# Increases in Circulating Megakaryocyte Growth-Promoting Activity in the Plasma of Rats Following Whole Body Irradiation


| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
|---|---|
| URL | http://hdl.handle.net/2297/7813 |

金沢大学十全医学会雑誌　第94巻　第4号　734－743　(1985)

# X線全身照射後のラット血漿中における巨核球成長刺激活性

金沢大学医学部小児科学教室（主任：谷口　昂教授）

三　浦　正　義

(昭和60年7月15日受付)

in vitroにおける骨髄巨核球前駆細胞の増殖分化の調節に関する知見を得るために，ラットにX線全身照射を行い，骨髄細胞の減少，血小板減少を誘導し，ラットの血漿中における巨核球成長刺激活性〔Megakaryocyte growth-promoting activity (Meg-GPA)〕をin vitro巨核球コロニー形成法を用いて測定した．血漿は，$^{137}$Csにより，834 radのX線全身照射後，最初は数時間間隔，後には数日間隔で経時的にX線照射後21日目まで採取し，メチルセルロースを用いたin vitro巨核球コロニー形成培養系に30%の濃度で添加された．血漿中Meg-GPAの経時的変動には2つのピークが認められた．第1のピークは照射後12時間目で，骨髄巨核球減少あるいは末梢血血小板数減少が生ずる以前であった．第2のピークは照射後10～14日目であり，巨核球数はすでに回復を始めた時期であり，血小板数はまだその最低値の時期であった．添加した血漿濃度と巨核球の増殖との関係をX線照射後11日目のラットの血漿を用いて検討したが，単巨核球の出現は30%以下の低い血漿濃度でも多くみられたが，クラスター（2～3個の巨核球の集塊）とコロニー（4個以上）形成は30%が至適濃度であった．40%の血漿濃度では，単巨核球，クラスター，コロニーのいずれもが減少した．照射後11日目の血漿30%の条件下では，植え込んだ骨髄細胞数と発育した単巨核球数，クラスター，およびコロニーの数の関係を調べたところ，いずれもほぼ直線関係が認められた．以上の結果から，X線照射を行ったラットは，in vivoにおけるMeg-GPAと骨髄巨核球数あるいは，末梢血血小板数との関連をみる上で非常に優れた実験モデルであると言える．

**Key words**　megakaryocyte growth-promoting activity, whole body irradiation, plasma

in vitroにおける巨核球培養の技術が開発されて以来，巨核球－血小板産生系の理解がより深いものとなってきた．これまで巨核球コロニー形式のためには2-mercaptoethanol (2-ME)[1]あるいはpokeweed mitogen (PWM)[2)~6)]とともに培養した脾細胞，それにWEHI-3[7)]，Buffalo rat liver[3)]などから得られる上澄(conditioned media)などが用いられてきたが，その精しい生理学的な意味は不明な点が多かった．近年Hoffmanら[9)]は再生不良性貧血あるいは骨髄の巨核球数減少を認める血小板減少性紫斑病の患者血清中には，人巨核球コロニーの数および大きさを増強させる因子が含まれていることを報告した．その報告では，in vitroにおける巨核球コロニー刺激因子の産生は，末梢血における血小板の減少よりもむしろ，骨髄の巨核球の減少に関連がより深いのではないかと推測した．他方これとは対照的に，榎本[10)]や河北ら[11)]は再生不良性貧血だけではなく，骨髄中の巨核球は通常はやや増加しているか，正常である血小板減少性紫斑病患者の尿からの抽出物も同様にin vitroにおけるマウス巨核球コロニー産性を刺激し，さらにin vivoにおいても巨核球ならび血小板増多をもたらすことを報告した．これら臨床の場から得られた材料で提起された疑問を解決するために，実験的に末梢血および骨髄の細胞数減少を誘導し，そのモデルを用いての試みが巨核球前駆細胞の増殖分化過程を理解する上で最も適していると考えた．本研究では，ラットにX線の全身照射を行った後，血漿を一定の間隔で採取し，血漿中の巨核球コロニー形成刺激活性をin vitroで測定し，in vivoにおける骨髄巨核球数あるいは末梢血血小板数のいずれが，Meg-GPAのレベルとより関係が深いかを明らかにしようと試みた．本稿では，巨核球コロニー刺激活性（Megakaryocyte colony-stimulating

Abbreviations: Meg-GPA, Megakaryocyte-growth promoting activity; 2-ME, 2-Mercaptoethanol; PWM, Pokeweed mitogen.

activity)という言葉を用いるかわりに，巨核球成長刺激因子〔Megakaryocyte growth-promoting activity (Meg-GPA)〕を用いた．その理由は，本研究で使用した血漿は，4個以上の巨核球で構成される巨核球コロニーのみならず，2個あるいは3個の巨核球の集塊で定義されるクラスターあるいはsingle megakaryocyte（「単巨核球」）の産生も促進したからである．

## 材料および方法

### Ⅰ．使用動物とX線照射

体重250～300 gの雄Long-Evans系ラット（Blue Spruce Farms, Altamont, N. Y.）を使用した．X線照射にはCesium 137の照射器を用い，1回に4～6匹のラットをラットホールダーに固定し，417 rad/minの照射量で2分間(総量 834 rad)照射した．X線照射後ラットにはフィルターを通し紫外線をあてた水を与え感染を予防した．

### Ⅱ．血液のサンプリング

ラットをエーテルにて麻酔し，足の外側静脈より27ゲージ針を用いて血液を採取した．血小板数の算定には，10 $\mu$lの血液を1％蓚酸アンモニウム 0.99 mlと混合し，位相差顕微鏡を用いた．ヘマトクリットは75 mmのヘパリン化した微量管を用いて測定した．Meg-GPAの測定を行う血液は，エーテル麻酔をしたラットの腹部大動脈から300 unitsのヘパリンを含む注射器にて採取した．3ないし4匹のラットより採取した血液をプールし，血漿を分離後Meg-GPAの測定まで－80℃で保存した．

### Ⅲ．ラット骨髄中の巨核球数の算定

ラットの胸骨より骨髄切片を採取し，B-5 fixativeで固定，脱灰後ヘマトキシン・エオジンにて染色を施した．平均巨核球数を×500倍率にて算定した．それぞれのラットの胸骨骨髄の縦一列全部の巨核球を数え，X線未照射ラットの巨核球数に対する百分率をもって表した．巨核球数は巨核球の大きさによる補正は行わなかった．

### Ⅳ．骨髄巨核球直径の測定

接眼鏡内のマイクロメーターを用いて3ないし4匹のラット胸骨骨髄切片から，それぞれ50の巨核球を任意に選び，その直径を×1250の倍率下で測定した．

### Ⅴ．骨髄細胞培養

エーテル麻酔をしたラットを脱血により絶命させ，脛骨から骨髄を得た．骨髄は3 mlのAlpha Mediaで注意深くピペットを用いてかく拌し，さらに細胞の凝塊を除くため，25ゲージの針を通過させた後，細胞培養に供するまで氷中に保存した．骨髄巨核球の培養はMessnerら[12]によって記載された方法に準じ，一部改変して行った．即ち，本実験ではconditioned mediaを全く用いず，代りに被検血漿検体を添加した．$2\times10^5$個の骨髄細胞を最終濃度$5\times10^{-5}$M 2-MEおよび1.1％メチルセルロースを含むIscoveのDulbecco's medium (GIBCO, Grand Island, N. Y.) 1 mlに植え込んだ．さらにMeg-GPAを測定しようとする被検血漿を最終濃度30％となるように添加した．これらを35 mmのプラスチック皿（5221-R Flow Laboratories, McLean, V. A.）に無菌的に植え込み$CO^2$孵卵器中で5％$CO_2$, 37℃の条件下で7日間培養した．同一検体はそれぞれ4個の培養皿を使用した．

### Ⅵ．メチルセルロース培養液中に増殖した巨核球の同定

ラット骨髄細胞の中で巨核球ならびにその前駆細胞は組織化学的にアセチルコリンエステラーゼ活性を有する唯一の細胞である[13][14]．それゆえ，KarnovskyとRootsのアセチルコリンエステラーゼ染色法[15]の変法により，巨核球を固定した．すなわち7日間の培養の後培地に直接5 mlのアセチルコリンエステラーゼ基質（0.2 Mクエン酸，pH 5.8に溶解）を静かに加え，30～40分間室温に放置した．アセチルコリン陽性細胞は4個以上の密に集ったものをコロニー，2～3個の集塊をクラスター，1個を単巨核球と同定した．

### Ⅶ．統計学的検討

成績はStudent's t-testを用い，推計学的に検討を加え，$p<0.05$の時を有意差ありと判定した．

## 成　　績

### Ⅰ．巨核球と血小板の推移

図1にラットの全身X線照射後21日目までの骨髄巨核球数および末梢血血小板数の推移を示す．照射後1日目，巨核球と血小板数は統計学的に有意な差は認めなかったが，対照値（X線照射前値）のレベルを一時越える傾向が認められた．（血小板$p<0.30$，巨核球$p<0.15$），その後，巨核球数は3日目までに対照の1/2に減少($p<0.005$)，7日目にはコントロールの10％以下にまで低下した．血小板数は，巨核球の減少より2日程遅れて同じように減少した．X線照射10日後，巨核球の増多がはじまり，血小板数も巨核球数に約4日間遅れて増多を示した．

### Ⅱ．骨髄巨核球直径の推移

骨髄巨核球の直径は，X線照射後増多を示し，8日目には対照より約30％大きくなり（$p<0.05$），その後も同じようなレベルを保った．この結果はEbbeらの報告[16]と同様の傾向であった．

### Ⅲ．X線照射後のヘマトクリットの推移

図3にX線834 rad 照射後のヘマトクリットの推

移を示す．5日目までは幾分増多傾向を示したが（最高値48%，$p<0.15$）その後減少し，12日目には28%となり（$p<0.005$），X線照射後21日目までにはヘマトクリットはほとんど正常値にまで復した．

IV．巨核球コロニーの同定

X線未照射の正常ラット血漿を用いた場合巨核球コロニー形成はなく，クラスターおよび単巨核球のみが観察された．一方，X線照射を行ったラットの血漿を用いた場合，巨核球コロニーは顕微鏡下で通常は他の細胞より角ばって大きく，また細胞質は光の透過性が強く，光の屈折性の強い細胞膜にも特徴が認められる．アセチルコリンエステラーゼ染色でこれらの細胞が明瞭に染色されるのが認められた（図4）．

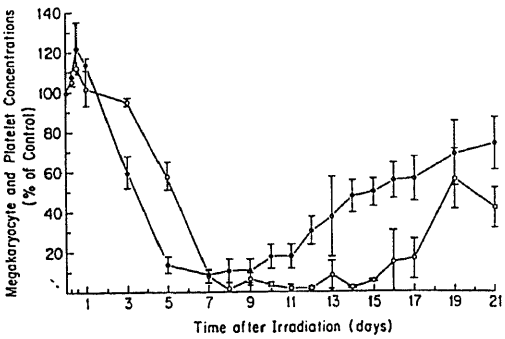


Fig. 1. megakaryocyte and platelet concentration (% of control) after irradiation (834 rad.). Each point represents the mean±SEM for 3 or 4 rats, except for days 8 when megakaryocyte concentration was determined on only 2 rats. Open circles; platelets, closed circles; megakaryocytes. The control megakaryocyte concentration was 6.0±0.4 per high-power field (4 rats): megakaryocyte values were not corrected for changes in cell size. The control platelet concentration was 1,000,000±100,000/cu mm (4 rats).

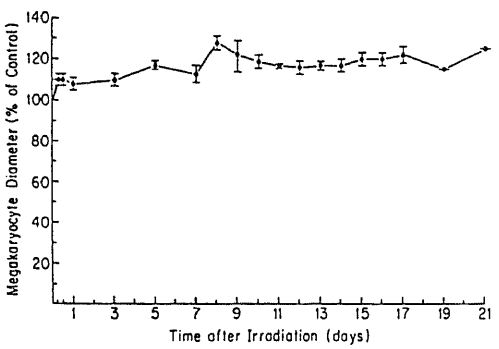


Fig. 2. Megakaryocyte diameter after irradiation (834 rad). Each point represents the mean± SEM for cells from 3 or 4 rats, except for days 8 when sections were obtained on only 2 rats; values are expressed as percentage of untreated controls. The control megakaryocyte diameter was 20±0.5 $\mu$m (4 rats).

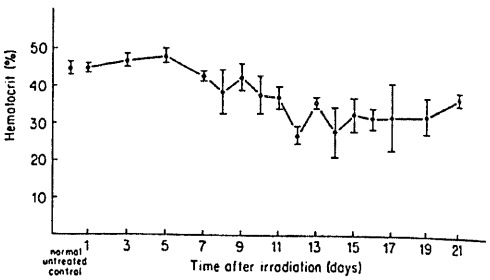


Fig. 3. Hematocrit of rats after irradiation (834 rad). Each point represents the mean±SEM for 3 or 4 rats.

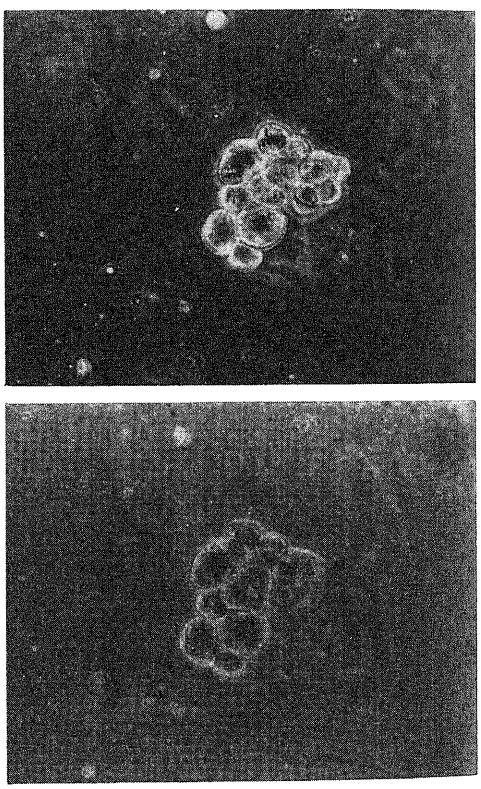

Fig. 4. Exmaple of rat megakaryocyte colony after culturing for 7 days. (A) Unstained colony (note refractory cell border and rather angular shape): (B) same colony as A, showing positive reaction after 30 min-incubation with modified acetylcholinesterase substrate added directly to the dish.

### V. X線照射後の血漿 Meg-GPA の推移

図5に照射後24時間以内の，また図6にその後のMeg-GPAの推移を示す．Meg-GPAの経時的変動には2つのピークが認められた．第1のピークは非常に早く，照射後12時間であり，骨髄細胞 $2\times10^5$ あたり平均40個の単巨核球，8個のクラスター，3個のコロニーを刺激した．これは，照射1日目の in vivo における巨核球数の増多（図1）に先がけて認められた．照射12時間目のラットから得られた血漿は，顆粒球－マクロファージ系前駆細胞（colony-forming unit granulocyte and macrophage）や Dimethoxy benzidine 陽性細胞の形成も促した．放射線照射後12時間目より Meg-GPA は24時間までには急速に減少した．Meg-GPA の第2のピークは照射後10～14日目に認められ，この時期は末梢血血小板数が最低値をとった時期と一致した（図6）．それ以後，巨核球コロニー刺激活性は徐々に低下し，放射線照射後21日目にはほぼ消失した．単巨核球とクラスター形成は，コロニー形成と類似したパターンを示したが，コロニー数よりも多く，より長期に持続した．すなわち照射後21日目，実験終了時点でも依然として有意のクラスターおよび単巨核球の形成が認められた．

### VI. in vitro における巨核球の増殖と血漿濃度との関係

図7に培養系の血漿の濃度と各巨核球の増殖数との関係を示した．コロニー・クラスター，単巨核球それぞれにおいて30%の濃度の血漿を用いた場合が至適条件となった．10%の低濃度では，30%濃度の場合に比べてコロニーの形成は非常に悪く，単巨核球の比率が増加した．血漿濃度を40%にすると，コロニー，クラスターおよび単巨核球すべてが減少した．

### VII. 培養に供した骨髄細胞数 in vitro における巨核球形成との関連

X線照射後11日目の血漿30%を用い，植え込んだ細胞数と形成された巨核球との関連を検索した．図8に見られるように，植え込んだ細胞数と巨核球コロニーの相関係数 r は 0.944 ($p<0.02$) となった．また最小二乗法により回帰直線を求めたところ，回帰係数は5.19，intercept は0.14の数字を得た．クラスターは，$r=0.954$ ($p<0.02$)，回帰直線は回帰係数は4.62，intercept は1.10でコロニーと非常に似た値となった．これらとは対照的に，単巨核球においては，回帰係数は10.80とコロニーやクラスターの2倍の値を示したが intercept は1.59でコロニーやクラスターと同様であった．相関係数 r は 0.986 ($p<0.005$) と高い値を示した．

### VIII. in vitro における巨核球形成と 2-ME の役割

in vitro megakaryocyte 形成における2-MEの役割を検討するため，2-MEを培養系に添加した場合と無添加の場合を比較した．X線照射後11日目のラット血漿を用い，培養開始後7日目に，単巨核球，クラスターおよびコロニー数を算定した．表1に示すように2-MEを加えない群では，観察されたコロニー，ク

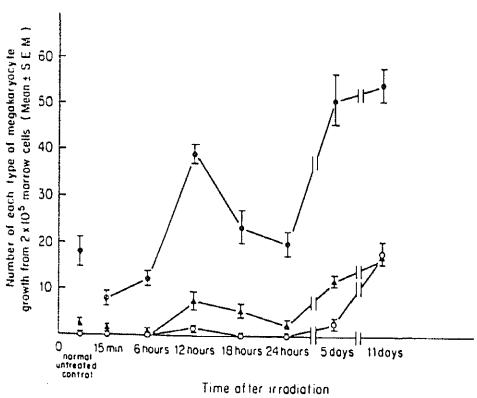


Fig. 5. Megakaryocyte growth-promoting activity of plasma collected early after irradiation (834 rad). Open circles; colonies of 4 or more megakaryocytes, closed triangles; clusters of 2 or 3 megakaryocytes; closed circles; single megakaryocytes. Each point represents the mean±SEM for 4 replicate dishes.

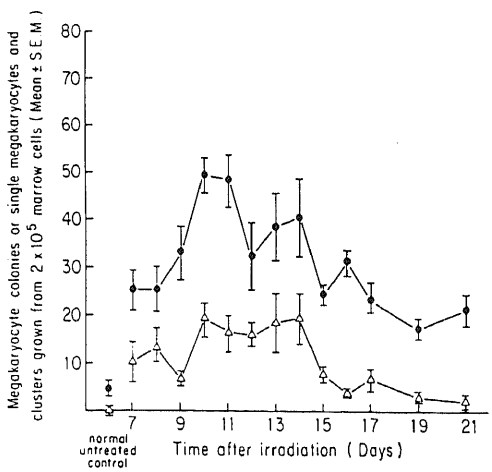


Fig. 6. Megakaryocyte growth-promoting activity of plasma collected during the second and third week after irradiation (834 rad). Open triangles; colonies of 4 or more megakaryocytes, closed circles; combination of single megakaryocytes and clusters of 2 or 3 megakaryocytes. Each point represents the mean±SEM for 4 replicate dishes.

ラスターおよび単巨核球はそれぞれ加えた群の約半数であった.

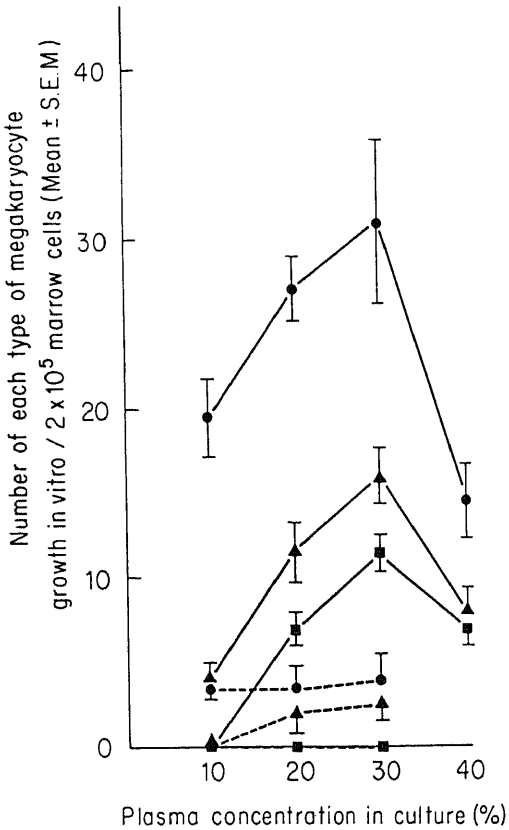


Fig. 7. Megakaryocyte growth in vitro versus plasma concentration. Circles; single megakaryocytes, triangles; clusters of 2 or 3 megakaryocytes, squares; colonies of 4 or more megakaryocytes. Solid lines; plasma collected 11 days after irradiation (834 rad), broken lines; plasma from untreated rats. Each point represents the number of single cells, clusters or colonies (mean±SEM) grown from $2\times10^5$ marrow cells in replicate dishes.

## 考　　察

これまで in vitro 細胞培養系における巨核球コロニー形成の研究は,そのコロニー形成促進因子として,主に各種培養細胞系の conditioned media を用いて行われてきたが,それらの生体内における造血幹細胞の増殖・分化に対する役割,特に生体内における巨核球ー血小板産生系の調節制御との関連は不明な点がはなはだ多かった.

今回の研究はラットに X 線を照射した後,経時的に血漿を採取し Meg-GPA を測定したものである. Messner ら[12]は血漿を用いた場合,血清よりも巨核球コロニーの増殖がよかった事を報告している. また

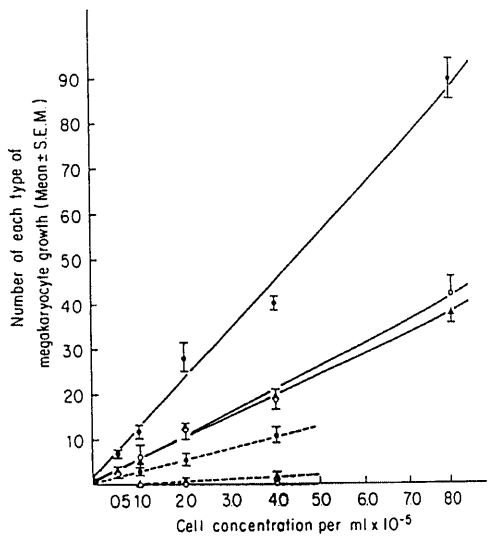


Fig. 8. Megakaryocyte growth in vitro versus number of cells plated. Solid circels; single megakaryocytes, solid triangles; cluster of 2 or 3 megakaryocytes, open circles; colonies of 4 or more megakaryocytes. Solid lines; plasma collected 11 days after irradiation (834 rad), broken lines; plasma from untreated rats.

Table 1. Effect of 2-mercaptoethanol on megakayocyte formation in cell culture

| 2-Mercaptoethanol | Megakaryocyte growth from $2\times10^5$ marrow cells* | | |
|---|---|---|---|
| | single | cluster | colony |
| $5\times10^{-5}$M | 27.5±2.6# | 14.5±2.2 | 12.0±0.8 |
| none | 16.5±0.5 | 8.5±1.5 | 5.5±1.0 |

* Cultures contained 30% plasma collected from rats 11 days postirradiation.
\# Mean±SEM. (n=4)
In this experment, control cultures with 30% plasma from untreated rats and $5\times10^{-5}$M 2-mercaptoethanol contained 7.0±0.6 single megakaryocytes, 2.5±1.9 megakaryocyte clusters, and no megakaryocyte colonies.

Vainchenker[17]はヒト血清中には巨核球コロニーの形成を抑制する因子が含まれていると述べている．このため本研究では，血清を用いるかわりに血漿を使用した．

Meg-GPA の変動には 2 つのピークが認められ，第 1 は X 線照射後 12 時間目，生体内において，骨髄巨核球数あるいは末梢血血小板数が減少する以前，むしろ一時的に増加する時期であった．この反応の機序は明らかではないが，最近の報告[18]によると，細胞培養系に放射線照射を行った骨髄細胞を添加すると各種コロニー形成が促進される事が述べられており，成長刺激因子が X 線照射 12 時間目頃放射線によって障害を受けた細胞から遊離されるのであろうと推論されている．X 線照射をしたラットからの血漿が in vivo において白血球増多を惹起する事も知られている[19]．Odell ら[20][21]は骨髄中の巨核球数と末梢血中の血小板数が X 線照射後 1 日目，やや増加する事を報告しているが，本実験においても巨核球数と血小板数の変動について同様の結果が得られた．

Meg-GPA の X 線照射後 10～14 日目における第 2 のピークは，おそらく巨核球数および血小板数の減少と結びついていると思われる．前述したように Hoffman ら[9]は再生不良性貧血および血小板減少性紫斑病の患者血清を用いての研究で，in vivo における巨核球産生刺激因子の産生は末梢血血小板数の減少よりも，むしろ骨髄巨核球数の減少により深く関連があると述べている．本研究によると Meg-GPA の高い時期は，巨核球数が減少した時期というより，むしろ血小板数が最も低下した時期とより強く関連していると思われた(図 6)．しかし，この問題はいくつかの研究室で，抗血小板抗体を用い血小板減少を誘導した動物実験で相反する結果が出ていることからも早急な結論は出せないように思われる．Levin ら[5]は，血小板特異血清を注射する事により，血小板減少を惹起したウサギの血漿は，巨核球コロニー形成を刺激しない事を見出した．これに反し Nakeff ら[22]は，抗血小板血清を用い，血小板減少をひきおこしたマウスの血清は，巨核球コロニー形成を促した事を報告している．Levin ら[5]は，抗血小板抗体の注射が，他の血液前駆細胞にも影響を与え，その反応は当初予想されたような単純なものではないのかもしれないと述べている．この問題を解決するためには，さらに多くの研究を要するものと思われる．

放射線照射後は，血液あるいは血漿量に変化が起こり，照射後 5 日間のヘマトクリットの変動は必ずしも，血流中における赤血球数の実際の変化をあらわしているものではない事はよく知られている．実験後半（X 線照射 10 日目～19 日目）におけるヘマトクリットの減少は主として，赤血球系細胞増殖の低下ならびに出血によるものの両者が関与している[23]．これまで，巨核球コロニー培養系において，エリスロポエチンの持つ役割が強調されてきたが[24)~26]，本研究において，ヘマトクリットと Meg-GPA の間に特にはっきりした相関は認められなかった．

前述したように，本研究においては，X 線照射後 11 日目のラットの血漿を用い，巨核球コロニーの形成を調べるとともに，単巨核球および 2 ないし 3 個の巨核球で構成されているクラスターについても検討した．単巨核球に関しては，これまでも幾つかの報告があるが[7][25][27]，本研究においても，30%の X 線照射ラットからの血漿を刺激因子として用いることにより，骨髄細胞 $2\times10^5$ あたり 18.5～54.0 (平均 32.7) の単巨核球を得た．これは X 線照射ラット血漿を刺激因子として用いる事により，骨髄中の血液幹細胞が in vitro で巨核球へと分化する事を示すものである．単巨核球を形成する血液前駆細胞が，コロニー形成の前駆細胞よりも，刺激因子に対してより感受性が高い事は，(1)単巨核球とクラスターに対する刺激因子が，放射線照射後コロニーに対する刺激因子よりも早く出現し，かつ遅くまで残る事（図 6），(2) 10%濃度の放射線照射血漿でも，30%の血漿の場合の 2/3 もの単巨核球を刺激するのに対して，コロニーの形成は全く促さなかった事(図 7)，(3)過去の報告で，急激な血小板減少を起こした直後，数時間で in vivo においてアセチルコリンエステラーゼ陽性細胞，すなわち巨核球の前駆細胞と考えられる細胞の増加を認めた[14][28]が，急激な血小板減少を引きおこしても，数日後になるまで in vitro において巨核球コロニー形成細胞の変化を認めなかった[5][29]などの例がある事より推測できる．Williams ら[30]は，2 つの刺激因子が巨核球コロニー形成の過程で必要であると述べている．1 つは巨核球コロニー形成刺激因子（Megakaryocyte colony-stimulating factor）と呼ばれるもので，細胞分裂ひいてはコロニー形成を刺激する因子であり，他は巨核球分化刺激因子とも言えるもので，巨核球への分化を刺激し，コロニーの大きさとコロニーを形成している細胞の ploidy と細胞容積の増加を促すものである．これら 2 つの因子の存在を前提にして考えると，本実験系において，X 線照射後，早期あるいは晩期の単巨核球およびクラスター刺激因子がコロニー形成刺激因子に比べて，より高いことが容易に説明できる．つまり，単巨核球への分化を促す巨核球分化刺激因子が，この実験中の初期および晩期に存在する一方，巨核球コロニー形成刺激因子はラット生体の中で X 線照射第 2 週に主として生産される

との解釈である．別の説明としては，放射線照射ラットからの血漿中に含まれるのは1つの因子だけであり，ただ巨核球コロニー形成のためには，単巨核球あるいはクラスター形成の場合に必要な量以上に多くの因子が必要とされるというものである．

巨核球コロニーに関しては，これまで多くの研究室からさまざまの報告があり，多くの矛盾点が指摘され，またそれぞれの結果の比較も困難であった．最近のLevinの報告[31]で見られるように，その混乱の原因のいくつかは現在使われている巨核球培養系が複雑な事であり，かつ刺激因子として使われている物質の物理的，生化学的特徴がよくわかっていないためであろうと思われる．巨核球コロニーを得るためには，胎児仔牛血清[1)2)4)~8)24)]，馬血清[32)33)]，ヒト血清[34)35)]，などの蛋白複合体の他に，conditioned media[1)~8)]，エリスロポエチン[24)~26)]，あるいは血小板減少症の患者から得られた血清[9)36)]や尿抽出物[10)11)37)38)]が必要である．その中でも，とりわけconditioned mediaの多様性が，研究の進歩の妨げとなっているのかもしれない．X線照射をしたラット血漿を用いる事により，巨核球培養系をより簡素に，かつ再現性のあるものにする事ができる．X線照射後11日目の血漿を用いた場合，培養に供した骨髄細胞数と形成されたコロニー，クラスターおよび単巨核球数との間に，ほぼ0点を通る直線関係が認められた．このことは，本実験系を利用して，骨髄巨核球前駆細胞の定量的測定が可能である事を意味する．2-MEはこの系において，培養条件を至適なものとするために不可欠のように思われる．

## 結　　論

in vivoにおける巨核球前駆細胞増殖調節機構についての知見を得るために，X線全身照射ラットモデルを開発し，その血漿中の巨核球成長刺激因子（Meg-GPA）をin vitro巨核球コロニー形成法で測定し，以下の結論を得た．

(1) X線照射後の経時的変動で，2つのMeg-GPAのピークが認められた．第1は，X線照射後12時間目であり，第2は照射後10～14日目で，この第2のピークは末梢血血小板減少の時期とほぼ一致するものであった．

(2) 巨核球コロニー刺激活性はX線照射後21日目までに消失するが，巨核球クラスター，ならびに単巨核球形成刺激活性はより長期に残存した．

(3) 本実験系における至適血漿濃度は，巨核球コロニー，クラスター，単巨核球とも30%であった．

(4) ヘマトクリットとMeg-GPAの間には特に明瞭な相関は認められなかった．

(5) 植え込んだ骨髄細胞数とコロニー，クラスター，単巨核球形成刺激活性の間には直線関係が成立した．

(6) 本培養系において6-メルカプトエタノールは$5\times10^{-5}$Mの濃度で，巨核球形成刺激活性を増強した．

(7) X線全身照射を行ったラットモデルは骨髄細胞培養系において，単に今までなかったMeg-GPAの信頼性ある，かつ再現性の強い供給源であるのみならず，Meg-GPAとin vivoにおける巨核球数あるいは血小板数との関連を研究する上において非常に有用なモデルであり，骨髄移植の実験モデルとしても応用できる．

(8) X線照射ラットから得られる血漿はin vitroにおいての単巨核球，巨核球コロニーの分化における分類体系を確立するための刺激因子として非常に有用であると考える．

## 謝　　辞

稿を終るに臨み，研究の御指導と御校閲を賜わりました金沢大学医学部小児科　谷口昂教授に深甚なる感謝の意を表します．また本研究の遂行にあたり，直接御指導，御助言を賜りましたアメリカ合衆国テネシー州，St. Jude Children's Research Hospital, Dr. Carl W. Jacksonに深く感謝します．併せて，種々の御助力をいただいた金沢大学医学部小児科　小泉晶一講師，佐藤保助教授に深謝いたします．

なお本論文の要旨は第2回Meeting of Cellular and Molecular Biology of Neoplasia（1983年，オンタリオ，カナダ）および第13回Experimental Hematology Meeting（1984年，アトランタ，USA）において発表した．

## 文　　献

**1) Metcalf, D., MacDonald, H. R., Odartchenko, N. & Sordat, B.**: Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 1744-1748 (1975).

**2) Nakeff, A. & Daniels-McQueen, S.**: In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: Colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **151**, 587-590 (1976).

**3) Burstein, S. A., Adamson, J. W., Thorning, D., & Harker, L. A.**: Characteristics of murine megakaryocytic colonies in vitro. Blood **54**, 169-179 (1979).

**4) Mizoguchi, H., Kubota, K., Miura, V. & Takaku, F.**: An improved plasma culture system for the production of megakaryocyte colonies in vitro. Exp. Hematol. **7**, 345-351 (1979).

**5) Levin, J., Levin, F. C. & Metcalf, D.**: The

effects of acute thrombocytopenia on megakaryocyte-CFC and granulocyte-macrophage-CFC in mice: Studies of bone marrow and spleen. Blood 56, 274-283 (1980).

6) **Lieschke, G. J.**: Kinetics of the formation of pure and heterogenous megakaryocyte colonies by megakaryocyte progenitor cells in vitro. Exp. Hematol. **10**, 78-89 (1982).

7) **Williams, N. & Jackson, H.**: Kinetic analysis of magakaryocyte numbers and ploidy levels in developing colonies from mouse bone marrow cells. Cell Tissue Kinet. **15**, 483-494 (1982).

8) **Penington, D. G.**: Megakaryocyte colony culture using a liver cell conditioned medium. Blood Cells **5**, 13-23 (1979).

9) **Hoffman, R., Mazur, E., Bruno, E. & Floyd, V.**: Assay of an activity in the serum of patients with disorders of thrombopoiesis that stimulates formation of megakaryocytic colonies. N. Engl. J. Med. **305**, 533-538 (1981).

10) **Enomoto, K., Kawakita, M., Kishimoto, S., Katayama, N. & Miyake, T.**: Thrombopoiesis and megakaryocyte colony stimulating factor in the urine of patients with aplastic anaemia. Br. J. Haematol. **45**, 551-556 (1980).

11) **Kawakita, M., Enomoto, K., Katayama, N., Kishimoto, S. & Miyake. T.**: Thrombopoiesis-and megakaryocyte colony-stimulating factors in the urine of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Br. J. Haematol. **48**, 609-615 (1981).

12) **Messner, H. A., Jamal, N. & Izaguirre, C.**: The growth of large megakaryocyte colonies from human bone marrow. J. Cell. Physiol. (suppl) **1**, 45-51 (1982).

13) **Zajicek, J.**: Studies on the histogenesis of blood platelets. Acta. Haematol. (Basel) **12**, 238-244 (1954).

14) **Jackson, CW.**: Cholinesterase as a possible marker for early cells of the megakaryocytic series. Blood **42**, 413-421 (1973).

15) **Karnovsky, M. J. & Roots, L.**: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. J. Histochem. Cytochem. **12**, 219-221 (1964).

16) **Ebbe, S. & Phalen, E.**: Dose autoregulation of megakaryocytopoiesis occur? Blood Cells **5**, 123-138 (1979).

17) **Vainchenker, W., Chapman, J., Deschamps, J. F., Vinci, G., Bouguet, J., Titeux, M. & Breton-Gorius, J.**: Normal human serum contains a factor (s) capable of inhibiting megakaryocyte colony formation. Exp. Hematol. **10**, 650-660 (1982).

18) **Humphries, R. K., Eaves, A. C. & Eaves, C. J.**: Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 3629-3633 (1981).

19) **Sodicoff, M. & Binhammer, R. T.**: Leukocytosis-induced factor in the blood of x-irradiated rats. Radiat. Res. **33**, 82-93 (1968).

20) **Odell, T. T. Jr., Jackson, C. W. & Friday, T. J.**: Effects of radiation on the thrombocytopoietic system of mice. Radiat. Res. **48**, 107-115 (1971).

21) **Odell, T. T. Jr.**: Radiation effects on the megakaryocyte and platelet system, p.109-116, In Manual on Radiation Haematology, Technical Reports Series No.123. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1971.

22) **Nakeff, A. & Bryan, J. E.**: Megakaryocyte proliferation and its regulation as revealed by CFU-M analysis, p.241-259, In Golde. D. W., Cline, M. J., Metcalf, D. & Fox, C. F. (ed.): Hematopoietic Cell Differentiation. Academic, Orlando FL, 1978.

23) **McDonald, T. P., Lange, R. D., Congdon, C. C. & Toya, R. E.**: Effect of hypoxia, irradiation and bone marrow transplantation on erythropoietin levels in mice. Radiat. Res. **42**, 151-163 (1970).

24) **McLeod, D. L., Shreeve, M. M. & Axelrad, A. A.**: Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro. Nature **261**, 492-494 (1976).

25) **Dukes, P. P., Izadi, P., Ortega, J. A., Shore, N. A. & Gomperts, E.**: Inhibitory effects of interferon on mouse megakaryocytic progenitor cells in culture. Exp. Hematol. 8, 1048-1056 (1980).

26) **Freedman, M. H., McDonald, T. P. & Saunders, E. F.**: Differentiation of murine marrow megakaryocyte progenitors (CFUm): Humoral control in vitro. Cell Tissue Kinet. **14**, 53-58 (1981).

27) **Kalmaz, G. D. & McDonald, T. P.**: The effects of thrombopoietin on megakaryocytopoiesis of mouse bone marrow cells in vitro, p.77-82, In Evatt, B. L., Levine, R. F. & Williams, N. T. (ed.): Megakaryocyte Biology and Precursors: In Vitro Cloning and Cellular Properties. Elsevier North Holland, New York, 1981.

28) **Kalmaz, G. D. & McDonald, T. P.**: Effects of antiplatelet serum and thrombopoietin on the percentage of small acetylcholinesterase-positive cells in bone morrow of mice. Exp. Hematol. **9**, 1002-1010 (1981).

29) **Burstein, S. A., Adamson, J. W., Erb, S. K. & Harker, L. A.**: Megakaryocytopoiesis in the mouse: Response to varying platelet demand. J. Cell. Physiol. **109**, 333-341 (1981).

30) **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).

31) **Levin, J.**: Review: Murine megakaryocytopoiesis in vitro: An analysis of culture systems used for the study of megakaryocyte colony-forming cells and of the characteristics of megakaryocyte colonies. Blood **61**, 617-623 (1983).

32) **Nakeff, A., Dicke, K. A., & Van Noord, M. J.**: Megakaryocytes in agar cultures of mouse bone marrow. Ser. Haematol. **8**, 4-21 (1975).

33) **Nakeff, A.**: Colony-forming unit, megakaryocyte (CFU-m): Its use in elucidating the kinetics and humoral control of the megakaryocytic committed progenitor cell compratment, p.111-123, In Baum, SJ., Ledney, G. D. (ed.), Experimental Hematology Today. Springer-Verlag, New York, 1977.

34) **Vainchenker, W., Guichard, J., Breton-Gorius, J.**: Growth of human megakaryocyte colonies in culture from fetal, neonatal and adult peripheral blood cells, Ultrastructural analysis. Blood Cells **5**, 25-43 (1979).

35) **Vainchenker, W., Bouguet, J., Guichard, J., & Bareton-Gorius, J.**: Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors. Blood **54**, 904-945 (1979).

36) **Mazur, E. M., Hoffman, R., & Bruno, E.**: Regulation of human megakaryocytopoiesis, An in vitro analysis. J. Clin. Invest. **68**, 733-741 (1981).

37) **Kawakita, M., Miyake, T., Kishimoto, S., Ogawa, M.**: Apparent heterogeneity of human megakaryocyte colony-and thrombopoiesis-stimulating factors: Studies on urinary extracts from patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. Br. J. Haematol. **52**, 429-438 (1982).

38) **Kawakita, M., Ogawa, M., Goldwasser, E., & Miyake, T.**: Characterization of human megakaryocyte colony-stimulating factor in the urine extracts from patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood **61**, 556-560 (1983).

**Increases in Circulating Megakaryocyte Growth-Promoting Activity in the Plasma of Rats Following Whole Body Irradiation** Masayoshi Miura, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J.Juzen Med. Soc. **94**, 734—743 (1985)

**Key words**: megakaryocyte growth-promoting activity, whole body irradiation, plasma

## Abstract

To gain insight into the regulation of megakaryocyte precusors in vivo, we assayed in vitro megakaryocyte growth-promoting activity (Meg-GPA) in the plasma of rats in which both marrow hypoplasia and thrombocytopenia had been induced by irradiation. Rats received whole body irradiation of 834 rad from $^{137}Cs$ source. Plasma was collected consecutively at various intervals of hours to days, up through the 21st day of postirradiation, and was tested, at a concentration of 30%, for Meg-GPA on bone marrow cells cultured in the medium containing 1.1% methylcellulose with $5\times10^{-5}$ M 2-mercaptoethanol. With normal rat plasma, no megakaryocyte colonies (defind as $\geq 4$ megakaryocyte ) were seen and only a few single megakaryocytes and clusters (defind as 2 or 3 megakaryocyte ) were formed. Two peaks of plasma Meg-GPA were observed after irradiation. The first appeared at 12hr, before any decrease in marrow megakaryocyte concentration or platelet count. The second occurred on days 10-14 after

irradiation, after the nadir in megakaryocyte concentration and while platelet counts were at their lowest levels. A dose response study of plasma concentration and megakaryocyte growth, using plasma collected 11 days postirradiation, demonstrated that patterns of megakaryocyte growth were related to plasma concentration in the culture medium; formation of single megakaryocytes was optimal over a range of 20%-30% plasma concentration, while cluster and colony formation were optimal at a plasma concentration of 30%. All forms of megakaryocyte growth were decreased with 40% plasma. There was a linear relationship between the number of bone marrow cells plated and growth of sigle cells, clusters and colonies using a concentration of 30% plasma collected 11 days after irradiation. We conclude that irradiation causes time-related increases in circulating megakaryocyte growth-promoting activity. We suggest that an irradiated rat is a good model for studying the relationships between Meg-GPA and megakaryocyte or platelet concentration in vivo.