

# 骨髓体外組織培養による白血病の螢光顕微鏡学的研究

## 第 3 編

### 白血病骨髓培養における細胞機能とアクリジンオレンジ 染色との関係について

岡山大学医学部平木内科

講 師 小 塚 堯

〔昭和41年2月3日受稿〕

#### 内 容 目 次

I 緒 言	3) 急性骨髓性白血病
II 実験方法	e. 小 括
1. 実験材料	2. 単球系細胞
2. 培養方法並びに色素添加方法	a. 単 球
3. 観察方法	1) 正 常 人
4. 記載方法	2) 単球性白血病
III 実験成績	3) 慢性骨髓性白血病
1. 顆粒球系細胞	b. 幼若単球
a. 好 中 球	1) 単球性白血病
1) 正 常 人	c. 小 括
2) 急性骨髓性白血病	3. リン巴球系細胞
3) 慢性骨髓性白血病	a. 淋 巴 球
4) 急性リン巴球性白血病	1) 正 常 人
5) 単球性白血病	2) 急性リン巴球性白血病
b. 幼若好中球	3) 慢性リン巴球性白血病
1) 慢性骨髓性白血病	4) 単球性白血病
2) 急性骨髓性白血病	5) 慢性骨髓性白血病
c. 好 酸 球	b. 幼若リン巴球
1) 正 常 人	1) 急性リン巴球性白血病
2) 急性骨髓性白血病	c. 小 括
3) 慢性骨髓性白血病	IV 総括並びに考按
d. 好塩基球	V 結 語
1) 慢性骨髓性白血病	附 全編の総括
2) 急性好塩基球性白血病	

#### I 緒 言

Acridinorange (以下 Ao と略す) は 3.6-tetra-methyl-diaminoacridine なる組成を有し, Kölbel<sup>2)</sup> によれば pH 7 附近で殆んど100%解離し, その水溶液は紫外線照射に際し濃度に応じた色変化を呈し,

1/100 で赤, 1/200 で橙黄, 1/1,000 で黄, 1/10,000 では緑の螢光を發し, 此の特性により細胞の色素摂取の程度を知り得る. Strugger<sup>3)</sup> はこれを Konzentrationseffekt (濃度効果) と呼び, Börner-Patzelt<sup>6)</sup> も赤色螢光は Polymerisation (重合) の結果であるとした. Ao の染色機転とも関連して細胞化学の分野で

は多くの研究がみられ、Schummelfeder<sup>33)</sup>はAo摂取量と細胞の代謝機能との関係を論じ、Bethe<sup>4)</sup>はpHにつき、Stockinger<sup>35)</sup>はAoの毒性につき広範な検索を行ない、Bertalanffy<sup>5)</sup>、Mellors<sup>24)</sup>はDNA、RNAの螢光を追求している。

血液学においては先づFellinger及びPakesch<sup>9)</sup>が血球の観察を試み、爾来Werth<sup>46)</sup>、Leonhardsberger<sup>23)</sup>、Braunsteiner<sup>2)</sup>、Kosenow<sup>17)</sup>、天木<sup>1)</sup>、宇野<sup>43)</sup>、山下<sup>49)</sup>等が主として超生体染色法により観察し、教室では渡辺<sup>46)</sup>、小林<sup>19)</sup>、木畑<sup>22)</sup>らが螢光培養法により螢光染色下の各種血液細胞の生態観察を行なっている。

Struggers<sup>2)</sup>はAoで染色せる細菌が死滅と共にAo摂取量を増して赤色を呈するのを見、これにより細菌の生死の鑑別を行なったが、同様の方法でVinegar<sup>45)</sup>は腹水腫瘍細胞の生死鑑別を、矢崎、小野田<sup>50)</sup>は鈎虫卵の、岡<sup>5)</sup>は蛔虫卵の生死鑑別を行なった。

教室渡辺<sup>46)</sup>はこの様な細胞の変性乃至は死によつてもたらされる螢光の変化に着目し、各種の悪条件下で培養を行なつて白血球の変性過程を観察し、細胞機能と螢光との間に相関関係のあることを明らかにした。

私は第1編、第2編において各種白血病患者の骨髓螢光培養を行ない、増生帯に出現する細胞の螢光を逐時的に観察した結果、正常人骨髓の諸細胞に比して著明な変性徴候の増加が認められたため、白血球細胞の機能低下と関係があるのではないかと考えるに至つた。因みに白血球細胞の機能低下は諸人の認めるところであり、形態学的にはZollinger<sup>52)</sup>、Bessis<sup>3)</sup>及び教室の品川<sup>41)</sup>が位相差顕微鏡により、又教室田村<sup>42)</sup>、大亀<sup>27)</sup>、太田<sup>29)</sup>は中性赤、ヤーンヌ緑により生体染色を行ない、池上<sup>15)</sup>、上田<sup>44)</sup>、横田<sup>61)</sup>は超生体染色を行なつて観察し、機能的には遊走能について坂野<sup>37)</sup>、井上<sup>16)</sup>、千田<sup>36)</sup>、更に教室の小野<sup>28)</sup>、十川<sup>39)</sup>、川野<sup>20)</sup>が何れも低下を認めて居り、墨粒貪喰能についても糸井<sup>14)</sup>、Galinowsky<sup>12)</sup>及び教室角南<sup>38)</sup>の記載は何れも機能低下をみている。

よつて私は本編において各種白血病患者骨髓につき、教室渡辺<sup>46)</sup>の考案せる培養後Ao添加法を行ない、染色直後より死に至る迄の各種白血球細胞の螢光を観察し、正常細胞における成績と比較して細胞機能と螢光との関係を追求したのである。

II 実験方法

1. 実験材料：各種白血病患者26例、並びに对照として正常人3例の骨髓組織片を用いた。各症例の内訳は表1の如くであるが、以下の文中においては下記の如き略称を用いた。即ち、急性骨髓性白血病はAML、急性淋巴球性白血病はALL、急性好塩基球性白血病はABL、慢性骨髓性白血病はCML、慢性淋巴球性白血病はCLL、単球性白血病はMLである。

第1表 実験症例

病名	症番 例号	氏名	好中球	好塩基球	好酸球	幼好中球	単球	幼単球	淋球	幼淋球
AML	41	角川	●				●			
	45	池田	●	●	●					
	49	田中	●				●			
ABL	9	市川		●						
CML	14	佐藤	●	●						
	19	秀加	●							
	20	加藤	●		●					
	23	松田	●	●						
	28	川崎	●		●					●
	36	伊藤	●		●					
	37	木村	●	●						●
42	浦上	●				●	●		●	
ALL	21	川上	●							●
	24	平木								●
	32	大川								●
	33	掛谷								●
	43	三木								●
	46	浅野	●							●
CLL	3	筒井								●
	27	播磨								●
ML	13	大山					●	●		●
	18	秋山	●							●
	29	馬越					●	●		●
	38	柏野					●	●		●
	39	三宅					●	●		●
	47	定兼	●				●	●		●
对照		岡本	●		●					●
		古谷	●		●					●
		宮田	●		●					●

注、症例番号は第1編、第1表による。

●は被験細胞種を示す。

2. 培養方法並びに色素添加方法：教室渡辺<sup>46)</sup>が用いた方法によつた。即ち教室考案の臨床培養法<sup>13)</sup>に準じ、培地に血清1滴及びVitamin B<sub>12</sub>1滴を用い平木式培養盤 No.1 上に組織片を静置し、被覆硝子を載せた後三方のみをパラフィンで封じて一方は開放し、被覆硝子面を下に向けて滅菌湿潤室中に静置し37°Cの孵卵器中で培養した。培養6時間後培養盤を取り出し、Micromanipulatorを用いて被覆硝子の開放せる部分より毛細管を挿入し、1/5,000Ao生食溶液を培地と等量注入してAo培地濃度が1/10,000になる様にし、開放面をパラフィンで封入した後再び37°Cで培養した。

3. 観察方法：蛍光装置は第1編Ⅱの3と同一であり、A<sub>0</sub>添加後10分, 1, 3, 6, 12, 24時間に標本を取り出し強拡大で観察した。なお、長時間の紫外線照射は細胞に高度の障害を与えるため、一度観察した標本は再び使用しなかつた。

4. 記載方法：渡辺に準じ蛍光を10段階に分け、同種細胞50個について各段階に属するものの百分率を求め、次いで各蛍光に略々該当する波長を設定し、表2の如くして平均蛍光度(以下MFと略す)を求め、数量的比較の基準とした。各種成熟細胞及び幼若白血病細胞について核MF及び顆粒MFを算出したが、淋巴球については胞体MFを、幼若好中球及び幼若単球では核小体MFをも求めた。共に著明な蛍光の変化を認めたからである。なお、実験例数が2例以上の場合は平均値を記載した。

第2表 平均蛍光度算出例

蛍光色	該当波長(Å)	細胞比率
赤	700	× 4/100 = 28.0
赤橙	650	× 54/100 = 351.0
橙	615	× 42/100 = 258.3
橙黄	585	+) MF = 637.3 平均蛍光度
黄	560	
黄緑	535	
緑(+)	515	
緑(+)	500	
緑(±)	490	
(-)	470	

Ⅲ 実験成績

1. 顆粒球系細胞

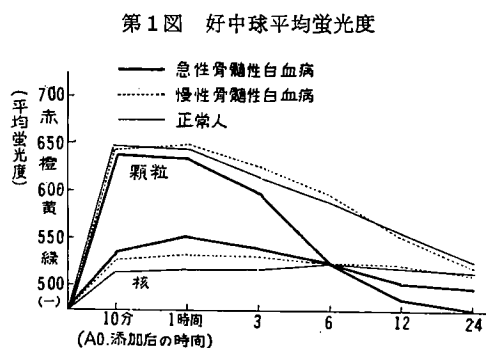
a. 好中球

1) 正常人(表3, 図1)

A<sub>0</sub>添加後10分には核は緑色を呈し、顆粒は88%が赤橙色で顆粒MFは645を示し、時間と共に核は黄色調を増して添加後6時間ではMFは527と最高値に達し、顆粒は漸次褪色して無蛍光のものが増加し24時間後では59.3%にも達し顆粒MFは527となった。この時核は褪色して緑色調のものも多く、弱緑色で膨化せるものも13.8%あり核MFは517に低下した。

2) 急性骨髓性白血病(表4, 図1)

A<sub>0</sub>添加後10分、核は黄緑色62%で核MFは534と高く、1時間後では橙色調のものが多数出現して550となり核MF曲線は正常人に比し著明に上昇した。顆粒は添加後10分に赤橙色62%で顆粒MFは



第3表 好中球の蛍光(%) —その1—

	時間	蛍光										MF	
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(+)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤		
正 常	核	10分	0	0	51.7	30.3	14.0	4.0	0	0	0	0	512
	核	1時間	0	0	30.3	42.7	21.0	6.0	0	0	0	0	517
	核	3時間	0	0	22.7	44.7	20.3	8.7	3.7	0	0	0	522
	核	6時間	0	0	20.7	34.3	29.3	9.3	4.0	2.3	0	0	527
	核	12時間	0	9.7	18.0	26.7	33.7	12.0	0	0	0	0	522
	核	24時間	0	13.3	26.3	28.0	22.7	9.7	0	0	0	0	517
	顆 粒	10分	0	0	0	0	0	0	2.7	9.3	88.0	0	645
人	顆 粒	1時間	0	0	0	0	0	0	2.3	14.3	83.3	0	644
	顆 粒	3時間	5.3	0	0	0	0	11.0	15.0	17.3	51.3	0	615
	顆 粒	6時間	12.7	0	0	0	0	8.7	28.3	36.3	14.0	0	588
	顆 粒	12時間	34.7	0	0	0	0	9.3	18.7	24.7	12.7	0	559
	顆 粒	24時間	59.3	0	0	0	0	3.0	10.3	18.0	9.3	0	527

第 4 表 好中球の蛍光(%) —その2—

		時 間	蛍 光										MF	
			(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤		
急性 骨髄性 白血病	核	10 分	0	0	0	22.7	62.0	15.3	0	0	0	0	534	
		1時間	0	0	0	7.3	45.3	32.0	12.0	3.3	0	0	550	
		3時間	0	0	21.3	16.7	30.7	8.7	17.3	5.3	0	0	539	
		6時間	0	0	60.7	5.3	8.7	4.0	15.3	6.0	0	0	526	
		12時間	0	0	93.3	0	5.3	0	1.3	0	0	0	503	
		24時間	0	0	100.0	0	0	0	0	0	0	0	500	
		顆 粒	10 分	0	0	0	0	0	0.7	4.7	32.7	62.0	0	635
	1時間		8.0	0	0	0	0	0	2.0	10.7	79.3	0	631	
	3時間		22.7	0	0	0	0	0	7.3	27.3	42.7	0	596	
	6時間		67.3	0	0	0	0	0	2.0	11.3	19.3	0	523	
	12時間		88.0	0	0	0	0	0	1.3	5.3	5.3	0	489	
	24時間		100.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	470	
	慢性 骨髄性 白血病		核	10 分	0	0	3.7	50.7	36.3	8.0	1.3	0	0	0
		1時間		0	0	0	43.0	39.7	12.3	5.0	0	0	0	532
3時間		0		0	9.7	39.0	35.7	8.3	5.0	2.3	0	0	530	
6時間		0		0	25.0	34.0	25.3	6.3	6.3	3.0	0	0	527	
12時間		0		0	46.0	21.0	14.3	10.7	4.7	3.3	0	0	522	
24時間		0		0	67.0	15.0	7.0	5.7	5.0	0.3	0	0	514	
顆 粒		10 分		0	0	0	0	0	0	3.3	20.7	76.0	0	641
		1時間	0	0	0	0	0	0	1.7	5.3	93.0	0	647	
		3時間	8.3	0	0	0	0	0.7	6.0	13.7	71.3	0	624	
		6時間	22.3	0	0	0	0	1.7	8.7	21.7	45.7	0	594	
		12時間	43.3	0	0	0	0	2.7	10.7	26.0	17.3	0	554	
		24時間	60.0	0	0	0	0	3.0	16.0	14.7	6.3	0	524	

635 と正常人より低く、1時間後では赤橙色 79.3% に増加したが既に褪色して無蛍光のものが 8% もあり、為に顆粒 MF は 631 に減少し、以後時間と共に急速に褪色して 24 時間後では顆粒の蛍光は認め得ず、従つて顆粒 MF 曲線は正常人に比し著明な早期低下を示した。核は添加後 6 時間迄は橙色調のものが増加したが、褪色して弱緑色に膨化するものも漸増し 12 時間後には 93.3% に達し、従つて核 MF 曲線も早期低下を示した。

### 3) 慢性骨髄性白血病 (表 4, 図 1)

添加後 10 分、核は黄緑色が 36.3% みられ、以後橙色調が増加して 1 時間後の核 MF は 532 となり、正常人に比し少々高値を示したが AML の 550 には及ばなかつた。6 時間以後の褪色も正常人より少々高度であり 24 時間後の緑色膨化細胞は 67% に達したが AML 程高率ではなかつた。顆粒では 1 時間後に赤橙色が 93% に達し、以後の褪色は緩徐であり、顆粒

MF 曲線は正常人と大差なかつた。

### 4) 急性淋巴细胞性白血病

核 MF は添加後 6 時間で最高に達したが、正常人に比して高くはなく、24 時間後の緑色膨化細胞は 91% を示し正常人より少々多く、核 MF 曲線は軽度の早期低下を示した。併し顆粒の蛍光は正常人と全く同様な経過を示し差は認められなかつた。

### 5) 単球性白血病

核、顆粒共に ALL におけるものと大体等しく、24 時間後の緑色膨化細胞は 84% であり正常人より少々多いが顆粒 MF には差が認められなかつた。

### b. 幼若好中球 (表 5)

骨髄性白血病における前骨髄球より後骨髄球迄の細胞を対象とし、AML では核小体も著明な蛍光の変化を示したので MF を算出した。

### 1) 慢性骨髄性白血病

Ao 添加後 10 分の核は緑色が多く、核 MF 516 は

第 5 表 幼若好中球の蛍光 (%)

		蛍光 時間	(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤	MF
急性 骨髓性 白血病	核	10分	0	0	30.0	52.0	18.0	0	0	0	0	0	514
		1時間	0	0	14.7	57.3	25.3	2.7	0	0	0	0	519
		3時間	0	0	0	23.3	41.3	14.0	14.7	6.7	0	0	543
		6時間	0	0	11.3	0	28.0	14.0	20.7	21.3	4.7	0	567
		12時間	0	0	40.0	0	27.3	9.3	8.0	10.0	5.3	0	535
		24時間	0	0	89.3	0	0	1.3	5.3	4.0	0	0	510
	核 小 体	10分	0	0	15.3	44.7	37.3	2.7	0	0	0	0	521
		1時間	0	0	0.7	27.3	58.7	13.3	0	0	0	0	533
		3時間	0	0	0	3.8	33.3	21.3	31.3	10.7	0	0	561
		6時間	0	0	11.3	0	13.3	18.7	26.0	26.0	4.7	0	575
		12時間	0	0	40.0	0	21.3	12.0	9.3	12.0	5.3	0	544
		24時間	0	0	89.3	0	0	0.7	4.0	6.0	0	0	511
	顆 粒	10分	2.7	0	0	0	0	0	20.7	66.0	10.7	0	609
		1時間	0	0	0	0	0	0	1.3	36.7	62.0	0	636
		3時間	0	0	0	0	0	0	4.7	34.0	61.3	0	635
		6時間	12.0	0	0	0	0	0	8.7	34.0	45.3	0	611
		12時間	40.0	0	0	0	0	0	8.7	33.3	18.0	0	561
		24時間	86.7	0	0	0	0	0	3.3	6.0	4.0	0	490
慢性 骨髓性 白血病	核	10分	0	0	28.3	55.3	15.7	0.7	0	0	0	0	516
		1時間	0	0	9.3	64.0	24.0	2.3	0.3	0	0	0	520
		3時間	0	0	0.7	64.0	26.3	5.3	3.0	0.7	0	0	525
		6時間	0	0	6.0	39.7	39.0	6.0	6.0	3.3	0	0	532
		12時間	0	0	19.7	25.7	38.0	5.7	7.7	3.3	0	0	531
		24時間	0	0	36.7	21.7	28.0	4.7	4.3	4.7	0	0	525
	顆 粒	10分	1.0	0	0	0	0	8.0	29.0	50.7	11.3	0	604
		1時間	0	0	0	0	0	0.3	17.3	36.3	46.0	0	626
		3時間	0	0	0	0	0	0	10.0	27.3	62.7	0	634
		6時間	4.3	0	0	0	0	0	8.0	21.7	66.0	0	633
		12時間	20.0	0	0	0	0	1.0	10.3	27.7	41.0	0	597
		24時間	38.0	0	0	0	0	6.3	12.7	19.0	24.0	0	561

成熟好中球より遙かに低いが漸次黄色調を加え、6時間後には532となり成熟好中球を凌駕する。顆粒も添加後10分のMFは604で誠に低く、以後漸次赤橙色が増加して3時間後にはMF634と最高に達し、以後の褪色も軽度で24時間後のMFは561の高値を保った。

2) 急性骨髓性白血病

▲o 添加後10分の核MFは514で成熟好中球の534(表4)に比し著しく低いが時間と共に橙色调が激増し、6時間後の核MFは567にも達しこの時の成熟好中球が褪色著明なるに比し対照的であり、更にCMLの幼若好中球に比しても著しい高値を示した。

又12時間以後の褪色も急激で24時間後の核MFは510でCMLに比し早期低下を示した。顆粒においても3時間後のMF635は成熟好中球の596に比し著しく高く褪色の遅いことを示すが、6時間以後の褪色は急激でCMLと比較しても早期低下を示した。更に核小体では添加後10分で黄緑色が37.3%もありMF521は核MFの514より高く、黄色化、橙色化も核に先行してみられ、この為核小体MFは常に核MFより高値を示し、6時間後では575に達し以後の褪色は核と殆んど同時に出現し、且つ進行した。

## c. 好酸球 (表6)

## 1) 正常人

△o 添加後10分, 核は黄色調が強いが好塩基球程ではなく, 核 MF は3時間後に546と最高値に達し, 以後漸次褪色するが24時間後の綠色膨化せるものは55.2%で少く, 核 MF525 は顆粒球中最も高い。顆

粒は好中球より赤色調が強いが好塩基球程ではなく, 3時間後の MF 546 を最高として以後徐々に褪色し, 24時間後の顆粒 MF 558 は顆粒球中最も高値を示した。

## 2) 急性骨髓性白血病

核は正常人より少々橙色調が強く, 3時間後 MF

第6表 好酸球の蛍光(%)

	時間	蛍光										MF		
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤			
正常人	核	10分	0	0	9.2	39.4	42.6	8.8	0	0	0	0	526	
		1時間	0	0	0	32.0	48.8	19.2	0	0	0	0	533	
		3時間	0	0	0	9.8	51.4	24.2	14.6	0	0	0	546	
		6時間	0	0	9.8	16.0	40.2	19.2	14.8	0	0	0	541	
		12時間	0	0	27.8	21.0	18.8	19.8	12.6	0	0	0	532	
		24時間	0	0	55.2	5.6	8.2	20.6	10.4	0	0	0	525	
		顆粒	10分	0	0	0	0	0	0	6.8	73.2	20.0	0	620
	1時間		0	0	0	0	0	0	0	51.8	44.0	4.2	634	
	3時間		0	0	0	0	0	0	0	7.0	77.2	15.8	655	
	6時間		10.6	0	0	0	0	10.8	8.6	21.4	32.2	16.4	616	
	12時間		26.2	0	0	0	4.0	4.2	8.8	18.0	27.6	11.2	588	
	24時間		40.0	0	0	0	2.2	5.6	9.0	18.8	24.2	0	558	
	急性骨髓性白血病		核	10分	0	0	12	42	46	0	0	0	0	0
		1時間		0	0	0	14	72	14	0	0	0	0	536
3時間		0		0	0	6	12	62	20	0	0	0	559	
6時間		0		0	0	4	46	28	22	0	0	0	552	
12時間		0		0	64	0	0	4	22	10	0	0	533	
24時間		0		0	92	0	0	4	4	0	0	0	506	
顆粒		10分		0	0	0	0	16	0	66	0	18	0	617
		1時間	0	0	0	0	0	0	0	38	62	0	637	
		3時間	0	0	0	0	0	0	0	12	78	10	651	
		6時間	12	0	0	0	0	0	14	12	52	10	620	
		12時間	22	0	0	0	0	6	18	36	18	0	581	
		24時間	48	0	0	0	0	6	36	10	0	0	531	
		慢性骨髓性白血病	核	10分	0	0	0.5	37.0	48.5	14.0	0	0	0	0
1時間				0	0	0	11.0	67.5	14.5	7.0	0	0	0	540
3時間	0			0	0	2.5	62.5	11.0	18.0	6.0	0	0	549	
6時間	0			0	16.0	3.5	46.5	8.0	17.0	9.0	0	0	549	
12時間	0			0	40.0	2.5	36.0	4.5	13.0	4.0	0	0	531	
24時間	0			0	68.5	0	23.5	2.0	6.0	0	0	0	515	
顆粒	10分			0	0	0	0	0	0	16.0	54.0	30.0	0	621
	1時間		0	0	0	0	0	0	3.0	44.0	39.0	14.0	637	
	3時間		0	0	0	0	0	0	0	20.0	58.5	21.5	655	
	6時間		8.5	0	0	0	0	0	14.5	23.5	38.5	15.0	625	
	12時間		23.0	0	0	0	0	0	21.5	28.0	26.0	1.5	586	
	24時間		45.5	0	0	0	0	0	24.0	28.5	2.0	0	543	

は559と軽度上昇を示し、24時間後の緑色膨化せるものも92%と高率で核MF曲線は早期低下を示した。顆粒の褪色も少々高度で24時間後の顆粒MFは531に低下した。

3) 慢性骨髄性白血病

核顆粒共に12時間後迄は正常人と大差なく、以後

の褪色は漸次著明となり、24時間後には核MF515、顆粒MF543で対照より少々低い。

d. 好塩基球

正常人好塩基球は観察可能な細胞が少く、百分率は算出し得なかつたが、その蛍光の推移はCMLの好塩基球に大体一致した。従つてCMLに於ける成

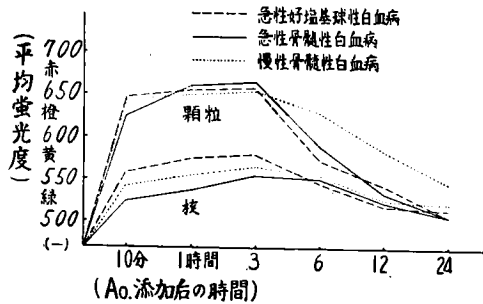
第7表 好塩基球の蛍光(%)

		時 間	螢 光										MF
			(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤	
急性好塩基球性白血病	核	10分	0	0	0	0	40	38	22	0	0	0	555
		1時間	0	0	0	0	12	46	22	20	0	0	574
		3時間	0	0	0	0	10	32	24	34	0	0	582
		6時間	0	0	22	0	22	50	6	0	0	0	543
		12時間	0	0	50	0	26	24	0	0	0	0	524
		24時間	0	0	84	0	6	10	0	0	0	0	508
	顆粒	10分	0	0	0	0	0	0	4	14	72	10	648
		1時間	0	0	0	0	0	0	0	12	72	16	654
		3時間	0	0	0	0	0	0	0	6	80	14	655
		6時間	34	0	0	0	0	6	10	12	26	12	579
		12時間	56	0	0	0	0	0	0	16	24	4	546
		24時間	78	0	0	0	0	0	0	10	12	0	506
急性骨髄性白血病	核	10分	0	0	0	28	72	0	0	0	0	0	529
		1時間	0	0	0	0	88	10	2	0	0	0	539
		3時間	0	0	0	0	66	18	10	6	0	0	549
		6時間	0	0	0	0	64	16	10	10	0	0	552
		12時間	0	0	36	0	48	16	0	0	0	0	526
		24時間	0	0	76	0	24	0	0	0	0	0	508
	顆粒	10分	0	0	0	0	0	0	0	48	52	0	633
		1時間	0	0	0	0	0	0	0	10	82	8	651
		3時間	0	0	0	0	0	0	0	4	80	16	657
		6時間	26	0	0	0	0	0	10	16	48	0	591
		12時間	60	0	0	0	0	0	0	6	34	0	540
		24時間	86	0	0	0	0	0	0	10	4	0	492
慢性骨髄性白血病	核	10分	0	0	2.5	5.0	64.8	21.3	6.3	0	0	0	541
		1時間	0	0	0	0	47.8	37.5	10.8	4.0	0	0	554
		3時間	0	0	0	0	39.3	35.0	15.0	10.8	0	0	561
		6時間	0	0	7.5	10.5	39.8	22.8	12.0	7.5	0	0	549
		12時間	0	0	14.8	17.5	53.0	7.3	6.5	1.0	0	0	533
		24時間	0	2.5	37.3	10.5	46.0	3.8	0	0	0	0	520
	顆粒	10分	0	0	0	0	0	1.3	1.3	12.8	79.3	5.5	646
		1時間	0	0	0	0	0	0	0	7.3	81.3	11.5	653
		3時間	0	0	0	0	0	0	0	9.0	80.3	10.8	652
		6時間	13.8	0	0	0	0	2.5	2.5	19.0	57.3	5.0	615
		12時間	27.3	0	0	0	0	2.5	8.8	25.5	36.0	0	584
		24時間	51.3	0	0	0	0	1.3	5.0	28.0	14.5	0	544

績を比較の基準とした。

1) 慢性骨髄性白血病 (表7, 図2)

第2図 好塩基球平均蛍光度



Ao 添加後10分, 核は黄緑色が64.8%を占め, 核 MF は541で, 好中球より高値を示し3時間後には561に達した. 顆粒は好中球より赤色調が強くなり1時間後の顆粒 MF は653に達し, 以後徐々に褪色したが好中球程著明でなく, 顆粒を認め得ない細胞は12時間後で72.3%, 24時間後でも51.3%にすぎず, 従って顆粒 MF はそれぞれ584及び544で甚だ高かった. 核の褪色も甚だ緩徐で24時間後に緑色膨化せるものは39.8%にすぎず, 核 MF は520の高値に留まった.

2) 急性好塩基球性白血病 (表7, 図2)

添加後10分, 核には既に橙黄色が22%もあり, 以後橙黄色調のものが急激に増加して, 3時間後の核 MF は582となり, 核 MF 曲線は CML に比し著しい上昇を示した. 顆粒は3時間後迄は CML と同様赤色調が強かったが, 6時間後では褪色して無蛍光のものが34%に達し顆粒 MF 曲線は急激な早期低下を示した. 核の褪色は6時間以後著明となり24時間後の緑色膨化細胞は84%にも達した.

3) 急性骨髄性白血病 (表7, 図2)

Ao 添加後10分の核には橙黄色はみられず, 核 MF は3時間後549に達したにすぎず CML より低値を示した. 顆粒は前二者と同じく赤色調強く, 而も6時間後には褪色無蛍光のものが26%出現し, 顆粒 MF 曲線は ABL と同じく著しい早期低下を示した. 核の褪色は少々遅れたが24時間後には緑色膨化細胞は76%に達し, 核 MF は508で ABL に等しかった.

e. 小括

顆粒球系細胞では核の蛍光は Ao 添加後時間と共に黄色, 橙黄色調を増し, 従って核 MF 曲線は上昇し, 次いで褪色して最後には緑色膨化を呈し, この為核 MF は低下した. 顆粒の蛍光は添加直後に一旦赤橙

色となつた後, 漸次褪色して無蛍光となり, 従って顆粒 MF 曲線は急激な上昇の後徐々に下降した. この傾向は白血病時には一層著明となつた. 即ち, 好中球では AML において最も著明な核 MF の上昇と顆粒 MF の早期低下を認め, CML では核 MF の軽度上昇をみたが顆粒 MF は正常人と大差なく, ALL, ML の好中球も正常人と有意の差はなかつた. 好塩基球では核の黄色調, 顆粒の赤色調が顆粒球中最も強かつたが, ABL では核 MF の著明な上昇と顆粒 MF の早期低下を認め, AML では顆粒 MF は著明に低下したが核 MF は上昇せず, CML では正常人好塩基球と同様の推移を示した. 好酸球では顆粒が赤橙色となるのが遅く, 且つ褪色も遅いが, 顆粒 MF 曲線の低下は顆粒球中最も軽微であつたが, AML では顆粒 MF が早期に低下し核 MF の上昇は著明でなく, CML では共に正常人と大差なかつた. 更に AML, CML における幼若好中球では, 核 MF の上昇, 顆粒 MF の低下が常に成熟好中球より遅れ, 且つ AML では CML より高度の核 MF 上昇と顆粒 MF 早期低下を認めた. 又 AML では核小体 MF の上昇が著明で常に核 MF より高値を示したが, CML では核 MF と異ならなかつた.

2. 単球系細胞

a. 単球 (表8, 図3)

1) 正常人

核は緑色調が強く, 顆粒球に比し橙黄色化する傾向が少かつた. 従って核 MF は3時間後に527, 6時間後でも低く, 以後漸次褪色して膨化した. 顆粒は添加後10分では赤橙色少く MF は603であるが, 時間と共に急速に赤色調を増し3時間後に MF は最高値648に達し, 以後の褪色は顆粒球に比し甚だ急激で, 顆粒 MF 曲線は6~12時間の間で急降下を示した.

2) 単球性白血病

添加後10分の核は黄色調が多く MF は528を示し, 時間と共に橙黄色調が増加して3時間後の MF は557となり正常人に比し著明な上昇を示した. 6時間以後の褪色も急速で24時間後の緑色膨化せる細胞は89.3%に達し, 核 MF は著しい早期低下を示した. 顆粒は添加後1時間の MF 640を最高として以後急速に褪色し, 12時間後の MF 523は正常人の598に比し著しく低く, 24時間後には実に97.3%が無蛍光となり顆粒 MF は著しく低下した.

3) 慢性骨髄性白血病

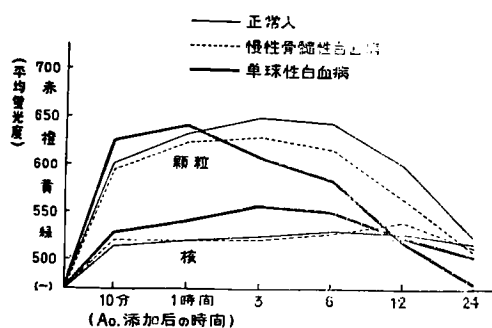
核, 顆粒共に正常人単球の MF と同様な経過を示し有意の差はなかつた.



第 8 表 単球の螢光 (%)

		螢光											MF
		時間	(-) 緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤		
正 常 人	核	10分	0	0	24.2	63.6	12.2	0	0	0	0	0	514
		1時間	0	0	9.8	51.8	38.4	0	0	0	0	0	521
		3時間	0	0	0	48.6	47.4	0	0	0	0	0	527
		6時間	0	0	6.0	44.4	33.2	10.2	6.2	0	0	0	530
		12時間	0	0	13.8	41.6	30.2	8.4	6.0	0	0	0	527
		24時間	0	0	50.2	16.2	21.6	8.2	3.8	0	0	0	518
	顆 粒	10分	0	0	0	0	0	0	52.2	37.6	10.2	0	603
		1時間	0	0	0	0	0	0	5.8	46.2	41.8	6.2	633
		3時間	0	0	0	0	0	4.0	0	33.6	46.4	20.0	648
		6時間	8.0	0	0	0	0	0	0	16.4	52.2	23.4	642
		12時間	28.4	0	0	0	0	0	0	20.6	38.8	11.2	598
		24時間	54.2	0	0	0	0	0	0	8.4	11.8	25.6	523
単 球 性 白 血 病	核	10分	0	0	6.0	43.3	34.7	15.3	0.7	0	0	0	528
		1時間	0	0	0	23.0	43.3	24.0	8.0	1.7	0	0	542
		3時間	0	0	3.3	4.7	40.0	25.7	15.3	8.7	2.3	0	557
		6時間	0	0	23.7	1.3	30.0	13.3	17.7	10.7	3.3	0	551
		12時間	0	0	55.3	0.3	24.7	4.7	7.7	7.3	0	0	525
		24時間	0	2.0	87.3	0.3	7.3	0.7	1.7	0.7	0	0	505
	顆 粒	10分	0	0	0	0	0	0	14.0	46.3	39.7	0	625
		1時間	0	0	0	0	0	0	2.3	31.3	61.7	4.7	640
		3時間	9.7	0	0	0	0	0	3.3	21.7	60.0	5.3	607
		6時間	31.7	0	0	0	0	0	3.7	24.0	37.7	3.0	584
		12時間	67.7	0	0	0	0	0	3.3	9.0	20.0	0	523
		24時間	97.3	0	0	0	0	0	1.0	1.3	0.3	0	474

第 3 図 単球平均螢光度



b. 幼若単球 (表 9)

ML における前単球を対象とした。核は成熟単球より緑色調が強く、黄色化、橙色化するのも遅れ、従つて核 MF 曲線は後期上昇を示し、6 時間後に 549 に達し、以後の褪色も成熟単球より緩徐で 24 時間後に緑色膨化するもの 73%、核 MF は 514 となった。顆粒は赤色調が少々少く添加後 1 時間の MF 635

を最高として褪色したが成熟単球程急激ではなく、一方では赤色調の強い粗大な空泡が出現して来た。核小体は早期より黄色調のものが多く、添加後 10 分の MF は 531 で、それ以後橙色調が激増し 6 時間後の MF は 565 となり、核 MF に比し著明な上昇を示したが、12 時間以後の褪色は核と同様であつた。

c. 小括

単球の核の螢光は顆粒球に比し緑色調が強く、黄色、橙色を呈し難く、従つて核 MF の上昇は軽度であつたが、顆粒は時間と共に赤色調の強い空泡となるものが多く、而も Ao 添加後 6 時間以後は急速に褪色するのを常とし、従つて顆粒 MF 曲線は一旦急上昇の後急激に低下した。ML における成熟単球は著明な核 MF の上昇と顆粒 MF の早期低下を示したが、CML における単球では正常人と大差がなかつた。更に ML における幼若単球では成熟単球に比し核 MF の上昇及び低下、顆粒 MF の低下が全て遅れ、核小体 MF は核 MF に比し著しい高値を示

第9表 幼若単球の蛍光(%)

	時間	蛍光											
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤	MF	
単球	核	10分	0	1.0	30.0	39.3	24.0	5.7	0	0	0	0	518
		1時間	0	0	15.7	30.0	43.7	7.0	3.7	0	0	0	525
		3時間	0	0	5.3	17.3	50.0	11.3	11.7	4.3	0	0	542
		6時間	0	0	12.3	5.7	43.7	13.3	15.0	8.7	1.3	0	549
		12時間	0	0	35.3	1.3	32.7	9.7	14.0	7.0	0	0	537
		24時間	0	0	73.0	1.0	15.7	2.7	6.0	1.7	0	0	514
		白血	核小体	10分	0	0	9.7	31.3	38.7	17.0	3.3	0	0
1時間	0			0	4.0	12.3	44.0	23.7	13.3	2.7	0	0	546
3時間	0			0	4.0	1.7	31.3	24.3	24.3	14.3	0	0	563
6時間	0			0	8.7	1.7	27.7	17.3	25.0	18.0	1.7	0	565
12時間	0			0	36.3	0.7	28.3	7.7	12.3	14.7	0	0	541
24時間	0			0	75.7	0.7	13.3	1.0	3.0	6.3	0	0	515
病	顆粒			10分	7.0	0	0	0	0	0	23.3	41.3	28.3
		1時間	0	0	0	0	0	0	7.3	37.3	50.3	5.0	635
		3時間	5.7	0	0	0	0	0	0.7	21.0	66.3	6.7	634
		6時間	18.3	0	0	0	0	0.7	2.3	10.7	63.3	4.7	595
		12時間	39.0	0	0	0	0	0.7	2.7	16.0	39.3	2.3	573
		24時間	75.7	0	0	0	0	0	2.0	10.7	11.0	0.7	509

し核小体橙変を呈した細胞が多いことを示した。この成績は AML と CML の幼若好中球相互の関係に類似しているが、ML の幼若単球とAML の幼若好中球を比較しても有意の差はMF の面では得られなかった。

### 3. 淋球系細胞

#### a. 淋球

淋球の蛍光は顆粒球及び単球に比して顆粒が微量であり、核の蛍光も目立つた変化は示さないが、Ao 添加後時間の経過したものでは胞体が橙色を呈するものが見られ、これは白血球時に特に著明に出現したので胞体 MF についても測定した。

#### 1) 正常人 (表10, 図4)

核は顆粒球、単球に比し黄色調が強く、Ao 添加後10分の核 MF は528で、時間と共に黄色調を増し6時間以後には橙色調のものも出現して、12時間後の MF は546に達し以後は褪色するが、24時間後の緑色膨化せるものは22%にすぎず、核 MF は543と高値を保った。顆粒は添加後時間と共に漸次赤色調を増し、3時間後の顆粒 MF は664で成熟細胞中最も高値を示したが、6時間以後の褪色も甚だ急激で24時間後の MF は503に低下した。胞体の蛍光は添加後10分では緑色で MF は503と核より低いが、漸

次黄色橙色調を増し12時間後の MF は538を示し、以後は褪色且つ膨化して24時間後の MF は512と核より低下した。

#### 2) 急性淋球性白血病 (表11, 図4)

核は早期より黄色調が強く、Ao 添加後1時間で既に橙色調が出現し3時間後の MF は556で正常人に比し著明な上昇を認め、6時間以後の褪色も高度で24時間後の MF は508に低下した。顆粒は添加後1時間の MF 645を最高として急速に褪色し、24時間後には顆粒の蛍光は全く認められなかった。胞体は早期より黄色調が強く、1時間後では橙色調のものが多数出現して MF は558となり、3時間後には565に達し、胞体 MF 曲線は著明な上昇を示したが6時間以後は急速に褪色し且つ膨化して、24時間後の MF は480であった。

#### 3) 慢性淋球性白血病 (表11)

核、顆粒、胞体共に添加後6時間迄は正常人と全く同様に経過し、12時間以後はやや褪色が著明となつて24時間後の核 MF は519、顆粒 MF は492、胞体 MF は488となり、何れも正常人よりやや低値を示した。

#### 4) 単球性白血病

核及び顆粒の MF は共に正常人と大差なく、胞体

第10表 淋 巴 球 の 蛍 光 (%) —その1—

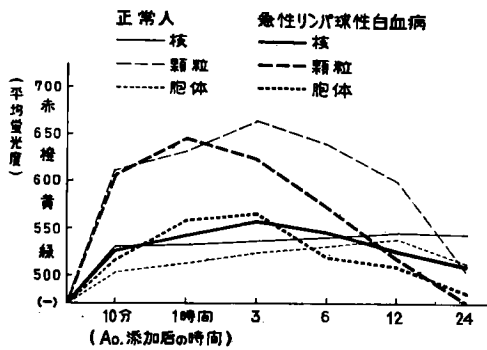
	時間	蛍 光										MF	
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤		
正	核	10分	0	0	0	34.3	65.0	0.7	0	0	0	0	528
		1時間	0	0	0	13.3	85.3	1.3	0	0	0	0	532
		3時間	0	0	0	12.7	71.3	16.0	0	0	0	0	536
		6時間	0	0	10.3	13.7	41.0	28.7	6.3	0	0	0	539
		12時間	0	0	10.7	7.3	36.7	31.7	9.7	4.0	0	0	546
		24時間	0	0	22.0	0	44.0	10.0	18.7	5.3	0	0	543
		常	顆粒	10分	0	0	0	0	0	0	32.0	56.0	10.3
1時間	0			0	0	0	0	0	12.3	40.3	37.3	10.0	632
3時間	0			0	0	0	0	0	0	10.0	55.7	34.3	664
6時間	8.0			0	0	0	0	0	0	19.7	50.7	21.7	640
12時間	24.3			0	0	0	0	0	0	27.7	40.0	8.0	601
24時間	80.8			0	0	0	0	0	0	8.0	11.7	0	503
人	胞体			10分	0	34.0	42.3	9.7	14.0	0	0	0	0
		1時間	0	0	53.3	14.3	32.3	0	0	0	0	0	513
		3時間	0	0	31.0	17.7	43.7	7.7	0	0	0	0	523
		6時間	0	18.0	20.7	2.0	35.3	7.7	12.3	4.0	0	0	531
		12時間	16.3	34.7	0	0	2.3	6.0	22.3	14.7	3.7	0	538
		24時間	65.7	0	0	0	0	4.3	19.7	8.3	2.0	0	512

第11表 淋 巴 球 の 蛍 光 (%) —その2—

	時間	蛍 光										MF	
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤		
急性	核	10分	0	0	5.0	42.5	43.5	9.0	0	0	0	0	527
		1時間	0	0	3.0	27.5	37.5	20.0	8.5	3.5	0	0	541
		3時間	0	0	5.0	9.0	30.0	25.0	20.5	10.5	0	0	556
		6時間	0	0	22.0	3.5	28.5	23.0	15.5	7.5	0	0	546
		12時間	0	0	51.5	3.0	28.5	8.0	6.0	3.0	0	0	524
		24時間	0	0	82.0	0	15.5	1.0	0.5	1.0	0	0	508
		淋	顆粒	10分	4.0	0	0	0	0	0	24.5	50.5	21.0
1時間	0			0	0	0	0	0	2.0	32.0	50.5	15.5	645
3時間	16.0			0	0	0	0	0	0	21.0	42.5	20.5	624
6時間	39.0			0	0	0	0	0	3.5	17.5	36.5	3.5	573
12時間	71.0			0	0	0	0	0	0	13.5	15.5	0	518
24時間	100.0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	470
血	胞体			10分	0	30.0	24.5	8.5	22.0	10.5	4.5	0	0
		1時間	0	0	18.5	9.5	15.0	7.5	33.0	16.5	0	0	558
		3時間	15.0	0	0	0	15.0	11.5	34.0	24.5	0	0	565
		6時間	39.0	0	0	0	14.0	5.5	14.0	27.5	0	0	520
		12時間	62.0	0	0	0	12.5	6.5	7.5	11.5	0	0	509
		24時間	88.0	0	0	0	8.0	0.5	1.5	2.0	0	0	480

慢性 淋 巴 球 性 白 血 病	核	10分	0	0	37	44	19	0	0	0	0	0	513
		1時間	0	0	6	61	33	0	0	0	0	0	521
		3時間	0	0	0	37	56	5	2	0	0	0	530
		6時間	0	0	6	34	37	14	6	3	0	0	535
		12時間	0	0	35	5	25	16	12	6	1	0	538
		24時間	0	0	51	2	39	7	1	0	0	0	519
		顆 粒	10分	9	0	0	0	0	0	14	61	16	0
	1時間		0	0	0	0	0	0	5	49	35	11	635
	3時間		0	0	0	0	0	0	0	8	68	24	659
	6時間		16	0	0	0	0	0	5	16	50	13	619
	12時間		50	0	0	0	0	0	6	20	22	2	550
	24時間		83	0	0	0	0	0	3	6	5	3	492
	胞 体		10分	0	23	52	15	10	0	0	0	0	0
		1時間	0	15	48	16	21	0	0	0	0	0	508
		3時間	0	8	30	10	45	5	2	0	0	0	521
		6時間	5	5	10	6	33	17	15	9	0	0	544
		12時間	31	15	9	0	9	12	13	11	0	0	523
		24時間	65	10	5	0	14	5	1	0	0	0	488

第4図 淋巴球平均蛍光度



の蛍光は核と全く一致した。

5) 慢性骨髄性白血病

核及び顆粒の MF は共に正常人と大差がなかつた。

b. 幼若淋巴球 (表12)

ALL における未熟淋巴球 (第2編で詳述せる如く淋巴芽球と成熟淋巴球の中間の成熟段階の細胞) を対象とし、胞体の蛍光は核にほぼ一致したため省略した。

核の蛍光は成熟淋巴球に比し黄色調のものが少なく、核 MF は3時間後に542であり、成熟淋巴球の556に比し少々低く、以後も顕著な変化なく徐々に

第12表 幼若淋巴球の蛍光(%)

	時間	蛍光										MF	
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤		
急性 淋 巴 球 性 白 血 病	核	10分	0	0	23.7	48.3	23.3	3.0	1.7	0	0	0	519
		1時間	0	0	8.7	41.0	34.3	9.0	5.7	1.3	0	0	530
		3時間	0	0	3.0	29.0	37.0	15.3	11.0	3.0	1.7	0	542
		6時間	0	0	13.0	23.7	33.0	12.7	11.7	5.3	0.7	0	540
		12時間	0	0	38.0	11.3	28.0	12.0	7.3	3.0	0.3	0	531
		24時間	0	0	73.7	3.0	18.7	3.3	1.3	0	0	0	510
		顆 粒	10分	29.0	0	0	0	0	2.0	17.0	37.3	14.7	0
	1時間		0.7	0	0	0	0	1.3	11.0	35.0	41.3	10.7	637
	3時間		7.0	0	0	0	0	0	1.3	24.0	50.7	17.0	637
	6時間		23.0	0	0	0	0	0	3.3	18.0	46.0	9.7	607
	12時間		53.3	0	0	0	0	0	0.7	21.7	22.3	2.0	547
	24時間		88.3	0	0	0	0	0	1.3	5.0	5.3	0	485

褪色した。顆粒は添加後10分では無蛍光のものが29%に達したが、以後漸次蛍光を発生し1時間後の MF は 637 を示し、以後は成熟細胞とほぼ同様の経過で褪色したが、全経過を通じ顆粒の蛍光に赤色調のものが多いのが特異であつた。

#### c. 小括

淋巴球の核は顆粒球単球に比して黄色調が強く且つ橙色化し易く、従つて核 MF は一般に高値を示した。顆粒の蛍光も赤色調が強く、且つ単球と同様に急速に褪色する性質があり、従つて顆粒 MF 曲線は一旦急上昇の後急激に下降するが、白血病細胞では以上の傾向が一層著明になつた。即ち ALL では核 MF が著明に上昇し、顆粒 MF が著明な早期低下を示し、CLL でも顆粒 MF の早期低下が認められたが、核 MF の上昇は顕著でなかつた。更に ALL では胞体が橙色調を呈するものが頻発し、胞体 MF は正常人淋巴球に比し著明な上昇を示し、更に一般に核の橙色化及び褪色に先行して変化することが明らかとなつた。CLL においても軽度ではあるがこの傾向を認めた。ML 及び CML における淋巴球は正常人との間に差異を認めなかつた。更に ALL における幼若淋巴球では核 MF は成熟淋巴球程上昇せず、顆粒 MF の低下も急激でなく、胞体の蛍光もほぼ核に同調し、又 AML の幼若好中球の幼若単球、ML と比較しても MF の面では大差がなく、僅かに顆粒の赤色調のものが多いのが目立つ位であつた。

#### IV. 総括並びに考按

私は第1編及び第2編において各種白血病患者骨髄の蛍光培養増生帯を観察し、時間と共に核の蛍光が黄色及び橙色調を増し顆粒の蛍光が褪色して行くのを認めたが、これは教室渡辺<sup>46)</sup>並びに小林<sup>19)</sup>が観察した変性徴候と同じものであつた。そこで私は各種白血病骨髄につき臨床培養を行ない、培養後6時間に Ao を添加し、細胞の蛍光を添加直後より死に至る迄観察し、平均蛍光度法によつて各々の成績を比較して来たのであるが、本章ではこの成績を諸家による白血球変性の観察、並びに上記渡辺の実験結果と比較し且つ若干の考察を行なうこととする。

白血病細胞の変性は形態的にも蛍光の上でも渡辺、小林の正常細胞の変性像と本質的な差異はなく、唯著しく早朝より且つ高度に起るのを認めた。即ち形態的には空泡の出現、異常空起形成、顆粒膨化、核小体膨化、核融解、核濃縮等がみられ、Zollinger<sup>52)</sup>、Bessis<sup>3)</sup>、Gross<sup>11)</sup>、及び教室品川<sup>41)</sup>等の観察と

異なるものではなく、蛍光像の面でも前記渡辺及び小林が観察した顆粒膨化、顆粒褪色、Ao 可染空泡及び不染空泡の出現、胞体赤変、胞体綠色膨化、核黄変、核赤変、核綠色膨化、核小体赤変、核小体綠色膨化等が随處にみられた。

さて、超生体又は生体染色法によると、白血球の変性は染色性の亢進を来することが古くより知られ、Ries<sup>30)</sup>はこの現象を胞体の Kolloidaler Struktur の変化によると考え、清野<sup>18)</sup>、藤浪<sup>10)</sup>、Seyderhalm<sup>34)</sup>らは細胞膜の透過性の亢進によると云い、教室田村<sup>42)</sup>も同じく細胞膜透過性の亢進と共に染色顆粒の機能低下による色素反撥力の減弱に基くものであろうと述べている。

何れにもせよ従来の生体染色法によれば染色性の差異は唯色調の濃淡を示すのみであつたが、Ao による染色では色素摂取量の多寡は Strugger<sup>32)</sup>の云う濃度効果により色調の差となつて現われる。Strugger によれば細胞の各螢光色は1/5,000乃至1/50,000の色素濃度に相当し、死滅せる細胞核の赤色螢光の如きは1/100の濃度にも達し、これにより細胞の生死を判別せんとした。又 Schummelfeder<sup>33)</sup>は生きた心筋細胞の胞体が綠色で、死滅と共に赤色となるのを観察し、蛋白ミセル構造の変化により Ao 摂取量の増加したためであると考え、Contier<sup>7)</sup>、Kosenow<sup>17)</sup>、山下<sup>49)</sup>の観察でも死細胞の胞体は赤色であつた。

教室渡辺<sup>46)</sup>は臨床培養法で培養した増生帯の細胞に Ao で蛍光染色を施し、細胞の蛍光が時間と共に核は色素濃度を増す方向に、顆粒は減ずる方向へと変化するのを観察し、各種の悪条件を負荷してこれが変性過程であることを確認した。そして平均蛍光度法により蛍光の変化を数量的に表現することを考案した。

実験成績で述べた如く私は白血病における各種細胞について MF を測定した結果、AML の好中球、ABL の好塩基球、ML の単球、ALL の淋巴球において著明な核 MF 曲線の上昇と顆粒 MF 曲線の早期低下を認め、更に ALL の ML の淋巴球では胞体 MF が著明に上昇し、AML と ML の幼若細胞では核小体 MF が著明に上昇するのも観察した。而し AML の好酸球、ALL の好中球の如く白血病種以外の細胞では核 MF の上昇、顆粒 MF の早期低下は著明でなく、又慢性白血病の各種細胞では正常人の同種細胞との間に差異を認め得なかつた。

先にのべた諸家の成績でも明らかなる如く核、胞体の赤色螢光、顆粒の褪色は死戦期又は死後の徴候で

あり、教室渡辺の実験でも核 MF の上昇、顆粒 MF の早期低下は悪条件下の細胞機能の低下時にみられたものであつた。従つて私の得た結果は白血病時の成熟細胞の機能が急性白血病及び単球性白血病では極度に低下し、且つそれは当該白血病種の細胞に一層著明であり、慢性白血病における機能低下は軽微なものであることを示している。

従来より白血病時の細胞機能の低下は諸家の指摘する処である。即ち、坂野<sup>27)</sup>、井上<sup>16)</sup>及び教室小野<sup>28)</sup>、川野<sup>20)</sup>は白血病時の好中球遊走速度を測定して何れも低下を認め、又好中球の墨粒貪喰能の低下は糸井<sup>14)</sup> Galinowsky<sup>12)</sup> が報告し、教室角南<sup>38)</sup>も白血病骨髄の好中球の貪喰能が常に低下し、急性白血病では低下の度が著しいことを認めている。中性赤生体染色においても教室田村<sup>42)</sup>、大亀<sup>27)</sup>が好中球、単球について急性白血病時に著明な機能低下を認め、慢性白血病では比較的軽微であるとのべている。これら諸家の成績では急性白血病及び単球性白血病における細胞の機能低下は全ての細胞種にみられて居り、当該白血病種の細胞において著明であつた私の成績とは僅かに異なるが、これは観察方法並びに染色機転の差によるものと考ええる。

因みに Schummelfeder<sup>33)</sup> は Ao の染色性と細胞の代謝機能との関係を論じ、癌細胞の核が生体染色時において既に赤色を呈することについて、Strugger<sup>32)</sup> の濃度効果と Warburg<sup>47)</sup> による腫瘍細胞の呼吸解糖能とを結びつけた結果、多量の Ao を摂取するには細胞の glykolytischer Aktivität が大でなければならぬと推論したが、Oxydationspotential との関係は明確にし得なかつた。一方 Ries<sup>30)</sup> 及び Rünstorn<sup>31)</sup> は塩基性色素で生体染色を行ない、何れも細胞呼吸の亢進時に染色性の増強を認めて居り、又 Bethe<sup>4)</sup> は pH を重視し Ao イオンはアルカリ性においてのみ細胞膜より侵入可能であり、又 Ao の摂取はリポイドに可溶性であるため行われ得ると考え、更に酵業作用の結果としての aktive Akkumulation をも色素摂取機転の要素と考えた。Schummelfeder<sup>33)</sup> は同じく Ao イオンが lipidreich の顆粒に侵入し易く、それは色素 Kation の吸着結合力によると考え、細胞核では核蛋白が細胞質では磷酸塩複体の含有量が異なるため異つた染色結果を生ずるとのべている。一方 Bertalanffy<sup>5)</sup> は Ao により DNA が緑色蛍光を、RNA が赤色を呈することより帰結して、核は DNA により緑色を、核小体は RNA により赤色を呈すると考えた。

上述の諸説に対し教室渡辺<sup>46)</sup> は核及び核小体が Ao を多量に摂取するのは細胞機能が障碍された時であることを実験的に証明し、私の観察においても核、核小体及び胞体の橙色调の蛍光は何れも死戦期においてのみ観察された。従つて前述の如き呼吸解糖能の亢進、RNA の増量によつて Ao の摂取量が増大したとしても、核 MF の高度上昇の主たる要因であるとは考えられず、矢張り機能低下による細胞膜の透過性亢進 (Seyderhalm<sup>34)</sup>、田村<sup>42)</sup>) 及び蛋白ミセル構造の変化 (Schummelfeder<sup>33)</sup>) が主たる原因であろう。但し、核小体の蛍光については AML 及び ML においてのみ MF の著明な上昇が認められ、且つ核 MF の上昇より遙かに高度であつた点よりして、RNA の増量と何らかの関係を有する如く思われる。

最後に顆粒の褪色については教室田村<sup>42)</sup> が白血病時の好中球において中性赤顆粒の著明な早期褪色を認め、大藤助教授<sup>46)</sup> はこの現象を細胞の病的な機能低下のため、色素毒性によつて清野<sup>18)</sup> の云う色素嗜好顆粒が早期に破壊されるためと考へているが、Ao 染色における顆粒の褪色も斯ることが要因の如く思われる。

## V 結 語

各種白血病骨髄の培養後 6 時間の細胞を Ao により染色し、染色直後より変性期を経て死に至る迄の細胞の蛍光を観察し、次の結果を得た。

1. 各種白血病細胞の変性像には正常人の同種細胞との間に本質的な差異はなかつた。
2. 核及び核小体は変性に際して橙色调の蛍光を呈し、次いで褪色して緑色となるが、顆粒の蛍光は漸次褪色して遂には無蛍光となつた。
3. 変性像においても各種白血病細胞の蛍光には差が認められ、就中急性骨髄性白血病及び単球性白血病では核小体の橙色调化が、急性淋球性白血病では胞体の橙色调化が特異であつた。
4. 白血病時の成熟細胞と正常人の同種細胞の蛍光を比較すると、各種細胞共急性白血病では核の橙色调蛍光が著明に出現し、顆粒の蛍光は早期に褪色し、平均蛍光度 MF で云えば核 MF は著明に上昇し顆粒 MF は早期に低下した。慢性白血病ではこの傾向は軽微であつた。
5. 核 MF の上昇、顆粒 MF の早期低下の最も著しかつたのは急性骨髄性白血病の好中球、単球性白血病の単球、急性淋球性白血病の淋球であり、

急性好塩基性白血病の好塩基球では核 MF の上昇のみを、又急性淋巴细胞性白血病の淋巴细胞では胞体 MF の上昇をも認めた。

6. 急性骨髄性白血病の好塩基球、好酸球では、顆粒 MF の早期低下はみられたが核 MF の上昇は認められず、単球性白血病の好中球、急性淋巴细胞性白血病の好中球では正常人の同種細胞との間に大差を認めなかつた。

7. 核 MF の上昇、顆粒 MF の早期低下は細胞機能の低下時にみられるものであり、従つて MF の面からみると細胞機能の障害は急性白血病及び単球性白血病では高度であり、且つ主として当該白血病種の細胞において著明に認められた。

(本論文の要旨は昭和35年4月第22回日本血液学会総会、及び36年4月第23回日本血液学会総会において発表した)

## 附、全編の総括

蛍光顕微鏡による血液細胞の観察は近年次第に盛んとなつたが、多くは超生体染色によるものであつて生体染色による観察は数少なく、まして白血病骨髄における広範な観察は内外に例を見ない。教室の渡辺は骨髄体外組織培養に Acridinorange (以下 Ao と略) を添加して蛍光顕微鏡で観察する法を案出し、蛍光培養法と呼んで正常人骨髄諸細胞の生態蛍光像及び変性像を観察したが、私は教室における白血病研究の一環として各種白血病患者50例の骨髄蛍光培養を行ない、蛍光顕微鏡による観察を行なつた。

第1編では各種白血病患者骨髄の蛍光培養法を診断に応用することを試み、血清1滴及び1ml中 Vitamin B<sub>12</sub> 80γ, Ao 0.2mg 含有の生食液1滴を培地とし、平木式臨床培養盤 No. 1 で培養し、光源に OSRAM HBO 200 水銀燈、光源フィルターに BG 12、接眼フィルター OG5 を用いて観察した結果、各種白血病増生帯の蛍光に明白な差異が認められ、本法による白血病診断が可能であつた。即ち、急性白血病の増生帯は非常に稠密で辺縁鋭利に区劃され、多数出現する幼若細胞の蛍光により瀰漫性緑色を呈し、骨髄性では顆粒の蛍光により赤橙色調を、淋巴细胞性では核により黄色調をおび、この傾向は周辺部で特に強く、急性好塩基性白血病では好塩基顆粒の蛍光により増生帯は瀰漫性赤色を呈した。慢性白血病では急性白血病と同様な増生帯の外方に稍々密度の

低い部分が存し、二重増生帯を形成し、骨髄性では顆粒により瀰漫性赤橙色を、淋巴细胞性では核により瀰漫性黄緑色を呈した。単球性白血病では稠密で辺縁比較的鋭利に区劃された増生帯には、単球系細胞の他好中球、淋巴细胞も出現するため、瀰漫性緑色の中に赤橙色黄緑色の蛍光が混在した。

第2編では同上の増生帯を強拡大で観察し細胞学的検索を行なつた。増生帯に出現した各種白血病細胞は蛍光に差がみられ成熟したもの程正常細胞の蛍光像に近似し、一般に急性白血病及び単球性白血病では高度の核異型性と核小体の増大不整化、核及び顆粒の成熟度の不調和、顆粒成分の増量等がみられ、慢性白血病では正常細胞と大差なかつた。即ち、急性骨髄性白血病では強赤橙色の Auer 小体を認め、著明に拡大した細胞中心域を有する巨大な白血病細胞もみられ、一般に芽球と云い得る無顆粒の細胞は少なく多くは前骨髄球に属した。単球性白血病でも Auer 小体を認め、細胞中心域附近に赤橙色微細な顆粒が集簇し時間と共に空泡化して花冠状となるのを認めた。急性淋巴细胞性白血病では芽球と云い得る核小体明瞭で核網繊細な細胞は少なく、多くは私の云う未熟淋巴细胞に属し、殆どの白血病細胞に粗大な赤色顆粒が散在するのを認めた。更に赤白血病における赤血病細胞では核、胞体共に強緑色を呈し、悪性貧血における巨芽球の蛍光が微弱な緑色であつたのに比し全く対称的な差異を認めた。

第3編では臨床培養法で培養後6時間に Ao を培地濃度1万倍となる様添加し、染色直後より変性乃至死に至る迄の細胞の蛍光を観察し、平均蛍光度法(蛍光色を波長におき換えて求めた平均波長)により核及び顆粒、一部の細胞では核小体及び胞体の平均蛍光度 MF を求めて比較検討した。その結果、細胞機能の低下時にみられる核 MF の上昇、顆粒 MF の早期低下が急性骨髄性白血病の好中球、単球性白血病の単球、急性淋巴细胞性白血病の淋巴细胞において著明にみられ、白血病種以外の細胞ではこの傾向は軽微であり、更に慢性白血病における各種細胞は正常人同種細胞と大差なかつた。又急性淋巴细胞性白血病の淋巴细胞では胞体 MF が著明に上昇し、急性骨髄性白血病の幼若好中球、単球性白血病の幼若単球では核小体 MF が著明に上昇するのを特異的に認めたが、結局これらの現象は白血病細胞の機能低下によるものであり、MF の面よりみると白血病時の細胞機能の障害は急性白血病では高度、慢性白血病では軽微であり、且つ主として白血病種の細胞において

一層著明であると推論された。

撰筆するに当り、終始御懇篤なる御指導御校閲を

賜つた恩師平木教授並びに大藤助教授に深甚なる謝意を捧げる。

## 参 考 文 献

- 1) 天木一太, 津金英雄: 日血会誌, 18: 298, 昭30.
- 2) Braunsteiner, H. u. F. Pakesch: Wien Z. Inn. Med., 32: 321, 1951.
- 3) Bessis, M.: Cytology of the blood and blood forming organs, Grune & Stratton, New York, 1956.
- 4) Bethe-Rohde: Zit. n. Kiyono, 1933.
- 5) Bertalanffy, L. & I. Bichis: J. Histochem. Cytochem., 4: 481, 1956.
- 6) Börner-Patzelt, D.: Protoplasma, 39: 639, 1950.
- 7) Contier, L.: Blut, 2: 277, 1956.
- 8) Eder, H.: Blut, 4: 332, 1958.
- 9) Fellingner, K. u. F. Pakesch: Klin. Med., 3: 369, 1948.
- 10) 藤浪 鑑, 清野謙次: 生体染色の研究の現況及び其の検査術式, 大10.
- 11) Gross, R.: Acta hemat., 11: 1, 1954.
- 12) Galinowsky, Z.: Fol. haemat., 62: 71, 225, 1939.
- 13) 平木 潔: 岡医会誌, 67(2), 別巻, 昭30.
- 14) 糸井重幸: 日血会誌, 13: 303, 昭25.
- 15) 池上 章: 岡医会誌, 48: 767, 昭11.
- 16) 井上道則: 日血会誌, 14: 193, 昭26.
- 17) Kosenow, W.: Lebende Blutzellen im Fluoreszenz- u. Phasenkontrastmikroskop, S. Karger, Basel & New York, 1956.
- 18) 清野謙次 他: 生体染色綜説綜論, 南江堂, 昭8.
- 19) 小林照雄: 岡医会誌, 72: 1510, 昭35.
- 20) 川野嘉彦: 岡医会誌, 70: 2761, 昭33.
- 21) Kölbel, H.: Z. Naturforschung, 2: 382, 1947.
- 22) 木畑正義: 未刊.
- 23) Leonhardsberger, F. u. F. Pakesch: Wien Z. Inn. Med., 82: 110, 1951.
- 24) Mellors, R. C. et al: Cancer, 5: 458, 1951.
- 25) 岡 常晴: 日本衛生学誌, 10: 214, 昭30.
- 26) 大藤 真 他: 東京医新誌, 71: 9, 13, 昭29.
- 27) 大亀 学: 岡医会誌, 71: 1361, 昭34.
- 28) 小野安三: 岡医会誌, 70: 4003, 昭33.
- 29) Ota, Z.: Acta Med. Okayama, 13(4), 1959.
- 30) Ries, E.: Grundriss der Histophysiologie. Allgemeine Methoden und Probleme, Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft, 1938.
- 31) Rünstrom, J.: Protoplasma, 5: 201, 1929.
- 32) Strugger, S.: Fluoreszenzmikroskopie u. Biologie, M. und N. Schaper, Hannover, 1949.
- 33) Schummelfeder, N.: Virchows archiv, 318: 119, 1950.
- 34) Seyderhalm: Zit. n. Kiyono, 1933.
- 35) Stockinger, L.: Zent. mik. anat. Forsch., 59: 304, 1950.
- 36) 千田信行: 最新医学, 9: 1518, 1646, 昭29.
- 37) 坂野俊彦: 日血会誌, 2: 777, 昭13.
- 38) 角南 宏: 岡医会誌, 68(8), 昭31.
- 39) 十川 保: 岡医会誌, 71: 1529, 昭34.
- 40) 佐藤光永, 宇野宏治: 日血会誌, 18: 298, 昭30.
- 41) 品川晃二: 岡医会誌, 73: 261, 昭36.
- 42) 田村 甫: 岡医会誌, 70: 2629, 昭33.
- 43) 宇野宏治: 引前医学, 7: 337, 昭31.
- 44) 上田幸夫 他: 日血会誌, 21: 423, 昭33.
- 45) Vinegar, R.: Cancer Res., 16: 900, 1956.
- 46) 渡辺 晋: 岡医会誌, 72: 1097, 昭35.
- 47) Warburg, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren, Berlin, Springer, 1926.
- 48) Werth, G.: Acta haemat., 10: 209, 1953.
- 49) 山下貢司: 総合医学, 14: 997, 昭32.
- 50) 矢崎芳夫, 小野田孝義: 日本衛生学誌, 10: 23, 昭30.
- 51) 横田政信: 日血会誌, 12: 73, 昭24.
- 52) Zollinger, H. V.: Am. J. Path., 24: 545, 1948.



Fluorescence Microscopic Studies on Leukemia by Bone Marrow  
Tissue Culture.

Part 3. On the relation between cellular functions and acridine  
orange staining of bone marrow tissue culture cells  
in various leukemias.

By

Takashi Kotsuka

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School.  
(Director: Prof. K. Hiraki)

Tissue culture cells from various leukemic bone marrow were stained with acridine orange and studied with the fluorescence microscope from the beginning of staining to the death of stained cells. Following was the results obtained.

1. By addition of acridine orange solution into the tissue culture medium, the nuclei of mature leukocytes from normal bone marrow revealed green fluorescence, and their cytoplasmic granules reddish orange. In degenerated leukocytes, however, nuclei and nucleoli displayed orange fluorescence immediately after addition of the dye, and then, losing their fluorescence, they became green. Meanwhile, red fluorescence of granules was gradually discolored and became invisible without changing the color.

2. The nuclei of mature leukocytes in acute leukemias, especially neutrophils in acute myelogenous, lymphocytes in acute lymphocytic, basophils in acute basophilic, and monocytes in monocytic leukemia, were stained with a more reddish tinge and their granules were discolored in the earlier stage of the tissue culture than those in normal bone marrow.

3. The red fluorescence of the nucleoli within the green nuclei was characteristic of leukemic cells in monocytic and acute myelogenous leukemias. However, the nucleoli became gradually vague, since, as time elapses, the nuclei changed into orange in color.

4. In cultured cells of chronic leukemias, no characteristic fluorescence was observed as compared with those of normal bone marrow.

5. In the present study, it was conceivable that cellular functions of leukemic bone marrow cells were damaged in acute leukemias, and not damaged in chronic leukemias by the acridine orange staining.

---