

末梢血白血球培養に関する 基礎的並に臨床的研究

第 2 編

健康人末梢血白血球培養の好中球機能に就て

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木 潔教授）

十 川 保

〔昭和34年1月6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

1) 実験材料

2) 実験方法並に観察方法

第3章 実験成績

1) 遊走速度

2) 墨粒貪喰能

3) 中性紅生体染色

第4章 総括並に考按

第5章 結 論

第1章 緒 言

前編に於て末梢血白血球培養法を種々検討して細胞機能を最も保持し得る新術式を考案し、次いで同方法に依り健康人末梢血白血球の細胞増生に就て観察を行ったが、本編に於てはその白血球機能を総合的に窺わんとし、遊走速度、墨粒貪喰能並に中性紅生体染色を検索した。

末梢血白血球の機能に就ては従来幾多の報告がみられ、1854年 Wharton Jones²³⁾ によつて初めて白血球の運動能が証明せられて以来 Philipsborn²⁵⁾、Wallgren²²⁾、Comandon⁵⁾、Jolly²²⁾ 等はその遊走形態、速度並に墨粒貪喰能を観察し、Jacobstal²¹⁾ は白血病患者の幼若細胞に就て貪喰能を検討し、Sabin⁴¹⁾ は超生体染色法を考案して各種細胞の超生体観察を行い、その染色性を詳細に観察している。

本邦に於ては杉山^{88) 89)}、森⁸⁸⁾、小野田⁸⁴⁾、栗原⁵⁷⁾、千田⁵⁸⁾、天野¹⁾ 等が血液細胞の運動生態並に遊走速度に就て研究を行い、山下⁵⁴⁾、谷⁴⁸⁾、宇佐美⁴⁹⁾ 等は人及び家兎末梢血白血球の墨粒貪喰能を検討し、杉山⁸⁹⁾ は各種色素を用いて血液細胞の染色性を詳細に観察している。

以上の如く白血球機能に関しては多くの業績がみられるが、之等の研究は殆んど超生体観察によるもので、細胞機能を可成り障害した状態で行われており、生体内の生活状態とは相当の隔りのあることは充分考

えられる。この点組織培養法による細胞機能の研究は生体内に最も近い状態で直接鏡下に観察し得る極めて有意義な方法である。教室に於ては既に骨髓細胞の機能に就て組織培養法を応用し、亘理⁸¹⁾ が人並に家兎骨髓内細胞の遊走速度を計測して時間的推移を観察し、角南⁸⁷⁾ は墨粒貪喰能に就て方法論的研究より健康人並に病的骨髓内細胞の貪喰能を詳細に研究し、田村⁸²⁾ は各種色素による生体染色を行い、白血球骨髓内諸細胞の染色性を論じている。そこで私はこの三者の実験方法を導入し、末梢血白血球培養に於て好中球機能を把握せんとし、種々実験を行い次の如き成績を得たので茲に報告する。

第2章 実験材料並に実験方法

1) 実験材料

前編に於て述べた如く、健康人末梢血をシリコン塗布採血器具を用いて肘静脈より約10cc採り、これを遠沈して白血球を分離し、次いで白血球層を凝固せしめ、約1mm³の細片として、これを培養原組織とした。

2) 実験方法並に観察方法

前編に述べた方法により海野⁵⁰⁾ 氏載物硝子による被覆培養法を行い、培養経過に従い好中球の遊走速度、墨粒貪喰度並に中性紅生体染色度を観察した。

遊走速度測定：前編に述べた方法により計測した。

墨粒貪喰能：良質の古梅園製紅花墨を用いてリングル氏液にて磨り、その濃度を墨汁の液柱の高さを5mmとして下に置いた白紙上の墨が見え始めるところとし、これを鶏胎圧搾液と1:1の比に混じったものを培養時2滴添加した。培養標本はそのままの位置で37°C 孵卵器に入れて血漿の凝固を待つて裏返しとし、培養開始後3, 6, 9, 12及び24時間後の観察時に再び元に戻して液状成分の附着面より観察した。

白血球の貪喰度は、墨粒子を小、中、大、巨大の4段階に分け次の如くした。

0度：全く墨粒を貪喰せざるもの

1度：小墨粒を1乃至数個貪喰せるもの

2度：中墨粒1乃至3個を喰し、これに小墨粒数個を混ざる程度のもの或は小墨粒のみの時は全顆粒の1/2以下が墨を取れるもの

3度：中墨粒4乃至5個以上或は大墨粒2個迄を含み、これに小墨粒数個を混ざる程度或は小墨粒のみの時は全顆粒の1/2乃至3/4が墨を取れる場合

4度：大墨粒3個以上或は巨大墨粒1個以上を有するもの、小墨粒のみの時は全顆粒の3/4以上が墨を取れる場合

以上の標準のもとに細胞増生帯を放射状に白血球100ヶを数えて平均貪喰度を算出し、培養経過に於けるその推移を観察した。

中性紅生体染色度：Merk製中性紅の0.03%水溶液を作成し、培養時血漿1, 圧搾液1, 染色液1の割合に添加して培地濃度を0.01%とし、培地内の染色液を均等にする為充分混和し、そのままの位置で37°C 孵卵器に入れ、観察時裏返えして細胞の遊出面を観察した。

白血球の染色度は次の如く分類した。

0度：全く染色顆粒を有しないもの

1度：5～6個程度の染色顆粒を有するもの

2度：中等度の染色顆粒乃至少数の融合膨大した染色顆粒を有するもの

3度：多数の染色顆粒乃至は中等数の融合膨大した染色顆粒を有するもの

以上の標準に従つて増生帯中心部の細胞100ヶに就て平均染色度を求め、培養各時期に於ける消長を観察した。

第3章 実験成績

I. 遊走速度

A. 末梢血白血球の遊走速度

各種細胞の最大遊走時の速度は、好中球 17.35 μ /m, 好酸球 14.82 μ /m, 淋巴球 10.52 μ /m, 単球 9.71 μ /m

を示した。

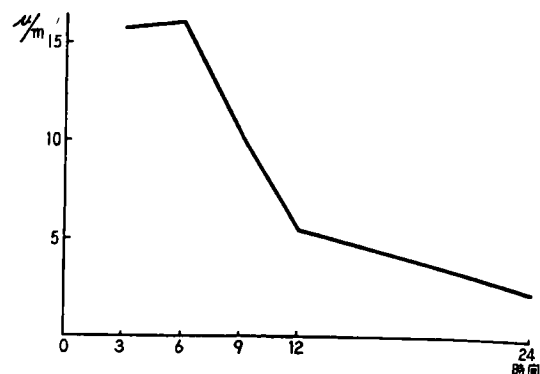
B. 好中球遊走速度の時間的経過 (表1, 図1)

健康人5例の末梢血好中球に就て、培養開始後3, 6, 9, 12及び24時間後の遊走速度を測定しその推移を観察した。

第1表 健康人末梢血白血球培養
好中球遊走速度 (μ /m)

経過時間 例	3	6	9	12	24
I	14.70	16.32	10.62	5.02	2.44
II	16.04	16.78	11.01	6.22	2.98
III	15.92	16.03	10.22	5.54	2.51
IV	15.54	16.09	10.82	5.89	3.02
V	16.30	15.48	9.28	5.03	1.15
平均	15.70	16.14	10.39	5.54	2.42

第1図 健康人末梢血白血球培養
好中球遊走速度



1) 培養3時間後

好中球は原組織周辺に多数遊出し、活潑なアメーバ様偽足運動を行いつつ培地内を遊走する。その遊走速度は最高19.89 μ /m, 最低12.54 μ /m, 平均15.70 μ /mを示した。

2) 培養6時間後

増生帯の増大と共に好中球は更に増加し、偽足を絶えず伸展して旺盛な運動を示す。遊走速度は最高17.35 μ /m, 最低14.95 μ /m, 平均16.14 μ /mと全培養経過を通じて最大の遊走速度を示した。

3) 培養9時間後

遊出好中球は次第に増生帯辺縁に向つて移動し始め、引続き活潑に遊走を示すが速度は少々遅くなり、最高14.89 μ /m, 最低9.23 μ /m, 平均10.39 μ /mを示した。

4) 培養12時間後

好中球は増生帯中間部より周辺部に多数密集し、運動は次第に不活潑となり最高 $6.76\mu/m$ 、最低 $4.81\mu/m$ 、平均 $5.54\mu/m$ を示した。

5) 培養24時間後

好中球の大多数は固有の運動形態を示すが遊走速度は極めて緩慢となり、最高 $2.66\mu/m$ 、最低 $2.15\mu/m$ 、平均 $2.42\mu/m$ を示した。

II. 墨粒貪喰能

A. 末梢血白血球の墨粒貪喰能

1) 好中球

培養初期より多数出現する本細胞は著明な貪喰能を認め、1度乃至4度迄種々の程度の貪喰度を示す。

2) 好酸球

培養初期より次第に出現するが、培養経過中終始貪喰能を認めない。

3) 好塩基球

末梢血中甚少しか認め得ない本細胞は全く貪喰能を有しない。

4) 淋巴细胞

培養経過中終始貪喰能を認めない。

5) 単球

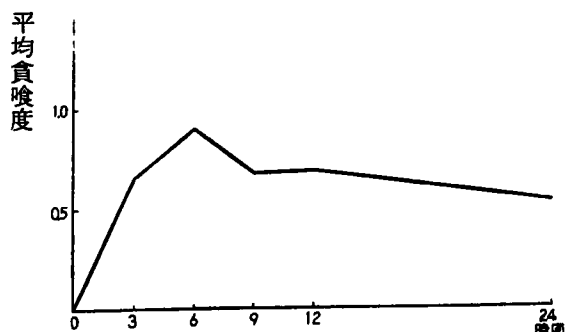
増生帯への出現が遅い単球は貪喰能が強く3度乃至4度の貪喰度を示すものが多数を占める。

B. 好中球平均墨粒貪喰度 (表2, 図2)

第2表 健康人末梢血白血球培養
好中球墨粒貪喰度

経過時間 例	3	6	9	12	24
I	0.93	0.83	0.46	0.55	0.48
II	0.60	1.18	0.79	0.77	0.50
III	0.47	0.73	0.65	0.53	0.54
IV	0.76	1.04	0.84	0.65	0.52
V	0.55	0.75	0.74	0.96	0.63
平均	0.66	0.90	0.68	0.69	0.53

第2図 健康人末梢血白血球培養
好中球墨粒貪喰度



5例の健康人末梢血好中球に就て、培養開始後3, 6, 9, 12及び24時間後の墨粒貪喰像並に平均貪喰度を観察した。

1) 培養3時間後

培地内には不整形の墨粒子が無数に沈澱し、好中球は既に多数のものが貪喰能を示し、主として微細及び小墨粒子を胞体内に散在性に認める。平均墨粒貪喰度は最高0.93、最低0.47、平均0.66を示した。

2) 培養6時間後

貪喰能は更に活潑となり胞体内の墨粒子は漸次凝集して、大、中、小種々の大きさを示し、中には巨大墨粒子を認めるものも現われる。平均墨粒貪喰度は最高1.18、最低0.73、平均0.90と最高貪喰度を示した。

3) 培養9時間後

好中球は6時間後と同様の貪喰像を示すが、一部は巨大顆粒が分解し、微細墨粒子の放出を始める。貪喰度は最高0.84、最低0.46、平均0.68と少々低下を示した。

4) 培養12時間後

遊走速度の減退したものでは墨粒子の放出が徐々に行われ、運動の活潑な細胞は尚著明な貪喰像を示す。平均墨粒貪喰度は最高0.96、最低0.53、平均0.69を示した。

5) 培養24時間後

好中球の運動が次第に衰えると共に胞体内の墨粒子は微細なものは可成り放出されるが、尚小、中墨粒子を止めているものが多い。平均墨粒貪喰度は最高0.63、最低0.48、平均0.53を示した。

III. 中性紅生体染色

A. 末梢血白血球の生体染色所見

1) 好中球

染色液添加直後より著明な染色性を示し、染色顆粒は初め微少、同大であるが経過と共に次第に融合し大小不同となる。色調は中等度紅色を呈する。

2) 好酸球

顆粒の染色は好中球より少々遅れるが殆んど同時に染色され、大きさは終始変化せず染色顆粒の融合膨大を認めない。色調は好中球より淡い。

3) 好塩基球

好酸球と同様多数の顆粒が一様に染色され、大部分が小円形を呈し染色顆粒は融合しない。色調は少々濃い紅色を示す。

4) 単球

染色顆粒は大小種々で著明に融合膨大し、中等度紅色より次第に濃紅色を呈し、特有な花冠状の配列を示

す。

5) 淋巴细胞

少数の濃紅染する微小染色顆粒を認め、膨大及び増加が著明でない。

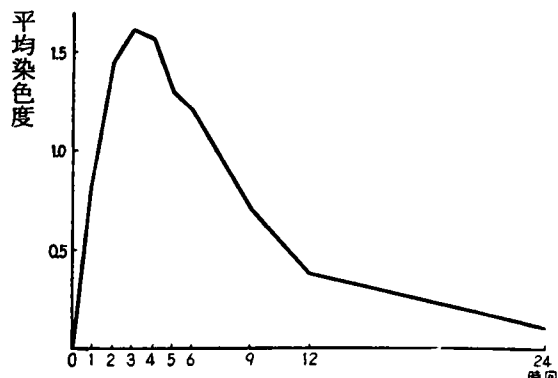
B. 好中球平均染色度 (表3. 図3)

5例の健康人末梢血に就て、中性紅溶液添加培養開始後1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12及び24時間後の染色度を夫々測定し、その消長を観察した。

第3表 健康人末梢血白血球培養
好中球中性紅生体染色度

例	経過時間	1	2	3	4	5	6	9	12	24
I		0.95	1.63	1.80	1.37	1.02	0.90	0.50	0.23	0
II		1.04	1.95	1.86	1.62	1.21	1.25	0.73	0.30	0.19
III		0.42	0.80	1.44	1.90	1.80	1.75	0.93	0.60	0.02
IV		0.72	1.06	1.10	1.08	0.88	0.63	0.44	0.33	0.21
V		1.11	1.78	1.93	1.89	1.59	1.52	0.96	0.47	0.16
平均		0.84	1.44	1.62	1.57	1.30	1.21	0.71	0.38	0.11

第3図 健康人末梢血白血球培養
好中球中性紅生体染色度



1) 培養1時間後

遊出好中球には既に多数の染色顆粒が認められ、その大きさは微小、同大のものが殆んどを占める。平均染色度は最高1.11, 最低0.42, 平均0.84を示した。

2) 培養2時間後

染色顆粒は更に増加し融合像も散見される。

平均染色度は最高1.95, 最低0.80, 平均1.44を示した。

3) 培養3時間後

染色は更に進み、染色顆粒は融合或は膨大の像が著明となり、大きさは大小不同で大型のものは略々正円形を呈し、微小顆粒では分子運動を行うものもみられる。平均染色度は最高1.93, 最低1.10, 平均1.62と培養全経過を通じて最高値を示した。

養全経過を通じて最高値を示した。

4) 培養4時間後

染色顆粒は3時間後と殆んど同様の像を呈するが、平均染色度は少々低下し最高1.90, 最低1.08, 平均1.57を示した。

5) 培養5時間後

全般に染色顆粒は漸次褪色を始め、平均染色度は最高1.80, 最低0.88, 平均1.30を示した。

6) 培養9時間後

細胞の遊走速度の減退と共に平均染色度は引き続き低下し、最高0.96, 最低0.44, 平均0.71を示した。

7) 培養24時間後

好中球は尚運動能を有するものが多いが染色顆粒は殆んど褪色し、最高0.21, 最低0, 平均0.11を示した。

第4章 総括並に考按

私は末梢血白血球培養に於て好中球機能を窺わんとし、その遊走速度、墨粒貪喰能及び中性紅生体染色を検討し、以上の結果を得たが之等の成績を総括して考按を加える。

まず好中球遊走速度の時間的経過を観察するに、培養開始3時間後より活潑な遊走を示し、培養6時間後に最大遊走速度に達し、以後次第に低下し、培養12時間後では最高時の約1/2を示し、更に培養24時間後では甚だ緩慢となり、最高時の約1/4を示した。

墨粒貪喰能では各種白血球の貪喰能をみるに、好中球、単球及び粒球は貪喰能を示し、特に単球には最も強い貪喰能を認めたが、好酸球、好塩基球及び淋巴细胞は培養中全く貪喰能を示さなかつた。好中球平均貪喰度の推移では、培養3時間後より次第に貪喰像を認め、培養6時間後に最高平均貪喰度を示し、以後軽度に変動しつつ緩慢に低下し、全体に緩やかな曲線を示した。

中性紅生体染色では各細胞共全て染色性を有し、好中球の染色顆粒は初め微小同大であるが次第に融合し不同となり、色調は中等度紅色を示し、好酸球は一時に殆んど顆粒が染色され、融合膨大せず色調は好中球より淡く、好塩基球は同様に小顆粒が同時に濃染し融合せず、単球では濃染せる顆粒が著明に融合膨大し、特徴ある花冠状の配列を呈し、淋巴细胞は少数の微小な濃い顆粒を認め夫々特徴を示した。平均染色度の時間的経過では、染色液添加後より著明に染色され、培養3時間後に最高値を示し以後次第に低下して、24時間後殆んど褪色した。

抑々末梢血白血球の遊走速度に関しては古くから研究が行われ、Philipsborn,⁸⁵⁾ Comandon,⁵⁾ Jolly,²²⁾ 植木⁴⁷⁾、杉山⁸⁸⁾、小野田⁸⁴⁾等の業績がみられる。之等研究者の健康人末梢血白血球の最大遊走速度と私の実験による数値とを比較すれば、Philipsbornは40 μ /m、植木は26.94 μ /m、小野田は27.7 μ /mと従来の測定値が少々大である。この数値の差は培養観察と超生体観察との差によるものと考えられ、私の場合は一定の深さを有する培地中に於て細胞が自由運動を行うため、従つて上下しつつ遊走する距離を平面的に計測することになり、一方従来の観察では硝子面に密着して一平面を遊走する距離である為、細胞機能は組織培養に於てより良く保たれているに拘らず、却つて遊走速度は低い値を示したものと解される。即ち従来の成績では実験開始後6時間前後で遊走速度が停止しているが、私の実験では24時間後尚遊走を認めている。

次に教室 亘理⁸¹⁾の健康人骨髓培養による成熟好中球の遊走速度では、培養3時間後最高速度を示し、以後漸次低下しているが、私の末梢血好中球では培養6時間後最高値を示し、骨髓のそれと略々同値を示し以後次第に低下している。これは骨髓培養では、骨髓内新生好中球の遊走機能が未熟でそれが頂点に達する前を観察し、末梢血白血球培養ではその機能が逆に少々低下しつつある場合を計測する為と考えられる。

墨粒貪喰能に就ては従来幾多の研究が行われているが末梢血白血球に関しては Jacobstal²¹⁾、山下⁵⁴⁾、谷⁴⁸⁾、宇佐美⁴⁹⁾等が人並に家兎に就て超生体観察を試みている。私は教室角南⁸⁷⁾が考案した方法に従い実験を試みたが、各種白血球の喰能では前述の如く好中球、単球は著明な貪喰像を示し、淋巴球では喰能をみなかつた。従来は末梢血では単球の方が低いと云われたが、これは超生体観察では観察時間が短い為である。好酸球並に好塩基球では貪喰を示さず、山下、谷等の結果と相違しているが、骨髓培養による報告では、いずれも貪喰像を示さず、唯鉤虫症、白血病等にて病的に好酸球増多のみられる場合に喰像を認めたと述べている。

好中球貪喰度の時間的推移では、従来の実験は短時間の観察であつて培養による長時間の経過をみた記載はない。私の結果を骨髓培養に於けるそれと比較すれば、最高貪喰度は末梢血では0.90に対し、骨髓では1.95と遙かに高く又骨髓では培養初期に貪喰度の急激な低下を示し以後緩慢に減じている。これは骨髓と末梢血とで白血球の貪喰能に差のある事を示すものであり、又私の成績では骨髓に於てみられる貪喰能の初期低下

を認めなかつたが、これは末梢血では骨髓に於ける如く分裂、成熟が起らずすべて成熟せる好中球が遊走して来る為と考えられる。

血球の超生体染色に就ては Sabin⁴¹⁾が考案してより幾多の研究が行われ、末梢血白血球に就ては本邦杉山、森が超生体染色により観察している。各種白血球の中性紅染色所見では、好中球の染色顆粒は初め微小同大で漸次膨大し不同となり中等度紅色を示し、好酸球及び好塩基球は大部分の顆粒が殆んど同時に染色され融合が著明でなく、色調は好酸球は好中球のそれより少々淡く、好塩基球は濃染し、森⁸⁸⁾の超生体染色所見と一致している。又単球の染色顆粒は融合膨大が極めて著明で、色調は経過に従い次第に濃染し特徴ある花冠状配列を示し、淋巴球の染色所見と共に Sabin 等の所見と同様の像を認めた。

好中球中性紅染色度の時間的経過をみるに培養初期より著明に染色され、3時間後最高染色度を示し、以後漸次褪色を始め、24時間後殆んど褪色した。これを教室 田村⁸²⁾の骨髓培養所見と比較するに、骨髓に於ては染色液添加5時間後に染色度最高となり、且つ末梢血好中球より可成り低い染色度を示している。この所見は細胞の生活力の低下したものの程早期に高度に染色すると云う教室田村の理論より考えれば、骨髓組織培養に於ける好中球に比し本法により培養された末梢血好中球は生体染色の面で機能低下を示すものであると云える。

第5章 結 論

組織培養法により健康人末梢血白血球の細胞機能を窺わんとし遊走速度、墨粒貪喰能並に中性紅生体染色を種々検討し次の結論を得た。

1) 好中球は培養3時間後既に活潑な遊走を示し、培養6時間後更に旺盛となつて遊走速度は培養全経過を通じて最高の値を示し、以後次第に低下して24時間後極めて緩慢な速度となる。

2) 各種白血球の墨粒貪喰能をみるに、好中球、単球は著明な貪喰像を示し、特に単球は貪喰度最も高く、好中球がこれに次ぎ、好酸球、好塩基球及び淋巴球では墨粒貪喰能を認めない。

3) 好中球の平均貪喰度は、培養6時間後に於て培養全経過を通じて最高の値を示し以後緩慢に低下した。

4) 各種白血球の中性紅生体染色をみるに、好中球及び単球は初め少数の顆粒が淡く染色され時間の経過と共にその数を増し、各染色顆粒は融合膨大し、特に単球では特徴ある花冠状配列を示す。好酸球、淋巴球

は淡紅色に、好塩基球は深紅色に夫々全顆粒が殆んど同時に染色され染色顆粒の融合が著明でない。

5) 好中球中性紅生体染色度は、培養初期既に高値を示し、培養3時間後培養全経過を通じて最高の値を示し、以後次第に褪色を始め、培養9時間後には染色液添加直後と略々同値となり、培養24時間後には殆んど褪色する。

擱筆するに当り終始御懇篤な御指導御校閲を賜った恩師平木教授に深甚の謝意を表すると共に、日夜御熱心なる御助言を戴いた教室角南講師に感謝する。

(本論文の要旨は昭和32年日本血液学会第19回総会に於て発表した)

(文献後掲)

Fundamental and Clinical Studies on Peripheral-Leucocyte Culture Part 2. The Function of Neutrophils in the Peripheral-Leucocyte Culture of Normal Persons

Tamotsu SOGAWA

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

In order to observe the cell function of peripheral leucocytes of normal persons by means of tissue culture, the author studied the wandering velocity, carbon-particle phagocytosis and neutral-red vital staining of cells from various angles; and arrived at the following conclusions:

1. Neutrophils begin to wander about actively already after 3 hours' culture, and after 6 hours' their behavior becomes still more vigorous, showing the maximum wandering velocity at this stage; but thereafter it gradually decreases, and after 24 hours' the wandering becomes very sluggish.
 2. In pursuing the carbon-particle phagocytosis of various leucocytes, neutrophils and monocytes reveal a marked phagocytosis; especially the phagocytosis of monocytes is highest, followed by that of neutrophils; but no phagocytosis can be recognized in eosinophils, basophilocytes, and lymphocytes.
 3. The average phagocytic capacity of neutrophils after 6 hours' culture reaches its maximum, but thereafter it declines very slowly.
 4. As for the degree of stain to neutral-red vital staining in various leucocytes, at first a few granules in neutrophils and monocytes are stained lightly, but with the lapse of time numbers of these granules gradually increase and these stained granules, swelling up by confluence, present a peculiar arrangement in a form of rosette. In eosinophils and lymphocytes all granules are stained light red, and in basophilocytes these are stained deep red. All these granules are stained almost simultaneously, but the confluence of stained granules are not so marked.
 5. The neutral-red vital staining of neutrophils is quite high already at the early stage of culture, and reaching the maximum after 3 hours' culture, thereafter it gradually begins to fade and 9 hours' after it is about the same degree of stain as that immediately after the addition of neutral red. It is almost completely faded after 24 hours' culture.
-