

## 綜 説

# 骨髓毒性とその検索法

松 本 清 司

信州大学医学部附属動物実験施設

## Detection of Myelotoxicity in the Safety Study

Kiyoshi MATSUMOTO

*Institute of Experimental Animals, Shinshu University School of Medicine*

**Key words:** myelotoxicity, bone marrow test, experimental animals, safety study

骨髓毒性, 骨髓検査, 実験動物, 安全性試験

### はじめに

医薬品, 農薬, 食品添加物等われわれの身の回りに存在する化学物質の毒性を調べる安全性(毒性)試験は人類の健康保持や豊かな社会生活を維持するために重要であり, しかも実験動物の貢献度が大きい研究分野である。この試験は化学物質を実際に動物に暴露してみても生体に及ぼす影響を調べ, 最終的にはヒトでの安全性評価を行うものであるから, 動物の全ての臓器や組織が研究検査の対象となる<sup>1)2)</sup>。たとえば, 実験動物としてはラット, イヌを中心にマウス, ウサギ, サル等多種の動物が用いられるし, 一般毒性試験では血液学および病理学的検査を中心に, 尿検査や眼科学および生理学的検査に至るまで調べられている。しかしながら, 血球産生の場合であり, その重量が体重の約3%<sup>3)-5)</sup>と肝臓に匹敵する骨髓については, 病理組織学的に検査されることが多く, 骨髓から末梢への一連の血球の流れが総合的かつ血液学的に十分検討されてきたとはいえない<sup>6)</sup>。事実, 実験動物の骨髓細胞の形態に関する報告も少ない。

一方, 近年の免疫学の急速な発展に伴い, 骨髓細胞や末梢血球の生体防御に対する重要性がクローズアップされ始めた。さらに, これら血液・骨髓細胞を含む免疫系が毒性学上の標的となるバイオテクノロジー技術を応用した医薬品が我々にとって身近なものになり

つつあり<sup>7)</sup>, その医療における有用性<sup>8)</sup>が期待されている反面, これら薬剤の安全性確保, すなわち血液・骨髓毒性を把握するための実験動物の血液・骨髓細胞に関する基礎資料が求められるところとなった。

以上のような背景を踏まえ, 安全性試験に骨髓検査を応用することを目的に, 実験動物の骨髓細胞に関する形態学的検索法の検討および実験動物の骨髓細胞の生理値を調べた後, 骨髓細胞数と細胞分類からなる骨髓検査の安全性試験への応用を試みた。本稿ではこれら一連の実験の成績を示し, 現在問題となっている免疫毒性およびその検索法としての骨髓検査の意義について考察する。

### I 骨髓とその毒性

骨髓は骨髓腔, 海綿質腔をみたす軟らかい組織で, 血球産生の場合として重要であるが, 他方「かくれた臓器」<sup>9)</sup>とも表現される。ラットの赤血球, 白血球および血小板の1日産生量はそれぞれ16.5, 1.0, および $132.0 \times 10^9/\text{kg/day}$ <sup>10)</sup>であり, ヒト<sup>11)</sup>に比べて約7倍多い。骨髓に入った動脈は枝分かれし, 放射状に細枝がでる。この動脈細枝は骨質近くで太くて血流のゆるやかな洞様毛細血管となり, 車軸状に中心静脈へ導かれる。これら洞様毛細血管の外には不完全な基底膜があり, その外はおもに細網組織であるが, その網眼に各成熟段階の骨髓細胞がつまっている。成熟した血球

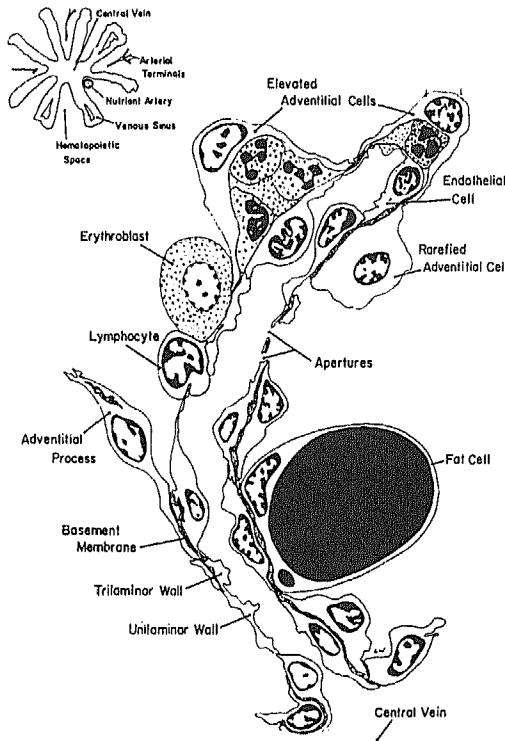


Fig. 1 Cross section (upper) and sinusoidal basement membrane (larger) of bone marrow according to Weiss, L.<sup>[3]</sup>.

が血管内皮の小孔を通して末梢血中へ放出される<sup>[2]</sup> (Fig. 1)。

ところで、薬剤の中には各骨髓細胞の分化増殖または造血微細環境 (HIM) に直接あるいは間接的に作用し、血球の数や機能の恒常性を乱すものがある。これを骨髓毒性といい、具体的には、再生不良性貧血、赤芽球ろう、(選択的) 顆粒球減少、(選択的) 血小板減少、溶血性貧血、過形成、白血病、炎症などの病変がみられる<sup>[4]</sup>。この検索には骨髓像の観察が重要と考えられるので、まず実験動物を用いた安全性試験における骨髓検査法を述べる。

## II 骨髓細胞数の測定と骨髓標本作成法

### A 骨髓の採取

骨髓採取法は動物種や実験系で異なる。イスやサル等の大動物<sup>[15][16]</sup>ではヒト<sup>[17]-[19]</sup>と同様麻酔下で胸骨や腸骨から骨髓穿刺針を用い骨髓を採取することができる。この方法は、実験期間中に容易に反復採取できる長所

をもつが、骨髓細胞数の測定において採取時の血液混入による数値の不正確さを招く短所がある。他方、安全性試験で多用されるラットやマウスでは解剖時に大腿骨から骨髓が採取される。これは、ヒトや大動物と異なり大腿骨での造血が生涯にわたり認められること<sup>[20]</sup>と、検査のための十分な骨髓量が得られることによる。

### B 骨髓細胞数の測定

細胞数は骨髓中の有核細胞の計数により行われ、ラットより大きい動物では単位骨髓容積あたり、マウスでは大腿骨1本あたりの測定法が用いられる。単位骨髓容積 (1 $\mu$ l) あたりの細胞数は、赤血球計数用ピペットで骨髓を吸引し、溶血剤 (ザッボグロビン<sup>®</sup>等) を加えたチュルク液 (2滴:1ml) で200倍希釈の後、従来の血球算定法に従って計数することができる。大腿骨1本あたりの細胞数は、両骨端を切り取り一定量の希釈液で骨髓細胞を洗い出し、ピペッティングにより細胞浮遊液としてこれを計数する。いずれの場合も採取後6時間以内であれば安定した値が得られる。なお、大腿骨1本あたりの細胞数を測定する場合、骨髓腔の容積が動物の成長に依存して変動するため、長期実験で群間に著しい体重差が生じる例では骨髓腔容積の差を考慮しなければならない。細胞数は市販の自動血球計数器で計数できるが、骨髓中に多く存在する多染性赤血球は市販の溶血剤では壊れにくく、有核細胞数に取り込むことがあるので、利用に際し機器の閾値設定には注意を要する<sup>[21]</sup>。

### C 骨髓標本の作成

標本作成には、用手法 (Wedge法) および集細胞遠心装置 (サイトスピン)<sup>[22][23]</sup>や遠心塗抹装置 (スピナー) 等の機器を用いる方法がある。いずれの場合も同種血清または牛胎仔血清で適宜骨髓を希釈した後、標本を作成する。骨髓細胞分類では形態学的特徴から細胞の種類と成熟段階により約20数種<sup>[24]</sup>に分類されるが、分類時に考慮されるのは細胞の大きさ、核形、細胞質の色調、一次 (アズール) および二次 (特殊) 顆粒等であり、分類のための情報はおもに細胞の原形質から得られる。上記作成法のうち、細胞萎縮が起きにくい点でサイトスピン法が骨髓細胞の観察に適していると思われる。いずれの場合も骨髓採取後15分以内に標本を作らないと細胞壊死を来し核構造の観察が困難となる。

### D 骨髓細胞の分類法

ヒト骨髓細胞の分類に関する成書や報告は多いが、

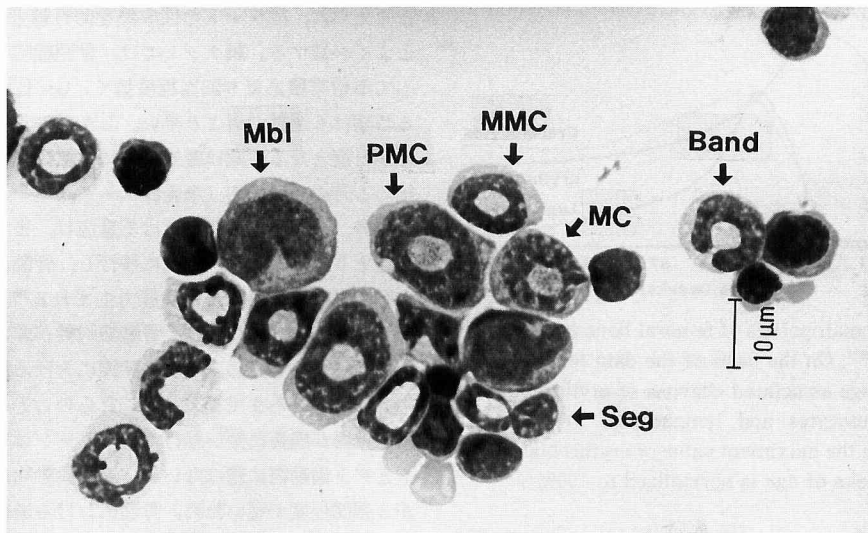


Fig. 2 Bone marrow cells of BALB/c nu/nu mouse. Mbl=myeloblast; PMC=promyelocyte; MC=myelocyte; MMC=metamyelocyte; Band=band form neutrophil; and Seg=segmented neutrophil.

実験動物に関するものは少ない。しかし、サルおよびイヌ骨髓細胞の成熟過程に伴う形態的变化、ならびにマウスやラットでも顆粒球を除く細胞の形態については、サイズが小さいものの核型や色調については基本的にヒトと類似しているの、ヒトでの成書が分類に際して役立つことが多い。ここではマウス顆粒球系細胞の成熟段階における形態的特徴について触れる。ゲッ歯類の幼若顆粒球の特徴は核型がいわゆるドーナツ状<sup>25)</sup>を呈することである。骨髓芽球は繊細網状の核構造を有し、明瞭な核小体と淡青色の原形質に少量のアズール顆粒が存在する。前骨髓球は骨髓芽球よりやや大きく、核型は腎臓型もしくは肉厚のドーナツ状を呈し、多量のアズール顆粒が腎臓型では陥凹部に、ドーナツ状では中空部に限局的ないしはまれに散在して認められる。この時期より特殊顆粒が認められるようになる。骨髓球は前骨髓球と後骨髓球の中間の大きさで、原形質は無色を呈しアズール顆粒が散在する。後骨髓球は成熟顆粒球とほぼ同じ大きさで、核は帯状を呈し外表面がなめらかで中空が広くリング状を呈し、アズール顆粒はほとんどみられなくなる (Fig. 2)。

#### E 骨髓細胞の観察とデータ処理

骨髓毒性評価上、有効な指標であるG/E比や各種細胞ごとの増減を的確に把握するためには、1標本あたり500ないし1,000個の細胞を数える必要がある。細胞分類の結果は出現頻度(%)で表示されるが、これ

Table 1 Femoral bone marrow cell counts of experimental animals

Species	No. of animals	Counts ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )
Mouse (ddY)	31	$2.67 \pm 0.22$
Rat (Wistar)	108	$2.12 \pm 0.19$
Marmoset	32	$1.28 \pm 0.20$
Pika	10	$1.20 \pm 0.22$
Monkey	19	$0.64 \pm 0.17$
Dog (Beagle)	11	$0.35 \pm 0.15$

Each value represents the mean  $\pm$  SD.

は相対的数値にはかならない。一般に安全性試験ではデータを個体別ではなく、群ごとに統計処理し毒性評価が行われること<sup>26)</sup>、各白血球数の統計処理には実数が用いられることから、本報では細胞数と細胞分類の結果から、できる限り各骨髓細胞の実数を求めてこれを示した。

#### III 実験動物の骨髓細胞数

各種実験動物の大腿骨骨髓 $1\mu\text{l}$ あたりの骨髓細胞数をTable 1に示す。大型の動物種ほど細胞数が少なく、細胞密度が低いのにに対し、小型の動物ほど細胞密度は高い。これは一般的に大型の動物ほど血球サイズが大きいこと<sup>27)</sup>、血球の寿命が長いこと<sup>28)-30)</sup>、ならびに動

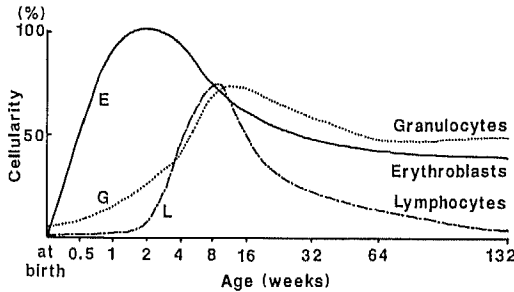


Fig. 3 Hematopoiesis of femoral bone marrow in rat<sup>(35)(36)</sup>. On the basis of the data on cellularity, age-associated changes of erythroblasts, granulocytes and lymphocytes are shown when the maximum value of erythroblasts at 2 weeks of age is normalized to 100%.

物種ごとに体重に対する骨髓腔容積比が異なること等によると考えられる。

#### IV ラット・マウスの生涯にわたる骨髓細胞構成比

ラットの骨髓細胞形態に関する報告<sup>(31)-(34)</sup>は、いずれも成熟動物についてのものであり、日齢や週齢ごとに詳細に検討したものはない。

前臨床試験として行われる安全性試験に骨髓検査を応用するために、Wistar 系雄ラットおよび ddY 系雄マウスの骨髓細胞数の生涯にわたる生理値を調べた。ラットにおける各時期の赤芽球系、顆粒球系およびリンパ球系細胞の加齢に伴う変動を Fig. 3 に示す。生後 0 日齢では骨髓細胞はほとんどみられないが、以後赤芽球の急激な増殖が見られた。骨髓における顆粒球系細胞およびリンパ球の増殖は赤芽球よりやや遅れ、それぞれ 10 日齢および 2 週齢頃より認められた。これらのことから、G/E 比（総顆粒球系細胞数/総赤芽球数）は 0 日齢の 7.4 から 4 日齢の 0.2 に急速に低下した<sup>(35)</sup>。これらの G/E 比はいずれもラットの生涯を通して最大および最小値である。細胞構成比では、赤芽球が 8 週齢まで骨髓細胞の大部分を占める。これは生後 8 週齢までのラットやマウスは急速に成長するので、体重増加に相応する血球を供給しているためと考えられるが、それでも同時期の末梢赤血球数は成熟動物に比べて 10~15% 低い。9 週齢以降の G/E 比は約 1.2 で一定であること、ならびに総骨髓細胞数が 9 週齢前後で約  $210 \times 10^4 / \mu\text{l}$  となり安定する<sup>(36)</sup>ことから、骨髓細胞を指標とした場合のラットの成熟期はこの 9 週齢

と考えられ、雄ラットの性成熟を 60 日齢とする報告<sup>(37)</sup>とよく一致する。雌ラットでは、骨髓細胞数は雄に比べて単位容積あたり 25% 程度低く、G/E 比が安定する時期は 6 週齢で雄より早い。しかし、骨髓細胞構成比が一定となる時期は雌雄ともに体重増加率が低下し始める時に一致する（未発表データ）。

一方、ヒトの胎児期における造血は、まず卵黄のうに始まり肝臓、脾臓、骨髓に移行し、骨髓における造血機能がほぼ完成された状態で生まれる<sup>(38)</sup>。これに対してラットやマウスでは、骨髓細胞数が非常に少ない状態で生まれるため、肝臓や脾臓における髄外造血が生後 4 週齢ごろまで続く<sup>(39)</sup>。これらのことは、造血を営む臓器が成長に伴い移行するパターンは基本的にヒトとゲッ歯動物に差はないが、ゲッ歯動物の妊娠期間が 3 週間程度で短いため、骨髓における造血能が未完成の状態で生まれることを示している。

各細胞系の増殖過程について、顆粒球系細胞は 1 週齢を過ぎてから緩やかに増加し、8 週齢ごろをピークに以後やや減少するが、1 年を過ぎるとその数はほぼ一定となる。リンパ球は 2 週齢以降増加し、5 週齢から 10 週齢にかけて高値を示すがそれ以後漸次減少を続け、ラットの寿命に近い 132 週齢では全骨髓細胞の 3% を占めるにすぎなくなる。加齢に伴う免疫能の低下はヒトにおいて問題となっているが<sup>(40)-(42)</sup>、マウスやラットでみられた骨髓リンパ球の減少は免疫能低下を示唆するものと思われる。

マウスについてもラットと同様に骨髓を調べたところ<sup>(43)</sup>、生後 4 日間に急激な G/E 比の低下が見られ、それ以後もラットとはほぼ同様の推移を示した。しかし、この ddY 系マウスでは寿命に近い 80 週齢を越えると、顆粒球系あるいはリンパ球系細胞が異常増加する例が 15% 程度の動物に認められ、このマウス系には後述する自己免疫疾患を自然発症する可能性がある。

安全性試験では通常 5~10 週齢の動物が用いられるが、骨髓造血能が未完成の 5 週齢に実験を開始した場合と成熟後の 9 週齢以降に始めた場合では、毒性試験結果に差のみられることが予想される。事実、被験物質そのものが血液毒性を有するフェニルヒドラジンや免疫抑制剤の投与により、骨髓の毒性反応が 10 週齢に比べて 5 週齢でより強く認められることから、化学物質の毒性評価には週齢に伴う造血能の差を考慮する必要性が示されている<sup>(44)</sup>。この週齢に関する問題は、すでに報告されている性差や種差<sup>(45)-(47)</sup>と同様、今後の検討課題と思われる。

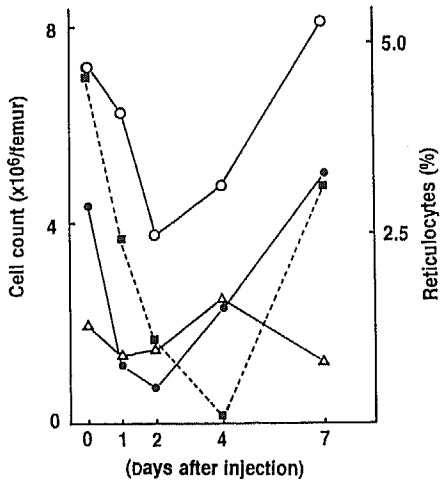


Fig. 4 Effect of mitomycin C (MMC) on the numbers of erythroblasts (—●—), granulocytes (—○—) and lymphocytes (—△—) and peripheral reticulocyte count (—■—) in mice<sup>49)</sup>. Animals were injected on day 0 with a single i.p. dose of 2mg/kg MMC.

## V 薬剤の骨髓に及ぼす影響

### A 単回投与後の経時変化

前項の実験でマウス骨髓の成熟時期が明らかになったので、9週齢のマウスに薬剤を投与し、その骨髓細胞に及ぼす影響を調べた<sup>48)</sup>。検体としては制癌剤であり骨髓細胞の増殖抑制作用を有するマイトマイシンC (MMC)<sup>49)50)</sup>を選び、2mg/kgを1回腹腔内投与し、経時的に骨髓検査と末梢の網状赤血球数測定を行った

(Fig. 4)。MMC投与後骨髓細胞数と網状赤血球数はともに減少し、骨髓細胞数は2日目に対照群の45%値、網状赤血球数は4日目に5%値まで低下した後いずれも漸次回復した。骨髓細胞分類の結果から、骨髓細胞数の減少は赤芽球系および顆粒球系細胞の減少によるものであったが、その程度は赤芽球で強かった。回復像については、末梢網状赤血球は骨髓細胞に比べて約4日間遅延し、この日数の差はマウス血球の骨髓における総成熟時間にはほぼ一致した<sup>51)52)</sup>。また、骨髓細胞数の減少時期に相応してリンパ球出現率の相対的増加が見られ、骨髓細胞分類におけるリンパ球数は総骨髓細胞数の変動を示す1つのパラメーターになると考えられた。同様の実験系でラットに既存化学物質の1つである水素化トリフェニール (Hydride terphenyls) 20g/kgを1回経口投与したところ、従来の毒性試験法では血液系にまったく影響が認められないが、骨髓検査の実施により赤芽球の増殖を特異的に抑制する成績が得られている (未発表データ)。

### B 短期骨髓毒性検索法の開発

現行の安全性試験では物質の投与期間が1ヵ月あるいは6ヵ月を越えるものが多く、物質の毒性あるいは標的臓器を短期間に調べ得るスクリーニング試験が望まれている。一方、骨髓幹細胞に対する影響についてはいくつかの報告があり、いずれの報告でも骨髓細胞数の変化は投与開始後4日以内に認められている<sup>53)~56)</sup>。骨髓への毒性影響を短期間に調べる方法を検討する目的で、溶血性貧血を惹起するフェニルヒドラジン (PHZ)<sup>57)</sup>、制癌剤の5-フルオロウラシル (5-FU)<sup>58)</sup>、既存化学物質のパラ-sec-ブチルフェニール (BP)を9週齢雄ラットに4日間連続投与し、

Table 2 Effect of four days drug administration on bone marrow cell in rats<sup>36)</sup>

Group	Control days	PHZ		BP		5-FU		Starvation	
		2	4	2	4	2	4	2	4
Erythroid cells	75.2 ±5.4	101.7 ±6.5	157.1 ±7.4	48.8 ±3.1	19.6 ±2.8	7.6 ±4.0	3.0 ±1.4	81.1 ±8.0	37.6 ±9.2
Granulocytic cells	70.8 ±8.2	57.8 ±7.1	47.3 ±7.4	86.2 ±4.1	65.7 ±2.0	49.4 ±5.6	20.0 ±3.0	75.7 ±3.9	79.7 ±3.4
G/E ratio	0.94	0.57	0.30	1.77	3.35	6.54	6.68	0.93	2.12
Lymphocytes	46.8 ±8.4	19.7 ±3.3	9.9 ±3.4	51.9 ±6.1	43.7 ±3.8	26.3 ±4.3	16.4 ±2.7	42.6 ±5.8	42.7 ±2.1

Phenylhydrazine (PHZ; 8.3mg/kg/day, s.c.), p-sec-butylphenol (BP; 800mg/kg/day, p.o.) or 5-fluorouracil (5-FU; 45mg/kg/day, s.c.) was administered to male Slc: Wistar rats for four days. Each value (cells×10<sup>4</sup>/μl) represents the mean±SD of five animals.

2 および 4 日目に骨髄および末梢血球数を調べた (Table 2)<sup>60)</sup>。PHZ 投与により末梢血では著明な大球性貧血と白血球数が増加し、骨髄ではこの貧血に対応する赤芽球系細胞の増殖が認められたが、リンパ球系細胞数は逆に減少した。5-FU 投与により末梢血では白血球数が軽度減少したが、赤血球系パラメーターにほとんど変化は認められなかった。これに対し、骨髄では全血球特に赤芽球が減少した。BP 投与では末梢白血球の軽度増加が見られたのみであったが、骨髄では赤芽球系細胞が著明に減少した。この実験に用いた薬物の用量はいずれも LD<sub>50</sub> 値の 1/4~1/3 であるが、このような大量の薬物投与により摂餌量減少のみられることがよく経験される。そこで、4 日間の絶食処理を行ったラットの骨髄についても同様に調べてみると、2 日目ではほとんど変化がみられず、4 日目に赤芽球の減少がみられたにすぎなかった。上述した各薬物の骨髄細胞への影響は絶食に比べて強いのか、あるいは逆方向の変化を示したもので、いずれも薬物に起因するものと考えられた。

このようにラットに大量の薬物を短期間投与する実験系で骨髄検査を行うことにより、薬物の直接あるいは間接作用による骨髄造血能の抑制あるいは亢進の状態を明確に示すことができた。この結果と著者らによる他の実験成績<sup>59)60)</sup>は、化学物質の血液系への毒性影響評価において、4 日間程度の短期骨髄試験の実施あるいは骨髄検査を安全性試験に組み入れることの重要性および有効性を示唆した。

## VI 制限給餌の骨髄に及ぼす影響

安全性試験の最終目的はヒトにおける化学物質の危険性の予知とその物質のもつ本質的な毒性像の把握にあるので、動物実験でみられた変化が投与された物質のみに起因するかどうかは毒性評価上の問題となる。前項でも少し触れたが、化学物質あるいはその用量によっては投与期間中に摂餌量減少を来することがよく経験される。飼料の制限給餌については、寿命の延長<sup>61)62)</sup>、繁殖率の上昇<sup>63)</sup>、腫瘍発生率の低下<sup>62)64)</sup>あるいは毒性試験項目<sup>65)~69)</sup>に関する報告はあるが、骨髄細胞に関するものはない。そこで、長期間の制限給餌が骨髄にどのような影響を及ぼすかを調べるために、飽食時のラットの 1 日摂餌量を 1 とし、その 2/3 あるいは 1/3 量 (1 日 1 匹あたりの平均給餌量はそれぞれ 15 g, 10 g および 5 g) にあたる飼料を毎日 1 回 3 カ月間与える実験<sup>70)</sup>を行った。ラットで制限給餌を行う

と、飼料制限の程度に応じた体重増加抑制が実験開始直後よりみられた。骨髄では体重の推移とパラレルに赤芽球数が減少するが、顆粒球系細胞とリンパ球の減少は 1 カ月以降であった。すなわち、飼料摂取量低下時の骨髄像として、G/E 比の上昇を伴う骨髄細胞数の減少がみられる。

## VII 免疫疾患モデルマウスの骨髄細胞

免疫機能発現には血球の相互作用が深く関与していることは周知のところである。種々の免疫疾患モデルマウスの骨髄細胞構成にどのような特徴があるのか調べた。多彩な自己抗体の産生を伴う全身性エリテマトーデス (SLE) を自然発症する MRL/lpr マウス<sup>71)72)</sup>では、好中球を主体とする顆粒球が 2 カ月齢より著明に増加し、6 カ月齢では B 細胞由来である形質細胞も増加していた<sup>73)</sup>。従来報告されている T リンパ球の異常に加えて、B 細胞ならびに免疫学的に重要な顆粒球にも異常があることから、このマウス系の病態発症機序解明には免疫系全体の解析が必要であることが示唆された。同様に、自己免疫疾患モデル動物である NZB マウス<sup>74)</sup>や C3H/gld マウス<sup>75)76)</sup>、先天性無胸腺の BALB/c nu/nu および KSN ノードマウス<sup>77)</sup>、先天性無脾臓無胸腺の LASAT マウス<sup>78)</sup>および重症複合型免疫不全症のモデルとされる SCID-hu マウス<sup>79)80)</sup>について骨髄検査を行った。その結果、いずれのマウス系でも普通マウスに比べて早期に 6 週齢頃より顆粒球の異常増加がみられた。これらのマウスは特異免疫応答に関与する T あるいは B 細胞もしくは両者に異常をもつ動物であり、非特異的免疫能を有する顆粒球増加という点で興味をもたれるが、その増加の要因は今のところ不明である。

## VIII 免疫毒性検索法としての骨髄検査

免疫毒性とは、化学物質が免疫系に作用し、その機能を抑制あるいは亢進することによる生体にとって好ましくない有害影響をいう。この概念は以前より存在したが、現毒性試験法ガイドラインや関連法規の遵守により、特に免疫系への影響を調べなくとも、発癌性を中心とした毒性評価が十分行い得るとされてきた。しかし、近年サイトカイン、ホルモン、ワクチン等のいわゆるバイオテクノロジー医薬品が出現しはじめ、これらはいずれも生体の免疫系に悪影響を及ぼすのではないかと危惧されている<sup>81)~84)</sup>。このことから化学物質のもつ免疫毒性をどのように調べるかが各国で問

題となっている<sup>85)</sup>。免疫毒性の検索法には、あくまでも免疫機能検査を主体にすべきであるというアメリカの提案と、現行の毒性試験を基本として免疫組織病理学的に拡大するという日本やEC各国による考え方<sup>86)</sup>がある。前者は米国NIEHSの国家毒性計画(National Toxicology Program)が示したもので、毒性病理、宿主抵抗性、細胞性免疫、液性免疫、マクロファージ機能および骨髄CFU (colony-forming units)に関する検索をスクリーニングとして実施するというものである<sup>87)88)</sup>。最近、わが国でも「安全性評価のための前臨床試験実施に関する考え方」<sup>89)</sup>が示され、ヒト型以外のサイトカインや調節因子については免疫毒性の検討が必要との方向にある。今までにも各種の免疫学的手法を用いた毒性検索<sup>90)</sup>が行われてきたが、実験系としては現毒性試験とかけ離れたものであった。このような背景から、どのような試験系で免疫毒性を調べたら良いのかを検討する目的で、日本、米国およびEC各国が国際共同研究として、ラットに免疫抑制作用が明らかなアザチオプリン(AZP)<sup>91)</sup>を28日間経口投与する実験が行われた<sup>92)</sup>。0, 12.5あるいは25.0mg/kgのAZPをF344雄ラットに投与すると、骨髄では特にリンパ球の減少が著明で、赤芽球系、顆粒球系細胞も減少する。これら骨髄の変化は胸腺重量の低下を除き、体重、脾臓およびリンパ節重量、ならびに免疫機能検査(NK細胞活性およびPFCアッセイ)の結果に比べていずれも鋭敏に反応したことから、免疫毒性を調べるためのスクリーニングとして、この検査は重要な意味を持つものと考えられた。なお、この免疫毒性国際共同研究には著者も参加し、昨年

(1991年)はサイクロスポリンA<sup>93)</sup>を被験物質として、さらに広範な免疫毒性が検索されており、これらの総合評価結果が注目されている。

## おわりに

以上のごとく著者が現在まで行った実験動物の骨髄に関する一連の実験成績を中心に述べ、今まで安全性試験で行われていなかった骨髄検査をこの試験で実施することにより、薬物の毒性評価上ならびに免疫系への影響を調べるために有意義な成績が得られることを示した。特に今後、開発や市場への導入が予定されているバイオ医薬品の安全性評価を行う場合、この検査は免疫毒性の検索あるいはスクリーニング試験として重要な1検査項目になる可能性が示唆された。しかし、光顕的な細胞形態から分類し得る細胞には限りがあり、機能面を含めた骨髄の全体像の把握には、幹細胞や各種造血前駆細胞等<sup>94)~98)</sup>を調べるための細胞培養技術を用いた*in vitro*の実験系や、免疫実験で用いられるフローサイトメトリー<sup>99)100)</sup>による細胞表面マーカーの検索<sup>101)</sup>も必要になるであろう。また、安全性試験は現在おもにラットで行われているのに対し、免疫に関する実験系はマウスが中心であることから、相互評価の点で動物種間のギャップをどのように埋めるかが大きな問題として残っている。今後、ラットにおける免疫機能検索法の検討が望まれるし、ラットの疾患モデル、特に血液や免疫異常動物の開発が待たれるところであるが、現在実施可能な何らかの方法で免疫系への影響を調べておく必要があるのも事実である。

## 文 献

- 1) Ministry of Health and Welfare: Information on the guidelines of toxicity studies required for applications for approval to manufacture (import) drugs. Notification No. 188 of the Pharmaceutical Affairs Bureau, Fed 15, 1984
- 2) 厚生省薬務局: GLPの概要. 厚生省薬務局審査課(編), GLP基準および毒性試験法ガイドライン解説, pp. 3-11, 薬事日報社, 東京, 1984
- 3) Fairman, E. and Whipple, G. H.: Bone marrow volume in adult dogs. *Am J Physiol*, 104: 352-359, 1933
- 4) Nye, R. N.: Bone marrow volume in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med*, 29: 34-40, 1931
- 5) Ringler, D. H. and Dabich, L.: Hematology and clinical biochemistry. In: Baker, H. J., Lindsey, J. R. and Weisbroth, S. H. (eds.), *Laboratory rat*, pp. 105-121, Academic Press, New York, 1979
- 6) Smith, R. P.: Toxic responses of the blood. In: Doull, J., Klaassen, C. D. and Amdur, M. O. (eds.), *Toxicology*, pp. 311-331, Macmillan, New York, 1980
- 7) Pharmaceutical Manufacturers Association: From patents to products, U.S. strong in genetically engineered medicines, 1989 annual survey. In: *Development Biotechnology Medicines*, pp. 1-8, Wash-

- ington, D.C., 1990
- 8) Bass, R., Scheibner, E. and Schnieders, B.: Preclinical safety of biotechnology products intended for human use, government regulatory position in the Federal Republic of Germany. In: Graham, C. E. (ed.), Preclinical safety of biotechnology products intended for human use, pp. 31-48, Alan R. Liss, New York, 1987
- 9) 服部絢一：かくれた臓器の物語 (7) 骨髄. からだの科学, 128: 111-117, 1988
- 10) Matsumoto, K.: Studies on bone marrow cells in experimental animals: Bone marrow testing in the safety study. Exp Anim, 40: 17-26, 1991
- 11) Finch, C. A., Harker, L. A. and Cook, J. D.: Kinetics of the formed elements of human blood. Blood, 50: 699-708, 1977
- 12) Erslev, A. J. and Weiss, L.: Structure and function of hemopoietic organs. In: Williams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J. and Lichtman, M. A. (eds.), Hematology, pp. 75-83, McGraw-Hill, New York, 1986
- 13) Weiss, L.: The history of the bone marrow. In: Gordon, A. S. (ed.), Regulation of hematopoiesis, p. 79, Appleton-Century-Crofts, New York, 1970
- 14) Vardiman, J. W. and Variakojis, D.: The hematopoietic system. In: Riddel, R. H. (ed.), Pathology of drug-induced and toxic diseases, pp. 87-118, Churchill Livingstone, New York, 1982
- 15) Switzer, J. W. and Schalm, O. W.: Bone marrow disorders in cats, Bone marrow sampling techniques. Calif Vet, 22: 20-29, 1968
- 16) Melveger, B. E., Earl, F. L. and van Loon, E. J.: Sternal bone marrow biopsy in the dog. Lab Anim Care, 19: 866-871, 1969
- 17) Jamshidi, K. and Swaim, W. R.: Bone marrow biopsy with unaltered architecture: A new biopsy device. J Lab Clin Med, 77: 335-340, 1971
- 18) Ellis, D. L., Jensen, W. N. and Westerman, M. P.: Needle biopsy of bone and marrow: An experience with 445 biopsies. Arch Intern Med, 114: 213-221, 1964
- 19) Bearden, J. D., Ratkin, G. A. and Coltman, C. A.: Comparison of the diagnostic value of bone marrow biopsy and bone marrow aspiration in neoplastic disease. J Clin Pathol, 27: 738-746, 1974
- 20) Cline, J. M. and Maronpot, R. R.: Variations in the histologic distribution of rat bone marrow cells with respect to age and anatomic site. Toxicol Pathol, 13: 349-355, 1985
- 21) Matsumoto, K.: Use of instruments for general toxicology testing. Toxicol Sci, 14: 304, 1989
- 22) Barrett, D. L. and King, E. B.: Comparison of cellular recovery rates and morphologic detail obtained using membrane filter and cytocentrifuge techniques. Acta Cytol (Baltimore), 20: 174-180, 1976
- 23) Dore, C. F. and Balfour, B. M.: A device for preparing cell spreads. Immunol, 9: 403-405, 1965
- 24) 藤井恭一：検査申込みと報告. 島峰徹郎 (編), 骨髄組織病理アトラス, pp. 57-60, 文光堂, 東京, 1984
- 25) Hulse, E. V.: Quantitative cell counts of the bone marrow and blood and secular variations in the normal adult rat. Acta Haematol (Basel), 31: 50-59, 1964
- 26) 山崎 実, 野口雄次, 丹田 勝, 新谷 茂：ラット一般毒性試験における統計的手法の検討, 対照群との多重比較のためのアルゴリズム. 武田研究所報, 40: 163-187, 1981
- 27) 松本清司：有形成分の検査法. 日本実験動物協会 (編), 実験動物の基礎と技術, pp. 299-301, 丸善, 東京, 1989
- 28) Cline, M. J. and Berlin, N. I.: Erythropoiesis and red cell survival in the hypothyroid dog. Am J Physiol, 204: 415-421, 1963
- 29) Burwell, E. L., Brickley, B. A. and Finch, C. A.: Erythrocyte life span in small animals, Comparison of two methods employing radioiron. Am J Physiol, 172: 718-724, 1953
- 30) Harrison, B. A., Burwell, E. L. and Finch, C. A.: Erythrocyte life span in small animals. Fed Proc, 10:



357-366, 1951

- 31) Harris, C. and Burke, W. T. : The changing cellular distribution in bone marrow of the normal albino rat between one and fifty weeks of age. *Am J Pathol*, 33 : 931-951, 1957
- 32) Ramsell, T. G. and Yoffey, J. M. : The bone marrow of the adult rat. *Acta Anat (Basel)*, 47 : 55-65, 1961
- 33) Roofe, P. G., Bingham, H. and Comer, R. : A quantitative study of normal hematopoiesis in the albino rat. *Anat Res*, 121 : 495-504, 1955
- 34) Vogel, M. : The femoral bone marrow cells of the albino rat. *Am J Med Sci*, 213 : 456-467, 1947
- 35) Matsumoto, K., Ochiai, T., Hagino, K., Sekita, K., Kawasaki, Y. and Furuya, T. : Differential bone marrow cell counts of newborn rats. *J Tokyo Vet Zootechn Sci*, 29 : 137-141, 1981
- 36) 松本清司, 白井俊一 : 薬剤の骨髓毒性に関する基礎的研究, 骨髓検査の安全性試験への応用. *順天堂医学*, 33 : 74-86, 1987
- 37) Weihe, W. H. : The laboratory rat. In: Poole, T. B. (ed.), *UFAW handbook on the care management of laboratory animals*, pp. 309-330, Longman Sic Tech, U. K., 1987
- 38) Erslev, A. J. : Bone marrow. In: Erslev, A. J. and Gabuzda, T. G. (eds.), *Pathophysiology of blood*, pp. 3-14, Saunders, Philadelphia, 1979
- 39) Schalm, O. W., Jain, N. C. and Carroll, E. J. : Normal values in blood of laboratory, fur-bearing and miscellaneous zoo and wild animals. In: Schalm, O. W., Jain, N. C. and Carroll, E. J. (eds.), *Veterinary hematology*, pp. 255-256, Lea and Febiger, Philadelphia, 1975
- 40) 伊藤宗元 : 高齢者医療と医薬品の安全性問題. *医薬品研究*, 15 : 159-171, 1984
- 41) Inkeles, B., Innes, J. B., Kuntz, M. M., Kadish, A. S. and Weksler, M. E. : Immunological studies of aging : III. Cytokinetic basis for the impaired responses of lymphocytes from aged humans to plant lectins. *J Exp Med*, 145 : 1176-1185, 1977
- 42) Augener, W., Cohnen, E., Reuter, A. and Brittinger, E. : Decrease of T lymphocytes during age. *Lancet*, 1 : 1164-1170, 1977
- 43) Matsumoto, K. : Changes of bone marrow and peripheral blood cell counts in newborn mice. *Exp Anim*, 33 : 339-344, 1984
- 44) Ogura, G., Noguchi, N., Ogura, M., Suzuki, K. and Matsumoto, K. : Age- and sex-related differences found in myelotoxicity study. *J Toxicol Sci*, 16 : 204, 1991
- 45) Balazs, T. : Measurement of acute toxicity. In: Paget, G.E. (ed.), *Methods in toxicology*, pp. 49-81, F. A. Davis, Philadelphia, 1970
- 46) Done, A. K. : Developmental pharmacology. *Clin Pharmacol Ther*, 5 : 432-479, 1964
- 47) McLean, A. E. M. and McLean, E. K. : Diet and toxicity. *Br Med Bull*, 25 : 278-281, 1969
- 48) Matsumoto, K., Furuya, T. and Tobe, M. : Effect of mitomycin C on bone marrow cells in mice. *J Toxicol Sci*, 9 : 51-56, 1984
- 49) Trainor, K. J., Seshadri, R. S. and Morley, A. A. : Residual marrow injury following cytotoxic drugs. *Leuk Res*, 3 : 205-210, 1979
- 50) Trainor, K. J. and Morley, A. A. : Screening of cytotoxic drugs for residual bone marrow damage. *J Natl Cancer Inst*, 57 : 1237-1239, 1976
- 51) Tarbutt, R. G. and Blackett, N. M. : Cell population kinetics of recognizable erythroid cells in rat. *Cell Tissue Kinet*, 1 : 65-80, 1968
- 52) Nagai, K., Kodama, J. and Imanaka, M. : The significance of reticulocytes in erythropoiesis. *Med J Osaka Univ*, 17 : 81-97, 1965
- 53) Fujimoto, S. and Ogawa, M. : Lethal toxicity and myelotoxicity to mice of the combination of 6-thioguanine and 3-[4-amino-2-methyl-(5-pyrimidinyl)methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea

- hydrochloride. *Gann*, 71 : 667-673, 1980
- 54) Constable, T. A. and Blackett, N. M. : Comparison of effect of four cytotoxic agents on granulocytic and erythroid repopulating ability of rat bone marrow. *J Natl Cancer Inst*, 148 : 941-948, 1974
- 55) Udupa, K. B. and Reissmann, K. R. : Acceleration of granulopoietic recovery by androgenic steroids in mice made neutropenic by cytotoxic drugs. *Cancer Res*, 34 : 2517-2520, 1974
- 56) Rebischung, J. L., Gougen, M. D., Mori, K. J., Lemaigre, G., Mathe, G. and Jasmin, C. : Hematological toxicity of repeated injections of (chloro-2-ethyl)-ribofuranosyl-nitrosourea. *Cancer Res*, 44 : 503-506, 1984
- 57) Remcracca, N. J., Rizzoli, V., Howard, D., Duffy, P. and Stohlman, F. : Stem cell migration and proliferation during severe anemia. *Blood*, 36 : 764-770, 1970
- 58) Borek, E. and Kerr, S. J. : Atypical transfer RNA's and their origin in neoplastic cells. *Adv Cancer Res*, 15 : 163-190, 1972
- 59) 川崎 靖, 内田雄幸, 関田清司, 松本清司, 落合敏秋, 降矢 強, 黒川雄二, 戸部満寿夫 : F344ラットによる Nivalenol の反復経口投与試験. *食衛誌*, 31 : 144-154, 1990
- 60) Matsumoto, K., Usui, A., Ochiai, T., Sekita, K., Kawasaki, Y., Naito, K., Furuya, T. and Tobe, M. : Short-term toxicity study of 4-dimethylaminoazobenzene in marmoset. *J Toxicol Sci*, 11 : 335-343, 1986
- 61) Berg, N. B. : Nutrition and longevity in the rat, II. Longevity and onset of disease with different levels of food intake. *J Nutr*, 71 : 255-263, 1960
- 62) Berg, N. B. and Simms, H. S. : Nutrition and longevity in the rat, III. Food restriction beyond 800 days. *J Nutr*, 74 : 23-32, 1961
- 63) Berg, N. B. : Nutrition and longevity in the rat : I. Food intake in relation to size, health and fertility. *J Nutr*, 71 : 242-254, 1960
- 64) Hayashi, Y., Takahashi, M. and Kokubo, T. : Nutritional factors influencing the results of toxicology experiments in animals. *J Toxicol Sci*, 9 : 219-234, 1984
- 65) Oishi, S., Oishi, H. and Hiraga, K. : The effect of food restriction for 4 weeks on common toxicity parameters in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 47 : 15-22, 1979
- 66) Pickering, R. G. and Pickering, C. E. : The effects of reduced dietary intake upon the body and organ weights, and some clinical chemistry and hematological variates of the young Wistar rat. *Toxicol Lett*, 21 : 271-277, 1984
- 67) Scharer, K. : The effect of chronic underfeeding on organ weights of rats. *Toxicology*, 7 : 45-56, 1977
- 68) Tavassoli, M. : Differential response of bone marrow and extramedullary adipose cells to starvation. *Experientia*, 30 : 25-33, 1974
- 69) Weiner, H. E., Godfrey, J. F., Meyers, R. L. and Miller, J. N. : Effects of food restriction and realimentation on serum proteins, complement levels and electrophoretic patterns. *J Nutr*, 81 : 405-410, 1963
- 70) Ogawa, Y., Matsumoto, K., Kamata, E., Ikeda, Y. and Kaneko, T. : Effect of feed restriction on peripheral blood and bone marrow cell counts of Wistar rats. *Exp Anim*, 34 : 407-416, 1985
- 71) Andrews, B. S., Eisenberg, R. A., Theofilopoulos, A. N., Izui, S., Wilson, C. B., McConahey, P. J., Murphy, E. D., Roths, J. B. and Dixon, F. J. : Spontaneous murine lupus-like syndromes, clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med*, 148 : 1198-1215, 1978
- 72) Dixon, F. J., Andrews, B. S., Eisenberg, R. A., McConahey, P. J., Theofilopoulos, A. N. and Wilson, G. B. : Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome in mice. *Arthritis Rheum*, 21 : 564-571, 1978
- 73) 松本清司, 坂本善郎, 広瀬幸子 : 自己免疫疾患自然発症系 MRL/lpr マウスの好中球増多症 : リンパ増殖症との関連性について. *順天堂医学*, 35 : 106-116, 1989

- 74) Bielschowsky, M., Helyer, B. J. and Howie, J. B.: Spontaneous anemia in mice of NZB/Bl strain. *Proc Univ Otago Med Sch*, 37: 9-11, 1959
- 75) Roths, J. B., Murphy, E. D. and Eicher, E. M.: A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med*, 159: 1-20, 1984
- 76) Murphy, E. D. and Roths, J. B.: Another mutation producing generalized lymphoproliferation. In: 10th Annual Report, pp. 23-24, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, 1979
- 77) Sudo, K., Suzuki, K., Matsumoto, K., Furuya, T. and Kurokawa, Y.: Characteristics of KSN inbred mice, a strain of self-perpetuating nude mice. In: Wu, B. and Zheng, J. (eds.), *Immune-deficient animals in experimental medicine*, pp. 45-49, Karger, Basel, 1989
- 78) Lozzio, B. B.: The lasat mouse: A new model for transplantation of human tissues. *Biomedicine*, 24: 144-153, 1976
- 79) Rosen, F. S., Cooper, M. D. and Wedgewood, R. J. P.: Review of the primary immunodeficiencies. *N Engl J Med*, 311: 300-310, 1984
- 80) Bosma, M. J. and Carroll, A. N.: The scid mouse mutant: Definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol*, 9: 323-350, 1991
- 81) Souza, L. M., Boone, T. C., Gabilove, J., Lai, P. H., Zsebo, K. M., Murdock, D. C., Chazin, V. R., Brzuszewski, J., Lu, H., Chen, K. K., Barendt, J., Platzner, E., Moore, M. A., Mertelsmann, R. and Welte, K.: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, 232: 61-65, 1986
- 82) Ulich, T. R., Castillo, J., Keys, M., Granger, G. A. and Ni, R.: Kinetics and mechanisms of recombinant human interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha-induced changes in circulating numbers of neutrophils and lymphocytes. *J Immunol*, 139: 3406-3415, 1987
- 83) Ulich, T. R., Castillo, J., Keys, M. and Granger, G. A.: Recombinant human alpha lymphotoxin induces peripheral neutrophilia and lymphoma in the rat. *Am J Pathol*, 128: 5-14, 1987
- 84) Yang, Y., Ciarletta, A. B., Temple, P. A., Chung, M. P., Kovacic, S., Witek-Giannotti, J. S., Leary, A. C., Kriz, R., Donahue, R. E., Wong, G. G. and Clark, S. C.: Human IL-3 (multi-CSF), Identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell*, 47: 3-10, 1986
- 85) Dayan, A. D.: Rationality and regulatory requirements: A view from Britain. In: Graham, C. E. (ed.), *Preclinical safety of biotechnology products intended for human use*, pp. 89-106, Alan R. Liss, New York, 1987
- 86) Commission of the EC: Guidelines on the preclinical biological safety testing of medical products derived from biotechnology. *TIBTECH*, 7: 13-16, 1989
- 87) Dean, J. H., Luster, M. I. and Gary, A.: Methods and approaches for assessing immunotoxicity: An overview. *Environ Health Perspect*, 43: 27-29, 1982
- 88) Luster, M. I., Munson, A. E., Thomas, P. T., Holsapple, M. P., Fenters, J. D., White, K. L., Lauer, L. D. and Dean, J. H.: Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam Appl Toxicol*, 10: 2-19, 1988
- 89) 早川 堯夫, 高橋道人, 田中 悟, 松本清司, 戸部満寿夫: バイオテクノロジー応用医薬品の安全性評価のための前臨床試験実施に関する考察. *医薬品研究*, 22: 28-40, 1991
- 90) Luster, M. I., Germolec, D. R., White, K. L., Fuchs, B. R., Fort, M. M., Tomaszewski, J. E., Thompson, M., Blair, P. C., Munson, A. E. and Rosenthal, G. J.: A comparison of three nucleoside analogs with anti-retroviral activity on immune and hematopoietic functions in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 101: 328-339, 1989

- 91) Declerk, Y. A., Ettenger, R. B., Ortega, J. A. and Pennisi, A. J.: Macrocytosis and pure RBC anemia caused by azathioprine. *Am J Dis Child*, 134 : 377-386, 1980
- 92) 松本清司, 関田清司, 落合敏秋, 降矢 強, 黒川雄二, 手島令子, 鈴木和弘, 沢田純一, 寺尾允男, 戸部満寿夫: アザチオプリン投与ラットを用いた免疫毒性試験法の検討, 免疫毒性国際共同研究報告. 衛生試験, 108: 34-39, 1990
- 93) Ryffel, B., Donatsch, P., Madorin, M., Matter, B. E., Ruttimann, G., Schon, H., Stoll, R. and Wilson, J.: Toxicological evaluation of cyclosporin A. *Arch Toxicol*, 53 : 107-141, 1983
- 94) Irons, R. D., Heck, H. D., Moore, B. J. and Muirhead, K. A.: Effects of short-term benzene administration on bone marrow cell kinetics in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 51 : 399-409, 1979
- 95) Mangalik, A. and Robinson, W. A.: Stem cell assays in the evaluation of myelotoxicity. *Environ Health Perspect*, 39 : 51-58, 1981
- 96) Greenlee, W. F., Dold, K. M., Irons, R. D. and Osborne, R.: Evidence for direct action of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) on thymic epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol*, 79 : 112-120, 1985
- 97) Vos, J. G., van Logten, M. J., Kreeftenberg, J. G. and Kruizinga, W.: Effect of triphenyltin hydroxide on the immune system of the rat. *Toxicol*, 29 : 325-336, 1984
- 98) Pigoli, S., Mangoni, L., Caramitti, C., Degliantoni, G. and Rozzoli, V.: Inhibition of murine CFU-C by vindesine: Restoration of colony growth by colony stimulating factor. *Int J Cell Colony*, 1 : 143-147, 1983
- 99) Horan, P. K. and Wheelles, L. L.: Quantitative single cell analyses and sorting. *Science*, 198 : 149-154, 1977
- 100) Irons, R. D.: Benzene-induced myelotoxicity, Application of flow cytofluorometry for the evaluation of early proliferative change in bone marrow. *Environ Health Perspect*, 39 : 39-49, 1981
- 101) Vos, J. G., Klerk, A. D., Krajnc, E. I., Kruizinga, W., van Ommen, B. and Rozing, J.: Toxicity of bis (tri-n-butyltin) oxide in the rat: II. Expression of thymus-dependent immune responses and of parameters of nonspecific resistance after short-term exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*, 75 : 387-408, 1984

(3. 11. 26 受稿)