

抗白血病剤の骨髓造血機能に及ぼす影響に関する研究

第 1 編

骨髓細胞浮游廻転培養法に関する研究

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木潔教授）

瀬 崎 達 雄

〔昭和 38 年 5 月 7 日受稿〕

内 容 目 次

第 1 章 緒 言

第 2 章 実験方法

第 1 節 実験材料

第 2 節 実験方法

第 3 節 観察方法

第 3 章 実験成績

第 1 節 家兎骨髓細胞浮游廻転培養

第 2 節 人骨髓細胞浮游廻転培養

第 4 章 総括並びに考按

第 5 章 結 論

第 1 章 緒 言

体外組織培養は 1884 年 Roux 次いで 1907 年 Harrison がこれを試みたのに初まり、その後 1910 年 Carrel & Burrows²¹⁾²²⁾ は固型培地を支持体として用い、被覆法及びカレル法により方法論的革新を行ったが、更に 1913 年 Carrel³⁶⁾ は廻転培養法を示唆し、1925 年 Löwenstädt⁸¹⁾ はこれを実際に用い、その後 Ottl¹⁰⁸⁾、Comman²⁷⁾ 等により装置の改良がなされ今日の廻転培養法の基礎が確立せられた。

さて、骨髓組織培養については、1910 年 Carrel & Burrows²¹⁾ が幼若猫の骨髓組織を培養したのに初まり、Maximow²⁸⁾ (1929)、Fieschi & Astaldi³²⁾ (1946)、Woodard & Pomerat¹⁵²⁾ (1953) 等は骨髓組織を血漿固型培地を用いて培養したが、之に対し Osgood & Muscovitz¹⁰⁵⁾ は 1936 年骨髓細胞を浮游液としての培養する方法を考案し、その後 1937 年¹⁰⁶⁾ にはワクチン瓶を使用して簡易化に成功している。更に、1948 年 Norris & Majnarichi⁹⁷⁾ は骨髓細胞浮游液を小試験管に入れ孵卵器中で静置培養し、Hays⁴⁸⁾ はワクチン瓶を利用して Warburg 氏恒温槽中で振盪培養を行いより簡便なものとし、骨髓に及ぼす各種物質の効果を検討した。

その後、Astaldi & Tolentino⁹⁾ (1949)、Lajtha⁷⁶⁾ (1952)、Clemmesen & Plum²⁶⁾ (1952) 等によつて骨髓細胞浮游液の静置又は攪拌培養が試みられ多数の研究成果が報告された。又、Lajtha⁷⁶⁾、Swan &

Reisner¹³⁹⁾ 等も Osgood の方法を用いて人赤芽球の成熟に関する研究を行い、更に Berman & Powsner¹¹⁾、Thomas & Lochte¹⁴³⁾ 等は本法が又骨髓細胞の D. N. A. 及び Hemin の合成に関する研究についても有用であつたと報告している。我国に於いても、伊藤⁶³⁾、牧野⁸¹⁾ 等は Osgood の変法である Norris & Majnarichi⁹⁷⁾ の方法によりビタミン剤、アミノ酸剤の骨髓造血機能に及ぼす影響を検討している。

近年教室の岩崎⁶⁴⁾、久米田⁷⁴⁾ 等は Osgood 等の骨髓細胞浮游培養法の改良を企て、家兎骨髓細胞浮游液の Warburg 氏恒温槽内での振盪培養法を創案し、各種アミノ酸剤、ビタミン剤、鉄剤等の影響を観察し、以後本法を以て骨髓赤血球系造血機能に関して多数の研究が行なわれている。

私は教室の白血病治療の系統的研究の一端として、各種抗白血病剤の骨髓造血機能、特に赤血球系造血に及ぼす影響について研究するに当り、前述の岩崎、久米田氏法に検討を加えた結果、新たに骨髓細胞浮游廻転培養法を考案し得たので、以下報告し諸賢の御批判を仰ぐものである。

第 2 章 実験方法

第 1 節 実験材料

20~30 才の健康人又は体重 1.5kg 内外の健康幼若家兎を選び、いずれも血液像を検査し正常であることを確かめた後、人においては胸骨骨髓穿刺を施行

し骨髓液 0.5cc を吸引した。家兎では大腿骨、脛骨及び上腕骨を取り出し、これを消毒した後、骨鉗子を用いて縦に割り骨髓を摘出した。尚、この際脂肪髄は用いず赤色髄のみを使用した。

第2節 実験方法

家兎骨髓培養に於ては、取り出した家兎骨髓を Gey 氏液 10cc に入れホモゲナイザーにより 800 回転 30 秒間回転させ骨髓を破碎した後、1500 回転 8 分間遠心沈澱し、上清及び表面の脂肪層を取除き、沈澱した骨髓細胞を家兎血清 10cc 及び葡萄糖を含む Tyrode 氏第 1 液と Tyrode 氏第 2 液の等量混合液 10cc 中に入れ細胞浮游液を作り、150 メツシュに通しこの濾液を三角コルペンに集めよく攪拌しながら 1cc の駒込ピットで浮游の中間の層を 0.8cc 宛吸引し、実験に必要とする本数の各円形培養管 (15mm×150mm) に分注し、更に Ringer 氏液 0.4cc 宛を分注した。最後に培養管にダブル栓をして 1 時間 20 回転の回転培養器に収め 37°C で培養を行なった。

人骨髓培養においては、同じく骨髓穿刺液 0.5cc を Gey 氏液に入れ、直ちに 1500 回転 8 分間遠心沈澱後上清を棄て、沈澱した骨髓細胞を同一人血清 10cc 及び葡萄糖を含む Tyrode 氏第 1、第 2 液等量混合液 10cc 中に入れ、細胞浮游液を作り、150 メツシュにて濾過し、濾液を家兎の場合と同様に分注し、培養を行なった。

液体培地組成

Tyrode 氏液による骨髓細胞浮游液	0.4 cc
家兎又は人血清	0.4 cc
Ringer 氏液	0.4 cc

尚、培養液中の有核細胞数は約 2000~5000/cu. mm とした。

第3節 観察方法

培養前及び培養後 6, 12, 24, 36, 48 時間毎に 2 本の培養管を取り出し、5 分間強く振盪した後、各々の骨髓細胞浮游液について赤血球数、有核細胞数及び血色素量を測定し、更に細胞浮游液を 1000 回転 5 分間低速遠沈し、その沈澱の塗抹標本を作製、May-Giemsa 染色を施行して観察した。

i) 赤血球数：赤血球用メランジュールにより細胞浮游液を吸い、ハイエム氏液に混じてピュルカー、チュルク氏計算盤にて算出した。

ii) 有核細胞数：白血球用メランジュールを用い、チュルク氏液に細胞浮游液を混じて計算した。

iii) 血色素量：1/15 モル第 1 磷酸カリ溶液 22cc

と第 2 磷酸ソーダ 3cc を混和し、之を 4 倍に希釈したもの 4cc 中に血球浮游液 0.2cc を充分に混和溶解せしめた後、不溶解部分を遠沈除去し、次いで 20% フェリシアンカリ溶液 1 滴を加え、10 分後に 5% シアンカリ 1 滴、更に 2 分後にアンモニヤ 1 滴を夫々加えて 10 分以内にベックマン分光光度計にて測定した。

iv) 赤芽球百分率、総赤芽球数、正染性赤芽球増加指数：培養した骨髓細胞の塗抹染色標本について 1000 個の有核細胞を算える間の赤芽球の分類を行った。赤芽球は前赤芽球、好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、正染性赤芽球の諸型に分類し、正染性赤芽球は細胞質に好塩基性の色調が全くなく成熟赤血球の色調を有するもののみを算定した。この赤芽球百分率並びに有核細胞数より細胞浮游液 1cu. mm 中の総赤芽球及び正染性赤芽球の絶対数を算出したが、正染性赤芽球数の増加は培養開始時の総赤芽球数並びに正染性赤芽球数に影響されるため、正染性赤芽球数の増加を、Berman¹¹⁾ の云う所謂 "Accumulated Orthochromic Cells"、(以下これを正染性赤芽球増加指数と呼ぶ) 即ち培養開始時の赤芽球系細胞 1000 ケに対する各培養時間における正染性赤芽球増加数によりあらわした。この正染性赤芽球増加指数は次式により算出せられた。

$$O = \frac{O_x \text{ 時間} - O_o \text{ 時間}}{T_o} \times 1000$$

O：培養開始時の総赤芽球 1000 ケに対する培養 X 時間後における正染性赤芽球増加指数

O_x 時間：培養 X 時間後における 1cu. mm 中の正染性赤芽球数

O_o 時間：培養開始時における 1cu. mm 中の正染性赤芽球数

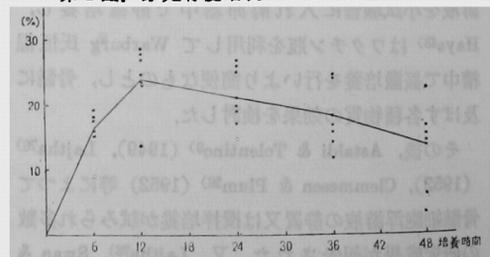
T_o 時間：培養開始時における 1cu. mm 中の総赤芽球数

第3章 実験成績

第1節 家兎骨髓細胞浮游液培養

i) 赤血球増加率 (第1表, 第1図)

第1図. 家兎骨髓培養における赤血球増加率



培養後6時間において16.4%であり、12時間後には最高値の27.5%を示し、その後漸次低下したが、24時間後21.2%、36時間後18.3%、48時間後13.6%であり、それぞれ培養前に比して増加を示した。

ii) 血色素増加量 (第2表, 第2図)

培養6時間後において71mg/dl、更に12時間後132.9mg/dlと急激な増量を示し、その後、更に24時間後188.6mg/dl、36時間後181.9mg/dl、48時

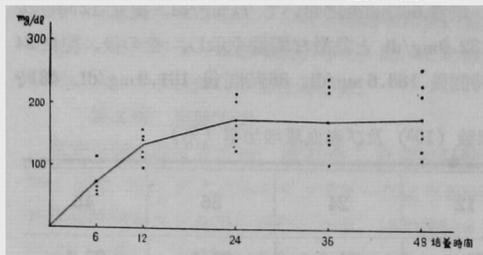
第1表 家兎骨髓培養における赤血球数 (10^9) 及び赤血球増加率 (%)

培養時間	0	6	12	24	36	48
NO. 1	22.5	26.1 (+16.1)	28.1 (+24.7)	28.2 (+24.8)	26.4 (+17.0)	26.1 (+15.3)
NO. 2	30.0	35.3 (+17.8)	38.1 (+26.9)	36.0 (+20.0)	35.6 (+18.5)	35.2 (+17.6)
NO. 3	25.7	42.1 (+17.9)	43.9 (+23.0)	41.2 (+15.1)	40.6 (+11.8)	38.5 (+ 6.0)
NO. 4	24.0	27.6 (+15.3)	29.5 (+23.2)	28.0 (+16.8)	27.8 (+15.7)	27.4 (+14.1)
NO. 5	23.7	28.2 (+19.2)	30.3 (+27.7)	29.8 (+25.9)	29.3 (+23.8)	27.6 (+16.5)
NO. 6	35.5	38.7 (+ 9.0)	40.3 (+13.5)	42.3 (+19.0)	41.5 (+16.8)	36.8 (+ 3.4)
NO. 7	23.0	27.5 (+19.2)	29.6 (+28.7)	29.1 (+26.8)	28.6 (+24.4)	28.2 (+22.4)
平均赤血球増加率(%)	0	16.4	24.0	21.2	18.3	13.6

第2表 家兎骨髓培養における血色素量 (mg/dl)

培養時間	0	6	12	24	36	48
NO. 1	515	590 (+ 75)	629 (+ 114)	638 (+ 123)	658 (+ 143)	673 (+ 158)
NO. 2	395	453 (+ 58)	535 (+ 140)	610 (+ 215)	635 (+ 240)	651 (+ 256)
NO. 3	290	365 (+ 75)	445 (+ 155)	505 (+ 215)	515 (+ 225)	503 (+ 213)
NO. 4	740	795 (+ 55)	835 (+ 95)	879 (+ 139)	840 (+ 100)	850 (+ 110)
NO. 5	500	615 (+ 115)	663 (+ 163)	702 (+ 202)	720 (+ 220)	731 (+ 231)
NO. 6	961	1016 (+ 55)	1081 (+ 120)	1111 (+ 150)	1097 (+ 136)	1086 (+ 125)
NO. 7	865	929 (+ 64)	1008 (+ 143)	1029 (+ 164)	1015 (+ 150)	1012 (+ 147)
平均血色素増加量	0	71	132.9	172.6	172.0	177.1

第2図. 家兎骨髓培養における血色素増加量



間後 173mg/dl であり、培養前に比しそれぞれ増加を示した。

iii) 有核細胞増加率 (第3表, 第3図)

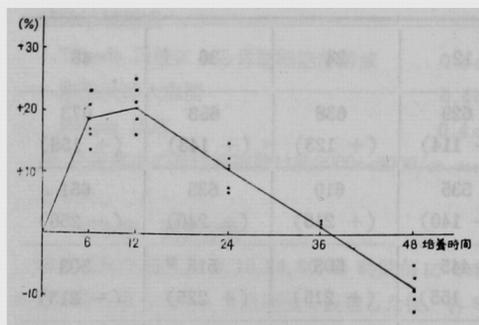
培養後6時間において+18.6%と急激に増加し、12時間後には+20.2%に上昇したが、その後、24時間後、+10.2%、36時間後、+1.4%と下降し、培養後48時間には-9.0%を示した。

iv) 正染性赤芽球百分率 (第4, 5表, 第4, 5図)

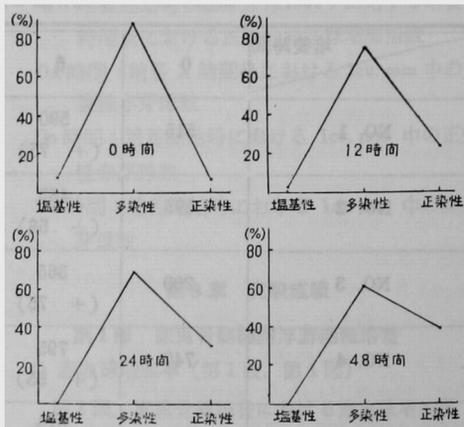
第3表 家兎骨髓培養における有核細胞数 (10²) 及び有核細胞増加率 (%)

培養時間	0	6	12	24	36	48
NO. 1	40.0	46.6 (+16.2)	47.4 (+18.6)	42.9 (+ 7.1)	40.5 (+ 1.2)	36.3 (- 9.3)
NO. 2	35.6	43.1 (+21.0)	43.9 (+23.1)	40.0 (+12.2)	36.2 (+ 1.6)	31.9 (-10.6)
NO. 3	70.1	81.9 (+16.8)	83.1 (+18.5)	77.3 (+10.2)	71.7 (+ 2.3)	65.0 (- 7.3)
NO. 4	68.2	77.5 (+13.7)	78.9 (+15.9)	72.8 (+ 6.9)	65.5 (- 4.0)	59.4 (-12.9)
NO. 5	53.4	65.9 (+23.3)	66.9 (+25.1)	61.1 (+14.6)	56.5 (+ 5.9)	50.7 (- 5.1)
平均有核細胞増加率	0	+ 18.6	+ 20.2	+ 10.2	+ 1.4	- 9.0

第3図. 家兎骨髓培養における有核細胞増加率



第4図. 家兎骨髓培養における赤芽球百分率



第4表 家兎骨髓培養における赤芽球百分率 (%) (平均値)

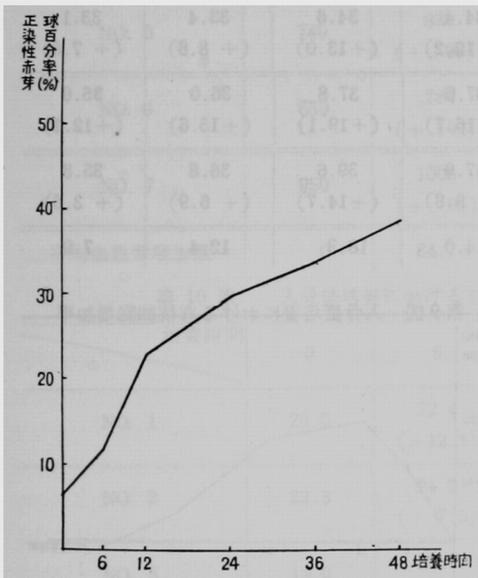
培養時間	赤芽球		
	塩基性	多染性	正染性
0	7	87	6
12	2	75	23
24	1	69	30
48	0	61	39

培養全経過にわたり正染性赤芽球百分率の持続的増加があり、培養前6.4%であつたが、6時間後、11.7%、12時間後、23%、24時間後、30%、36時間後34%であり、培養48時間後には39%を示した。これに伴い好塩基性赤芽球は消失し、多染性赤芽球百分率は漸次減少した。

第5表 家兎骨髓培養における正染性赤芽球百分率

		培養時間					
		0	6	12	24	36	48
NO. 1		7	9	20	32	34	38
NO. 2		4	15	21	27	30	35
NO. 3		6	11	23	25	32	41
NO. 4		10	14	27	34	36	40
NO. 5		5	9	24	32	38	41
平均正染性赤芽球(%)		6.4	11.7	23	30	34	39

第5図 家兎骨髓培養における正染性赤芽球百分率



v) 総赤芽球数 (第6表)

培養経過中総赤芽球数は略々一定乃至軽度増加の傾向を示した。

vi) 正染性赤芽球増加指数 (第7表, 第6図)

培養開始時の赤芽球 1000ヶに対する各培養時間における正染性赤芽球増加指数は, 培養全経過にわたり増加を認め, 培養6時間後59であつたが, 12時間後103, 24時間後 298, 36時間後 382と急激な増加を示し, 培養48時間後には428であつた。

第2節 人骨髓細胞浮遊廻転培養

i) 赤血球増加率 (第8表, 第7図)

培養6時間後9.0%, 12時間後14.0%と漸次増加し, 24時間後には18.3%と最高値を示し, その後36時間後12.4%, 48時間後7.9%と増加率は低下したが, 培養前に比しそれぞれ増加を示した。

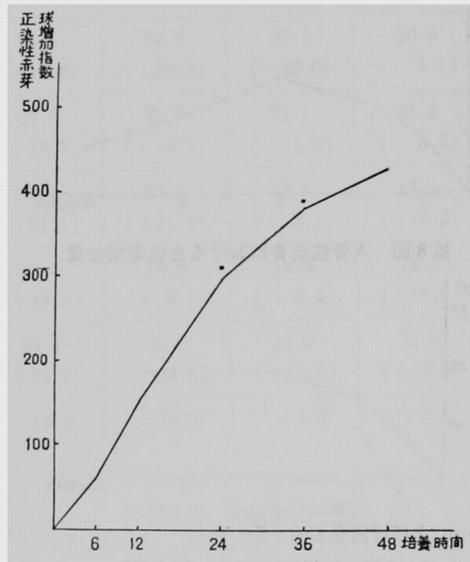
第6表 家兎骨髓培養における総赤芽球数 (/Cu. mm)

		培養時間				
		0	12	24	36	48
NO. 1		2123	2261	2205	2176	2101
NO. 2		1600	1678	1631	1571	1568
NO. 3		2720	2931	2871	2716	2791
NO. 4		1405	1508	1523	1427	1615
NO. 5		1968	2016	2191	1916	1937

第7表 家兎骨髓培養における正染性赤芽球増加指数

		培養時間				
		6	12	24	36	48
NO. 1		45	141	279	367	408
NO. 2		61	159	302	390	438
NO. 3		53	145	288	371	409
NO. 4		66	163	316	392	448
NO. 5		62	157	305	388	437
平均正染性赤芽球増加数		59	153	298	382	428

第6図 家兎骨髓培養における正染性赤芽球増加指数



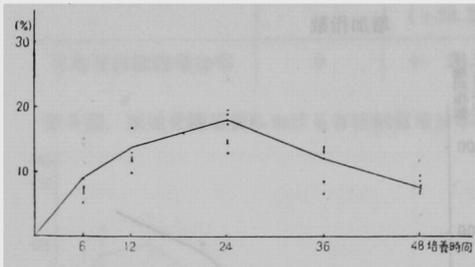
ii) 血色素増加量 (第9表, 第8図)

培養6時間後 84.7mg/dl, 12時間後 143.1mg/dlと急激な増加を示し, 更に24時間後には 188.6mg/dlと軽度増加したが, その後は変化なく, 36時間後及び48時間後にはそれぞれ 181.9mg/dl, 173

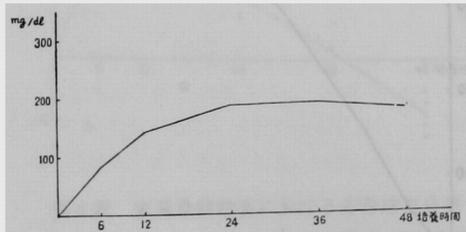
第8表 人骨髄培養における赤血球数 (10^9) 及び赤血球増加率 (%)

培養時間	0	6	12	24	36	48
NO. 1	25.5	27.2 (+ 6.9)	28.6 (+12.0)	32.6 (+19.7)	29.1 (+14.0)	28.2 (+ 8.1)
NO. 2	24.0	25.7 (+ 7.2)	31.4 (+13.0)	28.2 (+17.5)	27.3 (+13.9)	25.6 (+ 7.0)
NO. 3	27.7	31.8 (+15.0)	33.9 (+22.2)	34.4 (+24.4)	32.3 (+16.5)	30.4 (+ 9.7)
NO. 4	25.3	27.2 (+ 6.9)	28.6 (+12.0)	32.6 (+19.7)	29.1 (+14.0)	27.1 (+ 7.1)
NO. 5	30.7	32.8 (+ 7.2)	34.4 (+12.2)	34.6 (+13.0)	33.4 (+ 8.8)	33.1 (+ 7.6)
NO. 6	31.7	36.3 (+14.3)	37.0 (+16.7)	37.8 (+19.1)	36.0 (+13.6)	35.6 (+12.1)
NO. 7	34.5	36.4 (+ 5.3)	37.9 (+ 9.8)	39.6 (+14.7)	36.8 (+ 6.9)	35.8 (+ 3.6)
平均赤血球増加率	0	9.0	14.0	18.3	12.4	7.9

第7図 人骨髄培養における赤血球増加率



第8図 人骨髄培養における血色素増加量



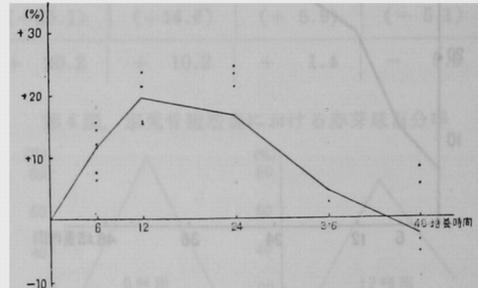
mg/dl とほぼ同様の値を示した。

iii) 有核細胞増加率 (第10表, 第9図)

培養6時間後+11.7%, 12時間後+19.8%と急激に増加したが, その後漸次低下し, 24時間後+16.6%, 36時間+4.3%であり, 培養48時間後には-2.7%と培養前に比し軽微ながら減少を示した。

iv) 正染性赤芽球百分率 (第11, 12表, 第10, 11図)

第9図 人骨髄培養における有核細胞増加率



第11表 人骨髄培養赤芽球百分率 (%) (平均値)

培養時間	赤芽球		
	塩基性	多染性	正染性
0	9	81	8
12	3	75	21
24	0	68	32
48	0	52	48

家兎骨髄培養の場合と同じく, 培養全経過にわたり正染性赤芽球百分率の増加を認め, 培養前8%であつたが, 12時間後21%, 24時間後32%, 36時間後39%であり, 培養48時間後には48%を示した。これと同時に好塩基性赤芽球は消失し, 多染性赤芽球百分率は漸次減少した。

v) 総赤芽球数 (第13表)

第 9 表 人骨髓培養における血色素量 (mg/dl)

培養時間	0	6	12	24	36	48
NO. 1	960	1035 (+ 75)	1085 (+ 125)	1140 (+ 280)	1149 (+ 189)	1153 (+ 193)
NO. 2	865	963 (+ 98)	1032 (+ 167)	1043 (+ 178)	1030 (+ 165)	1009 (+ 144)
NO. 3	718	795 (+ 77)	847 (+ 129)	888 (+ 170)	893 (+ 175)	901 (+ 183)
NO. 4	803	889 (+ 86)	962 (+ 159)	975 (+ 172)	999 (+ 196)	966 (+ 163)
NO. 5	740	838 (+ 98)	895 (+ 155)	923 (+ 183)	916 (+176)	902 (+ 162)
NO. 6	680	784 (+ 104)	849 (+ 169)	877 (+ 197)	893 (+ 213)	871 (+ 191)
NO. 7	950	1005 (+ 55)	1052 (+ 98)	1090 (+ 140)	1109 (+ 159)	1125 (+ 175)
平均血色素増加量	0	84.7	143.1	188.6	181.9	173.0

第 10 表 人骨髓培養における有核細胞数 (10²) 及び有核細胞増加率 (%)

培養時間	0	6	12	24	36	48
NO. 1	20.0	22.4 (+12.1)	23.2 (+15.8)	24.7 (+23.5)	22.4 (+12.0)	20.8 (+ 8.1)
NO. 2	22.3	24.0 (+ 7.5)	25.8 (+15.7)	23.6 (+ 5.7)	22.1 (- 1.0)	21.5 (- 3.6)
NO. 3	19.0	20.2 (+ 6.3)	23.1 (+21.5)	23.1 (+21.5)	19.5 (+ 2.5)	17.1 (-10.2)
NO. 4	13.8	15.8 (+14.5)	16.5 (+19.5)	15.0 (+ 8.7)	12.5 (- 9.4)	12.0 (-13.0)
NO. 5	20.5	23.7 (+18.2)	25.4 (+23.7)	25.6 (+24.8)	23.6 (+17.3)	21.6 (+ 5.3)
平均有核細胞増加率	0	+11.7	+19.8	+16.6	+4.3	-2.7

培養経過中総赤芽球数は略々一定乃至軽度増加の傾向を示した。

vi) 正染性赤芽球増加指数 (第14表, 第12図)

培養開始時の赤芽球1000ヶに対する各培養時間における正染性赤芽球増加指数は、培養全経過にわたり急激な増加を認め、培養6時間後32、12時間後85と増加し、24時間及び36時間後にはそれぞれ210、300であり、培養経過中最も急峻な増加を示し48時間後には360であつた。

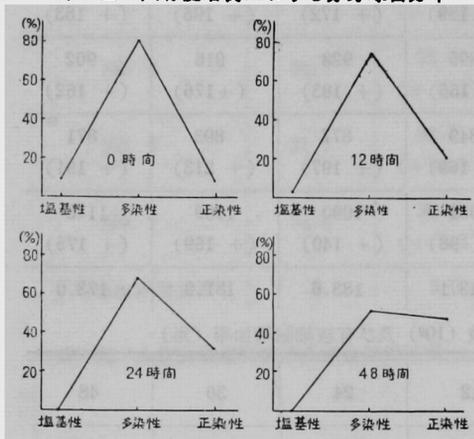
第 4 章 総括並びに考按

骨髓組織培養法は2つの主な型に分類される。即ち、1つは骨髓組織薄片を用いての血漿固型培養法であり、他の1つは骨髓細胞浮游液の静置、又は攪拌培養法である。血漿固型培養法は、1910年 Carrel & Burrow²¹⁾ が幼若猫の骨髓組織を培養したのに始まり、Ingebrigsten⁶⁰⁾ (1912) は海馬骨髓を、Erd-

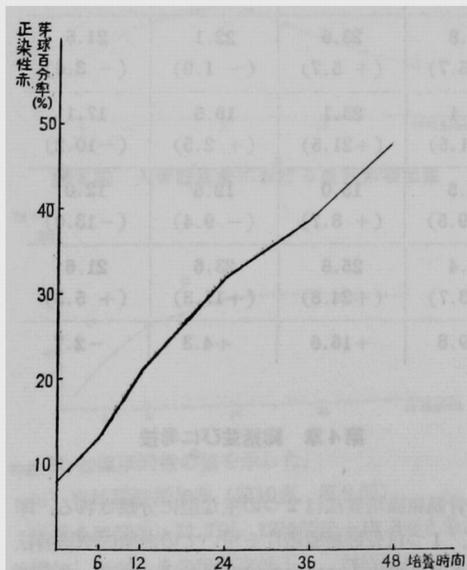
第12表 人骨髓培養における正染性赤芽球百分率

培養時間	培養時間					
	0	6	12	24	36	48
NO. 1	11	16	25	36	39	41
NO. 2	5	12	18	31	42	54
NO. 3	13	15	23	28	25	54
NO. 4	6	10	17	33	43	51
NO. 5	10	12	22	32	40	41
平均正染性赤芽球(%)	8	13	21	32	39	48

第10図 人骨髓培養における赤芽球百分率



第11図 人骨髓培養における正染性赤芽球百分率



mann³⁰⁾ (1917) は家鶏骨髓を夫々家鶏血漿中で静置培養し、新生細胞を観察し、又 Woodard & Pomerat¹⁰²⁾ (1953) は人肋骨骨髓を廻転培養法によ

第13表 人骨髓培養における総赤芽球数

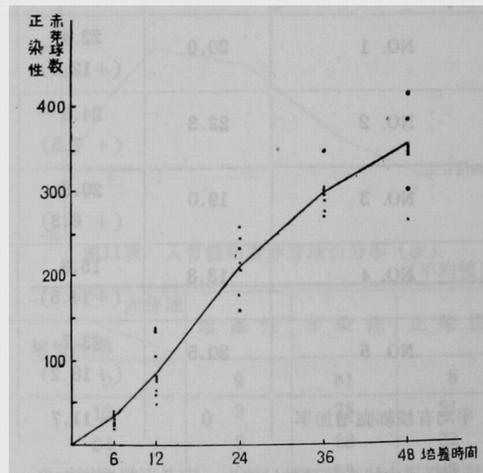
(/Cumm)

培養時間	培養時間					
	0	12	24	36	48	
NO. 1	375	379	381	396	408	
NO. 2	305	321	300	308	291	
NO. 3	250	263	279	271	296	
NO. 4	315	359	382	409	453	
NO. 5	340	361	359	347	358	

第14表 人骨髓培養における正染性赤芽球増加指数

培養時間	培養時間					
	6	12	24	36	48	
NO. 1	41	138	260	348	417	
NO. 2	36	105	208	290	388	
NO. 3	27	64	180	273	306	
NO. 4	30	59	161	279	351	
NO. 5	25	50	235	306	347	
NO. 6	33	82	246	304	357	
NO. 7	32	79	217	300	354	
平均正染性赤芽球増加指数	32	85	210	300	360	

第12図 人骨髓培養における正染性赤芽球増加指数



り培養し、血漿培地中に於ける骨髓血管の発達を観察している。更に近年教室においては教室考案の臨床組織培養法を行い白血病の診断及び治療に極めて有用であることを報告している⁵⁶⁾⁶⁸⁾⁸⁷⁾。細胞浮游培養法については、静置培養法では Osgood & Brownlee¹⁰⁶⁾ (1937), Lajtha⁷⁶⁾ (1952) 等はワクチン瓶又は McCarthy 瓶を使用し、深層培養液中で人骨髓細胞の培養を行い、その成熟を観察し、Astaldi &

Tolentino⁹⁾ (1941) はフラスコ中の浅層培養液中で正常又は病的条件における赤芽数の成熟を検討したが、一方攪拌培養では Clemmesen & Plum²⁶⁾ (1952) は培養液中に挿入したガラス管より持続的に空気を流入させ浮游液を攪拌する方法で白血病及び悪性貧血の骨髓赤血球系造血について研究している。

さて骨髓培養に於ては、骨髓細胞の正常な分化を乱さず、その変化を詳細に観察出来ることが要求されるが、骨髓細胞浮游培養については、既に Lajtha⁷⁶⁾ により本法が生体内と同様な骨髓細胞の成熟分化を示す方法であることが認められており、又この場合培養経過に従つて見られる赤芽球系細胞の好塩基性→多染性→正染色への色調の変化が単なる変性現象ではなく、細胞の成熟によるものであり、又正染色赤芽球数の増加が赤芽球の成熟を反映していることを認めている。更に Reisner & Swan¹³⁹⁾ はこの培養法により代謝拮抗物質の骨髓細胞成熟に及ぼす影響を観察することが可能であると述べている。

翻つて、血漿固型培養法においては、観察は骨髓細胞の形態学的変化に限られ、又赤芽球は増生帯に出現しない。又、浮游培養法にあつては経時的に有核細胞数を算定することが可能であるため、固型培養法では不可能である培養による骨髓細胞の成熟増生を数量的に測定出来るのである。斯くの如く骨髓細胞浮游培養法は赤芽球系細胞の成熟増生を観察するのに適した培養法であるため、各種化学物質、血清等の骨髓赤血球系造血に及ぼす影響に関する研究は Norris & Majnarich⁹⁷⁾, Swan, Reisner & Silverman¹³⁹⁾, Markson, & Rennie⁸³⁾, 伊藤⁶³⁾, 牧野⁸²⁾ 等多数にのぼるが、その報告の大部分は Osgood & Brownlee の浮游培養法の原理に基いている。

次に、細胞浮游培養法の内、静置培養法と攪拌培養法の優劣について考察を加えるに、攪拌培養法においては静置培養に於いて Osgood が指摘した重要な培養条件である細胞密度と培養液の深度の影響を減弱せしめ、又は無視することが可能であり、又攪拌培養では培養する細胞と培養液、更に添加された血清、化学物質等との間に静置培養法では得られない最も効果的に持続する接触性があり、培養液に溶解し得る薬剤の骨髓に及ぼす影響に関する研究に適している。更に Lajtha⁷⁶⁾ は静置培養法においては既に培養6時間後正染色赤芽球数の減少を認めているが、Berman¹¹⁾ は攪拌培養法、とくに Pyrex 管によ

る廻転培養法において、更に長時間にわたる赤芽球の成熟による正染色赤芽球数の持続的増加を認めている。

以上、諸種の骨髓培養につき方法論的考察を試み、骨髓細胞浮游攪拌培養法は血漿固型培地を支持体とする培養法、更には細胞浮游静置培養に比し赤血球系造血機能を観察する上に多大の利点を有するものであることを述べた。

尚、攪拌培養の内、本実験に用いた廻転培養法については、1913年 Currel²²⁾ が鶏胎児心臓組織の培養に際し、栄養及び酸素の供給を充分にし、且つ老廃物の除去を行うために本法を示唆し、Gey⁴²⁾ により現在の廻転培養法の原型が作られ、Coman⁸⁰⁾, Ott¹⁰⁷⁾ 等により幾多の改良が加えられ、線維芽細胞、癌細胞、ウイルス等の培養に広く用いられている。しかし骨髓については、骨髓組織片を血漿固型培地中で培養した Woodard & Pomerat¹⁵²⁾ 及び教室の菅野¹³⁵⁾ の報告があるが、骨髓細胞浮游培養では、Pyrex 管 (10×75 mm) による廻転培養法を行つた Berman¹¹⁾ の報告があるに過ぎない。しかもこの Berman の方法では 5~10 cc の多量の骨髓穿刺液を必要とし、又培養管中に少量の細胞浮游液 (0.25 cc) を含むにすぎないため、単に塗抹標本による観察のみ行つている。

そこで、私は抗白血病剤の骨髓赤血球系造血機能に及ぼす影響を研究するに当り、骨髓細胞浮游培養に廻転培養法を用い前述の Warburg 振盪装置による岩崎、久米田氏法の改良を図つた。即ち岩崎⁶¹⁾、久米田⁷⁴⁾ 等は、家兎の骨を骨錐子で割り骨髓を摘出し、ホモゲナイザーにて破砕し、Gey 氏液中に入れ均等な細胞浮游液とした後、3~5 箇の Warburg 用ボトルに 2 cc 宛分注し、各々のボトルより培養 8~9 時間後迄経時的に連続して培養液の少量づつを採取した後、赤血球数、有核細胞数、網状赤血球数、血色素量を測定した。しかし、この Warburg 氏恒温槽による振盪培養法においては細胞の変性破壊が培養早期より認められ、久米田も指摘している様に有核細胞数は屢々動揺し不安定であり、その塗抹染色標本は細胞学的分類に耐え得ない例が多かつたため、赤芽球系細胞の成熟段階の数量的変化を経時的に追求することが出来なかつた。

そこで私はこの点について検討し、より長時間にわたり骨髓赤血球系細胞の成熟過程を数量的に観察するために、以下に述べる様な培養方法に対する改良を加えて、新たに骨髓細胞浮游廻転培養法を考案

した。

i) まづ本実験においても家兎骨髓を破碎するにはホモゲナイザーを使用した。低速短時間に終る様に細胞の破壊溶血を防止した。

ii) 次いでホモゲナイザーによる破碎のみでは骨髓細胞塊、骨髓間質組織等の組織片が尚残存し、これは培養時の赤血球数、有核細胞数の算定及び塗抹染色標本による細胞分類に重大な関係を有するので、骨髓細胞浮游液を150メッシュにより濾過してこれ等を除去し、均等な細胞浮游液となした後三角コルベンに集め、よく攪拌しながらピペットで中間の層を吸い上げ各培養管に均等に分注した。

iii) 人骨髓培養においては、人胸骨骨髓穿刺に際し0.5cc以上の骨髓液を吸引すれば可成りの末梢血の混入は避けられないものと考えられるので、本実験では0.5cc以上は吸引しないこととし、骨髓穿刺液を直ちに150メッシュにて濾過し同様に培養管に分注した。

iv) 岩崎、久米田は培地として塩類溶液のみにより培養したが、本培養にあつては血清及び葡萄糖を含む塩類溶液を使用した。血清は家兎骨髓培養では同一家兎血清を、人骨髓培養では培養される人骨髓血球と異種血液型血清の使用は培養中凝集、溶血を来たすので、骨髓穿刺をした人と同一血液型血清を用いた。塩類溶液としては岩崎、久米田は葡萄糖を含まないタイロッド氏液を用いたが、Lewis⁷⁶⁾、福光³⁸⁾等は培養液中の適量の葡萄糖は鶏胎児の心臓、脾臓、結締織の培養に際し成長を促進することを認め、更に教室菅野¹³⁵⁾は家兎骨髓を血漿固型培地中で廻転培養法により短冊培養し、0.1%の葡萄糖を含むタイロッド氏液は之を含くまぬリングル氏液、生理的食塩水よりも秀れており、培養液中の葡萄糖の必要性を認めているので、本実験においては0.1%の葡萄糖を含有せるタイロッド氏液を使用した。尚、本培養法では出来るだけ生体内におけると同様な骨髓細胞分化の過程を観察することを目的としたため、鶏胎児搾液等、とくに細胞の分裂増殖を促進するものは使用しなかつた。

v) 又、岩崎、久米田氏法では培養経過中1培養瓶より連続して少量の観察材料を時計皿に採取しているが、細菌感染を惹起し易く、更に細胞数の算定に際し誤差を生じる可能性が大であるので、本法においては廻転培養のための円型培養管を用い、培養中の観察回数に応じて管数を決定し、各々の培養管

に細胞浮游液を均等に分注した。

vi) 培養法としては、久米田の述べた如く Warburg 氏恒温槽中での振盪培養法では培養後8~9時間で既に培養瓶底に多数の死滅した細胞塊を認め、そのため塗抹染色標本は細胞分類に耐え得なかつたので、細胞に対する破壊作用が少く空気の供給及び培養液の攪拌を充分に行い得る廻転培養法を用いた。

本法を用いて健康人及び家兎骨髓を培養した結果、培養開始後48時間目迄赤血球数、有核細胞数、血色素量の増加が認められ、又培養後96時間迄は培養された骨髓諸細胞を細胞学的に分類し得る塗抹染色標本が得られ、正染性赤芽球百分率及び正染性赤芽球増加指数も培養経過に従い漸次増加することを認めた。

以下実験成績の各項目について考察を試みた。

i) 赤血球増加率

Astaldi & Tolentino⁸⁾は培養中の前赤芽球及び好塩基性赤芽球の消失は、それ等が成熟により分化された型に変化したためであり、同様に多染性赤芽球は正染性赤芽球へと成熟、最後に正染性赤芽球の消失は脱核によるものであると推定している。又教室岩崎⁸⁴⁾、久米田⁷⁴⁾は培養経過に伴い赤血球数の増加を觀し、Clemmesen & Plum²⁶⁾は浮游培養において単位時間内の有核赤血球の成熟赤血球への移行率を測定し、Plum¹¹³⁾は培養5時間以内に20%の赤血球増加率を認め、更に Besis¹²⁾は赤血球数及び正染性赤芽球数の両者の増加を觀察している。私は廻転培養法により家兎及び人骨髓を培養した所、赤血球数は経過に従い漸次増加し、12、乃至24時間後それぞれ24.0%、18.3%の増加を示した。これは後述の如く急激に増加した正染性赤芽球が更に成熟脱核した結果によるものである。

ii) 血色素増加量

本実験では血色素量は培養初期に急激な増量を示した。さて、血色素と赤芽球の関係については、Lajtha⁷⁶⁾は Fe⁵⁹ 摂取が塩基性及び多染性赤芽球において最も著しいことを觀察し、小宮⁶⁸⁾は多染性赤芽球の染色性の相違は血色素量の濃度に応じてもたらされると述べ、中尾⁹¹⁾は血色素は多染性赤芽球の成熟段階において最も旺盛に合成されることを述べている。即ち血色素の合成は赤芽球の成熟に密接に関係しているが、私の実験に於て培養経過に従い血色素が増量したことは、他の実験成績と共に本

培養における赤芽球成熟の事実を更に確認するものである。

iii) 有核細胞増加率

培養初期には有核細胞数は増加するが培養12時間以後は漸次減少を示した。これは有核細胞の分裂増殖はあると思われるが、有核赤血球が成熟脱核して赤血球になること、及び成熟した顆粒細胞の破壊消失によると推定される。

iv) 正染性赤芽球百分率及び増加指数

骨髓細胞の成熟の指数として血漿固型培養に於ては有核細胞百分率が用いられたが、細胞浮游培養では有核細胞数の算定及び培養した骨髓細胞の塗抹染色標本による分類が可能であるため、骨髓細胞各成熟段階の絶対数を観察する事が出来る。Berman¹¹⁾は赤芽球系細胞の成熟指数として前述の正染性赤芽球増加指数を用い、Astaldi & Tolentino⁹⁾、Lajtha⁷⁶⁾等の考案した骨髓細胞浮游静置培養に於いては培養初期にのみ一時的増加指数の上昇を認めるに過ぎないが、前述の Pyrex 管による廻転培養に於ては増加指数の持続的増加を認めている。私の廻転培養法に於ても、培養全経過にわたり正染性赤芽球百分率の増加を認め、これに反し、多染性赤芽球百分率の漸次減少及び好塩基性赤芽球の消失を認め、正染性赤芽球増加指数に於ても、Berman の人骨髓培養では培養48時間後250であるが、私の場合では、人骨髓培養に於いて358、家兔骨髓培養に於て428に達する急峻な増加を認めた。

この正染性赤芽球百分率及び正染性赤芽球数の増

加は、培養開始時における赤芽球系細胞の成熟のみによるものではなく、好塩基性赤芽球の分裂増殖と正染性赤芽球の脱核にも影響されるものであろうが、とにかく培養中の総赤芽球数は略々一定であるので、培養初期の多染性赤芽球絶対数の圧倒的優勢から、好塩基性赤芽球は消失し、多染性赤芽球絶対数は漸次減少し、これと共に正染性赤芽球絶対数が急激な増加を来たしたものであることが明らかであり、培養による骨髓赤芽球系細胞の成熟を充分反映しているものと考えられる。

第5章 結論

骨髓赤血球系造血に対する各種抗白血病剤の影響を比較検討する目的で、人及び家兔骨髓の浮游廻転培養法を考案し、培養経過に伴う赤血球数、有核細胞数、血色素量、正染性赤芽球百分率、正染性赤芽球増加指数の変動を追求した。

その結果、本培養法は生体内とほぼ同様の骨髓赤芽球の成熟、分化を示す方法であることを認めた。従つて、本培養法により人及び家兔骨髓を培養し、化学物質、血清等の添加を行うならば、生体内骨髓赤血球系造血機能に及ぼす化学物質、血清等の直接的影響を観察出来るものであると考えられる。

擧筆するに当り、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角南講師に深甚な謝意を表す。

なお、本稿の要旨は第23回日本血液学会総会に於て発表した。

Influences of Anti-leukemic Agents on Hematopoietic
Functions of Bone Marrow

1. A Study on the Roller Culture Method of
Bone-Marrow Cell Suspension

By

Tatsuo SEZAKI

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Author's Abstract

For the purpose of a comparative study on the influences of various anti-leukemic agents on the erythropoietic function of bone marrow, a roller culture method was performed to culture the cell suspensions of human and rabbit bone marrow. In the course of the incubation, the author observed the changes in the erythrocyte counts, number of nucleated cells, hemoglobin content, percentage of orthochromic erythroblasts, and increment index of orthochromic erythroblasts.

As the results, it has been recognized that in this culture method bone marrow erythroblasts mature and differentiate in the same fashion as in *in vivo*. Therefore, it is assumed that, when human or rabbit bone marrow is cultured by this method in the media containing chemical substances or sera, it is possible to observe their direct influences on the erythropoietic functions of bone marrow.
