

組織培養による骨髓諸細胞の螢光顕微鏡学的研究

第 3 編

白血球の変性並に細胞機能と螢光との関係に関する研究

附. 全 編 の 総 括

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

大学院 渡 辺 晋
学 生

〔昭和35年4月8日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒 言	3) 小 括
第2章 螢光簡易培養法に於ける白血球変性像の観察	第4節 温度の螢光に及ぼす影響
第1節 実験材料並に実験方法	1) 実験方法
第2節 実験成績	2) 実験成績
1) 骨髓芽球	3) 小 括
2) 幼若好中球	第5節 培地滲透圧の影響
3) 好 中 球	1) 実験方法
4) 好 酸 球	2) 実験成績
5) 好塩基球	3) 小 括
6) 単 球	第6節 リンゲル培地に於ける螢光
7) 淋 巴 球	1) 実験方法
第3節 小 括	2) 実験成績
第3章 各種条件下に於ける人好中球の螢光の変化	3) 小 括
第1節 方 法 論	第7節 等張糖液培地に於ける螢光
第2節 培養經過後の各種時間に於て Ao. を添加せる際の螢光	1) 実験方法
1) 実験方法	2) 実験成績
2) 実験成績	3) 小 括
3) 小 括	第8節 励起光線の螢光に及ぼす影響
第3節 濃度と螢光の関係	1) 実験方法
1) 実験方法	2) 実験成績
2) 実験成績	3) 小 括
	第4章 総括並に考按
	第5章 結 論
	附. 全編の総括

第1章 緒 言

1852年 Stokes³⁰⁾ は fluor spar (螢石) の名に因んで螢光を fluorescence と名付けた。以後化学の発達に伴い多くの螢光物質が発見され, Stark & Meyer³⁰⁾ による紫外部の螢光, Wood⁴⁰⁾ の共鳴螢光,

Frank u. Hertz¹³⁾ による定量的研究, Frank¹⁴⁾ や Cario⁹⁾ による増感螢光等物理化学に於ける重要な問題が提出されたが, 1904年の Köhler²³⁾ による螢光顕微鏡の創製は生物学, 医学に於ける応用の途を開いた。

当初螢光顕微鏡は固有螢光の観察に用いられ

ていたが¹¹⁾¹²⁾¹⁷⁾³⁴⁾, 1934 年の Haitinger¹⁷⁾ による Fluorochromierung の発見は細胞学分野に大いに貢献する所となつた。

即ち、螢光色素で細胞を染色し、その螢光を観察する事により、矢崎・篠達⁵¹⁾ は染色体を研究し、Friedman¹⁵⁾ は子宮癌の、天木・原島²⁾ は胃癌の細胞学的診断を行い、宇野⁴⁶⁾ は腫瘍細胞を研究し、血液学に於ても Werth⁴⁸⁾, Kosenow²⁵⁾, Braunsteiner⁸⁾, Leonhartsberger²⁸⁾, Contier¹⁰⁾, 天木¹⁾, 佐藤³⁵⁾, 山下⁵⁰⁾等の研究が生まれたのである。然し Werth⁴⁸⁾ の固定染色, Kosenow²⁵⁾ による海猿の骨髓培養を除けば、従来の細胞学的研究は超生体染色を行つたのみであり、超生体染色は固定染色に比し優れた方法ではあるが、いはば瀕死の状態に於ける一断面を窺うに過ぎない。茲に於て、教室では更に進んだ方法である体外組織培養法を取り上げ、骨髓細胞の生態を徹底的に研究し大きな業績を上げたが¹⁹⁾²⁰⁾, この中教室田村⁴³⁾, 末永⁴²⁾, 大亀³¹⁾, 太田³³⁾は骨髓体外組織培養に中性紅, リチオンカルミン, ヤーヌス緑等を添加して人乃至各種動物骨髓細胞の生体染色を行い、超生体染色では見られぬ所見を得たので、私は Acridinorange (以下 Ao. と略す) による人骨髓細胞の生体染色を行い、螢光顕微鏡で観察して従来の超生体染色による所見と異なる点を指摘したが、この相異は活潑に生活中の細胞と瀕死乃至変性した細胞の螢光の相異ではないかと考えるに至つた。

扱、細胞の変性に関する文献を瞥見するに、Zollinger⁵³⁾⁵⁴⁾ はつとに細胞の変性、細胞死の問題を追求し、Besis⁶⁾ も詳細な研究を行い、その他 Gross¹⁶⁾ は骨髓培養に於ける白血球の変性を、小坂²⁴⁾, 宮川²⁹⁾ は末梢血白血球の変性を、藤井²¹⁾ は腐敗死体の白血球の変化を、中井³⁰⁾ は炎症巣に於ける好中球の変性を報告し、教室大河原³²⁾ は骨髓巨核球の変性を、教室品川³⁷⁾ は骨髓諸細胞の変性を研究し、超生体染色を行つて変性を観察したものとしては池上²²⁾, 横田⁶²⁾, 上田⁴⁵⁾の文献があるが、螢光顕微鏡による変性白血球の観察所見に関しては Kosenow²⁵⁾ に若干の記載が見られるのみである。

先に Strugger⁴⁰⁾ は Ao. による細菌の生死鑑別法を報告し、Vinigar⁴⁷⁾ は腹水腫瘍細胞につき Ao. による超生体染色を行い、螢光色の変化で細胞の生死を判別した。細胞に変化が起つて Ao. に対する親和性が変わると、Ao. は Strugger⁴¹⁾ の Konzentrationseffekt により著明な螢光色の変化を来すので、僅かな変化も観察し得るものである。従つて、培養直後より

変性期を経て細胞死に至るまでの螢光を追求すれば、生体染色と超生体染色との間の螢光の差を確認し得ると共に、細胞機能と螢光との関係を明らかにし得ると考えられる。

よつて本編に於ては、先づ螢光簡易培養法での変性時の骨髓細胞の螢光像を観察し、次いで悪条件下で培養した血球に螢光染色を施して螢光像の変化を観察した結果を報告する。

第2章 螢光簡易培養法に於ける白血球変性像の観察

本章に於ては、増生帯に出現し変性して行く白血球の螢光像を逐時的に観察した。

第1節 実験材料及び実験方法

実験材料及び培養方法は第2編第2章と同一で、観察方法は第2編第3章と同一である。

第2節 実験成績

1) 骨髓芽球：

胞体の螢光は健康な芽球の明緑色から漸次不透明な感じの緑色となり、やがて黄緑色となる。この頃小舌状、針状の突起や黒くぬけて見える不染空泡が出現する。次いで胞体は軽度膨化し、黄緑色の螢光は緑色となり24時間以後は漸次螢光が弱くなつて行く。本細胞は赤橙色顆粒を欠くが、時に胞体の一部に弱橙色の螢光が認められ、徐々に胞体に拡がる事があるが、この螢光も48時間以後には認められない。

核も胞体と平行して変化し、緑色の螢光が漸次黄色を帯び、この時核は縮小の傾向を有し、時に軽度の膨化を見るが、胞体と異り緑色螢光は長時間観察される。

核小体の変化は少いが、変化を起したものでは核の変化より少し遅れて膨化を足し、次いで緑色螢光を呈したまま縮小するが、極めて稀に橙色を呈し、橙色螢光は主として核小体の中心部に見られ、この場合胞体は赤変を起している事がある。

2) 幼若好中球：

幼若好中球は成熟好中球に比し変化が軽度かつ遅く起る。赤橙色顆粒は漸次黄橙色、黄色を経て褪色するが、後述の成熟好中球に比すれば変化は徐々に起り、殊に前骨髓球（好中球性）に於ては顆粒は長時間明瞭な螢光を発する。

胞体及び核の螢光は骨髓芽球に類似する。

3) 好中球：

赤橙色顆粒は膨化し、9時間以後は大小不同が著明となり、12時間以後は漸次褪色が起る。紫外線照

射を行うと容易に褪色するため、観察に際しては励起光線の照射時間を短くする必要があるが、褪色して橙黄色となつたものでも孵卵器中に暫く静置すると回復して赤橙色となる事がある。然し黄色となつたものは回復しない。

胞体は細胞の機能が弱まると先づ円形化し、9時間以後は黒くぬけて見える不染空泡を生じる。これと別に暗赤橙色のAo.可染空泡が出現し、正円形で逐時的に著明に大となる点で膨化した顆粒と区別が出来、又顆粒に比し褪色が遅い。この頃胞体に針状、毬状、小舌状等の異常突起を生じるが24時間以後は胞体は緑色を呈したまま膨化する。極めて稀に胞体の赤変するものがあるが、かかる細胞も48時間以後は緑色膨化を呈する。

核は先づクロマチンの凝集が起り、次いで黄変が起る。観察中にも黄変が起るが極く軽度の場合は、励起光線を遮つておくと回復して緑色となる。時に核の赤変を見る事があるが、24時間以後は過半数の核が緑色膨化を起す。

顆粒褪色、胞体赤変、核赤変、核緑色膨化を起したのものには運動を認めない。

4) 好酸球：

固有顆粒の褪色は好中球の如く容易には起らずAo.可染空泡の出現も少い。胞体の崩潰した後に赤橙色の固有顆粒が散在しているのを認める事がある。

胞体には針状、毬状の異常突起が生じる。

核は黄変するもの多く、末期にはやはり緑色膨化を起すが好中球の如く著明ではない。

5) 好塩基球：

深紅の色調を帯びた赤橙色顆粒は好酸球よりも早く発光し、かつ18時間頃まで褪色の徴を示さず明瞭に認められる。

胞体は突起形成や膨化が著明でなく、稀には赤変を見る事がある。

核は黄変するもの多く、24時間後も緑色膨化は著明でない。汚穢黄褐色の微弱な螢光を呈する核がかなり見られるのは他の白血球に比し特徴的である。

6) 単球：

赤橙色顆粒の大小不同は他種白血球に比し著明である。

胞体には針状、毬状、小舌状等の異常突起がかなり見られ、かつ胞体赤変も頻度が高い。

核は核膜、核網が不明瞭となり、瀰漫性黄緑色螢光を呈し、36時間後は大多数の核が緑色となるが、好中球の如き著明な膨化は起さない。

7) 淋巴球：

赤橙色顆粒は漸次不明瞭となり、これと逆比例して胞体の赤変を見るようになるが、異常突起形成や胞体膨化は少い。

核は長時間黄色螢光を呈し、24時間以後は再び緑色となるが著明な膨化は起さない。

第3節 小 括

1) 変性徴候を列挙すれば、赤橙色顆粒には顆粒膨化と顆粒褪色があり、胞体にはAo.可染空泡、不染空泡、異常突起形成、胞体赤変、胞体緑色膨化が見られ、核はクロマチン凝集、核黄変、核赤変、核緑色膨化を起し、核小体には核小体緑色膨化と核小体赤変が見られた。

2) 上記の変性徴候は各種細胞によつて起り方に差が見られた。

3) 細胞の濃縮性変化に際しては螢光は赤く、膨化性変化に際しては緑色を呈した。

4) 形態的变化は胞体に著明に見られるが、螢光色の変化は顆粒及び核に於て著明に現われた。

5) 赤橙色顆粒が黄色にまで褪色したもの、胞体の赤変せるもの、核赤変や核緑色膨化を起したものは死細胞と考えられる。

第3章 各種条件下に於ける人好中球の螢光の変化

第2章に於て螢光培養法により増生帯に出現した細胞の逐時的観察を行い、変性像を明らかにしたが、本章では人為的悪条件下で培養を行い、これにAo.を添加して変性時の螢光像を追求した。

第1節 方法論

1) 実験材料は正常人胸骨々髓組織片で、培養器具は平木式組織培養盤 No.1を用い、培養方法は教室考案の簡易法によつた(実験の性格によつては他の培地も用いた)。

2) 封入に際しては三方のみをパラフィンで封じて一方を開放し、培養盤の上面を下にして滅菌湿潤室中に静置し、湿潤室のまま37°Cの孵卵器中に入れて培養する(実験の性格によつては温度を変化させた)。

3) 培養6時間後に、培地濃度が $1/10 \times 10^{-3}$ となるようにAo.を添加する(実験の性格によつては3, 12, 24時間後の添加も行い、又濃度も各種濃度を用いた)。

色素の添加に際してはMikromanipulatorを使用し、培養盤の開放せる部分より毛細管を挿入し、

培養後の時間経過の長いものほど、赤橙色顆粒の早期褪色が起り、顆粒の MF が急速に減少し、核に

表 3 培養6時間後に Ao. を添加せる際の螢光 (%)

	時間	螢光	(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄 緑	黄	橙 黄	橙	赤 橙	赤	MF
顆粒	10 分	0	0	0	0	0	0	0	5.4	7.8	84.6	2.2	645
	1 時間	0	0	0	0	0	0	0	2.6	16.0	81.4	0	642
	3 時間	9.4	0	0	0	0	0	5.2	10.6	23.4	51.4	0	613
	6 時間	17.2	0	0	0	0	0	3.4	18.8	42.4	18.2	0	588
	12時間	49.2	0	0	0	0	0	2.2	17.8	19.4	11.4	0	556
	24時間	64.4	0	0	0	0	0	7.8	8.4	13.2	6.2	0	517
核	10 分	0	15.6	21.8	32.8	18.6	11.2	0	0	0	0	0	513
	1 時間	0	9.2	33.0	26.8	25.6	5.4	0	0	0	0	0	516
	3 時間	0	5.4	23.8	35.2	26.8	5.2	3.6	0	0	0	0	518
	6 時間	0	0	27.2	29.8	28.2	6.4	5.0	3.4	0	0	0	526
	12時間	0	8.2	22.8	24.6	31.8	12.6	0	0	0	0	0	520
	24時間	0	11.8	28.8	18.4	30.8	8.6	2.2	0	0	0	0	519

表 4 培養12時間後に Ao. を添加せる際の螢光 (%)

	時間	螢光	(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄 緑	黄	橙 黄	橙	赤 橙	赤	MF
顆粒	10 分	0	0	0	0	0	0	0	4.8	25.6	69.6	0	638
	1 時間	0	0	0	0	0	0	5.4	7.6	42.2	44.8	0	625
	3 時間	20.2	0	0	0	0	0	8.2	14.6	27.2	29.8	0	588
	6 時間	29.6	0	0	0	0	0	11.2	9.2	30.2	19.0	0	571
	12時間	57.4	0	0	0	0	0	0	13.2	19.0	9.8	0	532
	24時間	75.2	0	0	0	0	0	3.2	11.6	8.0	2.2	0	502
核	10 分	0	0	9.8	24.2	30.4	25.2	5.6	4.8	0	0	0	541
	1 時間	0	0	19.6	18.2	21.6	30.2	7.8	2.6	0	0	0	537
	3 時間	0	0	15.2	19.8	18.4	32.0	4.8	9.8	0	0	0	538
	6 時間	0	0	26.6	43.0	14.8	9.2	6.8	0	0	0	0	522
	12時間	0	13.2	22.4	23.2	17.0	19.4	4.8	0	0	0	0	524
	24時間	0	9.6	18.6	32.4	39.4	0	0	0	0	0	0	516

表 5 培養24時間後に Ao. を添加せる際の螢光 (%)

	時間	螢光	(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄 緑	黄	橙 黄	橙	赤 橙	赤	MF
顆粒	10 分	0	0	0	0	0	0	11.2	17.4	21.8	49.6	0	621
	1 時間	0	0	0	0	0	10.2	15.4	19.4	25.2	29.8	0	603
	3 時間	24.4	0	0	0	0	5.2	8.0	11.8	29.4	21.2	0	573
	6 時間	39.6	0	0	0	0	8.6	12.4	14.8	15.2	9.4	0	543
	12時間	74.4	0	0	0	0	0	4.6	5.2	11.0	4.8	0	503
	24時間	96.4	0	0	0	0	0	0	0	3.6	0	0	474
核	10 分	0	0	0	12.4	38.2	49.4	0	0	0	0	0	545
	1 時間	0	0	2.8	19.4	29.6	41.0	7.2	0	0	0	0	544
	3 時間	0	0	22.2	22.0	19.4	31.2	3.6	1.6	0	0	0	533
	6 時間	0	0	20.4	49.6	12.2	9.6	5.0	3.2	0	0	0	519
	12時間	0	0	25.6	54.4	14.8	5.2	0	0	0	0	0	517
	24時間	0	0	79.4	11.6	9.0	0	0	0	0	0	0	505

於ては早期黄変, 早期緑色膨化が起つた。

第3節 濃度と螢光の関係

1) 実験方法: 培養6時間後に, Ao. 培地濃度が $1/4 \times 10^{-3}$ 及び $1/100 \times 10^{-3}$ となるように添加した。

2) 実験成績(表6, 7):

Ao. 添加後1時間に於て大多数の発する顆粒の螢光は $1/100 \times 10^{-3}$ で橙色, $1/4 \times 10^{-3}$ では赤橙色であるが, $1/4 \times 10^{-3}$ では胞体赤度を多数認め, 添加後6時間に於て, $1/100 \times 10^{-3}$ では赤橙色顆粒が増加するに反して, $1/4 \times 10^{-3}$ では顆粒の螢光不明なるものが増加し, 胞体は赤変せるものが極めて多く, 添加後24時間では赤橙色顆粒を殆ど認めなかつた。MF は $1/4 \times 10^{-3}$ では添加後10分の644を最高として逐時的に減少するに反して, $1/100 \times 10^{-3}$ では添加後10分は

568で6時間では615に増加している。

核は $1/100 \times 10^{-3}$ では極めて弱く, $1/4 \times 10^{-3}$ では核赤変が頻発して添加後3時間に於て約半数を占めた。

MFで比較すると, $1/4 \times 10^{-3}$ では添加後1時間で既に581を示し, 添加後6時間の616を最高として以後減少するが, $1/100 \times 10^{-3}$ では添加後1時間では僅かに497であり, 以後逐時的に増加して24時間では512となるも $1/4 \times 10^{-3}$ に比すれば遙かに低値である。

3) 小括:

培地濃度 $1/100 \times 10^{-3}$ の如き低濃度では顆粒, 核共に染色は徐々に起り, $1/4 \times 10^{-3}$ の如き高濃度では顆粒の早期褪色と胞体赤変, 核赤変の多数出現が見ら

表 6 Ao. 培地濃度 $1/4 \times 10^{-3}$ に於ける螢光(%)

	時間	螢光										MF
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄 緑	黄	橙 黄	橙	赤 橙	赤	
顆粒	10 分	0	0	0	0	0	0	8.7	2.3	81.3	7.7	644
	1 時間	0	0	0	0	0	0	4.0	24.7	63.0	8.3	643
	3 時間	15.7	0	0	0	0	0	10.3	34.7	39.0	0.3	606
	6 時間	43.7	0	0	0	0	0.3	12.0	27.3	16.7	0	558
	12時間	65.3	0	0	0	0	2.7	11.7	8.0	12.3	0	519
	24時間	89.7	0	0	0	0	0	0.7	1.3	8.3	0	485
核	10 分	0	0	13.0	22.0	15.3	36.7	7.0	5.3	0	0	543
	1 時間	0	0	0	3.7	13.3	34.0	10.3	27.0	11.7	0	581
	3 時間	0	0	1.0	1.3	1.7	29.0	8.3	11.0	24.0	23.7	612
	6 時間	0	0	0	0	2.0	25.3	38.7	13.7	22.3	0	616
	12時間	4.3	0	0	12.7	12.0	20.3	27.7	0	28.0	0	575
	24時間	12.7	0	0	27.3	34.3	0	0	0	25.7	0	518

表 7 Ao. 培地濃度 $1/100 \times 10^{-3}$ に於ける螢光(%)

	時間	螢光										MF
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄 緑	黄	橙 黄	橙	赤 橙	赤	
顆粒	10 分	0	0	0	19.3	12.7	22.7	14.3	28.3	2.7	0	568
	1 時間	0	0	0	9.7	11.3	18.3	19.7	26.7	14.3	0	584
	3 時間	0	0	0	0	10.3	7.3	22.7	32.0	27.7	0	606
	6 時間	0	0	0	0	0	19.7	10.3	31.3	38.7	0	615
	12時間	18.0	0	0	0	0	25.3	11.7	20.7	24.3	0	548
	24時間	28.7	0	9.3	18.0	5.3	10.3	12.7	10.7	5.0	0	498
核	10 分	10.3	38.7	25.7	23.3	2.0	0	0	0	0	0	497
	1 時間	0	28.3	29.3	32.7	9.7	0	0	0	0	0	505
	3 時間	0	19.3	33.7	32.3	14.7	0	0	0	0	0	508
	6 時間	0	25.7	35.0	27.3	12.0	0	0	0	0	0	506
	12時間	0	18.7	32.3	28.7	20.3	0	0	0	0	0	510
	24時間	0	20.3	24.7	25.3	29.7	0	0	0	0	0	512

れた。

第4節 温度の螢光に及ぼす影響

1) 実験方法：

孵卵器中で培養したものを培養5時間後に取り出し、次の4条件につき観察した。

(1) 低温に於ける螢光を見るため

a) 氷室(5°C)に入れ1時間後にAo.を添加し、添加後氷室に静置する。

b) 氷室に入れ1時間後にAo.を添加し、添加後孵卵器(37°C)中に静置する。

(2) 高温に於ける螢光を見るため

a) 40°Cに保ち1時間後にAo.を添加し、添加後も40°Cに保つ。

b) 40°Cに保ち、1時間後にAo.を添加し、添加後孵卵器中に静置する。

Ao. 培地濃度は $1/10 \times 10^{-3}$ とし、添加の前後共に孵卵器中に入れたもの(表3)を対照として比較した。

2) 実験成績(表8~11)：

4群共に運動形態は少く、顆粒の染色性が低下し、

(1) a) 群では最高の染色を示した添加後1時間の観察に於ても22%が赤橙色螢光を発するに過ぎず、(2)

a) 群では染色は(1) a) 群より早く現われ添加後10分で最高に達するが、赤橙色螢光を発するものは12.7%に過ぎず、かつ早期褪色が著明である。(1)

b) 群では添加後3時間に於て赤橙色顆粒が71%に見られたが、(2) b) 群では添加後3時間に於ては赤橙色顆粒は全く見られなかつた。

MFで見ると、(1) a) 群は添加後1時間が最高で611であり、(2) a) 群、(2) b) 群は添加後10分が最高で

表 8 低温に於ける螢光 a) 群(%)

	時間	螢光										MF
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤	
顆粒	10分	14.7	0	0	5.3	10.7	16.7	18.3	19.0	15.3	0	571
	1時間	0	0	0	0	0	0	38.3	39.7	22.0	0	611
	3時間	9.0	0	21.3	2.0	26.7	0	0	22.7	18.3	0	559
	6時間	51.3	0	29.7	0	0	0	14.7	5.3	0	0	503
	12時間	84.0	0	0	0	0	4.3	4.0	6.7	1.0	0	490
	24時間	90.3	0	0	0	0	0	5.0	4.7	0	0	482
核	10分	0	0	0	5.0	69.3	12.7	8.0	5.0	0	0	546
	1時間	0	0	0	0	0	8.3	10.7	52.3	28.7	0	616
	3時間	0	0	0	6.3	11.0	25.7	17.0	24.7	15.3	0	586
	6時間	0	0	0	10.7	20.3	28.3	19.7	11.3	9.7	0	575
	12時間	0	0	0	22.0	28.0	21.0	21.3	7.7	0	0	551
	24時間	0	0	0	0	51.7	48.3	0	0	0	0	546

表 9 低温に於ける螢光 b) 群(%)

	時間	螢光										MF
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄緑	黄	橙黄	橙	赤橙	赤	
顆粒	10分	15.7	0	0	5.3	9.3	16.7	21.0	18.3	15.7	0	571
	1時間	0	0	0	0	0	9.3	14.7	24.7	51.3	0	622
	3時間	9.3	0	0	0	0	0	4.3	15.0	71.0	0	624
	6時間	17.0	0	0	0	0	8.3	9.7	30.7	34.3	0	596
	12時間	53.7	0	0	0	0	7.7	13.0	16.3	9.3	0	538
	24時間	72.3	0	0	0	0	5.0	7.0	11.0	4.7	0	507
核	10分	0	0	0	5.0	69.3	11.7	8.7	5.3	0	0	548
	1時間	0	0	7.3	12.7	41.3	38.7	0	0	0	0	540
	3時間	0	0	5.0	10.3	24.7	23.3	16.0	15.0	5.7	0	566
	6時間	0	0	0	14.3	30.7	28.0	12.7	9.3	4.0	0	565
	12時間	0	0	10.7	30.7	31.0	18.3	5.0	4.3	0	0	537
	24時間	0	0	0	49.0	22.3	28.7	0	0	0	0	533

表 10 高温に於ける螢光 a) 群(%)

	時間 \ 螢光	(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄 緑	黄	橙 黄	橙	赤 橙	赤	MF
顆	10 分	18.3	0	0	0	0	0	28.7	40.3	12.7	0	582
	1 時間	29.0	0	0	0	0	9.7	21.3	29.3	10.7	0	563
	3 時間	48.7	0	0	0	0	0	30.3	21.0	0	0	533
	6 時間	94.7	0	0	0	0	0	0	5.3	0	0	478
粒	12時間	97.3	0	0	0	0	0	0	2.7	0	0	473
	24時間	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	470
核	10 分	0	0	0	4.3	0	5.0	15.7	39.7	35.3	0	615
	1 時間	0	0	0	24.7	25.0	11.3	20.3	18.7	0	0	558
	4 時間	0	0	0	48.3	51.7	0	0	0	0	0	525
	6 時間	0	0	0	67.3	32.7	0	0	0	0	0	521
	12時間	10.7	0	0	58.3	31.0	0	0	0	0	0	516
	24時間	46.3	0	0	53.7	0	0	0	0	0	0	494

表 11 高温に於ける螢光 b) 群(%)

	時間 \ 螢光	(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄 緑	黄	橙 黄	橙	赤 橙	赤	MF
顆	10 分	18.0	0	0	0	0	9.7	10.3	25.7	36.3	0	590
	1 時間	29.3	0	0	0	0	7.0	15.7	38.3	9.7	0	559
	3 時間	48.7	0	0	0	0	4.0	19.3	28.0	0	0	536
	6 時間	89.3	0	0	0	0	0	5.0	5.7	0	0	483
粒	12時間	96.3	0	0	0	0	0	0	3.7	0	0	473
	24時間	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	470
核	10 分	0	0	0	0	7.0	18.3	36.7	38.0	0	0	588
	1 時間	0	0	0	0	7.7	10.3	42.3	39.7	0	0	591
	3 時間	0	0	0	0	5.0	5.7	45.0	44.3	0	0	594
	6 時間	0	0	0	0	4.3	6.0	40.7	49.0	0	0	597
	12時間	0	0	0	0	0	22.0	49.3	28.7	0	0	587
	24時間	0	0	0	0	20.3	38.7	19.7	21.3	0	0	571

夫々 582, 590 を示すが以後急速に減少する。(1) b) 群では MF はかなり高く、添加後 3 時間に於て 624 となり、対照の 613 より寧ろ増加していた。

核は (1) a) 群では添加後 1 時間に於て、(2) a) 群では添加後 10 分に於て約半数が赤変を起し、(1) b) 群は (1) a) 群に、(2) b) 群は (2) a) 群に類似した螢光を呈した。

核の MF は 4 群共に著明な高値を示した。

3) 小括：

低温に於ては、顆粒の染色性は低下し、核は赤変の傾向を有するが、Ao. 添加後培養至適温度に移せばかなり回復して対照に近づく。高温に於ても顆粒の染色性が低下し、顆粒の早期褪色と核の赤変が著明であり、培養至適温度に移しても回復が起らない。

第 5 節 培地滲透圧の影響

1) 実験方法：

3%食塩水 1 滴 + V. B₁₂ 1 滴 (1cc 中 V. B₁₂ 100 γ 含有の生理的食塩水 1 滴) + 血清 1 滴を高張培地とし、0.3%食塩水 1 滴 + V. B₁₂ 1 滴 + 血清 1 滴を低張培地とした。

2) 実験成績：

顆粒及び核の螢光は第 2 ~ 第 4 節の如き規則性ある推移を示さなかつたので、MF の算出は行わなかつたが以下に述べる所見を得た。即ち顆粒は 10 分後に於て、低張では半数が橙乃至赤橙色を、高張では半数以上が赤橙色を呈したが、以後両者とも早期に褪色し、染色性の低下が見られた。

胞体は、低張では綠色膨化が多く、高張では添加後 1 時間に於て胞体赤変を散見するが、以後綠色膨化を起す。

核は、低張に於ては添加後10分で約半数が黄変し、添加後1時間で $\frac{1}{2}$ が赤橙色を呈し、以後綠色膨化が増加する。高張に於ては添加後10分で半数以上が黄変するが、低張の際に見られたような完全な赤変はなく、橙色螢光を発する核を散見した。

3) 小括：

低張、高張共に顆粒の染色性が低下し、核は黄変、赤変の傾向を有するが、核赤変は低張に於て著明であつた。

第6節 リンゲル培地に於ける螢光

1) 実験方法：

培地をリンゲルのみとして培養し、培養6時間後に、培地濃度が $\frac{1}{10} \times 10^{-3}$ となるようにAo.を添加した。

2) 実験成績：

第5節同様螢光の推移に規則性なきため、MFの算出は行わなかつたが以下の所見を得た。

顆粒は染色性の低下が著明で、添加後10分に於て黄色乃至橙黄色を呈するのみであり、添加後6時間に於て橙色顆粒が見られるが、いつれの時間に於ても明瞭な赤橙色顆粒を呈するものは少なかつた。

核は添加後1時間に於て大部分黄綠色を呈し、以後時間と共に赤変せるものが増加したが綠色膨化は少なかつた。

3) 小括：

顆粒の染色性は低下すると共に遅期染色を示し、核は赤変が多く綠色膨化が少なかつた。

第7節 等張糖液培地に於ける螢光

1) 実験方法：

5%葡萄糖溶液のみを培養地として培し、培養6

時間後に、培地濃度が $\frac{1}{10} \times 10^{-3}$ となるようにAo.を添加した。

2) 実験成績：

第5節同様螢光の推移に規則性なきため、MFの算出は行わなかつたが以下の所見を得た。

顆粒は染色性の低下が著明で、特に12時間以後は甚だしく、顆粒の螢光は殆んど見られない。顆粒の周辺に色素が僅かに附着している如く見えるものがあり、この場合の螢光は橙色であつた。

胞体は赤変するもの多く、添加後1時間頃から大なる不染空泡が多数出現し、添加後24時間では胞体の螢光は不明であつたが、綠色膨化を起したものは極めて少数であつた。

核は早期より赤変多く、添加後10分で $\frac{1}{10}$ に認められ、添加後24時間に於ても大多数橙色螢光を発し、綠色膨化は少数であつたが、この橙色螢光は、これまでに述べた核赤変型の螢光と異り、透明感のある微弱な螢光であつた。

3) 小括：

顆粒の染色性の激減、不染空泡の頻発、核の微弱な橙色螢光が特徴的に認められた。

第8節 励起光線の螢光に及ぼす影響

1) 実験方法：

培養6時間後に孵卵器より取り出し、螢光観察時と同一状態にして培養盤を顕微鏡にとりつけ、励起光線を30分間照射した。この際

a) 30分照射した後Ao.を添加する

b) Ao.を添加した後30分照射する

の2群に分け、非照射群(表3)を対照として比較した。

表 12 励起光線照射時の螢光 a) 群 (%)

	時間	螢光										MF
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄 緑	黄	橙 黄	橙	赤 橙	赤	
顆粒	10 分	0	0	0	0	0	0	9.0	72.3	18.7	0	629
	1 時間	9.3	0	0	0	0	5.3	14.7	51.7	19.0	0	599
	3 時間	31.0	0	0	0	10.7	3.0	30.3	18.0	7.0	0	557
	6 時間	35.7	0	0	0	8.3	5.7	25.7	19.3	5.3	0	555
	12 時間	45.7	0	0	0	0	10.3	23.7	15.3	5.0	0	539
	24 時間	75.3	0	0	0	2.0	4.7	9.7	6.0	2.3	0	499
核	10 分	0	8.3	52.7	39.0	0	0	0	0	0	0	505
	1 時間	0	0	29.3	38.7	22.7	9.3	0	0	0	0	519
	3 時間	0	0	25.0	29.3	31.7	8.7	3.0	2.3	0	0	533
	6 時間	0	5.0	30.3	35.0	14.3	10.7	4.7	0	0	0	521
	12 時間	0	0	39.7	30.3	15.7	9.0	5.3	0	0	0	520
	24 時間	0	4.7	49.3	22.7	18.3	5.0	0	0	0	0	513

表 13 励起光線照射時の螢光 b) 群 (%)

	時間	螢光										
		(-)	緑(±)	緑(+)	緑(++)	黄 緑	黄	橙 黄	橙	赤 橙	赤	MF
顆粒	10 分	5.7	0	0	0	0	8.3	10.3	51.0	24.7	0	610
	1 時間	24.3	0	0	0	0	5.0	20.7	31.7	18.3	0	577
	3 時間	89.3	0	0	0	0	0	3.0	5.7	2.0	0	484
	6 時間	94.7	0	0	0	5.3	0	0	0	0	0	474
	12 時間	97.3	0	0	0	2.7	0	0	0	0	0	472
	24 時間	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	470
核	10 分	0	0	3.7	11.3	40.3	44.7	0	0	0	0	543
	1 時間	0	0	11.0	18.7	49.3	15.3	3.7	2.0	0	0	527
	3 時間	0	5.0	48.3	46.7	0	0	0	0	0	0	507
	6 時間	0	29.3	42.7	19.3	8.7	0	0	0	0	0	503
	12 時間	9.3	11.0	39.7	29.3	10.7	0	0	0	0	0	504
	24 時間	20.7	30.3	18.3	21.0	9.7	0	0	0	0	0	498

2) 実験成績 (表12, 13):

a) 群では顆粒の染色性が低下し、添加後10分及び1時間に於て大多数は橙色を呈し、以後徐々に褪色し、MFは添加後10分の629を最高として逐時的に減少し、すべての時間に於て対照より低い。

胞体及び核には著変を見ず、核のMFも対照と有意の差を見なかつた。

これに反し b) 群では、顆粒は染色性の低下と共に早期褪色が著明で、添加後3時間に於て既に赤橙色顆粒を殆んど認めない。MFが添加後1時間に於て a) 群で599, b) 群で577で大差がないのに、添加後3時間では a) 群が557を示すに比し b) 群では484となり著明な減少を示している。

核も添加後10分に於て黄変せるものが半数を占め、MFも対照の513, a) 群の505に対して543の高値を示し、添加後6時間に於ては緑色膨化が増加した。

3) 小括:

30分照射後にAo.を添加したものは、顆粒の染色性が低下するのみであるが、Ao.添加後に30分照射したものでは、顆粒は染色性の低下と共に著明な早期褪色を示し、核は黄変の傾向を示した。

第4章 総括並に考按

私は第1編に於て螢光簡易培養法を案出し、第2編に於て同法による血球の生態観察を行い、従来述べられて来た所見と異なる点を指摘したが、本編では変性時の螢光を観察した結果、従来の超生体染色による所見は顔死の状態に於ける一断面を観察したものに過ぎず、従つて変性像をも混じて記載されており、このため各観察者により区々別々の所見が得ら

れたものとの解釈を下した。

即ち Braunsteiner⁸⁾は白血球の胞体は赤いとなし、山下⁹⁾は単球の胞体は赤いと述べているが、胞体の赤色螢光は変性時の白血球に於て屢々見られる所見であり、又天木¹⁾は赤色螢光を発する好中球の核を観察し、変化した細胞であつて検討を要すると記しているが、私の観察では核が赤色螢光を発するのは死細胞であつて好中球に限らない。

先に教室柴田³⁶⁾は吉田肉腫細胞の螢光顕微鏡観察に於て、培養直後の細胞は胞体及び核の緑色調が強く、培養日数の経過と共に胞体に赤色螢光が現われ、核は帯黄緑色の螢光を発すると報告し、教室服部¹⁸⁾はマウスの腹水食細胞に於て、新生細胞ほど胞体及び核の緑色螢光が強く、大網を切除して新生細胞の増殖を制止すると食細胞の胞体は緑色螢光が弱くなり、赤橙色顆粒は大小不同を呈し、核は帯黄緑色螢光を発し、食細胞に貪喰された細胞に於ては、胞体は弱い赤色を呈し、赤橙色顆粒を認めず、核は赤色を呈すると述べている。これらの事実からしても私が第2章で述べた顆粒膨化、顆粒褪色、胞体赤変、核黄変、核赤変が変性徴候である事は首肯されるが、他方緑色乃至赤色の異常突起形成や胞体及び核の緑色膨化は形態学的に教室品川³⁷⁾の位相差顕微鏡による変性所見に一致した。

従つてこれらが変性像である事は疑のない所であるが、変性像に外ならぬ事を更に確認するため、私は悪条件下で培養した細胞にAo.を添加して生体染色を行い、変性過程に於ける螢光像を観察した結果、殊に顆粒及び核の螢光の変化に新知見を得た。

即ち培養経過後の各種時間に於てAo.を添加する

と、培養経過後の時間の長いものは赤橙色顆粒の早期褪色を見たが、教室田村⁴⁰⁾の中性紅による実験でも、培養後長時間を経たものに生体染色を行うと、顆粒の早期染色と早期褪色が認められ、これは細胞機能の衰えた時に起ると述べてあるが、Ao. も同じく塩基性色素である所からして同一の機点によつて起つたものと解釈され、又核の螢光が培養後長時間を経たものでは黄色となり易かつた事も、同様に細胞機能との関係が窺われる。蓋し中性紅、ヤーヌス緑等による生体染色に於ても、死戦期に至れば核の染色を見るものであり、Ao. で染色した際核の黄変、赤変が起るのは変性につれて核に於ける Ao. の濃度が高まり、Boerner-Patzelt⁷⁾の言う Polimerisation により黄色乃至赤色の螢光を發したと考えられる。この点他の色素ではその色素固有の色が濃くなるのみであるに反し、Ao. では濃度の差が Strügger⁴¹⁾の Konzentrationsseffekt により緑色～黄色～赤色と多彩な螢光となつて現われるのである。

従つて $1/4 \times 10^{-3}$ の如く培地濃度の高い場合、胞体赤変、核赤変が頻発する事は当然であり、又該濃度では増生の起らなかつた点より考えると、胞体及び核の赤変が変性像に外ならぬ事が帰結され、又 $1/4 \times 10^{-3}$ の如き高濃度に於て赤橙色顆粒の早期褪色が起つた事も、細胞機能の面より考えれば理解出来るのである。

更に温度との関係に於て、高温、低温共に顆粒の染色性が低下したが、低温では培養至適温度に戻した場合螢光が正常に復するに反し、高温では正常に復さなかつた点も、顆粒の螢光が細胞機能と密接な関係を有する事を示すものである。蓋し低温に於ては細胞は抵抗が強く、高温に際しては直ちに変性を起す事は教室津島⁴⁴⁾も述べている所である。

その他培地滲透圧の変化、リンゲル培地、等張糖液培地等の悪条件下に於て、赤橙色顆粒が早期褪色を起し、胞体赤変、空泡形成、核赤変等が頻発した事も以上の結論を裏づけるものであろう。

一方励起光線と螢光の關係に於て、励起光線照射後に Ao. を添加した例では螢光の変化が軽度であるに対し、Ao. 添加後に励起光線を照射せる例では著明な顆粒の早期褪色と核の黄変を來たした事実は、第1篇に於ける増生の觀察に際して、Ao. 無添加例では励起光線照射後も比較成長価の減少が少く、Ao. $1/10 \times 10^{-3}$ では照射後の減少が著明であつた成績と正の相関關係を有し、Ao. で染色された細胞に當つた紫外線が細胞機能に障礙を与え、顆粒の早期褪色、

核黄変を起したものと考えられる。かくの如き螢光の著明な変動は、生体染色に於て始めてよく認め得る所であり、同じく Ao. を用いても固定標本では認められない。

又空泡に関しても Kosenow²⁶⁾、山下⁵⁰⁾ は不染であると述べているが、私は不染空泡とは別に中性紅空泡に相当すると思われる Ao. 可染空泡を認め、この点天木³⁾の觀察に一致した。該空泡は正円形で時間と共に著明に大となり、顆粒とは明らかに區別し得るものであるが、この点も長時間の生態觀察により始めて確認し得た所である。

最後に核小体に関しては、赤色であるとなす山下⁵⁰⁾の所見は緑色であるとなす私の所見と異なるが、核小体赤変は胞体赤変や核黄変乃至赤変と同時に見られる事が多く、やはり変性像と思われる。Bertalanffy⁴⁵⁾は Ao. による固定標本に於て、DNA は赤色螢光を、RNA は緑色螢光を發し、従つて核は緑色、核小体は赤色を呈すると述べているが、私の実験に於ては、核も変性期には赤色を呈し得るので DNA、RNA のみでは生体染色に於ける螢光所見を説明し得ない。教室品川³⁷⁾は白血細胞に於ては正常人血液細胞よりも変性が早く起ると言い、教室小塚²⁷⁾の螢光顕微鏡による觀察では、白血細胞に於ては核小体の赤変が頻発すると述べられている。これらの点より考えると、白血病の際は DNA の増加があり、Ao. に結合した多量の DNA により赤色螢光が強いと言う事を仮定に入れても、生態觀察の観点からすれば、核小体の赤変はやはり細胞の変性と関係を有すると解釈される。

第5章 結 論

私は螢光簡易培養法を行つて白血球の変性像を觀察し、更に悪条件下で培養を行つた細胞に Ao. を添加して螢光の変化を追求し、次の結論を得た。

- 1) 従来超生体染色により言われて來た所見の多くは変性像である。
- 2) 変性像に於ても、各細胞により螢光に差を認めた。
- 3) 細胞の濃縮性変化に際しては螢光は赤く、膨化性変化に際しては緑色を呈した。
- 4) 細胞機能の低下を來たした状態では、赤橙色顆粒は早期褪色を示し、核は黄色となり著しい時は赤変する。平均螢光度で言えば、顆粒の平均螢光度は早期に減少し、核の平均螢光度は増加した。
- 5) 顆粒の螢光が消失したもの、胞体赤変、核赤

変及び核緑色膨化を起したものは死細胞である。

(本論文の要旨は昭和33年2月の第2回組織培養学会, 昭和33年4月の第22回日本血液学会総会に於

て発表し, 又昭和34年4月の第15回日本医学会総会に於ける平木教授のシンポジウムの一部として発表した)

附. 全 編 の 総 括

螢光顕微鏡による血液細胞の研究は最近とみに盛んとなつたが, 多くは超生体染色による観察がなされているに過ぎない。そこで私は骨髓体外組織培養に螢光色素 Ao. を添加して, 螢光顕微鏡による人骨髓諸細胞の生態観察を行う事を試みた。

第1編に於ては, 先づ Ao. の骨髓増生及び細胞機能に及ぼす影響を検索し, 培地濃度 $1/10 \times 10^{-3}$ 以下の低濃度では培養が可能である事を確かめ, 次いで光源に OSRAM HBO 200 水銀燈, 光源フィルターに BG12, 接眼フィルターに OG5 を用いて人好中球を観察し, $1/10 \times 10^{-3}$ に於て最も鮮明な螢光を認め, 血清1滴及び1cc 中 V.B12 80γ, Ao. 0.2mg 含有の生理的食塩水溶液1滴を培地とする培養法を考案し, これを螢光簡易培養法と呼んだ。

第2編に於ては, 先づ同法により正常人骨髓を培養し, 増生帯を弱拡大で観察して, 瀰漫性赤橙色螢光の中に緑色, 黄色の螢光が点在するのを認めた。次いで個々の細胞を強拡大で観察すると, 細胞の胞体は緑色で, ミトコンドリア及び各種顆粒は黄緑色~赤橙色の螢光を呈するが, ミトコンドリアの螢光は微々たるものであり, 核及び核小体は緑色で, 核小体は核よりも早く発光し, 芽球には赤橙色顆粒なく緑色螢光を呈し, それ以下の段階に於ては, 骨髓

系細胞は顆粒の赤橙色螢光が, 淋巴球系細胞は核の黄緑色螢光が特徴的であり, 単球系細胞では緑色の胞体と核周に集簇性を示す赤橙色顆粒により多彩な螢光を示し, その他の細胞も夫々螢光に差のあるのが認められた。更に, 接眼フィルターに GG4, OG4 を併用して観察すると, 赤芽球系細胞の白血球系細胞からの鑑別が容易となる事を見出した。

第3編に於ては, 変性細胞の螢光を観察し, 更に悪条件下で培養した細胞に Ao. を添加して螢光の変化を追求し, 従来超生体染色により述べられて来た所見の多くは変性像である事を明らかにし, 細胞機能の低下した状態に於ては赤橙色顆粒が早期褪色を示し, 核は黄変するのを観察し, 顆粒の螢光が消失したものや核の赤変及び緑色膨化を起したものは死細胞である事を確認した。又平均螢光度 (MF) の算出法を考案し, 細胞機能の低下を来した状態に於ては顆粒の MF が早期に減少し, 核の MF が増加する事を認めた。

擧筆するに当り, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜つた恩師平木教授に深甚なる謝意を表する。

参 考 文 献

- 1) 天木一太, 津金英雄: 日血会誌, 18, 298, 昭30.
- 2) 天木一太, 原島三郎: 癌の臨床, 3, 204, 昭32.
- 3) 天木一太他: 日血会誌, 22, 263, 昭34.
- 4) Bertalanffy, L. et al.: Science, 124, 1024, 1956.
- 5) Bertalanffy, L. & I. Bickis: J. Histochem. Cytochem., 4, 481, 1956.
- 6) Besis, M.: Cytology of the Blood and Blood Forming Organs, Grune & Stratton, New York, 1956.
- 7) Boerner-Patzelt, D.: Protoplasma, 39, 639, 1950.
- 8) Braunsteiner, H. u. F. Pakesch: Wien. Z. Inn. Med., 32, 321, 1951.
- 9) Caris, G.: Z. Physik., 11, 161, 1922.
- 10) Contier, L.: Blut., 2, 277, 1956.
- 11) Danckwortt, P.W.: Lumineszenz-Analyse im Filtrierten U V Licht, III Aufl., Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1934.
- 12) Förster, T.: Fluoreszenz Organischer Verbindungen, Vandenhoek & Ruprecht, Göttingen, 1951.
- 13) Frank, J. u. G. Hertz: Verh. dtsch. Physik. Ges., 16, 457, 1914.

- 14) Frank, J.: Z. Physik., 9, 859, 1922.
- 15) Friedman, H. P.: Am. J. Obst. & Gyn., 59, 852, 1950.
- 16) Gross, R.: Acta Haemat., 11, 1, 1954.
- 17) Haitinger, M.: Abderhalden, Handbuch d. biologischen Arbeitsmethoden, II, 3(1), 3307, Urban & Schwarzenberg, Berlin, 1934.
- 18) 服部進: 岡医会誌, 71, 4257, 昭34.
- 19) 平木潔: 岡医会誌, 68, 4号別巻, 昭31.
- 20) 平木潔, 大藤真: 日血会誌, 19, 406, 昭31.
- 21) 藤井大夫: 京医会誌, 39, 822, 昭17.
- 22) 池上章: 岡医会誌, 48, 767, 昭11.
- 23) Köhler: Zit. n. 矢崎芳夫: 医学のあゆみ, 16, 279, 昭28.
- 24) 小坂晋: 日内会誌, 29, 253, 昭16.
- 25) Kosenow, W.: Acta Haemat., 7, 217, 1952.
- 26) Kosenow, W.: Lebende Blutzellen im Fluoreszenz u. Phasenkontrastmikroskop, Basel, S. Karger, New York, 1956.
- 27) 小塚堯: 未刊.
- 28) Leonhartsberger, F. u. F. Pakesch: Wien. Z. Inn. Med., 82, 110, 1951.
- 29) 宮川晩男: 日血会誌, 16, 317, 昭28.
- 30) 中井彦二他: 日血会誌, 21, 424, 昭33.
- 31) 大亀学: 岡医会誌, 71, 1369, 昭34.
- 32) 大河原健次郎: 未刊.
- 33) 太田善介: 未刊.
- 34) Price, G. R. & S. Schwartz: Oster & Pollister, Physical Technique in Biological Research, III, 3, 91, Academic Press, New York, 1956.
- 35) 佐藤光永, 宇野宏治: 日血会誌, 18, 299, 昭30.
- 36) 柴田凡夫: 未刊.
- 37) 品川晃二: 未刊.
- 38) Stark, J. & R. Meyer: Z. Physik, 8, 250, 1907.
- 39) Stokes, G.: Phil. Trans., 143, ii, 463, 1852.
- 40) Strugger, S.: Dtsch. tierärztl. Wschr., 50, 51, 1942.
- 41) Strugger, S.: Fluoreszenzmikroskopie u. Biologie, M. u. S. Schaper, Hanover, 1949.
- 42) 末永泰三: 岡医会誌, 70, 1291, 昭33.
- 43) 田村甫: 岡医会誌, 70, 2629, 昭33.
- 44) 津島充: 岡医会誌, 68, 増刊号, 16, 昭31.
- 45) 上田幸夫他: 日血会誌, 21, 423, 昭33.
- 46) 宇野宏治: 弘前医学, 7, 337, 昭31.
- 47) Vinigar, R.: Cancer Research, 16, 900, 1956.
- 48) Werth, G.: Acta Haemat., 10, 209, 1953.
- 49) Wood, R. W.: Phil. Mag., 10, 513, 1905.
- 50) 山下貢司: 綜合医学, 14, 997, 昭32.
- 51) Yasaki, Y. & Y. Sinoto, Cytologia, 17, 336, 1952.
- 52) 横田政信: 日血会誌, 12, 73, 昭24.
- 53) Zollinger, H. U.: Am. J. Path., 24, 545, 1948.
- 54) Zollinger, H. U.: Am. J. Path., 24, 1039, 1950.

Fluorescence-Microscopic Studies on Various Bone Marrow
Cells by Tissue Culture

Part 3. A Study on Degeneration of Leucocytes and
on the Relationship between Cell Function
and Fluorescence

By

Susumu Watanabe

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

By performing the simple method of fluorochrominized bone marrow tissue culture the author observed the degeneration picture of leucocytes, and also studied changes in fluorescence in the cells cultured under an adverse condition but added with acridine orange. The following are the results of the present experiment.

1. It has been found that the majority of commonly-known findings by supravital staining are proven to be degeneration picture of cells.

2. As for the degeneration signs, the swelling and fading of reddish orange granules can be pointed out, while in cytoplasmic vacuoles either stained or unstained with acridine orange, abnormal processes, the reddening or green swelling of cytoplasm can be recognized. The nuclei have agglutinated chromatin and have become yellow, red, and swollen in green color, and in nucleoles green swelling or reddening can be observed.

3. In the degeneration picture likewise each cell type presents different fluorescence.

4. When cells become shrunk, the fluorescence is red, while when cells are swollen, it is green.

5. In the cells with decreased function reddish orange granules fade quickly and their nuclei turn yellow.

6. Those cells that have lost the fluorescence of their granules, and those that have red cytoplasm and red nuclei as well as those with their nuclei green and swollen as all-dead cells.
