

## 脾組織培養に関する研究

## 第 1 編

## 脾細網細胞の位相差顕微鏡観察

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木潔教授)

木 畑 正 義

〔昭和43年12月12日受稿〕

## 内 容 目 次

- |                                                                                                                            |                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>I. 緒 言</p> <p>II. 実験材料並びに実験方法</p> <p>1) 実験材料</p> <p>2) 実験方法</p> <p>3) 観察方法</p> <p>II. 実験成績</p> <p>1) 増生帯構成細胞の推移に就いて</p> | <p>2) 脾細網細胞の生態観察所見</p> <p>a. 脾細網細胞の位相差顕微鏡所見による分類</p> <p>b. 各型の運動に就いて</p> <p>3) 増生帯染色所見</p> <p>4) 爾余細胞所見</p> <p>IV 総括並びに考按</p> <p>V 結 語</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## I. 緒 言

脾組織培養は古くより数多く報告されている<sup>7)21)53)60)67)68)71)88)84)109)110)114)</sup>。然しその多くは生理解剖学的或いは実験病理学的研究に応用されたもの、また網内系機能の解明を目的とした細菌学的或は免疫学的研究に用いられたもの等であり、細胞学的立場からこれを行なったものは比較的少い。脾組織培養による細胞形態学的研究は何れも主として splenocytes, 貪食細胞, 網状織細胞, 細網内被, stroma zellen の名前で貪食作用のある細胞に就いて検討し更に単球との関連に於いて観察した業績もみられる。しかるにこれらのものは何れも培養方法及び観察方法が古典的であり、新たに廻転培養法, 位相差顕微鏡 (PCM) の進歩がみられる今日, 再検討せらるべき多くの点が存すると思われる。

先年来教室では骨髓組織培養により広範な基礎並びに臨床的研究を行ない数々の業績を発表して来たが<sup>15)16)17)18)19)</sup>、衆知の如く脾と骨髓は密接な関連を有し、脾穿刺により脾組織が比較的容易に得られる今日<sup>6)52)57)</sup>、脾腫を伴う血液疾患に脾組織培養を骨髓と併せ行なう時、その果たす病態生理学的或は臨床的意義の高い事は容易に想定されるところである。教室島崎<sup>42)</sup>は我々の臨床培養法<sup>39)</sup>を用い脾組

織培養の基礎的研究を行なった。しかるに同法は比較的短期間の生態観察を目標としたものであり長期間にわたる細胞形態学的研究には適当ではない。そこで私は廻転培養法の中、短冊法を用いて脾組織培養を行ない、脾細網細胞を中心に生態観察を行なった。本篇に於いては、位相差顕微鏡による所見、16ミリ映画撮影による運動所見、並びに培養増生帯の染色所見について述べる。

## II. 実験材料並びに実験方法

## 1) 実験材料

## a. 培養組織

動物は、生後約1ヶ月の成熟マウスを主とし一部成熟ラットを用いた。組織片は約1mm<sup>3</sup>の大きさになるよう、また被膜の部位を避ける可く切り出したが、特に白色髄を選ぶという事は肉眼的に不可能であり無選択的に採取した。

## b. 培養器具

培養管は長さ150mm、口径16mmの硬質プラスチック管を用い、培養管に挿入する短冊型カバーガラスには大きさ12×16mm、厚さ0.13~0.17mmのものをを用いた。

## c. 培養支持体

i) 組織培養液: 家鶏より採取せる血清を56°C

30分加温非働化するもの、9日目孵化鶏卵胎児圧搾液並びに Hanks 氏液をそれぞれ 2 : 2 : 6 の比に混合し 7% 重曹水で PH 7.2~7.4 に調整せるものを使用した。

ii) plasma clot : 短冊へ組織を固定する為にか家鶏血漿及び胎児圧搾液を用いた。家鶏血漿は 0.1% へパリンにて注射器管内を均等に湿らせる程度とし家鶏より採血せるものを遠沈分離した。

## 2) 実験方法

### a. 培養方法

短冊型カバーグラスを滅菌シャーレ内に置き、その上にツベルクリン注射器で 1/4 針を用いて血漿 1 滴落し、直径 10mm の円形に拡げ、その上に組織片を置き、鶏胎児圧搾液を血漿と同量之に加え、plasma clot とする。凝固を見届けた後この短冊型カバーグラスを培養管に挿入し、前記組織培養液を 2cc 入れ、滅菌せる 2 重ゴム栓を施して、回転ドラムに挿入した。回転ドラムは 37°C に保温し、1 時間 10 回転とした。

### b. 観察方法

培養後 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 時間経過後、教室、菅野<sup>46)</sup>、水津<sup>47)</sup> の考案になる溝型載物グラスを用い、その上に培養組織片のついた短冊型カバーグラスを組織片を下にして載せ、間隙に組織培養液を流し込み、周囲をパラフィンで封じた。これを 37°C に保った保温箱内にて位相差顕微鏡を用いて観察した。観察はパラフィン封入後 6~10 時間にわたり継続して行なうことが充分可能であった。

映画撮影装置は、特製のプラスチック製保温箱に入れた位相差顕微鏡に olympus PM 5 改造アタッチメントにより接続せしめられた Paillaud Bolex 16mm 撮影機を用い、自動装置で 2 秒間隔で撮影し、之を毎秒 16 駒の速さでスクリーン上に再現する。

細胞増生帯の固定染色標本の作成は、短冊型カバーグラスを 37°C に保ったリンゲル氏液に 20 分間浸して、共染の恐れある培養液その他の夾雑物を洗い落とし、また plasma clot も出来得る限り溶解除去した後、Zenker-Formol 液にて固定後 Hematoxylin-Eosin 染色を施した。

## III 実験成績

### 1) 増生帯構成細胞、特に細網細胞の推移について。

培養開始後より原組織周辺には主に成熟リンパ球

が出現し始め、5~6 時間では 15~20% の成熟好中球、少数の単球が認められる。そして末梢血と同系列の細胞種により増生帯が形成される。12~24 時間頃より、リンパ球が増加するが、一方僅かに細網細胞の出現を認める。細網細胞は次項にて三大別せるものを詳述するが本項ではこれを引用する。この時期のものは遊走能のある II<sub>a</sub> 型である。また原組織の部位により出現率は異なり、リンパ球の疎な部位に目立つ。48 時間ではリンパ球は遊走能は極く一部を除き低下する。単球は少数だが定型的な運動を示すものが散見される。細網細胞はこの時期より盛んに出現し、また核分割像をしばしば認める。原組織に沿って I 型が点在、或いは数コ集まり、それらに混じて I 型の有糸分割像を認める。II<sub>a</sub> 型は中間部または中心部に分散し遊走を示し、特に I 型の多くみられる部位に平行して多くみられる。II<sub>b</sub> 型は 24 時間頃より次第に増加するが全体的には極めて少なく、遊走能を殆んど持たない為か、増生帯に近い部位にみられる。同時に III 型が出現し増生帯全域に分布するが、主に辺縁部に占める率が多い。辺縁部では、死後変性せるリンパ球等が多く存在し、III 型により変性細胞の貪喰、即ち一種の浄化作用 (Reinigung) が行なわれている如き像を呈する。一方中心部では原組織より放射線状に線維芽細胞が出現し始める。48~72 時間では中心部は主に線維芽細胞、中間部は細網細胞、辺縁部は成熟リンパ球を主とした血液成分 (これらは可成り変性し III 型に貪喰されているか) によって占められ、ほぼ三層を形成する。線維芽細胞の間隙に I 型、II<sub>a</sub> 型がみられ同時に核分割像が盛んに行なわれるのを認める。72~96 時間でも、少数のリンパ球は活発に遊走を示す。各型細網細胞は増加するが、III 型が多くを占める。120 時間乃至 144 時間に於いてもなお成熟リンパ球の活発な出現が極く少数認められ、原組織にてリンパ芽球、幼若リンパ球より成熟したものが増生帯へ逐時出現すると思われる。細網細胞は、III 型の占める比率が次第に高くなるがやがてそれらが変性に陥入った後も、再び I~II<sub>a</sub> 型が線維芽細胞の間隙に密集するのを観察し得る。然るに、この時期の I~II<sub>a</sub> 型は 48~72 時間頃のものに比し、形態が変化しており機能的にも劣っていると考えられ又、III 型は減少する。線維芽細胞は尚しばらく活発な増殖を示し、全体が線維芽細胞によって占められるに到る。

### 2) 脾細網細胞の生態観察所見

前項にて出現せる諸種細胞のうち、リンパ球系、

単球及び好中球系細胞は既に知られる多くの報告と何等差を認めない所見であった。

組織培養に際し、増生帯に出現する細網細胞をその生態観察所見から、形態、機能(運動・貪喰能)及び発育の段階を基にして次の如く三大別した。なお培養120時間を過ぎると細胞の形態に変化がみられるので、観察は120時間迄のものについて行なった。

#### a. 脾細網細胞の位相差顕微鏡による分類

I型:(第1, 2, 3, 4, 5図)位置移動を示さないため一般に原組織に近く存在する。類円形大型の細胞で直径13~17 $\mu$ である。胞体縁明瞭で、短突起ないし短針状突起形成を認めるが著明な凹凸はない。胞体は均等で厚味がありDLLにて観察するに屈光性強く黒味を帯びて見える。胞体顆粒は、個有顆粒と考えられるものを認めないが、時にBMにて高度に輝く顆粒を1~数コ認める事がある。核は胞体に比し大きく、概して類円形または楕円形で、時に陥凹をみるが著明でなくまた陥入ないし分葉は認めない。核膜は中等度の厚味で極めて明瞭、顕微鏡の微動装置を調節する事なく全周を追求し得る事は特徴的である。核小体は大で不整形、2~3コ存在するが、微動装置を上下する事により、複雑な立体構造にて連絡するのを認める。又その一部が核膜に接するかに見える事が多い。核質の透光性は良好、核網は微細網眼状であるが余り明瞭でない。糸粒体は比較的大きく球状または短桿状で核周に密に、辺縁にて粗に分布するが、核陥凹部に一部集簇する。

細胞分割像(第18図)は培養48~96時間頃、最も多く主として原組織に近い部分でみられ、全経過はほぼ30分で糸粒分裂により行なわれる。

II型:I型に比し形態学的に稍々、成熟せるもので遊走能の有無によりII<sub>a</sub>型及びII<sub>b</sub>型の亜型に分かつ。培養24時間頃より出現し、48時間頃より次第に数を増し原組織周辺から中間部に存在する。

II<sub>a</sub>型:(第6, 7, 8図)著明な遊走を示す所の不整形の細胞で、I型と略々同大のものから更に大型のもの迄みられる。胞体縁は遊走時でも明瞭、偽足或いは突起は、舌状、鋸歯状等々複雑な形を呈し、かつ自由に変形する。胞体の厚味はI型に比し稍々減少しているが尚、可成りの屈光性がある。核は胞体の変形に応じて変形するが略々類円形、核膜明瞭で均等な厚味を持ち活発な遊走時といえども、一平面に全周を辿ることが可能である。核の分葉ないし立体構造は全く認めなかった。核質の透光性は稍々、

減弱し核網は粗且つ明瞭となり核全体の明度は減少する。核小体は明瞭で1~3コ認められるがI型に比し小且つ不明瞭となる。糸粒体は核周にみられるが、遊走時は核後方に集り偽足内には殆んどみられない。DLLで球状、短桿状、時に亜鈴状の大型糸粒体が鈍い黒色に認められるが、I型に比し数は少ない。また胞体の一部にBMにて強く輝やく顆粒を2~3個認める場合があるが常在するとは限らない。尚この型の運動は特徴的であり後に項を改めて詳述する。

II<sub>b</sub>型:(第9図)前記II<sub>a</sub>型に対し、本型は位置移動を殆んど認めないが形態学的には極めて近似する。また増生帯への出現は極めて少なく中心部から中間部に稀に認められる。胞体の形態はII<sub>a</sub>型と異なり、長い偽足を四方に突出し更にその先端が分裂し自由に動く。胞体の厚みはII<sub>a</sub>型と同程度で、偽足根部、核陥凹部が広いが、他では狭い。核は胞体に比し大で胞体の変形に応じて、腎形、曲玉状となるが、複雑な形はみられない。核膜明瞭で均等な厚味を呈す。核小体はII<sub>a</sub>型に比し稍々小で且つ不明瞭だが1~2個認め、円形ないし楕円形で、比較的発達せる核網に埋まっている。DLLで観察するに強い屈光性を示し黒色に認められる。核質の透光性はII<sub>a</sub>型と同程度である。胞体は前記の如く貧弱だが、糸粒体は核周に存在し、特に偽足根部および核陥凹部に集簇し、一方その一部は樹枝状に延びた偽足の中を移動し先端近く迄達するのを観察することが出来た。糸粒体は明瞭で大きく短桿状を呈し可成り多数存在する。また光輝性顆粒を少数認めることがある。なお、本型の運動に就いてはII<sub>a</sub>型のそれと比較して後述する。

III型:(第10, 11, 12図)形態学的にまた機能的に、前記I及びII型と異った所見を認める。胞体の大きさは極めて差がありIないしII型大から時に非常に大型のものを認める。形は類円形を呈するものが大部分であるが、時に星旁状を呈するものがあり、前者はIII<sub>a</sub>型、後者をIII<sub>b</sub>型とした。なお何等かの条件により、時にIII<sub>b</sub>型が多数存在する場合がある。

III<sub>a</sub>型:胞体は類円形で大きさはI型ないしII型大またはそれ以上可成りのもの迄あり一定でない。一般に培養経過と共に数を増すが始め24~36時間頃では他種細胞に孤立して存在する。一般に原組織に近い部位に多いが、時間の経過と共に、中間部、周辺部にも認める様になる。細胞は胞体縁明瞭で、辺

縁より不規則にひげ状、針状ないし叢状突起を出す。これら突起は極めて緩やかに運動する。核は胞体に比し小さく胞体の一側に偏在する。核膜は胞体成分に覆われ明瞭に観察し得ないが、顆粒に覆われない部分では比較的明瞭に認められる。核質透光性は低下し、核網粗剛で、発達が良い。核小体は一般に認め難いが、胞体に顆粒の少ない場合は、比較的明瞭な核小体を1~2個認める事がある。胞体には、大小顆粒が充満する。顆粒はBMにより強い光輝性を示す球形のもの及び凹凸の鈍い光を放つ充実性のものがあり胞体周辺から中心に向い存在し核周に及ぶ。時には核を覆い隠すものもある。更に貪喰せる異物が存在する。即ち、附近の変性細胞と同様な光学的性質を有し、円形で周囲に明域を持つ。それらは赤血球或いは裸核のリンパ球等でそのまま形を呈するもの、或いは小片として認められるものもある。糸粒体は一般に識別不能で認め難いが、顆粒の少ないものでは少数確認し得る場合がある。その他液性成分を充たすと見做される円形の空胞を有するものもある。

Ⅲ<sub>b</sub>型：星旁状、ひとで型を呈し、大きさその他に就いてはⅢ<sub>a</sub>型と同様だが、この型に属するものはなお顆粒が少なくまた核、核小体の明瞭な場合が多い。然るにⅢ<sub>a</sub>型に比し出現する度合は少ない。

上述各位の中間型に就いて：各型の中間に位置する所見を呈するもの、即ち各型の移行型が観察された。

I型とII型の中間型：(第13図) I型に比し胞体縁不整形化、胞体面積の拡大と共に、厚味減少、透光性の増加がみられる。核はI型のそれと大差ないが糸粒体が集簇する傾向がみられる。II<sub>a</sub>型の静止型と考えられる。

II型とIII型の中間型：(第14, 15図) II型が変性せる赤血球或いはリンパ球等を貪喰し、少数ながらIII型にみる光輝性顆粒を有するもので、一方II型特有の運動能を保有している。

以上の如く、胞体顆粒、貪喰能はII型の時期に既に観察され、またI型の核形態を有しながらII型に近い胞体を有するものが認められる。従って各型を更に細分化し得ることが知られる。

#### b. 各型の運動に就いて

I型：位置移動を全く認めない。胞体縁より突出せる短針状突起の運動を認め、また核が回転するのを映画撮影により時に観察し得る。

II<sub>a</sub>型：(第19図) 舌状、鋸歯状、その他複雑な形状の偽足を形成する。活発な位置移動をみるが、遊走の方向は常時一定しない。然し或る方向へ移動する場合、その運動の始期から終期迄は規則的な動きを観察し得る。即ち、最初偽足形成を行ない、同時にその基部附近の胞体が厚味を増す。更に核膜もその部位で厚味を増し、次いで核は偽足の中に侵入する。この際、糸粒体は大部分核周から核後方に集まり、偽足内には全く認めない。核の移動と共に胞体が徐々に後に続いて移動する。位置移動を終了し停止したと思われた時期では、偽足基部の胞体および核膜の厚味は元へ戻る。遊走速度は計測により5~15μ/Mである。この他、胞体縁より無差別に偽足を形成し、また直ちに引っ込める運動もみられた。

また遊走に際し、他細胞ないし変性細胞遺残物等の異物に対する走行性を認め、近くに存する時その方向へ移動し接触した。一度接触するとその周囲を偽足により取り囲み抱擁せんとする運動を行なう。完全に包囲し運動を停止し偽足の伸縮のみを行なう状態或いは、対象物の周囲を圍繞しながら前後に進む運動等が観察された。

然しこれらの観察を通じて、異物を完全に胞体中に貪喰する事実は確認されなかった。なお対象物に接した際核も僅かに変形しながら異物の方へ接近し、極端な場合は細胞膜を界して核膜と異物が接触せるかの如き像を呈した。又これらの運動を終えた後胞体に光輝性顆粒が新たに2~3コ生ずる事が認められた。

II<sub>b</sub>型：形態学的にII<sub>a</sub>に近似するが運動能は異なる。即ち偽足は極めて細長で、むしろ突起と称すべきもので、先端が二次性に分枝しこの部分が自由に動く。この先端は菲薄な膜状で波状運動を行なうことが映画観察により認められる。そして他細胞の突起と触れ合い相互に吻合させ網状構造を作るかの如くである。更に胞体の両端から出された二本の突起で異物を抱き込む動作を観察する場合もある。一方胞体内の糸粒体が極めて早い速度で突起内へ移行するのを見る場合がある。

III型：胞体の移動は全く認められない。胞体縁にみられる短突起をゆっくり出没させるのを観察するのみである。

#### 3) 増生帯染色所見(カラー第11, 12図)

増生帯は培養された状態で染色され、構成細胞も生態観察のそれに近い形で固定され染色される。位

相差像に基づく各型に相応するものを認める事が出来る。I型は胞体は類円形で薄く好塩基性に染まり、円形の大きな核を有す。核は紫青色で微細な色質結節がみられ、核小体は1~2個で大かつ不整形、紫青色に濃染する。II型では胞体は遊走形態をとり灰青色だが、先進部でやや濃染する。核もやや変形し、色質結節は粗に、核小体は小型になる。III型は胞体に濃染せる大小顆粒と共に赤橙色赤血球の残影を認め、また半光輝性不染顆粒および液泡が抜けた後の不染性の部がみられる。核は紫紅色に濃染し、胞体の一側にあり、小なる核小体様結節をみる。淋巴球は、ずっと小型で濃染せる核は種々の遊走形態を呈し、周囲に僅かに胞体を認める。線維芽細胞は胞体は淡染する細長な紡錘形を呈し、胞体顆粒を殆んど認めない。核は胞体の幅に比し大で繊細な網状構造の中にむしろ紫青色に淡く染まる核小体が2個認められる。線維芽細胞では核、胞体共に細網細胞に比し淡く、又より無構造である。

#### 4) 爾余細胞の生態観察所見

a) 淋巴球及び淋巴芽球：淋巴芽球は円形小型で運動性なく、胞体縁明瞭で胞体の幅狭く、糸粒体は明瞭で球状ないし桿状で核周に分布する。核膜厚く明瞭、核は円形又は鋭い切れ込みで二分さるものあり。核網は微細だが核質の透光性は少々低下する。核小体は円形明瞭1個時に2~3個みられる。淋巴球は所謂手鏡状運動を行なうものが多いが、円形のものも可成りみられ淋巴芽球と同大又はやや大である。胞体は狭いが少数の半光輝性顆粒を認める場合がある。核膜は一層厚く処々にて結節状に肥厚する。核膜透光性低下し核網は小塊をなし散在し、中心に小なる核小体を認めるものがある。大淋巴球は、胞体の幅が広く全体に菲薄である。

b) 単球：(第17図)胞体は広く辺縁不規則不明瞭で、薄い膜様の襞のある旗状偽足を細胞全周より出して運動する。核は複雑な立体構造を呈し、核膜薄く不明瞭、核質の透光性は低く胞体との差が少ない。また核小体は不明瞭で識別し難いものが多い。糸粒体は微細点状で核周に分布するが、陥凹部に集簇し、また固有顆粒が数十個存在しBMで中等度光輝性で、矢張り核陥凹部に集簇する。

c) 線維芽細胞：(第16図)一般に細長大型で紡錘形、辺縁は鋭利だが一側は鋸齒状を呈す。胞体は極めて薄く膜様で透明である。核は楕円形でその長径は胞体の長径に平行だが、短径は胞体の幅にほぼ等しい。核膜は菲薄明瞭、核質透明で核網繊細、

核小体は円形又は不整形の大かつ明瞭なものが1~2個存す。糸粒体は細長紐状で胞体一面に、主に長径に沿って並ぶ。その他塵埃状の大小顆粒が散在性にみられる。なお本細胞の運動能は認められなかった。

#### IV. 総括並びに考按

脾臓の組織培養、就中その構成細胞について研究せるものとして、Maximow<sup>94)</sup>(1916)、Carrel & Ebeling<sup>70)</sup>(1923)、Rioch<sup>103)</sup>(1924)、Fazzari<sup>78)</sup>(1926) Erdmann<sup>76)</sup>(1926)、Fischer & Dolschansky<sup>79)</sup>(1929)等古くからみられ、我が国でも倉重<sup>30)</sup>(1930)、後藤<sup>9)</sup>(1935)等は広範な研究を行なった。又R. Lambert<sup>90)</sup>(1911)はLycopodium sporeを添加し遊走細胞がforeign body giant cellを作ると述べ、速水、田中<sup>14)</sup>(1913)或いは服部<sup>12)</sup>(1930)等は生体染色を併せ用い、Huzzella<sup>87)</sup>(1931)或いはHerzog<sup>85)</sup>(1957)は映画による観察を行なっている。これらの観察所見は大同小異で各人が独自の立場で解釈しており、既に古典的であり、新しい研究方法が開拓された今日改めて再検討さるべきである。

私はマウス脾臓の組織培養を行ない増生帯構成細胞のうち特に細網細胞の動態に注目し、生態観察を行なったが、本篇ではその位相差顕微鏡所見を述べた。位相差顕微鏡の血液細胞形態学への応用はBessie<sup>62)</sup>、Ackermann<sup>58)</sup>、花岡<sup>10)</sup>或いは嘉村<sup>22)</sup>等枚挙にいとまがないが(6474)93)96)、教室嘉村<sup>23)</sup>、浅香<sup>6)</sup>、柴田<sup>43)</sup>等々他種細胞の生体観察にも応用している。海野<sup>65)</sup>は位相差顕微鏡観察の可能な組織培養法を工夫しているが、生体と同様の組織培養の状態を位相差により微細構造迄観察し得る方法は、嘉村<sup>22)</sup>の圧挫法と共に誠に有力な新方法と考える。私も始め教室考案の臨床組織培養法<sup>16)</sup>或いは海野氏法で培養を試みたが、細網細胞の出現は血液細胞に遅れ、また比較的長期の観察を必要とするので充分でなく、従って回転培養法に短冊型カバーガラスを挿入する方法を用いた。この方法で血液細胞学的研究を行なったものは少ないが、Pomerat<sup>115)</sup>は骨髓に就いて血管増生の検討を、また教室菅野<sup>48)</sup>は骨髓回転培養法の基礎的問題の詳細な検討を、またAckerman<sup>59)</sup>は淋巴腺に就いて行ない、細胞化学的吟味を行なった。短冊型カバーガラスに固着した培養組織を観察する目的で教室水津<sup>47)</sup>、菅野<sup>48)</sup>の考案せる溝型載物ガラスを用いたので、包埋せる培養組織および構成細胞は数時間にわたり殆んど変化を受けることなく活発な状態で観察された。位相差顕

微鏡を油浸レンズで充分駆使し得た点本研究にとり極めて好都合であった。

さて、培養初期に出現する淋巴球に次いで24時間頃より細網細胞が次第に出現するが、この細胞が血液細胞と区別し得る所見を認める事は実験成績に述べた如くである。即ち後にも述べるが、淋巴胚球、単球、及び線維芽細胞等が鑑別されなければならないが、詳細な生体観察により一連の細網細胞であると結論した。そもそも、本細胞に関しては、種々の研究により、歴史的に極めて議論の多いものであるが、位相差顕微鏡により生態観察を系統的に行なったものは之迄みられないようである。

脾の細胞学的研究の歴史は、始めは、骨髄及び淋巴腺と対比されながらその特異性の有無に就いて、形態学的、発生学的に検討されて来た。即ち1905年 Türk<sup>112)</sup> は単球の発生地を脾臓と予想して、単球に対して splenozysten の名を用いた。一方、Paremssoff<sup>100)</sup> は脾臓に特有な pulpaellen が存し、これは大淋巴球や単球とは異なる所の, lymphoide zellen であり、これに対して splenozysten の名を冠せようとした。その後もほぼ同様の議論が続いたが、清野<sup>27)</sup> は生体染色法を導入し組織球性細胞説を唱えると共に、脾に於いても網内系の立場から解明を行ない splenozysten をも組織球に編入した。即ち生体染色により脾臓組織内の空隙や脾洞内に色素顆粒を満した大貪食細胞がみられるが、これは細網細胞と洞内皮細胞が遊離したもので、これらは脾に於ける組織球であり、同時に splenozysten と呼ばれていたものであるとした。所が、Sabin<sup>105)</sup> らは超生体染色法を用いて、脾臓内には明らかに異なる二種の貪食細胞、即ち clasmatocyte と単球があり、形態学的、発生学的に異なるものとしている。その後、脾に特有な細胞種という意味での splenozysten なる概念は Hück<sup>86)</sup>、Hartmann<sup>83)</sup>、Naegeli<sup>99)</sup> 或いは Bloom<sup>66)</sup> 等により本質的には否定された。

かくして、天野<sup>4)</sup> は、清野の網内系とは全く関係ない単球系を確立させ、脾細網細胞はカルミン貪食能は弱く遊離遊走能は之を疑問とし、脾臓内貪食性大円形細胞として止るものであり、一方洞内細胞はカルミンを大量に摂取し、これは洞内剝離物と単球であるとした。そして splenozysten の名に相当する主要細胞は単球であるとした。

脾内単核球が歴史的に議論されて来たが、要するにこれは脾の清掃臓器としての機能に関して、単球、洞内剝離物、及び細網細胞が浮彫りにされ、これら

が著名な貪食能を示す所のものであることが明らかにされたようである。

最後に、赤崎門下の加納<sup>24)</sup> は、マウス脾内貪食性大円形細胞に就き、超生体染色、その他の方法で検討し、これが細網細胞由来のもので、一部単球由来のものがあるとし、且つ洞内皮の貪食は著明でないといふ述べ、又細網細胞の遊離円形化を認めている。そして、刺激により、幼若型遊離細胞の出現を認めている。著者の細網細胞が加納のいう細網細胞にほぼ匹敵するものと思われる。

私は増生帯に出現せる一連の細胞に就き観察し形態学上、また機能的に単球または淋巴球とは異なるもので、幼若型から次第に貪食能の強い型に移行成熟する所の細網細胞であると結論し、之等は遊離、遊走して増生帯へ出現したものと考えられた。そしてその起源は脾臓内に求められるべきもので培養という条件が考慮されねばならぬが、何等かの機転で極めて容易に離脱し出現せるものと考えられる。

さて、各型の分類は一応成熟段階により明らかに相違のあるものを大別したが厳密には移行型が存在する事は実験成績で明らかな如くである。

細網細胞の位相差顕微鏡による観察は Moeschlin<sup>96)</sup> が骨髄に就いて、Rohr<sup>104)</sup> の分類に基づいて plasmazelluläre- 及び Kleinzellige Retikulum zellen を観察した。即ち前者では核は exzentrisch で老化し Rodspeichen struktur が著明で、クロマチン塊が核膜内側に knopf förmig にあり繊細な構造で連なっている。胞体は微細灰白顆粒が核膜と接し、また多くの場合多数の黒色顆粒、滴状顆粒がみられ、これが淋巴球性形質細胞と異なるとしている。また後者は特に淋巴腺、脾に於いて認め、胞体は狭く粗な灰白色調顆粒が充満する。これが蛋白合成作用に関係すると称している。海野<sup>54)</sup> の場合は、家兎淋巴腺に於いて、定型的細網細胞は胞体の形が一定せず加温によって容易に不整突起を出す他、毎回墨粒を貪食し、中性赤空胞を有し、特に若いものでは、糸粒体の若干数を備えている。そして核は楕円形で核膜は薄く、中心位に小核仁を2個有し、核色質は極めて細網状で、概して核色質の貧な細胞であると述べている。これらは細網細胞の観察が比較的少ない今日、夫々の立場で充分な観察が行なわれたものとして引用したが、Moeschlin は、塗沫ないし圧挫標本で、胞体の顆粒に重点を置き、且つ従来の塗沫染色標本にとらわれた感が少なくない。海野の記載せるものは私のⅡ型又はⅢ型に近いものと思われ、一方

細網細胞由来の巨大貪食細胞を観察しているが、私のⅢ型に相当するものであろう。他方、組織培養を併用しているが、遊走能については殆んど触れる所がない。その他、最近に至り細網細胞への認識が高まるに従い、その範疇も拡大されつつあるが、現今一般に細網細胞と称しているものは以上にみられた如きものであり、私が一連のものとして取扱った細網細胞の一部は考慮されていなかったといえよう。極めて最近 Mitus<sup>95)</sup> は病的細網細胞増殖状態即ち reticulum cell leukemia, leukemic reticuloendotheliosis に於いて、末梢血に現われた細網細胞を観察し、また細胞化学的吟味を加えているが、外見上淋巴球に、細胞化学的に単球に近いことが認められた本細胞に、私のⅡ<sub>a</sub>型に近い遊走性を認めたと記載している。

さて、私の観察せる細胞に就いて少しく検討を加えてみるに、Ⅰ型は天野<sup>65)54)</sup>らの淋巴胚球と形態学的に極めて類似している。家兎淋巴腺を刺激し細網細胞から異形成的に発生し、極めて旺盛な分裂能を有すると共に淋巴芽球ないし大淋巴球に移行すると述べられている。海野<sup>54)</sup>の掲げる位相差顕微鏡写真をみると、胞体は類円形だが、Ⅰ型に比し柔軟性乏しく、厚味、粘稠度或いは透光性が、中心部と辺縁部で差があり、厚い感じがする。核質は同様だが、核小体は巨大で異様である。また培養を試みているが、培養により素速やく消滅するとしている点、私のⅠ型が、淋巴球の変性が起っている時期に尚盛んに分裂増殖を続けるの対蹠的である。そしてⅠ型が淋巴芽球、淋巴球に移行する事は認め得なかったのであり、これらの諸点からⅠ型は淋巴胚球とは別個のものと考えられる。

かくして、Ⅰ型の胞体、糸粒体、核質、核小体等全体に成熟傾向が認められるに従い、遊走能を示すが、この間の移行を認める事が出来た。こうしてⅡ<sub>a</sub>型がⅠ型に連続した型として観察されたが、種々な偽足形成、活発な遊走能及び軽度の貪食能等単球

と類似の点が多い。天野は先にも引用した如く脾内で遊走遊離し貪食せるものの大部分は単球であるとしているが、単球に比しⅡ<sub>a</sub>型は貪食していない場合でも胞体は遙かに大きく、核は全く平面的で立体構造を示さず、核膜、核小体とも極めて明瞭で、胞体、偽足は、単球の菲膜状とは趣きが全く異なる。運動は核先進であり、教室分類<sup>16)</sup> D型運動の単球とは異なる。以上諸点は単球と区別されるべき所見である。

線維芽細胞とⅢ型が形の上で似たものを示すが、核、胞体、胞体顆粒等全ての点で充分区別されるのであり、全く異なった細胞である事に異論を挿む余地はない。

白血球の運動に就いては Commandon-Levaditi-Muttermilch<sup>73)</sup>が脾組織培養に映画撮影を用い、3分間に10 $\mu$ 移動した事を観察記載したのが最初とされているが、その後も映画撮影を行なうものは多く<sup>65)80)92)101)102)</sup>、教室でも骨髄組織培養により白血球、巨核球等の詳細な観察を行なっている<sup>16)</sup>。然るに細網細胞に就いては Herzog<sup>95)</sup>等の海狸の肺、脾、胸腺等の組織培養等による大貪食細胞の映画観察があるが位相差顕微鏡下に充分観察せるものは見当らない。Ⅱ<sub>a</sub>型の遊走に就いては従来殆んど記載がないが、生態観察の得意とする所であり私の独自の所見である。私の観察中、先進部の胞体、核膜が厚味を増すのを認めたが、千田<sup>44)</sup>は好中球で同様の事実を観察し、多糖類、アルカリフォスファターゼ、酸性フォスファターゼ、ATPアーゼの偽足部へ流入するのを認め運動エネルギーと結びつけて考えている。Ⅱ<sub>a</sub>型でもその活発な遊走能と考え合わせ同様な事が予想されるが残された問題である。先に引用した Mitus<sup>95)</sup>は末梢血で Neoplastic lymphoid reticulum cell の運動をみており、これが活発な動きは示さないが、強い偽足形成は淋巴球と異なる所であるとしている。私も屢々指摘する如く、多彩な偽足については特有であり、手鏡様と称する淋巴球の運動とは全然別個のものである。

Ⅱ型の一部で胞体顆粒の増加と、赤血球、淋巴球の変性せるものを貪食する所のⅢ型への移行像がみられるが、遊走能をなお維持している。

Ⅲ型は旺盛な貪食能によって特徴づけられ一般に細網細胞性大貪食細胞と呼ばれるものに相当する。顆粒は培養の影響により、組織内に於けるより増加していることは充分考えられる。また貪食動作と見做されるが、Ⅱ<sub>a</sub>型が他の細胞に接触し抱擁せんとする動作を繰り返した後胞体顆粒の増加する事実を認めたが Ackerman<sup>99)</sup>等によると、淋巴腺を培養し、細胞化学的に検討すると、培養後の細網細胞に中性脂肪滴, lipid, plasmalogen, PAS 陽性顆粒が増加するのを認めており、また代謝亢進の為に、酸性およびアルカリ性フォスファターゼ活性値の増加を認め培養の影響を観察している。なおⅢ型のうち、老化単球由来と考えられるものがあり、顆粒が比較的少ない場合に胞体の性状、偽足の形態等から

僅かに鑑別し得る場合もある。然るに活発な単球の比率からみると、極めて僅かであろう。

最後に、培養せる増生帯の染色は、教室松木<sup>31)</sup>、菅野<sup>48)</sup>、服部<sup>19)</sup>の詳細な検討があり、又諸家の試みる所であるが、私の方法でも比較的良好な染色像が得られ位相差にてみた各型に応じた細胞を極めて明瞭に増生帯中に認め得た。倉重<sup>30)</sup>が家鶏脾培養後のものをヘマトキシリ・エオジン染色にて図示しているが、培養方法の相違による為か何れも空胞ないし顆粒が多く、C型—網状織内被細胞—と称するものがIII型に一致した像を示している。

以上の如く、マウス脾組織培養により増生帯に出現する細網細胞は最も幼若なI型から次第に段階を追ってIII型迄進る事が可能でありその成熟過程に於いては、一般に細胞の成熟段階に認められる胞体、核の変化が位相差顕微鏡学的に観察されたのであり、この事は先人の観じ得なかつた所のものである。

## V 結 語

回転培養法により正常マウス脾の組織培養を行な

い増生帯構成細胞のうち特に細網細胞を中心に位相差顕微鏡による観察を行なった。また運動形態を捉えるために16ミリ位相差顕微鏡映画撮影を行ない次の結論を得た。

i) 短冊型カバーガラスを用いた回転培養法は脾細網細胞等の生態観察に極めて有力な手段である。

ii) 培養後24時間頃迄は淋巴球を主とする血液細胞の出現をみるが次いで細網細胞が出現し48ないし72時間では主要構成細胞で、核分割像を認めるが、やがて線維芽細胞に置き換えられる。

iii) 脾細網細胞を形態学的に、また運動、貪喰能よりI, II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub>, III<sub>a</sub>, III<sub>b</sub>型に分類したが、これ等には相互に移行があり、I型が成熟しII型を経てIII型になるものと考えられる。

iv) 特にII<sub>a</sub>型は鏡検下で複雑な多彩な偽足を形成し、核先進により活発な遊走を示すことが観察された。

附図・文献後掲

## Studies on Tissue Culture of Spleen

### Chapter I Vital Observation of Splenic Reticulum Cells by Phase Contrast Microscopy

By

Masayoshi KIBATA

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

Morphology and movement of splenic reticulum cells of the normal adult mouse were observed in the growth zone of tissue culture by phase contrast microscopy and 16 mm microcinematography.

1) For the vital observation of these cells, rectangular cover slip method proved satisfactory.

2) In tissue culture of normal mouse spleen, lymphocytes appeared initially until 24 hours, followed by some types of reticulum cells which increased after 24 to 48 hours of culture, and finally fibroblasts increased in the growth zone.

3) According to the morphology, function and degree of maturation, these reticulum cells could be classified into three groups; I, II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub>, III<sub>a</sub> and III<sub>b</sub>. There were intermediate types between these cells and type I reticulum cells matured into type II and III reticulum cells.

4) Type II<sub>a</sub> reticulum cells possessed multiple pseudopods and showed active migratory movement, their nucleus locating in the forwarding part of the cytoplasm.