

---

ヒト巨核球造血に関する基礎的  
ならびに臨床的研究

---

〈研究課題番号〉 62480264

昭和62年度科学研究費補助金（一般研究B）

研究成果報告書

平成元年3月

研究代表者 溝口秀昭

（東京女子医科大学医学部教授）

課題番号 62480264

研究課題 ヒト巨核球造血に関する基礎的ならびに臨床的研究

研究組織 研究代表者 溝口秀昭 (東京女子医科大学医学部教授)  
研究分担者 押味和夫 (東京女子医科大学医学部助教授)  
泉二登志子 (東京女子医科大学医学部講師)  
片平潤一 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費	昭和62年度	3,000千円
	昭和63年度	1,000千円
	計	4,000千円

#### 研究発表

##### 1. 学会誌等

1) Mizoguchi H, Ohta K, Suzuki T, Murakami A, Ueda M, Sasaki R, Chiba H: Basic conditions for radioimmunoassay of erythropoietin, and plasma levels of erythropoietin in normal subjects and anemic patients. Acta Hematol Jpn, 50巻 1987年

2) Mizoguchi H, Katahira J, Akahoshi M: Characteristics of mega-

karyocyte progenitors in megakaryoblastic leukemia. Keio J Med,  
36巻 1987年

3)星野茂、斎藤博、和田真紀夫、阿久津美百生、塩崎宏子、高梨美乃子、武井弥生、田中茂治、寺村正尚、高田加寿子、瀧之上真澄、赤星雅、直原徹、増田道彦、山田修、片平潤一、高橋正知、戸塚恭一、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：多発性骨髄腫における間歇MP療法と5剤併用療法(QVMP)および3剤併用療法(QUP)の比較. 臨床血液, 28巻 1987年

4)徳重克年、増田道彦、赤星雅、押味和夫、溝口秀昭：重篤なDICを合併した急性リンパ性白血病の1例—ALLにおける血清LDH値とDICとの相関について—.  
臨床血液 28巻 1987年

5)赤星雅、星野茂、寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭、肥田野信：口腔および陰部潰瘍を初発症状としたhypereosinophilic syndromeと思われる1例.  
日本内科学会雑誌, 76巻 1987年

6) Hirai H, Kobayashi Y, Mano H, Hagiwara K, Maru Y, Omine M,  
Mizoguchi H, Nishida J, Takaku F: A point mutation at codon 13 of  
the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. Nature 327 1987年

7)泉二登志子、瀧之上真澄、高梨美乃子、高久史麿、溝口秀昭：遺伝子組み換え型コロニー形成刺激因子の白血病性幹細胞増殖におよぼす作用および病型との関連. 白血病細胞の生物医学的特性とその異常 眼と化学療法社

1987年

8)増田道彦、小籠弘子、押味和夫、溝口秀昭、橋本正志、神崎暁郎、八幡義人：赤血球ナトリウム濃度低下をきたした先天性有口赤血球症の1例。

臨床血液 28巻 1987年

9) Wada M, Yokota J, Mizoguchi H, Terada M, Sugimura T: Y chromosome abnormality in human stomach lung cancer. Jpn Cancer Res. 78巻

1987年

10)星野茂、押味和夫、溝口秀昭：Hemohagocytosis、汎血球減少、肝脾腫および持続性発熱を呈した1例。免疫薬理 5巻 1987年

11)星野茂、溝口秀昭：エリスロポエチンレセプター。医学のあゆみ

143巻 1987年

12)赤星雅、押味和夫、溝口秀昭：リンパ性白血病細胞における酸性ホスファターゼの電顕細胞化学について。日本血液学会雑誌 50巻 1987年

13) Takanashi M, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H: Effect of recombinant interferons on colony formation of blast progenitors in acute myeloblastic leukemia. Exp Hematol 15巻 1987年

14) Ueda M, Fujiwara Y, Murakami A, Takahashi M, Mizoguchi H:

Establishment of a CSF-producing cell line from a human gastric carcinoma and characteristics of the CSF produced by that cell line.

Int J Cell Cloning 5巻 1987年

15)佐野文明、寺村正尚、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：多彩な免疫学的異常を合併した原発性骨髄線維症の1例。 臨床血液 28巻 1987年

16) Hirai H, Okada M, Mizoguchi H, Mano H, Kobayashi Y, Nishida J, Takaku F: Relationship between an activated N-ras oncogene and chromosomal abnormality during leukemic progression from myelodysplastic syndrome. Blood 71巻 1988年

17) Katahira J, Mizoguchi H: Improvement in culture conditions for human megakaryocyte and pluripotent progenitor cells by low oxygen tension. Int J Cell Cloning 5巻 1987年

18) Akahoshi M, Oshimi K, Mizoguchi H, Okada M, Enomoto Y, Watanabe Y: Myeloproliferative disorders terminating in acute megakaryoblastic leukemia with chromosome 3q26 abnormality. Cancer 60巻 1987年

19)池田康夫、半田誠、小川哲平、野村武夫、檀和夫、外山啓助、長沢洋、溝口秀昭、増田道彦、清水勝、緒方完治：72時間保存濃厚血小板の臨床評価に関する多施設共同研究。 臨床血液 29巻 1988年

20) Oshimi K, Oshimi Y, Akahoshi M, Kobayashi Y, Hirai H, Takaku F, Hattori M, Asano S, Kodo H, Nishinarita S, Iizuka Y, Mizoguchi H: Role of T-cell antigen in the cytolytic activities of large granular lymphocytes (LGLs) in patients with LGL lymphocytosis. Blood 71巻 1988年

21) Takahashi M, Oshimi K, Saito H, Mizoguchi H: Inhibition of human granulocyte-macrophage colony formation by interleukin 2-treated lymphocytes. Exp Hematol 16巻 1988年

22) Oshimi K, Hoshino S, Takahashi M, Akahoshi M, Saito H, Kobayashi Y, Hirai H, Takaku F, Yahagi Y, Oshimi Y, Horie Y, Mizoguchi H: T<sub>H</sub>1 (WT31)-negative, CD3-positive, large granular lymphocyte leukemia with nonspecific cytotoxicity. Blood 71巻 1988年

23) Masuda A, Tsushima T, Shizume K, Ohashi K, Tanino S, Sato K, Oshimi K, Mizoguchi H, Kuki H, Yoshida M: Upper respiratory tract involvement in adult T-cell leukemia. Am J Med Sci 31巻 1988年

24) Oshimi K, Oshimi Y, Saito H, Mizoguchi H: Cytotoxicity of interleukin-2-activated lymphocytes for autologous normal blood mononuclear cells. J Immunological Methods 109巻 1988年

25)和田真紀夫、溝口秀昭：遺伝子操作の基礎と臨床－ヒト癌細胞における癌遺伝子および染色体の異常。 東京女子医科大学雑誌 58巻 1988年

26) Urabe A, Takaku F, Mizoguchi H, Kubo K, Ota K, Shimizu N, Tanaka K, Mimura N, Nihei H, Koshikawa S, Akizawa T, Akiyama N, Otsubo O, Kawaguchi Y, Maeda T: Effect of recombinant human erythropoietin on the anemia of chronic renal failure. *Int J Cell Cloning* 5巻 1988年

27) Wada M, Yokota J, Mizoguchi H, Sugimura T, Terada M: Infrequent loss of chromosomal heterozygosity in human stomach cancer. *Cancer Res* 48巻 1988年

28)藤岡達雄、関口守衛、高橋早苗、広沢広七郎、溝口秀昭、梶田昭：重症右心不全症例における脾機能亢進の臨床像ならびにその病態について。 心臓 29巻 1988年

29)片平潤一、星野茂、溝口秀昭、塩崎宏子、倉根理一：巨核芽球性白血病における組換え型ヒトガンマインターフェロンのin vivoおよびin vitroの影響。 臨床血液 29巻 1988年

30)Morisaki T, Tani K, Takahashi K, Tsutsumi H, Horiuchi N, Ogura H, Kanno H, Fujimura K, Nakayama S, Watanabe C, Takano T, Mizoguchi H, Hirai Y, Uno H, Fujii H, Miwa S: Ten cases of pyruvate kinase (PK) deficiency found in Japan: Enzymatic characterization of the

patients' PK. Acta Haematol Jpn 51巻 1988年

31) Teramura M, Katahira J, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H: Clonal growth of human megakaryocyte progenitors in serum-free cultures: Effect of recombinant human interleukin 3. Exp Hematol 16巻 1988年

32)高梨美乃子、増田道彦、泉二登志子、押味和夫、長田広司、清水勝、森茂郎：強化療法中の血小板輸血により急性GVHDを発症した急性骨髄性白血病の1例。臨床血液 29巻 1988年

33)押味和夫、溝口秀昭：LAK(lymphokine-activated killer)細胞の基礎と臨床。臨床免疫 20巻 1988年

34) Saito H, Oshimi K, Oshimi Y, Mizoguchi H: Characterization of interleukin 2-expanded human peripheral blood lymphocytes: Not only NKH-1<sup>+</sup>-NK cells but also NKH-1<sup>+</sup> and NKH-1<sup>-</sup> T cells are LAK effectors Cellular Immunology 117巻 1988年

35) Motoji T, Takanashi M, Fuchinoue M, Masuda M, Oshimi K, Mizoguchi H: Effect of recombinant GM-CSF and recombinant G-CSF on colony formation of blast progenitors in acute myeloblastic leukemia Exp Hematol 17巻 1989年



36) Sato T, Fuse A, Eguchi M, Hayashi Y, Ryo R, Adachi M, Kishimoto Y, Teramura M, Mizoguchi H, Shima Y, Komori I, Sunami S, Okimoto Y, Nakajima H: Establishment of a human leukaemic cell line (CMK) with megakaryocytic characteristics from a Down's syndrome patient with acute megakaryoblastic leukaemia. Brit J Haematol in press

37) Teramura M, Katahira J, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H: Effect of recombinant hemopoietic growth factors on human megakaryocyte colony formation in serum-free cultures. Exp Hematol in press

## 2. 口頭発表

1) 押味和夫、溝口秀昭、服部理男、浅野茂隆、幸道秀樹、西成田進、飯塚芳一：顆粒リンパ球性白血病細胞のキラー活性とキラー活性に対するモノクローナル抗体の作用 日本血液学会総会 1987年4月

2) 泉二登志子、瀧之上真澄、高梨美乃子、増田道彦、溝口秀昭、高久史麿：白血病性幹細胞の増殖因子に関する研究—ヒト遺伝子組み換え型GM-CSFおよびG-CSFの作用、同上

3) 片平潤一、押味和夫、溝口秀昭、藤井寿一、三輪史朗、神崎暁郎、橋本正志、池田明代、高原真由美、八幡義人：RAEBを合併したhereditary ovalostomatocytosisの一例 同上

4)星野茂、寺村正尚、高橋正知、押味和夫、溝口秀昭、上田正次：IL-3およびエリスロポエチンによるエリスロポエチンレセプターの変化 同上

5)寺村正尚、星野茂、高橋正知、押味和夫、溝口秀昭：My10を用いた臍帯血中の血液前駆細胞の純化 同上

6)斎藤博、押味和夫、溝口秀昭：LAK細胞の表面マーカーとキラー活性 同上

7)浦部晶夫、高久史麿、清水直容、田中孝司、三村信英、二瓶宏、越川昭三、秋沢忠夫、秋山暢夫、大坪修、太田和夫、溝口秀昭、川口良人：リコンビナント・ヒト型エリスロポエチンの第一相試験および腎性貧血への応用 同上

8)佐野文明、寺村正尚、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：多彩な免疫学的異常を伴った原発性骨髄線維症の1例 日本臨床血液学会例会 1987年2月

9)佐野文明、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：Intermediate-B cellの表面形質を呈したFMC7陽性のびまん性混合型悪性リンパ腫の白血化例 日本臨床血液学会例会 1987年6月

10)星野茂、寺村正尚、赤星雅、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、小林幸夫、平井久丸、高久史麿：免疫グロブリン遺伝子再構成により単一クローンであることが証明されたB-CLLと多発性骨髄腫の合併例 日本臨床血液学会例会 1987年9月

11)押味和夫、星野茂、赤星雅、高橋正知、斎藤博、溝口秀昭、小林幸夫、平井久丸、高久史麿：非特異的キラー活性を有するTi(WT31)陰性CD3陽性LGL白血病 日本臨床血液学会総会 1987年10月

12)泉二登志子、高梨美乃子、瀧之上真澄、溝口秀昭、上田正次：白血病性幹細胞の増殖因子に関する研究－エリスロポエチンの作用について－ 同上

13)高橋正知、斎藤博、押味和夫、溝口秀昭：IL-2活性化単核細胞によるCFU-C抑制作用の機序 同上

14)赤星雅、押味和夫、溝口秀昭：LGL白血病細胞の非特異的キラー活性に対する抗CD3抗体の作用に関する電顕的観察 同上

15)星野茂、寺村正尚、高橋正知、押味和夫、溝口秀昭、上田正次：正常人および各種血液疾患患者骨髓細胞におけるエリスロポエチンレセプターの検討 同上

16)寺村正尚、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、嶋勇吉、佐藤武幸：巨核芽球性白血病細胞株(CMK,CMK7,CMK11)に対する組み換え型ヒトIL-3の増殖刺激作用 同上

17)押味和夫、溝口秀昭：抗CD3、抗CD8モノクローナル抗体による顆粒リンパ球ADCC活性の抑制 日本血液学会総会 1988年4月

18) 泉二登志子、高梨美乃子、瀧之上真澄、増田道彦、溝口秀昭：白血病性幹細胞の増殖因子に関する研究－ヒト遺伝子組み換え型インターロイキン3の作用－ 同上

19) 高橋正知、押味和夫、溝口秀昭：顆粒リンパ球増多症から得られた末梢血単核細胞による赤血球系幹細胞の抑制について 同上

20) 赤星雅、押味和夫、溝口秀昭：顆粒リンパ球増多症に出現するリンパ球の微細構造と電顕細胞化学による酸性ホスファターゼについて 同上

21) 増田道彦、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：遺伝子組換え型インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の急性リンパ性白血病幹細胞に対する影響 同上

22) 星野茂、寺村正尚、高橋正知、押味和夫、溝口秀昭、佐中孜、杉野信博、上田正次：慢性腎不全患者骨髓細胞におけるエリスロポエチンレセプターの検討 同上

23) 寺村正尚、片平潤一、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：無血清培養による組換え型ヒトIL-3、GM-CSF、エリスロポエチンのヒト骨髓巨核球系前駆細胞に与える影響 同上

24) 斎藤博、押味和夫、溝口秀昭：抗体産生系に対する顆粒リンパ球増多症患者の影響について 同上

25)岡田経子、寺村正尚、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：プロトコールBFM、NHL81/83に基づく治療が有効であった急性リンパ性白血病（FAB分類L3）の1例 日本臨床血液学会例会 1988年2月

26)星野茂、増田道彦、赤星雅、高橋正知、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、斎藤政子、岡田美智子：共通の染色体異常t(1;7)(p11;p11)を認めた骨髓異形成症候群の父子例 日本臨床血液学会例会 1988年6月

27)日台智明、増田道彦、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、岡田美智子、湊啓輔、下山正徳：Double minute染色体の出現とMRK20陽性を認め、白血病へ移行した骨髓異形成症候群の1例 日本臨床血液学会例会 1988年10月

28)押味和夫、溝口秀昭、北村聖、高久史麿：CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>顆粒リンパ球白血病細胞のT細胞抗原レセプター 日本臨床血液学会総会 1988年11月

29)泉二登志子、高梨美乃子、増田道彦、押味和夫、溝口秀昭：白血病性幹細胞の増殖因子に関する研究—各種コロニー形成刺激因子の作用— 同上

30)高橋正知、押味和夫、溝口秀昭：顆粒リンパ球増多症における赤血球系幹細胞の抑制の機序に関する研究 同上

31)片平潤一、寺村正尚、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、佐藤武幸：巨核芽球性白血病細胞培養株CMKの分化成熟に対する組換え型ヒトγインターフェロンの作用に関する研究 同上

ターフェロンの作用 同上

32)星野茂、寺村正尚、増田道彦、赤星雅、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭  
：B-CLLと多発性骨髄腫の合併例における白血病細胞のサイトカインに対する  
反応 同上

33)寺村正尚、片平潤一、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：無血清  
培養下における各種造血因子のヒト巨核球系前駆細胞に与える影響 同上

34)高梨美乃子、泉二登志子、増田道彦、押味和夫、溝口秀昭：無血清培養に  
於ける白血病性幹細胞の増殖能に及ぼすインターロイキン1の影響 同上

35)横田仁子、寺村正尚、星野茂、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭、岡田美  
智子：t(7;14)(p15;q32)の染色体異常を認めたT細胞性リンパ腫の1例  
日本臨床血液学会例会 1988年12月

36)佐藤祐二、渋谷彰、工藤秀機、足立山夫、衣笠恵士、松本道男、青木幹夫、  
溝口秀昭：皮膚に髄外造血巣を認めた原発性骨髄線維症の1例 同上

## 研究成果

以下のとおり

## 研究目的

最近、骨髄細胞を培養することによって、巨核球コロニーの形成が可能となり、コロニーの基になる細胞は巨核球コロニー形成細胞(megakaryocyte colony-forming units、CFU-M)と呼ばれ、巨核球系幹細胞と考えられている。このような巨核球コロニー法を用いてマウスの巨核球造血に関わる因子については明らかにされつつある。つまり、コロニー形成に必要な因子として2種類あり、1つは巨核球コロニー刺激因子(megakaryocyte colony-stimulating factor、Meg-CSF)であり、他の1つは単独添加では巨核球コロニーは形成させないが、Meg-CSFと共に加えるとコロニー数を増やし、巨核球のploidyを増し、巨核球の成熟を促す巨核球増幅因子(megakaryocyte potentiator、Meg-POT)の存在が考えられている。しかし、ヒトの巨核球造血に関わる因子については明らかでない点が多かった。その理由として、ヒト巨核球コロニー法においてコロニー形成率が悪いこと、巨核球コロニーの同定が不正確で数え落しがある可能性があること、また種々の造血因子やサイトカインが純化されているのに無血清培養系が確立していないことなどが挙げられる。本研究の目的はヒト巨核球コロニー法における前述の問題点を改善し、ヒト巨核球造血に与える種々の造血因子やサイトカインの影響を明らかにし、さらに巨核球造血異常を来す疾患の病態を解明することを目的とする。

## 研究方法

### (1)ヒト巨核球コロニー無血清培養法による巨核球造血の基礎的検討

研究の2年目に当たる昭和63年度に予定していたヒト巨核球コロニーの無血清培養法が、初年度の昭和62年度に幸いにも成功し、その方法で終始研究を進めた。

### 1. ヒト巨核球コロニー無血清培養法の基礎的検討

ヒト骨髄細胞を骨髄穿刺で採取し、フィコールコンレーによる比重遠心法で単核細胞を分離し、さらに付着細胞とT細胞を除去し、非付着非T細胞を採取した。その細胞 $1\sim 2\times 10^5$ 個を、1%ウシ血清アルブミン、 $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン、 $2\times 10^{-5}\text{M}$ の2メルカプトエタノール(2-ME)、種々の造血因子あるいはサイトカインを含むASF101培養液に浮遊させ、0.3%の寒天に埋め込み培養した。培養器は酸素濃度と炭酸ガス濃度の両方をコントロールできる培養器を用い、酸素濃度5%、炭酸ガス濃度5%に調節し、通常14日間培養した。培養終了後、寒天を乾燥させ、血小板糖蛋白IIb/IIIaを同定するモノクロナル抗体であるP-2を添加し、その反応陽性細胞をAPAAP(alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase)法で同定し巨核球とした。3個以上の巨核球の集塊を巨核球コロニーとして算定した。巨核球コロニー刺激因子(Meg-CSF)としてヒト組換え型インターロイキン3(IL-3)を用い、他の至適条件を決定した。

### 2. 造血因子あるいはサイトカインのヒト巨核球造血に与える影響

上記のヒト巨核球コロニー無血清培養法を用い、種々造血因子あるいはサイトカインの巨核球造血に与える影響を検討した。検討した造血因子あるいはサイトカインは、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、エリスロポエチン(Epo)、IL-1、IL-3、IL-4、IL-6であり、それらの単独の効果あるいは組み合わせた時の効果を検討した。いずれも遺伝子組み換え型のものである。

### 3. 巨核球コロニー構成細胞のploidyの検討

巨核球コロニーを無血清で培養後、APAAP法で巨核球を染色し、さらにDAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindol)染色でDNAを染色した。APAAP法で巨核球と同定された細胞のDNA量を顕微分光光度計で測定した。



## (2)無巨核球性血小板減少症の病態の検討

14才の女性で皮下出血、月経過多などの出血傾向を主訴に来院した。その患者の血小板数は $5,000/\mu\text{l}$ に減少し、骨髓中に巨核球を認めないこと、また他の巨核球減少を起こす疾患を認めないことから、無巨核球性血小板減少症と診断した。この患者はその後シクロスポリンの投与で寛解となったが、その前後での骨髓の巨核球コロニー形成細胞や患者末梢リンパ球の巨核球系幹細胞に対する作用を検討した。

## (3)ヒト巨核芽球性白血病株細胞に対する種々造血因子およびサイトカインの作用

佐藤らと共に我々が樹立した急性巨核芽球性白血病株細胞(CMK)(Br J Haematol, 印刷中)を用い、それに対する種々造血因子あるいはサイトカインの影響を検討し、正常巨核球系幹細胞に対するそれと比較した。CMK細胞 $10^5$ 個に種々の造血因子あるいはサイトカインを加え、48時間培養し、培養終了4時間前に $10\mu\text{Ci}$ の $^3\text{H}$ チミジンを加え培養終了後細胞への取り込みを測定した。

## 結果および考察

### (1)ヒト巨核球コロニー無血清培養法によるヒト巨核球造血の基礎的検討

#### 1.ヒト巨核球コロニー無血清培養法の基礎的検討

1%のウシ血清アルブミン、 $2 \times 10^{-5}\text{M}$ の2-ME、5,000倍希釈のIL-3に種々の濃度のトランスフェリンを加えその至適濃度を検討したところ、図1に示すように $200\mu\text{g/ml}$ まで添加量に比例してコロニー数が増加したが、それ以上ではプラトーとなった。それ以後の実験ではトランスフェリンの添加量は $200\mu\text{g/ml}$ とした。

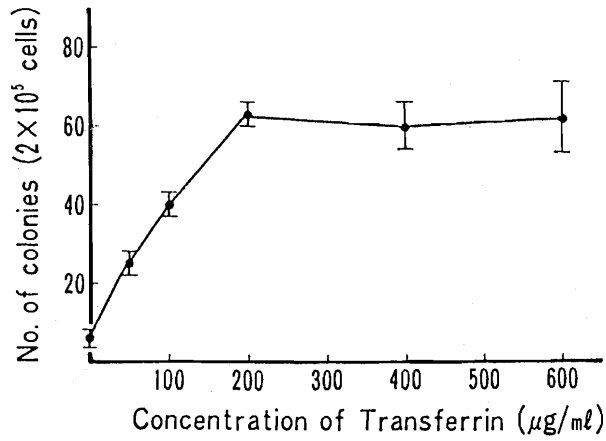


図1. トランスフェリン濃度と巨核球コロニー形成の関係

200 μl/mlのトランスフェリン、 $2 \times 10^{-5}$ Mの2-ME、5,000倍希釈のIL-3を加えておいて、ウシ血清アルブミンの濃度を変えたところ、図2に示すように1%と2%のウシ血清アルブミンを添加した時が、他の濃度の場合に比しコロニー数が有意に多かったので、以後の実験では1%とした。

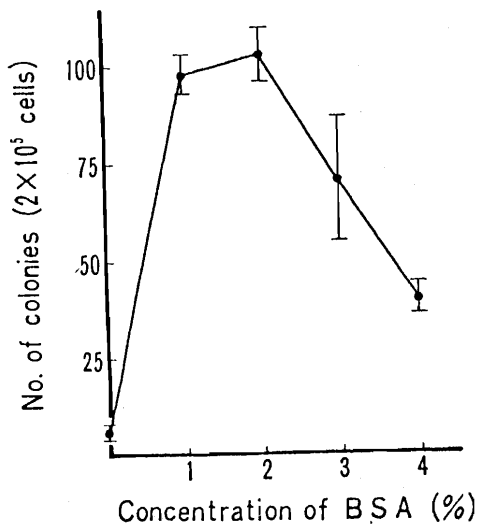


図2. ウシ血清アルブミン(BSA)濃度と巨核球コロニー形成との関係

2-MEの至適濃度を検討したところ、図3に示すように $2 \times 10^{-5}$  Mが至適濃度であることが分かり、以後の実験ではその濃度を用いることにした。

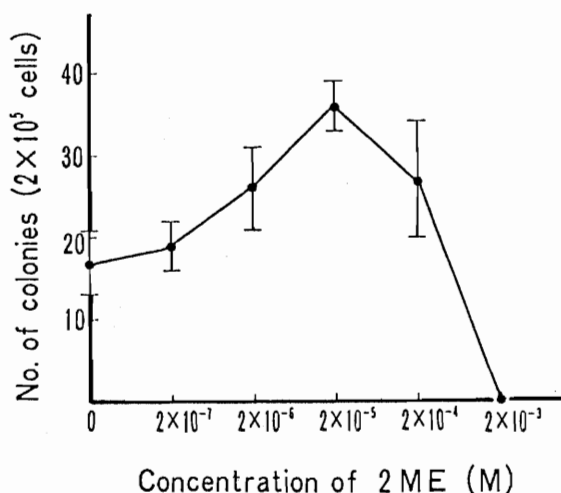


図3. 2メルカプトエタノール(2ME)濃度と巨核球コロニー形成との関係  
また骨髄単核細胞を培養して、IL-3の添加量とコロニー数との関係は図4に示すように100U/mlまで添加濃度を増すにつれコロニー数は増加し、それ以上の濃度ではプラトーになる。また骨髄の非付着非T細胞を用いて培養しても100U/ml以上のIL-3添加でプラトーとなった。

培養日数とコロニー形成の関係を見ると図5に示すように培養5日目にコロニー形成を認め、14日目までコロニー数は増加し以後漸減する。したがって、以後の実験では培養日数を14日とした。Williamsらはヒトの骨髄細胞を有血清の軟寒天に埋め込み培養し、巨核球コロニーの形成を観察したと報告をしているが、その場合に7日目にピークとなり、その後急激に低下している。このような差異は何に起因するかは明らかでないが、可能性としては血清中に細胞毒性のある物質があること、あるいは酸素濃度が20%ではそれによる細胞

障害が起こり易いなどが考えられる。

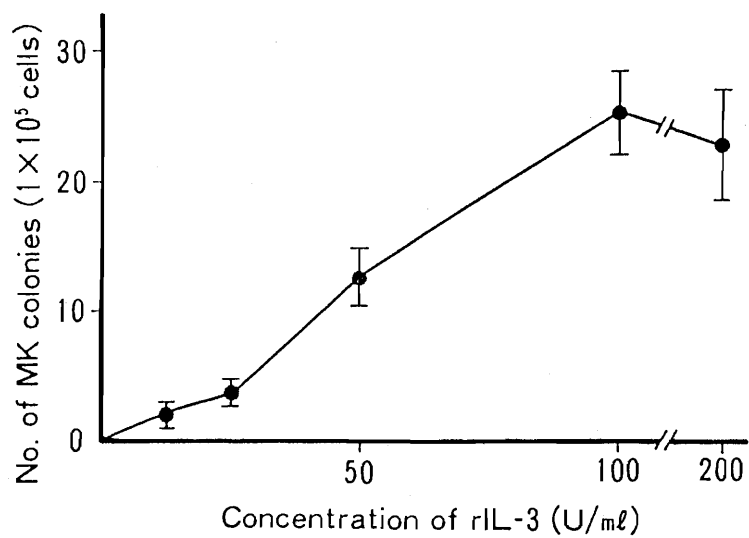


図4．IL-3の添加量と巨核球コロニー形成の関係

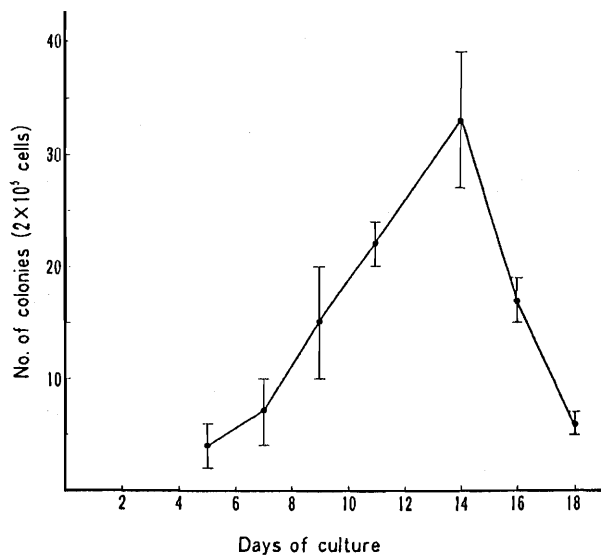


図5．培養日数と巨核球コロニー形成の関係

以上述べたような条件で培養骨髄細胞数と巨核球コロニー数との関係を見ると、図6に示すように0点を通る直線となり、一つの細胞由来のコロニーであることを示している。

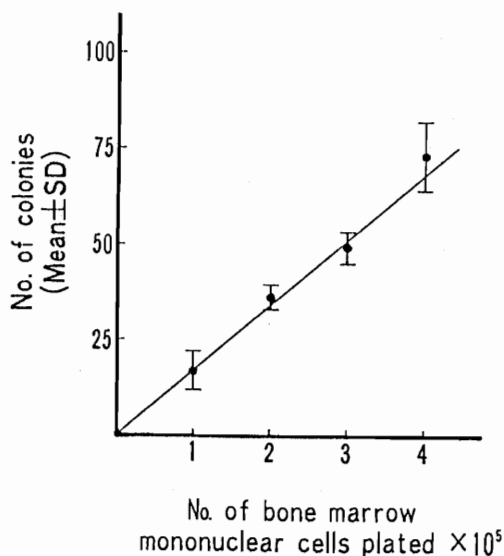


図6. 培養細胞数と巨核球コロニー形成との関係

## 2. 造血因子あるいはサイトカインのヒト巨核球造血に与える影響

### ① GM-CSFの作用

GM-CSFの巨核球コロニー形成に与える影響を見ると、図7に示すようにGM-CSFだけの添加で巨核球コロニーが形成される。つまり、Meg-CSF活性があることになる。しかし、その作用はIL-3の約1/3程度の活性である。GM-CSFのMeg-CSF活性については骨髄単核球に加えた場合よりも非付着非T細胞に加えた場合の方が活性が強い。このことは骨髄単核球中の細胞にGM-CSFが作用しコロニー形成を阻害する物質を産生させる可能性がある。

種々の濃度のIL-3に10U/mlのGM-CSFを加えると、図8に示すように低濃度の

IL-3にGM-CSFを加えるとさらにコロニー数は増すが、最大刺激をするIL-3を添加した場合はGM-CSFを加えてもそれ以上コロニー数は増加しない。このことはGM-CSFはIL-3が作用する巨核球系幹細胞の一部の細胞に作用すると考えられる。

最近興味を持たれているのはサルにヒトのIL-3を注射した後にGM-CSFを注射すると血小板数が増加すると報告されていることである。

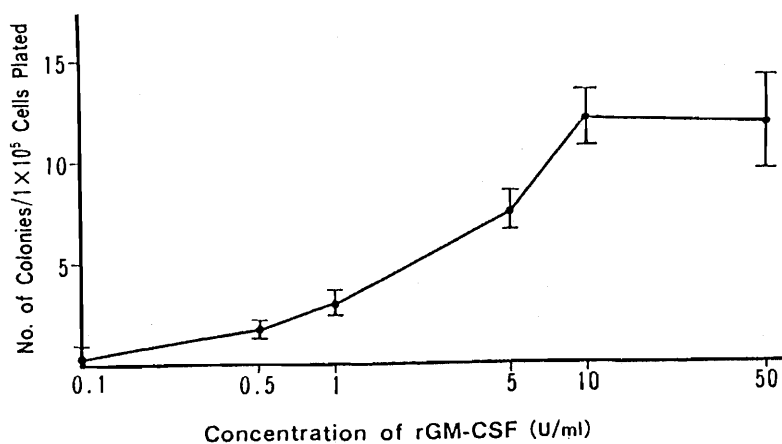


図7. GM-CSFの添加量と巨核球コロニー形成との関係

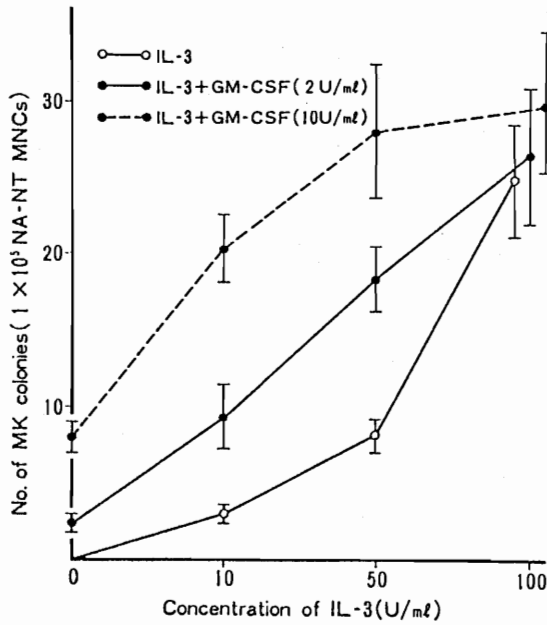


図8. IL-3とGM-CSFを添加した時の巨核球コロニー形成

## ②Epoの作用

EpoはヒトのMeg-CSFであるという報告があった。しかし、Epoを単独で加えても巨核球コロニーの形成は認められない。つまり、EpoにはMeg-CSF活性はないと考えられる。しかし、図9,10に示すようにIL-3あるいはGM-CSFと共に加えるとその作用を増強する。このEpoの作用は最大刺激濃度のIL-3あるいはGM-CSFに加えてもその作用を増強する。つまり、EpoにはMeg-POTの作用があることになる。

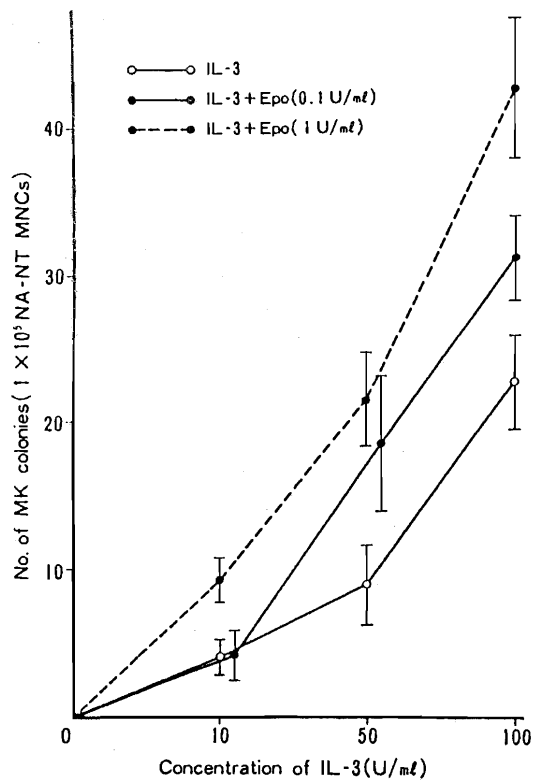


図9. IL-3とエリスロポエチン(Epo)を添加した時の巨核球コロニー形成

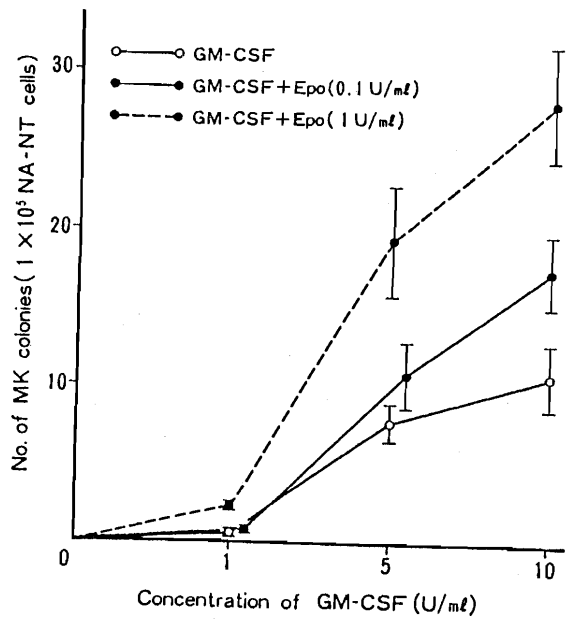


図10. GM-CSFとエリスロポエチン(Epo)を添加した時の巨核球コロニー形成



さらに、IL-3あるいはGM-CSFと共にEpoを加えた場合は、図11,12に示すようにIL-3あるいはGM-CSF単独添加の場合に比べて、コロニー構成巨核球数が増加する。さらにEpoを加えた場合のコロニー構成巨核球のploidyを測定すると図13に示すようにEpo添加によって、巨核球のploidyが増す。これらの事実はEpoが巨核球系幹細胞のIL-3に対する感受性を高めるか、IL-3で巨核球系へ分化した細胞の分裂、成熟を促す可能性がある。しかし、血中Epo濃度の高くなる二次性多血症で血小板が増加することはないし、腎性貧血などでEpoで治療しても血小板の増加は認められないことから、急性出血のような特別の場合を除いてEpoが血小板産生に関与する可能性は少ないと考えられる。

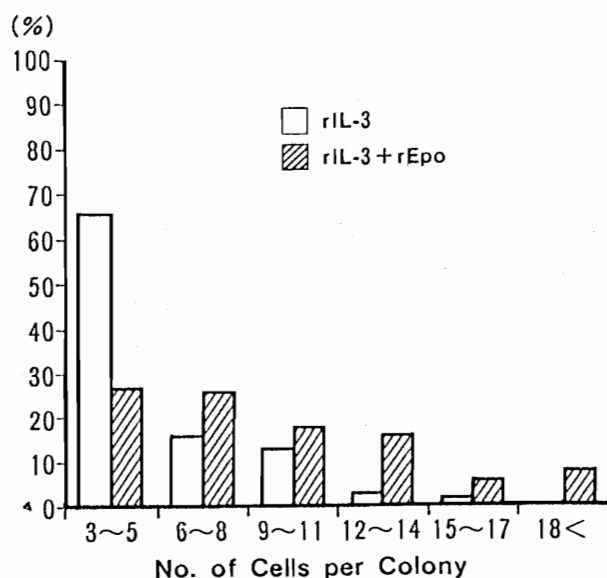


図11. IL-3とエリスロポエチン(Epo)を加えて培養した時のコロニー構成巨核球数の変化

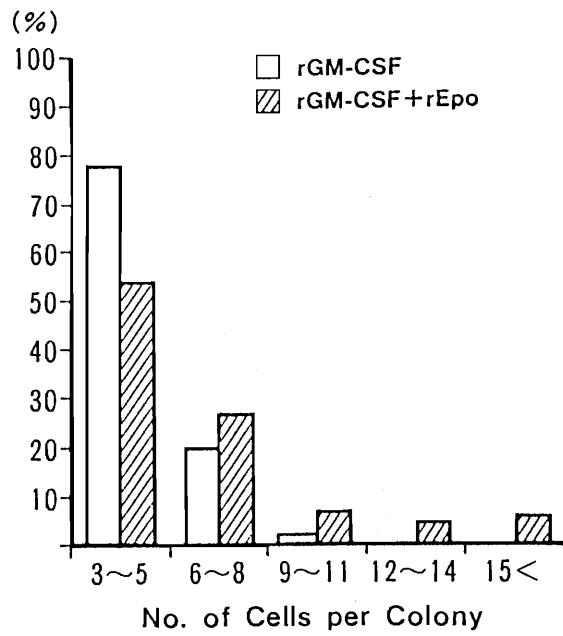


図 1 2 . GM-CSF と エリスロポエチン (Epo) を 加 え て 培 養 し た 時 の  
 コロニー構成巨核球数の変化

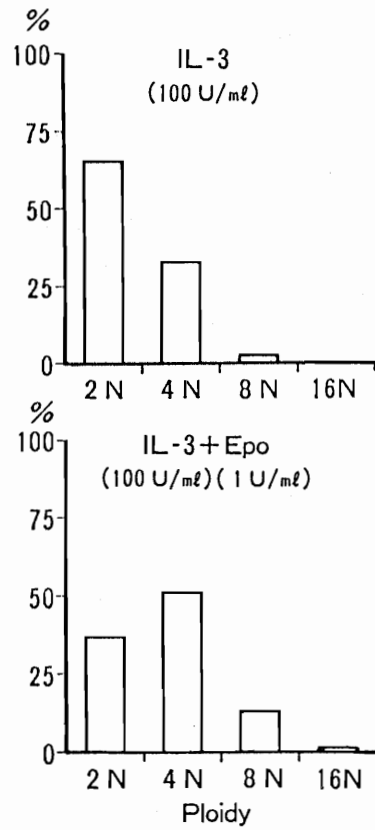


図 13. エリスロポエチン(Epo)添加によるコロニー構成巨核球の ploidy の変化

### ③M-CSFの作用

M-CSFを単独に加えても巨核球コロニーの形成は認められない。しかし、種々の濃度のIL-3と共に加えると図14に示すようにいずれの濃度のIL-3の作用も増強する。つまり、Meg-POTの作用があることになる。部分的に純化されたM-CSFを抗腫瘍剤による治療後あるいは骨髄移植後に用いると顆粒球減少の回復を促進させるばかりでなく、血小板減少の回復も促進すると報告されている。このようなM-CSFのin vivoにおける作用がin vitroにおけるM-CSFのMeg-POT作用の現れとするとこれまで血小板産生の調節因子として考えられていたトロンボポエチンの作用とされるものと酷似していることになる。

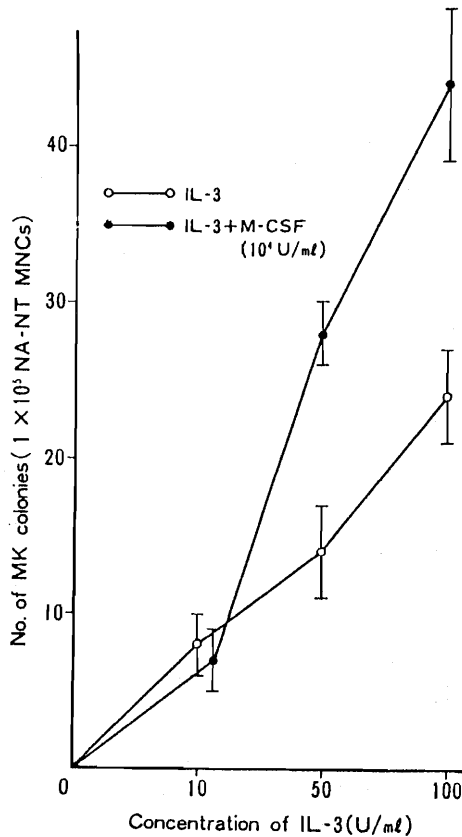


図14. IL-3とM-CSFを加えて培養した時の巨核球コロニー形成

#### ④IL-1 $\alpha$ とG-CSFの作用

図15に示すようにIL-1 $\alpha$ とG-CSFのいずれもMeg-CSFの活性はない。また、IL-3と共に加えてもIL-3単独添加の場合と比べて巨核球コロニー数は増加せず、Meg-POT作用もないと考えられる。かって、G-CSFを加えてヒト骨髄の単核細胞を培養すると巨核球コロニーが形成されるとされたが、付着細胞あるいはT細胞を介する作用だった可能性がある。また、マウスではIL-1をIL-3と共に加えるとIL-3の作用を増強すると報告されているが、ヒトではそのようなことはないと考えられる。

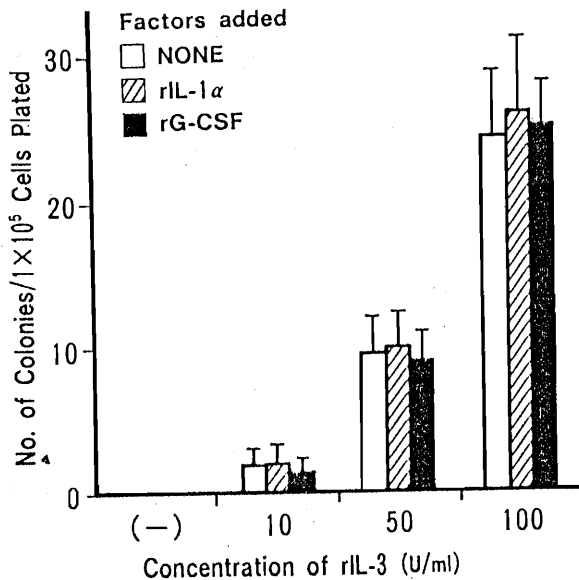


図15. IL-1 $\alpha$ あるいはG-CSFの巨核球コロニー形成に与える影響

### ⑤ IL-4とIL-6の作用

図16に示すようにIL-4とIL-6のいずれもMeg-CSFの活性はない。また、IL-3と共に加えてもIL-3単独添加の場合と比べて巨核球コロニー数は増加せず、Meg-POT作用もないと考えられる。

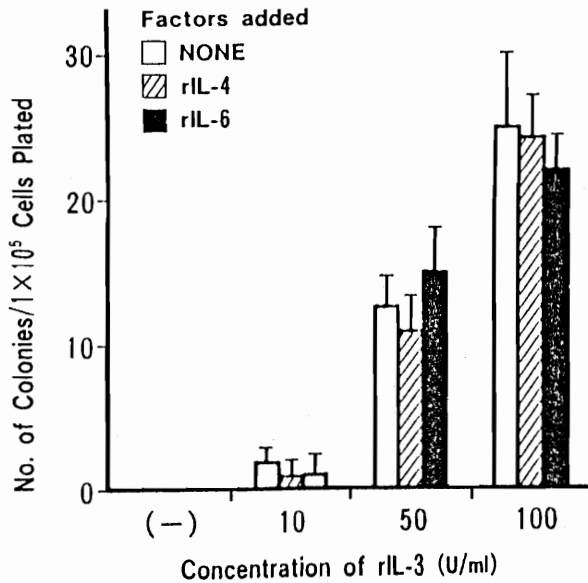


図16. IL-4あるいはIL-6の巨核球コロニー形成に与える影響

### ⑥ TSFの作用

McDonaldらがヒト胎児腎細胞株培養上清から純化した thrombopoiesis stimulating factor(TSF)あるいはトロンボポエチンをMcDonaldから供与を受け、それをヒト巨核球コロニーの培養系に加えた。その結果、図17に示すようにTSF単独でも僅かに巨核球コロニーが形成されるが、IL-3と共に加えると低濃度のIL-3と共に加えて時だけその作用を増強した。この作用はGM-CSF

のそれに似ている。さらに、McDonaldらは昨年の夏の国際実験血液学会（ヒューストン）で、TSFにGM-CSFが僅か混在していると報告しており、その作用を見ている可能性がある。

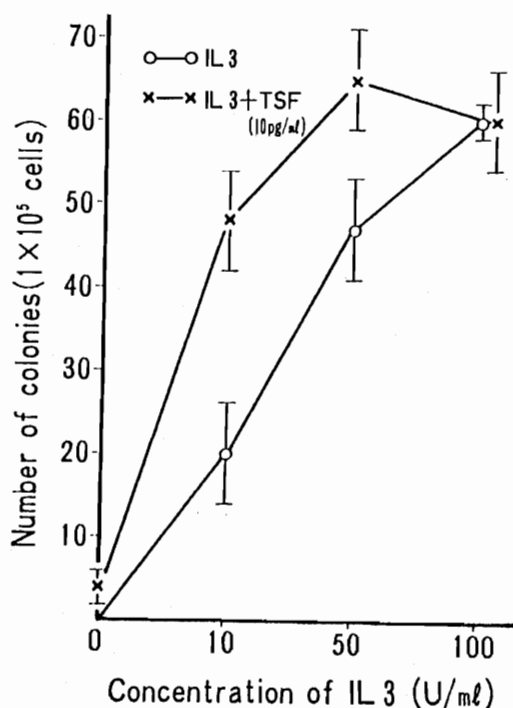


図17. TSFの巨核球コロニー形成に与える影響

## (2)無巨核球性血小板減少症の病態の検討

患者骨髄中の巨核球コロニー形成細胞を調べると、図18に示すように全く認められなかった。そこで、患者末梢血からTリンパ球を分離し、それを正常ヒト骨髄単核細胞に加えて培養した。その結果、図19に示すようにTリンパ球およびそれから分離したCD8<sup>+</sup>細胞がCFU-Mを抑制したが、CFU-GMあるいはBFU-Eは抑制しなかった。したがって、免疫学的機序が本例の発症機序に関与が

疑われ、メチルプレドニソロンの大量療法を行ったが、図20に示すように無効であった。そこで、シクロスポリンを用いたところ、図20に示すように血小板数が正常化した。またその時期の患者骨髄中の巨核球コロニー形成細胞は正常ヒト骨髄中のその約1/2位に回復した（図18）。

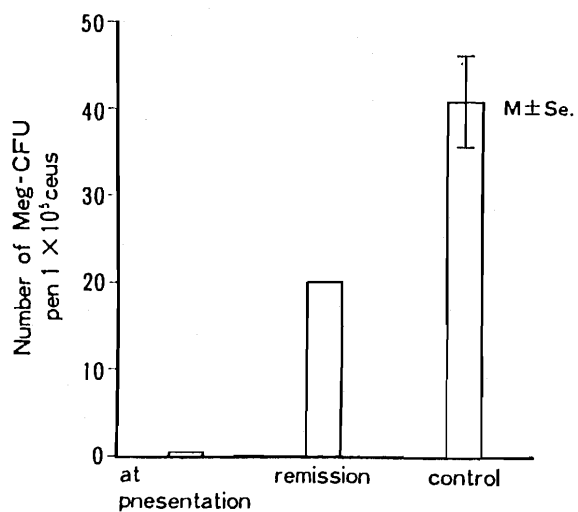


図18. 無巨核球性血小板減少症患者骨髄細胞の巨核球コロニー形成



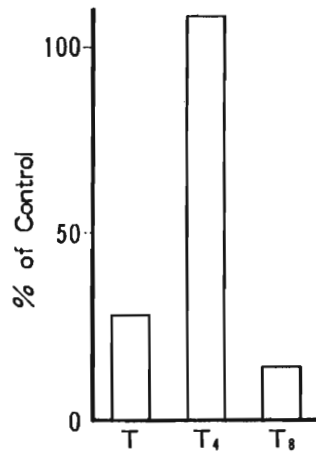


図19. 無巨核球性血小板減少症患者末梢リンパ球の巨核球コロニー形成に与える影響

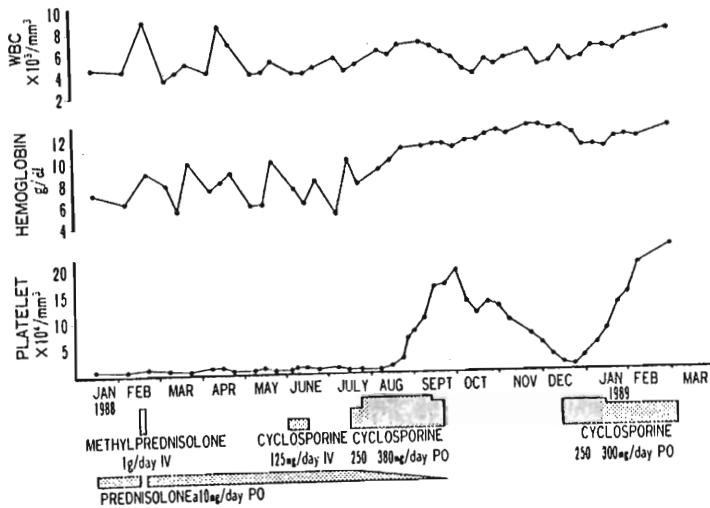


図20. 無巨核球性血小板減少症(14才、女性)の治療経過

血小板減少期のリンパ球を凍結保存したものあるいは寛解期の患者末梢リンパ球を寛解期の患者骨髄細胞に加えて培養した。その結果、図21に示すように血小板減少期の患者Tリンパ球、そのうちでもCD8+細胞がCFU-Mを抑制したが、CFU-GMあるいはBFU-Eは抑制しなかった。また、寛解期の患者リンパ球リンパ球はCFU-M, CFUGM, BFU-Eのいずれも抑制しなかった。このことは血小板減少期に出現したCD8+が本症の病態に関与し、それに対しシクロスポリンが作用し寛解となったと考えられる。ただし、血小板減少期と寛解期のリンパ球の数あるいは亜集団の割合には大きな変化はなくシクロスポリンの作用は殺細胞的に作用したよりはその機能を変えた可能性が強い。

本疾患は再生不良性貧血や不応性貧血へ移行した例が報告されているが、本例でも注意深く今後の経過を見る必要がある。さらに、再生不良性貧血や不応性貧血でCD8+細胞がその発症に関与し、シクロスポリンが有効である例があることを示唆している。

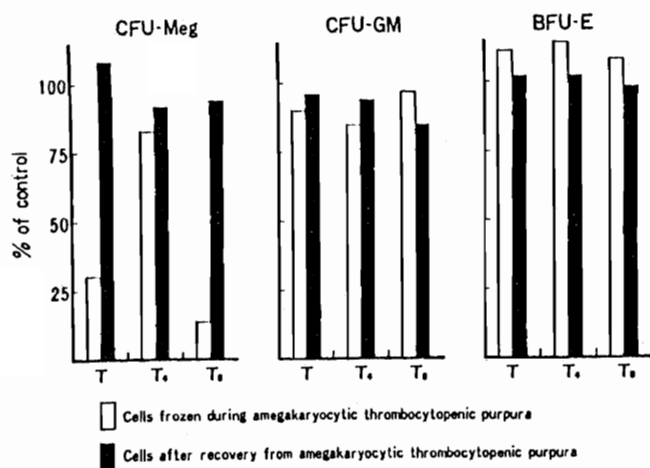


図21. 無巨核球性血小板減少症患者リンパ球の巨核球コロニー形成に与える影響

(3)ヒト巨核芽球性白血病株細胞に対する種々造血因子およびサイトカインの作用

図22,23に示すようにIL-3あるいはGM-CSFを添加すると容量依存性に<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みは増加する。EpoあるいはG-CSFを添加したのでは<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みは増加しない(図24,25)。このような事実は正常のCFU-Mの反応性と一致し興味深い。また予備実験であるが、TSFも<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みを高める。このような作用が混在するGM-CSFによるものか否かが興味を持たれる。今後ヒト骨髓細胞の巨核球コロニー形成とこの細胞の増殖に対する作用を指標として、血小板産生の調節因子をさらに解明することが可能と考える。

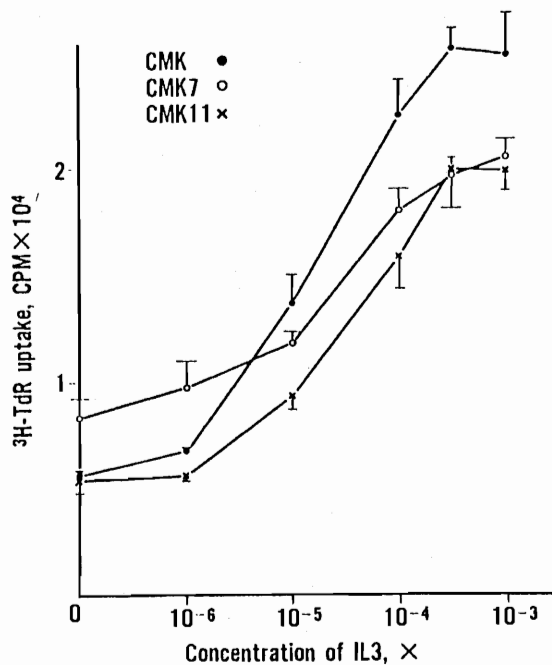


図22. CMKの<sup>3</sup>H-TdRの取り込みに対するIL-3の影響

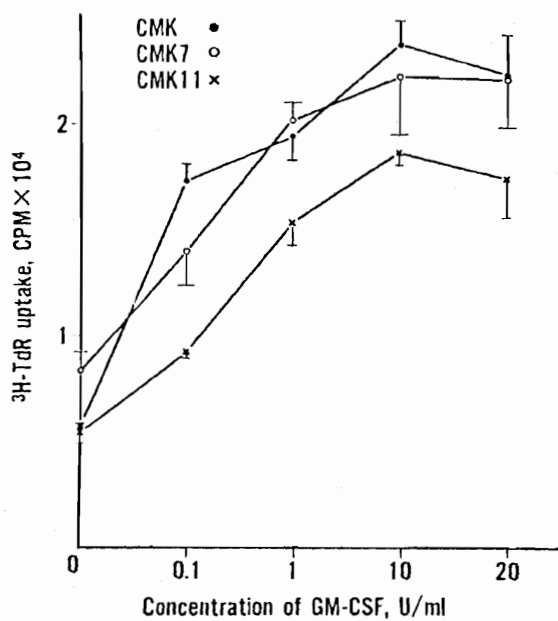


図 23. CMKの<sup>3</sup>H-TdRの取り込みに対するGM-CSFの影響

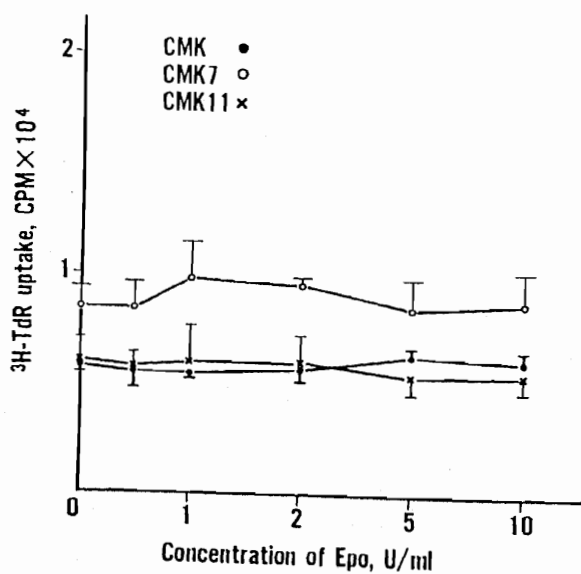


図 24. CMKの<sup>3</sup>H-TdRの取り込みに対するエリスロポエチン(Epo)の影響

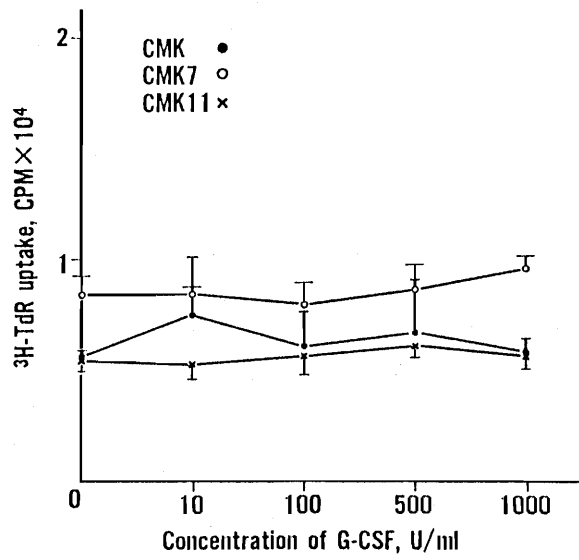


図 25. CMKの<sup>3</sup>H-TdRの取り込みに対するG-CSFの影響