

## C58 マウス白血病の研究

## 第 Ⅲ 編

## 組織培養法による白血病の診断と鑑別

岡山大学医学部平木内科教室（指導：平木 潔教授）

大学院 鈴木 信也  
学 生

〔昭和 39 年 11 月 14 日受稿〕

## 第 1 章 緒 言

マウス白血病はその形態、症状らに於いて人の白血病と著しく類似し、且つ白血病の多発する系統の得られることから実験的白血病研究の好材料となつて来た。しかしマウス白血病の診断が必ずしも容易でないことはかなり初期から論議されている<sup>1)2)</sup>。1951年 Gross<sup>4)</sup>の無細胞濾液による白血病移植の成功以来、実験白血病研究の主力はウイルスに向けられ、その方面への著しい発展を見た。ウイルス接種により発生する白血病に、もとの白血病とは病型を異にするものが発生することがしばしば報告され<sup>5)11)18)</sup>、これらの謂所病型変異は白血病ウイルスの単一性あるいは宿主の反応の相違などを検討する上で一つの重要な現象として注目されている<sup>3)11)</sup>。しかるにマウス白血病の諸病型ないし白血病類似疾患に於ける細胞形態学的立場からの検討は充分になされているとは云えない。単に末梢血液塗抹標本や骨髓像のみから安易に白血病病型を診断することは重大な過誤を招く恐れがある。私は第 1 編に於いて C58 マウスのリンパ性白血病の血液学的、形態学的並びに組織学的所見を検討し、第 2 編では病型変異により生じたと考えられる骨髓性白血病について同様の検索を行ない、両者の比較鑑別について述べた。教室では 1952 年以来簡易組織培養法を考案して骨髓、リンパ腺、脾らの体外組織培養による白血病の診断について数多くの業績を挙げている<sup>6)7)8)9)10)22)</sup>。私はマウス白血病の診断及び病型鑑別の目的に本法の応用を試み、いささか知見を得たので報告する。

## 第 2 章 実験材料及び方法

簡易組織培養法の基本的技は別紙<sup>12)</sup>にゆずる。培養に供した組織は正常及び白血病マウスの大腿骨

髄、腸間膜又は腹壁リンパ腺並びに脾で、それぞれ無菌的に採取し、生理食塩水中で剪刀にて約 1 mm 四方の小片として用いた。

培養には平木式培養盤 No. 1 を用い、培地は無菌的に採取分離したラッテ血清と市販ビタミン B<sub>12</sub> (10γ/cc) 注射液の等量混合液を用い培養は 37°C の恒温器中に静置して行ない、3 時間以後、6、12、24 時間に顕微鏡下にその増生帯、増生面積、細胞密度、細胞の形態、運動らを観察した。同一被検動物の各組織について 3～5 ケの組織片を培養観察し、その平均値をとつた。

比較成長価の測定算出；顕微鏡に Abbe 描画器を装着し、対物×4、接眼×5 のレンズを用いて原組織及び各観察時に於ける増生帯の輪廓を描写した後面積計を用いて各時間内の増生面積の増加を求め、その原組織面積に対する比を比較成長価とした。

細胞密度指数の算定；対物×40、接眼×10 のレンズを用い、接眼レンズに直注 5mm の円孔を有する Ocular Bredde を入れ、増生部、周縁部及びその中間部各一視野を任意に選んで細胞数を算えその総和を細胞密度指数とした。算定は増生帯の上下左右四方向で行ないその平均を求めた。

好中球遊走速度の測定；増生帯周辺部で最も活潑に運動している好中球を選び、Abbe 描画器を用いて細胞中心点の移動を 30 秒毎に追跡して軌跡を描きその移動距離を倍率より換算して実測値とした。任意の 5 細胞を選び各 3 分間観察し、1 分間の平均移動距離 (μ/mim) を算出した。

螢光培養法；教室渡辺<sup>21)</sup>の方法に従つた。即ち、上記の培地に Acridine Orange 0.2mg/cc 含有の生理食塩水 1 滴を加えて培養し、Karl-Zeiss 製螢光顕微鏡を用いて観察した。光源は HBO-200 高圧水銀燈、光源フィルターは BG12 を、接眼フィルタ

一はOG 5 を用いた。

### 第3章 実験成績

#### I. 正常マウス

##### 1. 骨髓培養

生後4～5ヶ月の正常マウス3例について大腿骨骨髓の培養を行なった。原組織はいずれも細胞に富む実質組織で培養時間の経過とともに原組織周辺に彌漫性に細胞の増生遊出を認めた。増生帯は原組織周囲で細胞増生最も密、周辺に行くに従って粗となる謂所 diffuse pattern (normal pattern) を呈した(写真1)。比較成長価は平均3時間4.83, 6時間8.69, 12時間14.01, 24時間17.69であつた(表1)。細胞密度指数は平均3時間126, 6時間152, 12時間159, 24時間121であつた(表2)。

表1 正常 C58 マウス骨髓培養比較成長価

| 時間    | No. 1 | No. 2 | No. 3 | 平均    |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 3 時間  | 5.12  | 5.15  | 4.22  | 4.83  |
| 6 時間  | 8.28  | 10.00 | 7.80  | 8.69  |
| 12 時間 | 14.00 | 15.40 | 12.62 | 14.01 |
| 24 時間 | 18.30 | 19.24 | 15.54 | 17.69 |

表2 正常 C58 マウス骨髓培養細胞密度指数

| 時間    | No. 1 | No. 2 | No. 3 | 平均  |
|-------|-------|-------|-------|-----|
| 3 時間  | 162   | 128   | 89    | 126 |
| 6 時間  | 182   | 144   | 127   | 152 |
| 12 時間 | 170   | 132   | 174   | 159 |
| 24 時間 | 130   | 97    | 135   | 121 |

##### 2. リンパ腺培養

リンパ腺は骨髓に比して一般に増生は悪い。増生帯はいずれも周辺に粗となる diffuse pattern を呈した(写真2)。比較成長価は平均3時間1.46, 6時間3.55, 12時間4.77, 24時間5.25と骨髓に比し著しく低い。細胞密度指数は平均3時間66.6, 6時間106, 12時間129, 24時間149であつた(表4)。増生帯に出現する細胞は殆ど小型円形で胞体の明い成熟リンパ球で殆ど遊走運動は示さなかつた。増生帯内部には大型円核で核粗剛な幼若リンパ球ないしリンパ芽球が少数認められた。好中球系細胞は殆ど認められなかつた。

##### 3. 脾培養

健康マウスの脾はリンパ腺と略々同様の増生を示した。出現する細胞は主として成熟リンパ球である

表3 正常 C58 マウスリンパ腺培養比較成長価

| 時間    | No. 1 | No. 2 | No. 3 | 平均   |
|-------|-------|-------|-------|------|
| 3 時間  | 1.24  | 1.63  | 1.50  | 1.46 |
| 6 時間  | 3.96  | 2.95  | 3.74  | 3.55 |
| 12 時間 | 5.81  | 3.63  | 4.88  | 4.77 |
| 24 時間 | 6.28  | 4.12  | 5.36  | 5.25 |

表4 正常 C58 マウスリンパ腺培養細胞密度指数

| 時間    | No. 1 | No. 2 | No. 3 | 平均  |
|-------|-------|-------|-------|-----|
| 3 時間  | 54    | 75    | 68    | 66  |
| 6 時間  | 94    | 118   | 105   | 106 |
| 12 時間 | 126   | 125   | 136   | 129 |
| 24 時間 | 116   | 184   | 148   | 149 |

が、増生内部には多数の赤血球が出現し集塊状をなしていた(写真3)。また好中球系細胞の出現も少数認められた。比較成長価は平均3時間1.97, 6時間2.67, 12時間4.73, 24時間5.88であつた(表5)。細胞密度指数は平均3時間103, 6時間127, 12時間145, 24時間123であつた(表6)。

表5 正常 C58 マウス脾培養比較成長価

| 時間    | No. 1 | No. 2 | No. 3 | 平均   |
|-------|-------|-------|-------|------|
| 3 時間  | 2.27  | 1.64  | 2.00  | 1.97 |
| 6 時間  | 3.94  | 3.07  | 2.92  | 2.67 |
| 12 時間 | 5.87  | 4.00  | 4.33  | 4.73 |
| 24 時間 | 6.23  | 5.36  | 6.04  | 5.88 |

表6 正常 C58 マウス脾培養細胞密度指数

| 時間    | No. 1 | No. 2 | No. 3 | 平均  |
|-------|-------|-------|-------|-----|
| 3 時間  | 90    | 85    | 129   | 103 |
| 6 時間  | 126   | 114   | 140   | 127 |
| 12 時間 | 140   | 123   | 172   | 145 |
| 24 時間 | 115   | 105   | 150   | 123 |

#### II. 自然発生リンパ性白血病マウス

自然発生白血病は全て形態学的にリンパ性白血病で、全身リンパ腺腫脹及び著明な脾腫が認められた。培養に用いたリンパ腺は主として腸間膜リンパ腺である。培養を行なった症例の血液所見は以下の如くである。

症例1 (No. 106 ♀) 末梢血白血球数40,500, リンパ芽球20%, 骨髓像ではリンパ芽球57.8%, 成熟リンパ球21%, 好中球系14.6%, リンパ腺塗抹標本

ではリンパ芽球62%, 成熟リンパ球35%, 脾塗抹標本ではリンパ芽球50%, 成熟リンパ球14.4%, 赤血球32.6%であった。

症例2 (No. 173 ♂) 末梢血白血球数89,500, リンパ芽球25%, 骨髓像ではリンパ芽球44.0%, 成熟リンパ球21.2%, 好中球系24.8%, リンパ腺塗抹標本でリンパ芽球70.4%, 成熟リンパ球29.0%, 脾塗抹標本でリンパ芽球64.8%, 成熟リンパ球5.8%, 赤芽球18%であった。

症例3 (No. 158 ♀) 末梢血白血球数45,000, リンパ芽球36%, 骨髓像ではリンパ芽球8.8%, 成熟リンパ球17.0%, 好中球系67.4%, リンパ腺塗抹標本でリンパ芽球53.2%, 成熟リンパ球43.6%, 脾塗抹標本ではリンパ芽球56.0%, 成熟リンパ球20.0%, 赤芽球16.0%, 好中球系3.2%であった。

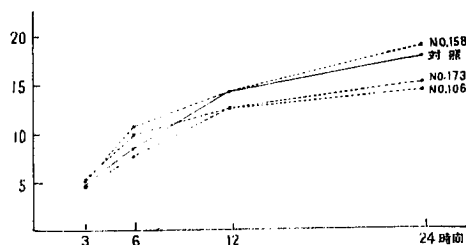
#### 1. 骨髓培養

症例1: 細胞の増生は極めて旺盛であるが, 比較成長価は3時間5.25, 6時間9.83, 12時間12.60, 24時間14.47と正常よりやや低下していた(表7)。増生帯は3時間では周辺粗となる normal pattern を示したが, 6時間以後は増生帯は極めて細胞稠密となり, 辺縁は比較的鋭利ないし不完全な二重増生帯を呈した。しかし急性白血病に特有の辺縁鋭利に区劃された増生帯は作らなかった(写真4)。細胞密度指数は3時間206, 6時間292, 12時間288, 24時間240と著しく高値を示した。増生帯内部には大型円型不正核を有する幼若細胞が多数出現するが, 周辺部にはかなり多数の成熟好中球が遊出していた。

表7 リンパ性白血病マウス骨髓比較成長価

| 時間    | No. 106 | No. 158 | No. 173 | 平均    |
|-------|---------|---------|---------|-------|
| 3 時間  | 5.25    | 5.22    | 4.67    | 5.05  |
| 6 時間  | 9.83    | 10.75   | 7.83    | 9.47  |
| 12 時間 | 12.60   | 14.17   | 12.51   | 13.09 |
| 24 時間 | 14.47   | 18.80   | 15.02   | 16.10 |

図1 リンパ性白血病骨髓比較成長価



症例2も症例1とほぼ同様の成績であつた(表7, 8)。

症例3: 増生帯は3, 6, 12, 24時間とも normal pattern を呈し白血病性増生を示さなかった。細胞構成もほぼ正常で多数の成熟好中球が出現し, 幼若細胞の増加は顕著でなかった。しかし増生帯の成長は大で比較成長価は3時間5.22, 6時間10.75, 12時間14.17, 24時間18.80と正常より大であつた(表7, 図1)。細胞密度も前2例に比し低値を示したが正常よりは大であつた(表8)。

表8 リンパ性白血病マウス骨髓細胞密度指数

| 時間    | No. 107 | No. 173 | No. 158 | 平均  |
|-------|---------|---------|---------|-----|
| 3 時間  | 206     | 265     | 180     | 217 |
| 6 時間  | 292     | 302     | 216     | 270 |
| 12 時間 | 288     | 263     | 224     | 258 |
| 24 時間 | 240     | 252     | 205     | 232 |

#### 2. リンパ腺培養

リンパ腺培養はいずれの症例も増生帯の辺縁は鋭利に区劃された謂所急性白血球型増生を示した(写真5)。比較成長価は3例とも正常リンパ腺より高値を示し, 平均3時間2.75, 6時間4.51, 12時間7.20, 24時間8.39であつた(表9)。また細胞密度指数も平均3時間126, 6時間205, 12時間220, 24時間248と著しく高値を示した。増生帯を構成する細胞は大型円形胞体少なく, 核は不正粗剛でしばしば切込みを有しているリンパ芽球が大多数を占め, 殆ど遊走運動は示さない。

#### 3. 脾培養

リンパ腺と同様いずれも辺縁鋭利な白血病性増生

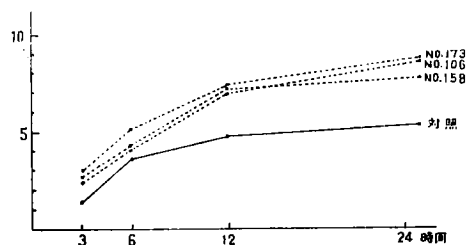
表9 リンパ性白血病マウスリンパ腺比較成長価

| 時間    | No. 106 | No. 173 | No. 158 | 平均   |
|-------|---------|---------|---------|------|
| 3 時間  | 2.46    | 3.05    | 2.75    | 2.75 |
| 6 時間  | 4.09    | 5.16    | 4.29    | 4.51 |
| 12 時間 | 6.99    | 7.40    | 7.20    | 7.20 |
| 24 時間 | 8.62    | 8.70    | 7.86    | 8.39 |

表10 リンパ白血病マウスリンパ腺細胞密度指数

| 時間    | No. 109 | No. 173 | No. 158 | 平均  |
|-------|---------|---------|---------|-----|
| 3 時間  | 125     | 154     | 98      | 126 |
| 6 時間  | 208     | 235     | 172     | 205 |
| 12 時間 | 225     | 262     | 174     | 220 |
| 24 時間 | 284     | 276     | 183     | 248 |

図2 リンパ性白血病骨髄比較成長価



を示し、稠密な増生帯を形成した(写真6)。比較成長価、細胞密度指数とも正常より高値を示した(表11, 12)。増生帯には多数のリンパ芽球が出現したが、原組織周囲に赤芽球、赤血球が密に出現するのが特徴的であつた。正常と異なり好中球系細胞は殆ど出現しなかつた。

表11 リンパ性白血病脾培養比較成長価

| 時間    | LL-20 | LL-24 | LL-28 | 平均   |
|-------|-------|-------|-------|------|
| 3 時間  | 1.80  | 1.74  | 2.16  | 1.90 |
| 6 時間  | 2.88  | 3.73  | 4.29  | 3.63 |
| 12 時間 | 4.07  | 5.41  | 4.57  | 5.02 |
| 24 時間 | 3.15  | 6.20  | 6.13  | 5.49 |

表12 リンパ性白血病脾細胞密度指数

| 時間    | LL-20 | LL-24 | LL-28 | 平均  |
|-------|-------|-------|-------|-----|
| 3 時間  | 150   | 204   | 184   | 176 |
| 6 時間  | 214   | 285   | 246   | 248 |
| 12 時間 | 242   | 308   | 222   | 252 |
| 24 時間 | 220   | 266   | 195   | 227 |

### Ⅲ. 骨髄性白血病マウス

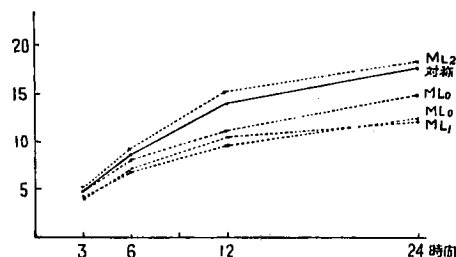
リンパ性白血病組織の無細胞濾液接種実験で5例の骨髄性白血病の発生を認めたが、これらはいずれも末梢血液像、骨髄像、その他の血液学的所見は慢性骨髄性白血病の病像を呈した。

詳細は第Ⅱ編で述べたが、リンパ性白血病との鑑別、類白血病反応との鑑別を目的に、これらのうち原発白血病2例、移植白血病(第1代、第2代)2例について組織培養を行なつた。

#### 1. 骨髄培養

細胞増生は極めて旺盛で巾広い増生帯を形成した。増生帯辺縁は内部の稠密帯とその外層に粗な細胞増生を有する所謂二重増生帯を示した(写真7)。しかし移植白血病はいずれも正常に近い瀰漫性増生を示した。比較成長価は平均3時間4.62, 6時間7.84,

図3 骨髄性白血病骨髄比較成長価



12時間11.59, 24時間14.40と正常よりやや低値を示したが、移植白血病の1例は正常より高値を示した(表13)。細胞密度指数(表14)はいずれも正常より高く、平均3時間174, 6時間208, 12時間226, 24時間213であつた。増生帯には少数の幼若好中球が出現し、その間に大型円型核を有し胞体やや大で運動性を示さない骨髄芽球が介在し、周辺部には遊走性好中球が多数出現した(写真8)。成熟好中球の遊走速度は正常に比し低下していた(図4)。

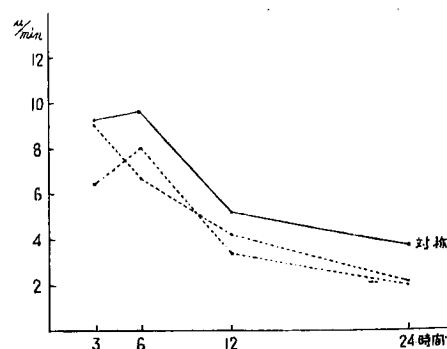
表13 C58 骨髄性白血病骨髄比較成長価

| 時間    | ML-0  | ML0   | ML1   | ML2   | 平均    |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 3 時間  | 4.30  | 4.82  | 4.20  | 5.17  | 4.62  |
| 6 時間  | 6.82  | 8.14  | 7.00  | 9.38  | 7.84  |
| 12 時間 | 9.52  | 11.20 | 10.40 | 15.24 | 11.59 |
| 24 時間 | 12.28 | 14.92 | 12.10 | 18.30 | 14.40 |

表14 C58 骨髄性白血病骨髄細胞密度指数

| 時間    | ML0 | ML0 | ML1 | ML2 | 平均  |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 3 時間  | 203 | 195 | 172 | 124 | 174 |
| 6 時間  | 210 | 224 | 212 | 185 | 208 |
| 12 時間 | 230 | 246 | 260 | 166 | 226 |
| 24 時間 | 213 | 237 | 235 | 168 | 213 |

図4 骨髄性白血病骨髄好中球遊走速度



## 2. リンパ腺及び脾培養

骨髓性白血病のリンパ腺及び脾の培養所見は正常と著しく異なつた特徴を示した。即ち増生帯は成長大で細胞密度著しく高く、辺縁は比較的鋭利ないし瀰漫性であつたが増生帯は殆んど骨髓系細胞で構成され、あたかも骨髓培養の観を呈した(写真9, 10)。増生帯内部は幼若な白血病細胞が多数を占め、その間に少数のリンパ球及び成熟好中球が介在するが、周辺部には多数の成熟好中球が出現、この傾向はリンパ腺より脾で著明であつた。比較成長価はいずれも正常より大で、リンパ腺で平均3時間2.89, 6時間4.73, 12時間6.47, 24時間6.87, 脾では平均3時間3.50, 6時間4.88, 12時間6.38, 24時間6.66であつた。細胞密度はリンパ腺で3時間144, 6時間188, 12時間163, 24時間134, 脾では3時間154, 6時間202, 12時間216, 24時間164の平均値であつた(表15, 16, 17, 18)。

表15 骨髓性白血病リンパ腺比較成長価

| 時間    | ML <sub>0</sub> | ML <sub>0</sub> | ML <sub>1</sub> | ML <sub>2</sub> | 平均   |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| 3 時間  | 2.64            | 3.10            | 2.83            | 3.00            | 2.89 |
| 6 時間  | 4.88            | 5.20            | 4.65            | 4.20            | 4.72 |
| 12 時間 | 6.32            | 7.00            | 6.00            | 6.54            | 6.47 |
| 24 時間 | 6.85            | 7.34            | 6.56            | 6.72            | 6.87 |

表16 骨髓性白血病リンパ腺細胞密度指数

| 時間    | ML <sub>0</sub> | ML <sub>0</sub> | ML <sub>1</sub> | ML <sub>2</sub> | 平均  |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|
| 3 時間  | 143             | 160             | 125             | 150             | 144 |
| 6 時間  | 205             | 194             | 169             | 186             | 188 |
| 12 時間 | 226             | 135             | 141             | 148             | 163 |
| 24 時間 | 186             | 136             | 108             | 105             | 134 |

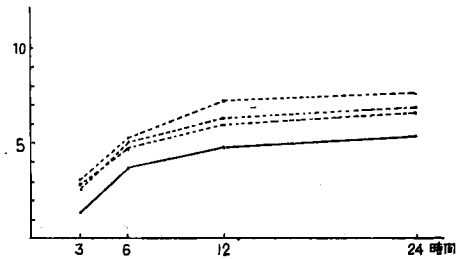
表17 骨髓性白血病マウス脾培養比較成長価

| 時間    | ML <sub>0</sub> | ML <sub>0</sub> | ML <sub>1</sub> | ML <sub>2</sub> | 平均   |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| 3 時間  | 3.28            | 4.00            | 2.88            | 3.83            | 3.50 |
| 6 時間  | 4.50            | 5.90            | 4.11            | 5.00            | 4.88 |
| 12 時間 | 6.08            | 6.95            | 5.83            | 6.65            | 6.38 |
| 24 時間 | 6.34            | 7.24            | 5.92            | 7.12            | 6.66 |

表18 骨髓性白血病マウス脾培養細胞密度指数

| 時数    | ML <sub>0</sub> | ML <sub>0</sub> | ML <sub>1</sub> | ML <sub>2</sub> | 平均  |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|
| 3 時間  | 146             | 126             | 175             | 169             | 154 |
| 6 時間  | 184             | 194             | 254             | 227             | 202 |
| 12 時間 | 195             | 156             | 242             | 269             | 216 |
| 24 時間 | 122             | 109             | 216             | 210             | 164 |

図5 骨髓性白血リンパ腺比較成長価



## IV. 螢光培養法

Acridine Orange 添加による螢光培養法<sup>21)</sup>により人の白血病増生帯の螢光所見は白血病の種類により差があることが知られている<sup>15)</sup>。螢光培養法をマウス白血病について応用し、培養6時間後の増生帯所見並びに増生帯を構成する白血病細胞の螢光所見を観察した。

## 1. リンパ性白血病骨髓

増生帯は中心部稠密、辺縁部でやや粗となる Pattern を呈した。中心部は幼若細胞の螢光により緑色が支配的で、周辺部は好中球の顆粒により瀰漫性に赤橙色を呈した。増生帯中心部は主としてリンパ芽球、幼若リンパ球、好中球系細胞よりなつていた。リンパ芽球は正常の骨髓には認められない特異な螢光所見を呈する細胞で増生帯に出現する細胞 5~10%を占め、核は2~3条の切込みを有し、異型性が強く、核膜は比較的薄く不明瞭な緑色螢光を示し、核網は繊細で核全体が弱い緑色雲架状の螢光を呈した。胞体は狭少で弱緑色、胞体縁は円形明瞭で胞体内に顆粒成分は認められなかつた。幼若リンパ球は約15%を占め、核はやや小型となり円形又は小なる切痕を有し、核網は比較的粗となり一部凝集状となつて帯黄緑色の螢光を呈した。核小体は不明瞭となるが1~2ヶ残存した。胞体は比較的巾広く一般的な弱緑色を呈し、辺縁は円形明瞭で運動を認めず、時に赤色疎大な不整形顆粒が少数存在した。成熟リンパ球は少数で、小円型の核は帯黄緑色の螢光を示し、核小体は認められず、胞体は巾狭く薄緑色で数ヶの赤色顆粒が存在した。

顆粒球系細胞は前骨髓球より成熟好中球まで多数認められ、特に増生帯周辺部は主として成熟好中球によつて占められていた。前骨髓球は弱緑色螢光の巾広い胞体を有し、核は大型円形ないし軽度の陥凹を有し、核網はやや粗で螢光に乏しい。核膜は薄く緑色螢光を呈し、明瞭な緑色の核小体を1~2ヶ認めた。核陥凹部附近の胞体には核色微細な顆粒が集

簇して認められた。橙色微細な顆粒は骨髓球の段階で最も多く、胞体全体に散在性に認められた。後骨髓球及び成熟好中球では顆粒は粗大となり数も減少し、赤橙色螢光を呈し、空胞化するものが多く、胞体全体に散在し、核及び胞体の螢光は幼若細胞より弱い緑色を呈する。

## 2. リンパ性白血病脾

培養6時間の脾では原組織周囲に稠密な増生帯が見られ、辺縁は鋭利に区劃された白血病型を呈した。ここではリンパ芽球、幼若リンパ球が大多数を占め、これらの核胞体の螢光により、増生帯は瀰漫性に帯黄緑色を呈した。細胞学的所見は骨髓に出現したものと同様であつた。骨髓系細胞は成熟好中球が少数点在するに過ぎなかつた。

## 3. リンパ性白血病リンパ腺

脾と殆ど同様に辺縁鋭利に区劃された白血病型増生を示し、リンパ芽球、幼若リンパ球により増生帯は瀰漫性に黄緑色の螢光を呈した。比処ではリンパ芽球と幼若リンパ球が90%以上を占め、その間に成熟リンパ球が介在した。

## 4. 骨髓性白血病骨髓

増生帯は巾広く中心部は極めて細胞稠密、周辺部も比較的密であるが辺縁鋭利でなく二重増生に近かつた。増生帯は前骨髓球を主とする幼若好中球及び成熟好中球が多数出現し、それらの顆粒による赤橙色及び橙色螢光が支配的であつた。特に増生帯周辺部は瀰漫性に赤橙色を呈し、中心部は幼若細胞の緑色螢光が支配的で、これに赤橙色の螢光が混在した。増生帯内部には径15 $\mu$ 内外の円型細胞が多数出現したが、この細胞は核は類円形で、時に1~2条の浅い切痕を示し、核膜は菲薄なるも比較的明瞭で緑色螢光を呈し、核小体は大型円型緑色のもの1~2ヶ有し、核網は繊細で螢光は殆ど認められなかつた。胞体は一様に濃緑色を呈し、胞体縁は円型明瞭で胞体内には赤橙色粗大な不整型の顆粒が数ヶ存在した。やや成熟した段階では細胞中心域附近に微細橙色の顆粒が集簇性に出現し、幼若好中球顆粒の螢光を呈し、前骨髓球への移行が認められた。従つてこの細胞は骨髓芽球と考えられた。

## 5. 骨髓性白血病脾

培養6時間後の増生帯は非常に細胞稠密では辺縁は比較的鋭利であつた。増生帯中心部は白血病細胞の核、胞体の螢光によつて瀰漫性に緑色を呈し、幼若好中球の顆粒による赤橙色螢光が混在した。周辺部には好中球系細胞が圧倒的に多く赤橙色螢光が瀰

漫性に認められた。

## 6. 骨髓性白血病リンパ腺

培養6時間後の増生帯は細胞稠密で辺縁は比較鋭利、脾とほぼ同様の螢光所見を呈したが、此処では好中球顆粒にある赤橙色螢光は脾よりやや少なく、リンパ球の介在による黄緑色の螢光が比較的強く認められた。

## 第4章 総括並びに考按

C58系マウスの自然発生白血病はほとんどがリンパ性白血病であり、骨髓性白血病の発生は極めて稀である<sup>1)17)</sup>。私の観察でもC58マウスの自然発生白血病は全てリンパ性白血病であつた。リンパ性白血病組織の無細胞濾液を同系新生児マウスに接種し、5例の骨髓性白血病への病型変異を認めたことは既に第2編で述べた。マウスではしばしば見られる感染症や白血病以外の腫瘍らによる類白血病反応或いは髄外造血は、その血液像が骨髓性白血病と類似しその鑑別は容易でない<sup>1)2)</sup>。またリンパ性白血病を同系マウスに累代細胞移植した場合にも、しばしば骨髓系細胞の反応性増殖が起り、骨髓性白血病と紛らわしい血液像を呈して来ることも第1編で述べた。白血病細胞の鑑別は最近めざましい発展をとげた血液学的諸検索手技の応用とCriteriaの確立によつて、著しく確実となつて来たが、尚多少の主観の介入による混乱は免れない。教室では骨髓その他の造血組織の簡易培養法を考案し、より客観的な立場から白血病の診断を行なう研究を続け数多くの興味ある業績を挙げて来た。即ち正常の人<sup>20)</sup>及びマウスその他の動物<sup>21)</sup>の骨髓培養では原組織周囲に幼若骨髓系細胞を含む密な増生を示すが中間部を経て周辺部に至るに従つて細胞増生は漸次粗となる瀰漫性増生帯(normal pattern)を呈し、活潑に遊走する成熟好中球が周辺部に多く出現する。増生帯に出現する細胞の運動形態は各細胞により各々特徴がありそれぞれの細胞の鑑別には有用である<sup>22)</sup>。一方白血病患者の骨髓は増生帯の細胞密度が著しく高く、急性白血病では遊走能のない芽球が主として増生帯を構成するため、増生帯の辺縁は鋭利に区劃され、また慢性白血病では残存する成熟好中球が鋭利に区劃された増生帯の外に遊出して二重増生帯を生じる。これらの増生帯の型は白血病に特有であり、その診断が極めて明瞭である<sup>7)9)</sup>。これらの組織培養の所見は骨髓のみならず、リンパ腺<sup>14)</sup>及び脾<sup>10)</sup>に於いても共通であるとされている。

私は C58系マウス白血病の診断に本法の応用を試みた。正常マウスの骨髓、脾、リンパ腺はいずれも周辺粗となる正常増生帯を示した。自然発生白血病は血液学的所見からすべて急性リンパ性白血病の像を呈したが、組織培養でも、リンパ腺及び脾は増生帯の細胞密度高く、辺縁鋭利に区劃された典型的な急性白血病型増生帯を呈した。細胞増生は極めて旺盛で細胞密度指数、比較成長価とも正常より高値を示した。リンパ性白血病の骨髓は症例により一定しなかったが増生帯の辺縁は比較鋭利ないし不完全な二重増生を示し急性白血病様増生は見られなかった。これは正常の骨髓系細胞がかなり残存しているためと考えられ、辺縁部にはかなり多数の成熟好中球が出現した。白血病細胞の浸潤の程度のもものでは全く正常増生を示した。しかし増生帯の細胞密度はいずれも正常の場合より著明に高く、内部には多数のリンパ芽球の出現が認められた。

次に C58 マウスの骨髓性白血病は血液像は慢性骨髓性白血病の像を呈したが、骨髓培養の増生帯も原発白血病ではいずれも二重増生帯を形成し、人の慢性骨髓性白血の場合と一致した。しかし移植白血病の骨髓では辺縁はやや瀰漫性となり、またリンパ腺及び脾はいずれの症例でも比較的鋭利ないし瀰漫性の増生帯を呈し白血病特有の pattern は見られなかった。教室の加原<sup>13)</sup> は D103系マウスに MY 肉腫を移植して惹起せしめた類白血病反応の造血組織の培養を行ない、骨髓、脾ともに正常増生帯を示し、比較成長価は増大するが細胞密度は正常と異ならなかったことを報告している。又佐藤<sup>14)</sup> はサポニン投与により惹起せしめた類白血病反応の培養に於いても骨髓、脾とも正常増生帯を呈し、比較成長価は正常に近く、細胞密度も正常ないし正常以下であったと報告している。骨髓性白血病の診断に際し類白血病反応との鑑別が常に問題となる。Barnes and Sisman<sup>1)</sup> は骨髓性白血病では幼若骨髓系細胞が主体をなすこと、赤芽球増殖巣の混在しないこと、周囲組織への浸潤のあること、全身リンパ腺の腫脹のあること、他のマウスへ移植可能であること等の点で類白血病反応と区別している。私の経験した 5 例の骨髓性白血病は既に第 II 編で述べた如く、全例同系マウス移植可能であり病理学的所見からも白血病と認められたが、更に骨髓培養でも慢性白血病に特有の二重増生を示した。脾、リンパ腺は白血病性の増生型を示さなかったが比較成長価、細胞密度とも正常より著しく増大し、増生帯の内部には遊走性の少

ない幼若骨髓系細胞が多数出現し、加原、佐藤らの類白血病反応の増生とは明らかに異なっていた。

教室の渡辺<sup>21)</sup> は骨髓組織培養の培地に蛍光色素 Acridin Orange を添加し正常人骨髓の諸細胞の生態観察を行ない蛍光培養法と名付けた。それによると正常人骨髓の増生帯は normal pattern を呈し、骨髓系細胞の顆粒による赤橙色蛍光が強く増生帯は瀰漫性に赤橙色を呈し、その間に幼若細胞の胞体、核による黄色及び緑色蛍光が散在する。また小林<sup>14)</sup> は正常リンパ腺の蛍光培養を行ない、リンパ球の核の黄緑色蛍光により増生帯は瀰漫性に帯黄緑色を呈しその間に赤橙色蛍光が点在し骨髓の場合と対称的な所見を呈すると述べている。教室の小塚<sup>15)16)</sup> は蛍光培養法を人の白血病の診断に応用し、白血病の骨髓、脾、リンパ腺は蛍光培養でも白血病特有の辺縁鋭利な増生帯を示すこと、また増生帯の蛍光所見は白血病の病型により特色があり白血病の病型診断が可能であることを報告している。マウス白血病の蛍光培養でも各細胞の蛍光所見は人の場合とほぼ一致し増生帯に出現する細胞の鑑別は一層容易となった。まずリンパ性白血病では脾及びリンパ腺は辺縁鋭利な白血病型増生を示し、増生帯はリンパ芽球、幼若リンパ球らにより瀰漫性に黄緑色蛍光を呈し、人の急性リンパ性白血病における骨髓やリンパ腺と同一の所見であつた。骨髓では増生帯の辺縁はやや粗となり周辺部は好中球系細胞の顆粒による赤橙色蛍光がかなり強く認められ、増生帯中心部は幼若細胞の核、胞体による黄緑色蛍光が支配的であり人の急性リンパ性白血病と異なつた所見であつたが、マウスリンパ性白血病では一般にリンパ芽球の骨髓への浸潤が中等度で骨髓系細胞が比較的良好に保たれているため、この様な二層の増生帯蛍光を示したと考えられる。

骨髓性白血病マウスの骨髓では増生帯は不完全な二重増生ないし瀰漫性で中心部は幼若細胞による緑色蛍光、周辺部は成熟好中球の顆粒による赤橙色蛍光が支配的であつたが、前記リンパ性白血病骨髓の場合よりも増生帯内部には好中球系細胞の顆粒による赤橙色蛍光の混在が著しく多いのが特徴的であつた。

骨髓性白血病のリンパ腺及び脾に於いては稠密な増生帯を作り、その辺縁は比較的鋭利、幼若細胞及びリンパ球の緑色、黄緑色蛍光が瀰漫性に認められ、その間に多数の好中球系細胞による赤橙色蛍光が混在し、リンパ性白血病の場合と明瞭に区別された。

佐藤<sup>19)</sup>によると類白血病反応の脾蛍光培養所見は好中球系細胞の増加により瀰漫性赤橙色の増生帯間示したと云うが、骨髓性白血病の場合はむしろ幼若白血病細胞による緑色蛍光が強く、特に増生帯内部ではこれが支配的である点、類白血病反応と区別し得た。

## 第5章 結語

C58マウス白血病に於いて骨髓、リンパ腺、脾の組織培養並びに蛍光組織培養法を行ない白血病の診断並びに病型鑑別を試みた。

1) 自然発生白血病ではリンパ腺及び脾が典型的な急性白血病性増生帯を示し、人の急性リンパ性白血病の所見に一致した。骨髓培養は急性白血病型の増生帯は形成しなかつたが、細胞密度は極めて高値を示した。

2) 骨髓性白血病の骨髓培養では原発白血病の

場合に慢性骨髓性白血病に特有な二重増生帯を示した。リンパ腺及び脾に辺縁比較的鋭利な増生帯を示し、細胞密度、比較成長価ともに増大し骨髓芽球を含む多数の好中球系細胞が出現した。

3) 蛍光培養ではリンパ性白血病でリンパ腺及び脾が辺縁鋭利で瀰漫性に黄緑色蛍光を示す増生帯を形成し、骨髓性白血病では骨髓、リンパ腺、脾とも比較的鋭利ないし瀰漫性の増生帯を示し、一般に増生帯内部は白血病細胞による緑色蛍光、周辺部は好中球系細胞の顆粒による赤橙色蛍光が支配的であつた。

以上リンパ性白血病ではリンパ腺及び脾が、骨髓性白血病では骨髓がそれぞれ白血病に特有の増生帯所見を示し白血病の診断、鑑別が可能であつた。

稿を終るに臨み御指導御校閲戴いた恩師平木教授並びに大藤助教授に深く感謝致します

## 文

- 1) Barnes, W. A. and Sisman, I. E., Myeloid leukemia and non-malignant extramedullary myelopoiesis in mice, *Am. J. Cancer*, 37; 1, 1939.
- 2) Dunn, T. B., Normal and pathological anatomy of the reticular tissues in laboratory mice, *J. Nat. Cancer Inst.*, 14; 1281, 1954.
- 3) Fiore-Donati, L. et al, Influence of host factor on development and type of leukemia induced by Graffi virus, *J. Nat. Cancer Inst.*, 32; 1083, 1964.
- 4) Gross, L., "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation, in infancy, with Ak-leukemia extracts, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 76; 27, 1951.
- 5) Gross, L., Development of myeloid leukemia on thymectomized C3H mice following inoculation of lymphatic leukemia virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103; 509, 1960.
- 6) Hiraki, K. and Ofuji, T., The method of tissue culture and simplified method of observing living cell, *Acta Med. Okayama*, 10; 99, 1956.
- 7) Hiraki, K. and Ofuji T., Diagnosis of leukemia and aplastic anemia by the bone marrow culture, *Acta Med. Okayama*, 10; 110, 1956.

## 献

- 8) 平木 潔, 大藤 真, 映画による血球動態観察並にその臨床応用—主として骨髓培養による, *日血会誌*, 19; 405, 昭31.
- 9) 平木 潔, 角南 宏, 白血病の診断殊に臨床組織培養, *総合臨床*, 10; 1871, 昭36.
- 10) 平木 潔他, 脾臓の組織培養とその臨床応用, *総合臨床*, 11; 1047, 昭37.
- 11) 平木 潔, 大藤 真, 他, マウスウイルス性白血病の病型変異とその機転—特にその免疫学的研究, *最新医学*, 17; 2982, 昭37.
- 12) 平木内科編, 臨床組織培養の手技, 昭30.
- 13) 加原雅教, MY肉腫移植による実験的類白血病反応に関する研究, *岡山医誌*, 75; 747, 昭38.
- 14) 小林照雄, 淋巴腺組織培養に関する研究, *岡山医誌*, 72; 1479, 昭35.
- 15) 小塚 堯, 他, 骨髓蛍光培養法による白血病の診断, *総合臨床*, 17; 367, 昭35.
- 16) 小塚 堯他, 諸造血臓器の蛍光培養法による観察, とくに白血病診断への応用について, *日内会誌*, 53; 539, 昭39.
- 17) McCowell, E. C. and Richter, M. W., Experiments with mammalian leukemia, *Phys. Rev.*, 15; 509, 1935.
- 18) Okada, K., et al, Studies on leukaemogenesis by cell-free filtrates of AKR mouse leukemia,

- Acta haemat. Jap., 25; 1, 1962.
- 19) 佐藤 端, サボニン投与による実験類白血病反応に関する研究, 岡山医誌, 75; 747, 昭38.
- 20) 末永泰三, 各種動物の骨髓体外組織培養, 岡山医誌, 70; 1291, 昭33.
- 21) 渡辺 晋, 組織培養による骨髓諸細胞の螢光顕微鏡的研究, 岡山医誌, 72; 1097, 昭35.
- 22) 亙理善治, 骨髓体外組織培養に関する研究, 岡山医誌, 71; 5955, 昭34.

### 写真説明

1. 正常マウス骨髓培養の増生帯, 培養3時間後.
2. 正常マウスリンパ腺培養の増生帯.
3. 正常マウス脾培養の増生帯.
4. リンパ性白血病マウス骨髓の増生帯.
5. リンパ性白血病マウスリンパ腺培養の増生帯.
6. リンパ性白血病マウス脾培養の増生帯.
7. 骨髓性白血病マウス骨髓培養の増生帯. いわゆる二重増生帯の形成.
8. 骨髓性白血病マウス脾培養の増生帯に出現せる細胞, 主として幼若好中球系細胞おりなる.
9. 骨髓性白血病マウスリンパ腺培養の増生帯.
10. 骨髓性白血病マウス脾培養の増生帯.

## Studies on Leukemia in the C58 Strain of Mice

### Part 3. Diagnosis and Differentiation of Mouse Leukemia by the Simplified Tissue Culture Method

By

Shinya SUZUKI

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director; Prof. Kiyoshi Hiraki)

The simplified tissue culture method and the fluorochrominized tissue culture method devised in our laboratory were applied to the bone marrow, spleen and lymph node of the leukemic mice of C58 strain for the purpose of diagnosis and differentiation of leukemia. And following results were obtained;

1. In the case of spontaneous leukemia, tissue culture of the lymph node and spleen showed sharply defined growth zone with increased cell density which is the characteric pattern of acute leukemia.

The bone marrow showed rather diffuse border of growth zone with the appearances of many migrating neutrophils, but cell density was remarkably increased and many leukemic cells appeared in the growth zone.

2. In the case of myelogenous leukemia, the bone marrow culture showed so-called double growth zone which is characteristic of chronic leukemia. On the other hand, the lymph node and the spleen showed diffuse border of the growth zone with increased cell density. Numerous immature and mature neutrophilic cells appeared in the growth zone.

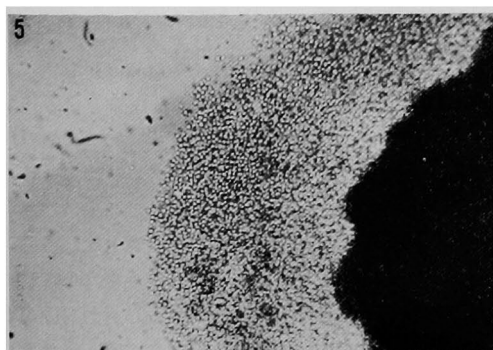
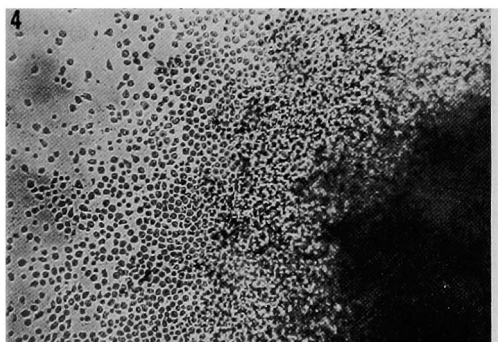
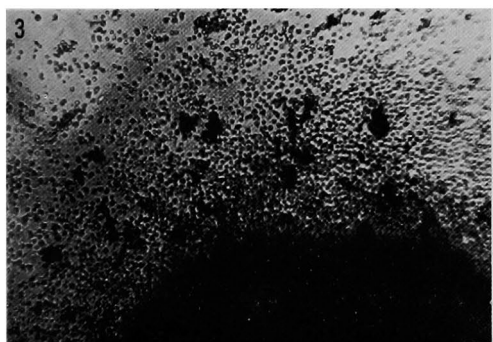
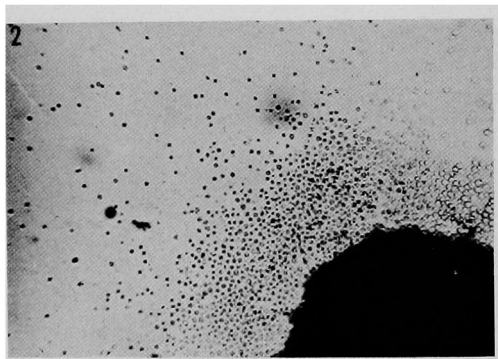
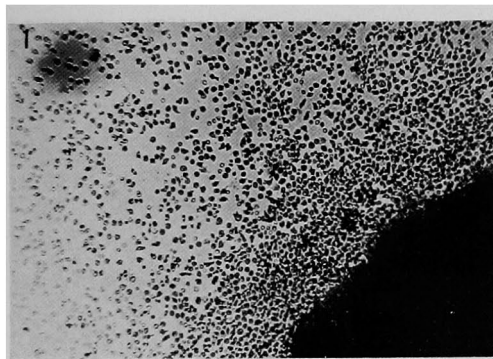
3. By the fluorochrominized tissue culture method, the lymph node and the spleen of lymphatic leukemia showed typical leukemic growth zone and gave diffuse yellowish-green color

due to the cytoplasmic and nuclear fluorescence of lymphoblasts and other lymphoid cells. On the other hand, the bone marrow, spleen and lymph node of myelogenous leukemia showed relatively diffuse pattern and the inner part of the growth zone gave greenish fluorescence due to the cytoplasm and nucleus of immature leukemic cell, but in the periphery of the growth zone, reddish-orange color was predominant due to the fluorescence of cytoplasmic granules of mature neutrophils.

In conclusion, the lymph node and spleen in lymphatic leukemia and the bone marrow in myelogenous leukemia showed typical leukemic growth zone respectively and these findings are useful for the differential diagnosis of mouse leukemia.

---

鈴木論文附図



## 鈴木論文附図

