

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 二 編

培 地 滲 透 圧 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

血球の動態観察は1845年 Wharton Jones⁵⁰⁾ による「エヒ」の白血球の観察が最初であり、1850年には Davaine³⁴⁾ により人の白血球の運動性が認められた。以後白血球の遊走速度、運動形態に関する研究は多くの学者によつて行われている。就中運動形態については Philipsborn⁴⁶⁾⁴⁹⁾, Wallgren⁵⁴⁾, 栗原⁸⁾, 千田¹⁷⁾¹⁸⁾等の詳細な研究が見られるが、これらの研究は多くは末梢血の超生体観察である。

体外組織培養は1907年に Harrison⁴¹⁾ が蛙の神経の培養に成功して以来、Carrel³¹⁾³²⁾, Fischer³⁷⁾³⁸⁾, 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。しかし造血臓器では脾、淋巴腺又末梢血の研究はかなり多いが、骨髓の研究は Foot³⁹⁾⁴⁰⁾, Carrel et Burrows³¹⁾³²⁾³³⁾, Erdmann³⁶⁾等により行われているが断片的であり系統的な研究は見られない。

近年教室の大藤、亙理²⁾等が患者骨髓を体外に於て培養観察し、又家兎骨髓組織培養に患者血清を添加し、その影響を観察した実験を契機として、平木教授²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾は本法を基礎的方面はもとより臨床的方面に應用され、多くの新知見を得ており益々発展

の途上にある。

さて生物が生命を維持するためには生体内、外の種々の条件が備わらねばならない。生体構成単位である細胞も内外の種々なる条件のもとに物質代謝を行い生命を維持している。就中物質代謝はすべて溶液中で行われているからには、当然溶液の滲透圧が重要な役割を果しており、従つて体外組織培養にも培地の滲透圧が重要な因子であることは論をまたない。

滲透圧の組織への影響に関する研究は Hamburger⁴²⁾, Ruth⁵⁰⁾, Carrel & Burrows³¹⁾³²⁾³³⁾, Ebeling³⁵⁾, Lambert⁴³⁾⁴⁴⁾, 速水、田中²³⁾, 内藤²¹⁾等により種々なる対象により行われており、千田¹⁵⁾¹⁸⁾等は主として末梢血の超生体観察により、白血球の運動と媒質の滲透圧の関係を詳細に研究している。先に教室の大藤、亙理³⁾は骨髓組織培養により白血球の運動形態を観察し、津島⁴⁾²⁰⁾は培地滲透圧の骨髓増生への影響を増告している。私は家兎骨髓組織培養に於て滲透圧の偽好酸球の運動能に及ぼす影響を観察し得たので、こゝにその成績を報告する。

第二章 実験材料並に実験方法

第1節 実験材料

- 1) 培養組織：健康家兎大腸骨髄を使用した。
- 2) 培養支持体：家兎のヘパリン加血漿を使用した。
- 3) 発育促進物質：9日目孵化鶏卵の鶏胎圧搾液を使用した。

以上の各材料については既に前編で詳述したので省略する。

第2節 実験方法

被覆培養法を用いた。培養術式は前編で詳述したので省略する。

培地の滲透圧を変化せしめるためにヘパリン加血漿に蒸溜水及び種々濃度の食塩水を加えた。即ち低張培地では血漿と蒸溜水の比を8:2, 6:4, 4:6, 2:8とし、高張培地では1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0%の滅菌食塩水を血漿2に対し1の割合に混じたものを以て培地を構成した。

対照にはロック氏液を同様割合に混じて培地を構成した。

培地の滲透圧測定には Beckmann 温度計により氷点降下度を測定した。

第3節 観察方法

顕微鏡を保温箱に入れ 37°C に調節し、原則とし

て増生帯中間部の偽好酸球について観察した。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個の観察を行った。

1) 遊走速度：Abbe 氏描画装置により細胞の軌跡を計測し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A型～I型の9型に分類し観察した。

3) 偽足形態：平木、大藤⁵⁾²⁵⁾²⁶⁾の提唱する分類法即ち舌状、鋸齒状、気泡状、旗状及び触手状偽足の5型に針状偽足及び無偽足の2型を加えて7型に分類観察した。

4) 尾形態：千田¹⁷⁾の提唱する分類法即ちI型～V型の5型に分類観察した。

5) 長短径比による運動形態分類：平木、大藤³⁾⁵⁾²⁵⁾²⁶⁾の提唱する分類法即ち長径/短径×10によりI型～IV型の4型に分類観察した。

以上観察方法に就ては、既に前編に述べてあるのでこゝではその詳細は省略する。

第三章 実験成績

培地滲透圧の測定は Beckmann 温度計により氷点降下度を測定した。その成績は第1表に示す通りである。又各培地滲透圧と同等の氷点降下度を示す食塩水濃度(%)を附記した。以下培地滲透圧を表

第1表 低張側培地滲透圧

稀積度	正 常	4/5	3/5	2/5	1/5
氷点降下度	ΔT 0.595	0.54	0.48	0.42	0.36
食塩水濃度	0.96 %	0.86 %	0.76 %	0.67 %	0.57 %

高張側培地滲透圧

稀積食塩水濃度	1.5 %	2.0 %	2.5 %	3.0 %	3.5 %	4.0 %
氷点降下度	0.65	0.70	0.75	0.81	0.86	0.91
食塩水濃度	1.05 %	1.14 %	1.22 %	1.31 %	1.39 %	1.48 %

現するのに便宜上食塩水濃度(%)を以てする。なおヘパリン加家兎血漿は ΔT 0.59, 鶏胎圧搾液は ΔT 0.60である。

第1節 遊走速度

a) 高張培地：各滲透圧培地に於て時間を追つて偽好酸球の遊走速度を運動停止に至るまで測定した。その成績は第2表に示す通りである。

1.48%培地では、僅かに細胞増生があり細胞運動が弛みられるが、培養後24時間では総ての細胞運動

は停止している。1.48%以上の高滲透圧培地では細胞増生、細胞運動は認められなかつた。

細胞の遊走が認められた期間は、対照120時間、1.05%、1.14%培地96時間、1.22%、1.31%培地72時間、1.39%48時間、1.48%12時間であり、高張になるに従つて次第に生存期間が短縮されている。

最高遊走速度を示したのは1.05%培地の培養後6時間であり、3～6時間では対照より勝り、その他の培地では何れも対照より劣つている。又各滲透圧

第2表 高張側遊走速度 (単位 μ)

食塩水濃度 \ 時間	3時間	6	12	24	48	72	96	120	144
(対照)									
0.96%	9.09	9.76	7.66	6.01	4.34	4.24	2.99	1.32	0
1.05%	9.65	10.66	7.45	3.09	2.93	1.64	0.84	0	
1.14%	4.12	5.68	4.63	3.42	3.62	1.54	0.24	0	
1.22%	3.69	4.58	4.17	3.30	2.95	0.42	0		
1.31%	3.94	3.15	3.95	2.04	1.54	0.37	0		
1.39%	2.03	2.72	3.02	2.24	1.72	0			
1.48%	1.82	2.13	1.90	0					

培地の最高遊走速度を示す時間は、1.05, 1.14, 1.22%及び1.48%培地では培養後6時間であり、1.31, 1.39%培地では培養後12時間であつた。

b) 低張培地： 低張培地は蒸留水で希釈しているので培地のフィブリン量が少く軟らかい培地となり、間もなく液化して来るので24時間以後は観察不能となり、0.57%以下の低張培地では培養直後より培地は液化して観察不能であつた。低張培地での偽好酸球遊走速度は第3表に示す通りである。

第3表 低張側遊走速度 (単位 μ)

食塩水濃度 \ 時間	3時間	6	12	24
0.86%	9.55	7.18	5.67	5.25
対 照	9.75	9.07	7.70	6.44
0.76%	12.52	10.45	8.63	5.57
対 照	11.25	9.12	7.67	5.95
0.67%	10.77	14.05	14.90	6.66
対 照	11.45	13.71	12.79	10.28
0.57%	14.62	16.24	12.44	4.72
対 照	10.39	10.39	6.57	5.28

0.86%培地では、対照と著変を見ないがやゝ対照が優位を示している。その他の培地では培養後12時間までは何れも対照より優れているが、24時間では急激に低下している。一般に低張培地の培養初期に於ては、偽好酸球遊走速度は大である。

第2節 運動形態

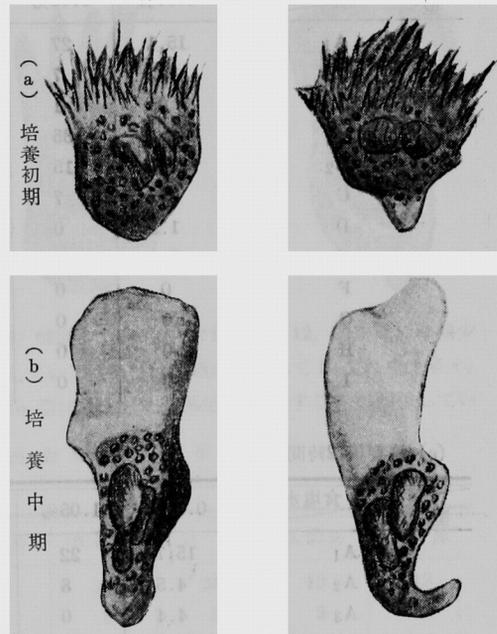
各種滲透圧培地に於て、偽好酸球の運動形態を先述した平木、大藤の提唱する分類法により、A型~I型の9型に分類し観察した。

a) 高張培地： 増生帯の細胞数は密であり、増生帯の辺縁は、細胞が周辺になるに従つて次第に粗となつている正常培養の増生帯に比較して幾分鋭利に明確に分劃されている。

細胞は一般に萎縮して小さく、細胞輪廓明瞭で、

顆粒及び核も比較的明瞭に見られる。又第1図(a)に示すような多数の極めて鋭尖な針状偽足を有する長短径比の小さい特異な形態の細胞が出現する。それが培養中期になると第1図(b)に示すような、細胞の1/2以上にも達するほどの大きな舌状、時には鋸歯状の偽足を有する細胞が出現する。

第1図 高張時特異型



高張培地の各時間に於ける運動形態百分率は第4表の通りである。

A型は培養後3時間では1.05%培地に少数に見られ、1.14%以上の培地では殆んど見られない。培養後6時間以後の1.05%培地では対照よりやゝ多数に見られたが、1.14%以上の培地では少数認められたに過ぎない。

B型は1.05%培地の培養後3時間に於て著明に多

第4表 高張培地の運動形態百分率

(a) 培養後3時間

型	食塩水濃度							
	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%	
A ₁	20.5	0	0	0	0	0	0	
A ₂	4.5	8	0	3	0	0	0	
A ₃	0.9	4	0	0	0	0	0	
B ₁	38.4	70	32	30	23	35	12	
B ₂	22.3	8	8	5	2	5	0	
C	2.7	8	23	27	30	31	50	
D	0	0	4	0	0	0	0	
E	7.1	0	31	28	35	30	38	
F	3.6	12	0	7	0	0	0	
G	0	0	0	0	0	0	0	
H	0	0	0	0	0	0	0	
I	0	0	0	0	0	0	0	

(b) 培養後6時間

型	食塩水濃度							
	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%	
A ₁	15.1	27	6	8	10	5	2	
A ₂	7.2	7	0	0	0	0	0	
A ₃	0	1	0	0	0	5	0	
B ₁	42.4	35	41	47	37	31	6	
B ₂	17.9	15	13	12	15	10	7	
C	8.3	7	17	21	18	24	47	
D	1.2	0	0	0	0	0	0	
E	7.9	8	23	10	20	25	25	
F	0	0	0	0	0	0	2	
G	0	0	0	0	0	0	0	
H	0	0	0	0	0	0	11	
I	0	0	0	0	0	0	0	

(c) 培養後12時間

型	食塩水濃度							
	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%	
A ₁	15.7	22	9	9	8	5	4	
A ₂	4.5	8	0	0	0	0	0	
A ₃	4.4	0	0	5	0	0	0	
B ₁	32.3	36	48	27	33	30	8	
B ₂	15.6	11	18	20	27	22	8	
C	9.8	7	12	22	21	25	44	
D	2.4	0	0	0	0	0	0	
E	11.9	16	15	17	11	15	8	
F	3.4	0	0	0	0	0	4	
G	0	0	0	0	0	0	0	
H	0	0	0	0	0	2	16	
I	0	0	0	0	0	1	0	

る。C型、E型も対照よりやや多い傾向があるが、遊走速度は相当に早い。D型は対照では稀に認められるに過ぎないが、低張培地では少数ではあるが認められている。その他の態形は一般に少数であり著変は認められなかつた。

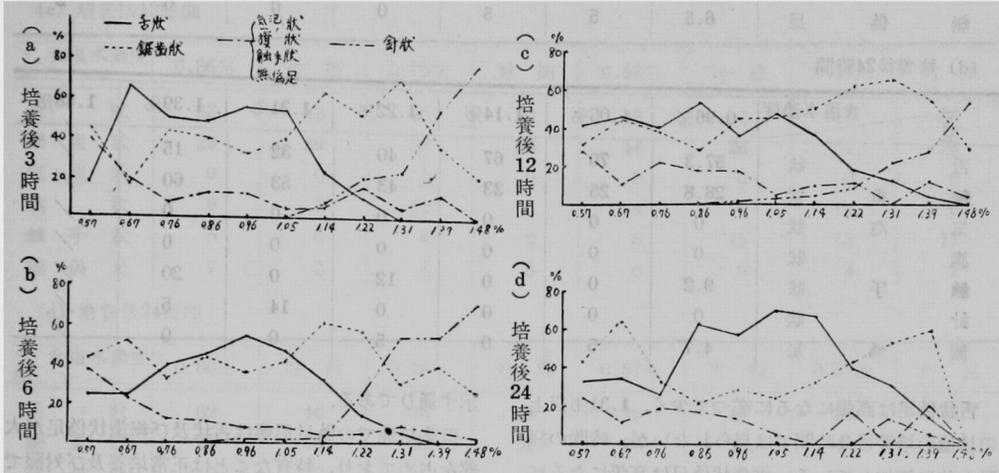
第3節 偽足形態

平木、大藤(5)(25)(26)による偽足形態分類、即ち舌

状、の歯状、気泡状、旗状、触手状偽足の5型に無偽足及び高張培地に特有である針状偽足を追加して7型に分類観察した。

a) 高張培地：特異な針状偽足は第3図に示したように、極めて尖鋭な細い針状突起が細胞前進部に多数見られ、その突起は直線状で彎曲しない。突起自体の運動は少いが、突起の基部にあたかも関節

第3図 各種滲透圧培地に於ける偽足形態百分率



がある如く運動し、触手状偽足の様に蛸足様の軟い運動は見られない。

高張培地の偽足形態百分率は第6表及び第3図に示す通りである。

第6表 高張培地の偽足形態百分率

(a) 培養後3時間

食塩水濃度			0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
舌	状	56.1	55	23	11	0	0	0	0
鋸	歯	31.7	40	64	53	72	37	21	
気	泡	0	0	0	0	0	0	0	0
旗	状	0	0	0	0	0	0	0	0
触	手	9.8	5	6	8	5	12	0	0
針	状	0	0	7	20	23	55	79	
無	偽	2.4	0	0	8	0	0	0	0

(b) 培養後6時間

食塩水濃度			0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
舌	状	54.6	47	32	13	6	0	0	0
鋸	歯	35.8	42	62	57	30	40	26	
気	泡	0	0	0	0	0	0	0	0
旗	状	0	0	0	0	0	0	0	0
触	手	6.4	4	2	5	7	6	2	2
針	状	1.6	2	2	25	55	54	71	
無	偽	1.6	5	2	0	2	0	1	1

(c) 培養後12時間

型			食塩水濃度							
			0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%	
舌	狀		36.1	47	36	18	13	5	0	
鋸	齒	狀	43.9	45	50	62	65	55	30	
氣	泡	狀	1.3	0	0	0	0	0	0	
旗	狀		0	0	0	0	0	0	0	
觸	手	狀	10.9	0	5	11	0	12	3	
針	狀		1.3	3	4	9	22	28	53	
無	偽	足	6.5	5	5	0	0	0	2	

(d) 培養後24時間

型			食塩水濃度							
			0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%	
舌	狀		57.3	70	67	40	32	15	/	
鋸	齒	狀	28.8	25	33	43	53	60	/	
氣	泡	狀	0	0	0	0	0	0	/	
旗	狀		0	0	0	0	0	0	/	
觸	手	狀	9.2	0	0	12	0	20	/	
針	狀		0	0	0	0	14	5	/	
無	偽	足	4.7	5	0	5	0	0	/	

舌状偽足は高張になるに従つて少く、1.31%以上の培地の培養後3時間では見られないが、時間の経過と共に増加している。鋸齒状偽足は高張になるに従つて増加し、1.14~1.31%培地を頂点としてそれ以上では減少しており、又各時間との間には多少の増減はあるが一定の傾向は見られない。気泡状、旗状偽足は稀に見られるのみであり、触手状、無偽足は少数に見られ共に著変は認められない。高張培地に特有である針状偽足は、高張になるに従つて多数に見られ、培養後3時間の1.48%培地では79%もの多数に見られており、時間の経過と共に減少している。

b) 低張培地：前節で述べたように低張培地に於ての偽足も早期に膨脹して一般に大きく、又厚味があり輪廓は不鮮明である。

低張培地の偽足形態百分率は第7表及び第3図に

示す通りである。

低張培地での偽足形態は舌状及び鋸齒状偽足が大部を占めており、特有なことは正常培養及び対照では少数しか認められなかつた旗状偽足が増加していること、触手状偽足も比較的多数に見られることである。旗状偽足は低張培地ほど多い傾向があり、時間的には大体6時間までは増加し、それ以後はやや減少している。触手状偽足も低張になるに従つて増加している傾向が見られるが、時間的には著変は認められない。

第4節 尾形態

各種滲透圧培地に於て偽好酸球の尾形態を、前述した千田の提唱する分類法によりI型~V型の5型に分類観察した。その成績は第8表、第9表及び第4図に示すように、I型及びII型が大

第7表 低張培地の偽足形態百分率

(a) 培養後3時間

型		食塩水濃度								
		0.86%	対照	0.76%	対照	0.67%	対照	0.57%	対照	
舌	狀	48	54	50	60	66	47	17	50	
鋸	齒	40	47	43	33	16	48	44	30	
氣	泡	0	0	0	0	0	0	0	0	
旗	狀	4	0	5	0	5	1	9	3	
觸	手	5	3	2	7	8	4	30	17	
無	偽	3	0	0	0	5	0	0	0	

(b) 培養後6時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
舌 狀		45	48	40	42	25	32	25	71
鋸 齒 狀		44	46	32	52	52	59	43	20
気 泡 狀		0	0	0	0	0	0	0	0
旗 狀		3	0	0	1	9	4	12	4
触 手 狀		7	6	9	4	14	6	25	5
無 偽 足		1	0	3	1	0	3	0	0

(c) 培養後12時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
舌 狀		53	32	40	29	46	57	41	58
鋸 齒 狀		29	59	38	59	44	26	31	23
気 泡 狀		0	0	0	0	0	0	0	0
旗 狀		6	1	10	4	4	0	11	0
触 手 狀		5	6	8	2	6	15	13	17
無 偽 足		7	2	4	6	0	9	4	2

(d) 培養後24時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
舌 狀		62	46	26	48	35	48	33	73
鋸 齒 狀		21	46	52	33	64	37	43	20
気 泡 狀		0	0	0	0	0	0	0	0
旗 狀		4	3	3	9	5	0	7	0
触 手 狀		8	4	16	6	6	9	13	3
無 偽 足		5	1	0	4	0	6	4	4

第 8 表 高張培地での尾形態百分率

(a) 培養後3時間

型	食塩水濃度	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
I		32.9	25	34	32	35	36	75
II		62.3	65	66	64	57	64	25
III		4.8	10	0	4	8	0	0

(b) 培養後6時間

型	食塩水濃度	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
I		60.9	42	35	22	26	21	82
II		31.6	52	62	63	51	64	18
III		7.5	6	3	15	23	15	0

(c) 培養後12時間

型	食塩水濃度	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
I		40.5	50	44	43	37	26	72
II		46.1	40	50	50	45	49	28
III		13.4	10	6	7	18	25	0

(d) 培養後24時間

型	食塩水濃度	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
I		56.1	32	33	45	52	46	/
II		35.4	52	60	48	45	49	/
III		8.5	16	7	7	3	5	/

第 9 表 低張培地の尾形態百分率

(a) 培養後3時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
I		46	35	60	46	53	42	91	50
II		44	63	35	51	40	49	9	47
III		10	2	5	3	7	9	0	3

(b) 培養後6時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
I		42	48	77	61	51	45	72	62
II		45	49	20	32	31	48	28	28
III		13	3	3	7	18	7	0	10

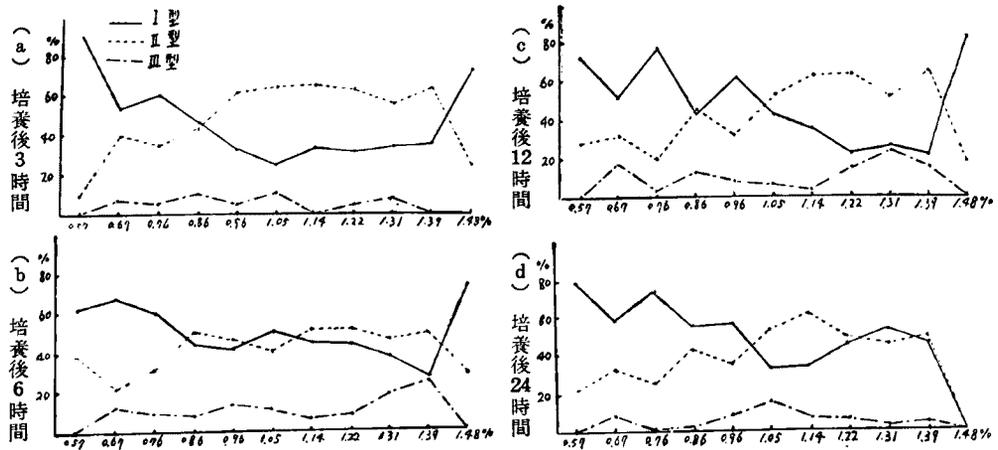
(c) 培養後12時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
I		43	31	60	35	67	35	61	53
II		50	62	31	49	21	47	39	37
III		7	7	9	16	12	18	0	10

(d) 培養後24時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
I		54	38	73	71	58	43	78	62
II		43	59	25	24	33	50	22	37
III		3	3	2	5	9	7	0	0

第 4 図 各種滲透圧培地に於ける尾形態百分率



部分を占め少数のⅢ型がありⅣ、Ⅴ型は全く認められなかつた。

高張培地の尾形態は一般に培養後 3, 6 時間ではⅠ型よりⅡ型が多く、培養後12, 24時間ではほぼ同数となつている。Ⅲ型は少数ではあるが1.22%~1.39%培地に比較的多数に出現している。1.48%培地では各時間共にⅠ型が大部分を占め、Ⅱ型は少なくⅢ型は全く見られなかつた。

低張培地の尾形態は0.86%培地では各時間共にほ

ぼ同数のⅠ型、Ⅱ型が見られているが、それ以下の培地ではⅠ型がⅡ型より多く、0.57%培地では断然Ⅰ型が多く大部分を占めている。Ⅲ型は少数ではあるが0.57%培地を除き他は24時間まで総てに認められている。

第5節 長短径比による分類

前述の栗原⁹⁾の分類法を変更した平木、大藤⁴⁾⁵⁾²⁵⁾²⁶⁾の分類法により偽好酸球をⅠ型~Ⅳ型に分類観察し、その成績は第10表、第11表及び第5図

第10表 高張培地での長短径比分類

(a) 培養後3時間							
型 \ 食塩水濃度	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
Ⅰ	5	11	14	42	38	49	36
Ⅱ	9	9	46	23	37	11	34
Ⅲ	41	57	33	31	23	36	28
Ⅳ	45	23	7	4	2	4	2

(b) 培養後6時間							
型 \ 食塩水濃度	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
Ⅰ	13	12	17	15	26	36	31
Ⅱ	10	7	28	24	25	32	55
Ⅲ	45	36	39	44	36	13	9
Ⅳ	32	45	16	17	13	19	5

(c) 培養後12時間							
型 \ 食塩水濃度	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
Ⅰ	6	14	13	18	24	33	38
Ⅱ	15	7	35	38	33	45	44
Ⅲ	42	43	38	27	32	14	11
Ⅳ	37	36	14	17	11	8	7

(b) 培養後24時間							
型 \ 食塩水濃度	0.96%	1.05%	1.14%	1.22%	1.31%	1.39%	1.48%
Ⅰ	11	15	18	23	26	37	/
Ⅱ	32	22	30	27	40	41	/
Ⅲ	34	38	39	36	29	14	/
Ⅳ	23	25	13	14	5	8	/

第11表 低張培地での長短径による分類

(a) 培養後3時間								
型 \ 食塩水濃度	0.86%	対照	0.76%	対照	0.67%	対照	0.57%	対照
Ⅰ	3	2	4	3	8	1	14	4
Ⅱ	27	27	24	13	15	16	24	24
Ⅲ	38	41	37	31	33	41	36	44
Ⅳ	32	30	35	53	44	42	26	28

(b) 培養後6時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
I		6	5	7	3	14	13	18	9
II		28	27	18	20	22	31	29	24
III		29	40	29	36	31	28	30	36
IV		37	28	46	41	33	28	23	31

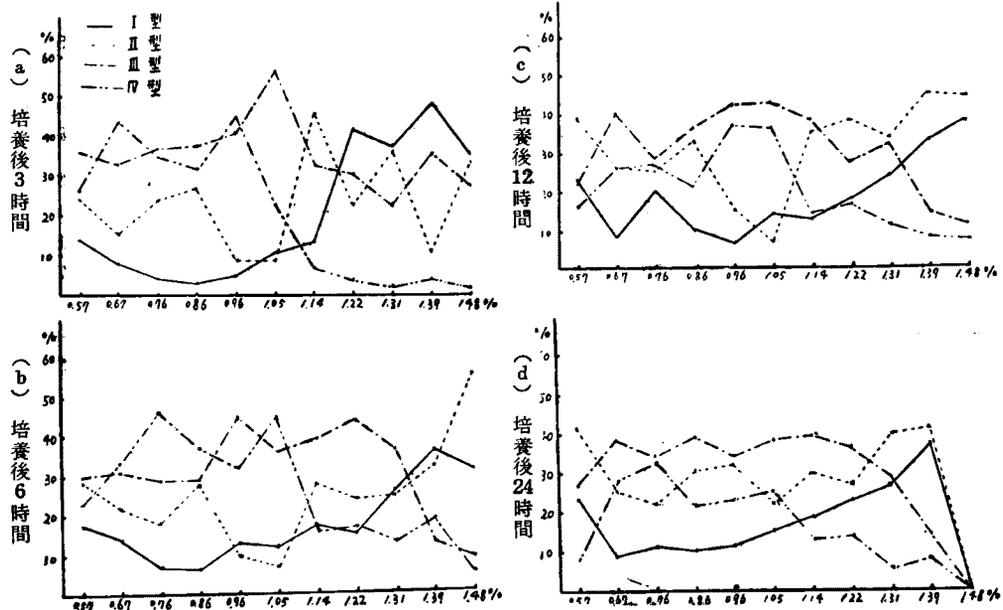
(c) 培養後12時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
I		10	4	20	6	8	8	23	8
II		33	18	25	18	26	20	39	23
III		36	42	28	33	40	31	22	35
IV		21	36	27	43	26	41	16	34

(d) 培養後24時間

型	食塩水濃度	0.86%	対 照	0.76%	対 照	0.67%	対 照	0.57%	対 照
I		10	8	11	6	9	8	24	13
II		30	24	22	21	25	21	41	32
III		39	40	34	38	38	30	27	31
IV		21	28	33	35	28	41	8	24

第 5 図 各種滲透圧培地に於ける長短径比による分類の百分率



に示す通りである。

高張培地では、各時間共に高張になるに従ってI、II型は増加して、逆にIII、IV型は減少している。即ち高張になるに従って円型に近い細胞が増加していることを意味する。

低張培地では、培養後3、6時間では対照よりI型及びIV型は増加し、12、24時間ではIV型は減少しI、II型が増加している。0.57%培地では初期よりI、II型が多く、時間の経過と共にIV型は激減している。

第IV章 総括並に考按

私は家兎骨髓体外組織培養を被覆法によつて行い、培地滲透圧の偽好酸球運動能に及ぼす影響を観察した。

体外における細胞発育と滲透圧の関係は従来より種々研究されており、Hamburger⁴³⁾は白血球貪喰能についてその限界を最高 ΔT 0.81, 最低 ΔT 0.24とし、Schade⁵³⁾は運動能についてその限界を最高 ΔT 1.0, 最低 ΔT 0.28としている。塚本¹⁹⁾は組織球について同様の実験を行い、Schade とほぼ同様の結果を得ている。千田¹⁸⁾等は人の白血球の運動と媒質の滲透圧の関係を研究し、その限界を食塩水濃度に換算して最高 1.7% としている。又福光は2.5%食塩水を 1/5 容加えた血漿培養基中で、心臓組織は全く発育し得ず、脾組織は発育不良という結果を得ている。

教室津島⁴²⁰⁾は家兎骨髓組織培養を行い、培地滲透圧の組織増生への影響を観察しているが、その限界は培地滲透圧を食塩水濃度に換算すれば最高 1.48%, 最低 0.57% であるといつている。私は培地滲透圧の偽好酸球の運動能に及ぼす影響を観察したところ、その限界は津島と一致した結果を得た。即ち1.48%培地以上では細胞は萎縮し全く運動は見られず、0.57%培地以下では培地は液化して観察は不能であつた。Hamburger は貪喰能についての研究であり同一に比較すべきではないが、私の実験の最高限界は Hamburger と Schade の値のほぼ中間に位している。なお最低限界は Hamburger, Schade の何れよりも高値を示している。その理由は、0.57%培地以下では培地は液化流動し増生帯は崩れ、観察は極めて困難であり、生命を維持している細胞でも多少の変形を見るのみで、統一された運動は見られない。そのため培地が或程度固定し、細胞運動が或程度統一された範囲に観察をとめたためである。しかしながら細胞の生死のみを観察の目的とするか、或は実験方法を考慮すれば、更に低滲透圧培地に於ても観察し得るものと考えられる。

次に白血球遊走速度に関しては Philipsborn⁴⁸⁾⁴⁹⁾、杉山¹¹⁾¹²⁾¹³⁾等、又科血球と滲透圧に関しては Lambert⁴³⁾、Bessis³⁰⁾、千田¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾等の幾多の研究が見られるが、骨髓組織培養に於ける組織増生及び遊走細胞の観察は、教室大藤、亘理³⁾の研究が最初であり、教室津島⁴²⁰⁾は更に滲透圧との関係を詳細に報告している。即ち低張培地では増生面積はすべ

て大であり、その大なるほど一般に細胞密度は粗であるので増生係数は一部の場合にのみ促進しているに過ぎない。遊走速度は低張培地全般に於て初期に亢進し、後急速に低下している。高張培地では増生面積は高張になるに従つて小となり、逆に細胞密度指数は一定度高張培地までは大となりそれ以上は小となつており、増生係数はすべて1以下である結果を得ている。

さて私は津島と同様の実験により偽好酸球の運動能に及ぼす影響を観察し、その基本ともなる遊走速度も観察して津島とほぼ同様の結果を得たが、特異なことは高張培地では増生帯の辺縁まで細胞数が多く、増生帯の辺縁は鋭利に区劃されていることである。これは細胞の遊走速度は低下しているが、細胞増生は遊走速度に比較してそれほど著明に低下していないためと考えられる。このことは平木教授²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾の述べている白血病患者の骨髓組織培養の増生帯所見と類似しており誠に興味深く思われる。

白血球の運動形態に関しては、Philipsborn⁴⁸⁾⁴⁹⁾が人好中球の自由運動を5型に分類したのが最初であり、本邦では栗原⁸⁾⁹⁾が長短径比により分類し、又近年千田¹⁷⁾は5型に分類している。しかし培地滲透圧の変化と運動形態との関係についての研究は少い。例えば千田¹⁸⁾は人末梢血好中球について媒質の滲透圧と運動形態の関係を見ているが、骨髓組織培養について観察した者はない。

さて私は偽好酸球の運動形態及び偽足形態について平木、大藤³⁾⁵⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾による分類法により百分率を求め、培地滲透圧の運動形態に及ぼす影響を観察した。低張培地では一般に3, 6時間でA型がやや増加し、B型は減少、C型以下は増加している。12時間以後にはA, B型共に減少し、C型以下が増加している傾向が見られる。高張培地では高張になるに従つてC型以下の運動機能の低い型が増加しているが、1.05%培地の3時間目にはB型が多く、それ以後はA型が増加している。このように低張培地の初期、高張培地の一部の初期に運動機能の活潑な型が増加しているのを先述の遊走速度と考え合せれば、明らかに培地の滲透圧が刺激的に作用しているものと考えられる。又D型が低張培地に少数ではあるが増加している傾向があり、これは低張培地の特徴であるとい得る。

次に偽足形態を分類したのは平木、大藤³⁾²⁵⁾²⁶⁾の分類が唯一であるが、一般に培地の物理化学的要因の変化は偽足に著明に影響するので偽足の観察は

極めて重要なことであると考えられる。さて私の観察に於て低張培地では偽足は膨脹して一般に大きく厚ぼつたくなり、その輪廓は不鮮明であり、百分率を見ると大部分は舌状及び歯状であるが、その他旗状及び触手状偽足も比較的多く見られ、培地が高張になるほどその傾向が著明であるのが特徴である。一方高張培地では、特異な針状偽足が出現する。この針状偽足は高張になるほど又培養初期ほど多く、時間の経過と共に減少して来る。これと反対に舌状偽足は高張培地ほど少ないが、培養時間の経過と共に多少は増加してくる。1.48%培地では針状及び鋸齒状偽足と少数の触手状偽足が見られたが、全経過を通じて舌状偽足は見られていない。

特記すべきことは、高張培地に於て培養初期に長短径比が小で、多数の極めて鋭な針状偽足を有する偽好酸球が出現し、培養中期には細胞全体の $1/2$ 以上にも達する舌状、又は鋸齒状の大偽足を有する偽好酸球が出現することである。平松は白血球の放射線感受性について研究し、放射中は偽足面積は小となり、放射後は急激に大となり、やがて大偽足が出現すると述べている。放射能と滲透圧とはもとより比ぶべくもないが、新しい環境の変化によつて類似の形態の推移を示したことは興味深いことである。

尾については Wallgren⁶⁴⁾、栗原⁸⁹⁾、千田⁷⁾、平松²⁷⁾等の研究があり、平松は放射線との関係について放射後は細胞の延長、尾糸の増加及び大偽足の出現を認めている。千田⁷⁾は尾を4型に分類し運動機能の低いものには尾はなく、運動機能の高いものほど尾の発達は良好で、尾のIV型は最も運動機能の高い細胞にのみ見られると述べている。しかし平木教授及び大藤²⁵⁾²⁶⁾はA、B型の如き遊走速度の早い細胞の遊走性が最高点から或程度低下して来た場合、粘着能は衰えないか或は率々上昇するので運動機能と粘着能との間に不均衡が生じ、頭部と尾部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述べている。

さて私は千田の分類法により培地滲透圧の尾形態に及ぼす影響を観察した。尾形態は滲透圧の変動により偽足のように著明な変化は見られなかつたが、一般に低張培地ではI型がII型よりやや多く、高張培地ではII型がI型よりやや多数に見られた。しかし両端の0.57%及び1.48%培地では圧倒的にI型が多数を占めている。III型は低張、高張培地共に比較的多数に認められている。しかし低張培地では対照のIII型も相当数に出現しているの、滲透圧のみな

らず、培地の稀釈という因子も考えなくてはならない。何れにしても以上の事実及び前編で述べた15°Cの培養初期にIII型が多数出現している事実から見ても、尾糸が運動機能の高い細胞ほど高度に発達するのではないことは明瞭である。

栗原⁸⁹⁾は好中球の長径と短径の比を以て運動型を分類し、その各々の型に数値を与え疾病の診断及び予後に利用している。教室平木、大藤²⁵⁾²⁶⁾は栗原の分類法を変更して4型に分類し、この比の大なるほど遊走速度の大なるものが多いと述べている。私はこの分類法により滲透圧の長短径比に及ぼす影響を観察した。

即ち低張培地では0.86~0.67%培地の培養6時間までは、各型共に対照とほぼ同様の比率を示しているが、12時間以後は著明にI、II型は増加しIII、IV型は減少している。0.67%培地では最初から対照よりI、II型は増加しIII、IV型は減少しており、12時間以後ではその傾向は更に著明となつている結果を得た。以上の結果と、先に述べた低張培地での初期の遊走速度が亢進していることは、平木、大藤が述べているところの、長短径比の大なるほど遊走速度が大なるものが多いということより、相反するように考えられる。しかし低張培地は稀釈によつて培地のフィブリン量が減少して粘稠度が低下する。又細胞も原形質の粘稠度が低下して流動性が高まるために、活潑に活動し得て或程度生活力のある間は却つて遊走性が亢進するものと考えられる。従つて長短径比が小であるにかゝらず遊走速度が大となり得ることが了解できる。

一方高張培地では、各時間共に高張になるに従つてI、II型が増加しIII、IV型が減少しており、対照と1.48%培地では著明な差が見られる。即ち対照ではI、II型は少くIII、IV型は多く(長短径比の大なるものが多い)、1.48%培地ではI、II型が多くIII、IV型は少い(即ち長短径比の小なるものが多い)。これらのことより、前述したように培地が高張になるに従つて遊走速度が低下することより考え合せると、高張培地では大藤、亘理の如く長短径比と遊走速度の関係はほぼ正の相関関係にあることが解る。

第V章 結 論

被覆法による家兎骨髓組織培養を行い、培地滲透圧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) 運動が観察出来る培地滲透圧は、食塩水濃度に換算して最低0.57%、最高1.48%であつた。

2) 高張培地の増生帯は、細胞密度大で辺縁は鮮明に分割されており、低張培地では細胞密度は著明に粗である。

3) 遊走速度は、低張培地では各滲透圧培地の間に著明な差は見られず、初期に亢進し後急激に低下している。高張培地では高張になるほど著明に低下している。

4) 高張培地の初期に、尖鋭な針状の偽足を有する長短径比の小なる特異形が見られ、高張になるほど増加している。

5) 低張培地では少数ではあるがD型運動型が増加している傾向がある。

6) 尾形態は培地滲透圧の変化により著明な変化は見られなかつた。

7) 培地滲透圧が高張又は低張になるに従つて偽好酸球の長短径比は小となつている。

擧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 Physicochemical Factors on the Motility of Pseudo-eosinophils in Bone-Marrow Tissue Culture of Rabbits

Part 2. The Effect of the Osmotic Pressure of the Medium on Bone-Marrow Tissue Culture

By

Saburo TAKAHASHI

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

In the bone-marrow tissue culture (cover-slip method) of rabbits, the author studied the effects of osmotic pressure of medium on the motility of pseudo-eosinophils, and arrived at the following conclusions:

1. The osmotic pressure of the culture medium that enables such observations of the movement of cells has been found to be, when calculated in terms of the saline concentrations, 0.57% the minimum, and 1.48% the maximum.

2. The growth zone in the hypertonic medium shows a high cell density with a clear-cut boundary, and the growth zone in the hypotonic medium reveals a markedly thin cell density.

3. The wandering velocity in the hypotonic medium at various osmotic pressures does not alter so markedly, showing an acceleration in an early stage but a precipitous fall later. In the hypertonic medium, the more hypertonic the medium is, the more marked is the wandering velocity.

4. In the early stage of the hypertonic medium there appears a specific form of cells possessing sharp needle-shaped pseudopodia with hardly no difference in the long axis and short axis, and the more hypertonic the medium is the greater is the number of such peculiar cells.

5. There is a tendency of an increase in the number of Type D of the movement patterns in the hypotonic medium, though the number is small.

6. No marked changes can be observed in the tail-shape of cells due to changes in osmotic pressure of the medium.

7. The more hypertonic or the more hypotonic the osmotic pressure of the medium is, the smaller is the ratio of the long axis and the short axis of pseudoeosinophls.
