

骨髓組織培養に於ける墨粒貪喰能の研究

第一編

方法論並びに一般的観察

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

助手 角 南 宏

〔昭和 31 年 4 月 23 日受稿〕

内 容 目 次

第 1 章 緒 言	1) 好中球の墨粒貪喰像
第 2 章 実験材料並に実験方法	2) 単球の墨粒貪喰像
第 3 章 組織培養における墨粒貪喰像の観察	第 4 章 総括並に考按
	第 5 章 結 論

第 1 章 緒 言

周知の如く、白血球の貪喰能に関する研究は古くより多数の研究者によつて行われている。Metschnikoff⁶⁸⁾ 69) は白血球及び他の遊走細胞に貪喰能を証明し、細菌感染に対する防禦機転に於て喰細胞が最も重要な役割を演ずると主張した。次いで Ehrlich 及びその門下により、血清の中に免疫性物質の存在が次第に有力視されるに至り、脊椎動物では抗体の働きのない無脊椎動物と異り、喰細胞のみで防衛が行われるものではないことが明らかになった。Rous and Jones⁷⁹⁾, Fothergill⁵⁰⁾, 渡辺⁴⁴⁾等は喰細胞が貪喰せる細菌を生体内に散布し、又自身の内で細菌の増殖さえ認めることから、貪喰能は必ずしも生体にとつて合目的の機転に非ずして、未分化な主として間葉性由来の細胞に存する原始的機能と考えた。

貪喰の機転に就いては金井・Hofer⁵⁶⁾ 57), Hamburger⁵⁴⁾, Ouweleen⁷²⁾⁻⁷⁵⁾等により白血球、異物、環境の相互間の理化学的研究が行われた。之と並行して末梢血中の白血球貪喰能に対する外的要素(物理的、化学的)の影響に関する研究は Hirschfeld⁵⁵⁾, Hamburger⁵⁴⁾, Madsen⁶⁷⁾, de Haan⁵³⁾, Asher⁴⁵⁾, v.

Philipsborn⁷⁶⁾ 77), Bierstein⁴⁸⁾等により行われた。本邦でも杉山²¹⁾及びその門下による詳細な研究が見られる。しかし之等の研究は殆んどすべて超生体観察により、可成り細胞を障碍した状態で行われた。それ故に生体内で行われる貪喰現象とは相当の隔りのあることが充分考えられる。この点では長雄²⁹⁾, 三田村, 仁藤³⁰⁾, 渡辺⁴⁴⁾等の如く生体内注入実験は最も理想的であるが、之では連続的に貪喰経過を観察することは全く不可能である。そこで両者の間にあつて直接鏡下に観察可能で、而も生体内に近い状態で貪喰を見るには体外組織培養法が最も理想的な方法である。

組織培養法による細菌貪喰の研究は 1917 年 Jones and Rous⁶¹⁾が家鶏胎児の結締組織でカルミン並に葡萄状球菌の貪喰を見たのに始まり、Lewis⁶⁴⁾は同じく小腸片でチフス菌を、Bermann⁴⁶⁾は幼若家兎骨髓組織培養で葡萄状球菌の貪喰を、Löwenthal und Micsch⁶⁵⁾は脾臓、リンパ腺組織培養で肺炎双球菌の貪喰を、Osgood and Brownlee⁷¹⁾は人骨髓の液体培養で球菌の貪喰を見た。本邦でも 1933 年植田^{7) 8)}が家兎脾臓培養で肺炎双球菌の貪喰を行つた。その後伊藤等⁴⁾は同様の実験を試みている。以上はすべて貪喰能と免疫の関係

を検討したものである。一方本法を用いて墨粒貪喰能を研究したものは、1919年 Shipley⁸²⁾の家鶏胎児の心臓、肝臓組織で行つたものが最も詳細である。次いで Rumjantzew⁸⁰⁾が蛙の膀胱上皮で、Möllendorff⁷⁰⁾は家兎皮下組織培養で、それぞれ若干の観察を行つている。本邦では1925年石川・下村⁵⁹⁾が膀胱上皮細胞で、服部³²⁾が家兎脾臓で2~3の知見を報告しているに過ぎない。骨髓組織培養で墨粒貪喰を行つた文献は未だ見ないが、河島¹³⁾が家鶏胎児骨髓で烏賊の墨を混和して僅かに貪喰に触れているに過ぎない。私は人及び家兎の骨髓組織培養で骨髓内諸細胞の貪喰能を検討し、それによつて骨髓機能を窺わんとした。此の際に被貪喰物として墨汁を選んだのは、細菌では免疫の影響が重大であり、且つ細胞に対する傷害作用が大なる為である。

本編に於ては骨髓組織培養法にて墨粒貪喰を計数的に把握する方法を考案し、同時に墨粒貪喰の本態に関係ありと思われる興味ある知見を得たので、茲に報告し諸賢の御批判を抑ぐものである。

第2章 実験材料並に実験方法

従来¹⁾の被覆培養法による方法を種々行うに、墨粒貪喰を数量的に観察するには数多くの欠陥があり、就中貪喰を完全に遂行させるためには油浸レンズによる生態観察不能となること等の為、遂に凹窩載物硝子¹¹⁾を止めて、海野氏¹¹⁾考案の穴あき載物硝子を使用し目的を達した。

実験材料；

人骨髓組織培養では健康人の胸骨骨髓穿刺を行つて得られた組織片を用いた。此の際に穿刺器に接続する吸引用の注射筒にツバルクリン注射筒(2cc)を用いて最大の陰圧をかけて吸引することが必要で、斯くしないと充分に大なる組織片を得られない。穿刺液中に浮遊せる組織片はリングル氏液¹²⁾中に入れて末梢血液を完全に洗い流して了う必要あり。

家兎では大腿骨骨髓を取り出して使用した。操作はすべて無菌的に行い、培養開始迄の所

要時間は少くとも30~60分以内とする。

培養器には海野氏考案になる載物硝子を使用した。即ち厚さ0.9mmの載物硝子の中央に直径2cmの円形の穴を有するもので、使用前に穴の片面に被覆硝子をベルサム¹⁴⁾ではり着けて用いる。

墨汁は良質の古梅園製紅花墨を選び、リングル氏液を以て硯(平滑な新しいもの)で軽く磨り、濾過して使用する。濃度の決定には森氏の方法に従い墨汁の液柱の高さを5mmとして、下に置いた白紙上の墨の辺縁が見え始めるところを取つた。この際に光源は60W電球を高さ20cmの所より照らした。後述する如く濃度の決定はこの程度で充分である。尚かくして得られた墨汁は煮沸滅菌し直ちに使用した。

血漿採取は1000倍稀釈のヘパリンを以て注射筒内を湿らす程度にして健康人肘静脈より約15ccの血液を採取しよく混和して後遠心沈澱管に入れて1分間3000回転で10分間遠沈し、上層の血漿を分離して用いた。家兎では心臓穿刺を行つて血漿を分離した。

鶏胎圧搾液は孵化7日乃至9日目の鶏卵を取り、その鈍端の卵殻を破り、胎児を取り出して適當数を集めてFischer考案の圧搾器で粥状液とし、3000回転20分間遠心沈澱してその上澄液を使用した。

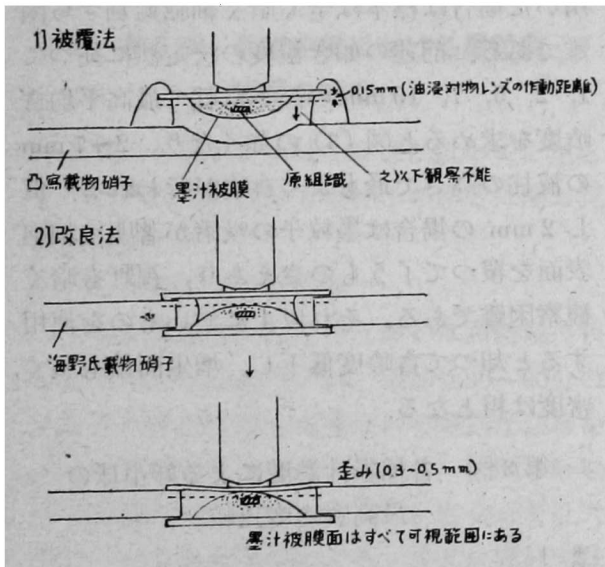
実験器具はメスを除き他はすべて乾熱滅菌して用いる。

実験操作：

量的関係を厳密に行うため、添加液はツバルクリン注射器で $\frac{1}{2}$ 針を使用して量比を一定にした。先づ海野氏載物硝子の穴の中で被覆硝子上にヘパリン加同種血漿(人又は家兎)を1滴滴下し直径1.5cmの円形に拡げる。次にその中央に約1mm²の骨髓組織片を置いて、その上に鶏胎圧搾液と墨汁を1:1の比に予め混和したもの2滴を滴下する。添加する際組織片は必ず培地の中央にある様にし、墨汁が均等に分布する様にする。然る後に被覆硝子を以て穴を覆い、載物硝子との間を極く少量のベルサムを用いて完全に封ずる。此

の時に上面の被覆硝子に血漿が直接附着しない様にしておくことが肝要であり、これに失敗すると以下述べる理由により、これ迄の操作を如何に嚴重に行つても貪喰度は低値に止まる。即ち封入後載物硝子を僅に傾斜させた時に始めて液状成分のみ被覆硝子面に附着させる様にする。この様にするると培地全面に墨汁が行きわたり、むらなく標本を作り得る。墨汁は凝固した血漿の表面より平等に侵入して薄い墨の膜が作られ、白血球はそこに於て貪喰能を発揮する。培養標本はそのままの位置で孵卵器(37°C)に入れて、血漿の凝固を待つて裏返えしにする。観察するときは再び元に戻して液状成分の附着面より油浸対物レンズにより観察する(模型図の如し)。尚顕微鏡は明視野普通顕微鏡の他に位相差顕微鏡を用いた。光源による標本の温度上昇を防ぐため断熱フィルターを使用した。明視野観察では、コンデンサーの位置は充分上げて絞りは用いない様にする。さもないと顆粒と墨粒子を混同する恐れあり。

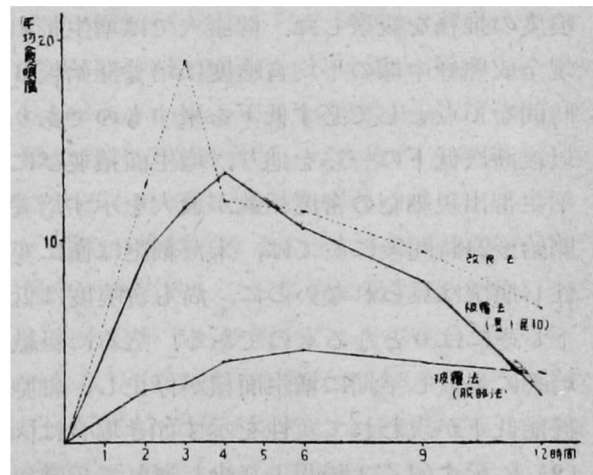
培養標本模型図



扱て以上の方法を用いた方が従来の組織培養に於ける貪喰能検査法よりも貪喰能の数量的検索に有利であると云う根拠は次の如くである。即ち図(1)に示す如く従来から行われている被覆法によつて、凹窩載物硝子を用いて墨汁を血漿と混和した場合(Shiple⁸²), 河島¹³)は組織増生悪く、個々の白血球の運動

も異常な型を示し貪喰度も低値に止まり、更に血漿と墨汁の混和は平等には仲々行かない欠点がある。この方法で貪喰度が不充分であるのは、森氏³⁸)法で墨汁アラビヤゴム膜を作ると墨粒貪喰がよく行われることより解る様に、血漿表面に墨汁被膜を作つた方がより充分に貪喰能が発揮されるのに、此の方法には欠点を欠く為である。一方服部³²)の行つた如く、血漿の凝固を待つて墨汁を添加する方法では、墨汁は深部迄達しないため、元来油浸対物レンズで観察し得る範囲は、被覆硝子の下面より作動距離 0.15 mm 以内で、それ以上深部には及ばないので、肝心の貪喰が行われている血漿の表面迄は到底観察出来ない。それ故に図(1)の如く平均貪喰度は低値を示す。海野氏載物硝子を用いると血漿の表面にある墨汁膜の面よりの観察が可能となり、充分に貪喰能を発揮している細胞を油浸対物レンズで詳細に観察出来る。本法により始めて以下述べる如き組織培養標本で生態観察により、墨粒貪喰能の数量的検索が可能となつた。尚海野氏載物硝子の本来の目的は組織培養に於ける位相差顕微鏡観察にあり、これが同時に行えることは生態観察における細胞鑑別と胞体内微細構造の追求に重要な武器を加えた事になる。

第1図 種々培養方法による墨粒貪喰能の比較



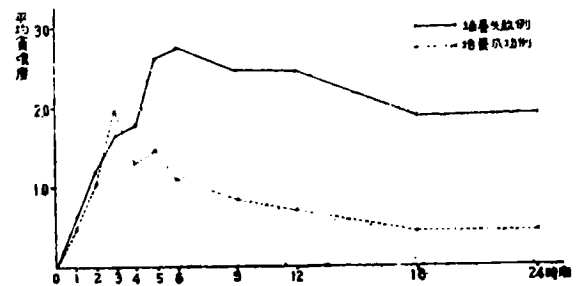
白血球墨粒貪喰の強さを谷²⁶)に従つて貪喰度を以て表わした。即ち墨粒子を小, 中, 大, 巨大の4階級に分つて次の如くした。

(一) 全く墨粒を貪喰せざるもの
 (±) 小墨粒を1乃至数個, これに未だ中墨粒を形成するに至らざる半月状墨粒を混ざる程度迄のもの
 (+) 中墨粒1乃至3個, これに小墨粒数個を混ざる程度迄のもの, 小墨粒のみの時は全顆粒の $1/2$ 以下が墨を取れるもの
 (++) 中墨粒4乃至5個以上, 或は大墨粒2個迄を有し, これに小墨粒数個を混ざる程度迄のもの, 或は小墨粒のみの時は全顆粒の $1/2$ 乃至 $2/3$ が墨を取れる場合
 (++) 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 $2/3$ 以上が墨を取れる場合

以上の標準のもとに白血球100個を数え, 杉山の方法に従つて平均貪喰度を算定した. 墨粒平均貪喰度の検査は森氏³⁸⁾法の如く孵卵器に一定時間(この場合は2時間)入れて置いて一回で求めるといふ訳には行かない. 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24時間目とそれぞれ時間を追つて平均貪喰度を求める必要あり. 何故ならば培養標本では時間を追つて原組織より成熟好中球の游出が起り, 更に幼若細胞は分裂, 成熟を起して増生帯に順次出現するものであるからで, 時間置きに而も増生帯の中心部, 中間部, 周辺部と各層を通じて平均貪喰度の推移を観察した. 健康人では増生帯出現全成熟好中球の平均貪喰度は培養開始後3時間を頂点として必ず低下を来すものであり, 以後漸次低下の一途を辿り, 増生面積並びに増生帯出現細胞の密度指数が最大を示す培養開始後24時間後に於ては, 未だ細胞は僅に変性し崩壊は見られないのに, 尚も貪喰度は低下し遂には0となるものである. 然るに組織培養に失敗し早期に増生面積が停止し, 細胞機能低下が現われて変性を示す如き場合は図(2)に示す如く3時間より少し遅れて正常以上の貪喰を示したまま, それ以後は僅に低下の傾向を示すのみで, 高い貪喰度を示したままで細胞は変性が進み崩壊してしう.

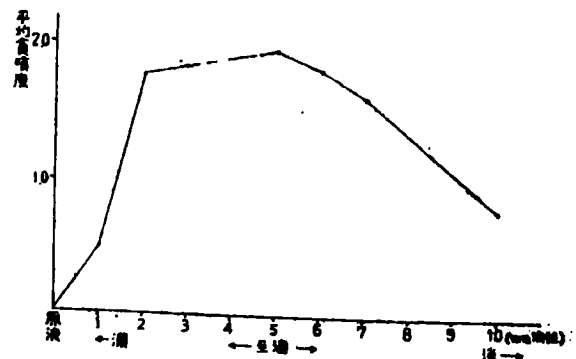
さて次に標本作製上の失敗による誤差を除外するために標本作製数を多くするを要する. 特に最も注意を要する不良標本としては血漿の盛り方が高すぎて培養器の厚さの0.9 mmを越す場合で, この様な標本では反対側の被覆硝子に血漿が附着して墨汁と鶏胎圧搾液を外側に排除して培養中心部には墨汁膜を作り得ない結果となり, 全く貪喰像を見ないことがある.

第2図 人骨髓組織培養に於ける好中球墨粒平均貪喰度



墨汁濃度の濃淡による平均貪喰度の変化に就いて観察するに, 12 cm×6 cm の硯にリンゲル氏液を満し, 1分間160回磨つた原液を用いた場合は標本は全く暗く細胞鑑別すら困難である. 前述の如き濃度の決定法に従つて1, 2, 5, 7, 10 mmの高さに就て最高平均貪喰度を求めると図(3)の如くなり, 2~7 mmの液柱の高さで最もよく貪喰が行われる. 但し2 mmの場合は墨粒子の吸着が著明で細胞表面を覆つてしうものさえあり, 視野も暗く観察困難である. それ以上に濃いものを使用すると却つて貪喰度低下し, 増生面積も悪く, 密度は粗となる.

第3図 各種墨汁濃度による好中球の最高貪喰度比較



家兎では平均貪喰度は人に劣るが、家兎血漿の凝固性が高いことが、更に貪喰能を充分發揮するに不利に働くものである。この凝固状態は種々の因子により左右され、就中血漿中のヘパリンの量に関係する。表1に示す如く血漿の凝固状態を凝固開始即ち血漿が培養開始後始めて流動を停止した時間を目標として調べた。即ち血漿中のヘパリン量を加減して血漿凝固開始時間を種々に変化させて、それぞれ平均貪喰度を求めてみると、30分前後で最も高い平均貪喰度が得られる。それ以上に速く凝固する場合は貪喰度は、それにつれて低下する。然し血漿が凝固せずに流動する場合も不良であり、培養の成績も悪い。

第1表 血漿凝固と貪喰度との関係

血漿凝固開始時間	家兎骨髄組織培養6時間後 偽好中球平均貪喰度
10分	0.82
20分	1.24
30分	1.52
40分	1.28
培地流動す	1.10

第3章 組織培養における墨粒貪喰像の観察

ここでは成熟好中球と単球に就いて、主として胞体内部に於ける墨粒子の態度に関し詳細に観察した。

1) 好中球の墨粒貪喰像

培地に添加された墨汁は最初は顕微鏡可視性の墨粒子を認めないが、添加後30~60分の間に墨粒子が沈澱し可視性の不規則な辺縁を有する微細粒子として出現する。時間の経過と共に漸次粗大となり遂には集合して巨大墨粒子が見られる様になる。扱て成熟好中球には培養初期に甚だ微細な辛うじて顕微鏡可視性の墨粒子を胞体内に散在性に認める。この微細墨粒子摂取の瞬間は稀に認められるもので、好中球の偽足突起の間に培地内で分子運動せる微細墨粒子が捕捉されて、胞体内に取り入れられる像あり。然し乍ら培地内に出現した巨大凝塊は摂取される事が甚だ稀な

め認め得ず。

上記の微細墨粒子とは別個に胞体内に於て、固有顆粒とは位相差顕微鏡的に性質の異なる(形が稍々大で、光輝性の強い顆粒)所謂分泌顆粒と考えられるものの表面に墨粒子が半月状に附着した像を認める様になる。この墨粒子は甚だ微細で先に見られた粒子の集合したのではなく、分泌顆粒の表面は甚だ滑らかで墨色を帯びている。次第に分泌顆粒の全表面は墨色を呈するに至り分泌顆粒自身も膨大する。遂には中等大の真円の滑沢な表面を有する濃い墨粒子となる。斯様な出来方をする粒子は単球に多く、好中球には左程多くない。

培養後貪喰度が最高の頃になると、前記の微細墨粒子は凝集して集団を作る傾向あり。かくて出来た大、中の墨粒子は表面が平滑でなく凹凸不平で明らかに数個の小墨粒子の集合体であることが認められる。更にこの微細墨粒子が上記分泌顆粒よりなる墨粒子の表面に附着し疣状となるものを見ることあり。

好中球の胞体内に、墨汁添加をしない場合にも出現する1~数個の空泡を生じ、培養経過と共に膨大するのを認める。この空泡は位相差顕微鏡で見ると、内容が周囲の培地よりも少し暗く見えるものであり、分泌顆粒の如く光輝性を有しない。その空泡の内部へ微細墨粒子が浸入して活潑な分子運動を行つて居るのが認められる。特に興味あるのはカラ・アザールの骨髄培養に於て認められた所見で *Leishmania donovani* が内部に存在していた。稀に混入する細菌等も、この空泡内部に貪喰されるものである。

貪喰が最高に達すると、分泌顆粒よりなる墨粒子は膨大し、又多数の微細墨粒子が出現し、それが2~3癒合して小墨粒子を形成し、一部は空泡内に分離されて来るが、此等墨粒子が胞体を充満することは殆んどない。培養後時間を経過し24時間目位では、変性は若干見られても、尚崩壊は見られないが、好中球の貪喰度は極度に低下し、嘗つて最高時に見られたる如き多数の墨粒子を貪喰せる好中球

を認め得ず、微細墨粒子は放出され、分泌顆粒も墨色を失つて来るものである。尚若干のものは僅かの墨粒子を胞体内に止めている。72~96時間に至ると細胞は変性高度となり一部崩壊するが、この頃では完全に貪喰像を認め得ず。

2) 単球の墨粒貪喰像

単球は好中球に比し甚しく異なるものである。先づ成熟単球は培養後増生帯に出現する時間が好中球に比し可成り遅れているが、墨粒貪喰像を認めるのも遅く、培養後3時間目で僅に見られ、漸次充進し24時間目頃に最高に達し、墨粒子は細胞全体を充滿するに至る。

単球内部に認められる墨粒子は、好中球に最初に見られる微細墨粒子が殆んど見られずして、最初には分泌顆粒の表面に半月状に附着したものが多数同時に現われる。此の際には分泌顆粒は円形のものと同時に楕円形のものもある。大きさも大小種々の段階が整然としてあり胞体を充す。墨粒子は核陥凹部に集中する傾向が多少ある。分泌顆粒表面の墨粒子は漸次全体を覆つて来る。而し好中球の如く微細墨粒子を表面に附着しないのですべて平滑である。然し培養の後期には単球の胞体内にも僅かに微細墨粒子が出現することあり。それよりも寧ろ培地内に認められる巨大な墨粒子の凝塊を思わせる如き粗大粒子の貪喰像を認めることあり。好中球に認められる空泡内部で微細墨粒子の分子運動をする像は始終殆んど認められない。

第4章 総括並に考案

抑々組織体外培養法は Harrison によつて創案され、Carrel, Fischer により確立された研究方法であり、生体外に取り出された組織細胞をして生体内に於けると全く同一の生活現象を営ましめ直接顕微鏡下に観察するを目的としている。故に培養された細胞の生活現象を観察し、之と生体内に於ける夫とを比較することにより一段と生体内の生活現象を明確にし得るものである。従つて本法による貪喰能の研究は多くの利点を有する。その最大

の利点は発育増殖を営みつつある細胞の貪喰現象を直接顕微鏡下に観察し得られることであり、これは到底生体内又は他の生体外研究法に於て企て得ないところである。

組織培養法で墨粒貪喰を数量的に観察した文献は未だないが、貪喰機転解明のために行つたものとしては、Shipley⁸²⁾ が家鶏胎児の心臓、肝臓組織を用いて、墨汁の他にトリパン青、トリパン赤、コンゴ赤、アツォ青、ベンツォプルプリン、銀及マンガン膠質等を添加して生体染色の貪喰説を主張している。本邦では服部³²⁾ が家兎脾臓培養に於て2~3の知見を報告している。河島¹³⁾ は家鶏胎児骨髄培養で烏賊の墨汁を添加して観察したが、培養後6時間目迄は貪喰現象を認めず、7時間目に始めてF型細胞に僅に認め、漸次強くなるも他種細胞は貪喰像を認めず、僅に3日目にM型第1型細胞に、4日目にK型細胞の少数のものに少量の墨粒子を認めたと述べている。その他に骨髄組織培養で墨粒貪喰をみたものは見られない。

私は骨髄組織培養法に於て墨粒貪喰を細胞の生きた状態(固定染色等行わずして)で数量的に観察することを試み、培養法を種々に変化させてみた結果海野氏載物硝子を用いた被覆法の変法が従来のものに比して最も適していることを知つた。本法は骨髄培養のみならず、他種組織の培養に対しても試みるべきものと考え。尚本法により最高の貪喰度を得るため肝要な条件について検討した。家兎では血漿の凝固が強くなると貪喰度が低下するが、これは血漿の粘稠度が高すぎて墨粒子が浸透しないのと、白血球運動が不自由となり墨粒子との接触が不良となるためと考えられる。血液粘稠度と白血球の墨粒貪喰能との関係で、入江^{5) 6)} は家兎の体外血液にアラビアゴム、ゼラチンを加え粘稠度を高めると、それぞれ0.25%, 0.1%を含む場合がリングル氏液のみより良好な貪喰度を得るが、それ以上粘稠度が高まると貪喰度は漸次低下すると述べている。これは末梢血に関して行われたものであるが、私の実験結果と比較してみ

て、白血球の環境の粘稠度が墨粒貪喰能を可成り左右することが分る。次に墨汁濃度を種々に変化させてみるに、淡いと勿論低いが一定濃度に達すると、貪喰度はそれ以上高まらず、表面吸着のみ著明となることは、墨粒貪喰能が拡散、滲透等の単なる物理的現象ではなく、細胞の能動的な機能である事を示すものである。更に高濃度になると服部³²⁾の云う如く墨汁は必ずしも無害とは云えず、細胞の増生及び機能を障碍する。

墨粒貪喰像に就いては従来生体染色との関聯に於て種々論じられている。組織培養に於て Shipley⁸²⁾は貪喰細胞の胞体内での墨粒子出現並に処理様式に関して述べているが、好中球、単球等に就いては格別に触れていない。服部³²⁾は組織球の他多核白血球に若干触れている。末梢血白血球の貪喰像に就いては森³⁹⁾は彼の方法で短時間の観察ではあるが、詳細に研究している。更に長雄²⁹⁾は生体内墨汁注入実験によつて膨大な研究を行つている。尚仁藤³⁰⁾、渡辺⁴⁴⁾は腹腔内貪喰細胞に就いて、それぞれ墨粒貪喰像に関し興味ある知見を報告している。之等は研究方法に於て、一長一短あり、いずれも連続して長期間観察したものはない。以下墨粒貪喰能に関する文献を参考として、私の観察成績をもとにして墨粒貪喰機転に就いて述べる。

長雄²⁹⁾は家兎に墨汁を静注し、時間置きに採血し偽好酸球及び単球の貪喰を観察した。即ち偽好酸球は静注後6~12時間で貪喰率最高を示し24~48時間で急速に減少し4~5日で殆んど消失するが、単球では不規則なる弛張を有し1週間内外で著しく減少するも、1ケ年後に於ても少数認められる。更に細胞体内に於ける墨汁の沈着状態並にその形態的变化について長雄は詳細に観察し、墨粒子を原顆粒、初期顆粒、第2期顆粒、第3期顆粒の4段階に分けている。即ち原顆粒は墨汁中に含まれる微細粒子に等しいもので、初期顆粒は注射後早期に出現し前者より著るしく大で、円形~類円形で滑沢な表面を有する。之は分泌顆粒に墨汁の沈着した中顆粒と考えられる。

次に第2期顆粒として初期顆粒と同大で凹凸不平、不規則で滑沢、平円でないものをあげている。そしてかかるものは基礎顆粒が容積を減じて表面に陥没を生じて出来たものと推定しているが、此は寧ろ分泌顆粒の表面に原顆粒の附着したのか、又は原顆粒の凝集したものと考える方が妥当である。私の観察では分泌顆粒が減容して変形するのを認めなかつた。第3期顆粒は変性した細胞又は細胞残骸中に存する不正の輪廓を有する一破片の如きものとしている。かかる凝塊は細胞内に形成されたものではなく、細胞外で墨汁が沈澱析出して生じたものである。此等の4種の墨顆粒が時間的推移と共に原顆粒から第3期顆粒へと順次移行すると云う彼の説には賛成出来ない。私は寧ろ後述する如く原顆粒と初期顆粒がそれぞれ別個に現われ、第2期、第3期顆粒は問題にならないものとする。

仁藤³⁰⁾は二十日鼠の腹腔内墨汁注射実験を行つて墨粒子が組織球、単球、好中球に貪喰される機転を3相に分けて考えた。此の場合細胞種による差異には余り触れないで、一般的に述べている。先ず第1相にて墨粒子が選択的に一定細胞種の周囲に濃縮集合し、細胞を覆い外套状に附着する。第2相で胞体内に挿られ顆粒間の原形質内に進入する。次いで第3相にて原形質顆粒間に到達した粒子は顆粒の表面に達する。此の際第1相より第2相への推移は頗る迅速にして、之を鏡下に認識し難いと述べている。然し貪喰にとつて第1相の如き極度の墨粒子吸着は必要でない。何故ならば私の実験で濃厚な墨汁を用いた場合、仁藤の云う如き第1相の像を認めたが、必ずしも貪喰能は高くない。又骨髓球の如きは貪喰能を殆んど認めないのに細胞周囲に著明な墨粒子の塊を認めることあり。私は多数の観察で吸着現象は貪喰に必要であるが、細胞表面に吸着された墨の粗大な塊は墨粒貪喰の第1段階ではないと考える。細胞周囲に粗大に沈澱した墨塊は稀にそのまま貪喰されることが有るが、此が再び微細墨粒子に分れて胞体内に取り入れられることはない。

墨粒子処理の問題に関しては、長雄³¹⁾、仁藤³⁰⁾共に墨粒の如き物質は細胞体内に於て消化を受けない故に細胞が変性崩壊して内部の墨粒を放出しない限り、胞体内より消失しないものであると述べ、顆粒性分泌の結果排泄されると云う事は甚だ疑問であるとしている。渡辺⁴⁴⁾も腹腔内貪喰細胞に就いて研究し、細胞体内での粒子の処理は当然行われる処でセピヤメラニン顆粒の如きも細胞体内で膨化し漂白され、次第にその黒色の色調は褐色に変じ遂に分解されて了うようであると述べているが墨汁の如く変化しないものは細胞の崩壊によつて放出されると云つてゐる。此等の実験はいずれも時間置きに貪喰細胞を生体外に取り出し、断片的に観察したもので、同一細胞に就いて経過を見たものではない。かかる不連続の観察結果をもつて墨粒子排泄を推定したに過ぎない。私は好中球の墨粒貪喰経過を直接鏡下に長時間連続観察して、その貪喰度が漸次低下するのを見た。培養初期低下の原因は幼若細胞の分裂、成熟により生じた新しい成熟好中球出現によるものであるが、12~24時間で増生面積の増大が停止し密度も増加を示さないにも拘らず、平均貪喰度は低下の一途を辿るものであり、此の頃には細胞は若干変性を起すが未だ崩壊は殆んど見られないものである。更に興味ある所見として、此の時期に好中球内に見られる分泌顆粒で全体に互つてぼんやりと色褪せた淡墨色を示すものあり。これが分泌顆粒の墨汁を放出したものかと考えられる。72時間乃至96時間で貪喰度は殆んど0となるが、この頃では変性崩壊が可成り見られる。尚一部の好中球では変性崩壊により始めて墨粒子を放出するものも見られるが決して多いものではなく、それは大抵極度に貪喰し比較的早期に変性の起るものに限られている。以上私は墨粒子の放出は必ずしも変性崩壊によるものでないことを強調したい。

次に好中球と単球の墨粒貪喰像の差に関しては森³⁹⁾の詳細な観察があるが、これに就いて若干私の知見を補い度い。即ち彼は家兎偽

好酸球では最初に甚だ微細な墨の顆粒が出現し、増加すると集合して大なる墨粒を形成すると共に、中性紅顆粒の表面に墨の極小なる顆粒又は一定度大となつた墨顆粒が吸着され表面に並ぶと記載している。更にこの顆粒とは別個に空泡状物が現われ、その表面に墨が吸着されて漸次大となる。注目すべき所見として常温に於て貪喰させた白血球に、時として微細墨粒子が空泡状物の内部で猛烈な分子運動するのを認めており、更に貪喰の瞬間を観察している。単球は貪喰能弱く中性紅顆粒の表面に弱く墨を附着し、半月状乃至輪状の配列をなし、全表面を覆いつくせるもの少く、僅に一部分を占めてゐると述べてゐる。以上の所見と私の観察した所見との相違は観察時間の差によるものであり、森の所見を一步先へ延長すれば略々等しくなる。即ち好中球にて、その内部に墨粒子が分子運動を行つてゐる空泡状物は時間を経るに従つて増加する。又単球の貪喰能を低いと云うが、長時間の観察では、墨粒子は漸次増加して分泌顆粒の一部でなく全体を覆い尽し、細胞内を充滿する様になる。

組織培養法により墨粒貪喰を観察した服部³²⁾は主として組織球に就いて記載しているが、その場合墨汁は小形顆粒基質並に大形顆粒基質に排泄され、大形顆粒基質内では分子運動を行うと述べてゐる。一方多形核白血球は組織球に比して墨粒貪喰能は遙に弱いが、墨汁が細胞内に貪喰せられた状態はほぼ似てゐるとのみ記載して詳細には触れていない。一方 Shipley⁸²⁾は家鶏胎児の肝臓、心臓の組織培養で貪喰細胞の観察を行つてゐる。彼は墨粒子に顕微鏡にて可視なるものから不可視のもの迄あり、不可視性の墨粒子が分泌顆粒に加つてその一部を形成すると考えた。更に粒子が相当に大きいときは封入空泡中に入る。この空泡は分泌顆粒と同様の機能を有し、色々の物質の貯蔵所となる。細胞の貪喰した細菌、脂肪球、赤血球等も同様に処理せられると述べてゐる。

白血球の墨粒貪喰の機転で Shipley の考え

と同様に墨粒子を2分しておく、私の得た墨粒貪喰像を可成り明快に説明し得る。墨汁は細菌とは異り、血漿中に加えられた最初には可視性粒子は殆んどなく、全体に互つて褐色に見える。30~60分経過すると微細粒子として現われて来るものである。不可視性墨粒子は細胞膜を通過して胞体内に入ると分泌顆粒に附加して中形墨粒子を形成する。即ち此の際該顆粒の表面が滑沢なのは、可視性墨粒子は附着して疣状になることと対比して、不可視性極微細墨粒子の附着したものと考える方が合理的である。他方可視性墨粒子の摂取は、培地内で活潑に分子運動している時に、好中球の突起の間に狭まれて胞体内に取り入れられ、顆粒間原形質内で活潑に流動する。此の摂取像は細菌貪喰と同様である。暫らくすると好中球内部に出現する分泌空泡内に排泄される。不可視性の墨粒の胞体内に於ける態度のみを見れば甚だ良く生体染色と類似する。単球に於ては不可視性墨粒子の摂取は早期に起るが、可視性微細墨粒子は好中球の放出したものを摂取する為か末期になる迄仲々見え難い。ここに好中球と単球では墨粒貪喰に於て、可成り本質的差異が存する様である。

第5章 結 論

骨髄組織培養に於て墨粒貪喰能を観察する

目的で、種々培養方法を検討し、更に貪喰機転に就いて考察し次の結論を得た。

1) 先ず従来の被覆法で、培地に墨汁を混和した場合と血漿凝固を待つて墨汁を添加した時はいずれも油浸レンズによる観察及び貪喰能の数量的把握に不充分である。

2) 海野氏載物硝子を使用した変法によると、数量的把握が容易で、且つ位相差顕微鏡を使用しての詳細な貪喰像の観察が可能である。

3) 好中球は著明に培地内の微細墨粒子を摂るが、単球は分泌顆粒表面への不可視性墨粒子の吸着が主である。又好中球では単球には見られない空泡内部での墨粒子の分子運動を認める。

4) 貪喰機転に関しては、従来の超生体観察と生体内墨汁注入時の断片的観察との間に立つて、一貫した墨粒貪喰の経過を長時間観察することにより、明確な解釈を与え得た。

擲筆するに当り終始御懇篤な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年日本血液学会第16回総会に於て発表した)

(文献後掲)

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

Phagocytosis of Carbon Particles Investigated by Means of
the Tissue Culture of Bone Marrow.

Part I. Comparative study on the methods and general considerations on phagocytosis of carbon particles.

By

Hiroshi Sunami

Several methods for tissue culture of bone marrow were comparatively examined in order to study the mechanisms of phagocytosis of carbon particles in detail. From the results obtained here, a consideration was made on the mechanisms of phagocytosis as follow:

1) Culture method with coverslips hitherto described, when applied with the Indian ink mixed with the culture medium as well as with the ink added after the coagulation of plasma, proved insufficient for the observation with oil immersion system and for the quantitative investigation.

2) A modified procedure with Unno's slide-glass proved more successful in that quantitative study could easily be made and more detailed observation of phagocytosis with phase contrast microscope could be accomplished.

3) Phagocytosis of carbon micro particles from the culture medium by the neutrophilic leukocytes was observed very clearly, but in case of monocytes it is quite different in that the submicroscopic microgranules of carbon were chiefly adsorbed on the surface of their secretion granules. In addition, in the vacuoles of neutrophilic leukocytes Brownian movement of carbon particles was observed. This was not so in case of monocytes.

4) The continuous observation of the process of phagocytosis described here afforded a better understanding on the mechanism of phagocytosis which would not be obtained by the usual methods hitherto described such as supravital observation or the fragmental observations after the intravenous administration of Indian ink.
