

Adenosine triphosphate (ATP) の骨髓造血機能に

及ぼす影響に関する研究

第 1 編

骨髓組織培養に於ける白血球系造血機能に及ぼす影響

岡山大学大学院医学研究科 (主任: 平木潔教授)

岡 本 迪 男

〔昭和 39 年 2 月 29 日受稿〕

内 容 目 次

第 1 章 緒 言	第 2 節 細胞密度
第 2 章 実験方法	第 3 節 白血球遊走速度
第 3 章 実験成績	第 4 章 総括, 考按
第 1 節 増生面積	第 5 章 結 論

第 1 章 緒 言

1929年 Lohmann⁴⁵⁾ によりアデノシン 5' 磷酸の一誘導体が筋肉から分離され、更にこれがアデノシン 5'-3' 磷酸 (ATP) である事が示され、Baddiley²⁷⁾ らは合成により ATP の構造を確認した。1939年 Engelhardt³⁴⁾ は収縮性の蛋白質 ミオシンが ATP を加水分解する作用を有し、ATP の末端ピロ 磷酸結合が分解される時に遊離される化学的エネルギーが機械的エネルギーに変化する可能性につき述べた。

1942年以来、Szent-Györgyi⁵⁴⁾⁵⁵⁾ 学派によりミオシンの研究が進められ、初めミオシンと呼ばれた物質は二つの蛋白質に分けられ、これが合して収縮性を現す複合体アクトミオシンを形成することが判明した。

さて、運動は最も基本的な生物現象の一つであり、それは常に生命の表示であるとされてきた。ATP は化学的エネルギーが機械的エネルギーに変る筋肉収縮系に参与しているが、Szent-Györgyi から現在に至る迄 ATP の意義に関しては多くの領域に亘って基礎的或いは臨床的研究が行われてきた。

ATP と単細胞生物との関係に就ては、ATP はアミーバ原形質の粘性を高めるという報告 (Kriszat⁴³⁾, 1949; 神谷⁹⁾, 1953), ATP をアミーバの各部に注射して原形質流動の変化を観察した報告 (Goldacre et al.³⁸⁾, 1950) 等がある。一方、生体内の各組織

に対する ATP の関係に就ての研究は数多いが、血液細胞に対する ATP の影響に関して行われた観察は少い。1954年、福島及び千田³⁶⁾ 等は人の好中球及び好酸球(成熟白血球は末梢血、未成熟白血球は胸骨骨髓穿刺液中のもの)を用いて白血球の運動形態と機能との間に密接な関係があることを認め、形態学的な面のみならず細胞化学的方法によつて、白血球機能に対して ATP は重要な意義を有する、即ち白血球運動形態は ATP によつて維持されると報告した。1959年、榎本¹⁾ は健康人好中球の運動能及び貪食能が ATP 添加により促進されることを観察し、更に千田²¹⁾、田村²⁶⁾ は白血球機能を検索する一連の実験により、白血球運動の原動力には ATP によるアクトミオシン様の収縮性蛋白の収縮と伸展が関与していると述べ、白血球の運動は ATP で共軛せられた mechano-chemical system で営まれると結論している。

他方では大山¹⁸⁾ (1959) は、健康家兎に ATP を注射し末梢血を用いて偽好酸球遊走能に及ぼす ATP の影響に就て時間的变化を検討し、ATP による遊走能の促進を認め、初芝ら²⁾ はほぼ同様の方法により偽好酸球遊走速度の上昇と白血球数の増加を認めているが、以上の実験はいずれも白血球を一定の条件下に観察したものであり、骨髓造血機能に就ては殆んど触れていない。

体外組織培養法は、1884年 Roux に始まり Harri-

son³⁹⁾を経て Carrel and Burrows³¹⁾³²⁾により固形メジウム法の基礎が確立されたが、液体培養では1937年 Osgood and Brownlee⁴⁹⁾が人骨髓細胞に対して初めて細胞浮游液液体培養法を行つた。

近年、教室では平木教授、大藤及び角南ら⁴⁰⁾⁴¹⁾は独自の骨髓体外組織培養法を駆使して血液学の広範囲に亘る業績を発表してきた。そこで私は骨髓造血機能、即ち白血球系、粒球系及び赤血球系に対する ATP の影響をみる為、動物及び人の骨髓組織培養に ATP 溶液を添加してその影響を検討したいと考え、先ず本編に於て教室考案の臨床骨髓組織培養法を用いて白血球系に対する添加実験を試み、興味ある成績を得たので報告する。

第2章 実験方法

1. 実験材料

1) 家兎：体重 2kg 内外の健康な成熟雄性家兎を一定期間一定の食餌を与えた後撲殺し、大腿骨より無菌的に骨髓を採取し、37°C のリンゲル氏液に浮游させて培養組織片を得た。

2) 健康人：比較的若年者を選び、小宮式骨髓穿刺器を用いて胸骨穿刺を行い、採取した穿刺液中、比較的大きな組織片を 37°C のリンゲル氏液に浮游させて培養材料とした。

3) 再生不良性貧血患者：教室に入院して診断の確定した本症患者につき、治療前に健康人と同様の操作により培養組織片を採取した。

添加する ATP 溶液は、培養直前に市販のアデホス・コワをリンゲル氏液で 1ml 中 5mg, 1mg 及び 0.1mg の各濃度に希釈して使用し、対照にはリンゲル氏液を添加した。

2. 培養操作

教室考案の臨床骨髓組織培養法に則り、平木式臨床組織培養盤 No. 1 (深さ 0.2mm) を使用した。

健康家兎の心臓穿刺で採取した血液より分離した血清、或いは健康人血清を培養盤の中央部に 1/3 注射針にて 1 滴滴下しガラス棒で円形に拡げ、その中央にリンゲル氏液中より眼科用メスの先端ですくい上げた骨髓組織片を置き、更にビタミン B₁₂ 溶液 (濃度 100γ/ml) と ATP 溶液を各 1 滴滴下して混和し、カバーガラスで覆い周辺をパラフィンで密封して 37°C の孵卵器中に静置した。

3. 観察方法

白血球系造血機能を観察するため、増生面積、細胞密度及び家兎偽好酸球並びに人好中球遊走速度を

測定した。

1) 比較成長価：培養開始後 3, 6, 12, 24 時間目に、顕微鏡 (5×4) に Abbe 氏描画器を装置し原組織及び増生帯を描写しその面積を Planimeter で測定した。各時間の組織増生面積の原組織に対する比率を比較成長価とした。

2) 細胞密度指数：培養開始後 6, 12, 24 時間目に顕微鏡 (5×100) を用いて増生帯周辺部、中間部及び中心部の各 1 視野に明視し得る細胞数を算定し、その和を以て細胞密度指数とした。

3) 白血球遊走速度：培養開始後 6, 12, 24 時間目に保温器内で顕微鏡 (10×100) と Abbe 氏描画器を用いて、比較的活潑な運動を示す家兎偽好酸球又は人好中球の 5 箇につき細胞中心部の移動を 30 秒毎に 2 分間描写して計測し、1 細胞の 1 分間の平均移動距離を白血球遊走速度 (μ/min) とした。

第3章 実験成績

実験はいずれも 5 例に就て行い、以下、家兎及び健康人ではその平均値を、再生不良性貧血患者では各例の実験成績を示す。

1. 比較成長価

1) 家兎 (表1, 図1)：図に示す如く骨髓組織の増生は各濃度の ATP 添加により促進されたが、1mg 添加で最も著しく、24 時間後には対照の 1.14 倍の増生を認めた。

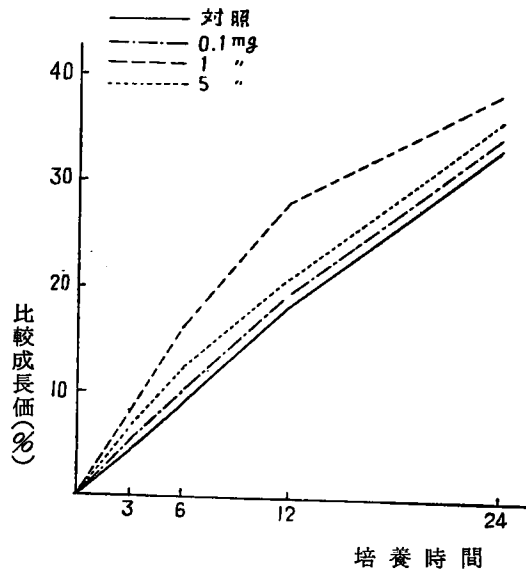
第1表 家兎比較成長価 (平均)

培養経過 時間 添加濃 度 mg/ml	3	6	12	24
5	6.59	12.69	20.79	35.61
1	7.91	15.73	26.95	38.11
0.1	5.93	9.90	19.36	33.95
対 照	4.71	9.37	18.36	33.36

2) 健康人 (表2, 図2)：骨髓増生は 1mg 添加により最も促進され、24 時間後には対照の 2.22 倍を示した。

3) 再生不良性貧血患者 (表3, 4, 5, 6, 7, 図3)：本症患者の実験では症例により数値が著しく変動するので平均値を以て示すことは出来ないが、5 例共に 1mg 添加群に於て骨髓増生は最も促進され、その傾向の最も著しい例では 24 時間後に対照の 3.24 倍を示した。

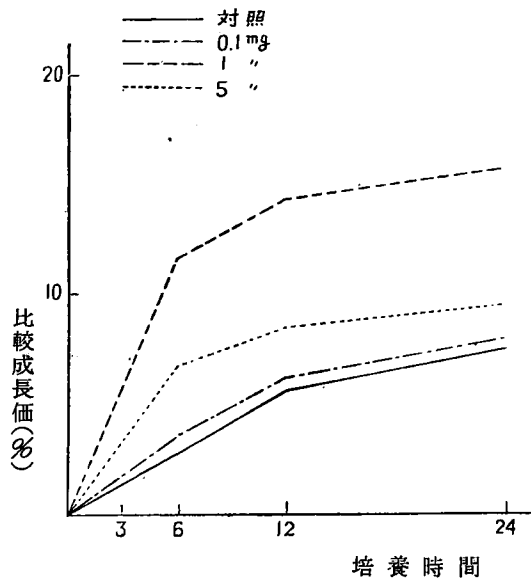
第1図 家兎比較成長価 (平均)



第2表 健康人比較成長価 (平均)

培養経過時間	3	6	12	24
添加濃度 mg/ml				
5	3.04	7.17	8.14	9.86
1	5.56	11.44	14.19	15.80
0.1	2.20	3.87	6.75	7.86
対 照	1.29	2.62	5.34	7.12

第2図 健康人比較成長価 (平均)



2. 細胞密度指数

1) 家兎 (表8, 図4): 図に示す如く細胞密度は各濃度の ATP 添加により増加を示すが, 1mg 添加群に於て各時間共に最も大であつた。即ち 1mg 添加では 6 時間後に対照の 1.85 倍, 12 時間後に 1.79

第3表 再生不良性貧血患者比較成長価 (No. 1)

培養経過時間	3	6	12	24
添加濃度 mg/ml				
5	0.24	1.33	1.60	1.82
1	0.32	1.80	2.46	2.72
0.1	0.19	1.21	1.47	1.64
対 照	0.11	0.95	1.24	1.79

第4表 再生不良性貧血患者比較成長価 (No. 2)

培養経過時間	3	6	12	24
添加濃度 mg/ml				
5	1.14	1.98	5.09	6.47
1	1.54	3.23	6.10	7.05
0.1	1.10	1.66	4.02	4.91
対 照	0.99	1.55	3.24	4.58

第5表 再生不良性貧血患者比較成長価 (No. 3)

培養経過時間	3	6	12	24
添加濃度 mg/ml				
5	1.45	4.28	5.91	6.31
1	2.22	4.46	6.27	7.70
0.1	1.31	2.13	3.81	5.25
対 照	0.67	1.11	1.79	2.38

第6表 再生不良性貧血患者比較成長価 (No. 4)

培養経過時間	3	6	12	24
添加濃度 mg/ml				
5	1.36	2.01	3.54	4.56
1	1.59	4.28	8.22	9.67
0.1	1.30	1.81	3.43	4.23
対 照	0.88	1.31	2.70	3.81

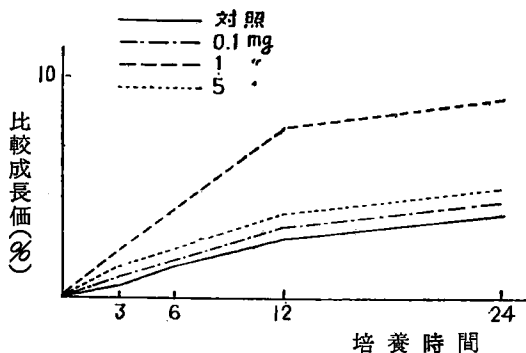
第7表 再生不良性貧血患者比較成長価 (No. 5)

培養経過時間	3	6	12	24
添加濃度 mg/ml				
5	0.88	1.71	2.82	3.40
1	1.34	1.95	3.32	4.01
0.1	0.54	1.47	1.99	2.23
対 照	0.52	0.96	1.33	1.79

倍, 24 時間後には 1.84 倍であつた。

2) 健康人 (表9, 図5): 細胞密度は 1mg 添加で最も大であり, 6 時間後に対照の 1.66 倍, 12 時間後に 1.47 倍, 24 時間後には 1.69 倍であつた。

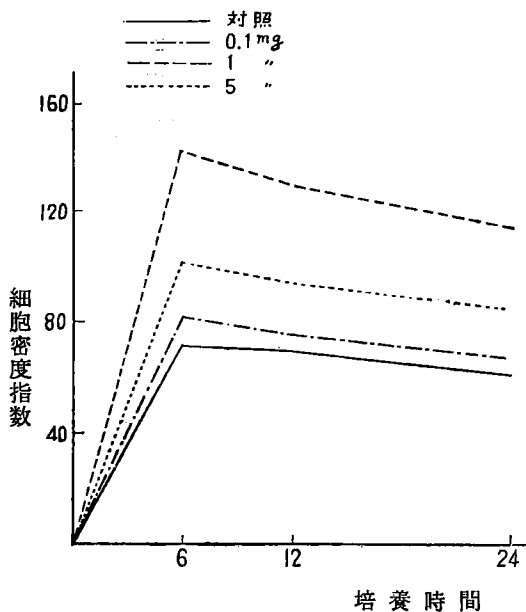
第3図 再生不良性貧血患者比較成長価 (No. 4)



第8表 家兎細胞密度指数 (平均)

培養経過時間 添加濃度 mg/ml	6	12	24
5	107.7	94.5	84.9
1	141.2	130.2	115.8
0.1	82.2	77.3	68.6
対 照	77.6	72.9	63.0

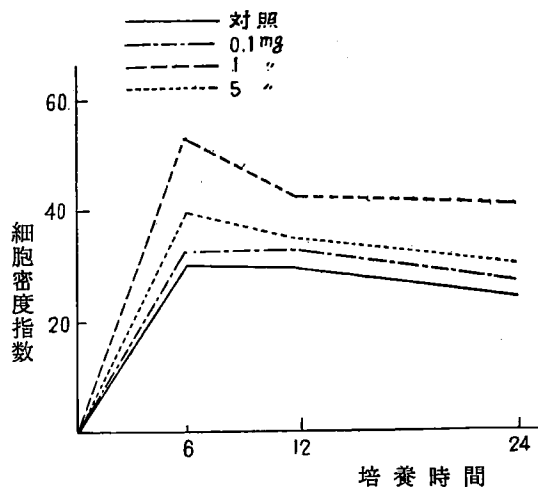
第4図 家兎細胞密度指数 (平均)



第9表 健康人細胞密度指数 (平均)

培養経過時間 添加濃度 mg/ml	6	12	24
5	39.8	34.6	30.0
1	53.5	43.4	41.5
0.1	37.1	31.2	27.2
対 照	32.3	29.5	24.6

第5図 健康人細胞密度指数 (平均)



第10表 再生不良性貧血患者細胞密度指数 (No. 1)

培養経過時間 添加濃度 mg/ml	6	12	24
5	17.5	16.5	11.0
1	20.0	17.0	12.5
0.1	13.5	11.5	10.0
対 照	12.0	8.5	7.5

第11表 再生不良性貧血患者細胞密度指数 (No. 2)

培養経過時間 添加濃度 mg/ml	6	12	24
5	36.0	32.0	22.0
1	39.0	37.5	26.5
0.1	31.0	25.5	18.0
対 照	29.0	19.0	15.5

第12表 再生不良性貧血患者細胞密度指数 (No. 3)

培養経過時間 添加濃度 mg/ml	6	12	24
5	24.5	18.5	15.0
1	27.0	20.0	18.0
0.1	19.0	12.0	11.0
対 照	15.0	11.5	10.5

3) 再生不良性貧血患者 (表10, 11, 12, 13, 14, 図6): 5例共に 1mg 添加により細胞密度は最も大で, 促進傾向の最も著しい例では6時間及び12時間後に対照の1.34倍, 24時間後には1.50倍を示した。

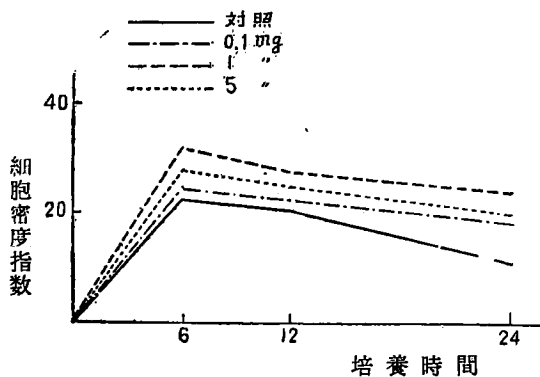
第13表 再生不良性貧血患者細胞密度指数 (No. 4)

培養経過時間 添加濃度 mg/ml	6	12	24
5	27.5	25.0	20.0
1	31.0	27.5	24.0
0.1	24.5	22.0	18.5
対 照	23.0	20.5	16.0

第14表 再生不良性貧血患者細胞密度指数 (No. 5)

培養経過時間 添加濃度 mg/ml	6	12	24
5	23.0	19.0	16.5
1	25.5	22.5	20.5
0.1	20.0	18.5	16.0
対 照	15.0	11.5	10.5

第6図 再生不良性貧血患者細胞密度指数 (No. 4)



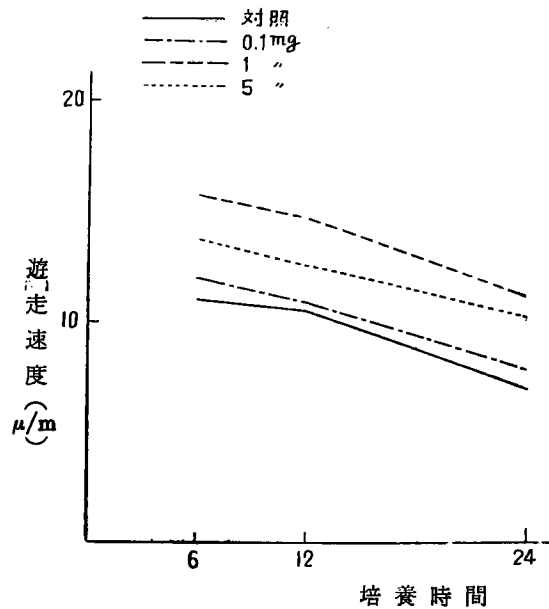
3. 白血球遊走速度

1) 家兎 (表15, 図7) : 図に示す如く偽好酸球遊走速度は各濃度の ATP 添加により亢進を認めるが, 1mg 添加群に於て各時間共に最も大であつた。即ち 1mg 添加では6時間後に対照の1.41倍, 12時間後に1.30倍, 24時間後にも1.30倍を示した。

第15表 家兎偽好酸球遊走速度 (平均)

培養経過時間 添加濃度 mg/ml	6	12	24
5	13.82	12.63	10.37
1	15.56	14.79	11.51
0.1	11.89	11.05	8.23
対 照	11.01	10.59	7.18

第7図 家兎偽好酸球遊走速度 (平均)

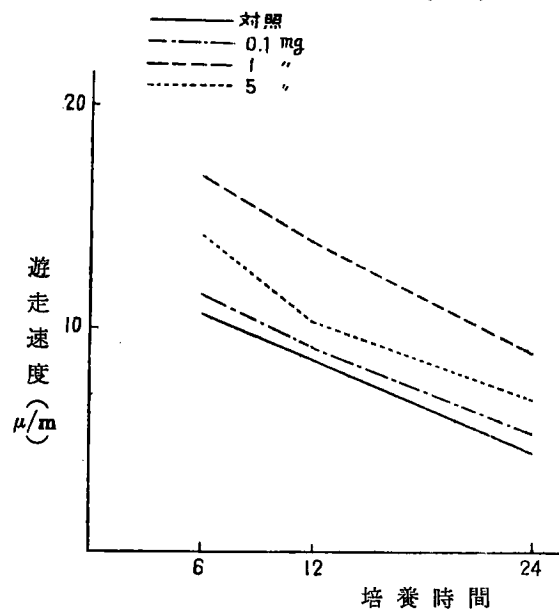


2) 健康人 (表16, 図8) : 好中球遊走速度は 1 mg 添加により最も大であり, 6時間後に対照の1.52倍, 12時間後に1.59倍, 24時間後には1.92倍を示した。

第16表 健康人好中球遊走速度 (平均)

培養経過時間 添加濃度 mg/ml	6	12	24
5	14.20	10.54	7.32
1	16.77	14.03	9.46
0.1	11.60	9.43	5.48
対 照	11.02	8.82	4.92

第8図 健康人好中球遊走速度 (平均)



3) 再生不良性貧血患者 (表17, 18, 19, 20, 21, 図9): 5例共に 1mg 添加により好中球遊走速度は最も亢進し, 著しい例では6時間後に対照の2.18倍, 12時間後に2.49倍, 24時間後には2.58倍を示した。

第17表 再生不良性貧血患者好中球遊走速度
(No. 1)

培養経過 時間 添加濃 度 mg/ml	6	12	24
5	3.96	3.28	3.14
1	4.72	4.51	3.33
0.1	3.75	3.15	3.04
対 照	3.70	3.07	2.82

第18表 再生不良性貧血患者好中球遊走速度
(No. 2)

培養経過 時間 添加濃 度 mg/ml	6	12	24
5	12.83	12.14	9.50
1	14.05	12.92	10.12
0.1	12.54	11.15	9.05
対 照	12.12	10.87	7.76

第19表 再生不良性貧血患者好中球遊走速度
(No. 3)

培養経過 時間 添加濃 度 mg/ml	6	12	24
5	4.98	3.73	3.64
1	5.49	5.20	4.72
0.1	3.56	3.49	3.22
対 照	2.91	2.81	2.55

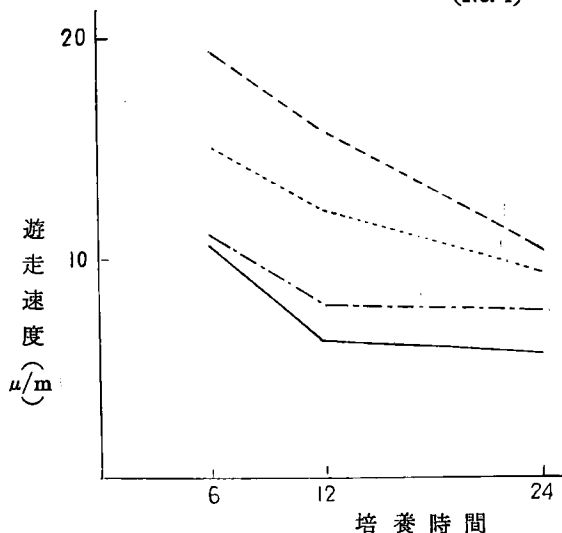
第20表 再生不良性貧血患者好中球遊走速度
(No. 4)

培養経過 時間 添加濃 度 mg/ml	6	12	24
5	15.02	12.22	9.25
1	19.07	15.86	10.04
0.1	11.18	7.95	7.45
対 照	10.42	6.11	5.81

第21表 再生不良性貧血患者好中球遊走速度
(No. 5)

培養経過 時間 添加濃 度 mg/ml	6	12	24
5	10.80	9.98	9.26
1	12.32	11.76	10.07
0.1	5.73	5.22	4.88
対 照	5.64	4.72	3.91

第9図 再生不良性貧血患者好中球遊走速度
(No. 4)



第4章 総括, 考按

以上の実験成績を総括すれば次の如くである。

1) 比較成長価: 家兎, 健康人, 再生不良性貧血患者共に ATP 1mg 添加群に於て対照無添加群に比して最も大であつた。5mg 添加群は 1mg 添加に比して劣り, 0.1mg 添加群がこれに次ぐ。

2) 細胞密度指数: 家兎, 健康人, 再生不良性貧血患者共に ATP 1mg 添加群に於て対照に比し最も大であり, 5mg 添加群がこれに次ぎ, 0.1mg 添加では対照より僅かに大であるに過ぎなかつた。

3) 白血球遊走速度: 家兎の偽好酸球遊走速度及び健康人, 再生不良性貧血患者の好中球遊走速度は, 各時間に於て ATP 1mg 添加群が対照に比し最も亢進の傾向を示し, 5mg 添加群がこれに次ぎ, 0.1mg 添加では対照より僅かに大であつた。

さて, 生体運動の直接エネルギーは, ATP の高エネルギー磷酸結合が他物質に転移して磷酸エステルをつくり, これが他物質と結合すると共に磷酸を放つ際の自由エネルギーが転化されるによると現在考えられているが, 白血球の運動能も同様の機序に

より維持されると云えよう。Szent-Györgyi⁵⁴⁾⁵⁵⁾に始まった筋肉収縮の研究以来、ATP と各種組織についての研究は多いが、白血球に関しては我国では武内²⁴⁾²⁵⁾らの細胞化学的研究を経て、前記千田²¹⁾らの白血球の運動エネルギーに関する一連の研究によつて白血球に対する ATP の意義が基礎づけられたとみてよい。

本実験では家兎及び人の骨髓組織培養に ATP 溶液を直接添加して白血球機能の亢進と同時に細胞増生の亢進を認めたが、これは ATP が白血球の運動能を維持するという従来の知見に加えて、ATP は骨髓の白血球系造血機能を促進することを示唆するものである。

再生不良性貧血患者の骨髓組織培養所見は健康人に比し極めて特異である。即ち、骨髓組織片は脂肪髓を呈し、比較成長価は小で細胞密度指数は低下し、白血球の運動は不活潑である。本症は Ehrlich により1888年、特殊の貧血として初めて記載されて以来、その分類が種々試みられているが、教室平木教授⁴⁾はI型(骨髓内血球抑留型)からV型(汎骨髓癆)に至る5型に分類している。従つて ATP 添加実験に於ても症例により ATP 添加の影響は程度を著しく異にし、家兎及び健康人に比較すれば一般に添加群と対照との差は小さく、汎骨髓癆に近い症例ほどこの傾向は強い。この事実は、再生不良性貧血患者に於ける ATP に対する骨髓の反応の低下を意味し、更に ATP の自由エネルギーにより影響を与えられ白血球運動及び細胞増生に關与する物質の欠乏を意味するものと思われる。

本症に対する ATP の効果に就ては、伊藤ら⁶⁾の本症患者2例に ATP を投与して血液所見の改善を

認めた報告があり、教室に於ても経過良好の症例を経験している。又、従来多くの薬物療法が試みられており、教室大藤ら¹⁷⁾は本症患者の骨髓組織培養に対し ACTH, Cortisone, V. B₁₂, 葉酸, 骨髓抽出多糖体を添加して白血球系造血機能の亢進を認め、李¹⁹⁾は可欠アミノ酸であるヒドロキシプロリンを用いて本症患者の骨髓組織培養に於ける効果と、本症患者に静注した場合の末梢血所見の改善を報告している。しかし、本症に対する単独効果として決定的なもののみならず、治療法が各方面に於て追求されている現在、本症患者の骨髓組織培養に対し ATP 添加の効果を認めた本実験の結果は甚だ興味深いものがある。

第5章 結 論

骨髓白血球系造血機能に及ぼす ATP の影響をみるため、家兎、健康人並びに再生不良性貧血患者の骨髓組織培養による ATP 添加実験を行い、その組織増生面積、細胞密度、白血球遊走速度を測定して次の結果を得た。

即ち、比較成長価、細胞密度指数及び白血球遊走速度は家兎、健康人、再生不良性貧血患者の三者共に至適濃度の ATP 添加により増大を示し、従つて ATP は骨髓の白血球系造血機能を亢進せしめるものと考えられる。

擲筆するに当り御懇篤なる御指導と御校閲を賜わつた恩師平木教授並びに角南講師に深謝致します。

(本論文の要旨は第24回日本血液学会総会に於て発表した)

(文献は第3編に一括記載)

Influences of ATP on Hematopoietic Functions
of Bone Marrow

1. Influences of ATP on Leukopoietic Functions of Rabbit,
Normal Human and Hypoplastic Marrow

By

Michio OKAMOTO

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director : Prof. Kiyoshi Hiraki)

Author's abstract

In order to observe the influences of ATP on the bone marrow leukopoiesis, clinical tissue culture of bone marrow from normal rabbits, normal persons and patients with hypoplastic anemia was conducted. ATP solutions at various concentrations were added directly to the culture media and observations were carried out to see effect of ATP on the functions of neutrophils of bone marrow.

As a result, it has been demonstrated that by adding an optimal amount of ATP the outgrowth, cell density and wandering velocity of neutrophils were increased.
