

各種動物の骨髓体外組織培養

第 1 編

組織増生並びに遊走細胞の観察

岡山大学医学部平木内科（主任：平木 潔教授）

末 永 泰 三

〔昭和33年2月21日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒 言

第2章 実験材料並に実験方法

第3章 実験成績

1. 増生面積の時間的推移
2. 細胞増生帯密度
3. 全細胞運動停止時間
4. 細胞増生帯に於ける細胞活動の推移

5. 各種細胞の生態観察（特に運動生態に就いて）

6. 好中球，偽好酸球遊走速度の時間的経過

7. 各種動物血漿の犬骨髓組織培養に及ぼす影響に就いて

第4章 総括並に考按

第5章 結 論

第1章 緒 言

組織を体外に発育せしめ、活動状態にある細胞を観察する事が出来れば、死んだ細胞を対象としている世界では到底追従を許し得ない多くの問題を取扱いうる事は容易に推察される所である。この様な考えの下に生れた組織培養法は、1907年 Harrison⁶¹⁾が蛙の神経線維を蛙淋巴内で成長せしめた実験にその端を発するものであるが、その後 Carrel⁶⁴⁾、Fischer⁶⁷⁾、Erdmann⁶⁴⁾⁶⁵⁾、Bisceglie⁴⁹⁾等の努力によつて基礎が確立され術式も進歩すると共に新生面が開拓せられ、本邦では木村教授¹⁷⁾門下によつて、特に細菌学、免疫学への系統的研究がなされ、現在ではその応用方面は医学生物学の各部門に及び、組織培養法を俟つて始めて解決される問題が少くない有様である。

さて現今温血、冷血動物の殆んど総ての組織が培養可能となつてゐるが、造血臓器の面でその主要部門たる骨髓の組織培養に関して最初に発表せるは、Carrel & Burrows⁶¹⁾であつて、猫、犬、蛙を用いて血液細胞の急速な出現と線維芽細胞の遅い出現を記載した。次で Foot⁶⁰⁾は鶏を用いて巨態細胞の出現せるを認め、これは中胚葉より生ずるもので骨髓の多核巨態細胞とは別個のものなりと云い、又続報

にて之は淋巴球より来るものであると訂正している。又 Erdmann⁶⁴⁾⁶⁵⁾は鶏骨髓にて細胞論並に其の分化に就て記載し、Foot の研究成果を再検討し、Grossmann⁶⁰⁾は海狼骨髓にて諸細胞の運命就中淋巴球に興味を持ちて検索し、Foot の所説を否定している。一方 Tower and Herm は幼若猫にて赤血球と骨髓巨態細胞に就き簡単に報告し、又 Maximow⁷¹⁾は幼若白鼠の骨髓を培養し、その際見られる細胞は赤血球、好中球、好酸球、骨髓球、淋巴球、結締組織細胞並に脂肪細胞なりと記載している。更に本邦では原³⁵⁾³⁶⁾が鶏骨髓で鍍銀染色を施し白血球の顆粒形質を観察し、河島¹⁶⁾は家鶏胎児骨髓で細胞増生の観察を行い、更に肝、脾のエキスを加えて、その影響につき検討している。

以上の諸家の業績は概して断片的で細胞の分化乃至は異同を扱つたものが多く、骨髓の組織増生、骨髓細胞の運動生態と共に墨粒貪喰能、生体染色等を併用した総合的系統的な観察は殆んど行われていない。先年来、教室では骨髓組織培養の方法論的乃至は細胞組織学的基礎研究と共に臨床応用が系統的に行われ、幾多の知見が既に発表されたが、就中平木教授³⁰⁾は組織培養による増生並に遊出血球の長時間に亘る動態を明視野及び位相差顕微鏡を用いて顕微鏡映画におさめ、その成果を第18回日本血液学会

(昭31)並に第6回国際血液学会(1956)にて発表された。この様な研究発表は内外にその例を見ず、従来の血球の死後乃至瀕死の状態における観察に比すれば血液学上の一大飛躍であり、骨髓培養の長所を如実に発揮したものと云う事が出来るであろう。私は教室の骨髓組織培養に於ける研究の一環として、温血動物より冷血動物に至る各種動物骨髓の体外培養を行い、組織増生、細胞運動生態と共に墨粒貪喰能、生体染色に就いても系統的に観察し、種々の角度より一連の実験を試みた。

本編に於ては組織増生、増生帯の細胞活動の推移、各種細胞の運動生態、並に好中球、偽好酸球遊走速度の時間的推移等に就いて報告する。

第2章 実験材料並に実験方法

培養組織

哺乳類：二十日鼠、白鼠、海狸、猫、犬

但し犬では後述の如く幼若犬、成熟犬で著しく実験成績を異にするので生後3ヶ月未満の幼若犬と、6ヶ月以上の成熟犬を夫々使用した。

鳥類：鶏、鳩

冷血動物：殿様蛙(夏蛙)

以上の各動物を夫々3例宛用い、大腿骨骨髓を無菌的に取出して使用した。

培養基材料：培地の支持体としては同種動物のヘパリン加血漿を、発育促進物質には9日目の家鶏胎児圧搾液を用いた。

培養操作：培養は被覆培養法(懸滴法)を用い教室の術式に準じて行つた。即ち先づ被覆硝子上にヘパリン加血漿を1滴取り、1.5cm直径に拡げ、その中央に骨髓組織片(約1mm³の細片)を載せ、鶏胎圧搾液1滴を加え、血漿の凝固の後凹窩載物硝子に合わせてパラフィンで封入し、温血動物では標本を孵卵器(37~38°C)内に入れ、冷血動物標本は室温(20°C前後)に静置した。

観察方法：温血動物では全て37°Cに保つた顕微鏡保温箱内に行い、冷血動物では室温にて観察した。

a) 増生面積の計測：アツペの描画器を用いて新生組織を描画し、その面積をプランニメーターで計測し、増生前後の差即ち絶対成長価の原面積に対する比率を比較成長価とした。

b) 細胞密度の測定：接眼レンズ5倍、対物レンズ100倍にて増生帯の周辺部、中間部、中心部の3

部に就て夫々一視野の細胞数を計算し、その和を密度指数とした。

c) 遊走速度測定：アツペの描画器にて細胞の中心点の軌跡を画き、之を「キユルビメーター」で計測し、その倍率から換算して実数値を求めた。即ち各細胞に就て30秒毎に形態を描画し、2~3分間観察し、1分間の平均値を算出した。

第3章 実験成績

1. 増生面積の時間的推移

白鼠、猫、海狸の骨髓面積増生は72時間迄増生し、二十日鼠、鶏、鳩、蛙では48時間で増生停止が見られた。犬は雑種が多くその成績は幼若犬、成熟犬で異なり一律に論ずる事は出来ないが、生後3ヶ月未満の幼若犬では48時間迄増生可能であり、成熟犬では24時間で早くも増生の停止が認められた。

各時間に於ける比較成長価を動物別に示すと第1表~第9表の如くであるが、複雑化を防ぐ爲各動物3例の平均値を求め、動物相互間の比較成長価を一括比較して見ると第10表、第1図に示す通りである。即ち白鼠、猫は72時間で50前後の高値を示し、鶏が48時間で32.75となり、以下幼若犬、鳩、海狸、二十日鼠の順で何れも25前後の数値を示すが、成熟犬は24時間で6.72、蛙は48時間で僅かに3.22を示すに過ぎない。

第1表 二十日鼠比較成長価

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	4.23	5.88	3.11
6	5.91	7.53	4.27
9	7.82	10.98	7.09
12	8.83	21.83	14.27
24	12.82	26.73	19.90
48	14.16	31.35	21.02

第2表 白鼠比較成長価

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	2.64	3.56	6.21
6	6.62	6.58	10.26
9	9.34	12.64	11.45
12	12.56	18.27	13.91
24	32.63	22.32	30.82
48	59.12	32.43	46.53
72	62.13	41.56	51.21

第3表 海狸比較成長価

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	3.12	3.91	5.04
6	4.02	5.12	6.21
9	5.73	6.54	7.38
12	7.75	8.16	10.12
24	10.34	11.63	12.77
48	15.36	19.02	21.83
72	20.82	25.84	23.22

第4表 猫比較成長価

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	4.41	3.52	4.62
6	8.82	5.33	9.13
9	14.92	10.03	15.16
12	27.43	22.09	28.22
24	35.86	26.82	36.26
48	40.43	30.52	39.34
72	48.76	40.33	51.26

第5表 幼若犬比較成長価

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	4.12	4.55	5.94
6	7.91	8.22	14.88
9	11.33	11.00	19.74
12	15.56	14.33	22.31
24	19.12	17.66	26.82
48	25.04	22.16	31.21

第6表 成熟犬比較成長価

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	0.71	3.12	1.85
6	1.55	4.01	2.32
9	3.43	5.22	3.81
12	5.22	7.31	5.63
24	6.46	7.81	5.89

第7表 鶏比較成長価

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	3.83	3.69	3.24
6	6.76	10.07	4.56
9	11.21	15.11	9.33
12	17.43	20.38	12.31
24	28.91	29.76	24.75
48	35.05	33.63	28.59

第8表 鳩比較成長価

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	2.13	1.63	1.43
6	3.74	3.64	3.21
9	7.64	7.56	5.12
12	12.81	12.75	10.23
24	19.93	21.32	19.18
48	24.05	27.63	23.21

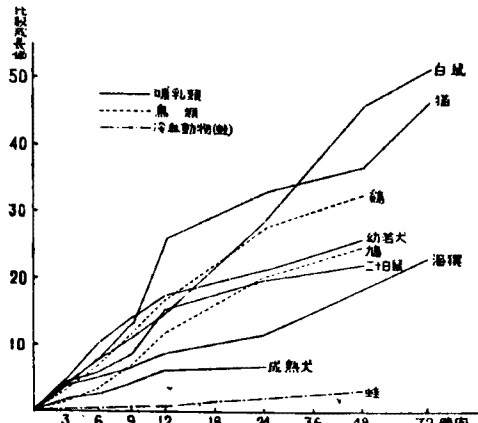
第9表 蛙比較成長価

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
6時間	0.40	0.53	0.36
9	0.43	0.58	0.42
12	0.56	0.62	0.48
18	1.59	1.62	1.43
24	1.82	2.12	1.65
36	2.61	2.83	2.47
48	3.32	3.56	2.91

第10表 各種動物比較成長価 (平均値)

動物 時間	二十日鼠	白鼠	海狸	猫	幼若犬	成熟犬	鶏	鳩	蛙
3時間	4.40	4.13	4.02	4.18	4.87	1.89	3.58	1.73	
6	5.90	7.82	5.11	7.76	10.33	2.62	7.13	3.53	0.43
9	8.63	11.14	6.55	13.37	14.02	4.15	11.88	6.77	0.47
12	15.31	14.91	8.67	25.91	17.40	6.05	16.70	11.93	0.55
18									1.54
24	19.81	28.59	11.58	32.98	21.20	6.72	27.80	20.14	1.86
36									2.63
48	22.17	46.02	18.73	36.76	26.13		32.75	24.96	3.26
72		51.63	23.29	46.78					

第1図 各種動物比較成長価 (平均値)



2. 細胞増生帯密度

各動物の時間別密度指数は第11表～第19表の如くであるが、各々の平均値を比較して見ると第20表に示す様になる。24時間に於ける密度指数は犬、蛙が僅かに25前後の低値を示すのに対し、他動物では何れも50以上の数値が認められる。犬は幼若犬に於ても比較成長価に比して密度指数は著しく低く、従つて増生面積及び密度両者を考慮に入れ真の増生値(面積×密度)を見れば、他の温血動物に比して一段と増生不良なる事が容易に伺われる。

第11表 二十日鼠細胞密度指数

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	99	67	51
6	95	98	95
9	88	89	83
12	77	81	79
24	68	71	67
48	57	54	53
72	47	51	45

第12表 白鼠細胞密度指数

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	82	83	86
6	101	92	67
9	93	86	71
12	89	84	78
24	74	68	65
48	48	51	68
72	30	42	55
96	33	34	42

第13表 海狸細胞密度指数

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	98	85	97
6	93	87	77
9	72	65	70
12	59	61	61
24	59	67	62
48	53	48	52
72	52	43	54
96	51	39	53

第14表 猫細胞密度指数

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	69	43	72
6	69	42	73
9	60	38	62
12	65	42	51
24	55	51	62
48	41	47	43
72	37	46	38
96	35	40	37

第15表 幼若犬細胞密度指数

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	27	29	40
6	39	36	33
9	31	29	22
12	29	31	31
24	29	28	28
48	19	18	21
72	15	19	17

第16表 成熟犬細胞密度指数

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	28	29	27
6	41	31	25
9	35	24	28
12	33	23	27
24	26	20	25

3. 全細胞運動停止時間

成熟犬骨髓細胞が36時間で最も早く運動停止し、蛙が72時間、二十日鼠、幼若犬、鳥類が96時間、白鼠、海狸、猫では何れも120時間であつた。但し鶏にて一例96時間で運動停止が見られず、120時間で

停止を見た。

4. 細胞増生帯に於ける細胞活動の推移

二十日鼠、白鼠、海狸、猫、鶏、鳩等の温血動物では大体同様な傾向を示す。即ち初期（12時間迄）は組織増生盛んにして好中球、偽好酸球（鳥類）最も活発に運動し、中期（48時間迄）では好中球、偽好酸球の運動稍々不活発となり、単球が比較的活発に運動する。末期（48時間以後）になると白血球には変性顆粒、空胞出現し、胞体膨化して遂には運動停止する。又上記動物の培養経過の概略を逐時的に見ると、培養後1時間では増生帯は好中球、偽好酸球が活発に運動し、3時間に至ると好中球、偽好酸球は依然として活発な偽運動をなし、好酸球も次第に活発となり、淋巴球、単球も漸く原組織周辺に出現する。6時間では好中球、偽好酸球は周辺部より中央部にかけて運動し、淋巴球、単球は中心部に未だ存在するが運動は亢進する。12時間に至ると好酸球、淋巴球、単球は中央部近くに進出し、24時間では周辺部の好中球、偽好酸球の運動が稍々不活発となり中央部と同程度になる。48時間では中央部の細胞が周辺部より活発で、淋巴球は殆んど動かなくなり、単球も漸く遊走速度が衰えて来る。72時間以後では中心部の細胞のみが活動し、漸次全細胞が運動停止する。線維芽細胞は鳥類では24～48時間、哺乳類では大体48～72時間で出現が見られ次第に増加する。犬では組織増生、細胞遊走速度は一般に非常に劣り、増生帯周囲は他動物に比し一般に不鮮明である。成熟犬細胞は円形の休止状態にある事が比較的多く、運動状態にある細胞も他動物に見られる様な活発なる形態の変動は余り見られず、扁平な偽足を出し、緩慢に運動するのを僅かに認める程度であり、24時間以後では細胞運動は全く不活発となる。尚線維芽

第17表 鶏細胞密度指数

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	82	74	71
6	59	75	57
9	50	82	48
12	56	63	54
24	52	64	48
48	57	63	53
72	56	61	51

第18表 鳩細胞密度指数

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	63	47	40
6	58	58	61
9	64	67	72
12	59	61	58
24	54	56	46
48	49	51	31
72	35	36	33

第19表 蛙細胞密度指数

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
6時間	15	17	13
9	12	13	11
12	12	14	12
18	19	21	18
24	29	29	30
36	24	26	22
48	20	18	18

第20表 各種動物細胞密度指数（平均値）

動物 時間	二十日鼠	白鼠	海狸	猫	幼若犬	成熟犬	鶏	鳩	蛙
3時間	72.3	83.6	93.3	61.3	32.0	28.0	75.6	50.0	
6	96.0	86.6	85.6	61.3	36.0	32.3	63.6	59.0	15.0
9	86.6	83.3	69.0	53.3	27.3	29.0	60.0	67.6	12.0
12	79.0	83.3	60.3	52.6	30.3	27.6	57.6	59.3	12.6
18									19.3
24	68.6	69.0	62.6	56.0	28.3	23.6	54.6	52.0	29.3
36									24.0
48	54.6	55.6	51.0	43.6	19.3		57.6	43.6	18.6
72	47.6	42.3	49.6	40.3	17.0		56.0	34.6	
96		36.3	47.6	37.3					

細胞は18時間後に出現が認められた。幼若犬は前記哺乳動物と大綱に於て大差ないが、一般に運動は不活発である。

蛙は室温にて放置観察すると、培養後6時間で漸く増生が認められる様になり、当初好中球、好酸球が出現し、単球が少々遅れて出現するが、好中球は9時間頃に最も活発に運動する。12時間に至ると単球も漸く活発となり、18時間を過ぎる頃より細胞の増生帯進出も多くなり、24時間で最も密となり、細胞活動も衰退を見せないが、48時間を過ぎる頃より漸次白血球は変性現象を呈し遊走速度も鈍くなる。線維芽細胞は24~36時間にて出現が認められた。

5. 各種細胞の生態観察（特に運動生態について）

骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球は全動物にて同様な生態を示し、且遊走性を認め得ない。骨髓芽球では核は円形で著明に見え核仁も認められるが、原形質には明瞭な顆粒を認め得ない。前骨髓球は哺乳類、鳥類では時に胞体のブラウン運動様震動乃至は廻転運動が見られる事もあるが、蛙では殆んどこの様な運動は見られない。核は明瞭に見え円形にして位置移動の認められる事がある。骨髓球には固有顆粒が明瞭に認められ分子運動を行い、核は円形で明瞭に見え胞体内を移動し胞体は徐々に変形してゆくが活発なる遊走性は認められない。後骨髓球からは遊走が認められ偽足を形成して運動し、核は殆んど腎臓形を呈して遊走時後進し、原形質顆粒の流動が見られる。好中球、偽好酸球は各動物共最も活発にアメーバ様運動を行い細胞の形状が絶えず変化する。哺乳類好中球では、核は運動時不鮮明で胞体の中心乃至後進部にあり変形しない。原形質顆粒は光輝性に乏しい中等大乃至微細顆粒である。鳥類偽好酸球では顆粒は光輝性の強い粗大で紡錘形乃至類円形を呈し、蛙好中球の原形質顆粒は極微細で光輝性乏しく暗色小斑点として認められる外、哺乳類好中球に同じである。好酸球は全動物共活発に遊走し偽足運動をなし核は後進する。哺乳類好酸球の顆粒は大型で特に光輝性強く、鳥類の顆粒も平等なる大きさを有し偽好酸球より少々小さい。又蛙では粗大球形なる固有顆粒が殆んどで、他に好中球顆粒に相似たる微細顆粒を有し、核は単核乃至多核で遊走時偏在の傾向がある。好塩基球は哺乳類では僅少で出現度も極めて低率な爲詳細な観察に欠ける恨があるが、一般に運動は活発でアメーバ運動をなし、その顆粒は光輝性に乏しく殆んど認められない。鳥類では哺乳

類より出現度僅かに大で、その遊走性は余り活発でなく、原形質顆粒は微細球形で核は単核で境界は明らかでなく遊走時先進する。蛙では中等度に認められ大小種々なものがあり、遊走性は殆んどなく、時に変形運動を呈し、顆粒は紡錘形で光輝性を有し、核は概して大きく境界は不明瞭である。

淋巴球の遊走性は各動物共殆んど同様で、原形質は無顆粒で明徹性あり、爲に円滑に感じられ、核は見え易く遊走時先進し、胞体の輪廓が明らかである。単球の生態も各動物で差異なく、大型で原形質は無顆粒なるも明徹性なく、胞体の輪廓は明らかでなく、培養時間を経過すれば大なる顆粒を生じ胞体内を流動する。その運動は甚だ特有にして鰭足様偽足運動乃至は扁平な偽足を緩やかに出して緩慢に運動し、胞体の変形は著明で、核は遊走時先進する。哺乳類巨核球の運動性については、教室に於て別に詳細に研究されているので私は省略した。絛球では大部分のものに運動は認められないが、一部のものに位置の移動を見る。鳥類、蛙に見られる紡錘状細胞は一般に集在の傾向を示し、軽度乍ら偽足運動が見られる。

6. 好中球、偽好酸球遊走速度の時間的経過

増生帯細胞の機能的方面を示すものとして、骨髓細胞の代表細胞である好中球の遊走速度を計測した。動物個々の遊走速度成績は第21表~第29表に示す如くであるが、更に各々の平均値を求め一括比較して見ると、第30表、第2図の如くなる。温血動物では大体一様に培養後3~6時間にて最高値を示すが、冷血動物（蛙）では9時間である。最大遊走速度は白鼠、猫が高値を示し、以下鶏、海狸、鳩、蛙、幼若犬、二十日鼠の順で僅小の差を以て続くが、成熟犬は4.03で最低値を示し36時間で遊走停止する。全遊走時間は犬、二十日鼠を例外として他の哺乳類では120時間、鳥類96時間（但し鶏にて一例丈120時間

第21表 二十日鼠好中球遊走速度

動物番号 時間	No. 1	No. 2	No. 3
3時間	5.0 μ /m	7.2 μ /m	6.5 μ /m
6	7.9 "	6.4 "	5.3 "
9	8.0 "	5.6 "	4.8 "
12	4.8 "	4.2 "	3.8 "
24	4.1 "	3.4 "	3.1 "
48	3.1 "	2.8 "	2.6 "
72	1.5 "	1.2 "	1.3 "
96	0 "	0 "	0 "

第22表 白鼠好中球遊走速度

動物番号	No. 1	No. 2	No. 3
時間			
3時間	13.3 μ /m	11.2 μ /m	9.8 μ /m
6	9.5 "	10.2 "	8.6 "
9	9.3 "	6.1 "	5.8 "
12	9.0 "	6.7 "	5.2 "
24	5.4 "	4.5 "	4.8 "
48	4.5 "	3.3 "	3.2 "
72	2.6 "	2.8 "	2.2 "
96	1.6 "	1.2 "	0.8 "
120	0 "	0 "	0 "

第23表 海狸好中球遊走速度

動物番号	No. 1	No. 2	No. 3
時間			
3時間	8.1 μ /m	7.9 μ /m	8.4 μ /m
6	6.7 "	6.8 "	6.5 "
9	7.0 "	6.2 "	6.1 "
12	7.3 "	5.8 "	5.3 "
24	6.5 "	5.7 "	5.1 "
48	6.3 "	5.3 "	4.8 "
72	2.8 "	2.9 "	2.3 "
96	0.3 "	0.4 "	0.5 "
120	0 "	0 "	0 "

第24表 猫好中球遊走速度

動物番号	No. 1	No. 2	No. 3
時間			
3時間	13.1 μ /m	9.3 μ /m	8.9 μ /m
6	9.1 "	8.2 "	8.6 "
9	9.0 "	8.1 "	7.9 "
12	8.9 "	7.8 "	7.2 "
24	6.6 "	6.7 "	6.1 "
48	4.0 "	4.7 "	4.1 "
72	3.1 "	2.8 "	2.9 "
96	0.6 "	1.5 "	1.2 "
120	0 "	0 "	0 "

第25表 幼若犬好中球遊走速度

動物番号	No. 1	No. 2	No. 3
時間			
3時間	6.3 μ /m	8.6 μ /m	5.4 μ /m
6	4.7 "	4.6 "	4.1 "
9	3.7 "	4.3 "	3.4 "
12	2.8 "	2.9 "	2.5 "
24	2.5 "	2.6 "	2.3 "
48	1.1 "	1.2 "	1.3 "
72	0.7 "	0.3 "	0.4 "
96	0 "	0 "	0 "

第26表 成熟犬好中球遊走速度

動物番号	No. 1	No. 2	No. 3
時間			
3時間	4.1 μ /m	4.6 μ /m	3.4 μ /m
6	3.3 "	4.1 "	3.1 "
9	3.1 "	3.7 "	2.8 "
12	2.7 "	3.1 "	2.4 "
24	1.2 "	1.3 "	0.9 "
36	0 "	0 "	0 "

第27表 鶏偽好酸球遊走速度

動物番号	No. 1	No. 2	No. 3
時間			
3時間	12.5 μ /m	7.6 μ /m	4.5 μ /m
6	10.2 "	5.9 "	6.1 "
9	9.4 "	5.4 "	6.4 "
12	9.2 "	6.1 "	5.8 "
24	5.0 "	3.6 "	4.2 "
48	5.6 "	2.8 "	4.8 "
72	2.5 "	2.3 "	2.1 "
96	0 "	2.1 "	0 "
120		0 "	

第28表 鳩偽好酸球遊走速度

動物番号	No. 1	No. 2	No. 3
時間			
3時間	11.5 μ /m	7.5 μ /m	3.3 μ /m
6	8.7 "	6.3 "	2.8 "
9	7.3 "	5.8 "	2.1 "
12	6.9 "	4.2 "	2.0 "
24	4.0 "	2.2 "	1.5 "
48	2.5 "	1.8 "	1.4 "
72	1.4 "	1.3 "	1.3 "
96	0 "	0 "	0 "

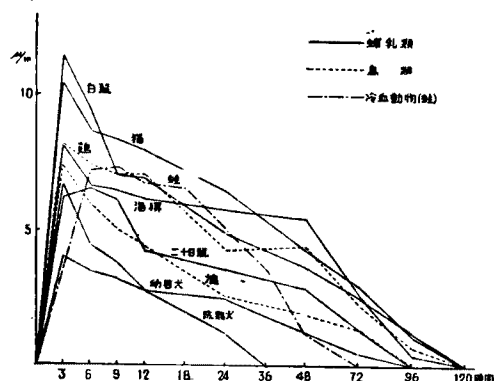
第29表 蛙好中球遊走速度

動物番号	No. 1	No. 2	No. 3
時間			
6時間	5.8 μ /m	5.7 μ /m	10.3 μ /m
9	6.3 "	8.2 "	7.4 "
12	6.6 "	7.0 "	6.7 "
18	7.5 "	6.8 "	5.3 "
24	4.6 "	6.5 "	4.0 "
36	3.5 "	4.0 "	3.1 "
48	1.5 "	1.2 "	1.0 "
72	0 "	0 "	0 "

第30表 各種動物好中球、偽好酸球遊走速度 (平均値)

時 間	動 物	二十日鼠	白 鼠	海 獺	猫	幼若犬	成熟犬	鶏	鳩	蛙
3時間		6.23 μ /m	11.43 μ /m	8.13 μ /m	10.43 μ /m	6.76 μ /m	4.03 μ /m	8.20 μ /m	7.43 μ /m	
6		6.53 "	9.43 "	6.66 "	8.63 "	4.46 "	3.50 "	7.40 "	5.93 "	7.26 μ /m
9		6.13 "	7.06 "	6.43 "	8.33 "	3.80 "	3.20 "	7.06 "	5.06 "	7.30 "
12		4.26 "	6.96 "	6.13 "	7.96 "	2.73 "	2.73 "	7.03 "	4.36 "	6.76 "
18										6.53 "
24		3.53 "	4.90 "	5.76 "	6.46 "	2.46 "	1.13 "	4.26 "	2.56 "	5.03 "
36							0 "			3.53 "
48		2.83 "	3.66 "	5.46 "	4.26 "	1.20 "		4.40 "	1.90 "	1.23 "
72		1.33 "	2.53 "	2.66 "	2.93 "	0.46 "		2.30 "	1.33 "	0 "
96		0 "	1.20 "	0.40 "	1.10 "	0 "		0.70 "	0 "	
120			0 "	0 "	0 "			0 "		

第2図 好中球・偽好酸球遊走速度 (平均値)



遊走) 蛙72時間である。

7. 各種動物血漿の犬骨髓組織培養に及ぼす影響に就いて

前記実験成績に見られる如く、同一条件下に組織培養を試みた哺乳類各動物の中、犬骨髓のみに組織増生、細胞遊走速度の著しい低下が見られたので、或は犬血漿が培養に不適ではないかと疑い、人、家兎、鶏の各血漿を使用して比較実験を試みた。第31表、第3図に示す如く、比較成長価では犬血漿が異

第31表 各種動物血漿使用時の犬比較成長価

血漿種類	犬	人	家 兎	鶏
時間				
3時間	4.55	1.15	0.85	
6	8.22	1.84	1.23	0.54
9	11.00	2.32	2.15	
12	14.33	3.23	2.76	1.32
24	17.66	5.05	4.36	2.15
48	22.16	7.10	6.52	

種血漿使用のものより遙かに高値を示し、又密度指数は第32表に見る如く24時間に於ける数値では鶏血漿にて最大であるが、夫とても前記他動物の密度指数(第20表)に比べると遙かに低値である。又好中球遊走速度は第33表、第4図に見る如く、最大遊走速度は犬血漿が異種血漿使用のものを凌駕する。以上の成績から見ると犬骨髓の組織増生、遊走速度が劣るのは、犬の血漿が犬骨髓組織培養に不適である為ではない事が分る。

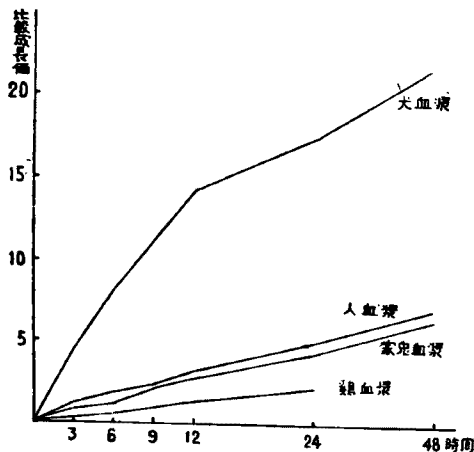
第32表 各種動物血漿使用時の犬細胞密度指数

血漿種類	犬	人	家 兎	鶏
時間				
3時間	29	18	15	
6	36	26	23	16
9	29	23	22	
12	31	20	18	35
24	28	19	20	38
48	18	19		
72	19			

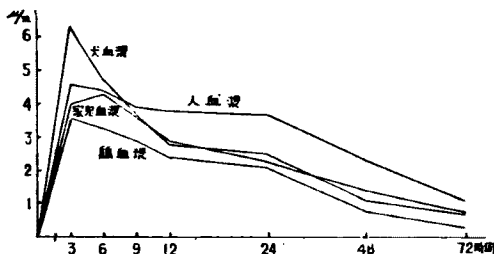
第33表 各種動物血漿使用時の犬好中球遊走速度

血漿種類	犬	人	家 兎	鶏
時間				
3時間	6.3	4.6	4.0	3.6
6	4.7	4.4	4.3	3.3
9	3.7	3.9	3.6	2.9
12	2.8	3.8	2.9	2.4
24	2.5	3.7	2.3	2.1
48	1.1	2.3	1.4	0.8
72	0.7	1.1	0.8	0.3

第3図 各種動物血漿使用時の犬比較成長価



第4図 各種動物血漿使用時の犬好中球遊走速度



第4章 総括並に考察

各種動物の血液の観察はそれ丈で甚だ興味をそよめるものがあり、系統発生立場よりの比較血液学的の研究は従来必ずしも少なくなく、我国でも天野氏¹⁾を中心としてかなり詳細に考究されている。抑々骨髓造血は無尾両棲類(蛙)にて初めて認められ、これ以上の高等脊椎動物に於ては骨髓造血が最も主要な造血臓となるのであるが、私は骨髓培養法を各種の脊椎動物に導入し、動物相互間で組織増生、血球の生態及び機能に異同があるか否かを検討し、以上の実験成績を得た。

先ず増生面積の時間的推移に関しては、白鼠、猫、海狸等の哺乳類では面積増生は72時間に及び、他の動物では殆んど48時間で増生停止が見られ、成熟犬のみ例外で24時間で早くも増生停止が認められた。又比較成長価では白鼠、猫が高値に達し鶏が之に次ぎ、幼若犬、鳩、海狸、二十日鼠の最高値は48~72時間で何れも25前後の数値で大差は認められないが、成熟犬は24時間で6.72、蛙は38時間で僅かに3.22を

示すに過ぎない。この結果より成熟犬、蛙の面積増生が他動物に比較して著しく不良なる事が容易に伺われる。先に教室大藤・亘理¹²⁾は人(胸骨穿刺)家兎(大腿骨々髓)を用いて、正常骨髓培養所見につき詳細な研究を発表したが、面積増生は人の18時間に比して家兎では48時間に及び、且比較成長価は家兎44.65(48時間)、人10.73(18時間)と記載している。私の実験成績と対比して骨髓造血の旺盛である温血動物(哺乳類、鳥類)の中では面積増生は動物の分化の程度に關係を有するとは思われないが、脊椎動物の中で始めて骨髓造血が認められ、且夫が脾造血の移行として出現するとされている無尾両棲類(蛙)骨髓では組織増生は温血動物に比して著しく劣る。

細胞増生密度では犬、蛙が低値を示すが、他動物では何れも24時間で50以上の数値を示した。蛙は組織増生も劣り、細胞密度も低い、之は下等動物なるが故に容易に理解される。犬は幼若犬に於ても比較成長価に比して密度は著しく低値を示す。そこで増生面積及び密度両者を考慮に入れ真の増生値(面積×密度)を見れば、他の温血動物に比して一段と増生不良なる事が伺われる。同一条件下に培養せる犬骨髓のみが、他の温血動物に比し組織増生が非常に劣る事に就ては、教室石田並に柚本も夫々犬を用いての骨髓培養で同様な結果を得ている。

石橋²⁾は犬の臓器(肝臓、腎臓、心臓、脾臓)では同種血漿より寧ろ異種血漿中によく増殖し、且臓器の發育に向つて犬の血漿は最も悪いと述べ、清水³⁾は各種動物血漿の家兎及び海狸胎児組織發育に及ぼす影響について検索し、犬血漿では發育不良なる事を指摘している。之等の研究より見れば犬血漿の使用が組織増生の不良を齎らす事も一応考えられるが、私の犬骨髓に於ける血漿交叉実験では異種血漿よりも犬血漿にて良く發育を見たので、犬骨髓の増生不良を血漿のみに原因を求める事は困難で、その真因は依然として不明であるが、犬に於ては赤色髓が生後比較的急速に黄色髓に換えられる様であり、それが一因をなすとも考えられるが、生後間もない幼若犬に於ては未だ赤色髓を保っているに拘り、かなり成績が劣っているので軽々しく今茲で断ずる事は出来ず、今後の研究に俟たねばならない。

細胞運動停止時間は面積増生と大体平行關係を示し、白鼠、猫、海狸等の哺乳類が120時間で最も長く、成熟犬では36時間で運動停止が見られ、鳥類96時間、冷血動物(蛙)72時間であつた。尚亘理¹²⁾の

成績は人胸骨、家兎骨髓共に120時間である。次に細胞増生帯における細胞活動の推移に就て、温血動物では大藤、亙理¹²⁾の人、家兎所見と殆んど異なる所はない。即ち初期は組織増生盛んで好中球、偽好酸球活発に運動し、中期では好中球、偽好酸球運動少々不活発となり、単球が比較的活発に動き、末期では線維芽細胞次第に増加し、白血球は遊走速度漸次低下し変性に陥り、遂に運動停止する。培養初期の細胞出現に就て Grossmann⁶⁰⁾ は海狸にて偽好酸球、好酸球は4~6時間にて出現すると云い、河島¹⁶⁾ は鶏胎児骨髓で第1時間目に骨髓芽球様細胞及び前骨髓球、骨髓球が出現してアメーバ様運動を営むが、偽好酸球は認められず培養数時間で現われると記載しているが、私の鶏、海狸骨髓培養所見では何れも培養後1時間で増生帯は殆んど好中球、偽好酸球が占め活発に運動する。又海狸骨髓で淋巴球を特に検索した Grossmann⁶⁰⁾ は、培養2日目に淋巴球出現を見ているが、私は海狸骨髓にて培養3時間で既に出現せるを認めた。培養中期より末期にかけての細胞活動推移の大綱は Foot⁵⁸⁾ (鶏)、Grossmann⁶⁰⁾ (海狸) 原³⁵⁾³⁶⁾、河島¹⁶⁾ (鶏) 等が示した所見と略々同様である。線維芽細胞は鳥類では24~48時間、哺乳類では48~72時間で出現を認めたが、Bermann⁴⁸⁾ は海狸で48時間、河島¹⁶⁾ は鶏にて24時間で出現を認めている。幼若犬は前記動物と大差ないが、一般に運動は不活発であり、成熟犬では更に不活発となり線維芽細胞は18時間にて出現を認めた。

蛙では培養後6時間で漸く増生が認められる様になり、好中球活動は9時間で最も活発で、24時間で細胞密度指数は最も大となり、線維芽細胞は24~36時間にて出現し、48時間を過ぎる頃より白血球は変性現象を呈し遊走も鈍くなる。即ち温血動物に比し細胞活動は遅く始まり且早期に衰退する感を抱かせる。

次に骨髓細胞の運動生態に関して、骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球では温血動物で時に廻転運動乃至は中心点の位置移動の見られる事があるが、活発なる遊走性を認め得ない。Grossmann⁶⁰⁾ (海狸)、原³⁵⁾³⁶⁾、河島¹⁶⁾ (鶏) は骨髓培養で骨髓芽球に多少の変形運動を認め、前骨髓球、骨髓球は偽足を出してアメーバ運動を営むと述べているが、教室大藤、亙理¹²⁾ (人、家兎) は此等細胞の活発なる遊走性を否定している。後骨髓球からは全動物にて遊走が見られ偽足を形成して運動し、原形質顆粒の流動が見られ諸家の所見と略々一致する。好中球、偽好酸球は最も活

発にアメーバ運動を行い細胞の形状は絶えず変化する。好酸球も活発なる遊走が見られ、好塩基球は哺乳類に著明な遊走性を認め得るが、鳥類では稍々不活発となり、蛙では僅かに変形運動を呈するのみとなる。尚好中球 (偽好酸球)、好酸球、好塩基球では動物種属により原形質顆粒に異同が認められる。

淋巴球並に単球は各動物で遊走性に差異なく、共に原形質は無顆粒で前者は偽足運動あるも一般に恰も静かな感じの運動をなし、後者は大型でその運動は甚だ特異で蛸足様偽足を緩やかに出し緩慢に運動し胞体の変形は著明である。粒球では一部のものに位置の移動を認め、鳥類、蛙の紡錘状細胞は集在の傾向を示し軽度乍ら偽足運動が見られ、蛙は鳥類に比し運動性が劣る。

動物白血球の運動性については、1世紀以上昔 Wharton Jones によつて「エヒ」で証明されたのが文献上最も古く、Schiling (1908) は白血球の運動を暗視野装置の下に観察したが、彼以後白血球の遊走速度を観察した人は少なく、Comandon⁵³⁾、Jolly⁶⁵⁾ Mc. Cutcheon⁷²⁾、杉山・森²⁷⁾²⁸⁾、Henderson⁶²⁾、Philipsborn⁷⁸⁾、渡辺、植木⁶⁾、山下⁴⁶⁾、小野田¹³⁾¹⁴⁾ 等実に枚挙に遑がなく、各種動物の遊走速度が記載されている。しかし之等は殆んど末梢血によるものであり、骨髓内白血球の運動性に就いては Foot⁵⁸⁾、Grossmann⁶⁰⁾、原³⁵⁾³⁶⁾、河島¹⁶⁾ 等が組織培養法にて観察しているが、遊走速度の記載はなく、坂野²²⁾、井上⁵⁾ の超生体観察による遊走速度が見られるも、何れも疾病時の遊走速度の比較であつて結局正常骨髓細胞の遊走速度については從來不完全であつた。教室亙理¹²⁾ は人、家兎の骨髓培養で始めて白血球遊走速度を時間的経過に従つて記載し一革新を齎したが、私は亙理氏法に則り骨髓細胞の代表白血球たる好中球、偽好酸球遊走速度を各動物に就て算定し、動物相互間の比較を試みた。最大遊走速度を示す時期は温血動物では殆んどが培養後3時間、冷血動物 (蛙) では9時間である。蛙では培養後6時間で漸く増生が認められ、それに附随して細胞遊出も段々活発になる爲、哺乳類に比して上の様な時間的差を生ずると思われる。最大遊走速度を比較して見れば白鼠 (11.43)、猫 (10.43) が高値を示し、以下鶏 (8.20) 海狸 (8.13) 鳩 (7.43) 蛙 (7.30) 幼若犬 (6.76) 二十日鼠 (6.53) と僅小の差を以て続き、成熟犬 (4.03) が最低値を示す。各種動物骨髓にて好中球、偽好酸球遊走速度を系統的に記載せる業績は未だ見出し得ないが末梢血の面で、杉山・

森²⁷⁾²⁸⁾並びに小野田¹³⁾¹⁴⁾は温血動物より冷血動物に至る各種動物にて白血球遊走速度を検索し、好中球遊走速度は一般に動物の分化高きものにて大で、低きものには小で、動物が下等となるに従い遊走速度は減少する傾向を示すと述べている。私の実験成績より各種属動物の最大遊走速度平均値を算出して見ると、哺乳類 $7.885 \mu/m$ 、鳥類 $7.815 \mu/m$ 、冷血動物(蛙) $7.30 \mu/m$ となり杉山・森、小野田の結論と一応一致はするが、末梢血で彼等が認めている如き大差は見られない。しかし好中球、偽好酸球全遊走時間は一・二の例外を除き、哺乳類では120時間で最も長く、鳥類96時間、蛙72時間であるので一般に下等動物になるに従って短くなる傾向が明らかである。以上を更に要約すれば、高等動物より下等動物となるに従って好中球最大遊走速度は僅小の差を認めるに過ぎないが、全遊走時間には明確な差異があり、細胞機能判定に遊走時間は大きな一因をなすものと思われる。

前述せる如く、同一条件下に培養を試みた温血動物の中、犬骨髓のみに組織増生、細胞遊走速度の著しい低下が見られた。培養基として使用される犬血漿の組織発育に及ぼす影響に就いて、Lambert u. Hanes⁵⁹⁾は Rat Sarcoma の発育に対して犬血漿は二十日鼠、海狸血漿に比し著しく劣ると記載し、石橋²⁾は犬血漿は各動物血漿中増生的影響少く、犬の臓器は同種血漿より寧ろ異種血漿中によく増殖すると述べ、清水²⁹⁾は家兎及び海狸胎児組織を各種動物血漿中に培養し、同種血漿が発育に最も秀で人血漿が対照血漿に近き発育度を示すが、犬血漿は哺乳類中で最も発育不良であると報告している。之等の研究業績より犬血漿使用が組織培養に対して当然問題となる様に思われるので、私は補位的実験として同種血漿(犬)並びに異種血漿(人、家兎、家鶏)の犬骨髓培養に及ぼす影響について検討した。

その結果は第3、4図に見る如く組織増生、細胞遊走速度(最大遊走速度)共に同種血漿が優り、異種血漿の中では人血漿が犬血漿に近き値を示した。以上の事実より、骨髓組織培養でも一般に認められている如く、同種血漿の使用が最も適切なる事が容易に推察される所であり、又同時に犬の骨髓培養に

於て組織増生、細胞機能が劣るのは犬血漿使用に基づくものではない事が明確である。従つて犬骨髓培養の成績が劣るのは、前記せる如く犬骨髓自体に原因を求む可きものがあると思われる。

第5章 結 論

哺乳類(二十日鼠、白鼠、海狸、猫、犬)鳥類(鶏、鳩)冷血動物(蛙)の骨髓組織培養により組織増生の経過並びに遊走細胞の観察を行い次の結論を得た。

(1) 増生面積では白鼠、猫、海狸は72時間迄、他の動物では殆んど48時間迄増生するが、成熟犬は24時間で増生停止が見られ、成熟犬、蛙の比較成長価は著しい低値を示す。

(2) 培養後24時間に於ける密度指数を比較すると、犬、蛙が著しい低値を示す外、他動物では何れも50以上の数値が認められる。

(3) 骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球は全動物にて活発なる遊走性を認めず、後骨髓球以後は遊走が見られ好中球、偽好酸球は最も活発なる偽足運動をなす。

(4) 好塩基球は下等動物となるに従つて遊走性は衰えるが、好酸球、淋巴球、単球の遊走性は各動物で著明な差異はない。粒球に位置移動を見、鳥類以下の紡錘状細胞にも軽度の偽足運動が見られる。

(5) 好中球、偽好酸球遊走速度を比較すれば、一般に犬が低値を示す外、各動物間で最大遊走速度に著明な差異を認めないが、遊走時間は一、二の例外を除き一般に下等動物になるに従って短くなる。

(6) 犬骨髓培養に於ける血漿を犬、人、家兎、鶏の各血漿で比較した所、犬血漿使用が比較成長価、好中球遊走速度共に最良の成績を示す。

拙筆するに当り終始御懇篤な御指導御校閲を賜つた恩師平木教授並びに大藤助教に深甚なる謝意を表します。

(本論文の要旨は昭和31年日本血液学会第18回総会に於て発表した)

(文献後掲)

Tissue Culture of the Bone Marrow in Various Animals

Part 1.

Observations on Tissue Growth and Wandering Cells

By

Taizo Suenaga

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

By conducting a series of tissue culture with bone marrow obtained from mammals (mice, albino rats, guinea pigs, cats and dogs), birds (chicken and pigeons), and cold blooded animals (frogs) the author studies the rate of tissue growth and wandering cells, and obtained the following results.

1) As for the growth area, the explant in culture grows up to 72 hours in the cases of albino rats, guinea pigs and cats, while in the case of other animals the growth continues almost up to 48 hours. However, in the case of mature dogs the growth ceases within 24 hours, and the relative growth in the cases of mature dogs and frogs presents a marked decrease.

2) In comparing the index of the cell density at the 24-hour culture, it is markedly lower in the cases of dogs and frogs, whereas in other animals it is over 50.

3) Myeloblasts, promyelocytes and myelocytes of all these animals have no active wandering capacity, and at the stages of maturation later than metamyelocytes cells show the wandering capacity. Neutrophils and pseudo-eosinophils show the most active pseudopoid movement.

4) As for the wandering capacity of basophilocytes, the lower the species of animals the poorer is their wandering capacity. However, as for the wandering capacity of eosinophils, lymphocytes and monocytes no marked difference in the wandering capacity can be observed among different animals. Motility of thrombocytes can be observed and moreover, even in species lower than birds, a slight pseudopoid movement of spindle cells can be recognized.

5) Comparing the wandering velocity of neutrophils and pseudo-eosinophils of various animals, with exception of dogs that show generally a decrease, no marked difference in the maximum wandering velocity among them. As for the duration of wandering, with one or two exceptions, generally the lower the species the shorter is the duration.

6) In comparing various plasma such as those of dog, man, rabbit and chicken as the medium for bone marrow culture of the dog, dog plasma gives the best relative-growth value as well as the highest wandering velocity of neutrophils.
