

## 超生体染色所見から見た血球の細胞膜透過性に関する研究

## 第 5 編

骨髄性白血病細胞に於ける色素透過性と、これに及ぼす 2, 3 の  
白血病治療薬の影響について

岡山大学医学部病理学教室 (主任: 妹尾左知丸教授)

大 口 基 光

〔昭和 31 年 9 月 13 日受稿〕

## 緒 言

第 3 編<sup>1)</sup>に於て著者は骨髄内顆粒球系幼若細胞についてその色素透過性を成熟顆粒球透過性と比較検討し、幼若な細胞は成熟細胞に比して塩基性色素に対する透過性が亢進し、酸性色素に対する透過性が低下していることを報告した。幼若細胞に見られるこのような性格は腫瘍細胞に於ても同様に現われるか或いは全く違った形を取るかということは興味ある問題である。著者は比較的成熟した前骨髄球及び骨髄球を多量に含む慢性骨髄性白血病 3 例及び未成熟の骨髄芽球を多量に含む急性骨髄性白血病 2 例について細胞膜の透過性を観察した。本編に於てはこれ等の成績を詳しく記述する一方、数種の白血病治療薬がこれ等の細胞の透過性に与える影響について観察した結果を報告する。

## 実 験 方 法

表 1 に示す様な血液像を持つ骨髄性白血病患者 5 例の肘静脈より血液 5cc 採血、これに 0.1% ヘパリン生理的食塩水溶液 0.25cc を加えて試料とした。対照には同様にして採血処理した正常人血液を用いた。これ等の血液は採集後直ちに第 1 編<sup>2)</sup>に示したと同様の方法によりその色素透過性を観察した。ここに用いられた色素は第 3 編<sup>1)</sup>骨髄細胞の観察に用いられた 4 種の塩基性色素及び 2 種の酸性色素である。

一方、白血病治療薬としてはアクサ、ナイトロミン、ナイトロゼンマスタード B、アザンを使用した。観察方法は次の如くである。(1) アクサ ACTH 10 I. U. (アーマー研究所製) を生理的食塩水 1cc に溶かし、 $\frac{1}{20}$  容の 0.1% ヘパリン生理的食塩水溶液を加えて凝固を防いだ白血病患者血液 (以後血液と略称) 2cc に加えた。(2) ナイトロミン: ナイトロミン (メチール-ピス [ $\beta$ -クロロエチル] オキサイド塩酸塩) 50mg (吉富製) を生理的食塩水 1cc に溶かし血液 2cc に加えた。(3) ナイトロゼンマスタード: ナイトロゼンマスタード B 5mg (日本薬化学製) を生理的食塩水 1cc に溶かし血液 2cc に混じた。(4) アザン アザン 1cc (16mg 含有) (田辺製) を血液 2cc に加えた。(5) 対照 生理的食塩水 1cc を対照血液 2cc に投じた。これ等の薬物添加血液は 37°C 孵卵器に保ち 3~6 時間後に型の如く B. C. B. 及びエオヂンを用いて白血病細胞の透過性が観察された。尚本実験に用いられた白血病血液は症例 IV に示したものである。

## 実 験 結 果

B. C. B. による 5 人の患者の病的顆粒球 (骨髄芽球, 前骨髄球及び骨髄球を含む) 透過性の観察結果は図 1 の如くである。即ち 3 例の慢性骨髄性白血病患者の白血球の透過性 (曲線 I, II, III) は pH 4.7~6.0 の pH 域に於て人の正常顆粒球 (曲線 VI) に比し著明な透

表 1 骨髓性白血病患者血液像

番 号	I	II	III	IV	V
日 附	1955.8.4	1955.9.18	1955.7.23	1956.3.27	1955.6.15
患 者 名	磯○敏○	東○久○	東○久○	小○八○	宮○朝○
年 令, 性 別	33才 ♀	43才 ♀	43才 ♀	55才 ♀	18才 ♂
赤 血 球 数	334万	292万	317万	402万	113万
白 血 球 数	119.200	54.200	13.300	160.000	207.000
血 色 素 係 数	67%	77%	69%	70%	23%
色 素 係 数	1.0	/	1.08	0.87	1.02
網 赤 血 球 数	/	2‰	21‰	2‰	/
血 小 板 数	467.600	613.200	840.610	38.000	/

白血球の分類

骨 髓 芽 球	1.0%	/	/	68.0%	61.2%
前 骨 髓 球	11.0	0.5%	/	6.0	20.8
骨 髓 球	8.5	4.5	5.5%	3.0	15.2
後 骨 髓 球	11.5	6.0	3.5	3.0	/
桿 状 核 好 中 球	16.5	27.5	15.0	2.0	0.4
多 核 好 中 球 (2核)	16.0	27.5	34.5	3.0	0.4
〃 (3核)	} 27.0	13.0	18.5	5.0	} 1.8
〃 (4核)		4.0	11.0	/	
〃 (5核)		1.5	/	/	
大 淋 巴 球	1.5	3.5	1.5	2.0	/
小 淋 巴 球	2.5	6.0	7.5	2.0	1.2
好 酸 球	3.5	2.5	1.0	/	0.4
好 塩 基 球	1.5	/	/	/	/
単 球	/	3.5	2.0	2.0	/
オキシダーゼ反応 (ナチ)	98%	/	/	/	/

過性の亢進が認められ、就中 pH 5.5 に於て最も著明な亢進が認められる。而るに幼若な骨髓芽球を多量に含む急性例(曲線IV及びV)では正常顆粒球との間に殆んど差異を認めない。次にニール青による超生染所見は図2に示す如く I, II, III 例では pH 5.5 に於て対照に比して透過性の亢進を認める。しかしその程度は B. C. B. の場合に較べると極めて小さい。症例IV, Vに於ては差異を認めない。中性赤による超生染所見は図3に示す如く pH 4.7~5.5 に於て症例 I, II, III のものは透過性の亢進を示したが症例IV及びVに於ては対照との間に殆んど差異を認めなかつた。又ヤームス緑の場合は図4に示す如く症例 I, II, III 及びVに於て pH 4.7~5.5 の間で透過性の亢進が認められたが症例IVではこの場合も対照と殆んど差異を認めなかつた。

次に酸性色素に於てはエオチンの透過性が I, II, III 例の血液に於て著明な抑制が認められ(3.3~4.7の pH 域), 急性白血病である IV, V の症例では対照との間に殆んど差異がなかつた。エリトロチンによる透過性の観察では I, II, III 及びIV例に於ては pH 3.3~4.7 の間で染色が抑制された。しかし V 例に於ては対照との間に差異がない。

即ち慢性白血病細胞(前骨髓球及び骨髓球を多量に含むもの)に於てはその色素透過性は正常骨髓球の場合と略々同様な結果を示し、塩基性色素の透過性が亢進し酸性色素のそれが低下するがこの関係は未熟な骨髓芽球を主とする急性骨髓性白血病の2例では殆んど見られず、それ等の透過性はむしろ正常の成熟顆粒球のそれに近いものであつた。

次に薬物添加後に於ける第IV例の細胞の

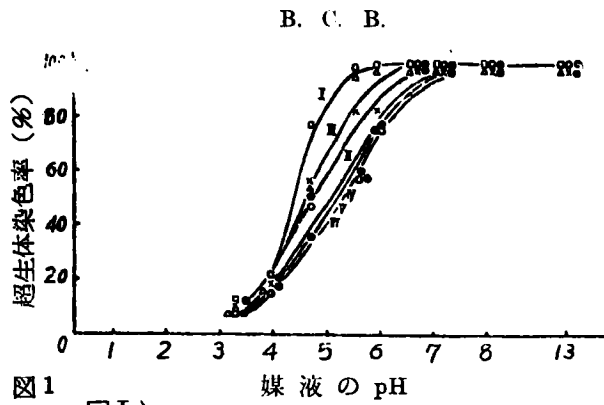


図 1

- I
  - × II
  - △ III
  - ⊙ IV
  - V
  - VI
- 末梢血骨髓芽球, 前骨髓球, 骨髓球 (骨髓性白血病患者)
- 末梢血顆粒球 (正常人)

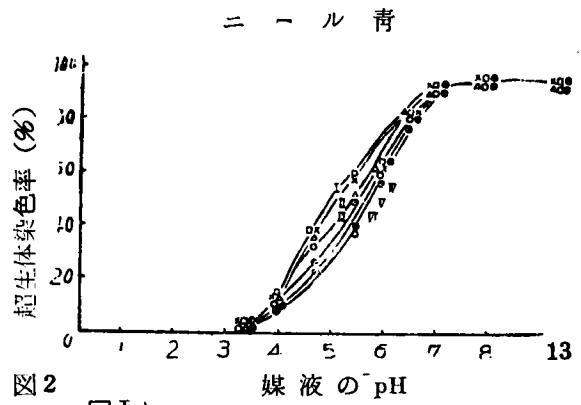


図 2

- I
  - × II
  - △ III
  - ⊙ IV
  - V
  - VI
- 末梢血骨髓芽球, 前骨髓球, 骨髓球 (骨髓性白血病患者)
- 末梢血顆粒球 (正常人)

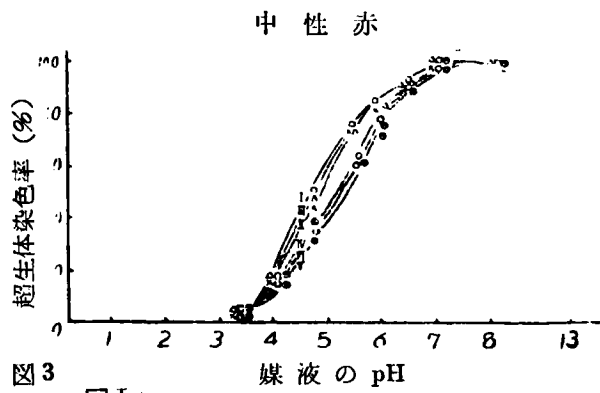


図 3

- I
  - × II
  - △ III
  - ⊙ IV
  - V
  - VI
- 末梢血骨髓芽球, 前骨髓球, 骨髓球 (骨髓性白血病患者)
- 末梢血顆粒球 (正常人)

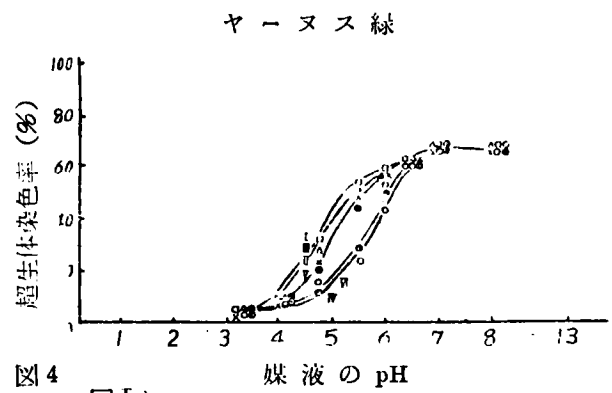


図 4

- I
  - × II
  - △ III
  - ⊙ IV
  - V
  - VI
- 末梢血骨髓芽球, 前骨髓球, 骨髓球 (骨髓性白血病患者)
- 末梢血顆粒球 (正常人)

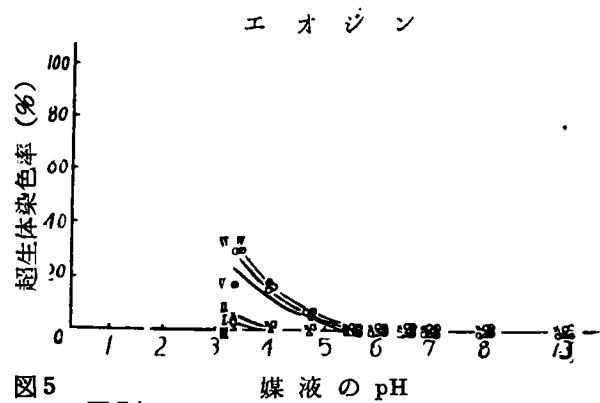


図 5

- I
  - × II
  - △ III
  - ⊙ IV
  - V
  - VI
- 末梢血骨髓芽球, 前骨髓球, 骨髓球 (骨髓性白血病患者)
- 末梢血顆粒球 (正常人)

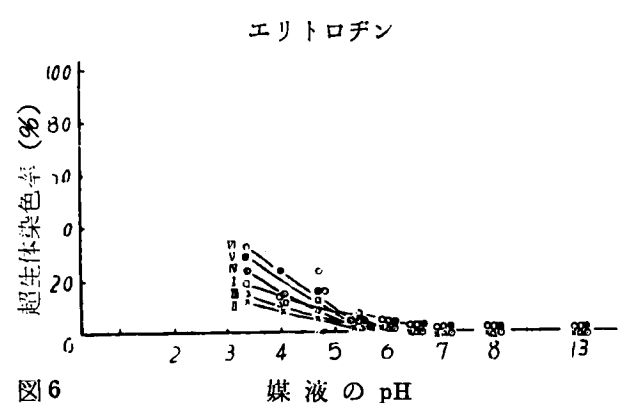


図 6

- I
  - × II
  - △ III
  - ⊙ IV
  - V
  - VI
- 末梢血骨髓芽球, 前骨髓球, 骨髓球 (骨髓性白血病患者)
- 末梢血顆粒球 (正常人)

B. C. B. に対する透過性の変化についての観察結果を述べると次の様である。

即ち塩基性色素 (B.C.B.) の場合, ACTH の添加に於ては pH 4.0~5.5 に於て透過性の亢進が見られる。ナイトロゼンマスタード B を添加した場合は透過性には正常と全く異なる所がない。しかしナイトロミンに於ては pH 6.5~7.0 に於て僅か乍ら透過性の抑制が見られた。最も著明な効果を示したものはアザンであつて観察されたすべての pH 域 (3.3~13.0) に於て著しい透過性の抑制が見られた (図 7)。一方酸性色素 (エオジン) に於ては ACTH の添加は pH 4.0 に於て僅かな透過性の亢進を見せた。ナイトロゼンマスタード B は B.C.B. の場合と異なり pH 3.3~4.7 の領域でかなりの抑制効果を示した。アザン及びナイトロミンはエオジンに対して最も著明な抑制効果を示し pH 3.3 附近で僅かに色素の細胞内浸入を許すのみで、他の観察されたすべての pH 域に於て色素の細胞内浸入は完全に阻止された (図 8)。

#### 考 按

白血病細胞の個々の性格を知り、更にそれに対する治療薬の作用機転を明かにすることは白血病の研究乃至治療の方面に一つの手掛りを与えるかも知れないという点に於て重要である。著者は先に顆粒球系細胞が骨髓内で成長し成熟して流血中に出され、更に一定の組織障害部位に移動して老化変性して行く各過程に於ける膜透過性の変化を観察し、細胞が成熟して行くに従つて塩基性色素に対する透過性が減弱し、酸性色素の透過性が亢進して行く事実を明かにし得た。本編に取扱つた白血病細胞については各例によりその細胞学的形態は必ずしも同一ではないが比較的細胞が成熟して、明かな前骨髓球乃至骨髓球に迄分化した細胞を多量に含む慢性骨髓性白血病 3 例に於ては正常骨髓内幼若顆粒球の場合と類似の成績を示し、成熟顆粒球に比して塩基性色素の透過性亢進及び酸性色素の透過性減弱が認められた。これ等の透過性曲線を仔細

に検討するに、塩基性色素の透過性亢進の程度はこの 3 例の内第 1 例が最も強く、第 3 例これに次ぎ第 2 例に於て最も弱い傾向を示しているが、表 1 に示した如く第 1 例は骨髓球に至る迄の幼若細胞を 3 例中最も多く含み第 3 例はこれに次ぐ、第 2 例は最も少い。桿状核以下の成熟関係はこれと全く逆の関係を示している。この様な結果が細胞の成熟抑制機転と一定の関係を有するものであれば、幼若な細胞を含むもの程塩基性色素の透過性が強いことになる (酸性色素の透過性については著しく弱く 3 者の間に確然たる区別をなしたい)。しかし非常に幼若な細胞を多量に含む第 4 例及び第 5 例に於てはその透過性は殆んど正常の成熟顆粒球との間に差異を見出し得ないことは注目に値する。これ等 2 例の細胞は骨髓球乃至成熟顆粒球への移行乃至成熟傾向は全く見られないものであり、この点に於て前 3 者とは細胞学的にも別に取扱われねばならない種類のものである。勝沼<sup>3)</sup> はマイクロマニプラトールによる色素注入法により白血球の rH 及び pH を測定し、白血病細胞の胞体の pH は 6.3~6.6 で成熟好中球のそれ (pH 6.4~6.8) に比してやや酸性であると云つている。この事実は塩基性色素の透過性亢進及び酸性色素の透過性抑制という現象と一定の関係にあるかも知れない。白血病患者に於ては一般に基礎代謝が亢進しているという観察結果が多く (Pettenkofer-Grafe その他<sup>4)3)</sup>、この事実は白血病細胞の酸素消費量の亢進 (Grafe<sup>4)</sup>, Daland & Isaacs<sup>5)</sup>, Gundersen<sup>6)</sup>、解糖力の亢進 (Bürger<sup>6)</sup>, Falcon-Lesses<sup>17)</sup>, Schmitz & Glover<sup>18)</sup>) と関係して白血病細胞の等電位点の低下の原因になつていとも考えられる。

次に白血病細胞の色素透過性に及ぼす薬物の作用を見るに、B. C. B. の透過性に対しては ACTH が透過を亢進させる様に働き、ナイトロゼンマスタード B は全く作用なく、ナイトロミンは軽度に透過性を抑制し、アザンは著しくその透過性を抑制する。又酸性色素であるエオジンに対しては ACTH のみ僅か

B. C. B の白血病細胞への透過性に  
及ぼす薬物の影響

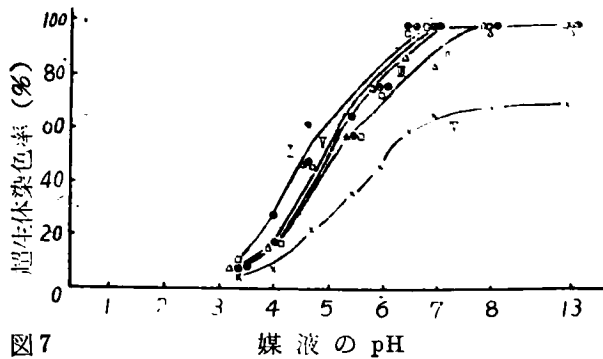


図7

- I : アクサ生理的食塩水溶液 1 cc (10 I. U. 含有) 添加 6 時間後
- △ II : ナイトロミン生理的食塩水溶液 1 cc (50mg 含有) 添加 4 時間半後
- III : ナイトロゼンマスタード B 生理的食塩水溶液 1 cc (5 mg 含有) 添加 4 時間後
- × IV : アザン 1 cc (16mg 含有) 添加 2 時間半後
- V : 対照

に透過性を亢進させ、ナイトロゼンマスタードは中等度に、アザン及びナイトロミンは著しく透過性を抑制する如き結果を与えた。これ等の内で脳下垂体ホルモンである ACTH は一般に腫瘍細胞の増殖を促進させる様に働くことが認められており (Robertson<sup>19</sup>, Smith<sup>20</sup>, 木村<sup>21</sup>, その他<sup>22-32</sup>)、恐らく細胞膜に対するこのような作用が腫瘍細胞の代謝乃至分裂の促進の一つの原因をなすものであろう。ナイトロゼンマスタード B は酸性色素の透過性を抑制する様に働いているが、塩基性色素の透過性には全く無関係であり、この物質が主として核に働いてその分裂を阻止する分裂毒である (田坂<sup>33</sup>, Auerbach, Herriott<sup>34</sup>, Elmore<sup>35</sup>) 以外に細胞質の透過性に直接関係して細胞の増殖を抑制する様な効果は全くないものと考えてよいであろう。ナイトロミンは僅かに塩基性色素の透過性を抑制し酸性色素の透過性を極めて強く抑制しているが、この結果はナイトロミンは恐らくナイトロゼンマスタードと同様な核毒であろうが一方に於て細胞膜の透過性にも、軽度の影響を与えるような性質のものと考えねばならぬ。アザンは著者が使

エオチンの白血病細胞への透過性  
に及ぼす薬物の影響

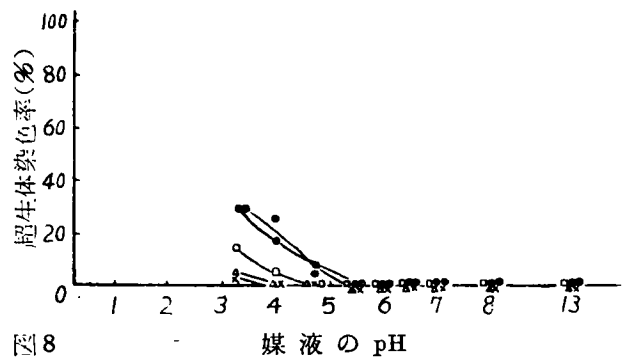


図8

- I : アクサ生理的食塩水溶液 1 cc (10 I. U. 含有) 添加 5 時間半後
- △ II : ナイトロミン生理的食塩水溶液 1 cc (50mg 含有) 添加 5 時間後
- III : ナイトロゼンマスタード B 生理的食塩水溶液 1 cc (5 mg 含有) 添加 3 時間半後
- × IV : アザン 1 cc (16mg 含有) 添加 3 時間後
- V : 対照

用した 4 種の薬物の内で最も著明な抑制効果を酸性及び塩基性色素の両者に対して示したが、この事はアザンがプリン拮抗物質の作用を持つ外に細胞の代謝毒である点に於て首肯出来る。これ等の事実は白血病の治療に当り種々の異つた面から細胞を攻撃する種々な薬物が併用されることにより、優秀な治療結果が得られるという日比野その他<sup>36-38,13</sup>の臨床経験に対する理論的裏付の一つの基礎を与えるものと信ずる。

## 結 論

- 1) 人の白血病細胞について種々の媒質の pH 域に於て数種の塩基性及び酸性色素に対する透過性が観察された。これ等の成績を基礎にして数種の白血病治療薬の白血病細胞への色素透過性に対する影響が観察された。
- 2) 比較的成熟した骨髓球を多量に含む慢性骨髓性白血病例に於ては、これ等の細胞が正常骨髓内顆粒球系幼若細胞と略々同様の傾向を示し、成熟顆粒球に比して塩基性色素に対する透過性が亢進し、酸性色素の透過性が抑制される。未分化の骨髓芽球を多量に含む

急性白血病2例については白血病細胞の色素透過性は成熟細胞のそれと殆んど差違を認めなかつた。

3) 1例の未分化細胞を多量に含む骨髄性白血病患者よりの血球について行われた薬物の作用は次の様である。即ちACTHはB. C. B. 及びエオジンの透過性を軽度に亢進させた。ナイトロゼンマスタードBはB. C. B. に対しては影響なく、エオジンの透過性に中等度の抑制効果を示した。ナイトロミンはB. C. B.

の透過性を僅かに抑制し、エオジンの透過性を著しく抑制した。アザンはB. C. B. 及びエオジン両者に対して著しい透過性抑制作用を示した。

本研究要旨は昭和30年岡山医学会総会及び昭和31年日本血液学会総会で発表した。

稿を終えるに臨み終始御懇切なる御指導と御校閲を頂いた妹尾左知丸教授に深謝する。

尚本研究は文部省科学研究費の補助を受けた。謹しんで謝意を表する。

#### 文 献

- 1) 著者：本誌，第3編。
- 2) 著者：本誌，第1編。
- 3) 勝沼精一：日内会誌，23，1，昭10。
- 4) Pettenkofer, M. & Voit, C.: Z. Biol., 5, 319, 1869.
- 5) Grafe, E. Dtsch. Arch. klin. Med., 102, 406, 1911.
- 6) Gunderson, A. H.: Boston Med. & Sci. J., 185, 785, 1921.
- 7) Holbøll, S. A. Acta Med. Skand., 72, 326, 1929.
- 8) Kranz, C. I. & Riddle, M. C.: Amer. J. Med. Sci., 175, 229, 1928.
- 9) Musser, J. H. & Edsall, D. L.: Univ. Penn. M. Bull., 18, 174, 1905~06.
- 10) Riddle, M. C. & Strugis, C. C.: Arch. Int. Med., 39, 255, 1927.
- 11) Starlinger, W. & Winauds, E.: Z. Exp. Med., 60, 138, 1928.
- 12) 小川敏，石原一郎：日血会誌（白血病論文集），14補，121，昭26。
- 13) 日比野進，木村喜代次：同上，14補，261，昭26。
- 14) Grafe, E. Dtsch. Arch. klin. Med., 102, 406, 1911.
- 15) Daland, G. A. & Isaacs, R.: J. Exp. Med., 46, 53, 1927.
- 16) Bürger, M.: Z. Ges. Exp. Med., 31, 1, 1923.
- 17) Falcon-Lesses, M.: Arch. Int. Med., 39, 412, 1927.
- 18) Schmitz, H. L. & Glover, E. C. J. Biol. Chem., 74, 761, 1927.
- 19) Robertson, C. H. et al.: Cancer Research, 13, 776, 1953.
- 20) Smith, M. C. et al.: Ibid, 12, 59, 1952.
- 21) 木村忠夫：未発表。
- 22) 林哲雄：腫瘍と内分泌，熊本医大病理，上巻，257, 1930.
- 23) Engel, D.: Z. Krebsforsch., 19, 339, 1922.
- 24) Karlefors Ebenda, 17, 195, 1920.
- 25) Enger Ebenda, 31, 281, 1934.
- 26) Ball et al.: Am. J. Cancer, 16, 351, 1932, 32, 50, 1938.
- 27) Reiß et al.: Klin. Wschr., 12, 1049, 1933.
- 28) McEuen & Thomson Brit. J. Exp. Path., 14, 384, 1933.
- 29) 河村正之：腫瘍と内分泌，熊本医大病理，上巻，456, 1930.
- 30) Griffin, A. C. et al. Cancer Research, 13, 77, 1953.
- 31) Talalay, P. et al.: Ibid., 12, 838, 1952.
- 32) Frederic, J. et al.: Ibid., 15, 1, 1955.
- 33) 田坂定孝：日血会誌，14補，261，昭26。
- 34) Herriott, R. M.: J. Gen. Physiol., 32, 221, 1948.
- 35) Elmore, O. T. et al.: Biochem. J., 42, 308, 1948.
- 36) 日比野進：日血会誌，18，5，442，昭30。
- 37) 日比野進，太田和雄：綜合医学，11，13，941，1954。
- 38) 岩田豊，太田和雄他：日血会誌，18，4，272，1955。

Department of Pathology, Okayama University Medical School,  
(Director · Prof. S. Seno)

Permeability Studies on Blood Cells by Supravital Stain

V. Permeability Studies on Leukemic Cells with Special Reference  
to the Influence of Antileukemic Drugs

By

Motomitsu Oguchi

By the same method as described in the 1st report permeability of human leukemic cells to dyes was studied using the same dyes as in report III comparing to that of matured granulocytes of normal human blood. The myelogenous leukemic cells showed an increased permeability for basic dyes and a depressed permeability for acidic dyes, giving similar data as in the cases of normal bone marrow cells of rabbits (s. IV Report). ACTH acted as to increase the permeability of both basic and acidic dyes. Nitromin and Azan showed a depressing effect on both series of dyes, especially Azan showed a marked inhibitory effects for the invasion of dyes. Nitrogen mustard B acted as to depress slightly the permeability of acidic dyes, too, but it showed not any effect on the permeability of basic dyes. From these data it was concluded that leukemic cells have similar characteristics for the passive permeability as those of normal young cells in bone marrow. The antileukemic mechanisms of several drugs were discussed from the view point of permeability.

---