

Adenosine triphosphate (ATP) の骨髓造血機能に 及ぼす影響に関する研究

第 2 編

骨髓組織培養に於ける栓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 章 実験方法	
第 3 章 実験成績	
第 1 節 海 獺	

第 2 節 健康人	
第 3 節 再生不良性貧血患者	
第 4 章 総括, 考按	
第 5 章 結 論	

第 1 章 緒 言

前編に於て骨髓白血球系造血機能に及ぼす ATP の影響につき述べたが、本編に於ては栓球系に就き検討を試みた。

血液が形態学的に 3 成分を有することは 1882 年 Bizzozzero²⁸⁾ により詳細に記載されたが、Donné³³⁾ は既に 1844 年にこれを観察していた。以来、栓球に就きその形態と機能に関して数多くの研究があるにも拘らず、栓球系は血液学の最も暗黒の分野の一つと云われている。就中、栓球の生成に関しては過去長年月に亘つて多くの学説が行われたが、想像の域を出ないものも少なくなく、1906 年に至つて Wright⁵⁷⁾ が、骨髓中の栓球は骨髓巨大細胞即ち巨核球より生成されると報告し、引続いて骨髓巨核球の機能に就いては組織切片標本又は塗抹標本を用いた貪喰能及び栓球分離像の観察が行われた。更に栓球の超生体観察としては位田⁵⁾、栗原¹³⁾ による報告があり、前原¹⁴⁾、Rich⁵²⁾ は組織培養法の応用による巨核球の運動観察を報告しているが、いずれも運動能を巨核球機能として認めるに到らなかつた。

1956 年、教室角南ら²³⁾ は骨髓組織培養法により人巨核球に活潑な運動能を認め、巨核球の胞体から突起を形成しその先端に結節及びくびれを生じて栓球が分離されている像を確認した。更に角南らは栓球系に関する一連の実験を行い、林³⁾ は骨髓巨核球機能に及ぼす各種ビタミンの影響を、西下¹⁶⁾ は各

種ホルモンの影響を検討した。

ここに於て私は ATP の骨髓栓球系造血機能に及ぼす影響をみるため、ATP 溶液を海獺、健康人及び再生不良性貧血患者の骨髓組織培養に添加して巨核球機能を観察し、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) 海獺：体重 300 g 内外の健康雄性海獺の大腿骨より無菌的に骨髓を採取して培養組織片を得た。

2) 健康人：比較的若年者を選び胸骨穿刺により骨髓を採取した。詳細は第 1 編に述べたので省略する。

3) 再生不良性貧血患者：教室に入院し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骨髓を採取した。

添加する ATP 溶液は第 1 編と同じく、1 ml 中 5 mg, 1 mg, 0.1 mg の各濃度を使用し、対照にはリンゲル氏液を添加した。

2. 培養操作：平木式臨床組織培養盤 No. 2 (深さ 0.6 mm) を使用し、概して白血球系の場合と同様に行うが、培養盤の中央部に海獺又は人血清を 1/3 針にて 2 滴々下し円形に拡げた中央に骨髓組織片を置き更に V. B₁₂ 溶液 (100 γ/ml) と ATP 溶液を各 2 滴々下して混和し、カバーガラスで覆つて密封した後 37°C の孵卵器に入れた。

3. 観察方法

培養開始後、巨核球の機能が最も活潑化する18時間目に標本を取り出し保温器内で観察を行った。

1) 増生帯に出現する全巨核球数を算定し、1群につき4枚の標本を用いて平均を求め、これを平均出現巨核球数とした。

2) 巨核球の運動形態を教室角南に従って下記の如き基準を設定し4型に分類した。

R型：胞体は正円形で全く変形の認められないもの。

A型：胞体の軽度変形を認めるもの。

B型：偽足形成のあるもの。

C型：触手状の突起形成を認め栓球分離を示すもの。

更に巨核球総数に対するA、B、C各型巨核球の百分率を算出し、その和を以て全運動型巨核球百分率とした。

第3章 実験成績

実験は海猿、健康人及び再生不良性貧血患者各5例につき行った。

1. 海猿(表1-6, 図1)

1) 増生帯への平均出現巨核球数は1mg添加で最も増大し、著しい例では対照の1.38倍を示し、5例平均値は対照の6.4に対し8.4であった。0.1mg添加群がこれに次ぎ、平均値は対照の1.17倍を示した。5mg添加では対照に比し有意の差を認めなかった。

第1表 海猿 (No.1)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	6.3	60.0	28.0	8.0	4.0	40.0
1	8.3	54.5	30.3	9.1	6.1	45.5
0.1	7.3	55.4	30.9	10.3	3.4	44.6
対 照	6.0	58.3	29.2	8.3	4.2	41.7

第2表 海猿 (No.2)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	6.3	52.0	32.0	12.0	4.0	48.0
1	8.0	43.6	37.5	12.6	6.3	56.4
0.1	7.5	46.6	36.7	10.0	6.7	53.4
対 照	6.3	52.0	36.0	8.0	4.0	48.0

第3表 海猿 (No.3)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	7.0	51.5	38.0	7.0	3.5	48.5
1	8.8	45.8	31.5	14.1	8.6	54.2
0.1	7.8	48.3	35.5	9.7	6.5	51.7
対 照	7.0	53.4	35.8	7.2	3.6	46.6

第4表 海猿 (No.4)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	6.5	57.6	30.8	7.7	3.9	42.4
1	7.5	50.0	30.0	13.3	6.7	50.0
0.1	7.3	51.6	34.5	10.4	3.5	48.4
対 照	6.0	54.1	37.5	4.2	4.2	45.9

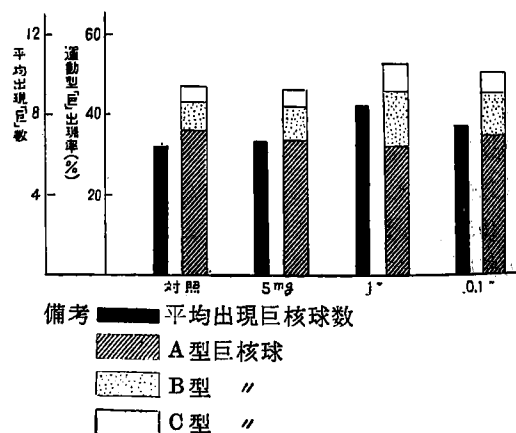
第5表 海猿 (No.5)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	6.8	49.9	40.0	7.4	3.7	50.1
1	8.5	44.1	29.5	17.6	8.8	55.9
0.1	7.5	46.6	36.7	10.0	6.7	53.4
対 照	6.8	51.9	37.0	7.4	3.7	48.1

第6表 海猿 (平均)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	6.6	54.0	33.8	8.4	3.8	46.0
1	8.4	47.6	32.6	13.3	7.3	53.2
0.1	7.5	49.6	34.9	10.1	5.4	50.4
対 照	6.4	53.9	35.2	7.0	3.9	46.1

第1図 海猿巨核球機能 (平均)



2) 全運動型巨核球百分率は 1mg 添加で最大であり、平均値は対照46.1%に対し53.2%を示し、特にB型、C型の出現を促進した。0.1mg 添加では効果はやや劣り、5mg 添加では認められなかった。

2. 健康人 (表7—12, 図2)

1) 平均出現巨核球数は 1mg 添加により最も増大し、著しい例では対照の1.61倍を示し、5例平均値は対照の7.0に対し10.4であった。0.1mg 添加ではこれに次ぎ対照の1.33倍を示したが、5mg 添加では対照に比し有意の差を認めなかった。

2) 全運動型巨核球百分率は 1mg 添加に於て最

第7表 健康人 (No.1)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	11.3	39.4	30.9	27.7	2.0	60.6
1	14.8	17.2	46.3	31.7	4.8	82.8
0.1	13.2	25.5	45.6	26.6	2.3	74.5
対 照	10.5	45.6	31.5	21.2	1.7	54.4

第8表 健康人 (No.2)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	5.8	56.7	26.0	13.0	4.3	43.3
1	9.3	48.7	29.7	13.5	8.1	51.3
0.1	8.3	54.5	27.3	12.1	6.1	45.5
対 照	6.0	58.3	25.0	12.5	4.2	41.7

第9表 健康人 (No.3)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	7.8	54.8	32.3	9.7	3.2	45.2
1	11.3	44.5	28.8	17.8	8.9	55.5
0.1	9.8	50.3	30.8	11.2	7.7	49.7
対 照	7.5	53.4	30.0	13.3	3.3	46.6

第10表 健康人 (No.4)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	3.0	58.3	33.4	8.3	0	41.7
1	4.5	44.4	33.2	16.7	5.6	55.6
0.1	3.8	53.3	26.7	13.3	6.7	46.7
対 照	2.8	63.6	27.3	9.1	0	36.4

大であり、平均値は対照45.0%に対し59.5%を示し、対照ではC型の出現をみない例に於てもC型が出現し、B型の増加は著しく、明らかに巨核球機能の亢進を認めた。効果は 0.1mg 添加では稍劣り、5mg 添加では認められなかった。

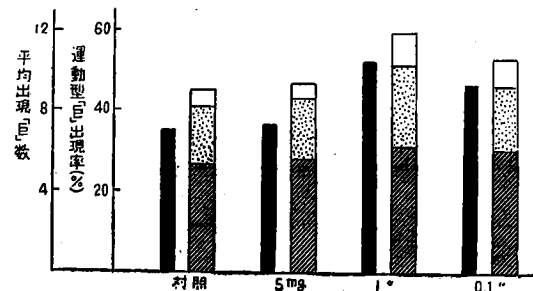
第11表 健康人 (No.5)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	8.8	56.0	17.6	17.6	8.8	44.0
1	12.0	47.9	20.8	18.8	12.5	52.1
0.1	11.3	51.1	19.9	17.8	11.2	48.9
対 照	8.3	54.5	21.2	15.2	9.1	45.5

第12表 健康人 (平均)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球数	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	7.3	53.0	28.0	15.3	3.7	47.0
1	10.4	40.5	31.8	19.7	8.0	59.5
0.1	9.3	46.9	30.1	16.2	6.8	53.1
対 照	7.0	55.0	27.0	14.3	3.7	45.0

第2図 健康人巨核球機能 (平均)



備考：同 上

3. 再生不良性貧血患者 (表13—17, 図3—7)

1) 本症患者の骨髓組織培養に際しては出現巨核球数は極めて僅少であり、実験成績は症例により程度を著しく異にするが、いずれの例に於ても 1mg 添加により平均出現巨核球数は最も増大し、0.1mg 添加ではこれに次ぎ、5mg 添加では対照に比し有意の差を認めなかった。

2) 本症では運動型巨核球の出現率は極めて低下し、特にC型は全くみられないが、1mg 添加によりB型が出現し得た。A型百分率は 1mg 添加に於て最大で、効果は 0.1mg 添加では稍劣り、5mg 添加では認められなかった。

第13表 再生不良性貧血患者 (No. 1)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球數	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	3.0	83.3	16.7	0	0	16.7
1	5.0	62.5	37.5	0	0	37.5
0.1	4.0	65.0	35.0	0	0	35.0
対 照	2.8	81.8	18.2	0	0	18.2

第14表 再生不良性貧血患者 (No. 2)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球數	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	1.3	80.0	20.0	0	0	20.0
1	2.3	44.4	55.6	0	0	55.6
0.1	1.8	57.1	42.9	0	0	42.9
対 照	1.0	75.0	25.0	0	0	25.0

第15表 再生不良性貧血患者 (No. 3)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球數	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	2.5	60.0	40.0	0	0	40.0
1	3.8	46.6	46.6	6.7	0	53.4
0.1	3.3	53.8	46.2	0	0	46.2
対 照	2.5	70.0	30.0	0	0	30.0

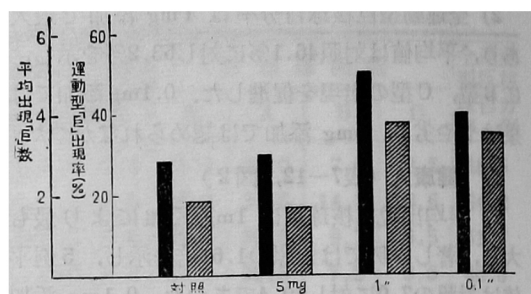
第16表 再生不良性貧血患者 (No. 4)

添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球數	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	1.5	100.0	0	0	0	0
1	2.3	66.7	33.3	0	0	33.3
0.1	2.0	75.0	25.0	0	0	25.0
対 照	1.5	83.3	16.7	0	0	16.7

第17表 再生不良性貧血患者 (No. 5)

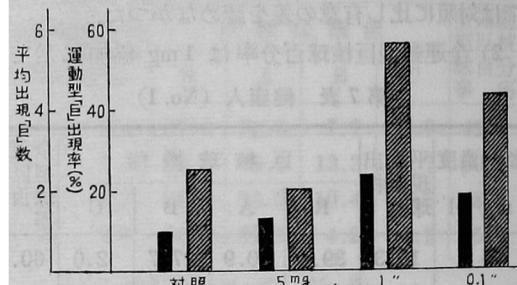
添加濃度 mg/ml	平均出現巨核球數	巨核球機能				全運動型巨核球百分率 %
		R	A	B	C	
5	1.0	100.0	0	0	0	0
1	1.8	57.1	42.9	0	0	42.9
0.1	1.3	60.0	40.0	0	0	40.0
対 照	1.0	100.0	0	0	0	0

第3図 再生不良性貧血患者巨核球機能 (No. 1)



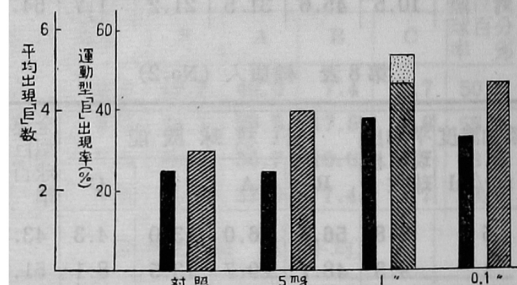
備考: 同上

第4図 再生不良性貧血患者巨核球機能 (No. 2)



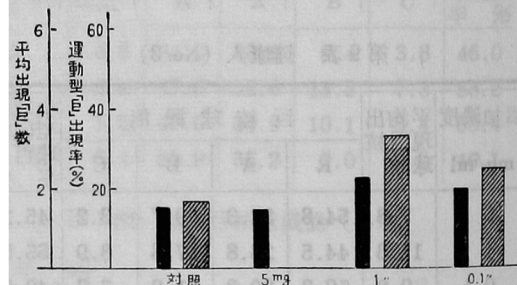
備考: 同上

第5図 再生不良性貧血患者巨核球機能 (No. 3)



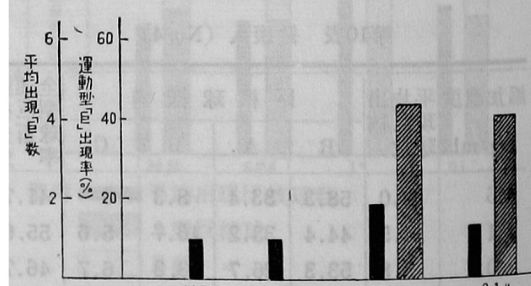
備考: 同上

第6図 再生不良性貧血患者巨核球機能 (No. 4)



備考: 同上

第7図 再生不良性貧血患者巨核球機能 (No. 5)



備考: 同上

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) 海狸：組織増生帯中の平均出現巨核球数は ATP 1mg 添加に於て最も大で、巨核球機能は強く亢進した。0.1mg 添加群がこれに次ぎ、5mg 添加では対照に比し有意の差を認めなかつた。

2) 健康人：平均出現巨核球数、全運動型巨核球百分率共に 1mg 添加に於て最も増大し、0.1mg 添加群がこれに次ぎ、5mg 添加では効果を認めなかつた。

3) 再生不良性貧血患者：健康人と同様の傾向を示し、1mg 添加に於て効果は最大で 0.1mg 添加群がこれに次ぎ、5mg 添加では対照に比し有意の差を認めなかつた。

さて、巨核球の機能としての運動能に関しては上述の如く角南ら²³⁾は独自の骨髓組織培養法を用いて骨髓巨核球の機能観察方法を確立し運動形態を4型に分類した。これに従つて ATP 添加時の骨髓巨核球の態度を観察すると、海狸、健康人、再生不良性貧血患者のいずれの骨髓組織培養に於ても ATP 添加により増生帯への巨核球出現が促進され、同時に運動型巨核球の占める比率が増大した事実は、ATP が骨髓巨核球の機能を亢進せしめ、更に骨髓の栓球系造血に対し刺激的に作用することを意味するものと考えられる。

再生不良性貧血患者の栓球系骨髓組織培養に於て佐々木²⁰⁾は巨核球の減少と機能低下を認め、本症患者の血清中には巨核球機能を低下させる物質が存在すると報告している。本実験でも巨核球機能は全般に著しく低下し、機能の最も亢進した状態であるC型のみでなくB型も対照無添加群では出現しなかつたのに対し、ATP 1mg 添加によりC型は皆無乍らB型の出現をみたことは注目し、更にA型の出現は 1mg、0.1mg 添加により著明に促進された。

栓球系造血に対する ATP の効果を検討した報告は殆ど無く僅かに加藤¹¹⁾は銅蛋白と ATP を併用筋注した家兎骨髓塗抹標本に於て巨核球の出現が対照の数倍に増大し、ATP の単独使用例ではこの傾向がみられなかつたと述べているが、その実験は塗抹染色標本を用いた静止的観察に止まり、巨核球自体の機能に就ては触れていない。因みに栓球と ATP の関係に就ては、森田ら¹⁵⁾は栓球のアミノ酸組成の研究により TCA サイクルの存在を推定し、他方

では血液凝固時の血餅収縮の過程には栓球中に異常に大量に含まれる ATP が関与すると述べており、Bettex-Galland 等²⁸⁾は人栓球より actomyosin と類似した作用を有する thrombostenin と称する収縮性蛋白を分離している。

骨髓組織培養による栓球系に対する各種薬剤の影響に関しては、教室林³⁾は V. B₁₂、葉酸が巨核球機能を亢進せしめ、西下¹⁶⁾は ACTH、副腎皮質ホルモンが有効であつたと報告したが、ATP に就ては未だ検討されていない。

従つて、ATP が骨髓巨核球の機能に対し如何なる独特の作用機序を有するかは不明であるが、胞体の軽度変形を示すものから活潑に栓球を分離するものに至る巨核球の運動には大量のエネルギーを要する筈である。第1編に述べた如く、白血球運動の原動力には ATP による actomyosin 様の収縮性蛋白の収縮と伸展が関与すると千田²¹⁾は結論しているが、巨核球の運動にも同様の機序が存在すると推定され、又、細胞に於ける蛋白合成、更に分裂増殖への ATP の関与を考えれば、運動型巨核球に限らず非運動型巨核球の生成をも含めて、骨髓組織培養に際し増生帯への総ての巨核球の出現にも ATP が影響を及ぼしているといえよう。

以上の如く本実験の結果は、ATP が骨髓巨核球の運動を維持すると共に、骨髓栓球系造血機能を促進することを示唆しているが、更に臨床面では再生不良性貧血に対し試みるべき治療法の一つを暗示するものと考えられる。

第5章 結 論

骨髓栓球系造血機能に及ぼす ATP の影響をみるため、海狸、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、組織増生帯に出現する巨核球の態度を観察して次の結果を得た。

即ち、海狸、健康人、再生不良性貧血患者の三者共に至適濃度の ATP 添加により増生帯への巨核球出現は増大し、出現した巨核球の運動は亢進するを認め、従つて ATP は骨髓栓球系造血機能を促進するものと考えられる。

擧筆するに当り御懇篤なる御指導と御校閲を賜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

2. Influences of ATP on Thrombopoietic Functions
of Guinea Pig, 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 thrombopoiesis, clinical tissue culture of bone marrow from normal guinea pigs, 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 megakaryocytes of bone marrow.

As a result, it has been seen that by adding an optimal amount of ATP the functions of megakaryocytes were accelerated.
