◆総説◆

巨核球の分化

寮 隆 吉*, 足 立 昌 司*, 西 郷 勝 康*

Regulation of Megakaryocytopoiesis

Ryukichi RYO*, Masashi ADACHI*, Katsuyasu SAIGO*

Key words: CFU-Meg, IL-3, IL-6, ploidy, GPIIb/IIIa

はじめに

巨核球は分化して血小板を産生するが、分化過程とその制御機構について不明な点が多い。巨核球が骨髓細胞の中で占める割合が低く、巨核球を用いる実験が手軽におこなえなかったからである。しかし1960年初頭からげっ歯類の巨核球分化に関する研究がはじまり現在までに数多くの知見が集積された。これは人の巨核球の同定方法がなかったのに反してげっ歯類の巨核球はアセチルコリンエステラーゼ活性の発現から容易に同定できたので動態を詳しく観察できたことによる。近年人の巨核球の分化の過程も次々に明らかになってきた。これは Vainchenker¹⁾ らによって人巨核球コロニー (CFU-Meg) 形成法が確立され *in vitro* で各成熟段階の巨核球を一個一個捉えることができるようになったことと巨核球が血小板ペルオキシダーゼ (PPO) 活性や血小板特異蛋白である膜糖蛋白 (GP) などのモノクローナル抗体を使って容易に同定²⁾ できるようになったことによる。また造血細胞を制御するサイトカインの多くがクローニングされリコンビナントのサイトカインが手に入るようになったこと³⁾ も巨核球分化の制御機構の解明に役立っている。今回は ① 巨核球分化の研究のための巨核球の取り扱い方法、② 巨核球分化を司るサイトカイン、③ 巨核球の分化過程について興味ある

話題を解説したい。

なお巨核球分化の総説は今までに多くの業績を挙げてこられた先生方によって書かれた血小板1989-血小板産生⁴⁾ と、Hoffman の書いた “Regulation of megakaryocytopoiesis”⁵⁾ があ

巨核球の取り扱い方

(1) CFU-Meg 形成法

骨髓細胞の単核細胞を血漿凝血法¹⁾、メチルセルロース法⁶⁾、フィブリン凝血法⁷⁾ あるいは軟寒天法⁸⁾ などによって培養すると巨核球コロニーを得ることができる。Kimura ら⁶⁾ はメチルセルロース法が巨核球の形態をよく保つとしているがいずれの方法も有用である。近年各種サイトカインの影響をみるため、生理的に存在するサイトカインを含む血清を使わず、さらにサイトカインを出す可能性のある付着細胞やT細胞を除いた単核球からの巨核球コロニー形成をみる方法がよいとされている⁹⁾⁹⁾。その一つである Teramura らの方法を表1に示す。cloning efficiency は血漿を使った場合に比較して60~70%と低値で、各コロニーサイズは小さいが、十分分化過程を観察できるという。progenitor は通常骨髓細胞からの単核球を用いるが、正常骨髓細胞をいつも手に入れるのは容易ではない。Mazur ら¹⁰⁾¹¹⁾ は常に末梢血由来の単核球を用いて CFU-Meg を作成し IL-3

* 神戸大学医学部付属病院輸血部 [〒650 神戸市中央区楠町7-5-2]; Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital 7-5-2 Kusunoki, Chuo-ku, Kobe, Hyogo Japan 650

表 1 巨核球コロニー無血清培養法

〔方法〕

ヒト巨核球コロニー
無血清培養法

や GM-CSF に対する反応を検討しているが、骨髓細胞由来の単核球からの CFU-Meg の反応とほぼ同一の成績を得ている。骨髓細胞の入手の困難な場合は試みてよいであろう。ただ末梢血中の幹細胞は骨髓細胞中のそれよりやや成熟した段階にあるといわれているので、その点を考慮しつつデータの解析をおこなう必要があるかもしれない。CFU-Meg の成績としては、コロニー数やコロニー中の巨核球数から巨核球 progenitor の増殖能をそして形成された巨核球の ploidy, 抗原発現量そして size の大きさから分化能を判定するのが一般的である。これらを指標として巨核球コロニーはコロニー形成に時間がかかるが一個コロニー当たりの巨核球数が 30 個以上と多い BFU-Meg¹¹⁾¹²⁾ と一般的に得られる CFU-Meg の 2 つの population から成っていることが明らかにされており、赤血球コロニーが BFU-E と CFU-E から成っているのとほぼ同様である。

(2) 巨核球の分離

巨核球の比重や size の特徴を利用したり、巨核球 lineage に特異的な GPIIb/IIIa に対す

表 2 巨核球分離

Purification of Megakaryocytes

るモノクローナル抗体を使って骨髓細胞から濃縮分離することができる。生理的な状態に近い巨核球の確保と言えるかもしれない。

density centrifugation と velocity sedimentation の組み合わせ

巨核球は 1.022~1.089 の間の比重を有しているのでアルブミン非連続勾配 (1.035~1.050 g/cmm)¹³⁾ そして Percoll (1.016~1.078 g/cmm)¹⁴⁾ などが分離、濃縮に用いられる。Percoll は巨核球膜の透過性に対する抵抗性が消失した後も細胞内に侵入しないので一番適しているかもしれない。比重の違いで濃縮した後 1 G から 1500 G の遠心を負荷して純度を上げることができる。なお巨核球は容易に凝集するので凝集阻害剤であるアデノシン、テオフィリン、prostaglandin E₁ (PGE₁) の使用そして分離液からの Ca²⁺ や Mg²⁺ の除去などの工夫が行われている。Fedorko¹³⁾ の方法を改変したわれわれの方法を表 2 に示す。また counter flow centrifugation といって遠心力と遠心と

図 1 cell elutriator による巨核球の分離. 文献 (8) より

は逆方向の流水力を負荷できるよう設計された cell elutriator を使うと沈降速度に応じた巨核球が採取できる¹⁶⁾¹⁷⁾. Straneva らは骨髓細胞から Ficoll-Hypaque で単核球を分離した後, cell elutriator に負荷して progenitor から血小板産生を示す巨核球を分離した¹⁸⁾ (図 1). 各成熟段階の巨核球に対するサイトカインの影響や, 血小板産生過程の形態学的特徴の検討が可能である.

免疫学的手法による分離

Tomer ら¹⁹⁾ は Percoll で 1.050 g/cmm 以下の骨髓細胞を採取した後, GPIIb/IIIa モノクローナル抗体を用いて fluorescence activated cell sorting を cell sorter で行い 98% の純度の巨核球を分離, 短期培養に成功した. この方法は GPIIb/IIIa 発現のない巨核球 progenitor は捕捉できないので CFU-Meg を形成する

細胞分画には有効でない.

(3) 巨核芽球性白血病細胞株

血球分化の研究に *in vitro* で短い doubling time を持って増殖する白血病細胞株が良く用いられるが多くの巨核芽球性白血病細胞株も樹立されている. 表面形質や PPO 発現からどの成熟段階の腫瘍化由来の細胞株であるかを知っておくことが大切である. myeloid, erythroid そして megakaryocytic な phenotype を示し PPO 活性のない K 562²⁰⁾ や HEL²¹⁾ などの幹細胞レベルの細胞株, myeloid や erythroid のどちらかのマーカーと megakaryocytic な phenotype を持ち PPO 活性が認められる CMK²²⁾, M-07²³⁾, Dami cell²⁴⁾ の細胞株, megakaryocytic なマーカーだけを示し血小板産生を思わせる形態学的特徴を示す Meg-01²⁵⁾, EST-1 U²⁶⁾, T-33²⁷⁾ などの細胞株はいず

れも分化に対応した表面形質の変化、遺伝子発現そして分化の際の signal 伝達機構の研究に有用である。ただこれらの細胞株は分化する正常細胞と違って増殖能だけが優位であるという腫瘍性の特徴があり、分化しても正常な機序のもとでの分化とは考えられない点もあろう。また白血病細胞は lineage infidelity があって正常とは異なった形質発現をすることがあるので注意したい。

(4) その他

巨核球の血小板産生能や分化の *in vivo* の過程は末梢血小板や size の動きで検討したり、骨髓細胞中の巨核球の ploidy の変化や CFU-Meg 形成能から観察するが²⁸⁾、ここでは古くから用いられ今でもマウスなどの血小板産生能の検索に用いられている⁷⁵Se-selenomethionine²⁸⁾ や $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ ²⁹⁾ 投与後の末梢血中への標識血小板の出現の程度を用いる方法を紹介しておきたい。これらの核種は巨核球の胞体に取り込まれ巨核球の血小板産生に従い標識血小板が末梢血に出現してくるので末梢の放射活性の推移を測定することによって巨核球の分化能が推定できる。血小板数の変化を追跡するより鋭敏な方法としてエリトロポエチンの血小板産生能に及ぼす効果の判定に用いられる²⁹⁾。

巨核球分化を司るサイトカイン

巨核球数の減少した再生不良性貧血患者の血清や尿中に巨核球コロニー形成を促進する humoral factor の出現がみられるし³⁰⁾³¹⁾、*in vitro* の巨核球コロニー形成のためには PHA-LCM, WEHI-3 CM あるいは PWM-SCM などから得られる液性の刺激因子を加える必要があること⁵⁾ などから、巨核球分化がサイトカインによって制御されていることをうかがい知ることができる。巨核球分化を制御するサイトカインは巨核球 progenitor の増殖に作用する巨核球コロニー刺激因子 (Meg-CSF) と巨核球の胞体の成熟を促す巨核球分化促進因子 (Meg-potentiator) の2つから成っていることが Williams ら³²⁾ によって明らかにされた。彼らは巨核球分化を強く促進するマウス myelomonocytic leukemia cell line の condi-

tioned medium (WEHI-3 CM) をゲルろ過し分子量の違う peak に Meg-CSF 活性と Meg-potentiator 活性を得て巨核球分化は作用部位の違う2つのサイトカインによって支配されていることを示し、この考えは現在も支持されている。

Meg-CSF

人の Meg-CSF は巨核球の減少した患者の尿から分離精製が試みられているが現在もなおアミノ酸配列を決定できる程精製できたとの報告はない³³⁾³⁴⁾³⁵⁾。1985年巨核球分化に2つの因子が必要であることを明らかにした Williams らは WEHI-3 CM 中の Meg-CSF 活性は IL-3 であることを報告した³⁶⁾。本来 helper T 細胞が出す IL-3 を myelomonocytic leukemia cell が恒常的に出すのは IL-3 遺伝子上流にレトロウィルス様配列が挿入されていることによる。同じころ Quesenberry ら³⁷⁾ も IL-3 と GM-CSF が巨核球コロニー刺激因子であることを報告し、従来粗製品の Meg-CSF でおこなわれていた分化の研究が単一に精製されたサイトカインを使って行われるようになった。IL-3 と GM-CSF はいずれも巨核球 progenitor の cloning efficiency を高めるが、IL-3 の方が作用は強力である³⁸⁾³⁹⁾。IL-3 と GM-CSF は相乗的な作用があり一部異なった機序を介する巨核球 progenitor 効果があるとされる⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴²⁾。Teramura ら⁴³⁾ はアッセイ系に混入してくるサイトカインを排除するため巨核球コロニー無血清培養法を用いて IL-3 と GM-CSF の影響を検討し図2に示す成績を得た。10 U/ml あるいは 50 U/ml の至適濃度以下の IL-3 と GM-CSF を添加すると相乗効果が認められるが、100 U/ml の濃度の IL-3 下では GM-CSF の効果がなかったという。Bruno ら⁴⁴⁾ は IL-3 と GM-CSF いずれの濃度でも相加効果があるとしている。IL-3 と GM-CSF が単独あるいは両者を介して巨核球 progenitor の増殖因子として働いているのであろう。Lu³⁸⁾ や Bruno ら⁴⁴⁾ は各種のサイトカインの効果を検討し、IL-1 α , G-CSF, M-CSF, トロンボポエチン刺激因子 (TSF), Epo そして IL-4 は単独では巨核球コロニー刺激作用がないことを報告

図2 サイトカインと CFU-Meg, IL-3 と GM-CSF を添加した時の巨核球コロニー形成. 文献 (43) より

し, IL-3 と GM-CSF だけが巨核球コロニー刺激因子として働いているとしている. IL-3 や GM-CSF が巨核芽球性細胞株の DNA 合成を刺激したり cloning efficiency を高める²³⁾⁴⁶⁾ ことからこの作用が確認できる. また IL-3¹¹⁾⁴⁷⁾ や GM-CSF¹⁰⁾ はコロニー形成を刺激するが ploidy を増加させないとの成績もこれらのサイトカインが巨核球増殖因子であるが分化促進因子でないことを示しているのであろう. また IL-3 や GM-CSF の *in vivo* への投与によっても血小板増多が観察できる⁴⁷⁾. IL-3 は本来ヘルパー T 細胞由来のサイトカインで T 細胞の初期の分化に関係する因子として見い出されたが現在は顆粒球, マクロフェージ, 赤芽球そして肥満細胞などの血球を誘導する multi-CSF, 赤芽球バースト形成刺激因子, 肥満細胞増殖因子, ヒスタミン産生細胞増殖因子と同一のものと考えられ, 多くの未分化な hemopoietic cell の増殖を支持する因子であることが判っている. IL-3 が巨核球コロニーの刺激因子としても働いているという最近の成績は未分化な progenitor には lineage 特異の増殖因子はなく IL-3 などの刺激によって偶然に顆粒球, 赤血球, 巨核球へと分化していくとい

う Ogawa の血球分化に対する stochastic theory を支持していると考えてよい. では IL-3 や GM-CSF 以外に巨核球 progenitor に働くサイトカインはないのかという興味あることに hypomegakaryocytic thrombocytopenia の患者血漿から分離された分子量 46 KDa の Meg-CSF に対する抗体は IL-3 や GM-CSF の巨核球コロニー形成に対する刺激効果を中和しなかった⁴⁸⁾⁴⁹⁾. また IL-3 や GM-CSF 抗体は血小板減少患者血中の Meg-CSF を中和しないなどの成績から IL-3 や GM-CSF 以外の巨核球 progenitor の増殖因子の存在の可能性が示唆されている. この本体の解明を期待したい.

エリスロポエチン (Epo) の巨核球 progenitor への効果については混乱がみられる. Sakaguchi ら⁵⁰⁾ は Epo は巨核球コロニーへの刺激作用があるとしており, また *in vivo* への Epo の大量投与によって血小板産生の亢進を示す所見が得られたとの報告⁵¹⁾ もある. 一方 Bruno⁴⁴⁾ は IL-1 α との併用でまた Dessypriss ら⁵¹⁾ は PHA-LCM と併用すると巨核球増殖因子として働くとしている. これらの成績の違いは用いた巨核球表面上の Epo 受容体の有無によるのではなかろうか. 巨核球 progenitor の一部に Epo の結合がみられる⁵²⁾⁵³⁾ が, これらの細胞は Epo 添加によって増殖するのであろう. しかし多くの巨核球には Epo 受容体はないのではないかと. 事実腎性貧血治療のための Epo 投与では血小板増多がみられない. ただ他のサイトカインとの併用で血小板増多という臨床効果が得られるかもしれない.

Meg-CSF の *in vivo* での産生のフィードバック機構についてほとんど判っていない. ただ血中への Meg-CSF 活性の出現は末梢血小板数の増減ではなく⁵⁴⁾ 骨髓中の巨核球数に応じて増減することが骨髓移植患者での Meg-CSF の推移から観察されている⁵⁵⁾. 反応性の造血は一般的に T 細胞やマクロフェージが signal をキャッチしてサイトカインを産生して司っていると考えられているが, 果して骨髓中の巨核球減少が T 細胞やマクロフェージにサイトカイン産生を指示することができるであろうか.

図3 CMK と HL-60 への TPA 添加による PKC の局在. 200 nmoles/l TPA を添加後 PKC II 型抗体で ABC 染色を行った, 左側: CMK, 右側: HL-60

私どもは骨髓中の巨核球 mass の低下が Meg-CSF (GM-CSF, IL-3 等) の増加を招来するという臨床観察から, 骨髓中で恒常的な造血制御をしている stroma 細胞が骨髓での異常を察知して Meg-CSF などのサイトカインの産生をおこない巨核球低下に対応しているのではないかと考えているが, 実際のところはどうなっているのであろうか. このフィードバック機構の解明も期待される.

Meg-potentiator

Meg-potentiator は巨核球の ploidy 増加や胞体の成熟を促し血小板を流血中に送り出す働きを示すサイトカインといえることができる. 血小板減少患者の流血中にはトロンボポエチン (Tpo) と呼ばれる血小板産生を刺激する因子があることが知られていたが現在もこの液性因子の存在を容易に観察することができる⁵⁷⁾. Meg-potentiator はヒト胎児由来腎臓細胞株 (HEK) 上清から TSF⁵⁶⁾ あるいは巨核球刺激因子⁵⁸⁾ としてあるいはマクロフェージ細胞株である P 388 D 1 培養上清⁵⁹⁾ からあるいはヒト肺癌細胞株上清から精製分離が試みられているが Meg-CSF と同様完全に純化されたとの報告はない. 筆者たちの興味を惹いたのはヒト肺癌細胞株上清が IL-3 や GM-CSF 添加後の胞体の成熟のない巨核球の血小板特異抗原の発

現量を増加させたとの Long ら³⁹⁾ の成績である. この上清中に生理的な Meg-potentiator が含まれるのではなかろうか, そして彼らはこの胞体の成熟が tumor promotor であるフォルボールエステル (TPA) で再現できたとしている. TPA はよく知られているようにプロテインカイネース C (PKC) を介して細胞分化を制御するので Meg-potentiator は巨核球の PKC 活性を刺激する液性因子と言い換えてもよいのではなかろうか. 事実私どもは TPA 添加後 cytosolic な PKC が核の ploidy 増加と膜の成熟を司る second messenger として働いていることを示唆していると考えられる核と膜への移動を示す所見を得た (図3). Long らはこの一連の仕事の中で IL-6 は巨核球分化を司る作用はないと報告したが Ishibashi ら⁶⁰⁾ は IL-6 が巨核球の胞体の分化と多 ploidy 化の作用があることを見出し, さらに *in vivo* でも血小板増多作用があることを報告した⁶¹⁾ (図4). IL-6 にはコロニー形成能はないが IL-3 や GM-CSF 存在下で Meg-potentiator として働くのではないかと注目されている⁶²⁾. ただ IL-6 は多彩な機能があり⁶³⁾, その中で急性期炎症蛋白の合成を促進することが知られているが *in vivo* 投与の際も顕著な CRP の増加を招来する. 再生不良性貧血患者で血中

図4 (A) Platelet and (B) differential cell counts in a dose response experiment of IL-6 in vivo in mice. Each dose of human rIL-6 indicated was administered in every 12 hours for five days. 文献 (61) より

の Meg-potentiator が増加していると考えられる際にも臨床的に CRP の上昇が認められないので, IL-6 以外の Meg-potentiator が存在することが十分考えられる。巨核球の ploidy を上げる他のサイトカインとして Meg-CSF として働き ploidy に影響しないと報告されている¹¹⁾⁴⁵⁾ IL-3 に Ishibashi ら⁶⁴⁾ は多 ploidy 化の作用があると報告した。また Epo にも同様の作用があるとの成績も得られているので⁶⁵⁾⁶⁶⁾ IL-3 や Epo も Meg-potentiator として働いているかもしれない。したがって Meg-potentiator は単一なサイトカインから成るのではなく色々なサイトカインが微妙に絡み合っている生体で機能している総体をいっていると考えた方が妥当であろう。

その他

巨核球分化は既知のサイトカインによって制御されていることが明らかになった。すべての

サイトカインはネットワークを作って相互に影響し合って造血に働いている³⁾ ので巨核球分化はすべてのサイトカインの制御を受けているといってもよいであろう。事実それに関する報告も多い。また造血細胞に抑制的に働く TGF- β ⁶⁷⁾⁶⁸⁾ やインターフェロン- α , - β ⁶⁹⁾ が巨核球分化に影響するのは言うまでもないことである。ここでは巨核球は GM-CSF や IL-6 (佐藤武幸博士私信) mRNA をもっており、また巨核球 lineage の分化を特異的に抑制すると考えられる血小板第4因子 (PF-4)⁷⁰⁾ の合成¹⁶⁾ をおこなって autocrine regulation の機構も精巧に備えていることを指摘しておきたい。また近年 IL-9 と名づけられるサイトカインも巨核球分化を促進することが明らかになった⁷¹⁾。

巨核球分化の過程

巨核球 progenitor は GPIIb/IIIa を発現しており, GPIIb/IIIa の発現は pluripotent 幹細胞の同定にも役立つとの成績が得られていた³⁾⁷²⁾⁷³⁾。最近のモノクローナル GPIIIa 抗体による cell sorting 後の細胞の巨核球コロニー形成能の検索から巨核球 progenitor が GPIIIa をもっているとの見解は否定された⁷⁴⁾。ただ巨核球コロニーを作る単核球は CFU-E や CFU-C を作るのも、幹細胞の性質を兼ね備えているということはできる。このもっとも未熟な progenitor は CD 34 と HLA-DR などの MHC class II 抗原を発現しているのが特徴とされる⁷⁵⁾ ので、もっとも未熟な巨核球は CD 34⁺ と HLA-DR⁺ 細胞である。この抗原は IL-3 存在下で分化に従い CD 34⁻ と HLA-DR⁺、そして CD 34⁻ と HLA-DR⁻ へと変化する。この未熟な細胞は DNA を活発に合成して分裂増殖するので *in vitro* ではコロニーとして観察することができる。形成されるコロニーは homogenous でなくもっとも未熟な progenitor から、形成までに約 21 日間と時間がかかり、コロニー当たり巨核球数が 30 個以上の BFU-Meg⁷⁶⁾ ができる。コロニー形成までに時間がかかり、細胞数が多いことはこの progenitor がより未熟な段階の増殖能の

表 3 増殖期の巨核球 progenitor

HLA-DR, CD 34 positive cells
↓
progenitor for BFU-Meg
↓
progenitor for CFU-Meg
↓
progenitor for LD-CFU-M

強い細胞であることを示す。通常認められるコロニーは形成までに約 12 日間かかり、コロニー当たり巨核球 3 個以上認める CFU-Meg である。より分化した progenitor からのコロニーである。さらに分化した progenitor から LD-CFU-Meg と呼ばれる⁷⁷⁾ コロニーが形成される。通常より低い比重の progenitor に由来し、コロニー形成が弱く、コロニー中の巨核球は高い ploidy を持っているのが特徴とされる。まだヒトでは確認されていない。私どもはここまでの細胞を増殖の活発な early stage の巨核球と考えている (表 3)。この増殖期を過ぎると巨核球は分裂する細胞から巨核球に特異的な endomitosis と呼ばれる分裂しないで核の DNA 合成だけを行い 4 N, 8 N, 16 N そして 32 N と ploidy の増加を示す巨核球へと分化していく。私どもは ploidy の上昇がみられる巨核球を分化期の巨核球と考えている (表 4)。

分化期の巨核球

分化を開始した巨核球は ploidy の上昇と同時に lineage specificity の高い GPIIIa⁷⁸⁾, GPIIb/IIIa⁷⁹⁾ などの膜抗原を発現する。この細胞は transitional megakaryocyte⁸⁰⁾ として正常の骨髓細胞の中にも確認することができる。単芽球様の形態を示すがコロニー形成能はなく血小板特異抗原や PPO 活性が陽性で ploidy は 4 N 以上である⁸⁾。endomitosis の開始は巨核球の分化を考える意味で大切な段階なのでそれに関する興味ある成績を紹介しておきたい。Arriaga ら⁸¹⁾ は放射線照射後のイヌ血清を用いて mitosis と endomitosis に及ぼす効果を観察したところ、低濃度の血清は mitosis と endomitosis を増加させ、高濃度の血清は mitosis だけを上昇させることを見出した。この所見は強い刺激に対してまず

表 4 分化期の巨核球

transitional megakaryocytes
↓
ploidy の増加 膜マーカーの出現
↓
cytoplasmic protein の出現 PF-4 thrombospondin
↓
dense membrane system α -granules

mitosis で反応し、一段落すると mitosis から endomitosis への反応に移行していくことを示しており、巨核球の mitosis と endomitosis は外からの刺激に応じいつもリンクしながら生体内で制御を受けているとした。endomitosis の活発な巨核球は大型化していくのが特徴である。一般的に大型の巨核球は ploidy が高い。しかし Ebbe ら⁸²⁾ は血小板減少マウスの巨核球の size と ploidy を検討し、血小板減少時は ploidy の上昇より巨核球の大型化の方が顕著であることを見出し、ploidy の上昇と size の大型化は異なった機序による制御を受けているとした。臨床的にも ITP において ploidy に比較して巨核球の大型化の方が目立つとの Nomura ら⁸³⁾ の観察がある。巨核球の胞体の増大は膜マーカーの増強と cytoplasmic 蛋白の合成がはじまったことを示唆している。Vinci ら⁸⁴⁾ は CFU-Meg を用いて膜マーカーとして GP そして cytoplasmic 蛋白のマーカーとして PF-4 や von Willebrand (VW) 因子の出現の経時的变化を検討して、いずれの蛋白もコロニー形成を開始した約 5 日後という早期にほぼ同時に出現してくるという所見を得た。しかし巨核芽球性白血病の phenotype の検索はこれを支持しない⁸⁵⁾⁸⁶⁾。多くの白血病細胞は GPIIb/IIIa の発現が強いのに比較して GPIb や PF-4 の発現がないのが特徴である⁸⁷⁾。これは分化傾向を有する細胞だけが PF-4 の発現を認める⁸⁸⁾ という所見からも確認されている。したがって胞体の分化は膜マーカーの出現、ひき続いて cytoplasmic 蛋白の出現を伴うと考えるのが妥当であろう。図 5、

図5 K 562 に TPA 10 nmol/l 添加4日後までの表現型の変化. 文献 (78) より

図7 CMK 細胞に TPA 10 nmol/l 添加後の GPIIb mRNA の Northern blot 像

6に K 562 の TPA による phenotype の経時的変化を示す. 膜マーカーから cytoplasmic 蛋白のトロンボスポンジンの合成される時期に違いがあることがよく理解できる. ただ抗原量の変化だけで発現の時期を論じることには問題があるかもしれない. 産生される抗原量や測定する感度によって容易に間違った解釈がなされる可能性がある. 抗原量は遺伝子発現の後増減

図6 K 562 に 10 nmol/l TPA 添加4~7後の表現型の変化. 文献 (78) より
Thr-4: GPIIIa, 224 B: GPIIb/IIIa

を示すので, 発現の時期は遺伝子レベルでの検索によって結論づけるべきであろう. 図7に TPA 添加後の CMK の GPIIb mRNA の動きを示す. この遺伝子の増強は細胞表面の GPIIb 量の変化より遙かに早い時期に挙動している.

ひき続き巨核球は α -顆粒の構築そして dense membrane system の成熟へと分化して血小板産生を行う²⁰⁾.

まとめ

巨核球分化の研究は血小板確保という臨床サイドの要請に応えるためにも極めて大切である. 現時点での巨核球の分化に関する知見をまとめてみた. 今回は枚数の制限で記述しなかったが, 巨核球の分化の研究は血小板特異蛋白の合成経路の解明や血小板の刺激応答系の伝達機構に有用な情報⁸⁹⁾⁹⁰⁾ を与えてくれる.

文献

- 1) Vainchenker, W., Bouget, J., Guichard, J., Breton-Gorius, J.: Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors.

- Blood, **54**: 940~945, 1979.
- 2) Vainchenker, W., Deschamps, J. F., Bastin, J. M., Guichard, J., Titenx, M., Breton-Gorius, J., McMichael, J.: Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: Immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in *in vivo* cells from normal and leukemic patients. Blood, **59**: 514~521, 1982.
 - 3) Sieff, C. A.: Hematopoietic growth factors. J. Clin. Invest., **79**: 1549~1557, 1987.
 - 4) 血小板1989-血小板産生 -: 青木延雄, 蔵本淳, 日高弘義, 山崎博男, 大熊稔 編, 科学評論社, 東京1989.
 - 5) Hoffman, R.: Regulation of megakaryocytopoiesis. Blood, **74**: 1196~1212, 1989.
 - 6) Kimura, H., Burnstein, S. A., Thorning, D., Powell, J. S., Harker, L. A., Fialkow, P. J., Adamson, J. W.: Human megakaryocytic progenitors (CFU-M) assayed in methylcellulose: Physical characteristics and requirements for growth. J. Cell Physiol., **118**: 87~96, 1984.
 - 7) Kuriya, S., Kwak, J., Tajika, K., Minoda, Y., Nomura, T., Murphy, Jr. M. J.: Cloning of murine megakaryocyte progenitor cells in a fibrin clot culture system. Exp. Hematol., **15**: 896~901, 1987.
 - 8) Teramura, M., Katahira, J., Hoshino, S., Motoji T., Oshimi K., Mizoguchi, H.: Clonal growth of human megakaryocyte progenitors in serum-free cultures: Effect of recombinant human interleukin 3. Exp. Hematol., **16**: 843~848, 1988.
 - 9) Bruno, E., Briddell, R., Hoffman, R.: Effect of recombinant and purified hematopoietic growth factors on human megakaryocyte colony formation. Exp. Hematol., **16**: 371~377, 1988.
 - 10) Mazur, E. M., Cohen, J. L., Wong, G. G., Clark, S. C.: Modest stimulatory effect of recombinant human GM-CSF on colony growth from peripheral blood human megakaryocyte progenitor cells. Exp. Hematol., **15**: 1128~1133, 1987.
 - 11) Mazur, E. M., Cohen, J. L., Bogart, L., Mufson, R. A., Gesner, T. G., Yang, Y. C., Clark, S. C.: Recombinant gibbon interleukin-3 stimulates megakaryocyte colony growth *in vitro* from human peripheral blood progenitor cells. J. Cell. Physiol., **136**: 439~446, 1988.
 - 12) Long, M. W., Gragowski, L. L., Hoffner, C. H., Boxer, L. A.: Phorbol diesters stimulate the development of an early murine progenitor cell. The burst-forming unit-megakaryocyte. J. Clin. Invest., **76**: 431~438, 1985.
 - 13) Levine, R. F., Fedorko, M. E.: Isolation of intact megakaryocytes from guinea pig femoral marrow. Successful harvest made possible with inhibitors of platelet aggregation: Enrichment achieved with a two step separation technique. J. Cell Biol., **69**: 159~172, 1976.
 - 14) Ishibashi T., Ruggeri Z. M., Harker, L. A., Burnstein, S. A.: Separation of human megakaryocytes by state of differentiation on continuous gradients of Percoll: Size and ploidy analysis of cells identified by monoclonal antibody to glycoprotein IIb/IIIa. Blood, **67**: 1286~1292, 1986.
 - 15) Saigo, K., Ryo, R., Nakaya, Y., Yamaguchi N.: Isolation of megakaryocytes by a combination of density gradient centrifugation and velocity sedimentation, and centrifugal elutriation. Kobe J. Med. Sci., **31**: 251~261, 1985.
 - 16) Ryo R., Nakeff, A., Huang, S. S., Ginsberg, M., Deuel, T.: New synthesis of a platelet-specific protein: Platelet factor 4 synthesis in a megakaryocyte-enriched rabbit bone marrow culture system. J. Cell Biol., **96**: 515~520, 1983.
 - 17) Berkow, R. L., Straneva, J. E., Bruno, E., Beyer, G. S., Burgess, J. S., Hoffman, R.: Isolation of human megakaryocytes by density centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. J. Lab. Clin. Med., **103**: 811~818, 1984.
 - 18) Straneva, J. E., Goheen, M. P., Hui, S. L., Bruno, E., Hoffman, R.: Terminal Cytoplasmic maturation of human megakaryocytes *in vitro*. Exp. Hematol., **14**: 919~929, 1986.
 - 19) Tomer, A., Harker, L. A., Burnstein, S. A.: Purification of human megakaryocytes by fluorescence-activated cell sorting. Blood, **70**: 1735~1742, 1987.
 - 20) Tabilio, A.: Myeloid and megakaryocytic properties of K-562 cell lines. Cancer Res., **43**: 4569~4574, 1983.
 - 21) Tabilio, A., Pelicci, P., Vinci, G.: Expression of

- platelet membrane glycoproteins by a human erythroleukemic cell line (HEL). *ENMBO J.*, **3**: 453~459, 1984.
- 22) Sato, T., Fuse, A., Eguchi M., Hayashi, Y., Ryo, R., Adachi, M., Kishimoto, Y., Teramura, M., Mizoguchi H., Shima, Y., Komori, I., Sunami, S., Okimoto, Y., Nakajima, J.: Establishment of a human leukemic cell line (CMK) with megakaryocytic characteristics from a Down's syndrome patient with acute megakaryoblastic leukemia. *Brit. J. Haematol.*, **72**: 184~190, 1989.
- 23) Avanzi, G. C., Lista, P., Giovinozzo, B., Miniero, R., Soglio, G., Bennetton, G., Coda, R., Gattoiretti, G., Pegoraro, L.: Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *Brit. J. Haematol.*, **69**: 359~366, 1988.
- 24) Greenberg, S. M., Rosenthal, D. S., Greenley, T. A., Tantravahi R., Hondin, R. I.: Characterization of a new megakaryocytic cell line: The Dami cell. *Blood*, **72**: 1968~1977, 1988.
- 25) Ogura, M., Morishima, Y., Okumura, M., Hotta, T., Takamoto, S., Ohno, R., Hirabayashi, N., Nagura, H., Saito, H.: Functional and morphological differentiation induction of a human megakaryoblastic leukemia cell line (MEG-01s) by phorbol diesters. *Blood*, **72**: 49~60, 1988.
- 26) Sledge, G. W., Glant, M., Jansen, J., Heerema, N. A., Roth, B. J., Goheen, M., Hoffman, R.: Establishment in long term culture of megakaryocytic leukemia cells (EST-IU) from the marrow of a patient with leukemia and a mediastinal germ cell neoplasia. *Cancer Res.*, **46**: 2155~2159, 1986.
- 27) Tange, T., Nakahara, K., Mitani, K., Yamasaki, I., Yasuda, H., Tanaka, F., Mizuguchi, M., Oda, H., Yatani Y., Takanashi R., Fujioka, S., Yamaguchi, K., Urano Y.: Establishment of a human megakaryocytic cell line (T-33) from chronic myelogenous leukemia in megakaryoblastic crisis. *Cancer Res.*, **48**: 6137~6144, 1988.
- 28) Levin, J., Levin, F. C., Hull III, D. F., Penington, D. G.: The effects of thrombopoietin on megakaryocyte-CFC, megakaryocytes, and thrombopoiesis: With studies of ploidy and platelet size. *Blood*, **60**: 989~998, 1982.
- 29) McDonald, T. P., Cottrell, M. B., Clist, R. E., Cullen, W. C., Lin, F. K.: High doses of recombinant erythropoietin stimulate platelet production in mice. *Exp. Hematol.*, **15**: 719~721, 1987.
- 30) Kawada, K., Kuriya, S., Dan, K., Sakamaki, H., Hamaguchi H., Nomura, T.: Thrombopoietic activity of serum fractions in mouse and man. *Acta Haematol. Jpn.*, **42**: 65~71, 1979.
- 31) Hoffman, R., Mazur, E., Bruno, E., Floyd, V.: Assay of activity in the serum of patients with disorders of thrombopoiesis that stimulates formation of megakaryocytic colonies. *New Engl. J. Med.*, **305**: 533~538, 1981.
- 32) Williams, N., Eger, R. R., Jackson, H. M., Nelson, D. J.: Two-factor requirement for murine megakaryocyte colony formation. *J. Cell Physiol.*, **110**: 101~104, 1982.
- 33) Hoffamn, R., Yang, H. H., Bruno, E., Straneva, J. E.: Purification and partial characterization of a megakaryocyte colony-stimulating factor from human plasma. *J. Clin. Invest.*, **75**: 1174~1182, 1985.
- 34) Kawakita, M., Ogawa, M., Goldwasser, E., Miyake, T.: Characterization of human megakaryocyte colony-stimulating factor in the urinary extracts from patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, **61**: 556~560, 1983.
- 35) Ogata, K., Kuriya, S., Dan, K., Nomura, T.: Partial purification of human urinary megakaryocyte colony-stimulating factor. *Exp. Cell Biol.*, **57**: 19~26, 1989.
- 36) Williams, N., Sparrow, R., Gill, K., Yasmeen, D., McNiece, I.: Murine megakaryocyte colony stimulating factor: Its relationship to interleukin 3. *Leuk. Res.*, **12**: 1487~1496, 1985.
- 37) Quesenberry P. J., Ihle, J. N., McGrath E.: The effect of interleukin 3 and GM-CSA-2 on megakaryocyte and myeloid clonal colony formation. *Blood*, **65**: 214~217, 1985.
- 38) Lu, L., Briddlell, R. A., Graham, C. D., Brandt, J. E., Bruno, E., Hoffman, R.: Effect of recombinant and purified human haematopoietic growth factors on *in vitro* colony formation by enriched populations of human megakaryocyte

- progenitor cells. *Brit. J. Haematol.*, **70**: 149~156, 1988.
- 39) Long, M. W., Hutchinson, R. J., Gragowski, L. L., Heffner, C. H., Emerson S. G.: Synergistic regulation of human megakaryocyte development. *J. Clin. Invest.*, **82**: 1779~1786, 1988.
 - 40) Robinson B. E., McGrath, H. E., Quesenberry P. J.: Recombinant murin granulocyte macrophage colony-stimulating factor has megakaryocyte colony-stimulating activity and augments megakaryocyte colony stimulation by interleukin 3. *J. Clin. Invest.*, **79**: 1648~1652, 1987.
 - 41) McNiece, I. K., McGrath, H. E., Quesenberry, P. J.: Granulocyte colony-stimulating factor augments *in vitro* megakaryocyte colony formation by interleukin 3. *Exp. Hematol.*, **16**: 807~810, 1988.
 - 42) Emerson J. G., Yang, U. C., Clark, S. C., Long, M. W.: Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 have overlapping but distinct hematopoietic activities. *J. Clin. Invest.*, **82**: 1282~1287, 1988.
 - 43) 寺村正尚, 溝口秀昭: 各種造血因子の巨核球産生に対する影響-無血清ヒト巨核球コロニー培養による検討(青木延雄, 蔵本淳, 日高弘義, 山崎博男, 大熊稔 編: 血小板1989-血小板産生-), 科学評論社, 東京, 1989, p68~79.
 - 44) Bruno, E., Miller, M. E., Hoffman, R.: Interacting cytokines regulate *in vitro* human megakaryocytopoiesis. *Blood*, **73**: 671~677, 1989.
 - 45) Segal, G. M., Stneve, T., Adamson, J. W.: Analysis of murin megakaryocyte colony size and ploidy: Effects of interleukin-3. *J. Cell Physiol.*, **137**: 537~544, 1988.
 - 46) Komatsu, N., Suda, T., Moroi, M., Tokuyama, N., Sakata, Y., Okada, M., Nishida, T., Hirai, Y., Sato, T., Fuse, A., Miura, Y.: Growth and differentiation of a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Blood*, **74**: 42~48, 1989.
 - 47) Donahue, R. E., Seehra, J., Metzger, M., Lefebvre, D., Rock, B., Carbone, S., Nathan, D. G., Granic, M., Sehgal, P. K., Laston, D., LaVallie, E., McCoy, J., Schendel, P. F., Norton, C., Turner, K., Yang, Y., Clark, S. B.: Human IL-3 and GM-CSF act synergistically in stimulating hematopoiesis in primates. *Science*, **241**: 1820~1822, 1988.
 - 48) Straneva, J. E., Yang, H. H., Hui, S. L., Bruno, E., Hoffman, R.: Effects of megakaryocyte colony-stimulating factor on terminal cytoplasmic maturation of human megakaryocytes. *Exp. Hematol.*, **15**: 657~663, 1987.
 - 49) Straneva, J. E., Briddell, R. A., McDonald, T. P., Yang H. H., Hoffman, R.: Thrombocytopoiesis stimulating factor (TSF) in aplastic anemia serum accelerates cytoplasmic maturation of human megakaryocytes. *Exp. Hematol.*, **16**: 217~225, 1988.
 - 50) Sakaguchi, M., Kawakita, M., Matsushita, J., Shibuya, K., Koishihara Y., Takatsuki, K.: Human erythropoietin stimulates murine megakaryopoiesis in serum-free culture. *Exp. Hematol.*, **15**: 1028~1034, 1987.
 - 51) Dessypris, E. N., Gleaton, J. H., Armstrong, O. L.: Effect of human recombinant erythropoietin on human marrow megakaryocyte colony formation *in vitro*. *Brit. J. Haematol.*, **65**: 265~269, 1987.
 - 52) Fraser, J. K., Lin, F., Berridge, M. V.: Expression of high affinity receptors for erythropoietin on human erythroleukemic cell line, HEL. *Exp. Hematol.*, **16**: 836~842, 1988.
 - 53) Fraser, J. K., Tan, A. S., Lin, F., Berridge, M. B.: Expression of specific high-affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megakaryocytes. *Exp. Hematol.*, **17**: 10~16, 1989.
 - 54) Miura, M., Jackson, C. W., Steward, S. A.: Increase in circulating megakaryocyte growth-promoting activity (Meg-GPA) following sublethal irradiation is not related to decreased platelets. *Exp. Hematol.*, **16**: 139~144, 1988.
 - 55) Yamasaki, K., Solberg, L. A., Jamal, N., Lockwood, G., Trichter, D., Curtis, J. E., Minden, M. M., Mann, K. G., Messner, H. A.: Hemopoietic colony growth-promoting activities in the plasma of bone marrow transplant recipients. *J. Clin. Invest.* **82**: 255~261, 1988.
 - 56) McDonald, T. P.: Thrombopoietin: Its biology, purification and characterization. *Exp.*

- Hematol., **16**: 201~205, 1988.
- 57) Straneva, J. E., Briddell, R. A., Hui, S. L., Hoffman, R.: Serum from patients with various thrombopoietic disorders alters terminal cytoplasmic maturation of human megakaryocytes *in vitro*. Eur. J. Haemat. **42**: 293~297, 1989.
- 58) Tayrien, G., Rosenberg, R. D.: Purification and properties of a megakaryocyte stimulatory factor present both in the serum-free conditioned medium of human embryonic kidney cells and in thrombocytopenic plasma. J. Biol. Chem. **262**: 3262~3268, 1987.
- 59) Sparrow, R. L., Swee-Huat, D., Williams, W.: Haemopoietic growth factors stimulating murine megakaryocytopoiesis: Interleukin-3 is immunologically distinct from megakaryocyte-potentiator. Leukemia Res. **11**: 31~36, 1987.
- 60) Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T., Kariyone, S., Friese, P., Burnstein, S. A.: Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 5953~5957, 1989.
- 61) Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T., Kariyone, S., Hirano, T., Kishimoto, T., Takatsuki, F., Akiyama, Y.: Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor *in vitro* in mice. Blood **74**: 1241~1244, 1989.
- 62) Lotem, J., Shabo, Y., Sachs, L.: Regulation of megakaryocyte development by interleukin-6. Blood **74**: 1545~1551, 1989.
- 63) Kishimoto, T.: The biology of interleukin-6. Blood **74**: 1~10, 1989.
- 64) Ishibashi, T., Burnstein, S. A.: Interleukin 3 promotes the differentiation of isolated single megakaryocytes. Blood **67**: 1512~1514, 1986.
- 65) Ishibashi, T., Kosiol, J. A., Burnstein, S. A.: Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes *in vitro*. J. Clin. Invest. **79**: 286~289, 1987.
- 66) Nagasawa, T., Neichi, T., Satoh, K., Nakazawa, M., Abe, T.: *in vitro* regulatory mechanisms for cytoplasmic maturation of murine megakaryocytes derived from colony-forming units megakaryocyte (CFU-M). Exp. Hematol. **16**: 667~673, 1988.
- 67) Ishibashi, T., Miller, S. L., Burnstein, S. A.: Type transforming growth factor is a potent inhibitor of murine megakaryocytopoiesis *in vitro*. Blood **69**: 1737~1741, 1987.
- 68) Alitalo, R., Mäkelä, T. P., Koskinen, P., Andersson, L. C., Alitalo, K.: Enhanced expression of transforming growth factor β during megakaryoblastic differentiation of K562 leukemia cells. Blood **71**: 899~906, 1988.
- 69) Gauser, A., Carlo-Stella, C., Greher, J., Volkens, B., Hoelzer, D.: Effect of recombinant interferons alpha and gamma on human bone marrow-derived megakaryocytic progenitor cells. Blood **70**: 1173~1179, 1987.
- 70) Gewirtz, A. M., Galabretta, B., Rucinski, B., Niewiarowski, S., Xu, W. T.: Inhibition of human megakaryocytopoiesis *in vitro* by platelet factor 4 (PF4) and a synthetic COOH-terminal PF4 peptide. J. Clin. Invest. **83**: 1477~1486, 1989.
- 71) Yang, Y., Ricciardi, S., Ciarletta, A., Calvetti, J., Kelleher, K., Clark, S. C.: Expression cloning of a cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor: Human homologue of murine T-cell growth factor P40. Blood **74**: 1880~1884, 1989.
- 72) Berridge, M. V., Ralph, S. J., Tan, A. S.: Cell-lineage are associated with the platelet II_b-III_a glycoprotein complex. Blood **66**: 76~85, 1985.
- 73) Fraser, J. K., Leahy, M. F., Berridge, M. V.: Expression of antigens of the platelet glycoprotein II_b/III_a complex on human hematopoietic stem cells. Blood **68**: 762~769, 1986.
- 74) Kanz, L., Mielke, R., Fauser, A. A.: Analysis of human hemopoietic progenitor cells for the expression of glycoprotein III_a. Exp. Hematol. **16**: 741~747, 1988.
- 75) Caux, C., Favre, C., Saeland, S., Dubert, V., Mannoni, P., Durand, I., Aubry, J., de Vries, J. E.: Sequential loss of CD34 and class II MHC antigens on purified cord blood hematopoietic progenitors cultured with IL-3: Characterization of CD34⁻, HLA-DR⁺ cells. Blood **74**: 1287~1294, 1989.
- 76) Briddell, R. A., Brandt, J. E., Straneva, J. E., Srou, E. F., Hoffman, R.: Characterization of

- the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* **74**: 145~151, 1989.
- 77) Chatelain, C., Bast, M. D., Symann, M.: Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M). *Blood*. **72**: 1187~1192, 1988.
- 78) Adachi M., Ryo, R., Yoshida, A., Yoneda, N., Tatsumi E., Yamaguchi N., Kishimoto, Y.: Kinetic study of platelet glycoproteins and PPO activity in TPA-induced K562 cells. *Acta. Haematol. Jpn.* **51**: 1069~1079, 1988.
- 79) Breton-Gorius, J. and Vainchenker, W.: Expression of platelet proteins during the *in vitro* and *in vivo* differentiation of megakaryocytes and morphological aspects of their maturation. *Sem. Hematol.* **23**: 43~67, 1986.
- 80) Rabellino E. M., Levene, R. B., Leung, L. L. K., Nachman, R. L.: Human megakaryocytes. II. Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes. *J. Exp. Med.* **154**: 88~100, 1981.
- 81) Arriaga, M., South, K., Cohen, J. L., Mazur, E. M.: Interrelationship between mitosis and endomitosis in cultures of human megakaryocyte progenitor. *Blood*. **69**: 486~492, 1987.
- 82) Ebbe, S., Yee, T., Carpenter, D., Phalen, E.: Megakaryocytes increase in size within ploidy groups in response to the stimulus of thrombocytopenia. *Exp. Hematol.* **16**: 55~61, 1988.
- 83) Nomura, T., Kuriya, S., Dan, K.: Characteristics of megakaryocytes in relation to platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta. Haematol. Jpn.* **46**: 1541~1546, 1983.
- 84) Vinci, G., Tabilio, A., Deschamps, J. F., van Haeke, D., Henri, A., Guichard, J., Tetteroo, P., Lansdorp P. M., Hercend, T., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J.: Immunological study of *in vitro* maturation of human megakaryocytes. *Brit. J. Haematol.* **56**: 589~605, 1984.
- 85) Koike, T.: Megakaryoblastic leukemia: The Characterization and identification of megakaryoblasts. *Blood*. **64**: 683~692, 1986.
- 86) 寮隆吉, 吉田明憲, 山口延男: 巨核芽球性細胞株と巨核芽球性白血病. *臨床病理*. **83**: 514~523, 1990.
- 87) Adachi, M., Ryo, R., Yoshida, A., Yamaguchi, N., Izumi, Y.: Refractory anemia terminating in a acute megakaryoblastic leukemia (M7). *Acta. Haematol.* **81**: 104~108, 1989.
- 88) Ryo, R., Adachi, M., Sugano, W., Yasunaga, M., Yoshida, A., Jikai, J., Saigo, K., Yamaguchi, H., Akita, H., Yokoyama, M., Konaka, Y., Poncz, M.: Platelet factor 4 mRNA in cells from a patient with megakaryoblastic crisis of chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1990 (in press).
- 89) Adachi, M., Ryo, R., Yoshida, A., Teshigawara, K., Yamaguchi, N., Hoshijima, M., Takai, Y., Sato, T.: Elevation of intracellular calcium ion by prostaglandin E₁ and its inhibition by protein kinase C in a human megakaryocyte leukemia cell line. *Cancer Res.* **49**: 3805~3808, 1989.
- 90) Ryo, R., Yoshida, A., Adachi, M., Sugano, W., Yamaguchi, N., Sato, T.: Cytosolic Ca²⁺ mobilization and thromboxane synthesis in a human megakaryocytic leukemia cell. *Exp. Hematol.* 1990 (in press).