骨髓移植(輸血)についての最近の知見

東京大学医学部附属病院輸血部

土 岐 謹 治

REVIEW ON THE BONE MARROW TRANSPLANTATION (TRANSFUSION)

by

Kinji TOKI

Tokyo University Hospital, Blood Transfusion Service.

§ 序 言

近年、白血病やその他の悪性腫瘍性疾患の治療に一つの新しい方向を生みだした骨髓移植 Bone Marrow Transplantation (骨髓輸血 Bone Marrow Transfusion と呼ばれ、先の輸血学会において著者はこれを用いたが、最近では前者の呼び方が一般的になりつつあるのでこゝにおいては“骨髓移植”の名称を用いることとする)はその着想の新鮮さと、これに伴う多くの興味深い問題によつて医学界、生物学界において広く注目を浴びている。しかし研究の歴史もまだ浅く、術式自体による危険性も少くないため、現在のところは一般臨床に応用するにはいまだ程遠い段階と云わざるを得ないが、近い将来、上に記した疾患に対する有力な武器として広く応用されるようになることも予想される。これに伴つて Marrow Bank 設置の必要を唱えるものもあり、輸血すべき骨髓液の採取やその保存の問題など輸血学として取扱うべき問題も少くないので、こゝに骨髓移植に関する従来の研究のあとをたどり、今後に残された幾つかの問題について検討してみた。

§ 歴 史

骨髓の細胞を造血促進のために患者に輸血する試みは1930年代フランス等ですで行われていたが、系統的な研究として行われていた訳ではなく、単なる試みにとどまっていた¹⁾。現在の骨髓

移植の研究は1950年 Recker の報告に始まる²⁾。彼は急性放射線障害を起した犬に骨髓液を輸血して、造血障害回復の促進をはかつたが成功するに至らなかつた。この頃 Jacobson 等はイエネズミを開腹して脾臓を露出し、之を鉛で蔽つた後致死線量のX線を全身照射すると、これに続いて造血能の回復がみられ、動物は死を免れうる事を発見した³⁾⁴⁾。又彼等は予め致死線量の全身照射をしたイエネズミに健康イエネズミの脾臓を腹腔内移植しても同様の効果を有する事を認めた⁵⁾。彼等はこれを脾臓に含まれる体液性因子 Humoral Factor の作用の結果と解釈し、骨髓移植による放射線障害回復に関する“体液説 Humoral Theory”を唱えた。一方1951年 Lorenz 等は致死量全身照射をしたハツカネズミ及びダイコクネズミに同系 Isologous, 同種 Homologous, 異種 Heterologous の健康動物の骨髓液を静注又は腹腔内注射し、同じく造血回復によつて動物が救われる事を観察した⁵⁾。この造血細胞の放射線障害回復機序について、Barnes 等は造血細胞が被照射動物の体内に着床増殖 Recolonize して血球を産出し、被照射動物自身の造血組織の機能を代行するためであろうと唱え⁶⁾、後に広く行われるに至つた“細胞増殖説 Recolonization Theory”の基礎を築いた。

1955年 Lindsley⁷⁾, 1956年 Ford⁷⁾⁸⁾⁹⁾, Cole¹⁰⁾, Makinodan¹¹⁾¹²⁾, Vos¹³⁾ 等はそれぞれ独立に種

々の方法で **Recolonization** が実際に起こる事を証明した。

この骨髓移植の効果を人の悪性腫瘍の治療に応用し、大量の放射線照射、又は大量の抗癌剤投与を行つて腫瘍細胞の絶滅をはかり、同時に起こる造血障害を輸血された正常骨髓液で救おうと云う試みは **Thomas** 等の一派が1957年に発表したものが始めである¹⁴⁾。やがて本法はアメリカ、イギリス、フランス等においてさかんに研究される様になり、今日に及んでいる。

§ 骨髓移植による放射線障害回復の機序 (**Radiation Chimera** の発生について)

Jacobson は彼の脾防禦及び脾移植実験の成績から造血組織の放射線障害回復作用は組織の中に含まれるある物質が被照射動物の造血組織を刺激して、その回復を促進する為と考えた³⁴⁾。この物質は甚だ不安定で室温に3時間放置するだけで破壊され、細胞の核成分、特にDNA等に関係のある物質であろうと云われていたが、後に **Recolonization Theory** が確立して、この所謂 **Humoral Factor** の特性は生きている移植細胞の性質をそのまま見ていたものと考えられるに至つた。例えば **Cole** 等が移植細胞を **Differential**

Centrifugation して核成分を分離し、破壊された細胞質成分より核成分の方に障害回復作用が残されている事を認めたと云う実験も、その後 **Cole** 等の用いた核成分分離の条件では核成分と共に生きている細胞が相当残つていて、これが有効に働いたと考える方がより妥当と思われるに至つた。

先に述べた如く **Recolonization Theory** の基礎を築いたのは **Barnes** 等の研究であるが、骨髓移植を受けた動物体内に出現した移植細胞を直接証明したのは **Lindsley** を始めとする。彼はイエネズミの同種異系骨髓移植によつて **donor type** である異種の赤血球が移植された動物の血中に出現する事を鑑別凝集法により確めた。又 **Makinodan** 等はイエネズミの骨髓移植を受けたハツカネズミの血中に鑑別凝集法によつてイエネズミ赤血球が出現し、漸次ハツカネズミ血球と入れ替つてしまう事を認め^{11) 12)} (**Fig. 1**)、又その血中ヘモグロビンの電気泳動所見及び結晶形成の起りやすさからイエネズミのヘモグロビンが混在する事を証明した^{12) 15)}。

白血球系については **Nowell** 等はイエネズミの好中球がアルカリ・フォスファターゼ反応強陽性であり、マウスのそれは陰性である事からX線

Fig. 1. Appearance of Circulating Rat RBC in Lethally Irradiated Mice Injected with Rat Bone Marrow

全身照射を行つたハツカネズミにイエネズミの骨髓移植を行い、骨髓及び血中にイエネズミ白血球が出現する事を認め¹⁰⁾、Porter 等は雄のウサギに全身照射を行つて雌のウサギの骨髓を移植するとその血中に雌に特異的な“drum stick”を核に有する偽好酸球が出現する事を認めている¹⁶⁾ 17)。

Smith 等はイエネズミの骨髓移植を受けたハツカネズミの血中にイエネズミの血小板が出現する事を抗血清を用いて観察した¹⁸⁾。

又 Ford 等は特有な染色体を有する $T_6/+$ 系のハツカネズミ及びイエネズミの骨髓移植を他系のハツカネズミに行い、 $T_6/+$ 系ハツカネズミ及びイエネズミの細胞が骨髓・脾臓・リンパ腺及び胸腺に出現する事を確めている⁸⁾⁹⁾。

又抗体産生機能に関してもハツカネズミの特定の系に特異性をもつ腫瘍の移植^{19) 20)}や皮膚移植等²¹⁾の実験から骨髓移植を受けた動物の抗体産生機能の中少くも一部は donor type のそれに変わる事から抗体産生細胞も移植された donor のもので置換わるものと考えられる。

この様に移植された細胞が宿主の体内で増殖し、機能を営んでゆく過程をハツカネズミで観察すると、輸注された細胞はまず肺毛細管に達し、約20分乃至3時間後には骨髓中に現われると云う²²⁾。かくして予め放射線照射によつて造血細胞の壊死をおこして荒廃した造血組織に達した細胞は増殖を始め、3日後頃からは明らかな造血機能の回復が認められ、1週間後には骨髓は造血細胞で満たされるに至ると云う^{10) 23) 24)}。又脾臓・リンパ腺等に髄外造血巣が証明される。リンパ組織の回復は顆粒球系、赤血球系の回復に比してやゝ遅く、骨髓の回復に続いて起る事が認められ、完全な回復には1カ月近くを要すると云われる^{24) 25)}。

従来への通念に反して成熟血球と異つて骨髓の未分化細胞の様な増殖能をもつた細胞が異なる生体の中でその機能を営むと云う現象が起こりうるのは移植に先立つて行われる放射線の全身照射の爲である。即ち放射線の照射は抗体産生に与かるリンパ組織を破壊し、その生体にとつての異物に対

する免疫防禦機能の消失又は低下を招く。これによつて外来の造血細胞はもとの生体内にあつたと同様の機能を営む事ができるようになるものと考えられている。たとえばハツカネズミにイエネズミの骨髓移植を行う際に同時にハツカネズミのリンパ組織の細胞を移植しておくとその後の生存率が著るしく低下する¹³⁾。これは上に述べた免疫防禦機能の破壊と移植されるイエネズミ骨髓の taking との関係を示すものと考えられる。

このように放射線的作用により一つの生体内に他の生体の組織が共存している状態を radiation chimerism と云い、そのような生体を radiation chimera と称する。同様な状態は胎児期又は新生児期の動物を種々の抗原物質で免疫するとかえつて之等の物質に対して抗体を産生しなくなると云う Immunotolerance の現象においてもみられ、免疫学の新しい問題の一つとして取挙げられている。

§ Recolonization の条件

上に述べた様な過程で移植された細胞が宿主の体内に着床し、増殖して機能を営むには次のような多くの条件が必要である。

1) 照射線量……動物に非常に大線量の放射線照射時を行うと直ちに痙攣を起こして死ぬ(中枢神経死)が、それよりやゝ少ない線量では腸管上皮の壊死によつて消化管出血を起こし、照射後2～3日で死亡する(消化管死)。さらにこれより少線量では造血組織障害のため顆粒減少症・血小板減少症(之等に遅れて貧血も現れる)を起こし、出血傾向及び感染のために照射後4～5日から2週間位の間に死亡する(骨髓死)。さらにこれより線量が少なければ造血障害は軽度であり、漸次回復に向つて死を免れうる。骨髓移植の場合に重要なのはこの骨髓死を起こす線量であつて、それ以上の線量を照射すれば、たとえ移植細胞は宿主体内にとり入れ(take)られても消化管出血等のために動物は死亡する。これに反し、線量が不足の場合には動物の死は防ぎえても免疫防禦機能の破壊が不十分のため細胞の taking が行われない。同種異系又は異種の動物間の骨髓移植の場合に線

Fig. 2. Therapeutic Effect of Isologous Homologous and Heterologous Bone Marrow in CBA Mice after Various X-Ray Doses

量が不足でLD 100を下廻る場合に高い致死率を示す事が認められ^{13) 26) 27)}, これは免疫防禦機能の残存のために移植される細胞が排除される結果と考えられる (Fig. 2).

2) 移植骨髓の種特異性……勿論近縁の動物の組織程 take されやすいわけであつて, 異種よりは同種, 同種よりは同系の動物間の方が移植の成功率は高く, またそれに伴つて移植に要する細胞数も少なく済む²⁸⁾.

もつとも異種動物間の移植と云つても非常に縁の遠い動物間では移植不可能であつて, ハツカネズミの場合, イエネズミ・ダイコクネズミ等では移植可能であるが, イヌ・サル・ニワトリ・ウサギでは移植は成功していない²⁸⁾.

この点に関し, Makinodan は“ 識別因子 Recognition Factor ” なる概念を提唱している

28). すなわち生体は自身に対し異種なものを異種なものとして識別する能力があり, 大量の放射線を受けるとこの能力は一時消失又は減退するが異種の程度の強いものから先に漸次回復して来ると考える. 例えばハツカネズミに大量のX線を照射しヒツジ及びイエネズミの赤血球で免疫してその血中抗体価を測定すると対照群に比して著しく抗体の産生が阻害されている事が証明される (Fig. 4). Makinodan はこの考えを後に述べる晩期反応の成因に応用しているのであるが, これについてはその項で更に述べる事にしたい.

3) 移植細胞量……先に述べた如く骨髓移植を成功させるに必要な細胞量はそれを供給する個体の宿主に対する近縁性によつて大きく左右される. 例えば致死量照射時のハツカネズミの30日生存率(移植後30日における生存率)を 100%にする

Fig. 3. Therapeutic Effect of Isologous, Homologous and Heterologous Bone Marrow in Irradiated Mice

ために同系の骨髄の細胞では 10^5 個程度であるのにイエネズミではその 100~1,000 倍を要し、同種移植の場合にはその中間の量を必要とする¹³⁾。又2系のハツカネズミの交配によつてえられた一代目の交配雑種の骨髄はその各々の親である系のハツカネズミにはもう一方の親の系の骨髄と同様の効果(同種移植)しかしめさないが、その交配雑種にとつて親の系の骨髄は同系移植と同様の効果を示す事がみられている¹³⁾ (Fig. 3)。

4) 移植の時期……移植細胞の taking には免疫防禦機能の破壊が必要なので、全身照射直後に移植を行うと体内に残存する抗体のために一部の移植細胞の排除が行われる事が考えられる。実際に照射後24~72時間に移植を行う方が照射直後に行うより成績が良いと云う報告もみられる²⁹⁾。

5) 放射線の種類 X線・ ^{60}Co の γ 線等が用いられ、Neutron 線を用いた場合には放射線障害の回復が起こりにくいと云う^{30) 31)}。又放射線のほかにそれと同様の作用を有する種々の薬剤が利

Fig. 4. Effect of Type of Antigen on the Immune Mechanism

用され、Nitrogen Mustard^{14) 33)}、Myleran³²⁾、6MP³²⁾、TEM¹⁴⁾、Mitomycin⁵⁴⁾ 等が報告されている。

6) 移植を受ける生体の条件……骨髄移植の成功の難易はこれを受ける動物の種によつても著しく異なる。従来移植の成功を報告されている動物としてはハツカネズミ・イエネズミ・ダイコクネズミ・Humster・ウサギ・イヌ・サル・Chimpanzee・ヒトなどが挙げられる。その中ハツカネズミ・イエネズミ等は移植の実験に屢々用いられ、成功しやすいが、これ等の動物は体格が小さいので、体内の線量分布が均一になりやすく、これに比べて大動物では骨髄を包む骨質も厚く、骨髄の線量を充分にしようとするれば腸管の線量を過大にせざるを得ない事もその一因とみなされている。

§ 所謂“晩期反応”について

骨髄移植の実験において移植の成否をみるためには“30日生存率”を示標とするのが普通である。これは照射による“骨髄死”は大体2週間以内に起こり、それ以後は血中の血球数も造血組織

中の造血細胞数も30日後頃には十分に回復しているからである。

しかるに **Barnes** は同種骨髄移植をうけたハツカネズミが30日以後に多く死亡する事を発見した⁶⁾。この現象は異種骨髄移植の場合にもみられ、“**Homologous (又は Heterologous) Bone Marrow Disease**”, “**(Delayed) Foreign Bone Marrow Reaction**”, “**Late Reaction (又は Death)**” 等数多くの名称で呼ばれている。

この反応の特徴的な症状としては食欲減少、下痢、体重減少、皮膚症状(脱毛、角化異常、感染等)、感染抵抗の低下等が挙げられ、血液にはリンパ球減少症及び貧血、時に高グロブリン血症又は低グロブリン血症等の所見がみられる。組織学的検索によればリンパ組織の萎縮、細網組織ことに形質細胞の増殖、組織壊死(フィブリノイド壊死)等の所見が認められる^{25) 35) 36)}。

この成因について **Makinodan** は移植骨髄の **Donor** と宿主とが比較的近縁な為にかなり長期にわたってその“識別因子”が麻痺し、その間移植細胞の **Recolonization** が行われていたものが、識別因子の回復によって生じた宿主の移植細胞に対する抗体の作用によってアレルギー現象を起こし移植細胞が排除されるためと考えた²⁸⁾。

晩期反応をこのように“**Host to Graft**”の反応として考える人は現在極めて少なく、多くは“**Graft to Host**”の反応とみており、又後者を支持する研究成績の方が多くみうけられる。すなわち宿主の体内で造殖した移植細胞中の抗体産生細胞が宿主の体細胞に対する抗体を産生し、これによって晩期反応が起こるとするのである。

たとえばA系ハツカネズミとC57BL系ハツカネズミの第1交代配雑種である F_1 ($A \times C57BL$) にA系及びC57BL系ハツカネズミの骨髄移植をするとその晩期の生存率はA系又はC57BL系ハツカネズミに F_1 ($A \times C57BL$) の骨髄移植を行つた場合に比べて著るしく悪い³⁰⁾。これは前者の場合 F_1 ($A \times C57BL$) の体内で移植されたA系又はC57BL系の細胞にC57BL系又は

A系の因子に対する抗体が生ずるのに対し、 F_1 ($A \times C57BL$) の細胞からはA系及びC57BL系の因子に対する抗体が産生されないためと考えられる。

又 **Donor** の抗体産生組織であるリンパ腺・脾臓の細胞を異種骨髄移植の際、同時に加えて移植すると単に骨髄の細胞のみを移植する時に比べて晩期反応が強い。これに反し、異種移植の場合でも **Immunotolerance** を起こしやすい胎児の造血臓器(脾臓)を用いると成熟動物の骨髄を用いた場合より晩期反応は少ない^{29) 38)}。

同種移植の場合、後に晩期反応を起こす頻度は宿主と **Donor** の近像性により同一ではなく、たとえばハツカネズミでは遺伝因子の **H-2 Locus** が大きな意義を有するらしく³⁹⁾、これを共通にする系は **H-1**、**H-3 Locus** は異つても移植の成功率は高いと云う。

この第2の危機を乗り越えた動物の体内における移植細胞の状態をイエネズミ→ハツカネズミの移植の場合でみると、あるものでは依然として血中の赤血球・白血球は **Donor Origin** のもので占められ、あるものでは全く **Host Origin** のものに置換えられ、あるものでは両方の **Origin** のもの

Fig. 5. Fate of Irradiated Rabbits with Bone Marrow Homotransplants

が時々変動する割合で混在している場合があり、また他のものでは赤血球と白血球で態度の異なる場合もみられる¹³⁾。ウサギで“Drum Stick”を利用して観察した成績では32週後に移植骨髄より産生される白血球を証明するのは総数の24.8%に過ぎない¹⁷⁾ (Fig. 5)。

§ 骨髄移植の臨床への応用

骨髄移植を臨床上の治療に応用する場合の適応症として考えられるものには次のようなものがある。

I. 腫瘍性疾患

1. 造血組織の悪性腫瘍およびその類似疾患：白血病，赤血病，細網肉腫，リンパ肉腫，リンパ肉芽腫，リンパ濾胞腫，骨髄腫等。
2. 造血臓器以外の悪性腫瘍性疾患（特に汎発化の傾向あるもの）。

II. 非腫瘍性造血組織疾患

1. 先天的造血機能異常
 - 1) 量的障害：先天性再生不良性貧血，家族性顆粒球減少症。
 - 2) 質的障害：内因性溶血性貧血，ヘモグロビン異常症。
2. 後天的造血組織疾患：後天性再生不良(能)性貧血。

III. 抗体産生組織疾患：自己免疫性溶血性貧血，アレルギー性顆粒球減少症，特発性血小板減少性紫斑病，全身性エリテマトーデス。

しかし実際には骨髄移植術自体の危険性が未だ大きいと現在迄に利用されているのは悪性腫瘍性疾患又は再性不能性貧血³²⁾（原子爐事故等の例を含む）の場合に限られている状況である。

しかもなお術後の成績は未だ良好とは云えない状況で、著者が1960年3月迄に文献から集めた26例^{14) 33) 34) 41) 42) 43) 44)} (Jammet 等の報告によるユーゴの原子爐事故の例⁴⁰⁾は除く)の中、1カ月以上の生存期間を示したものは13例に過ぎず、多くは2週間以内の所謂“早期死”によつて死亡している。又1カ月を過ぎて死亡した6例の中3例は原疾患の再発がみられ、1例は肺炎のために死亡し、他の2例については剖検の記載がないので不明である。移植する骨髄の細胞量は $1 \sim 8 \times 10^9$ 個に及んでいるが、van Bekkum は動物実験の結果から類推してヒトの骨髄移植を行うに充分な細胞数としては $30 \sim 40 \times 10^9$ 個位が必要であろうと述べている。

骨髄の供給者は一応A B O式血液型は一致するものを用い、兄弟・親子の骨髄を用いている例もあり、特殊な場合には一卵性双生児や照射前に採

Fig. 6. Clinical Course of the Patient Received Whole-Body Irradiation and Bone Marrow Therapy

Table 1 Donor Cells(D-Positive) in Treatet Patient (D-negative)

Date	Titre of Pat. CellD-neg Cell	D-posit. Cell
12/11, 58	(-)	0
17/11	1 : 1	6 %
21/11	macroscop. 1 : 1 microscop. 1 : 4	6 %
28/11	macroscop. 1 : 1 microscop. 1 : 4	6 %
2/12	microscop. 1 : 1	2 1/2 %
11/12	(-)	0
30/1, 59	macroscop. 1 : 1	6 %
5/3	1 : 1	
17/4	(+)	
19/5	macroscop. 1 : 9 microscop. 1 : 4	24%
26/9		40%

Bone Marcw Transfused at 12/11, (J.O.W. Beilby et al)

取しておいた自分の骨髓を用いている例もある。また後に述べるように保存した屍体の骨髓や胎児の造血組織もさかんに用いられている。照射線量は多く 300～1,000γ で4～5日に分割照射している例が多い。

これ等の中 Beilby 等が報告している興味のある例⁴³⁾ (Fig. 6, Table 1) を簡単に紹介するとホジキン氏病の30才の女性に Aminochlorambucil 245mmを投与していた所、汎骨髓癆の状態となつたため兄弟の骨髓穿刺液(細胞数 1.1×10^9 個)が投与された。その後色素量・赤血球数・白血球数等は漸次回復して来たが、患者がD(-)で兄弟がD(+)であつたため、これを利用して血液を検索し、Donor Type の細胞が血中に長期間出現していることが証明された。この様な血液型の差を利用して移植細胞の taking を証明した例は他にも幾つか報告されている³⁴⁾。

§ 移植骨髓の供給及び保存

移植骨髓の供給源としては、(1)骨髓穿刺液、(2)屍体より検出した骨又は手術時に剔除した骨片、(3)胎児脾臓が用いられる。

(1) この方法は血液型の適合性等を考慮して多くの Donor の中から適当なものを選ぶのが容易であり、何時でも希望する時期に細胞液を採取しうる利点はあるが、通常 Donor を全身麻酔

下に20～30カ所で骨髓穿刺をしなければならない事、それでも尙得られる穿刺液は末梢血の混入が多く、未分化な幼若細胞に乏しい等の欠点がある。この方法により Donor 1人より $1 \sim 4 \times 10^9$ 個³³⁾、又は、 $5.24 \sim 18.0 \times 10^9$ 個⁴⁵⁾の細胞が得られると云う。普通 Donor の胸骨、肋骨、前及び後腸骨棘から太目の骨髓穿刺針で2cc位ずつ吸引するのであるが、Vim-Silverman 針を用い、針を軽く廻転しながら深く進めて吸引し、針を少しずつ廻わしながらこれを繰返して両側後腸骨棘だけで充分な細胞量がえられるとも云う。輸血する際には普通の輸血用ナイロン・メッシュで濾過するだけでもよい。

(2) 手術時の切除試料としては胸廓整形、その他の開胸手術の際の肋骨が主に用いられる。屍体から採取する場合には心臓血管死、事故死等の急性死の場合の脊柱及び肋骨(死後1～2時間のものがよいが⁴⁶⁾、10～15時間を過ぎたものでも効果はみられると云う⁴⁷⁾。)を切取つて用いる。この方法では一時に大量の細胞が入手しうるが、細胞液調製の操作がやゝ複雑であること、また試料入手の時期に制限があるので多くは後に述べる様に保存の処置をとらねばならない等の複雑さを伴なう。これによつて屍体1体の肋骨から $2.8 \sim 10.9 \times 10^9$ 個⁴⁸⁾、又は12～15肋骨から $50 \sim 100 \times 10^{10}$

Fig. 7. Human Marrow Cell Count Obtained from One Rib

*after 4°C 18 Hrs

個⁴⁷、脊柱から $3.9 \sim 59.7 \times 10^9$ 個⁴⁸、又は $50 \sim 80 \times 10^9$ 個⁴⁷の細胞を、又肋骨1本から $64 \sim 5,443 \times 10^6$ 個⁴⁸、椎体1個から $3,438 \sim 9,866 \times 10^6$ 個⁴⁸の細胞が得られると云う。著者の実験では肋骨1本から得られる細胞数は $0.31 \sim 1.92 \times 10^9$ 個であつた (Fig. 7)。

採取に当つては無菌的に採出した骨を肋骨剝離子、ガーゼ等で軟部組織を充分に除いた後、骨鋏子で1~2cm大に細かく碎き、ホモゲナイザーに入れ、Hank液に10~30mg/dlにヘパリンを混じた液を少量加えて低速で廻転し、骨組織から遊出した骨髓組織液もシリコン被覆した採血瓶又はプラスチック・バッグにとり、1,000rpmで遠沈して、上清の一部とその上に浮かぶ脂肪層を吸引除去し、残りを混和して輸血用ナイロン・メッシュで濾過しつゝ他の同様の容器にとり、上述の穿刺液と同様にう一度濾過しつゝ点滴輸血すればよい⁴⁸。

実際にはこの細胞液は保有しなければならない

Fig. 8. Apparatus for Preservation of Hematopoietic Tissue with Poge-Smith's Method

D.W.H. BARNES et al

が、4°Cでは細胞は速かに死滅する。その為これを保存するには Polge-Smith の方法により超低温保存するのがよいと云われる^{50,51}。すなわち、非働化AB血清の7容に3容のグリセロールを加えた保存液を準備し、この保存液1容に上記の細胞液1容を加え、超冷凍器を用いて-15°Cまでは毎分1°C、それ以後は-70°C~-80°Cまで毎分2°C~10°Cの速さで冷却し、-70°C~-80°Cに保存する^{48,49}。Barnes等は少量の試料をこの方法で冷凍しうる簡単な装置を考案している (Fig. 8)⁵⁰。即ち Dewar 瓶にメタノールとドライ・アイスを充して-80°Cに保ち、この蓋に二重のビーカーを装置して、その間に40%のグリセロールを充しておく、内側のビーカーの内壁は40%グリセロールの氷点である-15°Cまでは対流により徐々に冷却し、それ以下になると凍結したグリセロールを通して急速に-80°Cまで冷却する。この際グリセロール中に電熱コイルを置き、これに通ずる電流を調節して冷却速度を調節する。又内側のビーカー中には少量のメタノールを入れて試料の氷着を防ぐようにする。この容器を用いてハツカ

Fig. 9. Viability of Human Marrow Cells Preserved with Serum and Hank's Solution at Various Temperature

ネズミの脾臓を83日間保存し、之を移植して造血機能の回復が証明されたと云う。

使用に当つてはこれを37°Cの温浴中に入れて1分以内に融解せしめ、液が未だ冷たい中に半量の35%ブドウ糖液を加え、2分後にこれと等量の生理的食塩水を加え、さらに2分後に同様に等量の生理的食塩水を加える（初めの6倍に希釈される）。この細胞浮遊液を徐々に点滴静注する⁴⁶⁾。

骨髓液を調製するのに要する時間のために出来上がった試料中の細胞はすべてが生きた active な細胞であるとは限らない。ことにホモゲナイズしたり、凍結・融解を行つたりすると細胞の損傷は著明である。又普通の方法で保存した骨髓は急速にその効力を失う。この事実は H^3 -Thymidine を用いてのDNA合成実験によつても推定されるが⁴⁹⁾、更に簡単に細胞の生活能を検べる方法として Shrek のエオジン法⁵²⁾がすぐれていると云われる。これはエオジンの2,000倍生理的食塩水溶液を用いて細胞液を希釈し、血算板にとつて検鏡し、核がエオジンによつて赤染しているものは生活能を失つた細胞とみなして、染色しない細胞を算えればよい。この方法を用いた場合にもその結果はDNA合成の結果とよく一致すると云われる⁴⁶⁾。このエオジン法を用いて細胞の生活能を検

討してみると上述の Slow Freezing の方法によつて保存したものがもつともよい生活能を有することが認められた (Fig. 9)。

(3) 先に記したように晩期反応を防止する効果があると云われるが、(2)の場合のように入手しうる時期が自由でないこと、また20週迄の胎児が望ましいので充分な細胞数がえられない等の欠点がある。細胞数の調製は(2)と大体同様でよい⁵³⁾。

結 語

以上、従来の文献から骨髓移植療法の概要について述べたが、生物学的な研究の華やかさに比して、臨床部門への応用はまだその端緒にあると云えよう。しかしながらこの治療法が安全に行ないうる様になれば、その応用範囲の広い事から先に述べた疾患等に対する有力な治療法となるであろう。

§ 文 献

- 1) Congdon, C.C., Uphoff, D., & Lorenz, E.: Modification of Acute Irradiation Injury in Mice and Guinea Pigs by Injection of Bone Marrow.: A Histopathologic Study. J. Nat. Canc. Inst. 13 (1): 73—108, 1952より引用。
- 2) Rekers, P.E., C. ulter, M.P., and Warren, L.S.: Effect of Transfusion of Bone Mar-

- row into Irradiated Animals. *Arch. Surg.* 60 : 635—667, 1952.
- 3) Jacobson, L.O., Marks, E.K., Gaston, E.O., Robson, M., & Zirkle, R.E.: The Role of the Spleen in Radiation Injury. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 70 : 740—742, 1949.
- 4) Jacobson, L.O.: Evidence for a Humoral Factor (or Factors) Concerned in Recovery from Radiation Injury: A Review. *Cancer Research* 12 : 315—325, 1952.
- 5) Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R., & Shelton, E.: Modification of Irradiation Injury in Mice and Guinea Pigs by Bone Marrow Injections. *J. Nat. Canc. Inst.* 12 : 197—201, 1951.
- 6) Barnes, D.W.H., & Loutit, J.F.: What is the Recovery Factor in Spleen? *Nucleonics* 12 : 68—71, 1954.
- 7) Lindsley, D.L., Odell, T.T., & Tausche, F. G.: Implantation of Functional Erythropoietic Elements Following Total-Body Irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 90 : 512—515, 1955.
- 8) Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W.H., & Loutit, J.F.: Cytological Identification of Radiation-Chimeras. *Nature* 177 : 452—454, 1956.
- 9) Ford, C.E., Librty, P.L., & Loutit, J.F.: Further Cytological Observations on Radiation Chimeras. *J. Cell. & Comp. Physiol.* 50. Supplement: 109—121, 1957.
- 10) Nowell, P.C., Cole, L.J., Habermeyer, J.G. & Roan, P.L.: Growth and Continued Function of Rat Marrow Cells in X-Radiated Mice. *Cancer Research* 16 : 258—261, 1956.
- 11) Makinodan T.: Circulating Rat cells in Lethally Irradiated Mice Protected with Rat Bone Marrow. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 92 : 430—436, 1956.
- 12) Makinodan, T.: Fate of Injected Rat Bone Marrow Cells in Irradiated Mice. *J. Cell. & Comp. Physiol.* 50-Supplement: 157—161, 1957.
- 13) Bekkum, D.W. van, & Vos, O.: Immunological Aspects of Homo- and Heterologous Bone Marrow Transplantation in Irradiated Animals. *J. Cell & Comp. Physiol.* 50 Supplement: 139—156, 1957より引用.
- 14) Thomas, E.D. Lochte, Jr. H.J., Wan Ching Lu, & Ferrebee, J.W.: Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *New Engl. J. Med.* 257 : 491—496, 1957.
- 15) Makinodan, T., & Anderson, N.G.: Physicochemical Properties of Circulating Red Blood Cells of Lethally X-Irradiated Mice Treated with Rat Bone Marrow. *Blood* 12: 984—992, 1957.
- 16) Porter, K.A.: Effect of Homologous Bone Marrow Injections in X-Irradiated Rabbits with Bone Marrow Homotransplants. *Brit. J. Exper. Pate.* 38 : 401—412, 1957.
- 17) Porter, K.A., & Moseley, R.: Long-Term Study of X-Irradiated Rabbits with Bone Marrow Homotransplants. *J. Nat. Canc. Inst.* 20 : 189—205, 1958.
- 18) Smith, L.H., Makinodan, T., & Congdon, C. C.: Circulating Rat Platelets in Lethally X-Irradiated Mice Given Rat Bone Marrow. *Cancer Research* 17 : 367—369, 1957.
- 19) Mitchison, N.A.: The Colonisation of Irradiated Tissue by Transplanted Spleen Cells. *Vrit. J. Exper. Path.* 37: 239—247, 1956.
- 20) Barnes, D.W.H., Ford, C.E., Ilbery, P.L.T., Koller, P.C., & Loutit, J.F.: Tissue Transplantation in the Radiation Chimera. *J. Cell & Comp. Physiol.* 50 Supplement: 123—138, 1957.
- 21) Main, J.M., & Prehn, R.T.: Successful Skin Homografts after the Administration of High Dosage X Radiation and Homologous Bone Marrow. *J. Nat. Canc. Inst.* 15: 1023—1029, 1955.
- 22) Urso, P. & Congdon, C.C.: The Effect of the Amount of Isologous Bone Marrow Injected on the Recovery of Hematopoietic Organs, Survival, and Body Weight after Lethal Irradiation Injury in Mice. *Blood* 12: 251—260, 1957.
- 23) Brown, M.B., Hirsch, B.B., Nagareda, C.S., Hochstetler, S.K., Faraghan, W.G., Toch, P., & Kaplan, H.S.: Some Biological Aspects of the Factor in Bone Marrow Responsible for Hematopoietic Recovery Following Systemic Irradiation. *J. Nat. Cancer Inst.* 15 : 949—973, 1955.
- 24) Loutit, J.F.: in the General Discussion on Transplantation of Bone Marrow. *J. Cell. & Comp. Physiol.* 50 Supplement: 163—171, 1957.
- 25) Congdon, C.C.: in the General Discussion on Transplantation of Bone Marrow. *J. Cell. & Comp. Physiol.* 50 Supplement: 163—171, 1957.
- 26) Trentin, J.J.: Mortality and Skin Transplantation in X-Irradiated Mice Receiving Isologous, Homologous and Heterologous.

- Bone Marrow. *Proc. Soc. Exp. & Med.* 92: 688—693, 1956.
- 27) Gengozian, N., & Makinodan, T.: Antibody Response of Lethally X-Irradiated Mice Treated with Rat Bone Marrow. *J. Immunol.* 77 : 430—436, 1956.
 - 28) Makinodan, T.: Immunology of Bone Marrow Transplantation. *J. Cell. & Comp. Physiol.* 50 Supplement: 327—351, 1957.
 - 29) Congdon, C.C.: Recovery from Radiation Injury, with Special Consideration of the Use of Bone Marrow Transplantation. *Progress in Hematology*. Vol. II edit. Tocantins, L.M., Grune & Stratton, New York & London: 21 : 46, 1959.
 - 30) Cole, L.J. & Ellis, M.W.: Effect of Bone Marrow-Spleen Injection in Mice after Fast Neutron Irradiation. *Fed. Proc.* 16 : 23—24, 1957.
 - 31) Randolph, M.L., Congdon, C.C., Urso, I.S., & Parrish, D.L.: Effect of Bone Marrow Treatment on Mortality of Mice Irradiated with Fast Neutrons. *Science* 125 : 1083—1084, 1957.
 - 32) Clinical and Fundamental Aspects of Transplantation of Bone Marrow. (Abstract of Conference). *Blood* 13 : 1096—1100, 1958.
 - 33) MacFarland, W., Granville, N.B., & Damshek, W.: Autologous Bone Marrow Infusion as an Adjunct in Therapy of Malignant Disease. *Blood* 14 : 503—521, 1957.
 - 34) Thomas, E.D., Lochte, Jr., H.L., & Ferrebee, J.W.: Irradiation of the Entire Body and Marrow Transplantation: Some Observations and Comments. *Blood* 14:1—23, 1959.
 - 35) Bekkum, D.W., Vos, O., & Weyzen, W.W. H.: The Pathogenesis of the Secondary Disease after Foreign Bone Marrow Transplantation in X-Irradiated Mice. *J. Nat. Canc. Inst.* 23 : 75—89, 1959.
 - 36) Mathé, G.: Application of Hematopoietic Cell Grafts to the Treatment of Leukemias and Allied Diseases. A Critical Review. *Blood* 16 : 1073—1088, 1960.
 - 37) Koller, P.C.: Open Discussion to "Makinodan, T.: Immunology of Bone Marrow Transplantation". *J. Cell. & Comp. Physiol.* 50 Supplement: 341—350, 1957.
 - 38) Uphoff, D.U.: Preclusion of Secondary Phase of Irradiation Syndrome by Inoculation of Fetal Hematopoietic Tissue Following Lethal Total Body X-Irradiation. *J. Nat. Canc. Inst.* 20 : 625—632, 1958.
 - 39) Uphoff, E.E., & Law, L.W.: An Evaluation of Some Genetic Factors Influencing Irradiation Protection by Bone Marrow. *J. Nat. Canc. Inst.* 22 : 229—241, 1959.
 - 40) Jammet, H., Mathé, G., Pendic, B., Duplan, J.-F., Maupin, B., Latarjet, R., Kalic, D., Schwarzenberg, L., Djukic, Z., et Vigne, J.: Etude de Six Cas d'Irradiation Totale Aiguë Accidentelle. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biolog.* 4 : 210—225, 1959.
 - 41) Atkinson, J.B., Mahoney, J.F., Schwartz, I.R., & Hesch, J.A.: Therapy of Acute Leukemia by Whole-Body Irradiation and Bone Marrow Transplantation from an Identical Twin. *Blood* 14 : 228—234, 1959.
 - 42) Humble, J.G., & Newton, K.A.: Technique of Human Bone Marrow Transplants. *Lancet* 1 : 142, 1958.
 - 43) Beilby, J.O.W., Cade, I.S., Jelliffe, A.M., Parkin, D.M. & Stewart, J.W.: Prolonged Survival of a Bone-Marrow Graft Resulting in a Blood-Group Chimera. *Brit. Med. J.* 96 —99, 1959.
 - 44) Thomas, D.E., Lochte, Jr., H.L., Cannon, J.H., Sahler, O.D., Ferrebee, J.W.: Supralethal Whole Body Irradiation and Isologous Marrow Transplantation in Man. *J. Clin. Invest.* 38 : 1709—1716, 1959.
 - 45) Schwartz, R., Misra, D.K., & Damshek, W.: A Technique of Bone Marrow Transplantation in Man. *Blood* 15 : 137—145, 1960.
 - 46) Ferrebee, J.W., Atkins, L., Lochte, Jr., H. L., McFarland, R.B., Jones, A.R., Dammin, G.J., & Thomas, E.D.: The Collection, Storage and Preparation of Viable Cadaver Marrow for Intravenous Use. *Blood* 14:140—147, 1959.
 - 47) Tocantins, L.M.: in "Summary of Proceedings of the Bone Marrow Transplantation and Chemical Radiation Protection Conference." *Blood* 14 : 602—604, 1959.
 - 48) Haurani, F.I., Repplinger, E., & Tocantins, L.M.: Attempts at Transplantation of Human Bone Marrow in Patients with Acute Leukemia and Other Marrow Depletion Disorders. *Amer. J. Med.* 28 : 794—806, 1960.
 - 49) Lochte, Jr., H.L., Ferrebee, J.W., & Thomas, E.D.: In Vitro Studies on the Preservation of Marrow Cells in Glycerol at Low Temperature. *J. Lab. & Clin. Med.* 53 : 117—126, 1959.
 - 50) Barnes, D.W.H., & Loutit, J.F.: The Radiation Recovery Factor: Preservation by

- the Polge-Smilh-Parke's Technique. J. Nat. Canc. Inst. 15 : 901—905, 1955.
- 51) Schwartz, I.R., Repplinger, E.F., Congdon, C.C., Tocantins, L.M.: Transplantation of Bone Marrow after Preservation at -70°C J. Appl. Physiol. 11 : 22—24, 1957.
- 52) Shrek, R.: A Method for Counting the Viable Cells in Normal and in Malignant Cell Suspension. Amer. J. Cancer 28 : 389—392, 1936.
- 53) Morrison, A.N., & Morrison, M.: A Method of Hematopoietic Transplantation in Humans Using Fetal Tissue Liver and Spleen. A Preliminary Report. Acta Haemat. 20 : 378—382, 1958.
- 54) 市川洋一, 森和久, 尾崎順一, 石橋幸雄, 朝部孝雄, 阿部由明: 骨髓の薬剤障害に対する骨髓輸血(移植)の免疫学的研究, 第1報, 日本輸血学会雑誌, 7 : 226—232, 1960.
-