

簡易骨髓組織培養法に関する研究

第 2 編

健康人及び諸種血液疾患々者骨髓内
好中球の生体染色に就て

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木 潔教授）

副 手 大 亀 学

〔昭和34年1月12日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒 言	II. 再生不良性貧血
第2章 実験材料並びに実験方法	III. 無顆粒細胞症
第3章 実験成績	VI. 本態性色素性貧血
A. 健康人骨髓	V. 悪性貧血
B. 諸種血液疾患々者骨髓	第4章 総括並びに考按
I. 白血病	第5章 結 論

第1章 緒 言

私は前編に於ては教室考案の簡易骨髓組織培養法を用いて、健康人及び諸種血液疾患々者骨髓内好中球の墨粒貪喰能を観察し、この面から見て本法が臨床従来組織培養法と略々同様の価値を有する事を認め、更に本編では中性紅生体染色に就て観察を行つた。

抑々生体染色とは動物の生体内に色素を注入し、その生活組織に於ける沈着の状態並びに種々なる運命を辿つた後に色素が体外に排泄されるまでの状況を追求するのが目的である。

一 従来生体染色の本態に関しては極めて多種多様の議論が繰返されて、未だその定説を見ない。生体染色の研究は清野¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾³¹⁾によつて大成され、生体染色細胞の本態究明に関する輝しき業績があり、その後組織培養法の進歩により速水及び田中²⁹⁾、Ruszel⁶⁸⁾、Hoffmann⁴⁹⁾、Pollitzer⁶⁴⁾、Roffo⁶⁷⁾、加門⁶⁾、服部²⁸⁾等は家鶏胎心、肺、肝、脾等の体外培養に種々色素を使用して生体染色の研究を行つてゐる。又末梢血白血球の生体染色に就ては、杉山¹⁶⁾、森³⁴⁾³⁵⁾、野手²⁵⁾等は人及び家兎白血球で夫々諸種色素を使用して生体染色並びに超生体染色を観察してゐる。然し従来骨髓組織培養による骨髓細胞の生体

染色に関する研究は Grossmann⁴³⁾ が海溟に就て中性紅の染色所見を多少記載し、Weitzmans & Posern⁷²⁾ が人に就てヤーヌス緑の染色を行つてゐるに過ぎない。教室田村¹⁹⁾ は骨髓組織培養法による生体染色に就て詳細なる研究を行い数量的に観察した結果、生体染色により細胞の機能の一端を窺い得るものと述べてゐる。

私は本編では簡易骨髓組織培養法を用いて、健康人及び諸種血液疾患々者骨髓内好中球の生体染色に就て、時間的推移を追つて詳細に観察し、従来組織培養法による教室田村¹⁹⁾ の成績と対比検討したので茲に報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

実験器材：

前編にて記述したものを用いた。

実験材料：

前編に述べた健康壮年者10例、及び諸種血液疾患々者19例（バンチ氏病を除く）に就て胸骨々髓穿刺を行つた。

教室田村¹⁹⁾ は中性紅溶液の培地濃度を0.01%となる様にしたが、私は予め生理的食塩水にて溶解した0.2%中性紅溶液を実験に際してビタミン B₁₂ (100 γ /cc) 溶液と1:9の割合に混和して濃度を

0.02%とし、これを培地に加える事によつて培地濃度は0.01%となる。

実験器具はメスを除き他はすべて乾熱滅菌して用いた。

実験方法：

血清及び添加液は1cc ツベルクリン注射器で1/3針を使用し量比を一定にした。先づ骨髓穿刺液中の組織液中の組織片を取り出してリングル氏液で充分洗い、載物硝子上に血清1滴を置き直径1.5cmの円形に拡げる。次にその中央に骨髓組織片を置いてその上に予めビタミンB₁₂(100 γ /cc)溶液と混和した0.02%中性紅溶液1滴を滴下し培地濃度0.01%中性紅溶液とする。その後その上を被覆硝子で覆い、周囲をパラフィンにて密封し、孵卵器(37°C)に被覆硝子の面を下に向けて入れる。観察する時は再び元に戻して油浸対物レンズにより観察する。

染色度の強さは教室田村¹⁰⁾の方法に準じた。即ち

(-)：全く染色顆粒を認めないもの。

(+)：少数の染色顆粒を認めるもの。

(++)：中等数以上の染色顆粒或は少数の融合膨化した顆粒を認めるもの。

(+++)：多数の染色顆粒或は中等以上の融合膨化した顆粒を認めるもの。

以上の基準のもとに増生帯中間部の白血球数100個を数え、細胞1個の平均染色度を算出した。

観察は中性紅溶液添加後1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24時間と時間を追つて行つた。

第3章 実験成績

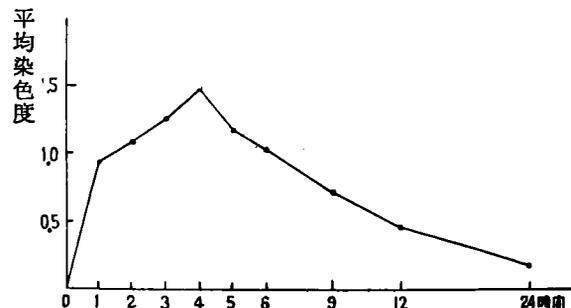
A. 健康人骨髓

健康人10例について夫々増生帯中間部の成熟好中球の平均染色度を求めた。即ち中性紅溶液添加後1時間では最高0.62、最低0.50、2時間では最高0.86、最低0.64、3時間では最高1.05、最低0.86、4時間では最高1.22、最低1.06、5時間では最高1.12、最低0.84、6時間では最高0.98、最低0.70、9時間では最高0.68、最低0.52、12時間では最高0.56、最低0.32、24時間では最高0.28、最低0.20を示した。又10例平均値の平均染色度は第1表、第1図に示す如くで中性紅溶液添加後1時間では0.56、2時間では0.73、3時間では0.90、4時間では1.12、5時間では0.96、6時間では0.82、9時間では0.62、12時間

第1表 健康人骨髓好中球中性紅生体染色

経過時間	染 色 度				平均染色度
	0	1	2	3	
1時間	48.8	46.5	4.7	0	0.56
2	38.5	50.5	11.0	0	0.73
3	27.8	54.9	17.3	0	0.90
4	13.6	61.2	25.2	0	1.12
5	23.2	56.3	20.5	0	0.96
6	34.0	49.8	16.2	0	0.82
9	47.6	42.7	9.7	0	0.62
12	64.0	30.3	5.7	0	0.42
24	78.9	18.7	2.4	0	0.23

第1図 健康人骨髓好中球中性紅生体染色
(10例平均値)



では0.42、24時間では0.23を示し、中性紅溶液添加後4時間が最高で以後漸次褪色した。

B. 諸種血液疾患々者骨髓

I. 白血病

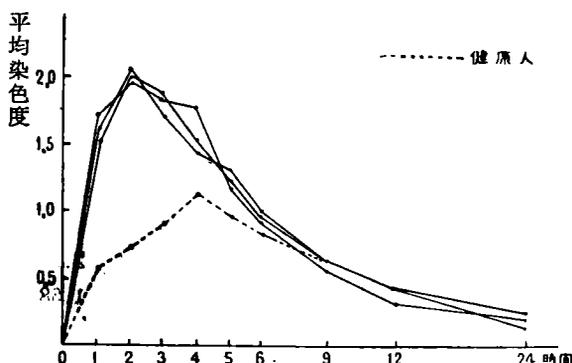
1) 急性骨髓性白血病

重症の3例について夫々平均染色度を求めるに、第2表、第2図の如く中性紅溶液添加後1時間では

第2表 急性骨髓性白血病患者骨髓内好中球中性紅生体染色

患者名	患者名		
	森下	大月	大西
経過時間	平均染色度	平均染色度	平均染色度
1時間	1.62	1.71	1.51
2	2.06	2.00	2.03
3	1.70	1.81	1.85
4	1.44	1.77	1.52
5	1.31	1.16	1.22
6	0.99	0.91	0.95
9	0.62	0.58	0.60
12	0.44	0.33	0.45
24	0.14	0.20	0.22

第2図 急性骨髓性白血病患者骨髓内好中球中性紅生体染色

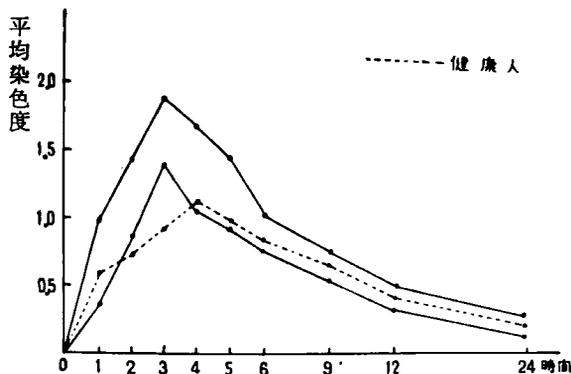


1.62, 1.71, 1.51, 2時間が最高で2.06, 2.00, 2.03, 以後褪色し始め3時間では1.70, 1.81, 1.85, 4時間では1.44, 1.77, 1.52, 5時間では1.31, 1.16, 1.22, 6時間では0.99, 0.91, 0.95, 9時間では0.62, 0.58, 0.60, 12時間では0.44, 0.33, 0.45, 24時間では0.14, 0.20, 0.22で, 健康人に比して早期に高度に染色し, 且褪色も急速であつた。

第3表 亜急性骨髓性白血病患者骨髓内好中球中性紅生体染色

患者名	谷原	越智
経過時間	平均染色度	平均染色度
1時間	0.97	0.36
2	1.43	0.85
3	1.91	1.41
4	1.70	1.08
5	1.45	0.91
6	1.02	0.76
9	0.75	0.52
12	0.50	0.32
24	0.25	0.12

第3図 亜急性骨髓性白血病患者骨髓内好中球中性紅生体染色



症状の比較的軽い亜急性型の2例について夫々平均染色度を求めるに, 第3表, 第3図の如く中性紅溶液添加後1時間では0.97, 0.36, 2時間では1.43, 0.85, 3時間が最高で1.91, 1.41, 以後褪色し始め4時間では1.70, 1.08, 5時間では1.45, 0.91, 6時間では1.02, 0.76, 9時間では0.75, 0.52, 12時間では0.50, 0.32, 24時間では0.25, 0.12で, 健康人に比して早期に高度に染色し, 且急速に褪色した。

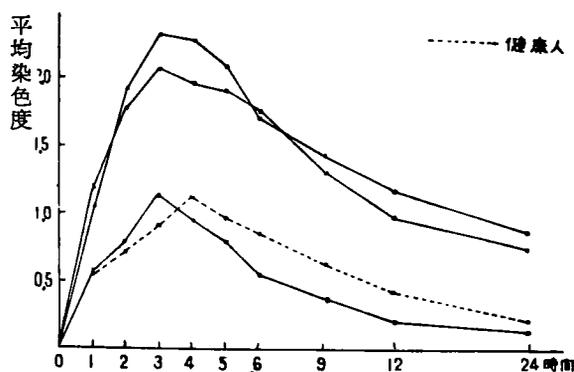
2) 慢性骨髓性白血病

3例について夫々平均染色度を求めるに, 第4表, 第4図の如く中性紅溶液添加後1時間では1.04,

第4表 慢性骨髓性白血病患者骨髓内好中球中性紅生体染色

患者名	河相	尾崎	鎌田
経過時間	平均染色度	平均染色度	平均染色度
1時間	1.04	1.19	0.59
2	1.93	1.78	0.78
3	2.33	2.08	1.14
4	2.27	1.95	0.94
5	2.10	1.90	0.77
6	1.73	1.75	0.53
9	1.44	1.32	0.39
12	1.18	0.98	0.20
24	0.86	0.74	0.14

第4図 慢性骨髓性白血病患者骨髓内好中球中性紅生体染色



1.19, 0.59, 2時間では1.93, 1.78, 0.78, 3時間が最高で2.33, 2.08, 1.14, 以後褪色し始め4時間では2.27, 1.95, 0.94, 5時間では2.10, 1.90, 0.77, 6時間では1.73, 1.75, 0.53, 9時間では1.44, 1.32, 0.39, 12時間では1.18, 0.98, 0.20, 24時間では0.86, 0.74, 0.14で, 健康人に比して早期に高度に染色したが, 褪色は緩慢であつた。

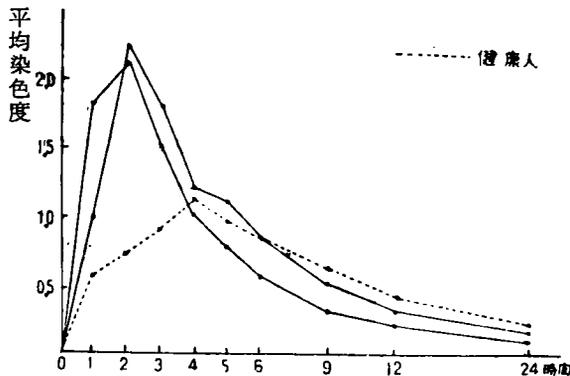
3) 単球性白血病

2例について夫、平均染色度を求めるに、第5表、第5図の如く中性紅溶液添加後1時間では1.84、

第5表 単球性白血病患者骨髓内好中球中性紅生体染色

患者名	長瀬	大坪
経過時間	平均染色度	平均染色度
1時間	1.84	1.00
2	2.14	2.25
3	1.50	1.80
4	1.04	1.20
5	0.79	1.10
6	0.58	0.82
9	0.31	0.50
12	0.24	0.33
24	0.10	0.17

第5図 単球性白血病患者骨髓内好中球中性紅生体染色



1.00, 2時間が最高で2.14, 2.25, 以後急速に褪色し始め3時間では1.50, 1.80, 4時間は1.04, 1.20, 5時間では0.79, 1.10, 6時間では0.58, 0.82, 9時間では0.31, 0.50, 12時間では0.24, 0.33, 24時間では0.10, 0.17で、健康人に比して早期に高度に染色し、且早期に褪色した。

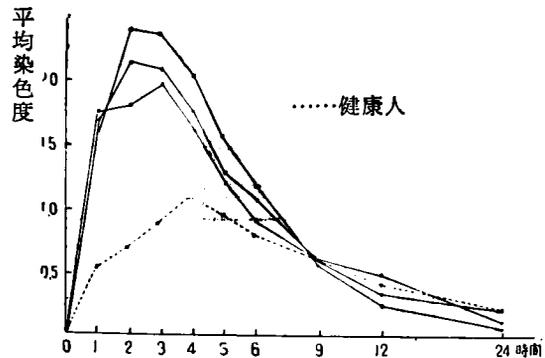
II. 再生不良性貧血

3例について夫々平均染色度を求めるに、第6表、第6図の如くでその中2例は中性紅溶液添加後1時間では1.70, 1.62, 2時間が最高で2.15, 2.43, 以後褪色し始め3時間では2.11, 2.38, 4時間では1.78, 2.09, 5時間では1.30, 1.58, 6時間では1.10, 1.20, 9時間では0.64, 0.58, 12時間では0.47, 0.26, 24時間では0.12, 0.10を示し、他の1例は中性紅溶液添加後1時間では1.75, 2時間では1.83, 3時間が最高で

第6表 再生不良性貧血患者骨髓内好中球中性紅生体染色

患者名	渡辺	藤原	石川
経過時間	平均染色度	平均染色度	平均染色度
1時間	1.70	1.75	1.62
2	2.15	1.83	2.43
3	2.11	2.00	2.38
4	1.78	1.62	2.09
5	1.30	1.22	1.58
6	1.10	0.92	1.20
9	0.64	0.63	0.58
12	0.47	0.36	0.26
24	0.12	0.20	0.10

第6図 再生不良性貧血患者骨髓内好中球中性紅生体染色



2.00, 以後褪色し始め4時間では1.62, 5時間では1.22, 6時間では0.92, 9時間では0.63, 12時間では0.36, 24時間では0.20で、健康人に比して早期に高度に染色し、且急速に褪色した。

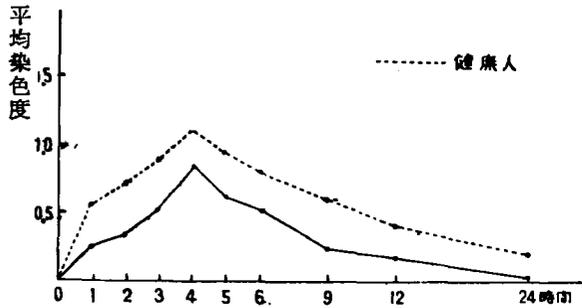
III. 無顆粒細胞症

第7表、第7図に示す如く平均染色度を求めるに、

第7表 無顆粒細胞症患者骨髓内好中球中性紅生体染色

患者名	伏見
経過時間	平均染色度
1時間	0.25
2	0.32
3	0.55
4	0.85
5	0.63
6	0.54
9	0.23
12	0.18
24	0.03

第7図 無顆粒細胞症患者骨髓内好中球中性紅生体染色



中性紅溶液添加後1時間では0.25, 2時間では0.32, 3時間では0.55, 4時間が最高で0.85, 以後腿色し始め5時間では0.63, 6時間では0.54, 9時間では0.23, 12時間では0.18, 24時間では0.03で, 健康人に比して低値を示した。

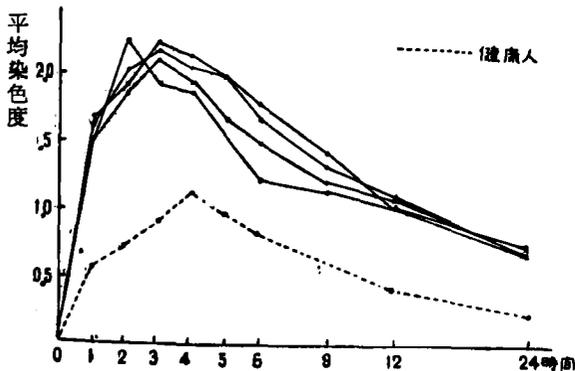
VI. 本態性低色素性貧血

4例について夫々平均染色度を求めるに, 第8表, 第8図の如くでその中3例は中性紅溶液添加後1時

第8表 本態性低色素性貧血患者骨髓内好中球中性紅生体染色

患者名	中山	川相	藤原	中本
経過時間	平均染色度	平均染色度	平均染色度	平均染色度
1時間	1.54	1.68	1.61	1.53
2	2.25	1.94	2.03	1.85
3	1.91	2.24	2.22	2.13
4	1.86	2.14	2.05	1.94
5	1.52	1.97	1.92	1.67
6	1.23	1.79	1.68	1.50
9	1.16	1.44	1.32	1.20
12	1.02	1.02	1.10	1.08
24	0.69	0.71	0.67	0.73

第8図 本態性低色素性貧血患者骨髓内好中球中性紅生体染色



間では1.68, 1.61, 1.53, 2時間では1.94, 2.03, 1.85, 3時間が最高で2.24, 2.22, 2.13, 以後腿色し始め4時間では2.14, 2.05, 1.94, 5時間では1.97, 1.92, 1.67, 6時間では1.79, 1.68, 1.50, 9時間では1.44, 1.32, 1.20, 12時間では1.02, 1.10, 1.08, 24時間では0.71, 0.67, 0.73を示し, 他の1例は中性紅溶液添加後1時間では1.54, 2時間が最高で2.25, 以後腿色し始め3時間では1.91, 4時間では1.86, 5時間では1.52, 6時間では1.23, 9時間では1.16, 12時間では1.02, 24時間では0.69で, いづれも健康人に比して早期に高度に染色したが, 腿色は緩慢であつた。

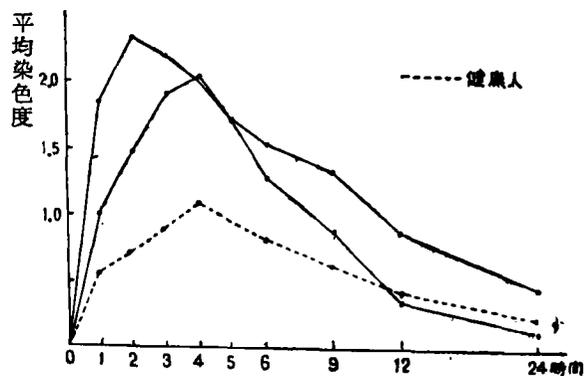
V. 悪性貧血

第9表, 第9図に示す如く治療前, 治療後の平均染色度を求めるに, 治療前は中性紅溶液添加後1時

第9表 悪性貧血患者骨髓内好中球中性紅生体染色

患者名	佐伯	
	治療前	治療後
経過時間	平均染色度	平均染色度
1時間	1.85	1.01
2	2.32	1.46
3	2.17	1.90
4	2.00	2.02
5	1.68	1.67
6	1.28	1.54
9	0.88	1.10
12	0.37	0.87
24	0.11	0.49

第9図 悪性貧血患者骨髓内好中球中性紅生体染色



間では1.85, 2時間が最高で2.32, 以後腿色し始め3時間では2.17, 4時間では2.00, 5時間では1.68, 6時間では1.28, 9時間では0.88, 12時間では0.37,

24時間では0.11で、健康人に比して早期に高度に染色し、且腿色も早かつたが、治療後は中性紅溶液添加後1時間では1.01, 2時間では1.46, 3時間では1.90, 4時間が最高で2.02, 以後腿色し始め5時間では1.67, 6時間では1.54, 9時間では1.10, 12時間では0.87, 24時間では0.49で、健康人に比して高度に染色したが、腿色は緩慢であつた。

第4章 総括並びに考按

私は教室考案の簡易骨髓組織培養法を用いて、健康人及び諸種血液疾患々者骨髓内好中球の中性紅生体染色に就て、時間的推移を追つて観察した。

抑々生体染色とは動物の生体内に色素を注入し、その生活組織に於ける沈着の状態並びに種々なる運命を辿つた後、色素が体外に排泄される状況を追求するものであり、生活細胞の機能としては絶えず物質代謝を営んでいるが、他方体内又は体外から有機的、無機的物質の作用により細胞自体の生活機能は調整され、或は障碍されている。

従来形態学の研究の多くは細胞の死後の形態学的所見からその生活時の状態や細胞の種類を類推しようとするのであり、この場合固定による細胞の変化によつて本来の正しい姿を把握することは出来ない。細胞の染色に於ても生体外に取り出して死亡した細胞の染色と、所謂生体染色による生活細胞の染色とは自ら全く別の様相と意義を有する。更に従来広く行われている超生体染色も生活細胞の末期に於ける機能の一部を観察するに過ぎない。

然るに組織培養法では少くとも培養の初期には細胞は盛に発育増殖を営み、その生活現象は恐らく生体内に於けると、余り変りないであろうと思われる。

扱て従来生体染色の本態に関しては多種多様の議論があるが、清野¹⁰⁾11)12)31)等はその実験成績を綜合して次の如く結論している。即ち生体染色及び超生体染色及び超生体染色によつて現われる顆粒は一般に既存の顆粒物質で、唯一定の場合に原形質の離相(Protoplasmatische Entmischung)と云うものが与るものであり、染色機転は色素と顆粒状基質との電氣的吸着であつて、これに色素の拡散性及び濃度、細胞の内外の水素イオン濃度、動物の体温又は周囲の温度が夫々一定の影響を与えると云い、又生体染色を生物学的に観ると、生体内に侵入した色素と云う毒物を一方は速かに排泄器等によつて体外に駆逐されると同時に、他方一定の細胞物質に結合した色素は再び徐々に遊離して体外に排泄される。

生体染色を物理化学的に観ると、細胞内に侵入した色素粒子は細胞顆粒に静電氣的に吸着されてその遊離エネルギーを減少する。色素の排泄により周囲の色素濃度が減少すると顆粒表面に於ける吸着平衡は破れて、結合していた色素は再び遊離して徐々に細胞外に去るものである。

藤浪³¹⁾は高等動物の死戦期に超生染性が強まるのは、細胞膜の透過性に變化を來し、多量の色素分子が原形質中に移行するが、若しくは細胞色素排泄作用の減少を來すのであると述べている。

又服部²⁸⁾は塩基性色素顆粒の細胞内出現は酸性色素顆粒に比べ遙に短時間内に行われ、この事は時間の経過するに従つて、即ち細胞の活動力の減退するに従つて更に速かに行われるもので、塩基性色素が細胞内に顆粒となつて現われるのは細胞の能働的作用によつて細胞内に摂取された色素が顆粒基質に沈着すると云うよりは、むしろ単に細胞内に侵入して顆粒基質に染着すると云う所謂死後染色の状態に近い感じが深いと述べ、一方顆粒基質は色素液を以て飽和されているので、新に包素を摂取しえないのであらうと云い、一度褪色した顆粒基質に色素が結合されないとすれば、この色素嗜好顆粒は既に色素と結合すべき或る力を失つているか、又は細胞膜の色素透過性に變化を來し色素の侵入を阻止するためであらうと述べている。教室田村¹⁹⁾は骨髓組織培養法による生体染色の詳細なる研究を行い、病的骨髓細胞は塩基性色素により早期に高度に染色し、且早期に褪色することを認めている。早期染色、高度染色に関しては膜透過性の亢進及び染色顆粒の機能低下による色素反撥力の減弱に基くものであらうと述べ、早期褪色に関しては細胞機能低下により、顆粒破壊に基く色素放出のためだらうと述べている。又諸種色素を種々の濃度で添加実験を行い、培地に対する至適濃度を検索しているが、中性紅では0.05~0.02%の如く濃厚すぎると顆粒染色は早期に且高度に出現するが、細胞の機能は速かに障碍されて衰え、早期に脱色乃至死後染色を呈し、且細胞増生も速かに停止し、又遊走も停止し所謂超生体染色と何ら異なる処がなくなる。之に反し0.002~0.001%の如く稀薄すぎると細胞増生、遊走速度等の機能は高度に現われるが、染色性は甚だ低値を示す。この他種々の濃度に於ける細胞機能、染色性等を比較観察し、可及的細胞の旺盛なる時期にそれ相応の染色性を示し、稍々長時間生存せるままで観察し得る濃度は0.01%か0.05%であるが、この両濃度は殆んど同程度の細

胞機能を現わし得るので0.01%を以て至適濃度としたと述べている。私の実験に於ても教室田村¹⁹⁾に従つて中性紅の培地濃度を0.01%とした。

私の得た成績では、先づ健康人成熟好中球の平均染色度は中性紅溶液添加4時間後最高で1.12を示し、従来の組織培養法を用いて行つた教室田村¹⁹⁾の成績によれば中性紅溶液添加5時間後最高0.75であるのに比して若干早く染色し、且より高い平均染色度を示したが、以後緩慢に褪色した。本法が従来の組織培養法と比較して若干早く最高平均染色度を示し、且それが高値であること、緩慢な褪色を示すことは、好中球機能低下のみならず、本法が従来の組織培養法と異り、ヘパリン加血漿と鶏胎圧搾液の代りに培地として血清及びビタミン B₁₂ を用いたことにも関聯があると考えられる。本法でも従来の組織培養法と同様に中性紅生体染色性は長時間維持されるし、顆粒破壊に基く色素放出による細胞機能低下を認める点から超生体観察によるものよりはより生体内に於ける状態に近いと考えられる。

次に諸種血液疾患々者骨髓内成熟好中球の染色度を観察したが、その結果は従来の組織培養法で得られた結果と略々類似した。先づ白血病では全例共早期に高度に染色したが、特に急性型は早期に褪色を示し、慢性型に比し褪色は緩慢であつた。次に再生不良性貧血では全例健康人に比して早期に高度に染色し、且早期に褪色した。無顆粒細胞症では健康人に比して低値を示した。本態性色素性貧血は健康人に比して早期に高度に染色したが褪色は緩慢であつた。又悪性貧血では治療前、治療後共に健康人に比して高度に染色したが、褪色は治療前は少々早く、治療後は緩慢であり、培地中のビタミン B₁₂ によつて細胞機能の回復は見られなかつた。

以上要するに、本法でも骨髓内好中球の中性紅生体染色性は長時間維持され、健康人及び、諸種血液疾患々者に於て従来の組織培養法と略々類似した結

果を示したと云えよう。

第5章 結 論

以上私は血清とビタミン B₁₂ を培地とする教室考案の簡易骨髓組織培養法を用い、健康人及び諸種血液疾患々者骨髓内好中球の中性紅生体染色を検索し、且つその結果を従来の組織培養法即ちヘパリン加血漿及び鶏胎圧搾液を用いた場合と比較検討し、次の結論を得た。

1) 健康人成熟好中球の平均染色度は中性紅溶液添加4時間後最高で1.12を示し、以後緩慢に褪色した。

2) 白血病では骨髓内成熟好中球は健康人に比して早期に高度に染色し、急性型は早期に褪色し、慢性型は急性型に比して褪色は緩慢であつた。

3) 再生不良性貧血では骨髓内成熟好中球は健康人に比して早期に高度に染色し、且急速に褪色した。

4) 無顆粒細胞症では骨髓内成熟好中球は健康人に比して低値を示した。

5) 本態性低色素性貧血では骨髓内成熟好中球は健康人に比して早期に高度に染色したが、褪色は緩慢であつた。悪性貧血では治療前、治療後共に高度に染色したが、褪色は治療前が若干早く、治療後は緩慢であつた。

6) 以上の成績は中性紅生体染色の面から従来の組織培養法の結果に比し僅かに劣るが、墨粒貪喰能検索の場合と同じく、その手技の簡便さからみて臨床応用には寧ろ本法の方が優れていると云つてよい。

擱筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師平木教授並びに角南講師に深甚なる謝意を表す。

(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)

Studies on Bone-Marrow Tissue Culture, the Simple Method of
our Own Device

Part 2. Vital Staining of Neutrophils in the Bone Marrow
of Normal Persons and Patients with Various
Blood Diseases

By

Manabu Ōkame

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

With the use of the simple bone-marrow tissue culture, the method devised in our laboratory, in the medium composed of serum and vitamin B₁₂, the author studied the neutral red vital staining of neutrophils in the bone marrow of both normal persons and patients with various blood diseases. These results were compared with those obtained by the conventional method using the medium composed of plasma mixed with heparin and chick embryo juice; and the author arrived at the following conclusions:

1. The average stain of mature neutrophils in the case of normal persons reaches the maximum of 1.12 within 4 hours after the addition of neutral red solution, fading gradually thereafter.

2. In the case of leukemia mature neutrophils in the bone marrow are stained more deeply at an early stage as compared with those of normal persons; and in the acute leukemia they fade at an early stage, and in the chronic leukemia they fade more slowly than those of acute leukemia.

3. In the case of hypoplastic anemia mature neutrophils in the bone marrow are stained deeper and earlier than those in normal persons, and also they fade more quickly.

4. In the case of agranulocytosis mature neutrophils are stained more lightly than those in normal persons.

5. In the case of essential hypochromic anemia mature neutrophils in the bone marrow are stained more deeply and earlier than those in normal persons, but fading more slowly. In the case of pernicious anemia these neutrophils are stained more deeply both before and after the treatment than those in normal persons, but as for the fading before and after treatment, the former is slightly faster than the latter.

6. These results indicate that, although this method is slightly inferior to the conventional method from the standpoint of neutral red vital staining, it is rather a superior method for clinical application because of its simplicity in manipulation the same as in the study of the carbon-particle phagocytosis.
