

骨髓並びに末梢血; 体外組織培養に 於ける単球系について

第 1 編

骨髓単球及び血液単球, 体外組織培養 の生態観察並びに染色所見

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

松 木 茂

〔昭和 34 年 1 月 10 日受稿〕

内 容 目 次

第 1 章 緒 言	2. 運動型態
第 2 章 生態観察	3. 遊走速度
第 1 節 実験方法並に実験材料	4. 墨粒貪喰
第 1 項 実験材料	5. 生体染色
1. 培養組織	第 3 章 培養組織の固定染色による観察
2. 培養支持体	第 1 節 固定染色法
3. 発育促進物質	第 1 項 固 定
第 2 項 実験方法	第 2 項 染 色
第 2 節 実験成績	第 2 節 染色所見
第 1 項 骨髓並びに末梢血培養に於ける単球 の生態観察	第 4 章 総括並に考按
1. 培養経過	第 5 章 結 論

第 1 章 緒 言

最近血液細胞学の発展と共にその観察方法として、従来の塗抹染色、超生体染色、貪喰能の所見に、新に骨髓及び末梢血の体外組織培養法による観察が重要視されるに至った。

血球の動態観察、即ち運動型態や遊走速度に関する研究は枚挙に遑がない程多い。即ち Schültze⁹⁵⁾、Wolff、Sohilling¹⁰⁶⁾、Commandon¹⁶⁾、Jolly⁵⁰⁾、Philip-born⁸⁰⁾、Wallgren、Osgood & Brooke⁸⁶⁾等の報告があり、本邦に於ても杉山¹⁰⁰⁾、森¹⁰¹⁾、渡辺¹¹⁰⁾、栗原⁶³⁾、千田⁸⁷⁾等の詳細な研究がみられるが、何れも末梢血球の超生体観察を主としたもので、又骨髓白血球では栗原⁶³⁾、坂野⁹⁴⁾、井上の超生体観察があるが何れも観察時間も短く且つ細胞機能の減弱乃至障碍されたものを対象としている。

一方造血臓器中最も主要なる地位にある骨髓の組織培養による研究は Foot²⁸⁾、Carrel et Burrows、Ingebrigsten⁴⁴⁾、Erdmann²²⁾等により研究観察されているが微々たるものである。

又単球に関しても古来 Ehrlich²⁰⁾、Naegeli⁷⁴⁾を始め多数の研究者によつて、主として発生学的並びに形態学的に論議され、本邦に於ても天野³⁾⁵⁾⁷⁾、勝沼⁵¹⁾、小宮⁶⁸⁾、森田⁷⁰⁾等による報告がみられる。而しそれは主として血液及び臓器の固定染色並びに超生体観察によるもので、組織培養による単球の観察は原の家鶏白血球培養組織の鍍銀染色による微細構造の研究がみられるのみである。

然るに教室に於ては先年来系統的に骨髓組織培養を研究し多大の業績を挙げてきているが、私はその一環として健康人及び健康家兎の骨髓及び末梢血の体外組織培養を行い、培養時間毎に単球の生態観察

を行い、又培養組織を固定染色により鏡検し、従来の塗抹染色に於ける単球との比較及び培養動態観察時の単球所見との関係について興味ある知見を得たので報告する。

第2章 生態観察

第1節 実験材料並びに実験方法

第1項 実験材料

1. 培養組織

健康壯年者7例(男子4名,女子3名)について胸骨々髄穿刺を施行し、穿刺液中の骨髓組織片を取り出し、リングル氏液で十分に末梢血を洗い流し細片とする。

健康壯年者7例について(男子4名,女子3名)ヘパリン加血液を採取し軽く振盪し血液とヘパリンを混和し、直ちに遠心沈澱1000回転5分すると、血漿と沈澱せる赤血球の中間に白色の薄い白血球層が出来る。静かにピペットにて血漿を除去し、鶏胎圧搾液1滴を加え、約5分間37.0°C 孵卵器に入れると白血球が凝固する。これを取り出しリングル氏液にて洗い細片とする。

次に家兎は健康幼若家兎(1.500~1.800 g)を使用し、実験前1週間以上一定食餌を与えたもので実験した。

骨髓は空気栓塞で殺した家兎の大腿骨髓を取出し、リングル氏液で十分に洗い細片とする。

末梢血は心臓穿刺によりヘパリン加末梢血を採取し、以後は健康人と同様の処置により、白血球の細片を作る。以上の操作はすべて無菌的に行うことが肝要である。

2. 培地支持体

生理的食塩水1000倍稀釈のヘパリンで注射筒内を湿す程度とし、健康人肘静脈並に健康家兎心臓穿刺により約15 ccの血液を採取し、よく混和して後1分間2000回転で10分間遠沈し、上層の血液を分離して用いた。

3. 発育促進物質

9日目孵化鶏卵より鶏胎児を取出し、リングル氏液にて洗い、Fischerの胎児圧搾器を使用して圧搾し、3000回転15分間遠心沈澱し、その上清を使用した。

第2項 実験方法

乾熱滅菌した大型被覆硝子の中央に、 $\frac{1}{4}$ 注射針にてヘパリン加血漿2滴を滴下し、直径1.5 cmの円形に拡げ約1 mm³の組織片を置き、次いで鶏胎児

圧搾液を同大の注射針で1滴滴下する。一方載物硝子の凹窩の周囲に滅菌ワセリンを盛り、培養を終えた被覆硝子の上に逆に置き、培地が固定するまでそのまま孵卵器に入れ、凝固完了したる後両硝子間をパラフィンにて十分に封ずる。次いで37.0°Cの孵卵器中にて培養する。

観察は37.0°Cに保つた顕微鏡加温装置中に顕微鏡を入れ、運動・型態の観察を行い、遊走速度の測定はAbbe氏描写器にて細胞の中心点の軌跡を画き、キユルビメーターで計測しその倍率から換算して実数値を求めた。

墨粒貪喰は数室角南⁷⁷⁾⁷⁸⁾¹⁰²⁾の方法により、生体染色は教室田村⁷⁷⁾⁷⁸⁾¹⁰⁷⁾の方法により実験観察を行った。

第2節 実験成績

第1項 骨髓並に末梢血培養に於ける単球の生態観察

1. 培養経過

培養後時間の経過と共に観察すれば、直後より多形核白血球の遊出が認められるが、単球は培養後3時間で原組織周辺に出現し始める。培養条件の悪い時、即ち、無菌的操作が不十分か、ヘパリン加血漿、鶏胎圧搾液が古いか、培養組織の洗滌が十分でない時には、単球出現時間も遅延する。増生帯中心部に出現した単球は、後述する固有のD型運動をとりながら培養時間の経過と共に増生帯中間部及び周辺部に向つて進んで行く。培養後8時間で中間部に見られるようになり、以後中間部に多くなり、12時間になると周辺部と中間部との境界に達するが、周辺部に見られる単球は極く僅かである。培養後9時間より単球の一部には、その胞体内に光輝性のある大きな変性顆粒が認められるようになり、次第にその数を増すと共に運動も次第に鈍くなる。遊走速度の減少と共に周辺部への遊出は増加せず培養後18時間で単球は中間部に最も多数にみられ、次で中心部に、周辺部には少数みられるのみである。培養後24時間になると周辺部の多形核白血球に僅かながら核崩壊及び変性がみられ細胞崩壊が進行するが、単球は抵抗が強い為か周囲の細胞が崩壊しても僅かながら運動を示しているか停止しても崩壊されず稍膨化している。培養後48時間になると周辺部、中間部の単球は膨化しているのも認められるが、中心部単球は尚運動を続けている。培養後72時間になると単球の膨化、運動停止しているのが認められ、96時間になると膨化は強くなり崩壊像もみられる。崩壊の場合は

運動停止後胞体が膨化し細胞膜が薄く、核は一方に偏し楕円形。卵形を示し、変顆粒はその数を増し、細胞膜の破壊と共に核・顆粒は外に放出される。又崩壊前に変性現象として胞体内に空胞の認められるものもある。培養後120時間になると周辺部、中間部単球は殆んど変性乃至は崩壊しているが、中心部では原組織より増生せる繊維芽細胞・組織球に混じて僅に遊走しているもの、又運動停止しているのが認められる。

単球の分裂及び他細胞への分化は認められなかった。

2. 運動型態

単球は他細胞に比し大型で細胞膜は薄く、為胞体の輪廓は稍不明瞭で細胞全体に透明な感が強く、固有顆粒も明瞭なものはなく非常に微細な顆粒を有す。核は略腎形を呈するが核膜の薄いため稍見えにくく、非常に柔い感じで、運動時には胞体の全周より特有の偽足を出没する。即ち薄い布がゆつくりと風にたなびいている如き偽足で、位相差顕微鏡によれば偽足運動が尚詳細に観察される。核は運動時、細胞の先進部乃至中心部を占め、胞体の変形に対して従順に適應して長く伸び又は短縮し腎形、垂鈴形、紡錘形、卵円形と変形し非常に柔い感じである。胞体内の微細顆粒もかなり活潑に流動するが胞体の変形、運動につれて流動しているようで顆粒個々の運動ではない。培養後9時間になると変性顆粒が出現し、光輝性の強い単球特有のものでその数は培養経過と共に増加するが、多くのものは少数で1~6個が多いが、中には10個又はそれ以上見られるものもある。

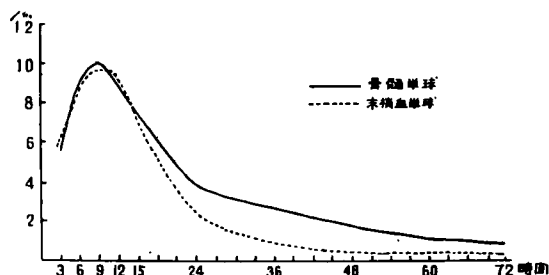
この顆粒は大きい為か流動は滑らかでなく核凹陷部に集合しやすい傾向があり、Rosetteの如く見える事もある。単球の運動は培養後6乃至8時間が最も著明で以後漸次衰えてゆくが、運動全体が緩慢になるのみで運動型態に変化はない。ただ運動停止の前段階で胞体の一部が半円形に突起を出すようにふくれ、ゆるやかに突起を縮めるのを見ることもあるが、これに対しては核の変形は認められない。

以上培養経過・単球運動型態は人骨髄・末梢血、家兎骨髄・末梢血について略々同様の為一括して記載した。

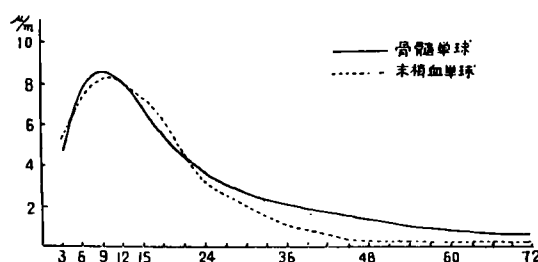
3. 遊走速度

第1図及び第2図に示す如くで、人骨髄及び末梢血に於ては培養後遊走速度は上昇するが8乃至9時間を頂点として次第に下降し、11時間より21時間迄

第1図 家兎骨髄及び末梢血培養に於ける単球の遊走速度



第2図 健康人骨髄及び末梢血培養に於ける単球の遊走速度



は末梢血の方が稍高値を示すも大差はないが、21時間以降になると末梢血単球は骨髄単球に比し急速に低下する。家兎骨髄に於ては培養後8時間迄は上昇し15時間より末梢血は骨髄に比し低値を示す。(第1図、第2図)。

4. 墨粒貪喰

単球は貪喰能は極めて旺盛で培養時3時間で既に貪喰せるのを認めるものもあり、時間の経過と共に墨粒の数と大きさを増加し、24時間後になると総ての単球が強度に貪喰しているのが認められる。墨粒は核凹陷部に集中する傾向があり、特に運動減退時に見られるが、強度に貪喰したものは細胞内が墨粒で充満せるのを認める。

5. 生体染色(中性赤)

中性赤顆粒の単球内出現は培養後4時間で認められるものから培養末期に至るまで見られないのみであり、染色度も一定でないが時間の経過と共に中性赤顆粒は増加し、細胞運動の盛な時は中性赤顆粒は細胞質の流れによつて移動し、機能が稍衰えると核凹陷部に集り花冠形成が認められる。花冠形成の認められるのは家兎骨髄及び末梢血では全単球の60%、人骨髄及び末梢血に於ては26%であつた。花冠形成は培養時6時間頃より見られるが18乃至24時間で最も多く見られ以後時間経過と共に中性赤顆粒は消失する。

第3章 培養組織の固定染色による観察

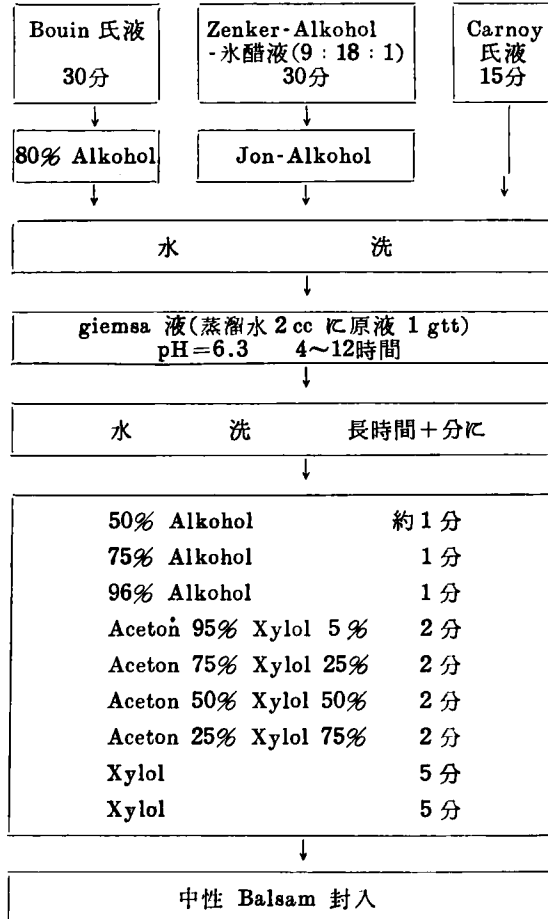
第1節 固定染色法

既に培養せる材料を孵卵器より取出し、密封せるパラフィンを薄刃にて除き、培養組織の附着せる被覆硝子を剝離す。家兎骨髓及び末梢血の場合は直ちに固定、人骨髓及び末梢血の場合は蒸気固定では直ちに、液体固定では 37.0°C リンゲル液中に3乃至5分(孵卵器中)放置後固定液に入れる。これは人骨髓及び末梢血では固定液に入れた時原組織が剝離する事があるからである。

第1項 固 定

第1表に示す如く種々の固定液について固定時間を変えて試みた結果、Zenker-alkohol-氷醋酸液(Zenker液9容, Alkohol 18容, 氷醋酸1容を混じた液)が最もよく次で Bouin 氏液, Carnoy氏液であつたので前者を主として用い、後2者を補助的に使用した。(第3図)(第1表)

第3図 培養組織固定染色法



第1表 培養組織の固定液

固 定 液	固 定 態 度
メタノール	
20%~50%~75%~96%アルコール	
May grunnwald	
無水アルコール	
2%フォルマリン	
5%フォルマリン	
10%フォルマリン	
2%フォルマリンリンゲル液	
5%フォルマリンリンゲル液	
Altmann 液	○
Flemming 液	○
オスミウム酸蒸気	○
Jolly 氏液	
Carnoy 氏液	◎
Müller 氏液	
Orth 氏液	○
Maximow 液	
Zenker 液	○
Helly 液	○
Apathy 液	
Schaudinn 液	○
醋酸・フォルマリン・アルコール液	
Bouin 液	◎
Allen 液	
Downey 液	
Regard 液	
Heidenhein 液	
Zenker-アルコール, 氷醋酸	◎
Stieves 液	
フォルマリン氷醋酸蒸気	
Zenker-アルコール液(10:1)	

- ◎ 固定良好にて収縮少し染色良好
- 固定稍良好, 又は固定良好なるも染色不良

第2項 染 色

ギムザ染色によつた。日常血液細胞の染色に用いられる為、普通塗抹標本との比較が容易なためである。即ち固定・後処置の終つた標本を蒸溜水 2 cc にギムザ原液 1 滴の割に加え、P. H 6.3に調整した液に入れ、4乃至12時間染色後に水洗、脱色、Xylolで透明にして載物硝子上に Balsam で封入し顕鏡する。染色の時間及び水洗、脱色は顕鏡しながら調節する。即ち第3図の如く操作する。

第3項 染色所見

弱拡大に於て原組織を中心に円形に遊出せる細胞

の染色像をみる。油浸1000倍像にては各細胞は運動状態を示したまま固定染色される為、塗抹標本と異つて複雑な形態を示し、原組織に近い細胞は類円形を、増生帯周辺のもの程不整形を呈するものが多い。以下単球の培養後各時間毎の染色所見を述べる。

培養後3時間；原組織周辺部にのみ存在し、細胞型態は卵円形、紡錘形、腎形を呈し、1側に偽足様の原形質突起を出すものあり。核は多くは胞体の1側に偏在するも、中央に位するものもあり、大きさは約胞体の $\frac{1}{2}$ で楕円形、腎形を呈する。旗状偽足、即ち細胞全周にみられる偽足は動態観察の場合のみ認められ、固定染色像に於ては全く欠除する。原形質は塩基性に淡灰青色に染りAzur顆粒は明かでない。

核はクロマチンに乏しく淡染し繊細網状構造を有す。

培養6日間；細胞型態は著しき変化を示し卵円形、亜鈴型、紡錘形、不整形を呈し、核は細胞の先端部に位置するものが多く、類円形、腎形、亜鈴形等胞体の形態に応じて種々雑多の形を示す。

培養9時間；此の期に最も複雑な形態を示し、胞体は馬蹄形、曲玉形、紡錘形、亜鈴形、棍棒形等で原形質突起も長く伸び餅を引伸したような形をとるものもある。核も偏在するものが多く、胞体の長く伸びたもの程偏在の傾向が強い。核の型態も細胞型により種々の形態をとるが胞体の変化程著明でない。原形質及び核の染色の態度は前述の如くで、胞体、核の形態変化以外は普通塗抹染色標本と同様である。

培養12時間；9時間のものと殆ど同様の所見を示す。変性顆粒は染色標本に於ては著明でない。

培養24時間；胞体、核共に尚変形著明ではあるが、長軸にのびた形ものは減少し原形質突起も短くなつてゐる。染色態度の変化はない。

変性顆粒が少数濃染しているのを認める。

培養48時間；周辺部単球は類円形化し、核も類円形となり運動停止の状態を示すのが認められるが中心部、中間部の単球は変形著明である。

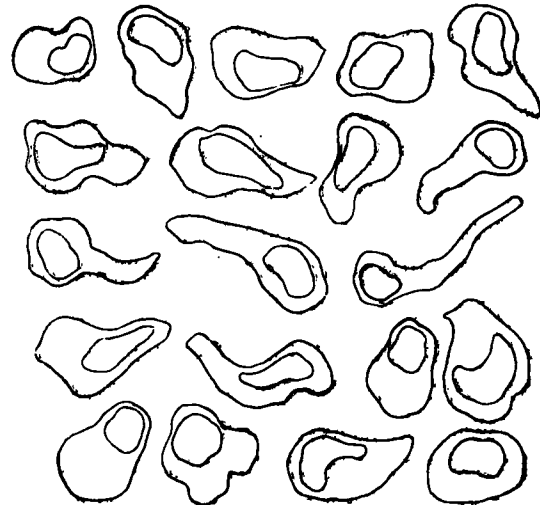
培養72時間；細胞の類円形化は数を増し、胞体は稍膨化の傾向のあるものも認められ、これらは原形質の染色に濃淡や非常に淡染したのがみられる。核は類円形又は腎形を示し、胞体の中央又は1側に存在する。中心部単球は変形著明なるも形態変化は今迄程でない。変性顆粒の濃染したものが多く見られ

る。

培養96時間；類円形又は不整形を示す胞体内で核のみ類円形をとるものが多くなり、胞体内に空泡を有するもの、胞体膨化の著明なものが多くなる。細胞膜の破壊したものが認められる。

培養120時間；細胞の膨化、破壊変性現象は強くなり、尚紡錘形、菱形、亜鈴型を示すものでも核の変化は少く、楕円、類円形を示し、類円形細胞に於ても細胞膜に凹凸のあるのが見られる。変性の進行した細胞では染色も悪く、原形質の殆ど染らぬものも認められるが、核の染色は割合良好に保たれてゐる。(第4図)

第4図 健康家兎骨髄被覆培養組織固定染色による単球の形態



第4章 総括及び考按

単球は Ehrlich (1895) が Mononukleäre Leucocyten u. Übergangsform と名付けてより、Pappenheim により Monocyten の名称が提案せられ、以後その所属及び発生をめぐつて Aschoff⁽⁸⁾⁽⁹⁾、清野⁽⁶⁾⁽⁷⁾、Sabin⁽²⁰⁾⁽²⁸⁾、Forkner⁽²⁹⁾ 等により種々研究論議され血液学上の謎の分野であつたが、天野⁽³⁾⁽⁵⁾ は単球系を骨髓系・淋巴系・網状内皮系とは別の無関係な1個の独立した細胞系と見做し、その発生部位を骨髓、一部脾と見る事を提唱し、この方面の論議は一段落したかの感がある。而るに今迄の観察は塗抹固定染色・超生体観察を主としており、体外組織培養によるものは極めて少いが、その中で Carrel & Ebeling⁽³⁰⁾ は液白血球より淘汰法によつて培養の世代を重ねて単球の純培養に成功している。又 Osgood⁽³⁵⁾ は血液培養より、血液内に出現する少数

の前単球は核分裂を示した事を認め、Israelis⁴⁷⁾ は白血病骨髓培養に於て単球の發育相を示し、骨髓芽球とは全く別個の發育を示す事を明かにしている。本邦に於ても原³⁶⁾³⁸⁾、河嶋⁵⁴⁾等の研究があるが、最近教室の大藤⁷⁵⁾⁷⁶⁾⁷⁷⁾⁷⁸⁾¹⁰²⁾・亙理・角南・田村等による人・家兎骨髓の培養観察、更に平木⁴³⁾教授の映画撮影による観察によつて最近の發展は誠に素晴らしいものがある。

さて私は被覆培養法によつて培養した健康人、健康家兎の骨髓及び末梢血白血球に就て特に単球の生態を詳細に観察した。

先づ単球遊出は培養後3時間よりみられるが、出現時間の多核白血球との差は遊走速度及び絶対数の差よりも当然と考えられる。又増生帯中間部に多いのも同様に遊走速度の差の程度によるものと考えられる。Carrel & Ebeling¹³⁾が淘汰法によつて単球純培養に成功した如く、単球は他血液細胞に比し崩壊変性が遅いため培養後長時間経過しても運動性が見られるが48時間頃より次第に崩壊現象が進行する。変性顆粒も単球特有のもので、その光輝性顆粒は顕微鏡下に於て単球発見の目標となる。

運動型態の中最も特徴のあるのは細胞周囲よりの旗状偽足であるが、これは骨髓培養で亙理がのべている如く、旗が風にゆつくりなびく様な形状を示し、末梢血に於ても全く同様であつた。又核の胞体運動に伴う変形の強い点も特徴と云える。

遊走速度は家兎で最も盛んな時間の平均では骨髓10.0 μ /m、末梢血9.7 μ /m、人では骨髓8.6 μ /m、末梢血8.25 μ /mであるが、第1.2図は各時間毎の多数の平均値であつて勿論最高速度では18 μ /mに及ぶのみみられる。亙理⁷⁶⁾は家兎骨髓単球の最大遊走速度を15.78 μ /mと述べているが、之は遊走速度の大なるものゝ平均であつて、私の如き培養後一定時間における平均値ではない。

遊走速度の最大平均値は人、家兎、骨髓、末梢血を問はず培養9時間が最高で、家兎が人よりやや値が大であり、人、家兎何れの場合も骨髓単球の方が末梢血単球に比し稍大であるがその差は僅少である。その後も略々同値を示すが24時間以後は末梢血単球遊走速度の方が稍急速に低下してめくが、これは末梢血培養前の前処置により細胞機能の減弱を来しているのも一因と思はれる。坂野⁹⁴⁾は超生体観察による遊走速度に於て骨髓単球は偏差域が大で最大値は末梢血と同程度であるが最小値は末梢血より小であると述べている。然し私の場合には偏差域の差は

認められなかつた。

墨粒貪喰は骨髓・末梢血単球共に角南¹⁰²⁾の骨髓単球の報告と一致する。

生体染色は花冠形成は単球のみの特徴でないといはれる如く好中球にも見られるし、反対に単球にも必ずみられるものではないが、他細胞に比し花冠形成の百分率は多い。只人骨髓及び末梢血に於けるそれは家兎に比し低率であつて、骨髓単球と末梢血単球の花冠形成の百分率は人、家兎共に同値を示した。

次に単球より他細胞への、又他細胞より単球の変化についてはCarrel & Ebeling¹⁴⁾¹⁵⁾は培養にえ球の纖維芽細胞への化生を認め、Fisher²⁶⁾もその事実を報告しHaan³³⁾は灌流培養法によつて単核遊走細胞が纖維芽細胞に変化しうるとのべ、Maximow⁶⁷⁾⁶⁸⁾は単球よりPolyblastenとなり纖維芽細胞に化生する事を主張し、Bloom¹⁰⁾は淋巴球→単球→組織球に、Seemann⁹⁸⁾はRatteを用い単球が組織球化する事に賛意を表し、Moellendorff⁷¹⁾⁷²⁾⁷³⁾一派は纖維芽細胞→単球→組織球に変化するとしているが天野は家鶏血液培養に於て出現する纖維芽細胞様単球と纖維芽細胞との差異をのべ纖維芽細胞ではないとしている。そこで私は培養経過中に於て単球を詳細に観察していつたが、崩壊は増生帯中に於てみられるが他細胞への化生は認められず、纖維芽細胞は骨髓培養に於て培養後24乃至36時間頃より原組織周辺に見られるが、単球とは全く別個に増生したものであり、単球より化生したものととは考えられない。又他細胞から単球への化生も認められなかつた。

以上の如く被覆培養法によつて単球の生態観察を行つて来たが、培養中の組織を直ちに固定染色すれば遊走細胞は運動型を示したままで観察される筈であるので従来の塗抹染色による略々円形・平面的な単球所見との相違特に胞体・核の型態的变化を観察せんとして固定染色法を試みた。

培養組織の固定染色法としてはFisherが2%フオオルマリン・リンゲル液固定、ヘマトキシリン・エオジン染色を、Grossmann³¹⁾が骨髓培養にOrth氏液固定、ギムザ染色を、原³⁵⁾が家鶏白血球培養にChampy氏液固定・鍍銀染色を、河嶋⁵⁴⁾が家鶏胎児骨髓培養にCarnoy氏液固定、ギムザ染色を、大谷⁸⁰⁾の鶏胎児紅彩及び鶏胎心臓培養にフオオルマリン醋酸蒸気固定、ヘマトキシリン・エオジン染色及びRadioautographieを行つている。その他固定

には Zenker 氏液、Bouin 氏液が用いられているが、血液細胞は固定に際し収縮する傾向が強いので、私は通常固定に用いられるものを瀕回に条件を変えて試みた。通常塗抹標本に用いられるメタノールでは、細胞の収縮が強く染色しても十分に所見を得られず、低濃度アルコールより高濃度アルコールを通じたものでは細胞が稍膨脹した型のものが多く、又逆に収縮の強いのもみられる。ホルマリン使用の固定液は収縮が中等度乃至強度で染色度が良好でなく、オスミウム酸固定は、固定は良好であるが染色度が良好でない。昇汞を含む固定液は尚収縮が可成りみられた。以上多くの固定液を第1表に示す如く試みた結果、収縮も少く染色度も良好な成績を得たのは私の作製した固定液 Zenker-Alkohol-氷醋酸液で、次で Bouin 氏液及び Carnoy 氏液である事がわかった。

培養組織は支持体及び発育促進物質の血漿、鶏胎圧搾液があるため、細胞は染りにくく且つ培地が共染する。又細胞は塗抹標本と異り立体形のため細胞の厚みがあり、且つ一層に増生するのでなく培地全体の厚さにわたって増生するため、特に原組織周辺には細胞が重り合い1ヶの細胞の観察にも微動装置による調整を要する。血漿共染のため染色後の水洗及び脱色には注意を要し、絶えず顕微鏡下に於て染色の度合を注意しながら操作する事が肝要である。

染色所見は上記上記条件のために1ヶの細胞についての詳細な所見は塗抹標本に劣るかも知れないが、可成りの程度にはその所見は得られ、細胞形態核・胞体の染色状態より直ちに単球である事はわかる。即ち優れているのは運動型態を示したままの状態に固定される為、死後染色とは云い乍ら生活状態に最も近い条件で観察され得る点で、染色所見よりも運動の状態が推測される。培養時間の経過と共に次第

に複雑なる型態を示し、9時間に於て最も型態的変化の著しいことは、生態観察及び遊走速度、運動型態の変化の時間的経過と一致する。遺憾に思うは単球の最も特徴とする特有の偽足が固定によつて全く消失する事であるが、私の試みた何れの固定の場合にも見られず、今後の研究をまつより仕方がない。

第5章 結 論

健康人骨髄及び末梢血白血球並びに幼若健康家兔骨髄及び末梢血白血球の体外及び組織培養を行い、培養時間毎の単球生態観察及び固定染色所見を検索した。

1. 単球は培養3時間で出現し、9時間で最も運動が著明、24時間以後より漸次崩壊が始る。
2. 運動型態はD型を示し特有の偽足運動がある。
3. 遊走速度は人・家兔の場合何れも培養経過を通じ、骨髄と末梢血単球に著しい差はないが培養後期になると末梢血単球の方が骨髄単球より低下する。
4. 染色液にギムザ液を用いた場合、培養組織の固定は私の考案した Zenker-Alkohol-氷醋酸液が最もよく、次いで Bouin 氏液・Carnoy 氏液が適当である。
5. 培養組織固定染色所見は塗抹染色所見に劣るが、運動型態を示したままの像が観察される。
6. 骨髄単球と末梢血単球は人・家兔共に生態観察及び固定染色所見に於ても差は認められなかつた。
7. 単球より他細胞への、又他細胞より単球への化生は認められなかつた。

擲筆するにあたり終始御懇篤なる御指導並びに御高閲を賜わつた恩師平木教授、大藤助教授に厚く感謝致します。

本論文の要旨は昭和31年第470回岡山医学会に於て発表した。

Studies on the Monocyte Series in the Bone-Marrow and
Peripheral-Blood Tissue Cultures

Part 1. Vital Observations and Findings of Fixation and Staining
of Monocytes in the Bone-Marrow and Peripheral-
Blood Tissue Cultures

By

Shigeru MATSUKI

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

In a series of the bone-marrow tissue culture of the sternum and peripheral-leucocyte tissue culture of healthy persons, and the bonemarrow tissue culture of the femur and peripheralleucocyte tissue culture of young healthy rabbits, both by the cover-slip method, the author investigated living conditions of monocytes and fixed and stained cultured tissues periodically.

1. Monocytes appear after 3 hours' culture, and their movement is most vigorous 9 hours after the start of culture, but from 24 hours on they begin to disintegrate gradually.

2. The movement pattern of monocytes is of D-type, showing the particular pseudopodial movement.

3. The wandering velocity of monocytes in bone marrow and peripheral blood through the tissue culture shows no marked difference both in the case of man and rabbits, but in the later stage of culture the wandering velocity of the monocytes in peripheral blood becomes less than that of bone-marrow monocytes.

4. In the case where Giemsa stain is used for staining, for the fixation of cultured tissue a modified form of Zenker-alcohol-glacial acetic acid solution of my own devise is best, and next, Bouin's solution and Carnoy's solution are suitable.

5. As for the findings on the fixation and staining of monocytes, although they are a little inferior to those on the smear-stained specimens, they present the picture showing the actual movement pattern.

6. No differences can be found between bone-marrow monocytes and peripheral-blood monocytes both in man and rabbits by the vital observation and fixed and stained specimens in tissue culture.

7. No transformation either from monocytes to other cells or from other cells to monocytes can be recognized in the present experiment.
