

放射線医学総合研究所

NIRS-R-1



890000097

特別研究「放射線医学領域における造血器移植に関する調査研究」

最 終 報 告 書

Final Report “Fundamental and Clinical aspects of Bone
Marrow Transplantation” in April 1970 ~ March 1973



October 1973

放射線医学総合研究所

National Institute of Radiological Sciences

Anagawa, Chiba, Japan

目 次

最終報告書について（熊取敏之）	1
I 組織適合性認識機構に関する研究	4
1. 造血組織の抗原性の差異と移植に関する研究（玉野井逸朗，出井敏雄 他）	4
2. 動物腹腔食細胞の異物識別（大町和千代，市村国彦）	16
II 造血器移植に伴う続発症の発現機構に関する研究	22
1. 異系骨髓移植後の続発症の機作：組織不適合性の強い組合せの放射性キメラにおける微生物制限による死の回避（山口武雄）	22
2. 異系骨髓移植における続発症の発現とエスケープの免疫学的機序に関する研究 （佐渡敏彦，小林 森 他）	30
3. 造血器移植におけ続発症の病理学的検討（春日 孟，古瀬 健 他）	40
III 移植造血細胞の動態に関する研究	58
1. 放射線感受性の異なる2系統マウスでの骨髓移植と造血系の回復について （土屋武彦，早川純一郎 他）	58
2. 造血の"場"の機能について —セルローズ・アセテート膜設置法による研究—（関 正利，吉田和子 他）	66
3. 移植造血細胞の動態に関する研究（平嶋邦猛，川瀬淑子 他）	75
IV 造血器移植の臨床的適用と改善に関する研究（栗栖 明，高沢 博 他）	83
V GvH 反応による赤血球分化の抑制（北村幸彦）	88

Contents

Preface (Toshiyuki Kumatori)	1
I.	
1. Studies on the Analyses of H-2 Alloantigens and the Radiation Chimera Induced by Allogeneic Bone Marrow Transplantation. (Itsuro Tamanoi, Toshio Dei, Takehiko Tsuchiya, Takehiko Tachibana and Toshio Tanaka)	4
2. Influencing Factors on Erythrophagocytosis of Peritoneal Exudate Cells. (Kazuchiyo Ohmachi and Kunihiko Ichimura)	16
II.	
1. Prevention of Death by Microbial Restriction in Radiation Chimera with a Strongly Histoincompatible Combination. (Takeo Yamaguchi, Tsuneya Matsumoto, Junko Suzuki and Yoshimitsu Tanaka) ...	22
2. Immunological Studies of Mouse Radiation Chimeras: Relation of Immunological Status of the Host to the Manifestation of Secondary Disease. (Toshihiko Sado, Shigeru Kobayashi, Hitoko Kamisaku and Toshitsugu Kurotsu) ...	30
3. Pathological Studies of the Secondary Disease Caused by Bone Marrow Transplantation. (Tutomu Kasuga, Takeshi Furuse and Yuhko Noda)	40
III.	
1. Recovery of Haematopoietic Cells after Bone Marrow Transplantation in Two Strains of Mice with Different LD50(30) (Takehiko Tsuchiya, Jun-ichiro Hayakawa, Toshio Dei, Itsuro Tamanoi and Shoji Teramoto)	58
2. Study of Hematopoietic Inductive Microenvironments by Means of Cellulose Acetate Membrane-Insertion Method (Masatoshi Seki, Kazuko Yoshida and Eiko Inoue)	66
3. Study on the Proliferation and Differentiation of Transplanted Haematopoietic Cells to Irradiated Recipients. (Kunitake Hirashima, Yoshiko Kawase, Masako Ohtani and Toshiyuki Kumatori)	75
IV.	
Some Clinical Investigation of Bone Marrow Transplantation (Akira Kurisu, Hiroshi Takazawa, Hajime Sugiyama, Sadahito Usui, Rikiko Koizumi and Kunitake Hirashima)	83
V.	
Suppression of Erythropoiesis by Simultaneous Proliferation of Alloantigen-Sensitive Units. (Yukihiko Kitamura)	88

最終報告書について

Preface

特別研究班長 熊取敏之

Toshiuki KUMATORI

本調査研究は昭和44年度を第1年度とする放射線医学総合研究所研究5ヶ年計画に基づいて、重点的に行なうべき特別研究として発足し、昭和44年度より昭和47年度まで4年間にわたって実施されたものである。

1 研究目標

わが国の原子力開発はかなりの進展を示しているが、幸いなことに本研究開始の時期までには人体に重大な障害を与えるような事故は発生していなかった。しかし、諸外国の例をみても、少数ながら時として人体に障害を与えるような被曝事故が報告されている。動物実験(主としてマウス)ではかなり以前から、致死線量を受けた動物に他の動物の造血細胞を移植すると死を来さないことが分っていたが、同種同系動物間以外では続発症がおこり、これによって致死的な障害を受けるという難点がある。人間の場合、同種同系動物に相当するのは一卵性双生児のみであって、通常は同種異系間の移植であって当然続発症の発生が考えられる。本調査研究の第一の目標は、この続発症について、組織適合性の面から、また、免疫学的、血液学的な面および感染防止の面から検討して、その発生機構を知り、発現の抑制もしくは軽減をはかることである。このため、十分な基礎的研究を行ない、同時に臨床的応用の可能なように、骨髓採取法の改良、骨髓保存法の研究、さらには無菌病室の設置等を計画した。これによって致死線量被曝者や悪性腫瘍患者の治療に進歩をもたらすことを目指した。

2 調査研究の経過および主な関連事項

以上の目標および造血器移植研究や当研究所の経常研究の状況を考慮に入れて、次の4研究グループを編成して調査研究を行なった。

1. 組織適合性識別機構に関する研究
2. 造血器移植に伴う続発症の発現機構に関する研究

3. 移植造血細胞の動態に関する研究
 4. 造血器移植の臨床的適用と改善に関する研究
- 各グループの調査研究の詳細については第1回、第2回研究経過報告書および本報文集に記載されている。次に関連事項として、主要施設、行事等について一言述べる。

本研究にとって実験動物、特に近交系マウスの供給は不可欠のことである。われわれは主として本研究所技術部動物管理課生産のマウスを用いたが、不足の分は外部購入、特に国内で入手不可能な系のマウスは米国より輸入して使用した。関係方面の御努力に感謝すると共に、全般的にみて動物の供給はなお限られた状態であったことを付記しておく。

本研究では、特に実験動物の感染症が問題となるが、幸いSPF動物照射実験棟が昭和47年6月より使用可能となり研究の進展がみられた。使用マウスも当研究所生産のSPFマウスである。

一方、本研究所の外来研究員として3頁記載の方々と協同研究を行ない、外部との交流をはかって研究の発展に努めた。

昭和45年10月には原子力委員会による招へい講師として、米国ニューヨーク州立大学のG. Gudkowiec教授を迎え、講演^{*}および討論会を行なったが、同教授の新しい着想は本研究に対する一つの大きな刺激となった。

また、造血器移植ではリンパ球の分離が一つの重要な問題となるが、昭和46年5月、当研究所において「リンパ球の分離・その方法と応用」というテーマで討論会を開催した。^{**} それぞれの専門家の参加を得て極めて有意義であった。

3. 研究概要

われわれの研究目標からみて、続発症に関して各方面から基礎的研究が行なわれた。

脚注

* Gudkowiec 教授の講演については佐渡敏彦博士により、第2回研究経過報告書(NIRS-BMT-2)および放射線科学15巻5号に紹介されている。

** 本討論会の記録は、最新医学、27巻3号に掲載されている。

致死線量を照射された宿主に造血細胞を移植する場合、移植細胞数が少なければ骨髓死を生じ、細胞数がそれを越えた場合は宿主の回復が早まってGVH反応で宿主は死亡する。さらに、大量の骨髓細胞を移植した時は免疫寛容が成立することが予想される。

続発症と胸腺との関係、さらに続発症と細菌感染との関係については本研究開始以来検討してきた。普通飼育のマウスの骨髓移植に際し、照射前の宿主の胸腺摘出により延命効果があり、抗生物質の投与によって生残率が増加した。SPFマウスでは致死量照射宿主に異系移植を行なっても宿主は死亡しない場合が多い。これを普通飼育の実験棟に移すと死亡し始めるが、抗生物質投与で死亡を軽減出来る。したがって、続発症による死亡は適当量の骨髓細胞移植と細菌制限によって回避されるが、これは臨床的応用への重要な指針となる。

一方、異系移植でも一部には続発症から自然に回復したり、また、続発症を起こさないものもある。これらは宿主と提供者の組み合わせや、上記の如く飼育環境に支配されるものと思われる。主要な組織適合性抗原が一致していれば、ある程度の抗原性の違いは骨髓移植の大きな障害にはならないようである。また、胸腺摘出マウスでは胸腺由来細胞に依存する免疫機能の回復は抑えられるが、骨髓由来細胞の活性は正常に回復する。これから考えると、異系骨髓移植を行なう前に、提供者骨髓から胸腺由来細胞だけを取り除いても続発症を抑えられない。骨髓由来細胞の除去効果をさらに検討する必要がある。

異系移植における続発症の病理学的研究を組織適合性の乏しいマウス間の移植によって行なった。死後の剖検と臨床病理学的検索を併用し、続発症による死を説明する所見を収集した。

他方、移植された骨髓細胞の中でも幹細胞の定着増殖が最も重要であるが、これを検索するには *in vivo* および *in vitro* の方法が一般に用いられ、われわれもこれらの方法で照射動物に移植後の幹細胞の分化増殖（特に赤血球系）の過程を解明した。さらに、*in vivo* と *in vitro* 法の間ともいべきセルローズ・アセテート膜腹腔内設置法を開発し、腹腔マクロファージを造血の場として造血コロニーを作るのに成功し、照射動物に

おける移植細胞の増殖に対する造血統御因子の検討を行なった。なお、マクロファージの異物識別機構に関する因子の性質および作用機作の一部を別途に解明した。

また、同系移植でも同一線量の照射後の移植で、同一生存率を得るための必要細胞数は系によって異なっている。一方、供与者の造血幹細胞の赤血球への分化は、供与者の免疫適格細胞が宿主でGVH反応を起こしている時には抑制され、その抑制の程度は免疫適格細胞の増殖の程度と逆相関があることが判明した。

さて、異系移植後は免疫抑制処置を必要とするが、免疫適格細胞の増殖分化のみを抑え、造血細胞の方を抑制しない方法の開発が必要である。X線、その他の免疫抑制剤の血液幹細胞障害作用を検討し、幹細胞障害度の軽いもの、あるいは障害度が強くても幹細胞障害の回復が早い薬剤を選び出した。また、免疫適格細胞の定量的測定法を用いて免疫抑制剤の免疫適格細胞に対する障害度を検討したが、臨床的に移植後によく用いられているメトトレキサートは免疫適格細胞抑制には効果が見られず、今後の臨床的応用について考慮すべき点と思われる。

以上の基礎的研究に基づき、あるいはそれと併行して臨床的に骨髓移植を実施し得るように機器、施設を病院内に設備した。その主なものは、骨髓保存装置、無菌病室の設置である。しかし、臨床的に骨髓移植を行なう必然性をもった症例がなかったこと、看護婦不足等のために病院側の体制が整わなかったこと等によって、臨床的に骨髓移植を行なわなかった。

骨髓移植を最終的に人間の適応例に応用するにはなお解決すべき問題は多く、極めて慎重に行なうべきであるが、われわれの研究によっても、将来に希望のものである。

4. 特別研究班の構成（昭和44年度—47年度）

班長 熊取敏之（障害臨床研究部長）

(I) 組織適合性識別機構に関する研究グループ

総括者 玉野井逸郎¹⁾（障害基礎研究部）

班員 大町和千代、市村国彦（化学研究部）

土屋武彦、出井敏雄（障害基礎研究部）

橋 武彦²⁾、田中俊夫³⁾

(II) 造血器移植に伴う続発症の発現機構に関する研究グループ

脚注

1) 現在、千葉大学教養学部

2) 外来研究員（国立がんセンター）

3) “（横浜市立大）

総括者 佐渡敏彦(生理病理研究部)
 班員 山口武雄, 松本恒彌, 鈴木順子,
 田中良光(生物研究部)
 春日 孟, 岩井依子, 小林 森,
 神作仁子, 黒津敏嗣(生理病理研究部)
 平野真司⁴⁾(障害臨床研究部)

熊取敏之, 川瀬淑子, 大谷正子(障害臨
 床研究部)
 北村幸彦⁸⁾

Ⅲ 移植造血細胞の動態に関する研究グループ

総括者 平嶋邦猛(障害臨床研究部)
 班員 関 正利, 浅尾武士,⁵⁾ 梶芳昌雄,⁶⁾
 猪股博美, 吉田和子, 井上江以子(生理
 病理研究部)
 土屋武彦, 早川純一郎, 玉野井逸郎¹⁾,
 出井敏雄, 寺本昭二⁷⁾(障害基礎研究部)

Ⅳ 造血組織移植の臨床的適用と改善に関する研究グル
 ープ

総括者 栗栖 明(病院部)
 班員 関山重孝⁹⁾ 大川治夫¹⁰⁾ 高沢 博,
 杉山 始, 碓井貞仁, 小泉利喜雄(病院
 部)
 平嶋邦猛(障害臨床研究部)

(なお, 各班員の順は不同である。)

なお, 本調査研究に御協力をいただいた外来研究員の方々は次の通りである。

年 度	氏 名 (所 属)	研 究 課 題
4 4 年度	秋 山 武 久 (慶 大 医)	同系ないし同種細胞の移入による X 線照射動物 免疫能回復に関する研究
4 5 年度	遠 藤 英 二 (日 大 医)	骨髄および胸腺細胞の移入による X 線照射動物 の免疫回復
4 6 年度	田 中 俊 夫 (横 浜 市 大 医)	組織適合性識別機構に関する研究
4 6 年度	橘 武 彦 (国 立 がん セ ン タ ー)	"
4 6 年度	花 岡 建 夫 (千 葉 大 医)	免疫適格細胞の分離法に関する研究
4 7 年度	北 村 幸 彦 (大 阪 大 医)	G V H 反 応 の 病 理 学 的 研 究 — と く に 細 網 内 皮 系 に及ぼす影響について

脚注

- 4) 現在, 富士市民病院
- 5) 現在, 日本大学医学部
- 6) 現在, 東京医科歯科大学
- 7) 研究生
- 8) 外来研究員(大阪大学医学部)
- 9) 現在, 神奈川小児病院
- 10) 現在, 千葉大学医学部

I 組織適合性認識機構に関する研究

1. 造血組織の抗原性の差異と移植に関する研究

玉野井逸朗 出井敏雄, 土屋武彦,
橘 武彦 田中俊夫

Studies on the Analyses of H-2 Alloantigens and the Radiation Chimera Induced by Allogeneic Bone Marrow Transplantation.

Itsuro TAMANOI , Toshio DEI, Takehiko TSUCHIYA,
Takehiko TACHIBANA and Toshio TANAKA

The aim of our present report is to pursue the factors which determine whether allogeneic bone marrow transplantation after whole body irradiation with lethal doses leads animals to the death by secondary disease or midlethal dose effect, or to the survival by the induction of radiation chimera. Therefore, the difference of histocompatibility antigens in CF#1/Nrs from C57BL/6j (H-2^b), both of which were used in the present experiments, was examined first by skin grafting and serological tests such as cytotoxic test, mixed haemadsorption test, immune adherence test and haemagglutination test. As a result, H-2 allele of CF#1/Nrs may be similar to H-2^k, as shown in Table 3, and it is different from H-2 allele of C57BL/6j (H-2^b).

In the subsequent experiments, CF#1/Nrs as host was irradiated with 900 R or 605 R (LD_{90/30}) and transplanted C57BL/6j bone marrow in the next day of irradiation. In the bone marrow transplantation with 25×10^6 of nucleated cells, 85% of 605 R group was dead until 20 days, while 85% of 900 R group survived until 50 days (Table 4).

When EL-4 tumour cells originated from C57BL were inoculated to the survivors, EL-4 cells proliferated linearly and animals were dead finally, in spite of the fact that syngeneic bone marrow transplanted animals rejected EL-4 completely (Fig. 1).

Furthermore, both skin grafts from donor and host strains on the survivors were alive over 120 days until death or sacrifice for histological examination. Histological examination showed the extreme proliferation and thickening of mature collagenous tissue of dermis.

By the indirect membrane fluorescent antibody method, the ratio of donor to host cells was examined in bone marrow and peripheral blood cells from the CF#1/Nrs, irradiated with 900 R or 605 R and transplanted with 25×10^6 of C57BL/6j bone marrow cells. As shown in Figs. 7 and 8, donor cells occupied at the first week, but host cells appeared from the second week. The reappearance of donor

cells, afterwards, was repeated every three weeks and at the same time, the number of donor cells increased every time, and finally to be approximately 50% at the 11th and 14th week. In the survivors about 200 days after 900 R, both of bone marrow and peripheral blood cells showed 50% of donor cells respectively in these mice.

In the last experiments, donor cells were examined in spleen, thymus and mesenteric lymph node of CF#1/Nrs mice irradiated with 605 R and transplanted C57BL/6j bone marrow cells (25×10^6). In early stage, the failure of small lymphocytes and the occurrence of fibrosis was noted, and it was suggested that donor cells might recur from organ to organ with a time lag, and afterwards, proliferation occurred rapidly.

From these results, it was concluded that the CF#1/Nrs mice irradiated with 900 R and transplanted with a large number of C57BL/6j bone marrow cells could survive for a long time in the state of radiation chimera, but the animals irradiated with 605 R were dead mostly until 20 days, even though the transplanted bone marrow cells were the same number. The radiation chimera seemed to be induced by repeating the appearance of host cells with an increasing number every 3 weeks.

全身に放射線を照射した後、異系あるいは異種の骨髄を移植した場合、secondary disease あるいは midlethal dose effect によって死亡することが知られている。¹⁾ この現象は、donor と host との抗原性の差による免疫反応によって生じるものと考えられているが、ある条件下では長期間生存し、そのあるものでは donor と host の細胞が共存する放射線キメラの状態にあることが報告されている。²⁾

本研究は、遺伝的に均一性を欠くヒトの場合を考慮し、H-2 の異なる 2 系統マウスを用いて免疫学的寛容の獲得を追求し、その条件を究明することによって「個体の認識機構」を明らかにしようとするものである。したがって、次の 4 段階に分け、実験をすすめた。

- 1) 本実験に使用する放医研自繁の近交系 C57BL/6J (以下 C57BL と略記) および CF#1/Nrs (以下 CF#1 と略記) 系マウスの抗原性の差異を明らかにする。
- 2) 永久放射線キメラ誘導の条件を見出し、その時のマウスは同系および異系細胞に対し免疫寛容状態であるかどうかを検討。
- 3) 骨髄および末梢血中での異系細胞の定着、増殖の状態を分析し、免疫寛容になる過程を追求。
- 4) 脾臓、胸腺、リンパ節の造血臓器における同系および異系細胞の分布状態をしらべ、免疫寛容誘導の機構、あるいは免疫反応による死の原因を追求する。

以下、これら 4 項目の結果について報告する。

1) CF#1 系マウスの抗原性の分析

Cawarth Farm 由来の CF#1 系マウスは、1960 年に放医研に入手されて以来、26 世代以上兄妹交配を続けている近交系である。同系皮膚移植を行なった予備実験

では、移植皮膚片は死亡時まで生着を続け、組織適合抗原因子に関しても均一化されていることが示された。しかし、この系統の H-2 allele および alloantigen に関しては不明のため、皮膚移植実験および血清学的検索で H-2 抗原の分析を行なった。

皮膚移植実験では、移植皮膚片として放医研自繁の A/He (H-2^a), C57BL/6J (H-2^b), DBA/2 (H-2^d), RF (H-2^k), C3H/He (H-2^k) および東大・医科研より入手した HTH (H-2^h), HTI (H-2ⁱ) の雄を使用し、host には CF#1 雄を用いた。移植方法は藤井、鈴木³⁾の方法にしたがい、手術後 6 日ないし 7 日目に包帯をとり以後連日観察して移植片の % 以上が変性した時を脱落の日とした。その結果は Table 1 に示す如く、系統により多少の違いはあるが、使用したいづれの系統の皮膚片も、12 日までに全例脱落することが示された。

血清学的検査法としては、Table 2 に示すような抗血清、すなわち H-2^a, H-2^b, H-2^d, H-2^f, H-2^k, H-2^s に対する抗血清および H-2 の 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 13, 19, 23, 25, 30, 32, 33 に対する alloantisera を使い、cytotoxic test⁴⁾, mixed haemadsorption test⁵⁾, immune adherence test⁶⁾, heamagglutination test⁷⁾ で検討した。

H-2 allele に対する抗血清を用いての cytotoxic test では、H-2^a あるいは H-2^k に対する抗血清で強い陽性の反応を示し、これらの系に相当する alloantigen を有していることが示唆された。alloantisera を用いた上記 4 方法の結果、ならびにこれらの結果から想定される CF#1 の alloantigen は Table 3 に示す通りである。表に示す如く、CF#1 は H-2 の 1, 3, 5, 8, 23 の alloantigen を有していることがわかる。したが

Table 1. Skin grafting tests in search of H-2 allele of CF#1/Nrs mouse.

Host	Graft (H-2)	No. of exp. animals	No. of unsuccess	Days after operation							
				7	8	9	10	11	12		
CF#1	A/He (H-2 ^a)	10	0	9	10						
	C57BL/6J (H-2 ^b)	39	5	13	24	28	32	34			
	DBA/2 (H-2 ^d)	10	0	10							
	HTH (H-2 ^h)	10	0		3	5	9	9	10		
	HTI (H-2 ⁱ)	20	0	12	16	18	20				
	RF (H-2 ^k)	10	1	5	7	8	8	(1: dead)			
	C3H/He (H-2 ^k)	10	0	7	7	7	8	10			

The number in the column of "Days after Operation" presents the number of mouse which rejected skin graft.

Table 2. Antisera used in the serological tests

Antiserum	Recipient	Donor	Specificity
H-2 ^a	A·CA	A	1, 3, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 25, 28, 29
H-2 ^b	A·CA × C3H	C57BL	2, 6 ² , 14, 22, 28, 29, 33
H-2 ^d	C3H × C57BL	DBA	4, 10, 13, 31
H-2 ^f	C57BL	A·CA	7, 8, 9
H-2 ^k	C57BL × DBA	C3H	1, 11, 23, 32
H-2 ^s	A	A·SW	7, 19
C 1	A·CA × PL/J	C3H.NB	1, 16
C 2	B10.D2 × A	B10.A(2R)	2
C 3	A·BY × WB/Re	A·SW	1, 3, 19
C 4	AKR.M × C3H.SW	B10.A	4
C 5	B10.D2 × A·CA	B10.A (5R)	5, 33
C 8	B10 × A·SW	B10.M	8, 9
C 9	B10.D2 × A·SW	B10.M	9
C13	B10.BR × 129	B10.AKM	13, 30
C19	A·CA × B10.A	A·SW	19
C23	B10 × LP.R111	B10.BR	23, 32
C25	D1C × PL/J	DBA/1	17, 25, 30, 33 ²
C30	B10.A × LD	B10.AKM	30, ?
C32	B10 × A	B10.BR	32
C33	B10.D2 × A	B10.A(5R)	33

Table 3. H-2 alloantigens of CF#1/Nrs mouse in serological tests

Examination	1	2	3	4	5	8	9	13	19	23	25	30	32	33
Cytotoxic Test	+	-	+	-	-?	+	-	-?	-	+	-	-	+R -?	-
MH Test	+	-	+	+	+	+	+	-	+	?	-	-	-	-
HA Test	+	-	+	-	+	+	?	-	-	+	-	?	?	-
IA Test	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
Proposed H-2	+	-	+	-	+	+	?	-	?	+	-	-	?	-

Abbreviation: MH test; Mixed haemadsorption test
 HA test; Haemagglutination test
 IA test; Immune adherence test

って、CF#1のH-2はH-2^kに一番近い系であることがいえるが、H-2^kの特長である11のalloantigenの存在が不明であり、9, 19のalloantigensが完全に否定できず、逆にH-2^kに存在する32が確定できなかった

たこと、および皮膚移植実験でH-2^kであるC3H/He, RFの移植皮膚片が12日以内に脱落を起すことから、H-2^kでない可能性もある。しかし、C57BL/6J(H-2^b)とは完全に異なる系であることは明らかとなった。

2) 放射線キメラの誘導と免疫寛容状態の証明

骨髓死に相当する線量の被曝を受けた場合の異系骨髓移植の成否は、照射された動物の免疫能の障害の度合と密接な関係がある。したがって、免疫能の障害の程度と移植細胞数(抗原量)とに依存し、その後の状態が次のように分れると仮定した。

- (1) hostの免疫能の障害が軽度の場合には、HvG反応あるいはmidlethal dose effectにより早期に死亡。
- (2) hostの免疫能がほとんど破壊された場合、移植細胞数に依存し、bone marrow failureないしはGvH反応を主体とするsecondary diseaseによって死亡。
- (3) 破壊された時に非常に多量の骨髓細胞を移植すれば、回復過程において、胎児期あるいは新生児期に抗原に接した時免疫寛容が誘導されるのと類似した現象が起り、永久放射線キメラとして長期間生存する。

そこで、まずCF#1のLD_{90/30}である605Rと完全致死の900Rの全身照射を行ない、翌日C57BLの骨髓細胞を移植して50日迄の生存率を確かめた。Table 4はその結果である。

Table 4. Mortality of CF#1/Nrs, irradiated and transplanted bone marrow cells

Radiation dose	605 R (LD _{90/30})		900 R				
	25 × 10 ⁶		25 × 10 ⁶		10 × 10 ⁶	5 × 10 ⁶	1 × 10 ⁶
BM cell No. transplanted	25 × 10 ⁶		25 × 10 ⁶		10 × 10 ⁶	5 × 10 ⁶	1 × 10 ⁶
Total No. of mice	Syn. 20	Allo. 20	Syn. 20	Allo. 20	Allo. 20	Allo. 20	Allo. 20
Days after BM transplant.							
Less 10 days	0	0	1	1	1	5	6
11 - 15	0	12	0	0	1	3	10
16 - 20	0	5	0	1	3	2	3
21 - 30	0	0	0	0	0	3	0
31 - 40	0	0	1	0	3	1	0
41 - 50	0	0	1	1	3	0	0
% of survival	100	15	85	85	45	30	5

この結果が示す如く、605Rの時にはほとんどのマウスが20日以内に死亡するのに対し、900Rでは同数の骨髓細胞を移植した場合85%と非常に高い生存率を示し、対照の同系移植の場合と変らない結果をえた。しかし移植細胞数が少なくなると、10日までの死亡を除いた半数以上が30日までに死亡する。これらの結果は始めの仮定と矛盾しない。したがって、次の実験として900R照射し、25 × 10⁶個の骨髓細胞を移植した生存マウスが、両系統の細胞が共存するキメラなのかどうか、またその場合、相互の細胞が免疫寛容となり共存しうるのかを検討した。そのため、C57BL由来の腫瘍細胞EL-4を用い、その腫瘍細胞が生着し増殖するかどうか。またさらに、同系および異系の皮膚移植を行ない、これらの移植皮膚片が

生着するかどうかを観察した。

EL-4腫瘍細胞を用いての実験では、下腹部皮下へ腫瘍細胞を移植した後、その腫瘍径の2点を測定してその平均値をもって腫瘍の増殖状態をしらべた。このEL-4を未処置のC57BLに移植した場合、細胞数に依存して腫瘍出現までにtime lagがあり、出現後は直線的に増殖して約20日で腫瘍死するが、これに対し未処置のCF#1では5 × 10⁶個のEL-4では約1週間を頂点とし、20日前後で完全に拒絶し、また5 × 10⁵個以下のEL-4では生着しないことがわかった。したがって、EL-4はCF#1には普通は生着せず拒絶されてしまうが、この拒否の機構が免疫反応と関連していることを示すため、EL-4で前感作したCF#1に5 × 10⁶個を接種して増殖状態をしらべた。腫瘍の最大値および完全な拒絶の期間は、ともに未処置の対照群の半分になり、拒否機構が免疫反応に関連していることがわかった。

900R全身照射したCF#1マウスに同系骨髓移植したグループでは、骨髓移植後2週から5週までにEL-4を移植した場合は、最大値および完全拒否までの期間に差

はあるが、いずれもEL-4は拒絶され、この期間に異系細胞に対する拒否反応としての免疫機構は回復していることを示した(Fig. 1)。しかし、異系骨髓移植をしたグループでは、Fig. 1に示す如く、いずれもEL-4は直線的な増殖を続け、実験例すべてが死亡した。このことから、これら異系骨髓移植をしたCF#1は、C57BLに対し免疫寛容になっているものと考えられるが、あるいはC57BLの細胞でCF#1の細胞がおきかわっている可能性も考えられる。この点を確かめるため、900R全身照射し、C57BLの骨髓細胞25 × 10⁶個を移植したグループで、70日以上生存しているマウス8匹について同系および異系の皮膚移植を行ない、その生着状態をしらべた。実験手技は前述と同じ方法である。

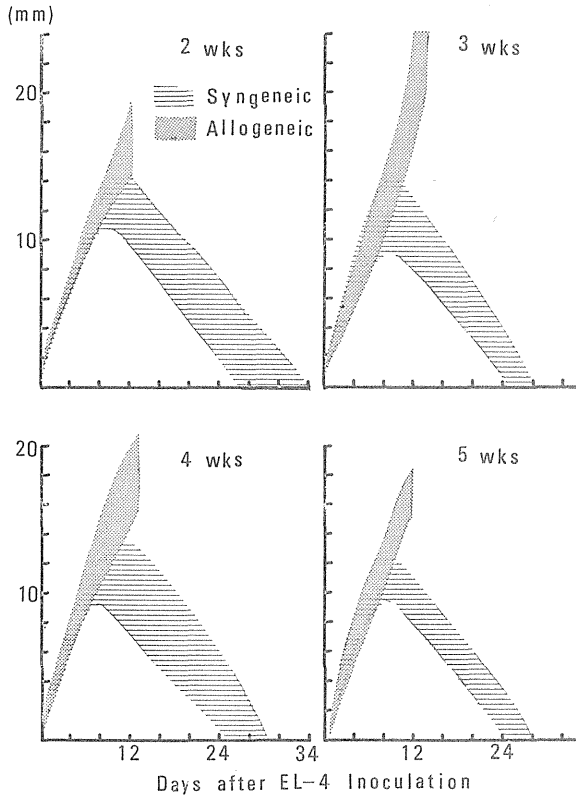


Fig. 1. Growth curve of EL-4 tumor cells in CF#1/Nrs, irradiated with 900 R and transplanted bone marrow cells (25×10^6).

その結果 8 例中 1 例、手術後 10 日で死亡したが、残り 7 例全部は、手術後 50 日より 150 日間（照射後 120 日より 220 日）移植片の組織学的検索を行なうための屠殺時あるいは死亡時まで両系統移植皮膚片は完全に生着した。

移植皮膚片とその周囲の組織学的観察では、真皮の深層あるいは皮下組織に古い肉芽性炎症像、異物型巨細胞の出現、真皮の膠原線維の著しい増生が認められ、Fig. 2 の如く完全な生着を示した。

以上の実験結果から、900 R 全身照射の翌日異系骨髄細胞を 25×10^6 個移植した CF#1 マウスでは、donor も host も相互に免疫寛容となり、永久キメラとして両系統の細胞が共存しうることが示された。

異系細胞の拒否機構については、放射線の線量に依存し損傷をうけるのか、あるいは閾値が存在するののかという問題がある。Celada & Makinodan⁸⁾ は、830 R で拒否反応に対する host の免疫能が 50% 破壊されるという。

そこで、CF#1 に種々の線量で全身に照射をしたときの腫瘍細胞 EL-4 の増殖状態をしらべた。用いた X 線の線量は 100 R, 200 R, 400 R, 600 R で各線量とも 10 匹の CF#1 雄を 1 群とした。

Fig. 3 は各線量の腫瘍径の経日的変化を示す。図で示されるように、線量の増加とともに腫瘍径の大きさが増加し、最大になる時期も延長、また完全拒否までの期間も遅くなる。さらに途中での死亡も増加し、400 R では 60% が、600 R では 13 日までに 100% が死亡した。600 R の場合、腫瘍径が最大になる前に死亡し、そのため Fig. 4 に示す如く、各線量での最大直径と線量との帰帰直線をはづれる結果になった。以上のことから、線量と密接な相関性をもって拒否機構が壊されること、しかも 100 R でも障害があることがわかった。さらに、CF#1 に 605 R と 900 R 全身照射した後同系骨髄細胞 25×10^6 個を移植し、1 週間経過した 2 つのグループに EL-4 を移植した場合、900 R の方が最大腫瘍径が大きく、かつ完全に拒絶するまでの期間も長いことがわかった。これらの実験から、900 R 全身照射した場合に、異系腫瘍の拒否機構が完全に破壊されたかどうかは不明であるが、極度に損傷されていることは想像される。このことは、host の免疫状態に関する始めの仮定を支持するものだろう。

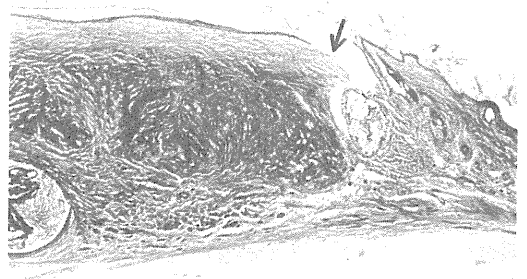


Fig. 2. Microphotograph of skin region of allogeneic skin graft.

Left major area divided from the arrow shows the grafted region. Extreme proliferation and thickening of cicatricial collagenous tissue of dermis is noted, in association of marked atrophy and reduction of skin appendage (Azan-Mallory stain, $\times 160$).

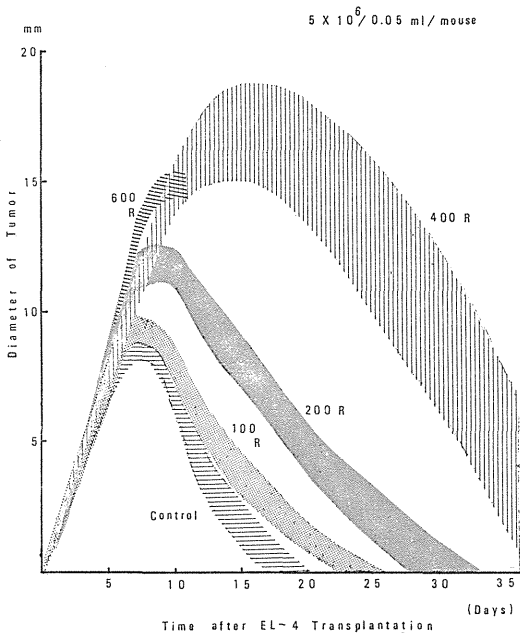


Fig. 3. Radiation effects on growth curve of EL-4 tumor cells in CF#1/Nrs.

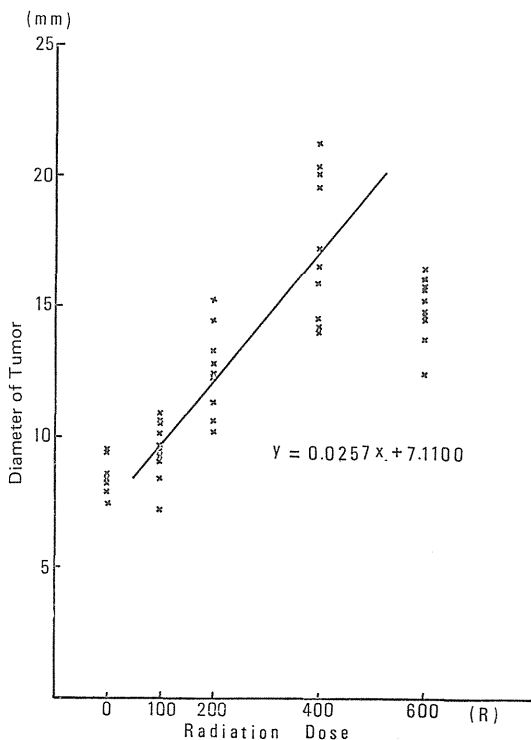


Fig. 4. Relationship between maximal size of EL-4 tumor cells and radiation doses with regression line in CF#1/Nrs.

3) 螢光抗体法による骨髓および末梢血での異系移植細胞の量的変動

2)の実験から、LD90/30 (605 R)の線量では早期に死亡してしまうのに反し、900 R全身照射した場合移植する異系骨髓細胞数に依存して長期生存マウスが高率に得られることがわかった。そして、その長期生存マウスは永久放射線キメラとなり、donor, host 両系統の細胞が相互に免疫寛容の状態で共存していることが判明した。さらに、異系腫瘍細胞に対する拒否機構は、放射線の照射線量に依存して相関的に破壊されることを示したが、900 Rあるいは605 R全身照射したマウスに異系骨髓細胞を移植した場合、移植された異系細胞は経日的にどの臓器に分布し、hostの細胞とどのような割合になっているのか？またdonorとhostの細胞がどのような状態のときに永久キメラとして生存でき、逆に早期に死亡するのか？といった問題は非常に興味あることだし、かつまた重要な点である。そこでこれらの線量で照射し、C57BLの骨髓細胞 25×10^6 個を移植したCF#1マウスの骨髓および末梢血について、膜螢光抗体法でdonorとhostの細胞の割合を追求した。同時にこれらマウスの体重変化、肝臓、脾臓、胸腺の重量変化、Ht値および骨髓の有核細胞数についても経時的にしらべた。

膜螢光抗体法については、骨髓あるいは末梢血細胞をマウス anti-H-2 抗血清で反応させた後螢光標識抗マウス IgG抗血清(マイルズ社製)で結合させる間接法を用いた。使用したマウス anti-H-2 抗血清は、Snellによって編集されたNIHのマウス alloantiseraの作成法⁹⁾にもとづき、胸腺、脾臓、リンパ節の細胞を腹腔内注射で作成した。anti-CF#1抗血清はCF#1の細胞をC57BLに注射し、anti-C57BL抗血清の場合は逆にC57BLの細胞をCF#1に注射する組合せをとった。免疫反応はマイクロプレートを用いておこない、Zeissあるいは日本光学の螢光顕微鏡で観察した。観察については、リング状あるいは半月状ないし一部ドット状に螢光を発するものを陽性として計上、その直後可視光下で全細胞数を計上し、全細胞数に対する陽性のパーセント値を出した。細胞全体が一様に螢光を発するものは死亡細胞として計算からはづした。骨髓細胞に関する実験では、1週間隔で5週まで屠殺してしらべた。末梢血の場合は同一マウスで1週間隔で14週まで、眼瞼下静脈叢よりヘマトクリット管に採血し、遠心した後に赤血球の部分を除いて白血球の部分でしらべた。観察時に赤血球が多少みられるが、これらはすべて計算より除いた。

先づ体重変化をみると、900 Rと605 Rでは体重減少

は 605 R のグループがひどく、特に 2 週目に最低値を示す。このことは 605 R の 2 週より 3 週にかけての死亡率の高いことと相関性があり、この時期をのりこえたマウスは回復にむかうが、再び 5 週目に減少を示した。900 R のグループでは、最低値は 3 週目にみられ以後回復にむかう。脾臓、胸腺の重量変化は Fig. 5 に示す如く、605 R では 2 週目に最低値となり、3 週目には最大となる。

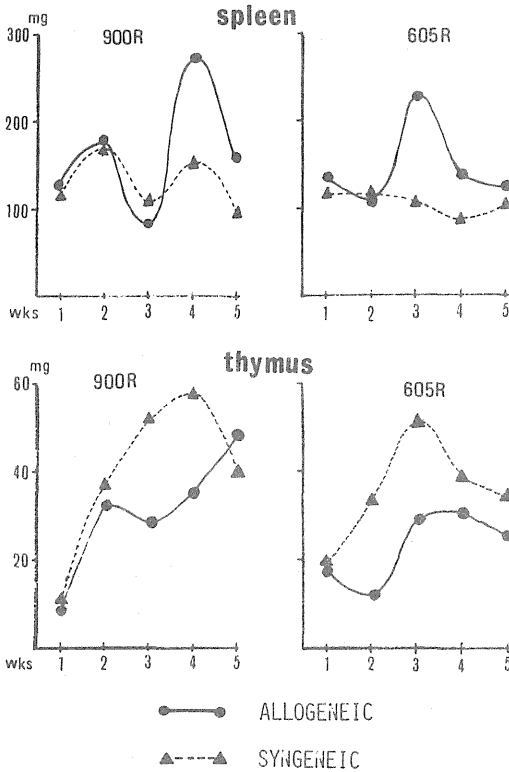


Fig. 5. Change of the weights of spleen and thymus in CF#1/Nrs after 900 R or 605 R irradiation and syngeneic or allogeneic bone marrow transplantation.

その後少数の生残したものは減少に向うが、正常値より高い値を示す。胸腺では 3 週 4 週で増大するが、正常値よりは低く正常の大きさへの回復がない。他方 900 R では 2 週目に脾臓、胸腺ともに一時的な増加があるが、3 週目に減少し以後再び増加を示す。脾臓では 4 週目に overshoot がみられ、5 週目に正常値近く値にかえるのに対し、胸腺では 4 週 5 週と徐々に増加し、5 週目には正常値に近くなる。肝臓の重量変化は脾臓の場合と大体一致し、605 R では 2 週目に減少、3 週目で最大となる。900 R の場合 2 週と 4 週で大体同じ重量で、その間の 3

週で減少を示した。これらの重量変化からみれば、一般的に 900 R よりも 605 R の方が回復が悪いことがいえる。

これらの組織学的検索では、605 R 1 週目の胸腺の皮質には、小型リンパ球の減少はあるが、かなり残存するのに対して、第 2 週目は髄質のピロニン好性の芽細胞様のもののみがみられ、3 週目にはそれらの細胞の分裂像とわづかな小型細胞がみられた。これに対し 900 R では、1 週目の変化は 605 R の第 2 週に相当する強い小型リンパ球の脱落と、胸腺の萎縮をみるが、第 2 週目は髄質周辺に著しい小型細胞の増生と髄質の分裂像がみられ、3 週目にはほぼ正常に近い構造をとった。一方、脾も 605 R の変化は 900 R よりも強く、特に赤芽球系の増生が抑えられ、3 週目に赤芽球が急激に増生し、この増生期が脾の重量増加に一致した (Fig. 6)。

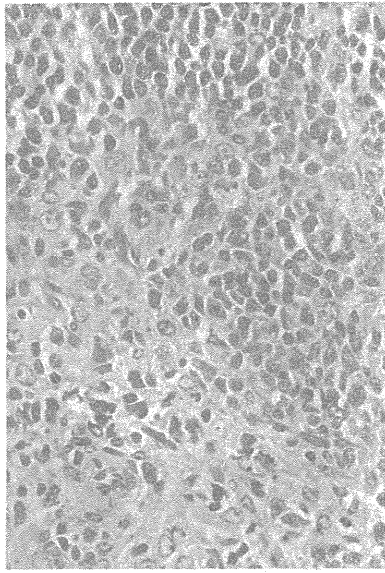
Ht 値についてはあまり変化がみられないが、末梢血検査の実験グループでは、途中死亡するマウスに 1 つは Ht 値が 40 以下になって死亡するもの、今 1 つは 50 以上になって死亡する 2 つの傾向があった。

骨髄の有核細胞数の変動は、Fig. 7 に示す如く、605 R の方が変化がはげしい。900 R では 2 週、3 週でわづかに overshoot するが、その後徐々に正常値に近づいていく。

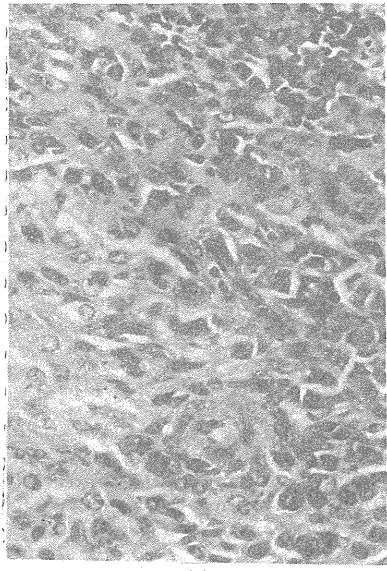
この骨髄細胞の膜蛍光抗体法でしらべた結果が Fig. 8 である。図の値は anti-C57BL 抗血清で陽性の数とし、anti-CF#1 抗血清で陽性を示した細胞数の和を 100% とし、anti-C57BL 抗血清陽性の比を出したものである。図からわかるように、第 1 週目は donor タイプの細胞がほとんどを占めているが、第 2 週目より host タイプの細胞が出現しはじめる。殊に 605 R においては host の細胞は急激に増加し、3 週で一番多く出現する。

その後再び徐々に減少するが、900 R では 605 R 程 host タイプの細胞の増加はみられない。605 R が 2 週ないし 3 週でほとんど死亡することから、host の細胞の回復による GvH あるいは HvG 反応がこの時期におこるものと想像される。他方 900 R では host の照射による損傷がはげしく、回復もおくれるが、そのためにわづかづか回復する host 細胞と大量の donor 細胞が接触することによって GvH 反応も起らず、免疫寛容へと誘導されるのではないかと想定される。

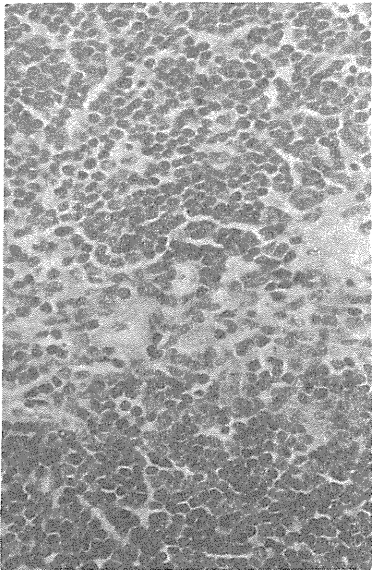
次に末梢血による割合をみると、605 R の場合には 2 週迄に全例死亡したため、その変動は不明であるが、900 R では 1 週目は 100% 近い donor タイプが、2 週、5 週、8 週、11 週と 3 週おきに host タイプの細胞の増加を示し、上の骨髄の変動より約 2 週おかれて末梢に影響して



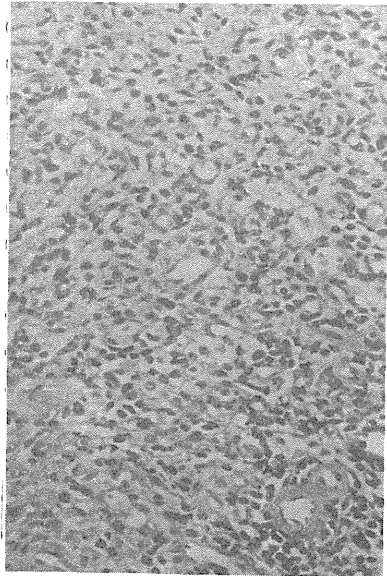
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 6. Microphotographs of spleens and thymuses in CF#1/Nrs, irradiated with 900 R or 605 R and transplanted C57BL/6j bone marrow (25×10^6).

- a) Spleen on day 7 after 900 R, revealing several numbers of blast-like cells, plasmacytes and large granuloctytic cells with a few mitotic figure in the vicinity of the central artery (HE stain, x 400).
- b) Spleen on day 7 after 605 R, showing large pyroniophilic blast-like cells, surrounding the central artery, associated with a marked fibrous proliferation (HE stain, x 400).
- c) Thymus on day 14 after 900 R. Marked proliferation of hyperchromatic small round cells in peripheral area of the medulla is prominent. Demonstrable recovery of original architecture is noted (HE stain, x 400).
- d) Thymus on day 14 after 605 R. Granulomatous changes with large pleomorphic cells are noted in the medulla, associated with the remarkable reduction of small lymphocytes in the atrophic cortex and the destruction of original architecture (HE stain, x 400).

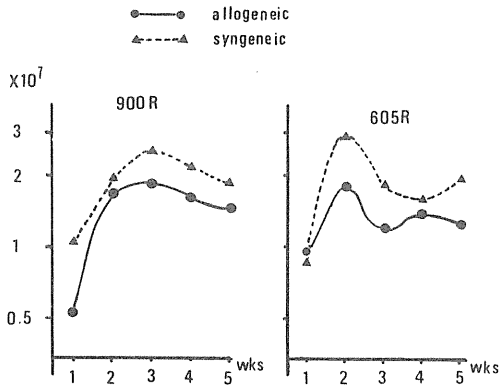


Fig. 7. Change of the nucleated cell number of bone marrow in CF#1/Nrs after 900 R or 605 R irradiation and syngeneic or allogeneic bone marrow transplantation.

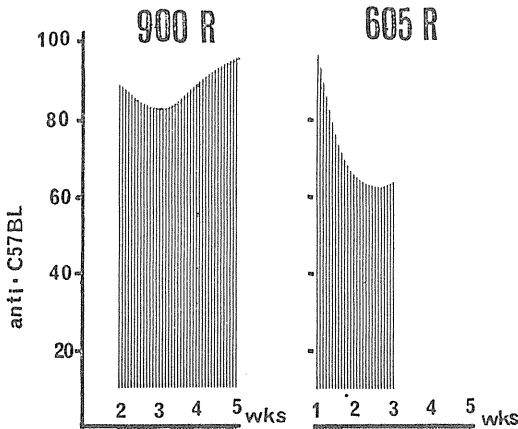


Fig. 8. Change of donor type cells in bone marrow of CF#1/Nrs, irradiated with 900 R or 605 R and transplanted C57BL bone marrow cells (25×10^6), by indirect membrane fluorescent antibody method.

The number was calculated as percentage of positive cells to anti-C57BL antiserum in the summation of positive cell number to anti-C57BL and anti-CF#1/Nrs antiserum.

現われることがわかる (Fig. 9)。しかも host 細胞の出現数が後になる程多くなり、11週では約半分が host 細胞で占められた。

さらに、同じ条件で 900 R 照射、骨髄移植をし、照射後 191 日生存していた別のグループ 2 匹について、骨髄と末梢血を同じように膜蛍光抗体法でしらべてみた。その結果、骨髄、末梢血ともに 56.19%、51.60% と donor

細胞が半数を占有し、全く donor, host 半々のキメラとして生存していることがわかった。したがって、照射後骨髄細胞を移植した初期では、donor 細胞がほとんどを占め、生体の機能を営んでいるが、host の回復にしたがい host 細胞が出現しはじめ、donor 細胞の増殖、host 細胞の増殖を 3 週おきに交互にくりかえし、その度にその割合が半々に近づいて最終的には両細胞が半々づつ共存する状態になることがわかる。この host の細胞が何故 3 週毎に増加するかについては不明であるが、今後の課題として興味ある事実と考える。

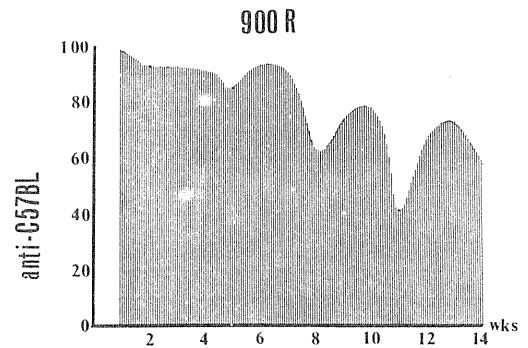


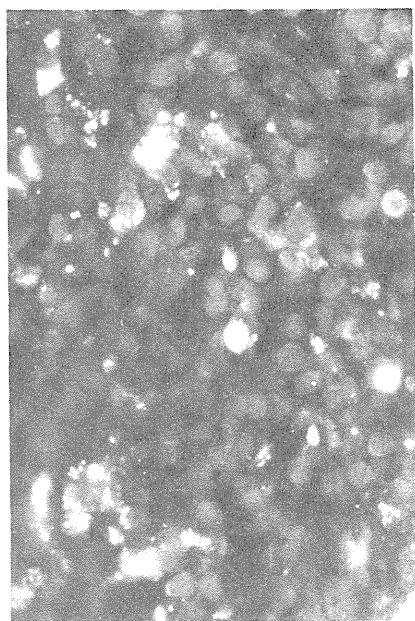
Fig. 9. Change of donor type cells in peripheral blood of CF#1/Nrs, irradiated with 900 R and transplanted C57BL bone marrow cells (25×10^6).

The number was calculated as percentage of positive cells to anti-C57BL antiserum in the summation of positive cell number to anti-C57BL and anti-CF#1/Nrs antiserum.

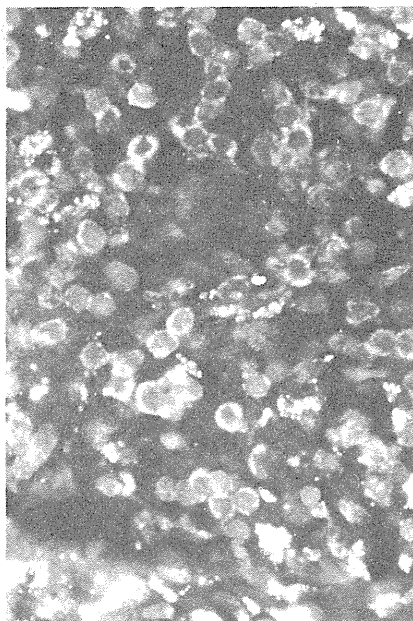
4) 脾臓、胸腺、リンパ節における異系移植細胞の分布とその経時的変化

2) および 3) の実験から、900 R 全身照射したマウスに 25×10^6 個の C57BL の骨髄細胞を移植した場合、長期生存し、しかも donor, host 両系統の細胞が共存するキメラとなっていること、さらにこれらの細胞は相互に免疫寛容になっていることが示された。したがって、このようなキメラになるためには造血臓器でどのようなことが起るのか、また 605 R の場合には、ほとんどのマウスが早期に死亡することから、この場合の死の原因について究明するため、脾臓、胸腺、リンパ節 (腸間膜) について、anti-H-2 抗血清を用い間接蛍光抗体法で経時的に分析した。試料作成は浜島、京極¹⁰⁾ のパラフィン包埋法にしたがつた。H-2 抗体および蛍光抗体は 3) と同じものである。

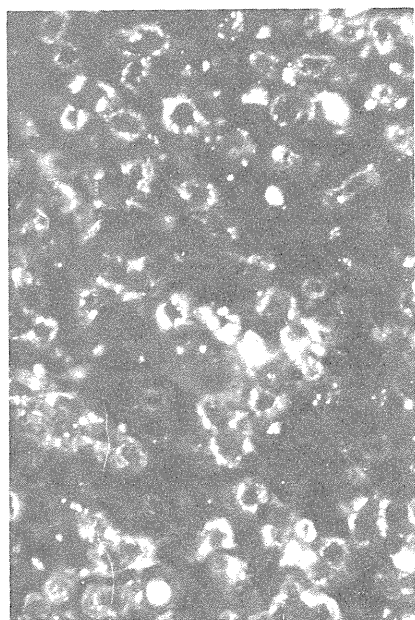
605 R の場合、骨髄移植後 3 日目の脾臓では、中心動



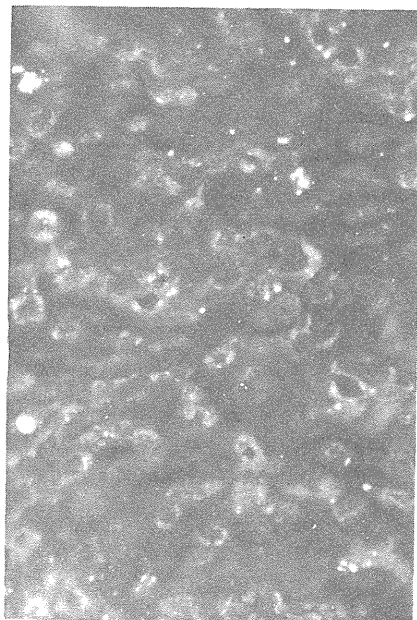
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 10. Microphotographs of spleens and thymuses in CF#1/Nrs on day 3 after 605 R and C57BL bone marrow transplantation (25×10^6) by fluorescent antibody method.

- a) Spleen stained by anti-C57BL antiserum.
- b) Spleen stained by anti CF#1/Nrs antiserum.
- c) Thymus stained by anti-C57BL antiserum.
- d) Thymus stained by anti-CF#1/Nrs antiserum.

脈周辺にみられる大型細胞は、そのほとんどが anti-CF#1 抗血清に陽性で、anti-C57BL の抗血清に陽性な細胞はほとんどみられなかった (Fig. 10, a & b)。しかし、胸腺では皮質部の小型リンパ球は著しく脱落しており、髄質部では大型の芽細胞様細胞が目立った。しかも、これら大型の細胞の大部分は anti-C57BL の抗血清に陽性として反応するもので、脾臓とは逆に anti-CF#1 陽性のもはほとんど認められなかった (Fig. 10, c & d)。リンパ節についてみると、anti-CF#1 の抗血清に対して陽性のものが認められるが、その数は極めて少なく、全体として小型リンパ球の脱落が目立った。これらの組織を経時的にみると、脾臓ではその後、線維化が起り、そのどちらの抗血清に対しても陽性の細胞が少なくなる。しかし、9日目には anti-C57BL の抗血清に対し陽性のものが観察された。胸腺では、4日目から anti-C57BL に対する陽性の細胞が少なくなり、どちらの抗血清に対しても陰性の結果を示した。リンパ節では、全体として陽性の細胞が少なく、9日目では anti-CF#1 に対し陽性の細胞がわずかに認められた。

これらの結果を総合的にみると、始めほどの臓器も小型リンパ球の脱落がみられ、同時に大型の芽細胞様細胞の増生が始まっていること、donor の細胞は経日的にこれらの臓器の間を循環しているのではないか？その間に多少の time lag があると思われること、また各臓器において、その間に急速な増殖現象が起っているが、この増殖がどちらの細胞によるのかは現在のところ不明である。

900R の場合については、現在実験が進行中である。

考察およびまとめ

以上、1) より 4) までの実験結果をみると、CF#1 の H-2 は皮膚移植および血清学的検査より H-2^k に近いことが示された。したがって、H-2^b の C57BL を donor とし、CF#1 を host として異系骨髄移植をおこなった場合、照射線量と移植骨髄細胞数との関係で、永久放射線キメラになるか、あるいは donor と host との免疫反応で早期に死亡するかが決まると考えられる。900R 全身照射を受けた場合、host の免疫機構がほとんど損傷されてしまうことは 2) の実験結果から想像される。そのような場合に移植された異系骨髄細胞がわずかであれば、bone marrow failure で死亡してしまう。その限度を越えた細胞数を移植した場合には、定着後増殖を始めるが、移植されたものの増殖では間に合わず個体全体として造血細胞を必要とし、host の回復も早まる。

その結果、GvH 反応が起って死亡すると思われる。しかし大量の骨髄細胞を移植した場合は、造血細胞の供給も十分なために host の回復もおくれ、しかも産生される host の細胞も少量ですみ、したがって、わずかず定期的に、数を増しながら出現する。そのために donor の細胞は low dose zone として host の細胞に接触し、逆に host の細胞は high dose zone として donor の細胞の影響を受け、donor, host 両系統の細胞が相互に免疫寛容へと導かれるのではないかと考えられる。一方 605R の場合、実験 2) から示されるように、host の免疫機構が 900R の場合よりは破壊されずに残っているため、移植された細胞は host の生残した免疫担当細胞と直ちに反応し、その結果 HvG 反応として死亡する。移植された細胞が、脾臓、胸腺、リンパ節の諸臓器を経時的に移り変わり、その後で大型の芽細胞様細胞の増生が起っていることは、この仮定を示唆するものではないかと思われる。この点につき、900R の場合の各造血臓器での host および donor の細胞の動態がわかれば、より明解な解答がえられるものと思う。

さいごに、皮膚移植の手技について御教示頂いた東大・医科研、藤井源七郎博士、また動物の入手に御尽力頂いた東大・医科研、藤原道夫博士、alloantisera を分けて頂いた県立西宮病院、辻公美博士に対して謝意を表す。また、本研究を行なうにあたって御協力頂いた放医研・病院部、碓井貞仁博士、国立がんセンター・ウィルス部の方々、放医研・動植管理課の方々、ならびに障害基礎・3研の方々に感謝したい。

参考文献

- 1) van Bekkum, D. W. & De Vries, M. J.: Radiation Chimaera. Academic Press. 1967
- 2) Welling, W. et al: *Int. J. Rad. Biol.* 1, 145 (1959)
- 3) Fujii, G. & Suzuki, M.: 移植 1, 43 (1962)
- 4) Gorer, P. A. & O'Gorman, P.: *Transplant. Bull.* 3, 142 (1956)
- 5) Tachibana, T. & Klein, E.: *Immunology* 19, 771 (1970)
Tachibana, T. et al: *Immunology* 19, 809 (1970)
- 6) Nishioka, K. et al.: *Int. J. Cancer* 4, 139 (1969)
- 7) Stimpfling, J. H.: *Methods in Medical Research.* 10, 22 (1964)
- 8) Celada, F. & Makinodan, T.: *J. Immunology.* 86, 638 (1961)
- 9) Snell, G.: Catalog of Mouse Alloantisera. NIH.

(1968)

- 10) Hamajima, Y. & Kyogoku, K.: 免疫組織学, 医学
書院, (1965)

2. 動物腹腔食細胞の異物識別

大町和千代・市村国彦

Influencing Factors on Erythrophagocytosis of Peritoneal Exudate Cells.

Kazuchiyo OHMACHI and Kunihiko ICHIMURA

The important role attributed to the phagocytic cells of the reticuloendothelial system is the engulfment and degradation of active or inert "foreign particles" invaded. Recognition of "self" from "non-self" would appear to be an inherent essential requirement of this system, and the property of the phagocytic cells (macrophages) to discriminate between "self" and "non-self" may be an important, and indeed essential, factor in host-defense mechanisms. Since Wright and Douglas first proposed the concept of opsonins for that plasma factor which promotes phagocytosis, many investigators have attempted to define the serum constituents which not only function as opsonins but which also enable the phagocytic cell to identify "self" from "non-self."

In the studies to be reported, we have attempted to isolate and characterize the opsonin for sheep erythrocyte and to clarify the action mechanism of opsonin contributing to phagocytosis. We have adopted the method of the *in vitro* assay system which has been devised by T. Morita *et al*⁴⁾ in an attempt to assess a phagocytic uptake and intracellular degradation of sheep RBC. This method involves the quantitative measurement of residual hemoglobin.

It was demonstrated that in this *in vitro* system the expression of phagocytic event of SRBC by rat or rabbit peritoneal phagocytes required the presence of certain humoral recognition factors (HRF) in order for phagocytes to recognize SRBC as "non-self".

This HRF presented in the anti-SRBC antisera which were prepared by immunization of rabbit, rat, mouse (C3H) and guinea pig, but not in the normal sera of these animals or chicken antiserum.

In an attempt to isolate and characterize the HRF, a major protein fraction consisting primarily of 7.0 s γ -globulin was obtained from rabbit antiserum. The γ -globulin manifested opsonic activity as measured by its ability to induce SRBC engulfment by rat peritoneal phagocytes.

Phagocytosis inhibition experiments were performed with rabbit antiserum sensitized SRBC and papain-digested fragments of rabbit γ -globulin. F_c fragment of rabbit γ -globulin containing anti-SRBC antibody inhibited phagocytosis of sensitized SRBC, whereas F_c fragment of rabbit normal γ -globulin or F_{ab} fragments of normal and immunized γ -globulin resulted in little inhibition. The result in inhibition experiments would appear to suggest that ingestion of sensitized SRBC would be mediated by the F_c region of the antibody molecules.

We have also shown that trinitrophenylated SRBC was ingested by rat peritoneal phagocytes in the absence of opsonin.

結 言

異物の識別反応は、高等動物にかぎらず、アメーバのような単細胞生物においても、食物と非食物とを識別する能力をもっている。また、多細胞生物であるカイメン

では、上皮細胞系の襟細胞が、まず識別を行ない、とりこまれた食物(異物)は遊走細胞におくられて消化される。

脊椎動物においては、非経口的に、異物が体内に入っ

た場合、それが病原体、炭素粒、あるいは自己細胞の遺骸。古くなった自己の赤血球などのいずれであっても。白血球、マクロファージなどの食細胞によって、異物(非自己)と識別され、食作用または、のみこみ作用によって細胞内にとりこまれ、食細胞内の分解酵素によって消化されてしまうという、一見、下等生物と似かよった識別処理を行っており、それが、生体防御反応として重要な役割をもっているのであるが、体内に入ってきた異物が、外来のタンパク質、多糖類などの場合には、免疫反応をしめす能力をもっており、より複雑な識別過程をふくむものと考えられる。造血器移植、一般的に臓器移植を行なった場合にみられる拒絶反応は、移植を受けた宿主の示す免疫反応の結果にはかならない。

このような異物の識別過程の機構を明らかにするために、われわれはマクロファージを多く含む動物腹腔細胞の赤血球に対する食作用能を測定する実験系を用いた。

マクロファージは、上述したように、異物の識別処理過程に含まれる細胞であり、容易に生体外にとりだすことができ、その食作用活性を指標として、識別処理能を測定することができる。

これまでの研究は、主として、動物腹腔食細胞が、他動物の赤血球を異物と識別し、細胞内にとりこむ作用に関与する物質(オプソニン)の性質およびその作用機序に関して行なった。

材料と方法

腹腔食細胞：体重2.5～3kgの白色在来種ウサギの腹腔に、鉱物油(エッソ・スタンダード社製 Marcol 52) 30mlを注射、またはWistar系ラット(生後12～14週)の腹腔に10%ペプトン溶液5mlを注射し、3日後に、ヘパリン(2～5単位/ml)を含む燐酸緩衝生理食塩水を用いて、腹腔内を洗滌採取した。これをガーゼで濾過し、800rpm、5分、4℃下で遠心後、細胞(85～90%の食細胞を含む)を10%正常血清(56℃、30分加熱、ヒツジ赤血球で吸収処理)を含むPH7.2のTC199培地(以下、培地と略)を用いて、2回遠心洗滌後、 2×10^7 /mlの濃度にけんだくする。

ヒツジ赤血球(SRBC)：ヒツジ血液(日本バイオテック研究所製)を、3,000rpm、5分、4℃下で遠心し、得られた赤血球を生理食塩水で、3回遠心洗滌し、培地で、 4×10^7 /mlの濃度にけんだくする。

抗血清：SRBCを、各種動物(ウサギ、ラット、C3H系マウス、モルモット、ニワトリ)の腹腔または静脈に注射し、二次感作後のhyperimmune期に採取し、56°

C、30分処理後、凍結保存する。

SRBCのオプソニン処理：赤血球凝集素のtiter 128の抗血清0.01mlを4mlのSRBCけんたく液に加え、37℃下で60分振盪する。

SRBCのトリニトロフェニル化(TNP化)：M.B. Rittenbergら¹⁾の方法を用いた。10mgのトリニトロペンゼンスルホン酸(TNBS)を3.5mlのカコジル酸緩衝液(0.28M, PH6.9, CaBと略)に溶かし、これにSRBC 0.5mlをかくはんしながら滴下する。25℃下、10分振盪した後、modified barbital buffer (pH 7.4, MBBと略)を加え遠心洗滌する。更に、グリシルグリシン(50mg/80ml)を含むMBBで、3回洗滌し、 4×10^7 SRBC/mlの濃度にけんだくする。

ウサギ血清ガンマーグロブリンの精製：D.R. Stanworth²⁾の方法を用いて精製した。DEAEセルロースを、通常の方法で処理した後、燐酸緩衝食塩水(0.01M 燐酸ナトリウム、0.015M NaCl, pH 7.5)で緩衝化する。このDEAEセルロースに、上記緩衝液に対し透析後遠心したウサギ血清を加えかくはんする(加える血清の量とDEAEセルロースの乾燥重量の比は1ml/g)。約5時間後、これを吸引濾過し、DEAEセルロースを上記緩衝液で2回洗滌する。これら濾液を混合し、初めの血清の量にまで濃縮する。

ウサギ血清ガンマーグロブリンのFab, Fc画分の作製：R.R. Porter³⁾の方法により作製した。上記の方法で精製したウサギガンマーグロブリン150mgとパバイン15単位を10mlの緩衝液(0.1M, 燐酸ナトリウム, pH 7.0, 0.01M システイン, 2mM EDTA)に溶かし、37°C 16時間反応後、0.01M 酢酸緩衝液(pH 5.5)に対し透析する。これをCMセルロースによりクロマトグラフィーを行ない、Fab, Fc画分を得る。

食作用の測定：森田ら⁴⁾が、マウス腹腔食細胞の食作用測定のために開発した方法を用いた。腹腔食細胞けんたく液とSRBCけんたく液を混合し、37℃で一定時間振盪する。各時間ごとに、反応液を1mlずつ採取し、4℃下で、1,200rpm、7分遠心し、沈でんした細胞を冷生理食塩水で1回洗滌する。細胞を0.25mlの冷生理食塩水にけんだくし、0.75mlの冷蒸溜水を加え、約40秒静かに振盪した後、0.25mlの冷3.5%食塩水を加える。この低張処理により、食細胞にとりこまれずに残っていた赤血球は溶血するが、食細胞および、食細胞内にとりこまれたSRBCは破壊されない。この方法で溶出したヘモグロビン量を測定することにより、食細胞にとりこまれずに残存しているSRBC数を知ることができる。更に、食細

胞を凍結融解することにより、食細胞内にとりこまれたSRBCが溶血し、この際溶出するヘモグロビン量を測定し、とりこまれたSRBCの数を求める。ヘモグロビン量の測定はメテモグロビンの最大吸収波長420m μ で行なう。

結果と考察

i. SRBCを溶血し溶出してくるヘモグロビン量の吸光度による測定値とSRBCの数とに相関々係があることが、この測定法の基礎となるが、Fig. 1はこの関係が成立することを示している。

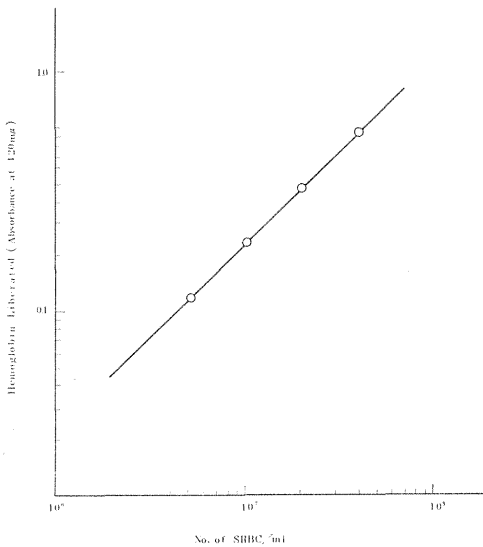


Fig. 1. The relationship between hemoglobin liberated and the number of SRBC lysed.

ii. 森田ら⁴⁾が、マウス腹腔食細胞において明らかにしたのと同様に、ウサギおよびラットの腹腔食細胞もSRBCを識別し、細胞内にとりこむには、抗SRBC血清であらかじめSRBCを処理しておく必要が示された。ウサギ腹腔食細胞を用いて、このことを例示したのがFig. 2である。抗SRBCウサギ抗血清で前処理したSRBCは、30分間に、 1×10^7 腹腔細胞当り、 1.8×10^7 以上とりこまれるのに対し、抗血清処理しないSRBCはほとんどとりこまれない。例示した実験においては、60分以上経過すると、未処理SRBCもわずかながらとりこまれるようになるが、60分以上反応させても、全くとりこまれない場合が多く、これは用いたSRBCの採血後の経過時日と関連があるようである。

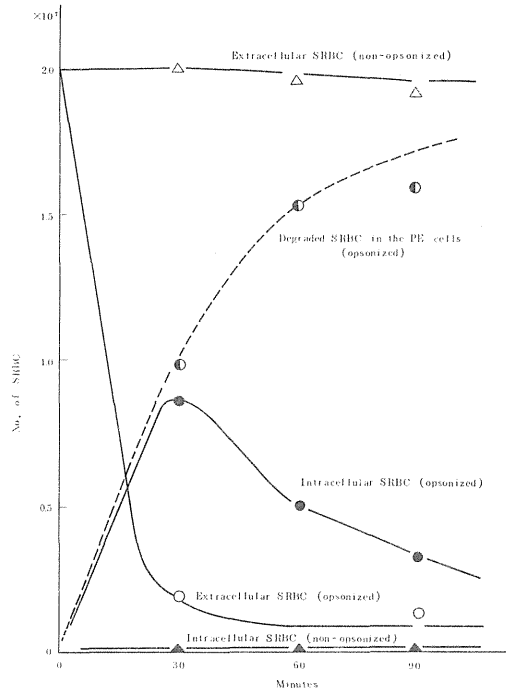


Fig. 2. The localization of SRBC during *in vitro* phagocytosis of rabbit PE cells: Effect of anti-SRBC rabbit serum.

iii. SRBCをラットおよびウサギ腹腔食細胞にとりこませるようにする作用(オプソニン作用)は、ウサギ、ラット、マウス(C3H/He)、モルモットで作製した抗血清には存在するが、ニトリの抗SRBC血清には存在しない(Table 1)。このことは、用いた動物腹腔食細胞と近縁にある動物で作製した抗血清は、オプソニンとして有効であるが、系統発生的に遠い関係にある動物の抗血清はオプソニンとして作用しえないことを示すものであろう。

iv. Table 2に例示した実験は、このようなオプソニン作用を示す物質は、SRBCに吸着する成分であることを示している。SRBCを抗血清で前処理することにより示されるオプソニン作用は、前処理後、SRBCを洗滌してもほとんど失なわれない。また、同様の処理を食細胞に対し行なっても、SRBCを抗血清で前処理しない場合には、食作用を示さない。

v. このオプソニン作用を示す物質は、正常血清中には含まれず、SRBCで動物を免疫して得られる抗血清中に含まれることから、抗SRBC抗体と考えられる。ウサギ抗SRBC血清をDEAEセルロースで処理し、ガンマー

Table 1. Opsonic effect of various anti-SRBC antisera as demonstrated by *in vitro* phagocytosis test

SRBC pretreated with	No. of ingested SRBC / 1×10^7 of rat PE* cells / 30 min.
Untreated control	0×10^7
Rabbit anti-SRBC serum	1.9×10^7
Rat anti-SRBC serum	1.7×10^7
Mouse (C3H/He) anti-SRBC serum	1.4×10^7
Guinea pig anti-SRBC serum	0.7×10^7
Chicken anti-SRBC serum	0×10^7

* Peritoneal exudate cells

Table 2. Interaction of opsonin in rabbit anti-SRBC serum and SRBC

Experimental System		No. of ingested SRBC / 1×10^7 of rat PE cells / 20 min.
SRBC	Rat PE cells	
Untreated	Untreated	0×10^7
Pretreated with rabbit anti-SRBC serum	Untreated	$0.9_4 \times 10^7$
Washed* after rabbit anti-SRBC serum treated	Untreated	$0.7_0 \times 10^7$
Untreated	Washed** after rabbit anti-SRBC serum treated	0×10^7
Washed* after rabbit anti-SRBC serum treated	Washed** after rabbit anti-SRBC serum treated	$0.5_0 \times 10^7$

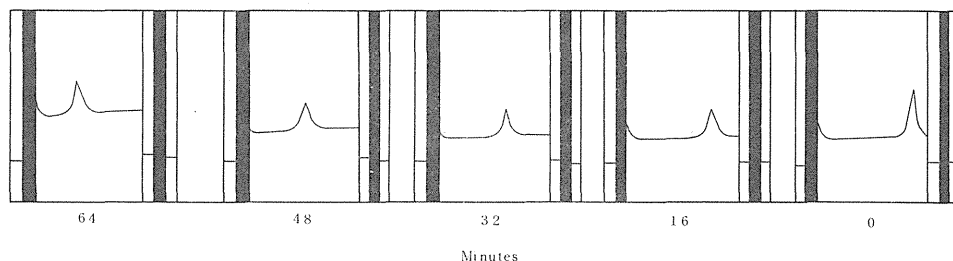
* Pretreated SRBC were washed twice with TC199 medium containing 10% normal rat serum.

** Four ml of PE cell suspension (1×10^7 /ml) was incubated with 0.01 ml of rabbit antiserum (titer 128) for 60 min., then, the cells were washed twice with TC199 medium containing normal rat serum.

グロブリン画分を精製し、これのオプソニン作用をしらべた。Fig. 3 にみられるように、得られたガンマーグロブリン画分は超遠心的には均一な 7.0 の S 値をもつことが示された。免疫電気泳動による分析では、わずかではあるが、ベータグロブリンの混入がみられる。この精製ガンマーグロブリンを、抗 SRBC 凝集素 titer 128 の

濃度に調整し、精製前の抗血清のオプソニン作用と比較したのが Fig. 4 である。抗血清中に含まれるオプソニン作用のほとんどは、7 S ガンマーグロブリン抗体によるものと考えられる。

Vi. これまでの実験で、腹腔食細胞が、SRBC をとりこむには、抗 SRBC 7 S 抗体が SRBC と結合することが



Protein concentration, 0.5%, solvent, sodium phosphate buffer (0.01M sodium phosphate, pH7.4) containing 0.15M sodium chloride; speed, 59,800 rpm; temperature, 20°C. S_{20w} = 7.0 s

Fig. 3. Ultracentrifugal patterns of γ -globulin fraction of rabbit anti-SRBC serum

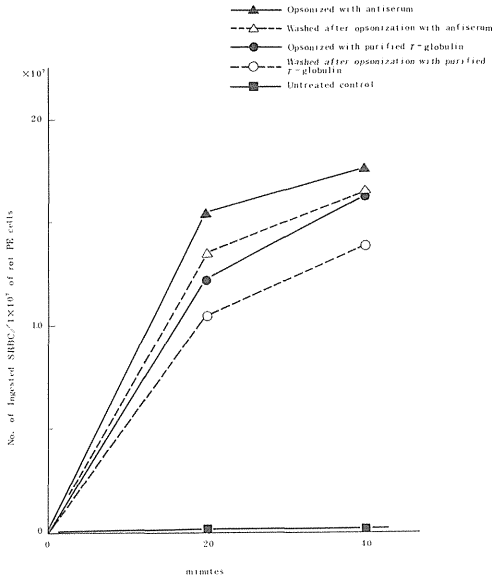


Fig. 4. Opsonic effect of purified r-globulin fraction of rabbit anti-SRBC serum

必要であることが示された。抗原抗体結合物が、抗体のFc部分を介してマクロファージ腹面に吸着し⁵⁾、この吸着は抗体分子のFc画分で阻害され、Fab画分では阻害されないことが明らかにされているが⁶⁾、これと類似の機構が腹腔食細胞のSRBCとりこみの際にも存在する可能性を確かめるために、7SガンマグロブリンのFab、Fc画分を作製し、これの腹腔食細胞の抗血清処理SRBCとりこみに対する影響を検討した(Table. 3)。得られた結果は、抗SRBC抗体を含むガンマグロブリンから作製したFc画分が、他の画分に比して、かなり強い阻害を示している。これは、抗体分子がFab部でSRBCと結合することにより、抗体分子中の食細胞との結合部(Fc)がsensitizeされ、食細胞と相互作用を起すこ

とによりSRBCの食細胞へのとりこみを促進するという可能性を示唆している。しかし、この実験結果の中で、正常ガンマグロブリンのFc画分の阻害度が低いことは、ガンマグロブリンのFc部の構造に関するこれ迄に得られている知見と、一見矛盾する結果であり、更に詳しい検討を加える必要がある。

vii. 以上の実験は、オプソニンの介在する食作用の系について行なってきたが、系統発生的に遠い関係にある動物の赤血球はオプソニンの存在なしに食細胞にとりこまれることが知られているので、われわれの系においても、SRBCを化学的に修飾することにより、ラット腹腔食細胞に識別され易くなり、オプソニンの非存在下でと

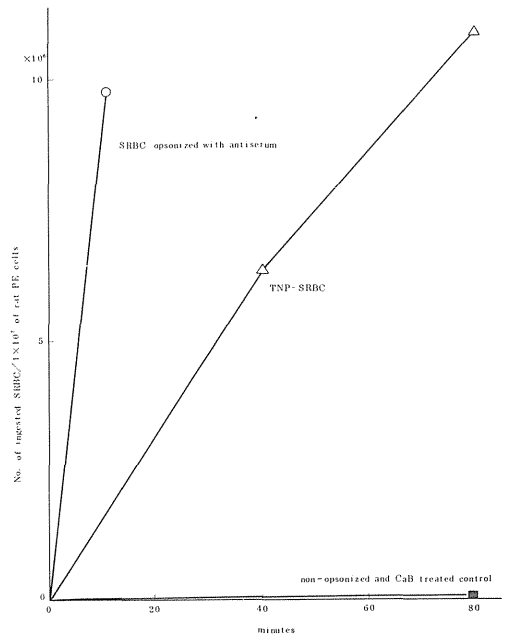


Fig. 5. Ingestion of TNP-SRBC in the absence of opsonin

Table 3. Inhibition of opsonic effect of antiserum by fragments of γ -globulin

γ -globulin fragment	Final protein concentration	Percent inhibition
Fab (of γ -globulin containing anti-SRBC antibody)	455 μ g/ml	17.7
Fc (ibid)	135	43.5
Fc (ibid)	365	54.0
Fab (of normal γ -globulin)	90	8.3
Fc (ibid)	80	8.3
Fc (ibid)	195	12.7

Ingestion which occurred in the absence of inhibiting protein was designated 100% uptake. Percent inhibition equaled 100 minus the percent uptake.

りこまれるようになることを考慮して、実験を行なった。前述の方法でTNP化したSRBCは、Fig.5に示すように、オプソニンの存在なしに、食細胞にとりこまれるようになる。そのとりこまれる初速度は、抗血清処理したSRBCのその約1/6である。ここで用いたTNP-SRBCは、SRBC 1個当たり、何分子のTNPが結合したものであるか、またSRBC 1個当たり最低何分子のTNPが結合すると、オプソニンなしにとりこまれるようになるかは今後の問題である。

結 論

異物の識別過程に含まれる食細胞(マクロファージ)を多く含む腹腔食細胞の赤血球に対する合作用能を指標とする実験系を用い、識別過程に関与する因子について検討を行なった。

ラットまたはウサギの腹腔食細胞がSRBCを異物として識別し、細胞内にとりこむには、オプソニンの存在を必要とする。このオプソニンは、抗SRBC抗血清中に存在する7Sガンマグロブリン抗体であり、この抗体グロブリン分子は、Fab部でSRBCと結合し、Fc部で食細胞と結合することにより、食細胞のSRBCとりこみに関与する可能性が示唆されたが、今後詳細な検討を要す

る。

更に、膜面を化学的に修飾した(TNP化)SRBCはオプソニンの存在なしに、食細胞にとりこまれるようになることも明らかにした。

ここで用いた実験系は、簡単に実験材料を得られ、活性測定も容易である点で有利ではあるが、識別機構の詳細を研究する上では、食細胞・赤血球・抗血清の供給動物が不均一であることが、解析を複雑にする点で問題があり、また食作用活性測定法も感度の上で問題が残る。今後、これらの点を改良した実験系により、詳細な機構の研究を行う予定である。

参 考 文 献

- 1) M.B. Rittenberg. et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132, 575 (1969)
- 2) D.R. Stanworth; *Nature*, 188, 156 (1960)
- 3) R.R. Porter; *Biochem. J.*, 73, 119 (1959)
- 4) T. Morita et al., *J. Reticuloendothel. Soc.*, 2, 406 (1965)
- 5) J.W. Uhr. et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 129, 793 (1963)
- 6) C. Inchley, et al., *J. Immunol.*, 105, 362 (1970)

II 造血器移植に伴う続発症の発現機構に関する研究

1. 異系骨髄移植後の続発症の機作：組織不適合性の強い組み合せの放射線キメラにおける微生物制限による死の回避

山口武雄・松本恒弥・鈴木順子・田中良光

Prevention of Death by Microbial Restriction in Radiation Chimera with a Strongly Histoincompatible Combination

Takeo YAMAGUCHI, Tsuneya MATSUMOTO, Junko SUZUKI
and Yoshimitsu TANAKA

Effect of microbial restriction on the long term (270 days) survival of murine radiation chimera with a strongly histoincompatible combination was examined.

Mortality of the conventional (CV) C57BL/6J (H-2^b, Hbb^S) mice transplanted with C3H/He (H-2^k, Hbb^D) bone marrow (BM) after a lethal irradiation (800 R of X-rays) was greatly reduced by increasing the number of BM cells from 5×10^6 to 15×10^6 . Continuous administration of aureomycin further increased this improved survival rate (upto 40% at 120 days postirradiation). On the contrary, when the irradiated CV C3H mice were given C57BL BM, the survival time of the host injected with 15×10^6 cells was shorter than that with 5×10^6 cells. Aureomycin did not improve the survival rate. No mice survived 90 days postirradiation among more than 100 C3H hosts with C57BL BM.

In the specific pathogen free (Caesarian originated, barrier sustained and almost free of bacterial flora) mice, the allogeneic BM cells in a dose of 5×10^6 prevented completely the death of the irradiated (1000 R of γ -rays from ^{137}Cs) hosts in both strain combinations. Forty C3H hosts with C57BL BM have survived quite healthy 270 days postirradiation without any dead individual.

If the C3H or C57BL recipients were pre-immunized before irradiation with the spleen cells of donor strain, all mice died in both SPF and CV conditions during the first month after allogeneic BM transplantation, indicating that SPF mice had a potency to produce a fatal Host-versus-Graft (HvG) reaction. If the SPF recipients were given 1×10^8 allogeneic spleen cells after irradiation, almost all the recipients died during the first month, indicating that the SPF mice had a potency to produce a fatal Graft-versus-Host (GvH) reaction.

When the C3H recipients given C57BL BM were transferred from SPF to CV condition at various times after irradiation, the long term survival rate decreased markedly. The decrease in survival rate was also observed in unirradiated C3H mice or syngeneic bone marrow recipients. Decrease in survival of allogeneic chimera after transfer to CV, however, was greater than that in syngeneic recipients or unirradiated controls. Administration of aureomycin alleviated the long term survival after the transfer from SPF to CV condition.

It is concluded that even in such a strongly histoincompatible combination (C57BL BM into irradiated C3H host), the death can be prevented if the microbial flora is restricted and an appropriate number of bone marrow cells is transplanted.

緒 言

致死線量照射後の同種あるいは異種骨髓移植治療の最大の困難は、続発症の克服である。続発症の発現において、細菌感染が決定的な役割を占めることが最近 Jones ら¹⁾によって示された。すなわち彼等は、C3H/He を宿主とし、致死線量照射後 DBA/2 骨髓を移植すると、120 日後における生残率が、通常状態 (conventional, CV) では 0% であるのに対し、無菌状態 (germ free) では 98% であることをみた。細菌感染の防禦による続発症の軽減効果については、他にラット→マウスの異種間移植における van Bekkum らの仕事^{2,3)}、および Wilson らの CFW と C3H 間の放射線キメラに関する報告^{4,5)}がある。

しかし、Jones らの仕事でも、ラット→マウスの場合には無菌にしても、120 日生残率は 0% となり¹⁾、しかもヒトやサルでは続発症の経過が、マウスの同種異系間キメラの場合よりも重篤である⁶⁾ことから考えると、Jones ら¹⁾および Wilson ら^{4,5)}の組合せよりも、もっと組織不適合性の大きな同種異系間移植について、果して細菌感染防禦によって長期の死が回避できるか否かを検討する必要がある。というのは、Wilson ら^{4,5)}の用いた CF 系と C3H の組合せは H-2 に関し近縁であり⁷⁾、Jones らの用いた DBA/2 (H-2^d, Hbb^D)⁸⁾ と C3H (H-2^k, Hbb^D)⁸⁾ とは、Hbb 型に関し同一であるからである。Kurnick と Nockay⁹⁾によると、放射線キメラの生残率に対し、H-2 座位と Hbb 型とが重要であることが示され、この点で C57BL/6J (H-2^b, Hbb^S)⁸⁾ と C3H/He との組合せが非常に組織不適合である⁹⁾。したがって、この組合せの放射線キメラにおいて細菌感染の防禦が、長期の死を回避し得るか否かを検討することにした。特に Jones ら¹⁾のラット→マウスの結果から考え、delayed rejection による晩発性の死をみるためには、同種キメラでは 120 日よりももっと長期の生残率を看視する必要があると思われるので、観察期間を 270 日まで延長した。

材料および方法

1. 動物. 上述の理由から C3H/He Ms と C57BL/6J とを用いた。CV, SPF (specific pathogen free) とともに、放医研動物管理課生産のものであり、特に記さない限り 3 カ月令の雄性である。使用した SPF マウスは、COBS (Caesarian originated, barrier sustained) で、C3HfND₂/He Ms "Nrs (SPF)" および C57BLfND₂/6J "Nrs (SPF)" で示

される。少なくとも内外寄生虫、サルモネラ属、Tyzzer 氏病菌、コリネバクテリウム、緑膿菌をもたない準無菌動物である。飼育は放医研 SPF 棟 (フォルマリン燻蒸後、オールフレッシュ 濾過無菌空気循環) において行ない、週 3 回飲料水 (次亜塩素酸添加) を交換し、週 1 回滅菌ケージ (滅菌木屑入り) を交換、高温滅菌した固型飼料 (船橋農場製) を与えた。飼育管理に際しては、滅菌衣服、靴下、帽子、マスクを着用し、長靴に交換、手指消毒、滅菌手袋を着用した。一方、CV 動物は放医研第 1 r 棟内飼育室を使用し、週 2 回飲料水 (塩酸添加 pH = 3) を交換し、週 1 回滅菌木屑入り熱湯洗滌ケージと交換した。いずれも 5 匹ずつ 1 ケージに収納し、24 ± 1 °C の恒温条件下で飼育した。

2. 照射. SPF 動物は、SPF 棟内の ¹³⁷Cs ガンマ線源により 104 R/分で 1,000 R 全身照射し、CV 動物は、200 kV, X 線 (島津信愛号) を 0.5 mm Cu + 0.5 mm Al でフィルターして 90-100 R/分で 800 R 全身照射した。この両線量が、それぞれ SPF, CV に対しほぼ等しい効果を与える。

3. 造血器移植. 骨髓は大腿骨および脛骨から常法¹⁾にしたがい無菌的に採取し、所要量を 0.5 ml になるよう Hanks 液 (ペニシリン 500 U/ml, ストレプトマイシン 1 mg/ml 添加) に懸濁した。特記しない限り照射の 3-6 時間後に受与者の尾静脈より注入した。懸濁液の 1 部は 37°C 培養し、無菌性の確認されたデータのみを採用した。脾細胞の移植の場合には、供与者の脾をガラスホモジナイザーで軽く 2 ストロークした後、200 メッシュの白金網で塊を除き、所要濃度に調節して 0.5 ml を宿主の尾静脈より注入した。何れも SPF 宿主には SPF 動物の、CV 宿主には CV 動物の細胞を移植した。

4. 前感作. 照射 20 日間前の宿主に、供与者の脾細胞懸濁液 (上述と同じ方法による) 1 × 10⁸ 個 (0.5 ml) を腹腔内に注射した¹⁰⁾。

5. 抗生物質. 動物用オーレオマイシン可溶散 (レダソー武田) を 0.5 ~ 2 g 力価/ℓ の割で飲料水に溶解し、週 1 ~ 2 回交換して所要期間中連続投与した。

6. 細菌学的検査. SPF 動物舎における細菌学的検査は、放医研動物管理課動物衛生係によってルーチンに行なわれ、毎月 SPF Animal Microbiological Test Report として報告され、前述の specific pathogens について異常のないことが確認されてきた。

一部の死亡個体については、心血培養による検査を行なった。すなわち、無菌的に採取した心血を BHI (brain heart infusion) 増菌培地および TGC (Thio-

glycollate) 培地に各々1白金耳ずつ接種し、37°C 好気条件下に BHI は24時間、TGC は24時間~14日間培養。24時間培養後の BHI 培地を NAC agar, DHL agar, SF agar および Mannitol salt agar に各々1白金耳ずつ接種し、24-84時間好氣的に培養して、それぞれ *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* を同定分類した。BHI で増殖をみなかったものは TGC でも増殖をみなかったので、嫌気性菌については同定しなかった。

結 果

1. 通常環境 (CV) での放射線キメラの生残率に対する投与骨髄細胞数の効果ならびに抗生物質投与の効果：
C57BL の骨髄細胞を照射 C3H 宿主 (いずれも 1群20匹) に移植した場合、 5×10^6 投与に比し 10×10^6 投与で有意の延命をみた (50%生残日数は、非移植13日、 5×10^6 群 17.5日、 10×10^6 群 38日)。さらに増して 15×10^6 投与では、かえって早期に死亡した (50%生存日数 12日)。この早期死は、照射当日、1日後および3日後の3回に 5×10^6 個ずつ計 15×10^6 個移植することで出現しなくなった (50%生残日数 21日)。しかし、いずれの場合も、照射後90日以内に全個体が死亡した。オーレオマイシンの照射後、連続投与は有意の延命を生じなかった。

これに対し、C3H 骨髄細胞を照射 C57BL 宿主に移

植した場合には、移植細胞数を 5×10^6 個から 15×10^6 に増すと、50%生残日数で、21日から41日への延長をみた (非移植では 8.5日)。 5×10^6 づつ3回移植すると、さらに52日へと延長した。この組合せでは、120日後も15% (5×10^6 を3回移植した群) あるいは10% (15×10^6 移植群) の生残者があり、オーレオマイシンの連続投与によって120日生残率は35~40%へと増加した。

以上の結果から、特に C57BL を供与者とした C3H 宿主において、重篤な続発症を生じ、これは通常環境では抗生物質投与で回避しにくいことが示された。したがって前述した如く、特にこの組み合わせにおける SPF 化の効果が注意をひくことになる。

2. 病原菌フリー環境 (SPF) での放射線キメラの生残率：

C57BL 骨髄を C3H に移植した場合 (計40匹, Fig. 1, C) および C3H 骨髄を C57BL に移植した場合 (18匹, Fig. 1, F), 何れの放射線キメラでも全数生残し、これは照射後240-270日後も全く死亡をみなかった (Table 1, 2 において F, S および I 群として示されている)。

CV では Syngeneic (同系) な組み合わせでも4カ月間に15~20%が死亡する (Fig. 1, e, b) のに対し、SPF では8~9カ月後も100%生残した (Fig. 1, B, E および Table 1, 2, G, T)。

3. 照射後骨髄移植マウスの生残に対する前感作の効

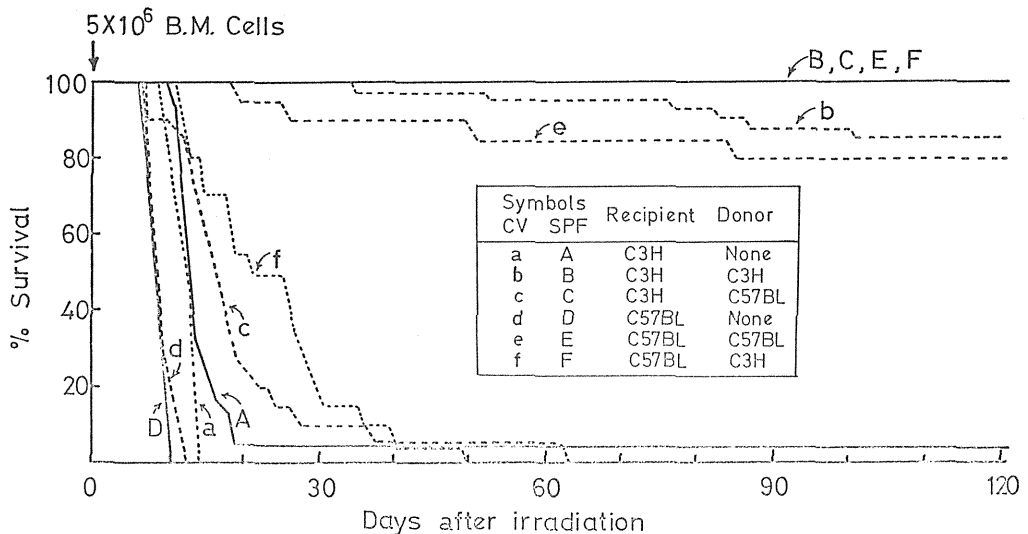


Fig. 1. Complete prevention of death by microbial restriction in lethally irradiated mice transplanted with allogeneic bone marrow cells from a strongly histoincompatible donor. CV: Conventional mice irradiated with 800 R. SPF: Specific pathogen free mice irradiated with 1000 R. No mice in groups B, C, E and F in this figure died 240-270 days after irradiation as long as they were kept under SPF condition (cf. Table 1, groups F, G and I)

果：

CV動物における異系骨髄移植による早期死には、HvG (Host-versus-Graft) 反応が関与している可能性がある^{11), 12)}。これがSPFで防止されるとすると、SPFでは細菌感染がないため免疫力がトリガーされず、HvGを起さないのかも知れない。この可能性を検討するため、あらかじめ供給者と同系の脾細胞 (1×10^8 個) で前感作したSPF宿主を照射し骨髄移植をした。結果はFig. 2に示すように、両方向の組み合わせとも、SPFでもCVと同様に早期に死亡し、HvG反応を起す能力のあることを示した。

4. 照射後脾移植によるGvH反応の検討：

SPF動物でGvH反応 (Graft-versus-Host reaction) が起らないために死まないのではないかと、この可能性を検討するために、骨髄細胞の代わりに脾細胞を移植する実験を行なった。SPFのC3Hに照射後C57BLの脾細胞を $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 個移植すると、Fig. 3に示すように、細胞数に比例して死が早まる。この結果は、CVでの報告³⁾と一致する。syngeneicな移植では、全く死亡しない。

Fig. 4に、C57BL \rightarrow C3H, C3H \rightarrow C57BL 両方向の組み合わせでの照射後脾移植の効果を、SPFとCVとで比較してある。これから明らかなように、重篤なGvH反応がSPFでもCVと全く同様に生ずることが示された。

5. SPFからCVへの移転による生残率の変化：

SPFのC3HをあらかじめCVに移し、その30日後に照射してC57BL骨髄を移植すると、Fig. 5 (およびTable 1, A) に示すように、始めからのCVの場合と全く同様の生残曲線となった。一方、SPFで照射しC57BL骨髄を移植し、直ちにCVに移した場合 (Fig. 5およびTable 1, B) には死はずっと遅れて出現した。SPFをCVに移し7日間オーレオマイシンを投与しつづけ、その後照射し異系移植したものは、両者の中間となった (Fig. 5)。このことは、この組合せでの早期死に、内因性 (怖らく腸内) の細菌群が重要な役割を果していることを暗示している。

さらに、SPFの放射線キメラを照射後種々の時点でCVに移した場合の、生残率の長期にわたる経時変化をTable 1に示した。

まず、C57BL骨髄を投与した照射C3Hでは、照射直後にCVに移した群 (Table 1, B 以下記号のみ記す) が90日以内に全滅するのに対し、照射後1カ月でCVに

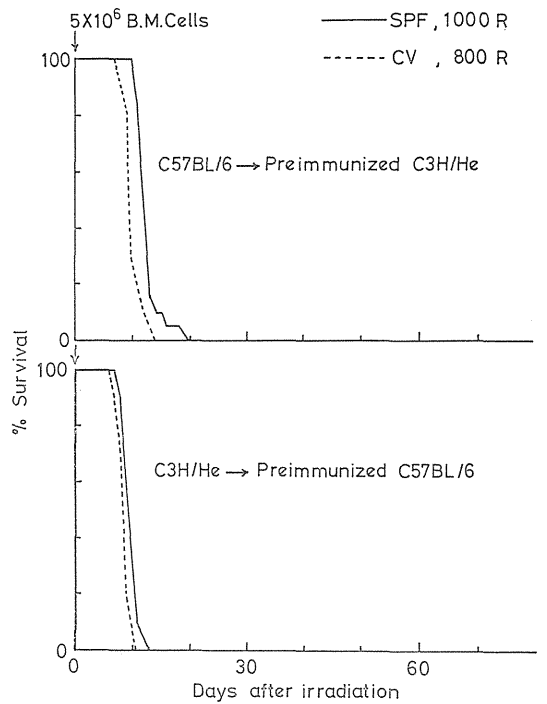


Fig. 2. Effect of pre-immunization of recipients with donor spleen cells. A suspension of 1×10^8 spleen cells from donor strain was injected intraperitoneally into recipient 20 days before irradiation and bone marrow transplantation. Note that a severe Host-versus-Graft reaction caused death in both CV and SPF recipients.

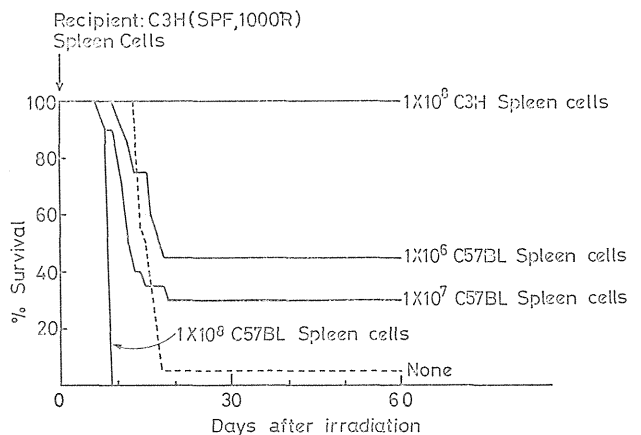


Fig. 3. Influence of spleen cell number on mortality from Graft-versus-Host disease in SPF mice.

移した群 (C) では、移転後90日 (照射後120日) で、56%の生残率を示し、180日後でも39%が生残した。同様に、照射後60日 (D)、90日 (E) および270日 (F)

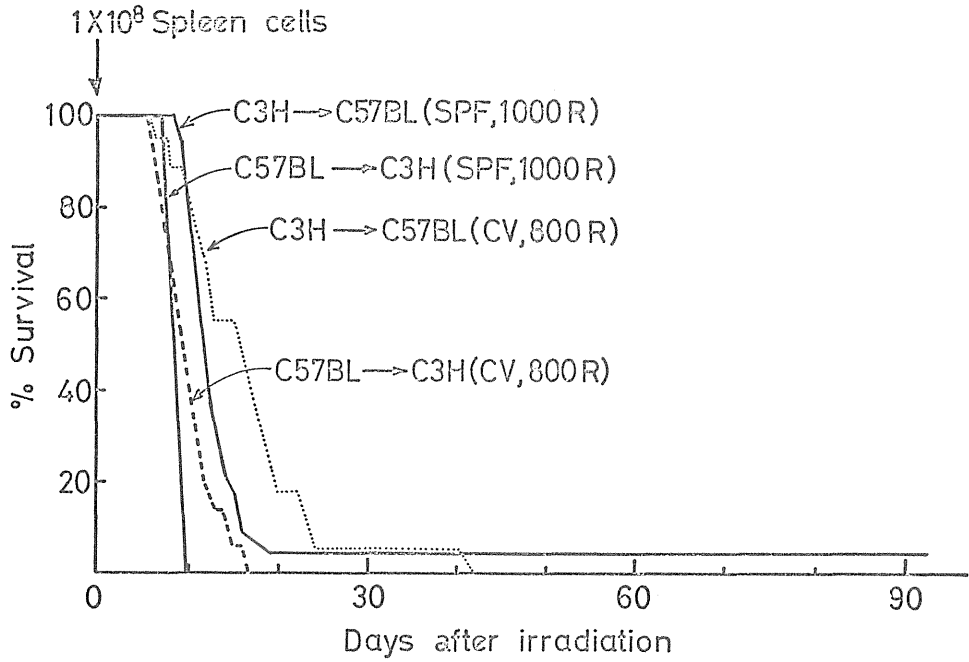


Fig. 4. Lethal effect of Graft-versus-Host reaction on CV and SPF mice. Note that a severe GvH reaction caused death in both CV and SPF mice.

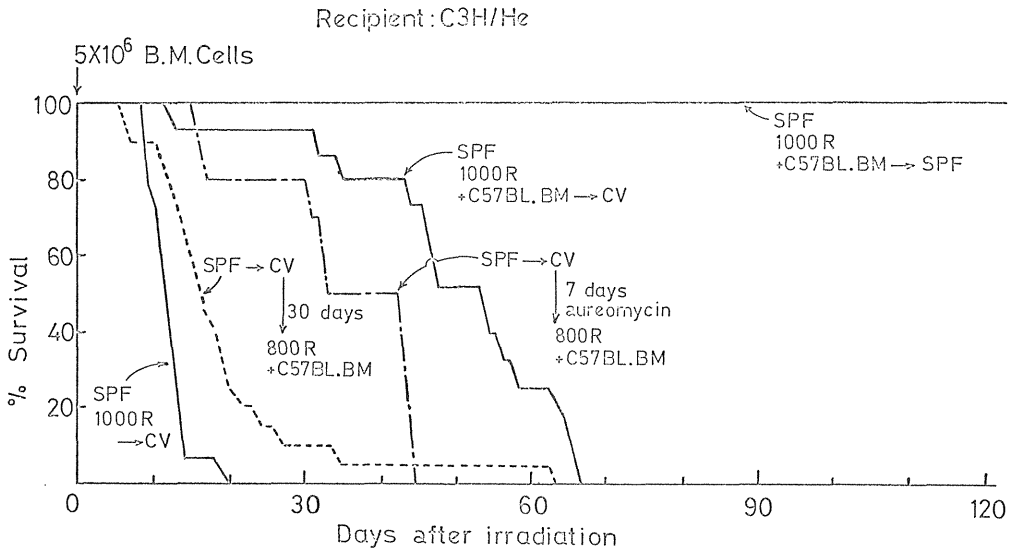


Fig. 5. Effect of transfer from SPF to CV condition on the survival of radiation chimera. If the SPF mice were transferred to CV condition, and irradiated and transplanted with an allogeneic bone marrow 30 days thereafter, the survival curve was similar to that of CV radiation chimera. If the transfer was made just after irradiation, the survival period lengthened indicating that endogenous (presumably enteric) bacterial flora is very important in the cause of early death.

で CV に移した群についても、移転後長期 (90~180日) の生残率は A, B 両群に比し有意に高かった。非処理の C3H で 3~12 月令の各年令で CV に移した場合にも同様な傾向がみられることから、移転の時期を 4~6 月令とすることが、移転後の生残率に好ましい条件を与えるものと思われる。怖らく免疫機能の発達がこの時期で最大で、細菌感染に対する順応力を得るのに最適な年令なのであろう。何れにせよ SPF 環境にある限り死亡例は全くなく、CV に移すと死に始めることが明らかとされた。

一方、C57BL の場合には、非処理群の SPF→CV 移

転ではほとんど死なず (Table 1, O~R), これに対応して、照射・異系移植後の CV 移転でも、移転後の長期生残率は C3H に比し遙かに高かった (Table 1, H, I)。

6. SPF から CV 移転後の生残率に対する抗生物質投与の効果:

SPF から CV に移すと、特に C3H において非処理でも放射線キメラでも、生残率が減少するが、これにオーレオマイシンを投与することで救命できるか否かが、実際の骨髓移植治療応用に照らして重大な問題となる。これを検討したのが、Table 2 である。

Table 1. Survival of radiation chimeras and unirradiated controls after the transfer from specific pathogen free (SPF) to conventional (CV) condition

Strain of bone marrow donor	Strain	Recipient			Percent survival at days after transfer (% of the number at the age of 3 month old)						
		Exptl. Group (No.)	Age at irradiation (month)	Age at transfer (month)	0	30	60	90	120	150	180
<u>Radiation Chimeras</u>											
C57BL/6J	C3H/He	A (20)	4	3	100	10	5	0			
		B (15)	3	3	100	93	26	0			
		C (18)	3	4	100	72	61	56	44	44	39
		D (15)	3	5	100	53	53	40	27	27	27
		E (20)	3	6	100	100	100	80	35	25	25
		F (20)	3	12	100	100	45	20	20	0	
C3H/He	C3H/He	G (20)	3	12	100	100	80	40	40	40	
C3H/He	C57BL/6J	H (18)	3	6	100	94	94	72	67	67	44
		I (18)	3	11	100	83	83	83	83	83	17
<u>Unirradiated controls</u>											
-	C3H/He	J (15)	-	3	100	100	87	80	73	53	33
		K (10)	-	4	100	100	100	90	90	90	50
		L (10)	-	5	100	100	90	90	80	80	70
		M (42)	-	6	100	88	86	86	76	76	74
		N (20)	-	12	100	85	75	55	50	40	30
		O (46)	-	6	100	98	98	98	98	98	96
-	C57BL/6J	P (31)	-	7	100	100	100	100	100	100	97
		Q (51)	-	8	98	94	94	94	94	94	94
		R (15)	-	11	100	100	100	100	100	87	80

Table 2. Effect of aureomycin administration on the survival after the transfer from SPF to CV condition in radiation chimeras and unirradiated controls

Strain of bone marrow donor	Strain	Recipient			Aureo-mycin	Percent survival at days after transfer (% of the number at the age of 3 months)				
		Exptl. Group (No.)	Age at irradiation (month)	Age at transfer (month)		0	30	60	90	120
<u>Radiation chimeras</u>										
C57BL/6J	C3H/He	F (20)	3	12	-	100	100	45	20	20
		S (20)	3	12	+	100	90	80	75	50
C3H/He	C3H/He	G (20)	3	12	-	100	100	80	40	40
		T (20)	3	12	+	100	100	90	90	90
<u>Unirradiated controls</u>										
-	C3H/He	N (20)	-	12	-	100	85	75	55	50
		U (20)	-	12	+	100	95	90	90	90

これから明らかなように、照射・異系移植後9カ月で全部生残していたものを、CVに移して120日(照射後12カ月)で20%に落ちた生残率は、移転後オーレオマイシンの連続投与で50%にまで上昇し得た。この差は95%信頼限界(χ^2 検定)で有意であった。一方、同系移植群および非処理群での120日生残率は、オーレオマイシン投与により99%信頼限界で有意に上昇した。

7. SPFからCVに移転したため死亡した個体の細菌学的検査:

Table 1に記載した各群について、死亡個体を凍結保存し、その1部について解凍し心血培養を行なった結果、20/46例(43%)に細菌が検出された。その内訳は、*Pseudomonas aeruginosa* 2例、*Str. faecalis* 4例、*Str. zymogenes* or *durans* 5例(内1例は*Sta. aureus* 共存)、*Sta. aureus* 1例、*Sta. epidermis* 2例、*Str. zooeconomicus* 1例、*Arizona sp.* 1例、*Klebsiella sp.* 1例および非同定3例であった。なおキメラと非処理各1例ずつに、肝の大乾酪巣がみられ、*Corynebacterium* 症と思われた。

キメラの死亡例では、被検31例中10例(32%)に、また非処理死亡群では15例中10例(67%)に細菌が検出された。両群の死亡個体の細菌出現率に関する差は、95%信頼限界(χ^2 -検定)で有意であった。何れにせよ敗血症のみが死因ではないが、CV環境中のこれらの細菌群がSPFからCVへ移した場合の死に寄与していると考えられる。

考察(従来の経過ならびに結論)

致死線量照射後の異系骨髄移植治療で問題となる続発症の発現機作については、移植細胞由来の免疫機能細胞による宿主組織の攻撃、すなわちGvH反応が重要であるとされていた⁶⁾。そこで、宿主の胸腺因子が移植骨髄内の前駆細胞に対し免疫機能を付与している可能性が検討されるべきであると考え、昭和44年度には、遺伝的な組織適合性を異にする種々の系統のマウス間での放射線キメラで、照射前の宿主胸腺の効果を検討し、1) 続発症には不適合性の大きい組合せにおける早期発現型のもの、不適合性の小さな組合せでの後期発現型(第2カ月目より出現する狭義の続発症)とがあり、2) 宿主胸腺は、前者を軽減し、後者を加速する、ことを報じた。この第2の結果は、照射後の免疫機能の再編制には異系移植でも宿主の胸腺が寄与しているのではないかと推測させ、胸腺動物での死は細菌感染による防禦不全すなわち消耗症(Wasting disease)によるものであらうと考え

られた。¹¹⁾ そこで、昭和45年度には、C57BL/6J(H-2^b, Hbb^s)の骨髄を移植した照射dd/YF(H-2^k, Hbb^sと考えられた)において、宿主胸腺で延命した上でオーレオマイシンを投与し、生残率の有意の増加を得た¹²⁾。その後、昭和46年にはJones, Wilson and Bealmea¹⁾によって、無菌C3H/HeにDBA/2骨髄を移植した放射線キメラでは、120日生残率が極めて高い(98%)ことが報じられるに至り、細菌制限をした環境で遺伝的背景の確立した近交系を用いることが緊急課題となった。幸い放医研動物管理課の努力により、まず近交系マウスの生産が軌道に乗り、次いでSPF棟の完成によって今回の実験が可能になったわけである。

CVでのC57BL→C3H放射線キメラにおいて、骨髄細胞数の増大が必ずしも生残率を改善せず、却って死期を早めたことは、C3H→C57BL放射線キメラの結果と併せ考えると、C57BLの免疫適格細胞によるC3H組織への攻撃が、C3H免疫適格細胞によるC57BL組織への攻撃よりも強いことを示している。

SPF状態でのC57BL→C3H放射線キメラの生残がどうかに関心がもたれた所以である。結果は、SPFでは全く死なず、CVに移すと再び死に始め、しかも、SPFでも異系脾細胞の大量投与でGvHが起り、前感作によってHvGで早期に死亡することが示され、続発症による死は、適当量の骨髄投与と細菌制限で完全に回避されるとのJonesら¹⁾の結果を追認したことになった。ただし、本実験ではより組織不適合な組み合わせで、しかも遙かに長期間の生残を確認し、さらにCVに移した後の死亡も抗生物質投与で減らし得ることを示した点で、続発症の重篤なことが知られているヒトでの応用の可能性を、ずっと強力に支持したことになる。

参考文献

- 1) J.M. Jones, R. Wilson and P.M. Bealmea: *Rad. Res.*, 45, 577 (1971)
- 2) D.W. Van Bekkum and O. Vos: *Int. J. Rad. Biol.*, 3, 173 (1961)
- 3) D.W. Van Bekkum, J.J. De Vries and D. Van Der Waay: *J. Nat. Cancer Inst.*, 38, 223 (1967)
- 4) R. Wilson and P.M. Bealmea: *Proc. Int. Conf. Rad. Biol. Cancer, Radiation Research Society, Japan*; p.107, 1967.
- 5) S.M.S.J. Connel and R. Wilson: *Life Sci.*, 4, 721 (1965)
- 6) D.W. Van Bekkum and M.J. De Vries: *Radiation*

Chimeras, Logos Press, London, 1967.

- 7) 玉野井逸朗, 土屋武彦, 田中俊夫: 影響学会15回大会, 1972.
 - 8) E.L. Green ed., *Biology of the Laboratory Mouse*, Jackson Lab., 2nd ed., p.355 and p.473, McGraw-Hill, New York, 1972.
 - 9) N.B. Kurnick and N. Nokay: *Rad. Res.*, 36, 31 (1968).
 - 10) G.E. Cosgrove and M.L. Davis: *Proc. SocExp. Biol. Med.*, 138, 210 (1971)
 - 11) 山口武雄, 田中良光: 特研「造血器移植」第1回報告, p. 12; 動雑., 78: 415, 1969
 - 12) 山口武雄: 特研「造血器移植」第2回報告, p. 10; *J. Rad. Res.*, 13, 41 (1972)
 - 13) R.E. Toya and C.C. Congdon; *Europ. J. Clin. Biol. Res.*, 16, 144 (1971)
- 研 究 発 表
- 1) T. Yamaguchi: A new Technique for the Quantitative Study of Transplantation Immunity. Annual Report NIRS, 9, 36-36 (1969)
 - 2) 山口武雄・田中良光: 照射後造血器移植したマウスの続発症発現に対する胸腺の影響。特研第1回報告書, 12-15頁, 1969.
 - 3) 山口武雄・田中良光: 諸系統マウス間の放射線キメラの成立における胸腺摘出の影響, 動物学会40回大会, 東京, ; 動雑, 78, 415 (1969)
 - 4) 山口武雄: 放射線キメラにおける続発症の発現における胸腺摘出と抗生物質投与の効果。特研第2回報告書, 10-12頁, 1970.
 - 5) 山口武雄・熊取敏之: 放射線キメラにおける続発症発現に対する胸腺摘出と抗生物質投与の効果, 放射線影響学会第14回大会, 三島, 1971.
 - 6) T. Yamaguchi and T. Kumatori: Effect of Thy-mectomy and Antibiotic Therapy on the Incidence of Secondary Disease in Radiation Chimeras. Annual Report NIRS, 11, 43-44 (1971); *J. Rad. Res.*, 13, 41 (1972)
 - 7) 山口武雄・田中良光・鈴木順子: 照射後骨髄移植したマウスの続発症発現に対する胸腺摘出と抗生物質投与の効果。原子力平和利用研究成果報告書, 12, (1973)
 - 8) 山口武雄: 放射線キメラにおける続発症の機作: 頻回移植と抗生物質投与あるいはSPF化の効果。放射線影響学会第15回大会, 金沢, 1972
 - 9) T. Yamaguchi: Mechanisms of Secondary Disease in Radiation Chimeras: Effect of Repetitive Transplantation and Microbial Restriction on Mortality. Annual Report NIRS, 12; in press; *J. Rad. Res.*, 14, 100, (1973)

II - 2. 異系骨髄移植における続発症の発現とエスケープの免疫学的機序に関する研究

佐渡敏彦・小林 森・神作仁子・黒津敏嗣

Immunological Studies of Mouse Radiation Chimeras: Relation of Immunological Status of the Host to the Manifestation of Secondary Disease

Toshihiko SADO, Shigeru KOBAYASHI, Hitoko KAMISAKU and
Toshitsugu KUROTSU

Primary purpose of the experiments reported in this paper was to understand the causative event(s) leading to the manifestation of secondary disease or to the escape from it among lethally irradiated animals protected with genetically incompatible (allogeneic) bone marrow.

The results are summarized as follows.

1. Lethally irradiated C57BL/6J (H-2^b) mice protected with CBA/H-T6T6 (H-2^k) bone marrow were analysed for donor cell proliferation with the use of T6 marker chromosomes (Fig. 1) at varying time intervals after irradiation and bone marrow treatment. Results indicated that at all time intervals studied practically all of the proliferating cells in the host spleens and bone marrow were donor derived (Table 1). This was also true for those chimeric mice suffering from the severe secondary disease. This indicates that allograft failure (allograft resistance) or delayed rejection of the donor cells by the host cannot be the cause of the secondary disease.

2. Kinetics of the recovery of immune competence of syngeneic radiation chimeras induced in C3H/HeMs as well as C57BL/6J mice was studied with the use of Jerne's hemolytic plaque assay (antibody forming capacity), skin allograft reactivity (cell-mediated immune capacity), and one way mixed spleen cell culture *in vitro* (cell-mediated immune potential). Results indicated that with all assay methods used, syngeneic mouse radiation chimeras restored their immune competence to a significant level by the end of the third week (Figs. 2, 4, 5, 6). Suppression of the recovery of immune competence was demonstrated in thymectomized mice by all assay methods used. It was also shown that the recovery of B cells (precursor of antibody forming cells) proceeded at a normal rate under the athymic environment (Fig. 3).

3. Lethally irradiated C3H/HeMs (H-2^k) mice protected with CBA/H-T6T6 bone marrow did not develop secondary disease in spite of the fact that CBA/H-T6T6 skin grafted onto C3H/HeMs mice is normally rejected in 12.6 days. This indicates that small reduction in the degree of antigenic disparity between graft donor and host improves the consequence of allogeneic bone marrow grafting.

4. Secondary mortality due to allogeneic bone marrow grafting following lethal irradiation of the hosts was diminished when they were reared under the specific pathogen free environment.

5. Antihost reactivity of spleen cells derived from allogeneic radiation chimeras (C57BL → C3H) induced in SPF mice was tested by injecting them into lethally irradiated host-type (C3H) or donor type (C57BL) recipient mice and scoring mortality due to GVH reaction by the injected cells. Results indicated that spleen cell populations of allogeneic mouse radiation chimeras which were apparently tolerant to the host antigens contained immunocompetent clones reactive to the host antigens but were inhibited from acting *in situ* by as yet unknown mechanism.

6. Lethally irradiated C3H mice were protected with C57BL bone marrow cells pretreated with AKR anti-C3H thymocyte sera and complement, with a hope that removal of thymus derived cells from the allogeneic donor bone marrow might improve the survival of allogeneic radiation chimeras. Results indicated that the incidence of secondary mortality was not reduced by such treatment, suggesting that GVH reaction leading to the manifestation of secondary disease was likely to be caused by bone marrow derived B cells rather than by thymus derived T cells.

7. Significance of these findings to the mechanisms of manifestation of secondary disease and of escape from it was discussed.

1 緒 言

生体が致死量の放射線に被曝すると、造血機能障害のためにすべての個体が2週間位の間に死亡するのが普通である。ところが、1951年 Lorenz とその協同研究者は致死量のX線照射をうけたマウスあるいはモルモットに、遺伝的に組織適合性を同じくする個体から集められた骨髓細胞を移植してやると、これらの個体が造血機能障害による死から免れることができることを報告した¹⁾。さらに続いて1954年には、彼らはこのような造血機能障害による死を防ぐには、遺伝的に組織適合性を異にする骨髓の移植さえも有効であると報告した²⁾。

ところが、その後の研究により致死量の放射線に被曝した個体は組織適合性を異にする個体からの骨髓の移植により確かに造血機能障害による死から免れることはできるが、これらの個体の多くは処置後3~4週経過した頃から徐々に体重減少、はげしい下痢、毛の逆立ち等の外観的症状を呈しながら体力を消耗し、3カ月目の終り頃までには大部分の個体が憔悴しきって死亡することがわかってきた³⁾。これがいわゆる続発症 secondary disease と呼ばれるものである³⁻⁴⁾。

ところで、注目すべきことは致死量の放射線に被曝後異系骨髓移植をうけた個体の全てがこのように悲惨な運命をたどるのではなく、一部の個体はこの症状から自然に回復し、さらに他の一部の個体ははじめから続発症に罹ることなく、ほとんど正常に生き続ける場合があるということである⁵⁾。このような続発症に罹らない(エスケープ)個体の頻度は宿主と提供者の組合せにより、あるいは飼育環境により大きく左右される。概して言えば、飼育環境がよいほどエスケープ個体の頻度は高いことが知られている。また、続発症をエスケープして長期生存した個体について造血細胞の由来を調べると、①提供者由来の細胞だけの場合(complete chimeras)、②宿主型細胞だけの場合(total reversals)、及び③両方の細胞がいろんな割合で混在している場合(partial reversals)があることが知られている⁴⁾。ところで、

このように続発症をエスケープした個体は宿主型及び提供者型の皮膚移植を受けつけるのがふつうで、このような個体は宿主型及び提供者型の抗原に対して免疫トレランスを獲得しているものと解釈される⁴⁾。したがって、続発症発現のメカニズムあるいは続発症からのエスケープ(免疫トレランスの成立)のメカニズムを探ることは、骨髓移植の研究領域においては単にその臨床的応用への可能性という面からばかりでなく、理論的な面からも特に重要な意義を有することは明らかである。

このような観点から、われわれは放射線キメラ個体における移植細胞の増殖動態、免疫機能回復の kinetics とその過程に及ぼす胸腺摘出の効果、ならびにキメラ個体における抗宿主型あるいは抗提供者型活性の検索と免疫トレランス成立の機序についての研究を進めてきた。本報では紙数に限りがあるので、これらの結果についてやや総括的に報告する

2. 実験材料と方法

マウス：本実験で用いられた実験動物は、すべて当研究所哺乳動物舎で生産された近交系マウスおよび外国購入マウスで、それらは次のようなものである。C3H/He Ms (H-2^k)、C57BL/6J (H-2^b)、CBA/H-T6T6 (H-2^k)〔以上普通飼育(CV)マウス〕；C3H/He Ms f、C57BL/6J f〔以上SPFマウス〕。

放射線照射及び骨髓移植：CVマウスを使った実験では全てX線(島津新愛250型X線発生装置；200kVp, 20mA, 90R/min)、SPFマウスを使った実験では全てr線(¹³⁷Cs-r線；104R/min)を使用した。骨髓移植のための致死線量としては、CVマウスではC3Hの場合900R、C57BLの場合800Rを使用し、SPFマウスではC3Hの場合1000R、C57BLの場合900~950Rを用いた。骨髓移植にあたっては、同系移植の場合照射後数時間以内に 2×10^6 個を、また異系移植の場合照射後24時間目頃に 10×10^6 個をいずれもイーグル液に浮遊液として尾静脈より移入した。

移植細胞の増殖動態の検索：移植細胞の増殖動態を調べるためには骨髄提供者として安定な染色体標識をもった CBA/H-T6T6 マウスを選び (Fig. 1) その骨髄細胞

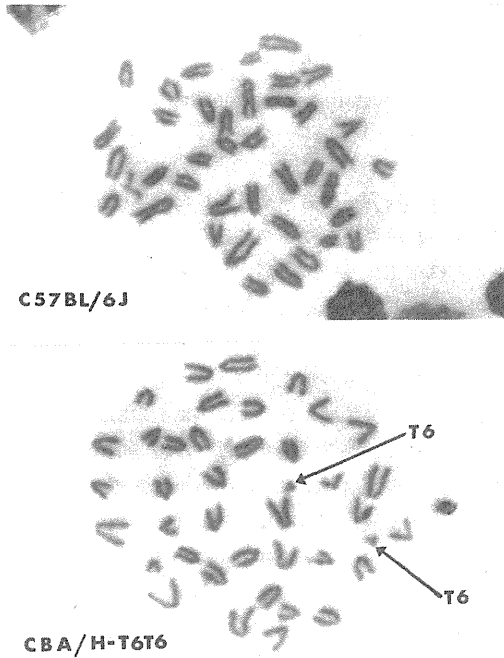


Fig. 1. Chromosomes of C57BL/6J and CBA/H-T6T6 mouse bone marrow cells at metaphase. Arrows indicate two T6 (marker) chromosomes.

胞を 800 R 照射した C57BL, または 900 R 照射した C3H マウスに移植したあと日を追って, 宿主の造血組織で増殖している細胞の染色体分析を行ない, 提供者由来細胞の頻度を調べた。染色体標本の作成に当っては, $10^{-3}M$ あるいは 0.04% のコルヒチンを生理食塩水に溶かし, その 0.25 ml をマウスの腹腔内に注射後 1.5~2.0 時間で骨髄及び脾をとり出し, Ford の方法⁶⁾を一部変更して染色体標本を作った。

免疫機能の検索：i) 抗体産生能, ヒツジ赤血球 (SRBC) 2.5×10^8 を腹腔内に注射後 4~6 日目 (実験目的により異なる) の脾に生じた直接 PFC (溶血斑形成細胞) の数を Jerne の方法⁷⁾によって調べ, この値をもって抗原刺激時における抗体産生能の指標とした。

ii) 同種移植拒絶能の検索 (異系皮膚移植), 処置後いろいろな日数経過したあと組織適合性を異にする系統の皮膚を移植し, それらの同種皮膚移植が脱落するまでの日数を調べた。また, 異系骨髄移植後長期生存した個体について免疫トレランス成立の有無を調べるためには, こ

れらのキメラ個体に宿主型及び提供者型の 2 種類の皮膚を移植し, これらの皮膚の長期生着の有無を調べた。同種移植反応力の強さを調べるためにはこのほかに混合脾細胞培養法⁸⁾をも用いたが, こゝでは繁雑になるのでこの方法についての記載は省略する。

iii) B 細胞活性の検索, 放射線キメラマウスにおける B 細胞 (抗体産生前駆細胞) 活性の回復を調べるためには, Lafleur⁹⁾の方法に従った。すなわち, 骨髄移植後いろいろな時間間隔で 5×10^7 個の A 細胞 (ガラスまたはプラスチック表面に附着 adhere する性質をもった細胞-マクロファージで, こゝでは 900 R 照射してリンパ系を不活化した同系マウスの脾細胞を用いた) と同じく 5×10^7 個の T 細胞 (胸腺細胞) を移入したあと, 2.5×10^8 個の SRBC を抗原刺激として腹腔内に注射し, 8 日目の脾に生じた PFC 数を調べ, その値をもって B 細胞回復の程度を知る指標とした。

異系放射線キメラ個体における抗宿主あるいは抗提供者活性の検索：この目的のためには SPF 条件のもとで 1,000 R 照射された C3H マウスに C57BL マウスの骨髄細胞 10^7 個を移植後, いろいろな日数経過したキメラ個体の脾細胞 10^7 個を, あらかじめ致死量の γ 線照射した C3H (宿主型) あるいは C57BL (提供者型) マウスに移入し, GvH 反応による死が起るかどうかでキメラ個体の抗宿主活性あるいは抗提供者型活性の有無を判定した。

3. 実験結果並びに考察

1) 放射線キメラマウスにおける移植細胞の増殖動態と免疫トレランスの成立

異系骨髄移植を受けた個体で, 実際に移植細胞がどれ位の割合で増殖しているかを調べるために CBA/H-T6T6 → C57BL キメラについて, 骨髄移植後日を追って骨髄及び脾における増殖細胞について提供者由来のものと宿主由来のものとの割合を調べた。その結果が Table 1 に示されている。この表から明らかなように, 骨髄移植後 5 日以上経過したものでは, 移植後の日数に関係なく増殖中の細胞のほとんど全てのものが提供者骨髄に由来するものであった。この実験で特に注目されたことは, 骨髄移植後 6~7 週経ってすでに続発症による消耗症状を呈した個体についても, それらの造血組織で増殖中の細胞はすべて提供者由来であったということである。このことから, われわれの実験条件では, 提供者細胞の移植不全 graft failure, allograft resistance¹⁰⁾ あるいは宿主による移植細胞の遅延性拒絶 delayed

Table 1. Karyotype analysis of proliferating hematopoietic cells in allogeneic radiation chimeras

Time after treatment (Days)	Tissues examined	Marker Chromosomes	
		Donor type	Host type
5 (2)*	Bone marrow	198/200 (99.0)**	2/200 (1.0)
	Spleen	200/200 (100.0)	0/200 (0.0)
8 (4)	Bone marrow	451/451 (100.0)	0/451 (0.0)
	Spleen	446/446 (100.0)	0/446 (0.0)
13 (3)	Bone marrow	291/291 (100.0)	0/291 (0.0)
	Spleen	201/201 (100.0)	0/201 (0.0)
18 (3)	Bone marrow	290/292 (99.4)	2/292 (0.6)
	Spleen	199/199 (100.0)	0/199 (0.0)
47 (3)	Bone marrow	336/339 (99.1)	3/339 (0.9)
	Spleen	344/344 (100.0)	0/344 (0.0)
110 (2)	Bone marrow	252/252 (100.0)	0/252 (0.0)
	Spleen	250/251 (99.6)	1/251 (0.4)
300 (1)	Bone marrow	128/128 (100.0)	0/128 (0.0)
	Spleen	78/78 (100.0)	0/78 (0.0)

* Number of mice examined.

** Percentage.

rejection が続発症の主因とはなり得ないと考えられる。今一つは、われわれの実験条件では移植後の経過日数とは関係なしに全ての個体が殆んど完全なキメラであって、部分的にあるいは完全に宿主型に戻った個体は見出されなかったことである。ただし、CV 条件下で行なわれたこの実験では、長期生存個体の数が少なく、標本抽出誤差を完全に拭い去ることはできないので、現在 SPF マウスを用いて追試が行なわれている。SPF マウスでは、異系骨髄移植によって続発症は殆んど発現しないので、標本抽出誤差が全くない状態で完全キメラ個体の割合について正しい値が得られるであろうと期待される。

一方、長期生存した数匹の異系放射線キメラマウス (CBA/H-T6 T6→C57BL,C57BL→C3H) について宿主型及び提供者型の皮膚移植を行なったところ、全ての個体で両方とも半永久的に (70日以上) 着生した。これらのことから、異系骨髄移植後長期生存したキメラマウスではその造血系 (リンパ球系を含む) 細胞は移植細胞によって完全に置き換えられ、しかもそれらの個体では宿主型及び提供者型の抗原に対して免疫トレランスが成立していると解釈される。

2) 放射線キメラマウスにおける免疫機能の回復

異系放射線キメラマウスで見られる続発症発現の一義的原因が宿主と提供者との間の免疫学的拒絶反応によるとすれば、当然このようなキメラ個体の免疫機能がどのような時間経過をとって回復するか、また回復したキメラ個体の免疫装置は宿主型のものかそれとも提供者型の

ものかが問題となる。そこで、われわれはまず C3H 及び C57BL 系マウスに誘導された同系放射線キメラを用いて、免疫機能回復の Kinetics を詳しく解析すると共に、この過程に及ぼす胸腺摘出の効果を調べた。胸腺摘出マウスの利用は、骨髄細胞の潜在的免疫活性を調べるのに有効であると考えられる。

a) ヒツジ赤血球に対する抗体産生能の回復

まず、C3H→C3Hキメラの SRBC に対する抗体産生能回復の kinetics を Fig. 2 に示す。図からわかるように、SRBC に対する抗体産生能は3週目の終り頃から1週間の間に急速に回復するが、5週目頃から回復速度はやゝ弱まり、抗体産生能が完全に正常レベルにまで回復するには約10週間かゝることがわかる。一方、胸腺摘出マウスでは抗体産生能の回復は著しく抑えられているが、脾あたりの PFC 数でみる限り、胸腺なしでもある程度の抗体産生能の回復がおりうるということがわかる。

ところで、ここで抗原として用いた SRBC に対する抗体産生反応には、胸腺由来の T 細胞と骨髄由来の B 細胞との協調が必要であることが知られている¹¹⁾。そこで、900R 照射されたマウスに SRBC に反応しうる免疫機能単位 (T 細胞と B 細胞を含む) が、生き残りうる可能性¹²⁾ 及び T 細胞が提供者の骨髄細胞に混じって移入される可能性¹³⁾ を検討するためのいくつかの実験を行なったが、結果はいずれの可能性をも否定するものであった。したがって、胸腺摘出マウスに誘導された C3H→C3H キメラの抗体産生能の部分的回復は骨髄に含まれている B 細胞の前駆細胞から発達した B 細胞による、T 細胞なしの

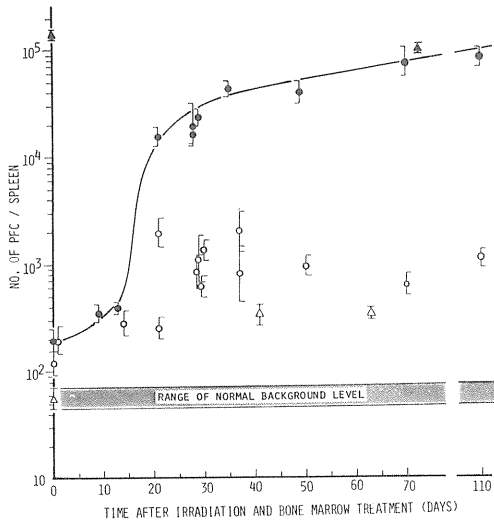


Fig. 2. Kinetics of the recovery of antibody forming capacity of syngeneic radiation chimeras induced in thymectomized [○] and normal [●] C3H mice. Mice were injected i.p. with 2.5×10^8 SRBC at varying time intervals after irradiation and their splenic PFC assessed 6 days later. ▲, 4 day PFC response by normal C3H mice of the same age group. △, Background PFC level observed in syngeneic radiation chimeras which was higher than that of normal C3H mice.

抗体産生反応であると考えられた。

この点をテストするために、胸腺摘出マウスに誘導された C3H→C3H キメラについて、Lafleur らの方法に従って B 細胞活性の回復を調べたところ、それは非胸腺摘出マウスに誘導された C3H→C3H キメラにおけると同じように、骨髄移植後 1 週間目には、すでにかかなり高いレベルにまで回復していることがわかった (Fig. 3)。これらの結果から、胸腺がない状態でも B 細胞は骨髄に含まれている前駆細胞から増殖分化することがわかる。

Fig. 4 は C57BL→C57BL キメラ及び CBA/H-T6→C57BL キメラにおける抗体産生能回復の kinetics を示す。この図からわかるように、C57BL→C57BL キメラでは抗体産生能の回復は、C3H→C3H キメラのそれよりも約 1 週間早くから始まることになる。一方、異系放射線キメラでは実験によりキメラ個体の健康度や生存率にバラツキが大きく、それを反映して抗体産生能についてもかなりのバラツキが見られた。しかしながら、長期生存個体でみる限り抗体産生能は同系キメラ個体のそれと比較して有意の差は見られなかった。概して言えば、異系放射線キメラ個体では同系放射

線キメラ個体に比して抗体産生能の回復が幾分おくれるようである。

b) 同種移植反応能力の回復

Fig. 5 は C57BL→C57BL キメラ個体の異系 (CBA/H-T6T6) 皮膚移植に対する拒絶能の回復の kinetics を調べた結果である。この図からわかるように、C57BL→C57BL キメラの場合、同種移植拒絶能は骨髄移植後 2 週間目には早くも完全に正常レベル (同種皮膚移植拒絶日数 ~ 10.5 日) に回復した。なお、C3H→C3H キメラの場合には、C57BL→C57BL キメラの場合よりも約 1 週間おくれて (約 3 週目に) 正常レベルに回復した。

同種移植反応能力の回復の kinetics については、このほか *in vitro* での混合脾細胞培養法でも調べたが、この場合には C57BL→C57BL キメラについて同種皮

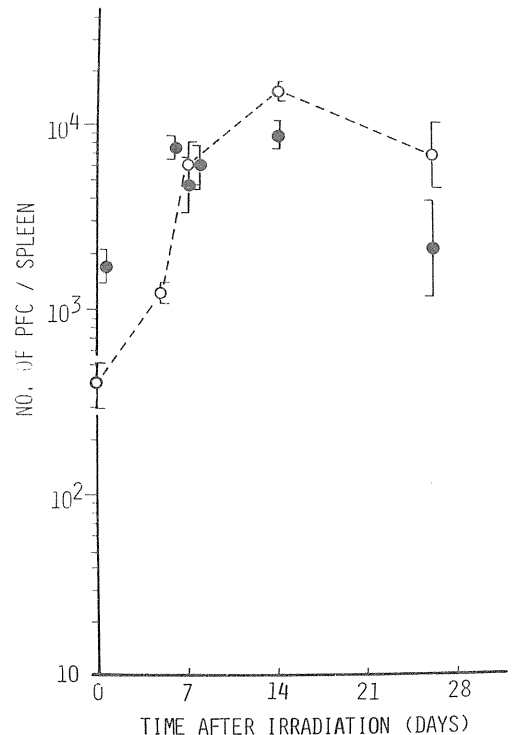


Fig. 3. Recovery of B cell activity in syngeneic radiation chimeras induced in thymectomized [○] and normal [●] C3H mice. The test mice were injected i.v. with 5×10^7 A cells (900 R-treated syngeneic spleen cells) and 5×10^7 syngeneic thymus cells (T cells) and then challenged i.p. with 2.5×10^8 SRBC. PFC assessment was performed at 8 days.

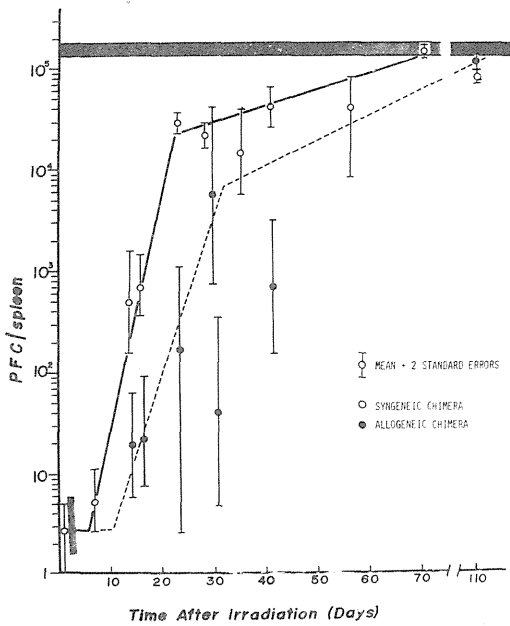


Fig. 4. Kinetics of the recovery of antibody forming capacity of syngeneic [\circ] as well as [\bullet] allogeneic radiation chimeras induced in C57BL mice. For induction of allogeneic radiation chimeras, 10^7 bone marrow cells from CBA/H-T6T6 (H-2^k) mice were injected i.v. into 800 R-treated recipient mice (H-2^b). Mice were injected i.p. with 2.5×10^8 SRBC at various time intervals after irradiation and their splenic PFC assessed 6 days later.

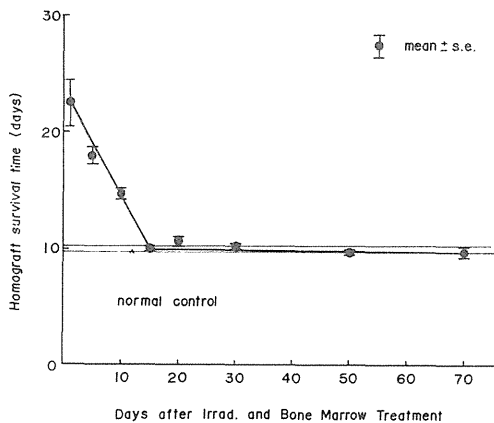


Fig. 5. Kinetics of the recovery of skin allograft reactivity of lethally irradiated C57BL mice protected with syngeneic bone marrow. Graft donor; CBA/H-T6T6 (H-2^k).

膚移植拒絶能がすでに完全に正常レベルに回復している2週目においても、まだ30%の回復しか示さず、胸腺摘出マウスでは反応性の回復は全く認められなかった。

これらのことから、免疫機能の回復という面から見た場合、抗体産生能>混合脾細胞培養における同種移植抗原に対する反応性>同種皮膚移植拒絶能の順序で正常レベルまでの回復に要する日数がかかるということが言えそうである。しかし、いずれの方法で調べても骨髄移植後4週目頃までには免疫機能はかなりのレベルにまで回復していることは確かで、これが続発症の発現とどのようにかかわりあっているか興味あるところである。

3) 異系放射線キメラマウスにおける抗宿主活性及び抗提供者活性の検索。

異系骨髄移植に伴っておこる続発症発現のきっかけとなる免疫反応は、移植細胞による宿主に対するGVH反応であると考えられている¹⁵⁾。ところが一方では、異系骨髄移植のあと続発症をエスケープした個体はいわゆる

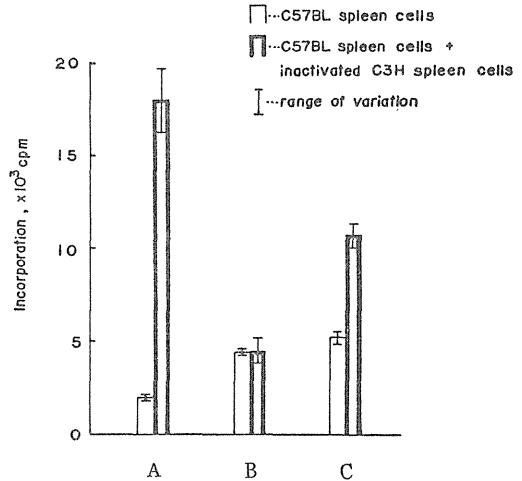


Fig. 6. Allantigen reactivity of C57BL mice assessed by one way mixed spleen cell culture *in vitro*. All test mice were injected i.p. with 3×10^7 inactivated C3H spleen cells 4 days before the *in vitro* tests were performed. For mixed spleen cell culture, 10^7 test spleen cells which had been primed for 4 days were cultured with or without the target all antigens (2×10^6 inactivated C3H spleen cells). ³H-thymidine was added to the culture at 48 hours and the cells harvested for radioactivity measurements at 72 hours. A, Normal C57BL mice; B, Syngeneic radiation chimeras induced in thymectomized C57BL mice (4 weeks after irradiation); C, Syngeneic radiation chimeras induced in normal C57BL mice (4 weeks after irradiation).

完全キメラであつて、その造血系あるいは免疫系細胞は骨髄提供者由来の細胞で占められているばかりでなく、宿主型及び提供者型抗原に対して免疫トレランスを獲得していると考えられる。したがつて、異系骨髄移植後ある時期に GvH 反応が優先する状態から免疫トレランス状態への移行がおこるものと考えられる。この点を検討するために、異系骨髄移植後日を追つてキメラ個体の脾細胞を、新しく致死量の放射線を照射された宿主型あるいは提供者型マウスに再移植して、それらの個体の死亡率からキメラ個体の脾細胞に抗宿主活性あるいは抗提供者型活性の有無を調べた。この種の実験を CV 条件下で行なうと、宿主と提供者との間の免疫学的不適合性によるメカニズム以外に、細菌感染の寄与が余りにも大きく再現性ある結果が得られないので、SPF マウスを用いてこの実験を行なつた。

山口氏の報告にもあるように、SPF 条件下では 1,000 R 照射した C3H (H-2^k) マウスに 10⁷ 個の C57BL (H-2^b) マウスの骨髄細胞を移植しても続発症はほとんど発現しない(われわれの実験では 82 例中 80 例までが 3 ヶ月以上生存した)。逆の組合せでも、結果は全く同じである(42 例中 40 例が長期生存)。

GV マウスで得られたこれまでの知見から考えると、SPF 条件下では全ての個体が完全キメラのまま移植細胞と宿主抗原との間に免疫トレランスが成立していると言えそうである。

そこで、骨髄移植後 2, 3, 4, 8 及び 22 週経過した C57BL→C3H キメラ個体の脾細胞 10⁷ 個をそれぞれ 1,000 R 照射された C3H (宿主型)あるいは 900~950 R 照射された C57BL (提供者型) マウスに再移植後 2 ヶ月間にわたつて、これらの個体の死亡率を調べた。ここで C57BL→C3H キメラにおいて宿主と提供者との間に本当に免疫トレランスが成立していれば、キメラ個体の脾細胞には抗宿主型あるいは抗提供者型の活性はなく、従つて両群ともこのような処置によつて死亡する個体はない筈である。ところが、実験結果は Fig. 7 に示されるように、キメラ個体の脾細胞には異系骨髄移植後の日数によりいろいろな程度の抗宿主型活性があるが、抗提供者型活性はないことを示した。一方、長期生存(5 ヶ月以上)した BL→C3H キメラ個体について同種皮膚移植あるいは混合リンパ球培養法で抗宿主型あるいは抗提供者型活性を調べると、結果はいづれの活性も陰性であつた。すなわち、長期生存した異系キメラ個体では、その

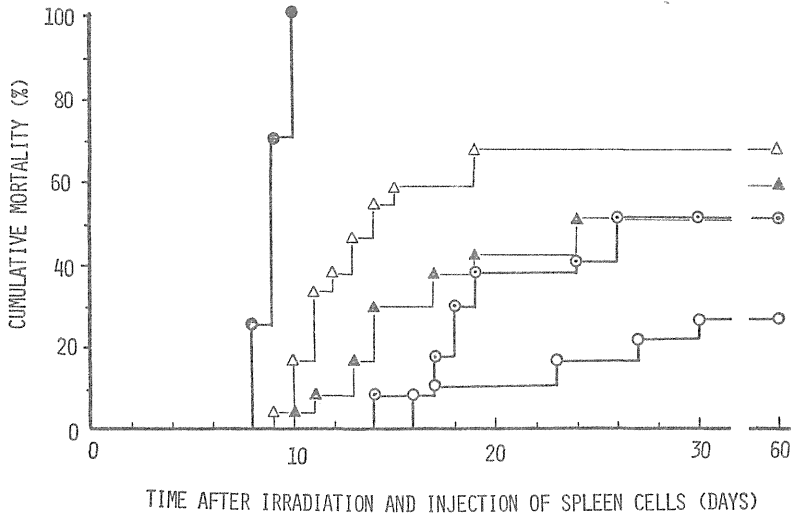


Fig. 7. 60-day cumulative mortality of lethally irradiated host-type (C3H), recipient mice treated with 10⁷ spleen cells derived from allogeneic (C57BL→C3H) chimeric mice. ●, C3H 1000 R + C57BL spleen cells (positive control); ○ C3H 1000 R + spleen cells from 2 week chimeras; ◎, C3H 1000 R + spleen cells from 3 week chimeras; ▲, C3H 1000 R + spleen cells from 8 week chimeras; △, C3H 1000 R + spleen cells from 22 week chimeras. No mortality was demonstrated in the following groups (negative controls): (1) C3H 1000 R + C3H spleen cells, (2) C57BL 900 R + C57BL spleen cells, (3) C57BL 900 R + spleen cells from 2 week chimeras, (4) C57BL 900 R + spleen cells from 22 week chimeras. Number of recipient mice varied between 20 and 25 for each group.

脾細胞には抗宿主活性を潜在的に持ちながら、その個体では宿主型及び提供者型抗原に対して免疫トレランスが成立しているということになる。

更に興味あることは、異系キメラ個体の脾細胞移入によって抗宿主活性が発現されることなく、長期にわたって生き残った個体について宿主型及び提供者型の皮膚を移植したところ、10例中10例において両方の皮膚を完全に生着した(>70日)。つまり、この場合にも生き残った個体は両方の抗原に対して、免疫トレランスを獲得していると理解される。

以上の実験から得られる一つの結論は、異系キメラ個体では提供者由来の免疫系細胞には抗宿主活性をもった細胞クローンが含まれているにもかかわらず、キメラ個体の体内では、これらの細胞クローンの抗宿主活性が抑

キメラにおける続発症からのエスケープ、とくに免疫トレランス成立の機序に関して極めて重要な示唆を与えるものと言うべきであろう。

4) 提供者骨髄細胞の抗胸腺細胞血清処置による続発症軽減の試み

異系放射線キメラにおける続発症の発現を免疫学的手段で抑える試みとしては、CVマウスを用いた異系骨髄移植実験(C57BL→C3H)において、胸腺細胞に対する特異的な抗血清処置により提供者(C57BL)の骨髄細胞集団から胸腺由来細胞(T細胞)を除去し、これを900R照射された異系宿主マウス(C3H)に移植した。しかしながら、Fig. 8に示された結果からわかるように、このような処置によって異系キメラ個体の生存率を高めることはできなかった。したがって、続発症発現の

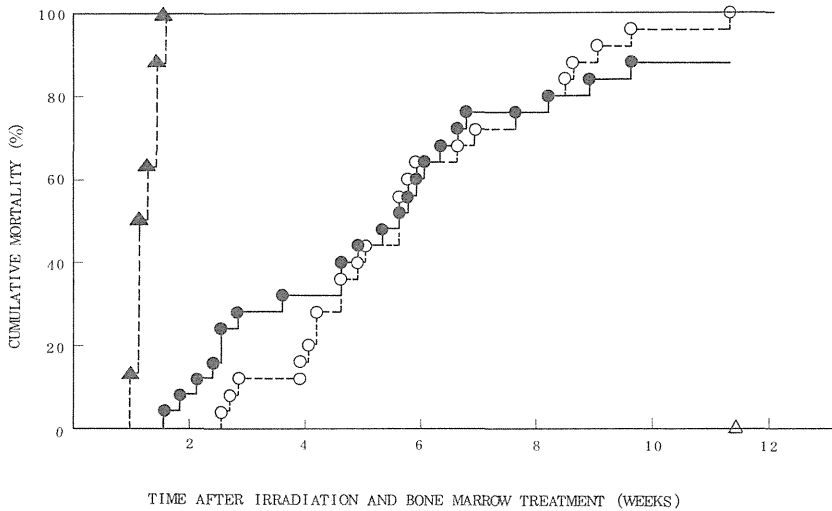


Fig. 8. Effect of pretreatment of allogeneic donor bone marrow with anti-thymocyte sera on the incidence of secondary mortality. ▲, C3H 900 R only; △, C3H 900 R + C3H bone marrow cells (2×10^6); ○, C3H 900 R + C57BL bone marrow cells (10^7) pretreated with AKR normal mouse sera and complement; ●, C3H 900 R + C57BL bone marrow cells (10^7) pretreated with AKR anti-C3H thymocyte sera and complement.

えられるようなある機構が発達し、両者の間には微妙な平衡関係が成立しているらしいということである。言いかえれば、キメラ個体で見られる宿主と提供者細胞との間の免疫トレランスはBurnet理論¹⁴⁾から予想されるような宿主抗原に反応する細胞クローンの消滅によるものではなく、むしろ腫瘍細胞について知られているエンハンシメント現象、あるいはそれに類似のメカニズム¹⁵⁻¹⁷⁾によるものではないかと考えられる。これは異系放射線

きっかけとなる免疫反応が骨髄中に含まれているT細胞によるという解釈には、少し無理があるように思われる。

4. 異系骨髄移植における続発症の発現とエスケープの機序についての考察

以上の知見を総合すると、異系骨髄移植によって起る続発症の発現あるいはエスケープの機序に関して最も基本的な重要なことは、(1)細菌感染がいろんな程度におこ

りうる CV マウスでも同系骨髄移植によっては続発症は殆んど発現しないということ、及び(2)細菌感染が起らない SPF マウスでは異系骨髄移植によっても続発症は発現しないということである。このことは異系骨髄移植によっておこる弱い GvH 反応あるいは細菌感染のいづれか一方だけでは、続発症は発現し得ないことを意味する。また、われわれの経験では SPF 条件のもとで続発症をエスケープした個体は CV 条件へ移してももはや続発症にはかかからない。これらのことから、続発症をエスケープするためには免疫トレランスの成立が細菌感染に先行することが必要であるように思われる。

一方、免疫トレランスの誘導に関する多くの実験から予想されるように、異系放射線キメラにおいても免疫トレランスの獲得は宿主の免疫機能がまだ十分に回復していない時期に進行するものと考えられる。

これらのことから、異系骨髄移植によっておこる弱い GvH 反応自体は宿主にとって致死的でなく、それだけでは続発症がおこる条件とはなり得ないが、ただでさえ免疫学的に無防備に近い状態にあるこの時期(恐らく骨髄移植後3週以内)に細菌感染と GvH 反応が加わるとそれは生体機能を大きく攪乱することになり、これがだんだんと続発症へと発展していくことになるのではないかと考えられる。CV マウスで、時折長期生存する異系キメラ個体が得られるのは、たまたま移植された骨髄細胞の中に免疫担当細胞が含まれていなかったか、あるいは細菌感染をエスケープした個体であろう。

今1つ、続発症の発現機序に関連して興味があるのは、宿主と提供者との間の免疫学的不適合性の大きさと続発症発現頻度との関係である。たとえば、われわれの実験では CBA/H-T6→C3H の組合せの放射線キメラマウスでは CV 条件のもとでも90%以上の個体が長期(5カ月以上)にわたって生存し続ける。この組合せの皮膚移植では、平均生着日数は 12.57 ± 0.59 日 ($n=14$) であった。このことから宿主と提供者との間の比較的弱い抗原性のちがいは、続発症の発現に導くほどの負荷をキメラ個体に与えるものではないと解釈される。このことはまた、比較的弱い抗原性のちがいに対しては比較的容易に免疫トレランスが誘導されることをも意味する。したがって、骨髄移植においては主要な組織適合性抗原さえ適合していれば、それ以外の弱い組織適合性抗原のちがいはそれほど致命的な効果をもつものではないといえそうである。

最後に、CV 条件下で誘導される異系キメラマウスにおいて続発症をひきおこすきっかけとなる免疫反応に関

与する免疫担当細胞が、一体如何なる性格のものであるかを考えてみたい。これまでの一般的な考え方では、GvH 反応は主として胸腺由来の T 細胞によるとされている¹⁸⁾。もしもこの考えが正しければ、骨髄細胞集団から T 細胞を除くような処置をすれば続発症の発現は著しく抑えられると期待される。ところが、われわれの実験では抗胸腺細胞血清で前処理された異系骨髄の移植によっても続発症の発現は軽減されなかった。一方、胸腺摘出マウスにおける免疫機能回復の研究から、胸腺なしでも抗体産生能の部分的回復がおこりうること、及び B 細胞の増殖分化は宿主の胸腺や T 細胞とは独立に進行することなどから、B 細胞による GvH 反応の誘導が考えられる。胸腺摘出マウスでも、異系骨髄移植により非胸摘マウスと同様に続発症が発現するという報告¹⁹⁻²⁰⁾もこの解釈と一致するものであろう。B 細胞を除いた異系骨髄細胞の移植によって、果して続発症の頻度が抑えられるかどうかについては、現在検討中である。

5. 要 約

本報告の結果を、次のように要約することができる。

- 1) 大量の異系骨髄移植後に発生する続発症は、移植不全あるいは宿主による移植細胞の選発性拒絶反応によるのではない。
- 2) 同系放射線キメラ個体の抗体産生能は照射後3～4週頃から急速に回復し始めるが、同種皮膚移植拒絶能は2～3週で完全に正常レベルに回復する。胸摘マウスでは、T細胞に依存する免疫機能の回復は抑えられるが、この場合でもB細胞活性は正常に回復している。
- 3) 主要な組織適合性抗原さえ一致しておれば、ある程度の強さの抗原性のちがいは骨髄移植の大きな障害とはならない。
- 4) SPF マウスでは、異系骨髄移植においても続発症は稀にしか発現しない。
- 5) 異系放射線キメラ個体の脾細胞は適当な assay 系を用いれば、抗宿主活性を検出することができる。しかし、その個体の中では免疫トレランスが成立し、抗宿主活性は発現されない状態にある。
- 6) 異系骨髄移植に先だつて、提供者骨髄から胸腺由来細胞を取除くような処置を行なっても、続発症は抑えられない。
- 7) 続発症の発現とエスケープにおけるこれらの知見の意義について考察した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行にあたっていろいろな面で多大の便宜を与えられた「造血器移植」特研班長の熊取敏之障害臨床研究部長を始め、特研班のメンバー各位及び実験用マウスの生産供給の面で絶大なる御協力を戴いた技術部動植物管理課の方々に心からの謝意を表したい。また、いろいろと問題の多い実験動物生産管理体制の改良に尽力された御園生圭輔所長以下関係者各位にも、この機会を借りてお礼申しあげます。

参 考 文 献

- 1) Lorenz, E., Uphoff, D. E., Reid, T. R., and Shelton, E., *J. Nat. Cancer Inst.* 12, 197 (1951)
- 2) Lorenz, E., and Congdon, C. C., *J. Nat. Cancer Inst.*, 14, 955 (1954)
- 3) Barnes, D. W. H., and Loutit, J. F., *Nucleonics*, 12, 68 (1954)
- 4) Van Bekkum, D. W., and De Vries, M. J. *Radiation Chimaeras*. Logos Press, London, 1967.
- 5) Miki nodan, T., Changes in immunobiological processes caused by radiation. In, *Handbuch der Medizinischen Radiologie*. Vol. II, Part 2, Ed. A. Zuppinger, pp. 303, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York, 1966.
- 6) Ford, C. E. The use of chromosome markers. In, Mickle, H. S., and Loutit, J. F. *Tissue Grafting and Radiation*. pp. 197, Academic Press, New York and London, 1966.
- 7) Jerne, N. K., and Nordin, A. A., *Science*, 140, 405 (1963)
- 8) Kobayashi, S., Sado, T., Kamisaku, H., and Kurokawa, H., *Ann. Rept. Nat. Inst. Radiol. Sci.*, 12, 31 (1973)
- 9) Lafleur, L., R. G. Miller, and Phillips, R. A., *J. Exp. Med.*, 135, 1363 (1972)
- 10) Cudkowicz, G., Hybrid resistance to parental hematopoietic cell grafts: Implications for bone marrow chimeras. In, *La Greffe des Cellules Hematopoiétiques Allogéniques*, pp.207, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1965.
- 11) Feldmann, M. and Nossal, G. J. V., *Quart. Rev. Biol.*, 47, 269 (1972)
- 12) Sado, T., Kamisaku, H., and Kurotsu, T., *Symposia Cell Biol.*, 23, 195 (1972)
- 13) Sado, T., and Kamisaku, H. (in preparation)
- 14) Burnet, F. M. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1959.
- 15) Amos, D. B., Cohen, I., and Klein, W. J., Jr. Mechanisms of immunological enhancement, *Transplantation Proc.*, Vol. II, No. 1, 68, 1970.
- 16) Hellström, I., Hellström, K. E., Storb, R., and Thomas, E. D., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 66, 65 (1970)
- 17) Voisin, G. A., *Cell Immunol.*, 2, 670 (1971)
- 18) Elkins, W. L., *Progr. Allergy*, 15, 78 (1971)
- 19) Simmons, R. L., Wolf, S. M., Chandler, J. G., and Nastuk, W. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 120, 81 (1965)
- 20) Goedbloed, J. F., and O. Vos, *Transplantation* 3, 603 (1965)

II - 3. 造血器移植による続発症の病理学的検討

春日 孟・古瀬 健・野田 攸子

Pathological Study of the Secondary Disease Caused by Bone Marrow Transplantation.

Tsutomu KASUGA, Takeshi FURUSE, Yuhko NODA.
(Division of Physiology and Pathology)

C57BL/6J(H-2^b) and DBA/2(H-2^d) strain mice maintained in conventional status were x-irradiated with the dose of bone marrow death(LD100(15)). The pathological study of a secondary disease of irradiated mice induced by homologous bone marrow cells was performed by the post-mortem examination and by time course examinations of clinical pathology, clinical hematology and histopathology. Drastic findings of the secondary disease in conventional mice were as follows: 1) viral hepatitis, infectious type consisting of inflammation, marked dissociation of cell cords, necrosis and its complications, 2) interstitial pneumonitis caused by viral infection, 3) degeneration and atrophy of the myocardium with Aschoff-like nodules, fibrinoid degeneration of vascular walls, and 4) hyperkeratosis and acanthosis of the epidermis, histio-plasmocytic cell infiltration in the subepidermis and hyalinoid thickening of collagen fibers. (Pathological data of the secondary disease is summarized in the Table). The repopulation of peripheral leucocytes in homologous bone marrow transplanted mice irradiated was extremely low in comparison with that in irradiated mice treated with isologous bone marrow cells. Sado has stated that the recovery of immunocompetent cells measured by plaque-assay method is reached a significant level within 3 weeks after the irradiation and bone marrow transplantation. Although irradiated conventional mice treated with homologous bone marrow cells died of the secondary disease, irradiated SPF-mice, as has been reported by Yamaguchi (1973), treated with the same procedure never died of the disease. In the post-mortem examination of mice which died of the disease, wide-spread necrobiosis of bone marrow was found.

According to the above experimental results, the following speculation is proposed: an immunologic activity of the body is still not demonstrated during several months after the recovery of the immune function of cells. This period is able to be called as an incomplete immunologic stage, and the pathophysiological condition in this stage will be available to suffer from infectious diseases, especially of the conventional maintained mice.

はじめに

動物個体が骨髄致死量の放射線照射を受けた場合、被曝後5～15日の間に死亡する。しかし、被曝個体に被曝後24時間目頃に必要量の骨髄移植が行なわれると、被曝宿主個体の死は被曝後20日目頃より始まる。この死が続発症による死といわれる。

これを解析するために、マウス、ラット、ウサギ、サルなどの実験動物およびヒト臨床例における homologous および heterologous の骨髄細胞の被照射個体への移植結果が検討され、骨髄細胞移植による chimera

状態の確立後に発現する宿主個体の死は、被照射線量、宿主と donar の動物種類の組合せ方、donar 中に含まれるリンパ球様細胞の量の多寡、chimera 状態の持続期間の長短、二次感染の有無、などにより死亡時期、並びに病像の異間が決定されるという。

病態生理学的には、被照射個体への骨髄移植に伴う病変は種々の原因により成立すると考えられる。第1は、被照射個体への骨髄細胞移植後6～12日の間に現われる急性相病変で、これは graft-versus host reaction によるものと考えられており、腸管、肝、および

他の主要臓器の細胞の急激、かつ、広汎な領域を占有する壊死巣の形成が起り、それに伴って、脱水状態によるショック、電解質代謝障害、内因性血清アルブミンの流出、および内因性毒素による中毒症などが宿主個体を死へ誘導すると云う考え方である。しかし、この時に表われる病態像および病理解剖学的所見は、放射線照射による急性期死変化と区別することは極めて困難である。第2は、被照射後骨髓細胞移植後20日より30日の間に発症する慢性期相病変（これを続発症と呼んでいる）で、本病変は肺炎などの感染症、あるいは原因不明の慢性大腸炎の発症に随伴して生ずる内因性血清アルブミンの持続的な腸管壁よりの脱失、食慾欠乏と免疫機構の崩壊との相互作用、hemolysis（種々の原因による）などによって発現し、個体のwastingにより死亡するものである。

その他皮膚における脱毛、皮膚炎、痂皮形成、潰瘍形成は、続発症の発現、存在を判定する上で特に重要な病変といわれる。またリンパ組織の高度の萎縮 — 場合によって — の有無、臓器細胞の崩壊、リンパ球様細胞、形質細胞、組織球様細胞の増生、血管壁およびその周囲における類線維素物質の沈着などがあげられているが、既に van Bekkum らによって示されているように続発症病態は極めて多様性に富むため、より慎重に、より正確性を期さなければならない。しかしながら、病理学的所見は実験条件 — 実験方法および実験材料という記載に現われた条件ばかりでなく、動物観察施設、飼育体制などによる記載されざる条件 — によるものと考えうる事柄によって同一性を欠いている。すなわち、急性期相病変も慢性期相病変も共に急性放射線障害、あるいは移植骨髄の宿主個体よりの遅延排除による慢性放射線障害の発現によるものかについてもいまだ明らかにされておらず、この事柄に、graft versus host、あるいはhost versus graft 反応が関与していることが想定される。そこで、再び死亡曲線を目標として、系統的に病態生理学的観点より追求し、続発症の病理を解析する。

実験材料および実験方法

大村実験動物研究所生産のC57BL/6J (H-2^b) 雄およびDBA/2 (H-2^d) 雄マウスは生後8週で本研究所に購入され、その後約4週間当所で船橋農場製飼育用固型飼料で飼育された後、生後11~12週で実験に用いられた。

1) C57BL/6J マウス(受容体)の放射線感受性は季節的環境変動を考慮した条件の下で行なった。本条

件下におけるC57BL/6J系マウスの造血器死線量は700~800Rであった。

2) 骨髓細胞移植実験：受容体としてC57BL/6J系雄が用いられ、700~800R全身照射された。供給体(graft)として生後11~12週令雄の1) DBA/2 マウスおよび2) C57BL/6J マウスが用いられた。続発症の実験群として、被照射後24~48時間の間に正常DBA/2マウスの大腿骨管状骨よりえられた 1.5×10^7 細胞/mlの骨髓細胞が700~800R被全身照射C57BL/6Jマウスに与えられた(homologous)。また、対照として正常C57BL/6Jマウス大腿骨管状骨よりえられた $1.5 \sim 3.7 \times 10^6$ 細胞/mlの骨髓細胞が同じ条件下のC57BL/6Jマウスに与えられた(isologous)。これらの骨髓細胞は500単位のカナマイシン、およびペニシリンを含むhanks氏液(千葉血清製)にsuspendされ、滅菌頭用400メッシュグリッドで濾過されたのち、受容体マウス尾静脈より1ml/マウス宛注入された。

3) 骨髓細胞を移植された各実験群は被移植後経時的に血液検査、および肝機能検査、電気泳動的検査がなされた群の他に、死亡時に剖検を行ない続発症像の追跡を行なわれた群とに分けられた。

実験結果

I) C57BL/6J マウスのLD₁₀₀₍₁₅₎ およびLD₅₀₍₃₀₎ について：

本実験に用いられたC57BL/6J系雄12週マウスの放射線感受性のLD₁₀₀₍₁₅₎は700~800Rの間であった。LD₅₀₍₃₀₎は季節によって470R、または610Rであった。すなわち、LD₅₀₍₃₀₎は照射がなされる季節によって大幅な変動がみられた。それに対してLD₁₀₀₍₁₅₎ではその季節的変動幅は700~800Rであり、これはlethal doseのため変動幅は小さかった。(Fig. 1, 2)

II) 造血器死線量被曝C57BL/6J系マウスにおけるisologous およびhomologous 移植病変について(剖検例)：(Fig. 3, 4)

1) isologous - bone marrow (BM) 移植群：

BM移植後12日以内に死亡するマウスは急性放射線障害(脳出血、または細菌感染による菌血症)によるものであった。またBM移植後21日目以降に死亡したものは15%であり、これらの肉眼的および組織学的検索所見は著明な白血球浸潤を伴った壊死性肝障害例(1例)、化膿性肺炎死例(2例)、間質性肺炎死例(3例)、著明な肺ウツ血死例(心萎縮例)(4例)、不明死例(5例)であった。

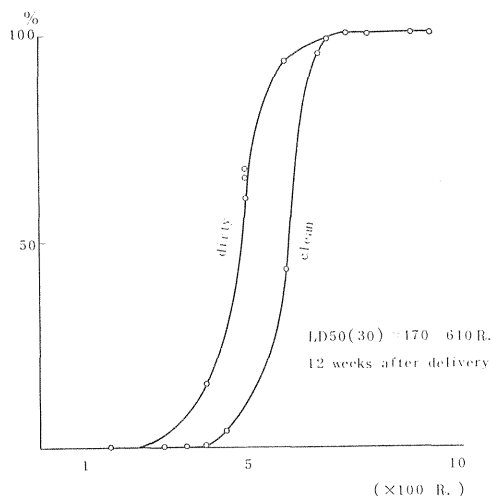


Fig. 1. Mortality curve of C57BL/6J mice irradiated with 200 kV X-ray.

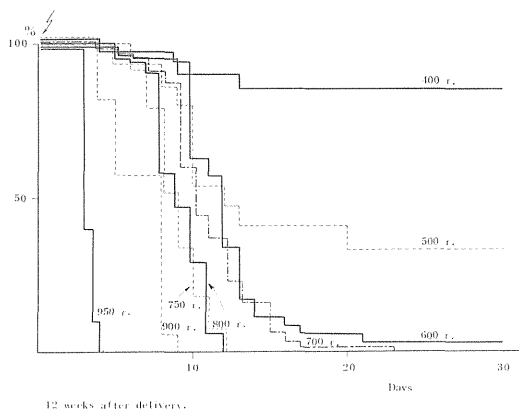


Fig. 2. Survival of C57BL/6J Mice Singly Irradiated with Different Dose of X-rays. (Whole Body Irradiation)

2) homologous - BM移植群:

BM移植後21日目より段階的に死亡し、52日目まで全例死亡した。比較的集中的に死亡した時期は39~40日目であった。一般的に死亡時体重は13.1~17.9gの間であった。本実験群の特徴ある病理解剖学的所見は肝、皮膚、心臓に認められた。脾、リンパ節および胸腺の萎縮ならびに形質細胞、リンパ球の消失等の所見は成書に既に報告されている所見と著しい差異は認められなかった。

a) 肝の変化:

肉眼的に肝色調は極めて多様性を示し、肝表面も顆粒

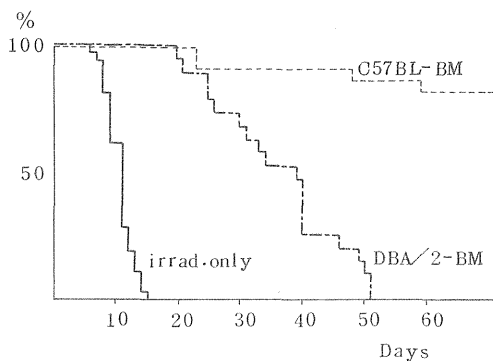


Fig. 3. Survival of C57BL/6J Mice Treated with Isologous and Homologous Bone Marrows after Single 700 r. Irradiation.

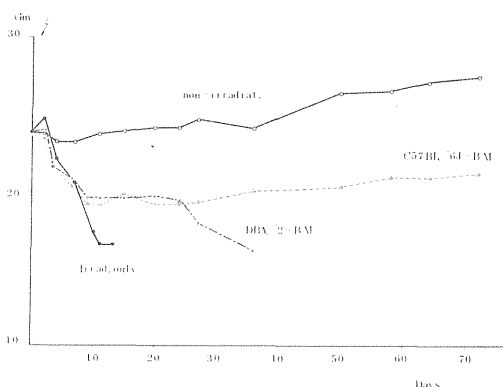


Fig. 4. Body Weight of C57BL/6J Mice treated with Isologous and Homologous Bone Marrows after Irradiation.

状、斑紋状、あるいは平滑、などの多様性を示した。肝重量は稀に1,000mgを越えた症例もみられたが、一般には450~800mgであり、肝は萎縮性であった (Fig. 5)。本変化を組織学的にみると、グリソン氏鞘の白血球浸潤、および小円型細胞浸潤がみられ、肝細胞のPAS反応は弱陽性ないし陰性であった。クッパー氏細胞は一般に著増し、PAS反応は極めて強陽性を示した。また肝細胞索の解離が著明で、肝細胞の大小不同性も著しく、時に巨核化するものもみられた。中心部壊死巣もみられ、それは更に進んで瘢痕化巣を示した例もみられた。これらの一連の変化はアレルギー性肝炎と云う変化よりも、細菌性、あるいはまたウィルス性肝炎に近い変化と考えた方がよいように思われる。

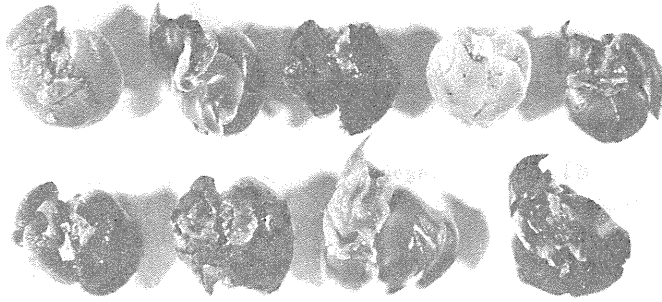


Fig. 5. 肝の肉眼所見

b) 皮膚の変化：

30日目以降に死亡した例にのみ皮膚の紅斑，痂皮，潰瘍形成，脱毛がみられた。組織学的には表皮の萎縮と角化層の増加，毛根の萎縮より消失，皮下結合織の萎縮ないし類硝子様肥厚増生，潰瘍治癒後の肥厚等であった。しかし，血管周囲炎，線維素滲出等の膠原病としての変化はみられなかった。

c) 心の変化：

心は総じて萎縮性であった。心重量は96～130mgの範囲にあるものが通常であった。また，120mg～150mgの範囲にあるものでは心筋の変性変化がみられた。また，死亡例の約62%に血管周囲にアショフ結節様の变化をみとめた。しかし，これはヒトのアレルギー性病変と同一変化と断定できるほど特異的な所見を呈するものではなかった。

d) 肺の変化：

心病変に伴う変化と考えられる著明な肺のウッ血，ならびに肺の間質性肺炎例が見出された。後者は死亡例の約31%に認められた。しかし，本変化は続発症に特異的な変化ではないかも知れない。

e) 腸の変化

糞便は固型であり，下痢例を認めなかった。腸壁の浮腫性肥厚は上行結腸に軽度で認められたにすぎず，また腸粘膜に潰瘍形成，出血点等の変化も見出せなかった。

組織学的には，粘膜下組織に円型細胞浸潤および浮腫が軽度で認められた例が1例見出されたに過ぎなかった。

f) 腎の変化：

肉眼的変化を欠く。組織学的にもネフローゼ，狼瘡性糸球体炎等の変化は見出せなかった。ただし，1例(2%)の腎にメサングイウムの肥厚が著明であった。

g) 副腎の変化：

肉眼的にはピンク調で腫大性変化を示すものが比較的多いが，組織学的には束状層の萎縮が著しく，網状層の肥厚が著しかった。一般に髄質は著明な萎縮を示した。ウッ血は中等度ないし著明であった。

h) リンパ節の変化：

リンパ節は，体上半部のものも体下半部のものも共に著明な萎縮を示した。一般にリンパ節構成細胞は細網結合織細胞であるが，白血球，小リンパ球，形質細胞も軽度で認められた。しかし，形質細胞の量はBM移植後の時間が経過した例は多少なかった。本死亡例群においては，リンパ母胞の再形成は見出せなかった。この変化は脾リンパ母胞においてもほぼ同様であった。

i) 骨髄の変化：

骨髄細胞移植後6週目までに死亡した症例では骨髄は著明な aplasia を示していたが，7週目以降に死亡した症例では骨髄は回復していた。一般に，顆粒球系芽細

胞の比率が高かった。

j) 脾の変化：

脾は萎縮性(70mg以下)を示した。骨髓と異なり造血巣の形成はみられた。しかし、リンパ球の回復はほとんど全くみられず、該部は形質細胞、顆粒球によって占められていた。

III) 経時的観察実験群：

homologous - BM移植群を第I群とし、isologous - BM移植群を第II群として記載する。実験群はBM移植後、1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56日, 12週, 16週に各群毎4 - 6匹宛検索された。

1) 血液学的所見：

Ht値は第I群, 第II群共に40%台を上下し、第II群においてさえ移植後16週目でも41%に留まり、50%台(正常値)に回復しなかった(Fig. 7, 8)。

第II群の末梢血白血球はstained cellとnon-stained cellからなっていた。stained cellとその両者総数(WBC)とは8週目にほぼ一致し12週目以降より完全に一致した。それに対して、第I群ではWBCの実測値は6週目まで行なわれたが、stained cellの測定は4週目までしか行ないえなかった。しかし、この結果より末梢血白血球が1万に達す

るに要する日数は第II群がWBCで第3週病日, stained cellで第6週病日であるのに対し、第I群ではWBCでほぼ第6週病日, stained cellで第9週病日(推定カーブによる)を要するであろう。

骨髓細胞数は大腿骨5mm長中に存在する骨髓細胞を1mlのハンクス氏液にsuspendし、それを白血球用メランジュールを用いて、通常方法で細胞数を測定した。これによって測定された第II群の骨髓細胞数の回復曲線はFig. 9に示されている。この結果より、骨髓細胞数が正常レベルに回復するのは第II群において第3週病日以降であった。この所見は骨髓の組織学的所見と合致している(後述)。

以上の結果を要約すると、isologous - BM移植群(第II群)ではWBC数、骨髓細胞数および骨髓の組織学的所見はBM移植後第3週病日にはほぼ回復したが、homologous - BM移植群(第I群)ではWBC数においてさえ第6週病日以降であった。またstained cellとWBCの数の一致はisologous - BM移植群(第II群)で第8週病日以降であること、すなわち末梢血中細胞の状態が正常に戻るのが第8週病日以降であることは、homologous - BM移植群(第I群)では正常状態に戻るのに、更に多くの日数を必要とすることを示唆している。

2) 胸腺、脾、肝、体重の変動：

第I群はFig. 10に、第II群はFig. 11に示されてい

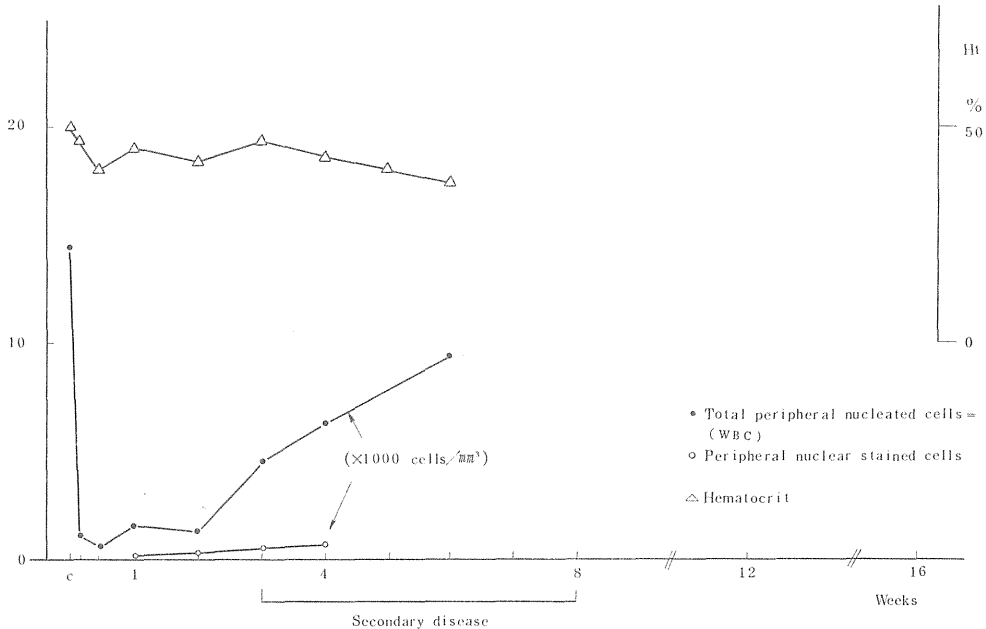


Fig. 7. Hematology of Irradiated C57BL/6J Mice treated with Homologous Bone Marrow Cells.

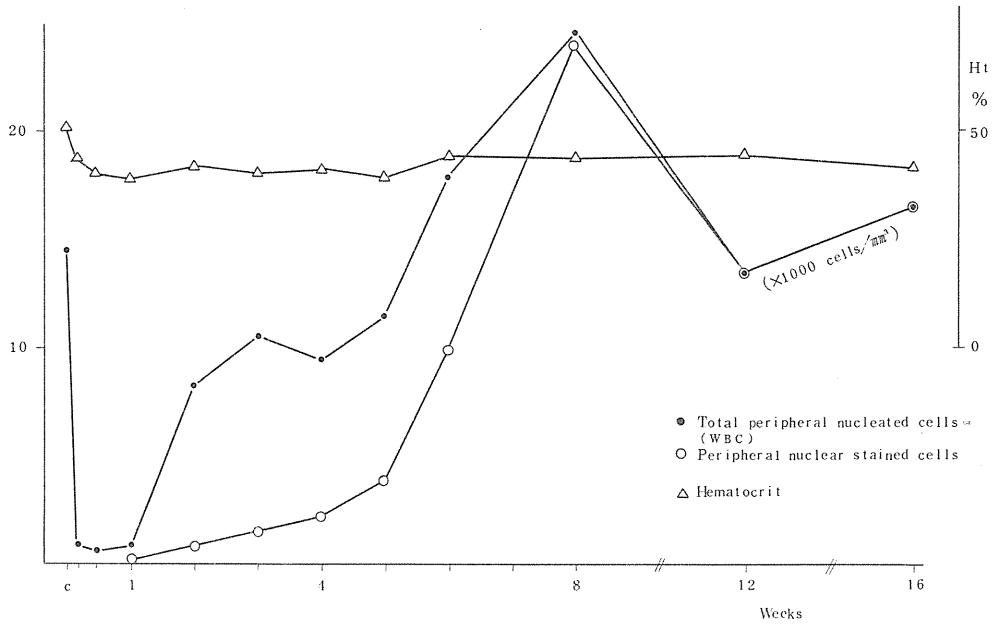


Fig. 8. Hematology of Irradiated C57BL/6J Mice treated with Isologous Bone Marrow Cells.

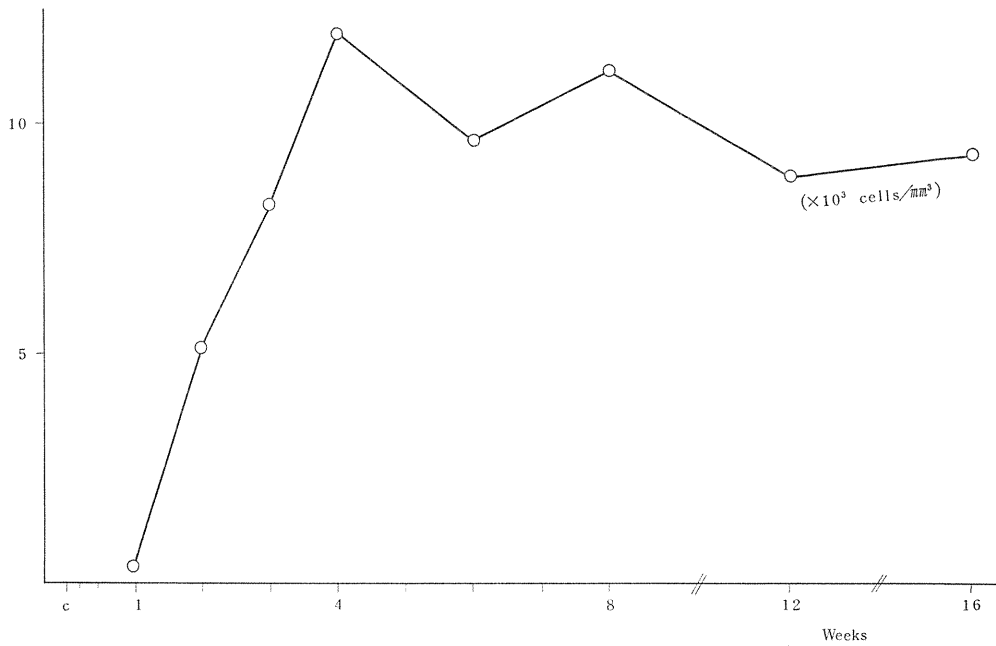


Fig. 9. Time Course of Repopulation of Bone Marrow Cells in irradiated C57BL/6J Mice treated with Isologous Bone Marrow Cells.

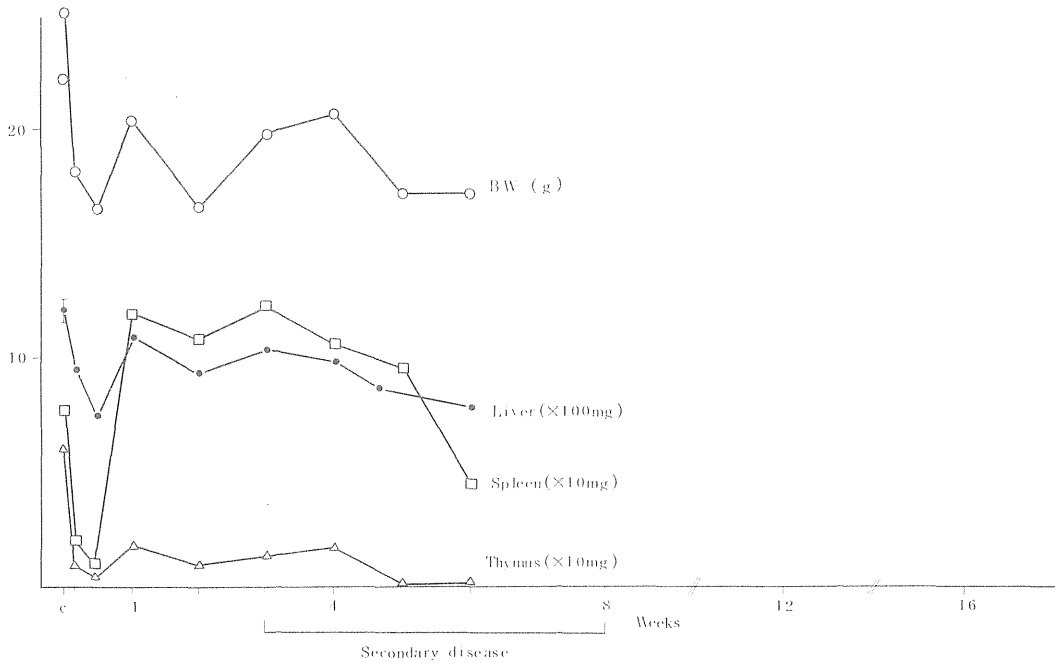


Fig. 10. Body Weight and Organ Weight of Irradiated C57BL/6J Mice treated with Homologous Bone Marrow Cells.

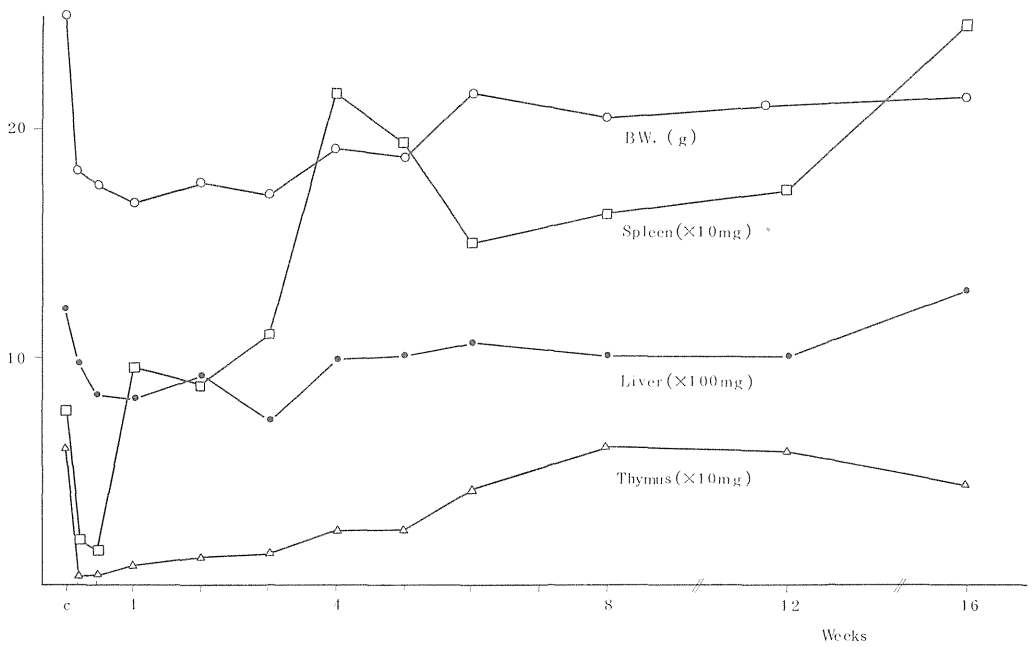


Fig. 11. Body Weight and Organ Weight of Irradiated C57BL/6J Mice treated with Isologous Bone Marrow Cells.

る。

この所見より homologous-BM 移植群 (第 I 群) では胸腺細胞および脾のリンパ球の消失が特徴的であり、肝重量の経時的減少 (肝機能の低下を示唆) もまた特異的所見であった。isologous-BM 移植群 (第 II 群) では脾の重量よりみた回復パターンは、少なくとも 2 相性を示した。

3) 血清総蛋白量, 血清アルブミン量, A/G 比について: (Fig. 12)

血清総蛋白量は第 II 群では BM 移植後 1 週目に 5.3 g/dl に低下した後第 2 週目以降はほぼ 6 g/dl 前後に回復した。しかし、第 I 群では連続的に 4 g/dl 台にまで低下した。

A/G 比は第 I 群, 第 II 群共に著減したが第 II 群は 8 週目で正常レベルに回復した。

アルブミン量は第 I 群, 第 II 群共に減少したが、その減少の度合は第 I 群がより顕著であった。第 II 群は 8 週目で正常レベルに回復した。

以上の結果より、A/G 比の減少は第 I 群ではアルブミン量の減少によるものである。rG の増加は通常第 I 群ではみられなかった。第 II 群の A/G 比の減少は BM 移植後 3 週目以前では rG の増加も否定できないが、一般的には第 I 群と同様アルブミン量の変動と密接な相関が認められた。

4) GPT の変動について:

3) の項で示された如く、第 I 群, 第 II 群共にアルブミン量の著減による A/G 比の著減が報告された。この結果より、肝機能障害の発生を考慮して GPT を測定した。この結果は Fig. 13 に示されている。すなわち、第 I 群の GPT の経時的増加がみられ、かつ続発症期である BM 移植後第 3 週目と第 8 週目測定例において有意な GPT の増加がみられたのに反して、第 II 群では BM 移植後 8 週目と 12 週目に軽度の増加がみられた以外、全経過を通じて正常マウスの GPT 値の上限値と下限値の範囲内にあった。

この結果より、第 I 群では A/G 比の変動と GPT の

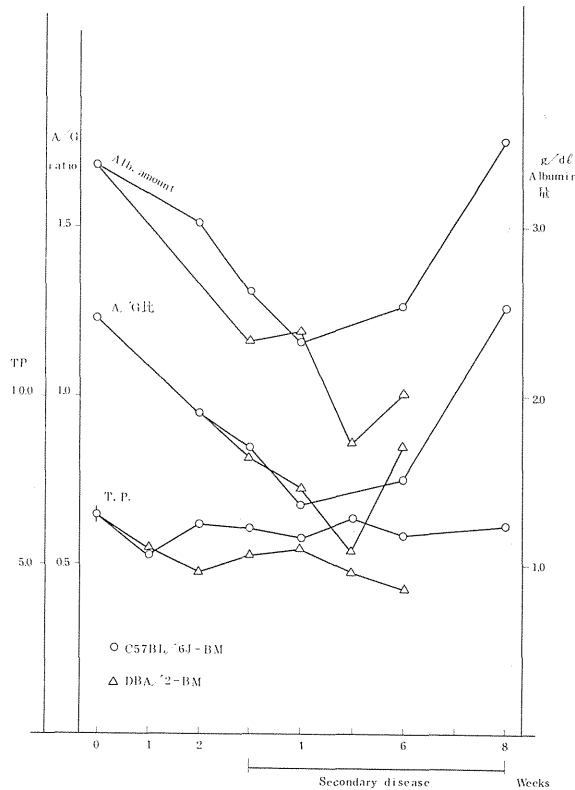


Fig. 12. Albumin Content, A/G Ratio and Total Protein of Irradiated C57BL/6J Mice treated with Isologous and Homologous Bone Marrow Cells.

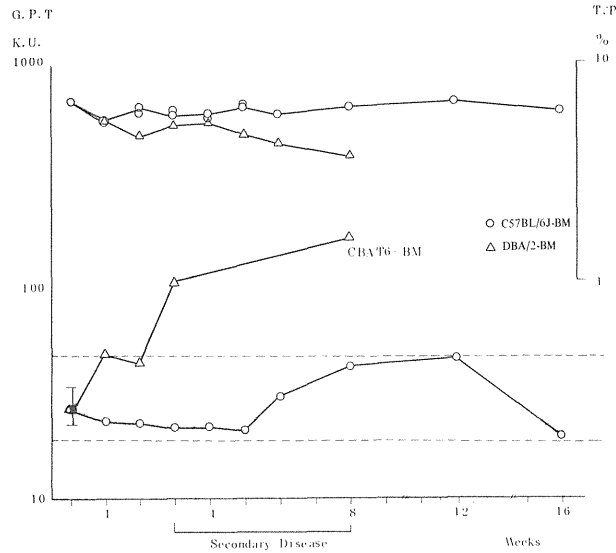


Fig. 13. time course of GPT and Serum Total Protein of Irradiated C57BL/6J Mice treated with Isologous and Homologous Bone Marrow Cells.

変動とが一見相関性のある変化と考えることができるが、第II群ではそれらの相関性は成立しなかった。

5) 経時的病理組織学的所見:

1) 正常 C57BL/6J マウスの臓器所見:

生後12週雄, conventional C57BL/6J マウスについて記載する。胸腺は $61.64 \pm 1.73 \text{mg}$ で組織学的に著変はみない。骨髄では赤芽球系細胞は極めて少なく、顆粒球系細胞が豊富であった。そして骨髄芽球は少なく、分葉核白血球が極めて多いのが通常であった。脾は、 $79.57 \pm 3.38 \text{mg}$ で myelogenic 細胞と erythrocytic 細胞の比はおおむね等価であった。リンパ節はリンパ系細胞よりなるのが通常であったが、稀に形質細胞、あるいはドーナツ型細胞の集団を含む症例もあった。リンパ節は体上半部と体下半部ではリンパ節内細胞の量にやや差異がみられた。すなわち、スタンプ標本と対比してみると体上半部の LN では大型リンパ球も多く、また形質細胞量も多い。それに反して、体下半部リンパ節では小リンパ球が多く、形質細胞の存在は通常体上半部リンパ節に比して少ない。腸管壁のリンパ装置は通常切片では遭遇するチャンスは少ない。副腎は顆粒層がみられ、束状層は淡明であった。肝は一般的に小脂肪滴がみられ、かつ PAS 反応はビマン性に中等度陽性であった。肺には稀に気管周囲リンパ節に富む例がみられた。

ロ) isologous-BM 移植群(BM移植後16週間観察): 皮膚は全経過を通じて脱毛、痂皮形成等を認めなかった。

肝の PAS 反応は移植後6週までは一般的に小葉中心部に陽性で、周辺部に陰性~弱陽性であった。これは8週以降、一般的にビマン性に反応陽性を示すようになった。

腎は全経過を通じて組織学的変性像は見出せなかった。糸球体壁の肥厚も認められなかった。

腸: 16週例の1例にリンパ球よりなる肥大性リンパ節を認めた他、一般的にリンパ節も、また腸壁の浮腫等の変化も見出さなかった。

副腎には著変を認めなかった。

骨髄: 骨髄の atrophy はおおむね2週目までみられ、3週目で骨髄細胞数は正常マウスのそれに回復し、また組織学的にも骨髄系細胞によって骨髄腔は完全に占有され、かつ構成細胞の比率も正常マウス骨髄のそれとほとんど差異を示さなかった。

脾: 脾重量(前述)は1週目で既に回復した。赤血球における造血系の回復は極めてよく、colony 形成は極めて著しいか、または既にビマン性に造血系の拡大を示していた。かつ、顆粒球系細胞と赤芽球系細胞の比率もほとんど正常マウスにおけるそれと大差を示さなかつ

た。しかし、リンパ球の回復は3週目まではみられず、リンパ球(中心動脈周囲組織)はドーナツ型の大型細胞および分葉核好中球によって占有されており、リンパ球は存在しなかった。リンパ球の回復は4週目以降に認められた。

リンパ節： 胚中心の出現は4週目以降であった。回復したリンパ節では、体下半部リンパ節に形質細胞が多数出現し、体上半部リンパ節における形質細胞数の出現度合よりも高頻度になったことを除いては、正常マウスのそれと差異はほとんどみられなかった。また、3週目までは形質細胞と共に小ドーナツ型及び大ドーナツ型細胞集団が軽度ないし中等度に認められた。これらドーナツ型細胞は顆粒球系細胞と考えられている。

胸腺はBM移植後3日目より重量の回復がみられ、徐々に重量を増加し、8週目で正常レベルに回復した。組織学的には、胸腺の回復過程像にも、回復後の組織像にも特記する病的変化は認められなかった。

h) homologous-BM移植群(BM移植後6週間観察)：

皮膚： 皮膚の痂皮形成、脱毛等は死亡例においても必発の病変ではなかった。しかし、経時的に実験を行なった場合、BM移植後21日目～28日目頃に皮下組織の著明な萎縮、表皮の肥厚がみとめられた。しかし、組織学的にアレルギー性炎を考えさせる所見は見出せなかった。この変化は35日目以降の実験例に高頻度化、あるいは病像の進展化する傾向はみられなかった。

肝： BM移植後肝は萎縮傾向を示して行く。PAS反応の経時的推移と関係なく、BM移植後7日目より肝細胞間のdissociation(解離)が始まり、解離の進行に伴って14日目よりクッパー氏細胞増加、グリソン氏鞘内白血球浸潤の増強、肝の核および細胞質の大小不同性等も出現する。このような症例ではGPTの上昇が測定された。しかし、解離は萎縮肝のみならず脂肪変性等も伴ったやや腫大性の肝にも共通して認められる所見であった。このような肝変化は更に癍痕化すると考えられる。また、21日目以降では髄外造血巣が高頻度に認められるようになった。

腎： 糸球体のメサンギウムの肥厚(PAS染色)が21日目例にやや高頻度(4/10例)に認められた他は、全経過を通じて糸球体、細尿管共に著変は見出せなかった。

骨髄： BM移植後の骨髄細胞の増殖は極めて早く、移植後7日目で管状骨、脊椎骨内は顆粒球系芽球及び好中球によってほぼ完全に占有されており(7日目例5例中4例に著明)、14日目(6例中6例)で完全に回復し

た所見がえられた。経時的実験群では42日目の最後の実験群に至るまでaplasiaを示す症例に遭遇しえなかった。本所見と末梢白血球数の変動とは相関性がみられなかった。

脾： 赤色髄における造血巣の回復は極めてよく、また赤芽球系細胞の回復も組織学上必ずしも不良でなかった。リンパ球の回復が21～28日目例にみられたが、それ以降の実験群ではリンパ球にリンパ球を認めず、既存の球細胞構造体は白血球、形質細胞、骨髓芽球によって占有されていた。

リンパ節および腸リンパ球について：

全リンパ節は全経過を通じて萎縮が著明であり、頸部リンパ節では形質細胞が中等度にみられた。腹部リンパ節では移植後35日目より形質細胞の増加がみられた。腸リンパ球は比較的腫大性を示したが、一般にリンパ球が少なく、細網細胞からなる支持組織と形質細胞を含む小円型細胞からなり、その反応は粘膜下組織より筋層に及んでいた症例が稀に認められた。

胸腺はBM移植後極く軽度の回復を示し、組織学的にはリンパ芽球が多く小リンパ球へのdifferentiationが不良であった。5週目以降は痕跡となった。

心臓には心筋の軽度の変性並びに萎縮がみられた。稀に類アショフ結節を認めた。

考 案

以上の所見をTable 1に纏め、van Bekkumの報告と対比した。異系骨髄移植群に高頻度に伝染性肝炎ないし急性黄色ないし赤色肝萎縮、間質性肺炎、皮膚病変、時に類アショフ結節を伴う心筋の変性がみられた。これらの変化は形態学的に認識できる続発症病変と云える。しかし、これらの病変のうち、皮膚病変、心病変はアレルギー性病変であるが、それに対して、肝病変および肺病変はウィルス性疾患に分類されているのでGVH反応、或はHVG反応による直接的变化とは云えない。経時的観察実験においては同系移植群、異系移植群共に骨髄および脾の回復は移入された細胞数に依存するが、おおむね2～3週で完成していた。Sadoによると、800R以上照射群では異系骨髄移植群において免疫機能の回復は移植後3週目において既にかんりのレベルに達すると報告されている。また、染色体解析においても、donar由来であることが証明されている。

しかし、それにもかかわらず末梢白血球数の回復曲線は異系移植群のそれは、同系移植群のそれに比して極めて不良であった。このことは、骨髄細胞の分化機構の

Table 1. Pathology of bone marrow transplantation (secondary disease)

	Graft vs. Host (by van Bekkum)	Homologous-BM (by NIRS)	Isologous-BM
Splenomegaly	+	-	++
Liver:			
Hepatitis (infectious?)	-	++	±
Cell dissociation	-	+++	±
Necrosis	+	+	±
Lungs:			
Interstitial pneumonia		+	±
Congestion, severe		++	+
Heart:			
Atrophy		+	-
Carditis, allergic	-	+	-
Arteriolar changes	+(human)	+(seldom)	-
Intestinal lesions	+	-	-
Skin lesions	+	+	-
Kidney lesions:			
Glomerular	-	-	-
Tubular	-	-	-
Lymphatic tissue (including Spleen):			
Histiocytic and Plasmocytic reaction	+	+	+
Lymphocytic disintegration	+	-	+
Hematopoietic tissue:			
Neutropenia	+	++	-
Lymphopenia	+	+++	-
Thrombopenia	+		
Erythropenia (Ht value)		+++	+
L.E. cells.	-	-	-
Bone Marrow Aplasia in Cases autopsied.		+*	-

* = in Cases, post mortem examination, autopsied until the 6th week after homologous bone marrow transplantation.

障害を示唆した所見と見做することもできよう。

また、異系 BM 移植群では tolerance の成立後未熟な免疫担当細胞が活動するまでに数カ月、本細胞の機能を不活動化する或る種の状態が存在することが考えられる。これらの状態が持続する不安定な免疫状態は感染を抑制できず、伝染性肝炎、間質性肺炎等が誘発されたと考える。続発症によって死亡したマウスでは、骨髄に広汎な necrobiotic な病変が認められた。この変化を広義の骨髄細胞の遅延性排除と考えるか、あるいは septic - または virotoxicemia による変化かは今後の課題であろう。

まとめ

① 7-800 R 照射をうけた C57 BL/6 J 系マウス (H-2^b) を受容体として、これに C57 BL/6 J (isologous syngenic), と DBA/2 (H-2^d) (homologous, allogenic) の骨髄細胞を尾静脈より移植した。

② 異系移植 (DBA/2-骨髄) 群の続発症は、それを誘発する因子より 2 つの型に分類した。

a) 皮膚病変と心病変はアレルギー性病変 (homologous 病)

b) 肝病変と肺病変はウィルス性病変

③ 異系移植群では、リンパ組織の高度の萎縮、および同系移植群と同じ病日に骨髄の組織学的回復が確立されたにもかかわらず、末梢血白血球数の回復不良は分化機構の障害を示唆する変化かも知れない。

参考文献

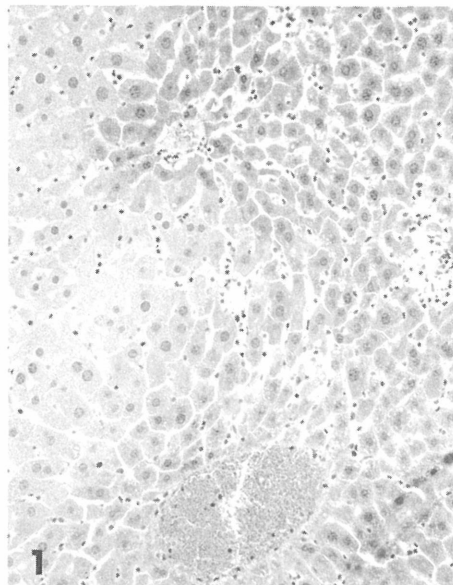
- 1) 佐度敏彦：放射線による免疫機能障害からの回復における胸腺および胸腺細胞の役割。細胞生物学シンポジウム, 23, 195~202 (1972)
- 2) Lorenz, E., et al.: Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiology*, 58, 863-877 (1952)
- 3) Congdon, C. C., et al.: Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by injection of bone marrow: A histopathologic study. *J. Natl. Cancer Inst.* 13, 73-107 (1952)
- 4) Van Bekkum, D.W.: Radiation Chimeras: Pathology of the Radiation Chimaera, pp. 127-165.,

Secondary disease following bone marrow transplantation, pp. 79-126., Logos Press, Academic Press, 1967. (Ed. W. van Bekkum and M. J. De Vries)

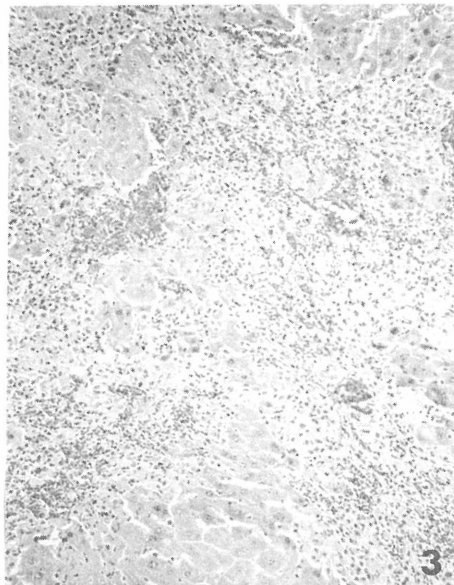
- 5) 宮地徹：伝染性肝炎と血清肝炎, pp 290-293,
臨床組織病理学, 宮地 徹 編, 杏林書院 , 1960.

- b) Yamaguchi, T.: Mechanisms of Secondary Disease in Radiation Chimeras. Effects of Repetitive Transplantations and Microbial Control on Mortality. J. Radiat. Res. 14(1): 100, 1973

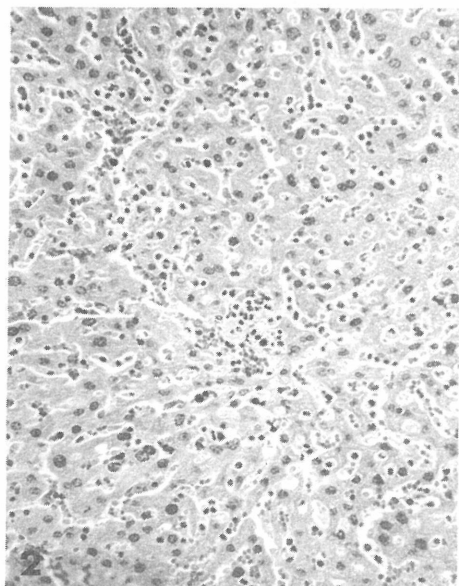
1. DBA/2-BM 移植後21日目。肝細胞索の解離と necrobiotic area の発現, クッパー氏細胞の増生, HE. 400X (経時的実験群)



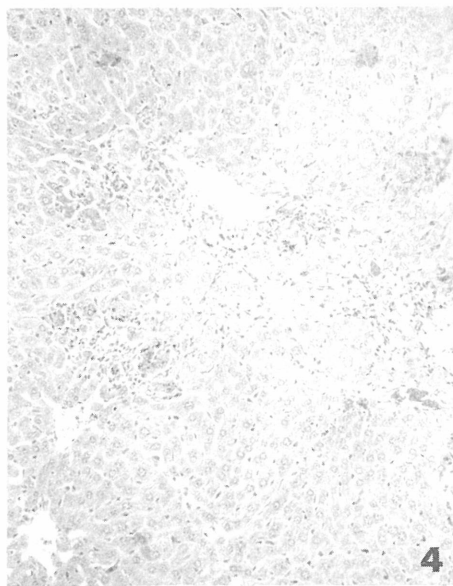
3. CBAT6-BM 移植後56日目死亡例。肝実質の崩壊, 出血, 形質細胞, 組織球, 結合織細胞の増生, HE. 200X。



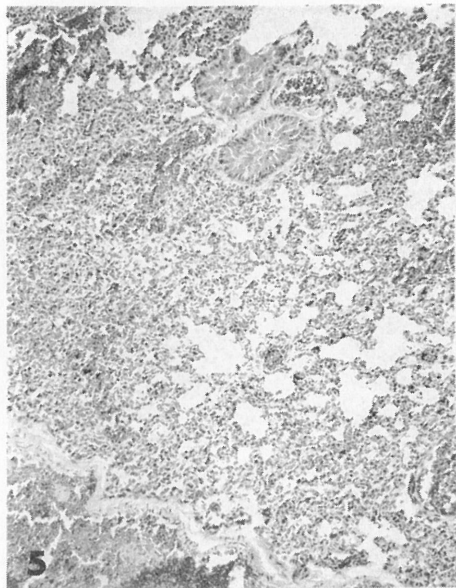
2. DBA/2-BM 移植後33日目死亡例。肝細胞の萎縮, クッパー氏細胞の増生, 円型細胞の増生と細胞集団巣の出現, HE. 400X



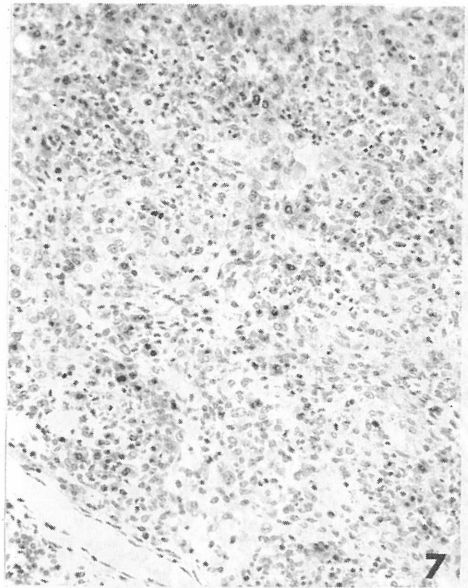
4. DBA/2-BM 移植後34日目死亡例。肝の巣状壊死巣, 巨細胞化した巣状病巣, グリソン氏鞘周囲の炎症細胞増生, HE. 200X。



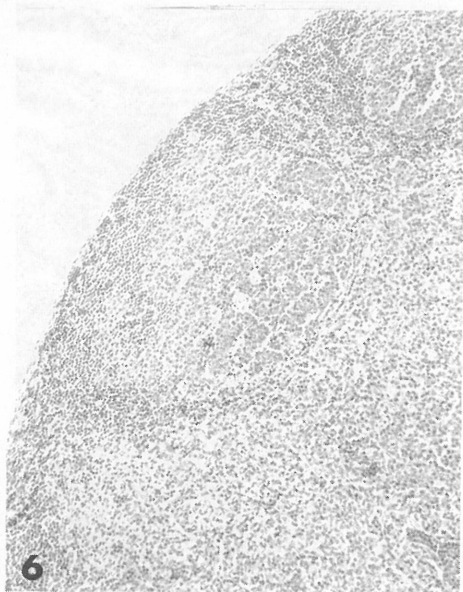
5. DBA/2-BM 移植後40日死亡例。間質性肺炎。
HE・200X。



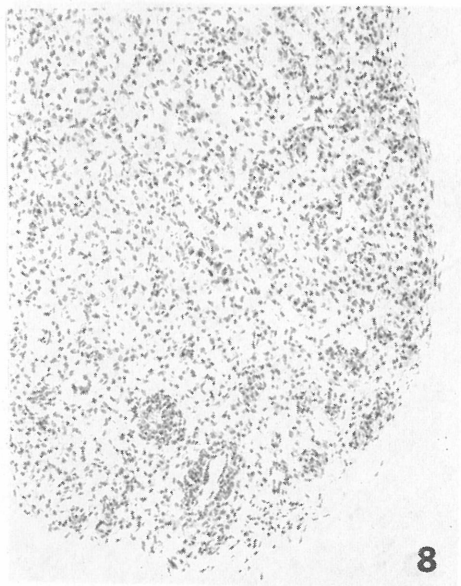
7. DBA/2-BM 移植後28日目(経時的実験例)。リンパ装置の消失、細網細胞の著増、形質細胞の中等度の増生。頸部LN, HE・200X。



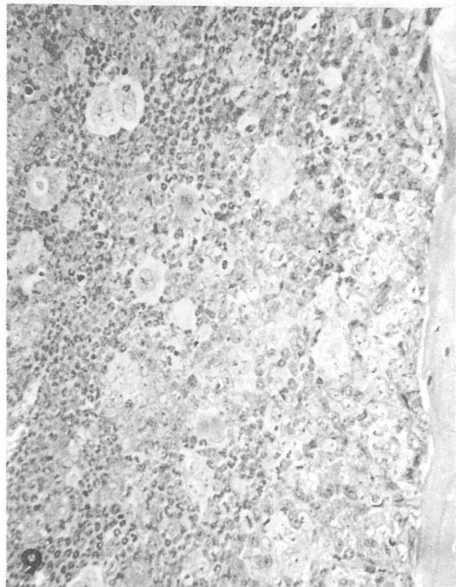
6. C57BL/6J-BM 移植後35日目(経時的実験群)。
胚中心を伴うリンパ細胞の頸部LN。HE・200X。



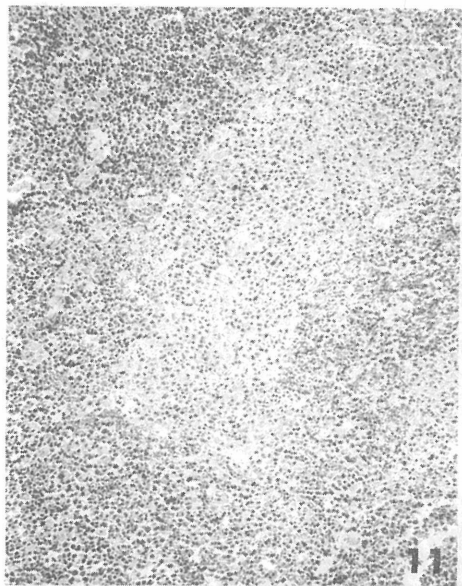
8. DBA/2-BM 移植後28日目(同上)。リンパ装置の消失、血管周囲の白血球増殖巣。形質細胞は出現していない。腹部LN, HE・200X。



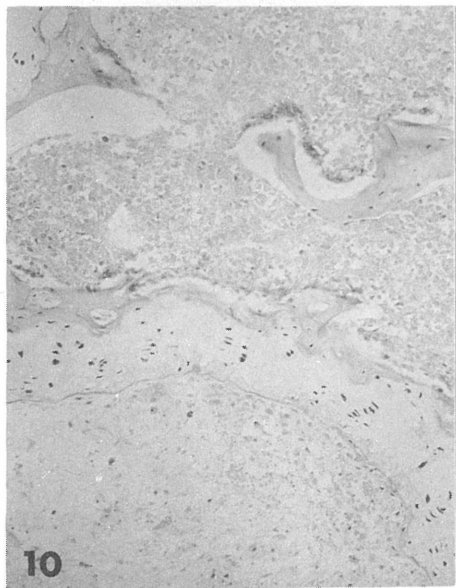
9. DBA/2-BM 移植後35日目(同上)。著明な造血芽細胞の増殖。骨髓, HE. 400X。



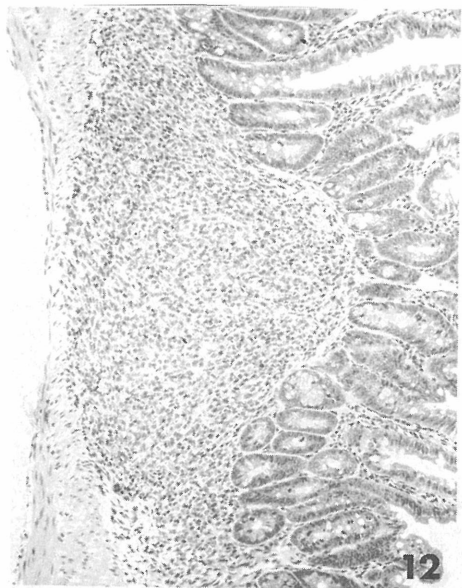
11. DBA/2-BM 移植後33日目死亡例。形質細胞を伴う萎縮性リンパ節。リンパ球の著明な消失。脾。HE. 200X。



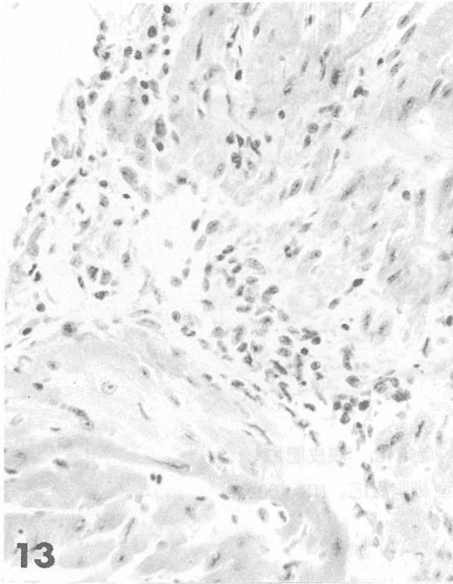
10. DBA/2-BM 移植後33日目死亡例。上半分はnecroticな骨髓。下半分は著明な aplasia を示す骨髓。HE. 200X。



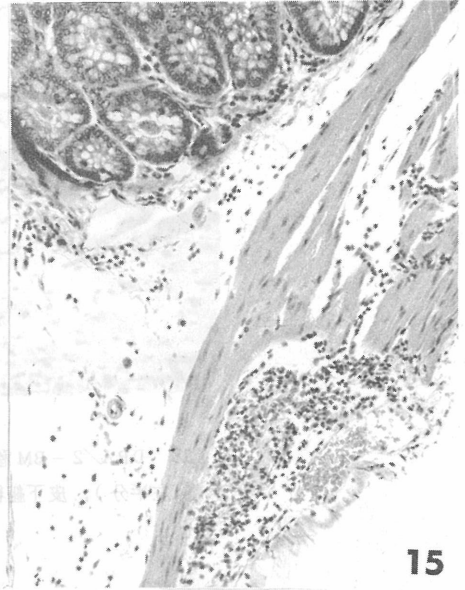
12. DBA/2-BM 移植後21日目(経時的実験例)。腸の細網細胞よりなる肥大リンパ母胞。リンパ球の消失。HE. 200X。



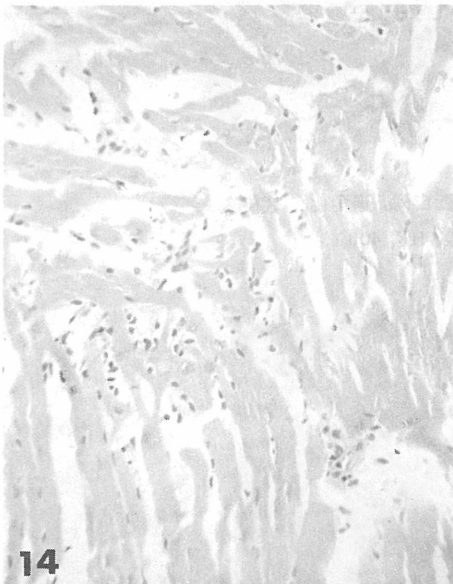
13. DBA/2-BM 移植後14日目(同上)。心の類アシ
ョフ結節。(塩基性円型細胞, アチニコフ型細胞より
なる細胞巢)。HE. 600X。



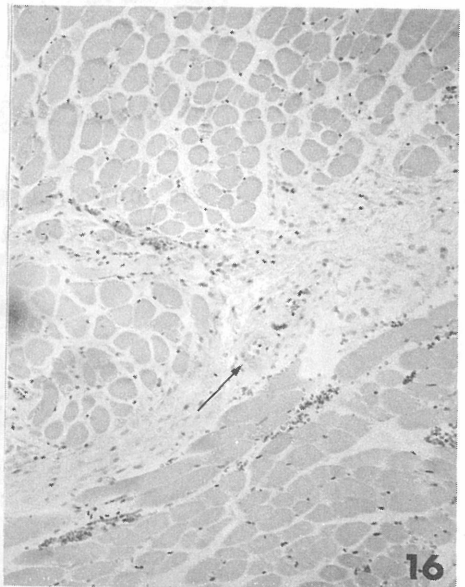
15. DBA/2-BM 移植後42日目(経時的実験例)。粘
膜下組織の浮腫, 円型細胞浸潤, serosa下血管壁の
線維素性変性と円型細胞増生。上行結腸。HE. 300X。



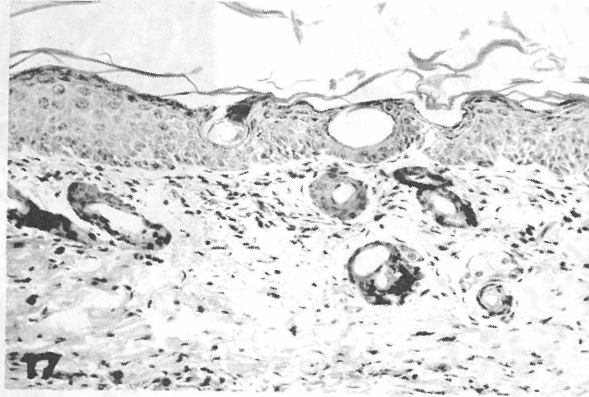
14. DBA/2-BM 移植後30日目死亡例。心筋の極度の
萎縮, 心筋間質における円型細胞の浸潤。HE. 400X。



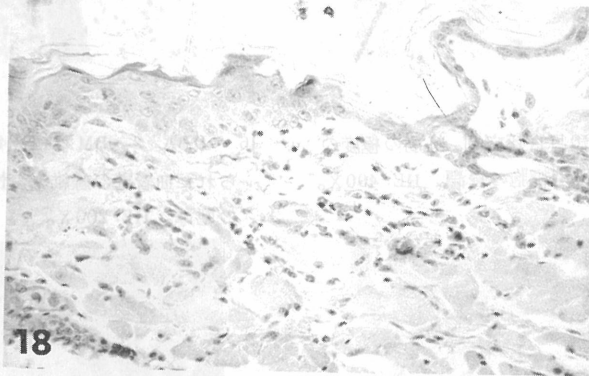
16. DBA/2-BM 移植後49日目死亡例。大腿筋内にみ
られた血管壁の線維素性変性(ノ)円型細胞浸潤, 結合織
の肥厚。HE. 200X。



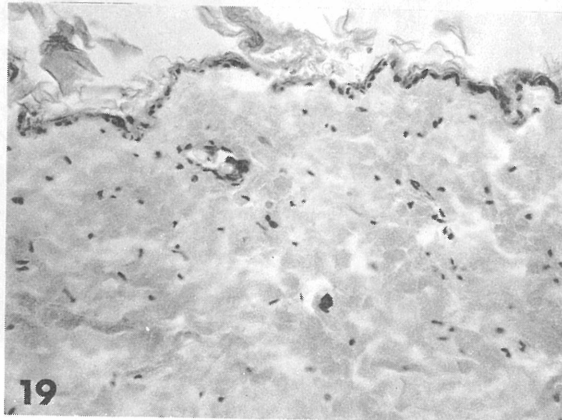
17. DBA/2-BM 移植後28日目(経時的実験例)。皮膚の表皮の肥厚, 過角化, 真皮における円型細胞浸潤。
HE. 400X



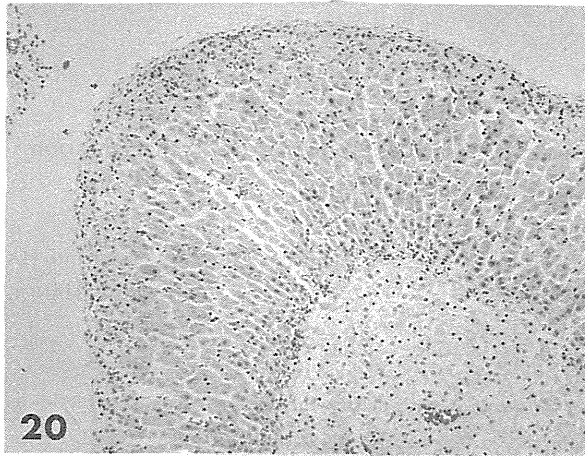
18. DBA/2-BM 移植後14日目。過角化, 表皮肥厚(左半分), 皮下組織の萎縮と円型細胞反応。HE. 400X



19. DBA/2-BM 移植後49日目死亡例。過角化, 表皮の萎縮, 皮下組織の硝子様肥厚。HE. 400X。



20. DBA/2-BM 移植後40日目死亡例。束状層の高度の萎縮と網状層の著明な肥厚を示す皮質内のヒマン性出血と髄質の萎縮。HE. 200 X。



21. DBA/2-BM 移植後42日目（経時的実験例）。腸にみられた潰瘍瘢痕。HE. 300 X。



Ⅲ. 移植造血細胞の動態に関する研究

1. 放射線感受性の異なる2系統マウスでの 骨髄移植と造血系の回復について

土屋武彦, 早川純一郎, 出井敏雄
玉野井逸朗, 寺本昭二

Recovery of Haematopoietic Cells after Bone Marrow Transplantation in Two Strains of Mice with Different LD50(30)

Takehiko TSUCHIYA, Jun-ichiro HAYAKAWA, Toshio DEI,
Itsuro TAMANOI, and Shoji TERAMOTO

In the present study we attempted to clarify the cause of haematopoietic death from the aspect of transplanted bone marrow cell kinetics in the two strains of mice, C57BL/6JNrs and CF#1/Nrs, whose LD50(30) are 685 R and 510 R, respectively.

In the first experiment, the survival rates were observed under various conditions which were varied on the radiation dose and the syngeneic bone marrow cell numbers. When a same lethal dose was given to these two strains of mice, CF#1 mice required about ten times as many cells as C57BL to be shown a same survival rate in the both strains of mice. The estimated LD50(30) after bone marrow transplantation increased with increase of the number of transplanted cells in both strains, and when same numbers of cell were transplanted in each strain, the difference in LD50(30) between two strains persisted as in LD50(30) without transplantation.

Based on the results, radiation dose and number of bone marrow cell which allow the ninety percent survival in each strains of mice were selected and under these conditions the recovery of bone marrow cells and peripheral blood cells were depicted with these two strains of mice. The results showed that the cells in C57BL mice recovered more slowly than those of CF#1 mice. This may imply that the numbers of functional blood cells which need to survive the animal in critical period during acute radiation sickness are different in these strains of mice.

In the next experiment, bone marrow and splenic CFU and AASU (Alloantigen Sensitive Units) in spleen cells of host animal after bone marrow transplantation were evaluated to make the direct comparison of recovery of undifferentiated progenitor cells between these two strains. The CFU in CF#1 mice recovered faster than that in C57BL, whereas the AASU recovered more slow than in C57BL. This indicates the possibility that the rate of commitment to lymphoid cell from undifferentiated precursor cells depends on the strains of mice.

Finally, survival rate after reciprocal allogeneic bone marrow transplantation between these two strains of mice was evaluated. The CF#1 host mice showed strongly allograft resistance to C57BL donor cells but not vice versa. However, when the C57BL donor cells override the resistance of CF#1 host, some mice survived more than 60 days after the treatment, and permanent chimeras were established, while C57BL host mice transplanted CF#1 cells could not survived beyond 60 days. These results of allogeneic transplantation imply that the difficulty of the practical application of bone marrow transplantation between individuals with genetic incompatibility.

From the results of the present study, it may be concluded that the difference in radiosensitivity measured by LD50(30) between these two strains of mice largely depends on the regulatory system in haematopoietic cell kinetics but not or less the capability of proliferation or sensitivity of haematopoietic cells.

結 言

致死線量の放射線の全身照射を受けた個体が同系の骨髄移植によって死からまぬがれることは、Lorenz¹⁾らによって示されて以来非常に多くの報告があり、著書^{2,3)}としてもまとめられている。また、移植された細胞が host の体内で定着し増殖、分化することも今さら言うまでもない事実として認められている。しかし、移植された骨髄細胞の細胞動態と生死の関係については、いまだつまびらかではない。われわれは LD_{50/30日} からみた放射線感受性の異なる 2 系統のマウス (C57BL/6J Nrs, CF#1/Nrs) について、造血系を主体として種々の生理的検索を行ない、両者の差異を見出している^{4,5)}。そこで、そのような基礎の上にならば、この 2 系統マウスを用いて骨髄移植を行ない、両者の差異より骨髄移植における細胞動態と放射線による急性死との関係を解明することを目的として、種々の角度より検討した。すなわち、骨髄移植細胞数と生存率あるいは造血系細胞動態との関係、相互異系移植における死亡パターンやそれらと放射線量との関係などについて検索した。したがって、実験は同系移植と相互異系移植に大別される。

1 同系移植

同系移植においては、照射線量と移植細胞数との関係を生存率を指標として検索し、ついで末梢血液細胞、骨髄有核細胞の回復パターン、CFU (colony forming units) AASU (alloantigen sensitive units) の回復などについて検討した。

a) 生存率からみた照射線量と移植骨髄細胞数との関係

まず両系統マウスを用いて、照射線量をかえ、移植骨髄細胞数をかえた場合に、生存率がどのように変わり、系統間での差異がどのように現われるかを知ることが基本と考えて、この点から検索した。

方法

動物：放医研自繁の C57BL/6J Nrs, と CF#1/Nrs の 80~100 日齢のものを用いた。この両系統は Fig. 1 に示すように生存率をプロビットでプロットすると、生存率と線量との関係は直線関係となり、LD₅₀ は C57

BL が 680 R, CF#1 が 510 R である。

照射：それぞれの系統に致死線量である 900 R を、またそれぞれの LD_{90/30日} 線量である 765 R (C57BL), 605 R (CF#1) を、また LD_{70/30日} 線量である 715 R (C57BL), 552 R (CF#1) の X線 (250KV) 全身照射を行なった。

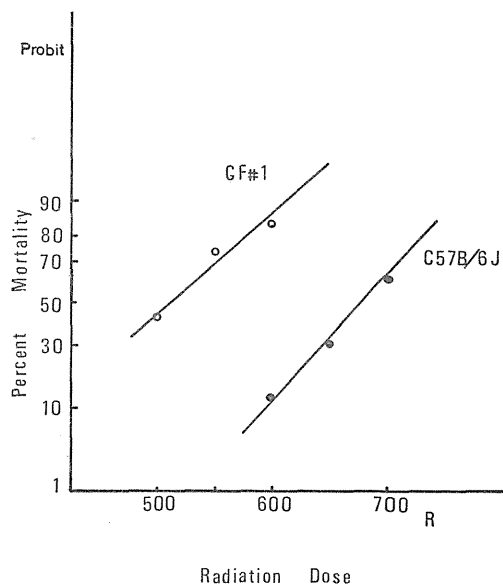


Fig. 1 Percent mortality as a function of radiation dose

骨髄移植：骨髄細胞の suspension は TC-199 液にペニシリン、ストレプトマイシンを加えたものを溶液 (TC液) として作成した。tibia, femur をとり出し、アルコールガーゼで筋肉をよく除去したあと、両骨端を切断し、TC液を用いて注射器で骨髄を洗い出すとともに細胞を分離させ、ガーゼあるいはステンレスメッシュでこして、骨髄細胞 suspension とした。移植は host に全身照射 1~3 時間後に行なった。細胞数はそれぞれの場合によって異なるが、900R の場合は $8 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ を、LD₉₀, LD₇₀ 線量の場合は $\frac{8}{3} \times 10^4$, 8×10^4 , 24×10^4 を TC液により調整し、細胞数の如何にかかわらず液量は 0.4ml とした。この suspension を尾

静脈より注射移植した。

動物の観察：毎日午前中に死亡の有無を観察した。また、9日以前に死亡するものは緑膿菌検出率が高いことが別の実験より知られたので、本実験では10日～30日での死亡のみで死亡率を求め、10日以前のはデータから除外した。

結果ならびに考察

900R全身照射し、移植したものの線量と生存率の関係は Fig. 2 に示すように、50%生存に必要なそれぞれの骨髓細胞数は C57BL/6 が約 2×10^5 に対し、CF#1 は約 2×10^6 と10倍の差が認められた。一方、LD₉₀, LD₇₀ 線量域においては、縦軸にプロビットで生存率を横軸に細胞数をとると、両系統ともほぼ同じ直線上にのることが示された。これらの生存率、移植細胞数、線量の関係をそれぞれの系統で整理して、骨髓細胞を移植したときの LD₅₀ 線量を求めた。そこで縦軸に LD₅₀ 線量を取り、横軸に移植細胞数を対数でプロットとすると、Fig. 3 に示すように両系統ともそれぞれ直線関係が得られ、両者はほぼ平行である。この関係図から、同一移植細胞数に対する両系統間での LD₅₀ 線量の差は1.65 R となった。また同一 LD₅₀ 線量の場合における移植細胞は約10倍も CF#1の方が多い細胞数を必要とすることが認められた。

Porteous⁶⁾ らや Smith⁷⁾ らは個体の感受性に幹細胞数の寄与が大きいことを指摘しており、当然両系統の差異の場合もこのことが考えられる。しかしながら、別の実験から tibia での有核細胞数の差は C57BL の方が約1.3程多いにすぎない。また有核細胞中の CFU は大差なく、骨髓有核細胞の D₀ は C57BL が 77R, CF#1 が 74R と、これらもまた大きな差異は認められない。したがって、tibia での有核細胞数の約1.3倍の差異だけから両系統にみられた本実験結果の差異を説明することは困難である。すなわち、照射後に生残している細胞の絶対数に生死が依存すると考えるだけでは説明されず、むしろ次に述べるように、生存に必要な機能細胞が生死を決定する臨界期にどれだけあるかが問題であり、系統間での差異はその機能細胞数の生死に関与するレベルに差異があることが考えられる。

b) 末梢血液細胞、骨髓有核細胞数の回復

前記の生存率からみた移植細胞数と線量の関係に、2系統間で著明な差異が認められた。そこで、このような差異を生ずる要因を考慮するにあたって、次のような仮定をたてた。すなわち、照射によっていわゆる造血死をおこすための生死を決定しづけるものに Bond⁸⁾ のような機能細胞があり、そのある絶対数が生死の臨界期に

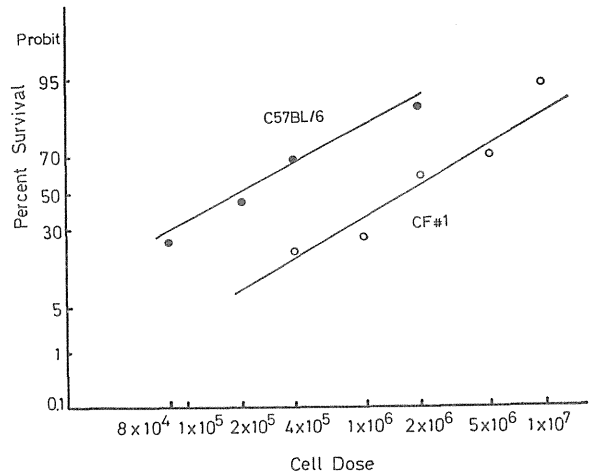


Fig. 2 Percent survival as a function of syngeneic bone marrow cell dose

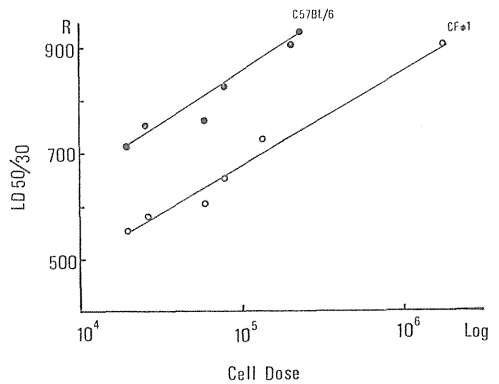


Fig. 3 LD₅₀(30) as a function of syngeneic bone marrow cell dose

保たれている必要があるとする。照射により、これら機能細胞は一度減少するが以後は移植された幹細胞ないしは自己のもつ生残幹細胞から分化、増殖して、これらが次第に増加し、その臨界時期(マウスでは10～15日位であろう)までにその数が一定のレベルに達していることが生存にとって不可欠であるとする。このような生体の防禦反応に関与し、生死を決定しづける機能細胞が何であるかは明確に述べられるものではないが、一応末梢血液細胞、骨髓有核細胞(時間的づれがあるから間接的ではあるが)に反映されるものと仮定する。このような仮定の上にならば考えると、前実験での両系統の差異は、生死をわける臨界期での機能細胞数のレベルが系統により異なることが考えられる。一方、もしそのレベルに差異がないとすれば幹細胞から分化、成熟する速度、ある

いは幹細胞が幹細胞をつくり、一方では分化してゆく過程での分化への比率の相違などが考えられる。そこでまず、末梢血液細胞数、骨髄有核細胞数の回復パターンを比較検討した。

が、全体として大きい差は認められなかった。また900 Rで細胞数が異なる場合 Fig. 7 に示すように白血球数をはじめとして、いずれの指標においても低い値を示した。

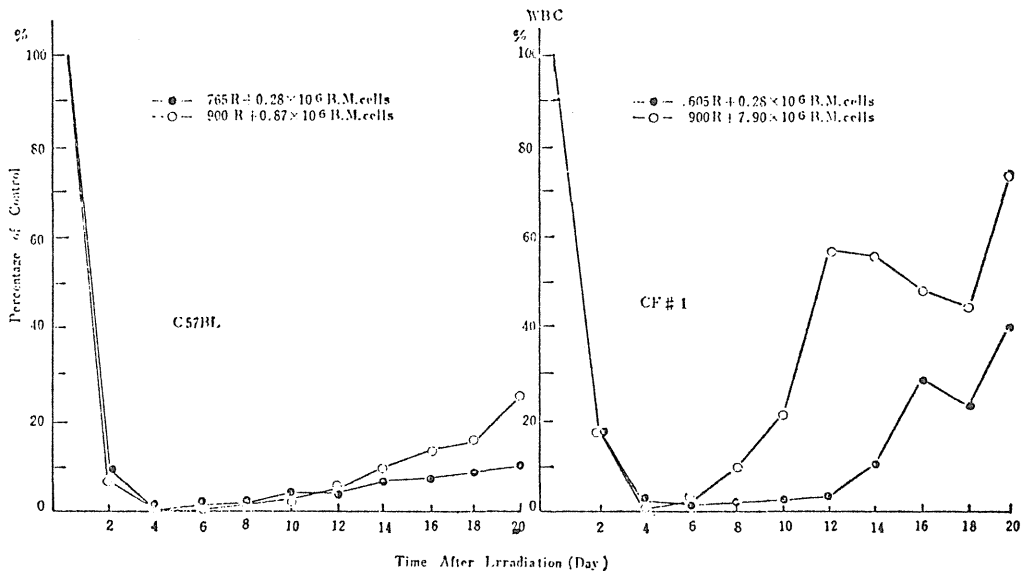


Fig. 4 Comparison of changes in peripheral white blood cell number after treatments which allowed ninety percent survival in each strain

方法

動物：前述と同じ。照射：両系統ともに900 Rならびに、LD₉₀線量(C57BL-765 R, CF#1-605 R)のX線全身照射。骨髄移植：骨髄細胞移植法は前述と同じである。細胞数は900 Rの場合、C57BLは 0.87×10^6 、CF#1は 7.9×10^6 であり、LD₉₀線量の場合はいずれも 0.28×10^6 である。この線量と細胞数の組合せは、先の実験から90%は生存する条件である。観察：移植後隔日に20日まで一群づつ屠殺し、末梢赤血球、白血球、血小板、tibia中の有核細胞数、Htなどを一般の検査法で測定した。

結果ならびに考察

同一系統内で、異なる線量、細胞数での回復を比較すると、C57BL、CF#1両系統とも Fig. 4 の対照に対する白血球数の比率でも明らかなように、いずれの指標についても移植細胞数の多い方が回復が早いことが示された。次に系統間で比較してみると、LD₉₀線量で移植細胞数が同じ場合には Fig. 5 に示すように白血球数の回復でC57BLがよい傾向を示しているが大差なく、Fig. 6 に示すように有核骨髄細胞数をはじめとして、その他の指標すべてにおいて、CF#1の方が高い値を示した

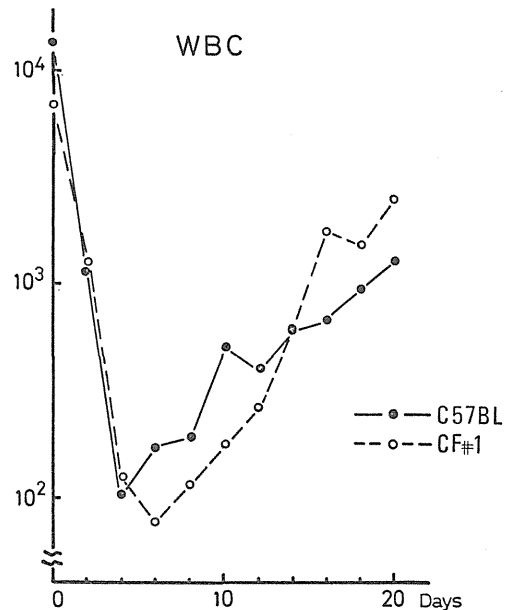


Fig. 5 Changes of peripheral white blood cell number after syngeneic bone marrow transplantation

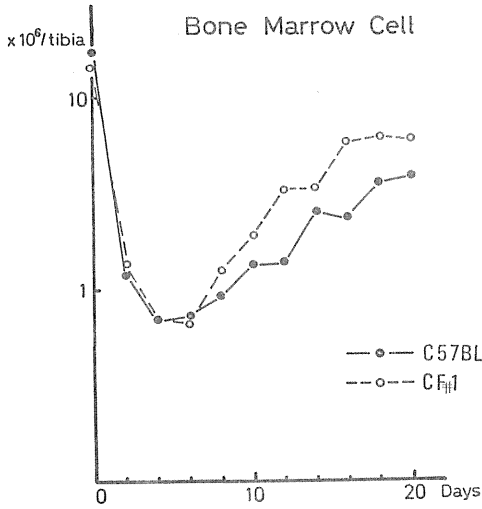


Fig. 6 Changes of nucleated cell number in tibia after syngeneic bone marrow transplantation

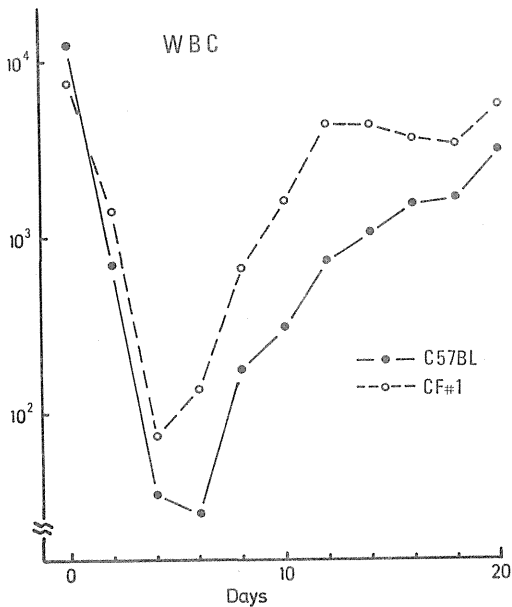


Fig. 7 Changes of peripheral white blood cell number after syngeneic bone marrow transplantation

同一系統内で比較した場合、いずれの系統でも移植細胞数が多い方が、いろいろな指標で早い回復を示したことは、de Vries ら⁹⁾や Doherty ら¹⁰⁾が云うように移植された細胞の方が host の生残細胞の repopulation による回復あるいは生存のための効率がよいことを示唆

するものであろう。また全体として C57BL の方が各細胞系で低い値を示したことは、臨界期の生存に必要な機能細胞数のレベルが低くても、C57BL は生存可能であることを示唆するものかもしれない。

c) CFU と AASU の回復

前述の結果から、C57BL の方が CF#1 に比して機能細胞数のレベルが低いところで生存可能であることが示唆された。しかし、線量を同一にした場合と同じ生存率を得るのに要する移植骨髄細胞数が 10 倍も異なることを説明しきる程の差異としては認められなかった。したがって、一つの問題点として移植後の CFU の回復が一つの問題点として考えられる。また機能細胞として、生体防禦にとくに重要な関連があると考えられる免疫系細胞と関与すると思われる AASU の回復についても重要と考え、CFU と AASU の回復についての検討を行なった。

方法

動物：免疫機能細胞に関与する点を考えて、C57BL/6、CF#1 の放医研で SPF 化したものの 80~90 日令の雄を用いた。目的とする CFU あるいは AASU を assay するための cell suspension は次のようにして作成した。まず両系統マウスにそれぞれ 950 R の γ 線の全身照射を行ない、ついで 1-(a) で述べた方法で、それぞれの骨髄細胞の suspension をつくり、950 R 照射 24 時間後のマウスにそれぞれ 1×10^6 個の細胞を syngeneic に移植した。移植後 7 日、10 日、14 日後にそれぞれの動物の骨髄細胞あるいは脾細胞をとり、TC 液で cell suspension を作成し、これを assay に用いた。細胞濃度は、それぞれの目的に応じて TC 液で調整した。CFU-assay：前述の cell suspension を骨髄細胞の場合は 8×10^4 を、脾細胞の場合は 5×10^5 をそれぞれ C57BL、CF#1 の syngeneic host (前日に γ 線 950 R 全身照射) に移植した。移植 8 日後に屠殺し、脾をブアン固定し、コロニー数を算定した。AASU-assay：Allo-antigen response を生じさせる系として、C57BL の細胞を入れる host としては C3H を、CF#1 の細胞を入れる host としては C57BL を用いた。これらの host マウスに前日にいずれも 950 R の全身照射を行なった。目的とする前記脾細胞 5×10^6 個をそれぞれの host に移植した。Bennet¹¹⁾ の方法の別法として、筆者らは次の方法を用いた。細胞移植 5 日後に $^{125}\text{I} \text{UDR} (0.5 \mu\text{Ci})$ を静注し、注射 18 時間後にそれら host を屠殺し、腸間膜リンパ節への $^{125}\text{I} \text{UDR}$ のとりこみを測定した。

結果ならびに考察

CFUの回復は骨髓細胞、脾細胞のいずれをみても Fig. 8 に示すように CF#1 の方が早い傾向を示した。一方、AASUを反映すると思われる腸間膜リンパ節への¹²⁵IUdRのとりこみは、注射量に対するとりこみ比からみても、その各々の対照に対する比からみても C57BL の方が大きい値を示した。

このことは幹細胞から成熟系へと分化するものと幹細胞にもどるものと比が、CF#1とC57BLで異なり、成熟系への分化の比がC57BLの方が大きいことを物語るものであろう。

2. 相互異系移植

人での骨髓移植を考えると、同系移植は一卵性双生児間での移植以外は考えられない。したがって、異系移植は続発症など解析を複雑にする問題があり、両系統間での差異を論ずるには困難がともなう。しかし、人間への応用の何らかの寄与を考えると異系移植をさけて通るわけにはいかない。そこで、これらの困難さを念頭において、上述のような性質をもった両系統マウスでの相互異系移植を行ない細胞数と死亡パターン、脾でのコロニー形成などについて検討を行なった。

a) 移植骨髓細胞数と生存率

同系移植において、同一線量で同一生存率をうるのに要する細胞数が10倍も異なる両系統での、異系移植の場合に細胞数と生存率の関係がどのようにあるかを検討した。

方法

hostのC57BLとCF#1にそれぞれ900RのX線全身照射を行ない、前述のような方法でそれぞれの骨髓細胞の suspension を作成した。照射24時間後に相互異系移植を行なった。細胞数はいずれも 4×10^6 、 10×10^6 、 25×10^6 を用いた。

結果ならびに考察

C57BLをhostにした場合30日間の生存率は 4×10^6 が35%、 10×10^6 が39%、 25×10^6 が43%と細胞数による相違がみられなかった。しかし、これを10日~20日、20~30日と生存期間を区分してみると、10日~20日では細胞数にある程度依存するが20日~30日では細胞数依存性がみられず、60日間での生存が 4×10^6 で10%みられただけである。一方、CF#1をhostにした場合には30日間生存からみると、 4×10^6 が27%、 10×10^6 が72%、 25×10^6 が84%と生存率に細胞数依存性がみられ、この傾向は10~20日でも同様である。また60日間観察した群で 4×10^6 で1/25、 10×10^6 で5/25、 25×10^6

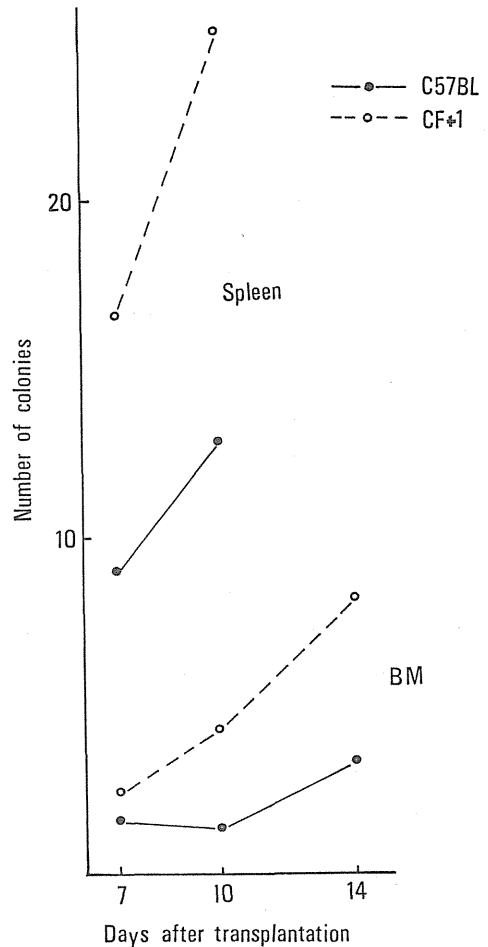


Fig. 8 Changes in splenic and bone marrow CFU after syngeneic bone marrow transplantation

で17/25と60日間生存もみられ、キメラの成立がみられた。C57BLをhostにした場合とCF#1をhostにした場合で生存パターンの差異が認められたが、このような現象はBennetらの云うような allograft resistanceあるいはGvH反応などとの関連が考えられる。

b) 相互異系移植におけるコロニー形成

前の結果からすると allograft resistance などの関与が十分考えられ、異系移植でのコロニー形成の相違が予想される。そこで、異系移植でのコロニー形成を検討した。

方法

hostにはいずれも900Rを照射し、24時間後にそれ

それ 8×10^4 の骨髓細胞を移植し、8日後に脾のコロニー数を算定した。

結果ならびに考察

host を C57BL として donor を CF#1 とした場合、コロニー数は 8.6 ± 0.48 であり、対照として C57BL を donor とした場合 8.1 ± 0.45 とコロニー形成があり、対照と変らなかつた。これに対して、host を CF#1 とし、donor を C57BL とするとコロニー数は 0.1 ± 0.12 とほとんどコロニー形成が認められなかつた。そこで、 16×10^4 に donor の細胞を増加したがコロニー形成は認められなかつた。これらの対照として CF#1 を donor としたものでは 11.0 ± 1.0 とコロニー形成があり、技術的問題でないことが認められた。

このように CF#1 を host にし、C57BL を donor にした場合にコロニー形成がみられなかつたことは、allograft resistance が働いて、コロニー形成ができないと考えられる。

しかし、細胞数を非常に多くすれば、この allograft resistance に打ち勝つか、あるいはそれからのがれた細胞が定着し、増殖が可能となることが別の実験より認められている。したがって、前の実験で CF#1 を host として、C57BL を donor としたときに生存が認められているのは、定着増殖した細胞によるためであり、細胞数の上昇とともに生存率が上昇するものと思われる。また一方、GvH 反応に必要な細胞の定着増殖にも resistance が働くために GvH 反応が起りにくくなると思われる。これに対して、C57BL を host にした場合には、allograft resistance は働かないかあるいは非常に小さいものであると思われる。そのためにコロニー形成もあり、10~20日では生存率は細胞数に依存して生存率が上がるが、それ以上経過すると、GvH 反応が生じて続発症により死亡するものと思われる。そのために30日あるいは60日での生存率でみると、細胞数との関連がみられず、60日ではむしろ細胞数が少ない方が生存が多くみられているのもこのためと考えられる。

総括ならびに考察

C57BL と CF#1 を用いて、同系あるいは異系骨髓移植を行った結果、両系統に明らかな差異が認められた。異系骨髓移植の場合は前述のように移植免疫としての種々の問題が関与して、その差異の根本的解析は困難であるが CF#1 を host して、C57BL を donor としたときには明らかに allograft resistance が働くものと思われる。しかも、この組合せでかえってキメラ

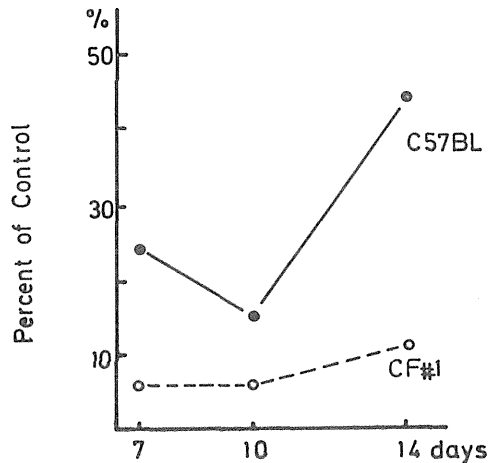


Fig. 9 Recovery of AASU in spleen cell after syngeneic bone marrow transplantation

が成立しやすいことの原因は明らかではないが、先にも述べたように GvH 反応をおこす細胞にも allograft resistance が働くためにキメラが成立しやすくなることが考えられる。

同系移植においては、現象としての大きな差異として同一線量、同一の生存率を得るのに骨髓細胞数が CF#1 では C57BL の10倍の多くを必要とすることである。この理由としてはいくつか考えられるが、その一つとして、1-bの実験で示すように、900R照射、あるいは LD₉₀線量照射で90%生存可能の場合の種々の末梢血液細胞数でのレベルが C57BL で CF#1 に比して、低い値を示したことから、C57BL では先に仮定したような機能細胞レベルが低いところでも生存可能であることが考えられる。また他の要因としては、1-cの実験から幹細胞から分化成熟して行く過程において、CFU への回転と、分化成熟への比率が CF#1 と C57BL とでは異なり、CFU への回転の比率が CF#1 では大きく、成熟系への分化の比が小さいことが予想される。このことは、成熟細胞と考えられる AASU の回復が C57BL でよいこと、また別の ⁵⁹Fe のとりこみなどの実験で照射、移植の条件が同じであると C57BL の方が高い値を示すことなどからも十分示唆されていると考える。もちろん、先にも述べたように真の死因が判然としないところに大きな問題があり、造血系細胞動態以外の要因も考慮に入れる必要はあるであろう。

はじめにたてた仮定からして、本実験におけるこれらの結果を総括すると、次のように推論できよう。

すなわち、C57BLはCF#1に比して機能細胞数が低いレベルであっても生命の維持が可能であり、幹細胞から成熟形への分化の比率が大きいことが両系統における骨髄移植後の生存率での大きな差異の原因とすることができよう。

これらの結果は、幹細胞から機能細胞群（固定はできないが）への分化を促進させる方向へと修飾する因子の重要性を示しており、もしこれと骨髄細胞移植を組合せることによって生存率を増大させることの可能性を示唆するものであろう。

参 考 文 献

- 1) Lorenz, E. et al., *J. Natl Cancer Inst.*, 12, 197 (1951)
- 2) van Bekkum, D.W., *Radiation Chimeras*, Logos Press, Academic Press (1967)
- 3) Micklem, H.S and Loutit J.F., *Tissue Grafting and Radiation*, Academic Press 1966.
- 4) Tsuchiya T. et al., The Difference in erythropoietic recovery after irradiation in two strains of mice, in "Comparative Cellular and Species". (Ed. Bond V.P. and Sugahara T.) *Igakushoin*, 53, 1969
- 5) 早川純一郎他, X線照射における脾遮蔽効果のマウスの系統による差異, *日本医学放射線学会誌*, 27, 1425 (1968)
- 6) Porteous, D.D and Lajtha, L.G., *Brit. J. Haemat.*, 12, 177 (1966)
- 7) Smith, L.H. and Willard, H.G., *Am. J. Physiol.*, 216, 493 (1969)
- 8) Bond V.P., *Mammalian Radiation Lethality*, Academic Press, 61, 1965
- 9) de Vries, F.A.J. and Vos, O., *Int. J. Rad. Biol.* 11, 235 (1966)
- 10) Doherty, D.G. and Smith, L.H., *Rad. Research*, 40, 85 (1969)
- 11) Bennet, M., *Transplantation*, 11, 158 (1971)

Ⅲ - 2. 造血の“場”の機能について

セルローズ・アセテート膜設置法による研究

関 正 利
吉 田 和 子
井 上 江以子

Study of Hematopoietic Inductive Microenvironments
by Means of Cellulose Acetate Membrane-insertion Method.

Masatoshi SEKI, Kazuko YOSHIDA and Eiko INOUE

Reticulo-endothelial cells of hematopoietic tissues play an essential role on the development of hematopoietic cells. On light of this, a new method of *in vivo* hematopoietic colony formation has been developed in this laboratory.

When a piece of cellulose acetate membrane (CA membrane) is surgically inserted into the peritoneal cavity of a C3H/He mouse, a macrophage layer is formed on the membrane. After whole body irradiation, membrane-bearing mice were injected intraperitoneally with aliquots of isologous or homologous bone marrow cells. Myeloid colonies derived from donor bone marrow cells are formed in the macrophage layer within several days of inoculation. The majority of the colonies were granuloid in nature; however, erythroid colonies were observed distinctly in some cases. Colony forming units on the CA membrane 2 days after bone marrow inoculation were shown.

By the modification of this method, the effect of irradiation of host animals on the development of myeloid colonies was investigated. In unirradiated hosts, the decrease in the number of colonies was remarkable with the time after the transplantation. In irradiated hosts, the number of colonies was virtually unchanged. An increase of erythroid colonies was clearly demonstrated in irradiated hosts, which may reflect a rise of erythropoietin level after irradiation. When the host was irradiated with LD₅₀ or less doses, the number of colonies was roughly proportional to the given dose, reaching to a plateau at the higher radiation dose. The results obtained suggested the increase of hematopoiesis-regulating factors in the irradiated hosts.

Addition of the thymus cells into bone marrow inoculum resulted in the augmentation of myeloid colonies. Growth of thymus-derived cells on CA membrane may relate to this augmentative effect.

1 緒 言

造血幹細胞とその分化・増殖の機構が次第に明らかにされるにつれ、必然的に提起されたのは造血の“場”（微小環境, haematopoietic inductive microenvironments: HIM)の概念である(8,11,13,14,16)。“場”とは要するに造血細胞が定着し、分化増殖を営むところの、造血組織基質を構成する細網内皮系細胞である。これはリンパ系を含む全身の造血組織中に、特殊化された小領域として存在し、血球産生の必要度に

応じて時に閉鎖され、また時には再賦活されるといった弾力性に富む機能単位である。その働きの第1は、それぞれの造血部位に適合した前駆細胞をその場に定着・局在せしめることであり、第2は多方向分化能を有する前駆細胞を、特定の系として分化する様誘導することである。第3にエリトロポエチン、CSF (colony stimulating Factor⁷⁾)等或る特定の系にcommitされた細胞の増殖を刺戟する様な体液性統御因子の働きは、“場”の機能を介して発揮されるものと考える可き

根拠がある。第4に“場”は幼若血球の発育に至適な環境条件をととのえ、時として成熟細胞の生死を支配し、更にこれらの血中放出に対し積極的な役割を演ずる。このような全身に散在する無数の造血の“場”は、フィードバック機構を含む全身的な統御機構の支配下において、生体の必要に応じた血球産生に与るのである。

骨髓移植の成り立ちを支配する、あるいはこれを妨げる種々の因子、特に graft failure, GVH 反応等の免疫学的現象の支配因子を解析して見ると、実に“場”の機能こそこれらの諸現象の本質をなすものであることが、容易に推測されるのである。したがって、“場”の研究は単にアカデミックな面で興味深いものであるのみならず、治療としての骨髓移植法が当面する種々の問題を解決する上での最大のポイントであると云っても過言ではない。

上記の観点から、吾々は過去数年間に亘り造血の“場”の機能について研究を進めて来た。そして、広義の細網内皮系に属する腹腔マクロファージュを用いて人工的な“場”を作り、この上に造血コロニーを発達せしめる試みに成功した。これは定性的には“場”の機能の存在に対する直接的な証明をなすものであるが、他方造血組織中の CFU (コロニー形成単位) の定量的検索法として用いることも出来る。

以下の章では、この手法とそれに基づく実験結果について述べることにする。

2 セルローズ・アセテート膜腹腔内設置法 (CA膜法) 原法による CFU の解析^{14) 15)}

(実験材料及び方法)

10~11週令の C3H マウスを主とし、必要に応じ CBA T₀ T₀ マウスを用いた。

マウスはネムブータル麻酔下に開腹し、1.5×2cmの大きさに切ったセルローズ・アセテート膜 (CA膜・常光産業製、電気泳動用) を腹腔内に挿入した後縫合する。CA膜はあらかじめ 10,000 U/ml のペニシリンを含むハンクス液に浸して置く事が必要で、乾燥したままでは癒着が高度となる。手術後数日を経たのち、このマウスを 750~900 R 全身照射し、その腹腔内に骨髓細胞浮遊液 1 ml を注入する。その後 6~7 日目に動物を屠殺し、CA膜を取り出してバッファー・フォルマリンで 30 分間固定、流水及び溜水で十分水洗したあと、ペルオキシダーゼ反応を施す (Fig. 1)。膜上に生じた顆粒球系コロニーは褐色の小点となって染め出されて来るので、これを肉眼または 4 X 程度のルーペで算定する。更に詳しい検

索を必要とする場合には、CA膜を溜水を満したシャーレに入れ、先端のよく合ったピンセットを用いて、マクロファージュ層を CA膜より剥ぎ取り、これをスライドグラスに貼布、ヘマトキシリン染色を施し、脱水透徹後バルサムで封入し光顕標本とした (Fig. 2)。

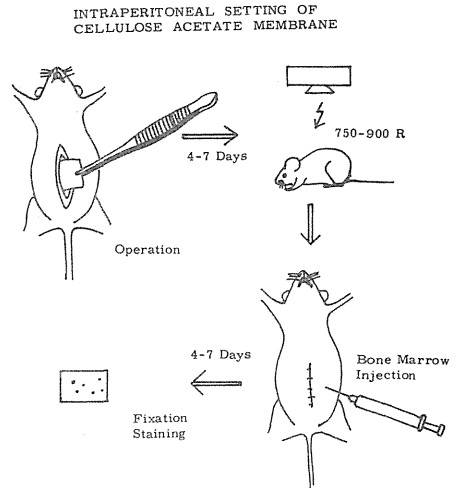


Fig. 1. Cellulose acetate membrane-insertion method (original).

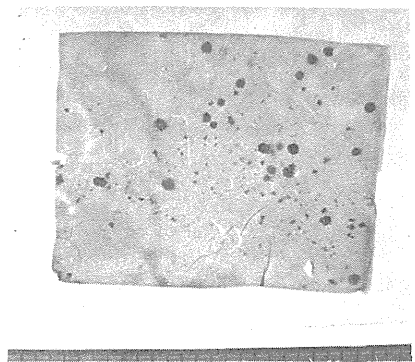


Fig. 2. A completed specimen. The scattered black spots represent myeloid colonies made visible by peroxidase reaction and hematoxylin staining.

(結果)

手術後 24 時間で CA膜は全面的に細胞によっておおわれる。その 90% 以上はマクロファージュで、少数の好中球、肥胖細胞及び小型リンパ球を混ざる。マクロファージュは次第に積み重なって、深部のは紡錘形となり、膠原線維の形成が顕著となる。一週間後には、CA膜は

数層の繊維芽細胞層とその上をおおうマクロファージュより成る細胞繊維性薄膜によっておおわれる。マクロファージュは酸フォスファターゼ陽性、PAS陽性で墨汁、羊赤血球等を貪喰する能力がある。

骨髓細胞移植を行なった場合、このマクロファージュ層には造血コロニーの発達が見られる (Fig. 2,3)。

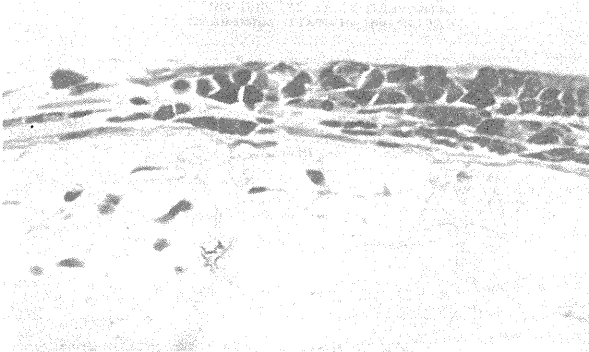


Fig. 3. Vertical section of the specimen. A granuloid colony is developing within the layer of macrophages and fibroblasts.

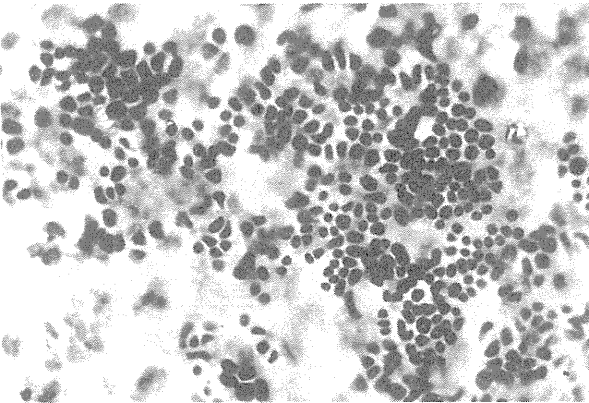


Fig. 4. Erythroid colony on CA membrane.

最も数多く出現するのは顆粒球系のコロニーであるが、赤芽球系コロニーも発現し (Fig. 4), 両者の比率は約20:1である。骨髓巨核球のコロニーは通常の実験条件下では出現しない。

顆粒球系コロニーは十数ケの幼若細胞より成るものから、数百ケないし数万ケの細胞を有するものまで種々の大きさがある。大形のは幼若細胞のみでなく、成熟した顆粒球を多く含む様になり、直径1mm程度に迄増大する。

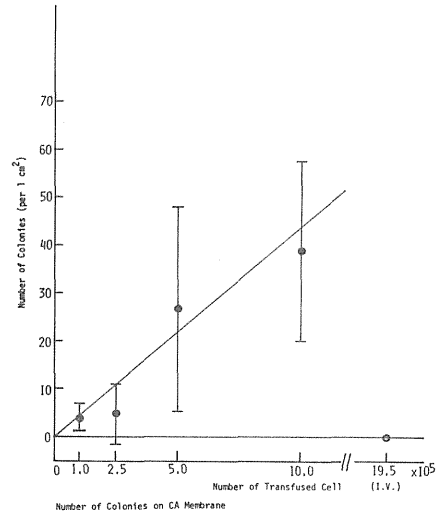


Fig. 5. Relationship between number of transfused cell and of developed colonies on CA membrane. Open circle indicates the case which received intravenous injection (I.V.) of bone marrow cells.

Mean and standard deviation.

移植骨髓細胞数と発現したコロニー数との関係は、Fig. 5に示す通りである。両者の間にはほとんど直線関係が成立する。但し、図からも明らかなように、コロニー数は実験例別のバラツキが非常に大きい。これは腹腔内に注入された骨髓細胞が、CA膜のマクロファージュ層と接触するチャンスの有無に依存する為と思われる。したがって、本法によりCFUの解析を行なうためには、実験例数を或る程度大きくして平均値を比較せねばならず、定量的解析法としてはやや不満足と云わねばならない。なお、過量の骨髓細胞を静脈内に移植しても腹腔内のCA膜上にはコロニーを生じない。

DonorとしてCBA T₀T₀マウスを用い、その骨髓細胞をC3Hマウスに接種した場合も、膜上のコロニーの形成は極めて良好である。このようなCA膜を0.5%プロナーゼを含むハンクス液で37℃30分振盪し、遠沈によって集めた細胞の染色体解析を行なったところ、約14%にT₀T₀染色体を証明した。骨髓移植を行なわない場合、CA膜上には造血コロニーの出現を見ないので、コロニーの殆んどすべてはDonor由来のものと考えられる。

CA膜上におけるCFU-Sの存否を調べるため、骨髓

Table 1. Number and differential count of spleen colonies 7 days after transfusion of the cells, obtained from CA membrane

Source of transfused cells	Number of cells transfused $\times 10^5$	Number of host mice	Macroscopic colonies means & standard error	Microscopic colonies						
				Total number mean & St. E.	§1 differential count (%)					
					E	G	M	U	Mix	E/G ratio
Bone marrow	1.00	9	28 ± 1.4	55 ± 3.6	54.6	29.1	10.2	3.4	2.6	1.84
§2 macrophage & bone marrow cells from CA membrane	1.34	9	36 ± 3.4	100 ± 10.5	54.4	23.8	15.1	2.8	3.9	2.45

Note: §1. E --- Erythroblastic, G --- Granulocytic, M --- Megakaryocytic, U --- Undifferentiated Mix --- Mixed Colonies.
 §2. Membrane-bearing mice were injected 2×10^6 of isologous bone marrow cells intraperitoneally 2 days before sacrificing. Cells from 10 sheets of CA membrane were pooled for the source of transfusion.

移植を行った2日後の膜を、0.5%プロナーゼで処理し、遠沈によって集めた細胞を950 R全身照射した同系マウスの静脈内に接種し、脾コロニーを検索した。結果は、Table. 1に示すように、宿主の脾に明確な造血コロニーの発達があり、且その分化パターンは通常の骨髓細胞移植の場合と大差無かった。即ち、少なくとも2日目の時点ではCA膜上に相当数のCFU-Sが存在することが明らかとなった。

3 CA膜法(変法)による体液性統御因子の解析¹⁷⁾

上記のようにCA膜法の原法は定量的解析法として稍欠ける面があるので、われわれは次のような改良変法を開発し、これによって照射による体液性統御因子の変動を調べた。

(実験方法)

マウスはC3H/He, 10~11週令のものである。Fig 6に示すように、CA膜はミリポア・セメントによって直径7mm, 長さ15mmの円筒状にして置く。これを原法同様8日間マウスの腹腔内に入れて、マクロファージュ層を形成せしめる。摘出したCA膜円筒をシャーレ中に並べ、その内面に骨髓細胞浮遊液を静かに注ぎ、37°C, 湿度飽和 5~10%CO₂の条件下で2時間静置する。この円筒をハンクス液で軽く洗ったあと、照射または未照射の第2の宿主の腹腔内に移植する。コロニーの判定は原法同様である。なお、マクロファージュ層の形成なきCA膜円筒に直接骨髓細胞を播き移植しても、コロニーは決して発現しない。

(結果)

a) 宿主照射の必要性

上記の方法で 1.47×10^5 の骨髓細胞を播いたCA膜円筒を500 R全身照射マウスと未照射マウスにそれぞれ移

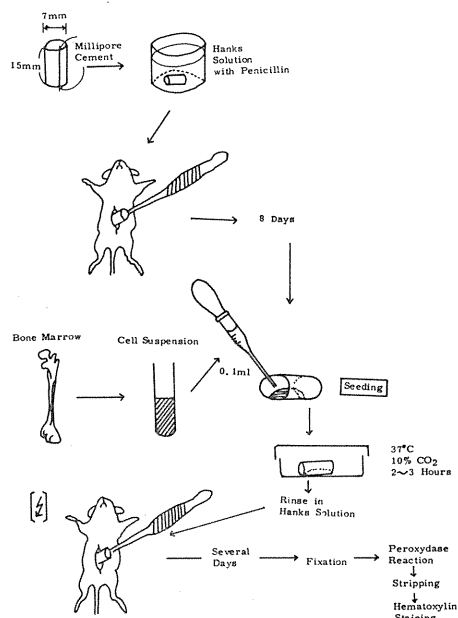


Fig. 6. Cellulose acetate membrane-insertion method. (Modification)

植し、経時的にコロニーの発達を比較した。この際同量の骨髓細胞を950 R照射マウスの静脈内に接種し、CFU-Sの推定値を求めた。

移植後2日目のCA膜上には幼若細胞の増殖が見られる(Fig. 7)。これは直径15μ内外の大型細胞で、円形~楕円形、あるいは周囲との関係で多角形を呈する。核は大きく、穴の小さいドーナツ形で細胞体の大部分を

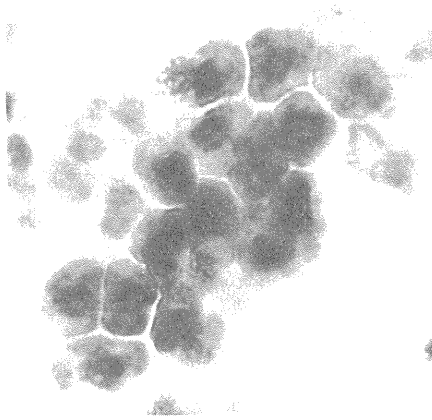


Fig. 7. Juvenile granuloid colony on CA membrane, 2 days after the transfusion.

満し、色質は粗で大きい核小体を有する。ドーナツの穴の部分に一致して明瞭なペルオキシダーゼ反応がある。原形質は好塩基性で時に分裂像が見られる。このように明らかに顆粒球系としての特徴を具えており、既に知られている CFU-S の形態⁴⁾¹³⁾とは異なる。この細胞は 1 ケのみ孤立して存することもがあるが、数ケが小集団を作ることが多い。コロニーの増大とともに構成細胞中にはより小型の(直径 10μ 以下)、核のドーナツ状形態のより明確な細胞を混ざるようになる。これはより分化が進んだものと考えられ、このようなコロニーを成熟型とする。骨髓細胞播種後 2 日目及び 4 日目のコロニーの構成細胞数とその分化度を比較した結果を Fig. 8 に示す。2 日目のコロニーはその大部分が幼若型で 3~16 ケの細胞より成る。すなわち、幼若型細胞は 48 時間以内に 2~4 回の分裂を行なうものが多い。成熟型コロニーの出現は 4 回目以降の分裂後に起るものらしい。4 日目では 10 ケ以上の構成細胞より成るものが 70% 以上を占め、しかも成熟型の頻度は著るしく増加する。しかし、この時点でも 4 回未満の分裂しか経ていないものが約 30% は存在する。このことは CFU の増殖能に著るしい不平等性が存することを示すもので、培養によってコロニーを生ずる、いわゆる CFU-C の場合と極めて類似している。この点から見て、CA 膜上のコロニーには CFU-C 由来のものが相当数存在するか、あるいは CFU-S が短期間のうちに CFU-C に移行するかという二つの可能性を考えねばならない。6 日目以降になると小型コロニーには変性像を示すものが増加する。このようなものは算定から除外することにした。

Fig. 9 は同数の骨髓細胞を播いた CA 膜円筒を、照

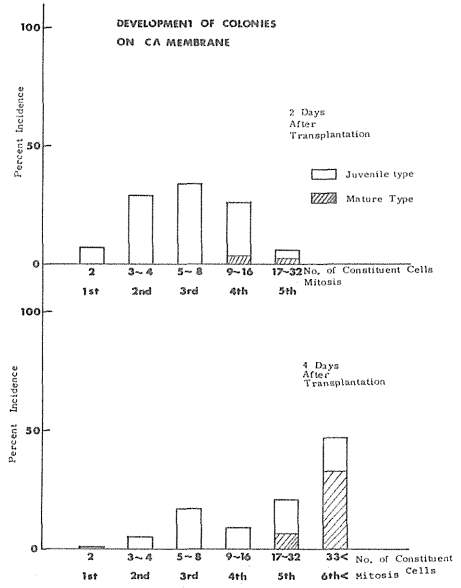


Fig. 8. Number and differentiation of constituent cells of myeloid colonies 2 and 4 days after transfusion.

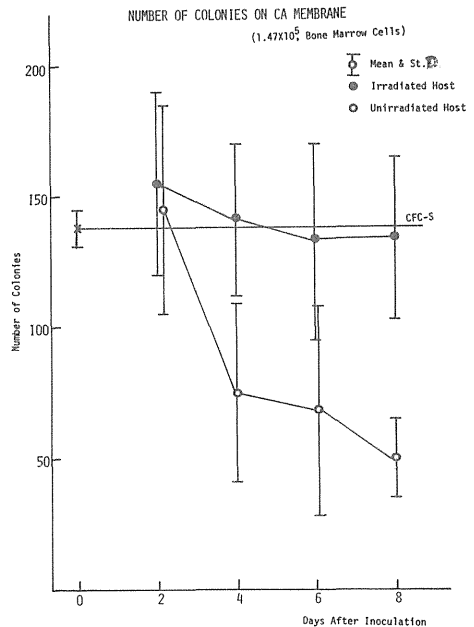


Fig. 9. Chronological changes of colony number in irradiated and unirradiated hosts.

射及び未照射の宿主に移植した場合のコロニー数の経時的変動の比較である。500 R照射宿主の場合、コロニー数は8日目まで事実上不変である。未照射宿主の場合コロニー数は急激に減少し、8日目には当初の $\frac{1}{2}$ になる。このことから宿主の照射はコロニーの発達に対して必要不可欠であることが結論されるが、その理由は何であろうか。宿主の腹腔内に移植されたCA膜は、腹腔内浸出液に浸されることによって、増殖に必要な液相を保持している。したがって、膜上のCFUは、生体内に増減する種々の体液性統御因子の支配下にある。未照射宿主でコロニーの発達が悪いことは、a) 未照射動物の体液中にはCFUの増殖抑制因子があり、照射により抑制が解かれるのか、b) 未照射動物には低レベルでしか存在しない増殖刺激因子が照射により増量するかという2通りの可能性が考えられる。

既に、照射動物の血中にエリトロポエチンが増加することが知られているので、膜上に生じた赤芽球系コロニーのみを算定した結果がFig. 10である。未照射宿主の場合赤芽球系コロニーは経時的に減少し、8日目にはほとんど0となるのに対し、照射宿主の場合6日目に未照射宿主の7倍以上の赤芽球系コロニーの発達を見た。この結果は照射によるエリトロポエチンの増加が、CA膜

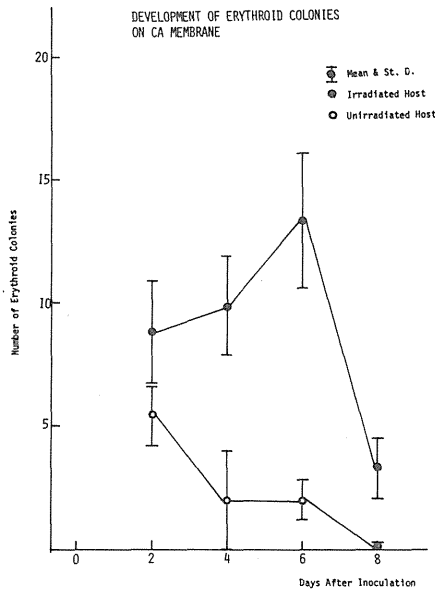


Fig. 10. Number of erythroid colonies in irradiated and unirradiated hosts.

上の赤芽球系コロニーの発達に支配的な影響を齎らすことを示している。

最近、Cronkite一派が、diffusion chamber中の骨髓細胞の増殖が、宿主の照射により著しく高進する事より、照射動物の体内に於ける造血刺激因子の増加を示唆したが¹⁾²⁾、われわれの成績も全くこれと一致するものである。

b) マクロファージュ層照射の必要性の有無

原法と比較した場合、変法ではマクロファージュ層は照射を受けない。この差に何らかの意味が有するか否かを検討する目的で、CA膜を有するマウスを500 R全身照射したあと屠殺し、これに一定量の骨髓細胞を播き、照射又は未照射マウスに移植し、コロニー数の変動を比較した。

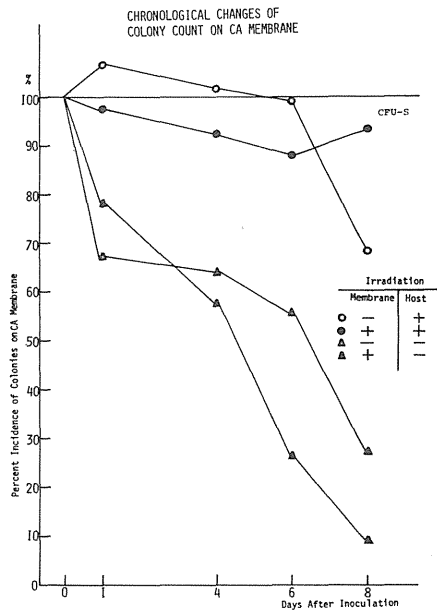


Fig. 11. Relationship between radiation dose of host and number of developed colonies.

結果はFig. 11に示す通りでコロニー数の経時的変動はマクロファージュ層照射の有無に関わりなく、宿主の照射の有無に相関する。すなわちコロニーの発達に最大の影響を及ぼすのは宿主の造血統御因子の変動であることが結論される。

c) 宿主の照射線量とコロニーの発達度

照射動物における造血統御因子の増加は、造血組織の崩壊に対処する為の合目的な反応の現われである。し

たがって、その増加の度合いと崩壊の程度との間には、ある程度の相関が成立する筈である。この点を検討するため、一定量の骨髓細胞を播いたC A膜円筒を、未照射、250 R、500 R、750 R及び1,000 R照射マウスに移植し、5日目のコロニー数を算定比較した。

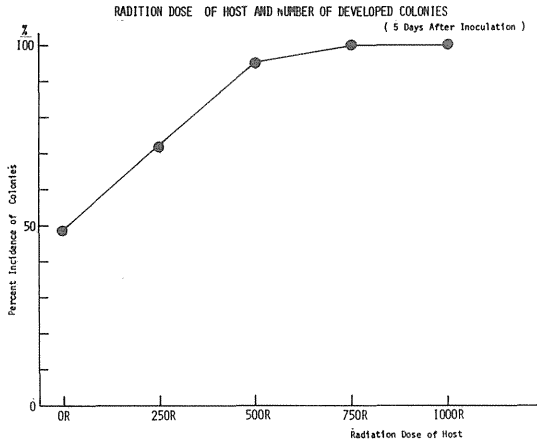


Fig. 12. Relationship between radiation dose of host and number of developed colonies.

結果は Fig. 12に示すように、500 Rまでの線量域では線量にほぼ比例して造血統御因子の増量が起こることが示されている。プラトーの部分では、個体の産生し得る造血統御因子量が最大限に達したのか、あるいは膜上のCFUをコロニーに発達せしめるに充分なレベルに達したのかのいずれかが考えられる。ともあれ、宿主が最小限度500 Rの照射を受けることが、C A膜法変法の実施に当たっての必要条件となる。

d) 播種骨髓細胞数とコロニー数との関係

以上の基礎的知見にもとづき、播種骨髓細胞数とコロニー数との関係を検討した結果を Fig. 13に示す。宿主はすべて500～750 Rの全身照射を受けている。図に明らかな通り、播種細胞数とコロニー数との間にはかなり良好な直線関係が成り立ち、且この直線はCFU-Sの推定値の画く直線と平行である。原法と比較して感度が一桁上ったこと、すなわち 10^4 の骨髓細胞によって約20ケのコロニーが検出し得ることは大きな利点である。この図に示されたコロニー数は、必ずしも播かれた骨髓細胞中に含まれるCFUの実数を示すものではないが、実験条件を等しくする限り、各々の数値は可成再現性に富むものであって、CFUの定量的解析法として、充分実用に供し得るものである。

4 胸腺細胞が造血コロニーの発達に及ぼす影響

胸腺細胞移植が骨髓系造血に対して促進的効果をもたらすことについては、既に何度か報告した¹²⁾。しかしそのメカニズムについては殆んどが明らかにされていない。そこで、われわれはC A膜法変法によって、この問題と取り組むことにした。

(実験方法)

C 3 Hマウスに作らせたC A膜に、同系の骨髓細胞を、同系またはC 57 B Lの胸腺細胞と混じて播き、膜上のコロニーの発達度を対照と比較した。また、一部の動物では、移植後6日目に取り出したC A膜円筒を³H-チミン $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ を含むハンクス液にひたし、37℃ 1時間解置したあと、固定水洗し、次いで剝離したマクロファージュ層の放射能活性を液体シンチレーション・カウンターにより計測した。

第2の実験として、C 3 Hマウスに作らせたC A膜に、CBAT₀T₀マウスの胸腺細胞を単独に、あるいはC 3 Hマウスの骨髓細胞と混じて播き、5日目に膜上の細胞をプロナーゼで落し、染色体解析を行なった。

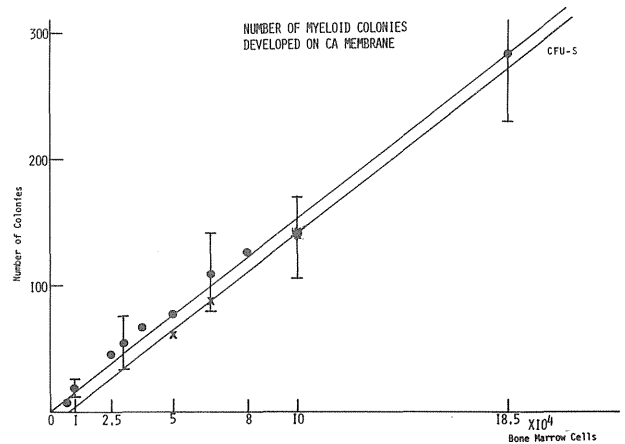


Fig. 13. Relationship between number of seeded bone marrow cell and developed colonies on CA membrane.

(結果)

Table 2に示す通り、同系、異系を問わず胸腺細胞を混ざることによって顆粒球系コロニー数の増加を見た。単に数のみならず、個々のコロニーの大きさも対照に比し大きいものが多い。赤芽球系コロニーも良く発達する。更に少数ではあったが、骨髓巨核球のコロニーの出現を見た (Fig. 14)。

Table 2. Effect of isologous and homologous thymus cells on the development of myeloid colonies in macrophage layer

Exp.	Number of bone marrow cells (C3H) × 10 ⁶	Thymus cells		Number of colonies mean ± standard error
		Origin	Number × 10 ⁶	
I.	22.0	—	0	153 ± 29
	22.0	C3H	54	247 ± 54
	22.0	C3H	11	211 ± 29
	22.0	C3H	2	271 ± 20
II.	2.5	—	0	21 ± 5
	2.5	C3H	7	86 ± 18
	2.5	C57BL	6	43 ± 7

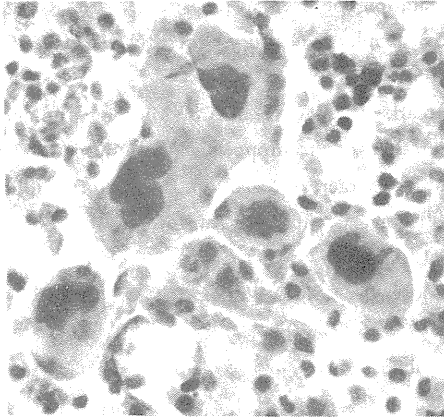


Fig. 14. Colony of megakaryocyte on CA membrane.

H-チミジンの取り込みは 1×10^5 ケの骨髓細胞を播いた場合、 1078 ± 229 c.p.m.の対照値に対し、これに 1.27×10^6 の同系胸腺細胞を加えた場合は 1444 ± 185 c.p.m.、 1.48×10^5 の C57BL 胸腺細胞を加えた場合、 1868 ± 205 c.p.m.で、これらは共に対照に対し、1%及び0.1%の危険率で有意であった。

マクロファージュ層上における胸腺細胞の状態を経時的に調べると、移植後2日目には多数の胸腺リンパ球が附着し、島状の集団を作る。これらには分裂像は無く、またTingible bodyの形成も明らかでない。この胸腺リンパ球は日を遂って減少し、マクロファージュにより置き換えられる。

CBA T₀T₀の胸腺細胞による染色体解析の結果を、Table 3に示すが、胸腺細胞単独或いは骨髓細胞との混合播種の何れの場合にも、膜上の細胞にT₀T₀由来の細胞の分裂像を認めた (Table 3)。すなわち、胸腺細胞中にはマクロファージュ層に定着増殖する細胞が存在することは確実である。形態学的検索の結果と対比し

Table 3. Incidence of CBA T6T6 cells on C3H CA membrane 5 days after thymus cell seeding

Thymus Cell	Bone marrow Cell	Meta-phase	T6T6 Number	Chromosome %
CBAT6T6 10 ⁷	—	70	18	25.7
CBAT6T6 10 ⁷	C3H 10 ⁵	67	8	11.2

て考えると、胸腺細胞中にはマクロファージュまたはその前駆細胞が存在し、これがCA膜マクロファージュ層上に定着、増殖することによって造血コロニーの発達に対し促進的な作用を齎らすものと考えられる。

5 考 察

CA膜法に利用される腹腔マクロファージュは明らかに炎症性のものであるが、造血の“場”の機能を或程度発揮することが証明された。この際、マクロファージュ層に定着するCFUが、CFU-SであるかCFU-Cであるかについては未だ最終的な結論に達していない。しかしいずれにせよ、これらの細胞はガラス・プラスチック等の表面には接着性を持たないのであって、これがマクロファージュとは極めて容易に且可成の強さで接着するという事は、両者の細胞膜表面に特異的な親和性を有する物質構造が存在することを示している。このような親和性が、“場”における前駆細胞の撰択的定着機構に關与するであろうことは想像に難くない。

移植後2日目の時点でCA膜上にCFU-Sが存在することは証明されたが、もしコロニーの大半がCFU-S由来とすれば、腹腔マクロファージュにより構成される造血の“場”は、主として顆粒球への分化を誘導するものと云わねばならない。北村らは腹腔内に骨髓細胞を移植

した場合、大網や腸間膜に生ずる造血コロニーの大部分が顆粒球系であることを報告して居るので⁶⁾、あるいは腹腔という環境あるいは腹腔細胞にはこの様な性格が存在するものかも知れない。

C A膜法変法による解析は、照射動物の体内に造血統御因子の増量が起ること、そしてこの増量がコロニーの発達に対して必要不可欠であることを明らかにした。最近 colony stimulating cell の存在がマウス以外の動物で実証され³⁾⁵⁾¹⁰⁾、マクロファージュ自体による統御因子産生の可能性も考慮せねばならないが、本実験においてはむしろ体液性の変化が大きい影響力を持つように思われる。これはマウスという動物の特殊性か、あるいは腹腔マクロファージュの性質によるものかは今後検索を必要とする問題である。

胸腺細胞混合播種実験の結果が示唆するのは、マクロファージュの増生がコロニーの発達に刺激的な役割を演ずる可能性である。Endotoxin、抗原等の投与が造血機能を亢進せしめることは良く知られているが、これは“場”の賦活を介して行なわれるものと考えられる。

造血組織の細網内皮系は比較的長い分裂周期を持ち、緩慢な増生を行なうことが知られているが、これは分化した細胞が生理的条件下にある場合のことである。造血の“場”を構成する細胞が、前駆細胞の形で血流により造血組織に供給され、これが分化・増生することによって絶えず“場”の機能の活性を維持するという機構も一つの可能性として考え得るのである。

6 結 論

腹腔マクロファージュにより作られた人工的な造血の“場”によって骨髓系造血コロニーを発現せしめる試みに成功し、造血の“場”の機能の実在とその重要性を証明した。照射による造血統御因子の増量はこの“場”の機能に大きな影響力を持つものである。また“場”の構成細胞の増殖が、造血細胞の増殖に対して刺激的な効果を有すると考え得る根拠を得た。

参 考 文 献

- 1) Boyem, A., Carsten, A.L., Laerum, O.D. & Cronkite, E.P., *Blood*, 40, 174 (1972)
- 2) Boyem, A., Boecker, W., Carsten, A.L. & Cron-

kite, E.P., *Blood*, 40, 163 (1972)

- 3) Chervenick, P.A. & LoBuglio, A.F., *Science*, 178, 164 (1972)
- 4) Dicke, K.A., Noord, M.J. van & Bekkum, D.W. van., *Exptl. Hematol.* 1, 36 (1973)
- 5) Golde, D.W. & Cline, M.J., *J. Clin. Invest.* 51, 2981 (1972)
- 6) 北村幸彦, 須田沖夫, 岡野錦彌, 江角吉造, 移植 3, 286 (1968)
- 7) Metcalf, S. & Bradley, T.R., Factors regulating in-vitro colony formation by hematopoietic cells. Regulation of Hematopoiesis, I. (Ed. Gordon, A.S.), Appleton-Century-Crofts, New York, 1970, p.185.
- 8) Metcalf, D. & Moore, M.A.S.; Microenvironmental regulation of haemopoiesis, Haemopoietic Cells, (Ed. Neuberger, A. & Tatum, E.L.). North-Holland Publishing Company, Amsterdam & London, 1971, p.312.
- 10) Moore, M.A.S. & Williams, N., *J. Cell Physiol.* 80, 195 (1972)
- 11) 関 正利, 遺伝, 22, 58 (1968)
- 12) 関 正利, 最新医学, 24, 1418 (1969)
- 13) 関 正利, 血球の分化(幹細胞論)細胞学大系7(小川和朗, 小田琢三, 黒住一昌, 杉野幸夫編), 朝倉書店(東京)1971, p.185
- 14) 関 正利, 医学のあゆみ 80, 356 (1972)
- 15) Seki, M.: Hematopoietic Colony Formation in a Macrophage Layer Provided by Intraperitoneal Insertion of Cellulose Acetate Membrane. Transplantation, 1973, in press.
- 16) Trentin, J.J. Influence of hematopoietic organostroma (Hematopoietic Inductive Microenvironments) on stem cell differentiation. Regulation of Hematopoiesis, I., (Ed. Gordon, A.S.), Appleton-Century-Crofts, New York, 1970, p.161.
- 17) 吉田 和子, 井上江以子, 関正利: 照射による体液性変動が骨髓系造血に及ぼす影響(セルローズ・アセテート膜設置法による)第15回放射線影響学会要旨集, ICB, 1972

Ⅲ - 3. 移植造血細胞の動態に関する研究

平 嶋 邦 猛
川 瀬 淑 子
大 谷 正 子
熊 取 敏 之

Study on the Proliferation and Differentiation of Transplanted Haematopoietic Cells to Irradiated Recipients.

Kunitake HIRASHIMA, Yoshiko KAWASE,
Masako OHTANI and Toshiyuki KUMATORI

The fate and development of transplanted haematopoietic cells in syngeneic recipient's spleen was analysed by the means of measuring weights, ^{59}Fe incorporation, the responsiveness to erythropoietin, DNA synthesis and retransplantation method successively.

It was observed that the most immature stem-cells (expressed as CFU-s) differentiated to erythropoietin-responsive cells (ERC) 3 days after transplantation and matured to pronormoblasts which had active DNA synthesis with great proliferation capacity 4 days after transplantation. Five days after transplantation, pronormoblasts differentiated into iron-incorporable erythroblasts.

This experimental system should be regarded as a very useful technique to study the differentiation process of erythroid cells from stem-cells in the synchronous cell culture method *in vivo*.

Applying this syngeneic haematopoietic cell transplantation method, the quantitative assay of stem-cell injury after the various immunosuppressive agents was also performed.

X-irradiation (X), Cyclophosphamide (CY), Nitroimin (NT), Mitomycin-C(MT) injured stem-cell in great degree whereas Prednisolone (PR), Actinomycin-D (AM), Azathioprine (AZ) and Methotrexate (MTX) did not damage stem-cell.

Compared with X-irradiation, however, the recovery pattern of stem-cell after CY and NT were much faster and sufficient.

On the other hand, the quantitative assay of immunological competent cells which provoke the secondary disease resulting from graft-versus-host reaction (GVH) in allogeneic combination was performed using different strains of mice such as C3H/He (H-2^k) and C57BL/6J (H-2^b). According to the method of M. Bennett, the changes of splenic uptake of ^{125}I -deoxyuridine in recipient's mice grafted by allogeneic lymph-node cells clearly demonstrated the grade of proliferation of alloantigen-sensitive units (AASU).

It was also clarified that this AASU assay very well corresponded to the experimental results of GVH mortality.

Using this assay system of AASU, the suppressive effects of immunosuppressive drugs such as Cyclophosphamide (CY), Methotrexate (MTX) and Prednisolone (PR) were measured by the administration of drugs after lymph-node cells transplantation.

Moreover, the effects of these drugs were also observed by the effectiveness to prevent GVH mortality. It was concluded that the optimal dose of CY could prevent GVH reaction measured by AASU suppression and mortality whereas MTX suppressed AASU but could not decrease mortality.

Finally, the combination assay of haematopoietic stem-cell by the splenic colony-forming method and of immunological competent cells by alloantigen-sensitive units method is regarded as an useful approach to resolve the mechanism of allogeneic haematopoietic cells transplantation and develop the immunosuppressive treatments.

造血器移植の場合、他の腎臓、心臓等の器管移植の場合と全く異なった本質的な問題は、移植された組織が recipient の体内で十分な細胞増殖、分化をおこし得るような potentiality を維持することが、不可欠であると云う点にある。換言すれば、移植された組織が、脱落しないで生着していれば良いと云う腎臓、心臓等の器管移植の場合と異なり、移植組織が donor の体内におけるときのと同様に、正常な増殖、分化をとげて、血球を新生しつづけると共に、組織不適合の結果、拒絶反応をおこし、移植組織の脱落の原因となると考えられる免疫適格細胞の増殖分化のみは、選択的に抑制されると云う好適の条件をつくることが要求されるわけである。

このような観点から、造血器移植の場合は免疫剂的な面からの検索とともに、造血細胞の増殖・分化と云う面からの検索が併せて行なわれる必要がある。

われわれは、免疫学的不適合性の問題のない同系マウスを用いる syngeneic な組合せによって、移植注入された造血細胞の定着、増殖、分化機構を検討し、更に造血器移植の臨床的適用の場合に問題となる allogeneic な組合せの場合の「拒絶反応」に対する免疫抑制剤適用の際の移植造血細胞の障害度を検討し、更にすすんで、「拒絶反応の原因になると考えられる GVH 反応をひきおこす免疫適格細胞の定量的実験法を用いて、免疫抑制剤の免疫抑制効果を検討し、造血幹細胞を障害せず、免疫適格細胞の増殖のみを抑制する薬剤の選択検索を行なった。

実験材料及び実験方法

実験動物は、米国 Jackson 研究所より購入したものと及び放医研において自繁した C3H/He 系マウス、生後 12 週ないし 14 週のものを選んで使用した。

なお、allogeneic な組合せの実験には、同じく C57 BL/6 J 生後 8~10 週のものと一緒に用いた。放射線照射は X 線照射 (200 KV, 線質半過層 Cu 1.2mm, 1 分間 78 R, 管球動物間距離 50cm) によった。

造血器移植は、donor 動物よりとった造血組織 (骨髄

及び脾臓) の細胞浮遊液を Tyrode 氏液または生理的食塩水を用いて作製し、ステンレス製金網を通し、recipient 動物を 900 R 照射した後、1~2 時間以内に、尾静脈に定量、注入することによって行なった。

実験成績と考察

1 移植増血細胞の定着、増殖、分化機構の研究：

移植された造血細胞がどのような経路をとって、宿主の造血組織に定着し、増殖分化をとげて、血球の新生を行なうかについての研究業績は、従来より比較的乏しい。

Nowell 等によれば¹⁾、移植された骨髓細胞は、2 時間以内にマウス骨髓中に検出されるようになる。アイソトープで標識した donor 骨髓細胞の移入実験^{2) 3)}によれば、静注された細胞は肺、肝をへて、骨髓、脾臓中に次第に集ってくることが実証されている。

次に、移植された造血細胞の中、宿主体内で増殖分化可能な細胞はどのような成熟段階のものであるかと云うことについて考えてみると、既に有名な Jacobson の脾防護実験^{4) 5)}をはじめ、腹腔内細胞⁶⁾、末指白血球の移植実験^{7) 8)}などで明らかなように、移植されて recipient 体内で造血を維持するに有効な細胞は、組織に定着した、いわゆる "Fixed cell" ではなく、自由に流血中を移動できる "Free cell" の形のものであることが明らかである。

さらに、移植実験に染色体分析を組合せた研究業績から、宿主体内に増殖してくる造血細胞は各血球系に分化可能な multipotential な機能をもった造血幹細胞 (stem-cell) に由来することが、実験的に明らかになると^{10) 13)}ともに、人間についても、その考えが裏付けされるような臨床観察がなされている¹⁴⁾。したがって、骨髓細胞中の赤芽球、骨髓芽球、巨核球などのような既にある血球系に分化するように運命づけられた段階の細胞が、造血器移植のとき、宿主の体内で血球新生を行なう根元になる細胞でないことは明らかである。このように考えてくると、結局、幹細胞の宿主体内での増殖分化機序を検討することが、移植細胞の動態を研究する

上で本質的な問題であると結論できる。このような観点から、以下の実験を行なった。¹⁵⁾ TillとMcCullochの実験法に基づき、超致死量(900 R)照射マウスに、同系マウス骨髓細胞 1.4×10^6 を尾静脈より注入移植し、経時的に殺して脾臓を別出し、骨髓移植を行なわなかった対照群と比較検討した。Fig. 1に示すように、脾臓重

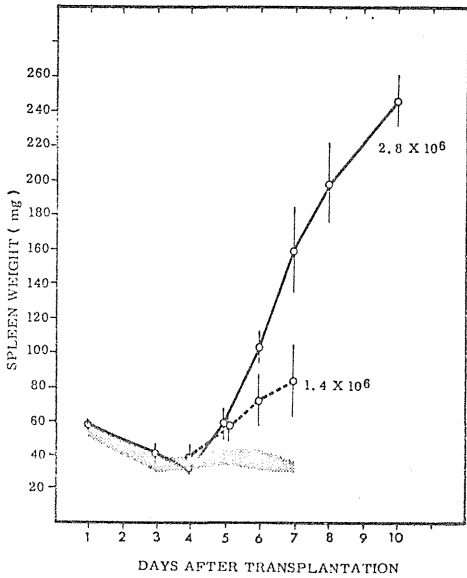


Fig. 1 骨髓移植後の recipient 脾臓重量の変化陰影部は、非移植群

量に差を認めるようになるのは、移植後5日目以降である。この際、殺戮前5時間前に放射性鉄 ^{59}Fe Ciを注射しておき、別出脾の放射活性を測定して検討すると、非移植群との差は、やはり著明となる。更にこの際、骨髓移植と共に、recipient動物に、充分輸血を行なって、多血症をおこさせ(ヘマトクリット値53以上)、移植後、日を追って、充分量のエリトロポエチン(erythropoietin)を注射し、エリトロポエチン(Epo)に対する反応性を、Epo注射後48時間後の脾臓中赤芽球増殖量を ^{59}Fe の脾臓摂取率から求めると、recipient動物の脾臓中に、Epoに反応する段階の細胞(Erythropoietin-responsive cell ~ERC)が認められるようになるのは、移植後、3日目以降であった。更に骨髓移植

後、日を追って ^3H -thymidineを注射し、recipient動物脾臓の放射活性をliquid Scintillation counting法及びミクロラジオオートグラフ法によって検討すると、移植後4日目よりDNA合成の活潑な前赤芽球の増殖が、はじめて明らかになることを見出した。以上の実験成績を要約して考えると、

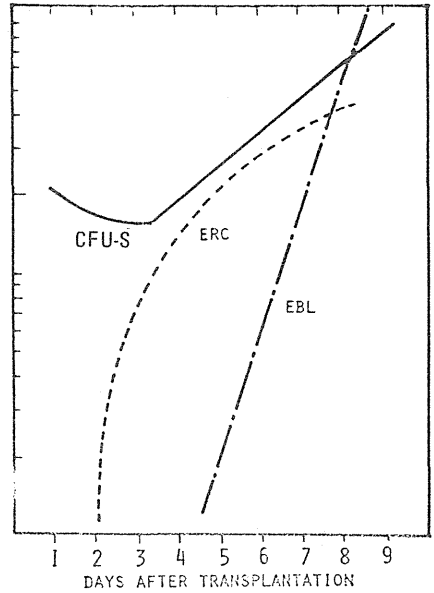


Fig. 2 骨髓移植後、recipient 脾臓中における各成熟段階の造血細胞の増殖曲線
CFU-S: colony-forming cell ERC: Erythropoietin responsive cell EBL: 赤芽球

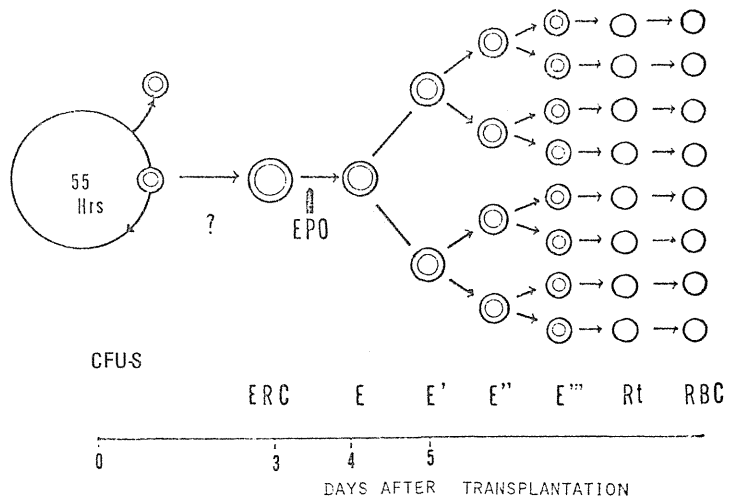


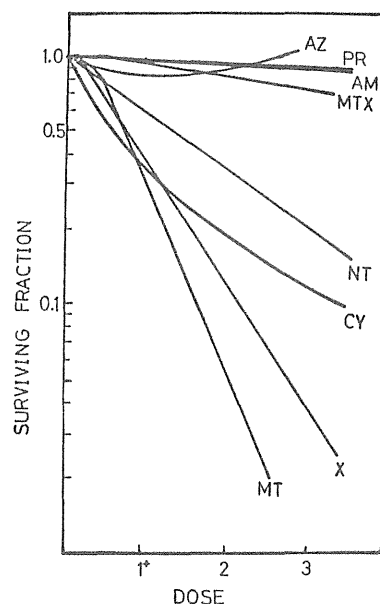
Fig. 3 移植後、造血幹細胞の分化・増殖モデル
CFU-S: colony-forming cell E~E''': 赤芽球 Rt: 網赤血球 RBC: 赤血球
ERC: Erythropoietin responsive cell Epo: Erythropoietin

donor 動物の骨髓細胞中の幹細胞が移植されると、その中の一部が recipient 動物の脾臓に定着する（脾に定着する割合はほとんど 5% と考えられている¹⁷⁾¹⁹⁾。この定着した幹細胞の中、更に一部²⁰⁾が（約 37%）脾臓中で増殖分化を開始するが、移植後 3 日後に Epo に反応する ERC にまで分化し、移植後 4 日目に前赤芽球となり、ここで活潑な分裂を行ない、5 日目に鉄を摂取して、ヘモグロビン合成を活潑におこなう赤芽球にまで分化すると考えられる²¹⁾。移植後 5 日目以降になると、肉眼でははっきりと識別可能な造血細胞のコロニーを形成するようになり、この脾臓表面に生じたコロニーの数は移植骨髓細胞数と比例関係を^{16) 22)}示し、染色体分析の成績からも、一ヶの幹細胞に由来する細胞群、すなわちクローンであることが証明されている²³⁾ので、コロニーの数を算定することにより、逆に移植された骨髓細胞中の幹細胞の量を推定することが可能となるわけである。このような assay 法によって表現される相対的な幹細胞数を、CFU-S (colony-forming units-spleen) と呼ばれている¹⁷⁾。われわれの実験で recipient 動物の脾臓中で、この CFU-S の自己増殖の状態を検討するために、骨髓移植後の脾細胞を移植後経時的に集めて、900 R 照射マウスに再移植してコロニー形成能をみることにより検討すると、移植後 3 日間の lag phase の後、4 日以降は 55 時間の generation time で増殖することが明らかにされた。われわれの実験成績をまとめたものが、Fig. 2, 3 であり、移植後、日を追って幹細胞から赤血球系細胞への増殖分化が、一種の同調培養 (synchronous cell culture) の様な形でおこなうことが明らかである。

2. 免疫抑制処置による血液幹細胞障害に関する研究：

人体における骨髓移植は、Bortin^{24) 25)}によると 1939 年より 1969 年の間に、全世界で 203 例が報告されている。骨髓移植の臨床的応用は、1962 年をピークとして、次第に衰退している。その理由は、骨髓が宿主に確実に生着したことが証明された症例が 203 例中 11 例で、5.4% と云う低率であることが主因であろう。人間のような donor と recipient の間に、一卵性双生児の場合を除いては、syngeneic な組合せが期待できない場合は、たとえ HL-A 系の型合せ、混合リンパ球培養法等を用いて donor の選択に慎重を期しても、現段階では組織不適合に基づく、GVH 反応による、続発症の発現を避けることは出来ない。したがって、この続発症の抑制に、免疫抑制処置が行なわれる必要があるが、造血管移植の場合は、この免疫抑制処置が、移植した造

血組織中の幹細胞をも障害してしまう為に、移植による造血組織の再生を期待することが、困難になる。したがって、骨髓移植の臨床的発展のためには、免疫適格細胞系の増殖分化のみを選択的に抑え、造血細胞系の抑制は起こらないような方法の確立が望まれるのである²⁴⁾。このような観点から、われわれはまず、免疫抑制処置の幹細胞の増殖分化に及ぼす影響を、実験動物を用いる syngeneic な組合せで検討した。Fig. 4 に示すように、X 線照射(X), Mitomycin C (MT), Cyclophosphamide (CY), Nitromin (NT) に強い幹細胞障害作用があり、これに対して Azathioprine (AZ), Prednisolone (PR), Actinomycin D (AM), Methotrexate (MTX) の幹細胞障害作用は比較的軽度である。



	100	200	300R
X-irradiation (X)	40	80	120mg/Kg
Nitromin (N)	80	160	240mg/Kg
Cyclophosphamide (CY)	4	8	12mg/Kg
Mitomycin C (MT)	16	32	48mg/Kg
Methotrexate (MTX)	160	320	480ug/kg
Actinomycin D (AM)	80	160	240mg/Kg
Prednisolone (PR)	80	120	240mg/Kg
Azathioprine (AZ)			

Fig. 4 X線及び各種免疫抑制剤の造血幹細胞障害曲線

次に、一時的な幹細胞障害作用は強くても、幹細胞の障害よりの回復がすみやかであれば、その免疫抑制剤は実用に耐えるものと考えられる。放射線の照射に比して、薬剤の方が幹細胞の障害からの回復が早いとの諸報告もあるので^{25) 28)}、この点を検討した成績を示す²⁹⁾。

前述した方法によって、donor 動物に、X線照射及び

Nitromin 及び Cyclophosphamide 注射後24時間の骨髓幹細胞障害度が等しくなる様な処置量を求めると、X線150 R照射と、Nitromin 2.5 mg/mouse, cyclophosphamide 6.5 mg/mouse が、幹細胞の障害度を等しくすることがわかる。次に、X線150 R照射、Cyclophosphamide 6.5 mg/Nitromin 2.5 mg注射後の幹細胞障害回復動態を、処置後4,7,14日後について比較した成績を求めると、Fig. 5 のようになる。このこ

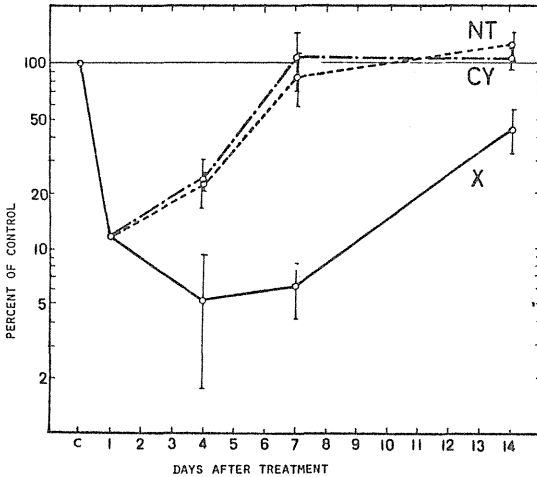


Fig. 5 X線150 R(X), cyclophosphamide 6.5 mg/mouse (CY) Nitromin 2.5 mg/mouse (NT) 処置後の造血細胞の障害回復曲線

とから明らかなように、cyclophosphamide, Nitromin のような薬剤は投与直後の幹細胞増殖能に対する障害作用は強くとも、幹細胞の回復が極めて速やかであるので、使用法を考慮することによって、免疫抑制剤として、充分、有用であることがわかった。この研究成績の附随的な成果とし、cyclophosphamide等は、分化した造血細胞 (ERC また赤芽球等) に対する障害作用が強いため、薬剤処置後、4日目の骨髓細胞は相対的に幹細胞の密度のきわめて濃い状態であることがわかった。したがって、この時期の骨髓細胞を集めて、幹細胞の選択的な採取法及び形態学的研究が可能となる。

3. 免疫適格細胞の定量的測定法：

Allgenetic な組合せによる造血器移植の造合は、組織不適合に基づく、いわゆる続発症をひきおこして死亡する。既に1954年 Barnes と Loutit^{30) 31)}によって、累系マウスの組合せによる骨髓移植の成績からこの点は明らかにされているが、重篤な下痢、体重減少、皮膚障害等を主体とするもので、放射線障害による造血障害を一次疾患とすれば、二次疾患または続発症 (sec-

ondary disease) と呼ばれて居る³¹⁾。この続発症の主因をなすものは、移植された造血組織に含まれる免疫適格細胞の増殖による、いわゆる graft-versus-host reaction (GVH) であることが、Trentin³²⁾, Uphoff^{33) 34)}の業績により明らかにされている。続発症治療のために免疫抑制剤を選択するにあたっては、まず、GVH反応をひきおこす免疫適格細胞に対する薬剤の効果を、定量的に検討可能な実験法の確立が必要である。従来、免疫抑制剤の効果を実験的に検討するには、移植、処置後の動物の生残率によるもののみであった。生残率をみる方法は実際的ではあるが、多くの動物を必要とし、また効果判定も薬剤による中毒効果及び、薬剤による血液幹細胞の障害等を考慮に入れれば、必ずしも正しく免疫抑制効果を見ているのかどうか疑問点を残す。Bennett³⁵⁾は超致死量照射マウスに allogeneic な造血組織を移植したとき、数日後におこる recipient 動物脾臓中での donor 由来の免疫適格細胞の増殖を、¹²⁵I-deoxyuridine (¹²⁵IUDR) の脾臓採取率によって測定する実験法を考案し、この場合、増殖する免疫適格細胞の量を alloantigen-sensitive (AASU) と呼んでいる。この実験法は、われわれが幹細胞の測定法に通常用いている脾コロニー形成法と手法が酷似しており、幹細胞と免疫適格細胞の定量を比較検討する上で、極めて有用であると考えられた。そこでまず、この実験法の基礎的な検討を行なった。800 R照射

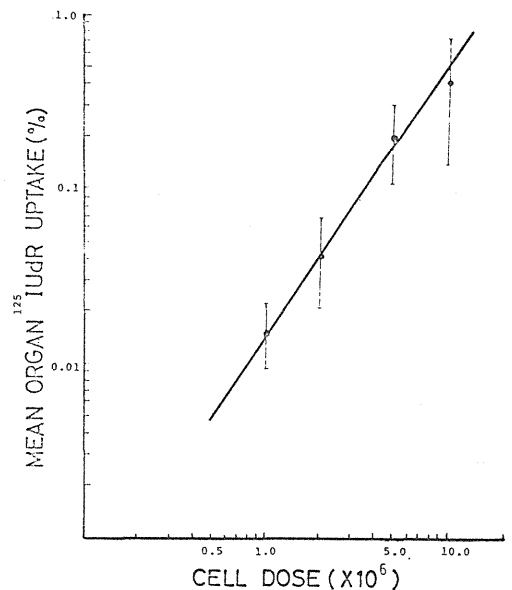


Fig. 6 移植腸間膜リンパ節細胞数と recipient 動物脾臓 ¹²⁵IUDR 摂取率の関係

C57BL/6J系雌マウス(H-2^b)に、C3H/He系マウス(H-2^k)の腸間膜リンパ節細胞浮遊液(Tyrode氏液に10%の仔牛血清を加えたもの)を、細胞の量をかえて静注移植し、4日目に、2μCの¹²⁵IUdRを腹腔内注射し、17時間後に殺して、recipient脾臓の¹²⁵IUdR摂取率を測定すると、Fig. 6に示すようにきれいな移植細胞数との間の作用曲線を求めることができた。

次に、果してこの方法で移

植された免疫適格細胞の増殖がGVH反応をおこして、recipient動物に続発症をおこすかどうかを検討するため、同様の実験系で種々の量のリンパ節細胞と定量の骨髓細胞(1×10⁷)を移植し、recipient動物の致死率を経時的に求めた。10⁷ヶ以上のリンパ節を移植された動物は、hunched posture, ruffled fur, lethargy等の典型的な続発症の症状を示して、12日までの間に全部死亡する。リンパ節細胞の量をへらしてゆくと、次第に致死率は低下してゆく(Fig. 7)。この実験結果から、Bennettの実験法は免疫適格細胞の定量的bioassay法として秀れたものであることが確認された。

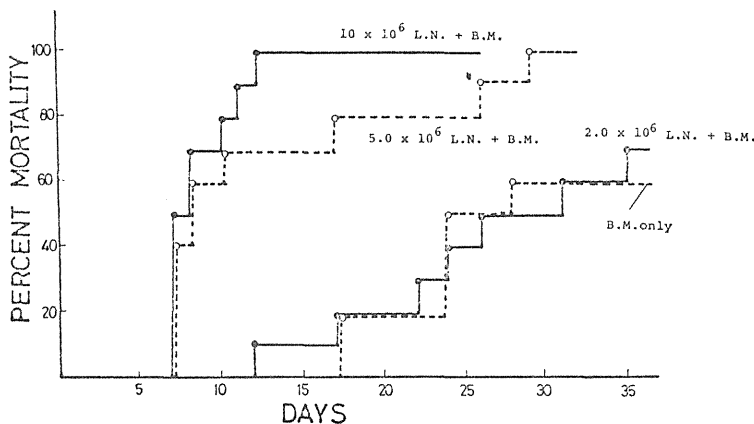


Fig. 7 移植リンパ節細胞数と、recipient動物の致死率の関係
LM: Lymph node cells, BM: Bone marrow cells

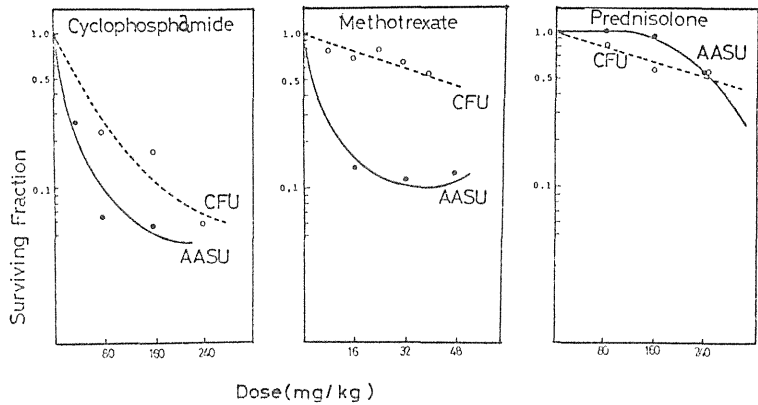


Fig. 8 各種免疫抑制剤の免疫適格細胞(AASU)及び造血幹細胞(CFU)の障害度曲線

AASU: Alloantigen - sensitive units

CFU: colony - forming units

4. 免疫抑制剤による免疫適格細胞の障害の定量的研究

前述のAASU法を用いて、免疫抑制剤の効果を判定した。用いた免疫抑制剤は、臨床的に免疫抑制剤として広く用いられている²⁴⁾Cyclophosphamide (CY), Methotrexate (MTX) 及びPrednisolone (PRE)である。1×10⁷ヶの腸間膜リンパ節細胞(C3H/He系マウス由来)を、800 R照射C57BL/6J系マウスに移植し、24時間後にCY, MTX, PREを量を変えて1回注射し、4日目に¹²⁵IUdR注射、17時間後に脾臓をとり、摂取率を求めた。薬剤注射を行わない対照群と比較することにより、AASUの各免疫抑制剤の投与量反応曲線を求めた(Fig. 8)。

なお、参考までに、900 R照射C3H/He系マウスにC3H/He系マウス由来の骨髓細胞を移植し、24時間後にこれらの免疫抑制剤を投与したときの幹細胞量(CFU-S)の障害度を併記した。この結果より、CY及びMTXに対してはAASUの方がCFU-Sよりも障害度が強いが、PREでは逆であることがわかる。理想的な免疫抑制剤は幹細胞(CFU)を障害しないで、免疫適格細胞(AASU)を、よく障害するものであらねばならないから、この点からprednisoloneは不適格で、

Methotrexate がもっとも秀れ、Cyclophosphamide がそれにつぐことになる。

次に、致死率によって、上記の実験を検討した結果について述べる。AASUを10%程度に低下させるCYとMTXの量を選び(CYは、80mg/kg、MTXは16mg/kg)充分量のリンパ節細胞と(1×10^7)と骨髓細胞を移植した後、1.7.17, 24日に薬剤注射をおこなって、致死率を検討した。結果はFig. 9に示すように、MTX注射に

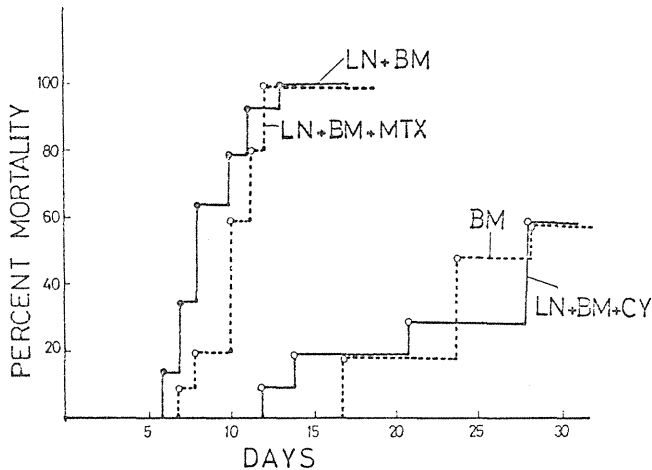


Fig. 9 リンパ節細胞移植後、免疫抑制剤(MTX 16mg/kg; CY80mg/kg)注射をおこなった場合の致死率の変化
LN: Lymph node cells BM= Bone marrow cells
MTX: Methotrexate, CY: Cyclophosphamide

よっては、移植後数日よりおこるGVH反応をおさえきれないのか、薬剤による中毒現象によるのか不明であるが、対照薬剤無処置群との間に差を認めることが出来ない。しかし、CYは著名な延命効果を示し、リンパ節細胞を移植せず、骨髓細胞のみを移植した群とほとんど同様であった。以上の結果は、allogeneicな組合せで、骨髓細胞のかわりに、脾臓細胞を用いておこなったOwens³⁶⁾等の成績が、同様にMTXが無効でCYが有効であったのと良く一致する。MTXがAASUは充分抑制するのに、致死率の実験では有効でない理由は今後検討すべき点であるが、今月、臨床的に臓器移植後の続発症の治療に、主としてMTXが用いられている点²⁴⁾は、再検討すべき点があるのではないかと考えられる。なお、この実験成績で今後に残された問題として、リンパ節細胞移植による早期のGVH反応を免疫抑制剤できりぬけることができても、移植後2週間前後より出現してくる骨髓移植による後期のGVH反応を抑制することが不可能であった点である。免疫抑制剤の選択及び投与法の改良をはかると共に、その発症機序の解析を行なう必要が

今後に残されている。

結 語

syngeneicな組合せを用いる実験動物による造血器移植の実験により、移植の際、有効な役割を果す細胞は造血組織中の幹細胞であり、更なるその幹細胞の宿主体内における経時的な増殖分化の動態を明らかにすることができた。更に、この方法によって、幹細胞量は、colony-forming cell(CFU-S)として、定量的に測定することができる。一方、M. Bennettのalloantigen-sensitive units(AASU)法を用いることにより、allogeneicな組合せの移植の場合の続発症の主因となるgraft-versus-host反応(GVH)に関与する免疫適格細胞を定量的に測定できることを確認した。この2つの定量法を組合せることにより、造血器移植の際、幹細胞の増殖を障害することなく、免疫適格細胞の増殖を抑制するような免疫抑制剤の検索を行なったが、なお今後、この方法を応用することにより、免疫抑制剤の開発のみならず、幹細胞と免疫適格細胞の分離、形態学的識別等をはじめ、骨髓移植に関する種々の問題が、解明されることが期待されるのである。

参 考 文 献

- 1) Nowell, P.C., Cole, L. J., Habermeyer, J. G. and Roan, P. L., *Cancer Research*, 16, 258 (1956)
- 2) Gregusova, V. and Hupka, S., *Neoplasma*, 8, 577 (1961)
- 3) Balner, H., Simmel, E.B. and Clarke, D. A., *Transplantation Bull.*, 29, 427 (1950)
- 4) Jacobson, L. O., Marks, E. K., Gaston, E. O., Robson, H. and Zirkle, R. E., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 70, 740 (1949)
- 5) Jacobson, L. O., Simmons, E. L., Retard, W. F., Markes, E. K. and Robson, M. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 73, 455 (1950)
- 6) Cole, L. J., *Am. J. Physiol.*, 204, 265 (1963)
- 7) Smith, L. H. and Congdon, C. C., *Lab. Invest.*, 10, 719 (1961)
- 8) Popp, R. A., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 104, 722 (1960)

- 9) Goodman, J. W. and Hodgson, G. S., *Blood*, 19, 702 (1962)
- 10) Barnes, D. W. H., Forx, C. E., Gray, S. M. and Loutit, L. F., "Progress in nuclear energy," Series VI. 2 : 1, (Ed. Bugher, J. G., Coursaget, J. F.), London, Pergamon Press, 1, 1959
- 11) Becker, A. J., McCulloch, E. A. and Till, J. E., *Nature*, 197, 452 (1963)
- 12) Ford, C. E., Hamerton, J. L., Barnes, D. W. H. and Loutif, J. F., *Nature*, 177, 452 (1956)
- 13) Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L. and McCulloch, E. A., *L. Exp. Med.*, 127, 455 (1968)
- 14) Whang, J. W., Frei III, E., Tjio, J. H., Carbone, P. P. and Brecher, G., *Blood*, 22, 644 (1963)
- 15) 平嶋邦猛 : 日血会誌, 32, 903 (1969)
- 16) Till, J. E. and McCulloch, E. A., *Rad. Research*, 14, 213 (1961)
- 17) Dunn, C. D. R., *Series Haematologica*, IV, 4 (1971)
- 18) Hendry, J. H., *Cell Tissue Kinet.* 4, 217 (1971)
- 19) Niewisch, H., Vogel, H. and Matioli, G., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58, 2261 (1967)
- 20) Vogel, H., Niewisch, H. and Matioli, G., *J. Cell Physiol.* 72, 221 (1968)
- 21) 平嶋邦猛, 平野真司, 熊取敏之, 高久史磨, 中尾喜久
臨床血液, 9, 642 (1968)
- 22) 平嶋邦猛, 血液と脈管, 1, 1049 (1970)
- 23) Bortin, M. M.: *Transplantation*, 9, 571 (1970)
- 24) 平嶋邦猛, 血液と脈管, 4, 311 (1973)
- 25) Host, H. *Acta Radio.* 4, 337 (1966)
- 26) 伊藤隆明, 滝沢韻一, 伊藤明弘, 山崎孝男, 西原法味
西原益美, 横路謙次郎, 日血会誌, 31, 1082 (1968)
- 27) Harris, E. B. and Aponte, L., *Cell & Tissue Kinetics*, 1, 289 (1968)
- 28) Valeriote, F. A., Collins, P. C. and Bruce, W. R., *Rad. Research*, 33, 501 (1968)
- 29) 平嶋邦猛, 放射線生物, 5, 371 (1970)
- 30) Barnes, D.W.H. and Loutit, J.F.: Spleen protection: the cellular hypothesis. In Radiology Symposium Liege 1954 (Bacq, Z.M. ed.) Butterworths, London, 134, 1955.
- 31) van Bekkum, D.W. and de Vries, M.J.: in "Radization chimaeras", Logospress, London, 79, 1967.
- 32) Trentin, J.J., *Proc. Sloc. Exper. Biol. Med.*, 92, 688 (1957)
- 33) Uphoff, D. E., *J. Nat. Cancer Inst.*, 19, 123 (1957)
- 34) Uphoff, D.E. and Law, L.W., *Rad. Research*, 7, 456 (1957)
- 35) Bennett, M., *Transplantation*, 11, 158 (1971)
- 36) Owens, A.H. Jr. and Santos, G.W., *Transplantation*, 11, 378 (1971)
- 37) Graw, R.G. Jr. et al., *Blood*, 36, 736 (1970)
- 38) Buckner, C.D. et al., *Blood*, 35, 741 (1970)
- 39) Thomas, E.D., Buckner, C.D., Rudolph, R.H. et al., *Blood*, 38; 267 (1971)

IV. 造血器移植の臨床的適用と改善に関する研究

栗 栖 明 高 沢 博
杉 山 始 碓 井 貞 仁
小 泉 利喜雄 平 嶋 邦 猛

Some Clinical Investigation of Bone Marrow Transplantation

Akira KURISU, Hiroshi TAKAZAWA, Hajime SUGIYAMA,
Sadahito USUI, Rikio KOIZUMI and Kunitake HIRASHIMA

For severe bone marrow damage caused by acute whole body irradiation two forms of treatment are available: chronic intermittent blood transfusion and bone marrow transplantation. Some clinical investigation of bone marrow transplantation were performed in this series.

According to the references, the number of bone marrow cells plenty enough to be cured such a patient has been said to be over 1×10^{10} at least. Aspirated and collected bone marrow cells in the plastic bag as practised in blood transfusion with heparinized TC-199 tissue culture medium are available for the transplant as they are.

Storage of collected bone marrow cells can be done by the use of deep freezing. Three units; Slow freezing apparatus (VirTis), Storage freezer (VirTis) and Diluent-reconstitution set (IEC, Huggins cytoglomerator) were prepared for this purpose (Fig. 1, 2 & 3). The thawed cells suspension obtained by the use of the last apparatus can be injected into the recipient through the tubing of an intravenous drip clinically.

Except in identical twins the usual course of an allotransplant is acceptance followed after an interval by rejection. So far as the rejection or G.v.H. reaction is concerned with genetical differences of histocompatibility factors between donor and recipient, the first choice of tissue typing and matching might be directed to the blood relationship. ABO blood groups with possible exception of Q group, other red cell antigens such as Rh and MN are important in bone marrow transplantation. In this series, leucoagglutinin test and mixed lymphocyte cultures are used in practice as histocompatibility test, although the validity of HL-A typing for transplantation has been proved by clinical and experimental observation.

The effect of some weak incompetabilities can easily be overcome by immunosuppressive treatment. Immunosuppression, however, involves the risk of infection and other serious complications. And then it is necessary that the recipient must be nursed in the bio-clean room of intensive care unit. A bio-clean room for one patient was reconstructed from an ordinary room for four patients at this time (Fig. 4). The results of an examination relating to the cleaning capability of this system are listed in table 1.

Bone marrow transplantation should only be carried out in specialized centres and by experienced teams, and should be reserved for those patients in whom the hope for their survival will not be compromised.

はじめに

急性放射線死の一因に骨髄死があげられている。この場合、骨髄造血の回復が個体の死に密に関連することはいうまでもない。また、これには個体の神経体液性調節機能等の関与も重要であろう。いずれにしても、このような患者の治療としては、温存的に輸血を繰返すか積極的に骨髄移植を試みるか、どちらかを早い時期に選ばなければならない。しかしながら、骨髄移植療法は今日の日常臨床のなかで単純に適用されるのには、まだ種々の問題点を残している¹⁾²⁾³⁾。

同種臓器移植における組織型適合の問題も、その一つである。ヒトの臓器移植のなかで、今日最も大きな成功をおさめているのは腎移植である。腎機能の廃絶した患者における人工透析の長期使用の有用性は捨てがたいが、それにも自ら限界があるばかりでなく、種々の合併症の発生が憂慮されている。それに比べて、腎移植は成功すれば患者にとって大きな光明となる。肝、心、肺、脾などは、大きな臓器の同種移植はまだ腎の場合のような比較すべきものをもっていない。小組織片、たとえば小さな皮膚欠損は自家移植が行なわれ極めてよく治癒する。同種移植でも角膜、軟骨、骨、心弁膜の場合のように長期生着が成功して価値の高いものもある。これらの組織では、種々の理由で移植成功率も高いが、完全に組織型適合を無視してもよいというわけではない。これら各種の臓器組織の移植に比べて、骨髄移植は移植片のなかに多量の免疫適格細胞を含んでいるという点で組織型適合の一層の重要性と臨床的適用上の困難性をもっている。

組織型の不一致は拒否反応を招く。これに対処する手段として、あらかじめ行なわれる精細な型合せや後に続けられる免疫抑制療法は一卵性双生児相互間の移植の場合のはかは、欠かすことのできない要素である。免疫抑制は患者に感染の危険度や特定の腫瘍発生の頻度を増加させ、種々の合併症さえ発生させうるので、一方では患者を持続的に危険な状態に準備づけるという結果にもなる⁴⁾⁵⁾。したがって、免疫抑制の実施にあたっては、できるだけこれを軽度で止めるよう工夫する必要があるとともに、無菌病室の設置が強く要望される。

以上のような問題点をふまえて、本研究は昭和44年から47年度まで、造血細胞の採取とその保存法、組織適合性の判定法および無菌病室の設置に関し研究を進め、一応の成果をおさめたので報告する。

研究目的

すべての医療行為は、safty first でなければなら

ない。本研究の目的は、上述の諸問題をふまえて、他の基礎研究グループでの研究成果と相俟って、文献上にも急性重症放射線症に対して極めて有効と考えられている造血器移植を臨床的に安全に適用しよう、その治療技術を改善して患者救命対策に資することにある。

研究結果と考察

(1) 造血細胞の採取とその保存法

一般成人における同種骨髄移植療法を実施する場合、有効必要量最少限の細胞数は 1×10^{10} とされている¹⁾²⁾。日常临床上、診断の目的で骨髄穿刺が行なわれる。この場合、採取される骨髄液量は診断目的によっても異なるけれども0.5mlから10mlまでである。通常の診断目的で行なわれる骨髄穿刺により採取される有核細胞数は日本人の場合、老年者でも $5.5 \times 10^4 \sim 25 \times 10^4 / \text{mm}^3$ 、平均約 $13 \times 10^4 / \text{mm}^3$ とされている⁶⁾。1回の穿刺吸引摂取量が多くなればなるほど末梢血液の混入が増加するので、単位容積当りの細胞数は減少することになる。いま、1箇所から1回に5mlの骨髄液を採取するとして、仮にその時の有核細胞数が $10 \times 10^4 / \text{mm}^3$ であるとすれば、採取された有核細胞総数は 5×10^8 となる。したがって、上記の有効必要量を確保するためには、少なくとも20箇所から20回にわたり採取する必要があり、液量としても100mlを超えることになる。この場合、donorのうける苦痛は無視できないので、全身麻酔の準備も必要とされ

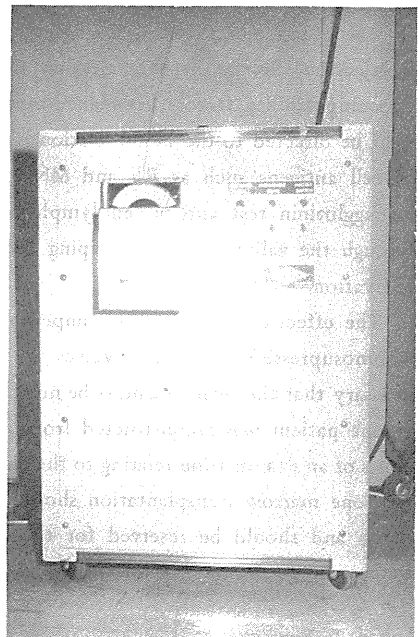


Fig. 1. Slow freezing apparatus (VirTis).



Fig. 2. Storage freezer (VirTis).

る。通常は30分位で終るので静注用短期麻酔剤の使用でも間に合う。採取液は10単位/mlのヘパリン加TC-199組織培養液とその都度混じり、輸血用のプラスチック製バッグに集めれば、直ちに輸血用セットに接続して点滴静注に供しうる。

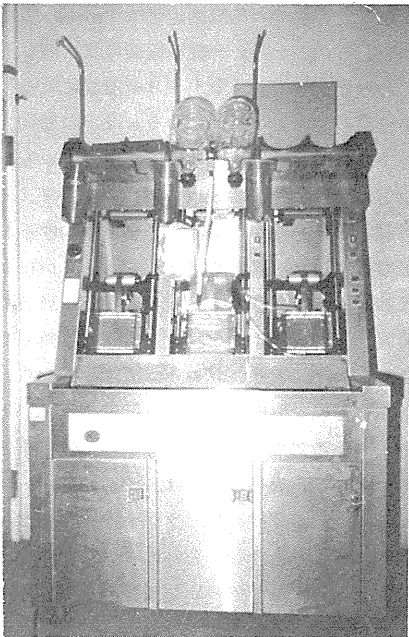


Fig. 3. Diluent-reconstitution set (IEC, Huggins cytoglomerator)

自家移植あるいは将来のための各種の組織型の骨髄細胞を貯蔵する必要がある場合には冷凍保存する⁷⁾。この場合は、上記骨髄細胞浮遊液をあらかじめグリセロール添加浮遊液として後、緩速冷凍装置 (Fig. 1) 内で -20°C まで冷凍し、直ちに超低温槽内 (Fig. 2) に -80°C で保存する。長期保存のためには温度の低い方がよいとされ、 -80°C では通常3年、 -120°C ～ -196°C ではそれ以上の長期保存も可能とされている⁸⁾。冷凍保存の骨髄細胞は、用に臨み解凍、洗滌、再浮遊液と精製される必要がある。この一連の操作を機械的刺激による細胞破壊をできるだけ少なくし、円滑に行なうため冷凍血液処理装置 (Fig. 3) が用いられる。精製された細胞浮遊液はさきの場合と同様に、輸血用セットを用い点滴静注される。近年プラスチック製の医療器具におけるフタル酸エステルの毒性が論議されているので¹⁵⁾、とくに長期保存に供する場合考慮する必要がある。なお、保存容器としてステンレス製のうすいボックスもあって、凍結速度も一層速いものが市販されている。

(2) 組織適合性試験

骨髄移植の安全実施には、donorとrecipientとの間の組織型適合の確認が極めて重要である。組織適合性試験には、種々の方法が提案されてきた。今回は、千葉大学第2外科における臓器移植研究グループの協力を得て、一般血液型についてはABO, Rh, MN及びQの各型について、また組織型については白血球凝集反応、リンパ球混合培養試験のふたつをとりあげることにした¹⁶⁾¹⁷⁾。

臓器移植が成功するための第一の要因は、donorとrecipientとの間の密な抗原関係である。組織細胞の抗原性の決定が遺伝子の支配下にあることが明かにされている以上、止むを得ない場合のほかは、recipientの同胞血族のなかにdonorの撰択を求めるのが賢明といえよう。臨床的に重要なことは、組織型適合性試験とは組織型の細かいtypingという意味ではなくて、matchingがどこまで有意に条件づけられかということである。

なお、この場合、donorについてはあらかじめAu-抗原、血清梅毒反応、肝機能など一般状態についてのチェックの必要なことは一般的輸血の安全実施の場合の考慮と同様である。

1968年、WHOの免疫部門では、欧米のエキスパートによる組織適合性試験についての会議を開き、ヒトのMHS (major histocompatibility system) にはHL-A systemを採用することに決定し、その定義づけについての公報も発表した^{18)～21)}。その目的と

するところは、臓器移植術の世界的普及の傾向がみられる反面、HL-A phenotypes の相対率が1:1,000以上でないという事柄から、移植可能な臓器の国際交換も可能にすることを旨としたもので、そのためのいわば基本的事項としてとりあげられたものであった。その後も会議を重ねられ、1972年にも組織適合性についての第5回 workshop が開かれており、その結果をまとめたテキストも発表されている²²⁾。

いずれにしてもこのような現状は、ヒトにおいては組織適合性が完全に一致したペアを見出すことは極めて困難事であるということの一端を示しているものとも考えられ、骨髄移植療法自身についてもその実施にあたっては十分慎重であらねばならないことを物語っている。

(3) 無菌病室の設置

一般的血液型およびHL-Aなど組織型の typing が、donor と recipient との間でたとえ match した結果を示したとしても、今日の段階ではこれだけですべての因子での適合性に対し保証済みということではなく、minor factor でのとりこぼしは免れず、これによる型不適合のための拒否反応の予想は考慮されねばならない。しかしながら、このような抗原性の弱い相異性による影響は、免疫抑制療法を加えることによって抑止できる可能性はある。また、骨髄移植の場合はその特殊性として、移植片のなかに多量の免疫適格細胞が含まれている関係上、これによるGVH反応も考慮の上で、免疫抑制措置は必要不可欠の安全治療対策の一つといえるかもしれない。

免疫抑制療法は、患者を易感染状態にすることは前に述べたとおりであり、入院治療中の患者が耐性菌による院内感染をおこし死亡するという事例も少なからず散見される今日の一般病院の環境状況からも、骨髄移植の施されるような患者の場合には、無菌病室の設置がとくに強く要望される。

無菌病室は、本来は5床位を単位とした独立した病棟として設置されることが望ましい。そこにはメジカル、パラメジカルを含む特殊の医療チームの編成が不可欠であるからでもある。今回設置した無菌病室は諸般の事情からこのような理想からはやや遠いものであるが、一応の目的は達しうものとする。

設置場所としては、従来のR1診療センター内の4床用病室を改造してこれに当てた。それには、場合によっては汚染を伴った被曝患者の入院もありうることを考慮したという理由がある。規模及び各部分の配置の概略は Fig. 4 に示すとおり1床用である。クリーンルームの

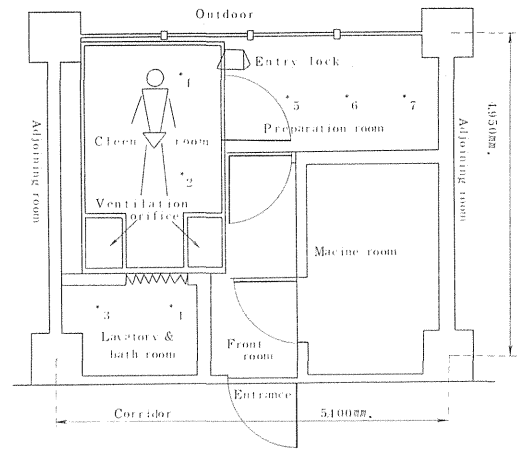


Fig. 4. Distribution sketch of each area in the reconstructed bio-clean room system.

* : shows the place estimated dust reduction degree.

ほか機械室、前室、準備室ならびに洗面トイレ浴室が、やや無理な形で配置されている。図の上方が窓外、下方が廊下となっている。騒音防止のため機械室の壁は防音装置が施されている。クリーンルームは風速 0.5m/sec の垂直フロー型で、室温は $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ に、湿度は $50\% \pm 5\%$ になるよう自動調節機構がとり入れてある。

ROYCO-220型塵埃測定器による床上90cm高での※印1~7の各部位での塵埃測定値はTable.1に示したとおりであるが、たとえ一般の服装のままのヒトが準備室まで入ったとしても、※1~3の部位においては米国航空宇宙局の基準に示された 0.5μ 以上の塵埃0というクラス100を満足するだけの性能を保っている。患者の食事などの挿入口としてentry lock (ダクトボックス) が設けられ、ここには殺菌灯をとりつけるとともに部屋圧の差により、風向もクリーンルームから準備室方向に流れるよう工夫されている。このほか患者監視用テレビ装置、インターホンを設置し治療看護処置の必要ある場合は、クリーンルームには誰も立ち入らないよう厳重に患者を隔離できるよう配慮されている。

長期にわたる患者の隔離は、患者の孤独と不安を助長する怖れもある。このためには、クリーンルームをもっと広くし室内歩行やテレビ、ラジオの視聴もできるように設備すべきであろうし、窓外には面会用の廊下を設け、面会人は窓越しにインターホンで会話もできるような配慮すること等も必要と考える。飲食物の滅菌、浴用湯水、便器等の滅菌法など今後の工夫に俟つところも少なくない。

Table 1. Degree of dust reduction estimated by the apparatus ROYCO-220 at 900 mm. in height above the floor

Place (*)	Time (min.)	Over 0.5 μ				Over 5.0 μ			
		1st	2nd	3rd	Mean	1st	2nd	3rd	Mean
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
3	20	0	0	0	0	0	0	0	0
4	30	240	260	150	220	0	0	0	0
5	40	2370	3840	2580	2930	670	1090	660	860
6	50	120	230	330	230	10	50	80	47
7	60	0	0	0	0	0	0	0	0

おわりに

以上、骨髓移植の放射線障害の臨床への適用について、より安全性の高い治療法が施されるよう、種々検討した結果の概要を報告した。現状がすべて満足すべきものであるとは、決して考えていない。今後なお改善と工夫を要する面も多々残されている。

本治療法の患者への適用にあたっては、あらかじめその適応について十分な討議が必要とされ適用決定は十分に慎重であることが望まれる。また、施設設備の整備はもちろん、メジカル、パラメジカルを含めたスペシャリストによる協力態勢が是非必要と考える。

参 考 文 献

- 1) Mathé, G. et al.: Bone marrow transplantation and leucocyte transfusions. Springfield, Illin. 1971, p.33.
- 2) Thomas, E.D. et al.: Technique for human marrow grafting. *Blood*, 36, 507 (1970)
- 3) Herbich, J.: Rechtliche Fragen zur Organtransplantation. *Wien. Klin. Wochenschr.* 84, 668 (1972)
- 4) Graw, R.G. Jr. et al.: Bone marrow transplantation from HL-A matched donors to patients with acute leukemia. *Transplantation*, 14, 79 (1972)
- 5) Penn, I. et al.: Malignant tumors arising de novo in immunosuppressed organ transplant recipients. *Transplantation*, 14, 407 (1972)
- 6) 前川 正はか: 老人血液像, 日血全書 I, 丸善, 東京, 1963, p. 175.
- 7) Polge, C. et al.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 666 (1964)
- 8) Malinin, T.I. et al.: Long-term storage of bone marrow cells at liquid nitrogen and dry ice

temperatures. *Cryobiology*, 7, 65 (1970)

- 9) Huggins, C.E.: Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide. *Transplantation*, 3, 483 (1963)
- 10) Pyle, H.E. et al.: Factors influencing the post storage viability of human bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 114, 686 (1964)
- 11) Huggins, C.E.: Frozen blood; Theory and practice. *JAMA*. 193, 941 (1965)
- 12) 三浦 健はか: 冷凍保存血輸血, 日医師会誌, 57, 1635 (1967)
- 13) 隅田幸男: 冷凍血液輸血, 日本医事新報社, 東京 1972
- 14) Adamson, J.W.: The proliferative potential of frozen stored human marrow cells. *Transplantation* 14, 490 (1972)
- 15) 片瀬隆雄: フタル酸系可塑剤は安全か, 科学 42, 349 (1972)
- 16) 岩崎洋治: 臓器移植の可能性—特に組織適合性を中心に— 臨床外科, 23, 609 (1968)
- 17) 佐藤 博はか: 臓器移植のための組織適合性試験, 外科, 31, 1622 (1969)
- 18) Amos, D.B.: Human histocompatibility locus HL-A. *Science*, 160, 659 (1968)
- 19) WHO, Immunology, Nomenclature Committee: Nomenclature for factors of the HL-A system. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39, 483 (1968)
- 20) WHO, Immunology, Basic requirements for the international exchange of transplantable organs. *Wld. Hlth. Org. Memoranda* 909, 1968.
- 21) Dausset, J.: Similarities between the HL-A system and other immunogenetic systems. *Vox Sanguinis*, 23, 153 (1972)
- 22) WHO, Immunology: Nomenclature for factors of the HL-A system. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 47, 659 (1972)

V. C V H 反応による赤血球分化の抑制

北 村 幸 彦

Suppression of Erythropoiesis by Simultaneous Proliferation of Alloantigen-Sensitive Units

Yukihiko KITAMURA

Parental (CBA-T6T6) cells were injected into (DS X CBA-T6T6) F₁ hybrid mice following varying doses of irradiation. Proliferation of erythropoietic cells was assayed by ⁵⁹Fe uptake in the spleen and that of alloantigen-sensitive units (AASU) by 5-iodo-2'-deoxyuridine-¹²⁵I uptake. Erythropoietic differentiation of parental bone marrow cells was suppressed when the cells were injected with lymph node cells or thymus cells and there were inverse relationship between the proliferation of erythroid cells and that of AASU. The change of erythropoietic microenvironment seemed to have more important role than humoral erythropoiesis stimulating factor in the present phenomenon, because the suppressed erythropoiesis of the mouse remained to be suppressed even if the mouse was being joined in parabiosis with another mouse, in which the erythropoiesis was not suppressed so markedly. As the change of local environment, the activating process of AASU was essential rather than activated AASU itself or other active substance produced by AASU, because re-irradiation (830 R) of the host abolished the suppressing effect of the previously injected and activated lymph node cells and because the erythropoietic differentiation of the marrow cells mixed with the activated AASU was not suppressed when the cells were injected into irradiated CBA-T6T6 mice.

はじめに

graft-versus-host (GVH) 反応は宿主 (host) の造血・リンパ組織に機能的及び形態的に種々の変化をひきおこす¹⁾。この変化の程度は、多くの要因により左右される。例えば宿主の年齢、宿主と供与者との間の組織適合抗原の差異の程度、宿主に行なう前処置の種類と強さ、注射される供与者の細胞数などが異なることの変化の程度、時にはその質さえも変わる。例をあげると、X線照射をうけていない成熟マウスに中等度のGVH反応をひきおこすと、抗体産性²⁾³⁾や赤血球生産⁴⁾の程度はしばしば上昇する。しかしながら、注射する細胞の量をふやすとか、宿主にX線照射を行なうとかして、GVH反応の程度を相対的に強めると、抗体産生⁵⁾や赤血球形成能⁶⁾はGVH反応により強く抑制される。GVH反応によりhostの造血・リンパ組織が障害されるのは、これらの組織を構成する細胞がGVH反応をひきおこす免疫適格細胞の標的であることを考えれば、むしろ容易に理解される。しかしながら、GVH反応によって影響されるの

は、hostの造血細胞のみではなく、GVH反応をひきおこした免疫適格細胞と同じ供与者より由来する造血細胞の増殖と分化もまたGVH反応の影響をうける。

Davisら⁷⁾は供与者の造血幹細胞の赤血球への分化は、造血幹細胞に免疫適格細胞を加えて、供与者とはH-2の異なる宿主に移植する時、著明に抑制されることを見出した。われわれも脾コロニーの分化パターンを半連続切片で観察することにより、GVH反応が同時におこる場合、造血幹細胞の分化パターンは赤血球系より顆粒球系へかたむくことをすでに報告した⁸⁾⁹⁾。組織学的方法は赤血球系、顆粒球系、巨核球系の分化を同時に、かつ確実に同定出来る長所を持っているが、きわめて複雑であり大量の動物をあつかうのに適さない。本研究では、⁵⁹Feの脾へのとりこみで、幹細胞の赤血球への分化の程度を判定し、GVH反応の際の供与者由来の造血幹細胞の赤血球分化への抑制の作用機構を明らかにすることをめざした。

2. 材料と方法

マウス DST6F₁ (DSXCBA-T6T6) マウスと、CBA-T6T6 マウスを用いた。DS マウスは、CBA-T6T6 マウスとはH-2の異なる近交系マウスで、実験時、64-69代であった。オス及びメスのマウスを9-12週令で使用した。

X線照射 190KV, 15ma, 0.5mm Co + 0.7mm Al のフィルター使用, 照射距離42cm, 69R/min. の条件で宿主を全身照射した。

細胞浮遊液 細胞は Eagle 液に浮遊させ、0.2-0.5ml の量で、尾静脈より、X線照射後3時間以内に注射した。2×10⁷以上の細胞を注射する際には、あらかじめ50 I.V. のヘパリンを腹腔内注射しておいた。

細胞の分化と増殖の測定 赤血球への分化量は脾における⁵⁹Feのとりこみで測定した。細胞注射後7日目にクエン酸バッファー (PH 6.5) にかした⁵⁹Fe 0.1 μC を皮下注入、6時間後にマウスを殺して、脾への放射能のとりこみをウェル型シンチレーションカウンターで測定した⁶⁾。免疫適格細胞の増殖は、リンパ節細胞または胸腺細胞の注射後4日目に、脾への¹²⁵IudR (¹²⁵Iでラベルした5-iodo-2'-deoxyuridine) のとりこみで、測定した¹⁰⁾¹¹⁾。この場合マウスは¹²⁵IudR 注射後16時間目に殺した。結果は、注射した全放射能に対する脾への取りこみをパーセントであらわした。

染色体解析 リンパ節細胞を注射したマウスに、4日後コルヒチン (0.04 mg/マウス) を静注し、その2時間後に殺した。脾の染色体標本は Kuritara の方法によって作製した¹²⁾。

パラビオーゼ パラビオーゼは Bunster と Meyer¹³⁾ の方法で行なったが、腹腔はひらかなかつた。X線照射と細胞の注射は手術後4週間してから行なった。パラビオーゼされたマウスの各々への照射量が異なる場合には一方をある時間だけ鉛で遮蔽した。しかしながらどの実験群でも、各々のパラビオーゼされたマウスに対する注射細胞量は常に同じになるようにした。

3. 結果

1. 宿主のX線照射量と、骨髄細胞に加えるリンパ節細胞の量の赤血球分化に対する影響

DST6F₁ マウスに210-830 RのX線照射を行ない、0.5×10⁶コのCBA-T6T6の骨髄細胞単独、あるいは同数の骨髄細胞に0.25×10⁶-4×10⁶コのリンパ節細胞を加えて注射、7日後における脾への⁵⁹Feのとりこみを測定した。骨髄細胞単独で注射した場合は、宿主の照射量

が変化しても、⁵⁹Feのとりこみは同程度であるが、リンパ節細胞を加えた場合には、⁵⁹FeのとりこみはX線照射量によって変化し、照射量が増すほどとりこみ量が減少する (Fig. 1)。

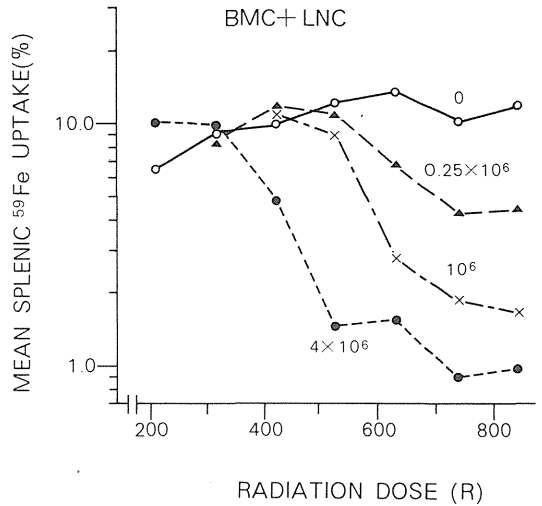


Fig. 1. The splenic ⁵⁹Fe uptake values in DST6F₁ mice, receiving irradiation (210-830 R) and parental cells (0.5 × 10⁶ BMC alone or the mixture of 0.25 × 10⁶ or 10⁶ or 4 × 10⁶ LNC and 0.5 × 10⁶ BMC). Each point was the mean of 6-8 mice.

この場合、⁵⁹Feのとりこみ量は、宿主であるDST6F₁マウスの内因性幹細胞の増殖と、移植されたCBA-T6T6マウスの骨髄細胞中の幹細胞の増殖との和であるはずで、⁵⁹Feのとりこみ減少は、単にDST6F₁の内因性幹細胞が、CBA-T6T6のリンパ節中に含まれる免疫適格細胞によって、その増殖を抑制された結果かもしれない。そこで、次の実験では、CBA-T6T6のリンパ節細胞のみを、210-830 R照射したDST6F₁マウスに注射し、免疫適格細胞の内因性幹細胞の増殖に対する影響をしらべた (Fig. 2)。

Fig. 1とFig. 2に示した値よりCBA-T6T6由来の幹細胞の赤血球分化の程度を次式のようにして計算し、Fig. 3に示した。

$$\text{Erythropoiesis by injected BMC} = \frac{{}^{59}\text{Fe uptake value of mice receiving BMC and LNC} - {}^{59}\text{Fe uptake value of mice receiving LNC alone}}$$

Fig. 3に示したように、宿主のX線照射量が410 R以

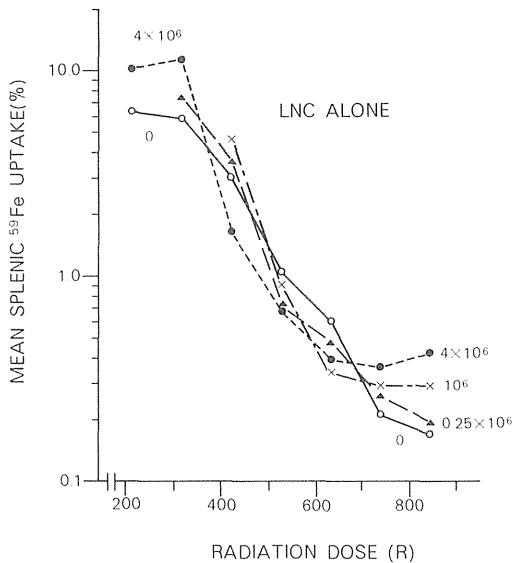


Fig. 2. The splenic ^{59}Fe uptake values in DST6F₁ mice receiving varying doses of irradiation and parental LNC (0.25×10^6 , 10^6 and 4×10^6). Each point was the mean of 5-7 mice.

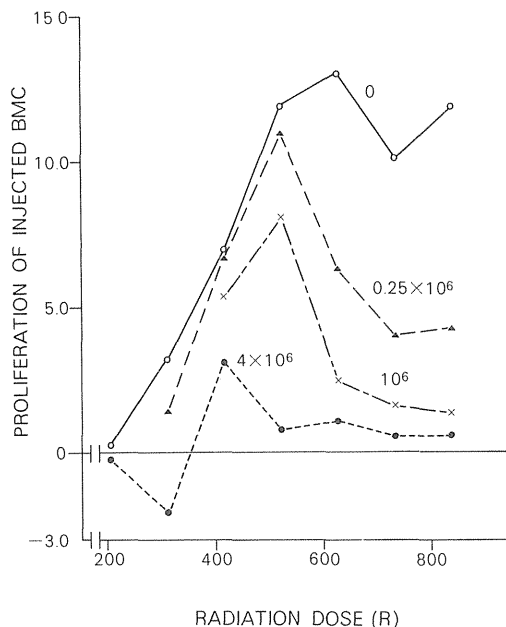


Fig. 3. Effect of varying doses of irradiation and parental LNC on the erythropoietic differentiation of parental BMC in DST6F₁ mice. The values were calculated from the data shown in Fig. 1 and Fig. 2.

下だと、内因性幹細胞の増殖量が大きく、外来の幹細胞の増殖を評価することが困難である。1方照射量 520 R 以上では、リンパ節細胞を加えることによって CBA-T6 T6 マウスの幹細胞の赤血球分化が抑制される。

2. 免疫適格細胞の増殖の程度と赤血球分化抑制の関係

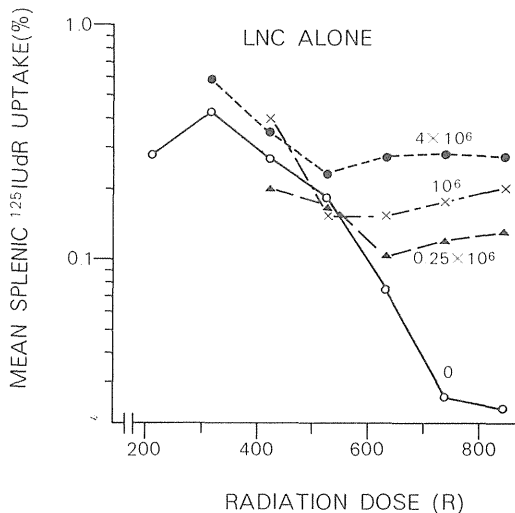


Fig. 4. The splenic $^{125}\text{IUdR}$ uptake values in DST6F₁ mice receiving varying doses of irradiation and parental LNC (0.25×10^6 , 10^6 and 4×10^6). Each point was the mean of 10-14 mice.

210 R - 830 R 照射した DST6F₁ マウスに種々の量の CBA-T6 T6 マウスのリンパ節細胞を注射後 4 日目に脾における $^{125}\text{IUdR}$ のとりこみを測定した。細胞の注射をうけなかったマウスでは、X線照射量が増すほど、 $^{125}\text{IUdR}$ のとりこみは減少するが、リンパ節細胞を注射した場合には、520 - 830 R の照射範囲で、とりこみ値は変わらなかった。(Fig. 4) $^{125}\text{IUdR}$ のとりこみ値は注射された免疫適格細胞の増殖量と宿主の細胞の増殖量の和であるが、赤血球系細胞を主とする⁸⁾ 宿主の細胞の増殖は、免疫適格細胞により色々の程度で抑制されるので⁹⁾ (Fig. 2), 免疫適格細胞のみの増殖は次のようにして求めねばならない。

免疫適格細胞 (AASV) の増殖

= 脾の $^{125}\text{IUdR}$ のとりこみ

× 増殖する CBA-T6 T6 の細胞
増殖細胞の全数

ここで、増殖する CBA-T6 T6 の細胞の割合は、染色体

Table 1. Origin of dividing cells in the spleen of DST6F₁ mice irradiated and injected with LNC of CBA-T6T6 mice 4 days earlier

Radiation dose (R)	LNC dose ($\times 10^6$)	No. of mice	% of CBA-T6T6 cells (mean \pm SE)
520	0.25	4	55 \pm 2
	1	4	68 \pm 5
	4	4	99 \pm 1
620	0.25	4	100
	1	4	100

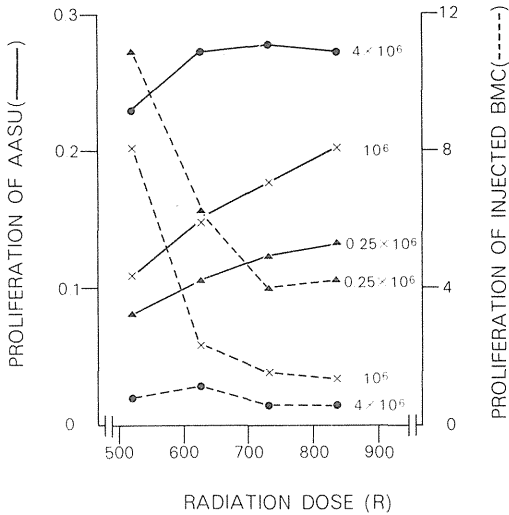


Fig. 5. Interrelation between the proliferation of parental AASU and that of parental erythropoietic cells (Fig. 3) in DST6F₁ mice receiving varying doses of irradiation and parental LNC. The values of AASU proliferation was calculated from the data shown in Fig. 4 and Table I.

解析で、T6T6のマーカー染色体を数えることによってえられた (Table. 1)。Fig. 4とTable. 1に示した値より免疫適格細胞の増殖の程度を計算し、Fig. 3に示した赤血球分化の程度を示す数値とともにFig. 5に目盛った。免疫適格細胞の増殖が多い時には、同時に注射された幹細胞の赤血球への分化がより強く抑制される。

3. 胸腺細胞とリンパ節細胞の比較

胸腺細胞によってGVH反応をおこした時の造血幹細胞の増殖と分化の様式についてはさまざまな報告があるので¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、次の実験ではこの実験系における胸腺細胞とリンパ節細胞の比較を行なってみた。DST6F₁マウスに830 R照射し、胸腺細胞又はリンパ節細胞のみを

注射したマウスでは4日目に¹²⁵IUdRのとりこみをはかり、 0.5×10^6 コの骨髓細胞に、胸腺細胞またはリンパ節細胞を混ぜて注射したマウスでは7日目に⁵⁹Feのとりこみを測定した。この条件では、胸腺細胞は赤血球分化を抑制するが、その効率はリンパ節細胞の約 $1/20$ であった。また、胸腺細胞を用いた場合にも、脾における¹²⁵IUdRと⁵⁹Feのとりこみには逆相関の関係があった (Fig. 6)

4. 局所における抗原刺戟の必要性

Elkinsによると、腎の局所GVH反応は、あらかじ

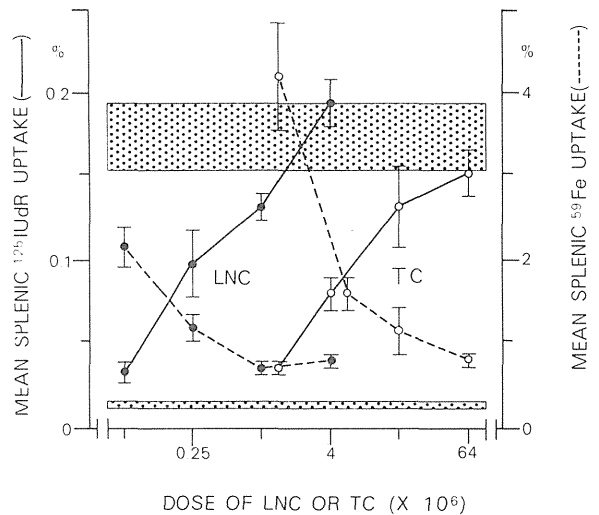


Fig. 6. Comparison of the potential to suppress the erythropoiesis between LNC and TC. Each point was the mean of 5-8 DST6F₁ mice receiving irradiation (830 R) and parental cells. The upper hatched area indicated the mean \pm SE of ⁵⁹Fe uptake values for 8 mice receiving 0.5×10^6 BMC alone. The lower hatched area indicated the mean \pm SE of ¹²⁵IUdR uptake values for 13 mice receiving irradiation alone.

Table 2. Splenic uptake of ^{59}Fe and $^{125}\text{IUdR}$ in parent to F_1 chimeras and control mice

Primary injection*		Secondary injection**		No. of mice	Mean uptake value \pm SE	
($\times 10^6$)		($\times 10^6$)			^{59}Fe	$^{125}\text{IUdR}$
LNC	BMC	LNC	BMC			
4	2	4	0	6		0.06 \pm 0.01***
4	2	0	0.5	6	9.19 \pm 50****	
4	2	4	0.5	8	6.32 \pm 0.98****	
0	0	4	0	9		0.25 \pm 0.01***
0	0	0	0.5	6	9.39 \pm 0.50***	
0	0	4	0.5	8	1.06 \pm 0.12****	

* Parental cells were injected after 520 R-irradiation.

** Parental cells were injected after 830 R-irradiation.

*** $P < 0.001$

**** $P > 0.1$, when adjacent two values were compared by Student's t test.

め宿主を照射しておくとおこななくなるので、この反応をおこすためには宿主の末梢白血球による抗原刺戟が必要である¹⁷⁾。この場合、腎実質の細胞も移植抗原を持っているにもかかわらず有効な抗原刺戟とはならない。一方、われわれの実験系では 830 R の照射後においても、免疫適格細胞は、脾で増殖し自分と同じ組織適合抗原をもつ造血幹細胞の赤血球分化を抑制する。そこで、われわれの系において免疫適格細胞を刺戟する細胞の性質を知るために、キメラになったマウスを用いて、次のような実験を行なった。まず、DST6F₁ マウスに 520 R 照射し、① CBA-T6T6 のリンパ節細胞 4×10^6 コのみ、② CBA-T6T6 のリンパ節細胞 4×10^6 コと骨髄細胞 2×10^6 コ、③ Eagle 液のみを注射した。リンパ節細胞のみを注射したマウスは全例 20 日以内に死亡し、組織学的にしらべても、その脾に造血系をみとめなかった。リンパ節細胞と骨髄細胞の注射を受けたマウスの 65% が 60 日目にも生存していたが、われわれがすでに報告した、これとよく似た実験条件の時⁹⁾、細胞注射後 10 日目に脾で増殖している細胞のほとんど全部が CBA-T6T6 由来であったので、60 日以上生存した DST6F₁ マウスは、キメラとして使用した。Eagle 液を注射したマウスは全例 60 日以上生存したので、対照として用いた。キメラ及び対照のマウスに 830 R の照射をおこない、リンパ節細胞単独、骨髄細胞単独、及びリンパ節細胞と骨髄細胞を混合して注射した。キメラのマウスにおいては、 $^{125}\text{IUdR}$ で測定した免疫適格細胞の増殖は、 ^{59}Fe のとりこみで測定した赤血球分化を抑制するほどには充分多くなかった。(Table 12)。したがって、免疫適格細胞に抗原刺戟を与える細胞は(少なくとも短期的には)放射線抵抗性ではあるが、リンパ節細胞と骨髄細胞の移植によっておきかえることの出来る細胞であるように思われる。

5. パラビオーゼの効果

赤血球分化の抑制に、エリスロポイエチンの分泌減少あるいは抗エリスロポイエチンの産生といった体液性の要因が関与していないかどうか、パラビオーゼを用いて実験してみた。パラビオーゼされた 2 匹の DST6F₁ マウスの右側のマウスには 830 R、左側には 520 R を各々照射して、両方のマウスに CBA-T6T6 マウスのリンパ節細胞 1.5×10^6 コと骨髄細胞 0.5×10^6 コを注射した。脾の ^{59}Fe のとりこみは 830 R 照射された方の群で有意に低く、その値は両側のマウスに 830 R 照射して同量の細胞を注射したマウスの脾におけるとりこみ値と同程度であった。一方、520 R 照射された方のマウスの ^{59}Fe とりこみ値は、両方に 520 R の照射をうけたパラビオーゼマウスのとりこみ値と変わらなかったので (Table 3) パラビオーゼによって、脾における赤血球分化の程度は影響をうけないことがわかった。

右方と左方で、照射量が異なり、赤血球分化の程度もちがうような時においても、左右の血流の交換は充分行われていることを明らかにするために、新しくつくられた赤血球の分布をしらべてみた。この場合には、 $0.5 \mu\text{C}$ の ^{59}Fe を左右のマウスに注射し 6, 24, 48 時間後における赤血球と、脾へのとりこみを測定した。Table 4 に示すように、脾における赤血球の生産量は異なるが、新しく造られた赤血球は左右に同じように分布するので、パラビオーゼによる血行は保たれていると思われる。

6. リンパ節細胞と骨髄細胞の注射の時間的間隔

前節までに述べた実験においては、リンパ節細胞と骨髄細胞は常に同時に注射されていたが、本節では、同時に注射することが必要なかどうかを検討する。Table 5 に示したように骨髄細胞注射後、2 日以内にリンパ節細胞を注射した場合には、骨髄細胞の注射後 7 日目に測

Table 3. Effect of parabiotic union on the splenic erythropoiesis of each parabiont

Group	Side of parabiont	Radiation dose (R)	No. of cells ($\times 10^6$)		No. of mice	Splenic ^{59}Fe uptake* (mean \pm SE)
			LNC	BMC		
1	Right	830	1.5	0.5	6	1.36 \pm 0.21
	Left	520	1.5	0.5	6	4.34 \pm 0.59
2	Right	830	0	0.5	6	8.72 \pm 1.01
	Left	520	0	0.5	6	8.80 \pm 1.13
3	Right	830	1.5	0.5	5	0.93 \pm 0.23
	Left	830	1.5	0.5	5	1.03 \pm 0.10
4	Right	520	1.5	0.5	5	4.20 \pm 1.02
	Left	520	1.5	0.5	5	4.01 \pm 0.39

* When ^{59}Fe uptake values of right parabionts were compared with those of left parabionts, $P < 0.01$ in group 1; $P > 0.7$ in group 2, 3, 4.

Table 4. Distribution of newly-formed erythrocytes across the parabiotic union*

Hrs after ^{59}Fe injection	Side of parabiont	Radiation dose (R)	No. of mice	^{59}Fe uptake (mean \pm SE)**	
				Spleen	Erythrocytes***
6	Right	830	5	3.04 \pm 0.51	1.08 \pm 0.26
	Left	520	5	7.33 \pm 1.24	0.98 \pm 0.26
24	Right	830	6	1.88 \pm 0.18	2.25 \pm 0.39
	Left	520	6	3.41 \pm 0.35	2.07 \pm 0.40
48	Right	830	6	1.12 \pm 0.14	2.48 \pm 0.42
	Left	520	6	2.57 \pm 0.27	2.29 \pm 0.33

* All parabionts were injected with 10^6 LNC and 0.5×10^6 BMC of parental origin.

** When the values of right parabionts were compared with those of left parabionts, $P < 0.05$ in the spleen; $P > 0.7$ in erythrocytes.

*** Erythrocytes contained in 0.3-ml blood.

Table 5. Effect of LNC injection on the splenic ^{59}Fe uptake when LNC were injected after BMC injection*

Injection of LNC	Day of LNC injection	No. of mice	Splenic ^{59}Fe uptake
No		11	4.20 \pm 0.68
Yes	0	6	0.71 \pm 0.16
Yes	1	6	0.68 \pm 0.04
Yes	2	5	1.05 \pm 0.16
Yes	3	6	5.58 \pm 0.75
Yes	4	5	3.86 \pm 0.23

* 0.5×10^6 BMC were injected following 830 R-irradiation on day 0.

定した赤血球への分化は抑制されていた。

一方、520 R照射し、 4×10^6 コのリンパ節細胞を注射1, 2, 3, 4, 5日目に骨髄細胞を注射すると、赤血球分化は抑制されるが、骨髄細胞を注射する前に、宿主にもう1度830 R照射すると赤血球分化は抑制されることなく、むしろ亢進する (Table 6)。したがって、リンパ節細胞と骨髄細胞は同時に注射される必要はないが、免疫適格細胞が増殖能力を持ちつづけることが、赤血球分化の抑制のためには必要と思われる。

7. 活性化された免疫適格細胞の影響

免疫適格細胞を組織適合抗原により一度活性化した後、第2の宿主に移植する実験を次に行なった。まず、DST 6 F₁ マウスに830 R照射しCBA-T6T6のリンパ節細胞 4×10^6 コを注射、4日目にこのDST 6 F₁ マウスを殺してその脾をとり出し活性化された免疫適格細胞として用いた。この脾細胞をCBA-T6T6の骨髄細胞 0.5×10^6 コと混ぜ、CBA-T6T6とDST 6 F₁に注射して、この2番目の宿主の脾における ^{59}Fe のとりこみをしらべた。赤

Table 6. Effect of LNC injection on the splenic ⁵⁹Fe uptake when LNC were injected before BMC injection*

Injection of LNC	Day of LNC injection	Splenic ⁵⁹ Fe uptake (mean ± SE)**	
		Irradiated before BMC injection	Not irradiated before BMC injection
Yes	-5	9.58 ± 0.88 (6)	2.45 ± 0.15 (11)
Yes	-4	12.39 ± 0.82 (8)	2.49 ± 0.23 (10)
Yes	-3	11.43 ± 0.92 (7)	1.53 ± 0.19 (9)
Yes	-2	13.32 ± 0.76 (7)	3.00 ± 0.56 (8)
Yes	-1	10.79 ± 1.31 (6)	3.24 ± 0.27 (8)
Yes	0		1.60 ± 0.20 (11)***
No		7.68 ± 0.51 (9)****	

* 4 × 10⁶ LNC were injected following 520 R-irradiation; 0.5 × 10⁶ BMC were injected following 830 R-irradiation or without the second irradiation.

** Number of mice was shown in parenthesis.

*** The mixture of LNC and BMC was injected following 520 R-irradiation.

**** BMC alone were injected following 830 R-irradiation on day 0.

Table 7. Transfer of activated lymphoid cells to 830 R-irradiated secondary hosts

Strain of secondary host	Cell dose (× 10 ⁶)		No. of mice	Splenic ⁵⁹ Fe uptake** (mean ± SE)
	SpC*	BMC		
CBA-T6T6	0	0.5	11	13.54 ± 1.24
	20	0.5	9	11.22 ± 1.34
DST6F ₁	0	0.5	5	6.35 ± 0.62
	5	0.5	6	1.60 ± 0.09
	20	0.5	9	1.58 ± 0.38

* SpC, spleen cells of DST6F₁ mice which received irradiation (830 R) and parental LNC (4 × 10⁶) 4 days earlier.

** When the values of mice receiving BMC alone were compared with those of mice receiving SpC and BMC, P > 0.2 in CBA-T6T6 mice; P < 0.001 in DST6F₁ mice.

血球分化は第2の宿主が DST6F₁ である時のみ抑制された (Table 7)。赤血球分化の抑制はすでに活性化された免疫適格細胞があるのみではおこらず、2回目に移された場所でも新たに抗原刺激が与えられて、免疫適格細胞の活性化が持続しておこる必要があると思われる。

4. 考 案

供与者の造血幹細胞の赤血球への分化は、供与者の免疫適格細胞が、宿主で G V H 反応をおこしている時には抑制され、その抑制の程度は、免疫適格細胞の増殖の程度と逆相関する。

この実験系で測定される胸腺細胞の作用能力はリンパ節細胞の 1/20 程度であるが、これは Cantor と Azofsky¹⁸⁾ が、Simonsen の脾重量測定法により得た値とよく一致するので、両方の方法で働いている effector cell の共通性が考えられる。一方、胸腺細胞は 600 R の照射をうけたマウスでは同系の造血幹細胞の赤血球分化を亢進させるという報告もあるので¹⁵⁾、マウ

スの系統の違いや X線照射量が複雑な影響を与えると考えられる。

赤血球の分化は、長距離でも働く体液性因子と、短距離でしか働かない環境因子の2つにより統御されていると考えられるが¹⁹⁾²⁰⁾、体液性因子の方はパラビオーゼにより伝達されることが知られている²¹⁾。しかるに、われわれの実験系ではパラビオーゼは結合された2ヒキの動物の脾における赤血球の生産に何らの影響を与えなかった。したがって、この系における赤血球の分化抑制は主として環境因子のためと考えられる。

G V H 反応の作用機構についての最近の知見も、上述の説明とよく一致するように思われる。Elkins²²⁾ と Singh²³⁾ は G V H 反応を2段階に分けた。即、供与者の免疫適格細胞の活性化がおこる第1段階と、宿主の細胞が主として増殖する第2段階である。第1段階でおこる細胞障害は免疫学的に特異的であり、供与者の細胞の活性化のための刺激となった宿主の細胞のみが障害される。他方、第2段階の方は非特異的で、増殖した宿主

の細胞は供与者由来の細胞を含め色々な細胞を障害する。われわれの系では宿主の X 線照射量が増すほど赤血球分化は抑制されるが、照射量が増すことは、それだけ増殖可能な宿主の細胞が減少することを意味するのであるから、第 2 段階の非特異的細胞障害がこの現象に重要な役割を演じているとは考えられない。そうすると、赤血球分化の抑制は第 1 段階の特異的反応による宿主の細胞の障害の結果と考えねばならない。すなわち、赤血球分化のための環境を構成している宿主の細胞が、供与者の免疫適格細胞により障害され、そのために供与者の造血幹細胞はエリスロポイエチンの十分な存在にもかかわらず、赤血球に分化できないと思われる。

キメラを用いた実験は、キメラにおいては、造血の場を構成する細胞もまた供与者の細胞により置換されており、したがって、もはや供与者の免疫適格細胞の標的とはなりえないと考えると容易に理解される。しかし、キメラの動物には、阻止因子²⁴⁾²⁵⁾、または阻止細胞²⁶⁾が存在して、GVH 反応が 2 度目におこることを禁止している可能性もある。

最後に、赤血球分化のための環境が、どのようにして障害されるのかを考えてみる。Ruddle と Waksman²⁷⁾ 及び Granger ら²⁸⁾ は活性化された免疫細胞は lymphotoxin と呼ばれる化学物質を出し、他の細胞を障害することをみだした。また、Williams と Granger²⁹⁾ は、免疫細胞は 300—2000 rads の照射後でも lymphotoxin を出すことを示した。一方、われわれの系では、活性化された免疫細胞自身には赤血球分化を抑制する作用がないし、活性化されつつある免疫細胞の抑制効果も 830 R の照射によってなくなってしまうので、lymphotoxin がきわめて重要な役割をはたしているとは考えられない。したがって、われわれの系では、すでに活性化された免疫細胞自身、あるいはその細胞が出す化学物質よりは、免疫細胞の活性化の過程が重要と思われる。

最後に、本研究の遂行を可能にいただいた特研班長熊取敏之部長初め、関係各位に深く感謝します。また始終御助言いただいた生理病理部関正利室長以下、第 2 研究室の方々の御協力に、心からお礼を申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 北村幸彦, 最新医学, 28;1733 (1973)
- 2) Osborne, D. P., Jr., and D. H. Katz., *J. Exp. Med.*, 136, 439 (1972)
- 3) Katz, D. H., and D. P. Osborne, Jr., *J. Exp. Med.* 236, 455 (1972)
- 4) Pinno, E., G. O. Bain, and L. A. Campbell, *Arch. Path.* 88, 284 (1969)
- 5) Möller, G., *Immunology*. 20, 597 (1971)
- 6) Davis, W. E., Jr., and L. J. Cole., *Transplantation*. 5, 60 (1967)
- 7) Davis, W. E., Jr., R. Schofield, and L. J. Cole., *J. Cell. Physiol.* 71, 185 (1968)
- 8) Kitamura, Y., T. Kawata, O. Suda, and K. Ezumi, *Transplantation*. 10, 455 (1970)
- 9) Kitamura, Y., T. Kawata, and A. Kanamaru, *Transplantation*. 14, 568 (1972)
- 10) Bennett, M., *Transplantation*. 11, 158 (1971)
- 11) Gershon, R. K., and S. A. Lieberhaber, *J. Exp. Med.* 136, 112 (1972)
- 12) Kurita, Y., T. Sugiura, and Y. Nishizuka, *Cancer Res.* 28, 1738 (1968)
- 13) Bunster, E., and R. K. Meyer, *Anat. Rec.* 57, 339 (1933)
- 14) Hilgard, H., *J. Exp. Med.* 132, 317 (1970)
- 15) Bennett, M., *Cell. Immunol.* 3, 531 (1972)
- 16) Cantor, H., and R. Asofsky, *J. Exp. Med.* 135, 764 (1972)
- 17) Elkins, W. L., *Transplantation*. 11, 551 (1971)
- 18) Cantor, H., and R. Asofsky, *J. Exp. Med.* 131, 235 (1970)
- 19) Curry, J. L., J. J. Trentin, and N. Wolf, *J. Exp. Med.* 125, 703 (1967)
- 20) McCulloch, E. A., and J. E. Till, 1970. Cellular interactions in the control of hemopoiesis. In Hemopoietic cellular proliferation. F. Stohlman, Jr., editor. Grune and Stratton, New York, U.S.A.
- 21) Reissmann, K. R., *Blood*. 5, 372 (1950)
- 22) Elkins, W. L., *Transplantation*. 9, 273 (1970)
- 23) Singh, J. N., E. Sabbadini, and A. H. Sehon, *J. Exp. Med.* 136, 39 (1972)
- 24) Voisin, G. A., R. Kinsky, and J. Maillard. *Ann. Inst. Pasteur Paris*. 115, 855 (1968)
- 25) Hellström, I., K. E. Hellström, and A. C. Allison, 1971. Neonatally induced allograft tolerance may be mediated by serum-borne factors. *Nature (London)* 230, 49 (1971)
- 26) Elkins, W. L., *Cell. Immunol.* 4, 192 (1972)
- 27) Ruddle, N. H., and B. H. Waksman, *Science*. 157,

1060 (1967)

28) Granger, G. A., S. J. Shacks, T. W. Williams, and
W. P. Kolb, *Nature (London)*, 221, 1155 (1969)

29) Williams, T. W., and G. A. Granger, *J. Immunol.*
103, 170 (1969)