611-086~85: 611-018.46 : 578.085.23

骨髄体外組織培養に於ける生体染色の研究

第 3 編

臨 床 的 応 用

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木 潔教授）

専攻生 田 村 甫

〔昭和33年6月10日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒 言
第2章 実験材料並びに実験方法
第3章 実験成績（1）
健康家兎骨髄体外組織培養に対する諸疾患々者血清並びに脾抽出液添加及び諸疾患々者骨髄体外組織培養
第1節 各種貧血
1) 再生不良性貧血症
2) 所謂バンチ氏病
3) 鉤虫症
4) 本態性低色素性貧血症
5) 急性失血性貧血症
第2節 その他の血液疾患
1) ウエルホーフ氏病
2) 白血病
a) 慢性骨髄性白血病
b) 単球性白血病
3) ビキニ水爆症
附）放射線障害家兎
第3節 血液疾患以外の疾患
第4章 実験成績（2）
一定時間培養後に於て色素液を添加した場合
第5章 総括並びに考按
第6章 結 論
附 全編の総括
参考文献

第1章 緒 言

本編に於ては第1編及び第2編の基礎的実験に則り，骨髄培養に於ける生体染色の臨床諸疾患えの応用を試みた．

従来組織培養の臨床的応用は極めて少く，外国では Meyer[45] が人の子宮粘膜，胎盤，子宮悪性腫瘍を培養し，之に対するラヂウム，X線，ホルモン等の影響をみており，又 Osgood & Brownlee[51] は悪性貧血患者骨髄の液体培養に対する血清の影響をみ，又その他 Israël[26]，Fischi & Astaldi[10] も血液疾患の骨髄培養を試みており，本邦に於ては飯塚[24]—館石教教授門下に於て家鶏胎児心，肺組織培養を用いて主として糖尿病，結核の研究が行われている位のものである．更に臨床的応用として組織培養を行い，之に色素を応用せる業績は内外共に之を見ない様である．此の様に臨床的応用の少いのは，直接臨床家の手に依る組織培養の研究が少い為であろうと思われる．

茲に於て私は家兎骨髄培養に対する患者血清，脾エキス添加実験及び患者自身の胸骨々髄培養を行い，之等に中性紅に依る生体染色を施して観察した結果，主として諸血液疾患の診断，予後，治療等の諸面に於て聊か本法独自の新境地を開拓することが出来たので報告する．尚この臨床応用の裏付けの実験として健康家兎骨髄を一定時間培養して後に色素を添加し，細胞機能と染色との関係を観察したので同時に報告する．

第2章 実験材料並びに実験方法

第1編記載の如き条件下の健康家兎大腿骨々髄並びに患者骨髄及び血清，脾エキス等に就いて第1編記載と同様の方法にて中性紅に依り生体染色を施し実験した．尚実験の対照として健康人血清，胃潰瘍患者剔出脾エキス及び健康人胸骨々髄を用いた．

第3章 実験成績（1）

健康家兎骨髄体外組織培養に対する諸疾患々者血清並びに脾抽出液添加及び諸疾患々者骨髄体外組織培養

諸血液疾患の催貧血性因子の存在に関しては従来より甲論乙駁にて，認められてもその因子が果して骨髄に直接働くか否か，更にその機序の詳細に関しては判明していない．

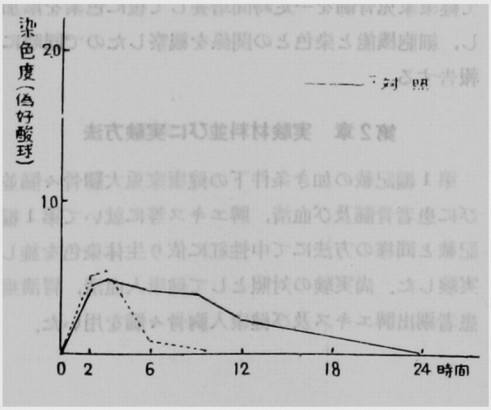
私は貧血を主徴とする各種貧血（再生不良性貧血症，所謂バンチ氏病，鉤虫症，本態性低色素性貧血症，急性失血性貧血症），其他の特定血液疾患（ウエルホーフ氏病，白血病，ビキニ水爆症）及び血液疾患以外の諸症患（肝硬変症，悪性腎硬化症，肺結核，カラアザール）の三群に分けて実験を行つた．

第1節 各種貧血

1） 再生不良性貧血症

本症血清中の催貧血性因子については既に古くFranke[12]（1939）が本症患者血清を健康人末梢血及び胸骨穿刺液に添加して白血球崩壊因子（Leukotoxin）を認めたのが最初である．又家兎に対する催貧血作用を認めたのは李[54]が最初である．本邦に於ては其の後浜西[17]，説田[63][64]，長谷川[18]等も血清中の催貧血性因子を認めており，又教室の池田[23]は本症患者の血清のみならず尿，脳脊髄液中にも催貧血性因子を確認し更に夫は酸性分劃中にある事を認めている．之に反し河北[27]は血清中の催貧血性因子を認めず，脾エキス中にのみ認めている．私は数例の本症患者血清を家兎骨髄に添加培養した所細胞の遊出著明に少く，培養2時間後既に変性に陥る少数の偽好酸球及び好酸球を認め，又偽好酸球の染色状態は第1図の如く，対照に比し早期に且つ高度に染色

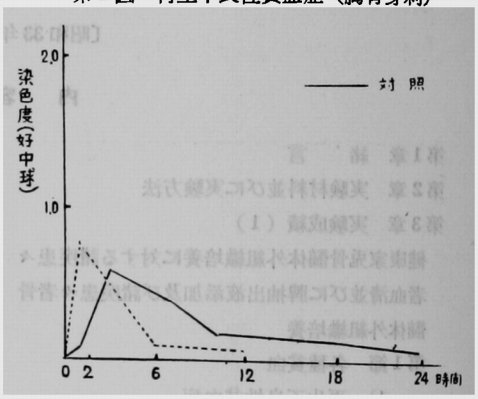
第1図 再生不良貧血症（血清添加）



され且つ早期に褪色を行い生体染色の面に於て細胞機能の低下を示している．之に依つて骨髄に対して血清中の催貧血性因子が直接働き，其の機能を著しく低下せしめていると云う事を確認する事が出来た．即ち換言すれば本症血清中には直接骨髄に働き白血球系の増生を抑制し機能を低下せしめる因子の存在する事が明らかである．

次に胸骨々髄培養に於ては第2図の如く血清添加

第2図 再生不良性貧血症（胸骨穿刺）



の際と全く同様著明に機能低下の像を示した．之は教室亘理[73]，角南[58]の認めている他の培養所見（細胞増生，墨粒貪喰能等）と共に本症の特徴にして，診断上極めて重大な価値を有するものである．

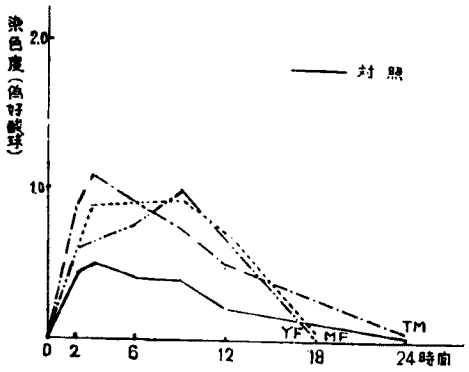
2） 所謂バンチ氏病

本症患者の脾抽出液を家兎に注射すると催貧血作用が認められる事は飯塚[24]，安川[75]，阿南[2]等が夙に云つているが，更に昭和18年末友田[69]教授及び其の門下に依つて所謂脾性中毒症の脾生理食塩水抽出液，血清，脳脊髄液，尿に催貧血性因子を認められ，又教室の小林[37][38]も脾「リンゲル」氏液及び同「アセトン」抽出液，血清，脳脊髄液，尿に催貧血性因子を認めている．

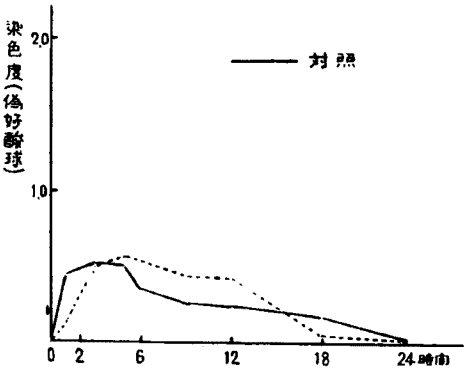
茲に於て私は家兎骨髄培養に対して数例の本症患者血清及び脾「リンゲル」氏液並びに同「アセトン」抽出液を添加し其の生体染色について影響を検討した．

a） 血清添加：剔脾前の同患者血清を家兎骨髄培養に添加するに第3図の如く其の何れの例に於ても対照を凌ぐ早期高度染色，早期褪色の機能低下の染色像を示した．之に対し剔脾後の例に於ては第4図の如く対照と有意の差を認めなかつた．尚此の内代表例の剔脾前後の血液像は第1表の如くである．

第3図　所謂バンチ氏病3例（血清添加）



第4図　所謂バンチ氏病剔脾後（血清添加）

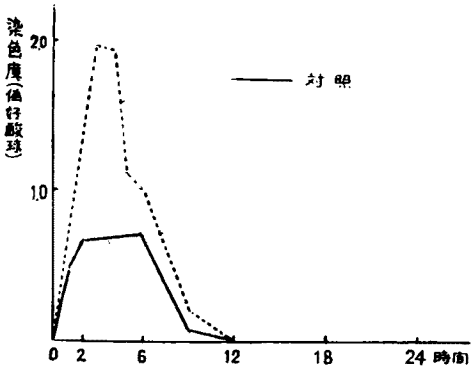


第 1 表

血液所見	血球素量(%)	色素指数	赤血球数(万)	白血球数	網赤血球数(‰)	栓球数	白血球百分率						出血時間
							桿状核	分葉核	リンパ球	好酸球	単球	好塩基球	
剔脾前	48	0.68	355	2000	7	63900	17	39	34	5	5	0	7′30″
剔脾後	76	0.93	411	8400	9	172620	8	66	14	7	5	0	2′30″

b）脾「リンゲル」抽出液添加：剔脾に依り得た脾を「リンゲル」氏液にて処置しその抽出液を家兎骨髄培養に添加しその影響を見るに第5図の如く著明に機能低下を示している．

第5図　所謂バンチ氏病（脾リンゲル抽出液添加）

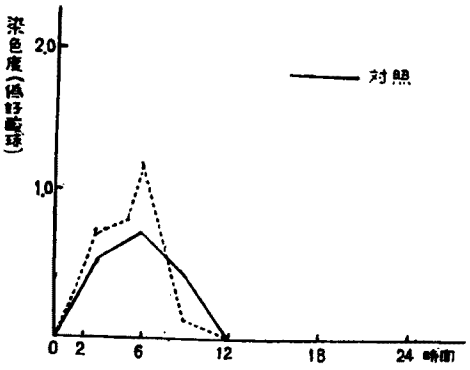


c）脾「アセトン」抽出液添加：前同様にして得た「アセトン」抽出液を家兎骨髄培養に添加しその影響を見るに第6図の如く中等度の機能低下を示している．

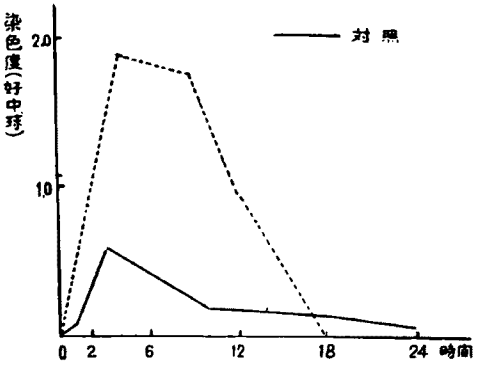
同症患者胸骨々髄培養にあつては第7図の如く著明に機能低下の染色像を示している．

之を前述の再生不良性貧血症のそれと比較するに染色度のみに於ては一見前者より機能低下が高度の

第6図　所謂バンチ氏病（脾アセトン抽出液添加）



第7図　所謂バンチ氏病（胸骨穿刺）

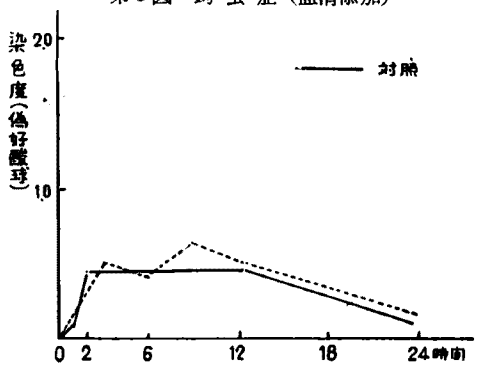


如く見受けられるが，之は培養に際して遊出する細胞の絶対数に著しい差異があるためであつて，骨髄障害の度は勿論前者の方が著しい事は教室亘理[73]，角南[58]等の他の培養成績に於ても明らかである．

3) 鉤虫症

本症血清中の催貧血性子については夙に山田[76]，村田[40]に依り記載せられ，その後北山[30]教授は第47回日本内科学会の宿題報告に於て本症血清中の催貧血性因子を詳細に分析して一種の類脂体とした．又この因子の骨髄に働く機序については平木教授，内藤[19]は骨髄灌流実験に依り骨髄静脈竇内血球抑留作用が一因である事を認めている．私は本因子の骨髄に及ぼす影響を更に詳細に検討するため家兎骨髄培養に対して数例の本症血清を添加し生体染色を施して観察した．結果は骨髄培養に依る他の実験と同様第8図の如く僅かに低下を見るに過ぎない．即ち本

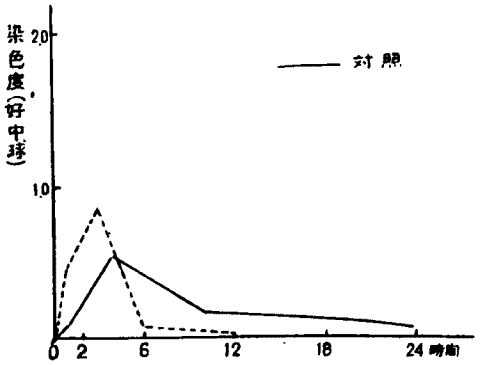
第8図 鉤 虫 症（血清添加）



症血清中の催貧血性物質の骨髄に働く作用は，先に教室で認めた所の骨髄静脈竇内血球抑留作用が主であつて骨髄実質に対する増生抑制作用は殆んど無い事が判明した．

胸骨穿刺材料に依る培養にては第9図の如く機能

第9図 鉤 虫 症（胸骨穿刺）



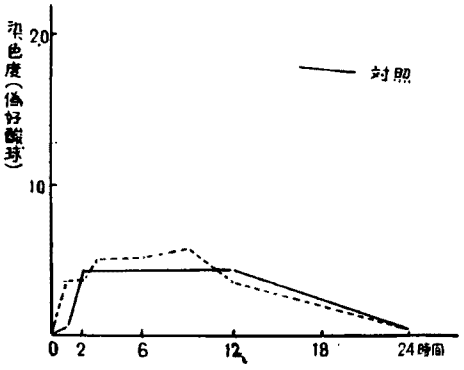
低下は認められるが前2者の如く著しいものではない．特異な事は好中球の染色顆粒に比し帯橙紅色の一見ごろごろした感じの顆粒を持つた好酸球の著明な増加のある事である．

4) 本態性低色素性貧血症

本症血清中の催貧血性因子に就いては説田[64]等は著明で無いとしており，教室池田[23]等も認めていない．

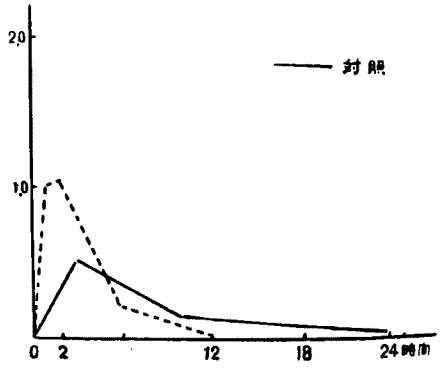
私は数例の本症血清を家兎骨髄培養に添加し之に生体染色を施したが，第10図の如く有意の差は認められなかつた．即ち本症血清中には直接骨髄に働く催貧血性因子は証明されなかつた．

第10図 本態性低色素性貧血症（血清添加）



しかし本症患者胸骨々髄培養に於ては細胞増生，細胞運動停止時間，好中球遊走速度等は略々正常であるが，角南[58]の行つた墨粒貪喰には機能低下を認め，生体染色にても第11図の如く明瞭な機能低下を

第11図 本態性低色素性貧血症（胸骨穿刺）

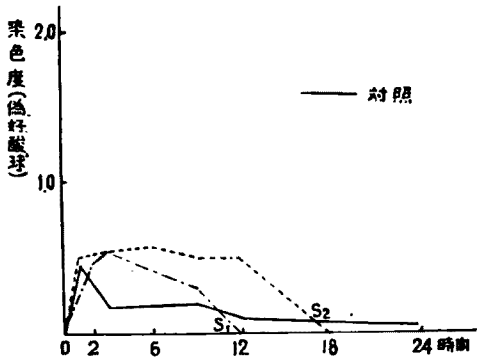


示しており，又之に鉄剤を投与した治療後には機能の正常復帰する点より見て，骨髄そのものに或程度機能低下のあると云う事実は否み難いものと云えよう．

5) 急性失血性貧血症

2例の急性失血性貧血症血清を家兎骨髄培養に添加し2例共第12図の如く生体染色の面からは明らか

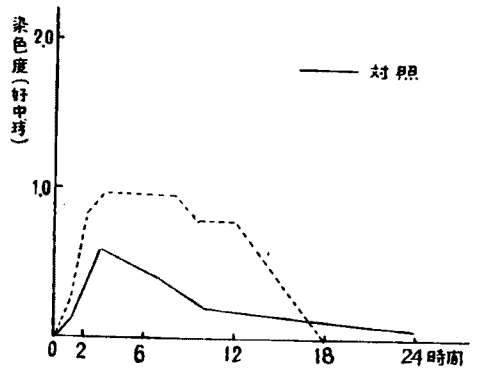
第12図　急性失血症貧血2例（血清添加）



な機能低下を認めた．

又胸骨々髄培養に於ても同様第13図の如くやはり

第13図　急性失血性貧血（胸骨穿刺）



明瞭な機能低下を示している．

扨て吾々の経験よりすれば一般に成熟細胞機能が異常に低下せる場合は各機能面に於て低下し，反対に異常に亢進せる場合は各機能面に於て亢進するのが普通である．然るに教室角南[58]，沼本[48]等の研究によれば急性失血性貧血症に於ては骨髄培養上細胞の増生は著しく且つ好中球の遊走速度も著しく亢進を示しているが，墨粒貪喰能は低下していると云う．私の成績でも前述の様に生体染色の面からは機能低下を示した．即ち本症に於けるこの様な著明な機能解離性は極めて特異であり，個々の成熟好中球は形態的には成熟でも機能的には未熟な濫造細胞で，謂わば不完全成熟好中球とも云うべきものと解される．

第2節　その他の血液疾患

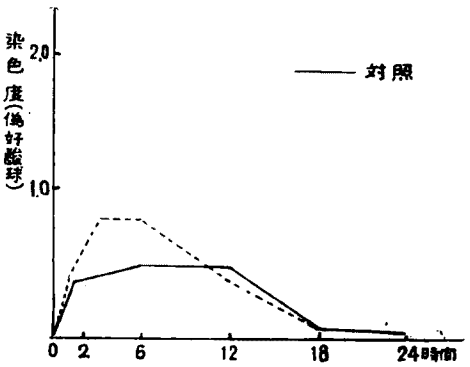
1) 「ウエルホーフ」氏病

Sprague et al[66]，平岡[20]及び教室の小林[39]等は本症血清を家兎に注射して催栓球減少因子を認め，又 Troland & Lee[70]，奥田[49]，平岡[20]及び小林[39]等は同様にして本症脾「リンゲル」氏液及び「アセトン」抽出液中に催栓球減少因子を認めている．

私は本症血清及び脾抽出液を家兎骨髄培養に添加し中性紅生体染色を試みた．

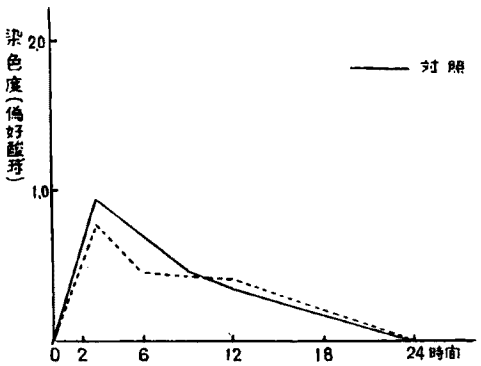
a) 血清添加：第14図の如く或程度の機能低下を

第14図　ウエルホーフ氏病（血清添加）



示した．同症患者中剔脾術を施行した1例の手術後の培養成績は第15図の如く対照と大差無く，機能に

第15図　ウエルホーフ氏病剔脾術後（血清添加）



於て有意の差を認め無かつた．この事は剔脾に依り同症を治癒に導いた事を物語るものである．尚同患者の術前，術後の末梢血液像は第2表の如くである．

b) 脾「リンゲル」氏液抽出液，「アセトン」抽出液添加：共に明らかに機能に対する影響を認め得る成績は得られなかつたが，僅かに1例の

第 2 表

血液所見	血球素量(%)	色素指数	赤血球数(万)	白血球数	栓球数	白血球百分率						出血時間	ルムペルレーデ
						桿状核	分葉核	リンパ球	好酸球	単球	好塩基球		
剔脾前	49	0.59	412	6700	32960	8	67	24	0	1	0	100′	(卅)
剔脾後	77	0.84	460	7500	240000	14.0	37.5	30.0	14.0	4.5	0	2′30″	(−)

みの観察であるので明確な事は云えない.

扨て教室亘理[73]は本症血清を家兎骨髄培養に添加して細胞増生並びに遊走機能にかなり低下を認め,且つ同症剔出脾「リンゲル」抽出液添加にて同様の結果を得,以て本症血清中には脾に由来して直接骨髄に障害的に働く因子の存在する事を認めている.

私の以上の生体染色のみの実験からも確かに本症血清中には或程度直接骨髄に障害的に働く因子の存在する事がうかがわれる.しかしその因子が脾に由来するか何うかは材料の関係上遺憾乍ら明確にする事は出来なかつた.

次に患者胸骨々髄培養に於ける生体染色を試みたが対照に比し有意の差は認め得なかつた.即ち本症血清中には骨髄障害因子が存するが患者骨髄自体には生体染色の面から何等障害は認められないのであり,この事は上記亘理[73]も骨髄細胞増生,遊走機能の面から認めている.

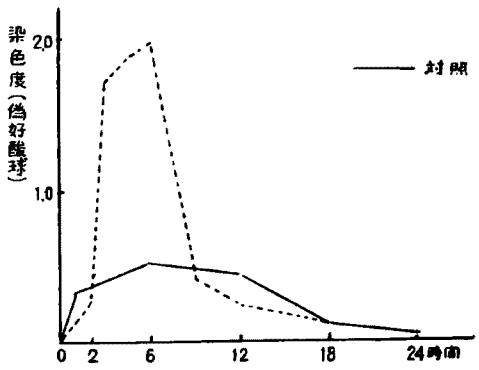
2) 白血病

本症血清中の催貧血性因子は説田[63]等に依り認められており,池田[23]も之を確認している.私は慢性骨髄性白血病(3例)及び単球性白血病(数例)血清を家兎骨髄培養に添加し中性紅生体染色を施しその影響を見た.

a) 慢性骨髄性白血病血清添加

第16図の如く明らかな機能低下を示した.即ち培養後2時間にして既に変性に陥る細胞を認め,出現する細胞も運動性に乏しく諸所に集在し染色度も初期に於ては高度であるが染色液添加後6時間をピークとして比較的急速に脱色して行く.

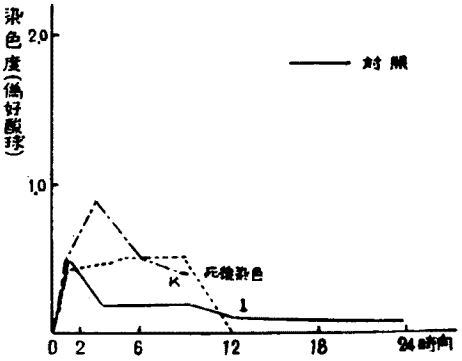
第16図 慢性骨髄性白血病(血清添加)



b) 単球性白血病血清添加

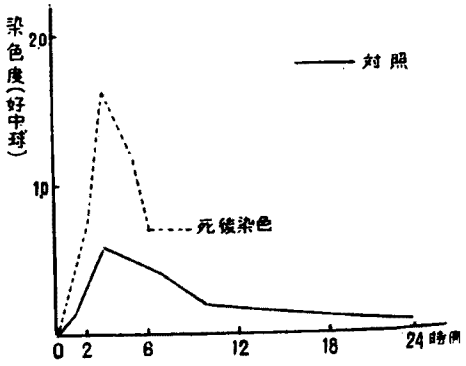
この場合も前者同様機能低下著明にして第17図の如き染色度を示した.特に図中K例の如く,褪色の途次に於て白血球の機能を全く失うに至り,生存して脱色に至るを待たず直ちに死後染色に移行する例のある事を見ても著しい機能低下のある事が判る.

第17図 単球性白血病2例(血清添加)



次に胸骨々髄培養に於ては両者共著明な機能低下を示し,特に単球性白血病の場合は第18図の如く血

第18図 単球性白血病(胸骨穿刺)



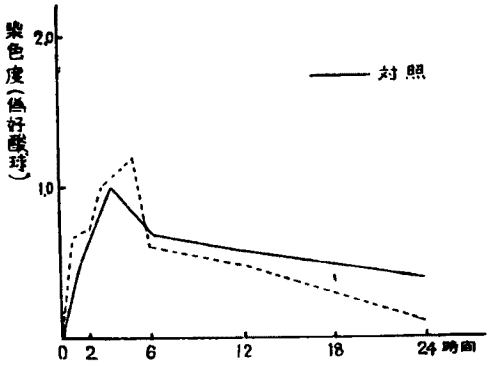
清添加の際見られた所見と同様に褪色の途次死後染色に移行する像を認めた.

以上の如く生体染色の面からみると，白血病患者血清中には直接骨髄に障害的に働く因子の存在する事が分り，之は亘理[73]，角南[58]が骨髄細胞増生，遊走機能，墨粒貪喰能の面で認めている所と一致する．又白血病患者骨髄細胞の機能低下が認められた点も前記の観点からみた亘理[73]，角南[58]の成績と軌を一にするものである.

3)　ビキニ水爆症

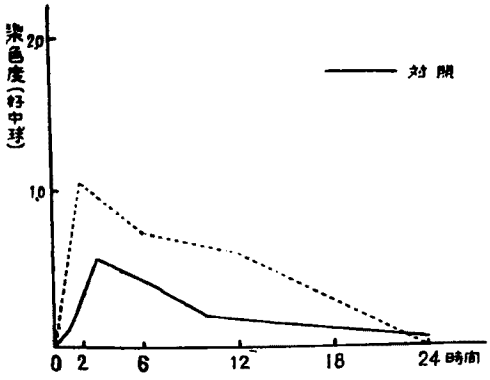
偶々ビキニ水域に於ける被爆患者の血清の家兎骨髄培養に対する影響を見る機会を得た．数例の平均染色度は第19図の如く対照と大差を認めなかつた.

第19図　ビキニ水爆症（血清泳加）



次に入院時白血球減少のある3例及び血清鉄量上昇を認めた1例について胸骨々髄培養を行つた所，第20図の如く生体染色の面で機能低下を認めたが退

第20図　ビキニ水爆症（胸骨穿刺）



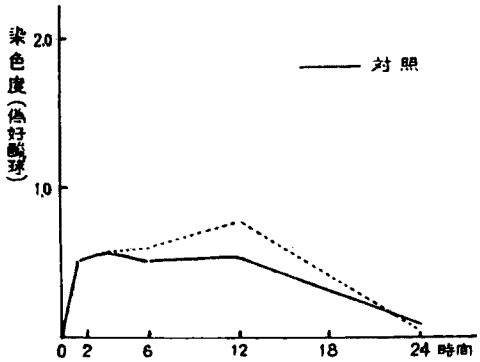
院時には何れも略々正常値を示した.

即ちビキニ被爆患者血清中には直接骨髄を障害する因子は認められないが，患者の一部には骨髄機能低下が認められ，之等の成績は同時に行つた教室亘理[73]，角南[58]の骨髄細胞増生，遊走機能，墨粒貪喰の成績と一致をみた.

附）　放射線障害家兎

上記実験の追加として実験的に 3000 R．照射に依る重症放射線障害家兎を作製し，その血清を健康家兎骨髄培養に添加したが，第21図の如く有意の差

第21図　レントゲン障害家兎（血清添加）



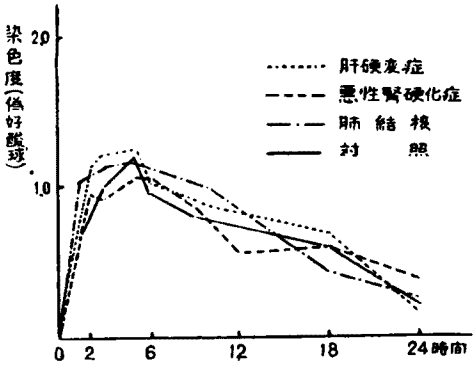
は認められなかつた.

次に同実験家兎骨髄を培養し之に生体染色を施し観察を試みたが再生不良性貧血症の如く細胞の遊出甚だ不良のため観察は不能であつた.

第3節　血液疾患以外の疾患

肝硬変症，悪性腎硬化症，肺結核等について家兎骨髄培養に対する血清添加の影響を見たが第22図の

第22図　血液疾患以外の疾患（血清添加）



如く対照と有意の差を認めなかつた.

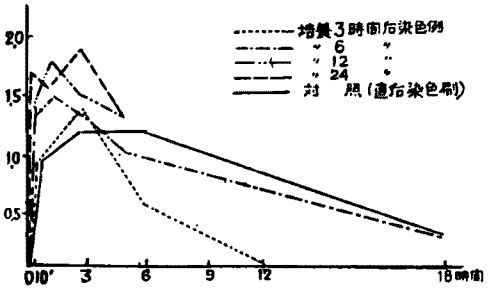
次に重症カラアザール患者の胸骨々髄培養を行つた所著明な機能低下の所見を示した．骨髄はレイシュマニア・ドノバニーの無数の繁殖の為，高度の荒廃に陥つており再生不良性貧血症の所見と何等選ぶ所が無かつた.

第4章 実験成績（2）

一定時間培養後に於て色素液を添加した場合

正常家兎骨髄を型の如く培養し，一定時間後（3, 6, 12, 24 時間）に培地濃度 0.01%中性紅液を添加し更に培養を続行し，逐時偽好酸球の染色状態を観察するに，第23図の如く10分後にして既に対照即

第23図 一定時間培養後に於ける家兎骨髄偽好酸球染色度の推移（0.01%中性紅）



ち培養直後に色素液を添加したものより相当高度に染色されている事を認める．即ち平均染色度は3時間後添加に於ては（以下同じ）0.85, 6時間後は1.3, 12時間後は1.4, 24 時間後は 1.7を示し，之に対し対照は0.5以下を示している．即ち培養後経過時間の長いもの程染色が早期に且つ高度に現われている．又褪色も何れも1～1.5時間後に既に開始しており，最も経過時間の短い3時間後添加例に於ても添加後3時間に至れば急速に褪色を開始している．即ち褪色も培養後経過時間の長いもの程早期に開始されている事が判る．

第5章 総括並びに考按

各疾患に関する臨床的諸事項については既に本文中に於て考察を述べてある為本章に於ては之を省略し，生体染色の本態特に病的骨髄生体染色の理論に関し以下考察を加える事とする．

生体染色の本態については極めて多種多様な議論が繰返されている．

清野[34]，等は生体染色を生物学的に観て，生体内に侵入した色素と云う毒物を一方では排泄器官に依つて体外に駆逐すると同時に，他方では一定の細胞物質に結合した色素を再び徐々に遊離して体外に排泄すると述べ，又生体染色及び超生体染色を物理化学的に観ると，先づ現われる染色顆粒は一般に既存の顆粒物質であつて，之に原形質の雑相（Protoplastische Entmischung）と云う現象が与り，その顆粒基質に対して色素が静電気的吸着を起すものであり，之に依つて色素は遊離エネルギーを失うと述べ，又之に色素の拡散及び濃度，細胞内外の水素イオン濃度，動物の体温又は周囲の温度等が夫々一定の影響を与えるものであると述べている．更に又色素の体外排泄に依り細胞周囲の色素濃度が減少すると顆粒表面に於ける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辞去するものと考えられると云う．

次に勝沼[29]も生染にもあれ超染にもあれ，顆粒と色素との結合は常に化学的に非ずして理学的現象に外ならぬと述べており，又服部[15]も塩基性色素顆粒の細胞内出現は酸性色素顆粒に比し遙かに短時間内に行われ，此の事は時間の経過するに従つて換言すれば細胞の活動力の減退するに従つて更に遠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依つて細胞内に摂取せられた色素が顆粒基質に沈着すると云うよりは，むしろ単に物理的に細胞内に侵入した色素が顆粒基質に染着すると云う所謂死後染色の状態に近いのではないかと云う感じが此の際特に深いと述べている．

更に森田[43]は骨髄穿刺液の超生体染色に就いて，細胞が成熟して活発な遊走能や貪喰能を獲得する頃になると，顆粒の染色性が俄然低下して，大部分は無染に近い状態で残り，単に少数の顆粒のみが強く染色されると云い，此の場合原形質内に侵入して来た中性紅は一部の顆粒の負担に於て其の周囲に集積せられ，他の大部分の顆粒は色素を強く抱き込んで運動を拘束される事を避けて，尚疲労せざる精鋭部隊として残るのであると述べている．此の事は Seyderhelm[67]の述べている細胞が漸次変性し，其の細胞膜が障害されて来ると色素が内部に侵入する様になり，細胞が全く死滅すると原形質及び核を染色すると云う意見と現象的には一致する．

又清野，藤浪[8]も高等動物細胞の死戦期に超染性が強まるのは，細胞膜の透析性に変化を来し，多量の色素分子が原形質中に移行するか，若しくは細胞色素排泄作用の減少を来すのであると述べている．

茲に於て私の行つた前述の第1実験の成績を総括するに，全実験例に於て貧血を来す病例は殆んど全て骨髄細胞は塩基性色素に依り早期に高度に染色せられ，且つ早期に褪色する事が認められた．即ち之は前述の諸家の諸説と一致した現象を更に時間を追

つて詳細に把えたものと云えよう.

此の病的骨髄細胞に於ける塩基性色素の正常より速かに又高度に染色し又正常より早期に褪色すると云う事実は私の他の実験即ち P_{32},「ベンツォール」等抑制物質の添加に於ても見られる. そこで早期高度染色の問題は後に述べるので, 先づ早期褪色に就いて考えるに, 之等抑制物質を添加した時骨髄細胞の増生悪く, 又白血球機能(遊走速度, 墨粒貪喰能)も低下する事を認めているので, 此の事実は明らかにこの塩基性色素の早期褪色は細胞の機能と直接関係がある事を示唆するものである. 即ちこの早期褪色の機転に就いては細胞の病的に機能低下の為色素毒性に依つて清野氏の所謂色素嗜好顆粒が早期に破壊される為ではないかと考えられ, 従つて之より類推すれば正常時色素褪色の機転も同様にして次第に色素嗜好顆粒が破壊されて行く為ではないかと考えられる. 尚又第2実験に於て培養後時間が経過して後色素添加例では培養直後例に比して総て早期に褪色を開始している事実も, 当然前述の理論に基くものであろうと考えられる. 尚塩基性色素は陽荷電であるから, 培地 pH が塩基性側に傾く程染色され易い事が考えられ, Bethe-Rohde[3] も色素摂取に関する所説に於て pH の増加に連れて顆粒染色は迅速となり, 染色顆粒の色調も濃厚となり, pH の小なる酸性混合液を加えると速かに染色顆粒の脱色を来したと述べているが, 私は一応アルカリを添加し pH の酸性側に傾くのを防いで見たが矢張り褪色は普通に行われたし, 又病的骨髄培養では乳酸発生少く, pH はアルカリ性が長く保たれるにも不拘, 却て早期褪色をみるのであるから, 褪色と pH との関係は一応不明瞭と云わねばならない.

次に早期高度染色性に就いて考えるに, 私は先述の第2実験即ち骨髄細胞培養後各時間に於ける染色実験に於て, 塩基性色素に依る顆粒染色は細胞の生活力の減退した時, 例えば培養後時間を経過して色素を添加した時に高度に行われ易いものである事を明確にしており(之は服部[15]の心, 脾に於ける同様の実験とも一致している), 此の点に就いて服部[15]も塩基性色素生体染色には細胞の旺盛な生活力は寧ろ抑制的因子となつていると云つているが, 正に私の第1実験即ち病的条件下の細胞の染色実験は之等の事を別の事実に依つて明確に裏書きしたものと云えよう. 尚此の機能低下して細胞が高度に染色する機転に就いては, 先述の森田[13]の機能旺盛なる細胞に就いての染色理論の逆論去(顆粒機能減弱に基く色素の反撥力の低下)も考えられ, 又 Seyderhelm[67] の膜透過性の亢進も考えられるが, 更に其の詳細なる実態を把握するには尚将来の研究に俟たねばなるまい.

第6章 結 論

私は主として血液疾患々者の血清を家兎骨髄組織培養に添加し, 偽好酸球の中性紅生体染色に対する影響を検討し, 併せて患者胸骨骨髄組織培養に於ける好中球の中性紅生体染色を追求し, 更に裏付けの実験として培養後時間の経過した細胞に対する生体染色を行い, 次の結論を得た.

1) 組織培養に於て細胞機能(遊走性, 墨粒貪喰)の低下している時は中性紅生体染色は早期且つ高度に染色し, 早期に褪色をみる.

2) 培養後一定時間経過後生体染色を施す時も, 培養時間の経過したもの程即ち細胞機能の低下したもの程矢張り早期高度に染色し早期に褪色する.

3) 生体染色上骨髄細胞機能低下の認められた疾患は再生不良性貧血症, 所謂バンチ氏病, 白血病, 急性失血性貧血症, カラアザールである.

4) 同じく稍々機能低下の認められた疾患は鉤虫症, 本態性低色素性貧血症, ウエルホーフ氏病であり, 殆んど認められないのは肺結核, 肝硬変症, 悪性腎硬化症等の血液疾患以外の疾患である.

5) 血清中に生体染色上骨髄機能の低下を来す因子を含む疾患は再生不良貧血症, 所謂バンチ氏病, 急性失血性貧血症, ウエルホーフ氏病, 白血病である.

全編の総括

私は Carrel[5], Fischer[9] の原法を教室で改良した被覆培養法に依り骨髄体外組織培養に於ける生体染色の研究を行つた.

従来の骨髄内細胞の観察法は折角生体外に取出した生存せる細胞をそのまゝ観察する事無く塗抹, 固定して死に至らしめて後に染色を施してその生活時に於ける状態や細胞の種類等を類推する方法であり, 更に一歩進んだ超生体染色法にしてもいわば細胞の死戦期の極く一部の之又アブノーマルな所見に外ならない. そこで私は生体外に取出した細胞を殆んど生体内に於けると同様の生活を営み得る条件で, しかも容易に観察出来る状態に置くため, 骨髄の体外組織培養を行い之に色素液を添加して種々観察を試みた.

而して先づ第1編に於ては服部[15]の心，脾体外組織培養に於て使用した7種の色素に就いて健康家兎骨髄機能（細胞増生並びに機能）に及ぼす影響を検討した．

之に依れば「ゲンチアナ「紫は0.001%及び0.01%の両濃度共抑制的に，中性紅，「メチレン」青，「トリパン」青の低濃度（0.001%）では促進的に，中性紅，「メチレン」青，「トルイジン」青の高濃度（0.01%）では抑制的に，「リチオンカルミン」，「トリジン」青は両濃度共不定に作用する事を認めた．

次で之等色素は細胞に対して多少の差こそあれ何れも毒物であるため，組織及び細胞に最小限に影響し且つ可及的短時間に高度に色素摂取をみる最も適度な量を見出す必要を感じ，色素濃度と比較成長価，偽好酸球の染色度及び遊走速度との関係を明らかにし至適濃度を決定した．

即ち中性紅至適濃度は培地に対し0.01%，「リチオンカルミン」至適濃度は0.03%である．之等は服部[15]の心，脾組織培養の至適範囲と略々一致する．

次で第2編に於ては各骨髄細胞の生体染色の様相を考究せんとし，骨髄体外組織培養に対して中性紅，「リチオンカルミン」に依る生体染色を施し逐時的観察を試みた．

先づ中性紅は「リチオンカルミン」に比し染色性甚だ著明である．

又家兎骨髄偽好酸球は人骨髄好中球に比し染色性が遙かに鮮明である．

骨髄培養に依り細胞増生帯え出現する細胞に対する中性紅染色性は，細胞種に依り特異性があるので，本法に依れば細胞鑑別が一目瞭然である．

又中性紅に依る家兎骨髄偽好酸球の染色度の時間的推移を観察するに，色素液添加直後より染色開始し，培養5時間前後で最高となり以後次第に褪色し始め24～30時間で殆んど褪色する．

更に第3編に於ては以上の基礎的実験に則り之を臨床的に応用し，主として諸血液疾患の診断，治療，予後等の諸面に於て独自の新境地を開拓する事が出来た．

即ち病的に機能低下せる場合は生体染色に於ては早期，高度染色，早期褪色を呈する事を知つた．この事は清野[34]，杉山[61]，勝沼[29]，森田[43]等の諸家が各々述べた所と略々一致する．

又培養後一定時間経過して色素液を添加せる場合は，時間の経過の最長のもの即ち最も機能低下せるものより順次上記の現象を呈したので，上記の法則を別の事実より証明し得た事となつた．

擱筆するに当り終始御懇篤なる御指導御校閲を賜つた恩師平木教授並びに大藤助教授に深甚なる謝意を表す．

（本論文の要旨は昭和29年3月第16回日本血液学会総会に於て発表した．）

参 考 文 献

1) 天野重安：血液学の基礎(上)，丸善，昭23.
2) 阿南光義：京城医専紀要，8，317，昭13.
3) Bethe-Rohde Zit. n. Kiyono, 1933.
4) Bisceglie, V.: Archiv f. Entwicklungsmech. d. Organismen, 108, 708, 1926.
5) Carrel, A.: Berlin. Klin. Wochschr., 48, 1364, 1911.
6) Carrel, A., M. T. Burrows. J. A. M. A., 55, 1379, 1910.
7) Erdmann, R.. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 15, 96, 1917.
8) 藤浪鑑，清野謙次：生体染色の研究の現況及び其検査術式，大10.
9) Fischer, A.: J. Exp. Med., 34, 447, 1921.
10) Fischer, A., G. Astaldi Arch. f. Exp. Zellforsch., 24, 241, 1940～42.
11) Firquet, J.. Zit. n. Takigawa. Bull. Johns-Hop. Hosp., 33, 271, 378, 1922.
12) Franke, E.. Zeitsch. f. Gesamt. Exp. Med., 104, 406, 1939.
13) Foot, M. D.: J. Exp. Med., 17, 43, 1913.
14) Grossmann, W.: Beitr. Zur Path. Anat. u. Zur Allg. Path., 72, 195, 1924.
15) 服部鉦三：日微病学誌，24，71，89，105，127，149，165，昭5.
16) 速水猛，田中正治：日病会誌，2，287，291，大2.
17) 浜西寿三郎他：日血会誌，15，264，昭27.
18) 長谷川弥人：血液討議会報告，7輯，248，昭29.
19) 平木潔，内藤博士：岡山医学会雑誌，62，186，昭25.
20) 平岡佳郎：日血会誌，16，397，昭28.
21) Harrison, R. G.. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 4, 140, 1907.

22) Hoffmann, P.: Folia haematologica, 18, 130, 1914.
23) 池田隆：岡山医学会誌, 67, 43, 65, 85, 昭31.
24) 飯塚直彦：京都医学雑誌, 19, 24, 127, 大10.
25) Ingebrigtsen, R.: J. Exp. Med., 15, 397, 1912.
26) Israël, M. C. G.: J. Path. a. Bact., 50, 145, 1940.
27) 河北靖夫：第14回日本医学会総会特別講演, 昭30.
28) 加門英夫：日本薬物学会誌, 7, 115, 昭3.
29) 勝沼精蔵：清野に依る, 昭8.
30) 北山加一郎：日本内科学雑誌, 39, 259, 昭25.
31) 北山加一郎：臨床の進歩, 4, 82, 昭25.
32) 木村廉：組織培養, 南条書店, 昭22.
33) 清野謙次：日病会誌, 2, 295, 大2.
34) 清野謙次他：生体染色綜説総論, 南江堂, 昭8.
35) 清野謙次：日微会誌, 16, 257, 大11.
36) 清野謙次：生体染色の研究, 昭4.
37) 小林正：岡山医学会誌, 68, 1471, 昭31.
38) 小林正：綜合臨床, 5, 昭31.
39) 小林正他：日本内科学雑誌, 45, 7, 昭31.
40) 村田恭造：実験医学雑誌, 27, 206, 昭18.
41) 森喜久男：十全会雑誌, 33, 962, 1151, 1518, 1532, 1697, 昭3.
42) 森喜久男：十全会雑誌, 34, 1221, 1252, 1745, 昭4.
43) 森田博道：血液及び組織の新研究と其の方法(杉山繁輝著), 361, 昭27.
44) Maximow, A.: Arch. f. Mik. Anat., 96, 494, 1922.
45) Meyer, R.: Zit. n. Ishibashi, J. Clin. End. Metab., 3, 123, 1953.
46) 野手雅信：十全会雑誌, 33, 708, 748, 1126, 1455, 1609, 昭3.
47) 野手雅信：十全会雑誌, 34, 529, 1040, 昭4.
48) 沼本徹郎：岡山医学会雑誌, 70, 63, 昭33.
49) 奥田邦雄：医療, 6, 301, 580, 昭27.
50) Osgood, E. E., I. Brownlee J. A. M. A., 107, 123, 1937.
51) Osgood, E. E., I. Brownlee: J. A. M. A., 108, 1793, 1937.
52) Osgood, E. E.: J. A. M. A., 109, 933, 1937.
53) Pollitzer, G.: Zeitschr. f. wiss. Biof. ab. B., 1, 644, 1924.
54) 李東洋：日血会誌, 4, 429, 昭15.
55) Russel, D. G.: Journ. of Exp. Med., 20, 545, 1914.
56) Roffo, A. H.: Bol. dellinst. de med. exp., 1, 369, 1925.
57) Roffo, A. H.: Prensa méd. argentina, 12, 481, 1925.
58) 角南宏：岡山医学会雑誌, 68, 1191, 昭31.
59) 杉山繁輝：日微会誌, 16, 257, 1505, 大11.
60) 杉山繁輝：十全会雑誌, 34, 1370, 昭4.
61) 杉山繁輝：血液及び組織の新研究と其の方法, 昭27.
62) 清水一夫 日微病学誌, 26, 1174, 昭7.
63) 説田武：日血会誌, 16, 209, 昭28.
64) 説田武 日血会誌, 17, 279, 昭29.
65) Sabin, F. R.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 32, 314, 1921.
66) Sprague, C. C. et al.: J. A. M. A., 150, 1193, 1952.
67) Seyderhelm Zit. n. Kiyono, 1933.
68) 友田正信：治療, 36, 413, 昭29.
69) 友田正信：脾性中毒症, 金原, 昭29.
70) Troland, C. E., F. C. Lee: J. A. M. A., 111, 221, 1938.
71) 上与那原朝珍：海軍々医学雑誌, 46, 184, 大13.
72) 上与那原朝珍：日病会誌, 15, 28, 大14.
73) 亘理善治：未刊.
74) Weissmann, G., E. Posem: Mitt., Virchows Arch. Path. Physiol. Klin. Med., 299, 458, 1937.
75) 安川星三：京城医専紀要, 10, 305, 昭15.
76) 山田正徳 同上, 8, 391, 昭13.

Studies on Vital Staining in the Bone-Marrow Tissue Culture

Part 3. Clinical Application of Vital Staining in Bone-Marrow Tissue Culture

By

Hajime Tamura

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

By adding the serum of patients with varicus blocd diseases to the medium of bone-marrow tissue culture of rabbits, the author studied mainly its influence on the vital staining of pseudoeosinophils with neutral red. At the same time the author pursued vital staining of neutrophils in the bone marrow of the sternum from the same patients with neutral red; and as for the verification of the study, the cells that had been cultured for several hours were vitally stained. As the result the author arrived at the following conclusions:

1. When the cell functions (wandering velocity and carbon-particle phagocytosis) are low during the tissue culture, vital staining by neutral red takes place fast and highly but the stained color fades quickly.

2. Also when the vital staining is done after fixed intervals of culture, the longer the time of culture is, namely, at the time when the cell functions are further diminished, the more prompt and the higher is the staining and also the fading takes place more quickly.

3. Those patients showing lowered cell functions on the vital staining of bone marrow are aplastic anemia, Banti's disease, leukemia, acute bleeding anemia and kala-azar.

4. Likewise those who show a slight lowering in the cell functions are ancylostomiasis, essential hypochromic anemia and Werlhof's disease; and those whose functions are hardly lowered are those patients suffering from lung tuberculosis and malignant nephrosclerosis, namely, not from blood diseasses.

5. On vital staining the sera that possess factors of lowering the functions of bone marrow are those of aplastic anemia, Banti's disease, acute bleeding anemia, Werlhof's disease, and leukemia.