

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 三 編

培 地 水 素 イ オ ン 濃 度 の 影 響

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)

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 実験材料並びに実験方法	
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 形 態	
第5節 長短径比による運動形態	
第IV章 総括並びに考按	
第V章 結 論	
附. 全編の総括	
参考文献	

第I章 緒 言

培養組織の発育は種々なる条件により左右されるものである。従つて組織の発育程度、又は細胞の示すところの様々の変化を指標として、各種の条件が組織に及ぼす影響を検することは、組織培養に於て重要なことである。

組織培養に於ける培地水素イオン濃度の影響は極めて重要な意義を有するものであり、従来、Rous⁵¹⁾, M. Lewis & Felton⁴⁵⁾⁴⁶⁾, Fischer³⁷⁾³⁸⁾, Rumjantzev⁵²⁾, 福光²⁸⁾²⁹⁾等により種々の臓器について研究が行われているが、骨髓に関しては甚だしく又断片的なものに過ぎない。即ち河島⁶⁾が家鶏胎児骨髓について、又鈴木¹⁴⁾が家兎骨髓について培地水素イオン濃度の推移を観察している程度である。

近時教室に於て骨髓に関する幾多の研究がなされており、大藤、亘理³⁾は骨髓組織培養に於て増生面積及び遊走細胞の観察を行い、津島⁴⁾²⁰⁾は培地イオン濃度の組織増生及び遊走速度に及ぼす影響を報告している。

先に私は第一編、第二編に於て家兎骨髓体外組織培養に於ける培養温度及び培地滲透圧の偽好酸球運動能に及ぼす影響について報告したが、本編に於ては培地水素イオン濃度の偽好酸球運動能に及ぼす影響を検討したので、こゝに報告する。

第II章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験材料

- 1) 培養組織: 健康家兎大腿骨骨髓
- 2) 培養支持体: 家兎のヘパリン加血漿
- 3) 発育促進物質: 9日目孵化鶏卵の鶏胎児胚液

以上の各材料については既に第一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。培養術式は第一編に於て詳述したので省略する。

培地の水素イオン濃度を変化せしめるために各種濃度の塩酸或は苛性曹達液を添加した。即ち塩酸 $1/100 \sim 1/1000$ 規定或は苛性曹達 $1/300 \sim 1/2000$ 規定の

等張液と、家兎のヘパリン加血漿及び鶏胎圧搾液各々1滴を混じて培地を構成した。対照には中性生理的食塩水を添加した。

水素イオン濃度測定には硝子電極 pH メーターを使用した。

第3節 観察方法

顕微鏡を 37°C の保温箱に入れ、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⁾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、鋸歯状、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型に分類し観察した。

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

5) 長短径比による運動形分類: 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型に分類し観察した。

以上観察方法については第一編に述べてあるのでこゝではその詳細は省略する。

第Ⅲ章 実験成績

被覆培養法により、各種濃度の塩酸及び苛性曹達を添加し、その直後の培地 pH を硝子電極 pH メーターにより測定した。その結果は第1表に示す通りである。なお家兎ヘパリン加血漿の pH は7.46であり、鶏胎児圧搾液の pH は7.49である。

第 1 表 各種濃度の塩酸苛性曹達添加培地の pH

添 加 液 濃 度	塩 酸				対 照	苛 性 曹 達			
	N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
培 地 pH	7.11	7.16	7.20	7.36	7.45	7.80	7.86	7.94	8.01

第1節 遊走速度

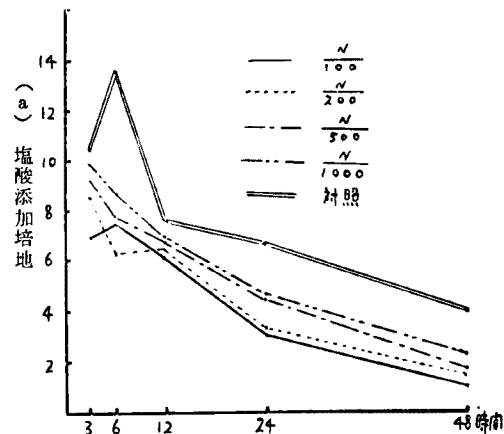
各種濃度の塩酸又は苛性曹達添加培地に於ける偽好酸球遊走速度を計測し、その結果は第2表及び第1図に示す通りである。

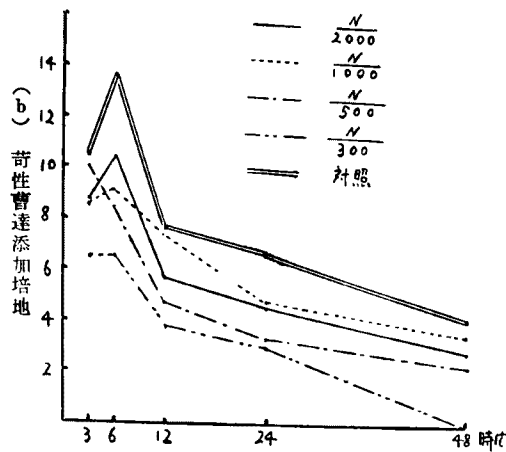
第2表 各種濃度塩酸、苛性曹達添加培地の偽好酸球遊走速度(単位μ)

濃 度	時 間	3 時間	6	12	24	48
		N 100	N 200	N 500	N 1000	対 照
塩 酸	N 100	6.87	7.52	6.27	3.12	1.13
	N 200	8.45	6.27	6.39	3.28	1.45
	N 500	9.28	7.83	6.79	4.52	1.81
	N 1000	9.90	8.58	6.93	4.66	2.25
	対 照	10.39	13.57	7.63	6.67	4.12
苛 性 曹 達	N 2000	8.73	10.27	5.57	4.62	2.83
	N 1000	8.64	9.13	7.25	4.72	3.53
	N 500	9.95	8.44	4.72	3.25	2.37
	N 300	6.35	6.50	3.72	2.95	0

各種濃度の塩酸添加培地の遊走速度は、各時間共に対照より劣り、酸性度の強い培地ほど低下している。又各種濃度の苛性曹達添加培地の遊走速度も、図の如く塩酸添加培地の場合と同様に、各時間共にすべて対照より劣り、矢張り塩基性度の強い培地ほど低下している。但し N/1000 の場合は、12時間以後に於て N/2000 よりやや高値を示した。

第1図 各種濃度塩酸、苛性曹達添加培地に於ける偽好酸球遊走速度





第2節 運動形態

各種濃度の塩酸又は苛性曹達添加培地に於て、偽好酸球運動形態を、先述した平木、大藤の分類法によりA型～I型の9型に分類し観察した。

酸性、塩基性培地共に、細胞は一般に運動周期は不明瞭で偽足小さく、細胞輪廓明瞭、不正形で凹凸多く、又顆粒には大小不同があり、細胞全体が汚穢に感じられた。このような傾向は酸性又は塩基性度が強くなるほど著明である。

次に各運動型の百分率は第3表に示す通りである。A₁, A₂, B₁, B₂の各型についてみるに各時間共に対照培地に於て最も多く、酸性、塩基性度の強い培地ほど少くなっている。しかし各培地の百分率は各

第3表 各種濃度塩酸苛性曹達添加培地に於ける偽好酸球運動形態百分率
(a) 培養後3時間

添加液濃度 型	HCl				対 照	Na OH			
	N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
A ₁	6	10	14	20	20.5	15	18	15	12
A ₂	2	3	6	12	4.5	3	2	0	1
A ₃	0	0	0	0	0.9	0	0	0	0
B ₁	24	26	30	36	38.4	34	31	28	22
B ₂	8	15	18	16	22.3	27	15	14	16
C	32	21	18	12	2.7	8	17	23	25
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	19	20	13	4	7.1	13	13	20	18
F	0	0	0	0	3.6	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	9	5	1	0	0	0	4	0	6

(b) 培養後6時間

添加液濃度 型	HCl				対 照	Na OH			
	N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
A ₁	4	8	13	17	15.1	17	13	9	3
A ₂	2	1	4	6	7.2	12	5	2	1
A ₃	0	0	0	2	0	0	0	0	0
B ₁	16	28	23	31	42.4	30	27	24	15
B ₂	9	6	15	14	17.0	18	16	13	7
C	36	25	18	14	8.3	15	21	28	40
D	0	0	0	0	1.2	0	0	0	0
E	20	19	16	12	7.9	8	17	21	27
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	6	3	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	13	7	8	4	0.9	0	1	3	7

(c) 培養後12時間

型	添加液濃度	HCl				対 照	Na OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
A ₁		7	9	11	14	15.7	12	8	8	4
A ₂		0	1	3	5	4.5	3	1	0	0
A ₃		0	0	3	0	4.4	1	0	1	0
B ₁		13	20	24	29	32.3	29	25	23	14
B ₂		8	13	15	16	15.6	13	11	7	5
C		37	26	17	18	9.8	17	25	28	38
D		0	0	0	0	2.4	0	0	0	0
E		22	27	23	17	11.9	19	24	26	24
F		0	0	0	0	3.4	0	0	0	0
G		0	0	0	0	0	0	0	0	0
H		4	0	0	0	0	0	2	0	3
I		9	4	4	1	0	6	4	7	12

(d) 培養後24時間

型	添加液濃度	HCl				対 照	Na OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
A ₁		3	1	7	11	13.0	4	5	3	0
A ₂		0	0	5	2	2.6	4	3	1	0
A ₃		0	0	0	0	0	0	0	0	0
B ₁		18	17	21	24	45.4	22	18	15	11
B ₂		4	4	11	13	13.0	10	12	9	4
C		48	35	27	15	6.5	38	35	33	36
D		0	0	0	0	1.3	0	0	0	0
E		24	27	26	19	11.7	14	23	27	34
F		0	2	0	1	5.2	0	0	0	0
G		0	0	0	0	0	0	0	1	0
H		0	1	0	1	1.3	2	1	0	0
I		3	13	3	14	0	6	3	11	15

培地共に対照と同じく、B₁が最も高く B₂, A₁, A₂の順にこれに続いている。又各培地の時間的経過を見ると、培養時間の経過につれて A, B 型共に漸次減少している。C 型以下の運動型に於ては A, B 型の場合とは逆に対照を最小として酸性、塩基性度の強い培地ほど増加しているが、各培地での百分率は大体に於て対照と同じく C, E, I 型の順に減少している。D, F, G, H 型は稀に少数認められるに過ぎない。又培養時間の経過につれて、各培地共に C, E, I 型はやゝ増加している。

第3節 偽足形態

平木、大藤による偽足形態分類、即ち舌状、鋸歯

状、気泡状、旗状、触手状偽足の5型に、前編に述べた針状及び偽足の認められないものを無偽足として加え、7型に分類観察した。その成績は第4表及び第2図に示す通りである。偽足は一般に培地の酸性、塩基性度の強いほど狭く小さくなっている。

各培地共に舌状及び鋸歯状偽足が大部を占め他の型は少い。舌状偽足は図に示す如く、対照を中心として N/1000 塩酸、N/2000 苛性曹達添加培地で急激に減少し、酸性及び塩基性度の強くなるに従つて徐々に増加している。鋸歯状偽足は対照を中心として舌状偽足の場合と逆に N/1000 塩酸、N/2000 苛性曹達添加培地で急激に増加し、酸性及び塩基性度

第 4 表 各種濃度塩酸、苛性曹達添加培地に於ける偽好酸球偽足形態百分率
(a) 培養後 3 時間

添加液濃度 型		HCl				対 照	Ha OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
舌	狀	36	44	20	16	56.1	8	4	35	35
鋸	齒	56	40	67	80	31.7	92	92	55	49
氣	泡	0	0	0	0	0	0	0	0	0
旗	狀	0	0	0	0	0	0	0	0	0
触	手	4	12	5	4	9.8	0	0	5	6
針	狀	0	0	0	0	0	0	0	0	3
無	偽 足	4	4	8	0	2.4	0	4	5	7

(b) 培養後 6 時間

添加液濃度 型		HCl				対 照	Ha OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
舌	狀	24	31	34	12	54.6	25	17	27	37
鋸	齒	44	54	60	84	35.8	71	73	64	52
氣	泡	0	0	0	0	0	0	0	0	0
旗	狀	4	0	0	0	0	0	0	0	4
触	手	12	6	3	0	6.4	1	3	4	3
針	狀	0	0	0	0	0	0	0	0	4
無	偽 足	16	9	3	4	3.2	3	7	5	0

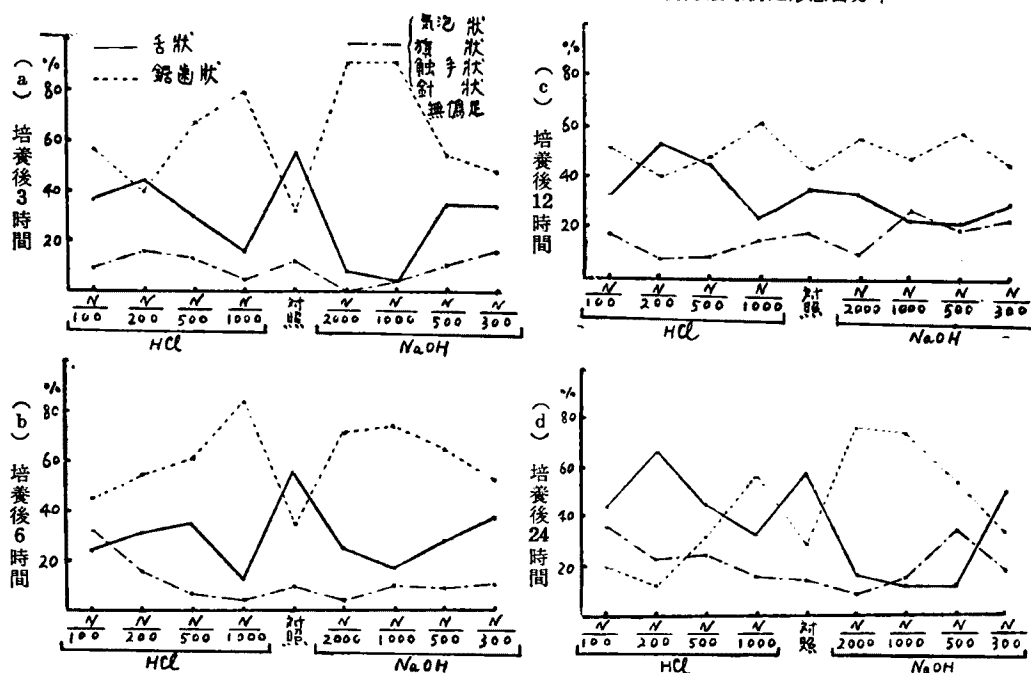
(c) 培養後 12 時間

添加液濃度 型		HCl				対 照	Ha OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
舌	狀	32	53	44	23	36.1	34	24	21	30
鋸	齒	51	40	48	62	43.9	56	48	59	46
氣	泡	0	0	0	0	1.3	0	0	0	0
旗	狀	0	0	4	0	0	0	0	0	6
触	手	2	0	0	0	10.9	3	8	7	2
針	狀	0	0	0	0	0	0	0	0	12
無	偽 足	15	7	4	15	7.8	7	20	13	4

(b) 培養後 24 時間

添加液濃度 型		HCl				対 照	Ha OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
舌	狀	44	66	44	32	57.3	16	12	12	49
鋸	齒	20	12	32	56	28.8	76	73	53	33
氣	泡	0	0	4	0	0	0	0	0	0
旗	狀	8	0	0	4	0	0	0	0	2
触	手	8	3	8	4	9.2	0	7	12	7
針	狀	0	0	0	0	0	0	0	0	3
無	偽 足	20	19	12	4	4.7	8	8	23	6

第2図 各種濃度塩酸、苛性曹達添加培地に於ける偽好酸球偽足形態百分率



の強くなるに従つて徐々に減少している。又時間の経過と共に各培地に於て舌状と鋸歯状偽足の占める率の差はやゝ小さくなつてゐる。次に気泡状、旗状、触手状、針状及び無偽足では、無偽足と触手状偽足が比較的多く、他の型は殆んど認められない。又時間の経過と共に各培地に於て無偽足、鋸歯状偽足はやゝ増加の傾向が見られた。興味あることは針状偽足が、N/300 苛性曹達添加培地のために於て各時間共に少数ではあるが認められたことである。この針

状偽足は、前編に述べた高張培地に多数見られた針状偽足と比較すると、針状突起はやゝ太く短くその数も少い。

第4節 尾形態

各種濃度の塩酸及び苛性曹達添加培地に於て、尾形態を先述の千田の提唱する尾形態分類法により、5型に分類観察した。但しIV型及びV型は認められなかつた。その成績は第5表及び第3図に示す通りである。

第5表 各種濃度塩酸、苛性曹達添加培地に於ける偽好酸球尾形態百分率

(a) 培養後3時間

型	HCl				対 照	Na OH			
	N/100	N/200	N/500	N/1000		N/2000	N/1000	N/500	N/300
I	56	49	24	8	32.9	4	27	21	25
II	40	46	60	88	62.3	84	68	75	68
III	4	5	16	4	4.8	12	5	4	7

(b) 培養後6時間

型	HCl				対 照	Na OH			
	N/100	N/200	N/500	N/1000		N/2000	N/1000	N/500	N/300
I	81	73	34	37	60.9	13	42	60	45
II	16	18	57	60	31.6	72	55	36	47
III	3	9	9	3	7.5	15	3	4	8

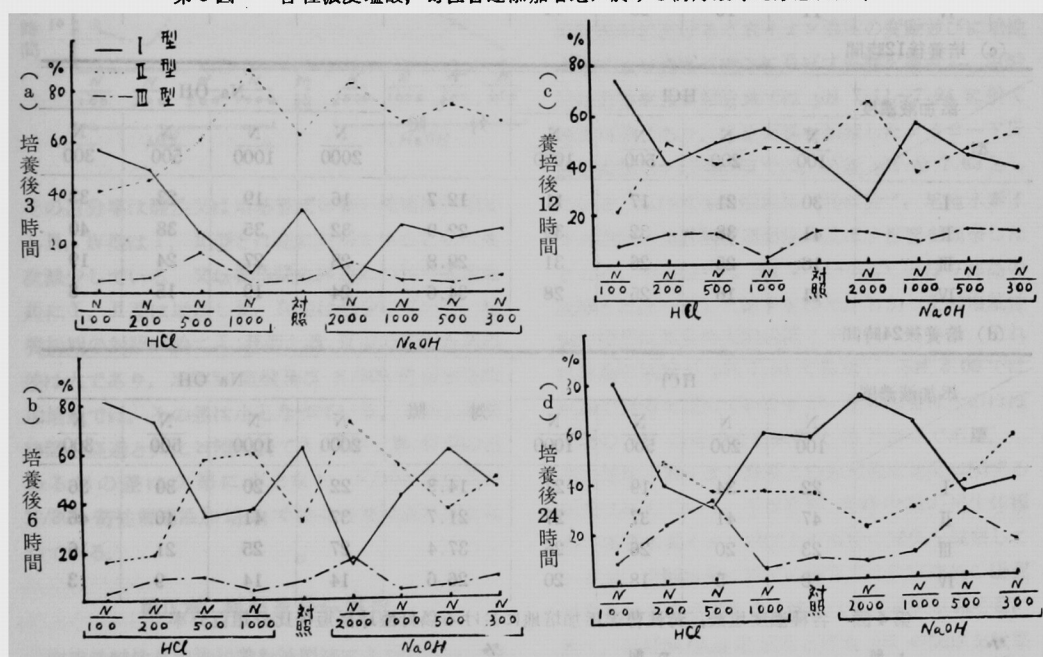
(c) 培養後12時間

型	添加液濃度	HCl				対 照	Na OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
I	Cl	73	40	48	53	40.5	24	56	43	37
II	OH	21	48	40	46	46.1	64	36	44	51
III		6	12	12	1	13.4	12	8	13	12

(d) 培養後24時間

型	添加液濃度	HCl				対 照	Na OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
I		80	39	30	59	56.1	72	62	34	39
II		12	48	36	36	35.4	20	28	39	47
III		8	23	34	5	8.5	8	10	27	14

第3図 各種濃度塩酸、苛性曹達添加培地に於ける偽好酸球尾形態百分率



各培地共にI型、II型が大部を占めIII型は少い初期に於ては一般に各培地共にII型がI型より多くなっているが、時間の経過につれて各培地共にI型が増加しII型が減少している。又I型は対照を中心としてN/1000 塩酸添加培地、N/2000 苛性曹達添加培地に於て急激に減少し、酸性又は塩基性度の強くなるに従つて徐々に増加している。II型はI型の場合と逆に対照を中心としてN/1000 塩酸添加培地、N/2000 苛性曹達添加培地に於て急激に増加し、酸

性又は塩基性度の強くなるに従つて徐々に減少している。但しこの現象は3時間及び6時間の場合に於て著明であり、12時間以後ではその傾向は明確でない。III型は時間の経過につれて、各培地共にやや増加している傾向が見られた。

第5節 長短径比による分類

前述した平木、大藤の分類法により、I型～IV型に分類観察した。その成績は第6表及び第4図に示す通りである。即ちI型、II型は対照を中心として

第 6 表 各種濃度塩酸，苛性曹達添加培地に於ける偽好酸球長短径比分類百分率
(a) 培養後 3 時間

型	添加液濃度	HCl				対 照	Na OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
I		19	17	10	7	7.4	8	15	13	19
II		37	33	29	18	17.0	21	25	33	30
III		30	29	33	34	37.7	41	31	31	29
IV		14	21	28	41	37.9	30	29	23	22

(b) 培養後 6 時間

型	添加液濃度	HCl				対 照	Na OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
I		28	26	20	12	6.4	6	12	18	25
II		39	33	28	24	21.9	23	33	37	46
III		22	25	27	30	37.4	33	31	27	21
IV		11	16	25	34	34.3	38	24	18	8

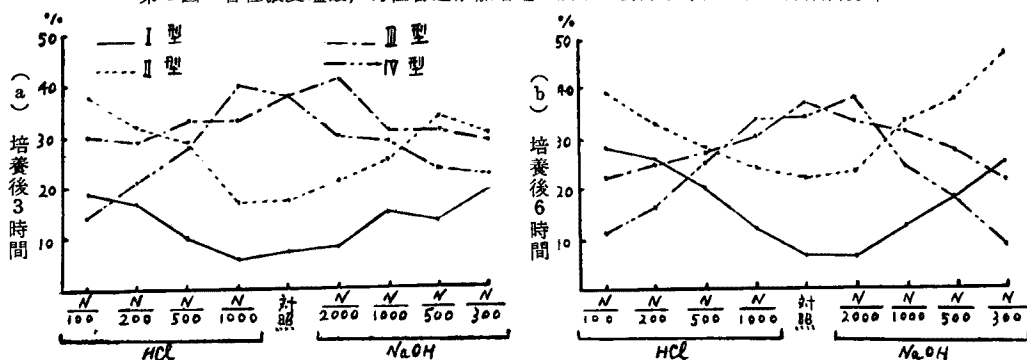
(c) 培養後 12 時間

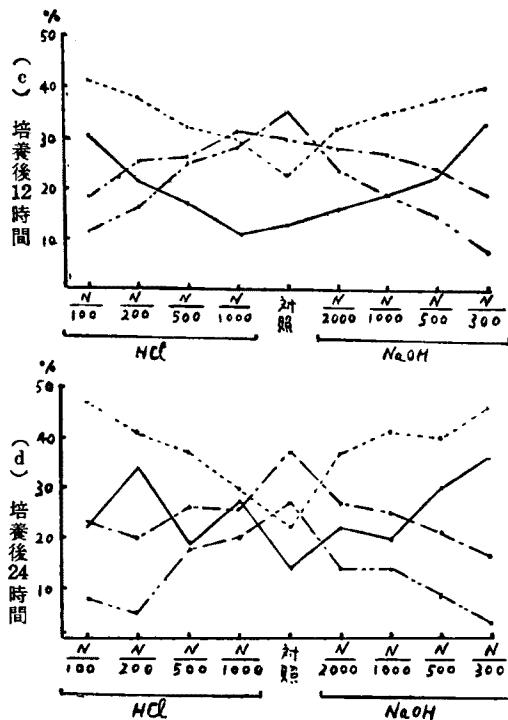
型	添加液濃度	HCl				対 照	Na OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
I		30	21	17	11	12.7	16	19	23	33
II		41	38	32	30	22.9	32	35	38	40
III		18	25	26	31	29.8	28	27	24	19
IV		11	16	25	28	34.6	24	19	15	8

(d) 培養後 24 時間

型	添加液濃度	HCl				対 照	Na OH			
		N 100	N 200	N 500	N 1000		N 2000	N 1000	N 500	N 300
I		22	34	19	27	14.3	22	20	30	36
II		47	41	37	27	21.7	37	41	40	46
III		23	20	26	26	37.4	27	25	21	16
IV		8	5	18	20	26.6	14	14	9	3

第 4 図 各種濃度塩酸，苛性曹達添加培地に於ける偽好酸球長短径比分類百分率





その百分率は酸性又は塩基性の強い培地ほど増加しⅢ、Ⅳ型はⅠ、Ⅱ型とは逆に対照を中心として漸次減少している。又培養時間の経過につれて各培地共にⅠ、Ⅱ型は増加しⅢ、Ⅳ型は減少している。培養初期の対照に於てⅠ、Ⅱ型とⅢ、Ⅳ型の占める率の差は大であり、N/100 塩酸及び N/300 苛性曹達添加培地では、その差は小となつてゐる。しかし培養時間の経過と共に対照に於てⅠ、Ⅱ型とⅢ、Ⅳ型の占める率の差は次第に小となり、N/100 塩酸及び N/300 苛性曹達添加培地ではその差は逆に大となつてゐる。

第四章 総括並びに考按

家兎骨髓体外組織培養を被覆法によつて行い、培地に各種濃度の塩酸又は苛性曹達液を添加して、培地水素イオン濃度の偽好酸球運動能に及ぼす影響を検索した。

組織の發育と培地水素イオン濃度との関係は、古くより多くの研究がなされており、M. Lewis & Felton⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾ は Locke-Lewis 氏液内における線維芽細胞の發育に及ぼす pH の影響を比色法により検査して、pH が 6.0~9.0 の範囲では細胞は正常に發育し、至適濃度は 6.8~7.0 であると述べてい

る。Fischer⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾ は血漿と胎児圧搾液との培地に緩衝液を加え培地 pH を 5.5~8.5 に調製して、各培地に於ける線維芽細胞の發育を比較成長価と比較し、pH 7.4~7.8 が發育の至適水素イオン濃度であると述べている。Rumjantzew⁽⁵²⁾ は Ringer-Locke 氏液に緩衝液を加えて種々の pH とし蛙の肝、腎、脾を保存して、肝は pH 6.0~8.0、脾 6.0~7.8、腎 6.5~7.6 が適當であると報告している。本邦では福光⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾ が鶏胎心臓及び脾組織發育に及ぼす培地 pH と温度の影響を観察し、至適 pH を 7.45~7.95 としている。千田⁽¹⁸⁾ は人好中球の超生体觀察に於て、緩衝液で媒質の水素イオン濃度を調整し、pH と好中球運動生態との関係を検索しており、pH 4.5 及び 9.2 では殆んど運動を認めず、pH 6.4~8.0 ではほぼ正常の運動型を保持していると述べている。

教室津島⁽⁴⁾⁽²⁰⁾ は家兎骨髓組織培養に於て、その培養経過中に於ける水素イオン濃度の変動並びに培地水素イオン濃度の増生に及ぼす影響を検索し、塩酸又は苛性曹達添加培地では pH 7.11~7.94 に於て培養可能であり、又重曹量を加減したタイロッド氏液を添加した培養成績では、至適 pH を 7.63 としている。私は家兎骨髓組織培養に於て、培地水素イオン濃度の偽好酸球運動能に及ぼす影響を観察したところ、その限界は pH 7.11~8.01 となり津島の成績とはほぼ一致した結果を得た。しかしその塩基性側の限界は津島の実験成績とやや異つてゐる。それは津島の実験が pH 7.94 で成功し、pH 8.05 では組織の發育を認めていないが、私の場合はそのほぼ中間の pH 培地で培養觀察し得たためである。

次に培地水素イオン濃度と白血球遊走速度に関する研究は極めて少く、千田⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾ は好中球の超生体觀察で媒質水素イオン濃度と走電性の関係を觀察しているが、骨髓培養に於ての研究では教室津島の研究が見られるのみである。津島は家兎骨髓組織培養に於て、偽好酸球遊走速度と培地 pH の関係を觀察し、培地 pH 7.11~7.94 に於て遊走を認め、偽好酸球遊走速度は培地の酸性度或は塩基性の強いほど抑制せられると報告している。私は津島と同様の實驗により偽好酸球の運動能に及ぼす影響を觀察し、その基本ともなる遊走速度も觀察して、津島とはほぼ同様の結果を得たが、更に pH 8.01 培地に於ても遊走速度を觀察し得た。

次に白血球の運動形態に関しては第一編、第二編に於て述べた如く Philipsborn⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾ が人好中球に

ついて運動形態を分類したのが最初であり、本邦では栗原が長短径比により分類し、又千田¹⁸⁾は超生体観察により分類し、更に媒質水素イオン濃度と白血球の運動型に関する詳細な研究を行っている。しかし胃腸組織培養に於ける培地水素イオン濃度と白血球の運動形態に関する研究は見られない。

さて私は家兎胃腸組織培養に於て、培地水素イオン濃度が偽好酸球運動形態に及ぼす影響を観察したところ培地の水素イオン濃度の変化により偽好酸球は不正形で凹凸多く、細胞輪廓は比較的明瞭となり運動周期は明確を欠き、偽足は小さく顆粒には大小不同が認められ細胞全体は汚穢に見られた。このような傾向は培地の酸性、又は塩基性度が強くなるほど著明であり、酸性培地及び塩基性培地共に同様な傾向が認められた。各運動形の百分率についてはA、B型は各時間共に大体に於て対照が多く、酸性、塩基性度の強くなるほど少くなり、各培地に於ては各時間共にB型がA型より多い。又培養時間の経過につれてA、B型共に漸次減少している。C型以下の運動型に於てはA、B型の場合とは逆に対照を最小として酸性、塩基性度の強いほど増加しており、各培地での百分率は大体に於てC、E、I型の順に減少している。又培養時間の経過につれて各培地共にC、E、I型はやゝ増加している。他の型については稀に少数認められるに過ぎない。以上のように培地の酸性或は塩基性度が強くなるに従つて、運動機能の旺盛な型は減少し、機能の減弱した型が増加している。しかしpH 7.80培地に於ける培養後3時間のB₂型並びに培養後6時間のA₁、A₂型とpH 7.36培地に於ける培養後6時間のA₁型が、対照よりやゝ増加しているのは培地pHが1時期に細胞に刺激的に作用したものと考えられる。又第一編、第二編に於て、培養温度及び培地滲透圧の変化により特異な運動形が見られたことを述べたが、培地水素イオン濃度の変化に於ては特異な運動形が見られなかつたのは、培地の血漿及び鶏胎圧搾液の強力な緩衝作用のために、かなり正常培地のpHに近づけられたためではないかと考えられる。

次に偽足の分類を行つたのは教室平木、大藤⁵⁾²⁶⁾²⁸⁾の報告が最初であり、私もこの分類に針状及び無偽足の2型を加え、培地水素イオン濃度の影響を検索した。一般に偽足は培地の酸性、又は塩基性度の強いほど小さくなっている。このことは先に千田¹⁸⁾も人好中球の超生体観察に於てはと同様のことを報告している。偽足の各型の百分率は、舌状

及び鋸歯状偽足が大部を占め、舌状偽足はpH 7.36培地及び7.80培地に於て急激に減少し、培地の酸性又は塩基性度の強くなるに従つて徐々に増加しているが、対照よりは少い。しかしながら鋸歯状偽足は舌状偽足とは逆の現象を示しており、培養初期に於てその現象は著明である。以上のことは培地水素イオン濃度の変化に於ける特長と考えられる。¹⁾他の偽足形態は一般に少いが、無偽足と触手状偽足は比較的多く、気泡状、旗状、針状偽足は極く少数認められるのみである。又時間の経過については各培地共に舌状偽足は減少し、無偽足、鋸歯状偽足はやゝ増加の傾向が見られている。又針状偽足はpH 8.01培地に於てのみ認められており、前編に述べた如く高張培地に於てもこの針状偽足が多数認められている。このように異つた環境の変化によつても類似の偽足形態が出現したことは興味深いことである。

次に尾については第一編及び第二編に述べた如くWallgren⁵⁴⁾、栗原⁸⁾⁹⁾、千田¹⁷⁾等の研究があり、千田は尾を5型に分類し、運動機能の高いものは尾の発達良好であると述べている。しかし平木教授、大藤は尾は遊走機能が或程度低下した時発生するのであると述べている。私は千田の分類法により培地水素イオン濃度の尾形態に及ぼす影響を検索した。I型はpH 7.36培地及びpH 7.80培地では少く、培地酸性度又は塩基性度の強くなるに従つて増加している。II型はI型とは逆の傾向を示し、その傾向は培養初期に於て著明である。なお前述の偽足の観察と合わせ考えると、同一pH培地に於て、しかも同一培養時間に鋸歯状偽足と、II型の尾形態が相共に増加する傾向があることがわかり、培地pHの変化によつてうける細胞運動エネルギーの変異に於て両者共通の面のあることが推定せられ誠に興味深く思われる。III型はI、II型に比すれば少数ではあるが、大体に於て各培地共に培養時間の経過につれて、24時間まではやゝ増加の傾向が見られた。このことは千田のいう尾は運動機能の高いものに高度に発達するという事と相反する。しかしそれは氏の方法が超生体観察のため、初期より細胞機能の低下があることに基因するのではないかと考えられる。IV型、V型は各培地共に全く認められなかつた。

次に長短径比による分類については第一及第二編に述べた如く栗原⁸⁾⁹⁾の詳細な研究がみられ、教室平木、大藤は氏の分類法を変更して4型に分類し、この型の数字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。私もこの分類法により培地

水素イオン濃度の影響を検索した。即ちⅠ、Ⅱ型は対照に於て少く、培地の酸性又は塩基性度の強くなるに従つて増加しⅢ、Ⅳ型はⅠ、Ⅱ型とは逆の傾向を示している。又時間の経過により各培地共に、大体に於てⅠ、Ⅱ型は増加しⅢ、Ⅳ型は減少している。以上のことより、先に述べた遊走速度が培地酸性又は塩基性度が強くなるに従つて低下することを考え合せると、平木教授、大藤のいう遊走速度と長短径比とはほぼ正の相関関係にあるということ、培地水素イオン濃度の面から立証し得たものといえよう。

第V章 結 論

被覆法による家兎骨髓組織培養に於て、各種濃度の塩酸又は苛性曹達液を添加し、培地水素イオン濃度の偽好酸球運動能に及ぼす影響を観察し次のような結論を得た。

- 1) 運動が観察出来る培地水素イオン濃度の限界は pH 7.11~8.05であつた。
- 2) 偽好酸球の遊走速度は培地の酸性度又は塩基性度が強いほど低下している。
- 3) 酸性、塩基性培地共に、細胞は輪廓明瞭、不正形で顆粒に大小不同があり、偽足は小さく、運動周期は不明瞭である。
- 4) 運動形態は培地の酸性度又は塩基性度が強いほど A、B 型は減少し C、E、I 型は増加する。
- 5) 培地の pH を変化せしめることにより、舌状偽足は減少し鋸歯状偽足は増加している。その傾向は対照培地の pH に近いほど強く、しかも培養初期ほど著明である。
- 6) 尾形態のⅠ型は pH 7.36培地及び pH 7.80培地では少く、培地の酸性度又は塩基性度が強いほど増加している。Ⅱ型はⅠ型と逆の傾向を示す。Ⅲ型は各培地共に少く、培養時間の経過につれてやゝ増加の傾向がある。
- 7) 偽好酸球の長短径比は、培地の酸性度又は塩基性度が強いほど、その小なるものが増加し、大なるものは減少する。

附. 全 編 の 総 括

組織培養に於て組織の発育は種々なる条件により左右せられるものである。従つて組織の発育程度又は細胞の示すところの様々な変化を指標として、各種の条件が組織に及ぼす影響を検することは、組織培養に於て重要なことである。そこで私は数種の条

件のもとに、家兎骨髓組織培養を被覆法によつて行い、その条件が偽好酸球の運動形態、偽足形態（以上平木、大藤による分類）、尾形態（千田による分類）及び遊走速度等に及ぼす影響を観察した。

第一編に於ては培養温度の及ぼす影響を観察した。10°~45°Cの温度について実験し、細胞運動の観察出来た範囲は 15°~43°Cであつた。遊走速度は 39°Cの初期に於てのみ対照より亢進しており、高温又は低温になるに従つて低下している。又各温度に於ての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。運動形態は 37°C、39°Cに於ては運動機能の高い A、B 型が多数を占め、低温又は高温になるに従つて A、B 型は減少し、C 型以下の運動機能の低い細胞が増加しており、高温、特に 43°Cに於て多数の F 型が認められた。又 43°Cの培養初期と、15°Cの培養120時間前後に類似の垂鈴状の特異型が出現した。偽足形態では 37°C前後でも舌状、鋸歯状偽足が多く、高温又は低温になるに従つて減少し、団子状、旗状、触手状偽足及び無偽足が増加する。尾形態は各温度を通じてⅠ、Ⅱ型が多くⅢ型は少く、高温、低温の両端では特異な比率を示す。長短径比による運動形態では、高温又は低温になるに従つて長短径比の小なる円形に近い細胞が増加する。

第二編に於ては培地に蒸留水又は各種濃度の食塩水を加え、滲透圧の影響を観察した。遊走速度は、高張培地では高張になるに従つて低下し、低張培地では長短径比は著変は見られないが、遊走速度は初期に亢進し、後急速に低下している。運動形態は低張培地では、一般に軽度であるが、初期に A 型及び C 型以下の形態が増加し、B 型は減少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 A、B 型は減少し、C 型以下が増加する。偽足形態については低張培地では偽足は膨脹し大きく、輪廓は不鮮明であり、旗状、触手状偽足はやゝ増加の傾向がある。高張培地では舌状偽足は少く、特異な針状偽足が見られる。

第三編では、培地に各種濃度の塩酸、又は苛性曹達液を添加し、水素イオン濃度の影響を観察した。遊走速度は培地酸性度又は塩基性度が強くなるに従つて低下している。運動形態も培地酸性度又は塩基性度が強くなるに従つて A、B 型は減少し、C 型以下の型が増加する。偽足形態は、pH 7.36培地及び pH 7.80培地に於て舌状偽足は著明に減少し、培地酸性度又は塩基性度が強くなるに従つて増加してい

る。鋸齒状偽足は舌状偽足と逆の傾向を示す。尾形態も pH 7.36 培地及び pH 7.80 培地に於て I 型は少く、酸性、塩基性度が強くなるに従つて増加し、II 型は I 型と逆の傾向を示す。長短径比による運動形態では、酸性度或は塩基性度が強くなるに従つて I, II 型は増加し、III, IV 型は減少している。

以上のように組織に不利な条件が作用すると細胞の運動能は一般に低下するが、各条件についてそれ

ぞれ聊か特有の所見が見られた。

拙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

- 1) 江川修：十全会雑誌，40巻，1833頁，昭10.
- 2) 大藤真・互理善治・角南宏：臨床病理，2巻，282頁，昭29.
- 3) 大藤真・互理善治：東京医事新誌，71巻，453頁，昭29.
- 4) 大藤真・津島允：東京医事新誌，72巻，15頁，昭30.
- 5) 大藤真・最新医学，10巻，2642頁，昭30.
- 6) 河島勇：日血会誌，4巻，71頁，昭15.
- 7) 木村廉：組織培養，昭22.
- 8) 栗原操：日血会誌，8巻，109頁，昭19.
- 9) 栗原操：日血会誌，13巻，244頁，昭25.
- 10) 甲賀嘉六：北海道医学雑誌，15巻，1999頁，昭12.
- 11) 杉山繁輝，森喜久男：十全会雑誌，33巻，616頁，昭3.
- 12) 杉山繁輝，森喜久男：十全会雑誌，34巻，1370頁，昭4.
- 13) 杉山繁輝：血液及び組織の新研究と其の方法，昭19.
- 14) 鈴木清・杉村秀男：臨床病理血液学雑誌，3巻，136頁，昭9.
- 15) 千田信行：血液討議会報告，5輯，252頁，昭28.
- 16) 千田信行：日血会誌，16巻，166頁，昭28.
- 17) 千田信行：最新医学，9巻，1518頁，昭29.
- 18) 千田信行：最新医学，9巻，1646頁，昭29.
- 19) 塚本茂：十全会誌，35巻，571頁，昭5.
- 20) 津島允：岡山医学会雑誌，68巻，8号，増刊号，1頁，昭31.
- 21) 内藤賢次：実験医学雑誌，8巻，319頁，大13.
- 22) 根本衛：Tohoku Journ. exp. Med., 14, 1, 昭4.
- 23) 速水猛・田中正治：日本病理学会雑誌，2巻，287頁，大2.
- 24) 平木潔：岡山医学会雑誌，67巻，2号別巻，1頁，昭30.
- 25) 平木潔・大藤真：岡山医学会雑誌，68巻，4号別巻，1頁，昭31.
- 26) 平木潔・大藤真：日血会誌，19巻，406頁，昭31.
- 27) 平松博：血液討議会報告，5輯，438頁，昭28.
- 28) 福光廉平：日本微生物学病理学雑誌，23巻，1945頁，昭4.
- 29) 福光廉平：日本微生物学病理学雑誌，24巻，1945頁，昭4.
- 30) Bessis, M. : *Traité de Cytologie Sanguine*, 1954.
- 31) Carrel, A. & Burrow, M. T. : *J. A. M. A.*, 55, 1379, 1910.
- 32) Carrel, A. et Burrows, M. T. : *Compt. rend. de la Soc. de Biol.*, 69, 299, 1910.
- 33) Carrel, A. & Burrows, M. T. *Journ. exp. Med.*, 13, 562, 1911.
- 34) Davaine, M. : *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 2, 103, 1850.
- 35) Ebeling, A. H. : *Journ. exp. Med.*, 20, 130, 1914.
- 36) Erdmann, R. H. : *Am. Journ. Anat.*, 22, 73, 1917.
- 37) Fischer, A. : *Journ. exp. Med.*, 34, 447, 1921.
- 38) Fischer, A. : *Journ. exp. Med.*, 35, 367, 1922.
- 39) Foot, N. C. : *Beitr. z. path. Anat. u. z. allg.*, 53, 466, 1912.
- 40) Foot, N. C. : *Journ. exp. Med.*, 17, 43, 1913.
- 41) Harrison, R. G. : *Proc. of the Soc. of exp. biol. Med.*, 4, 140, 1907.
- 42) Hamburger, H. J. : *Physik. chem. Unt. u. Phagocyt.*, 1911.
- 43) Lambert, R. A. u. Hanes, F. M. : *Virchow's Arch. f. path. Anat. . Physiol. u. f. Kl. Med.*, 211. 89, 1913.

- 44) Lambert, R. A. Journ. exp. Med., 19, 398, 1914.
- 45) Lewis, M. R. & Felton, L. D. Science, 54, 636, 1921.
- 46) Lewis, M. R. & Felton, L. D. · Bull. Johns Hopkins Hosp., 33, 112, 1922.
- 47) Osgood, E. E. & Brownlee, I. J. A. M. A., 107, 123, 1936. *ibid.*, 108, 1793, 1937. *ibid.*, 109, 933, 1937.
- 48) Philipsborn, E. V. Dtsch. Arch. f. klin. Med., 146, H5/6, 1925.
- 49) Philipsborn, E. V. : Dtsch. Arch. f. klin. Med., 160, 323, 1928.
- 50) Ruth, E. S. Journ. exp. Med., 13, 422, 1911.
- 51) Rous, P. Journ. exp. Med., 18, 183, 1913.
- 52) Rumjantzew, A. Arch. f. exp. Zillf., 3, 115, 1927.
- 53) Schade, H. Physik. Chemie ind. inn. Med., 1923.
- 54) Wallgren, A. Arbeiten an d. path. Inst. d. univ. Helsingfors, Neue Folge, 3, 1, 1925.
- 55) Jones zit. n. E. V. Philipsborn · Fol. Haemat., 43, 142, 1931.

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

Part 3. The Influences of Hydrogen Ion Concentration (pH) of the Medium on the Tissue Culture

By

Saburo TAKAHASHI

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

By addition of hydrochloric acid or caustic soda at various concentrations to bone-marrow tissue culture (cover-slip method) of rabbits, the author studied the influences of medium pH on the motility of pseudo eosinophils and obtained the following results:

1. The limit of pH of the medium which enables such observations of the movement of pseudo eosinophils is pH 7.11—8.05.
2. The more acidic or basic is the medium, the more marked is the decrease in the wandering velocity of pseudo eosinophils.
3. In the medium both acidic and basic, the boundary of the cell is distinct; the shape is irregular with different sizes of granules; pseudopodia are small; and the wandering cycle is indistinct.
4. In the medium which is either highly acidic or basic, the number of cells of Types A and B are less, but those of Types C, E, and I are increased.
5. By changing pH of the medium either higher or lower those with pseudopodia shaped like a tongue are lessened and the cells with saw-like pseudopodia are increased. Moreover, this tendency is stronger as the pH approaches that of the control medium; and what is more it is markedly so in an early stage of culture.
6. The tail-shape pattern of Type I can be found less in the medium of pH 7.36 or pH 7.80, but this type increases in both more acidic and more basic media. Type II shows a tendency just the reverse of Type I. Type III is rare in any medium, but it tends to increase slightly with the lapse of culture time.
7. As for the ratio of the long axis and short axis of a pseudo eosinophils, the smaller ratio increases while the greater ratio decreases, in a more acidic or a more basic medium.