

赤芽球分化に関する研究：多血動物瀉血後の 骨髓赤芽球分化の形態的観察

岡山大学医学部第一病理学教室（指導：妹尾左知丸教授）

中 塚 久

（昭和54年11月16日受稿）

Key words : 多血動物, 赤芽球分化
骨髓赤芽球前駆細胞, 末梢血液幹細胞

諸 言

1961年 Till と McCulloch により開発された脾コロニー法及び Becker²⁾らの特殊染色体 T₆マーカーを有するマウスを用いた実験により、血液細胞は単一のクローンから分化することが証明された。即ち、彼等は一定数のマウス骨髓細胞を全身致死照射マウスの静脈内に移植すると脾に未分化細胞のコロニーができ、それがやがて赤芽球コロニー・顆粒球コロニー・巨核球コロニー等に分化するのを見た。しかしこれらのコロニーの中には各種の細胞を含む混合コロニーも認められ、夫々のコロニーは一つの細胞 (Single Cell) から出発することが示された²⁾。これらの実験結果は、血球には共通の幹細胞があって、この幹細胞は多分化能を有し、赤芽球・顆粒球・巨核球・その他の血液細胞に分化することを示し、Maximow の一元論³⁾に有力な支持を与えることになった。更に、この多分化能性幹細胞はコロニー再移植の実験から自己複製能を有し、分化に向うことなく増殖することができることも明らかになった^{4),5)}。周知の如く、このような多分化能幹細胞に対してマウス脾コロニー形成単位 Colony forming unit in Spleen (CFUs) という名前が与えられた。このように、CFUs は多分化能をもつ血球幹細胞であることには間違いがないが、予期に反して CFUs はサイミジン自殺実験 (tymidine Suicide test) では生きのびることが証明され、CFUs は正常では殆んど DNA 合成を行わず Go 又は G₁ 期にあることが証明された⁴⁾。これらの事実は、CFUs は各種血球の増殖要求度に応

じて夫々の血球を補充する為に細胞周期に入り、赤芽球・顆粒球・或は巨核球等の前駆細胞 (Comitted Stem Cell), 即ち Colony forming unit in Culture (CFUc), Erythropoietin responsive cell (ERC), 及び Colony forming unit for megakaryocyte (CFU-M⁸⁾) 等に分化することを示すものと考えられる。然し、脾コロニー形成実験からも明らかのように、分化の為に少くとも数日を要することも確かである。従って、非常に早く回転している日常の赤芽球・顆粒球等の産生は、自己増殖能をもつ CFU_E・CFU_C 等によって行われているものと考えられる。

こうして一応幹細胞の新しい概念は生れたが、CFU_S・CFU_C・ERC 等はどうのような形態の細胞なのか、現在迄に正確な形態学的特徴はつかまえていない。

CFU_S の赤芽球系細胞への分化は、ERC の投階で体液因子エリスロポエチン (EP) により誘導されることは明瞭で、ERC は EP の作用で赤芽球に分化する^{9),10)}。ERC の前段階の細胞と考えられる BFU_E も EP で赤芽球に誘導されるが、著しい高濃度を必要とし¹¹⁾、生理的に EP の作用を受けて分化することは考えられない。

貧血で赤血球が不足する場合、或は空気中の O₂ が減少して O₂ 欠乏を起すような場合には、血中の EP 濃度が上り赤芽球の増生が起り、逆に多血症で赤血球が過剰になり充分な O₂ が得られる場合には、EP の血中濃度は低下ないし消失することが知られている¹²⁾。例えば、同系動物の赤血球浮遊液を繰返し腹腔内に輸血することによりヘマトクリットが65%に

もなった実験的多血症マウスでは、赤芽球の分化が停止するが、この状態でEPを注射すると、注射後24時間で前赤芽球が出現し、48時間たつと成熟赤芽球迄分化するといわれる⁹⁾。

EPは又赤芽球の成熟分裂をも促進するといわれる¹³⁾。Goldwasser¹⁴⁾によると、骨髓の細胞をEPを含む培養すると5分後には赤芽球分化と関係のあるm-RNAの合成が起り、2時間後にはDNA合成が起り、3時間後には鉄の摂取、6時間後には幼若細胞にヘモグロビン合成がみられる。三浦ら¹⁵⁾の輸血多血症マウスの骨髓を用いた invitro の実験では、EP作用後4時間以内にDNA合成細胞が起り、18~24時間で赤芽球は最終分化段階まで達すると云う。

以上の実験結果とも関連して、赤芽球の前駆細胞から形態学的に認識できる最も幼若な赤芽球、即ち前赤芽球への分化に要する時間については報告者により又実験方法の相違により著しい差異がある。C-FUsからの分化は一応別として、ERCからの分化と考えられるものについて見ても大動脈吻合パラピオージス法では42時間^{16),17)}、多血動物にEPを注射した後48時間⁹⁾、或は12時間以内¹⁴⁾等と報告されている。このような差異が何に起因するかについては充分明らかでないが、一つの可能性としては各研究者によって少しづつ観察の方法や条件が異なるので、ERCの数が非常に少い時には存在が認識される迄には或程度の分裂による数の増加を必要とし、比較的長時間を要する。一方、ERCの数が非常に多い場合には発見が容易であり、赤芽球が認識される迄に要する時間が比較的短かく、正確に測定できるのではないかと考えられる。竹林¹⁸⁾は高度の貧血家兎に一時に大量輸血し赤血球数を正常に戻すと、骨髓中の赤芽球が速やかに消失すると共に末梢血赤血球数が2・3日の内に著しい増加を示し、この時点で骨髓には細網細胞様幼若細胞が充滿していると報告している。これらの細胞は赤芽球への分化が阻止されたERCと考えられるので、この状態で急激な瀉血を行えば生体内でERCからの赤芽球への分化に要する時間がかなり正確に把握できるのではないかと考えられる。このような考えのもとに著者はラットに一回大量の瀉血による高度の貧血を起し、これに急激に大量の輸血を行ってHtを70%以上の高値とし、1週間後大量瀉血を行って赤芽球分化の状態を経時的に観察した。

このような状態下では、幼若赤芽球の分化は6時間で誘導され、24時間で全ての分化段階にある赤芽

球を観察することができた。

実験材料及び実験方法

実験動物としては、体重280~300gのウィスター内交系成熟雄ラット75匹を用いた。別に同系ラット300匹を供血動物として用いた。

動物は4群に分け、第1・第2群夫々5匹、第3群55匹、第4群5匹とした。第1群の5匹は貧血動物とし、第2群の5匹は第1群の貧血動物を急激に多血状態としたもの、第3群の55匹第2群と同様の処置後急激に瀉血したもので、第4群の5匹は正常対照動物とした。

第1・2・3群の65匹の動物は1回大量瀉血して、24時間後のHt値を約25%とした。瀉血は、眼窩後部の静脈叢にヘマトクリット用毛細管を挿入して行った。第1群の動物はこの時点で屠殺した。第2・3群の60匹の動物は、夫々赤血球生食浮遊液 $5-6 \times 10^6/ml$ を1回7mlあて腹腔内に5回注射した。即ち初日は1日3回、2日目は1日2回注射し、3日目にHt略70%であることを確認した後1週間まで隔日1回注射した。第2群の5匹の動物は輸血開始後1週間で屠殺した。第3群の55匹の動物は更に瀉血しながら輸液及び血清注射を行った。瀉血による貧血はHt値25%前後を目標とした。即ち、瀉血と同時に陰茎静脈より生食、5%グルコース及び健常ラット血清1:1:1の割合に混じたものを補液した。瀉血は緩徐に行い終了までに約30分を要した。又瀉血終了後、あらかじめ用意しておいた同系貧血動物血清約6mlを静脈内に注入した。瀉血終了後3・6・9・12・18・24・30・36・42・48及び72時間目に各々5匹の動物を屠殺した。尚第4群の動物は無処置のまま屠殺した。全ての動物は屠殺前に眼窩静脈洞より採血し、Ht値を測定する一方、1滴を超生体染色後塗沫標本とし、ギムザ染色を施して網状赤血球を算定した。全ての動物は屠殺後左側大腿骨を取出し、一部塗沫標本とし、乾燥し、メタノール固定後メイグリューンワルド・ギムザ染色を施し細胞形態の観察及び骨髓細胞の分類を行い、残余のものは10%ホルマリン固定パラフィン包埋後ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、骨髓組織の観察に供した。

輸血用赤血球浮遊液の調整：同系健常動物約300匹の眼窩後静脈叢にヘマトクリット用毛細管を挿入し流出する血液を適量のヘパリンナトリウムを含む氷冷生食液中に採った。採取は血液を攪拌しながら行い凝血を防いだ。採血後2000rpm15分間遠沈し、

上清を捨て、更に血球成分2倍量の生食にて3回洗浄した。血球成分上層部の白血球成分は可能な限りピペットで吸引除去した。3回洗浄後、沈下した赤血球成分に等量の生食を加え赤血球浮遊液とし、腹腔内輸血に用いた。

貧血動物血清の調整：上記健常内系動物300匹の動物の瀉血2日後の血液を採血し、集めた血液を1昼夜静置し、分離した上清を用いた。尚、採血、血清採集、輸血時の器具は全て滅菌したものをを用いた。

網赤血球(RC)算定法：0.1%ブリアントクレシールブルー生理食塩水溶液1滴をオブセクトグラスにとり、末梢血液1滴を加えて細いガラス棒でよく混和し、塗沫、メタノール固定を施した後、ギムザ染色標本とした。網赤血球は超感染時の姿を再現するので、RBC1,000個を数え網赤血球数を0/00として算出した。

骨髓塗沫標本の作製法：骨髓の小組織片にラット血清1滴を加え、2枚のオブセクトグラスの間に挟み、静かに加圧して細胞を遊離させたものを塗沫、乾燥し、メタノールで瞬間固定後、メイグリュエンワルド・ギムザ染色を施した。

骨髓切片標本の作製：大腿骨を骨鉗子で軽く挟んで割り、内部の骨髓組織を取出し、10%中性フォルマリンで2日間固定し、型の如くパラフィン包埋後、組織切片標本を作製し、H-E染色を施した。

実験結果

第4群の健常な対照雄ウィスターラット5匹、及び全動物の中任意の5匹を選んで実験開始直前に測定されたHt値は約50%であり、RC数は20%以下であった。第1、2、3群の70匹の動物では全て前項で述べた方法で瀉血したが、第1群の5匹について測定した結果では、1回瀉血を行うと24時間後にはHtは約25~30%に低下し、RCは既に約60%と、上昇した。この時点で第1群の動物5匹は屠殺し、第2群第3群の動物には赤血球浮遊液を前項で述べた方法で大量輸血し多血動物とした。第2群の5匹について観察した結果では、輸血の後にはHtは70~75%となった。第2群の動物はこの時点で屠殺した。第3群の55匹の動物には大量の瀉血と輸液を行い、多血状態から30分間で大量瀉血しHt値約20%の貧血状態にした。これらの動物はこの貧血状態から最初の12時間までは3時間毎、その後は6時間毎に5匹宛屠殺したが、屠殺時に測定した網赤血球数の変動を見ると、瀉血9時間からRCが次第に上昇し

12~18時間で一時停滞、その後は48時間まで略指数函数的に上昇を示し約43%に至り、その後減少して72時間後には22%で略健常動物と同値となった(Fig1)。

次に各群の動物の骨髓の塗沫標本、及び骨髓切片標本について述べる。

第1群の瀉血貧血動物の骨髓は赤芽球過形成を示し赤芽球が骨髓有核全細胞数の45~50%を占め、骨髓有核細胞全細胞数に対する骨髓赤芽球数比E/Tは高値を示している。組織切片で無処置対照動物(Fig2-A)に比し核の濃染する赤芽球群が著明に増加しているのが認められる(Fig2-B)。この状態で急激に赤血球輸血を行い多血状態としたものでは、骨髓は赤芽球が著しく減少し、大型の芽球様細胞と著明に増加した顆粒球によって占められている(Fig2-C)。

組織切片を強拡大で見ると赤芽球は殆んどなく組織が顆粒球と大型の細網細胞様細胞で核の好塩基性が弱い細胞で占められ、他の組織と比較すると全体として非常に染色状態がわるいように見える(Fig2-C,D)。骨髓塗沫標本で見るとこれらの細胞はリンパ芽球ないし細網細胞様形態を呈する(Fig2-E,F,G)。このような骨髓をもつ多血動物を大量瀉血し経時的に観察すると、瀉血後3時間目に既に大型で細胞質がやや好塩基性に染まる前赤芽球が出現する(Fig2-H)。瀉血後6時間の組織切片では、これら大型の前赤芽球と思われる幼若細胞が僅かながら集簇を形成して増殖しているのがみられる(Fig2-I)。この時点で成熟型赤芽球数の増加も明瞭である(Fig3)。瀉血後9時間から12時間を経過すると組織切片では6時間ないし9時間で比較的明瞭であった赤芽球集簇が、明瞭に認められるようになり(Fig2-J)、E/T比の増大が顕著である(Fig3)。塗沫標本では前赤芽球及び好塩基性赤芽球と明瞭に認められる細胞が増加する(Fig2-K)。瀉血後12時間で赤芽球数は一過性に減少する(Fig3)。瀉血後18時間でE/T値は再度上昇の傾向を示し(Fig3)。24時間を経過すると骨髓塗沫標本では、増加した好塩基性赤芽球及び以降の分化段階にある赤芽球系細胞が目立つようになり(Fig2-L,M, Fig3)、組織切片では赤芽球集簇は更に増加しているのが認められる(Fig2-N)。瀉血後36時間まで赤芽球比は増加するが、特に好塩基性赤芽球数の増加が顕著である。その後E/T比は増減したが、成熟型赤芽球の増加が主体となり72時間までに健常動物の骨髓像に類似した所見を示すようになる(Fig3, Fig2-O)。Fig3は骨髓の赤芽球対骨髓全有核細胞比及び赤芽球分類をまとめて示したものである。第4群の健

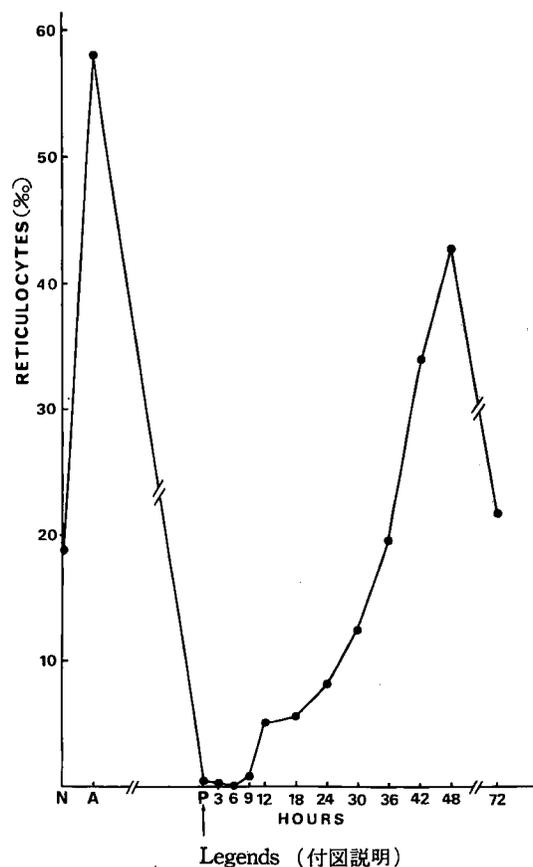
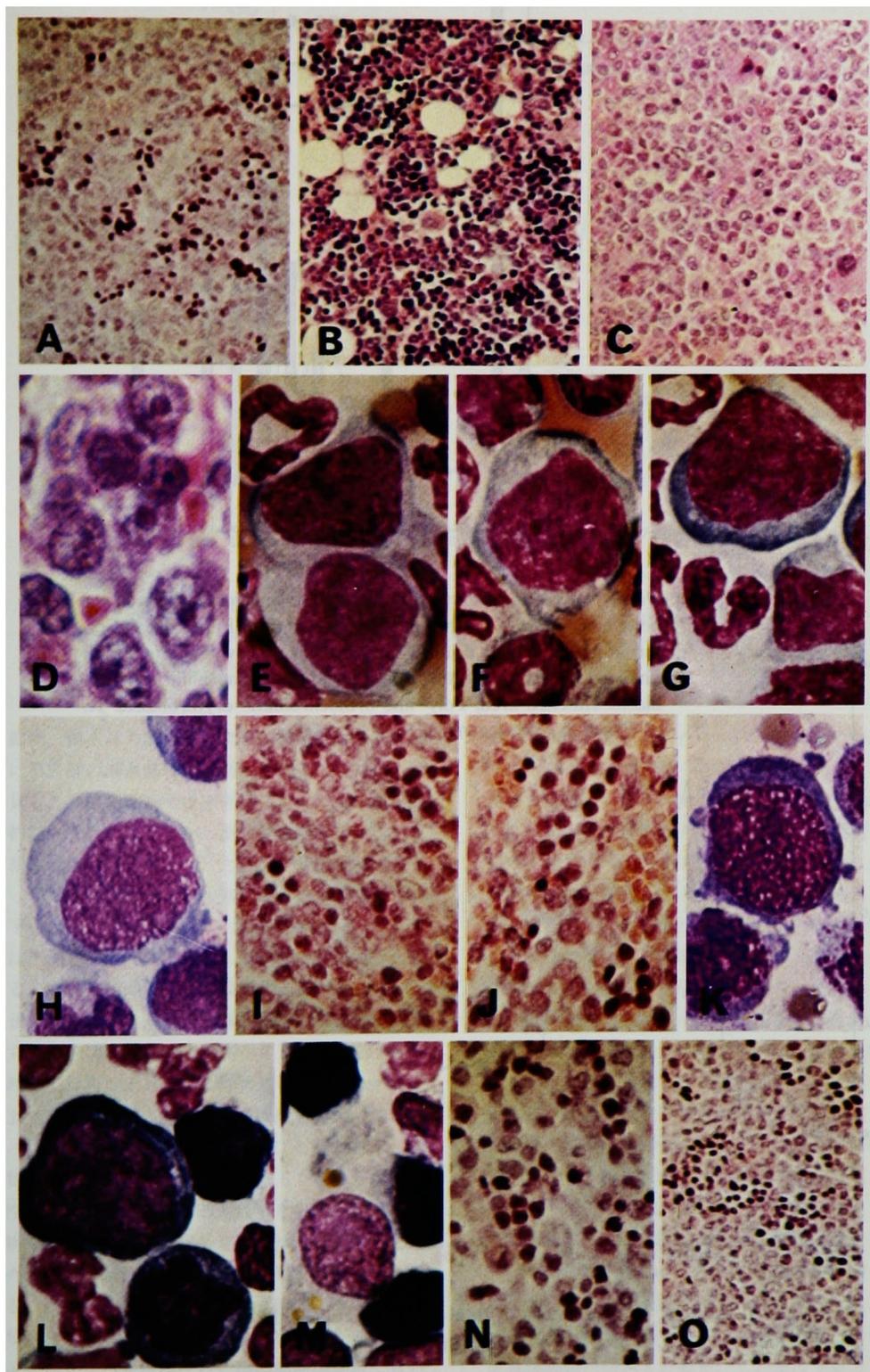


Fig. 1 Reticulocyte number in peripheral blood under normal, anemia and polycythemia, and anemic conditions after blood withdrawal. N; normal, A; anemia, P; polycythemia, ↑; Blood drawing.

Fig. 2 Cytohistologic pictures of bone marrow sections and smears. A; Normal bone marrow, 10x10. B; Bone marrow of an anemic animal with erythroid hyperplasia. 10x10. C; Bone marrow of a polycythemic rat showing myeloid marrow, 10x10. D; Enlarged picture of bone marrow of a polycythemic animal and shows reticulum cell-like cells having clear cytoplasm and a big nucleolus. 10x40. E-G; Smears from a polycythemic animals. Lymphoblastoid or reticulum cell-like cells appeared in bone marrow. 10x100. H; Proerythroblast like cell appeared 3 hours after blood withdrawal. 10x100. I; Bone marrow section 3 hours after blood withdrawal showing small erythroid cell clusters composed of primitive erythroid cells. 10x20. J; Bone marrow section 6 hours after blood letting. The erythroid clusters became prominent and increased in number with some mature ones. 10x20. K; A proerythroblasts having characteristic cytoplasmic basophilia and nuclear chromatin nets appears 6 hours after blood letting. 10x100. L; An early basophilic erythroblasts having deep basophilic cytoplasm and matured erythroblasts seen 12 hours after blood withdrawal. 10x100. M; Three matured erythroblasts being associated with a macrophage seen in the same field of smear as L. 10x100. N; Bone marrow section 12 hours after blood letting showing erythroid clusters. 10x20. O; Bone marrow section 72 hours after blood letting and shows the picture of erythropoiesis returned to normal. 10x10.

中塚 久論文附図



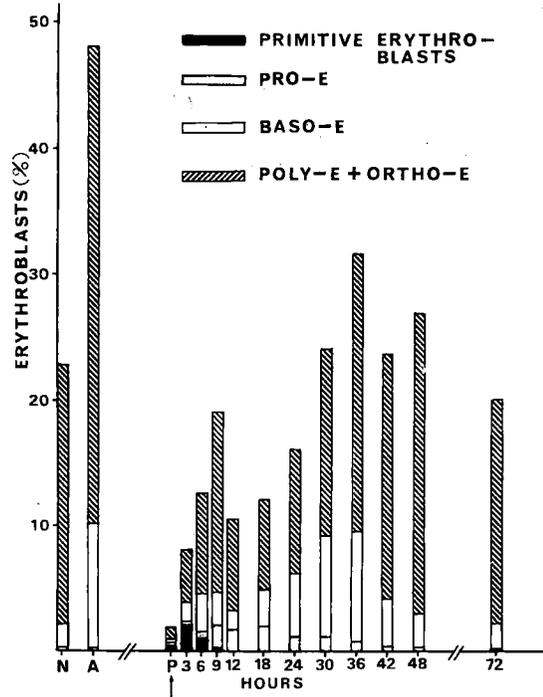


Fig. 3 Numerical ratios of erythrois cells to total nucleated cells in the bone marrow with erythroid cell classification. Filled area; Erythroid precursors or primitive erythroblasts shown in Fig 2E-H. Shaded area; Proerythroblasts. Open area; Basophilic erythroblasts. Hatched area; Poly- and orthochromatic erythroblasts. N, A, P and ↑; See legend in Fig 1.

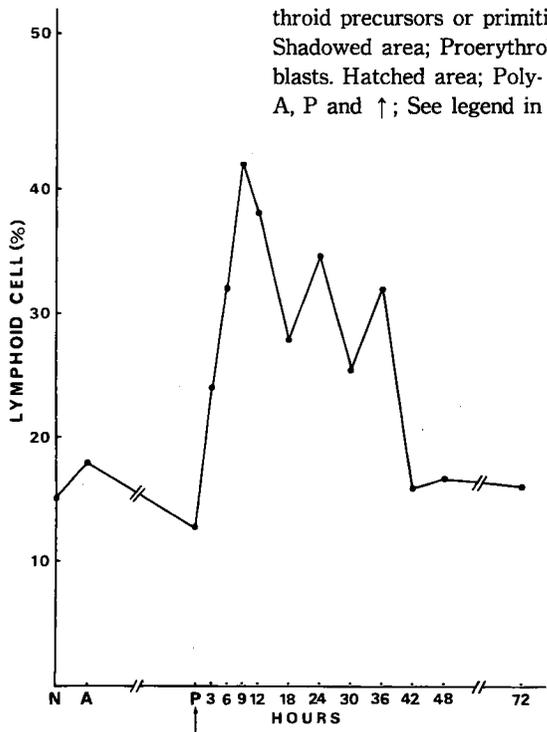


Fig. 4 Numerical ratios of lymphoid cells to total nucleated cells in the bone marrow. N, A, P and ↑; See legend in Fig 1.

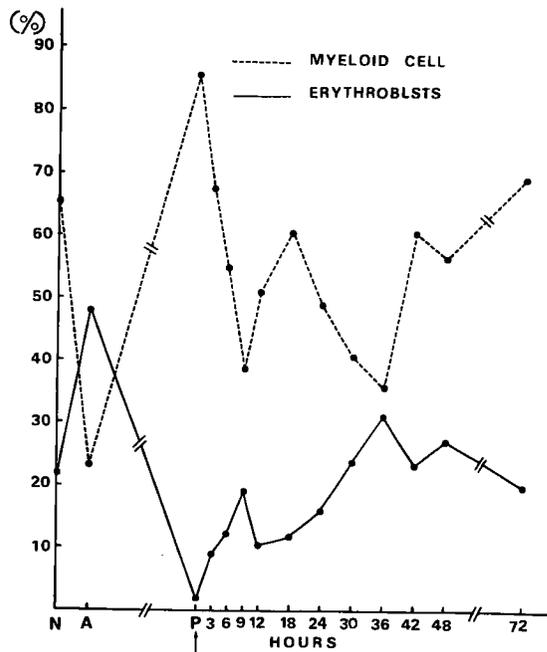


Fig. 5 Erythroid and myeloid cell number under normal, anemia and polycythemia, and anemic conditions after blood withdrawal. N, A, P and ↑; See legend in Fig 1.

常動物、第1群の瀉血貧血動物、第2群の多血動物、更に第3群の瀉血動物の時間的な骨髄赤芽球の動態を見ると、健常動物では赤芽球は骨髄全有核細胞数の約22%を占めているが、瀉血貧血動物においては赤芽球数は著しく増加し、これに大量赤血球輸血を行って多血状態にすると1週間目には赤芽球は2%以下となる。この多血動物では、瀉血後速やかにE/T比は増加し、6時間で13%、9時間では約18%に達する。その後12時間でやや減少する傾向を示すが、以後増加してゆき、36時間後には32%に達する。これら赤芽球は42時間でやや減少する傾向を示すが、48時間では再度上昇、72時間までに健常動物のレベルまでもどる。この赤芽球数の増減を分化の段階によって分類してみると次のようなことがわかる。即ち貧血動物では前赤芽球は1%以下で好塩基性、多染性及び正染性赤芽球が99%以下を占めるが、多血動物では前赤芽球、好塩基性赤芽球が殆んど見当らず、極めて少数の多染性及び正染性赤芽球を見るのみである。尚、多血動物及び瀉血後3時間で前赤芽球と分類されているものは形態的にFig2-E, F並びにGに示したリンパ芽球様ないし細網細胞様細胞で真の

前赤芽球は殆んど見られない。多血動物で特異なことはこれら大型のリンパ芽球ないし細網細胞と呼ばれる細胞 (Fig 2-E-G) が全体の25%以上を占め、これを前赤芽球とみなせば健常動物の約15倍も増加しているということである。これらの細胞は瀉血6時間後には激減し、この時点で前赤芽球類の細胞 (Fig 2-H) 並びに前赤芽球が出現し早期好塩基性赤芽球への分化傾向がみられる。瀉血後9時間では前赤芽球は少し増加し、多染性赤芽球への分化がうかがわれる。瀉血後12時間たつと好塩基性赤芽球が一過性に減少し多染性及び正染性赤芽球への分化が明瞭となり、24時間経過すると36時間まで前赤芽球の減少に伴い晚期好塩基性赤芽球の著増と多染性赤芽球、正染性赤芽球の増加が見られる。以後前赤芽球は漸減しE/T比の増加に伴い多染性及び正染性赤芽の増加がみられ、E/T比は増減を示すが72時間までに全てが健常動物の赤芽球造血の像に等しくなる。

赤芽球以外の細胞としては、骨髄リンパ球の分布は非常に特異的である (Fig 4)、ラットは末血にリンパ球が多く健常動物で約60~70%を占め、骨髄でも全有核細胞の15%を占める、この値は多血状態でも

殆んど変化がない(17%)。然し瀉血後増加し瀉血3時間後には24%に増加し、9時間後には41%と著明に増加する。その後18時間まで減少し、以後は12時間毎に増減をくり返し、72時間までに健常動物と同値となる。

顆粒球数は赤芽球の動きと逆向に動く傾向を示す(Fig 5)。即ち、多血動物では顆粒球髄を呈するが、瀉血後赤芽球の増加に伴い減少し、以後赤芽球の増減に伴って逆相関的に動く。

考 案

本実験は、エリスロポエチン反応細胞(ERC)の分化が、生体が貧血状態に陥った場合に、どの程度の時間で赤芽球に分化するかを知る目的で行ったものである。この実験系で著者は骨髓内 ERC の数が著しく増加していると考えられる瀉血貧血後大量輸血による多血状態から、更に急激な瀉血を行って一定時間隔で骨髓の検索を行った。上記実験結果から見られるように、多血状態で赤芽球分化が一時的に停止したラット骨髓では赤芽球前駆細胞から前赤芽球への分化は既に3~6時間までに起り(Fig2-H,I), 9時間までに好塩基性赤芽球及び多染性赤芽球まで分化して(Fig2-J, K, Fig3), 12時間までに第1相の赤芽球分化が終了する。これは多血状態で一時分化を止めていたか或いは分化が緩徐となっていた赤芽球前駆細胞が瀉血及びEPに相当する貧血動物血清注射により刺激されて速やかに赤芽球に分化したものと考えられ、これら前駆細胞はERCの中でも極めて前赤芽球に近い投階のものと考えられる。この実験結果は三浦らの多血マウスの実験¹⁵⁾に比べてずいぶん赤芽球分化が速いようであるが、飢餓ラット骨髓細胞にEP添加後5分以内にPNA合成が始まり2時間後にはDNA合成が起り、3時間後には鉄摂取、6時間後には幼若赤芽球にヘモグロビン合成がみられ、12時間たつと最後成熟投階の赤芽球が見られたというGoldwasserら¹⁴⁾の報告とよく一致する。

急激な瀉血によって前赤芽球によって前赤芽球に分化するERCがどのような形態の細胞であるかは不明であるが、竹林¹⁰⁾によるウサギを使つての実験では、瀉血貧血動物に同系赤血球を大量に注入して正常の赤血球数にすると、その後2~3日間末血の赤血球は増加し続け、増加が停止した状態では、骨髓には殆んど赤芽球がなく細網細胞様幼若細胞が充満していた。この実験は、貧血により大量に産生された赤芽球は、急激な輸血によって不用になつても

赤血球に分化し、ERCの投階でフィードバックがかかっていることを示すようにみえる。少くとも一部の前駆細胞は分化は中止し、前駆細胞の蓄積¹⁵⁾がおこることが期待される。

本実験では、ラットに於て竹林のウサギに於ける実験と類似の実験をラットで繰返したもので、この多血ラットの骨髓でも赤芽球数極めて少なく(Fig3)、少数の成熟赤芽球を見るのみで、一見顆粒球髄の状態を呈しているが、いわゆる大型の細胞様細胞で核の淡染する細胞が増加している(Fig 2-C, D)。これらの細胞は塗抹標本では好塩基性大型のリンパ芽球ないしいわゆる細網細胞に類似した細胞で(Fig2-E~G)、約40%を占めており、好塩基性赤芽球は極めて少い(Fig3)。瀉血3時間ではこれら芽球は前赤芽球類似の形態をとり全赤芽球の約1/3を占め瀉血後6時間では明らかに前赤芽球好塩基性赤芽球への分化が見られ多染性赤芽球への分化傾向を示し、9時間後には第1相の赤芽球分化が終了する(Fig3)。瀉血後3時間ではE/T比は多血動物の約3倍にも増加し芽球も約3倍となっている。一部の前駆細胞は分裂期に入っているものと考えられる。ERCでも種々の投階の細胞があるので¹⁹⁾この時点で芽球増加に関与している細胞は極めて前赤球に近い分化投階のものと考えられる。即ち大型の細網細胞様細胞ないしリンパ芽球様細胞(Fig2-D~G)がERCに相当する可能性が多分にありこれらの細胞自体少しづつ分化投階を異にしている可能性がある。

妹尾ら²⁰⁾はかつて急性リンパ性白血病の細胞が組織に浸潤して増殖するとき細網細胞様の形態をとることを見出したが、これはリンパ腺の胚中心に存在する細胞の形態に一致し、天野氏のLymphogoniaに相当するものかも知れない。リンパ球は既に芽球化現象が知られている²¹⁾。従つて赤芽球に於いても、その前駆細胞が細網細胞様形態を示しても特殊な現象ではたいように思われる。前述の如くGoldwasser¹⁴⁾によれば、EP添加後培養ラット骨髓では5分以内にRNA合成が起り、2時間でDNA合成、6時間ではヘモグロビン合成がみられることが認められている。著者の実験でも瀉血後6時間で前赤芽球の分化を認めているので、ERCからの赤芽球の分化は意外に速く起るものと考えてよいであろう。瀉血6~9時間後にはE/T比は顕著な上昇を示し、形態学的にも好塩基性赤芽球の分化が顕著であることを見れば、この時点で、既に前赤芽球が旺んに細胞分裂を行い分化していることが示唆される(Fig3)。

この間少数の成熟赤芽球が見られるが、これは多血状態で尚且分化していた少数の芽球から来たものと考えられる。E/T比は9時間で著明に大きくなり12時間では一過性に低下するが、この理由については多血状態で一部SynchronizeされていたERCないし赤芽球前駆細胞が分化しきって、後続の前駆細胞が未だ赤芽球に分化していない状態かと考えられる。この時点までの一連のE/T比及び赤芽球分類の変動はERCにも種々の分化段階があることを示唆するものと考えられる。

雌雄パラビオージスラットによる実験からすれば、末梢血有核細胞が大巾に赤芽球産生に関与していることが示されている^{17),22),23)}。即ち貧血動物では、10日間で40%近くの分裂細胞が末梢血から骨髄に流入、増殖していることが示されている。末梢血中を流れている前駆細胞の形態は不明であるが、実験結果は少くとも次のことを示している。即ち、赤芽球造血は骨髄内の細胞のみで行われるのではなく、末梢からの細胞の分裂と分化により大きく支えられていると云うことである。著者の実験で瀉血後9時間迄のE/T比の増加と、12時間における一過性の増加の低下、更にその後の加速的増加様式が2相性を示しているのは、前者は骨髄内に残存した赤芽球前駆細胞の分化と分裂を示し、次の相は末血由来の前駆細胞の関与を示唆しているのかも知れない。少くとも末梢血には細網細胞様幼若細胞は存在せず、成熟型の細胞であるから、これらが芽球化する為に一定の時間を必要とすることは当然考えられる。

X線致死照射ラットを大動脈吻合パラビオージスによって正常非照射動物と結合した実験では、末梢血中の有核細胞が骨髄に定着し、前赤芽球に分化するのに要する時間は最短42時間とされており、48時間で完全な赤芽球の分化が起る^{16),17)}。この実験結果に比べ、本実験では赤芽球の分化はかなり促進されているように見えるが、X線照射状態と云う異常な細胞環境の中での分化は正常状態よりはるかに遅れるのかも知れない。

最後にERCの形態について考察を加えたい。貧血から急激に多血状態に移した動物の骨髄に見られる細網細胞様細胞がERCの一つの形である可態性については既に述べた。然し、末梢血有核細胞については、その形態は今の所全く不明である。Van Bekkum²⁴⁾は、CFUsの細胞形態を骨髄細胞を分画法によって各種細胞種に分けて追及し、リンパ球様細胞であろうとして、その形態を詳しく記載している

が、彼の得た分画は少数ながらリンパ球以外の細胞も含まれている。本研究における骨髄でのリンパ球の動態を見ると瀉血後著明に増加を続け、9時間でピークに達し18時間まで減少する。その後は略12時間の間隔で増減をくり返し、42時間後は略健常動物と同分布を示す(Fig4)。この瀉血初期における骨髄でのリンパ球分布の急激な増加傾向、及び高値を保持しながら12時間毎に増減するパターンは、骨髄リンパ球様細胞が赤芽球前駆細胞として働いている可能性を示唆しているようにも思われる。確実な証明はリンパ球を何等かの方法で破壊した実験で得られるかも知れないが、今後の研究に俟たれる所である。

結 語

赤芽球前駆細胞-エリスロポエチン感受性細胞(ERC)に相当する細胞-がどのような動態をとり赤芽球に分化してゆくかについて観察した。実験は1回瀉血して赤芽球分化を促進させたラットに、急激に大量輸血を行い多血状態とし、約1週間を経過した後1回大量瀉血後、経時的に骨髄での赤芽球分化の動態を形態学的に追及した。

観察結果をまとめると次のようである。

- 1) Ht25%前後の高度の瀉血貧血のラットでは骨髄は赤芽球過形成を示す(赤芽球(E)/全骨髄有核細胞(T)=50%)。
- 2) このような動物に同系動物の赤血球を注入して短時間内に多血状態(Ht=70~75)とすると、1週間後には顆粒球髄となり、赤芽球数は著しく減少(赤芽球(E)/全骨髄有核細胞(T)=2%)し、リンパ芽球様ないし細網細胞様細胞が目立つ。これが前駆細胞から赤芽球への分化が抑制された時の骨髄形態学的表現である。
- 3) この状態で大量の瀉血を行いながら循環液量を保つため同時に輸液(生食：血清=1：1)を行って約30分でHt値約25%の極端な貧血状態におくと急激に赤芽球の分化が誘導される。
- 4) 時間的に骨髄に起る変化を観察した結果では、瀉血後3時間で前赤芽球の分化が起り始め、6時間では早期好塩基性赤芽球への分化がみられ、9時間までに正染性赤芽球まで分化する。これが多血状態で一時停止していた赤芽球前駆細胞よりの分化相である。その後E/T値は一度低下し36時間まで増加を続ける。これが末血由来の赤芽球前駆細胞よりの分化相である。このように赤芽球前駆細胞は2相性を示す。42時間以後は分化と増殖を

くり返しながら72時間までに略健常動物と同値を示す。

- 5) 末梢網状赤血球数は瀉血9時間後より増加し始め12~18時間で一時停滞するが、以後急激に上昇して48時間で40%以上に達し、72時間で健常動物と同値となる。
- 6) 骨髓細胞の分類では赤芽球の増加に先立ってリンパ球様細胞ないし細網細胞様細胞の増加が起り、幼若赤芽球は一定の消長を続けながら赤芽球増生の期間中継続する。顆粒球系細胞は赤芽球・リンパ球系細胞の増減に対し相補的な傾向をもって変

動した。

- 7) 以上の実験結果から、骨髓中での赤芽球の分化、及び末梢血有核細胞からの赤芽球への分化の動態について考察を加えた。

謝 辞

稿を終るにあたりまして御指導、後校閲下さいました妹尾左知丸教授、終始御指導、御教示賜りました林肇輝講師並びに薛昭亮助手に深謝致します。

(本論文の要旨は第39回日本血液学会総会に於いて発表した)。

文 献

- 1) Till, J. and Mc Culloch, E.A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14, 213, 1961.
- 2) Becker, A.J., Mc Culloch, E. A. and Till, J.E.: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452, 1963.
- 3) 天野重安: 血液学の基礎(上巻). 8頁, 丸善出版株式会社, 1948年. より引用.
- 4) Becker, A.J., Mc Culloch, E. A., Sinovitch, E. A., Sinovitch, L. I. and Till, J.E.: The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice. *Blood*, 26, 296, 1965.
- 5) Lewis, J.P. and Trobaugh, F.E. Jr.: Haematopoietic stem cells. *Nature* 204, 589, 1964.
- 6) Ichikawa, Y., Pluznick, D.N. and Sachs, L.: *In vitro* control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 56, 488, 1966.
- 7) Kranz, S.B., Gallien-Lartigue, O. and Goldwasser, E.: The effect of erythropoietin upon heme synthesis by marrow cells *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 238, 4085, 1963.
- 8) Metcalf, D., Mc Donald, H.R., Odartchenko, N. and Sordat, B.: Growth of mouse megakaryocyte colonies *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1744, 1975.
- 9) Nakao, K., Miura, Y. and Takaku, F.: *In vitro* effect of erythropoietin on the spleen of the polycythemic mouse, I. *Blood* 27, 646, 1966.
- 10) Miura, Y., Mizoguchi, H., Takaku, F. and Nakao, K.: *In vitro* effect of erythropoietin on the spleen of the polycythemic mouse, III Limited exposure to erythropoietin and actinomycin D. *Blood* 31, 433, 1968.
- 11) Iscove, N.N.: Comparison of human and mouse erythroid progenitors detected by colony formation in culture, *In Erythropoiesis* ed. K. Nakao, Univ. of Tokyo Press, p.115, 1975.
- 12) Balcerzak, S.P. and Bromberg, P.A.: Secondary polycythemia. *Semin. Hematol.* 12, 353, 1975.
- 13) Krantz, S.B. and Jacobson, L.O.: *Erythropoietin and the Regulation of Erythropoiesis*, The University of Chicago Press, Chicago and London, pp. 128-132, 1970.
- 14) Goldwasser, E.: Some molecular aspects of red cell differentiation, *Regulation of Erythropoiesis*, ed. A.S. Gordon M. Condorelli and C. Peschle, Ponte, Milano, P. 227, 1972.
- 15) 三浦恭定: 赤血球の細胞周期, 日本動物学会編“細胞周期”, 171頁, 東大出版会, 1976年.
- 16) Seno, S., Fang, C.H. Himei, S. Hseh, C.L. and Nakashima, Y.: Hemopoietic recovery in bone marrow of lethally irradiated rats following parabiosis. I. Granulopoiesis. *Acta Haematol.* 55, 321, 1976.

17. 方 肇輝, 薛 昭亮: 血球の分化と増殖—実験血液学からみた多分化能唯一「血液幹細胞一元論」批判—, 倉敷中央病院年報, 47: 73, 1978.
18. Takebayashi, J.: Effect of mass blood-transfusion on erythroid cell differentiation in anemic rabbit I. An evolutionary change in the cell specialization process. *Acta Med. Okayama* 21, 251, 1967.
19. 三浦恭定: 血液幹細胞, 22頁, 中外医学社, 1977年.
20. 妹尾左知丸, 小林淳一, 木村三雄, 久保融, 川野善彦, 佐々木邦朗, 藤田公朗: 白血病性網内症の1例について, 白血会誌, 21, 145, 1958.
21. Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin; an initiation of mitosis in cultures of normal leukocytes *Cancer Res.* 20, 462, 1960.
22. Shimada, K.: Chimeric analysis of hemopoietic cells after cross-sex parabiosis. *Acta Med. Okayama* 29, 189, 1975.
23. Yamashita, S., Baba, Y., Fang, C.H.-Hayashi, Hsueh, C.H. and Seno, S.: Participation of circulating nucleated cells in hemopoiesis observed by chimerism. Society. of Hematology, *IV-Meeting of Asian-Pacific Division. of Hematology, Seoul.* 1979.
24. Van Bekkum, D.W., Van Noors, M.J., Mast, B. and Dicke, K.A.: Attempt at identification of hemopoietic stem cell in mouse. *Blood*, 38, 547, 1971.

**Induction of erythroblasts in polycythemic rat bone marrow
after acute blood letting**

Hisashi NAKATSUKA

Department of Pathology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director : Prof. S. Seno)

Wistar rats were made polycythemic by daily injections of massive numbers of red cells for one week. The injections were made into the peritoneal cavity and the Ht level rose to between 70 and 75%. This plethoric state resulted in suppressed erythropoiesis of the bone marrow. At this stage, a quantity of blood was drawn from the orbital sinuses with concomitant transfusion of a saline-glucose-blood serum mixture. This withdrawal-transfusion process took about 30 minutes and the Ht value decreased from 75 to 25%. Distinct proliferation of erythroblasts and basophilic erythroblasts was observed 6 to 9 hours after blood withdrawal. Polycythemic animals had many large blast-like cells having relatively large clear cytoplasm. In each of these cells, the nucleus had fine chromatin nets and an ambiguous nucleolus. At 3 hours after blood withdrawal proerythroblast like cells with basophilic cytoplasm had appeared, but there were no basophilic erythroblasts. Typical proerythroblasts having characteristic nuclear chromatin nets and deep blue cytoplasm were prominent after 6 to 9 hours. More mature, poly- and orthochromatic erythroblasts appeared between 9 and 12 hours after blood letting. At 72 hours after blood letting, the cytohistologic picture of the bone marrow of polycythemic animals had returned to nearly normal. Possible erythroid cell differentiation from precursors in the bone marrow and from circulating blood is discussed.