

家兎骨髓組織液体培養法による鉄、銅及び

コバルトの増血作用に関する研究

第 1 編

方法論及び鉄の増血作用

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

副手 久米田 克哉

〔昭和33年4月23日投稿〕

目 次

第1章 緒 言	第2節 グルコン酸第2鉄単独添加
第2章 液体培養方法論	第3節 硫酸第1鉄、塩化第2鉄及びクエン酸鉄アンモンの単独添加
第1節 Osgoodの原法	第4節 グルコン酸第2鉄と血清の同時添加
第2節 Hays他諸氏の方法	第5節 硫酸第1鉄、塩化第2鉄及びクエン酸鉄アンモンと血清の同時添加
第3節 私の改良法	第4章 総括及び考按
第4節 改良法考案の経過	第5章 結 語
第3章 各種鉄剤の増血作用	
第1節 実験方法	

第1章 緒 言

体外に取出した動物の組織或は細胞は、之を単に生理的食塩水或はリンゲル氏液中におくだけでも或程度その生命を維持し得ることは古来よりよく知られていたが、更に一定の支持組織及び發育促進物質として鶏胎圧搾液等を加えるならば、組織片は恰も生体内に於けるが如くによく分裂、増殖を行ひ得るものである。

この現象を応用したものが組織培養法であり、ごく原始的には既に前世紀以来、Roux⁶¹⁾、Harrison¹⁹⁾等により試みられたところである。その後1910年に至り、Carrel、Burrows⁴⁾⁵⁾により方法論的革新が齎されて以来、Fischer¹²⁾、Gey¹⁶⁾、Osgood & Brownlee⁵⁹⁾⁶⁰⁾⁶¹⁾、Erdmann¹⁰⁾¹¹⁾、Lewis & Lewis⁴⁴⁾、Maximov⁴⁹⁾等の諸学者により陸続として研究が発表せられ、各方面に新生面が開拓せられて今日に見る長足の進歩を遂げるに至つた。本邦に於ても木村教授³⁶⁾一門の30年来の尠大な細菌学的、免疫学的方面の研究の他、館石、飯塚教授門下⁸²⁾の糖尿病その他に関する業績が見られる。而して現今、冷血、温血動物の殆んどすべての組織が培養可能であり、造血臓器

については脾臓、淋巴腺と共に骨髓に關してもCarrel & Burrows⁴⁾⁵⁾を始めとし、Foot¹³⁾、Erdmann¹⁰⁾¹¹⁾、Grossmann¹⁸⁾、小松⁴¹⁾、Osgood & Brownlee⁵⁹⁾⁶⁰⁾⁶¹⁾、Israëls³²⁾等の初期よりに研究が見られ、又近年教室に於ては系統的詳細に骨髓組織培養の研究を行っている⁵⁴⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾。而してその培養方法としては他組織と同様に凹窩載物硝子法及びカレル氏瓶法によるものがあり、又最近には回転培養法も試みられているが、之等により観察するところは殆んど白血球系細胞の形態、機能等に関するものであり、赤血球系細胞、Hb代謝等に関する観察はかかる方法では困難である。然るに1936年、Osgood⁵⁶⁾等は初めて骨髓細胞を浮游液として培養する方法を考案し、種々改良を加えて簡易化し、その培養条件等に関する基礎的研究を始め、臨床的応用方面についても多くの業績を発表した。又Norris & Majnarich⁵²⁾⁵³⁾、Hays²⁵⁾等も相次いで更にこの方法の変法を考案してより簡便なものとし、赤、白両血球系細胞の分裂、増殖に及ぼす各種物質の効果を研究した。本邦に於ても伊藤³³⁾、牧野⁴⁶⁾等は主としてMajnarichiの方法により、骨髓細胞増生に及ぼすV. B₁等の影響を、小池³⁹⁾もほぼ同様の方法により、各種アミノ酸の増血

作用、特に骨髓に於ける血色素代謝に及ぼす影響を検討した。

扨蹠つて鉄に造血作用のあることは極めて古くから知られており、貧血状態にある生体に経口的に無機或は有機の鉄剤を与えれば、赤血球、殊に Hb の著明な増加を来すことは周知の事実であり、又最近直接静脈内に投入して有効な鉄剤の研究も見られる。而して投与された鉄が如何なる過程を辿つて生体内での Hb 合成に導かれるかについては、尚不明の点が多い。経口的投与の場合の鉄の吸収過程に関しては、Heubner²⁷⁾、Lintzel⁴⁵⁾、Starkenstein⁷⁵⁾⁷⁶⁾ その他多くの人々の詳細な研究があり、又血清内の鉄に関しては Heilmeyer 一派²⁶⁾、Barkan¹⁾、Starkenstein 等の極めて広汎な業績が見られ、又赤血球系細胞内に於ける Hb の合成過程に関しては、Vannotti⁸⁷⁾、Schilling⁶⁷⁾、Watson⁹⁰⁾ 等の興味ある研究がある。Lintzel、Starkenstein 等によれば、経口的に投与された鉄の中、生理的に利用されるのは 2 価の形でイオン化されたものに限り、3 価の形で投与された鉄も胃の中で 2 価の状態に還元され Cl と結合して FeCl₂ の形で空腸、殊に十二指腸上部の粘膜より吸収されるのであるが、血清内に証明せられる鉄は既に 3 価の状態となつており、之は血清グロブリンと結合して存する。而してこの鉄が如何なる条件のもとで如何ようにして Hem 核へ導入され、血色素として合成されるやについては尚明かでない。

私はこの鉄の増血機転解明の一端として上述の骨髓液体培養法を応用したいと思ひ、既述の諸氏の方法を追試してみたが、骨髓液の採取方法その他種々疑問の点を見出したので之を改良し、これにより無機、有機の 2 価及び 3 価の鉄剤を直接骨髓細胞に接触せしめてその Hem 核への導入の如何を検し興味ある知見を得た。

以下暫く諸氏の方法について記述し、次で私の改良法及びその考案の経過を述べ、更に之を用いて行つた各種鉄剤の添加実験成績について述べる。

第 2 章 液体培養方法論

第 1 節 Osgood の原法⁵⁹⁾

第 1 項 原始的方法

Osgood が 1936 年、Muscovitz と共に Journal of American Medical Association に発表した最初の骨髓液体培養法は第 1 図の如き複雑な装置を必要とするものであるが、その主体は半透膜製の囊によるガス交換装置で、骨髓液をこの囊に入れその周囲にメ

ヂウムを満し、この膜を通じてメヂウム中の栄養物質は培養骨髓中に入り、骨髓中の老廢物質はこの膜を通してメヂウム中に拡散するようにしたもので、一定時間後このメヂウムを取出し之を分析することにより、骨髓の培養条件及びその代謝状態を測定する。

第 2 項 大量の骨髓培養のための改良法⁶⁰⁾

同年、彼は更に大規模に多量の骨髓を培養する装置として、第 2 図の如きものを考案発表した。その主体は 2 立容の吸引瓶 5 個と、之等を互に連結する圧力管よりなり、各瓶間の落差をうまく利用し、Wasserbad 中に入れた (1) の瓶中の培養骨髓は (3) より滴下して来るよくガスと混和されたメヂウムに絶えず洗われ、このメヂウムは常に循環するように考案されている。ガス及びメヂウムは夫々 (6) 及び (7) より適宜取出して分析し、又骨髓も (2) より取出して細胞数の算定、その他必要な血液学的検索に用いられる。

第 3 項 簡便法⁶¹⁾

更に同年、彼は遙かに簡便な培養法をワクチン瓶を利用することにより創案し、翌年更に之を改良して発表した。以下その概略を述べる。滅菌した 50 cc 及び 30 cc 容のワクチン瓶、目盛付試験管及び注射器を多数用意する。胸骨穿刺により得た 1 乃至 10 cc の人骨髓液を、先づ 25 cc の Gey 氏 I 液を入れた 50 cc 容ワクチン瓶に入れ、1500 回転 15 分間遠沈し上清を捨てよく混和した後、ゴムキャップを付した目盛付試験管に入れ再遠沈、沈澱した細胞層から管底の成熟赤血球層を除いた全有核細胞を採取し、8 cc の Gey 氏 II 液を入れたワクチン瓶に移しよく混和する。次に之に分娩後可及的速かに採取分離した人臍帯血清を加え、更に Gey 氏 II 液を追加して

	I 液 (クエン酸加)	II 液
Na ₂ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	5.0	—
NaCl	6.8	8.0
KCl	0.37	0.37
NaHCO ₃	0.23	0.23
CaCl ₂	0.17	0.17
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.21	0.21
KH ₂ PO ₄	0.03	0.03
NaH ₂ PO ₄	0.15	0.15
Mg ₄ SO	0.07	0.07
Dextrose	1.0	1.0

Gey 氏平衡塩液

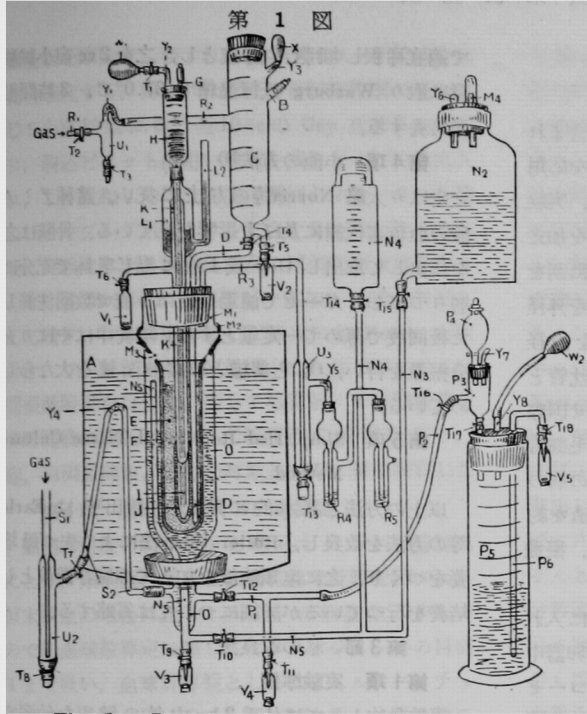
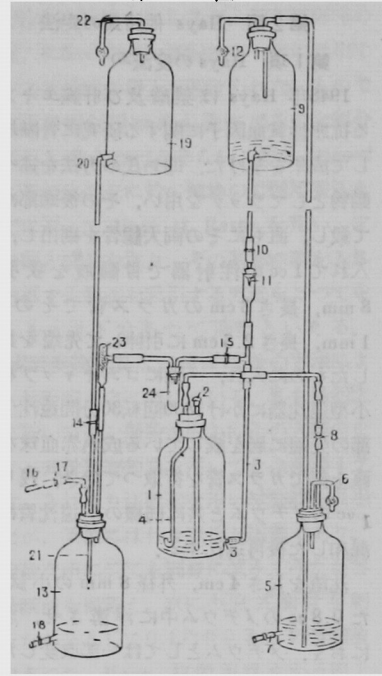


Fig. 1. — Diagram of marrow culture apparatus: A, thermostatically controlled glass water bath. B, inlet for introduction of marrow. C, calibrated chamber for measuring volume of marrow culture. D, tube leading from C into E. E, marrow culture chamber. F, semipermeable membrane containing marrow culture. G, inlet for introduction of serum of special nutrients. H, calibrated reservoir for serum or nutrients. I, small tube leading from H to interior of semipermeable membrane J. J, semipermeable membrane. K, larger tube for outlet of serum from J. L1, manometer for balancing colloid osmotic pressure of serum from J. L2, side arm of manometer containing mercury. M1, glass chamber, capped with rubber stopper onto which medium F is fitted. M1 rubber ring around shoulder permitting gas tight seal to chamber O. M3, hole for exit of gas from chamber O and for filling of E with medium from O. N1, inlet tube for refilling reservoir with fresh medium. N2, reservoir of sterile unused medium. N3, tube connecting reservoir with N4 and N5. N4, calibrated supplementary reservoir for mixing additional ingredients with stock medium and connecting tube. N5, tube through which medium flows from N3 or N4 into chamber O. O, glass chamber containing medium surrounding semipermeable membrane F. P1, outlet for withdrawal of medium from O. P2, rubber tube permitting raising or lowering of P5 and thus regulating the fluid level in O. P3, small chamber for pH determination. P4, reservoir for alcoholic neutral red solution. P5, calibrated reservoir for collection of used medium. P6, outflow tube for withdrawal of used medium. R1 and R2, inlet tubes from gas supply into marrow culture. S1 and S2, inlet tubes from gas supply into chamber O. T1 to T18, pinch cocks, stop cocks or screw compressor clamps. U1 to U3, traps for collection and withdrawal of water of condensation. V1 to V5, outlets for aseptic withdrawal of medium or culture; each has a fine, glass tip surrounded by sterile, nonabsorbent cotton and projecting into a protecting chamber, which is kept stoppered when not in use W1 and W2, rubber bulbs with two valves for introducing air under pressure. X, rubber bulb without valves for aspirating marrow into C. Y1 to Y8, sterile, nonabsorbent cotton to filter bacteria from gas and air inlets or outlets.

第 2 図



1 耗中の細胞数が1000乃至2000でかつ加えた臍帯血清の量が全量の35%となる如く稀釈する。之を 30 cc 容のワクチン瓶に 10~15 cc 充分注し、その 1 を対照として残し、他の瓶に試験すべき物質の夫々異つた量を加え、最終量が等しくなるよう第 II 液を追加する。各瓶をよく混和した後、37.5°C の孵卵器又は重湯煎中に入れておく。適当な時間後、注射器で各瓶中より 1 cc の液を吸引し、細胞数の計算或は之を遠沈し沈渣を塗抹して網赤血球その他種々の検索を行う。又メチウムの交換及びガスの混和は、48時間毎に培養瓶を孵卵器より取出して、1500回転40分間遠沈し、その上清を捨て新しい35%臍帯血清加 Gey 氏 II 液を加え、又 4 日毎に滅菌綿で濾過した空気を注射器に取り、予じめ培養瓶のキャップに注射針を 2 本刺して空気の脱出を可能にしておいてから、注入することにより行う。

Osgood はこの方法を用い、骨髓細胞の堪え得る種々の培養条件等基礎的な研究を行っており、特に培養時間については、材料提供の患者の死後 6 週間にしてなお培養器中に運動しつつある骨髓細胞を認めたと述べている。

第2節 Hays 他諸氏の変法

第1項 Hays の変法²⁶⁾

1948年 Hays は葉酸及び肝臓エキス中に含まれる抗悪性貧血因子に関する研究に骨髓培養法を応用して成果を挙げた。即ち氏の方法を述べると、実験動物としてラッテを用い、その後頭部に打撃を加えて殺し、直ちにその両大腿骨を剔出し、基部に割を入れて1 ccの注射器で骨髓液を吸引、之を外径8 mm、長さ3 cmのガラス管でその一端を内径1 mm、長さ2.5 cmに引伸して先端を封じ遠沈管としたものに入れ、一端にゴムキャップをかぶせ国際小型遠沈器にかけ1800回転30分間遠沈する。毛細管部の先端に層を成している成熟赤血球を、この層の直上部でガラス管を折取つて除き、残りの沈渣を約1 ccのメチウムと共に同様の小遠沈管に入れ、振盪混和した後再遠沈する。

沈渣を長さ4 cm、外径8 mmの小試験管に入れた0.8 ccのメチウム中に浮遊させ、之を解卵器中におく。メチウムとしては一部改変したグルコースを含みぬタイロード氏液を用いる。3時間後培養管を取出し、その1滴を取り検査を行う。

第2項 Norris & Majnarich の変法

Hays と同じく1948年、Norris & Majnarich³³⁾ は Osgood の変法を考案し、Xanthopterin の骨髓細胞増生に対する影響を見ている。実験動物としては家兎を始め、牛、鼠、羊、猫等を用いているが、典型的な家兎の場合を述べると、3匹の家兎の胸骨及び肋骨より骨髓液を吸引し、之を20 ccの Glucose free のタイロード氏液の中に入れ細胞浮遊液とし、更に同液で55 cc位に稀釈する。次に之を遠沈し粗大な組織片、リポイド等を除去しその2 cc 宛を5 cc容のワクチン瓶に入れる。対照群には0.2 ccのタイロード液を、添加群には0.1 ccのタイロード液及び0.1 ccの健康人血清を加え、各瓶を Warburg 氏恒温槽に入れ 37.0°C でゆつくり振盪培養する。3時間及び6時間でその一部を取出し検査する。

第3項 伊藤³³⁾、牧野⁴⁰⁾の方法

昭和26年、牧野等は主として Norris Majnarich の方法に従い V. B₁、V. B₁₂ 等の増血作用を研究した。家兎の胸骨又は大腿骨先端より、骨髓穿刺器により約1 ccの骨髓液を採取し、Glucose free の Gey 氏 I 液を入れた約30 cc容の大型共栓遠沈管に移しガラス玉を入れて充分振盪混和し、1500回転で15分遠沈し沈渣とはほぼ同量の液を残して上清を捨て、要すれば更に第 I 液を加え再遠沈する。沈渣を第 II 液

で適宜稀釈し細胞浮遊液とし、之を2 cc 宛小試験管に取り Warburg 氏恒温槽で 37.0°C、3時間振盪培養する。

第4項 小池の方法³⁹⁾

やはり大略 Norris等の方法に従い、諸種アミノ酸の血色素代謝に及ぼす影響を見ている。骨髓は之を露出して取出し Gey 氏 I 液に混じ乳鉢で充分に磨りつぶし、ガーゼで濾過後更に I 液で数回洗滌した後同液で薄めて一定量とする。培養中はやはり充分振盪を行い、O₂ と組織との接触面積を大ならしめている。

第5項 Simplified Replicated Tissue Culture Method

以上の方法と基本的に異なるが、勝田³⁴⁾ は Earle 等の方法を改良し、Roller tube 法により先づ母培養をつくり、之に塩類溶液を加えて細胞浮遊液とし培養を行つているが詳細については省略する。

第3節 私の改良法

第1項 実験準備

実験動物としては体重2 kg内外の健康な幼弱家兎を選び、約1週間一定食餌のもとに飼育したものをを用いた。小試験管、小遠沈管、駒込ビベット、ピンセット、骨鉗子等の実験器具は乾熱滅菌器で充分に滅菌し、骨髓破碎に用いるホモゲナイザーはプロペラ及びガラス槽を取り外し、煮沸滅菌しておく。

第2項 骨髓採取法

耳静脈よりの空気栓塞により家兎を屠殺後、直にその両上膊骨、両大腿骨及び両下腿骨を剔出し、各々の骨の表面を沃丁及び80%アルコールで滅菌し、骨鉗子を用い徐々に圧力を加えながら縦に割る。次に大小のピンセットを以て注意しつつ骨片を取除き骨髓を露出する。

第3項 培地及び細胞浮遊液の作製

Gey 氏第 I 液は滅菌操作中屢々原因不明の白濁を起したので培地としては第 II 液のみを用いた。又骨髓を洗滌するには Glucose free のタイロード氏液を用いた。

煮沸滅菌したホモゲナイザーのガラス槽を取出しその中に Glucose free のタイロード氏液を入れ、先に露出した骨髓をピンセットでしごきながらこの中に落す。この際屢々下腿骨末端等に見られる脂肪髓の部分は避ける。次にホモゲナイザーを組立て最低速、毎分約800回転で約1分間廻転させ骨髓を破碎する。得られた液を数本のスピッツグラスに分注し、約1500回転で10分間遠沈を行い上清及び表面の

脂肪層を去除し、要すれば再びタイロッド氏液を加え再沈沈する。得られた管底の骨髓細胞層の量に応じて小試験管に6乃至10 ccの Gey 氏第Ⅱ液をとり、駒込ピペットを用い沈澱を残さずこの中に入れ、よく混和し均等な細胞浮游液とする。3~5個のワールブルグ用ボトルに之を2 cc 宛分注する。別に実験すべき各種金属塩類の滅菌蒸溜水溶液をつくり、各 Bottle に所要量だけ添加、1個を対照として残す。特に考案作製した腕木に各 Bottle を取付け、ワールブルグ氏恒温槽に入れ 38°C で8時間培養を行った。而して培養前、4時間後及び8時間後に駒込ピペットで培養液の少量をとり、赤、白両血球数、網赤血球数及び Hb 量を測定した。

第4項 血球数及び Hb 量測定

細胞浮游液の約0.2 ccを駒込ピペットで時計皿にとり、末梢血の場合と同様に血球計算を行った。但末梢血の場合に比し1 mm³中の細胞数が少ないので赤血球数算定に際してはメランジュールの目盛1まで吸い、血球計算盤としてはビュルカー、チュルク氏のものを用いその小区割32を数え、得た数に $\frac{5}{32} \times \frac{1}{2}$ を乗じて1 mm³中の数とし、又白血球数は大区割4個を数えてその平均をとり、網状赤血球数の算定には Pappenheim 氏法を用いた。但後述の如く、爾後の実験中白血球数及び網赤血球数はその値が屢々動揺し不定であつたので実験成績より削除した。

次に Hb 量の測定は同じく末梢血用メランジュールで0.1の目盛まで骨髓液を吸い、フェリチアニード法によつてベックマン氏光電比色計を使用し測定した。

第4節 改良法考案の経過

Osgood は従来 Carrel 氏瓶若しくは被覆ガラス法によるより方法のなかつた骨髓組織培養に、液体培養という新生面を開拓し、これにより赤血球系細胞の分裂増殖の観察を可能ならしめ、後進の研究者達による基礎医学的、臨床的多数の業績への端緒を開いたのであり、この点に於て氏の功績は偉大なるものであり、その方法も完全な無菌的操作を行い、又ガス交換について考慮を払う等、今日に於ても傾倒すべき点が多い。しかしながら氏の方法は何分にも古く1936年に発表されたものであり、今日我々の有する血液学的知識よりして幾多の首肯し難い点がある。

先ず骨髓採取方法であるが、氏の原法に於ては人骨髓を用い、普通の胸骨穿刺法により、骨髓液1乃至

10 cc を吸引すると述べているが、近年猪野等の研究によれば、0.5 cc 以上の骨髓液を一度に吸引する時はかなりの末梢血の混入を避けられないものであり、まして氏の如く10 ccにも及べばその大部分は末梢血であると考えねばならない。即ち Osgood の方法は既にその出発点に於て純粹の骨髓培養法と云い難い。之に対して Hays は Ratte を用い、之を屠殺後その両大腿骨を取り、その基部に割を入れそこから注射器で骨髓液を吸引する方法をとつてをり、吸引量も1 cc 以下であつて妥当といえる。Norris 等も実験動物は異なるがほぼ同様の方法により、又伊藤・牧野等も之に倣つている。私も最初之等諸氏の法に従い家兎を屠殺後直ちにその大腿骨を露出し、ドリル式骨髓穿刺器を用いてその基部1ヶ所に穴を開け、それより注射器を用い骨髓液を吸引せんと試みたが、実際には仲々吸引が困難であり、骨幹部その他数ヶ所に於ても同様に試みてみたが容易に適量の骨髓液を得難く、次に小宮式胸骨穿刺針も用いてみたが辛うじて0.1乃至0.3 cc の骨髓液を得るのみであつた。Hays、牧野等はかかる際予め注射器に少量の培地を吸引しておけば骨髓液の流出を容易ならしめると述べており、私も試みてみたが殆んど無効であつた。

而して茲に問題となるのは、液体培養法に於ては得た骨髓液をそのまま用いず、メチウムで稀釈して細胞浮游液をつくるのであり、従つて0.1乃至0.3 cc 位の量では後に血球計算の場合に1 mm³中の細胞数が屢々10万以下となり、計算盤による算定の際誤差が大きくなることである。又 Hb 量も非常に低濃度の液として光電比色計にかけるので計測が困難となり誤差も大となる。そこで私は末梢血の混入は極力之を避け、而も培養後の計測に充分な量の骨髓液を得るために、既述の如く家兎の骨を骨鉗子で割り半流動体の骨髓をそのまま取出すことを考えた。之は小池も試みているところであるが、彼はかくして得た骨髓から細胞浮游液をつくるのに乳鉢で磨りつぶす方法をとつている。私も最初磁製乳鉢、次に磁製乳鉢を用いかなり長時間丹念に磨りつぶしてみたが相当に粗大な塊が残し、均等な細胞浮游液とすることが困難であり、又之をガーゼで濾過すればやはり濾液中の細胞数が少くなる。

茲に於て私は骨髓を破碎するのにホモゲナイザーを用いることを思いついたが、之により強い機械的刺戟を与えることは骨髓細胞を破壊、死滅させはしないかと考えしばらく躊躇した。紺野⁴²⁾は同じく骨

髓組織液体培養に於て放射性鉄を用い Hem の合成と分解をしらべているが、その際細胞膜を破壊し膜の影響を除くためにホモグナイザーを使用している。しかし実際にごく低速で短時間内に之を廻転させれば細胞膜破壊の恐れは少いことが分つた。即ち、かくして得た液をピペットにとり、載物ガラス上に1滴落しカバーガラスで覆い保温箱中で鏡検すると、各種白血球の活発な運動を認め、又溶血もごく程度に認められるのみであつた。

次に之を培養する方法であるが、最初 Osgood の方法に従い、密栓した小試験管に細胞浮游液を分注し、37°C の孵卵器中に置き、30分毎に取出してよく振盪混和しながら培養を続けてみたが、Norris 等の記述している如く、数時間後には管底に細胞塊の集積を認め、之は烈しく振盪しても離散しない。そこで以後は Norris、牧野等の行つている如く、ワールブルグ氏槽温槽を利用し、絶えず振盪攪拌して骨髓細胞を常にメチウムと接触せしめるようにし好結果を得た。

次に培養を行つた時間についてであるが、Osgood はメチウムの交換及びガスの交換を行いつつ非常に長期に亘り培養を続け得たと述べているが、前記の如く培養管を孵卵器内に放置しただけでは数時間で管底に死滅した細胞の凝塊を生ずる点、及び本培養法では Carrel 氏瓶、載物ガラス法と異り骨髓細胞に対する支持組織のない点等から考えて、如何にメチウム及びガス交換を行つてもかほど長期に亘り細胞の分裂、増殖が行われたということは極めて疑問である。Norris 等の実験に於ても6時間後のデータまで記載しあるのみであり、Hays は3時間まで、牧野も同様、小池は2時間まで培養を行つているに過ぎない。私も8時間以上培養を続けてみたが、それ以上になると細胞数も Hb 量も減少の一途を辿り、培養瓶の底に多くの死滅した細胞塊を生ずるだけであつたので8時間までで培養を打切つた。

第3章 各種鉄剤の増血作用

第1節 実験方法

前章に於て述べた如く、体重2kg内外の健康幼弱家兎の両大腿骨、両下腿骨、両上膊骨より骨髓細胞浮游液をつくり、之に添加試験薬剤として日本薬局方硫酸第1鉄、塩化第2鉄、クエン酸鉄アンモンの各滅菌水溶液及びグルコン酸第2鉄（大日本機器製薬製のグルフェリコン）を用いた。

之等各水溶液を駒込ピペットにより1乃至数滴宛

培養に添加し、その添加量は各液の濃度と1ccあたりの滴数とより算出した。なお同時に添加した血清は、同じく健康幼弱家兎より無菌的に採取、分離した血清を用いた。実験は各薬剤の各濃度について3例宛行い、その平均値をとつた。なお家兎の骨髓はかなり個体差が大きいため、各例毎に对照として滅菌蒸留水を1滴添加した。実験成績中、網状赤血球、白血球（全有核細胞数）は値に変動が多く不定となつたため、実験成績より削除した。

第2節 グルコン酸第2鉄単添加

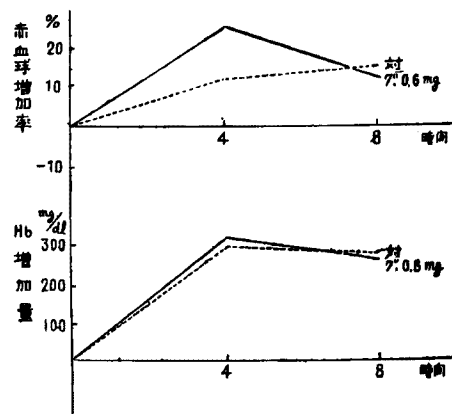
第1項 0.6mg 添加（第1表、第1図）

図表の如く添加例は4時間で赤血球数は25%の増加を示し对照と13%の差を示すが、8時間では之より減少し、对照とほぼ同様の増加率を示す。Hb量は之に対し、4、8時間共夫々300mg、250mg前後の増加を示し、对照と殆ど差を見ない。

第1表 グルコン酸第2鉄添加（1）

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	0.6mg	12.8	16.0	14.3
	対	13.1	14.7	15.0
赤血球増加率(%)	0.6mg	—	25.0	12.0
	対	—	12.0	14.5
Hb量(mg/dl)	0.6mg	230	540	480
	対	190	480	460
Hb増加量(%)	0.6mg	—	310	250
	対	—	290	270

第1図 グルコン酸第2鉄添加（1）



第2項 1mg 添加（第2表、第2図）

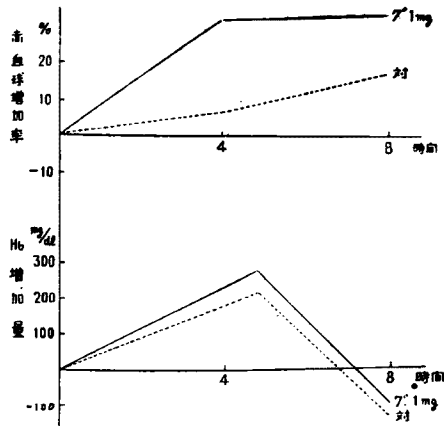
赤血球増加率は添加例では4時間で32%となり对照の5.7%に比し明かな差を見、8時間に於てもな

お17%の差をみる。之に対し Hb 量は4時間でよく増加, 8時間では培養前よりやや減少するが対照も同じ経過をとり, 0.6 mg 添加の場合と同様に殆んど差を見ない。

第2表 グルコン酸第2鉄添加(2)

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	1 mg	23.1	30.5	30.9
	対	22.8	24.1	26.5
赤血球増加率(%)	1 mg	—	32.0	33.3
	対	—	5.7	16.2
Hb 量 (mg/dl)	1 mg	560	830	460
	対	395	615	265
Hb 増加量 (")	1 mg	—	270	-100
	対	—	220	-130

第2図 グルコン酸第2鉄添加(2)



第3項 2 mg 及び 0.1 mg 添加 (第3表, 第3図)

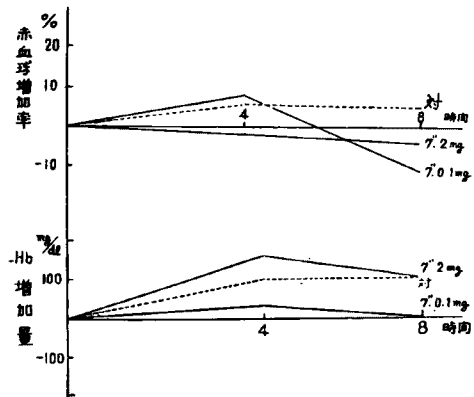
更に大量添加の場合として 2 mg では赤血球数は 4, 8 時間共培養前に比し僅かに減少し, 対照と比して 7~8% 増加率が悪い。Hb 量は 4 時間で 55 mg 対照より増加大であるが, 8 時間では等しい増加量を示す。之に対し 0.1 mg の少量添加の場合には前者と逆に Hb 増加量は 4, 8 時間共対照より悪くなる。赤血球増加率は 4 時間で殆んど等しく, 8 時間ではかなり対照より悪くなる。

以上グルコン酸第2鉄(以下グ.) 単独添加では 1 mg 添加の際, 著明に赤血球増加率が大きくなる他, 対照との間に大差なく, 即ちグ. はそのまま添加しても明かな増血作用は見られず, 殊に骨髓細胞の Hb

第3表 グルコン酸第2鉄添加(3)

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	2 mg	16.3	15.5	12.5
	0.1mg	17.5	18.8	15.5
	対	16.0	17.0	16.8
赤血球増加率(%)	2 mg	—	-0.8	-3.8
	0.1mg	—	7.4	-11.4
	対	—	6.3	5.0
Hb 量 (mg/dl)	2 mg	190	345	190
	0.1mg	90	120	90
	対	90	190	190
Hb 増加量 (")	2 mg	—	155	100
	0.1mg	—	30	0
	対	—	100	100

第3図 グルコン酸第2鉄添加(3)



合成に殆んど利用されないことが分かる。

第3節 硫酸第1鉄, クエン酸鉄アンモン, 塩化第2鉄添加

第1項 硫酸第1鉄添加(第4, 5表, 第4, 5図)

2価の無機鉄を代表するものとして硫酸第1鉄を, 0.1, 0.3及び1 mg 添加してみた。0.1及び0.3 mg 添加では 4, 8 時間共赤血球増加率は対照より 3~10% 悪く, 又 Hb 量も同じく 50~200 mg の減少を示し対照より少し悪い。又 1 mg 添加例では赤血球数は 4 時間で培養前と同じく, 8 時間ではやや減少し, 共に対照より僅かに優っているが, Hb 量は反対にかなりの減少を見る。即ち硫酸第1鉄単独添加では何等の増血効果も認められない。

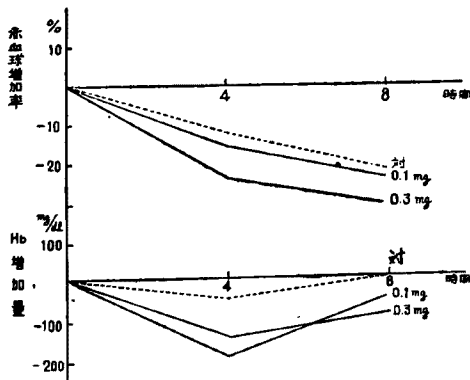
第4表 硫酸第1鉄添加(1)

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	0.1mg	24.6	20.8	18.9
	0.3mg	26.9	20.5	18.8
	対	24.7	21.7	19.2
赤血球増加率(%)	0.1mg	—	-15.5	-23.0
	0.3mg	—	-23.8	-30.0
	対	—	-12.1	-22.3
Hb量(mg/dl)	0.1mg	340	140	290
	0.3mg	390	240	280
	対	290	240	290
Hb増加量(%)	0.1mg	—	-200	-50
	0.3mg	—	-150	-90
	対	—	-50	0

第5表 硫酸第1鉄添加(2)

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	1mg	17.6	17.8	16.2
	対	18.0	17.7	14.1
赤血球増加率(%)	1mg	—	1.1	-7.9
	対	—	-1.7	-21.7
Hb量(mg/dl)	1mg	740	370	-290
	対	580	470	395
Hb増加量(%)	1mg	—	-370	-480
	対	—	-110	-185

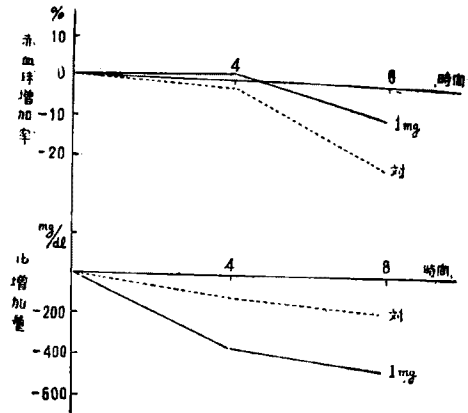
第4図 硫酸第1鉄添加(1)



第2項 クエン酸鉄アンモン添加(第6表, 第6図)

3価の有機鉄としてクエン酸鉄アンモンを試みたが、之は分子量が大であるから1mg及び2mg添

第5図 硫酸第1鉄添加(2)

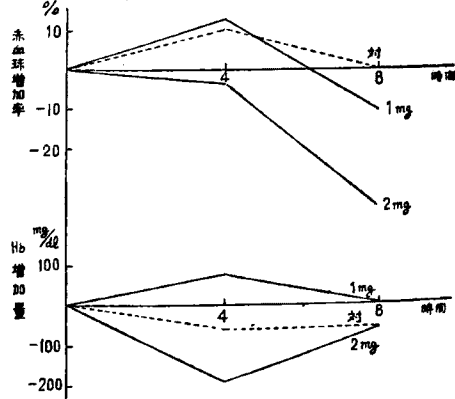


加した。1mgでは赤血球数は4時間ではほぼ対照と同程度に増加するが8時間では培養前より減少し、対照よりも少し増加率が悪い。Hb量は対照が4、8時間共減少するに対し、4時間で75mgの増加

第6表 クエン酸鉄アンモン添加

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	1mg	18.3	20.5	16.3
	2mg	16.6	16.0	10.7
	対	16.7	18.5	16.7
赤血球増加率(%)	1mg	—	12.0	-10.9
	2mg	—	-3.6	-35.5
	対	—	10.8	0
Hb量(mg/dl)	1mg	1270	1345	1270
	2mg	1320	1125	1260
	対	1285	1225	1225
Hb増加量(%)	1mg	—	75	0
	2mg	—	-195	-60
	対	—	-60	-60

第6図 クエン酸鉄アンモン添加



を示し、8時間では培養前の値と等しくなるがなお対照と45mgの差を見る。次に2mg添加例では赤血球数、Hb量共に4、8時間で減少し対照に比してもかなり悪い。即ちこの鉄は1mg添加の際幾分増血効果を認めるが、2mgでは逆に全然効果なく、不定の結果を示す。

第3項 塩化第2鉄添加(第7, 8表, 第7, 8図)

以上の有機3価鉄、無機2価鉄に続き、無機3価鉄として塩化第2鉄の添加を試みた。先ず0.3mgの添加では赤血球増加率は4、8時間共対照よりやや良く、0.6mgの場合は4時間で増加率は0で対照より悪いが、8時間では逆に対照よりやや良好であり、全体として対照と著明な差は認められない。Hb増加量は0.6mg、0.3mg共4時間では対照よりやや悪く、8時間では0.3mgの場合少し対照を上廻るが0.6mgではやはり僅かに対照より悪くな

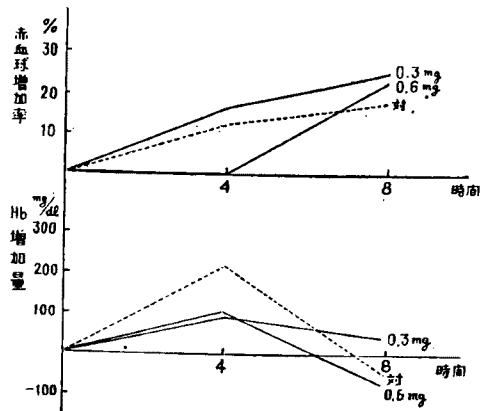
第7表 塩化第2鉄添加(1)

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	0.3mg	7.6	8.9	9.5
	0.6mg	14.1	14.1	17.4
	対	20.8	23.4	24.5
赤血球増加率(%)	0.3mg	—	16.1	25.3
	0.6mg	—	0	23.4
	対	—	12.5	17.8
Hb量(mg/dl)	0.3mg	300	395	340
	0.6mg	260	360	190
	対	340	557	290
Hb増加量(%)	0.3mg	—	95	40
	0.6mg	—	100	-70
	対	—	217	-50

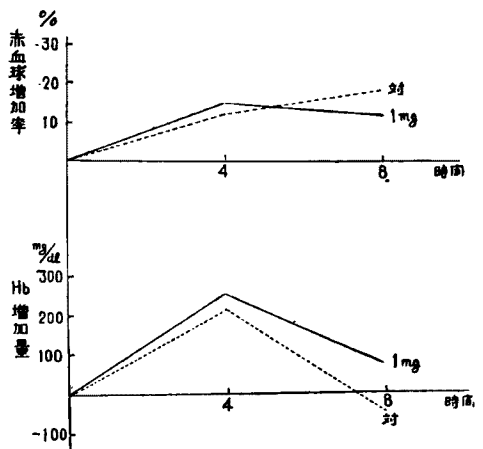
第8表 塩化第2鉄添加(2)

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	1mg	18.7	21.3	20.8
	対	20.8	23.4	24.5
赤血球増加率(%)	1mg	—	13.7	11.2
	対	—	12.5	17.8
Hb量(mg/dl)	1mg	190	440	260
	対	340	560	290
Hb増加量(%)	1mg	—	250	70
	対	—	220	-50

第7図 塩化第2鉄添加(1)



第8図 塩化第2鉄添加(2)



り、全体として赤血球増加率と同じく対照と明かな差はない。次に1mg添加の場合もHb増加量がやや良いようであるが、明かな差なく、赤血球増加率も同様である。即ちこの鉄も単独で骨髓に加えただけでは見るべき増血作用を齎さない。

第4節 グルコン酸第2鉄と血清の同時添加(第9, 10表, 第9, 10図)

前節までの実験に於て試みた各種鉄剤の骨髓造血機能に及ぼす影響をみるに何れも著明なものはなく、殊にHb量増加作用が明らかでない。既述の如く之等鉄剤は経口的抗与の場合には腸管から吸収された後血清内に於て蛋白と結合し、3価の状態となつた上骨髓細胞のHem合成に与るものと考えられている。茲に於て私は、之等鉄剤を家兔の血清と同時に添加して単独添加の場合と比較してみた。

先ずグ.について、比較的赤血球増加率、Hb増加

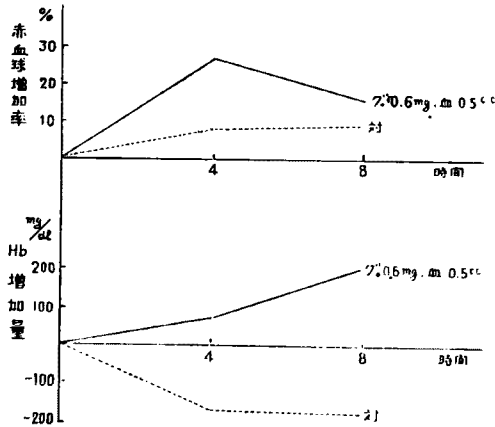
第9表 グルコン酸第2鉄+血清添加(1)

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	グ.+血清	9.8	12.4	11.3
	対	9.4	10.2	10.2
赤血球増加率(%)	グ.+血清	—	26.5	15.6
	対	—	8.5	8.5
Hb量(mg/dl)	グ.+血清	395	465	600
	対	385	210	200
Hb増加量(%)	グ.+血清	—	70	205
	対	—	-175	-185

第10表 グルコン酸第2鉄+血清添加(2)

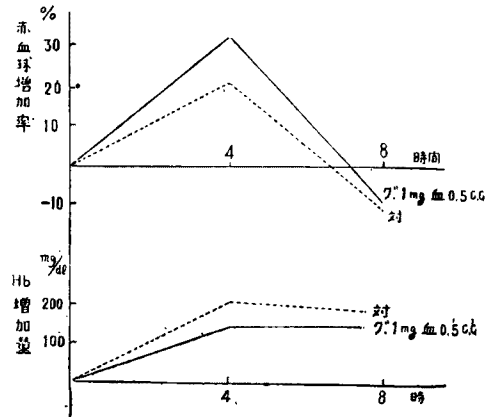
		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	グ.+血清	14.0	18.5	12.7
	対	10.3	12.5	9.2
赤血球増加率(%)	グ.+血清	—	32.1	-9.3
	対	—	21.3	-10.7
Hb量(mg/dl)	グ.+血清	150	290	290
	対	110	310	290
Hb増加量(%)	グ.+血清	—	140	140
	対	—	200	180

第9図 グルコン酸第2鉄+血清添加(1)



量の大であつた 0.6 mg 及び 1 mg に健康家兎血清 0.5 cc を添加した。0.6 mg の場合赤血球増加率は対照に比しかなり大であるが、単独添加の際と比較してはあまり差がない。之に対し Hb 量は対照が4、8時間共に培養前より減少の状態であるのに対し、4時間で70 mg、8時間では205 mg の増加を示し著明な差を認めた。次に 1 mg の場合は単独添加の場合に比し赤血球増加率も Hb 増加量も却つてやや悪い結果をみたが、之は加えたグ.の量に比し血

第10図 グルコン酸第2鉄+血清添加(2)



清の量が少なすぎたものと考えられる。兎も角 0.6 mg のグ.と血清を同時に添加すれば且てみない Hb 増加量の差を対照との間に認めたことは、グ.が骨髓細胞の Hem 合成に利用されるためには何等かの血清中の因子を必要とすることが示唆されている。

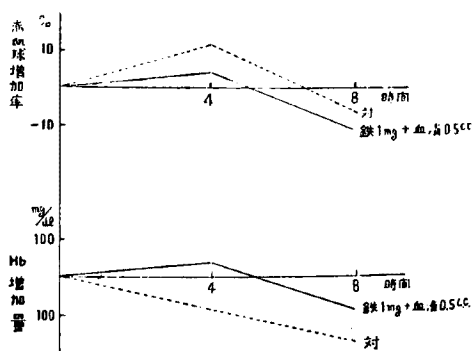
第5節 硫酸第1鉄、塩化第2鉄、クエン酸鉄アンモンと血清の同時添加

第1項 硫酸第1鉄と血清の同時添加(第11表、第11図)

第11表 硫酸第1鉄+血清添加

		培養前	4時間	8時間
赤血球数(10 ⁴)	鉄+血清	24.5	25.4	21.5
	対	22.9	25.3	21.3
赤血球増加率(%)	鉄+血清	—	3.7	-12.2
	対	—	10.5	-7.0
Hb量(mg/dl)	鉄+血清	395	105	300
	対	395	425	210
Hb増加量(%)	鉄+血清	—	30	-95
	対	—	-95	-185

第11図 硫酸第1鉄+血清添加



硫酸第1鉄 1mg に家兎血清 0.5cc を併せて添加したが図表の如く赤血球増加率は寧ろ対照より低く、反対に Hb 増加量は対照よりやや大であり、之を硫酸第1鉄単独添加の場合に較べると丁度逆の関係になつている。即ち グ. の場合程着明ではないが、この鉄も血清を同時に与えれば僅かながら骨髓細胞に直接利用されるものの如くである。

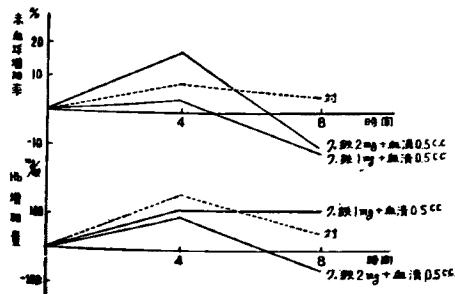
第2項 クエン酸鉄アンモンと血清の同時添加 (第12表, 第12図)

クエン酸鉄 1mg 及び 2mg に血清を夫々 0.5cc 併せ添加した。1mg の場合赤血球増加率は4時間で対照とはほぼ同じく、8時間では之よりやや悪くなり単独添加の場合に比して差をみない。Hb 増加量は単独添加では4, 8時間共対照より少し大であるがこの場合は4時間ではやや劣り、8時間で少し対照より増加している。次に 2mg の添加では単独添加で赤血球数は4, 8時間共に減少して対照より明

第12表 クエン酸鉄アンモン+血清添加 (ク.鉄=クエン酸鉄アンモン)

		培養前	4時間	8時間
赤血球数 (10 ⁴)	ク.鉄1mg, 血.	25.9	26.8	22.8
	ク.鉄2mg, 血.	22.5	26.5	20.2
	対	19.6	21.2	20.5
赤血球増加率 (%)	ク.鉄1mg, 血.	—	3.5	-11.9
	ク.鉄2mg, 血.	—	7.8	-10.2
	対	—	8.2	4.6
Hb 量 (mg/dl)	ク.鉄1mg, 血.	500	395	395
	ク.鉄2mg, 血.	290	396	235
	対	290	450	340
Hb 増加量 (〃)	ク.鉄1mg, 血.	—	115	115
	ク.鉄2mg, 血.	—	105	-55
	対	—	160	50

第12図 クエン酸鉄アンモン+血清添加



かに増加率が悪いが、本例では4時間で対照より少し大となつている。

又 Hb 増加量は対照にはやや劣るが単独添加例にくらべると僅かに大である。以上要するにクエン酸鉄アンモンの増血作用は血清を加えるも明かな変化は認められない。

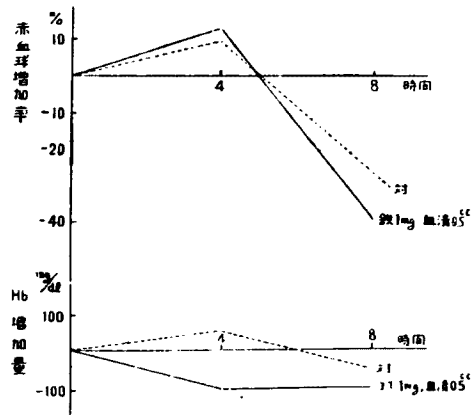
第3項 塩化第2鉄と血清の同時添加 (第13表, 第13図)

同じく鉄 1mg と血清 0.5cc を加えた。Hb 増加量は4, 8時間共対照より悪く単独添加の場合に比

第13表 塩化第2鉄+血清添加

		培養前	4時間	8時間
赤血球数 (10 ⁴)	塩鉄+血清	9.6	10.8	5.3
	対	14.7	16.2	10.3
赤血球増加率 (%)	塩鉄+血清	—	12.5	-44.8
	対	—	10.2	-30.0
Hb 量 (mg/dl)	塩鉄+血清	290	190	190
	対	240	290	190
Hb 増加量 (〃)	塩鉄+血清	—	-100	-100
	対	—	50	50

第13図 塩化第2鉄+血清添加



し却つて悪くなる。又赤血球増加率は4時間で対照より僅かによく、8時間では之より少し悪くなり、単独添加の場合と等しい。即ちこの鉄も血清を加えても増血効果の増強は見られない。

第4章 総括及び考按

I. 方法論に関する総括と考按

1910年 Carrel⁴⁾等により方法論的革新が齎されて以来 Fischer¹²⁾, Erdmann¹⁰⁾¹¹⁾を始めとし多数

の学者により骨髓組織培養法が行われるようになり、基礎医学的及び臨牀的に多方面に亘る業績が発表せられて来たが、その多くは白血球系細胞の形態、運動或は貪食機能等について観察せられている。

之に対し Osgood は1936年、骨髓組織液体培養法を創始し白血球系細胞の分裂、増殖の観察を可能ならしめた。その方法は最初極めて複雑な装置を必要とするものであつたが⁵⁹⁾、逐次之を改良して最後にワクテン瓶を利用することにより極めて簡単に又同時に多数の実験が行えるようになった⁶¹⁾、更に Norris & Majnarich⁵²⁾⁵³⁾ は相次いでその改良法を考案し、又本邦に於ても伊藤³⁹⁾、牧野⁴⁰⁾、小池³⁸⁾等により変法が行われ、Vitamin、アミノ酸を始めとし諸種薬剤の骨髓造血機能に及ぼす影響が検討された。

私は教室に於ける骨髓組織培養研究の一端として液体培養法を行い、之まで試みられたことのない鉄、銅、コバルト等金属塩類の直接添加の影響を見ましたが、その方法の撰択にあたり上記諸氏の方法を検討した結果、何れにもその骨髓液採取法、骨髓液採取量等におお改良すべき点を見出した。即ち Osgood は人体の胸骨穿刺により1~10 cc の骨髓液を吸引しているが、近時猪野²⁸⁾の研究によれば末梢血の混入を避けるための吸引量は1回0.2 cc 位が適量とされており、0.5 cc 以上を吸引すればかなりの量の末梢血の混入をみることになり、純粹の骨髓培養とはいい難くなる。更に Norris 等、伊藤、牧野は家兎の胸骨、大腿骨等からやはり1 cc 内外の骨髓液を吸引しており、実際に追試の結果、普通の骨髓穿刺法では家兎の骨髓からは0.1~0.2 cc の骨髓液しか吸引困難であり、無理に1 cc もの液をとろうとすれば相当量の末梢血の混入を避けがたい。之に対し小池は家兎の骨髓を直接取り出して之を乳鉢で磨りつぶして細胞浮游液をつくっているが、やはり追試の結果充分均等な細胞浮游液を得ることができなかつた。こゝで私は培養するに充分な量の骨髓を可及的純粹に得るために小池の如く家兎の骨を剔出して之を割り、半流動体の骨髓を直接に得る方法をとつたが、次に之から細胞浮游液をつくるにあたり、ホモゲナイザーを低速(毎分約800回転)で廻転させて骨髓を破碎することを思いつき之により好結果を得た。その経過に関しては第2章第4節に詳述した。

II. 各種鉄剤添加実験に関する考按

脊椎動物に於ける白血球系細胞の發育段階は(A)

前赤芽球→(B)好塩基性赤芽球→(C)多染性赤芽球→(D)正常赤芽球→(E)成熟赤血球となるものであり、赤血球中の Hb 含有量は(C)、(D)の時期に於て既に(A)、(B)の時期の約10倍に達し成熟赤血球のそれとほぼ等しくなるという。(Ponder)⁷⁰⁾

扱へモグロビンは周知の如くポリペプチド環の積み重ねよりなるグロビン分子に4個の含鉄色素ヘムが結合したものである。経口的に投与された鉄は胃液によつてイオン化し易い状態となり、之が食物中の還元物質やビタミンCによつて還元され2価鉄として大部分は幽門部、十二指腸上部で吸収されるといわれる。

而してこの鉄が血液中加入するには Granick¹⁷⁾の説によると Apoferritin なる蛋白体が細胞内を行き来して腸管内より鉄をとりそれを血液中に放出するという。之は鉄を結合した時には Ferritin なる形をとる。鉄は Apoferritin と結合時には3価となり血流中に入ると共に再び2価、血行中でCO₂と結合し鉄結合蛋白体 β-globulin に荷する時にはもう一度3価となるとされている。近時 Hb の構造及び合成に関しては多くの仕事が成され、Isotope 利用の研究により Protoporphyrin 環の構成やグロビンの構成アミノ酸が次第に解明されて来ているが、最後に3価の状態に分離した鉄が如何なる条件のもとに Hem 核へ入つてゆくかの機転については不明の点が多い。之に関して紺野⁴²⁾は Gey 氏 I、II 液による家兎骨髓液体培養を行い、Fe⁵⁹⁾を加え Hemin 鉄の Activity を調べているが、それによると鉄の Hem 核への Incorporation には β、γ-globulin、Albumin 等が必要であり、又 Hem の合成能は骨髓細胞の核を主とする分割が有すると述べている。小池³⁸⁾も同じく液体培養を用い諸種アミノ酸等の Hb 合成に対する影響を見ているが、γ-globulin は Albumin よりもすぐれた効果をあらわすとしている。

扱骨髓液体培養に於ては既述の如き(A)→(E)の各段階の骨髓細胞が含まれており、加えられた鉄は各段階の細胞の分裂を促進すると共に一方脱核が進むにつれて赤血球中へとり入れられ、Protoporphyrin 環中へ導入され Hem を構成してゆくものと考えられる。私は各種の2価及び3価の鉄を直接骨髓細胞に単独で、或は血清と合併して接触せしめてその利用度の如何を見たわけであるが、以下順を追つて如上の実験の結果につき考察を試みる。

1) グルコン酸第2鉄

本剤はいうまでもなく有機の3価鉄である。1893年以来、Stockmann⁷⁴⁾他2,3の人々により非経口的鉄剤の投与が試みられたが、筋肉内注射は疼痛が烈しく、静脈内注射は屢々重金属中毒症を惹起するために実験的に使用されているに過ぎなかつた。然るに1947年 Nissin⁵¹⁾等が Saccharated iron oxide の静脈内注射に成功し、鉄欠乏性貧血に用いて有効なこと及び副作用の少いことを報告して以来、同様の製剤の臨床的応用が、Slack, Wilkinson⁷³⁾等により追試せられるに至つた。本剤もまた静脈内注射用鉄剤として大日本臓器研究所に於て製造せられグルフェリコンと命名して発売されたもので1cc中2mgのグルコン酸第2鉄を含み、既に福井¹⁴⁾、中塚等により各種貧血疾患に応用され忌むべき副作用なく、又その効果も特に顕著とはいへないが、各種貧血の恢復をよく促進することが証明せられてゐる。

さて私の実験成績によれば、グ. 単独の添加では赤血球数は添加量が適当であればよく増加するが、Hb量は添加量の大小に拘わらず、殆んど認むべき増加を示さない。然るに血清を同時に添加するならばHb量も著明に増加した。骨髓液体培養に於ては細胞浮游液をつくるに際し Gey 氏液でよく洗滌するわけであるから、血清の影響は勿論除外されている。即ち茲に於てグ. の鉄がHb構成に与るためには血清中の何等かの因子を必要とすることが分かつた。紺野⁴²⁾の行つた放射性鉄を利用した鉄のHb分子中への Incorporation をみる実験では血清蛋白、殊に γ -globulin が之を助長することを述べ、小池³⁹⁾もまた骨髓培養に際し栄養素としての意味から Albumin 及び γ -globulin を添加し、Hb合成に対しては γ -globulin がよい結果を示すことを述べている。又その機転に関して紺野はかかる蛋白を加えた場合、Hbの合成が短時間に起ることから、分子の大きい蛋白質が短時間内に分解して栄養素として役立つとは考えられず、鉄がHem核へ入る場合の担体として働くか、或は鉄と Protoporphyrin とを接近せしめる如く作用するのではないかと推論している。私の実験に於てはこの機転については解明し得なかつたが、血清中に鉄のHb構成を強く促進する何等かの物質の存在することは明かになつたと考える。

2) 硫酸第1鉄、クエン酸鉄アンモン、塩化第2鉄
之等は何れも古くから実験的及び臨床的に用いられており、井上²⁹⁾その他は硫酸鉄を、駒ヶ嶺⁴⁰⁾等は

クエン酸鉄アンモンを家兔に静注し、何れもかなりの増血効果を認めている。

さて有機の3価鉄たるグルコン酸第2鉄の増血効果と比較対照する意味から、無機の2価、3価鉄として硫酸第1鉄及び塩化第2鉄を、又構造の異なる有機3価鉄としてクエン酸鉄アンモンの添加を試みたが、先づ単独添加では硫酸第1鉄の場合はHb増加量が常に対照より劣り、グ. 単独の場合に比し更に成績が悪い。又赤血球増加率もグ. に比し劣り、全体として増血効果はグ. より明かに悪い結果を示している。次にグ. と同じ有機3価のクエン酸鉄は1mg添加ではHb増加量はグ. に比し大であるが、2mgでは逆にかかなりの減少を示す。赤血球増加率は何れの場合にもグ. に比し劣る。即ち増血効果は前者と同じくグ. にやや劣るが、両者の間ではクエン酸鉄の方がやや良い結果を示している。次に塩化第2鉄はその添加量に拘わらずグ. 0.6mg, 1mg添加でみられる如き赤血球増加を示さず、ほぼ硫酸第1鉄、クエン酸鉄と同じ効果をあらわす。Hb増加量は1mg添加の場合、やや対照より大となるが、他は対照より悪く、グ.、クエン酸の場合と同じ傾向を示し、硫酸第1鉄に比すれば遙かによい効果を示す。

さて次に之等と血清の合併添加の効果を検討するに、硫酸第1鉄では単独添加の場合に比しHb増加がやや大となり、逆に赤血球はやや減少する。クエン酸鉄、塩化鉄では何れも単独添加の場合と差をみないか、或は之よりやや増加が悪い。

以上要するに、単独添加では無機2価鉄たる硫酸第1鉄が他の2者に比し増血効果が劣るが他の2者の間では明かな差は認められず、又之等をグ. に比するとHb増加量には大差はないが赤血球増加率はグ. よりかなり低い。又血清を添加した場合もグ. 以外の鉄では明かなHb増加が見られない。即ち之等は血清を加うるも直接骨髓細胞中にとり入れられHbの構成に与らないものと考えられる。既述の如く経口的に投与された鉄は消化管壁を通過するに當つては2価の形となるが、一旦血行内に入るとその原子価は2価と3価の間で可逆性的変化を行つてゐる。古くから行われている鉄の静注実験によつても、或者は2価、或者は3価の鉄を静注しているが夫々同程度の増血効果を得ており、3価の形で加えたものが特にすぐれて生体に利用されるとはいえないようである。私の実験に於ては以上の如く、無機2価鉄と無機3価鉄の間に増血効果の大差はなく、

逆に有機 3 価の 2 剤間には明らかな差が認められ、更に無機 3 価の塩化第 2 鉄と有機 3 価のクエン酸鉄アンモンとの間には明らかな増血効果の差異が認められない。即ち以上を要約すれば、鉄が Hem 合成に利用されるに際し少くも骨髓に於ける直接作用面に於ては原子価も又有機、無機の区別もあまり問題にならず、むしろ加えられた鉄の化合物の形が問題となるものと考えられる。即ちグルコン酸第 2 鉄が卓越した効果を示したことは、之が生体内で最も重要かつ必須のぶどう糖の誘導体グルクロン酸と鉄との化合物であることに基くものと考えるのが妥当であろう。

第 7 章 結 語

- 1) 骨髓組織液体培養法について諸氏の方法を歴史的に考察し、その批判と私の改良法及び之を用いるに至つた経過につき述べた。
- 2) この方法により家兎骨髓組織の培養を行い、

無機 2 価、3 価及び有機 3 価鉄を添加してその増血効果を検討した。即ち以上の中グルコン酸第 2 鉄は最も良好な結果を示し、かつ之は血清と同時に添加した場合に Hb の増量特に著しく、従つて鉄の Hem 合成には血清中の因子の必要なることを知つた。

3) 他の鉄剤相互の間には増血効果に大差が認められず、鉄 Hb の構成に利用されるには、少くも骨髓に於ける直接作用面に於てはその原子価及び有機、無機の差別よりむしろ添加された鉄化合物の形が問題となるものと考えられる。

撰筆するに当り御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師平木教授並に大藤助教授に深甚の謝意を表す。

(本稿の要旨は第 17 回日本血液学会総会及び第 11 回中・四国内科学会に於て発表した)

(文 献 後 載)

Hematopoietic Action of Iron, Copper and Cobalt by Rabbit Bone Marrow Tissue Culture in Fluid Medium Part I Methodology and Hematopoietic Action of Iron

By

Katsuya Kumeda

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

The author studied various conventional methods of bone marrow tissue culture in fluid medium and its history, and compared these methods with a modified form of own design, and obtained the following results:

1. With this modified method a series of rabbit bone marrow tissue culture in fluid medium has been performed and studied hematopoietic effects of inorganic ferrous and ferric compounds and organic ferric compounds by adding each of these compounds to the medium. As the results it has been found that ferric gluconate proves to be the most effective hematopoietic, moreover, when this compound is added to the medium along with serum, Hb content increases strikingly, thus indicating that serum is an indispensable factor Hem synthesis.

2. Among iron compounds other than ferric gluconate no appreciable difference can be found in their hematopoietic effectiveness, at least from the standpoint of its direct action in bone marrow, it is not the valency of iron itself nor organic or inorganic nature, but rather the form of the compounds, that will have any bearing on the utilization of iron for the production of Hb.