

骨髓移植の基礎的研究:Density Gradientによる免疫担当細胞の分離について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4609

骨髓移植の基礎的研究

Density Gradient による免疫担当細胞の分離について

金沢大学医学部内科学第3講座（主任：服部絢一教授）

原 田 実 根

（昭和50年2月27日受付）

本論文の要旨は第36回日本血液学会総会（昭和49年4月）において報告した。

最近数年間の免疫学の進歩はめざましく、単なる感染防禦という古典的な概念から免疫監視機構（Immunological surveillance）という、より包括的な考え方へと変化してきている。抗原に特異的に反応する抗体は血清中の免疫グロブリンで代表されるもので、液性抗体の主な担い手であるが、これとは別に抗原を認識し特異的にこれと反応する感作リンパ球が直接“effector cell”として関与する機構があり、これは細胞性免疫のひとつとして知られている。この effector cell については、これまでの多くの優れた細胞生物学的研究によって、その起源、性質、機能および分化増殖機構などが明らかにされつつある¹⁾²⁾。さらに免疫反応に関与するリンパ球には、胸腺の影響をうけ主に細胞性免疫を担当すると考えられる胸腺由来細胞（thymus derived cell, T cell）と、抗体産生にあずかる骨髓由来細胞（bone marrow derived cell, B cell）に二大別され、さらにマクロファージが第三の細胞として考えられている³⁾⁴⁾。したがって抗原刺激をうけた生体においては、これら三種類の細胞によって種々の免疫反応が遂行されているものと理解されており、抗原を認識し特異的に反応して生体反応を惹起し、さらに免疫的記憶にいたる免疫応答の過程は細胞レベルで解析されるようになってきている⁵⁾⁶⁾。

同種移植免疫反応では体液性免疫の関与よりは細胞性免疫がより重要で、反応の主役を演ずる免疫担当細胞は T cell であるといわれている⁷⁾⁸⁾。また “not self” として認識されるのは組織適合抗原群あるいは移植抗原群と呼ばれる遺伝的に決定された細胞膜上の抗原によってであり⁹⁾、拒絶反応はこの抗原を認識し増殖分化した T cell によって惹き起され、主にそ

の細胞障害性によって発現されると考えられている⁸⁾⁹⁾。しかし補体存在下での抗体の細胞障害性や最近注目されている抗体依存性細胞性免疫（Antibody dependent cell-mediated immunity¹⁰⁾）の影響も予想されており、移植免疫の詳細なメカニズムについては、まだ不明な点が少なくない。

骨髓移植は移植される graft が形態的にも機能的にも異なる数種類の単離した細胞によって構成され、しかも免疫担当細胞およびその前駆細胞をも含んでおり、さらに graft はただ生着するだけでは目的を達せず自己再生、分化および増殖をおこなって造血を営まねばならぬ点で他の臓器移植とはきわめて異っている¹¹⁾。同種骨髓移植反応では host の免疫担当細胞が graft の組織適合抗原群を認識して惹き起す host versus graft reaction (HVGR) と、逆に graft 中の免疫担当細胞が host に対して反応する graft versus host reaction (GVHR) の二種類の拒絶反応が理論上生じうる。骨髓移植は免疫生物学の基礎的研究分野では欠くことのできない実験方法として重用されてきたが、ヒトにおける本格的な臨床応用即ち造血不全の治療手段として利用され成功例が報告されるようになったのは、ごく最近のことである¹²⁾。近年ヒト主要組織適合抗原（HL-A）についての理解が深まりまた検索法が開発され、一方 host の免疫能を低下させる免疫抑制療法が進歩した結果、腎移植の豊富な臨床経験が示すように HVGR をかなりの程度までコントロールできるようになった¹³⁾。ヒト骨髓移植では一旦 graft が生着しても GVHR が発現すると、host は体重減少、下痢、皮膚炎および造血リンパ組織不全などを主徴とする graft versus

Fundamental studies on human bone marrow transplantation ; Physical separation of immunocompetent cells from bone marrow cells by density gradient. **Mine Harada** Third Department of Internal Medicine (Director : Prof. K. Hattori.), School of Medicine, Kanazawa University.

host disease (GVHD) を招来してしばしば死に至ることが知られている¹¹⁾。したがって GVHR をいかに予防するか、あるいは一旦生じた GVHR をいかに軽減するかということが、ヒト同種骨髓移植における解決すべき重要な課題として残されている。これには graft 中より免疫担当細胞を物理的に除去したり、あるいは何らかの生物化学的处理をおこなって免疫担当細胞の機能を消失させる方法が可能性として考えられる。

本論文では GVHR の予防ないし軽減する方法を見い出すことを目的として、各種濃度の牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 溶液による不連続密度勾配遠心法 (BSA discontinuous density gradient centrifugation, BSA-DDGC) を利用してヒト骨髓細胞をいくつかの層に分画し、得られた各分画について細胞の種類や機能を種々の角度から検討し、一定の成績を得たので報告する。

実験材料および実験方法

1. 対象および骨髓細胞採取

当科外来および入院患者のうち免疫学的異常を有さず、ほぼ正常ないしごく軽度の異常しか示さない骨髓像を有するものを対象とした。骨髓穿刺は型のごとくおこない、ヘパリン加穿刺液を約 2 ml 得た。室温 1-2 時間放置または plasma gel (再々蒸留水に gelatin 3 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 0.7 g を加え全量 100 ml としたもの) を 1 ml 加え混和後 20-30 分 37°C 恒温槽に放置後、赤血球が可及的にまじらず、かつ有核細胞に富む上清を得た。必要に応じて培養液 (RPMI 1640 又は McCoy 5 A) あるいは

HBSS で洗浄遠心した。

2. BSA-DDGC の方法

1) 35% stock solution の調整

BSA 粉末 (Fraction V powder, Armour Pharmaceutical Co.) には浸透圧に影響を及ぼす程度の塩類が含まれているので、Dicke¹⁵⁾の方法に準じて次のような浸透圧調整をおこなった。まず BSA 粉末を再々蒸留水に溶かし 17.5% BSA 溶液を作製しその浸透圧を osmometer (Advance Co.) で測定した。この 17.5% BSA 溶液の浸透圧の 2 倍の値 (35% BSA 溶液の浸透圧) との和が 375 mOsm となるように浸透圧を調整した pH7.2 の Tris (hydroxymethyl) amino methane buffer を作製した。50 g の BSA 粉末を 90 ml の上記 Tris buffer に完全に溶かし refractometer (Atago Co.) で refractive index が 1.4003 になるまで Tris buffer を加えて 35% stock solution とした。ただちに filter pad (Toyo Roshi, 0.45 μ , No.85) で加圧濾過して滅菌し -20°C で保存した。

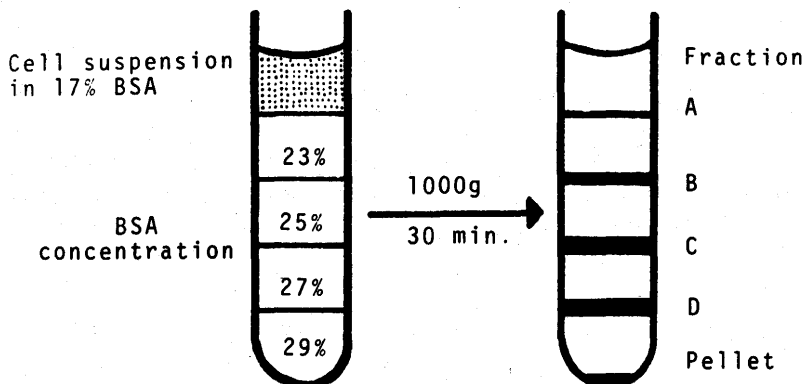
2) NaCl-Phosphate buffer (N-P buffer) の作製

0.94% の食塩水 900 ml に 0.2 M, pH7.2 の Phosphate buffer および再々蒸留水をそれぞれ 22.5 ml ずつ加えたものを N-P buffer とした。ついでオートクレープで滅菌後浸透圧が 300 mOsm となるように調整した。この N-P buffer で stock solution を希釈し 29, 27, 25, 23, 17% の各濃度の BSA 溶液を作製した。

3) Centrifugation の方法

各 BSA 溶液を 5 ml の Nitrate cellulose tube (2 x 1/2 inch, Beckmann) に 1 ml ずつ比重の重い

Figure 1 Schematic representation of discontinuous density gradient centrifugation (BSA-DDGC)



順序で気泡を作らぬように注意深く重層し、さらに17% BSA 溶液に浮遊させた 100×10^6 前後の骨髓細胞を23% BSA 溶液の上に重層した。遠心は冷却遠心機(富永製作所, CG-101)で 10°C 1000gの条件で30分間行ない、各濃度 BSA 溶液の境界に生じた細胞層を比重の軽い順にA, B, C, D分画および Pellet とした。得られた各分画細胞は必要に応じて HBSS または培養液で2回洗浄し、0.3% Trypan blue を用いる dye exclusion test で viability をチェックした後、適当な細胞濃度に調整し以下の実験に使用した。BSA-DDGC の方法の概略を Fig.1 に示す。

3. 分画骨髓細胞の種類、形態および機能

1) 分画骨髓細胞の細胞分布と形態学的特徴

得られた各分画の細胞数の算定と共に Giemsa 染色塗抹標本から各分画骨髓細胞の光顕的形態分類を行った。

2) Phytohemagglutinin (PHA) および Pokeweed mitogen (PWM) に対する in vitro 反応性

ヒトにおいては T cell stimulant のひとつと考えられている PHA と、T cell, B cell 両方を刺激するといわれている PWM に対する反応性を滝口ら¹⁵⁾の方法によって検討した。まず各分画細胞 1×10^6 個を自己血漿 10% と抗生物質 (PC 100u./ml, SM 100μg/ml) を加えた RPMI 1640 培養液 (GIBCO) 2 ml とともに培養試験管に入れ、PHA-P (Difco) の場合は2μl, PWM (Difco) の場合は20μlを添加し、それぞれ72時間および96時間 37°C にて 5% CO_2 in air, 100% 湿度の条件下で培養した。培養終了前24時間に於いて $1 \mu\text{Ci}$ の ^3H -Thymidine (Amersham, Spec. Act. 5 Ci/mmol) を各試験管に加えた。培養終了後 0.85% の冷食塩水を加えて2回 1500 rpm, 10分間遠心洗浄し、ついで2回 1800 rpm にて 5% TCA (Trichloro acetic acid) で遠心洗浄し、さらに1回メタノールを加えて遠心した。沈渣を乾燥させた後、0.25 ml の Hydroxide of Hyamine 10-X (Packard Co.) を加え 56°C , 60分恒温槽にて incubate 後、シンチレーション液 (Toluene 1 l に POP 5g, POPOP 100mg を溶かしたもの) を 10 ml づつ加えて ^3H -Thymidine の取り込み即ち芽球化したリンパ球の DNA 合成を 5% TCA 不溶性 ^3H -Thymidine 量として液体シンチレーションカウンターで活性を測定した。培養はいずれも duplicate で行い誤差が 10% 以内になるようにし、それ以上のものは除外した。

3) Alloantigen に対する反応性

alloantigen としては Conray-Ficoll 法¹⁶⁾によって分離した正常健康人末梢血リンパ球をもちいて Bach ら¹⁷⁾の方法を修正して各分画骨髓細胞との one way mixed leukocyte culture (MLC) を行なった。まず stimulant cell として $1.5 \times 10^6/0.25$ ml の各分画骨髓細胞および末梢血リンパ球を培養試験管に入れ、これに 50μg/0.1 ml の Mitomycin (三共製薬, MMC) を含む RPMI 1640 培養液を加え混和後、 37°C , 30分間 incubate し、ついで冷しておいた培養液を加えて2回遠心洗浄した。これに responding cell として各分画細胞 1×10^6 を2)と同じ培養液 2 ml とともに加え、2)と同様の条件で7日間培養した。培養終了24時間前 $1 \mu\text{Ci}$ の ^3H -Thymidine を加え培養終了後、2)と同様の処理を行なって 5% TCA 不溶性 ^3H -Thymidine 量として活性を測定した。

4) 羊赤血球ロゼット形成性リンパ球

ヒトでは T cell のマーカーといわれる羊赤血球と spontaneous rosette を形成するリンパ球 Rosette forming cell (RFC) について、矢田ら¹⁸⁾の方法に従って検討した。HBSS で3回洗浄後、牛胎児血清 (FCS) 中に $5 \times 10^6/\text{ml}$ の細胞濃度に調整した各分画細胞浮遊液 0.1 ml と FCS に $1 \times 10^8/\text{ml}$ となるようにした羊赤血球浮遊液 0.1 ml とを小試験管にとり、混和液 37°C にて15分間 incubate 後、1000 rpm, 5分間遠心し、さらに 0°C の氷浴中で1時間以上反応させた。反応終了後毛細管ピペットをもちいてゆるやかに再浮遊させ、その一部を血球計算盤に入れ400倍で検鏡した。250個以上の各分画細胞について2個以上の羊赤血球と結合しているリンパ球を陽性として陽性率を計算した。また別に作製しておいた各分画骨髓細胞の Giemsa 染色塗抹標本より、リンパ球の百分率を求めておき、各分画骨髓細胞に含まれるリンパ球中に占める RFC の割合を間接的に求めた。対照としては Conray-Ficoll 法で分離した正常健康人の末梢血リンパ球の RFC を用いた。

5) Colony forming cell in culture (CFC-C)

in vitro での造血能を測定するひとつの指標として、軟寒天培地上に形成される顆粒球コロニーを各分画骨髓分画細胞について、Pike ら¹⁹⁾の方法を用いて検討した。まずコロニーの発育に不可欠な colony stimulating factor (CSF) を産生する feeder layer を作製した。健康正常人よりヘパリン加血液約 10 ml を試験管にとり室温で1-2時間放置後、毛細管ピペットで leukocyte rich plasma を得た。McCoy 5 A medium (GIBCO) に FCS 15% と、

種々のアミノ酸やビタミン類を Pike らの処方に従って添加したものを培養液として用いた。この培養液を前もって37°Cに加温しておき、これに沸とう後完全に溶解した5%寒天 (Bacto-Agar, Difco) を9:1 (最終濃度0.5%) で加え40°Cになるまで冷した後、先に得た leukocyte rich plasma を $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度になるように加えよく混和した。混和後ただちにこの細胞浮遊液を1mlづつ 35mm Petri-dish (Falcon #1008) に分注し室温にてゲル化させたものを feeder layer とした。feeder layer は37°C, 10% CO₂ in air, 100% 湿度の条件にした incubator に保存し、作製後一週間以内に使用するようにした。一方 overlayer も feeder layer 作製の場合と同じ要領で行なった。寒天を最終濃度 0.3% になるように培養液に加え、さらに培養液で3回洗浄した各分画骨髓細胞を $2 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度になるように加え、これを上記 feeder layer の上に overlayer として 1ml づつ重層しゲル化するまで室温に放置した。以上の操作はすべて無菌下に行なった。ついで dish を上記と同じ条件の incubator に移し12-14日間培養した。培養終了後倒立顕微鏡で観察し、軟寒天層に形成された40個以上の細胞からなるコロニー数を算定した。

実 験 成 績

1. 分画骨髓細胞の細胞分布と形態学的特徴

得られたヒト骨髓細胞の各分画における細胞数分布は10例の平均値として示すと Fig.2 のようになり、A分画に最も少なく常に10%以下、B分画は 10-20%、CおよびD分画は最も多く 40% 前後であった。穿刺液量が約 2ml と比較的多くかなり末梢血の混入が避けられないために、P分画における細胞数はどの程度末梢血が混入するかによって変動が大きかった。P分画を含めた回収率は BSA-DDGC を行なう際 17% BSA 溶液に浮遊させた全骨髓細胞数の約 60-70% であった。Giemsa 染色所見については Fig.3 に、また5例についての各分画骨髓細胞の百分率は平均値と標準偏差を Table 1 に示した。Fig. 3A と 3B から明らかなようにA、B分画には赤芽球系、顆粒球系ともに大型芽球様細胞が多数を占めた。一方C分画は Fig. 3C に示すように大型芽球様細胞は減少し骨髓球以下のやや成熟した好中球が増加、またリンパ球も10%前後みられた。ついでD分画には Fig. 3D に示すごとく小リンパ球が集中して分布し、顆粒球も後骨髓球以下の成熟したものが多く見られた。Pellet は遠心操作により破壊された細胞が多く分類

不可能なものが約 20% を占め、主体をなすのは成熟好中球で、その他、好酸球が集散的に分布しリンパ球も散見された。多染性正球性赤芽球はどの分画にも 20% 前後分布し、巨核球はA、B分画、形質細胞はC、D分画、単球は特に一定の傾向を示さなかった。

2. PHA および PWM に対する in vitro 反応性

Mitogen を加えた場合と加えなかった場合の ³H-Thymidine の取り込みの比を Index of stimulation (I.S.) として表すと、PHA に対してD分画はA、BおよびC分画に比較し最もよく反応し、I.S.は常に1.1以上の値を示した。またC分画も I.S. が1.1以上の値を示す場合があったが、A、B分画は常に1.0以下であって PHA は cytotoxic に働いた。Table 2 に代表的な場合を示したが、PHA 非添加でB、C分画細胞が高い background 値を示したのは、この分画に DNA 合成を行なっている細胞が多いためと思われる。一方 PWM に対しては各分画の反応は一定の傾向を示さなかったが、Table 3 および Fig.4 に示すように I.S. が1.0 以上になる場合が多かった。

3. Alloantigen に対する反応性

リンパ球によって規定される組織適合抗原 (Lymphocyte defined determinants) の最も信頼できる検査法であるといわれている MLC によって骨髓リンパ球の T cell 機能を検討すると、Table 4

Figure 2 Distribution profile of human bone marrow cells fractionated by BSA-DDGC

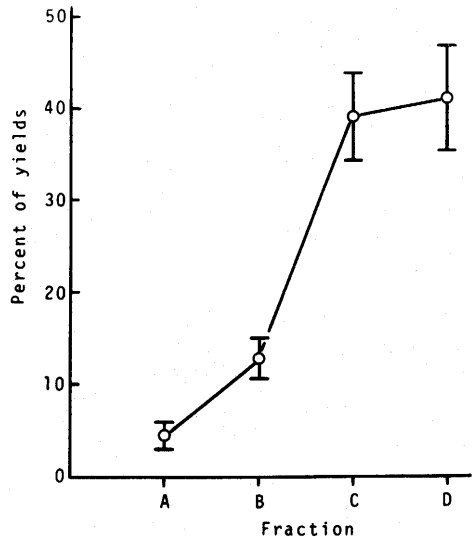


Table 1 Morphological differentiation of fractionated human bone marrow cells

	Fraction				
	A	B	C	D	Pellet
Erythroblast					
Proerybl.	1.8±0.				
Macro. Bas.	1.8±0.24	0.3±0.28	0.1±0.21		
Macro. Poly.	5.1±2.11	2.0±0.51	0.8±0.47	0.3±0.24	
Macro. Orth.				(+)	
Normo. Bas.	3.4±0.97	0.8±0.24	0.7±0.87	14	
Normo. Poly.	23.3±3.74	27.5±1.10	23.3±6.46	14.9±6.68	8.5±6.01
Normo. Orth.				(+)	
Mitosis	0.3±0.24	0.3±0.24			
Granulocytes					
Myelobl.	8.8±0.74	7.0±1.57	0.1±0.20		
Neutr. Prom.	29.1±4.03	36.5±3.11	7.3±3.52	1.4±1.39	
Neutr. Myel.	12.3±1.74	11.3±3.14	27.7±17.92	11.7±5.24	2.1±1.60
Neutr. Met.	7.0±0.48	6.3±3.14	11.0±3.69	21.8±4.29	12.6±5.47
Neutr. St.	0.8±0.43	0.6±0.57	8.2±4.39	18.4±3.84	27.6±5.93
Neutr. Seg.	0.7±0.26	0.4±0.26	2.8±2.47	4.3±2.47	17.7±3.83
Eosin.	(+)	0.3±0.24	0.5±0.38	1.8±1.24	4.6±1.60
Basophil			(+)	1.4±1.71	
Monocytes	1.5±0.31	1.4±0.21	2.8±1.91	1.9±0.60	1.2±1.51
Lymphocytes					
Large	1.8±0.24	2.0±0.79	2.8±1.01	2.9±2.08	1.7±1.62
Small	0.9±0.31	0.8±0.77	10.3±3.79	21.2±4.86	5.2±1.88
Plasma cell			(+)	(+)	
Megakaryocytes	(+)	(+)			
Unclassified	1.7±0.73	1.3±0.74	1.4±0.34	1.6±0.64	22.7±9.74

Table 2 PHA stimulation of fractionated human bone marrow cells

Fraction	³ H-TdR uptake in 3 days culture (cpm)		
	without PHA	with PHA	I. S. *
A	49195	13676	0.28
B	110814	39022	0.35
C	211577	43202	0.20
D	36672	61354	1.67
P	12539	15955	1.27

* I. S. : Index of Stimulation = $\frac{\text{cpm in culture with PHA}}{\text{cpm in culture without PHA}}$

Table 3 PWM stimulation of fractionated human bone marrow cells

Fraction	³ H-TdR uptake in 4 days culture (cpm)		
	without PWM	with PWM	I. S. *
A	35794	42881	1.20
B	91124	55957	0.61
C	184830	41926	0.23
D	30350	37511	1.24
P	8238	11858	1.44

$$* \text{ I.S. : Index of Stimulation} = \frac{\text{cpm in culture with PWM}}{\text{cpm in culture without PWM}}$$

Table 4 One way mixed culture of fractionated human bone marrow cells as responder and peripheral blood lymphocytes as stimulant

Fraction	³ H-TdR uptake in 7 days culture (cpm)		
	Syngeneic	Allogeneic	I. S. *
A B	4798	5070	1.1
C	5596	4921	0.9
D	1094	2733	2.5
P	[124]	[824]	[6.6]

$$* \text{ Index of stimulation} = \frac{\text{cpm in culture of allogeneic combination}}{\text{cpm in culture of syngeneic combination}}$$

に示されるように、D分画は I.S. 2.5 と高値を示し常に1.5以上の値であった。したがってD分画は alloantigen である MMC 処理末梢血リンパ球を認識するリンパ球即ち T cell に富む分画であることがわかる。³H-Thymidine の取り込みが background においてかなり低下しているのは PHA や PWM の場合に比べ、培養期間が長いことによると考えられる。

以上 mitogen と alloantigen に対する反応性をそれぞれ4例について検討した結果を平均値として図示すると Fig.4 のごとくなり、D分画が PHA および alloantigen に高い反応性を示していることは明らかである。

4. 羊赤血球ロゼット形成性細胞

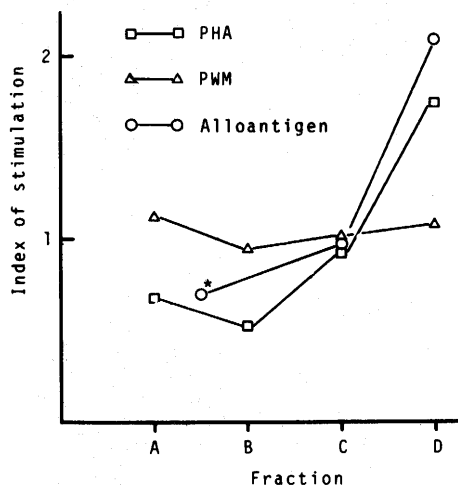
羊赤血球と spontaneous rosette を形成するリンパ球はA, B分画にはほとんど認められないが、6

例の検討では Fig.5 に示すようにC, D分画にはそれぞれ $6.9 \pm 3.6\%$, $14.6 \pm 6.4\%$ となり、D分画に RFC が最も多く観察された。さらにD分画について骨髓リンパ球中の RFC を間接的に求めると、 $57.2 \pm 11.4\%$ となり、30例の健康正常人で得られた成績 $52.5 \pm 7.3\%$ とほぼ同様の値を示した。したがってD分画に含まれるリンパ球にも末梢血リンパ球とほぼ同程度の RFC が存在することが明らかとなった。

5. Colony forming cell in culture (CFC-C)

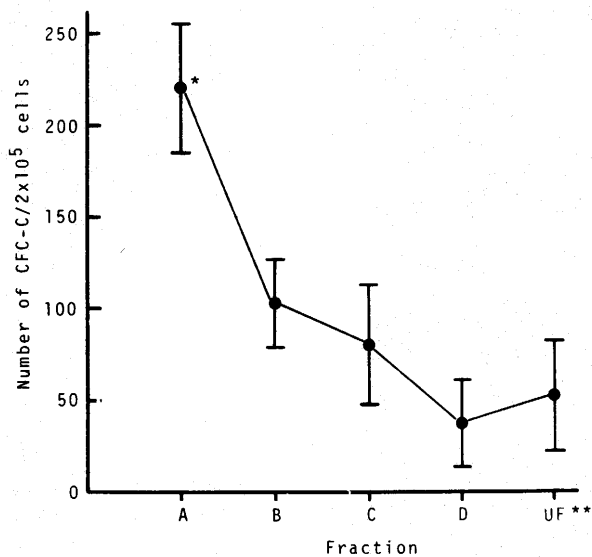
各分画について 2×10^5 個の骨髓細胞あたりの CF-C-C 数を4枚のプレートの平均値と標準偏差で表わすと、代表的な場合は Fig.6 のごとくなり、A分画は 239 ± 28 と最も高値を示しB, C分画がこれにつき、D分画は最も低く常に末分画の場合より低値を示した。A分画の CFC-C 数は他分画にくらべ有意に高いコロニー数が得られ ($P < 0.05$, Mann-Whitney

Figure 4 Response of fractionated human bone marrow cells to PHA, PWM and alloantigen



* A+B fraction

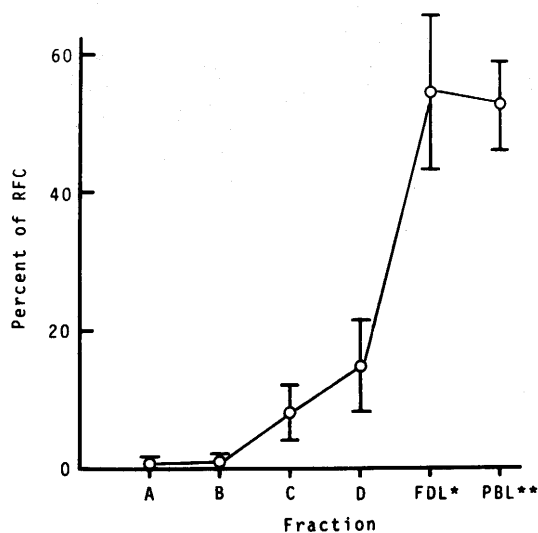
Figure 6 Colony forming cell in culture (CFC-C) of fractionated human bone marrow cells



* A vs B, C, D and UF ; $P < 0.05$
(Mann-Whitney U test)

** UF : Unfractionated bone marrow cells

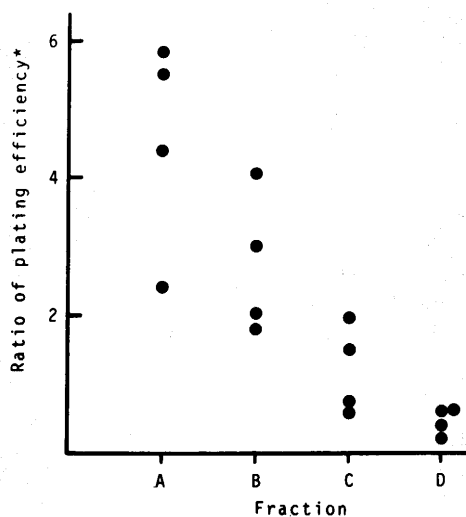
Figure 5 Rosette forming cell (RFC) of fractionated human bone marrow cells



* FDL : Fraction D lymphocyte

** PBL : Peripheral blood lymphocyte

Figure 7 Ratio of plating efficiency of fractionated and unfractionated human bone marrow cells



* Ratio of plating efficiency : Mean number of CFC-C of fractionated cells / mean number of CFC-C of unfractionated cells

U test), 4例について行った検討でもほぼ同様の傾向がみられた。さらに末分画の場合の CFC-C 数の平均値と各分画骨髄細胞中の CFC-C 数の平均値との比を Ratio of plating efficiency として表わすと, Fig.7 のようにA分画は 2.4-5.8 倍, B分画は 1.8-4.8 倍と高値を示したが, C分画は高々 2 倍まででD分画は常に1.0以下であった。即ち CFC-C はA, B分画に集中し, とくにA分画にそのピークが認められ, C, D分画は CFC-C には乏しかった。ヒトの顆粒球コロニーはその形態的特徴によって, 好中球コロニーとマクロファージコロニーとに区別されるが, Fig.8 にその1例を示した。

考 察

1. BSA-DDGC について

血液ないし造血臓器から血液細胞を分離または分画する方法には種々のものが考案されているが, 大別すると細胞の容積や大きさの差と, 比重の差を利用するものにわけられる。比重差を利用する細胞分画法には, 連続的密度勾配で行なうものと非連続なものがあり, 密度勾配に使用される溶媒としては BSA の他に Ficoll, アラビアゴム, Glycogen などがよく知られている²⁰⁾。BSA はまず末梢血液より白血球を分離したり²¹⁾, 赤血球を分画するのに利用されたが²²⁾, BSA 溶液の濃度を比を変えることによって末梢血から顆粒球とリンパ球を分離することも試みられ, 低比重層に 90-96% のリンパ球, 高比重層に 93-95% の顆粒球を含むという分離成績が報告された²³⁾。さらに技術的改良が重ねられ, Shortman²⁴⁾ は全血でなく, あらかじめ赤血球を除去した buffy coat を BSA 浮遊液として重層する方が, 細胞の streaming が起らず濃度勾配も乱れず cell aggregation が減少し分離精度が向上する点で有利であると述べている。Dicke¹⁴⁾ は BSA-DDGC に影響を及ぼす諸因子をひとつひとつ厳重にチェックして高い再現性を得ることに努めている。その主なものを列挙すると次のごとくである。1) pH ; stock solution の pH は 5.3 が最も細胞分離が良好で 7.2 になると density equilibrium が底部に移り, 細胞が高比重域に集中する。またこの pH ではとくに明らかな細胞障害性は見られなかった。2) BSA の濃度 ; BSA 濃度が溶液の比重を決定し, わずかな濃度誤差でも分画された細胞の分布が異なってくるので, とくに重要である。BSA 濃度と refractive index は各種濃度の BSA 標準溶液の extrapolation による分析から直線関係にあることが明らかにされているので, 20% 以上

の粘稠な BSA 溶液の正確な濃度は refractometry を行なって refractive index によって決定される必要がある。また比重を直接測定することも高粘度のため困難であるが, pyknometry によって測定することができる。たとえば 35% BSA 溶液の比重は 1.1004 ± 0.001 , 27% では 1.0780 ± 0.001 であることが確かめられている。3) 浸透圧 ; 高浸透圧では細胞は収縮し低浸透圧では膨張することはよく知られている。したがって浸透圧は分画される細胞分布に重大な影響を及ぼし, 細胞は高浸透圧では高比重域に, 低浸透圧では低比重域に集中して分布する結果を招く。さらに使用する BSA 粉末にも少量の塩類が含まれるので, 新しい lot ごとに浸透圧を測定し, その結果にあわせて Tris buffer の浸透圧も調整しなければならぬ。BSA に含まれる塩類をイオン交換樹脂によって除去する方法²⁵⁾ もあるが, 本実験で行なった浸透圧調整法でも, 分画細胞の機能を明らかにする上では問題なく再現性も十分であった。その他分画すべき細胞数, 温度および遠心力なども少なからず影響を及ぼすといわれる。一方ある分画を再び BSA-DDGC によって分画する refractionation を行なえば, より純粋な分画が得られる。BSA 溶液は 35% 溶液 (Pentex Co.) として市販されているものもあり, これを用いて胸腺細胞²⁶⁾ や脾細胞²⁷⁾ などの heterogeneity を明らかにした報告もあるが, lot ごとに品質が一定でないので正確を期する実験には同一 lot のものを使用する必要があるといわれている。骨髄細胞のように形態的機能的に異なる多種類の細胞によって構成されている場合には, より再現性の高い分画法が望まれる。しかしながら Table 1 より明らかなごとく, ある一種の細胞を純粋に集めることは, 骨髄細胞の場合は困難で隣接する各分画間で overlap することは避けられない。即ち骨髄リンパ球と同じ比重を有する顆粒球や赤芽球が混在する。しかし細胞を集団として分析する研究手段としては, この BSA-DDGC は有用であり, とくに多種類の細胞からなる骨髄細胞の分画には適していると思われる。高分子多糖体ポリマーである Ficoll が最近頻用されているが²⁸⁾, 廉価であり高濃度でも浸透圧に影響を与えないこと, 毒性がなく高圧滅菌可能なことなどが有利な点であろう。しかし骨髄細胞による検討では, BSA にくらべ回収率がかなり低下する成績を得ている。

2. 骨髄リンパ球の T cell 機能

同種骨髄移植において生じる GVHR は donor-recipient 間の組織適合性の差によって重症度²⁹⁾ が, また graft 中に含まれる免疫適格細胞とくに T

cell の量的な差によって発現時期¹¹⁾が決定されるという。従って GVHR を解析するには骨髓リンパ球の T cell 機能を量的および質的に検討することが不可欠である。骨髓リンパ球の起源、分化および機能について、現在までに得られている知見を主に実験動物における成績から要約すると、1) 骨髓リンパ球はマウス³⁰⁾、ラット³¹⁾、モルモット³²⁾などの実験動物で総有核細胞数の約 20-25% を占め、ヒトでは 15% 前後^{33/34)}といわれる。2) Autoradiography を利用した骨髓リンパ球の cytokinetics の研究³⁵⁾や染色体マーカーを使ったリンパ球の分化増殖に関する研究³⁶⁾などより、骨髓リンパ球は骨髓で産生される。いいかえれば他の血球と同じ幹細胞から分化するものと一応考えられている。3) 骨髓リンパ球は形態的には大部分を占める小リンパ球と比較的大型の large lymphoid cell あるいは transitional cell に区別され、後者は小リンパ球の precursor cell と考えられている³⁷⁾。4) 小リンパ球は life span の長短により short-lived のものと long-lived のものに分けられるが、骨髓小リンパ球は大部分が short-lived で、long-lived のものはごく少ないといわれている³⁸⁾。従って骨髓にも T cell と考えられる。いわゆる long-lived, recirculating and small lymphocyte と区別できないリンパ球が存在するものと思われる。5) 骨髓リンパ球の免疫学的機能についての詳細はまだ不明であるが、この方面についての報告が最近が多い。細胞表面に免疫グロブリンを有するリンパ球が多数みられること³⁹⁾、抗体産生前駆細胞の存在が確かめられていること⁴⁰⁾、一方 in vitro で PHA 反応性を示し MLC において活性を示すこと^{41/42)}、さらに GVHR を起しうること^{43/44)}などの事実から、骨髓リンパ球には B cell および T cell という機能的に異なる少なくとも 2 種のリンパ球の population が存在すると考えられている。

細胞分画法によって骨髓リンパ球の機能を検討した成績がいくつか報告されている。まず Dicke ら⁴¹⁾は細胞構成がヒト骨髓とよく似ているマウス脾細胞を BSA-DDGC によって分画し造血能は脾コロニー法、GVHR は spleen weight assay 法を用いて検討した結果、造血能に富む分画とは異なる分画に GVHR がみられることを報告するとともに、ヒトおよびサルにおいて PHA に in vitro で反応する T cell がマウスにおいては GVHR 陽性の分画とはほぼ同じ density を有することを明らかにした。Phillips ら⁴³⁾は細胞の容積、大きさおよび細胞表面性質の差を利用した細胞分画法である velocity sedi-

mentation によってマウス骨髓細胞を造血能に富む分画と GVHR を起す分画にそれぞれ分離しうることを明らかにした。同じ方法を用いてマウスおよびヒトの骨髓細胞を分画し、in vitro で PHA に反応し MLC において活性を示す細胞集団はほとんど小リンパ球からなり、CFC-S や CFC-C とは異なる sedimenting rate を示す成績⁴²⁾も得られている。さらに Burleson ら⁴⁴⁾は BSA-DDGC によってマウス骨髓リンパ球の T cell 機能を GVH 活性を指標として検討した結果 GVH 活性を示す細胞は高比重域に分布し、この分画を構成するリンパ球は形態的機能的にいわゆる long-lived, small lymphocyte と判別できないと主張している。またラット骨髓リンパ球にも GVH 活性のあることが明らかにされている⁴⁵⁾。著者ら⁴⁶⁾も BSA-DDGC によってマウス骨髓リンパ球の T cell 機能を検討した結果、小リンパ球に富む高比重域分画は in vitro で PHA に反応し、MLC で活性を示し、さらに GVHR を惹起しうる即ち T cell 機能を有することを報告したが、この際行なった、最も信頼できる T cell のマーカーである θ 抗原による骨髓細胞の検索では、 θ 抗原陽性リンパ球は従来の報告^{47/48)}と同様にごくわずかしき証明されなかった。一般的には T cell は骨髓において前駆細胞より分化増殖して胸腺に移行し、胸腺の影響を受けてさらに分化成熟して T cell としての機能を獲得し、末梢リンパ組織に出ていわゆる long-lived, recirculating, small lymphocyte になるものと理解されている。骨髓に θ 抗原陽性リンパ球がほとんど証明されないことは既に述べたが、一方細胞表面に免疫グロブリンを証明できないリンパ球が 50% 以上存在するという報告もある³⁹⁾。この点については骨髓で産生されたリンパ球が、そのまま骨髓内で成熟し T cell 機能を持つに至ったとする可能性と recirculating, small lymphocyte がさらに成熟し骨髓内に移行したとする可能性のふたつが考えられる。いいかえれば prethymic T cell か postthymic T cell か⁴⁹⁾という問題であるが、Komuro ら⁵⁰⁾は骨髓リンパ球に胸腺より抽出したホルモン様物質 (Thymosin) を作用させると、 θ 抗原陽性細胞が出現するという注目すべき報告をしている。一方 Claman⁵¹⁾は nude mouse の骨髓リンパ球が PHA および ConA に反応しなかったことより、骨髓の T cell も胸腺依存性であると述べている。このように骨髓リンパ球の免疫学的機能や life history については次第に明らかにされてきているが、ヒト骨髓リンパ球については技術的困難性や末梢血リンパ球の混入が避けら

れないことなどより、まだ十分な知見が得られていない。骨髓移植で実際に graft として用いられるのは骨髓穿刺液であるから、その免疫学的機能や造血能を検討することは重要である。本実験で得られた成績から明らかなように、骨髓穿刺液中のリンパ球についても実験動物の場合とほぼ同様の成績が得られた。ヒトにおける T cell のマーカーとしては⁵²⁾⁵³⁾、蛍光抗体法で証明されるリンパ球原形質の HTL 抗原 (human thymus lymphoid tissue antigen), ヒツジ赤血球とのロゼット形成性, in vitro で PHA や Con A のような非特異的 mitogen や MLC における alloantigen などの特異的抗原刺激に対する反応性, さらに芽球化した T cell から放出される生物学的活性因子 (lymphokine) の直接的ないし間接的測定などが利用されている。勿論病的状態では、これらのマーカーは必ずしも厳密な意味では T cell のマーカーとして使用できない場合もありうる。in vitro PHA 反応性は Table 2, Fig. 4 に示されるように D 分画のみが常に I.S. 1.1 以上となり、D 分画は T cell 機能を保持していることがわかる。一方 C 分画にも D 分画の約 1/2 のリンパ球が見られ、PHA 反応性も I.S. の平均値で示すと 1.0 以下ではあるが 1.1 以上の場合もあり、また A, B 分画より高値を示す傾向がみられた。これは、この分画には顆粒球が多数混在しリンパ球が量的に少ないために、芽球化して DNA 合成を行なうリンパ球の ³H-Thymidine 取り込みの増加としては認められなかったものと考えられる。末梢血リンパ球を alloantigen とする one way MLC においても Fig. 4 Table 4, にみられるように PHA と同様の傾向がみられたが I.S. の値を比較すると D 分画の T cell 機能はより明らかである。PWM に対しては Table 3, Fig. 4 に示されるようにどの分画も反応しうると考えられる。これは PWM が T, B cell 両方を刺激しうること、既に述べたように小リンパ球の前駆細胞や抗体産生細胞が軽比重域に分布すること⁴⁰⁾⁵⁴⁾ などと考え合わせると、PWM がこれらの細胞を刺激している可能性も否定できない。ヒトでは GVH assay を行なうことは不可能であるが、T cell が非自己である抗原を認識し増殖するという免疫応答の初期段階の出来事は、GVHR においても当然発現していることであり、この意味において MLC は T cell 機能を in vitro で評価しうる有用な方法である。羊赤血球と spontaneous rosette を形成するリンパ球は、胸腺リンパ球のほとんどを占め、HTL 抗原陽性で in vitro PHA 反応性が高く胸腺依存部に局在するなど

の事実より、T cell の性質と考えられている⁵²⁾⁵³⁾。この RFC は Fig. 5 より明らかなごとく、D 分画に最も多く観察され、しかも末梢血リンパ球とほぼ同程度の比率で認められた。また C 分画にも D 分画の約 1/2 程度の RFC が見られた。

以上述べてきた成績より、ヒト骨髓リンパ球にも PHA に反応し、alloantigen を認識しさらに羊赤血球とロゼットを形成するなどの T cell 機能を有するリンパ球が存在し、本実験で用いた BSA-DDGC では D 分画について C 分画に集中して分布し、従って骨髓 T リンパ球を分離除去することは可能であることが明らかとなった。

3. 造血幹細胞

造血幹細胞の起源については古くから論議されてきたが、1961 年 Till and McCulloch の脾コロニー形成法⁵⁵⁾の開発以来、造血幹細胞は抽象的な概念から具体的な論議の対象となってきた。最近数年間の技術的開発とともに幹細胞研究が盛んに行なわれつつあり新しい知見も得られているが、造血機構の詳細はまだ完全に解明されていない状況である。致死量 X 線照射をうけたマウスに同種骨髓移植を行なうと 8-10 日後脾には肉眼的コロニー (CFC-S) が生じる⁵⁵⁾。この CFC-S は赤芽球系、顆粒球系、巨核球系および混合型の細胞構成を有し、他のマウスに再移植すると再び同様のコロニーが生じること⁵⁶⁾、移植骨髓細胞数と脾コロニー数とは直線関係にあって 1 個の幹細胞が分化増殖することによってコロニーが形成されること⁵⁶⁾などより自己再生、分化および増殖の可能な multipotential stem cell と見做されている。一方リンパ球からなるコロニーは証明されていないが、マーカー染色体を用いた実験成績⁵⁶⁾⁵⁷⁾⁵⁸⁾などより、CFC-S は骨髓系のみならずリンパ球にも分化しうることが明らかにされている。従って骨髓系およびリンパ系両方に分化しうる共通の幹細胞の存在が予想される。ヒトでは CFC-S に相当する multipotential stem cell の存在はまだ確認されていないが、ヒト骨髓細胞の in vitro culture で顆粒球系コロニーを发育させる方法¹⁹⁾⁵⁹⁾が開発されている。この CFC-C は multipotential stem cell が顆粒球系へ分化する方向に commit された unipotential stem cell であるといわれている⁶⁰⁾⁶¹⁾⁶²⁾。CFC-S が骨髓細胞分画法でどこに分布するかについては、velocity sedimentation による検討⁴³⁾で、CFC-S のピークは GVHR を起す分画とは異なる sedimenting rate を示す大型細胞によって占められるという。既に述べたように著者ら⁴⁶⁾も BSA-DDGC による検討で T

cell 機能を示す、主に小リンパ球からなるD分画より軽い density (A, B分画) にCFC-S が集中して分布するという成績を得ている。一方ヒトの CFC-C については velocity sedimentation で調べられており⁴²⁾、やはり T cell 機能を示す分画とは明らかに異なる sedimenting rate を認めたという。BSA DDGC による検討では Fig.4 に示されるように、T cell 機能を有するリンパ球に富むD分画より比重の軽いA, B分画に CFC-C が多数見られ、とくにA分画にそのピークがありかつ他分画に比較して有意に高いコロニー数が得られた。Worton ら⁶¹⁾は BSA-DDGC と velocity sedimentation によって CFC-S と CFC-C との関係を検討し、CFC-S と CFC-C はかなり overlap する部分はあるものの、そのピークはそれぞれ異なるという成績を得ており、Haskill ら²⁵⁾も CFC-C が CFC-S よりやや高比重域に分布することを明らかにしている。結局両者とも小リンパ球と異なる、即ち小リンパ球よりやや大きく比重の軽い細胞であり、さらに CFC-S は CFC-C より比重が軽かつ CFC-C より小型の細胞ということになる。このことは CFC-C が CFC-S の分化したものであるという成績⁶⁰⁾⁶¹⁾⁶²⁾を考慮すると非常に興味深いことである。ヒトでも CFC-S に相当する細胞は CFC-C より軽比重域にあり、より小型の細胞である可能性も示唆される。ところで幹細胞そのものではないにしても、CFC-S あるいは CFC-C を形態的に同定しようという試みが、Bekkum らによってなされている。Bekkum ら⁶³⁾はまず CFC-S rich fraction を refractionation してかなり純粋な CFC-S fraction を得た。そして形態的検討を加え stem cell の候補者と考えられる細胞は、顕微鏡的には一見小リンパ球様に見えるが、電顕的には核小体を有し organelles に乏しい小リンパ球とは異なる細胞であろうと述べている。さらに Dicke ら⁶⁴⁾はヒトおよびサル の骨髓細胞について同様の検討を行なった結果、ほとんど CFC-C より成る分画の細胞は in vitro で PHA に反応せず形態的には上記のマウス幹細胞の候補者によく似ているという。この candidate stem cell については異論もあり⁶⁵⁾、リンパ球の cell kinetics の研究から long-lived の骨髓小リンパ球⁶⁶⁾、あるいは transitional cell⁶⁷⁾ ないし large lymphoid cell⁶⁸⁾ を造血幹細胞と想定しているものもある。ヒトでは CFC-S に相当する幹細胞の存在を示唆する直接的証明はまだないが、Philadelphia 染色体が認められる慢性骨髓性白血病や発作性夜間血色素尿症などにおける臨床的観察⁶⁹⁾⁷⁰⁾⁷¹⁾から、multi-

potential stem cell の存在が予想されている。いずれにせよ骨髓細胞中に造血幹細胞が存在することには異論はないようであるが、その形態や分化機構などについてはまだ不明点が多い。

4. 臨床的骨髓移植への応用

骨髓移植の臨床応用における最も大きな障害は、他の臓器移植でも問題となる HVGR と骨髓移植にのみ見られる GVHR である。Bortin⁷²⁾によれば1959-62年の間に行なわれた骨髓移植は203例にのぼるが、そのうち確実に骨髓細胞の生着が証明されたのは僅か 5.4% にすぎないという。いずれも移植免疫の知識に乏しくかつ評価する技術がなかった時代に行なわれたものであり、HVGR や GVHR が原因となって移植が不成功に終わったものと思われる。両反応とも donor-recipient 間に組織適合性の差が認められる場合に発現してくるものであるから、この組織適合性の差を克服することがまず解決されねばならない。HL-A については抗血清の標準化を除けば検査法も現在ほぼ確立されており⁷³⁾臓器移植との関係をみると腎移植⁷³⁾でも皮膚移植⁷⁴⁾でも HL-A identical な組み合わせの場合に最も高い移植成功率が得られている。一方同種移植では HL-A identical な場合でも isogeneic な組み合わせではなく、また non HL-A 抗原の影響も無視できないので、自己とは異なる同種抗原に対する反応をできる限り抑制する目的で recipient の免疫能を低下させる処置、即ち免疫抑制療法をあらかじめ実施しておく必要がある。組織適合性を考慮し十分な免疫抑制療法を行なうことによって拒絶反応がコントロールされるものであることは、既に8000例を超える腎移植の豊富な臨床経験⁷³⁾が如実にこれを示している。臨床的骨髓移植の対象となる疾患はいずれも治療困難で予後不良なものであるが、大別すると白血病、再生不良性貧血および免疫不全症の3つである。最近の組織適合性検索や免疫抑制療法の発達に伴って、骨髓移植例数は増加傾向を示し1968年より73年まで148例が報告されている⁷³⁾。しかしその生着率は全体として 45%、生存率は 25% と余り良い成績とはいえない。移植前に必要な免疫学的処置を施しても移植骨髓細胞が一旦生着した後に GVHR が生じれば、移植はほとんど成立せず目的は達成されないことになる。GVHR の予防には HVGR におけると同様組織適合性を考慮することが重要なことはいうまでもないが、HL-A identical な場合でも 50% 程度に GVHR が起りうる。従って GVHR をいかに防止軽減するかが骨髓移植の臨床応用において解決すべき重要な問題である。問題解決の具体的手段として

は、免疫抑制剤や抗リンパ球血清の使用、免疫適格細胞の除去などが考えられる。骨髄移植における免疫抑制剤としては cyclophosphamide や methotrexate がもっぱら使用されているが、投与期間や投与法を工夫することによって移植成功例が最近報告されるようになった⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽⁷⁵⁾。しかし HL-A nonidentical な場合には効果が落ちるといわれているし、また大量長期投与では造血不全などの重篤な副作用が知られている。抗リンパ球血清の GVHR 抑制効果も明らかにされており既に臨床的にも使用され重症の GVHR を抑制できるといわれているが、1) 異種血清なので anaphylaxis を起す可能性、2) 力価の不安定性、3) 出血傾向を招く危険性などの問題点が指摘されている。最近では histocompatibility complex について幾多の研究が発表されており、少なくとも LD (lymphocyte defined), IR (immune responsive), および SD (serologically defined) determinants があることは確実といわれ、これら determinants の解明と共に HL-A matching についても将来の発展が期待される。

細胞分画法を利用して GVHR を惹き起す免疫適格細胞を除去する試みも既に臨床的になされている。deKoning ら⁷⁶⁾は lymphopenic immunological deficiency の小児に BSA-DDGC 法によって、Abu-Zahra ら⁷⁷⁾は白血病症例に velocity sedimentation 法によって、それぞれ免疫適格細胞を除去して同種骨髄移植を行なったところ、いずれも GVHR が軽度であったといい、GVHR を軽減する有望な方法だと述べている。最近 Dicke ら⁷⁸⁾は10例の combined immunodeficiency disease の患者に BSA-DDGC 法によって得られた濃縮幹細胞浮遊液を移植した結果、HL-A identical の場合には少量の骨髄移植で免疫能が回復し、HL-A nonidentical の場

合でも GVHR を抑制できたと述べている。骨髄移植が結局は造血幹細胞の移植に他ならず、GVHR が免疫適格細胞によって惹き起こされることを考えれば、上記のごとく免疫適格細胞を物理的に除去して造血幹細胞に富む分画を移植することは、非常に合理的なことといえる。従がって本実験成績より考えてA、B分画を移植すれば、GVHR を防止ないし軽減することが可能であると予想される。しかし問題点として、1) 操作がやや面倒で大量の骨髄細胞を処理するには BSA が非常に高価である、2) 分画後の回収率からいえば velocity sedimentation 法より優れているといふが⁴¹⁾、骨髄細胞中の幹細胞はもともと極めて少ないので、再生不良性貧血の場合のように大量の骨髄細胞の移植を必要とする時には操作による細胞のロスが特に深刻な問題となる、3) 造血幹細胞より分化した免疫適格細胞によって遅延型の GVHR が起ってくる可能性がある、などの諸点が挙げられる。しかし細胞数については最近の細胞冷凍保存技術の進歩によって、分画した造血幹細胞を冷凍保存して pool しておき、必要な時に十分量を解凍して使用することは実施可能である⁷⁹⁾⁽⁸⁰⁾⁽⁸¹⁾。著者ら⁸²⁾もマウス造血幹細胞が凍害に抵抗性を示す成績を得ており、今後検討に値する方法と考えられる。いずれにせよ適確な治療法が確立されていない造血不全状態を呈する疾患に対して、骨髄移植は有効な治療手段といえることができる。

BSA-DDGC は単に骨髄移植への応用だけでなく免疫学、血液学、広く細胞生物学の分野において、細胞を集団として解析していく研究手段として有用な方法であり、今後大いに利用されることが期待される。

結 論

ヒト同様骨髄移植において生じる GVHR を防止ないし軽減する方法を見出すことを目的として、ヒト

Table 5 Summary of some biological properties of fractionated human bone marrow cells

Fraction	Lymphocyte distribution	PHA response	PWM response	MLC	RFC	CFC-C
A			+			+++
B			+			++
C	+	+	+	+	+	+
D	+++	+++	+	+++	+++	
P	+	+	+	+	+	

骨髓細胞を BSA-DDGC によって分画し、得られた各分画について免疫学および血液学的検討を行なった結果、以下の成績を得た。主要な成績を Table 5 に表示する。

1. 比重の差によってヒト骨髓細胞を4層に分画した。それぞれの分画は形態的機能的に特徴ある細胞集団として区別することができた。幼若な細胞は低比重域に、成熟した細胞ほど高比重域に分布する傾向がみられた。

2. 低比重域には大型芽球様細胞が多く、造血能のひとつの指標である CFC-C に富むが、免疫適格細胞とくに T cell 機能を有するリンパ球はほとんど認められなかった。

3. 高比重域には小リンパ球が集中して分布し、しかも PHA に反応し alloantigen を認識し、さらに羊赤血球とロゼットを形成する、即ち T cell 機能を有するリンパ球に富むが、造血能には乏しかった。したがってヒト骨髓細胞中にも T cell の存在することが示唆された。

4. 以上の成績から骨髓細胞より T cell 機能を有するリンパ球を除去することは可能であり、造血能に富む分画のみを移植することによって GVHR を予防ないし軽減しうることが示された。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を戴いた服部絢一教授に深謝いたします。また直接御指導、御助言を戴いた前金沢大学第三内科講師（現金沢医科大学内科助教授）滝口智夫博士、ならびに御協力と御援助を戴いた金沢大学がん研究所右田俊介教授に深く感謝いたします。

本研究は文部省科学研究費（944034）および厚生省特定疾患（再生不良性貧血）研究費によりなされた。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Nossal, G. J. V. and Ada, G. L. : Antigen, lymphoid cells and the immune response, p.61, New York and London, Academic Press 1971.
- 2) Lindahl-Kiessling, K. and Osoba, D. : Lymphocyte recognition and effector mechanisms. Proceedings of the 8th leukocyte culture conference, p.13, New York and London, Academic press 1974.
- 3) 武谷健二 : 免疫生物学, 46頁, 東京, 朝倉書店 1973.
- 4) Raff, M. C. : Nature, 242, 19 (1973).
- 5) Miller, J. F. A. P., Basten, A., Sprent, J.

- and Cheers, C. : Cell. Immunol., 2, 469 (1971).
- 6) Good, R. A. : Clinical Immunology, vol. 1, p.1, New York, Academic press 1972.
- 7) Falk, J. A. and Falk, R. E. : Med. Clin. North. Am., 56, 403 (1972).
- 8) Billingham, A. and Silvers, W. : The immunobiology of transplantation, P.102, New Jersey, Prentice-Hall Inc. 1971.
- 9) Wagner, J., Harris, A. W. and Feldman, M. : Cell. Immunol., 4, 395 (1972).
- 10) Möller, G. and Svehaug, S. : Cell. Immunol., 4, 1 (1972).
- 11) Bekkum, D. W. van : Sem. Hematol., 11, 325 (1974).
- 12) Phillips, R. A. and Cowan, D. H. : Med. Clin. North, Am., 56, 433 (1972).
- 13) ACS/NIH organ transplant registry : JAMA, 226, 1211 (1973).
- 14) Dicke, K. A. : Proc. Workshop Rijswijk, Sept., 167 (1970).
- 15) 滝口智夫・久田友一郎・岸田 繁 : 免疫実験操作法（日本免疫学会編）, 315頁, 金沢 1971.
- 16) 辻 公美 : 免疫実験操作法（日本免疫学会編）, 235頁, 金沢 1971.
- 17) Bach, F. and Voynow, N. K. : Science, 153, 545 (1966).
- 18) 矢田純一・橋 武彦 : 免疫実験操作法（日本免疫学会編）, 473頁, 金沢 1972.
- 19) Pike, B. L. and Robinson, W. A. : J Cell Physiol., 76, 77 (1970).
- 20) Cutts, J. H. : Cell separation methods in hematology, p.39, New York and London, Academic Press 1970.
- 21) Valee, B. L., Hughes, W. L. and Gibson, J. G. : Blood, Spec. Issue, 1, 182 (1947).
- 22) Leif, R. C. and Vinograd, J. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 51, 520 (1964).
- 23) Buckley, E. S., Powell, M. J. and Gibson, J. G. : J. Lab. Clin. Med., 36, 29 (1950).
- 24) Shortman, K. : Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., 46, 375 (1968).
- 25) Haskill, J. S., Mcneil, T. A. and Moore, M. A. S., : J. Cell Physiol., 75, 167 (1970).
- 26) Takiguchi, T., Adler, W. H. and Smith, R. T. : J. Exp. Med., 133, 63 (1971).
- 27) Konda, S., Stockert, E. and Smith, R. T.

- : Cell. Immunol., 7, 275 (1973).
- 28) Cutts, J. H., Noble, P. B. and Brinkman, T. : Proc. Can. Federation Biol. Soc., 10, 136 (1967).
- 29) Elkins, W. L. : Prog. allergy, 15, 78 (1971).
- 30) Ropke, C. and Everett, N. B. : Cell Tissue Kinet., 6, 499 (1973).
- 31) Morrison, J. H. : Brit. J. Haemat., 13, 229 (1967).
- 32) Hudson, G., Osmond, D. G. and Roylance, P. U. : Act. Anat., 53, 234 (1963).
- 33) Wintrobe, M. M. : Clinical Hematology, 6th ed., p.38, Philadelphia, Lea and Fabiger 1967.
- 34) 小宮悦造 : 臨床血液図説, 上巻, 第9版, 50頁, 東京, 金原出版 1967.
- 35) Osmond, D. G. and Everett, N. B. : Blood, 23, 1 (1964).
- 36) Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L. and McCulloch, E. A. : J. Exp. Med., 127, 455 (1968).
- 37) 吉田弥太郎・中津井俊之 : 臨床血液, 15, 1089 (1974).
- 38) Osmond, D. G. : Proc. 6th Leukocyte Culture Conf., p.3, New York and London, Academic Press 1972.
- 39) Ryser, J. and Vassalli, P. : J. immunol., 113, 719 (1974).
- 40) Lafleur, L., Miller, R. G. and Phillips, R. A. : J. Exp. Med., 137, 954 (1973).
- 41) Dicke, K. A., Tridente, G. and Bekkum, D. W. van : Transplantation, 8, 422 (1969).
- 42) Amato, D., Cowan, D. H. and McCulloch, E. A. : Blood, 39, 472 (1972).
- 43) Phillips, R. A. and Miller, R. G. : J. Immunol., 105, 1168 (1970).
- 44) Burleson, R. and Levey, R. A. : Cell. Immunol., 4, 305 (1972).
- 45) Yoshida, Y. and Osmond, D. G. : Transplantation, 12, 121 (1971).
- 46) 原田実根・滝口智夫・服部絢一 : 第4回日本免疫学会総会記録, 117 (1974).
- 47) Raff, M. C. and Owen, J. J. T. : Eur. J. Immunol., 1, 27 (1971).
- 48) Takahashi, T., Old, L. J., McIntyre, R. K. and Boyse, E. A. : J. Exp. Med., 134, 815 (1971).
- 45) Claman, H. N. : J. Immunol., 112, 960 (1974).
- 50) Komuro, K. and Boyse, E. A. : J. Exp. Med., 138, 479. (1973).
- 51) Claman, H. N. : J. Cell. Immunol., 13, 484 (1974).
- 52) Bentwich, Z. and Kunkel, H. G. : Transpl. Rev., 16, 29 (1973).
- 53) 矢田純一 : 最新医学, 28, 1256 (1973).
- 54) Miller, H. C. and Cudkowicz, G. : Science, 171, 913 (1971).
- 55) Till, J. E. and McCulloch, E. A. : Radiat. res., 14, 213 (1961).
- 56) Metcalf, D. and Moore, M. A. S. : Hemopoietic cells, p.70, Amsterdam and London, North-Holland Publishing Co. 1971.
- 57) Lafleur, L., Underdown, B. J., Miller, R. G. and Phillips, R. A. : Ser. Haematol., 5, 50 (1972).
- 58) Nowell, P. C., Hirsch, B. E., Fox, D. H. and Wilson, D. B. : J. Cell Physiol., 75, 151 (1970).
- 59) Iscove, N. N., Senn, J. S., Till, J. E. and McCulloch, E. A. : Blood, 37, 1 (1971).
- 60) 仁保喜之 : 最新医学, 28, 1705 (1973).
- 61) Worton, R. G., McCulloch, E. A. and Till, J. E. : J. Cell physiol., 74, 171 (1969).
- 62) Wu, A. M., Siminovitch, L., Till, J. E. and McCulloch, E. A. : Proc. Nat. Acad. Sci., 59, 1209 (1968).
- 63) Bekkum, D. W. van, Noord, M. J. van, Maat, B. and Dicke, K. A. : Blood, 42, 195 (1971).
- 64) Dicke, K. A., Noord, M. J. van, Maat, B., Schaefer, U. W. and Bekkum, D. W. van : Blood, 42, 195 (1973).
- 65) Dicke, K. A., Noord, M. J. van, Maat, B., Schaefer, D. W. and Bekkum, D. W. van : Ciba Foundation Symposium 13. Hemopoietic Stem Cells, p.47, North-Holland, Elsevier Excerpta Medica 1973.
- 66) Haas, R. J., Flad, H., Flidner, T. M. and Fache, I. : Blood, 42, 209 (1973).
- 67) Yoffey, J. M. : Ciba Foundation Sympo-

- sium 13. Haemopoietic Stem Cells, p.5, North-Holland, Elsevier Excerpta Medica 1973.
- 68) Harris, P. F. and Kugler, J. H. : *Acta Haemat.*, 32, 146 (1964).
- 67) Whang, J., Frei, III., Tjio, J. E., Carbonne, P. P. and Brecher, G. : *Blood*, 22, 664 (1963).
- 70) Fialkow, P. J., Lisker, R., Detter, J., Gibbekt, E. R. and Zavala, C. : *Science*, 163, 194 (1969).
- 71) Aster, R. H. and Enright, S. E. : *J. Clin. Invest.*, 48, 1199 (1969).
- 72) Bortin, M. M. : *Transplantation*, 9, 571 (1970).
- 73) Ray, J., Scott, R. C., Hare, D. B., Harria, C. E. and Kayhoe, D. E. : *Manual of tissue typing technique*, p.1, Bethesda, Maryland, Transplantation and Immunology Branch, NIAID, NIH (1972).
- 74) Amos, D. B., Seigler, H. F., Sonthworth, J. G. and Ward, F. E. : *Transplant. Proc.*, 1, 342 (1969).
- 75) Buckner, C. D., Clift, R. A., Fefer, A., Funk, D. D., Glucksberg, Ramberg, R. E., Storb, R. and Thomas, E. D. : *Transplant. Proc.*, 5, 913 (1973).
- 76) deKoning, J., Dooren, L. J., Bekkum, D. W. van, Rood, J. J., Dicke, K. A. and Radl, J. : *Lancet*, 1, 1233 (1969).
- 77) Abu-Zahra, H., Amato, D., Aye, M. T., Bergsagel, D. E., Clarysse, A. M., Cowan, D. H., Fornasier, V. L., Hasselback, R., Iscove, N. N., McCulloch, E. A., Messner, H., Miller, R. G., Phillips, R. A., Ragab, A. H., Rider, W. D. and Senn, J. S. : *Ser. Haemat.*, 5, 189 (1972).
- 78) Dicke, K. A., Schaefer, U. W. and Bekkum, D. W. van : *Transplant. Proc.*, 5, 909 (1973).
- 79) Mathé, G., Amiel, J. L. and Schwarzenberg, L. : *Bone Marrow transplantation and leukocyte transfusions*, p.156, Springfield, Illinois, Charles C Publisher (1971).
- 80) Leibo, S. P., Farrant, J., Mazur, P., Hanna, Jr. M. G. and Smith, L. H. : *Cryobiology*, 6, 315 (1970).
- 81) 隅田幸男 : 冷凍血液輸血, 134頁, 東京, 日本医事新報社 1972.
- 82) Harada, M. and Hattori, K. : *Low Temp. Med.*, 1, 27 (1975).

Abstract

In an attempt to prevent or minimize graft versus host reaction (GVHR) occurring after allogeneic human bone marrow transplantation, physical separation of immunocompetent cells from human hematopoietic bone marrow cells was evaluated by using BSA discontinuous density gradient centrifugation (BSA-DDGC). Four fractions separated by this density gradient were studied morphologically and functionally.

Low dense fractions mostly containing immature cells, were enriched with hematopoietic activity measured by colony forming cells in culture (CFC-C), and possessed only little immunocompetence. On the other hand, however, high dense fractions contained, together with mature marrow cells, a good number (approximately 25%) of small lymphocytes which apparently showed T-cell function measured by in vitro response to PHA and alloantigen in MLC, and spontaneous rosette formation with sheep erythrocytes, although hematopoietic activity was very low.

The results obtained here showed the possibility of elimination of T cell function from human bone marrow cells, and also suggest that bone marrow T cells exist in human bone marrow as described in mice by others. CFC-C rich fractions, which are low-density fractions by BSA-DDGC, could be used as bone marrow graft, and would minimize GVHR which is initiated by bone marrow T cells.

Legends for Figure 3 and 8

Figure 3 ; Morphology of fractionated bone marrow cells. A and B represent Giemsa-stained smears of bone marrow cells of fraction A and B respectively. C and D do those of fraction C and D respectively. ($\times 1000$)

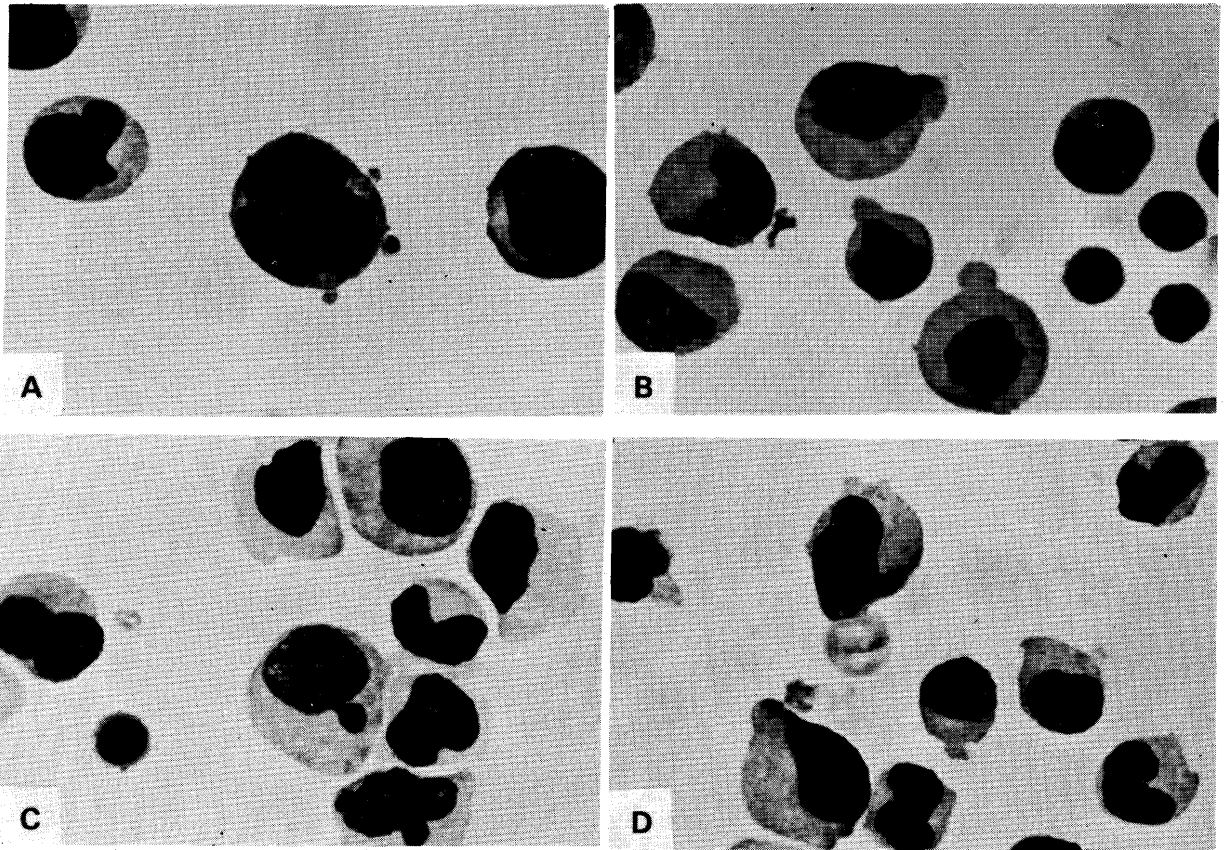


Figure 8 ; Morphology of colony forming cell in culture. A represents neutrophil colony, and B macrophage colony. ($\times 200$)

