

脾組織培養に関する研究

第 2 編

脾細網細胞の中性赤並びにヤーマス緑 B による生体染色
及び墨粒貪喰に就いて

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木潔教授)

木 畑 正 義

〔昭和43年12月12日受稿〕

内 容 目 次

I. 緒 言

II. 実験材料並びに実験方法

1) 実験材料

2) 実験方法

3) 中性赤 (NR) 並びにヤーマス緑 B (YG)

の添加濃度に就いて

III. 実験成績

1) NR 並びに YG による生体染色所見に就いて

2) 墨粒貪喰所見に就いて

IV. 総括並びに考按

V. 結 語

I. 緒 言

前編で得られた位相差顕微鏡による生態観察に基づく細網細胞の塩基性色素中性赤及びヤーマス緑 B (以下 NR 及び YG と略す) に対する染色所見を検討し、また墨粒貪喰の態度を観察した。

塩基性色素による細胞学的検索は血液学者の間に賞用されているが³³⁾⁷²⁾⁸²⁾、一方田中、速水¹⁴⁾以来組織培養に色素を添加する方法が行なわれており、特に教室では各種組織培養に NR 及び YG を添加する生体染色の方法にて基礎的並びに臨床方面に数々の業績を挙げている。一方、脾の細胞学的検索には Sabin¹⁰⁾、森田³⁴⁾、大森³⁵⁾そして加納²⁴⁾の研究が知られている。私は本編に於いて、これらとは異なって、回転培養法で培養されたある時期の脾細胞に NR 並びに YG を添加して観察しようとするものであり、本法が従来試みられていない漸新な方法である事はいふ迄もない。又、清野²⁷⁾により酸性色素生体内注入により網内系が定義づけられ、更に今日に至る迄その貪喰性が細網細胞の最も重要な特徴であることからして、前編で観察した細網細胞の墨粒貪喰の態度に就いての検討は疎そかであってはならない。

そこで私は前記生体染色と並行して組織培養に於

ける脾細網細胞の墨粒貪喰能をも検討したので、以下之等の成績に就いて述べる。

II. 実験材料並びに実験方法

1) 実験材料

第一編で用いたと同じ材料を用いた。

2) 実験方法

a) NR 並びに YG 生体染色は、先づ第 1 編の方法により回転培養を行ない、一定時間、即ち 24, 48, 72, 96, 120 時間後に短冊ガラスを取出し溝型載物ガラスに包埋する際に、培養液と両色素を混合して封入包埋した。この濃度に関しては後述 3) 項にて検討した結果を採用した。観察は直後より、或いは一定時間、30分、1、3、6 時間及び 12 時間孵卵器に放置せる後取り出し、37°C 保温箱中にて明視野顕微鏡で観察した。

b) 墨粒貪喰の検討には i) 回転培養の始めから培養基に墨粒を添加する方法及び ii) 溝型載物ガラスへ封入包埋時に添加する方法を吟味したが、ii) の場合 plasma-clot に妨げられる為めか墨粒子の浸透が不十分で目的を達し得ないので以下の観察には i) の方法を用いた。杉山⁴⁶⁾の墨粒浮遊液調整法に基づいて調整した墨粒浮遊液を培養液 2cc に対し 1/3 針にて 2 滴滴下し、一方組織固定の際に、

鶏胎圧搾液1滴、血漿1滴に同じく墨粒浮遊液1滴を加え混合し plasma-clot とした。観察は溝型載物ガラス包埋後 37°C 保温箱中にて明視野顕微鏡下に行なった。

3) 中性赤 (NR) 並びにヤーヌス緑 B (YG) の添加濃度に就いて

a) NR.

最終濃度を $1/5 \times 10^{-3}$ 、 $1/10 \times 10^{-3}$ 及び $1/25 \times 10^{-3}$ の3段階とし、教室田村⁴⁰⁾の方法で平均染色度を求めた。48時間及び72時間培養後、染色液を前記の方法で添加し30分後及び3時間後の各型の細網細胞に就いて夫々値を求めた。成績は表1の如くである。即ち一般に72時間培養後のものが染色性は

表1. 脾組織培養増生帯細網細胞

細網細胞	培養後 染色後 中性赤 濃度	中性赤平均染色度			
		48時間		72時間	
		30分	3時間	30分	3時間
I 型	$1/5 \times 10^{-3}$	0.20	変性強し	0.14	0.93
	$1/10 \times 10^{-3}$	0.14	0.28	0.25	1.08
	$1/25 \times 10^{-3}$	0.05	0.12	0.26	0.11
II 型	$1/5 \times 10^{-3}$	0.86	変性強し	1.22	変性強し
	$1/10 \times 10^{-3}$	0.43	0.50	1.15	1.08
	$1/25 \times 10^{-3}$	0.10	0.44	0.23	0.50
III 型	$1/5 \times 10^{-3}$	3.17	変性強し	3.27	変性強し
	$1/10 \times 10^{-3}$	2.95	2.55	3.43	3.23
	$1/25 \times 10^{-3}$	1.37	3.22	2.50	2.92

注：平均染色度＝

$$\frac{(0 \times n_1) + (0.5 \times n_2) + (1 \times n_3) + (2 \times n_4) + (3 \times n_5)}{n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5}$$

(0) : 全く染色顆粒を認めぬ

(0.5) : 1～3コ認める

(1) : 少数認める

(2) : 中等数以上の染色顆粒ないし少数の融合

(3) : 多数の顆粒又は中等数以上の融合

亢進している。又30分後観察では $1/5 \times 10^{-3}$ が最もよく染まり、濃度が低下すると染色性は低下する。3時間後では $1/5 \times 10^{-3}$ は染色高度となる反面中性赤空胞大となり、一部色調消褪ないし変性現象を認める。又 $1/25 \times 10^{-3}$ では30分後の染色は充分でなく、3時間で $1/10 \times 10^{-3}$ に近い価を示すが不充分である。従って以上より $1/10 \times 10^{-3}$ を最適最終濃度とした。

b) YG

教室太田⁴⁰⁾は骨髓組織培養にて $1/60 \times 10^{-3}$ を用いているが私は $1/20 \times 10^{-3}$ 、 $1/60 \times 10^{-3}$ 及び $1/100 \times 10^{-3}$ の3段階で、染色するに、 $1/20 \times 10^{-3}$ では直後より強く染まるが、短時間で膨化し褪色する。 $1/100 \times 10^{-3}$ では染色性著しく弱く、 $1/60 \times 10^{-3}$ では数時間にわたり一定の染色性を保つことが判明した。

c) 小括

以上より NR $1/10 \times 10^{-3}$ 、YG $1/60 \times 10^{-3}$ に最終濃度を保ち観察を行なうことが最も好ましいと結論した。

III. 実験成績

1) 脾細網細胞の NR 並びに YG による生体染色所見について

前編でみた如く細網細胞を中心とした増生は48時間頃から最も旺盛となるので、主として48時間培養後染色液添加による所見を中心に述べる。

染色液添加直後ないし30分頃より観察するに既に概ね好ましい染色状況を呈している。前編にて位相差顕微鏡を中心とせる観察により脾細網細胞を I、II_a、II_b、III_a、III_b 型に分類したが、本項でもこれに従って観察を行ない、大略この分類に沿った特徴的所見を得たので以下それに準じて述べる。

I型：(第20図) 淋巴球の3～4倍大で核及び核小体を明瞭に認め、顆粒は殆んど認めない。染色後30分頃迄は、NR 可染物は殆んど認めず糸粒体が YG に染まり多数認められる。胞体全域に於いて、核周に密で辺縁に行くに従い粗に分布す。形態は短桿状ないし球状を示し、位相差所見とはほぼ同大ないし稍々大である。明るい緑青色を呈する。一時間頃より、胞体に橙黄色微細顆粒が数ケないし十数ケ現れる。存在部位は核に接した位置で、必ずしも核陥凹部に一致しないが、集簇性である。なお以上の経過中に、細胞全体の位置移動は全く認められず僅かに胞体の変形並びに核の変形を観察し得た。3時間頃で、NR 染色は最高に達するものと思われ、一部橙黄色、一部橙赤ないし鮮赤色、更には暗赤色を呈する微細顆粒として認められるに至る。数は十数ケで最初よりやや増加しており、更に核を挟んで反対側に数ケの顆粒を持つものを認める。顆粒の大きさは始めと殆んど変化しないが、一部でやや大きさを増す。顆粒は内容充実性でゴツゴツした像を呈し、顆粒相互の融合は見られない。YG による糸粒体所見は、30分頃に認められたものと差違をみないが、時に褪色傾向を認める。かくして、3～5時間の観

察を通して本細胞は遊走能を示さず、著じるしい突起ないし偽足を形成する事はなく、僅かに胞体の変形を認める程度であった。又 NR 染色が最高頂に達した時期に於いても、NR 可染物を全く認めないものが極く少数存在し、2～3ヶしか出現しないものも存在した。即ち、段階的に数が増していることが判明した。NR 顆粒の分布は主として、核側に集簇性であるが、その配列は何れの場合も不規則で顆粒相互間に特別の関係を示さない。そして、単球にみられる如き花冠形成は認められなかった。6時間頃では NR 顆粒は殆んど変化しないが YG による糸粒体は少々膨大し褐色が進行している。12時間以後になると胞体の緊張は失われ、膨化傾向が明らかとなり、NR の色調は低下する。

II_a型：(第20, 21図) 前編で詳述せる如く、不規則な偽足を形成して遊走する所の大型の細胞であり、明視野顕微鏡下にも核及び核小体が明瞭に認められる。胞体の顆粒が時に少数核後方に認められる。染色直後より糸粒体は YG により緑青色短桿状垂鈴状又は球状に染色され核周に密で、辺縁部に粗な I 型同様の分布を示す。I 型に比し少々大で数は減少している。遊走時は、大部分核後方に集まり、極少数は核前方にも認められる。強く押し出された偽足の中には全くみられない。NR 可染物は染色直後より数ヶ～十数ヶ出現し、橙黄、橙赤色の微細顆粒及び顆粒が核側又は核を離れた尾部に集簇して存在する。尚この際 NR の周囲に YG が取り囲む様に集まっている事がある。一般的には、活発に遊走を示す場合は糸粒体が核後方に集まると共に NR 顆粒もこの部位に集簇する。顆粒は微細なものから少々大のもの迄あり時に、少数の比較的大なる空胞が少数混在する。NR 顆粒の分布は不規則で花冠形成は認められない。染色後1時間30分～2時間では余り差が認められないが顆粒の色調は赤味を増して来る。3時間頃では染色は最高調となり NR 顆粒は少々大きさを増し、形は不整形凸凹あり、鮮赤色～暗赤色を呈す。大きさを増した空胞が混在する。糸粒体は青が強くなり大きさをやや増す。鈍く輝やく小さい不染性顆粒が数ヶ集まり胞体の一侧に存するのを認める様になる。この不染顆粒は、細胞が遊走し、他の変性細胞に遭遇しこれを偽足で取り囲み、あたかも貪喰せんとする動作の行なわれた後に2～3ヶ増加するのを認めることがある。また胞体内に極めて大きな NR 空胞を認めるものが時にある、貪喰せる異物によるものと見做されるもので

詳細に観察すると、暗赤色で不整形な内容の周囲に鮮赤色～橙赤色の液胞が囲んでいるのがみられ、全体が緊張性の NR 空胞として認められる。数はせいぜい1～3ヶであるが、時には更に多くを認めるものもあり、過度に異物を貪喰せるものと考えられる。更に3～6時間頃では NR 顆粒の一部がやや大きさを増しむしろ NR 空胞として認められる。12時間後に観察するに色調は低下し不染顆粒が増加し且つ胞体膨化が認められ変性状態を呈する。これ等の所見は培養後72, 96時間の観察でも略々同様であるが、120, 144時間頃では YG により糸粒体は棍棒状となり可成り膨大した像として染まる。NR 空胞は増加し胞体の各部に散在し且つ細胞変性迄の時間が4～6時間と短縮される。

II_b型：(第22図) 前編にて形態学的に位相差所見で II_a 型に類似している点を述べたが NR 及び YG による所見も比較的類似する。YG により細長樹枝状偽足内の糸粒体は短桿状で鮮明な青緑色に染められる。核周の胞体では短桿状、球状に染まるのが認められる。NR 可染物は鮮赤色ないし暗赤色微細又は細顆粒として数ヶ位集簇し主に核陥凹側の胞体広域にみられる。その配列は不規則で一部は相互に接近し、一部は少々離れて存在する。時に核の反対側に1～2, 3ヶ孤立して認められる事もある。時間の経過によっても著じるしい膨大を認めないし数の増加する事もない。

III型：(第23図) 胞体の形の上から、類円形のもの III_a 型、星状のものを III_b 型に分類したが生体染色所見を述べるに際して必ずしもその必要がないと考えられるので纏めて述べる。

この型に属するものは胞体の顆粒の多寡、異物貪喰の程度により、即ち細胞の成熟ないし老化の度合により多少の差がみられる。一般に染色後既に30分頃にて高度に染色され NR 可染物を胞体内に多数認める。NR 顆粒、空胞及び巨大な貪喰顆粒に基づく NR 空胞等を区別する事が出来る。それらの数及び配列は区々まちまちである。また時に不染顆粒、不染空胞が介在する。胞体は一般に大型で辺縁複雑で短い突起を多数認める。核は偏在しむしろ一侧へ圧排された如くであり、核膜は不明瞭、核小体は認め難い。先づ NR 可染物の比較的少ないものでは、主として大小不同の NR 顆粒が胞体の一侧に集簇し橙赤色、赤色、暗赤色調を呈し、それより少々大で緊張性の NR 空胞を混える。更に核の反対側胞体にも同時に或いは時間を隔いて出現する。

2～3時間迄は数を増し、大きさを増す傾向があるが、その後は余り変化しない。配列には規則性はみられず一部は密に集まり、又一部は粗に分散する。また最初から胞体各部に大小、可染性の貪喰物を認めるものがある。貪喰物は淋巴球等の変性せる核、或いは濃縮せる赤血球遺残物で、NRにより深味のある赤色調から褐色調を帯びる。飽満に貪喰せるものは胞体を埋め尽し、かつ著明に増大する。これ等の顆粒ないし空胞は色調は橙黄色、鮮赤色、暗赤色と種々で、相互に密着し、重なり合い、多彩な色調を呈し、空胞は緊張性で、一方顆粒はむしろ凹凸不整モザイク状である。細胞によっては比較的大きな不染空胞を1～数ヶ認め、これが時間と共に、次第に拡大する。

以上の如き諸細胞に於いて、YG 不染性の糸粒体は殆んど観察し得ない。斯くして、NR 空胞のあるものは経時的に大きさを増し、橙黄色調が強くなり、12時間位では、核を見失う程度に胞体に充満する。胞体は膨化し扁平化し、これを位相差顕微鏡で観察すると、胞体の密度の低下がみられる。更に核染色が認められ細胞変性が起った事が明らかとなる。

以上の所見は培養後48, 72, 96時間のもので略々共通であるが、120～144時間後のものでは、早期より強度に染色され、かつ不染空胞を示すものが増加し、また変性迄の時間が短縮される傾向が明瞭になる。

線維芽細胞：胞体は扁平細長で、大型、核は類円形大、核膜菲薄、核小体類円形大で明瞭である。NR 顆粒は略々同大で胞体全域に散在性にみられるが、一部核周に集簇してみられる。NR 空胞は半透明緊張性で橙赤色を呈し上記顆粒に混在する。時間と共に空胞の数及び大きさは増加、増大するが、Ⅲ型の如く著明ではない。一方 YG により淡青色に染まる糸粒体は、細長紐状で、胞体全域に散在性に存する。

単球：培養後24時間頃増生帯に、運動形態等から識別し得る少数の単球がみられる。胞体は菲膜状、波状を呈し、核は不明瞭で核膜は薄い。NR 顆粒は微細で核周、或いはむしろ核陥凹部に集簇し、所謂花冠を形成する。NR 顆粒が少数の場合は花冠形成は明らかではないが、数を増すに従い明らかになり、NR 空胞が、圍繞する様に認められる。更に時間を経て空胞が腫大すると胞体全面に拡がるものもみられる。前記Ⅲ型と区別し難いものも認められる。糸粒体は淡青色細桿状で胞体全域にみられるが、更に

花冠の周囲を取り囲む様に集簇する。

淋巴球系細胞：淋巴芽球では NR 顆粒は少数核側に認めるものがあるが、成熟するに従い大小不同の NR 顆粒が、核側に集簇して認められるに至る。大小不同で鮮赤色ないし暗赤色の凹凸不整のものに混在して NR 空胞を少数認める。糸粒体は YG により暗青色を呈し、比較的大で短桿状、一部核陥凹部に集まり、胞体一面に散在性にみられる。

2) 墨粒貪喰所見に就いて (第24, 25, 26, 27図)

前記の如くにて培養を行なうに、増生は極めて抑制され、淋巴球等遊走細胞の出現は正常に比し少ない。然るに、細網細胞は24時間頃より次第に増生帯に出現し、少数の単球の出現もある。

細網細胞は各型共みられるが、この場合始めからⅢ型とみられるものが大半を占め、何れも墨粒を貪喰している。一方原組織内でも墨粒を貪喰せるⅢ型を多数識別し得る。尚又、活発な遊走能を示すものは極めて少なく、従って運動形態からの形態の鑑別は困難である。

I型：殆んど貪喰性を示さない。極めて稀に、1～数個の墨粒子を認める。一方、他の培養では殆んど認められない所の光輝性の顆粒が増加しているのがみられた。

Ⅱ型：Ⅱ_a型は1～数ヶから可成り多数のもので、様々で、少数の場合は、小顆粒が核後方に不規則に分布するが、多数の場合は、大小不同の顆粒が一部集合し、一部散在性に存在する。遊走は一般に軽度で、多数貪喰するものでは、殆んど遊走を示さない。Ⅱ_b型は増生帯に殆んど出現をみなかった。

Ⅲ型：貪喰は極めて高度で、大小不同の顆粒が核部を残して、胞体全面を覆うもの、更には胞体が肥大し、墨粒は相互に融合し全面を墨一色で塗りつぶした如くなるもの迄みられる。比較的少ないものでは墨粒は大小不同で、胞体縁の明域を残し内部に、一部強く集塊を作り、他はやや疎に一面に核部を残して存在する。これ等のものの極く一部は墨粒以外の変性淋巴球等を貪喰するもの、或いは光輝性の顆粒に覆われ墨粒を少量しか貪喰しないのがみられる。

IV. 総括並びに考按

NR、及び YG を脾組織培養に用いた報告は速水、田中¹⁴⁾以来多数みられるが、培養方法が何れも Carrel⁷⁰⁾に基づく懸滴法であり、細胞学的検索の面で私の所見と相容れないばかりでなく細胞学自

体が古典的な憾みがある。私は第1編に於いて位相差顕微鏡を駆使して脾細網細胞の観察を行なったがその細胞学的根拠に基づいて生体染色所見を検討した。

色素添加の方法に就いて私の用いた手技を以てすれば、回転培養中任意の時期より生体染色が可能でありこれによって色素の組織培養に及ぼす影響を最小限に止め乍ら、目的とする細胞の生体観察が可能である。そもそも NR は最も毒性の少ない色素とされているが、服部¹¹⁾、教室田村⁴⁹⁾にみる如く濃度によっては可成り影響があり、また被曝時間が長いほど影響は大となる。この点を考慮し、培養細胞に余り障害を与えず、而かも生体観察が数時間にわたり可能である至適濃度を求めるべく簡単な実験を行なったが、骨髓組織培養に於いて、教室田村⁴⁹⁾、末永⁴⁵⁾、前田³²⁾及び太田⁴⁰⁾は NR $1/10 \times 10^{-3}$ を最適として用い、また水津は Bashford 癌回転培養にて $1/20 \times 10^{-3}$ を最適としている。服部¹²⁾は脾組織培養で $1/10 \times 10^{-3}$ で良好な結果を得たとしている。私の場合 plasmaclot の中へあらかじめ加えるのではなく回転培養後の一定時期に添加する点、先の諸氏と異なるが NR は $1/20 \times 10^{-3}$ 溶液で充分目的を達し得る事が判明した。YG は教室太田⁴⁰⁾が $1/60 \times 10^{-3}$ 溶液を用いており、これに準じて、染色性の上から $1/20 \times 10^{-3}$ 及び $1/100 \times 10^{-3}$ に就いても検討した。結局 $1/20 \times 10^{-3}$ では染色は極めて良好だが膨化褪色が早く、一方 $1/100 \times 10^{-3}$ では染まり難いことが判明し、中間の $1/60 \times 10^{-3}$ ではほぼ満足し得る染色性が得られた。

NR 可染物に就いて、2-3 考察を加えてみると、Sabin¹⁰⁶⁾はこれを顆粒と空胞に分ち、顆粒は一樣に染まり且つ色素に触れた儘でも変化しないものであり、空胞は液性粒子が染まるから次第に大きさや色が変わると述べている。教室太田⁴⁰⁾は、更に付け加えて顆粒の染まり方はモザイク様であり、分解しなければ大きさ、形は一定であり、また空胞は表面張力により球形になるという。私が細網細胞で観察したものでも略々両者を区別し得るがⅢ型に於ける如く著じるしく充滿し互いに重なり合って接する場合空胞が複雑な色調を呈し顆粒と区別し得ない場合もある。所で NR 及び YG に可染のものが果して何であるか議論の多い所であるが、杉山⁴⁶⁾は既存顆粒基質と色素との電氣的吸着であり、色素の拡散性及び濃度、細胞内外の水素イオン濃度の関係により生ずるとして、既存顆粒の存在を前提に置いて

いる。骨髓系細胞の顆粒が染色されることはよく知られているし、私のⅠ型の一部には、極く少数の顆粒が位相差鏡検で認められる。従って既存の顆粒が染色されることは間違いないと考える。一方最近中本³⁶⁾は電子顕微鏡による研究で、NR が細胞質中の Organellae とは無関係に色素滴として存在し、Golgi 装置或いは他の如何なる細胞小器官をも特異的に染めるものではないとしている。そして色素は pynocytosis の如き現象で取り入れられるとしている。然し Weiss¹¹³⁾は同様に電顕による観察をマウスの脾外分泌細胞、腎細胞で行ない、NR が糸粒体、小胞体並びにチモーゲン顆粒に影響を及ぼし、糸粒体は内嚢を失ない空胞化し NR 空胞として染まるという見解を述べ対立している。尚また Weiss の観察に近いと思われる所の興味あるものとして、教室内藤⁹⁵⁾は電顕にてマウス脾細網細胞の顆粒を観察し次の如き見解を述べている。即ち顆粒として認められるものは大部分糸粒体が変性膨化して出来たもので、糸粒体の内部構造の崩壊の状態を段階的に追う事が出来るというものである。また教室太田⁴⁰⁾は糸粒体が膨化し空胞化するのを認めており、中本の観察はさて置いて、私の観察に於いて、新たに NR 顆粒ないし空胞として認められたものは、糸粒体その他の胞体小器官が膨化変性し空胞を形成し NR に染まる様になったものと解釈してよいと思う。

却説、Ⅰ型は NR 顆粒の数は、全く認めないものから10数口位迄で、一般に極めて少いが、その配列は一般に不規則で、淋巴球系細胞に於いて、教室太田⁴⁰⁾、田村⁴⁹⁾等の観察せる所見と類似せる所もある。然し淋巴球系細胞の NR 顆粒はどちらかといえ小で、かつ色調が濃いⅠ型のそれは、大きさに大小があり濃淡がある点、やや差があると思われる。加納²⁴⁾はマウス脾細網細胞を超生染により観察しているが、出産直後に比較的多くみられる幼若型に就いての記載は私のⅠ型に近い所見と考える。加納は組織を搔破し 500~800 倍 NR 溶液を用いている等条件が異なる点同日に論じ得ない点がある。

更に、Ⅰ型との間に問題になるのは単芽球または前単球であるが、単球に就いては成績でも明らかな如く差を認めている。脾内単球生成に就いては茲で論ずべき課題ではないが、私の現在迄の観察では単球生成の事実を確認していない。そこで幼若単球に就いての報告をみるに、教室太田⁴⁰⁾、佐々木⁴¹⁾の

ヒト単球性白血病の骨髓並びにリンパ腺での単球系細胞の所見をみると、単芽球は、染色開始後30分位から多数の NR 微細顆粒が胞体一面に認められ YG による糸粒体と混り合って存在する。更に NR 顆粒が胞体広域に集簇するのを特徴的に認めるとして、そして、NR 顆粒の存在しない単芽球に出会することはないと述べている。単芽球、前単球の NR 顆粒が時間の経過と共に大きさを増し、更に花冠形成を行なうが花冠にみる NR 顆粒、空胞の数配列並びにその色調は一見極めて識別し易い等、I 型に於いて斯様な花冠形成は到底あり得ないし、I 型が生体染色所見からも単球系細胞とは異なるものと断じてよい。

I 型に於ける糸粒体は YG によっても明瞭に認められ配列は位相差所見と何ら変る所がないが、大きさが少々増大して認められる場合がある。

YG は糸粒体を特異的に染色するという説は 1910 年 Bensley⁶¹⁾ により述べられたが、中本³⁶⁾ は電顕による観察で、糸粒体の内部構造は色素の侵入により破壊され一方他の顆粒、胞体小器官に何等影響のないことを認め、Lazarow & Cooperstein⁹¹⁾ により主張された糸粒体に於ける YG 酸化発色の考えを否定している。何れにしても YG により糸粒体は特異的に染色されることは明らかだが、時間の経過と共に、また顕微鏡下で観察中膨化ないし褪色がみられるのは糸粒体の破壊によるものと考えられる。

II_a 型は運動能を有する点で、極めて特異であるが、生体染色上鑑別さるべき 2—3 の点に就き考按すると、先づ大リンパ球では、NR 顆粒が少数核周にみられ色調は濃く暗赤色で凹凸が強い。YG による糸粒体は殆んど認めないか又は極めて少数である。一方 II_a 型のそれは、数配列は類似しているが少々大きく、赤橙色調を呈す。YG 顆粒は大きく明瞭である。斯くの如く NR 染色の上からは類似しているといえよう。更に鑑別すべきものとして単球であるが、定型的単球の超生染に就いての報告は夥しく、教室田村⁴⁰⁾、太田⁴⁰⁾、川野⁷⁰⁾、松木³¹⁾、末永⁴⁰⁾ 等がヒトを始め各種動物の単球の培養による生染所見を示しているが、何れも花冠形成を挙げている。私の観察でも、単球に於いて定型的な花冠形成を明瞭に認めたが、染色直後よりしばらく時間を経た後に於いて判然とする。一方 Downey⁷⁰⁾ によればリンパ球、形質細胞、細網細胞に於いて、また加納²⁴⁾ はチフス病変時の細網細胞に花冠様配列を稀に認めると述べているし、私も II_a 型の核陥凹部に花冠様配

列を認めることがあるが、太田⁴⁰⁾ も述べる如く、単球のそれは一様な色調と整然とした配列がみられ、また経時的な観察にて、この間の特徴が一層明白になる。その他、細胞形態学的に鑑別が容易であることは既に述べた。

II_b 型は線維芽細胞との間に何等の類似所見はない。

III 型の生体染色所見は Sabin¹⁰⁵⁾ が正常並びに刺激時家兎脾穿刺材料によりみたものの中の Clasmatoocyte として図示せるものに類似する。彼女は、結合織に於ける貪喰細胞を超生染により、遊走貪喰内被細胞と見做す所の Clasmatoocyte Naegeli 等の意味を含めた単球であるとして、Aschoff, Kiyono⁷⁷⁾ の組織球説を訂正している。然るに内被細胞は形態学上も全く別個に存在し、加納²⁴⁾ もその貪喰性を否定している通り、私の観察でも全く論外と考える。従って Sabin の Clasmatoocyte は III 型に属すべきものと解される。一方加納のいう成熟型ないし老熟型は III 型と略々一致すると考えられる。加納は成熟細網細胞の比較的新鮮なものから、これに貪喰ないし種々の Noxe の洗礼を受けて多様な段階の超生染所見を呈する事を述べているが、私の III 型も斯る多様性がみられるのであり之等は III 型の持つ強い貪喰能或いは各種老廃物により極めて刺激され易い性質に基づくものと考えられ、I 型又は II 型では未だ余り顕著に認められない所のものである。さて、III 型にみられる NR 可染物は I 型並びに II 型にみられるものと本質的に同じものであり数及び大きさが増大していると考えられる。更に II 型の一部にも認められたが変性リンパ球等を貪喰せるものがある。Sabin が clasmatoocyte の貪喰に際し Evans のいう "segregation apparatus" に貪喰物が取り入れられ貪喰物が大きければこの空胞はどんなにでも大きくなると述べているが、私が緊張性の NR 空胞の中に一段と濃染せる貪食物を認めたのもこの状態に一致すると考える。さて、III 型細網細胞としてみられるものの中に単球由来のものが存することは第 1 編に触れたが、生体染色によっても同様鑑別し難いものがある。然るに色素添加直後よりその染色の経過を観察するに可成り明瞭な差が認められる。即ち、III 型では核陥凹部にて染色し始めるが大小不同、色調の差が著明であり、同時に胞体の各部に分散した NR 空胞が認められるに反し、単球では一般に NR 微細顆粒が主として核陥凹部に集簇するのが特徴で時間が経つに従い肥大するが色調の差は著明ではな

い、I型、II型で述べた単球系細胞の鑑別と同様である。

而して色素添加後3時間頃染色は最高頂になるがその所見は第1編での観察所見からは想像し得ないものでありIII型に於いて特にその傾向は強い。先に述べた如く色素の影響即ちその毒性によって斯様な像を呈して来ると考えるが、培養後120時間、144時間……経過せるものでは染色迄の時間が短縮される事実が認められる。即ちこの時期には既に培養条件が悪化し、細胞の生活機能、即ち色素に対する抵抗性が低下せるに依るものと考えることが出来よう。先の電顕の所見を再び引用する迄もなく、又 Möllendorff⁹⁸⁾、Evans & Scott⁷⁷⁾、Glasnow⁸¹⁾ 等酸性色素染色で予想した所であるが、生体染色、超生体染色なるものが、細胞の変性過程を促がしその過程に於いて認められる所の変化を捉えたものであるといえよう。

尚、III型にあっては、位相差鏡検でも糸粒体が確認されなかったが、YG によって確認し得なかったとしても存在を否定することは出来ない。

墨粒貪喰を検索するに就いては私の行なった培養方法では、plasmaclot と培養液の双方へ添加する事により観察し得たが、III型の貪喰態度は極めて旺盛で、教室大藤³⁷⁾ 等の腹水食細胞にみる墨粒花冠形成とは全く比較し難いものである。又I型、II型が減少しているのは、墨粒添加により培地の条件が悪化し、I型、II型の分裂が抑制された事及びIII型への移行が急速に行なわれた為と考える。

以上 NR、YG による培養細胞生体染色並びに墨粒貪喰の所見を総括すると、I型、II型は比較的近似しているが、II型で NR 可染物は数、大きさを増し、YG 顆粒は減少している。またII型の一部は NR 可染物は大小顆粒、空胞共に増加、肥大し且つ貪喰顆粒が染色されIII型に類似を求め得るのである

が、一方III型の多くのものは、多数の NR 可染物が充満し、特異な所見を呈する。墨粒添加によりIII型のみが著るしく貪喰を示し機能的に全く特異な面が認められる。

V. 結 語

前編にて試みた脾細網細胞を中心とする生態観察に際し、塩基性色素、中性赤並びにヤーヌス緑Bにより生体染色を施し、更に墨粒貪喰所見に就いて検索し、次の結論を得た。

- 1) 回転培養後任意の時期に色素添加し培養下の脾細網細胞を中心とする生体染色所見を比較的色素の悪影響を避けつつ観察する事が可能であった。
- 2) 第1編で分類せる脾細網細胞の各型は生体染色によっても夫々特徴ある所見を得た。
 - i) I、II及びIII型は次第に中性赤顆粒、空胞の数、大きさを増し、他方、ヤーヌス緑B顆粒は減少ないし消失する。この所見からI、II、III型の順に成熟するものと考えられる。
 - ii) III型では特に中性赤空胞の増大が著るしく又貪喰性可染物が多数認められ、特に機能的に差違のあることが伺われる。
- 3) 中性赤可染物の一部は中性赤又はヤーヌス緑Bの影響により二次的に生じた空胞が染色されたものである。
- 4) 培養後120時間以上経過せる細網細胞はそれ以前のものに比し、染色時間並びに褪色時間が短縮される。これは細胞機能の低下に関するものと思われる。
- 5) 墨粒添加によりI型及びII型の大部分は殆んど貪喰能を示さないが、III型は強度の貪喰能を有し胞体一面に飽食する事が知られ、III型独自の機能が伺われる。

附図・文献後掲

Studies on Tissue Culture of Spleen

Chapter II Vital Observation of Splenic Reticulum Cells by Vital Staining

By

Masayoshi KIBATA

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

Janus green B and neutral red were used for vital staining of mouse splenic reticulum cells that have been described in the chapter I and phagocytic activities were observed by carbon particle feeding.

1) With my established method, observation of vital staining of splenic reticulum cells were possible under condition avoiding deleterious effects of stain after various time intervals of culture.

2) Each type of reticulum cells which were classified in the chapter I was characteristically separated by vital staining method.

i) Neutral red granules and vacuoles increased in size and number. On the other hand, janus green B granules decreased and/or vanished, in the stage of I, II and III type of reticulum cells. These findings showed that type I reticulum cells matured into type II and then type III reticulum cells in this order.

ii) In the cytoplasm of type III reticulum cells, markedly enlarged red vacuoles and phagocytized stainable materials were observed.

3) Some of the neutral red stainable materials were vacuoles induced by toxic effects of neutral red and janus green B stain.

4) Reticulum cells cultured over 120 hours were stained immediately and faded sooner, in contrast to reticulum cells in the relatively early stage. This phenomenon was thought to be related to the declining function of the cell.

5) By addition of carbon particles to medium, most of type I and II reticulum cells showed little phagocytic ability, but type III reticulum cells manifested active phagocytosis so that their cytoplasm was filled with carbon particles. That was considered to be specific function to type III reticulum cells.
