐる。A. Fischer und Demuth は脚軟骨細胞を培養してヘマトキシリンに染る基質様のものを認め、Demuth は脚軟骨細胞の継代培養により基質の形成を認めている。著者の培養は最長12日間で先人の報告に較べれば短期間であるが、いづれの部位から採取

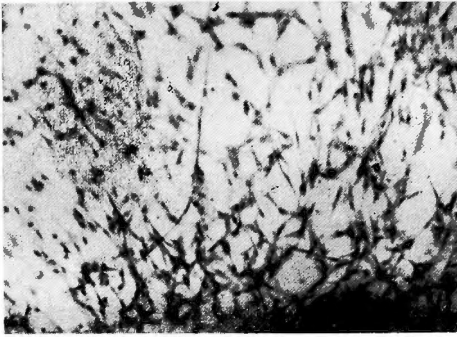


Fig. 4 (A) 普通培養法による上顎骨軟骨細胞の
發育状態（培養72時間目）

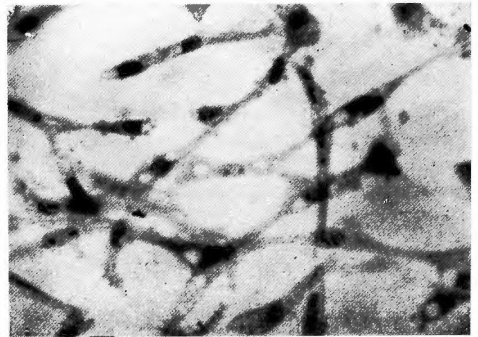
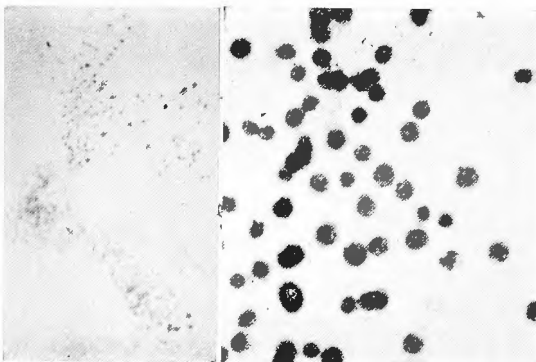
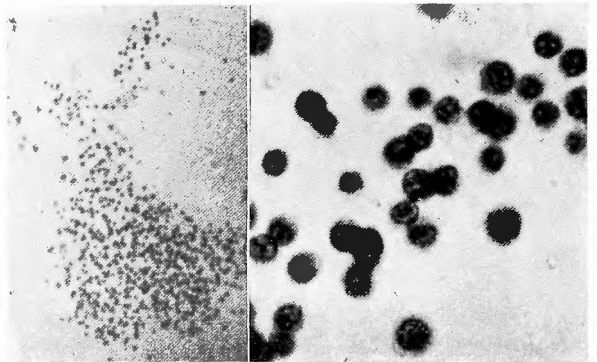


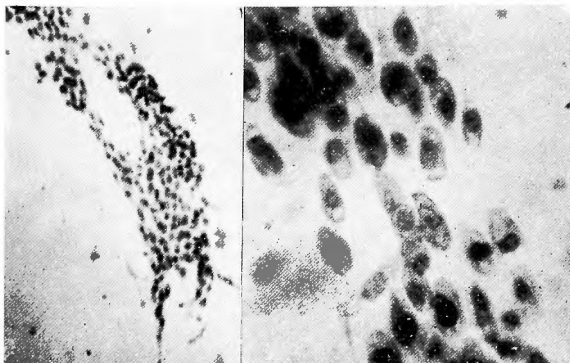
Fig. 4 (B) , Fig 4. (A) の強拡大像



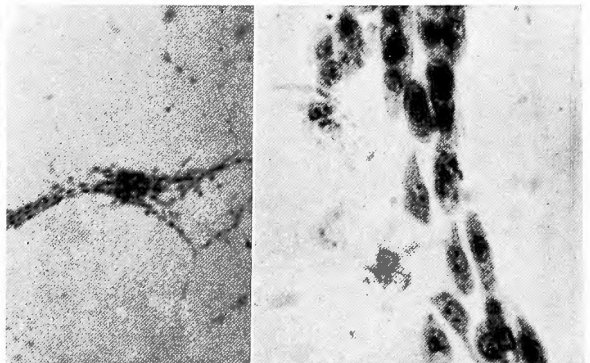
弱拡大 強拡大
Fig. 5 鞏膜軟骨（トリプシン消化）
未培養



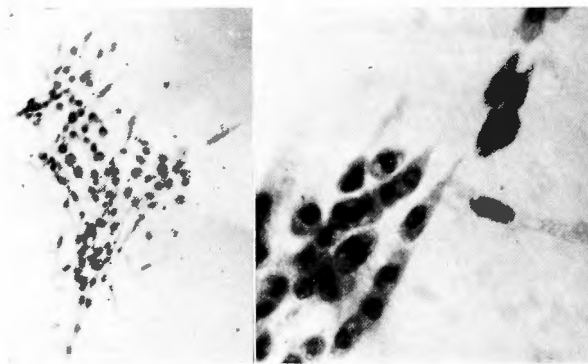
弱拡大 強拡大
Fig. 6 上顎骨（トリプシン消化）
未培養



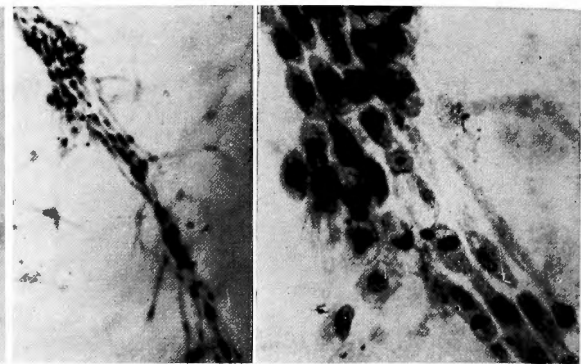
弱拡大 強拡大
Fig. 7 鞏膜軟骨（トリプシン消化）
培養12時間目



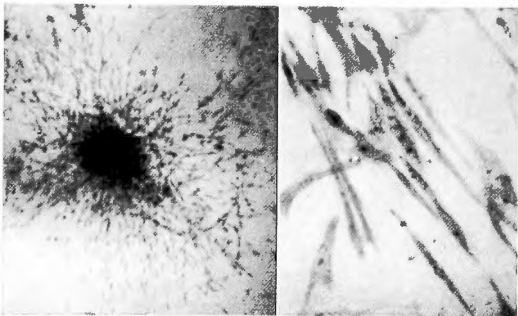
弱拡大 強拡大
Fig. 8 上顎骨（トリプシン消化）
培養12時間目



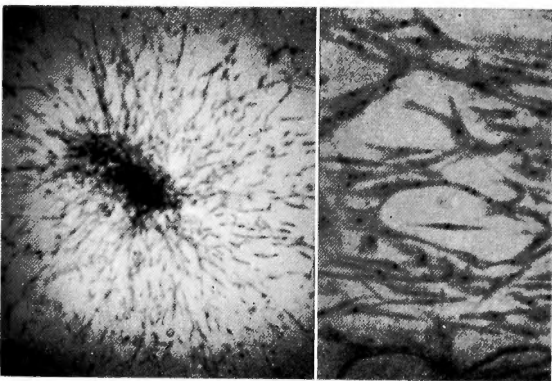
弱拡大 強拡大
Fig 9 鞏膜軟骨(トリプシン消化), 培養24時間目



弱拡大 強拡大
Fig. 10 上顎骨(トリプシン消化), 培養24時間目



弱拡大 強拡大
Fig. 11 鞏膜軟骨(トリプシン消化), 培養48時間目



弱拡大 強拡大
Fig. 12 上顎骨(トリプシン消化), 培養48時間目

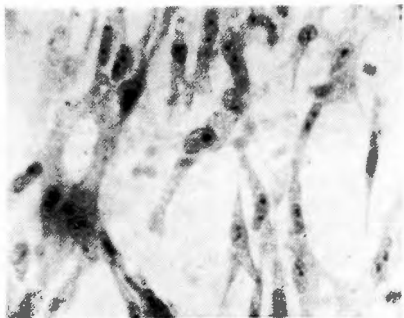


Fig. 13, Fig. 12の拡大像

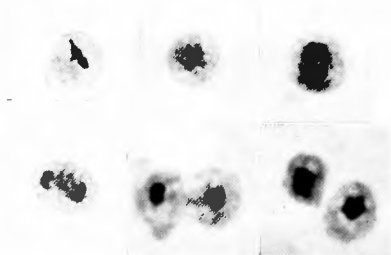
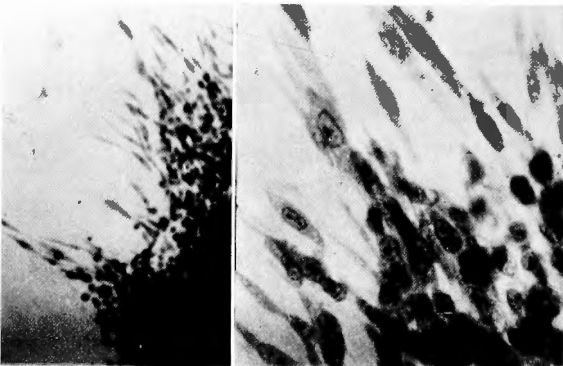


Fig. 15 鞏膜軟骨細胞の間接核分裂像



弱拡大 強拡大
Fig. 14 脛骨踝部(トリプシン消化), 培養24時間目

した軟骨組織の培養に於ても軟骨基質の形成はみられなかつた。Moscona and Moscona は孵化 4 日目の脚原基細胞を液体培地に培養すれば軟骨の形成をみるが、凝固血漿に培養した時は軟骨は形成されなかつたと云つてゐる。Chondrioblasten の培養に於ても凝固血漿中の鶏胚圧搾液量の多寡により軟骨形成に差のある事が知られているから、軟骨細胞に於ても軟骨基質の形成は培地の物理的、化学的性状に大きく左右されるものであらう。

結 語

鶏胚軟骨組織を凝固血漿中に培養して軟骨細胞の純培養を得る事が出来たので培養軟骨細胞の發育、形態学的所見につき種々の観察を行つた。

1. 普通培養法に従つて鶏胚上顎骨を凝固血漿中に培養し、培養組織片の 2~10% のものに軟骨細胞の發育を認めたが、軟骨細胞の培養は容易ではない。この難培養性は軟骨基質中に軟骨細胞が埋没していると云う特殊な組織構造に由来するものである。トリプシンで消化し基質の軟化した鶏胚上顎骨、鞏膜軟骨及び脛骨踝部を培養してその 90~100% のものに軟骨細胞の旺盛な發育をみる事が出来、軟骨細胞の純培養を極めて容易に得る事が出来た。

2. 軟骨細胞は培養の経過とともに漸次肥大し、終極に於ては紡錘細胞となる事を証明する事が出来た。紡錘形となつた軟骨細胞は形態、配列、染色態度に於て線維芽細胞と区別し難い所見を呈するが、軟骨細胞には墨汁食作用が認められた。この点から培養軟骨細胞は線維芽細胞とは異なるものである。

3. 培養軟骨細胞の増殖は間接核分裂による。

4. 軟骨細胞には表面培養を好む性質はなく、凝固血漿中でよく發育する。

5. 将来骨化する軟骨組織も、終生軟骨に止まる軟骨組織も、その小軟骨細胞の培養所見には相異を認めなかつた。

(参考文献は第Ⅱ編末に一括記載する)。

本論文の要旨は第31回日本整形外科学会総会に於て発表した。

終りに臨み終始懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師近藤鋭矢教授に満腔の謝意を表すると共に、御教示、御助言を戴いた京大微生物学教室木村廉名誉教授、大山昭夫博士に厚く感謝の意を表します。

本研究には芝蘭会研究奨励金を戴いたので茲に謝意を表します。