單細胞のオートラジオグラフィーに關する基礎的研究

（東京大学医学部放射線教室 主任宮川正）

百 瀬 郁 光

（昭和33年3月20日受付）

緒言

「オートラジオグラフィー（Autoradiography 以下「オ」と略記す）とは，アイソトープ（以下 R.I. と略記す）の存在及び位置を感光乳剤によつて測定する一研究方法である．最近生化学的研究に広く R.I. がもちいられ，特に物質代謝の研究に無くてはならない存在となつている．それ故組織或は細胞内の細部に至るR，I の摂取及び物質代謝の状況についての究明に，この「オ」が一手段として応用されるようになつたのである．「オ」は1896年 Becqerel によつてウラニュームの放射能を乾板に感光させて以来，1904年 London はラドンを使用して蛙の「オ」を作成している．1924年 Laccasagne, Lattes により初めて組織の「オ」を得たのであるが，その後この可能性は認められてはいたが，R.I. が医学的に応用されなかつたことや感光乳剤，解像力の研究の不備の為めに一般化しないまゝになつていたのであるが，1946年 Belangen, Leblond により組織標本に初めて Coating Method を行なつた．1947年 Pele によつて Stripping Method, 同年 Evans により Mounting Method, が行なわれた．1948年 Boyd により初めて単細胞の「オ」を得た．単細胞についてその後 Boyd の C^{14} による白鼠の白血球の「オ」 Morse (1950)P^{32} maria, Eaustonie Larraine M, Kraus, の Fe^{59} 等の骨髄細胞の「オ」がある．我邦では名古屋大日比野内科，木村，福井，柴橋，三輪の諸氏による血球の「オ」がある．以下「オ」の基礎及び応用実験につき述べ種々の R.I. を動物に投与し骨髄細胞，吉田肉腫細胞の「オ」を作成し，正常とエックス線照射の場合とのR.I. 摂取をオを通じて比較検討し，又白血病の P^{32} 治療時の血球のオを作成した，又 Cr^{51} による赤血球の「オ」をも作成した．

「オ」の基礎的概念について

「オ」には，実験目的試料の種類によつて大略次のように分類される．

I Macroskopic Autoradiography

(i) Autoradiography without Separation Layer.

(ii) Autoradiography, with Separation Layer.

II. Microskopic Autoradiography

(i) Autoradiography without Separation Layer.

(ii) Autoradiography with Separation Layer.

(a) (i) Random grain Autaradiography

(ii) Track Autoradiography

(b) (i) Tissue Autoradiography

(ii) Single Cell Autoradiography.

単細胞の「オ」については（I）及び(II b i)をのぞいた他のすべてが適応される．（I）は単に放射性物質の存在を探知し，R.I 分布の大略を知り解像力は極めて悪く肉眼的観察にのみとゞまるものである．（II）は（I）に比し高度の解像力が得られ，組織学的，細胞学的に物質代謝の過程及び微細部に至るまで追究出来る見通しをもつている．飛跡を確実に証明すれば「オ」の目的は達せられる．Random grain Autoradiograp hyは，感光乳剤の感度，乳剤厚に関係し飛跡をとらえずに現像銀粒子の存在でオの目的を達するものである．

次に理想的な「オ」を得る為めの条件について大略すると，(1)試料の作成技術向上（薄い試料作成も含む）(2)「オ」作成技術向上（失敗の項参照）(3) 高度の解像力を得ること．

(i)　感光乳剤の解像力を上げること

(ii)　アイソトープの種類（低エネルギー）

(iii)　試料感光乳剤間距離の短縮

(iv)　感光乳剤の感度を上げること

(v)　標準露出，現像処理

(vi)　「かぶり」Back ground の減少

以上の項を考慮に入れて「オ」を作成しなければならないが，以下に述べる単細胞「オ」については更に要求が複雑になつてくる．単細胞オの具備すべき条件について述べる．

1）　低エネルギーの R.I 高感度乳剤（微粒子）

2）　高度の解像力

3）　「かぶり」の発生を防止すること

4）　標準露出現像処理

5）　細胞の鑑別容易

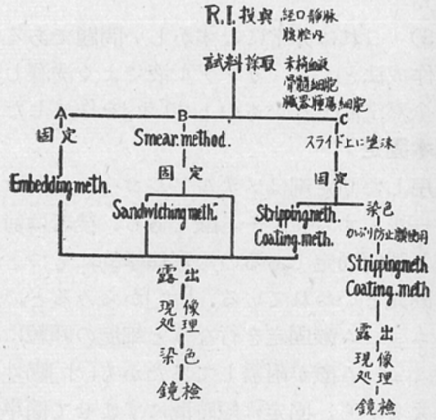
6）　細胞の破壊防止

7）　細胞外の R.I の存在を最小限度にすること（track Autoradiography を目的とするときは解像力は低下する）．

単細胞「オ」の作成手順について：

第1図に示す通りであり，R.I を含む試材を3つの方法にしたがつて「オ」を作成していく．（A）は試料（固定ずみ）と乳剤を混和する．（B）は乳剤上に直接塗布され次に固定され露出現像後染色される．（C）はスライドグラス上に試料を塗抹固定し，次に染色，「かぶり」防止膜を使用して「オ」を作成するものと，固定後直ちに「オ」作成して現像処理後染色する方法とがあるが，これらについては後述するので省略する．

第1図　「オ」作成手順



標本作成：

第2図に示す如く，3つの目的によつて作成法が分けられる．

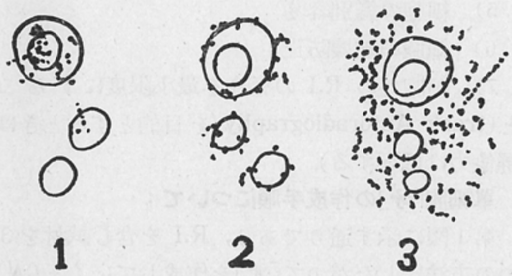
1）　単細胞（特に核内）の R.I 摂取を証明する．

2）　細胞膜にＲＩが附着しているか否かについて．

3）　細胞外に R.I があり細胞にいまだ R.I が摂取されない場合．

(1)　従来主にこの方法によつて陽性度を判定した方法である．

第　2　図



(2)　R.I 摂取の一過程としてみるか，又は R.I が膜に単に附着しているかである（化学的，物理的）．実際問題として細胞膜に「オ」が陽性に出ても，物理的か，化学的結合であるか判然としない．化学的結合を観察する為め，物理的に附着した R.I を或方法で取りのぞく必要がある．著者は確実な方法ではないが，リンゲル又は生理的食塩水にて細胞を洗滌して「オ」を作成した（写真3）．

(3)　これは非常にむずかしい問題であるが試料の作成法として，リンゲル液でよく洗滌した細胞と全然洗滌しないものとで「オ」を作成した．

標本固定：

使用した固定剤はメチルアルコール，エチルアルコール，オスミューム酸である．後者は前二者に比し瞬間固定であるので形態学的にもつとも優秀な固定といわれている．「オ」からみると，長くオスニューム酸固定を行なうと細胞の顆粒に黒くオスミューム酸が附着してあたかも「オ」陽性の如くみえるから，固定は短時間にすませて簡単に水洗する．

オスミュームガス固定は標本が乾燥しないうちにオスミュームガスにあたると数秒にて固定される（1%オスミューム酸1ccを固定用小ビンに入れ封入しその中に速かに標本を入れて固定する）．メチルアルコールは固定に3～5分を要し，エチルアルコールは1分である．又一方 R.I 漏出の点から言つてもオスミューム酸ガス固定の方が前二者より優れている．

標本染色：

ギムザー，ライト染色（緩衝液pH 6.4）を使用したが両染色には形態学的にみて殆んど差なく，又 R.I の漏出も殆んど差がなかつた．しかし染色時間については前者は20～30分以上を要し，後者は2～3分で染色されるので，主に後者を採用し，「オ」後染色にはギムザー染色にて長時間おこなつた．これは濃度の高い染色液を使用すると乳剤自身も濃染される恐れがあるからであるが，又長時間染色も「オ」作成上から言つて余り好ましくないので，著者は1～ 1.5時間にしている．又後染色は前染色に比し染色が良くないと言われている．乳剤を含めての染色であり乳剤のpHが高く上記の緩衝液ではかえつて細胞が青染されがちである．

その為めpH5 － 5.5の緩衝液を使用した．

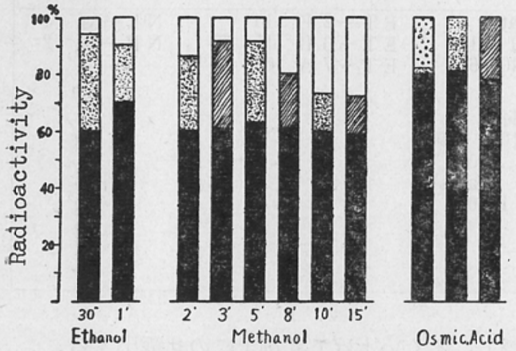
R.I の漏出流出：

「オ」作成上細胞内より R.I の漏出することはすこぶるる不利なことである．各試料について固定前後，染色，水洗，乾燥，後に試料の R.I の放射能を測定すると第3図に示めす如く P^{32} Fe^{59} 共にオスミューム酸ガス固定では R.I の漏出は無く，染色水洗しても殆んど R.I の漏出流出されないことがわかる．メチルアルコール固定では染色，水洗の R.I の漏出は時間的には殆んど変らなかつた．又染色は3分にても30分にても R.I の漏出は殆んど変らなかつた．又固定の方が染色のときより漏出が多いことは興味あることである．オスミューム酸ガスとアルコール固定を比較して R.I の漏出が前者の方が明らかに少ないが，「オ」の目的からいつて後者の方が有利なこともある．第3図に示す 1.5時間で採取した試料についての結果であるが，R.I の漏出が大きい．これは恐らく細胞内よりも細胞外の R.I が流出したのではないかと思われる，しかもオスミューム酸よりアルコール固定の方がより多く流出している．又見方を変えると細胞内 R.I より細胞外の R.I の方が流出し易いとも言える．又「オ」を鏡検すると殆んどの破壊細胞の附近に現像銀が見られないのもこの為めであろう．

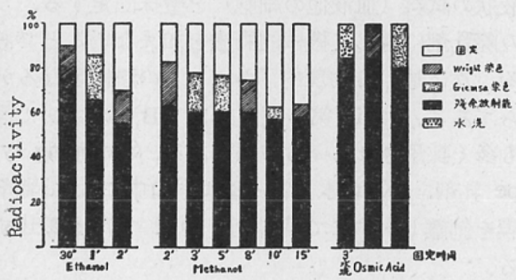
感光乳剤：

「オ」の主体となるもので，「オ」の成績はこの乳剤の良否如何にかゝつているともいえる．この原

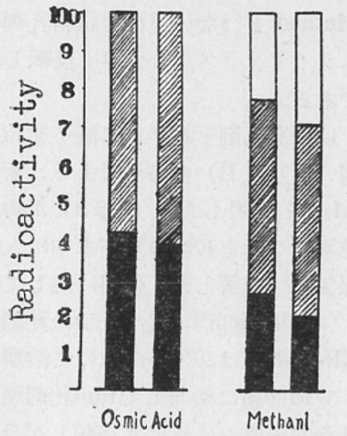
第3図　(a) Fe^{59} 注射3時間後骨髄細胞試料の R.I. 漏出



(b) P^{32} 注射6時間後骨髄細胞試料の R.I. 漏出



(c) P^{32} 注射 1.5時間後骨髄細胞試料の R.I. 漏出



子核乳剤は一般の感光乳剤とその性質を異にするもので，ハロゲン銀密度が大きく70－85%重量で微粒子（0.05μ以下）で且つ均等でなくてはならない．又乳剤厚も厚く一般に10～25μで飛跡用のものは50μ 以上もある（宇宙線用には200μ 以上）．解像力を上げる為めに数μ以下の乳剤厚にして使用することもある．「オ」用の乳剤には3種類あり Smear (Mounting) type（富士フィルム会社製では Contact-type と言つている）これはスライドグラスと乳剤間にゲラチン下塗がしてあり乳剤が剝離しないようになつている．Stripping type これはスライドグラス乳剤間にゲラチン下塗がしてない．Coating-type 液状のものと非硬膜性乾板のものとがあり，液状にして使用する．各 typeとも一長一短あつてその使用目的によつて採用されるものであるが Coating type の場合が解像力，「オ」作成後の処理仕上りの点で非常に安定している．第1表は現在市販，又は製作されている「オ」用乳剤である．著者の使用せる乳剤は ET-2E,-6B,-7A, NR-M_1-M_2 G-5, NTB, B_2である．「オ」の解像力については，R.I. のエネルギーが高かいと乳剤の試料と密着部の銀が感光されずに放射線が通過し離れた所の銀から次第に感光する．その為め解像力が低下する．低エネルギーの R.Iを使用した方が良い結果が得られる．同種の R.Iを使用する場合は低感度のものより高感度の乳剤の方が解像力は上がる． 例えば S^{35} C^{14} 等を使用して高感度の乳剤で「オ」を作成すれば解像力はよい．しかし細胞内の R.I. の摂取の有無を定性的に観察するのみであれば，解像力は，悪るくとも充分実験出来るが，露出中種々の悪影響を考えると高感度乳剤を使用すべきである．飛跡用「オ」乳剤を使用する時は感度も高いので細胞より得た R.I の飛跡と R.I, Back ground と區別がつかなくなる恐れがある．それ故使用される乳剤は主として乳剤製作日数の浅いものを使用した．

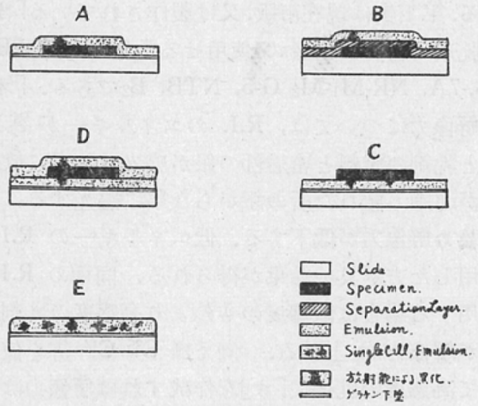
「オ」の各術式について：

第4図に示す如く5種類の方法がある．（A）はオの原理に属するものであるが，試料が乳剤に対し化学的「かぶり」を発生させるような物質を含有しない場合にのみ行なわれる方法である．（B）は試料が乳剤に対し「かぶり」を発生させるような場合で乳剤と試科間に後述する「かぶり」防止膜をはさむ方法である．（C）は乾板上に（A）と同様「かぶり」を発生させない試料を

第1表 「オ」用感光乳剤

Eastman Kodak	Kodak	Ilford	Fuji	Sakura
NTC 25 50	NT—1a 50 NT—2a 100	all plate 25 50 100 200 400 600	ET—2E 15 ET—6B 15 50 ET—7A 50	NR—M 1 NR—M 2
NTA 10 25	NT—4 200			
NTB 10 25 50 100 150 200		Pellicles 50 100 200 400 600		
NTB—2 10 25 50 100 150 200		G—5 Plates 400 1000 2000		
NTB—3 50 100 150 200				
Pellicles 250				

第4図 「オ」原理を5つに分けることが出来る



のせる方法である．（D）は（A）と（C）を併用した方法で試料中のR・Iが少ない場合便利である．（E）は（D）の変形であり液状乳剤を使用しなければならない．

「オ」術式のと称について：

(I) Macroscopic Autoradiography
  Contact Method
(II) Microscopic Autoradiography
(i) Mounting Method
(ii) Smear Method
(iii) Stripping Method
(iv) Inverting Method
(v) Coating Method
(vi) Sandwiching Method
(vii) Embedding Method

（i）第4図（C）の方法で乳剤（Smear type）を水底におき染色前の試料（主に組織）を水面に浮し，すくい上げて乳剤上にのせ露出する．

（ii）は（i）の変法で（i）と同種の乾板上に液状の試料（血液他の細胞）を塗抹固定する．この際乳剤に対して機械的刺激を加えないことである．次に述べる物理的「かぶり」の原因となるからである．（iii）第4図（A）（B）の方法で最も多く採用されている方法である．Stripping type 乳剤を KBr 水（20—25°C）の中に入れ乳剤膜を剝離し水中にて試料上にのせて乾燥露出する．

（iv）は塗抹試料の場合は応用出来ない方法で主に組織である．始めに染色しない試料に Stripping Method を行ない現像後試料乳剤を合わせたまゝスライドグラスより剝がし反転して染色する方法である．

（v）は液状乳剤を試料上に滴下塗布し乾燥する第4図（A）（B）の方法である．著者はG-5, NR-M_1M_2 を使用した．G-5 は $400\mu \times 2'' \times 3''$ の乾板でこれを40ccの蒸溜水中に入れ37°Cで3日間保温して溶解した．使用に際して 0.5ccを $1'' \times 2''$ の面に塗布すると凡15μの乳剤膜が得られた．NR-M_1M_2 は40°C—60°Cにて溶解し 0.5cc を $1'' \times 3'$ の面積に塗布して15μ 乳剤膜を得た．両乳剤共塗布後直ちに氷にて冷却しゲラチンを凝固させ自然或いは微風乾燥させた．

（vi）これは Smear type 乳剤上に Mounting, 又は Smear Method を行ない更にその試料上に Stripping 又は Coating Method を行なう方法である（第4図D）. R.I が少ない場合に両面

第2表　各RIに対する各種感光乳剤の露出期間（数は日数を現わす）

RI \ Emulsion days	G-5	NR-M1	NR-M2	ET-2E	ET-6B	ET-7A	NT-B2
P^{32}	5—10	20—30	7—14	20—30	14—20	7—14	14—20
Fe^{59}		14—30			14	10—14	14
S^{35}	7—14				14—20	7—14	14—20
Cr^{51}	10	30			14		
Y^{90}	3—5				4—10	3—7	

乳剤に感光するので便利である．（vii）は液体試料特に単細胞の「オ」に適応されるもので，方法は小ビン（50cc）中に少量のオスミューム酸又は10%ホルマリン（乳剤の硬膜にもなる）を少量入れ血清で稀釈した細胞を入れよく混和固定する．次に適当に Coating 用乳剤を入れ37°Cにて数分間放置し，その後乳剤をスライド上に滴下乾燥した．

後述する実験には Mounting, Inverting, Method をのぞく他のすべての術式を採用した．

露出及び露出時間：

乾燥した試料のスライドは間をはなして何枚かかさねて一組とし包装後露出するが，極度の乾燥を避け（乳剤膜剝離の為め）2〜5°Cにて露出する．単細胞の「オ」では細胞自身から放射される放射線を乳剤で補足するのであるから，試料全体の放射能を測定して露出時間を定めても意味がない．理論的に言つて細胞1箇から出る放射能を測定して R.I の種類乳剤の感度を併せ考え露出時間を定めねばならない．しかし実際問題として不可能であるので，始めは等比級数式に日を選んで（2, 4, 8, 16……日）現像し標準露出時間を定める方がよいと言われている．著者は1〜2枚の「オ」スライドを別に1組として第2表の露出日数前後に試験的に一枚現像してから同種の「オ」の現像を行うことにしている．露出日数は長期間になつては良くない．R.I. の物理的半減期に比例して露出すべきであるが，「オ」標本の保存と褪光現像の面から言つて多くの場合露出は20日以内にとゞめた方がよい．それ以上の日数を要する乳剤は「オ」に適当でない．

現像処理：

現像：セルフライド赤色反射光にて Kodak-D-19 現像液にて20°Cで現像した．この際 Stripping typeの現像は乳剤膜剝離の恐れがあるので写真1の如き特殊な器を使用し現像が終れば下から現像液を放出し，定着液を入れる方法をとり極力膜の剝離を防いだ．其の他の「オ」ではメタノール固定用水槽で現像した．現像時間については第3表の如く乳剤の種類と膜厚によつて時間が異なるが，種類よりも膜厚に大いに関係し15μ前後では6分以内，50μでは6〜12分である．長時間現像は長時間露出と同様「オ」の結果より見て良くない．

第3表　乳剤厚に対する各種感光乳剤の現像時間

Emulsion		15μ	50μ
Ilford	G 5	3—5min	6—8min
Sakura	NR—M1	8—12	12—15
〃	NR—M2	3—6	6—9
Fuji	ET2E	3—6	
〃	ET6B	4—6	6—9
〃	ET7A		6—9
Kodak	NTB2	4—6	

停止：現像を停止させる目的と現像液水洗の意味をかねて行なうもので異常の「かぶり」発生防止，定着液保存の為めで，1%の醋酸，又は蒸溜水を使用し30秒間おこない，定着へ移す．

定着：20〜30%チオ硫酸ソーダ（又はチオ硫酸アンモン）を使用した．原子核乾板では容易に定着しないので，最もよい方法として容積の大きい水槽を利用して，斜めに乾板を立掛ける方法が短時間に銀がおちて結果がよい．50μ乳剤で10〜20分で定着される．

水洗：「かぶり」防止膜を使用した「オ」では長時間水洗は膜が剝離する恐れがあるので好ましくな

い．長くとも1分以内ですますようにして乾燥後たゞちにツェデル油或はバルサムで表面を覆うようにした．過去4年間の「オ」の結果からみて殆んど変色しないことがわかつた．定着は乳剤の種類，膜厚によつて異なりG-5，(15μ) NTB，ET-2E，6B，では5～15分 MR-M_1,M_2,ET－7A，G-5 (50μ) では10～20分であつた．以上によつて「オ」が完成したわけであるが，同種の10枚の「オ」が10枚とも同じように仕上がるかいなか問題があつて前述の過程中に種々の失敗がおこる．以下このことについて述べる．

「オ」の失敗：

(i) 乳剤膜の剝離，「ずれ」水泡形成（乳剤，試料間）(ii) 物理的，化学的「かぶり」の発生 (iii) 脱染色，染色困難，(iv) 乳剤溷濁，(v) 細胞破壊，消失，(vi) 現像銀の消失，（乳剤の褪光現象）

(i) については，(a) 各「オ」作成後の乾燥で乳剤膜が剝離する．(b) 露出中の乳剤膜の剝離，(c) 現像処理による剝離，(a) は乳剤乾燥過度によつて剝離をおこすのであつて，乳剤が「かぶり,防止膜になじまない為極端におこる．人工乾燥（旋風器）による急激な乾燥は避けるべきで使用する場合は乳剤の水滴が消失した時乾燥を中止しなければならない．著者は微風又は自然乾燥を適用している．(b) 露出の項で述べた如く乾燥箱の中で露出しないことである．(c) は現像の項で述べたが，我々は解像力を上げる為めに「かぶり」防止膜を使用する際は一般にゼラチン下塗をしなかつた．その為め水中に長く「オ」試料を放置すると屢ゝ剝離をおこした．又現像液では余り剝離しないでも水洗になると剝離する．これは液の濃度に関係しているのではないかと思われる．「かぶり」防止膜を使用しないですむ場合は，第4図 (A) の方法により行なわれるのであるから，ゲラチン下塗を行なつてその上に試料を塗抹し，「オ」を作成するので完成する迄の乳剤膜の剝離が殆んどない（写真4）は乳剤剝離による「オ」

(ii)「かぶり」発生は「オ」中最も重要な問題の一つで絶対に避けねばならない．物理的「かぶり」は塵埃によつてもおこり得るものであるが，一般にゼラチン保護膜で乳剤を覆つてあるので，その心配は少ないが原子核乾板ではそのような保護膜は用いないのでこの点考慮すべきである．又すべての操作に於いて乳剤に対して過度の刺激は避けるべきである．即ち Stripping method では水中で乳剤を無理に剝離したり，水中からとり出して操作をしたりしないことで Smear method に於いて試料を塗抹する際の刺激 Coating 用乳剤の溶解に攪拌することや，乳剤を沈澱せしめたりすることは絶対に避けるべきである．又高感度乳剤の乾燥は急激におこなつてはいけない．

第4表 種々の物質と「かぶり」との関係を表わす

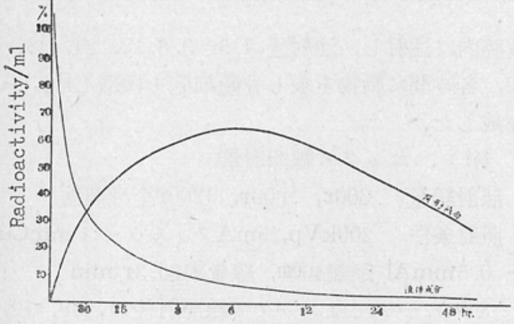
Zinc	fog	Osmium	no fog
Cadomium	fog	Sodium sulf	no fog
Silicon	fog	Giemsa stain	fog
Iron	no fog	May giemsa	fog
Stainless steel	no fog	Wright's stain	fog
Celloidin	no fog	Saran	no fog
Cystein	fog	Vinyl	no fog
Methionin	no fog	Metacryl resin	no fog
Glycin	no fog	Methyl Ethyl Keton	no fog
Glutamicacid	no fog	Blood	no fog
Formic acid	no fog	Nylon	no fog
Aceton	no fog	Bone marrow cells	no fog

化学的「かぶり」は第4表に示めす如く種々の物質によつぐ「かぶり」がおこる．この様な物質が試料中に含まれているときは第4図の (B) の方法により「かぶり」防止膜を使用して「オ」を作成しなければならない．Giemsa，氏液も「かぶり」をおこす物質の一つである．それ故本実験においても染色された試料上には必らず「かぶり」防止膜を覆つてから「オ」を作成しなければならない．一般にこの防止膜に使用されている物質は，1％セロイジンであるが，これは水に対し透過性で高感度乳剤に対しては使用出来ない．脱染色性でセロイジン自身染色され，膜が厚く難点が多い．「かぶり」防止膜としての要求は非常にむずかしく，例えば (a) 膜自身乳剤に対し「かぶり」をおこ

第5表　「かぶり」防止膜，膜厚の感光乳剤に対する「かぶり」発生の有無について

Separation Layer	Solvent	Tickness (μ)	ET－2E	ET－6B	G－5
Celloidin	Ethyl Alcohol＋Ethyl Ether	0.68	no fog	no fog	fog
Nitrocellulose	Amyl acetate	0.04	no fog	fog	fog
Metacryl resin	Aceton	0.64	no fog	no fog	fog
Saran	Methyl Ethyl Keton	0.25	no fog	no fog	no fog
Vinyl	Methly Ethyl Keton	0.35	no fog	no fog	no fog

第5図　白血病末梢血の放射能曲線を示す



さないこと．（b）膜の溶剤が試料に対して障害をあたえないこと．（c）水に対して非透過性であること．(d) 膜厚が薄く均等であること．(e) 膜にピンホールを作らないこと．（f）膜が剝離しないこと．(g) 微粒子粘着性大なること．(h) 膨脹系数小なること．（i）乾燥迅速なること．第5表に示すものは，現在使用されている「かぶり」防止膜であるが，このうち2％ Metacryl resin, Saran, Vinyl が成績がよかつたので Coating Method に使用しているが Stripping Method では膜が剝離しやすく好ましくなかつた．しかし「かぶり」についての判定は放射能による現像銀と區別しがたいことがある．放射能を含まない対照例にてもかなり「オ」陽性像の如く見えることがある．写真2に示す如くである．それ故対照の「オ」作成は勿論であるが，現状によつてはある程度の経験的知識が必要であろう．又「オ」陽性飛跡と Background との區別も困難である．その為め乳剤は常に新製品を使用して宇宙線其の他の自然放射能による Background を避けた（写真5参照）．(iii) 脱染色については「かぶり」防止膜の溶剤としてセロイジン用のエタノール＋エーテル，Saran, Vinyl 用 Methyl-Ethyl-Keton（軽度の脱色）等のアルコールによる脱色があり，その為染色については濃染すればある程度解決されるが，防止膜自身染色されて「かぶり」の原因となるので，一度使用した防止膜液は使用しない方が結果がよい．露出中の脱色については，現像液中に染色血液標本を直接入れても脱色は殆んどみられないが，現像した結果「かぶり」の多い部分の細胞の脱色していることから見て現像液よりむしろ乳剤と染色液と関係がある様に思われる．露出中に「かぶり」防止膜或はピンホールを通じてpHの高い乳剤液が染色標本と接觸し「かぶり」と同時に脱色をおこすのではないかと思われる．一般に露出現像後に脱色が強く現われるときは「かぶり」が起つてくるものと思わねばならない．

染色しにくい場合がある．これは染色をおこなわないで「オ」作成し後染色を行なう場合であるが，これは染色の項に述べたが要は完全な定着，水洗を行なつた後に染色を行なえば解決される．又長期間の露出も難染色性であることを考慮に入れて露出せねばならない．

(iv)　乳剤の溷濁現象がおこると，鏡検に支障をきたすのは当然である．これは，停止，定着，水洗を完全におこなえば解決される．

(v)　細胞の破壊消失は試料作成にさかのぼつてみなければならない．細胞を洗滌するリンゲル，生理的食塩水も破壊の原因になる．遠心沈澱も同様であるが原形質の消失，核の破壊，核，原形質の分散がみられるので，著者はなるべく洗滌を避けて同種動物，同人の血清にて試料を稀釈して塗抹標本を作成した．勿論固定も充分行なわねばならない．又これらの変化は露出中にもおこる様に思われる．乳剤成分，R.I. 等による影響も一

応考えられる．骨髄細胞の場合は（白鼠）少量でもあり洗滌にも困難をきたすので血清にて稀釈して塗抹すると細胞の破壊は殆んど無く細胞は分散し細胞外 R.I. も稀釈散在され細胞はスライドグラス上によく定着され「オ」仕上げにはよい結果をもたらした．

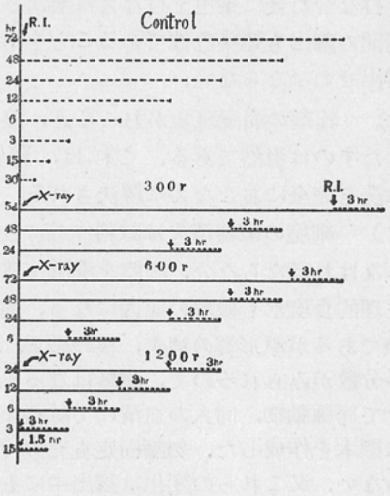
露出中に破壊することがある（一部前述す）特に後染色を行なう「オ」の場合で，固定を厳重にして，剝離の項に述べたことに反するが，この場合は乾燥された箱の中で露出すると破壊が少なかつた．又露出，現像処理後までは細胞の破壊は認められないのに後染色後，細胞が完全に破壊されていることがある．これは恐らく固定不充分か，染色濃度，長時間染色に関係しているように思われる（乳剤と接觸しない細胞に於いても同様）が，これらの原因を取除いてもおこることがある．この点については原因不明である．

以上の基礎実験をもとにして単細胞の「オ」を作成し実際問題に応用しいずれの術式が単細胞の「オ」に最も理想的な効果を発揮するか比較検討することにした．

實驗方法

（I） 骨髄細胞の「オ」（第6図参照）

第6図 対照群エックス線照射群の R.I. 投与法略図



（i） 対照群 P^{32}を各白鼠（80－100g）の腹腔内に注射し，注射後 1.5，3, 6, 12，24，48，72，各時間に動物を殺し骨髄細胞を採取し「オ」を作成した．

第 6 表

Chemical form	R. I.	Radiation	Energy. (MeV)	H. L. (days)
Sodium phosphoms	$_{15}P^{32}$	β^-	1.701	14.3
Sodium Sulfort	$_{24}S^{35}$	β^-	0.167	87.1
Sodium Chlorid	$_{16}Cr^{51}$	γ Kapper	0.33	27.8
Iron Chlorid	$_{26}Fe^{59}$	β^- γ	0.46 1.29	45.1
Yttrium Chlorid	$_{39}Y^{90}$	β^-	2.18	61hrs

（ii） エックス線照射群

照射線量 300r，600r，1200r全身照射

照射条件 200kVp,25mAフォルター 1 mmCu＋0.5mmAl 距離40cm，線量率90.3r/min

300rについてはエックス線照射後24，48，72，120，各時間を中心として骨髄細胞の摂取を行なつた．これは白鼠の LD_{50} が凡 400～500である為骨髄細胞系の障害度もこの時間附近にあるものと考える．又5日後には恢復に向つている．600rについてはエックス線照後6, 12，24，48，72，各時間に骨髄細胞の採取を行なつた．上記 LD_{50} 線量よりはるかに越えている為初期死亡も3－4日から始まるので，この期間の観察が適当である．

1200rについては24時間後には早くも死亡開始がおこりそれ以内に観察する必要がありエックス線照射後 1.5，3, 6, 12，24，各時間について行なつた．

エックス線照射による影響を観察する方法に2つある．(1)は照射直後にR.I.を投与し対照群と同様の時間に骨髄細胞と採取し「オ」を作成するものと，(2)照射後，骨髄細胞採取迄は対照群と同様の時間を採用し，R.I. 摂取を一定の時間で比較する方法とである．本実験では (2)を採用し，3時間とした．後述する吉田肉腫の場合は (1)を採用した．

投与した R.I. 量は乳剤の種類によつて異なるが 300～500μc とした（S^{35}，Fe^{59} は 80～100

μc とした)又「オ」陽性度の点からいつて同じ R.I. でも比放射能の大なるものを使用した．これは R.I. の放射能と無関係に元素の細胞内摂取量は同一と考えられるから減衰度の少ない R.I. を使用する方が「オ」陽性度の点から有利である．骨髄細胞採取法は対照群に於いては全期間にわたり肉眼的に骨髄の変化は見られず簡単に採取出来た．エックス線照射群の場合は 600r，1200rについて12時間，6時間附近より骨髄の粘稠度を欠き出血傾向が大となり，72時間，24時間においては殆んど赤血球で満たされ採取困難であつた．その為毛細管ピペットにてこれを採取，少量の二重蓚酸を加え血清にて稀釈し塗抹標本を作成した．基礎の項で述べた如くすべて骨髄細胞は洗滌しなかつた．

（Ⅱ）　慢性骨髄性白血病の末梢血液の「オ」

P^{32} を 3 mc 葡萄糖にて稀釈し徐々に静脈内注射を行なつた．其の後（Ⅰ）で述べた対照群の場合と同様の時間に末梢血液採取塗抹標本を作成（白血球が多い場合は同人の R.I. 注射前の血清にて稀釈してから塗抹する）この際なるべく血球はリンゲル，生理的食塩水にて洗滌しない方がよい原形質破壊の原因となるからである．又直接末梢血液塗抹を行なつた際血清内（細胞外）の R.I. による「オ」の陽性が考えられ細胞のオの判定に支障をきたすが如く考えられるが，同病の P^{32} の血球血清内の放射能を測定してみると第5図の如く血球では30分で可成り高く血清と同程度であるが，3時間以後は血球の放射能は増々高くなり逆に血清内の R.I. は減少し，6時間後には殆んど認められなかつた．従つて「オ」の実験上血液の洗滌をしなくとも支障をきたさない．むしろ血清内の R.I. の存否も見ることが出来るのである．Y^{90} で治療をした際も殆んど血球内に摂取されないものと考えられ，この場合も上記の方法を採用した．

（Ⅲ）　吉田肉腫細胞の「オ」

（Ⅰ）と同様対照群とエックス線照射群について比較した．まず吉田肉腫移殖後4日の白鼠腹腔内に P^{32} 300μc 注射し（Ⅰ）と同様の各時間に毛細管ピペットにて腹水を少量吸上げ塗抹標本を作成した．エックス線照射群については，1200r を前述の条件にて全身照射し直後 P^{32} 300μc 腹腔内に注射し対照群と同じ各時間に腹水採取塗抹し「オ」を作成した．

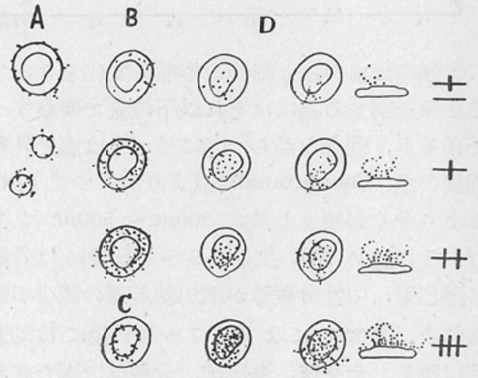
（Ⅳ）　Cr^{51} を指標とする赤血球の生存期間測定に関する実験に於いて「オ」を応用し Cr^{51} の摂取された赤血球の放射能を測定すると同時に赤血球内 Cr^{51} の「オ」を作成し赤血球の生存期間を「オ」によつて測定した．まず患者より30cc採血し二重蓚酸を加え遠心沈澱し血球のみとり出し(15～16cc)その中に $Na_2\ Cr^{51}\ O_4$ 100～150μc を挿入し注意しながら混和し37℃にて30～40分間放置し，しかる後リンゲル液をもつて3～4回洗滌1cc取り（放射能測定用）次に総量を測定（血液総量測定の為）．リンゲル液又は始めに取除いた血清を加えて静脈内注射する．注射30分後に2cc採血放射能測定用に使用し耳朶より更に採血「オ」を作成した．この採血「オ」を1週間おきに行ない両者を比較検討した．測定法は，網状赤血球，栓球計算法と同様赤血球1000に対し「オ」陽性赤血球何箇あるかを計測した．

以上各実験についての判定は1動物について或いは各時間試料につき「オ」各術式を採用し，更に放射能を含まない細胞の「オ」をおこない，5～8枚の各種「オ」と染色細胞標本により比較判定した．

判定基準：

第7図に示す如く第2図の「オ」作成目的に従がつて分類した．（A）は R.I. が細胞膜に附着し

第7図　判定基準



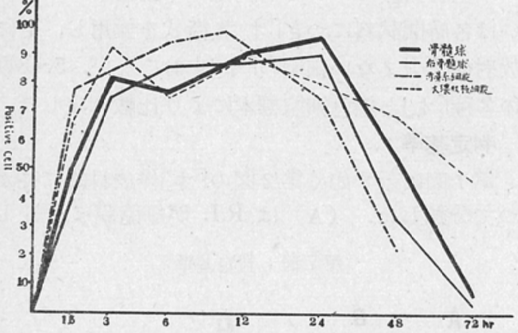
ているかの如くみえる場合も原形質の辺縁に現像銀がみられるものである．

（B）は原形質内に R.I. の存在する場合であり，これを（±）（+）（卄）と3つに分けた．（卄）は次に述べる（C）即ち核の縁にまで現像銀が認められる場合である．（C）は核の辺縁に陽性に見られる場合．（D）は今迄一般に使用されている判定基準である．これらを Random grain-, Track-Autoradiography の立場より2つに分けて（±）（+）（卄）（卌）の4つの陽性度をきめた．これらの分類に従つて「オ」の陽性度を判定した．（以下の判定に疑陽性，陽性とあるは（D）を示す）

結果及び考按

R.I. を動物に投与して細胞の代謝の研究は多いが，まず考えられることは R.I. による組織細胞の障害度である．その為一般に体重1gにつき1μc の P^{32} であれば初期の障害は起らないと言われているが実際は P^{32} 投与後48時間72時間

第8図　対照群P^{32}投与による骨髄細胞の「オ」陽性曲線



で骨髄の出血が起り細胞の形態に変化をきたすので正確を期する為にはそれ以下の量で観察すべきであるが，残念ながら「オ」に於いては感光乳剤の感度の点，Backgroundの点よりかえつて1μc/体重より多く必要とし最大 300μc～500μc であつた．その為 R.I. 投与後3～4日後には骨髄中に淋巴球，中性分葉球が増加幼若球の減少が認められた．Morse によると7～10日後には幼若細胞は消失し赤芽球，淋巴球，分葉球で満たされると記している．

P^{32} 投与せる白鼠の骨髄細胞の R.I. の摂取状況について述べると第7表第8図に示すように注射後 1.5時間にして骨髄細胞に R.I. が摂取されるが，いまだ核に到達せず細胞膜或いは原形質内に R.I. の存在が認められた．細胞外 R.I.もそれ程多量に存在しない．

「オ」の立場より観察すると．骨髄芽球については全般に 0～2％の細胞の出現に対して50～100％の陽性疑陽性を示している．前骨髄球については始めの1.5時間では30～40％の凝陽性率を示し，数％の細胞膜原形質内の疑陽性率を示めし，核内陽性の前過程を思わせる．1.5時間60～70％3時間では60％の陽性率を示し，数箇の原形質内陽性を示している，6, 12，24時間においては90～100％の疑陽性，陽性率を示めし原形質内のR.I. の存在は殆んど証明されなかつた．48，72時間においては60～50％に減少し前骨髄球の出現も少なくなつている．骨髄球においては，1.5時間にては50％の疑陽性陽性率を示すも，3時間では85％に達し，6，12，24時間では90％以上の疑陽性率を示している．Morse によると21時間で 100％の陽性率を示している．48時間では50％に低下し，72時間以後は出現度も減少し陽性度も少ない．後骨髄球においては，1.5時間にては40％の疑陽性率を示し，3時間以後では80％，90％の陽性率を示している．48時間以後は陽性率も極度に低下し，細胞数も少ない．桿状，分葉球には始めから殆んど R.I. の陽性は証明されず，たゞ数％が原形質，核の周辺部に疑陽性に証明され特に環状球(家兎では疑エオヂン）に多くみられた．淋巴球については骨髄に於ける出現率が少なく，しかも「オ」陽性も殆んど無かつた．単球は殆んど出現しない．赤芽球については大赤芽球の出現が最も多く20％以上に達し，「オ」の陽性率も高く，他の幼若細胞と同様 1.5時間より陽性を示し12～24時間で最高で50～70％に達してはいるが，それ以後48, 72時間では同細胞の出現率が高いわりに「オ」陽性率は低下している．中小赤芽球は大赤芽球に比し出現

第7表　P^{32}投与せる白鼠対照群，骨髄細胞「オ」陰性陽性率について（B，Cは第7図による）

時間 hr		1.5				3				6			
判定基準		−		±	+	−		±	+	−		±	+
骨髄芽球								0.5				0.5	
前骨髄球	好中	1.0		1.0		0.5		0.5	2.0	0.5		2.5	
	好酸												
骨髄球	好中	5.0	B	4.0	1.0	2.5	2.5B	4.0	4.5	2.5		3.0	6.5
	好酸					0.5				0.5		0.5	
後骨髄球	好中	4.5	B	2.5	0.5	2.5	B	2.5	4.0	1.5		7.0	4.5
	好酸					0.5		0.5		1.0		1.0	
桿状核	好中	5.0	C			1.5		0.5		3.5	1.5C		
	好酸	1.5				2.0		0.5		1.5		0.5	
分葉核	好中	13.0	B．C			13.0	2.5C			14.0	4C		
	好酸	2.0				2.5							
単球						1.0							
淋巴球		3.0				4.5							
前赤芽球													
大赤芽球		8.0		10.0	7.0	1.5	5B	8.0	11.5	2.0		10.0	15.5
正赤芽球	好塩	3.5		2.0		1.5		0.5	0.5				
	多染	6.0	B	5.0	1.5	4.0	B	2.0	1.5	1.5		4.0	5.0
	正染												
大環状核細胞		2.5		4.0	1.0	0.5	2C	2.0	2.0	1.5		0.5	3.5
細胞分裂							C						

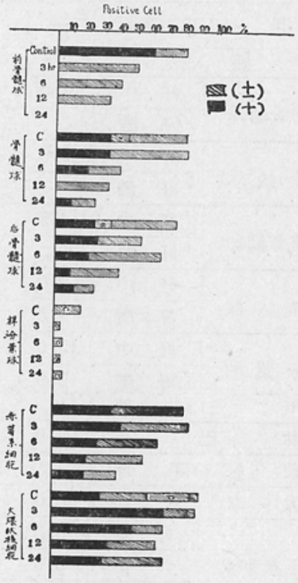
時間 hr		12				24				48				72			
判定基準		−		±	+	−		±	+	−		±	+	−		±	+
骨髄芽球						1.0											
前骨髄球	好中	1.0		1.0	1.0	0.5		2.0	1.0	0.5		0.5		0.5		0.5	
	好酸									1.0							
骨髄球	好中	1.5	B	6.0	7.0	0.5		6.0	2.0	6.0		2.5	2.0	3.0		1.5	
	好酸									2.0							
後骨髄球	好中	1.0		7.0	2.5	1.0		7.0	2.5	6.5		2.5	1.0	7.5		0.5	
	好酸	1.0								2.0							
桿状核	好中	2.0	2C	1.0		4.5	0.5C			2.0				10.0			
	好酸	0.5				0.5											
分葉核	好中	14.5	3.5C			16.0	4C			22.0	3B	2.0		28.5	C		
	好酸																
単球										0.5				1.0			
淋巴球		3.0		0.5		5.5		2.0		6.0				1.5		0.5	
前赤芽球						1.0											
大赤芽球		3.5		8.0	13.5	3.0		8.0	10.5	12.0		2.0	4.5	8.0		2.0	0.5
正赤芽球	好塩									0.5				1.5		0.5	
	多染	1.0		4.0	2.0	1.5		3.0	5.5	2.0		3.5		3.0		0.5	0.5
	正染									4.0		0.5		0.5		0.5	
大環状核細胞		1.0		3.0	5.5	2.0		3.0	5.5	4.0		2.5	3.0	4.0		3.5	
細胞分裂																	

度も少ないが「オ」の陽性率は高く多染性に多かつた．3時間で50％に達し24時間で85％である．以後48，72時間では大赤芽球と同様細胞出現率に比し「オ」陽性率は低下を示している．大環状核細胞，これは人間の骨髄ではみられない単球より大きく20～30μもあり又それ以下のものもある．原形質は塩基性のもの多く顆粒性のものもある．又両者の中間に属する前骨髄球の原形質を思わせるものもある，核は主に環状で家兎疑エオヂンに類似し，幼若なもの成熟せるものもある．又，核が大きく（中心部に小穴があり）原形質塩基性の basophile kugelhaufenzellen と称する細胞もある．著者は前者について，いずれの系に分類してよいのかわからないのでかりにこの名称をつけ分類した．写真7，8，11参照，この細胞は正常白鼠でも4～8％出現し後述するエックス線照射によると10％以上に増加する．「オ」より見ても1.5時間より疑陽性率を示し，3時間では50％もあり24時間では90％の陽性率を示している48時間では細胞の出現度も10％に達し72時間も同様の％を示すが「オ」の陽性率は50％に低下している．又後者についてもかなりの陽性率を示しており，形態学的に見て類似しており，両者何か関係がある様にも思われる．以上述べたのは核の陽性率についてであるが，1.5，3，時間においては（特に3時間）細胞の膜面に点々と，現像銀が点在し又原形質からもβー線飛跡が証明され，特に骨髄球，大環状核細胞に多くみられ，6時間以後12，24時間には殆んどみられない．この様な現象は恐らく 1.5，3，時間では注射した R.I. が多量に骨髄内に進入し細胞内に盛んに摂取されつゝあるを意味するものであろう．この状態は又，R.I. が核内へ摂取される前過程とも言えるのではないかと思われるのである．

エックス線照射せる白鼠骨髄細胞の P^{32} による「オ」について．

1200r 照射について：第10図に示す如く形態学的立場から観察すると 1.5時間後には幼若形は減少し骨髄球，後骨髄球の減少，中性分葉球淋巴球，赤芽球の増加が見られ，6時間後では後の3

第9図　対照群（3時間）1200r 照射群と骨髄細胞「オ」の陽性率の比較

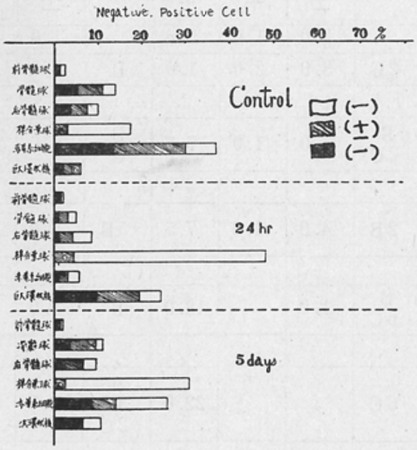


者が一様に最高率を呈し，24時間では中性分葉球が圧倒的に増加し，中性幼若球，赤芽球の減少濃縮，空泡形成，破壊細胞が多くなる．6時間で骨髄内に出血をきたし，24時間では骨髄内殆んどが赤血球で満たされ照射後2～3日で死亡する．

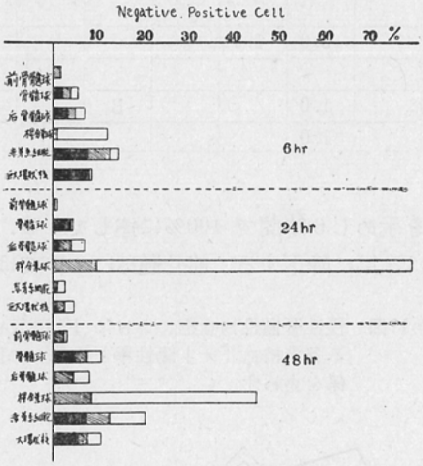
「オ」から観察すると第9図に示す如く骨髄芽球は殆んど認められず，前骨髄球は，6時間では細胞出現率は1～2.5％あり「オ」陽性率は50％である．骨髄球については対照例に比し極度に減少し，「オ」の陽性率も3時間80％，6時間42％，24時間では30％の値であつた．後骨髄球については，前者と同様出現度も少なく，「オ」陽性率も3時間迄は50～60％であるが，24時間では25％に減少している．分葉球，淋巴球については細胞の出現度は高いが，「オ」陽性率は対照群と同様殆んど無く1％以下であつた．赤芽球については70～80％の陽性率を示し，24時間では出現率も少なく50％以下の「オ」陽性率であつた．24時間では又，大赤芽球の出現を見なかつた．大環状核細胞は概してエックス線に強く増加し24時間では細胞出現率も13％もあり「オ」陽性率も70％に達し3～6時間では70～90％であつた．又対照群に比して細胞膜，

第　10　図

(a) 対照群（3時間）300照射群の細胞出現と「オ」陽性率との比較



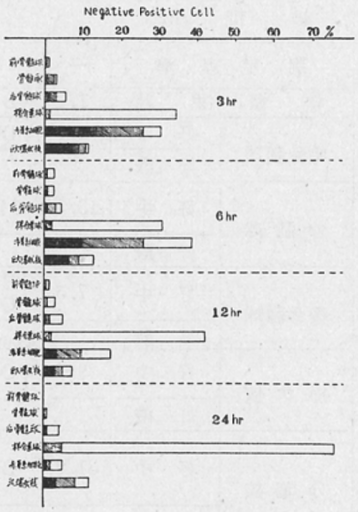
(b) 600r 照射群細胞出現「オ」陽性率との比較



原形質内の「オ」陽性率は殆んどなく，各時間における R.I. 細胞内摂取も極度に抑制され骨髄細胞のエックス線による障害が現われている．

600r照射群について．形態学的立場から述べると，1200r と多少異なり6時間で淋巴球，赤芽球の極度の増加がみられ，24時間では逆に中性分葉球の増加がみられ淋巴球，赤芽球の減少が目立つ，分葉球には形態異常をきたし，大分葉形を呈し6～7核に分葉し顆粒が点在，或るものは塩基性を呈しているものもある．72時間では赤芽球，分葉球の増加があつて4～7日で死亡する．「オ」の

(c) 1200r 照射群



立場より観察すると，エックス線照射後6時間では骨髄系の出現が少ないが「オ」の陽性率は高く骨髄芽球，前骨髄球の「オ」の陽性率は 100%，80% であつた．24時間では50%， 100% であり，48時間では骨髄芽球は認められず前骨髄球は83% であつた．骨髄球については6時間では70%，24時間では81%，48時間では56% であつた．分葉球，淋巴球では「オ」の陽性率は殆んどなかつた．小赤芽球では，全経過を通じて60% 前後であつた．大赤芽球については，全経過を通じて比較的 R.I. が摂取されている．大環状核細胞は一様に高度の陽性率を示し90%にも達している．原形質内細胞膜に於ける「オ」陽性率では6時間でも各細胞に認められ24時間における陽性率はかなり高かつた．48時間では陽性率は殆んど見られなかつた．

300r照射群について．形態学的に述べると，エックス線照射後24時間では骨髄球，後骨髄球，大赤芽球の減少があり，逆に好中分葉球，大環状核細胞の増加がみられる．照射後5日では骨髄系細胞，赤芽系細胞の出現は共に恢復されつゝあり，その後の生存期間については殆んど死亡しない．「オ」よりこれを観察すると24時間5日に於ける差は骨髄球に於いては60%より86%に増加しており，後骨髄球に於いても47～68%に増加している．赤芽球においては24時間では50%の陽性率で

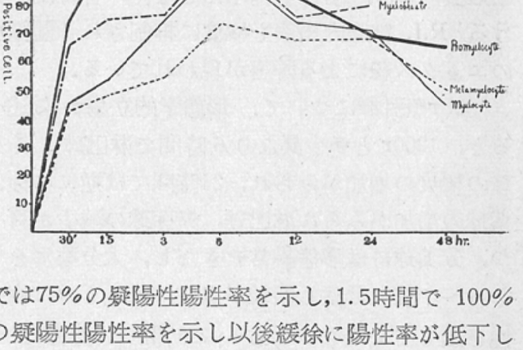
第8表 慢性骨髄性白血病の

時間 hr		30分				1.5				3			
判定基準		−		±	+	−		±	+	−		±	+
骨髄芽球		1.0	B	1.0	1.0	1.0		2.0	1.0	0.5		1.0	0.5
前骨髄球	好中	2.0	B	3.0	3.0		2C	3.0	2.0	1.0	B	4.0	3.0
	好酸					1.0							
骨髄球	好中	13.5	4B	8.0	3.0	3.5	B 2C	1.0	1.0	7.5	B C	8.0	11.0
	好酸					1.0							
後骨髄球	好中	7.5	B C	3.0	2.0	7.0	2B	4.0	1.0	7.5	5B	5.0	4.0
	好酸												
桿状核	好中	9.5	C	4.0		18.0	B 6C	1.0		12.0	B	1.0	
	好酸					1.0							
分葉核	好中	31.0	B	2.0		31.0	6C			22.0	A 3B 2C	3.0	
	好酸					2.0							
単球												1.0	
淋巴球													
大赤芽球				2.0				2.0	1.0				
正赤芽球	好塩												
	多染							1.0			B		
	正染	1.0						1.0					

あるが，5日後には70〜83%の陽性率に増加している．大赤芽球においては100%の陽性率であつた．大環状核細胞では24時間にて70%，5日では80%の陽性率であつた．

P^{32}による慢性骨髄性白血病の治療に於ける血液の「オ」についてまず第8表に示めす如く細胞学的に観察すると骨髄芽球は2〜4%の出現である．前骨髄球では4.5〜8%であり，骨髄球は出現率は最も多く1.5時間の7.5%をのぞいて15.5〜27%である．後骨髄球では13〜17%の出現である．赤芽系では貧血の割に出現度は少なく主に大赤芽球の1〜2%正赤芽球は1〜2%であつた．「オ」を作成した全期間を通じて各細胞の百分率については大きな変動はなかつた．その為め第11図に示めす如く各細胞の出現に対する「オ」の陽性率を各時間について比較観察した．この図によるとP^{32}静脈内注射後30分にして各細胞に多量のR.I.の摂取がみられた．骨髄芽球については70%の「オ」陽性率を示めし6時間で100%に達している．それ以後は次第に降下する．前骨髄球については30分

第11図 慢性骨髄性白血病におけるP^{32}摂取せる各末梢血「オ」陽性率と時間との関係を表わす



では75%の疑陽性陽性率を示し，1.5時間で100%の疑陽性陽性率を示し以後緩徐に陽性率が低下していく．骨髄球については，30分に於いて45%の

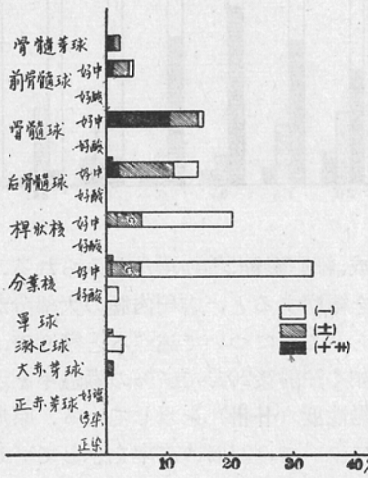
末梢血の「オ」陽性率について

6				12				24				48			
−		±	+	−		±	+	−		±	+	−		±	+
		1.0	1.0	0.5		1.0	0.5	0.5		1.0	1.0				
0.5		3.0	1.0	1.0		3.0	2.5	2.0		2.0	3.0	0.5		3.0	1.0
												1.0			
0.5		5.0	9 (1卄)	6.0	B	6.0	6.5	4.0	B	5.0	12.0 2卄	13.5	B	6.0	2.0+ 3.0卄
												1.0			
4.0	B	9.0	2.0	5.5		5.0	5.0	5.5	B	5.0	7.0	7.0	B	5.0	3.0
1.0				1.0								1.0			
14.5	4C	2.0		14.0	3C			6.0	C	4.0	2.0	6.0	3C	1.0	
1.0				1.0								2.0			
28.5	B 6C	1.0		24.0	3C			20.0	C	5.0	1.0	30.0	5C	21.0	
2.0				1.0								2.0			
				1.0						1.0					
3.0	B			2.0		0.5									
		1.0		1.0		2.0		1.0		2.0					
				1.0											
				1.0		1.0				1.0			B		

疑陽性，陽性率を示し，次第に陽性率が高まり，6時間で97%の最高に達する12，24時間と次第に陽性率も減少する．後骨髄球では「オ」の陽性率は前述の細胞に比し少なく最高値である6時間では73%であつた．桿状核，分葉核，淋巴球については，白鼠骨髄の場合と同様殆んどP^{32}は摂取されず核の辺縁に現像銀の存在を見るのみであつた．赤芽系について細胞の出現数が少ないので「オ」陽性率について正確なことは言えないがP^{32}の摂取が証明される．P^{32}の細胞内摂取の経過について観察すると始めの30分において原形質内の摂取がかなり明らかに認められ時間のたつにつれてその数も減少していく．又各細胞のP^{32}摂取の最高値が3～6時間（第12図に示す）にあることは第5図に示めす血球の放射能測定曲線とよく合つている．又R.I.摂取の最高値が骨髄の場合の24時間と対照的である．

吉田肉腫細胞の対照群については形態学的に

第12図　慢性骨髄性白血病に於けるP^{32}投与後6時間の「オ」陽性度を示めす

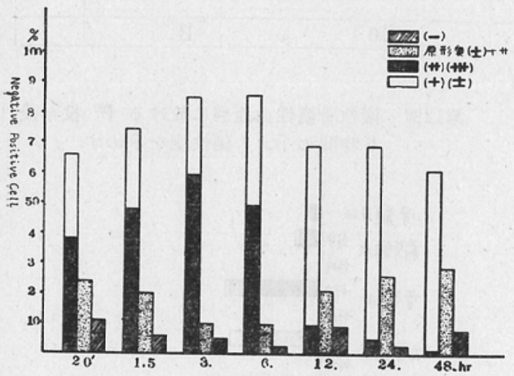


は，全細胞中単核が大部分を占め60～90%である．その他二核，多核，巨核，等がある．P^{32}腹腔内注射は移植後4日目に行なつた．5日頃より

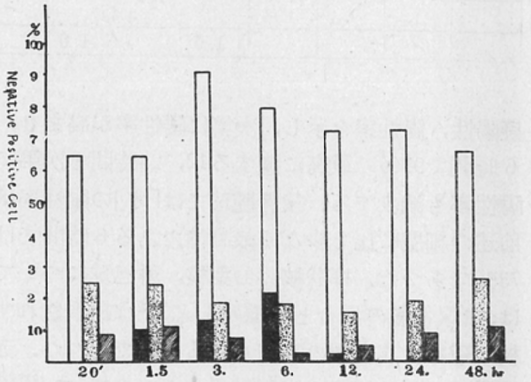
第9表　吉田肉腫，対照群，1200r 照射群の「オ」陽性率比較を表わす

	単核「オ」陽性度と時間との関係									
		(卌)		(卄)		(+)		(±)		(−)
	hr	B	D	B	D	B	D	B	D	
Control	20′	0.5	5	0.5	27	10	16.5	9	7.5	7
	1.5		10.5	1.5	30.5	8	14.5	7.5	7	5
	3		17.5	3	31.5	1.5	14	4.5	6.5	4
	6		12.5	1.5	28.5	4	23.5	4.5	6.5	2.5
	12				6	10	30	5	12	6
	24				3	12	28	5	13	2
	48				1	13	30	6	10	5
1200r	20′					20	49	3	10	8
	15				7	9	24	8	13	9
	3			2	10	8	39	5	16	6
	6			1	20	10	41	5	8	3
	12				2	7	37	3	7	7
	24					5	36	7	8	5
	48					5	21	8	10	5

第13図　(a) P^{32}投与せる吉田肉腫対照群単核細胞「オ」



(b) 1200r照射群単核細胞「オ」



空泡形成，細胞濃縮，等の増加がみられる．「オ」よりこれを観察すると，吉田肉腫の大部分が単核であるから，これについて述べると第9表，第13図に示す如く注射後20分で67%の陽性率を示し内38%の強陽性度（卄卌）を示している．原形質内の陽性率については24%の高率を示している．又陰性の割合も他の時間に比し高い． 1.5，3時間の経過と共に細胞内の P^{32} の摂取は，高まり3, 6, 時間で最高に達した．この時間を境に12，24，48時間と減少している．又これにともない強陽性度も3～6時間が最高値を示している．これに比し原形質内の P^{32} の摂取については時間の経過と共に減少し3～6時間に於いて逆に最低値を示し，12，24，48時間と時間の経過と共に又増加していく．おそらくそれ以後になると核内の陽性率と同じように原形質内の陽性率も低下していくものと思われる．何故に原形質及び核内の R.I. の摂取がこの様な経過をたどるかについて断定出来ないが，恐らくは一つの細胞を例にとつて仮定するならば，30分， 1.5時間と原形質内を通過して，3,

写真1.

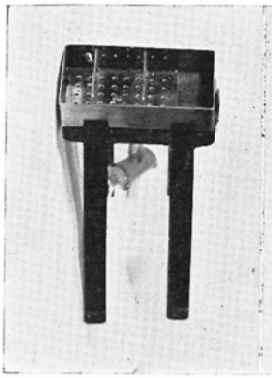


写真2. a.　　b.　　c.

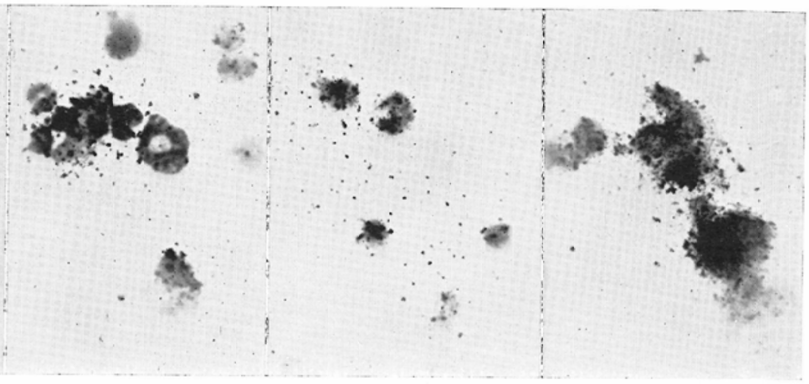


写真3.

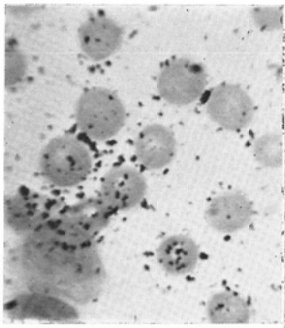


写真4.

写真5.

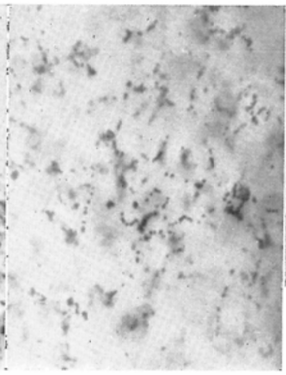
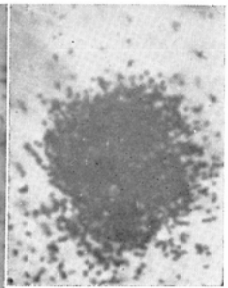
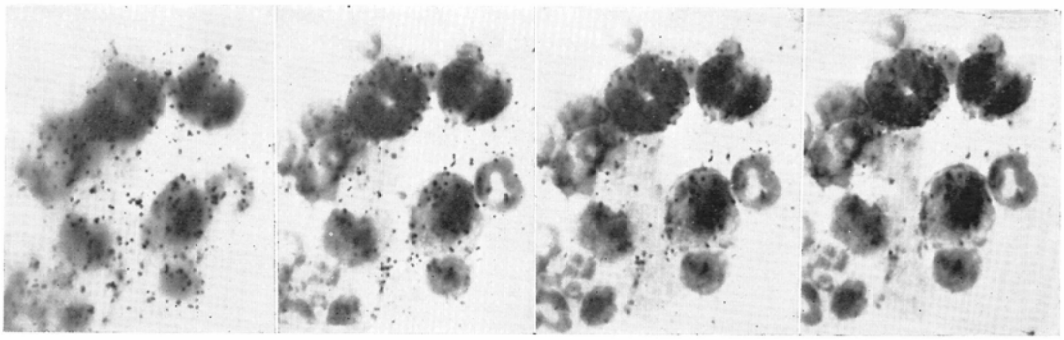


写真6.



写　真　7.



写　真　8.

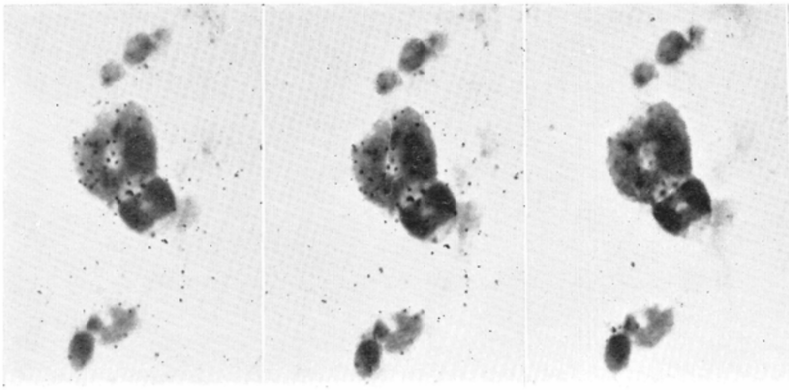
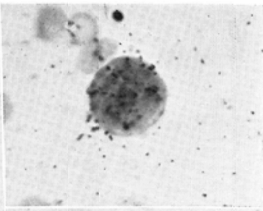
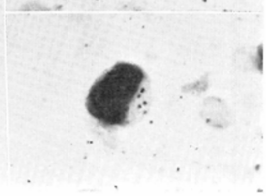
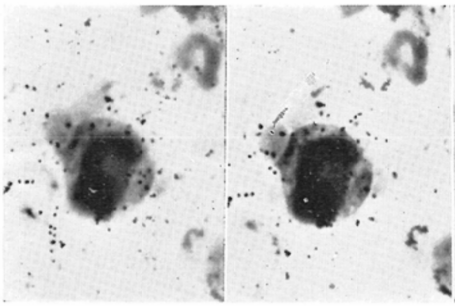


写真9．写真10.

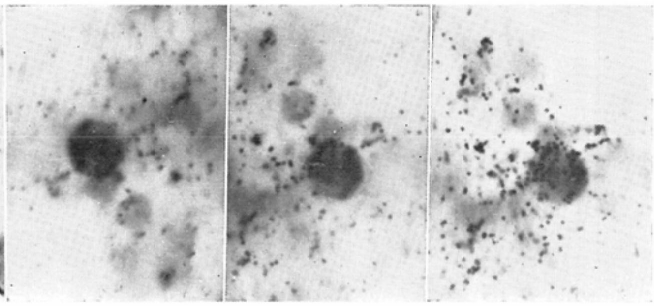




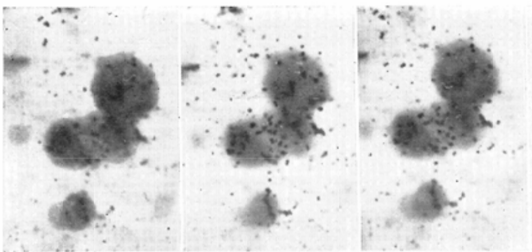
写　真　11.



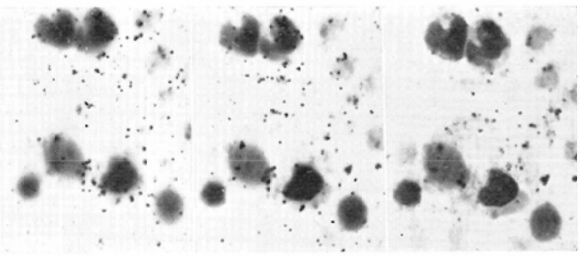
写　真　12.



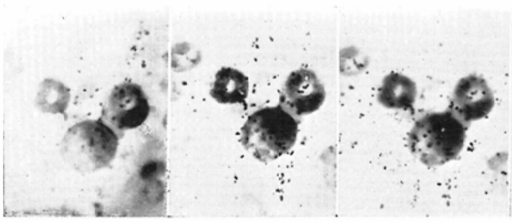
写　真　13.



写　真　14.



写　真　15.



写　真　16.

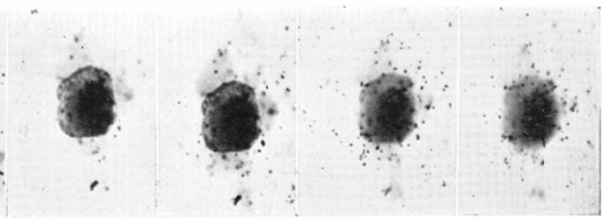


写真17.

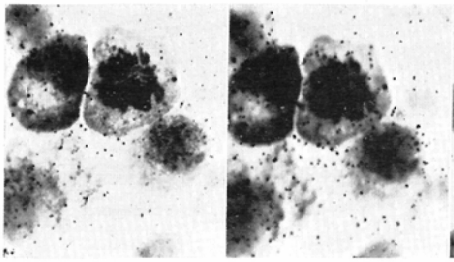


写真18.

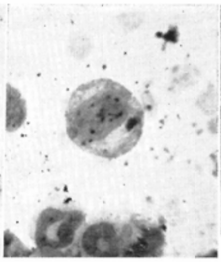


写真19.

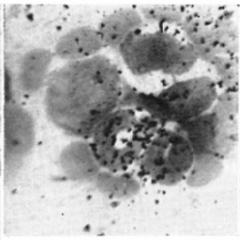
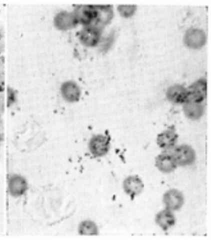


写真20.



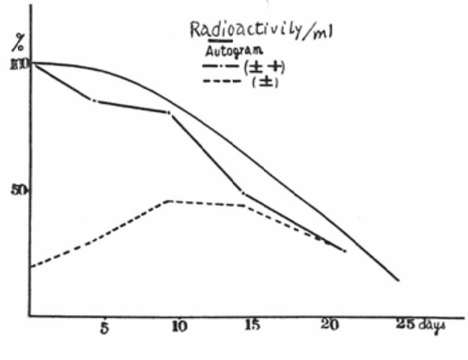
写真（1）現像及び「かぶり」防止膜作成用容器（2）（a）細胞の「かぶり」（b）（c）「かぶり」と放射能による現像銀．（3）細胞膜に存在する放射能による現像銀．（4）感光乳剤のずれ．（5）自然放射能によるβ線飛跡．（6）露出過度による「オ」（7）（8）（11）大環状核細胞「オ」50μ乳剤．（9）大赤芽球．（10）前骨髄球．（12）赤芽球50μ乳剤．（13）大赤芽球，骨髄球．（14）後骨髄球分葉球50μ乳剤．（15）環状球，骨髄球．（16）骨髄球．（17）吉田肉腫．（18）後骨髄球．（19）後骨髄球桿状球．（20）Cr^{51}による赤血球「オ」

6時間で核内へR.I.が摂取されそれ以後になると核から原形質を経て，細胞外に排泄されるのではないかと思われる．

1200r照射群については，移殖後4日目にエックス線照射と同時にP^{32}を注射し7日目に死亡した．形態学的には対照群に比しそれ程特異的変化は見られなかつた．「オ」においてはR.I.の摂取される細胞の数に於いても殆んど差が認められなかつた．又細胞内R.I.摂取過程についての時間的推移についても殆んど変らなかつた．照射後20分にしてR.I.の摂取量の差が現われている．即ち第13図に示す如く対照群に強陽性率が38%もあるのに比し照射群に於いては強陽性細胞は全く無かつた．照射群に強陽性率を示す最高である6時間でさえ22%である．吉田肉腫細胞は1200rに対しても細胞の病的な変化である破壊，壊死，濃縮，空泡形成等が簡単におこつてこない．たゞ照射によつて初期より極度に代謝が抑制されていることがよく現われている．

Cr^{51}を指標とする赤血球生存期間測定に関しては，赤血球にCr^{51}が摂取されると6価のCr^{51}となり，ヘモグロビンと結合される．これを「オ」の立場より観察すると写真20の如く赤血球内のCr^{51}の放射せる状態が「オ」を通じて証明される．Cr^{51}を指標とせる赤血球を注射後15分の赤血球「オ」では同赤血球は分散せずに密集しており，30分後では同赤血球は分散している．又一つの赤血球について考えてみると，理論的には1週間おきに採血される赤血球の「オ」では1コの赤血球内Cr^{51}によつて得られる現像銀は半減期に比例してその数が減少して行かねばならないが実際問題として露出

第14図　Cr^{51}指標とする赤血球の放射能曲線と「オ」陽性曲線



時間，現像処理によつて，現像銀の数は不平等であつた．第14図は赤血球1ccの放射能測定曲線と「オ」による曲線の比較で始めは（±）（＋）として現われるが15，25日では殆んど（±）であつた．

総括

以上により各種の単細胞の「オ」はすべての「オ」中最も困難な実験の1つであるが又その目的に対する意義はまことに大きいものがある．「オ」作成技術については単細胞に最も適した術式を選ぶべきである．以下「オ」術式の成績につき述べ比較することにする．

Stripping, Coating, Method：第1図に示めしたように2種類方法があつて，その一つは，前染色「かぶり」防止膜使用の場合で，往々にして解像力低下がみられ，「かぶり」防止膜に Celloidin を使用する際は脱染色し膜自身青染されがちであつた．前述した種々の「かぶり」防止膜を使用してみても膜が完全でなくどうしても「かぶり」を完全に防止することが出来なかつた．又乳剤のずれによる失敗，乳剤膜の剝離等が多かつた（15μ乳剤膜厚の Coating Methodでは剝離しなかつたが50μ硬膜では剝離が見られた）．Vinyl, Saran, Metacryl resin, 等を材料とする「かぶり」防止膜では，各術式中染色の保存については良好であつたが，乳剤剝離の恐れがあつた．この両術式を比較するとすべての点において Coating Method が勝つていた．たゞし Coating 用乳剤の入取が困難なことと技術も困難であつたが，この技術を修得すれば案外簡単な術式の一つであると思う．其の2は，本実験の単細胞の「オ」では染色液以外は乳剤に「かぶり」をおこさせなかつたので，「かぶり」防止膜を使用せず後染色を行なつたが，成績は非常に良かつた．Lawrence, Austonie, Morse, 等もこの方法を導入しているが，術式の詳細については記載してなかつた．著者の最も困難をきたしたのは後染色であつた．「オ」陽性陰性の差が出ても細胞の鑑別がつかなければ何の意味もないのである．一般に乳剤細胞が青染される傾向があり失敗が多かつた．正しい染色を行なう為めに充分な定着，水洗によつて余分な銀，ハイポーを取除き次にpH5～5.5のギムザー染色を1～1.5時間以内におこなうようにした．（木村福井氏によると12時間染色を行なつている）結果は非常によく赤芽球，多染性，正染性，塩基性，或いはリンパ球．或いは骨髄芽球前骨髄球との鑑別が容易であつた．たゞし乳剤の厚さが薄いことが必要で（15～20μ），飛跡用50μでは難染色性で良成績が得られなかつた．

Smear Method：細胞を乾板上に塗抹する際おこる物理的「かぶり」は殆んど防止出来た．塗抹直後の固定も乳剤に対し悪影響を及ぼさなかつた．又乳剤の「ずれ」についての心配は考慮する必要はなく，乳剤厚も無関係であつた．

現像後の後染色は上記と同様に行ない結果は良好であつた．解像もよく細胞よりたゞちに飛跡が観察され上部に向かうβ-飛跡は膜厚薄い為め途中で遮断されるが，横に走る飛跡は長く延びていることも観察された．

Sandwiching Method：上下左右に R.I. 飛跡が観察され他の術式で「オ」疑陽性でも本術式では「オ」陽性と記することが出来た．他の術式に見られない特徴がある．以上の各術式より主として Stripping, Coating, Method, Smear Method(50μ)を，採用し次に track 用50μについて Stripping Coating, Method（1の方法）で行なつた．最も成績のよかつたのは Stripping, Coating, Method(2の方), Smear method であり，この方法を主に採用して単細胞の「オ」を作成した．白鼠骨髄細胞吉田肉腫への R.I. の摂取について述べると初期においては原形質内に摂取が見られ時間的経過と共に核内へ移行し，やがて殆んど核内に摂取される状況を証明した．又幼若細胞に多くＲＩが摂取され，特に好中球，赤芽系に多く淋巴系には殆んど摂取されない．最高値については骨髄では24時間前後であり，白血病末梢血では3～6時間であつた．エックス線照射の場合では全体に R.I. の摂取量が減少していることが証明され骨髄では形態的変化が見られたが，吉田肉腫では形態学的変化が少なかつた．又白鼠骨髄中に大環状核なる細胞があり幼若な形態を呈しながらエックス線照射により却つて増加し，R.I. の摂取もよくおこなわれていることは興味あることであつた．以上の様な実験を容易ならしめるものは「オ」をおいて他に方法がないのである．又白鼠骨髄細胞の形態学的観察については，文献が少なく，又形態学的説明も不備であり特に上述の大環状核細胞についても分類法が無く，R.I. 摂取の状況より別個の系統に属するものと考えられこの様な分類をしたのである．又分類中 Basophile Kugelhaufen Zellen と称する細胞があるが 0～2％の出現度で上記細胞と類似点多く両者を含めて分類した．

単細胞の R.I. 摂取について本実験では各細胞の R.I. 摂取が定性的比較に終始したが，細胞の R.I. の定量については現在の高感度飛跡用乳剤をもつてすれば可能であると信ずる．その上細胞内の微細構造について R.I. の摂取状況も観察することも可能であろう．

稿を終るにあたり終始御指導御援助を賜わつた中泉名誉教授，宮川教授，江藤助教授に慎みて謝意を表す．又教室諸兄及び吉田肉腫を御提供下された佐々木研究所並びに五十子氏に感謝す．又富士フイルム会社研究所古関，高尾両氏，小西六フイルム会社森，同研究所若林両氏には常に基礎及び技術の御指導，又感光乳剤の御提供を賜わり紙上より深謝す．

文　献

1) Autonie, M.E.: Autorodiographic Studied on Iron-59 turnover by Erythroid Cells in rat bone marrow. Exp. Biol. Med. -85, 48—51, 1954. — 2) Austin, S.: Comparative incorporation of S-35 L Cystein and S-35 Sodium Sulfate by nomal and Leukaemia Leucocyte. Blood. Vol. 10 458—466, 1955. — 3) Belanger, I.F.: Improvements to melted emulsion technic of Autoradiography. Nature 170:625, 1952. — 4) Boyd. G.A. & Williams: Al Stripping film technic for histological Autoradiographs. Proe Soc. Exp. Biol. Med. 69 : 225, 1948. — 5) Boyd, G.A.: Autoradiography in biology and medicin academic press Inc., Publishers, N.Y. 1955. — 6) Boyd, G.A.: Cancer Symposium, Microskopie Autoradiography as tool in Cancer research. Texas Repts. Beal & Med., Vol. 8: 456, 1950. — 7) Boyd, G.A. & Board, F.: A preliminary report on histohaemogrophy Science 110 : 586, 1949. — 8) Boyd, G.A. & Leui, H.: Carbon 14 beta track autoradiography. Science 110:586, 1949. — 9) Campbell, D.: Track Autoradiography with Fe-59 and S-35 with quantitative evaluation. Nature Vol. 67 : 274, 1951. — 10) Celilia Lutwak-Man Some aspect of phosphorus Metabolisum in bone marrow. Biochemical. J. Vol. 52 : 356—364, 1952. — 11) Diserens, H.W. & Hall, O.: Method for radioautographic localization of isotope in tissues. Texas Reptes. Biol. Med. Vol. 10:286, 1952. — 12) Doniach, I. & Pelc, S.R.: Autoradiographic technique. Br. J. Radiol. Vol. 23 : 184. — 13) Elmlinger, P.J.: Iron turnover abnormalities in patients having anaemia. Serial blood and in vivo tissue studies with Fe-59, Acta Haemat. Vol. 59, 9 : 2, 1953. — 14) Erik Odebled artefact in Autorodiagraphy. Acta Radiol. Vol. 39, 192—203, 1953. — 15) Ellis, F., Lajtha, Li. G. & R. Oliver: Uptake of sulfate 35 by leukaemic human bone marrow in vitro. J. Clin. Path 8 : 166, 1955. — 16) Eugene P. Cronkite, M.D.: The Haematology of Ionizing Radiation. Atomic Medicin, p. 103—121. — 17) Fitzgerald: Radioautography in Cytology. Texas Repts. Biol. Medi. Vol. 11 : 671, 1955. — 18) Ganosto, F. & Rechenman, R.: Invitro incorporation of Glycine 1-C 14 in reticulocytes. Biochen. et Biophys. Acta 13:583, 1954. —19) Gomberg, H.J.: A new high resolution system of autoradiography. Neucleonics. Vol. 9, No. 4, 28—43 Oct. 1951. — 20) Greulich, R.C. & Leblond, C.O.: Radioautographic visualization of raiocarbon in the organ and tissue of newborne rats following administration of C 14-labelled hicarbonate anat. Record 115 : 559, 1953. — 21) Herz, R.H.: Autoradiography. Med. Radiol. and Phot 26:46, 1950. — 22) Herz. R.H.: Photographie Fundamentals of Autoradiography. Neucleonics Vol. 9, No. 3, Sept. 1951. — 23) Heilmeyer, L., Keiderling, W.: Radioisotope in der Diagnostik und Therapie der Blut Krankheit. Strahlen Therapie, 100 : 1, 169—183, 1956. — 24) 医事新報，No. 1751. 32，11, 16. 白鼠の骨髄細胞分類，— 25) 古関靖夫：オートラジオグラフィー，1954. 納谷書房. — 26) 木村喜代次，福井良久：血球のオートラジオグラフィー，日本血液学会雑誌，19:3, 1956. — 27) Lajtha: Utilization of formate C-14 for synthesis of D.N.A. by human bone marrow cells in vitro. Neuture 174:1013, 1954. — 28) Lajtha, L.G.: Detection of adenine carbon-14 in DNA by autoradiography. Nature 173, 4404, 1954. — 29) Lajtha, L.G.: Isotope uptake of individual cells. Esptl. Cell Research 3:696, 1952. — 30) Lajtha: Cultere of human bone marrow in vitro. J. Clin. Pathol. 5:67, 1952. — 31) Lajtha, L.G.: High resolution autoradiography; Isotope uptake of individual cells. J. phat. Sci 2 : 131, 1954. — 32) Latha & Suit, H.D.: Uptake of radioactive Iron by nucleated red cells invitro. B.J. Hematology 1, 1955. — 33) Lamerton, L.F. & Harris E.B.: Resolution and sensitivity considerations in autoradiograpyh. J. Rath. Sci. 2 : 135, 1954. — 34) Leglond, Stevens, C.E. & Bogoroch, R.: Histolobical lacalization of nealy fomed desoxy-rihonueleic acid. Science 108 : 531, 1948. — 35) Liquier-Milword, J.: A track-radioautography study of the intracellulor localization of cobalt in neoplastic tissue. Biochim et Biophys. Acta. 14 : 455, 1954. — 36) Larrain M. Kraus, & Dempsie. Morrison :

Invitro incorporation of Iron 59 into hemoglobin S. visualizid by autoradiography. Experi bial. Med. 89 : 598—602, 1955. —37) MacDonald, A.M. Cobb, J. & Solomon, A.K. & Stainberg, D.: Stripping film technique for radioautographs. Proc. Soc. Exp. the Biol. Med. 72 : 117, 1949. —38) Morse, W.I.: 2nd. M.D. Single cell autoradiographs of bone marrow and blood from rats using radioactive phosphorus. A.J. Med. Sci. 220 : No. 1—5, 522—529, 1950. —39) Morse, W.I.: 2nd M.D. Singl cell autoradiographs of bone marrow and blood and the other haemological studies with rats using radioactive phosphorus. Mcgill University. 1950. —40) 百瀬郁光: Microautoradiographyに於ける「かぶり」防止膜について, 日本医学放射線学会雑誌, 第17巻, 12号, 1958. —41) Odell, T.T., J.R.E.G., Tausche & Oude, W.D.: Uptake of radioactive suffate by elements of the blood and the bone marrow of rats. A.J. Radiology, Vol. 180 : 3, 1955. —42) Pelc, & Howard, A.: Technics of autordaiography and the application of the stripping film method to problems of nuclear metabolism. Brit. Med. 8 : 132, 1952. —43) Preuss, L.E. & Harrison, C.: A mote on a chemographic artefact in autoradiography. Science, 120 : 67, 1954. —44) Ray, R.C. & Stevens, C.W.W.: Recipracity failure and latent image in autoradiography. Brit. J. Radiol. 26 : 362, 1953. —45) 柴橋一雄, 三輪良雄：血液及び造血器における Radioautgraphy の研究, 第1報, 日本血液学会雑誌, 17 : 3, 1954. —46) Strumia Max. M. Lewrence Taylar: Uses and limitation of survival studies of erythrocytes tagged with Cr-51. Blood, 10 : 429, 1955. —47) Simmons, B.S. & Everett, N.B.: Some aspects of radio-iron metabolism by leucocytes. Biochim. Et. Biophys. Acta, 13:102, 1954. —48) Steinberg, D. & Solomon, A.: Detection of Ca-45, I-131, P-32 and Zn-65 by photographic film. Rev. Sci. Instr. 20:655, 1949. 49) Victor, H., Witten, M.D. & Morion, B. Suizberger: The mode of action of thorium X on human skin. Vol. 74 : No. 1, 90—97. 50) Saran resin F-120 Coating technical service. November, 1954, The Dow Chemical Company Midland Michigan. —51) Wainwright, W.W., Anderson, E.C., Hammer, E.C. & Lehrman, C.A.: Simplified autoradiography exposure calculations. Neucleonics, 12 : 19, 1954. —52) S. Oka, T. Mukoiba, S. Suzuki, H. Magae, K. Yamada, K. Adachi & A. Osakada: The proparation of test chart used for measuring resolving power of neuclear emulsion on irradiation by beta-ray of S-35. —53) Williams, A.L.: Method for preventing of leaching and fogging autoradiography. neucleonics. 8 : 10, 1951. —54) 吉田富三：吉田肉腫, 1949.

On the Fundamental Study of Single Cell Autoradiography.

By

Ikumizu Momose
Department of Radiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo.

The single cell autoradiography is one of the most difficult method among the microscopic autoradiography, therefor the most suitable technique should be selected for the study of the subject. By using various techniques, the following experiments were carried on in order to obtain the most suitable method.

(I) On the uptake of P^{32} of bone marrow of white rat.

(A) Control groups:

About 1.5 hours after peritoneal injection (300—500 micro curie), young cells, began to uptake P^{32} and, between 12 and 24 hours, in promyelocyte, myelocyte and macro-ringform cells, the percentage of autoradiographic positivity increased over 90% (±+) and then decreased after 48 hours, polymorphneucleic and lymphoid-cells should low uptake during the period of the experiment.

(B) Irradiated groups:

(i) 1200 r : The irradiated animals, in which the serious morphological changes were observed died within 2–4 days. The uptake of P^{32} young cells inhibited by irradiation and that of macro-ringform cells should some increase.

(ii) 600 r : The irradiated animals, in which same morphological changes just as in the case of 1200 r irradiation. The uptake of P^{32} was inhibited.

(iii) 300 r : Some morphological changes were also observed but they be come to recover within 4–5 days. P^{32} uptake of the cells was inhibited at the begining, but recovered in parallel to that of morphology.

(II) Autoradiography leukaemic cells treated by P^{32}.

About 3–6 hours after injection 3 mc P^{32} intravenously the uptake of P^{32} of the cells reached its maximum value and gradually decreased. Thereafter P^{32} incorporation of serum showed rapid decrease.

(III) The destribution of P^{32} in the Yoshida sarcoma control and irradiated.

(i) Control groups :

After 3–6 hours, the concentration of P^{32} reached maximum in the neucleous and minimum in cytoplasma, thereafter, that of P^{32} gradually decreased in the neucleous and increased tempolary in the cytoplasma.

(ii) 1200 r : The uptake of P^{32} of the neuclous could hardly be recognized, which cytoplasma incorporation was observed.

(iii) Autoradiography of Cr^{51} labelled erythrocyte in its life spann.

The complete autoradiographs of Cr^{51} labelled erythrocyte could be obtained.

From the above described experimental results, it was concluded that the most suitable method was the stainning process after the development by using stripping or coating or smear method.
