

家兎骨髓組織培養に於ける物理化学的要因の 偽好酸球運動能に及ぼす影響

第 一 編

培 養 温 度 の 影 響

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木 潔教授）

専攻生 高 橋 山 郎

〔昭和33年7月12日受稿〕

内 容 目 次

第I章 緒 言	
第II章 実験材料並に実験方法	
第1節 実験材料	
第2節 実験方法	
第3節 観察方法	
第III章 実験成績	
第1節 遊走速度	

第2節 運動形態	
第3節 偽足形態	
第4節 尾の形態	
第5節 長短径比による分類	
第IV章 総括並に考按	
第V章 結 論	

第I章 緒 言

体外組織培養は1907年に Harrison⁴⁾ が蛙の神経の培養に成功して後、Carrel & Burrows³¹⁾(32)(33) により今日の固形培養法が確立され、Fischer³⁷⁾(38)、Osgood & Brownlee⁴⁷⁾、木村⁷⁾等により長足の進歩を遂げ、各方面に広く応用されるようになった。

組織培養は人工的に生命を存続させ得る条件のもとに、組織を体外に於て生活、育成させるもので、従つてその發育は種々なる物理化学的要因により左右される筈である。就中温度の影響は古くから研究された問題である。

即ち、Lambert & Hanes⁴³⁾ は家鶏組織の増殖に対する最適温度は36°~39°Cであり、發育速度は温度に比例するという。根本²²⁾は5°~45°Cの間の6種の温度で線維芽細胞の發育を検し、39°C が最も高く30°C がこれに次ぎ45°C が最少で、20°、12°、5°C では全く細胞の發育がないと述べている。

又、白血球に対する温度の影響について甲賀¹⁰⁾ は海狗白血球で実験し、30°~41°Cの間で活発に遊走し、13.4°C以下及び43°C以上では遊走を認めていない。江川¹⁾ は家兎偽好酸球の墨粒貪喰能と温度の関係について実験し、最高貪喰能を示す温度は

40°Cで、55°Cでは全く貪喰像を認めていない。千田等¹⁵⁾(18) は人の末梢血の超生体観察で、媒質の理化学的要因と白血球の運動との関係の詳細な研究を行っている。しかしながら骨髓組織培養により、白血球の運動能と温度との関係の研究は未だなされていない。

最近、教室の大藤、亘理²⁾ 等が患者骨髓を体外に於て培養観察した実験を契機として、その基礎的方面、並びに臨床的方面の發展はすばらしいものがある。先に大藤、亘理³⁾ は培養組織の増生及び遊走細胞の観察を行い、津島⁴⁾(20) は温度と骨髓組織増生への影響を観察した。私は家兎骨髓組織培養により、温度が偽好酸球の遊走速度、並に形態学的に運動能に及ぼす影響を観察し、聊か興味ある知見を得たので茲に報告する。

第II章 実験材料並に実験方法

第1節 実験材料

1) 培養組織：家兎大腿骨骨髓組織を使用した。体重1.2~1.7 kgの健康家兎を、空気栓塞により殺して出来るだけ早く大腿骨骨髓を取出し、リンゲル氏液にて洗滌し眼科用グレーフェ刀で約1 mm³の小片に細切して、これを培養材料とした。

2) 培地支持体: 家兎のヘパリン加血漿を使用した, 本実験に使用する家兎の心臓穿刺により血液を採取し, ヘパリンの生理的食塩水溶液とを混じ, 遠心沈澱して分離した血漿を使用した。

3) 発育促進物質: 9日目孵化鶏卵より胎児を取出し, Fischer 氏の考案せる圧搾器を使用して圧搾し, 遠心沈澱して得た上清液を使用した。

第2節 実験方法

1) 培養術式: 被覆培養法を用いた。大型被覆硝子の中央にヘパリン加血漿1滴を滴下し, 硝子棒にて円形に拡げ, その中央に骨髓細片を置く, 次に鶏胎圧搾液を1滴滴下し硝子棒にて血漿とよく混和せしめる。一方, 凹窩載物硝子の凹窩部の周囲にパラフィンワセリンの堤を作り, 前述の培養被覆硝子面に逆に置き, 培地が凝固完了するまで孵卵器中に入れ, その後にパラフィンにて充分に封鎖し孵卵器中で培養した。

2) 培養温度: $10^{\circ}\sim 45^{\circ}\text{C}$ の間を, 30°C 以下は 5°C , 37°C 以上は 2°C の間隔で区分して, 実験の開始よりこの温度を保持して行つた。又同時に 37°C の実験も行い, これを対照とした。

第3節 観察方法

顕微鏡を保溫箱に入れ所定の温度に調節し, 光源による標本の温度上昇を防ぐために断熱フィルターを使用して, 原則として増生帯中間部の偽好酸球について以下述べる遊走速度, 運動形態, 偽足形態, 尾形態及び長短径比による分類により観察した。

1) 遊走速度: Abbe 氏描画装置を使用して, 細胞重心点の軌跡を30秒毎に求め2分間観察した。その軌跡をキュルビメーターを使用し計測して, 倍率により換算して実数値を求め1分間の遊走距離を以つて速度とした。

2) 運動形態: 平木, 大藤³⁾⁵⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾の提唱する分類法(第1図)により観察した。即ちA型~I型の9型。

A型: 舌状, 鋸歯状偽足を急速に出し細胞主体前進期に細胞長径が短径の3倍以上に達するもので, 偽足の単一なるものをA₁型とし, 偽足の分岐するものをA₂型, 又尾部の極端に伸展され細胞直径の2倍以上に達するものをA₃型とする。

B型: 舌状, 鋸歯状偽足を急速に出し細胞主体前進期に長径が短径の3倍以下のもので, 偽足の単一なるものをB₁型とし, 偽足の分岐するものをB₂型とする。

第1図 運動形態の分類

型	運動推移 →
A	1
	2
	3
B	1
	2
C	
D	
E	
F	
G	
H	
I	

C型: 細胞主体前進期と尾部収縮期が同時に行われ, 前進時胞体の伸縮が見られず, 運動周期が明確でないもの。

D型: 旗状, 触手状偽足並に突起を細胞四囲より出し, その中の一偽足が肥大し胞体が入り込んで前進行するもの。

E型: B型より更に小なる舌状, 鋸歯状偽足を緩慢に出し, 細胞主体前進期, 尾部収縮期も緩慢に行われる型。

F型: 気泡状偽足が1~数ヶ出沒し, その中の1偽足の方向に前進する型。

G型: 胞体がブラウン様の振盪状運動を行い, 偽足形成のないもの。

H型: 胞体の中心部を中心にして回転運動を行う型で偽足形成はない。

I型: 胞体の軽度の変形を見るのみで偽足形成はない。

3) 偽足形態: 平木, 大藤³⁾⁵⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾の提唱する分類法(第2図)により観察した。即ち次の5型である。

舌状偽足: 巾広く厚味のある舌状の偽足

鋸歯状偽足: 巾広く前縁の鋸歯状の偽足

旗状偽足: 波状運動をなす薄い膜状偽足

気泡状偽足: 小球状の突起様偽足

触手状偽足: 尖鋭なる細き触手状の偽足

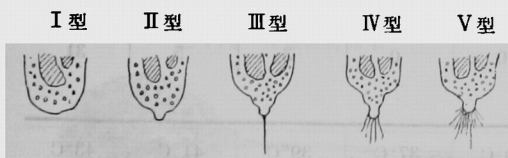
第2図 偽足の分類



4) 尾形態：千田¹⁷⁾の提唱する分類法(第3図)により観察した。即ち次の5型である。

- I型：尾のないもの
- II型：膨隆のみあるもの
- III型：膨隆と1～3本の偽鞭毛のあるもの
- IV型：偽鞭毛の数～10本前後のもの
- V型：偽鞭毛の10数本～数10本のもの

第3図 尾形態の分類



5) 長短径比による運動形分類：栗原⁸⁾⁹⁾の分類法を変更した大藤、亘理の提唱する分類法により観察した。即ち 長径/短径 $\times 10$ により15以下をI型、20以下をII型、26以下をIII型、26以上をIV型とする。

以上1実験の各時間に20個の偽好酸球を観察して、5回の実験を行い計100個の観察を行つた。

第III章 実験成績

第1節 遊走速度

各温度に於て偽好酸球の運動停止に至るまでの遊走速度を測定し、その成績は第1表に示す通りである。

運動が認められた温度の範囲は最低15°C、最高43°Cであつた。又遊走の認められた期間は15°C 168時間、20°C 144時間、30°C 120時間、37°C 96時間、39°C 72時間、41°C 24時間、43°C 6時間であり、高温ほど早期に運動は停止し、低温になるに従つて生存期間が延長している。

最高遊走速度を示したのは39°Cの3、6時間で以後急速に低下している。各温度に於いての最高遊走速度を示す時間は、15°C 48時間、20°C 24時間、25°C 30°C 12時間、33°C 6時間、37°C以上では3時間であり、最高遊走速度を示す時間は高温ほど早期に、低温になるに従つておくれている。

第2節 運動形態

偽好酸球の運動形態を前述の平木、大藤の分類法に従いA型～I型の9型に分類観察して、第2表の如き結果を得た。

A型は一般にB型に次で多数に見られる型であるが、低温15°Cでは全く見られず、43°Cでは僅かに認められたに過ぎない。B型は25°C、30°C、37°Cでは半数以上を占め、37°Cに於て最高値を示しており、低温、高温では減少している。C型は15°Cに

第1表 各温度に於ける偽好酸球遊走速度(単位 μ)

時 間 温 度	時間 3	6	12	24	48	72	96	120	144	168	192
15°C	0	1.33	1.42	2.13	2.27	1.37	1.13	0.73	0.43	0.22	0
20	2.05	2.65	3.04	3.45	2.65	2.63	1.95	1.76	0.53	0	
25	4.93	5.06	5.15	3.94	3.13	2.74	1.32	0.42	0.43	0	
30	7.45	6.26	7.66	5.80	4.31	2.28	1.64	0.76	0		
33	8.13	8.24	7.05	4.18	3.61	2.53	1.33	0.70	0		
37	11.02	9.16	6.32	5.31	3.40	1.85	0.59	0			
39	11.67	9.53	3.48	2.95	2.83	1.48	0				
41	5.15	4.43	3.22	1.25	0						
43	1.33	0.62	0								

(a) 培養後3時間 第2表 各温度に於ける運動形態百分率

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
A ₁	/	8	10	11	12.5	24	15	0
A ₂	/	6	5	8	5.4	5	5	0
A ₃	/	0	0	3	4.5	9	4	2
B ₁	/	32	35	38	42.9	28	32	11
B ₂	/	25	23	21	24.1	22	15	8
C	/	17	17	12	4.5	12	12	5
D	/	0	0	0	0	0	0	0
E	/	9	7	5	3.6	0	1	7
F	/	0	0	0	0	0	5	32
G	/	0	0	0	0.8	0	0	0
H	/	2	1	1	1.7	0	0	0
I	/	1	2	1	0	0	9	13
その他	/	0	0	0	0	0	2	22

(b) 培養後6時間

形 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
A ₁	0	17	22	23	25.8	29	25	0
A ₂	0	7	3	5	7.5	12	3	0
A ₃	0	0	0	1	2.3	2	0	2
B ₁	16	23	25	28	33.2	23	29	3
B ₂	12	18	21	25	23.7	22	19	6
C	60	23	19	10	7.5	4	10	22
D	0	0	0	0	0	0	4	0
E	2	7	6	3	0	2	5	5
F	0	0	0	0	0	4	0	17
G	1	0	0	1	0	0	0	0
H	1	3	0	1	0	0	0	0
I	8	2	4	3	0	0	0	14
その他	0	0	0	0	0	3	5	31

(c) 培養後12時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
A ₁	0	9	12	16	19.1	31	3	/
A ₂	0	3	3	0	0	5	1	/
A ₃	0	0	0	0	0	3	0	/
B ₁	24	35	39	39	52.3	32	37	/
B ₂	16	21	25	23	21.4	15	10	/
C	48	18	12	15	4.8	10	24	/
D	0	0	0	0	0	0	5	/
E	4	8	6	3	2.4	0	5	/
F	4	0	0	0	0	2	4	/
G	0	0	0	0	0	0	0	/
H	2	2	1	1	0	0	1	/
I	2	4	2	3	0	0	2	/
その他	0	0	0	0	0	2	8	/

(d) 培養後24時間

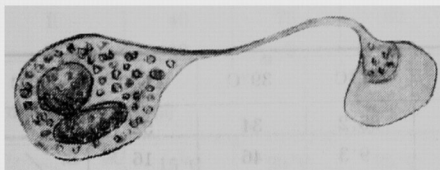
型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
A ₁	0	13	7	18	16.3	12	8	/
A ₂	0	9	4	2	4.7	8	2	/
A ₃	0	0	2	1	0.4	0	0	/
B ₁	19	32	33	40	44.5	24	22	/
B ₂	16	13	15	13	12.2	18	7	/
C	48	25	28	19	15.3	12	25	/
D	0	0	0	0	0	2	0	/
E	6	5	4	5	4.1	12	7	/
F	4	0	0	0	0	4	5	/
G	0	0	0	0	0.6	0	0	/
H	6	1	2	0	0.3	2	3	/
I	1	2	5	2	1.6	0	8	/
その他	0	0	0	0	0	6	13	/

於て最高値を示し、6時間目には60%の高率であり、高温になるに従つて減少し、37°Cでは最低となり、それ以上高温になるとやゝ増加している。F型は43°Cに於ては約1/3の多数に見られ、他の場合にも少数は見られるが低温には少ない。G、H型は共に少数であるが低温にやゝ多い傾向がある。I型は低温の初期及び機能減弱して、死亡する前に増加している。以上機能旺盛時にはA、B型が多く、機能が低下するとC型以下の形態が多い。

又温度の変化により一時期に次のような特異な形態を示すものが見られた。

高温時の特異型は、運動を観察し得た最高温度の43°Cにのみ見られた形態で、第4図に示した如く、

第4図 高温時特異型

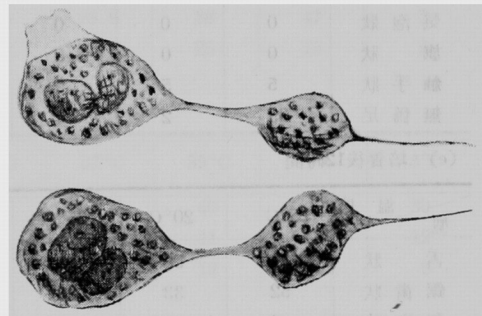


ほとんどの細胞の一部より円形の偽足を生じ、その基部がくびれ細くなり伸展して垂鈴状となる。前臈大部は緩慢に伸縮又は左右に運動するが、細胞主体即ち後臈大部の移動は見られず、又核の前臈大部へ

の移動は見られない。時間を経過すると、前臈大部は中間の細い部分が徐々に短縮して、次第に後臈大部に合体されて、再び原形の円形の細胞に復する。前臈大部の偽足には少数の顆粒が見られるが、広い透明なる部により占められている。

低温時の特異型は第5図に示す如く、高温時のそ

第5図 低温時特異型



れとはほぼ同様の形態を示す。しかし高温時のものと相違点は、透明なる偽足の部分は狭小であるか時には全く認められないこともあり、前臈大部に後臈大部から顆粒、核が徐々に流動し、後臈大部は縮小し遂には消失して円形の細胞となることである。又この特異形には尾糸を生じていることが多く、15°Cの120時間頃に多く見られた。

第3節 偽足形態

前述の平木、大藤の偽足形態分類法による5型に、偽足の認められない無偽足を追加して6型に分類し観察した。

偽足は細胞の一運動周期の時期により変化するこ

とがあるが、主体前進期の形態をその細胞の偽足形態として分類し、第3表及び第6図の如き成績を得た。

舌状、鋸歯状偽足が大部分を占めているが、細胞機能が低下すると気泡状、旗状、触手状及び無偽足が増加している。即ち気泡状偽足は43°Cの場合に特に著明に出現しており、旗状偽足も高温側に多い傾向があり、又無偽足は高温、低温の両端に多く見られている。一方遊走速度の大なる細胞には舌

状、鋸歯状偽足を示すものが多い。

第4節 尾形態

偽好酸球の尾の形態を、前述した千田の提唱せる分類により5型に分類し観察した。それによるとI、II型が大部分を占めており、III型は少なくIV型は極めて稀に認められるに過ぎず、V型は全く見られなかった。

各時間の各温度に於ける尾形態百分率は、第4表及び第7図に示す通りである。

第3表 各温度に於ける偽足形態百分率

(a) 培養後3時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
舌 状	/	57	53	56	52.9	35	31	20
鋸 歯 状	/	33	38	37	41.2	53	34	24
気 泡 状	/	0	0	0	0	0	0	32
旗 状	/	0	0	0	0	0	0	0
触 手 状	/	7	3	5	1.8	4	23	0
無 偽 足	/	3	6	2	4.1	8	7	24

(b) 培養後6時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
舌 状	9	64	52	48	44.8	48	45	30
鋸 歯 状	53	29	35	42	48.3	46	40	33
気 泡 状	0	0	0	0	0	4	0	17
旗 状	0	0	0	0	0	0	4	0
触 手 状	5	5	9	3	4.6	1	5	0
無 偽 足	33	2	4	7	2.3	1	6	20

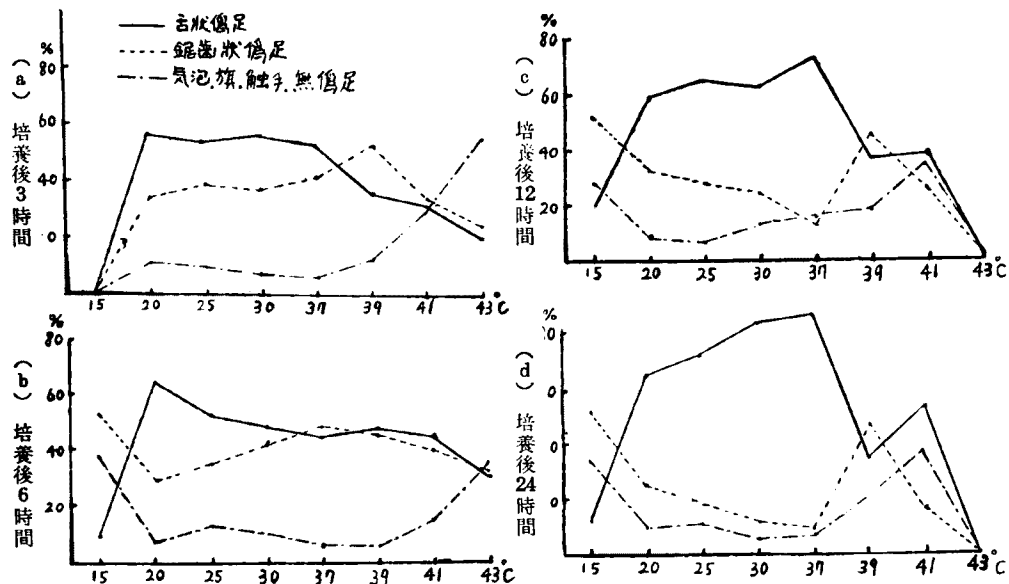
(c) 培養後12時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
舌 状	20	58	65	62	72.3	37	39	/
鋸 歯 状	52	33	28	25	12.5	45	26	/
気 泡 状	4	0	0	0	0	2	4	/
旗 状	0	0	0	0	0	0	5	/
触 手 率	0	6	2	5	8.6	13	16	/
無 偽 足	24	3	5	8	6.6	3	10	/

(b) 培養後24時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
舌 状	12	65	72	84	85.2	34	52	/
鋸 歯 状	52	25	18	11	9.3	46	16	/
気 泡 状	4	0	0	0	0	4	5	/
旗 状	0	0	0	0	0	2	0	/
触 手 状	0	2	3	2	3.1	6	24	/
無 偽 足	21	8	7	3	2.4	8	8	/

第6図 各温度に於ける偽足形態百分率



第4表 各温度に於ける尾形態百分率

(a) 培養後3時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
I	/	53	41	40	27.5	37	38	92
II	/	47	59	49	58.6	38	47	3
III	/	0	0	11	13.9	25	15	5

(b) 培養後6時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
I	40	14	32	36	38.8	40	41	80
II	16	86	65	56	46.7	41	48	12
III	44	0	3	8	14.5	19	11	8

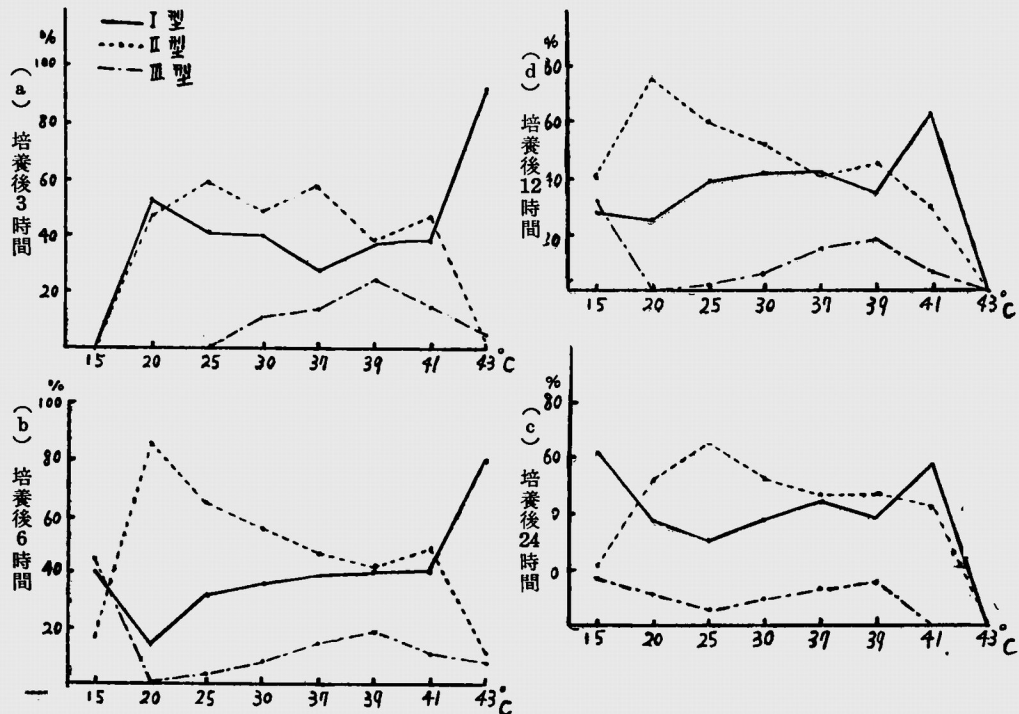
(c) 培養後12時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
I	28	25	39	42	42.7	35	63	/
II	40	75	60	52	42.4	46	30	/
III	32	0	1	6	14.9	19	7	/

(d) 培養後24時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
I	62	37	30	38	44.2	38	57	/
II	21	52	65	52	42.5	46	43	/
III	17	11	5	10	13.3	16	0	/

第7図 各温度に於ける尾形態百分率



培養後3時間目に於ては、I型は20°Cで約半数を占め、高温になるに従つて減少し37°Cでは最低値を示し、更に高温になると増加しており、最高温度の43°Cでは90%以上がI型で占められている。II型は20°Cより37°Cまでは大体一様に50%前後に見られ、39°C、41°Cではやや減少し43°Cでは極めて少い。III型は少数で20°C、25°Cでは見られず39°Cを頂点とする山形を示す。

培養後6時間では、I型は15°Cより41°Cまでは30~40%に見られるが、43°Cでは80%の多数に見られている。II型は15°Cでは少いが、20°Cで極端に増加しており、又温度の上昇と共に徐々に減少し、37°C、39°Cで約半数となり、43°Cでは急激に減少している。第8図に示す如きIII型が15°Cに於て多数に見られたことは注目すべき事である。

培養後12時間では6時間の成績とはほぼ同様であるが、15°CではI、III型が減少しII型は増加している。43°Cではすでに総ての細胞が死滅している。

培養後24時間では12時間の成績と比較するとI型は15°C、20°Cで増加し、III型は15°Cで減少、20~30°Cでやや増加している。

以上の様に一般に各温度を通じてI、II型が多数を占め、III型は少なく、高温、低温の両端では特異

な比率を示している。又15°Cの6、12時間に於て、多数のIII型の認められたことは特筆すべきことである。

第8図 低温(15°C)に出現した尾糸を有する細胞



第5節 長短径比による分類

前述した様に、栗原の分類法を変更した大藤、亘理の提唱する分類法により、偽好酸球を4型に分類し観察した。その成績は第5表及び第9図に示す通りである。

37°C以上では、時間の経過と共に、又高温ほどI、II型が増加しIII、IV型は減少しており、43°CではI型が大部分を占めII、III型は少なく、IV型は

第 5 表 各温度に於ける長短径比による分類

(a) 培養後3時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
I	/	16	10	8	6.6	3	17	70
II	/	34	25	16	11.0	14	20	16
III	/	33	37	31	33.0	28	29	8
IV	/	21	28	45	49.4	55	34	6

(b) 培養後6時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
I	22	12	10	8	4.0	9	24	67
II	37	23	20	18	14.0	20	25	10
III	34	31	33	32	26.5	20	25	11
IV	7	34	37	42	55.5	51	26	2

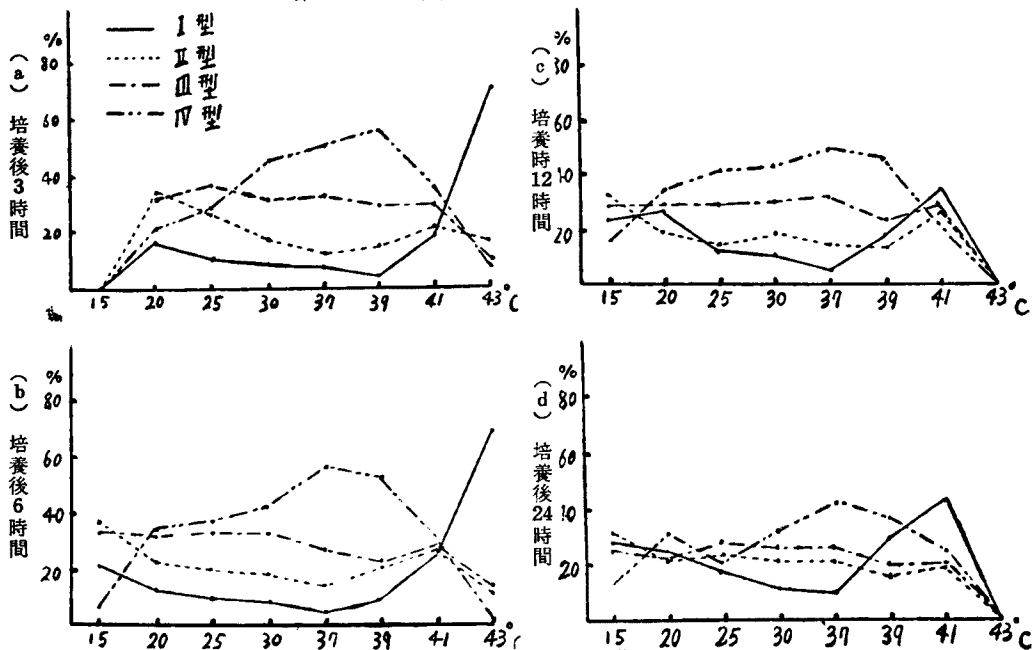
(c) 培養後12時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
I	24	28	12	10	4.2	17	33	/
II	32	20	12	18	15.7	14	26	/
III	28	28	29	30	31.0	23	28	/
IV	16	34	41	42	49.1	46	21	/

(d) 培養後24時間

型 \ 温度	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	39°C	41°C	43°C
I	29	25	18	11	9.9	29	43	/
II	31	21	24	21	20.7	16	19	/
III	26	24	27	26	26.0	19	20	/
IV	13	30	21	32	41.4	36	24	/

第 9 図 各温度に於ける長短径比による分類



稀に認められるに過ぎない。39°Cの3時間では、37°Cの同時間よりI型は少なくIV型が多いが、これは温度の刺激により機能が亢進している状態と考えられる。

37°C以下では、30°Cと37°Cは各型の比率はほぼ同様であるが、低温になるに従ってI型は増加し、IV型は減少している。時間の経過では前述した高温時の場合ほど著明な変化は見られなかった。

第IV章 総括並に考按

私は被覆法によつて家兎骨髓体外組織培養を行い、温度の偽好酸球運動能に及ぼす影響を観察した。

偽好酸球の運動を観察し得たのは15°Cより43°Cの間であつた。低温10°, 12°Cでは増生及び細胞運動は見られず、15°Cの6時間目より僅かに増生が見られ、細胞運動が観察された。高温の45°Cでは全く増生及び細胞運動は見られず、41°, 43°Cでは増生は見られないが、培養時に培養組織周辺に流出した少数の細胞の運動が観察された。最高遊走速度を示すのは39°Cであり、6時間までは他の何れの場合より優位を見、その後急激に低下している。又各温度に於て最高遊走速度を示す時間は、15°Cでは48時間、20°C24時間、25°C、30°C12時間、33°C6時間、37°C以上は3時間と高温になるに従つて、早期に最高遊走速度を示し、低温になるほど最高遊走速度を示す時間が遅れ、又生存期間も延長されている。

体外組織培養はHarrison⁽⁴⁾により最初の成功を見、その後多くの学者により研究されているが、その当初より培養温度は問題になっており、一般に37°~38°Cが至適温度とされて採用されている。然しながら骨髓体外組織培養に於て温度の運動能に及ぼす影響に関する系統的な研究は見られない。

教室津島⁽⁴⁾⁽²⁰⁾は家兎骨髓体外組織培養を行い、3°~37°Cについてカレル壔法により組織増生を観察し、又33°~41°Cについて被覆法により組織増生及び偽好酸球遊走速度を観察して、増生を示す範囲を最低12°C、最高39°という結果を報告している。即ちその範囲は私の実験成績の偽好酸球の運動を観察し得た範囲(最低15°C、最高43°C)とやや異なっている。その理由としては、低温の相異は津島はカレル壔法、私は被覆法と実験方法の差異であろうと考えられ、高温の場合は、増生を認めた限界(39°C)は津島も私も同様であるが、私は更に培養時に原組織周辺に流出した少数の細胞の運動を観察

したためであると考えられる(津島の研究は組織増生の観察が主目的であり、私の研究は細胞運動の観察が主目的である)。

千田⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾は、人の末梢血好中球の走化性と温度との関係について研究し、走化性を見る最低温度は15°C、最高温度55°Cとし、走化性の最も旺盛なのは37°~40°Cとしている。最低温度は私の成績と一致しているが、かなり高温に於ても観察しているのは、氏の方法は培養ではなく短時間内の観察のためであらう。

根本は線維芽細胞を被覆培養法を用いて5°~45°Cにて培養し、最大生存期間は45°C5日、39°C11日、30°C20日、20°C14日、12°C11日、5°C8日であるが、20°C及びそれ以下ではその発育は見られず、又30°C以上では低温ほど生存期間が延びている結果を報告している。Lambert u. Hanes⁽⁴³⁾の鶏胎児心臓及び腸管組織の培養に於ける結果によると、増生を示す範囲は最低26°C、最高44°Cであり、運動の認められる期間は高温より低温の場合の方が長期であるという。このように根本及びLambert u. Hanesの実験成績では、実験材料が異つても低温ほど生存期間が延長している点は一致しているが、私の実験では更に低温で成功している。

次にPhilipsborn⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾は湿潤薄層標本で人好中球の自由運動を観察し、5型に分類した。これが白血球の運動形態を分類した最初の報告である。本邦では栗原⁽⁸⁾⁽⁹⁾が人末梢白血球を瞬間的に過熱固定した後に染色し、固定された好中球の長径と短径の比を以て7型に分類した。そして各々の型に一定の数値を与え、所謂運動型値法を提唱している。又近年千田⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾は人末梢血について白血球運動形態を5型に分類し、同時に阪尾、米田、村上等によつて温度の運動形態に及ぼす影響が報告されている。

さて私の観察では高温の場合(39°C、41°C)の比較的初期には、顆粒運動が極めて活発で、原形質が明るく透明であることから、原形質の粘稠度の低下が考えられる。このことは千田、阪尾⁽¹⁸⁾等及びBessis⁽³⁰⁾もほぼ同様のことを報告している。次に運動形態百分率ではA、B型は15°Cより37°C、39°Cに至るまで増加し、更に高温になると減少している。A型の占める率は39°Cが最も多く(特に培養12時間まで著明)、B型は24時間まで常に37°Cが最高値を示している。C型以下はA、B型と逆に低温より37°Cに至るまで、温度の上昇と共に減少し、更に高温になると急激に増加している。以上の

ような 39°C 初期の A 型の増加と、前述の遊走速度の 39°C 初期の亢進とを考え合せると、 39°C では特別の刺激状態であり、 37°C が運動形態からみて運動能に対する至適温度であろうと考えられる。なお 43°C に於て F 型が著明に多く認められておるが、この現象は高温時の特長であるといえる。又高温及び低温に類似した特異型が認められた。即ち高温の場合は 43°C のみに見られた型で、細胞より円形の偽足を生じ、その基部がくびれ細く伸展し垂鈴状となり、前脛大部は伸縮又左右に運動するが、後脛大部は移動せず、時間を経過すると前脛大部は徐々に後脛大部に合体し、決して後脛大部が前脛大部に合流し前進することはない。低温では 15°C の 120 時間以後に見られた型で、高温のそれとは同様の垂鈴状を示すが、偽足の透明部は狭く、顆粒、核は次第に前脛大部に移動して、前脛大部は膨大し後脛大部は縮少し細胞は前進する。このように高温、低温共に類似の垂鈴状の特異型が認められたことは極めて興味深いことと思われる。

次に偽足の分類を行つたのは教室平木、大藤⁵⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾ の報告が唯一で、私もこの分類により温度の影響を観察した。温度の変化に関わらず一般に舌状及び鋸歯状偽足が大部分を占めているが、 15°C 及び 41°C 、 43°C では減少している傾向が見られた。気泡状偽足は 43°C に特に著明に出現し高温時の特長と考えられる。旗状偽足は少数ではあるが高温時に多い傾向があり、触手状偽足も高温側に多くなる傾向がある。無偽足は高温、低温の両端に多く認められている。以上のことより、前述した遊走速度及び運動形態とを考え合せると、運動機能が旺盛な時は舌状及び鋸歯状偽足を示し、反対に気泡状、旗状、触手状及び無偽足を示す細胞は、運動機能が低いことが了解される。

Wallgren⁵⁴⁾ は運動しつつある好中球を観察して、尾部に膨隆部がありこれより糸状物を発生しているのを認めた。栗原もこれを認め両者を総称して尾と名付けた。近年千田は人末梢血好中球及び好酸球について詳細に観察し、好中球の尾を 5 型に分類し、更に運動機能との相関を認めて、運動機能の低いものには尾を認めず、運動機能の高いものに高度に発達すると発表している。所が平木教授及び大藤は、尾は遊走性の高い細胞の遊走機能が或程度低下した時発生するもので、好中球、好酸球が一定時間後或程度遊走機能が低下してきた場合、粘着能は全然衰えないか寧ろ上昇するので、運動機能と粘着能との

間に不均衡を生じ、頭部と尾部の間の運動エネルギーの不均衡を招来し、これが特有の尾の形で表現されるのではないかと報告している。

さて私は千田の分類法に従い、温度の尾形態に及ぼす影響を観察した。その成績では、 15°C より 43°C に至るまで一般に I、II 型が大部分を占め、III 型は少なく IV 型は極く稀に見られるに過ぎず、V 型は全く認められなかつた。III 型は A、B、C 型の一部のものに見られ D 型以下には認められず、 37°C 、 39°C 及び 41°C の初期に比較的多数に出現し、 37°C 、 39°C では 24 時間まではほぼ同数に見られている。特記すべきことは 15°C の初期に多数の III 型が出現し、その尾糸は多くは 1 本で他のそれより長く、又時間の経過と共に減少していることである。以上のように運動機能の極めて低い高温 41°C 、又低温 15°C の場合に特に多数の III 型が認められており、このことは尾は運動機能の高い細胞ほど高度に発達するという千田の記載と反し、一方教室平木教授、大藤の所説を温度の面から立証したものといえよう。千田の記載の誤りはもとより氏の方法が培養法でないため、初期より細胞機能の低下があることに基因すると思われる。

次に長、短径比による分類については、前述したように栗原は、好中球の長径と短径の比によつて運動形を分類して、その各々に数値を与え疾病の診断、予後に利用している。教室平木、大藤⁵⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾ は栗原の分類法を変更して 4 型に分類している。私もこの分類法により温度の影響を観察した。即ち 39°C 以上では時間の経過と共に、又高温になるに従つて著明に I、II 型が増加し、III、IV 型は減少している。 25°C 以下では低温ほど I 型が増加して IV 型は減少している。 30°C 、 37°C では IV 型がほぼ半数を占め、III、IV 型で大部分を占めており I、II 型は少ない。そして時間の経過により I、II 型の増加が見られる。このように 37°C 前後を中心として、低温及び高温になるに従つて長短径比の小なるものが増加することより、前述した遊走速度とを考え合せると、平木教授及び大藤²⁵⁾²⁶⁾ のいう遊走速度と長短径比はほぼ正の相関関係にあるということが、温度の影響の場合にも適用されることが明らかである。

第 V 章 結 論

被覆法による家兎骨髄組織培養に於いて、各温度の偽好酸球運動能に及ぼす影響を観察して、次のような結論を得た。

1) 運動が観察出来る温度の限界は、最低15°C、最高 43°Cであつた。

2) 最高遊走速度を示すのは 39°Cであつた。又各温度に於て最高遊走速度を示す時間は、高温ほど早く低温ほどおくれる。

3) 運動形態では各温度共に最高遊走速度を示す時間に A 型、B 型が多く、又高温に於ては多数の F 型が見られた。

4) 最高、最低の限界温度 (43°C, 15°C) の一時期に、類似の特異型、即ち偽足部と細胞主体とが極めて細い部で連絡されて、垂鈴状を呈する形態が見られた。

5) 偽足形態は各温度共に舌状、鋸歯状偽足が多く、気泡状、旗状偽足は高温ほど多い傾向がある。

無偽足は高温又は低温になるほど多く出現している。

5) 尾糸は 37°C, 39°C 及び 41°C の初期に比較的多数に見られ、低温では一般に見られないが、特異なことは 15°C の初期にのみ多数の尾糸を有する細胞が見られたことである。

7) 30°C より低温或は 39°C より高温になるほど、又時間の経過と共に長短径比は小となる。

欄筆するにあたり終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師平木教授、大藤助教授に厚く感謝致します。

(本論文の要旨は第19回日本血液学会総会に於て発表した)

(参考文献は第三編に一括して記載する)

Influences of Physiochemical Factors on the Motility of Pseudo-eosinophils in Bone-Marrow Tissue Culture of Rabbits

Part 1. The Effect of Temperature on the Tissue Culture

By

Saburo TAKAHASHI

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

By observing the influences of temperature on the motility of pseudo-eosinophils in bone-marrow tissue culture of rabbits (cover-slip method) the author obtained the following results:

1. The limit of temperature that enables such observations lies in the range between 15°C, the minimum and 43°C, the maximum.

2. The maximum wandering velocity is found at 39°C, whereas the peak of the wandering velocity appears faster at a higher temperature and slower at a lower temperature.

3. As for the movement pattern, at the temperature showing the peak of wandering velocity, pseudo-eosinophils of Types A and B appear most numerously; and also many pseudo-eosinophils of Type F can be seen at a higher temperature.

4. At a certain stage in the limit temperature of both the maximum and minimum (43°C, 15°C) there appear a similar specific type, namely, the cell presenting a dumbbell-like shape having pseudopodia connected with the cell body at their very narrow part.

5. As for the shapes of pseudopodia, those presenting tongue-shape or saw-like ones tend to be most numerous at any temperature, and those with bleb shape or flag shape tend to be more numerous at a higher temperature. Those possessing no pseudopodia appear more at a lower temperature.

6. Relatively numerous tail-threads appear in an early stage at temperature of 37°C, 39°C, or 41°C, but generally these do not appear at a lower temperature, with one exceptionally peculiar thing is that only in an early stage at the low temperature of 15°C cells with many tail-threads make their appearance.

7. Either at the temperature lower than 30°C or higher than 39°C, and with the lapse of time the ratio of the long axis against the short axis grows smaller.