

Bleomycin の造血器に及ぼす影響に関する研究

第 2 編

Bleomycin の正常海猿骨髄栓球系造血に対する影響について

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木潔教授）

国 政 郁 哉

〔昭和48年3月8日受稿〕

第1章 緒 言

Bleomycin (BLM) の作用機序については Mitomycin C (MMC), 5-Fluouracil (5-FU) と同様に細胞の DNA 合成阻害にある⁵⁾とされているが, MMC, 5-FU では当然の結果と考えられる造血障害という副作用が BLM ではみられない^{7), 36)}ことは特筆すべきことである。従って骨髄造血に対する BLM の影響について検討することは, BLM の作用機序そのものを解明するための一助になり得ると考え, 前編では BLM の骨髄白血球系造血に対する影響について述べたが, 本編においては栓球系造血に及ぼす影響について検討を試みた。臨床的に黒川⁴¹⁾らは MMC では白血球減少に比し栓球減少が強いことに注目し, 特に長期投与で群ではいずれも相当高度の栓球減少を認めており, 5-FU では軽度の栓球減少を認めている³⁷⁾ので, これらを, BLM の対照として比較検討を行なった。一方, 教室においては, 従来教室考案の臨床骨髄組織培養法を用いて多数の系統的研究が行なわれ,^{13), 14), 15), 16)}本法が骨髄の造血能をよく反映するものであることは一般に認められているところである。教室角南, 栗井⁴²⁾は本培養法により巨核球に明瞭な偽足運動並びに突起形成を認めその尖端より栓球が分離されるのを確認し, 本法が骨髄巨核球機能の判定に最も有力な手段であることを述べている。そこで私はこの臨床骨髄組織培養法を用いて海猿骨髄を培養し, これに各々 BLM, MMC 5-FU を添加実験し, その骨髄巨核球機能に及ぼす影響を比較検討したので報告する。

第2章 実験方法

第1節 実験材料

実験動物は体重300乃至400gの健康雄性海猿を

使用した。第1編においては家兎を使用した。家兎骨髄では組織培養増生帯への巨核球の出現が極めて少なく, 各制癌剤の巨核球への影響を観察するには不適當であるため, 海猿骨髄を使用した。海猿は実験の都度撲殺し右大腿骨を骨鉗子を用いて割り, 無菌的に取り出した骨髄を予め滅菌シャーレに Ringer 氏液をみたした中に入れて用いた。添加した MMC, 5-FU, BLM は, 市販の粉末又は注射液を Ringer 氏液を溶媒として稀釈して用い, その濃度は, 白血球系造血に対する影響について検討した第一編と同じく, 各々の臨床上の常用量が投与された場合の最高血中濃度^{65), 66), 67)}の近似値及びこれより10倍, 100倍, 1000倍の高濃度について実験を行った。即ち MMC は 2mg/cc, 0.2mg/cc, 0.02mg/cc, 0.002mg/cc, 5-FU では 5mg/cc, 0.5mg/cc, 0.05mg/cc, 0.005mg/cc, BLM では 5mg/cc, 0.005mg/cc, 0.0005mg/cc の培地濃度とし, これらの対照には同量の Ringer 氏液を用いた。

第2節 実験方法

培養方法は教室考案の臨床組織培養法¹⁶⁾によった。即ち教室考案の平木式臨床組織培養盤 No. 2 を使用し, その中央にツベルクリン用注射器 (1ml 1/2針) を用いて海猿血清2滴を滴下し直径1.5cmの円形に拡げる。その中央に無菌的に採取した骨髄組織片 (1mm³) を置き, 次に VB₁₂ 溶液 (1ml 中に100γを含む) 及び各制癌剤を各々2滴加え, 複覆硝子で覆い周囲をパラフィンで封入し, 37℃の孵卵器中に静置した。

第3節 観察方法

観察は総て培養約18, 24時間目に37℃の保温箱内に顕微鏡を入れて行った。各濃度につき5枚の標本を作成し, 各増生帯中に出現する巨核球総数を算定し, その平均値を求めて出現巨核球数とし, 更に骨髄巨核球機能は図1の如く

図 1



- A. 変形運動型：胞体の軽度変形を認めるもの
- B. 偽足運動型：胞体に偽足運動を認めるもの
- C. 突起形成型：触手状突起形成を認め核球分離を示すもの

運動形態によりA, B, C型の3型⁴⁾に分類し、各型についても増生帯の出現巨核球数に対する百分率を求め、又その和をもって全運動型巨核球百分率とした。

第3章 実験成績

1) 海猿骨髄巨核球機能に及ぼすMMC添加の影響 (表1, 図2)

表1 海猿骨髄巨核球機能に及ぼす Mitomycin C 添加の影響

添加濃度 mg/cc	対照	0.2	0.02	0.002	
18 時間	出現巨核球数	11.7	6.0	7.0	11.2
	全運動型巨核球百分率	57.9	27.0	30.0	63.5
	変形運動型	43.4	27.0	28.0	51.0
	偽足運動型	12.8	0	2.9	10.5
	突起形成型	1.7	0	0	2.0
24 時間	出現巨核球数	13.6	6.0	7.3	14.5
	全運動型巨核球百分率	50.2	24.2	32.2	51.4
	変形運動型	34.2	24.2	30.1	36.7
	偽足運動型	14.0	0	2.1	12.1
	突起形成型	2.0	0	0	2.6

出現巨核球数は対照に比し 0.2mg/cc, 0.02mg/cc 添加において減少を認めたが, 0.002mg/cc 添加では対照とほぼ同様であった。全運動型巨核球百分率についても 0.2mg/cc, 0.02mg/cc 添加では対照に比し軽度の低下を認めたが, 0.002mg/cc 添加では影響を認めなかった。運動型巨核球百分率でも 0.2mg/cc 添加では, A型は低下し, B型及びC型の出現はなく, 0.02mg/cc 添加にても B型は著明に低下し, C型は認められなかった。0.002mg/cc 添加ではC型の出現を

図 2 海猿骨髄巨核球機能に及ぼす Mitomycin C 添加の影響

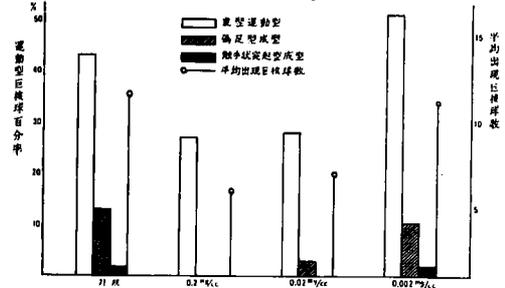
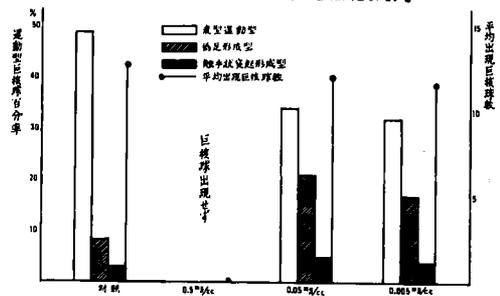


表 2 海猿骨髄巨核球機能に及ぼす 5-Fu 添加の影響

添加濃度 mg/cc	対照	0.5	0.05	0.005	
18 時間	出現巨核球数	12.7	0	12.0	11.6
	全運動型巨核球百分率	60.6	0	59.2	53.3
	変形運動型	48.7	0	33.8	32.0
	偽足運動型	8.4	0	20.8	17.2
	突起形成型	3.0	0	4.6	4.1
24 時間	出現巨核球数	14.1	0	16.0	14.1
	全運動型巨核球百分率	57.1	0	63.8	56.1
	変形運動型	35.1	0	36.8	33.1
	偽足運動型	17.5	0	22.5	18.4
	突起形成型	4.5	0	4.5	4.6

図 3 海猿骨髄巨核球機能に及ぼす 5-Fu 添加の影響



認め対照と同様であった。

2) 海猿骨髄巨核球機能に及ぼす 5-FU 添加の影響 (表2, 図3)

5-FU 0.5mg/cc 添加では全く巨核球は出現せず対照とは明らかな差を示したが, 0.05mg/cc 添加では出現巨核球数及び全運動型巨核球百分率, 運動型巨核球数のA, B, C型出現率ともに対照と有意の差を認めず, 0.005mg/cc 添加でも同様に対照と有意の差を認めなかった。

3) 海猿骨髄巨核球機能に及ぼす BLM 添加の影響 (表3, 図4)

図4 海猿骨髄巨核球機能に及ぼすBleomycin添加の影響

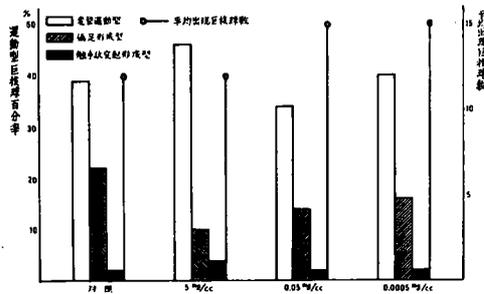


表3 海猿骨髄巨核球機能に及ぼすBleomycin 添加の影響

添加濃度 mg/cc		対照	5	0.05	0.0005
18 時 間	出現巨核球数	12.0	12.2	15.0	15.0
	全運動型巨核球百分率	63.6	60.2	51.1	58.4
	変形運動型	39.1	46.1	34.6	40.0
	偽足運動型	22.2	10.2	13.8	15.9
	突起形成型	2.3	3.9	2.7	2.5
24 時 間	出現巨核球数	15.0	13.9	15.2	15.3
	全運動型巨核球百分率	63.1	66.6	49.2	52.9
	変形運動型	42.8	50.0	32.8	34.3
	偽足運動型	16.4	11.1	13.4	16.6
	突起形成型	3.9	5.5	3.0	2.0

BLMでは 0.0005mg/cc, 0.05mg/cc, 更に 5 mg/cc 添加でも出現巨核球数, 全運動型巨核球百分率, A, B, C, 型の出現百分率ともに, 全く対照と有意の差を認めなかった。

第4章 総括並びに考按

MMCの造血障害は本剤による悪性腫瘍の治療上の副作用として重要な問題であり, 白血球減少と共に栓球減少による出血性素質の出現が注目されている。黒川⁴¹⁾等は白血球減少に比し栓球減少が強いことに注目し, 特に長期投与群ではいずれも相当高度の栓球減少を認めている。私の実験成績によると in Vitro に於てMMCは0.2mg/cc, 更に0.02mg/ccの添加で海猿骨髄の栓球系造血を明らかに抑制したが, このことは, MMCの癌細胞への作用機転²¹⁾と同様の機転によるものかも知れない。

5-FUでは臨床的にその副作用としての栓球減少は軽度であるとされている³⁷⁾が, 私の実験でも 0.5 mg/cc添加では骨髄増生帯への巨核球の出現は全くみられず, 明らかに骨髄栓球系造血に対する抑制を認

めたけれども, 0.05mg/ccではすでに対照と有意の差を認めず, MMCに比しその抑制が軽度であると考えられ, このことは上記の臨床的事実と一致する。しかし, 5-FUによる末梢血栓球減少はMMCと同様に, その制癌剤としての作用機序^{69), 70)}と関連して惹起されるのではないかと推察される。

次にBLMでは in Vitro に於て 5 mg/ccという高濃度の添加によっても骨髄栓球系造血はまず障害されないものと考えられる。この濃度はBLMの臨床的な常用量15mgが静注された場合の最高血中濃度 3.2mcg/cc⁷¹⁾と比較して極端な高濃度である。これらのことは第1編の白血球系造血に対する成績と合せて考えると, MMC, 5-FUでは骨髄造血を明らかに障害するのに対し, BLMではまず骨髄造血を障害しない結果が示されたものと考えられる。この理由について第1編の成績とも考え合わせて総合的に検討を加えることにする。

BLMの制癌への作用機序については, 田中, 鈴木, 永井, 梅沢⁴⁴⁾等によって一応解明されている。即ちこれによると先ずDNAにSH化合物が反応し, これにBLMが反応すると, DNAは切断される。^{44), 45)} また, DNAにBLMだけでは反応しないが, H₂O₂が低濃度に存在すると BLMはDNAに反応しDNAは切断される。⁴⁴⁾

更に市川⁴⁷⁾らは20-Methylcholarthreneを塗布してマウスの皮膚につくった扁平上皮癌に対し BLMは阻止的に作用するが, 同物質を皮下注射してつくった肉腫に対してはBLMは抑制力のないことを観察している。又梅沢⁴⁸⁾らはこのようにして得た扁平上皮癌又は肉腫を有するマウスに ³H-Bleomycin を注射し, 腫瘍及び各臓器の濃度を放射活性と抗菌作用とで測定した結果, BLMは扁平上皮癌によくとりこまれ不活性化が弱いので扁平上皮癌を阻止するが, 肉腫には周囲の正常な皮膚より低い濃度にしかとりこまれず, 肉腫中では肝等と同様に強く不活化され, その結果肉腫の発育を阻止しないことを証明し, 薬剤の効果と組織の不活化作用の間には逆関係のあるという興味深い成績を発表している。このような関係は藤田⁴⁹⁾らによるとMMCにおいてみられ, MMCの有効な胃癌や肺癌組織では不活化作用が弱いのに対して, MMCの無効な原発性肝癌組織では嫌気的不活化作用が強いという現象と類似している。更に藤田⁴⁹⁾らはBLMを投与された家兎及びマウスの各種臓器の組織内濃度を Bioassay 法によって測定し, BLMは脾, 肝, 睾丸, 消化管, 横紋

筋、血球などで強く不活化されるが、高濃度のBLMの分布が証明されている⁴⁰⁾肺や皮膚の乳剤による不活性化作用は弱いと報告している。従ってBLM投与では、高濃度に薬剤が分布し副作用をきたしやすい皮膚や肺組織に薬剤を不活化する作用が弱いことは特記すべきことである。さてBLMの骨髓組織内濃度、不活性化の程度についての研究はこれまでに見当たらないが、私の実験成績から *in vitro* においてBLMは骨髓組織培養に5 mg/ccという大量を添加しても造血障害を示さないとことが判明したことは極めて興味深いことといえよう。BLMの骨髓造血に対する影響と制癌効果との関係、疑問点をまとめて考察すると次の様な可能性が示唆される。即ち先ずBLMの細胞膜透過性という点から考えると、BLMが効果を示す扁平上皮癌その他ではよくとり込まれるが、骨髓造血細胞ではBLMがとり込まれないのかもしれない。次にBLMの不活作用、という点から考えると、骨髓の細胞はBLMの強い不活化能を有するため骨髓は障害されないのかも知れない。更に、BLMとDNAとの反応を促進する因子という点から考えると、もし、BLMのDNAへの反応がH₂O₂との協力によるものであれば、梅沢³⁹⁾の述べる如くカタラーゼが少ないほど、BLMに対する

感受性が強いわけであり、この点から推論すると、造血臓器の細胞ではカタラーゼが多く、一方これに対して癌組織ではカタラーゼが少ないと云われているが³⁹⁾特に扁平上皮癌ではカタラーゼが少ないというようなことがあるのかもしれない。

第5章 結 論

栓球系造血に対する *in vitro* でのBLMの影響を検討するため正常海溟を用い、骨髓組織培養法により巨核球機能を検討し、次の結果を得た。まず対照とした制癌剤では、MMCは高度に、5-FUは軽度に出現巨核球数並びに全運動型巨核球百分率の低下を認め、骨髓栓球系造血を抑制する。これに対してBLMは全くかかる骨髓栓球系造血を抑制しないことが判明し、白血球系造血障害のないことと共に、本剤の骨髓造血に対する特異な態度が示された。

擱筆するにあたり、御指導と御校閲を賜った恩師平木教授に深甚の謝意を表すと共に終始御助言、御援助下さった木村郁郎講師に感謝致します。

尚、本稿の要旨は第31回日本血液学会総会において発表しました。文献は第3編末尾に記した。

Influence of Bleomycin on Hematopoietic Organ

Part II

Influence of Bleomycin on thrombopoietic Functions of Bone Marrow from normal guinea pigs

By

Ikuya KUNIMASA

Department of Internal Medicine, Okayama Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Author's abstract

In order to observe the influence of Bleomycin on the bone marrow thrombopoiesis, clinical tissue culture of bone marrow from normal guinea pigs was conducted. Bleomycin solutions at various concentration were added directly to the culture media and observations were carried out to see effect of Bleomycin on the function of megakaryocytes of bone marrow.

The results obtained show that the thrombopoietic functions of bone marrow were not inhibited in the medium containing 0.0005 mg/ml, 0.05 mg/ml and 5 mg/ml of Bleomycin.