616.155.194.7：611-018.46：578.085.23

骨髄体外組織培養法による再生不良性貧血に関する研究

第　2　編

再生不良性貧血患者骨髄液体培養に就て

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木　潔教授）

宇　治　鉄　也

〔昭和34年1月14日受稿〕

内　容　目　次

第1章　緒　　言
第2章　実験材料並びに実験方法
第3章　実験成績
　第1節　健康人骨髄組織液体培養
　　第1項　赤血球数
　　第2項　血色素量
　第2節　再生不良性貧血骨髄組織液体培養
　　第1項　赤血球数
　　第2項　血色素量
第4章　総括並びに考按
第5章　結　　論

第1章　緒　　言

前編に於いて再生不良性貧血の本態を追求するため新たに組織培養法を本研究に導入し，被覆培養法を用いて本症患者骨髄組織を培養し，その増生面積並びに白血球系細胞の機能を種々の面より探索し，本症の診断に甚だ有力な特徴的所見を得たが，これは主として白血球系造血の機能状態を表わすものであり，赤血球系造血機能が如何なる状態にあるかに就いては全く不明と云わざるを得ない．

さて本症では末梢血中血色素及び赤血球共に著明に減少し，骨髄に於いても著明な赤血球造血の荒廃があることは周知の事実であり，更にそれは鉄代謝の面からも充分窺われるが，最近教室の西内[28]は本症患者骨髄の呼吸解糖作用を測定し呼吸値の著明な低下を認め，本症骨髄赤血球系造血の低下は疑う余地のないものと述べている．

抑々骨髄組織培養法により赤血球系造血を知らんとするには被覆法では到底不可能であり，矢張り遊走能力のない赤血球系細胞には液体メヂュームを用いた細胞浮游液培養法が最も適当である．この点，1936年 Osgood & Brownlee[17]が始めて人骨髄細胞を特殊メヂュームを用いて行つた細胞浮游液体培養法は利用価値の高いものと考えられる．教室久米[29]，岩崎[30]は本法を改良し，更に Norris & Majnarich[31]の細胞浮游液をワールブルグ恒温槽で振盪培養する変法を取り入れ，独自の方法を考案した．これにより彼等は家兎骨髄の液体培養を行い，之に対する各種ビタミン Fe，Cu，Co，等の添加を行い，之等の赤血球系造血に及ぼす影響を観察している．しかし再生不良性貧血患者骨髄の液体培養を行つた者は，もとより全然見られない．そこで私は本法を用いて先つ健康人の骨髄を培養し，次いで再生不良性貧血患者骨髄を病型別に夫々培養を行い，その赤血球系造血に就いて観察を行い，若干の新知見を得たので茲に報告する．

第2章　実験材料並びに実験方法

実験材料平木内科入院の再生不良性貧血患者14例に就いて胸骨及び腸骨穿刺を行い得られた骨髄液を用いた．

実　験　方　法

1）再生不良性貧血患者の胸骨及び腸骨より得られた骨髄を取り出し Bottle 中に遊離させ Warburg の恒温槽で振盪培養を行つて所謂骨髄液体培養を実施し，赤血球増加率及び血色素増加率を患者例及び対照健康人に於いて比較検討した．其の方法は教室岩崎，久米田の改良方法により行つた．之を少し詳細に述べると再生不良性貧血患者の胸骨及び腸骨よ

り得られた骨髄穿刺液 0.5 cc を，10 cc の Gey 氏液を入れたスピツ Glas に投入して低速にて5分間遠心沈澱器にかけ，遠沈後，上清を捨てて，小ピペットにて沈澱物を吸取り葡萄糖を含まぬタイロード氏Ⅰ，Ⅱ液各3 cc を分注した小試験管の液中に充分混和した後側室の無い Warburg の Bottle に2 cc 宛を分注する．この Bottle を Warburg の恒温槽 38°C 中で振盪培養を行つた．

2） 赤血球数と血色素量に就いて培養直前及び培養後3, 6, 9時間目に観察を行つた．

イ） 赤血球数： Warburg 恒温槽で振盪中の細胞浮游液を滅菌した赤血球数測定用メランヂュールに吸いハイエム氏液に混じてビユルカー計算盤で型通り計算した．

ロ） 骨髄血色素量： 1/15 モル第一燐酸カリ溶液 22.0 cc と第二燐酸ソーダ 3 cc を混和した燐酸緩衝液 1 cc に蒸溜水 3 cc を加え計 4 cc とする．（A液）之を4倍に稀釈したもの 4 cc を小試験管2本に分注する．次に Warburg の Bottle からピペットで時計皿に血球浮游液を約 1.5 cc 宛採取し血色素量測定用メランヂュールで規定目盛 0.2 cc 迄採取し，A液内に吹き込み2～3回A液でメランヂュール内を洗滌する．之に20%フェロチアンカリ液1滴宛を加え2000～3000回，回転，5分間遠沈を行い，之にフェロチアンカリを加えた時間から10分後に5%チアンカカリ，1滴宛を加え，更に2分後に強アンモニア液，1滴を加えて10分以内に Beckman 分光光度計にかけてA液のみ含む試験管内容を対照として各3, 6, 9時間目の血色素量の増加率を検討した．分光光度計は波長 540 mμ を用い血色素量換算には第1表を用いた．亦，培養開始迄は出来る限り

第 1 表

Gey's solution	第 1 液 citrated balanced salt solu.	第 二 液 balanced salt solu.
$Na_2C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (Citrat-Na)	5.0	—
NaCl	6.8	8.0
KCl	0.37	0.37
$NaHCO_3$	0.23	0.23
$CaCl_2$	0.17	0.15
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.21	0.21
KH_2PO_4	0.03	0.03
Na_2HPO_4	0.15	0.15
$MgSO_4$	0.07	0.07
Doxtrose	1.0	1.0

Transmittance absorbance	Hemoglobine mg/dl
99	90
98	190
97	290
96	395
95	500
94	615
93	740
92	865
91	980
90	1100

短時間となる様に努力したが約10分を要した．

第3章 実 験 成 績

第1節 健康人骨髄組織液体培養

健康人壮年男子8名，女子2名に就いて夫々胸骨穿刺を行い，其の穿刺について上述の如く液体培養を行い培養後経過を追つて赤血球数及び血色素量を測定し，夫々の増加率を求めた．

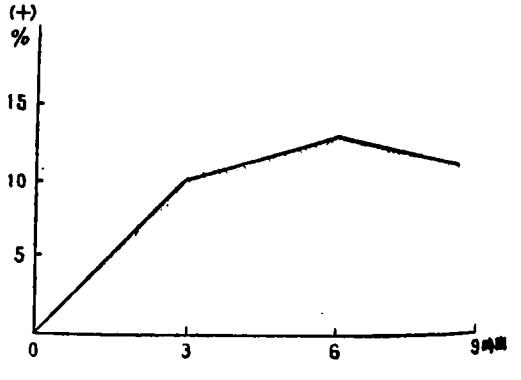
第1項 赤血球数：

全例の赤血球数の推移は第2表に示す通りであるが培養直前の赤血球数は勿論各例不同のため各々の増減百分率を求めて第2表に示し，夫々の平均増減率を第1図に示した．培養3時間に於いては赤血球は培養前の値より増加し最高21%，より最低1%，平均10.3%の増加を示した．次いで培養6時間値では最高23%より最低0%，平均13.1%の増加を示し又，9時間値に於いては最高23%より最低3%，平均11%の増加を認めた．以上要するに赤血球数は培養前に比し3, 6, 9時間と僅かながら増加の傾向を認めた．

第2項 血色素量：

全例の血色素量の推移は第3表に示す通りであるが，培養直前の血色素量は各例不同である事は赤血

第1図 健康人赤血球数増加率（平均）



第 2 表　健康人赤血球数推移及び増加率（%）

時間 / 氏名		前	3時間	増加率	6時間	増加率	9時間	増加率
		(万)	(万)		(万)		(万)	
No. 1	♂ 25才	670	730	8	790	17	710	6
No. 2	♀ 28才	770	880	14	920	19	920	14
No. 3	♂ 31才	840	960	16	960	16	890	5
No. 4	♂ 20才	810	920	9	960	18	960	9
No. 5	♀ 25才	760	890	17	940	23	940	23
No. 6	♂ 23才	890	980	10	890	0	920	3
No. 7	♂ 21才	710	740	4	780	10	780	9
No. 8	♂ 30才	815	825	1	890	9	890	9
No. 9	♂ 25才	790	820	3	890	13	870	18
No. 10	♂ 34才	710	860	21	820	15	840	18
平均 (%)				10.3		13.1		11.2

第 3 表　健康人血色素量推移及び増加率（%）

時間 / 氏名		前	3時間	増加率	6時間	増加率	9時間	増加率
		mg/dl	mg/dl		mg/dl		mg/dl	
No. 1	♂ 25才	980	988	0.8	988	0.8	988	0.8
No. 2	♀ 28才	1100	1140	3.6	1100	0	1140	3.6
No. 3	♂ 31才	1100	1100	0	1162	5.4	1162	5.4
No. 4	♂ 20才	1162	1162	0	1225	5.4	1225	5.4
No. 5	♀ 25才	1225	1262	3	1262	3	1262	3
No. 6	♂ 23才	1225	1285	5	1285	5	1285	5
No. 7	♂ 21才	675	740	9	740	9	740	9
No. 8	♂ 30才	865	865	0	892	3.1	892	3.1
No. 9	♂ 25才	1225	1345	9	1225	0	1225	0
No. 10	♂ 34才	1225	1225	0	1285	4	1285	4
平均 (%)				3		3.6		3.6

球と同一であり，同様に百分率を以つて培養後の推移を窺つた．即ち各々の百分率は第3表に示す如くで，培養3時間に於いては血色素量は最高9%，最低0%，平均3%の増加を示し，又6時間に於いては最高9%，最低0.8%，平均3.6%の増加を示した．次いで9時間に於いては最高9%，最低0%，平均3.6%の増加を示した．

以上要するに血色素量は培養前に比し3時間目に於いて稍々増加を示し，以後6,9時間共に3時間値と略々平行した増加率を示した．

第2節　再生不良性貧血骨髄組織液体培養

本症患者14例に就いて病型別に夫々赤血球数及び血色素量を時間を追つて測定し，夫々増減量を求めた．

第1項　赤血球数（第4表）

Ⅰ型：（主として骨髄内血球抑留型）

本型に属する4例に就いて時間を追つて観察するに，第4表(A)に示す通り培養直前の赤血球数は勿論各例不同であるため，各々の増減百分率を求めて同じく第4表(A)に示し，夫々の平均増減率を第2図に示した．3時間に於いては菅谷例5%，河上例4%の増加を示し，渡辺例0.7%，佐藤例9%の減少を示し，結局全例では平均0.7%の減少を示した．又，6時間に於いては4例共に最高7%，最低10%，平均13.5%の減少を示し，9時間にては最高21%，最低35%，平均27%の減少を示した．

以上3時間値に於いては培養前と有意の差なきも6時間値，9時間値と漸次減少を示した．

第4表（A）　赤血球数推移及び増加率（%）　　Ⅰ型

培養時間	前	3時間		6時間		9時間	
氏名			増加率		増加率		増加率
	(万)	(万)		(万)		(万)	
No. 1 菅谷	200	210	5	170	−7	156	−22
No. 2 渡辺	292	290	−0.7	262	−10	240	−21
No. 3 佐藤	210	190	−9	161	−19	136	−35
No. 4 河上	228	235	4	187	−18	159	−30
平均 (%)			−0.7		−13.5		−27

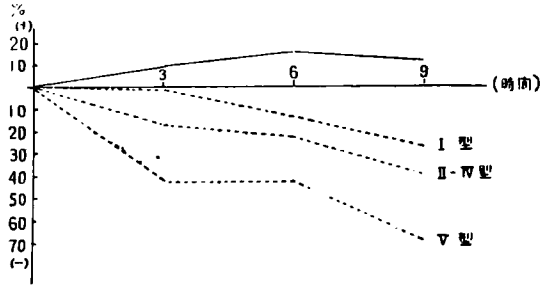
第4表（B）　赤血球数推移及び増加率（%）　Ⅱ～Ⅳ型

培養時間	前	3時間		6時間		9時間	
氏名			増加率		増加率		増加率
	(万)	(万)		(万)		(万)	
No. 1 横田	180	162	−10	114	−36	100	−44
No. 2 成本	262	250	−5	242	−8	242	−8
No. 3 藤原	272	280	3	262	−4	202	−26
No. 4 秋山	220	142	−35	130	−41	70	−68
No. 5 藤井	170	160	−6	134	−21	90	−47
No. 6 久保	140	122	−13	130	−7	90	−36
No. 7 山本	230	135	−41	144	−37	127	−45
平均 (%)			−15		−22		−39

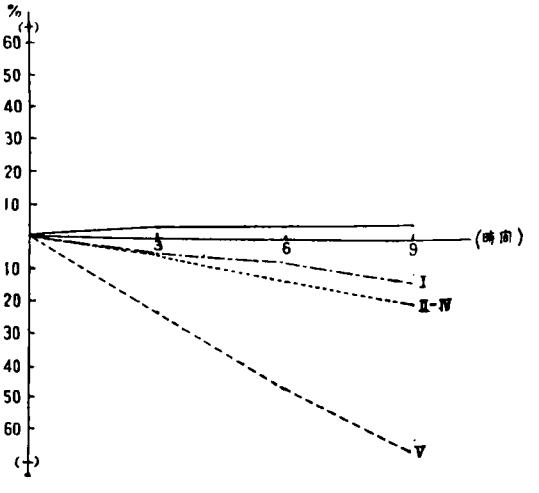
第4表（C）　赤血球数推移及び増加率（%）　　Ⅴ型

培養時間	前	3時間		6時間		9時間	
氏名			増加率		増加率		増加率
	(万)	(万)		(万)		(万)	
No. 1 島本	42	22	−47	20	−52	13	−69
No. 2 真鍋	120	71	−41	78	−35	30	−75
No. 3 石川	64	42	−34	40	−38	24	−63
平均 (%)			−41		−42		−69

第2図　赤血球増加率（再不貧血各型）平均値



第3図　血色素増加率（再不貧血各型）平均値



Ⅱ～Ⅳ型：（主として成熟抑制，生成障碍，混合）

本症に属する7例に就いて時間を追つて観察するに第4表(B)に示す如く3時間値に於いて藤原例を除いて最低5%，最高41%，平均15%の減少を示し

6時間値に於いては最高41%，最低4%，平均22%の減少を示し9時間値に於いては最低8%，最高47%，平均39%の減少を示した．

尚藤原例は3時間3%の増加を示したが，6時間値，9時間値は他の6例と同様減少の一途を辿つた(第4表(B))．

V型：（汎骨髄癆型）

本症に属する4例に就いて時間を追つて観察するに第4表(C)に示す如く，3時間値にて最低34%，最高47%，平均41%の減少を示し，6時間値にては最低35%，最高52%，平均42%の減少を示し，9時間値にては最低63%，最高75%，平均69%と著明なる低下を示した．

第2項　血色素量

I型

本型に属する4例に就いて時間を追つて観察をするに第5表-(A)に示す通りであるが，培養直前の血色素量は各例共不同である事は赤血球数と同一であつて同様に百分率を以つて比較を行つた．3時間値は4例中1例(河上例)を除いて最低6%，最高13%，平均3.3%の減少を示し，河上例のみは12%の増加を示した．6時間目に於いても河上例を除いて最低6%，最高16%，平均6.5%の減少を示し，河上例に於ては6%の増加を示した．又9時間目に於いては4例共に最低6%，最高12%，平均14%の減少を示した．

II～IV型

本型に属する7例に就いて時間を追つて其の推移を観察するに第5表(B)に示す如く3時間値は7例中3例（成本，藤井，久保例）は最高13%，最低8%，平均9.7%の増加を示したが，他の4例は最高31%，最低0%，平均14%の減少を示して居るため全例では平均3%の減少を示した．6時間値は7例中1例（横田例）を除いて最高31%，最低12%，平均13%の減少を示した．9時間値は最高32%，最低9%，平均19.5%を示し全例とも減少を示した．

以上要するに3時間値は個々により不定で一定の傾向を認め難いが，6時間値，9時間値は漸次減少の傾向を示した．

V型

本型に属する例に就いて時間を追つて其の推移を観察するに，第5表(C)に示す如く，3時間値は最高47%，最低34%，平均41%と中等度の減少を示した．6時間値は最高52%，最低35%，平均42%と著明に減少し，9時間値は最高75%，最低63%，平均69%と更に著明な減少を示した．

第5表（A）　血色素量推移及び増加率（%）　I型

培養時間	前	3時間		6時間		9時間	
氏名	mg/dl	mg/dl	増加率	mg/dl	増加率	mg/dl	増加率
No. 1 菅谷	802	740	−8	677	−16	615	−23
No. 2 渡辺	1040	980	−6	980	−6	980	−6
No. 3 佐藤	922	802	−13	802	−13	740	−20
No. 4 河上	980	1100	−12	1040	6	865	−12
平均 (%)			−3.3		−6.5		−14

第5表（B）　血色素量推移及び増加率（%）　II～IV型

培養時間	前	3時間		6時間		9時間	
氏名	mg/dl	mg/dl	増加率	mg/dl	増加率	mg/dl	増加率
No. 1 横田	740	740	0	802	8	675	−10
No. 2 成本	677	740	8	677	0	615	−9
No. 3 藤原	802	615	−23	615	−23	615	−23
No. 4 秋山	802	557	−31	557	−31	557	−31
No. 5 藤井	740	802	−8	615	−17	500	−32
No. 6 久保	865	980	13	740	−14	740	−14
No. 7 山本	980	980	0	865	−12	822	−16
平均 (%)			−3		−13		−19.5

第5表（C） 血色素量推移及び増加率（%） V型

培養時間	前	3時間		6時間		9時間	
氏名	mg/dl	mg/dl	増加率	mg/dl	増加率	mg/dl	増加率
No. 1 島本	215	190	−12	90	−58	90	−58
No. 2 真鍋	342	140	−59	190	−44	90	−74
No. 3 石川	240	290	21	140	−42	90	−63
平均 (%)			−22		−47		−66

第4章 総括並びに考按

再生不良性貧血患者骨髄を教室久米田，岩崎の考按せる液体培養法にて培養し，赤血球数及び血色素量の測定を行つた結果を総括すれば次の如くなる．

先づ対照として健康人骨髄の液体培養では培養開始後，3時間目で血色素量は培養前の値より3%増加し，其の後6時間，9時間後も略々同じ値を維持した．一方赤血球数は培養後3時間目で培養前の値より10.3%増量し，其の後，6時間及び9時間後では夫々増量の傾向を示した．

再生不良性貧血患者骨髄の液体培養では先づ赤血球数に就いてみれば，骨髄の変化の最も軽い骨髄内血球抑留型（I型）では培養3時間後，培養前の値に比し平均7%減少し，以後時間を追つて益々減少の傾向を示し，9時間目では培養前の値に比し27%減少した．成熟障碍型（II型）生成障碍型（III型）及び混合型（IV型）ではI型に比しいづれも僅か乍ら減少率が大であつた．一方，汎骨髄癆型（V型）は高度に減少を示し，I型の約3倍の減少を示した．

次いで血色素量の変動を見るに，I型，II～IV型，V型のいづれも培養後3時間目にすでに減少の傾向を示し，健康人対照とは逆に益々時間の経過と共に減少したが，各型の間ではV型を除いては赤血球数に認められた程の有意の差は示さなかつた．

以上要するに赤血球数は健康人では培養後3, 6, 9時間で略々同様で培養前に比し増加を示すが，再生不良性貧血患者ではいづれも培養3時間後既に減少の傾向を示し，時間の経過と共に益々減少し，然も減少の度はI型で最も軽くV型で最も高度であつた．血色素量は健康人では培養後増加の一途を辿るも本症患者例では培養後減少しV型に於いて特に著明な減少を認めた．

飜つて人骨髄の液体培養に於て液体メヂューム中での赤血球数の変動に関与する要因を挙げると，最初培養を開始した時に既にある成熟赤血球が時間と共に次第に崩壊することが先づ考えられる．次に増加を来たす源としては，骨髄内に含まれている赤芽球が成熟して成熟赤血球になることが充分考えられ，又赤芽球の分裂増殖の可能性も，もとよりある．即ち健康人骨髄の場合に若干の増加を認めたことはこの増減2つの要因の差として赤芽球よりの成熟赤血球形成が既存の赤血球の崩壊を陵駕したためであり，一方，再生不良性貧血患者骨髄では逆に崩壊の方が赤血球の形成よりも相対的に激しい事を示している．然るに，本症患者赤血球の脆弱性の有無に関して長谷川[32]は，溶血指数が正常範囲に有る事，更にAshby[33]の方法により輸血血球の寿命を観察し健康人血球と比較して何等差がないことから結論として，本症では体内に於ける赤血球の脆弱性はなく，又，溶血昂進の事実はないと述べている．この点を考慮に入れて私の成績を考えれば，恐らく赤芽球から成熟赤血球が作られるのが不充分なため，かかる減少を示したものと推測される．

ここで本症骨髄の病理解剖に於ける赤芽球系細胞について平福[18]は次の如く述べている．

本症の赤芽球は大小不同で核に特有な分芽を生ずるのが特徴的であるとし，これは赤芽球の成熟障碍を意味するものであろうと述べている．かかる所見は赤芽球の増殖が認められる再生不良性貧血のErythroblastenmak 型と称するものに於いて特に著明であるので，かかる型が如何に有核細胞数が多く，一見赤芽球系の Hyperplasie の如く見えても，これは骨髄の他の部位で造血巣の容積が全体として減少したため代償的に再生現象として起つたものと考えるべきではないと云い，これは赤芽球系の成熟障碍に基くところの見掛上の Hyperplasie に過ぎないと推論している．この解釈は私の実験成績により一層，明白に裏付けされたと云えよう．即ち私の分類したI型では有核細胞数多く，赤芽球系はむしろ増加を示したが培養上は決して赤血球数の増加をもたらさず健康人よりも遙に低い値を示し，明らか

に赤芽球系に成熟障碍の存することを示した．然してⅡ～Ⅳ型の如く赤芽球系の低形成を示すものは勿論，Ⅰ型より赤血球数減少著明であつたし，又Ⅴ型の如き無形成の例では極度の赤血球数低下を示したのは当然で，この場合は既存の成熟赤血球は崩壊するのみで，それを補う赤芽球よりの赤血球は形成は全く期待されないものである．

骨髄機能を代謝の面より検討した教室西内[28]のワールブルグ検圧計による本症患者骨髄穿刺液の呼吸値測定の結果は，Ⅰ型では軽度にⅡ～Ⅳ型では中等度に，Ⅴ型では高度に低下を認めているが呼吸は赤血球系細胞と密接な関係があることより私の成績と照合して興味がある．

更に前編で述べた白血球系細胞の増生及び機能の面で病型別に可成り特異性があつたが，これは以上の赤血球系造血に関して各病型別に見られた程度の差とほぼ同じ傾向であり，ここで赤・白両血球系を総括してみれば，要するに本症の臨床的分類としてⅠ～Ⅴ型に分つことが同時に本症の骨髄機能，即ち赤血球造血及び白血球系造血の状態を如実に表わしていると云えよう．

次いで本症に於ける血色素形成に就いて見るに私の血色素量に関する実験成績では健康人では赤血球数の増加と同様に増量の傾向を示すが，時間の経過と共に赤血球数は各々増加するにも拘わらず血色素量は一定時間後は略々不変である．この様に血色素の増量はあるも，赤血球数の増加に比べて著明でないのは，もとよりメヂューム内の鉄の不足に基ずくものと思われる．

さて再生不良性貧血患者では血色素は一般に培養後減少するが，この際にも赤血球数に於いて見られる様にⅠ型に於いて最も減少が少くⅤ型に於いて最も著明な減少が見られた．

即ち当然ながら本症骨髄の血色素の形成不全は赤血球形成不全と相関々係を有するものである事を示している．要するに本症では赤血球形成障碍に伴つて血色素の形成障碍があり，培地メヂューム中の血色素量は新たに形成されるよりも分解される方が多いと云う結果を示した．

第5章 結　　論

再生不良性貧血患者の骨髄組織を教室久米田，岩崎の改良した液体培養法を用いて培養し，赤血球数及び血色素量の変動を測定して健康人のそれと比較検討し，次に述べる如き結果を得た．

1) 再生不良性貧血患者骨髄の液体培養では赤血球数及び血色素量は培養後3時間目に既に培養前の値より減少し，以後漸次低下の傾向を示した．対照の健康人では培養後3時間目に前の値より夫々増加し，其の後も終始同様に増加の傾向を示した．

2) 再生不良性貧血患者を病型別に見れば赤血球数減少の度はⅠ型で最も軽くⅡ～Ⅳ型がこれに次ぎ，Ⅴ型が最も高度であつた．一方，血色素量の減少の度も同様にⅠ型で最も軽くⅡ～Ⅳ型がこれに次ぎ，Ⅴ型が最も高度であつた．

擱筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りたる恩師平木教授並びに大藤助教授に深甚なる謝意を表す．

（本論文の要旨は昭和32年日本血液学会第19回総会に於て発表した）．

Studies on Hypoplastic Anemia by means of Bone-Marrow Tissue Culture

Part 2. Bone-Marrow Tissue Culture of Hypoplastic Anemia in Fluid Medium

By

Tetsuya Uji

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

By conducting bone-marrow tissue culture of hypoplastic anemia in fluid medium, the method modified by Kumeda and Iwasaki of our department, the author calculated the erythrocyte count and determined the change in the hemoglobin content: and comparing these results with those in normal persons, obtained the following results:

1. In the bone-marrow tissue culture of hypoplastic anemia in the fluid medium, the erythrocyte count and hemoglobin content after three hours' culture already showed values lower than those before the culture; and thereafter tended to decrease gradually. In the case case of the control, normal persons, each of these values after three hours' culture was higher than that before culture, showing a gradual increase thereafter.

2. Looking hypoplastic anemia according to the types of this disease, the degree of decrease in the erythrocyte count was least in Type I, followed by Types II—IV, and it was highest in Type V.

Similarly the decrease in the hemoglobin content was least in Type I, followed by Types II—IV and it was highest in Type V.