白血病細胞の比重にかんする研究 特に骨髓と末梢血細胞の比較について

東京慈恵会医科大学第二内科

山田 欽 清水 進 土屋 喬 当摩 正美
沢 泰彦 蓮村 幸兌 秋山 雄一

STUDY ON THE SPECIFIC GRAVITIES OF LEUKEMIC CELLS:
COMPARISON BETWEEN THE CELLS IN THE BONE
MARROW AND THE PERIPHERAL BLOOD.

Shitoo YAMADA, Susum SHIMIZU, Takashi TSUCHIYA, Masami TOHMA,
Yasuhiko SAWA, Sachie HASUMURA and Yuichi AKIYAMA
The Second Dept. of Internal Medicine The Jikei University School of Medicine

概要 目的：多層式重層遠心分離法を行ない骨髓性白血病の末梢血と骨髓における細胞の関連性と由来を細胞比重の面より追求した。対象：acute myeloid leucemia (AML) 9例, monocytic leucemia (ML) 2例, chronic myeloid leucemia (CML) 9例につきその末梢血と骨髓の細胞分布比重の範囲, 各比重層を構成する細胞の種類を比較検討した。成績：一般に比重が軽い程幼若な細胞であつた。AMLでは末梢血に細胞の存在しない軽比重層でも骨髓に白血病細胞が認められた。CMLの末梢血の細胞比重は, 悪化に従い軽くなり, 軽比重層に幼若細胞の出現をみた。この細胞は骨髓には存在しない。また化学染色態度が骨髓芽球と酷似する分葉核球を悪化時の末梢血に認めた。³H-thymidineの成績も比重別に異なるだけでなくAMLは骨髓に高く, CMLの悪化時は末梢血に高値であつた。断案：急性型と慢性型は骨髓と末梢で骨髓芽球の比重が逆の関係にあり, ³H-thymidineの成績も同様に逆の関係で, 両者の分裂能は部位および比重によつて相異があるものと考えられる。

I. 緒 言

生化学的酵素定量法, isotopeの導入, 染色体分析, 電顕による微細構造の解明等, 細胞研究の分野における現代の進歩は, 目ざましいものがある。しかしこれら高尚華麗な手段の基本となるものは常にprimitiveな, 最も方法のeasyな細胞診であろう。なぜなら, 悪性腫瘍は細胞単位で出発

〔昭和47年2月21日受稿〕

し, その後, 組織的特色を異とするものであるため, 最も特徴ある現象は細胞形態の上に, より早く確実に認められるからである。

白血病とその周辺疾患の細胞は多種多彩である。検索法の多面化により, 細胞の特徴を捉えやすく, より正確に判定できるようになつた現在でも, 病的細胞量が少なければ, また反対に細胞量が多くとも複雑ならば, 確実な判別がなかなか困

難なことも多い。すなわち同一の細胞に、同時にいろいろの検索法を適用できぬためであり、これでは折角の高度な手技手段も無用の長物と化する。それどころか、諸々の検索法で異なつた細胞を、同種細胞として観察している危険すらある。同一の細胞に、同時にこれらの検索法、異種類の染色を施し、解析し得る方法が存在するなら、診断もより適確となり細胞学に寄与するところが大きいはずである。

このような目的から、われわれは多層式重層遠心分離法を開発し^{1)~3)}、血液細胞学に応用^{4)~7)}した。その結果、同一細胞をほぼ純粋に分離し、多種目的のために利用することが可能となつたばかりか、各細胞はおのの特定の比重を有し、この比重が細胞の新らしい客観的な判定基準とできることが明らかとなつた。さらに白血病細胞にも適用し^{5)~7)}、白血病を分離比重所見より4型に分類し、これらが臨床経過と密接な関係をもつことも機会あるごとに報告してきた。しかしこれまでの研究が、白血病末梢血の細胞ばかりを対象としてきたものであり、末梢血と骨髓細胞の比重所見を対比した試みは一度もない。今回われわれは、比重所見を主体に、各比重層に分離された細胞に各種染色を施し、末梢血と骨髓を比較したところ、興味ある新知見を得たので、その一端を紹介したい。

II. 多層式重層遠心分離法と細胞の観察法

末梢血細胞ならびに骨髓の各種細胞間にはそれぞれ比重差がある。この比重差を利用して、あらかじめ積層した色々な比重のアラビアゴム溶液層をへだて遠心力を加える事により、比重の異なる色々な細胞を別個に分離する手技である。方法の詳細は紙面の関係上他著⁸⁾⁷⁾に譲り概略のみを記載する。アラビアゴム原液は比重 1.090のものを、次式にしたがい生食水にて希釈し各比重溶液を作製した。

$$X = \frac{1.090 - G}{G - g} \times a$$

すなわち比重Gなるアラビアゴム溶液を作るためには、比重 1.090の原液 a ccと混合すべき比重

g (g≒1.00) なる生食水の量 X ccの関係式である。積層するアラビアゴム溶液は重い順に7~10層とし、4,000~5,000rpm 15分間遠心し、各溶液境界面に分離された細胞をメスピペットで吸引して資料とした。この場合細胞の集つたアラビアゴム溶液の比重は、細胞の実際の比重ともほぼ等しいので、溶液の比重をもつて細胞比重と呼ぶこととする。

細胞の形態は主としてGiemsa染色、Wright染色によつて観察し、この他干渉位相差法、時には電顕法も併用した。化学的染色にはperoxidase染色、P A S 染色、Unna-Pappenheim染色、alkaline phosphatase染色、Sudan Black B染色、dithizone染色等を実施し、機能面からはneutral rot, janus grün, brilliant cresyl blueによる超生体染色、蛍光法、墨汁吞食能も併用した。この他^{8)H}-thymidineによる分裂能の追求も必要に応じin vitroで実施した。

III. これまでの研究成績の概略

実験に入るに当たり、われわれがこれまで実施してきた末梢血と骨髓における細胞比重について簡単に紹介したい⁷⁾。Table 1, Table 2 はおのの健康人の末梢血と骨髓における細胞の分布比重を示したものである。

末梢血では、細胞は比重 1.058~1.075の狭く重い範囲に分布し、とくに顆粒球は比重 1.062より重く、大多数が比重 1.065~1.070に存在する。しかしリンパ球はやや軽く比重 1.058~

Table 1. Specific gravities of cells in peripheral blood. (from healthy individuals).

Kinds of cells	Distribution of specific gravity
Platelet (1)	1.030~1.045
* Lymphocyte	1.058~1.062
Monocyte	1.058~1.062
Platelet (2)	1.055~1.062
Plasma cell	1.058~1.065
* Mature neutrophil leucocyte	1.065~1.070
* Red blood cell	1.070~1.090

* These cells can be chiefly observed.

In granulocytes there is a tendency that the eosinophil mature cell is the heaviest of all and the neutrophil mature cell is lighter than the basophil one

Table 2. Specific gravities of nucleated cells in bone marrow from healthy individuals or patients with iron deficiency anemia.

Kinds of cells	Distribution of specific gravity
Pronormoblast (Ebl.)	1.048~1.054
Normoblast (Ebl.)	1.050~1.070
Lymphoid cell	1.056~1.058
Promyelocyte	1.056~1.062
Myelocyte	1.058~1.062
Metamyelocyte	1.060~1.065
Lymphocyte	1.058~1.065
Mature stab and Segmented leucocyte	1.065~1.070
Reticulum cell	1.056~1.065

Myeloblast, megakaryoblast and megakaryocyte have not proper distribution of specific gravities.

1.062に観察された。これに対し、健常時の骨髓では細胞は比重 1.048～1.075の広範囲に及ぶが、常在する細胞は圧倒的多数が比重 1.056～1.065に集中してみられた。しかも表の各く、幼若顆粒球間では、成熟するほど比重が重くなる傾向を示し、同種細胞が症例により全く異なる比重をとることはない。また末梢血と骨髓間で、成熟顆粒球、リンパ球の存在する比重範囲は全く一致している。

つぎにわれわれは、末梢血の白血病細胞の分離所見を中心に、多種染色を加味し、白血病をA, B, C, Dの4型に分類してきた。Fig. 1はこれを示したもので、A型は比重 1.050～1.052に均一な骨髓芽球のみが分布する病型で、生存期間12～40日間、従来の激症型の骨髓芽球性白血病に相当する。B型は比重 1.054～1.058に前骨髓球のみの分布する病型で、生存期間は極めて短かく3～20日間で従来の前骨髓球性白血病に相当す

Fig. 1. Classification of myeloid leukemia from the standpoint of specific gravity of leukemic cells in peripheral blood.

る。C型は生存期間3カ月以上で緩解を示し、数年に及ぶものもあり、比重 1.052～1.058と広範囲に分布し、構成細胞は、大小不均一な骨髓芽球よりなるのが特徴である。いわゆる亜急性型というべき骨髓芽球性白血病である。D型は慢性骨髓性白血病であり、分布比重も、その病期により異なり増悪期には比重 1.048～1.060にまでおよび各成熟段階の骨髓系細胞で構成される。これらの病型は、全く相互に移行することを示さなかつた。これらは無治療状態の細胞比重で決めた病型であるが、治療によって形態に変化を生じても分布する比重範囲は、殆ど変化しなかつた。この他A型とC型はともに骨髓芽球性白血病であるが、A型はC型に比べ分布する比重範囲が狭く軽いだけでなく単一形態の細胞よりなり、とくにC型、D型にみられるようなリンパ球様所見の小骨髓芽球を混在しない点が異なる。臨床症状もA型は、発熱、出血、口内潰瘍を伴う重症型で発病するのに対し、C型は貧血のみの緩慢な初発症状である。わたくしたちの昭和31年以降の病型別年次推移をみると、当時は半数ずつであつたものが3年間で、A型の激減をみC型は著しく増加している。すなわち昭和34年以後の10年間でC型17例に対しA型は2例で、とくに最近の4年間はA型に全く遭遇していない。この限りでは、本分類が今日的ではないといえるかもしれない。A型の減少の理由は、明らかでないが、治療前の所見ですでに減少しているところから、治療の進歩とは無関係なものと考えられる。現時点では、急性骨髓芽球性白血病はC型のみとする方が当を得ているというべきかもしれない。

IV. 研究

A. 対象： Acute myeloid leucemia (AML) 9例, chronic myeloid leucemia (CML) 6例, monocytic leucemia (ML) 2例計17例の患者に対し、頻回に末梢血および骨髓を資料として本法を実施し、臨床像と対比し所見の経過を追つた。さらにこの他末梢血のみで細胞比重の経過を観察したAML 8例, CML 3例の結果もあわせて検討

した。なお末梢血は5~10mlを、骨髓では穿刺液0.2~0.5mlを生食水10mlに希釈して資料とした。抗凝固薬としては heparin Naを使用した。

B. 研究成績

末梢血と骨髓の白血病細胞が分布した比重範囲とその種類(以下細胞パターンと呼ぶ)は、次の4種のグループであつた。

③ 細胞比重(細胞の分布する比重範囲)も細胞パターン(その比重層に分布する細胞の種類)も相違がないもの。

④ 細胞比重だけ変化しているもの。

⑤ 細胞パターンだけ変化しているもの。

⑥ 細胞比重と細胞パターンの両者に変化が存在するもの。

この③, ④, ⑤, ⑥は前述の病型と極めて関係が深く、末梢血で白血球数増多が著明で白血病裂口の明瞭なAMLは③グループに属し、非白血性白血病は④か⑤のグループであつた。前骨髓球性白血病とCMLの両者は⑥グループに属していた。以下病型別にその内容を記載する。

1. 急性骨髓性白血病

1) 細胞比重および細胞パターンの異なるもの

AMLのうち、白血病細胞が比重1.054~1.058に分布し構成する細胞が前骨髓球よりなる症例1), 2)を経験した。これらの生存期間は極めて短かく、3日と9日間でFig. 1のB型すなわち前骨髓球性白血病に相当する。両者とも末梢血では前骨髓球が100%を占めるのに対し、骨髓はほぼ前骨髓球と骨髓芽球より成つていた。Fig. 2は本2症例の細胞分離所見であるが、2例とも同じ成績を示し、末梢血と骨髓の間で細胞比重および細胞パターンの異なる④グループの症例であつた。末梢血の分布比重は1.054~1.060で構成細胞(すなわち細胞パターン)は前骨髓球のみであるが、骨髓では比重1.050~1.060と分布が軽くなり、構成する細胞も骨髓芽球、前骨髓球で、とくに末梢血では細胞の存在しない軽比重層(1.050~1.054)に骨髓芽球が認められた。末梢血と骨

Fig. 2. Specific gravity and cell pattern (kinds of cells) in acute promyelocytic leukemia.

髓の前骨髓球の分布比重値は同一である。すなわち、この病型では、末梢血に欠除し骨髓のみに認められる軽比重の骨髓芽球が存在し、さらに幾分分化した前骨髓球のみが末梢へ流出しているものと推定できる。

2) 細胞比重、細胞パターンとも変化のないもの

症例は、亜急性経過をとつた2例3), 4)でC型である。末梢血、骨髓ともに細胞数が著増しており2例とも末梢血で骨髓芽球97~100%, 分葉核好中球0~3%で、両例とも白血病裂口が明らかに認められた。Fig. 3はこの2症例の分離所見で

Fig. 3. Specific gravity and cell pattern (kinds of cells) in acute myeloblastic leukemia.

Patients	Sex	Age	W	B	C	Nucleated cells in bone marrow	Hemogram											
							Mbl.	Pro.	Mz.	Meta.	Stab.	Seg II.	III.	IV.	L.	P.	Mon.	
⑤	♂	(69)	6,800	250,000			71	1	7	2	2	1	0	0	12	0	4	
⑥	♂	(30)	1,900	350,000			9	0	0	4	8	27	10	0	29	0	3	
⑦	♀	(27)	4,000	96,000			18	1	0	2	7	7	3	0	52	0	10	
⑧	♂	(62)	4,700	1134,000			65	1	1	4	11	9	3	1	4	0	1	

All cases are aleukemic type and their hiatus leukemicus are not clear.
In bone marrow many myeloblasts are recognized in the light layer.

Fig. 4. Specific gravity and cell pattern (kinds of cells) in myeloblastic leukemia.

ある。末梢血、骨髓ともに細胞の分布する範囲は比重 1.052～1.058 で大型、小型の骨髓芽球よりなり、他の層では殆ど細胞が採取されなかつた。すなわち上記④グループに属し、細胞比重、細胞パターン共末梢血と骨髓の間で全く相異を示さない症例である。剖検にて2症例とも膿様の白色骨髓で肝脾腫、リンパ節腫大は顕著でなかつた。それ故、これらの症例は、骨髓の骨髓芽球が、そのまま末梢血へ流出したものと考えたい。

3) 細胞比重のみが変化する症例

症例は、亜急性経過をとつたC型4例(5), (6), (7), (8)である。共通点は4例とも末梢血の白血球数が余り増加してないことで、全経過を通じて白血病裂口は不明瞭であつた。Fig. 4は4症例の分離所見である。全例とも細胞の種類はかなり多彩であるが、各比重層を構成する細胞は軽い比重層ほど幼若な細胞となる傾向がみられる。細胞パターンは骨髓も末梢血も同一である。しかし細胞の分布する比重は末梢血で比重 1.054 (1例のみ 1.052) までなのに対して、骨髓では比重 1.048 までにおよぶ。すなわち4例とも骨髓には、末梢血では細胞の認められない軽い比重層にも骨髓芽球が存在している。一方末梢血にも骨髓芽球は存在するが、その比重は重い。またこの末梢血の骨

髓芽球に相当する比重に骨髓でも、やはり骨髓芽球(軽比重層の骨髓芽球と形態上の相異は認められない)が観察された。骨髓に存在する骨髓芽球のなかに末梢血へ流出していない細胞(骨髓の比重 1.048～1.052に相当するもの)がある事を示している。

4) 細胞パターンの異なるもの

この症例(9)は、非白血性で血液像からみると完全なAMLであり激症経過で死亡しているが、A型かB型かの分別が困難であつた1例である。Fig. 5は本症の分離所見である。注目すべきは、

Fig. 5. Specific gravity and cell pattern (kinds of cells) in acute myeloid leukemia.

末梢血で1%にすぎない前骨髓球が分離所見では多量に検出され、逆に骨髓は前骨髓球のみで全く骨髓芽球を分離標本に欠除していた事である。

骨髓分離所見からみれば一見B型の前骨髓球性白血病とも思われるが、血液像と末梢血分離所見からは、むしろAMLのA型と考えるべき症例である。

本症の末梢血と骨髓の分離所見は、後に述べるCMLと共通する興味ある成績であつた。末梢血と骨髓の間で細胞の分布比重は殆ど差異がないけれど、細胞パターンはかなり明瞭な違いが認められる(㉔グループ)。すなわち末梢血の細胞パターンは多彩であるが、骨髓は前骨髓球のみであり、とくに末梢血では比重1.048に骨髓芽球を認めるのに骨髓には全くみられなかつた。したがって単純な考え方をすれば、骨髓からは前骨髓球の形で流出した細胞が末梢血で一部骨髓芽球に逆もどりしているわけである。本症は激症経過で死亡し、剖検にて著明な肝脾腫、リンパ節腫がみられた。これらの臓器には髄外増殖を裏づける造血亢進所見が認められた。

5) 単球性白血病の2例

症例10), 11) の2例である。1例は末梢血白血球数、骨髓有核細胞数のいずれもあまり多くなく亜急性経過(生存期間3カ月)をとつた。他の1例は白血球数、骨髓有核細胞数が共に著増しており生存期間7日間と激症経過で死亡している。両

症例とも末梢血の分離所見は比較的軽く狭い比重1.058~1.070に細胞の分布が認められる。構成細胞は、形態的にはRieder型を含む単球、単芽球でperoxidase反応、PAS反応とも弱陽性、UP反応陽性、墨汁により著明な呑食能を示した。

Fig. 6は2例の分離所見である。激症経過を示した症例11)では、末梢血と骨髓の間で細胞比重に著しい差が認められるが、細胞パターンには差異がない。すなわち骨髓には末梢血に存在しない軽い比重層(1.048~1.056)にも多量に単芽球が分布している事を示している。特長はC型の㉔グループと同一である。

亜急性経過を示した10例では、図にみる如く細胞比重、細胞パターンともに末梢血、骨髓に相異が認められない。骨髓の細胞が、それと相応する末梢血の比重層の細胞と一致している。骨髓細胞がそのまま末梢血へ流出しているものと考えられる。この症例の骨髓は有核細胞数が少なく骨髓低形成に陥つていた。骨髓の分離所見で、軽比重層に細胞を欠除していたのも、このためと考えられる。

2. 慢性骨髓性白血病

CMLは各成熟段階の細胞を含み、生存期間も長期に及ぶため、末梢血の重層遠心分離法による所見も多彩であり、各病期により変化が著しい。それ故、われわれはまずCMLの長期経過を臨床症状等により細分し、発病期、進行期、増悪(極)期、軽快期、緩解期と五分した。次いでこの病期にしたがい、CML9例につき肝脾腫と末梢の細胞分布比重を対比して追求したところ、全症例とも一定の推移を示した。またこれ以前に経験した当教室のCMLも、この比重推移の一時点に極めて良く一致した。さらにこの5期の骨髓の分離所見も末梢血と比較して考察した。

1) CML末梢血の細胞分布比重値の推移

分離所見は、症例の病期により異なるが、全症例とも、増悪時の末梢血比重は、ほぼ比重1.052~1.065であり、構成細胞(細胞パターン)は、分化を異とする幼若顆粒球を含み、いわゆる白血

Fig. 6. Specific gravity and cell pattern (kinds of cells) in monocytic leukemia.

Fig. 7. Changes in distribution of cell specific gravities in chronic myeloid leukemia (in peripheral blood of 9 cases).

病裂口をもたない。また細胞は、幼若なほど軽比重層に存在する。生存期間は3年以上で、現在生存中の者も多い。

Fig. 7はこれらの末梢血の分布比重値と細胞パターンの推移を示したものである。発病初期は、分布比重値も正常人末梢血と同一で比重 1.058～1.070であり、比重 1.065～1.070の重い層に分葉核好中球を認める点も、正常人と変化はない。ただ軽い層に少量の骨髓球、後骨髓球が観察される点異なる。病状が悪化し脾腫等が増強してくると共に、分布する比重も軽い層へと広がり、比重 1.054～1.058に骨髓芽球、前骨髓球が出現する。この時期（進行期）より正常人では細胞のみられない比重 1.054～1.062に成熟型好中球を認める（これをⅡ群と仮称する）。さらに白血球数も10万を越え、血小板減少、貧血を伴い、発熱、疼痛などを訴え、肝脾腫、リンパ節腫が最大となり、時には身体の各所に腫瘤形成が起こる時期、すなわち増悪期や急性転化期では、出現する細胞も、より軽い層にまで広がり、比重 1.048～1.054は多量の骨髓芽球で占められるようになる。とくに急性転化時の直前より、白血球の増加とともに比重 1.048～1.054に多量の成熟型分葉核球を認める（Ⅰ群と仮称する）。この細胞は、形態的に、クローバー状の核を有し、化学染色面でも、正常人の成熟好中球とは異なる細胞である。

治療が効を奏し、徐々に軽快に向うと、軽い層を占めていた骨髓芽球、前骨髓球は減少し、さらに緩解期では、殆ど正常人の所見と変化なく、進行期、増悪期にみられた成熟型分葉核球も消失する。肝脾腫等も極度に縮小し、白血球数も1～3万程度、数%までの幼若顆粒球をみるのみとなる。症例の中に急性転化後死亡するもの、緩解するもの等転帰は雑多であるが、全ての症例が、ここに示した一定の経過を辿つた。

進行期、増悪期の軽比重層に出現した成熟型分葉核球であるが、前者（Ⅱ群）は、平均 9.2μ とやや小さいだけで、形態的に正常人好中球と判別できないがAP score 0～9（当方Kaplow変法で、0～Ⅳ度に分けたもの）と極めて低い。また後者（Ⅰ群）は、平均 11.5μ の大きさであるが、クローバー状の核を有し、顆粒を欠除するものAuer小体をもつものであり、形態的に正常人好中球と明らかな相異を示す。PAS反応（－）、peroxidase反応（－）、AP score 0など酵素活性も低い。これらの細胞は出現する比重も元来骨髓芽球や、前骨髓球に相当する比重層であるので、白血病細胞の一変形細胞と推定している。

2) CMLにおける末梢血と骨髓の細胞分布比重上の対比

Fig. 8は代表的症例 12の各病期における末梢血、骨髓の細胞比重と細胞パターンを示したものである。CMLの末梢血の分離所見は前項で示した如く、病期により一定の推移を有する。しかしこのように末梢血が大きな変化を呈するのに対して、骨髓の分離所見は、発病より進行期、増悪期を通じて分布比重および細胞パターンに殆ど変化をみない。また増悪期に末梢血では、比重 1.048の軽い層に多量の骨髓芽球や、白血病細胞と考えられる異常な分葉核球を認めたが、骨髓では全くこの比重層に細胞を欠除している。特に増悪期の末梢血に認められた骨髓芽球のうち、少なくとも比重 1.048～1.050の細胞は骨髓に全く存在しない白血病細胞である。Dry tapの症例 14は、入院時より極度の肝脾腫を有した症例である。緩解時

Fig. 8. Changes in the distribution of cell specific gravity and kinds of cells in peripheral blood and bone marrow (chronic myeloid leukemia).

をととして末梢血分離所見は、肝脾腫の増減に比例し一定の推移を示したが、骨髓は一度も採取されなかった。再発時、急性心不全にて死亡したが、剖検にて骨髓は殆ど造血を営んでなく線維化しているのに対し、肝脾には髄外増殖巣が密に存在していた。したがって本症の末梢血に認められた軽比重の白血病細胞は、どのような由来によるか興味深い点である。

3. ^3H -thymidineの成績

前項(1, 2)に述べた如く、AMLは末梢血に存在しない軽比重の骨髓芽球が骨髓に認められ、CMLは逆に末梢血の軽比重の骨髓芽球が骨髓に全く存在しなかった。これらを ^3H -thymidineの標識率で比較した。

白血病細胞の標識率は比重によつて異なる値をとるが、AMLは3.1~13.5%の標識率で、この

うち末梢血は3.1~6.3%であるのに対し、骨髓は4.5~13.5%で骨髓が末梢血より高い標識率を示している。CMLでは6.0~23.0%で、このうち骨髓が6.0~18.0%であるのに対し、末梢血は7.0~23.0%であつた。とくに骨髓に認められない比重1.048の骨髓芽球は23.0%の高い標識率を示した。

まだ症例数が少なく、ひきつづき今後の検討を要するが、AMLは骨髓に標識率が高く、CMLは(但し悪化時)末梢血に高値で、両者の間で明瞭な相異があつた。 ^3H -thymidineが、細胞の分裂能を表現する数値の一つであるとすれば、AMLとCMLの間には、部位別の白血病細胞分裂能に相異があるものと推定できる(なおこの標識率は比重1.048~1.062の各比重における数値である)。

Fig. 9. Blood film chronic myeloid leukemia (D type) case No. 13. in the later stage. specific gravity 1.052. Only numerous myeloblasts are present, and another immature leucocyte can't be seen. Giemsa Stain. $\times 1,500$

Fig. 10. Marrow film the same case as the left. (D type) specific gravity 1.050. Promyelocytes, myelocytes and lymphocytes are seen among myeloblasts in this light layer. Giemsa Stain. $\times 1,500$

Fig. 11. Blood film chronic myeloid leukemia (D type) case No. 12. in the terminal stage. specific gravity 1.052. The illustration shows numerous myeloblasts, some of which give a positive peroxidase reaction. Note several segmented cells like with clover-shaped nucleus. These cells (1st Group) look like mature neutrophil leucocytes, but don't show a positive peroxidase reaction. peroxidase reaction, counterstained Giemsa Stain. $\times 1,500$

Fig. 12. Blood film chronic myeloid leukemia (D type) case No. 17. in the later stage. specific gravity 1.052. Some coarse granules giving black precipitates are seen in the nucleoli of myeloblasts. (Grade III~V). ^3H -thymidine. $\times 1,500$

V. 考 案

血液より特定の血球のみを分離するという目的のために、今日までいろいろの方法が報告されてきた。Szilard ら⁸⁾による溶血法、Burnett ら⁹⁾による赤血球凝集法、さらには本法の如き有形成分の比重差を利用する浮遊法¹⁰⁾や遠沈法である。遠沈

法も媒質の違いにより数種にのぼるが、アラビアゴムが媒質として 1948 年 Spear¹¹⁾により使用されてから、わが国でも榎本¹²⁾、木村ら¹³⁾により採用されるに至った。当教室でも、山田、清水ら¹⁴⁻¹⁸⁾は、これに改良を加え、8~10層の積層を行ない、かなり多くの種類の細胞を一度に分離することができるようになり、細胞の多彩な白血病の分野に利用するようになった。細胞比重を決定する因子は複雑で未だ不明であるが、本法により一定

の細胞が特定の比重を有し、幼若な細胞ほど軽比重であることも明確となつている。われわれは、白血病をその末梢血の分布比重所見より A, B, C, D 型に分類し、これらが臨床経過に密接な関係のあることもすでに報告してきた⁴⁻⁷⁾。概略は前述した通りである。今回は、白血病の末梢血と骨髓の所見を対比し、急性と慢性との間で、悪化時に増加する細胞の由来について興味ある成績を得た。

AML では、(イ) B 型の症例 1), 2) で、末梢血がほぼ前骨髓球のみに、骨髓では、末梢血に細胞がみられない軽比重層にも多量の骨髓芽球が分離された。(ロ) C 型症例 5), 6), 7), 8) および単球性白血病症例 11) においては、末梢血も骨髓も同一の細胞パターンであるが、骨髓では末梢血に細胞が認められない軽い比重層にも、骨髓芽球、単芽球が存在した。(ハ) C 型症例 3), 4), 単球性白血病 10 例は、末梢血、骨髓間で細胞比重、細胞パターンとも変化をみない。この場合は、骨髓の白血病細胞が、そのままの形態でも末梢血へ流出しているといえる。これらイ), ロ), ハ) の所見から AML では、骨髓に白血病細胞増殖の主体があるものと考えられる。この事は、C 型の ³H-thymidine 取込み¹⁴⁾¹⁵⁾において、骨髓の方が末梢血細胞より標識率が高い事からも窺える。

なお症例 9 は、これら AML の型に反して、末梢血に骨髓より幼若な細胞を認めたが、本症は、AML のうち髄外増殖の比較的著しかった稀な例と考える。剖検にて、激症にもかかわらず肝脾腫に著明な髄外増殖巣をみた事からも納得のゆくところである。

次に CML であるが、末梢血の分離所見は、一定の推移を示した。すなわち病状の悪化とともに肝脾腫や形成腫瘍の増大と比例して、各比重層に骨髓芽球、前骨髓球等の幼若球を多量に認めた。また軽快時も、各腫瘍の縮小に平行して軽比重層の幼若球は減少している。これに対して、骨髓は、終始一定の細胞分離所見をとり、細胞比重、細胞パターンとも全く変化しない点興味深い。と

くに増悪期で脾腫や腫瘍が増大する時期に、骨髓で少量の骨髓芽球しか認められぬのに、末梢血ではより軽い比重層に多量の骨髓芽球が観察された。CML では、AML と異なり、骨髓所見が必ずしも末梢血所見より先に増悪はしていない。これらの現象は、末梢血での白血病細胞増殖の場が肝脾や形成腫瘍等の髄外増殖巣にあることを示唆するものと考えたい。この事は、症例 14 が、入院時より骨髓が全く低形成に陥いりながら、著明な白血球増多、肝脾腫を示した例からも裏づけされる。また症例 WK, TH 等の ³H-thymidine 取込みにおいて、末梢血の軽比重層の細胞が大型であり、標識率も高いが、これは AML と全く反対の所見である。太田¹⁶⁾は、急性転化例の脾動脈に直接 ³H-thymidine を注入し、末梢血、脾臓骨髓での標識率を比較し、末梢血中の白血球の大部分が脾臓より流出していることを証明しているが、これも CML 悪化時の白血病細胞増殖の主体が髄外にあることを suggest する結果と考える。

CML 増悪時、幼若球の増加とともに、分葉核球の増加も著しい。この増加は絶対数も極端に増えており、造血機能のおかされた白血病では、これらの分葉核球がすべて、正常の分葉好中球と考えるのは納得がいかない現象といえる。われわれも、前述した如くクローバ状核を有し、骨髓芽球と化学染色態度の酷似した成熟型分葉核球を全例に検出した。PAS 反応 (一)、peroxidase 反応 (一)¹⁷⁾¹⁸⁾のものも多く、AP 活性も極めて低値である。かつ元来骨髓芽球等幼若球に相当する比重を有する点等から、われわれは、白血病細胞の一変形態と考えているが、実際軽快に向うと、他の幼若球と共に減少している。また完全緩解に入ると分葉核球の正常化にしたがい、末梢血の AP 活性は、かえって上昇したが、これは、白血病細胞の性格を持つ分葉核球 (I, II 群) の消失により、正常の成熟好中球が、クローズアップされたためと考えるが、朝長ら¹⁹⁾²⁰⁾の主張する好中球 2 系統説と一脈通ずるものがある。

以上、細胞比重の面から、AML, CML の相

異を簡単に検討してみた（なお、理解を早めるため、文中、比重が重い軽い等の表現を用いた）。

VI. 結 論

1) 白血病細胞は成熟程度の相違によつて比重に違いがあり分化の進んだ細胞ほど重い分布を示す。

2) 骨髓と末梢血では形態が同一の芽球でも比重の異なる場合があり。

(A) 一般に骨髓の細胞の方が軽い。

(B) 骨髓も末梢血も同じ比重に分布する例は骨髓低形成を示すか、または完全なる白色骨髓をなしていた。

(C) 末梢血の方が軽い例は骨髓低形成とともに髄外造血巣の著明な肥大を認めた。とくに慢性骨髓性白血病の増悪期例にこの所見が顕著であった。

(D) ^3H -thymidineの標識率も比重だけでなく、骨髓と末梢血の間で相違が認められた。骨髓低形成ならびに髄外造血巣の腫大が著明な例は末梢血の方が高値で、とくに骨髓に存在しない軽い細胞（比重 1.048）の標識率が最高値であった。

3) これらの所見から白血病細胞の由来は骨髓が主体であるけれども、それだけでなくとくに慢性型の悪化時の所見は骨髓以外の関与が大きいと考えねばならない。また骨髓から末梢血に出現する過程には一定の規則性が窺われ、なんらかの選択機転があり、骨髓破壊による単純な流出のみではないと考えられる。

4) 白血病細胞の形態には分葉核をなすものがあり、とくに慢性骨髓性白血病の経過中に好中球と鑑別困難な形態で出現することが多い。

文 献

1) 山田欽他：内科領域における悪性腫瘍の細胞診に関する研究，慈医誌，74：2751，1958。—2) 清水 進：癌細胞の分離法に関する研究，特に多層式

重層遠心分離法による内科的域の細胞学的診断に就いて，日消会誌，55：795，1958。—3) 山田欽他：腹水の細胞診について，内科，3：343，1959。—4) 山田欽他：白血病診断に対する多層式遠沈法の応用，臨床血液，1：566，1960。—5) 山田欽他：白血病の予後と白血病細胞の性状，臨床と研究，42：895，1965。—6) 加藤 勲：骨髓性白血病の細胞学的研究，特に多層式重層遠心分離法による白血病細胞の比重検索を中心として，慈医誌，82：1，1967。—7) 清水進：重層遠心分離法による白血球の分別，血液と脈管，1：1245，1970。—8) Szilard, P.: Eine Methode zur isolierten Gewinnung der weissen Blutkörperchen. Pflügers. Arch. ges. Physiol. 211: 597, 1926。—9) Minor, A.H. and Burnett, L.: A method for obtaining living leukocytes from human peripheral blood by acceleration of erythrocyte sedimentation. Blood 3: 799, 1948。—10) Fawcett, D.W. and Vallee, B.L.: Studies on the separation of cell types in serosanguinous fluids, blood and vaginal fluids by flotation on bovine plasma Albumin. J. Lab. clin. Med 39: 354, 1952。—11) Spear, F.: Separation of leukocytes from whole blood by floatation on gum acacia. Blood 3: 1055, 1948。—12) 榎本 巖：白血球の分離法に関する研究（第2報）重層遠心分離法による白血球分離，阪市大医誌，5：221，1956。—13) 木村英一他：重層遠心分離法による骨髓細胞の分離，阪市大医誌，6：234，1957。—14) 山形敏一他：白血病細胞の核酸蛋白代謝，診療，22：772，1969。—15) Vincent, P.C., Cronkite, E.P., Greenberg, M.L., Kirsten, C., Schiffer, L.M. and Stryckmans, P.A.: Leukocyte Kinetics in Chronic Myeloid Leukemia: I. DNA Synthesis Time in Blood and Marrow Myelocytes. Blood 33: 843, 1969。—16) 太田 和雄：Ⅱ. ^3H -サイミジンの血液学への応用，a白血病および腫瘍における細胞回転，日血会誌，27：693，1964。—17) 佐藤 傳：白血球および白血病細胞のペルオキシダーゼに関する研究，昭和医学会雑誌，26：273，1966。—18) 大北 威：オキシダーゼ陰性骨髓ペルオキシダーゼ反応に関する知見，補遺，日血会誌，7：329，1943。—19) Tomonaga, M., Watanabe, B., Kamochi, Y. and Ozono, N.: Leukocyte Alkaline Phosphatase in Hematological Disorders. Acta med. nagasaki. 5: 90, 1960。—20) 朝長正允他：血液疾患における白血球アルカリフォスファターゼの意義，臨床血液，1：714，1960。