

氏名・(本籍)	木 藤 克 之 (滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第157号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成6年3月24日
学位論文題目	各種血液疾患 (CML, MDS, ITP) における骨髄巨核球系細胞動態の検討
	審 査 委 員 主査 教授 挾 間 章 忠
	副査 教授 服 部 隆 則
	副査 教授 細 田 四 郎

論 文 内 容 要 旨

[目 的]

骨髄巨核球系細胞の増殖動態については、巨核球コロニー形成法、および骨髄塗沫標本あるいは骨髄組織標本を用いた免疫組織化学的な幼若巨核球同定法などがある。慢性骨髄性白血病 (CML) では、コロニー形成法による検討から、巨核球コロニーは増加し、免疫組織化学的検討から、骨髄巨核球も正常に比して多いとされている。一方、骨髄異形成症候群 (MDS) では、巨核球コロニー形成法では十分なコロニー形成の得られないことから、その増殖動態の解析は十分ではない。免疫組織学的検討では、MDSにおいて幼若巨核球が増加していたとする報告がみられるが、形態学的に細胞の大きさのみから骨髄巨核球の増殖動態を検討することには問題がある。また特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) では、巨核球細胞動態が正常に比して亢進しているか否かは結論がでていない。そこで、Thymidineの誘導体であるBromodeoxyuridine (以下BrdU) を増殖期にある骨髄細胞にin vitroで取り込ませ、パラフィン包埋切片を作製後、抗BrdU抗体と抗Glycoprotein III a (Gp III a) 抗体あるいは抗von Willebrand factor (vWf) 抗体を用いて免疫組織化学二重染色によって増殖期にある骨髄巨核球系細胞を同定する方法を開発し、CML、MDS、ITPにおける骨髄巨核球系細胞の増殖動態の検討を行った。

[方 法]

1) 対象

症例は慢性期CML8例、MDS13例、ITP16例であり、コントロールとしては、正常骨髄6例を用いた。MDSの内訳は、Refractory anemia (RA) 4例、RA with excess of blasts (RAEB) 5例、RAEB in transformation (RAEB in T) 1例、Chronic myelomonocytic leukemia (CMMoL) 3例である。

2) BrdU標識ならびに標識細胞の同定

採取した骨髄細胞1mlを10U/mlヘパリンナトリウムを含む培養液RPMI1640 5mlと混じ、BrdU (Sigma)0.8 μ gを加えて37°C・30分間培養した。70%エタノールにて24時間固定後、パラフィン包埋して4 μ mの薄切切片を作製した。1次抗体にはDNase I (10U/ml) を含有したマウス抗BrdU抗体 (Amersham) を使用し、ペルキオキシダーゼ標識ラビット抗マウスIg(DAKO) を2次抗体として反応させ、Diaminobenzidine (DAB) にて発色させた。

3) 巨核球系細胞の免疫組織学的同定

巨核球系細胞の同定には、抗vWfマウスモノクローナル抗体 (DAKO) あるいは抗GP III aマウスモ

ノクローナル抗体 (DAKO) を用い、Alkaline phosphatase-LAB法を用いて反応させた。(15 μ m以下の巨核球を幼若巨核球とした)

[結 果]

1) BrdU標識率

各疾患群でのBrdU標識率は、群間に差を認めなかった。しかし、急性ITPのBrdU標識率は慢性ITPに比し、また他の疾患群と比べても有意に高値を示していた。

2) 骨髄巨核球系細胞出現率

各疾患群での巨核球系細胞出現率は、vWf陽性細胞でみた場合、GPⅢa陽性細胞でみた場合ともに各群間で差は認められなかった。

3) 骨髄巨核球系細胞BrdU標識比率はコントロール、ITPでともに1%以下であったが、CML、MDSでは有意に高値を示した。一方、幼若巨核球比率は、コントロール、ITPで、両群間において差を認めず、ITP急性型と、慢性型とでの差も認めなかった。これに対してCML、MDSでは、vWf陽性細胞、GPⅢa陽性細胞ともにコントロール、ITPに比し有意に高値を示した。CMLでは巨核球BrdU標識比率、幼若巨核球比率はほぼ均一な分布を示していた。一方MDSでは、不均一な分布を示し、RAEB、RAEB in T症例の巨核球BrdU標識比率および幼若巨核球比率はRA、CMMoL症例に比し有意に高値を示した。また、RAEB、RAEB in T症例中観察期間中に白血病に移行した症例では、白血病へ移行していない症例に比し高値を示した。

[考 察]

骨髄細胞をBrdUで標識し、免疫組織化学的に増殖期にある骨髄巨核球系細胞を同定する方法を用いて検討し、巨核球BrdU標識比率、幼若巨核球比率がコントロール、ITPにおいては低値であるのに対して、CML、MDSでは有意に高値を示すことを明らかにした。また、骨髄全細胞のBrdU標識率はCML、MDSのような幹細胞レベルでの異常をもつ疾患とコントロール、ITPとの間には差を認めないこと、さらに、急性ITPにおいては他の疾患群と比較して全骨髄細胞の増殖亢進を認めるとする結論を得た。ITPとコントロールで巨核球出現率、幼若巨核球比率および巨核球BrdU標識比率に差はなく、ITPでの巨核球系細胞動態は正常の巨核球増殖動態の範囲内にあるものと考えられた。また、MDSでは巨核球BrdU標識比率、幼若巨核球比率が臨床経過を推測する重要な指標となりうる可能性が示唆された。

[結 論]

CML、MDS、ITPおよびコントロールの各群での全骨髄細胞BrdU標識率には差を認めなかった。一方、CML、MDSでは幼若巨核球比率、巨核球BrdU標識比率はともにコントロールに比して有意に高値を示し、またITPでの巨核球細胞動態はコントロールと差を認めなかった。MDSの場合、幼若巨核球比率、巨核球BrdU標識比率は個々症例の臨床経過の重要な指標になることが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

骨髄巨核球系細胞の細胞動態については、骨髄中での数が少ないこと、分離が困難であること等の理由で、他の血球系と比較してその研究が遅れている。本論文では、増殖期にある骨髄細胞にプロモ

デオキシウリジン(BrdU)を *in vitro* で取り込ませ、免疫組織学的に増殖期にある骨髄巨核球系細胞を同定するといった従来の方法にない簡便な骨髄巨核球BrdU標識法を開発した。特に本法の特徴は、浮遊状態の骨髄細胞にBrdUを標識した後、エタノールで骨髄細胞を凝固固定することにより、BrdUならびに巨核球の表面抗原の抗原性を維持することを可能にした点にある。

つぎに、慢性骨髄性白血病 (CML)、骨髄異形成症候群 (MDS)、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 症例の骨髄巨核球系細胞を巨核球 (Glycoprotein IIIa (GP IIIa)、von Willebrand factor (vWf)陽性細胞)、幼若巨核球とBrdU標識巨核球の3群に分け、各疾患群で比較、検討している。一般に、ITPでは骨髄巨核球数が増加するとされ、また巨核球コロニーについては正常と比較して増加しているか否かは統一した見解がないのが現状である。本研究ではITPで巨核球出現率、幼若巨核球比率、ならびに巨核球BrdU標識比率に正常と比較して差は認められず、ITPでの巨核球系細胞動態は定常状態にあることを示唆する知見を得ている。

CML、MDSはともに巨核球系細胞の形態異常がその特徴の一つとされている。本研究により、幼若巨核球ならびにBrdU標識巨核球がGP IIIa陽性細胞、vWf陽性細胞ともに有意に増加していることから、両疾患群における巨核球系細胞の異常細胞動態が確認された。さらに、MDSでは臨床経過を見る上で、巨核球BrdU標識比率の増加が白血病化と密接に関連しているとの知見も得ている。以上より、本研究は、(1)新しい骨髄巨核球BrdU標識細胞同定法を開発し、(2)広範にわたる疾患群での巨核球系細胞動態を詳細に検討し、(3)巨核球系細胞動態と臨床経過との関連性に新たな情報を提供するものであり、博士(医学)の学位を授与するに値するものと考えられる。