

岡山医学会雑誌

第74巻 1, 2, 3合併号 (第806, 807, 808号)

昭和37年3月30日発行

611.018.46 : 578.085.23 : 612.398.145.1

核酸の骨髄体外組織培養に及ぼす影響

第 1 編

健康家兎骨髄の白血球系に及ぼす影響

岡山大学医学部平木内科 (主任: 平木 潔教授)

山 崎 良 平

〔昭和37年1月17日受稿〕

目 容 目 次

第1章 緒 言
第2章 実験材料並びに実験方法
第1節 実験材料
第2節 実験方法
第3節 観察方法
第3章 実験成績

第1節 増生面積並びに細胞 密度に及ぼす影響
第2節 偽好酸球機能に及ぼす影響
第4章 総括並びに考按
第5章 結 語

第1章 緒 言

今日、核酸は蛋白と共に生命現象解明の鍵を握るものとして生物学のあらゆる分野に於いて盛んに研究されているが、その歴史は比較的浅く、この間における研究者の努力の跡をたどってみると、次の2つの時期に大別する事が出来よう。即ち、1869年化学者としての Miescher がウミの主体をなす白血球の核から初めてヌクレインを分離し、後に細胞学者の Altmann⁴¹⁾ がそれに核酸という名称を与えた。それ以来、核酸に関する研究が最初はその化学的成分の研究に主力が注がれ、Kossel⁶⁵⁾、Levine⁷⁰⁾、Schmiedeberg⁸²⁾、Levene⁶⁸⁾ 等の優秀な学者の努力で1930年頃までには主成分は全て究明された。この化学的研究を主とした第一期に続いて、1940年頃から核酸の機能が多くの研究者の注目を惹くに至った。

電子顕微鏡、顕微分光測定、遠心分離、電気泳動、各種のクロマトグラフ、同位元素等、新しいテクニックを使つて生物学全般にわたつて大きく取り上げられた。かくして、核酸の研究はこれ等化学的並びに生物学的研究を二つの車輪として1945年以後加速度的に進展し、特に米国で生合成過程に関する重要な知見が相次いで発見された。即ち1955年には Ochoa⁷⁶⁾ 等により、ポリヌクレオチド合成酵素が更に1956年によつて DNA 合成酵素が報告されるに及び近代生化学の絢爛たる華を咲かせるに至つた。

さらに、Caspersson⁵⁰⁾、Thorell⁸⁵⁾、Novikoff⁷⁴⁾、Spiegelmann⁸⁴⁾ 等は細胞質に於ける RNA は蛋白合成の機能と関係がある事を指摘している。そして、各種細胞に於いて RNA の多いところでは蛋白の合成、細胞分裂が盛んであると云う事実から、

Haurowitz 等の新しい研究による RNA の生体内での役割は蛋白合成の際に何か鑄造 (Template) 様の作用をつかさどっているであろうと述べている。然して、DNA は核分裂及び遺伝に密接な関係がある事は先駆者により認められているところである。

翻つて、核酸の造血機能に及ぼす影響については既に、天野¹⁾、菊地⁹⁾、高橋²¹⁾、Andreason⁴³⁾、Martin⁷²⁾、Lawrance⁶⁸⁾、Abrams³⁹⁾、Lutwak-man⁷¹⁾、森等³⁶⁾により骨髓内核酸量の消長と造血機能とが密接なる平行関係にある事が究明されているが、現在核酸の骨髓に対する直接作用については不明である。

さて、体外組織培養法は1884年 Roux⁸¹⁾、1907年 Harrison⁵⁹⁾に端を発し、1910年 Burrows & Carrel⁴⁵⁾⁴⁶⁾は凝固メジウムを組織の支持体として用いる事を考案し、更に1912年 Carrel はその上に发育促進物質として胎児エキスを添加する事を案出した。これが現今の被覆培養法の始まりである。本法の特長は培養された細胞の生活現象を詳細に観察する事によつて、生体内の生活現象を可成り明確に推定し得られる点にある。従つて、本法を用いれば骨髓の白血球機能、例えば遊走能、貪喰能等の研究には、多くの利点があり、就中发育増殖を営みつつある細胞の諸機能を直接顕微鏡下に観察し得る事は最大の利点と云うべきである。然して、家兎骨髓の組織培養に関しては、教室の互理³⁸⁾はその組織増生並びに、骨髓内偽好酸球の遊走能を、同じく角南¹⁸⁾は墨粒貪喰能を、田村²⁴⁾は生体染色をそれぞれ詳しく研究し確固たる実験方法を樹立している。

ここに於いて、私は骨髓造血機能に及ぼす核酸の影響の一端を究明するため、被覆培養法により家兎骨髓の組織増生、細胞密度並びに偽好酸球機能に及ぼす核酸の直接添加の影響を観察しいささかの知見を得たので報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験材料

核酸塩リンゲル氏溶液 (以下核酸溶液と省略する): 酵母より抽出した RNA と牛の胸腺より抽出した DNA を使用した。使用するに際し本物質のナトリウム塩リンゲル氏溶液を作り、無菌的にするために Seitz 濾過器にて濾過して用いた。

実験動物: 1.5 kg 前後の白色健康雄家兎を用

い、1週間同一条件のもとに飼育し生活環境に馴致せしめた後、瞬間的に撲殺してその大腿骨骨髓を用いた。骨髓採取は総て無菌的に行なつた。

第2節 実験方法

被覆培養法: Carrel, Fischer の原法を教室で改良した方法によつた。即ち培地の支持体としては同種健康家兎のヘパリン加血漿を用い、发育促進物質として孵化7~8日の鶏胎圧搾液を使用した。術式順は (1)、カバーガラスにヘパリン加血漿1滴を直径1.5mmに拡げ、(2)、一辺が約1mmの小骨髓組織片を入れる。(3)、鶏胎圧搾液1滴を加え、(4)、その上に各種濃度の核酸溶液を1滴加える。(5)、血漿の凝固の後、凹窩載物硝子に合わせてパラフィンで封入し、(6)、37~38°C の孵卵器に入れる。対照には核酸溶液のかわりにリンゲル氏液1滴を加えた。

第3節 観察方法

第1項 組織増生の観察

増生面積の計測: 37~38°C の保温箱の顕微鏡を入れ、アッペ氏描画器で新生組織を描画し、その面積をグラリメーターで測定し実面積に換算した。次に増生前後の差、即ち絶対成長値の原面積に対する比率を比較成長値とし、求められた比較成長値の対照実験に対する比率を成長係数とした。

細胞密度の測定: 増生帯の周辺部、中間部、中心部の3部に就いてそれぞれ一視野の細胞数を計算しその和を密度指数とし、対照のそれに対する比率の百倍を密度係数とした。

第2項 偽好酸球の機能観察

遊走速度測定: 逐時的に細胞の中心点の軌跡を30秒をおきに求め、一細胞につき2分間観察し、これをキユルビメーターを用いて計測し、その倍率より換算して実数値を求め、1分間の遊走速度を算定した。

墨粒貪喰能観察: これには海野氏打抜載物硝子を用いて、墨汁は紅花墨をリンゲル氏液にて磨り濾過後使用した。術式は教室角南¹⁸⁾の法に倣い墨汁が血漿の凝固した表面に侵入して薄い膜を作り、ここに於いて貪喰しやすい様にした。

貪喰率とは細胞100個中の貪喰している細胞数で表わし、貪喰度の表現は谷²²⁾の方法に従い度数を0~4度に分け、細胞100個に就きそれぞれ貪喰度を求め、細胞1つの平均貪喰度を算出した。

第3章 実験成績

第1節 増生面積並びに細胞密度に及ぼす影響

(1) RNA 溶液を添加した場合 (表1, 図1)

10% RNA 溶液では高濃度による抑制作用のため培養初期に於いて増生を停止し24時間に於ける成長係数はそれぞれ0.04, 0.03, 0.02, 0.05, 0.10と著しい低値を示した。5% RNA 溶液添加でも明らかに抑制作用がみられ、24時間の成長係数はそれぞれ0.15, 0.18, 0.11, 0.47, 0.19と低値を示した。また細胞密度も表2の如く低値を示した。次に2% RNA

溶液では No. 5 に於いて24時間の成績係数が1.68とやや高値を示した他は全て組織増生は対照より劣り、No. 3では12時間で増生は停止した。1% RNA 溶液では可成りの増生面積の増大をきたし全例に於いて比較成長係は対照より高値を示し、No. 2, No. 4, No. 5 の24時間の成長係数はそれぞれ 2.38, 2.30, 4.28で、特に No. 5 で著しい組織増生を示した。細胞密度は培養後12, 24時間に於いて対照の67, 64に対し、76, 88と僅かながら増加を認めた。

0.5% RNA 溶液添加では培養初期よりすでに著しい増生を示し、24時間に於ける成績係数はそれぞれ1.83, 2.35, 3.33, 2.19, 4.55と高値を示した。細胞

表1 比較成長係 (RNA 溶液添加)

家兎番号	添加物	経過時間				24時間の成長係数
		3	6	12	24	
No. 1	リングル氏液	5.10	10.20	20.98	28.21	
	10% RNA	0.92	1.23	1.23	1.23	0.04
	5% RNA	3.12	4.21	4.26	4.26	0.15
	2% RNA	4.21	6.27	14.11	18.04	0.63
	1% RNA	5.92	11.60	22.40	32.17	1.13
	0.5% RNA	11.05	21.00	47.70	51.92	1.83
No. 2	リングル氏液	5.71	12.32	20.25	26.59	
	10% RNA	0.52	0.86	0.86	0.86	0.03
	5% RNA	3.02	5.08	5.08	5.08	0.18
	2% RNA	3.51	5.49	13.04	16.92	0.63
	1% RNA	7.88	14.83	30.24	63.30	2.38
	0.5% RNA	10.18	18.33	36.25	62.71	2.35
No. 3	リングル氏液	4.53	6.90	12.08	16.28	
	10% RNA	0.21	0.36	0.36	0.36	0.02
	5% RNA	1.86	1.86	1.86	1.86	0.11
	2% RNA	2.89	5.01	12.29	12.29	0.75
	1% RNA	6.73	11.15	19.57	23.50	1.44
	0.5% RNA	5.03	9.25	34.00	54.22	3.33
No. 4	リングル氏液	5.71	7.89	13.12	18.02	
	10% RNA	0.62	0.98	0.98	0.98	0.05
	5% RNA	1.75	7.17	8.54	8.54	0.47
	2% RNA	3.11	4.22	10.01	11.32	0.62
	1% RNA	8.08	15.42	34.20	41.61	2.30
	0.5% RNA	4.34	5.72	33.68	39.62	2.19
No. 5	リングル氏液	4.60	6.48	10.58	11.52	
	10% RNA	0.57	1.16	1.16	1.16	0.10
	5% RNA	1.20	1.20	1.20	1.20	0.19
	2% RNA	2.70	5.32	13.29	19.35	1.68
	1% RNA	10.41	17.28	44.44	49.36	4.28
	0.5% RNA	11.76	17.42	46.91	52.44	4.55

No. 6	リングル氏液	7.08	12.98	20.21	24.37	2.34 0.95 0.67
	0.1% RNA	8.02	25.26	50.25	57.01	
	0.01% RNA	8.34	17.51	21.77	23.76	
	0.001% RNA	5.48	8.09	11.94	16.47	
No. 7	リングル氏液	5.71	12.32	18.24	20.49	1.55 1.30 1.11
	0.1% RNA	3.25	10.60	22.89	31.94	
	0.01% RNA	4.36	9.06	24.27	26.92	
	0.001% RNA	5.94	10.21	12.96	22.61	
No. 8	リングル氏液	4.77	8.79	14.36	189.2	2.11 1.80 0.80
	0.1% RNA	3.12	12.86	32.16	39.91	
	0.01% RNA	4.21	13.12	33.96	34.19	
	0.001% RNA	5.01	7.92	10.26	15.21	
No. 9	リングル氏液	4.53	6.90	12.68	16.28	2.34 2.10 1.41
	0.1% RNA	7.00	18.09	31.78	38.13	
	0.01% RNA	4.21	13.12	33.96	34.19	
	0.001% RNA	7.12	13.95	16.02	25.00	
No. 10	リングル氏液	6.18	9.37	13.42	18.32	2.30 1.97 1.57
	0.1% RNA	4.85	8.45	27.54	43.16	
	0.01% RNA	6.26	8.56	25.51	36.11	
	0.001% RNA	6.21	12.69	20.01	28.86	

図 1. 各種濃度 RNA 溶液添加に於ける比較成長価 (平均)

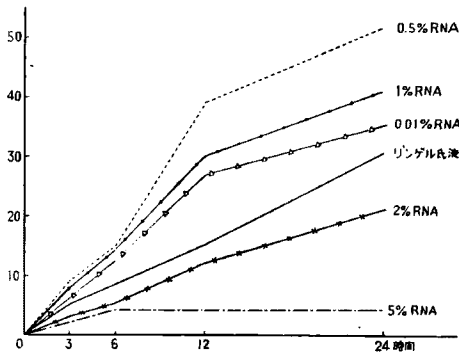


表 2 密度指数 (平均値)

添加物	培養時間	3	6	12	24	24時間の密度係数
リングル氏液		52	54	67	64	
5.0% RNA		6	10	11	8	12
1.0% RNA		38	51	76	88	137
0.5% RNA		49	40	64	82	128
0.1% RNA		36	47	48	57	89
0.01% RNA		45	47	60	66	103

密度は24時間に於いて密度係数は144を示した。0.1%RNA溶液添加例では培養後12時間及び24時間の成長係数はNo.7を除き2以上の高値を示し、密度指数は対照と有意の差を認めなかつた。0.01%RNA溶液では培養初期に於いて対照と同程度の増生を示したが、12時間以後は可成りの差を認め24時間の成長係数はNo.6以外はそれぞれ1.30, 1.80, 2.10, 1.97と大体対照の約2倍の増生面積を示した。細胞密度は対照と有意の差を認めなかつた。0.001%RNA溶液では比較成長価、密度指数共に対照と有意の差を認めなかつた。

(2) DNA 溶液を添加した場合 (表 3, 4 図 4)。

1%DNA溶液では培養後3時間で、全例に於いて比較成長価は対照より低値を示し、24時間では成長係数はそれぞれ1.00, 0.98, 1.26, 0.93, 1.39と対照と同程度の増生を認めた。細胞密度は24時間の密度係数が220と対照の2倍以上の増加を示した。0.5%DNA溶液の添加では全例に於いて培養の初期より細胞増生が尽んで、24時間の成長係数はそれぞれ1.40, 1.33, 1.57, 1.33, 1.23と明らかに対照より高値を示した。細胞密度は対照と有意の差を認めなかつた。次に、0.1%DNA溶液の添加で24時間の成長係数はそれぞれ1.00, 0.98, 1.26, 0.97, 1.39を示し、対照と増生面積は有意の差を認めなかつた。密度指

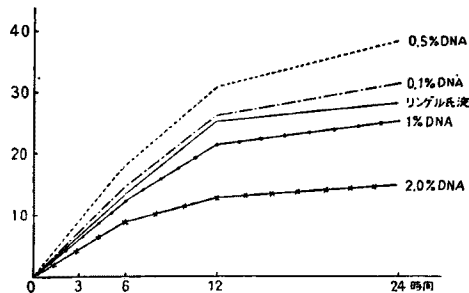
表 3 比較成長価 (DNA 溶液添加)

家兎番号	添加物	経過時間				24時間の成長係数
		3	6	12	24	
No. 11	リングル氏液	6.02	12.92	26.24	27.00	0.83
	1 % DNA	5.60	13.40	22.09	24.50	
	0.5 % DNA	8.20	18.26	31.56	38.00	
	0.1 % DNA	7.80	14.12	24.86	27.26	
No. 12	リングル氏液	7.26	15.00	28.08	29.34	0.92
	1 % DNA	6.26	13.56	23.92	27.26	
	0.5 % DNA	9.59	16.92	30.92	40.92	
	0.1 % DNA	9.26	15.00	27.00	27.60	
No. 13	リングル氏液	5.82	10.56	22.26	22.26	1.07
	1 % DNA	4.62	10.16	19.26	23.92	
	0.5 % DNA	7.50	16.00	28.36	35.02	
	0.1 % DNA	7.00	13.92	24.92	28.04	
No. 14	リングル氏液	8.52	17.24	30.12	31.19	0.87
	1 % DNA	5.21	14.26	23.00	27.26	
	0.5 % DNA	9.86	19.21	32.62	41.56	
	0.1 % DNA	8.52	16.11	28.89	30.26	
No. 15	リングル氏液	6.14	10.80	20.80	20.80	1.08
	1 % DNA	4.89	10.28	17.79	21.68	
	0.5 % DNA	5.41	17.75	31.02	36.70	
	0.1 % DNA	5.18	11.87	24.37	28.98	

表 4 密度指数 (平均値)

添加物	培養時間				24時間の密度係数
	3	6	12	24	
リングル氏液	25	35	22	25	220
1 % DNA	37	72	43	55	
0.5 % DNA	38	58	31	36	
0.1 % DNA	26	40	24	29	

図 4. 各種濃度 DNA 溶液添加に於ける比較成長価 (平均)



数も対照に比し有意の差はなかつた。

第 2 節 偽好酸球機能に及ぼす影響

(1) RNA 溶液を添加した場合 (表 5, 表 6, 図 2, 図 3),

5% RNA 溶液の添加で、遊走速度は培養初期より既に明らかに低い値を示し、全て培養後 12 時間で遊走を停止した。2% RNA 溶液でも各培養時間に於ける遊走速度は対照より全て低く、また 72 時間以上も遊走を認めたのは対照は No. 1, No. 4, No. 5 の 3 例に対し、2% RNA 溶液の添加では No. 2 の 1 例のみたにすぎない。1% RNA 溶液の添加では No. 5 で対照より低値を示した以外大体対照と同程度の遊走速度を示した。

次に、0.5% RNA 溶液の添加で培養後 3 時間の遊走速度は対照の 16.72, 15.21, 10.20, 18.21, 13.34 μ /min に対し、20.00, 18.20, 15.12, 17.54, 22.95 μ /min と可成りの促進を示したが 24 時間以後は全般的に対照より僅かに低い値を示した。一方、墨粒貪喰能は培養後 6 時間に於いて最高の値を示し、対照の平均貪喰度はそれぞれ 0.42, 0.56, 0.36, 0.46, 0.24 に対し、0.5% RNA 溶液添加ではそれぞれ 1.06, 1.06, 0.92, 0.74, 1.56 と対照の約 2 倍の高値を示した。貪喰率も同等の高値を示した。0.01% 及び 0.001% RNA 溶液では遊走速度は対照と有意の差を認めなかつた。0.1% RNA 溶液では全般的に遊走速度は対照より促進を示し、貪喰能は培養後 6

表5 偽好酸球遊走速度 (RNA 溶液添加)

家兎番号	経過時間 添加物	3	6	12	24	48	72
		No. 1	リンゲル氏液	16.72	14.26	11.92	6.98
	5 % RNA	11.26	5.00	2.01	0	0	0
	2 % RNA	13.12	9.92	5.36	2.01	0	0
	1 % RNA	18.86	17.11	10.16	4.00	2.46	0
	0.5 % RNA	20.00	15.02	10.05	4.50	2.00	1.90
No. 2	リンゲル氏液	15.21	10.13	7.21	6.21	2.10	0
	5 % RNA	10.18	4.10	1.22	0	0	0
	2 % RNA	12.80	5.56	4.24	4.50	2.00	1.06
	1 % RNA	16.59	14.92	8.00	5.02	1.54	0
	0.5 % RNA	18.20	13.24	9.01	3.00	2.02	2.00
No. 3	リンゲル氏液	10.20	7.12	6.76	2.12	0	0
	5 % RNA	9.21	3.12	0	0	0	0
	2 % RNA	10.11	8.27	4.41	3.00	1.50	0
	1 % RNA	15.21	12.12	7.42	4.59	2.00	1.05
	0.5 % RNA	15.12	16.31	10.20	5.02	1.22	1.23
No. 4	リンゲル氏液	18.21	12.92	8.40	8.50	2.56	1.10
	5 % RNA	12.91	6.00	1.22	0	0	0
	2 % RNA	10.00	7.05	2.00	1.00	0	0
	1 % RNA	17.92	16.00	9.00	2.01	0	0
	0.5 % RNA	17.54	15.28	7.61	1.93	0	0
No. 5	リンゲル氏液	13.34	6.48	4.28	6.14	5.63	5.51
	5 % RNA	7.74	3.78	1.09	0	0	0
	2 % RNA	17.58	7.70	4.66	1.02	2.42	0
	1 % RNA	18.98	21.04	5.54	5.64	1.16	1.09
	0.5 % RNA	22.95	11.25	9.59	1.00	1.26	1.00
No. 6	リンゲル氏液	19.11	9.42	5.05	2.29	1.56	0
	0.1 % RNA	18.20	15.20	8.24	4.96	3.56	1.00
	0.01 % RNA	15.90	12.80	8.78	5.70	5.74	1.20
	0.001% RNA	16.20	14.78	10.10	2.00	1.80	0
No. 7	リンゲル氏液	16.92	14.32	6.26	5.82	5.12	3.12
	0.1 % RNA	18.00	14.20	7.02	4.10	2.46	2.50
	0.01 % RNA	18.30	10.36	5.96	2.10	2.00	1.00
	0.001% RNA	18.85	13.00	7.12	3.96	2.20	1.50
No. 8	リンゲル氏液	13.36	8.92	7.38	3.36	0	0
	0.1 % RNA	16.28	10.26	7.28	3.21	2.44	0
	0.01 % RNA	15.00	10.95	6.20	3.00	3.20	1.00
	0.001% RNA	17.78	14.36	7.20	3.35	2.95	1.86
No. 9	リンゲル氏液	17.72	10.36	7.21	3.81	2.10	0
	0.1 % RNA	17.36	18.22	10.12	4.00	2.04	2.00
	0.01 % RNA	19.01	13.84	8.00	4.06	3.86	1.54
	0.001% RNA	18.20	12.06	7.86	4.10	3.00	2.40

No. 10	リングル氏液	17.21	16.19	12.32	5.21	4.36	1.00
	0.1% RNA	19.92	17.70	8.24	4.30	2.04	2.74
	0.01% RNA	20.12	16.86	9.60	4.00	3.90	2.05
	0.001% RNA	21.10	15.40	8.20	5.44	3.05	2.70

表 6 墨粒貪喰能 (RNA 溶液添加)

家兔番号	添加物	経過時間				
		3	6	12	24	
No. 16	リングル氏液	貪喰率	22	19	17	18
		平均貪喰度	0.47	0.42	0.40	0.49
	0.5% RNA	貪喰率	58	42	27	24
		平均貪喰度	0.78	1.06	0.62	0.48
	0.1% RNA	貪喰率	46	50	24	23
		平均貪喰度	0.85	1.67	0.70	0.40
No. 17	リングル氏液	貪喰率	34	24	12	8
		平均貪喰度	0.74	0.56	0.46	0.21
	0.5% RNA	貪喰率	48	45	23	22
		平均貪喰度	0.92	1.06	0.63	0.41
	0.1% RNA	貪喰率	46	44	28	25
		平均貪喰度	0.96	1.12	0.51	0.48
No. 18	リングル氏液	貪喰率	22	21	15	13
		平均貪喰度	0.42	0.36	0.21	0.18
	0.5% RNA	貪喰率	36	35	20	17
		平均貪喰度	0.76	0.92	0.50	0.31
	0.1% RNA	貪喰率	42	35	22	22
		平均貪喰度	0.84	0.78	0.38	0.32
No. 19	リングル氏液	貪喰率	36	20	16	18
		平均貪喰度	0.79	0.47	0.32	0.27
	0.5% RNA	貪喰率	30	34	18	17
		平均貪喰度	0.49	0.74	0.43	0.28
	0.1% RNA	貪喰率	31	33	21	20
		平均貪喰度	0.71	0.80	0.32	0.39
No. 20	リングル氏液	貪喰率	28	11	10	19
		平均貪喰度	0.80	0.24	0.33	0.66
	0.5% RNA	貪喰率	45	40	29	24
		平均貪喰度	1.20	1.56	0.85	0.60
	0.1% RNA	貪喰率	38	32	26	24
		平均貪喰度	0.73	0.74	0.36	0.54

時間に於いて対照の約 2 乃至 4 倍の平均貪喰度並びに貪喰率を示した。

(2) DNA 溶液を添加した場合 (表 7, 表 8, 図 5, 図 6)

図 2. 各種濃度 RNA 溶液添加に於ける偽好酸球遊走速度 (平均)

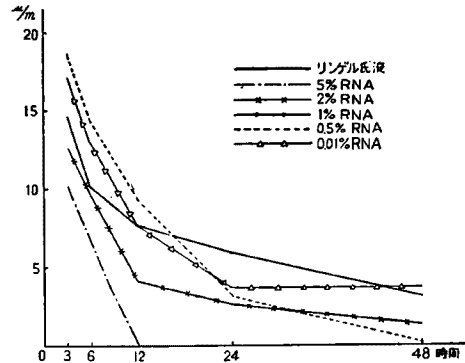
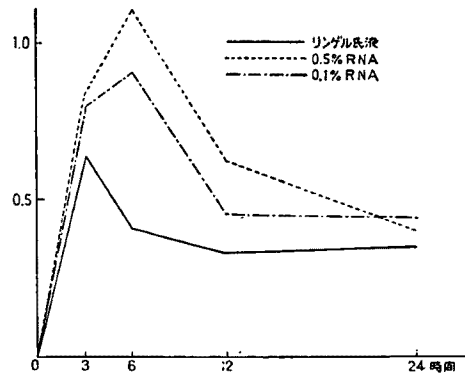


図 3. 各種濃度 RNA 溶液添加に於ける墨粒貪喰度 (平均)



遊走速度は 1% DNA 溶液添加で多少抑制的に働き、僅かながら対照より低値を示した。墨粒貪喰能は培養後 3 時間の平均貪喰率が対照の 0.47, 0.74, 0.42, 0.42, 0.29 に対し、それぞれ 1.25, 1.42, 1.72, 1.21, 0.93 と亢進を示した。貪喰率も同程度の高値を示した。0.5% DNA 溶液の添加では遊走速度は対照と有意の差を認めなかつたが、平均貪喰度はそれぞれ 1.73, 2.12, 1.76, 2.16, 0.82 と対照の 2 乃至 3 倍の高値を示した。0.1% DNA 溶液では培養初期に於いて、遊走速度は明らかに対照より促進を示し、6 時間以後は対照と有意の差を認めなかつた。墨粒貪喰能は 0.5% DNA 溶液の添加と同様亢進を示した。

表7 偽好酸球遊走速度(DNA溶液添加)

家兎番号	添加物	経過時間				
		3	6	12	24	48
No. 11	リングル氏液	17.20	15.00	10.00	3.52	3.00
	1% DNA	14.00	10.95	6.00	3.00	2.00
	0.5% DNA	17.26	14.00	9.05	5.25	3.00
	0.1% DNA	19.25	12.50	6.00	4.00	3.85
No. 12	リングル氏液	18.85	17.25	12.55	4.00	3.65
	1% DNA	16.02	12.00	7.20	4.35	3.15
	0.5% DNA	18.85	15.55	7.22	4.00	3.25
	0.1% DNA	21.05	14.25	8.05	4.95	3.58
No. 13	リングル氏液	16.50	12.05	9.85	3.05	2.05
	1% DNA	13.55	10.00	5.45	2.00	2.05
	0.5% DNA	15.00	13.20	5.20	2.05	1.00
	0.1% DNA	18.28	11.95	6.25	3.40	2.00
No. 14	リングル氏液	20.10	17.50	12.00	4.82	3.50
	1% DNA	14.00	12.55	6.28	3.10	2.56
	0.5% DNA	16.52	15.18	9.55	6.00	4.80
	0.1% DNA	20.72	14.60	8.15	5.85	3.15
No. 15	リングル氏液	19.46	14.20	9.80	3.67	2.85
	1% DNA	13.48	11.90	7.33	3.60	2.98
	0.5% DNA	16.37	16.12	11.80	5.80	1.97
	0.1% DNA	20.70	12.95	7.90	4.92	3.52

表8 墨粒貪喰能(DNA溶液添加)

家兎番号	添加物	経過時間			
		3	6	12	24
No. 21	リングル氏液	貪喰率 22	19	17	18
		平均貪喰度 0.47	0.42	0.40	0.49
	1% DNA	貪喰率 55	41	23	14
		平均貪喰度 1.25	1.08	0.84	0.38
0.5% DNA	貪喰率 61	43	24	13	
	平均貪喰度 1.73	1.19	0.82	0.41	
0.1% DNA	貪喰率 78	72	50	10	
	平均貪喰度 1.73	1.64	0.92	0.44	
No. 22	リングル氏液	貪喰率 34	24	12	8
		平均貪喰度 0.74	0.56	0.46	0.21
	1% DNA	貪喰率 54	53	42	20
		平均貪喰度 1.42	1.32	1.00	0.40
0.5% DNA	貪喰率 64	63	51	17	
	平均貪喰度 2.12	2.05	1.26	0.47	
0.1% DNA	貪喰率 84	76	52	12	
	平均貪喰度 2.12	1.96	0.72	0.50	

No. 23	リングル氏液	貪喰率 20	21	15	13
		平均貪喰度 0.42	0.36	0.21	0.18
	1% DNA	貪喰率 53	48	40	24
		平均貪喰度 1.72	1.54	0.92	0.52
0.5% DNA	貪喰率 52	51	42	16	
	平均貪喰度 1.76	1.50	0.91	0.54	
0.1% DNA	貪喰率 81	72	51	19	
	平均貪喰度 1.91	1.12	0.82	0.62	
No. 24	リングル氏液	貪喰率 25	18	17	8
		平均貪喰度 0.42	0.31	0.28	0.20
	1% DNA	貪喰率 44	40	32	18
		平均貪喰度 1.21	1.03	0.72	0.24
0.5% DNA	貪喰率 87	88	42	31	
	平均貪喰度 2.16	2.20	1.12	0.72	
0.1% DNA	貪喰率 52	54	34	28	
	平均貪喰度 0.99	1.21	0.42	0.32	
リングル氏液 添加	貪喰率 18	18	12	11	
	平均貪喰度 0.29	0.27	0.19	0.18	

No. 25	1 % DNA	貪喰率	42	29	14	13
		平均貪喰度	0.93	0.67	0.31	0.23
	0.5% DNA	貪喰率	41	35	28	28
		平均貪喰度	0.82	0.51	0.36	0.35
	0.1% DNA	貪喰率	48	40	30	27
		平均貪喰度	0.95	0.76	0.50	4.20

図 5. 各種濃度 DNA 溶液添加に於ける偽好酸球遊走速度 (平均)

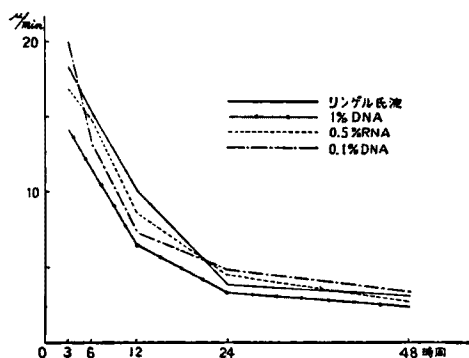
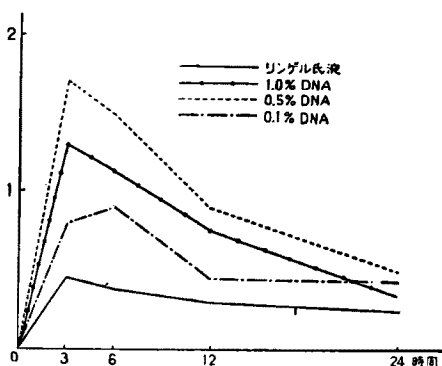


図 6. 各種濃度 DNA 溶液添加に於ける墨粒貪喰度 (平均)



第4章 総括並びに考按

核酸は細胞の重要な構成因子の一つであることは論を俟たないが、その生理作用については不明の点が多い。DNA は核分裂及び遺伝に密接な関係があり、RNA は蛋白合成の場に重要な役割を果していると云われる。即ち、1941年 Caspersson⁵⁰⁾ は各種細胞に於いて核酸の多いところでは蛋白合成、細胞分裂が旺盛であると述べている。彼と平行して、1938~1942年に亘り天野¹⁾、古賀¹⁴⁾等は紫外線顕微鏡を使用し血液細胞を観察しその細胞質に多量の

RNA を見出して、核酸が細胞の機能と密接な関連のあることを予想した。そして、今日癌細胞の如く増殖の盛んな細胞では特に核酸代謝が活潑である事が知られ、従つて正常時に於いて絶えず活潑に血球形成の行なわれている造血臓器に於いても核酸代謝の旺盛である事は当然予想されるところである。既に、菊地⁹⁾¹⁰⁾は骨髓核酸代謝と骨髓造血機能が密接な関係があるとして、これを定量的に立証しているが、一方細胞化学的核酸代謝の研究としては Thorell⁸⁶⁾、White⁸⁹⁾、Caspersson⁵⁰⁾、Davidson⁵³⁾、森³⁶⁾等の業績を挙げることが出来る。先にも触れた如く、天野は血球形成の初期盛んに分裂する細胞では胞体内に多量の RNA を含有すると共に、核分裂に際して核物質の新しい合成、就中核の重要な成分である DNA の新しい合成が必要なわけである。その際、胞体内 RNA が材料的に核内の DNA に変化するのであろうと述べている。Thorell も蛋白合成との関連を考慮に入れて更に詳細な究明を行ない、Caspersson は胞体内 RNA が蛋白合成に際し、酵素的な役割を果すのだと予想している。森は RNA が赤血球系及び顆粒球系の所謂未熟細胞に多量に集積し、特に前赤芽球、好塩基性赤芽球、骨髓芽球等の細胞分裂の可能な細胞に多い事を指摘している。又上村⁴⁾は核酸呈色反応にて核酸の消長と骨髓造血機能が並行関係にあると述べている。同位元素を用いた実験として菊地、高橋、Andreason⁴³⁾、Martin⁷²⁾、Lawrance⁶⁸⁾、Abtams³⁹⁾、Lutwak-man⁷¹⁾等の報告があるが、教室の長瀬²⁵⁾はP³²を用いて各種実験的貧血家兎骨髓の核酸磷の推移に就いて経時的に定量を行ない骨髓造血機能と核酸との密接な並行関係を立証している。以上、核酸の造血機能に関する細胞化学的役割に就いて述べた。

次に核酸の生物学的作用に就いては、核酸並びにその誘導体が菌の發育を促進せしめると云う数多くの研究があり、例えば⁷⁹⁾A型の溶血性連鎖状球菌の培養に際し増殖因子として用いられ、その際強い溶血毒を作る事が知られている。高等動物に対する核酸の生物学的作用に関する研究では、19世紀の終りに Ziegler⁸⁰⁾、Wells⁸⁷⁾、Cabot⁴⁹⁾、Ames⁴²⁾等により核酸の白血球増多作用のある事が知られ、次いで1928年 Doan⁵⁴⁾等は家兎に酵母核酸ソーダ1gを静脈注射し、一時は白血球減少を呈するが45分乃至150分の間に増加を認めている。又1951年 Rosenow⁸⁰⁾は犬に毎kg、0.5gの核酸ソーダを静注し、白血球数の増加する実験を行なつている。本邦に於いては

林田²⁶⁾、岸川¹¹⁾等の業績を挙げる事が出来る。林田は家兎に酵母核酸ソーダ毎 kg, 5 mg を静注し、白血球増多を認め、岸川は酵母核酸ソーダを先づ正常マウスの腹腔内に注入し、約3倍から18倍の白血球増加を、次いで400 γ レントゲン照射後のマウスに注射した場合も同様の白血球数の増加率を示したと述べている。

上記の核酸投与による白血球増加は末梢血液にあらわれる所見であり、その際骨髓への影響について Doan 等は骨髓組織切片標本を作り検討した結果、骨髓細胞の成熟過程が明らかに促進していることを認め、林田は酵母核酸の静注後、3時間よりその骨髓像において漸次骨髓母細胞及び前骨髓細胞の増加を認め、9時間乃至24時間に於いて骨髓母細胞は10~20倍、前骨髓細胞は2~5倍と著しい増加を認めている。又、Habetin⁵⁷⁾等は骨髓像より好中球系細胞の著明な増加を、Ames 等は骨髓に幼若なる Mononucleic Lencocyte の増加を認めている。そして、Doan, Habetin, Ames 等は核酸の白血球増多は骨髓への直接刺激作用であると結論している。併し、唯単に核酸を注射して骨髓に刺激像を認めたという理由で核酸が直接に作用したと結論する事は出来ない。何故ならば核酸が先づ網内系で処理され、そこから催白血球増多因子 (Lencopoietin) が生産され、この因子が骨髓に作用したとも考えられる。又林田の説の如く核酸が脳中枢に作用して、中枢支配下に一種の Lencopoietin を生じ、それが間接的に骨髓に作用したかも知れない。その真実を究明するため、骨髓体外組織培養法を応用して核酸の骨髓への直接影響を観察する事は最も適した方法と云わなければならない。

ここで、組織培養法においてその培養として用いられる発育促進物質に関する従来の文献をみると、1912年 Fischer⁵⁵⁾、Carrel⁴⁷⁾⁴⁸⁾等は家鷄胎児抽出液を組織培養の培地として用い、Fischer はその中に含まれる Growth promoting substance に Embryosin なる名称を与えているが、それが如何なる物質であるか未だ十分に解明されていない。Fischer⁵⁵⁾⁵⁶⁾、Kutsky⁶⁶⁾、Novikoff⁷⁴⁾等は核酸に関係している物質であると推論している。更に、Carrel & Baker⁴⁸⁾、Fischer⁵⁵⁾⁵⁶⁾等は発育促進物質である胎児抽出液中には核酸以外の高分子の物質、即ちある種の蛋白、アミノ酸等多数の Growth promoting factor の存在する事を指摘している。最近勝田⁶³⁾等は発育促進物質として鶏卵胎児圧搾液のかわりに RNA を

代用する事が可能であると述べると共に、細胞組織の代謝、あるいはその他の事に関して定量的研究をする場合の培地の発育促進物質として圧搾液の如く力価の不定なものでは精密な研究をする事は不可能であるが、リングエル氏液に各種ビタミン、必須アミノ酸、グルコース等の上に RNA を加えることに依つて、定量的に一定した組成をもつ優秀な発育促進物質を作る事が可能であると述べている。

さて、組織培養において核酸の直接添加の影響をみたものに Tenant⁶⁵⁾、林²⁷⁾、勝田³⁶⁾等の実験がある。即ち、Tenant 等は二十日ネズミの心臓線維芽細胞をカレル瓶培養法にて培養し、核酸が線維芽細胞の増生を促す事を観察し、そして核酸が組織培養への添加実験に於いて、細胞の代謝機転をはやめる事を暗示すると共に、この場合核酸が低分子のものより密木細工様に合成されるのみでなく、核酸そのものが直ちに供給され利用される道もあると報じている。又、林等は被覆法により培養単球の発育に及ば核酸の影響を検討し増生面積及び細胞密度を求めている。その成績をみるに酵母核酸 5 mg/dl を添加してその増生面積は培養後72時間で約2倍、細胞密度は2.5倍の効果を認め、胸腺核酸は 5 mg/dl の添加で増生面積は1.4倍、細胞密度は2.1倍の効果を認めている。勝田等は家鷄胎児の心臓線維芽細胞を培養し核酸添加実験を行ない前述の如く家鷄胎児抽出液に代る優秀な発育促進物質であると云つてゐる。然し、未だ骨髓組織培養に對し核酸を添加した実験はみられない。そこで私は核酸の骨髓への直接影響を追求するため、健康家兎骨髓を被覆法により培養し、培地に種々の濃度の核酸溶液を添加し上記の実験成績を得たが、以下それを総括して述べる。

2% RNA 溶液添加で組織増生は対照より悪く、却つて抑制的に作用した。1% RNA 溶液添加で増産面積は対照の約2倍、0.5% RNA 溶液添加で最もよく対照の約2倍の値を示した。然し、0.01% RNA 溶液では対照と有意の差を認めなかつた。細胞密度は0.5%、1% RNA 溶液添加で僅かに対照より高値を示した以外、他の濃度では対照と有意の差を認めなかつた。次に、偽好酸球の機能、就中その遊走速度と墨粒貪喰能に就いて述べると遊走速度は0.5% RNA 溶液添加で僅かに対照より亢進を示した以外はどの濃度溶液添加でも対照と有意の差を認めなかつた。墨粒貪喰能は0.5%、1% RNA 溶液添加で対照の約2倍の値を示した。次に DNA に就いては0.5% DNA 溶液添加で増生面積は対照

の約1.5倍の値を示し、1%及び0.1% DNA 溶液添加では対照と有意の差を認めなかつた。細胞密度は1% DNA 溶液添加で対照の約2倍、0.5% DNA 溶液添加で対照の約1.4倍の密度係数を示した。偽好酸球の遊走速度はどの濃度溶液添加で何等影響がみられなかつたが、墨粒貪喰能は著明な亢進がみられ、0.5% DNA 溶液添加で対照の約3倍、1.0% DNA 溶液で対照の約2倍の平均貪喰度並びに貪喰率を示した。

以上、私は骨髓組織培養を応用して核酸が骨髓に対し、直接刺戟作用を有する事を認めると共に、従来の研究者の業績を組織培養の面より立証し得た。

この際、骨髓組織培養に添加した核酸がどのような形で刺戟作用を発揮するに至るものかを以下考按したい。

1945年 Ahlström⁴⁰⁾ は同位元素を用いて生体内に与えた核酸が速やかに分解され、又試験管内に添加した実験においても同様分解される事を観察している。又、Brown⁴¹⁾ 等の実験は生体内に与えられた核酸の一部は体内核酸の合成素材として利用される可能性のある事を示している。一方近年、核酸誘導体の生物学的作用が諸学者により研究され、1928年 Doan⁵⁴⁾ はアデニン、グアニン、ヌクレオチドを家兎に注射し、白血球数の増加と骨髓に於いて刺戟像を認めている。又、服部³⁰⁾ は健康家兎にリボ核酸分解物を注射すると骨髓細胞新生を促進せしめると述べている。牧野³³⁾³⁴⁾ Schwietzer⁸³⁾ 等は核酸ピリミジン合成の重要な前駆物質としてのオロトン酸が白ネズミに対し発育促進作用のある事を認めている。更に、最近のめざましい生化学の進歩に依つ

て、核酸分解物が核酸合成の素材として利用されるのみでなく、各種ビタミンと共に補酵素として極めて重要な役割を演じている事が知られている。

以上の事実から核酸そのものが骨髓に対し直接刺戟的に作用する以外に分解物として利用される道もあることが充分考分考えられる。

第5章 結 語

私は核酸の骨髓造血機能に及ぼす影響に就いて検討するため、健康家兎骨髓を被覆法にて培養し、各種濃度の RNA 並びに DNA 溶液の直接添加実験を行ない、次の結果を得た。

1) RNA の至適濃度溶液の添加は増生面積の著しい増大と、細胞密度の増加を認めた。そして偽好酸球の墨粒貪喰能の著しい亢進と、遊走速度の軽度促進を認めた。

2) DNA の至適濃度溶液の添加は増生面積の軽度の増大と、細胞密度の増加を認めた。そして偽好酸の墨粒貪喰能の著しい亢進を認めたが、一方遊走速度に対して促進作用を認めなかつた。

擧筆するに臨み終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜わつた恩師平木教授並びに角南講師に深甚なる謝意を表す。

(本論文の要旨は日本血液学会第20及び21回総会に於いて発表した)

(文献後掲)

Effect of Nucleic Acids on Bone-Marrow Tissue Culture

Part 1. Effect of nucleic acids on the leucocyte series of normal rabbit bone marrow

By

Ryohei Yamasaki

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

In order to determine the effect of nucleic acids on the hematopoietic functions of bone marrow, the author added RNA and DNA at various concentrations directly to normal rabbit bone marrow being cultured by the coverslip method, and obtained the following results.

1. The direct addition of RNA at optimal concentration to the culture medium increased the growth area markedly and also there could be observed an increase in the cell density. In addition, there were recognized a marked acceleration of carbon particle phagocytotic ability in pseudo-eosinophils as well as a slight increment in the wandering velocity of these cells.

2. In the case of the addition of DNA there were recognized a mild increase in the growth area and an increase in the cell density. Moreover, the carbon particle phagocytotic ability of pseudo-eosinophils was greatly accelerated but there could be seen no effect on the wandering velocity.
