

# 螢光顕微鏡による穿刺液の細胞学的研究

## 第一編

### 各種動物, 人の正常腹水細胞について

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

## 服 部 進

[昭和 34 年 5 月 26 日受稿]

### 目 次

I. 緒 言	5. 猫腹水細胞
II. 研究方法	6. 犬腹水細胞
1. 観察装置	7. 猿腹水細胞
2. 予備実験	8. 人腹水細胞
3. 実験方法	9. 鳩腹水細胞
III. 研究成績	10. 鶏腹水細胞
1. 一般的所見	11. 各種動物腹水食細胞の運動
2. マウス腹水細胞	IV. 総括並びに考按
3. 家兎腹水細胞	V. 結 論
4. ラッテ腹水細胞	

### I. 緒 言

約半世紀前より腹水細胞とくに食細胞については、数多くの先人達が各種の方法を使用し夫々その研究成績<sup>(15)(16)(17)(18)(19)(22)(23)(24)(37)(43)(44)(45)</sup>を發表している。即ち、初期に於ては専ら固定染色法により研究され、Weidenreich<sup>50)</sup>により Grosse Transsudatzellen, Marchand<sup>33)</sup>により Grosse Wanderzellen, 又 Maximow<sup>34)</sup>により Polyblasten などと呼ばれていた。その後、清野<sup>27)</sup>はカルミンによる生体染色を施行し、又 Goldmann はピロール青を使用して生体染色を行い、清野は組織球説を打立てた。又 Sabin 一派<sup>40)(41)</sup>は中性赤、ヤーヌス緑を用いて超生体染色を施行し、単球と Clamatoocyte よりなるとし、Seeman<sup>42)</sup>は第一次組織球及び第二次組織球の存在を唱えた。天野<sup>5)</sup>、平田<sup>21)</sup>等は過酸化酵素反応陽性を示す事及び超生体染色による中性赤ロゼッテ形成、核形などより単球説を唱えた。一方赤崎<sup>1)(2)(3)</sup>、小島<sup>28)(29)</sup>、村田<sup>37)</sup>は過酸化酵素反応を陰性といい細網内皮論による組織球説を唱えている。以上の如く、現在単球説と組織球説とが鋭く対立し

て相容れざる状態である。教室に於ては数年来組織培養を中心とした生態観察を以てこの解決を企図して来たが、私はその研究の一環として、螢光顕微鏡的観察を試みた。

螢光顕微鏡は Köhler によつて1904年に創作され、1913年 Lehmann により完成されて以来、約半世紀を経過している。この間1934年 Haitinger によつて螢光色素を用いて観察する道が開かれ、以来急速な進歩を遂げた。現在、螢光色素の数は100種を超える多数であるが、Strugger はこれらの色素を主として3群に分けている。この内、現在主に使用されている色素は Acridin 誘導体である。そして之等数多くの色素を使用する事によつて螢光顕微鏡の細胞形態学及び細胞化学的な応用が進展して来ている<sup>54)</sup>。細胞研究への応用は Strugger が植物細胞の分裂や染色体の観察に Acridinorenge を用い、又 Stockinger は組織培養による細胞の核分裂の観察を同じ色素を用いて行つている。又、山崎<sup>51)</sup>らは AL-Morin を使用してユスリカ (Chironomus) の幼虫アカムシの唾液腺細胞核内の染色体やダイミョバッタ (Locusta migratoria soritaria) の染色体な

どを観察している。Friedmann<sup>9)</sup>, Gierlach は剥離した上皮細胞について研究を行い、又血液細胞及び腫瘍細胞に関しては Kosenow<sup>30)</sup>, Contier<sup>8)</sup>, Braunsteiner<sup>7)</sup>, Mellors<sup>35)</sup>, Bertalanffy<sup>6)</sup>, 天木<sup>4)</sup>, 宇野<sup>49)</sup>, 山下<sup>52)</sup>, 原島<sup>18)</sup> などの発表がある。このうち Mellors, Bertalanffy などは細胞化学的な結びつけも行っている。然しながら、彼等の殆んどは色素を生理的食塩水溶液、又はアルコール溶液として使用するか、若しくは Braunsteiner の如く人血清で溶解して超生体染色を施行して観察しているに過ぎない。Kosenow, Stockinger は培養法も用いているが、この方法によつての細胞観察所見については詳しい記載をみない。まして超生体染色法と同時に培養法に蛍光色素を添加して生体染色を施行し、両者の蛍光像を比較したものについては未だ詳しい記載を見ず、又各種動物の腹水細胞についての蛍光顕微鏡的観察については従来全くみられざる所である。

よつて私は教室の生態観察による一連の腹水細胞研究に蛍光顕微鏡観察を導入した結果、聊か本研究分野に新生面を開拓し、細胞の本態追求にも寄与する所があつたので以下その成績を報告する。

## II. 研究 方 法

### 1. 観察装置

カール、ツァイス製大型蛍光装置及び顕微鏡を使用した。従つて蛍光光源はオスラム HBO 200 水銀灯で光源フィルターには主として B.G 12 を使用し、接眼フィルターには主として O.G 5 を使用して観察した。なお観察に当り油浸レンズは絞り付 100 倍を使用し、ツェデル油は蛍光を有するため良質の流動パラフィンを用いた。

### 2. 予備実験

色素の選択に当り先ず Acridinorenge, Auramin, Coriphosphin O, Fluorescein, Haematoporphyrin, Magdalarot, Morin, Phosphin E, Primulin, Rhodamin B, Thiazolgelb を使用し、夫々生理的食塩水溶液又はアルコール溶液を作製し超生体染色を施行して蛍光像を観察した。Fluorescein は赤色～黄橙色の蛍光を呈するも細胞種の鑑別は困難であり、Phosphin E も同様に鈍い壁色の蛍光を呈するも鑑別には不適であり、Rhodamin B は汚穢な黄色の蛍光をみるが Auramin よりもおとり、Thiazolgelb の利用価値はその両者の中間に相当する。比較的鮮

明なる蛍光像を認め得たものは Auramin, Acridinorenge, Coriphosphin O の 3 種であつたが、Auramin は核も胞体も各種顆粒も全て黄色又は黄金色であり、1 番美麗なる蛍光像を得たものは Acridinorenge であつた。よつて Acridinorenge (以下 A.O と略す) について次の如き検索を行った。

A.O は化学的には 3-6-Bis-Dimethylaminoacridin で褐色の粉末であり、溶解すれば濃度の変化と共に褐色より淡黄色の色調を呈す。なお実験に使用せし A.O は Merk 製である。

超生体染色は Kosenow の方法により 200 倍から 100,000 倍までの各種濃度アルコール溶液を作製して観察したが、100,000 倍の蛍光像は不鮮明であり、1,000 倍以下の高濃度では細胞の受ける障壁が強く、結局 10,000 倍溶液が一番良好であつた。

次いで A.O を組織培養に導入する事を試み、先ず培養法の選択を行つた。200 倍より 100,000 倍までの各種濃度 A.O 生理的食塩水溶液 (以下 A.O 生食液と略す) を作製し海野式穴アキガラスによる被覆培養法に添加して施行した。この方法では血漿、鶏胎胚液を使用するため培地の厚さが大となり、為に蛍光像観察が極めて困難であり、加えて血漿中の繊維素が析出しこれが A.O によつて赤く染まり一層観察を困難ならしめた。そこで教室考案の簡易培養法<sup>20)</sup> に A.O 生食液を添加したところ、培地の厚さも観察をさまたげず、且つ血清を使用するため、繊維素の析出もなく良結果を得た。次に濃度の選択に当り 200 倍より 100,000 倍までの各種濃度で施行した所、培地濃度 2,000 倍よりわずかながら細胞の生存を認められたが、10,000 倍ではより一層長時間鮮明に観察し得た。100,000 倍では鮮明なる蛍光像は得られなかつた。教室渡辺<sup>55)</sup> は健康人骨髓体外組織培養に A.O 生食液を添加した結果、培地濃度 10,000 倍が一番良いと述べているが、この成績と私の成績は全く一致する。次いで pH による色調の変化を Sørensen<sup>39)</sup> 緩衝液を使用して各種 pH の A.O 生食液を作製して、マウス腹水食細胞について観察した所、次の如くであつた。核は pH 6～7 の領域に於て緑色調強く、酸性度が増すにつれて緑色調が淡くなり、アルカリ性が増すにつれて黄色調を帯びてくる。胞体は pH 6～7 の領域では緑色調強く、酸性度が増すにつれて緑色調が弱くなるが、アルカリ性の場合には酸性に比し変化すくなきも、やや

黄色を帯びてくる。胞体内顆粒は pH 6~7 の領域では赤橙色を呈し酸性度が増加すると黄色調を増すも、アルカリ性の増す場合は殆んど変化ない。即ち pH 7 前後が一番美麗なる螢光像を観察出来た。この事は簡易培養法を施行する場合、血清の pH とほぼ一致するため極めて好都合である。よつて生体染色は簡易培養法によつて施行した。

以上の超生体染色と培養法応用による生体染色を比較すると超生体染色では初期より細胞はやや変性像を呈しており、生体染色は生活細胞を観察し得るという点ではるかに前者より優れている。而してこの細胞の生活度と色調の間には重要な相関が認められた。之等の詳細は成績の項で後述する。

### 3. 実験方法

以上の予備実験により先ず A. O アルコール溶液を使用して超生体染色を施行した。標本の作製はあらかじめ色素膜を作り、この上に被検物を1滴々下し、カバーガラスをその上に置き四囲をパラフィンで封入し直ちに観察した。次に簡易培養法応用ではビタミン B<sub>12</sub> と A. O 生食液とを混合した。割合は1cc当りビタミン B<sub>12</sub> を 80% とし、之に各種濃度の A. O 生食溶液を混合し、アンプルに入れ滅菌して氷室に貯蔵し使用に供した。培養法は教室考案の簡易培養法の術式によつたが支持体としての血清はマウス、ラットの場合はラット血清を、家兎には家兎血清、鶏、鳩には鶏血清、犬には犬血清、猫には猫血清、猿、人の場合には人血清を使用した。又この培養法を更に簡便化するために紙土手を取り去り培地の上に直接カバーガラスを置き四囲をパラフィンで封入し観察する方法、即ち圧挫法<sup>26)</sup>を施行して観察したが、この方法でも充分螢光像を観察し得た。

材料の採取方法は動物の場合は断首し失血死させ直ちに腹部正中線の右又は左の部位より硝子毛細管を腹腔内に挿入して採取した。人腹水の場合には本学陣内外科の御好意により病的腹水の増加のない疾患（主として胃潰瘍）の開腹手術時に硝子毛細管を使用して採取した。

## III. 研究成績

### 1. 一般的所見

超生体染色と生体染色を問わず低濃度になるにつれ核も胞体も緑色調が増し、高濃度となるにつれて黄色より赤橙色を増してくる。この事について Strugger は濃度の変化に伴い色調の変化の起る事

を指摘しているが、私は超生体染色と生体染色との比較より細胞の生活度による変化もある事を知つた。

先づ生体染色に於ける一般所見を述べるに、先づ核も胞体も緑色の螢光を示し、ミトコンドリア及びその他各種顆粒は緑色より赤橙色の螢光を呈する。顆粒の螢光は長時間後には褪色し、又励起光線の照射により螢光を失い、核は時間の経過と共に緑色から黄色調を増すが、これらの螢光色の推移は細胞によつて難易があり、運動形態と共に細胞鑑別の根拠の一つにも成り得る。細胞の変性が進むにつれ種々の変化が核、胞体及び顆粒に起つてくるが核と胞体とに区別すると次の如き所見を呈する。核の場合、核は膨化し内部の構造全く不明のまま緑色の螢光を示すもの、全く赤染してしまうもの、核濃縮を起し緑色又は黄緑色を呈するものの3様式となる。胞体の場合は胞体が膨化して単一の淡緑色を呈し、又は赤染し、或は胞体の辺縁より四囲に向つて淡緑色の気泡様突起を出すもの、胞体内部に螢光なき空泡形成を有するものなどである。然して之等の変性像は単一の状態よりも、それ等の変性像が種々組合せられた像を呈して甚だ複雑なる螢光像を示す。このように変性像を示す細胞に於ては最早や、細胞の運動は全く認め得られない。なおこの変性を起すに至る時間は動物種により差異がある。

一方、超生体染色では各種動物とも前記生体染色に比して速やかに変性像を示す。

### 2. マウス腹水細胞

細胞構成は教室福田(源)<sup>11)</sup>によれば次の如くである。細胞数 70,930/mm<sup>3</sup> でその内、食細胞は 83.79% で、その他はリンパ球 12.41%、漿膜細胞 0.45%、肥胖細胞 1.24%、顆粒球 2.19% である。従つて細胞構成上、主細胞となるものは食細胞である。

#### A. 食細胞の所見

##### a. 超生体染色法による螢光像

i. 各種濃度による核、胞体及び胞体内顆粒の色調の変化について

##### A. O 100,000 倍

中型細胞の核は緑色の螢光を呈し、胞体の螢光は核よりも弱くて淡帯緑黄色を示す。核が緑黄色を示す細胞では、胞体は帯黄橙色を呈す。胞体内顆粒の螢光は胞体よりも強くて、赤橙色、帯黄橙色又は緑色を呈す。この顆粒には大小不同性を認める。

小型細胞の核は緑色で胞体は緑色又は帯黄緑色を呈するも胞体は中型細胞に比べると狭い。わずかに緑色の螢光を認める。胞体内顆粒は赤橙色、緑色の

螢光を呈し、大小不同余りなく、且つ数も中型細胞に比較すれば少ない。

A. O 20,000 倍

中、小型細胞共に核の緑色螢光は 100,000 倍に於けるよりも強い。胞体の螢光は 100,000 倍に比べると、やや緑色の色調が強い。胞体内顆粒は橙色又は赤橙色であるが、少数緑色の螢光を示すものがある。

A. O 10,000 倍

中、小型細胞共に核は緑色又は淡黄緑色で胞体の螢光は帯橙緑色又は緑色を呈する。胞体内顆粒は赤橙色で益々明瞭となるが、時には 20,000 倍、100,000 倍の如く緑色に認められるものも存在する。

A. O 5,000 倍

中型細胞の核の黄緑色螢光はやや強くなり、胞体もやや黄色又は橙色の色調を加えてくるが、小型細胞では未だ緑色調をうかがい得る。胞体内顆粒は明瞭に赤橙色の螢光を示す。

A. O 1,000 倍

中型細胞の核は小型細胞の核よりも帯黄緑色が強いが、この濃度までは核の赤色螢光を認めない。胞体の螢光は帯緑より橙色となり、胞体内顆粒は強い赤橙色の螢光を呈す。

A. O 500 倍

中、小型細胞共に核は黄色調を増し、時には赤色螢光を呈す。胞体は橙色を呈するも、胞体内顆粒の赤橙色螢光はそれより更に鮮明である。

A. O 200 倍

小型細胞の核に比べると中型細胞では黄色調が強い。胞体は中型、小型細胞共に橙色を呈し、胞体内顆粒は強い赤橙色の螢光を示す。

ii. 核及び胞体の形態について

小型細胞： 核は円形又は楕円形を呈し、楕円形を呈する核に於ては陥凹を有するものが多い。核膜は比較的明瞭で核網はやや粗である。核、胞体共に同濃度に於ては緑色調やや強く、後述の中型細胞はやや黄色調を帯びる。胞体は狭いが後述のリンパ球とは核網、核及び胞体の色調並びに胞体内顆粒の存在状態などにより鑑別出来る。

中型細胞： 核は立体的分葉傾向を示す。従つて核形は多様であり、且つ核は胞体内の 1 側に偏在するものが多い。核膜は比較的明瞭であり、核網は小型細胞に比しやや繊細である。胞体は広くて円形又は楕円形を呈する。

iii. 胞体内顆粒の存在形式について

存在の状態により次の 4 様式に分類する。I 型は

核の 1 側に、概して核陥凹部に集簇性を示すもの、II 型は核の 1 側に集簇性を示すものが多いが核周にも認められるもの、III 型は不定に胞体内に存在するもの、IV 型は非常に多くて胞体内に充満し、ために胞体基質の色調も不鮮明なものである。

中型、小型細胞を合せ A. O 100,000 倍の標本に於ける分類では I 型 31%、II 型 32%、III 型 23%、IV 型 11% で胞体内顆粒の不明瞭なるもの 3% である。又 5,000 倍の標本に於ては I 型 57%、II 型 27%、III 型 11%、IV 型 4%、認めないもの 2% である。即ち、高濃度でも低濃度でも I ~ III 型が圧倒的に多く、濃度には関係しない。中型細胞のみについて分類すると I 型 56%、II 型 25%、III 型 16%、IV 型 3% を示し前者同様に I ~ III 型が多い。この分類によると I ~ II 型は花冠状配列か、それに近い核陥凹部への集簇性を示す。I ~ III 型は後述の血液単球の螢光像に極めて類似する。

iv. 顆粒の大小不同性について

小型細胞では赤橙色の顆粒に大小不同性余りなく、中型細胞の夫れに比較し微細である。中型細胞では大小不同性強くなり、且つ小型細胞よりも数を増す。

v. 紫外線照射による胞体内顆粒の螢光色の變化について

A. O 10,000 倍以上の低濃度に於ては次の如く變化する。橙色の顆粒に於ては照射時間と共に橙色の螢光を段々と失うが一部には黄色となり、更に緑色と變化するものもある。一方、最初より緑色を示す顆粒は光輝性を有し、核の緑色螢光よりも明瞭であるが、夫れも 1 時間以上連続照射すれば極めて螢光は弱くなり、そして遂には認め得られなくなる。小型細胞に於ては、この顆粒の数の減少は殆んど不明であるが、中型細胞では段々と減少して行くようである。1,000 倍以下の高濃度では前述の如き赤橙色→黄色→緑色→消失といった多彩なる色調の變化を余り認めず、比較的短時間内に消失してしまう。

b. 生体染色法による螢光像

i. 培地濃度 A. O. 10,000 倍

培養直後： 核及び胞体共に緑色の螢光を示すも核の方がやや強く、核膜、核網は比較的明らかに認められる。胞体内顆粒は赤橙色を呈し、且つ集簇性を示す。教室山近はこれらの細胞の運動形態として胞体縁よりの針状突起を認めているが、螢光顕微鏡的には余り明確でない。

培養 3 時間後： 胞体はやや黄色、黄橙色調を加え、核も黄緑色を呈するが、胞体内顆粒は赤橙色に

して、なお集簇性を認める。

培養6時間後：核は膨化し帯緑色の螢光は認められるも、核内構造は全く不明であり、胞体内に赤橙色顆粒の存在を認めない。

即ち、培養6時間後に於ては最早、変性像を呈しており細胞の生活状態に於ける正確なる所見をうかがう事は出来ない。

ii. 培地濃度 A. O 100,000倍

培養直後：核も胞体も弱緑色を呈するが、核の方がやや強い。而しながら核内構造は不明である。胞体内に赤橙色顆粒を認めるも螢光は弱い。

培養3時間後：培養直後と同様の螢光像を示し変化ない。

培養6時間後：核及び胞体も淡緑色で両者間の区別は困難であるにも拘わらず胞体内の赤橙色顆粒の存在は認められない。

従つて10,000倍の濃度に於けるが如き美麗なる螢光像を呈する事なく培養6時間後には変性を起せしものと認めざるを得ない。

c. 圧挫法による螢光像 (A. O 10,000倍)

a'. 食細胞

A. O 10,000倍の濃度に於ける簡易培養法による所見と同様であつた。

b'. 好中球

核の螢光は緑色で核膜は明瞭であり、核網は粗剛である。胞体内の赤橙色顆粒はやや大小不同あるも、胞体内にはほぼ均等に充満し、ために静止細胞に於ては胞体基質の色調を認める事は困難である。運動形態をとるものに於ては偽足、尾の部分に緑色の胞体を認める。変性が進むにつれて核は緑黄色となり、又胞体内の赤橙色顆粒も減少し、胞体も赤橙色を呈する。

c'. リンパ球

核は円形にして緑色螢光を呈するも屢々黄色を示し、胞体も緑色を呈するが胞体は狭く、食細胞ほど明瞭に認めず、胞体内顆粒は赤橙色で集簇性は認めず数も数個認めるに過ぎない。核膜は厚く明瞭にして、核網は屢々車軸状で粗剛に認められる。変性が進むにつれ胞体は橙色の色調を加えてくる。

d'. 肥胖細胞

細胞は大型にして、円形又は楕円形に近い形を呈す。核は細胞の中心部に於て緑色の強い螢光を示すも核の内部構造は認める事が出来ない。胞体内の顆粒は同大で好酸球の顆粒より大きく、強い赤橙色の螢光を呈し、核より胞体辺縁まで充満し一見して判

然とする。而しながら胞体基質の色調は全く認め得ない。

3. 家兎腹水細胞

細胞構成は教室福田(源)によれば細胞数は1,796/mm<sup>3</sup>で、その内食細胞92.2%, リンパ球6.8%, 肥胖細胞0.01%, 漿膜細胞0.15%, 偽好酸球0.8%で主要細胞はマウスの如く食細胞である。

圧挫法 (A. O 10,000倍) による螢光像

i. 食細胞

細胞は円形又は楕円形にして、核はマウスより立体的分葉傾向を示し、核膜は比較的明瞭に認めるも核網の緑色螢光はやや弱い。而し核網はうかがう事が出来、比較的繊細に認められる。胞体は緑色を呈し、その中に赤橙色の螢光を示す顆粒の存在を認める。マウス同様に中型細胞に於ては大小不同を認めるが、小型細胞では著明でない。この赤橙色顆粒は核の1側、概して核陥凹部に集簇性を示す。マウスの如く顆粒の存在様式を分類するとI型60%, II型7%, III型37%, その他6%となり、マウス同様I~III型までが大多数を占める。

ii. 偽好酸球

胞体内にやや大きく、しかも同大の紡錘形を呈す赤橙色の螢光を有する顆粒が充満して、一見他の細胞と区別出来る。その他リンパ球なども認めるが、マウス同様の螢光像につき省略する。

4. ラッテ腹水細胞

細胞構成は教室福田(源)によると次の如くである。細胞数は67,221/mm<sup>3</sup>で、その分類は食細胞80.6%, リンパ球5.5%, 肥胖細胞6.0%, 漿膜細胞0.02%, 好中球0.2%, 好酸球7.7%でやはり食細胞が圧倒的に多い。

圧挫法 (A. O 10,000倍) による螢光像

i. 食細胞

細胞は円形又は楕円形を呈し、核は分葉傾向を示し緑色の螢光を認める。核膜は比較的明瞭で核網はマウスより繊細にして家兎よりはやや粗剛である。核は胞体内の1側に偏在し、胞体の広い部分は緑色の螢光が明瞭に認められ、この部分に赤橙色顆粒の集簇するのを見る。又、一方マウスよりも変性を起し難い。即ち、簡易培養法に於て培養後3, 6時間に於ても変性像を認めない。

ii. 好酸球

胞体内の顆粒に特徴がある。即ち、円形のほぼ同大の強く赤橙色に発光する顆粒が胞体内に充満している。このやや大きな顆粒により一見して識別出来

る。

#### 5. 猫腹水細胞

細胞構成は教室福田(源)によると次の如くである。細胞数は腹水量が少なかりしため、検索し得なかつたが百分率では食細胞86.8%, リンパ球12.0%, 好中球1.2%を示し、やはり食細胞が主要細胞である。

圧挫法 (A. O 10,000倍) による螢光像

#### 食細胞

中型細胞に於ては核は緑色又は淡黄緑色の螢光を呈し、核の形は立体的である。時には2核のもの、楕円形を呈するものがあるもこれ等は少い。核膜は比較的明瞭に認められ、核網はやや繊細である。核は胞体内の1側に偏在するものが多く、胞体の広い部分に向つて核陥凹を示す。核陥凹部には赤橙色顆粒が集簇して存在し時にはこの部分に貪喰された白血球の残骸を認める。赤橙色顆粒は矢張り大小不同を呈す。胞体は緑色なるも屢々黄橙色の色調を増してくる。小型細胞では中型細胞に比較すれば赤橙色顆粒に大小不同が殆んどない。而し核形は中型細胞ほどに立体的でない。

猫腹水食細胞はマウス食細胞より強染し易い。赤橙色顆粒の存在様式はI型46% (小型8%, 中型38%), II型26% (小型6%, 中型20%), III型16% (小型8%, 中型8%) であり、やはりI~III型が占める。

#### 6. 犬腹水細胞

細胞構成は教室福田(源)によると次の如くである。細胞数は  $3,040/\text{mm}^3$  で、その百分率は食細胞84%, リンパ球7%, 好中球7%である。

圧挫法 (A. O 10,000倍) による螢光像

#### 食細胞

核及び胞体の緑色螢光を呈する事や、核膜が比較的明瞭に認められ、核網はやや繊細である事は猫の食細胞と同様である。又、赤橙色顆粒の存在様式及び大小不同性もほぼ同様である。赤橙色顆粒の存在様式を分類すればI型62% (小型16%, 中型46%), II型14% (小型6%, 中型8%), III型16% (小型12%, 中型4%) でI~III型が大部分を占める。又、猫腹水食細胞と同様にマウス食細胞に比較すれば強染し易い。

#### 7. 猿腹水細胞

猿は断首し失血死せしめる事なく、自然死せる猿を用いて腹水を採取せしめたため、初期よりやや変性像を認めた。百分率では食細胞90.7%, リンパ球7.4%, 肥胖細胞0.7%, 好中球1.2%で他の動物同様に

食細胞が大多数を占める。

圧挫法 (A. O 10,000倍) による螢光像

#### 食細胞

核は円形、楕円形又は腎形を呈し緑色又は帯黄緑色を示し、核膜は明瞭で核網はやや粗である。胞体は緑色又は淡黄橙色を帯びた緑色を呈する。胞体内の赤橙色顆粒は大小不同やや著明であるが、やはり集簇性を示して食細胞の特徴を有す。

#### 8. 人腹水細胞 (非病的腹水)

外科手術の際、非病的腹水と思われるもののみについて採取せしめたため、その量は微量であり、従つて主として食細胞のみについて圧挫法 (A. O 10,000倍) により観察した。

中型細胞の核は立体的分葉傾向に富み、緑色の螢光を呈す。核膜はやや明瞭で、核網は繊細である。時には2核のものも存在するが数は少ない。胞体は広くて緑色の螢光を呈す。胞体内には大小不同を示し、且つ明らかに集簇性を有する赤橙色顆粒を核陥凹部に認める。

小型細胞の核及び胞体の共に緑色螢光を呈する事は中型細胞と同様なるも中型に比べ胞体は狭い。又、核形も中型ほどに複雑ではない。胞体内の赤橙色顆粒に大小不同を殆んど認めない。而しながら集簇性を有する事は中型と同様である。

#### 9. 鳩腹水細胞

微量なるため細胞構成については調べられなかつたが圧挫法 (A. O 10,000倍) により特徴のある食細胞の螢光像を認めた。

細胞は小型のものが多く、形は円形を呈する。核及び胞体共に緑色の螢光を示すも、その両者の鑑別はマウス、家兎、ラットの如く明確でない。胞体内の赤橙色顆粒は概して数が少なく、且つ大小不同が余り著明でない。而しながら集簇性を示して食細胞の特徴を呈する。

#### 10. 鶏腹水細胞

鳩腹水と同様に量が極めて少ないため、細胞構成については充分検索出来なかつたが圧挫法 (A. O 10,000倍) により特徴ある細胞の螢光像を認めた。

細胞は中型が多く、核は円形又は楕円形を呈し、立体的分葉こそ認めないが、核に陥凹を認める事多く、従つて核は胞体内の1側に偏在するものが多い。核及び胞体は緑色を呈すが、核膜は鳩食細胞より明瞭に認められる。核網はやや粗剛である。胞体内の赤橙色顆粒は大小不同を呈し、前者同様やはり胞体の広い部分に集簇性を示す。

11. 各種動物腹水食細胞の運動

(簡易培養法応用による)

培地濃度 A. O 10,000倍で観察した。マウスの場合には針状突起運動を教室山近<sup>53)</sup>は観察しているが、私の方法では確認出来なかつた。而しながら家兎、ラッテ、猫、犬、人、鶏に於ては膜様偽足運動を認めた。この運動形態は教室山近も強調している如く、食細胞の一つの鑑別の特徴である。この場合、胞体内赤橙色顆粒はその膜様偽足の中にまでは移動しない。且つこの運動は励起光線を連続照射すれば認める事が出来なくなる。即ち、細胞の生活に与える励起光線の障害を意味するものである。

IV. 総括並びに考按

以上各種動物の腹水食細胞について螢光像を観察して来たが茲で従来の螢光顕微鏡による研究をかえりみると Köhler によつて1904年創作されて以来各方面に利用され種々研究されてきている。即ち、螢光顕微鏡を使用する事によつて光学顕微鏡で満たされざるものが或る程度知り得るようになった。Strugger は A. O を使用する事により細菌及び細胞の生死の状態を区別し、又 Stockinger は核、胞体が同時に染色されるのを利用して細胞の分裂を観察し、Mellors, Bertalanffy は細胞の構成物質の定性及び或る程度までの定量への応用をなしている。且つ、紫外線を利用するため種々の顆粒が光点として発光し、従つて細胞の微細なる部分まで観察出来るので微細構造の観察にも使用されている。一方、螢光色素を使用しない一次螢光については工藤<sup>32)</sup>、宇野<sup>49)</sup>等の悪性腫瘍、工藤、山下<sup>52)</sup>の貧血時の螢光赤血球などの研究があるが、それ等の研究は微々たるもので、大部分は矢張り各種の螢光色素を使用する事によつて多種多様の研究がなされている。Al-Morin を用いての唾液腺細胞の染色体の研究を山崎<sup>54)</sup>は行つているが、この種の研究のうち系統的な細胞形態学的研究としては Kosenow が A. O, Auramin を用いて血液細胞についての詳しい研究を行つている他、Contier, 天木, 山下などの血液細胞についての発表がある。一方細胞化学的な結びつけとして Mellors<sup>35)</sup>、Bertalanffy などは光電管使用による測定方法をも行つている。而して、染色方法にも Kosenow, Contier, 天木, 山下の如き超生体染色法や Stockinger, Kosenow の如き培養法応用及び Mellors, Bertalanffy の如き固定染色法と種々ある。その内、培養法の応用は細胞の生活状

態より変性までの過程を知り得るので細胞形態学的研究には最も優れた方法という可く、又私の研究の目的にも最もかなつている。

しかしながら何れにしても従来、超生体染色と同時に培養法に螢光色素を添加して生体染色を施行し、両者の螢光像の相違を比較したものについては未だ詳しい記載はなく、且つ各種動物の腹水細胞についての一連の螢光顕微鏡的観察も従来みられざる所である。そこで私は腹水細胞を対象として、超生体染色法と生体染色法による観察を企図した。先づ11種類の色素を吟味せんがため超生体染色を施行して、それ等色素による螢光像を検索した結果一番綺麗な螢光像を示したものは A. O であつた。そこで次いで培養法に応用するため培養法の選択を行つたが教室考案の簡易培養法が次の点で一番優れていて、即ち、方法が簡便であり、培地の厚さが培養法の中で一番すく観察に便利であり、且つ血清を使用するため常に pH が一定されており、又纖維素の析出をみないという事である。この簡易培養法に A. O 生食溶液を種々の濃度にして添加した所、教室渡辺<sup>55)</sup>の成績の示す如く、4,000倍よりわずかながら増生を認めたが密度指数、好中球遊走速度などより A. O 10,000倍(培地濃度)が鮮明なる螢光像を示し、且つ細胞に高度の障害を与えない最適の濃度である事が明らかになつた。腹水細胞に於ても大体上記の成績に一致した。次いで簡易培養法の紙土手を取り去り、圧挫法として観察したが、この方法でも充分観察出来、少くともこの方法による螢光像は超生体染色による螢光像と比較すると極めて鮮明であつた。そもそも、A. O を使用して螢光顕微鏡学的観察を行う際には次の点に注意しなければならない。即ち、この問題については Strugger<sup>47)</sup>、Kosenow<sup>30)</sup>等もいつているが、色素の濃度による色調の変化は勿論の事、pH による変化、励起光線の照射時間による変化及び染色方法による夫々の色調の変化についてである。私の方法では、このうち濃度及び pH、染色方法は一定であるため解決出来、ただ励起光線の照射時間だけが問題であるが、これも同一時間をもつて観察する事にとめた。次に一つの細胞を染色する場合、核及び胞体の螢光像について生体染色と超生体染色では次の如き相違を有する事を知つた。生体染色に於て、生活細胞しかも活潑なる運動をなす細胞に於ては、核及び胞体の螢光は極めて弱く、核網構造などは不明であり、従つて染色され難い事を示した。やや運動が衰えてくると、核は緑色に染

まり、核網も鮮明となつてくる。更に変性が進むと核及び胞体は共に黄色調を帯び、遂には赤染又は淡緑色に膨化してくる。一方、超生体染色に於ては生体染色に比べ初期よりやや変性像を示し、勿論運動は認めず、且つ核及び胞体は初めから黄色調を加えている。よつて生体染色を施行すれば之等一連の色調の変化が観察され細胞の変性過程を一段と明確に把握出来る事を知つた。胞体内顆粒も同様に運動中のものでは停止せるものに比し、ややその所見を異にするが之については第二編に詳述する。核、胞体及び胞体内顆粒の染色の機転について Strugger, Contier などは *Speicherung* と呼び、山下<sup>52)</sup> は *Bindung* と名付けているが未だ明確でない。又 Mellors, Bertalanffy, 山下, 天木などは核小体を対象として RNA は赤色の螢光を呈すると唱えているが、私の所見では必ずしも核小体は赤色ではなく、生活細胞の場合には緑色を呈し、変性して来るとやがて赤色になる事を知つたが、この点についても第二編で詳細に述べる。胞体内顆粒ことにミトコンドリア（以下「ミ」と略す）の螢光像については Kosenow, 山下は認めているが、Contier, 天木は認めておらず、宇野は *Neutralrot* 併用で認めている。私の場合「ミ」は余り明確でなく、同種の細胞でも認める時と認め得ぬ時とあつた。生活細胞では「ミ」は極して緑色の螢光を示し、丁度胞体の中に埋つているような感がある。即ち、胞体内顆粒（固有顆粒）は「ミ」よりも強い螢光を示し、山下のいうが如き強い赤橙色の螢光は「ミ」には認め得なかつた。細胞が幼若なものより段々と成熟してくるにつけ、胞体内顆粒の赤橙色螢光が強くなり、又もとより「ミ」も減少してくるはずであるから、「ミ」の螢光像は更に不鮮明になる。さて次に腹水食細胞の運動形態、胞体内顆粒の集簇性をみる事及び核形

などにより一見して他の細胞と区別出来る。又本細胞の所見はマウスよりラッテ、家兎及び犬、猫、人となるに従い血液単球の所見に近づく。然しながら食細胞の一部には組織球にやや似た細胞も存在するが之等の細胞の本態については第二編に於て詳細に発表する。

## V. 結 論

A. O を用い生体染色及び超生体染色を施行してマウス、家兎、ラッテ、猫、犬、猿、人、鳩、鶏の腹水食細胞について螢光顕微鏡学的研究を行い次の結論を得た。

- 1) 生体染色には教室考案の簡易培養法が一番合目的であり、且つ至適培地濃度は10,000倍である。
- 2) 超生体染色による螢光像は生体染色に於ける変性像である。
- 3) 食細胞の生活細胞は核も胞体も緑色で、且つ生活度の高い小型細胞ほど染り難く、変性して来るに従つて強染する。
- 4) 腹水食細胞は一連の共通性即ち、特有な運動形式、胞体内顆粒の集簇性及び複雑な核形を有しそれ等の特徴は血液単球の螢光像の特徴に類似する。然して下等動物より高等動物になるほど、その類似性が強まる。

稿を終るに臨み終始御懇切なる御指導と御校閲を賜わりし恩師平木潔教授並びに大藤助教授に深謝します。

(本論文の要旨は第19回、第20回日本血液学会総会、第67回岡山医学会総会、第2回組織培養学会に於て発表した)

(文献、附図は第三編巻末に一括記載す)



## Cytological Studies on Aspirated Fluid by Fluorescence Microscope

### Part 1. On the ascites cells, especially phagocytes in normal persons and various animals.

By

Susumu Hattori

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

In the fluorescence microscopic study of ascites cells vitally or supravitaly stained with acridine orange, which were aspirated from mice, rabbits, rats, cats, doge, monkeys, human, pigeons, and chicken the author obtained the following results.

1. For the vital staining the simple culture method devised in our department is most suitable and as for the concentration of the medium the dilution of  $10^4$  is most appropriate.

2. The fluorescence picture by the supravital staining of the ascites cells turned out to be a degenerated picture in vital staining.

3. Active phagocytes have nucleus and cell body stained green and those more active and smaller cells are difficult to be stained and they become stained deep as they degenerate.

4. Ascites phagocytes all possess a series of common characteristics, namely, a peculiar movement pattern, the massing tendency of cytoplasmic granules and nuclei of complicated shape; and these characteristics resemble those of the fluorescence picture of monocytes in blood. Moreover, this similarity tends to be greater in the higher class of animals.

---