
遺伝子組み換え型顆粒球コロニー
形成刺激因子の白血病細胞の分化
と増殖に及ぼす影響

研究課題番号 <62570554>

昭和63年度科学研究費補助金 (一般研究C)

平成元年3月

研究代表者 泉 二 登 志 子

(東京女子医科大学)

課題番号 62570554

研究課題 遺伝子組み替え型コロニー形成刺激因子の白血病細胞の分化
と増殖に及ぼす影響

研究代表者 泉二登志子 (東京女子医科大学医学部講師)

研究経費

昭和	62年度	1200千円
昭和	63年度	300千円
	計	1500千円

研究発表

1. 学会誌等

(1) Takanashi M, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H, Effect of recombinant interferons on colony formation of blast progenitors in acute myeloblastic leukemia Exp. Hematol. 15:946-951, 1987

(2) 泉二登志子、淵之上真澄、高梨美乃子、高久史麿、溝口秀昭 遺伝子組み替え型コロニー形成刺激因子の白血病性幹細胞に及ぼす作用および病型との関連 白血病細胞の生物学的特性とその制御 癌と化学療法社 p247-255, 1987

(3) Teramura N, Katahira J, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H, clonal growth of human megakarioblastic progenitors in serum-free cultures: effect of recombinant human interleukin-3. Exp. Hematol. 16:843-848, 1988

(4) 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. 17:56-60, 1989

(5) Motoji T, Takanashi M, Masuda M, Nakayama K, Oshimi K, Mizoguchi H, Colony promoting activity of interleukin-3 on leukemic progenitor cells and collaborative activity with other CSFs 発表予定

2. 口頭発表

(1) 泉二登志子、淵之上真澄、高梨美乃子、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—白血病病型による差異について 日本臨床血液学会 1986年10月

(2) 泉二登志子、淵之上真澄、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—ヒト遺伝子組み替え型GM-CSFおよびG-CSFの作用 日本血液学会 1987年4月

(3) 泉二登志子、溝口秀昭：遺伝子組み替え型コロニー刺激因子の白血病性幹細胞に与える影響 国立遺伝学研究所 研究集会 1987年1月

(4) 泉二登志子、溝口秀昭：組み替え型コロニー形成刺激因子の白血病性幹細胞に与える影響 札幌冬期がんセミナー 1987年2月

(5) Motoji T, Fuchinoue M, Takanashi M, Takaku F, Mizoguchi H, Effect of recombinant human GM-CSF and recombinant human G-CSF on proliferation of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. Exp. Hematol. 1987, Aug.

(6) 泉二登志子、高梨美乃子、淵之上真澄、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 日本臨床血液学会 1987年10月

(7) 泉二登志子、高梨美乃子、淵之上真澄、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—ヒト遺伝子組み替え型インターロイキン3の作用 日本血液学会 1988年4月

(7) 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 日本臨床血液学会 1988年10月

研究成果

以下のとおり

研究目的

急性白血病の治療において化学療法後の正常顆粒球の回復を促進することはきわめて重要である。最近、ヒト遺伝子組み替え型顆粒球単球コロニー形成刺激因子 (rG-CSF) や遺伝子組み替え型顆粒球コロニー形成刺激因子 (rG-CSF)、さらにヒト遺伝子組み替え型インターロイキン3 (rIL-3) が開発され、この目的に利用されることが期待されている。臨床応用に先立ちこれらの物質が白血病細胞の増殖と分化に及ぼす影響を明かにしておくことが必要である。本研究は我々が長年行ってきた白血病コロニー法などを用いてこれを解明することを目的とした。白血病細胞の増殖および分化機構を明かにすることは白血病治療の向上に役立つと考えられる。

研究方法

1. 白血病細胞の採取

急性骨髄性白血病患者の末梢血または骨髄血をヘパリン採血した。採血は白血病の初発時または再発時に行なった。白血病細胞の分類はF A B分類に従い分類した。

2. 白血病性コロニー法

白血病コロニーの形成はMindenらの原法に改良を加えた方法を以前より我々は確立しておりその方法を用いた。(医学のあゆみ123(10)934-936、1982 Acta Haematol Jap 46(7)212-220、1983 Blood 65(4)894-901、1985)

急性骨髄性白血病患者の末梢血または骨髄血をヘパリン採血しフィコールに重層、遠心し単核細胞を採取した。これにヒツジ赤血球を加え、ロゼットを形成させ、再びフィコールに重層することにより混在するTリンパ球を除

去した。このように分離した白血病細胞はただちに培養するかまたは使用時まで保存した。保存はDMSOとウシ胎児血清を加え液体窒素中に凍結保存した。アルファー培養液中に浮遊させた白血病細胞 $1-4 \times 10^5$ 個をウシ胎児血清(20%)、コロニー形成刺激因子(10%)と共にメチルセルロース(0.8%)に埋め込み 37°C 、5%炭酸ガス培養器中で7日間培養した。コロニー形成刺激因子(CSF)としては対照群として正常末梢血単核球をphytohemagglutininで培養した上清(PHA-LCM)、実験群としてはrGM-CSF、rG-CSF、rIL-3を加えた。培養7日目に20個以上よりなる細胞塊を白血病コロニー(L-CFU)とし、その数を算定した。CSFに反応性の有無の判定は以下の基準によった。CSF無添加でコロニー形成が認められなかった場合は一皿あたり10個以上のコロニーが形成されたものを陽性と考えた。CSF無添加でコロニー形成が認められた場合は、実験群でのコロニー数がCSF無添加群に比して統計学上有意に多い場合を陽性と判断した。添加するCSFの濃度はrGM-CSF 10^4U/ml 、rG-CSF 10^2U/ml 、rIL-3 10^2U/ml で、これらは正常骨髄顆粒球単球コロニーを最大に刺激する最低の濃度とした。rGM-CSFはGenetics InstituteのDr. Wang、および住友製薬より供与された。rG-CSFはキリンアムジェン社より供与されたものを用いた。またrIL-3はGenetics Instituteまたはキリンアムジェン社より供与された。CSF併用作用を検討するためにrIL-3とrGM-CSFまたはrG-CSFを同時に添加し、その効果を見た。

3. 自己再生能の測定

Buickらの方法により測定した。各種コロニー形成刺激因子で形成されたコロニーを培養皿ごと培養液に浮遊させ遠心し、再度マイクロウェル中に培養した。2次培養は上記と同じ培養組成とし、CSFとしてはPHA-LCMを用いた。7日後に20個以上よりなる細胞塊をコロニーとして判定し、その数を算定

した。これを二次性コロニーといい、PE2と称する。

4. 細胞表面形質および細胞形態

各種コロニー形成刺激因子による白血病細胞の分化をみるために、各種CSFで形成されたコロニー構成細胞について細胞表面形質および細胞形態を調べた。細胞表面形質の検索は間接蛍光抗体法を用いた。各種モノクローナル抗体はMY4, MY7, OKMI, OKIa1を一次抗体として使用し、細胞自動解析装置を用いて調べた。細胞形態はサイトスピンで塗末標本を作製し、ギムザ染色、ペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ二重染色を行い調べた。

5. PHA-LCM中に含まれるコロニー形成刺激因子について

各種CSFのコロニー形成刺激活性はいずれもPHA-LCMに比較すると低値を示した。PHA-LCMの中には種々の因子が含まれていると考えられる。PHA-LCMと各種CSFとの関連をみるために、PHA-LCMをあらかじめ各種CSF抗体と共に室温で30分間ふ置した後培養系に添加し、そのコロニー形成刺激活性の変化について検討した。抗rIL-3抗体はGenetics Instituteより、抗rGM-CSF抗体は住友製薬より、また抗rG-CSF抗体はキリンアムジェン社より供与されたものを用いた。

結果および考案

1) rGM-CSF、rG-CSF、およびrIL-3の白血病性コロニーに及ぼす作用

表1に21症例でのコロニー数を示す。PHA-LCMの刺激下に形成されたコロニー数は 4×10^5 個あたり51-8300個であった。CSF無添加でのコロニーは、病型によって異なりM1では形成されなかったが、M2とM5では小数形成され、一方M4では多数のコロニーが形成された。rGM-CSFは20例

中13例でコロニーを形成させたが、その程度はPHA-LCMと比較すると有意に低かった($p < .005$)。M1の4例ではrGM-CSFによるコロニー数は0または10個以下であったが、PHA-LCMでは多数形成された。症例1、2ではrGM-CSFの濃度を 10^4 U/mlまで増加させてみても、コロニー形成は見られなかった。症例7、8では骨髓血を用いているが、コロニー構成細胞の形態は芽球様であった。M2の7例中6例で、M5では5例中3例で、rGM-CSFによりコロニーが形成された。しかし、その程度はPHA-LCMよりも有意に低値であった。症例12のM2細胞では他のM2の症例に比べてコロニー数はかなり多かったが、この患者では血清リゾチームが高値を示した点でM4に類似していた。M4

Type	Patient no.	Source of cells*	Number of colonies			
			Without CSF	rGM-CSF	rG-CSF	PHA-LCM
M1	1	PB	0	1	0	4200
	2	PB	0	0	0	51
	3	PB	0	ND	0	560
	4	PB	0	6	0	2400
	5	PB	0	0	0	5800
M2	6	PB	0	66 ^b	0	1300
	7	BM	11	140 ^b	0	2100
	8	BM	12	160 ^b	70 ^b	1300
	9	PB	180	260	570 ^c	2100
	10	PB	170	1020 ^b	200	8300
	11	PB	2	370 ^b	68 ^b	6200
	12	PB	8	160 ^b	0	220
M4	13	PB	27	89 ^b	56 ^c	87
	14	PB	110	2500 ^b	120	2900
	15	PB	110	160 ^b	120	210
	16	PB	100	210 ^b	140	270
M5a	17	PB	1	6	0	1100
	18	PB	11	770 ^b	0	5200
	19	PB	100	260 ^b	200 ^b	1200
M5b	20	PB	45	66 ^b	42	260
	21	PB	0	3	4	240

表1 rGM-CSF, rG-CSFによる白血病コロニー数

PB: 末梢血、BM: 骨髓血 (骨髓中の芽球は80%以上) ND: 未施行

b: $p < .01$, c: $p < .05$ でコロニー数を有意に形成した例を示す

の症例では、rGM-CSFにより非常の多数のコロニー数が形成された(図1)。その程度は全体のコロニー数からCSF無添加でのコロニー数を引いてPHA-LCMのコロニー数を100%とした場合、その50-100%であり、CSF無添加で多数のコロニー数をみた点を考慮しても高い反応性を示した。症例14では高濃度のrGM-CSFを添加するとコロニー数はむしろ減少した。

rG-CSFは21症例中5例でしかコロニーを形成しなかった(表1、図1)。コロニー形成がみられた5例中3例はM2で残る例はM4とM5aが1例ずつであった。反応した症例全例で、その程度はごく軽度であった。4症例ではrG-CSFの濃度を 10^5 U/mlまで増加させてみたが、症例1と2では、そのような条件下でもコロニーは形成されなかった。症例12と14では、 10^4 - 10^5 U/mlに増加させた場合のみ、僅かのコロニーが形成された。

rG-CSFで形成されたコロニーの程度はrGM-CSF、PHA-LCMに比べそれぞれ有意に低値($p < .001$ 、 $p < .05$)であった。またrG-CSFに反応する症例数は、rGM-CSFに反応する症例数に比し有意に少なかった($p < .02$)

以上の結果よりGM-CSF、G-CSFは白血病性コロニーを形成するが、その反応程度は白血病病型によって明かに異なっていることがわかった。GM-CSFはM1ではほとんどコロニーを形成せず、CSF無添加でのコロニーを考慮してもM4で最も強くコロニー形成能を有し、その程度はPHA-LCMに比べ、わずかに低い程度であった。このことからGM-CSFはM4の芽球にとって主なCSFの一つと考えられた。SabbathらはM4の白血病性幹細胞はearly (day14) CFU-GMの細胞表面形質をもち、M1の白血病性幹細胞はCFU-GEMMの形質をもつことを報告した。さらに正常骨髄細胞においてGM-CSFはearly (day14) CFU-GMのコロニー形成を刺激する事が、Nicolaらにより明かにされている。これらの事よりM1のL-CFUはCFU-GEMMのように未熟であるのでGM-CSFと反応しないと考

えられる。一方、M4のL-CFUはGM-CSFに非常に強く反応するが、CFU-GMとほぼ同じ成熟段階にあるのではないかと考えられる。

G-CSFは21例中5例のみにコロニーを形成したが、その程度はGM-CSFに比べ有意に少なくごく軽度であった。うち3例はM2であり、G-CSFはM2の芽球を特に刺激する傾向を有するのかもしれない。

これらCSFを白血病治療に用いることが、多いに期待されている。G-CSFはM2を除いた病型では白血病性コロニーを形成しないので、M2以外の白血病患者に使用できると考えられる。またGM-CSFはM1の病型では白血病性コロニーを形成しないので、この病型では臨床使用が可能と考えられる。

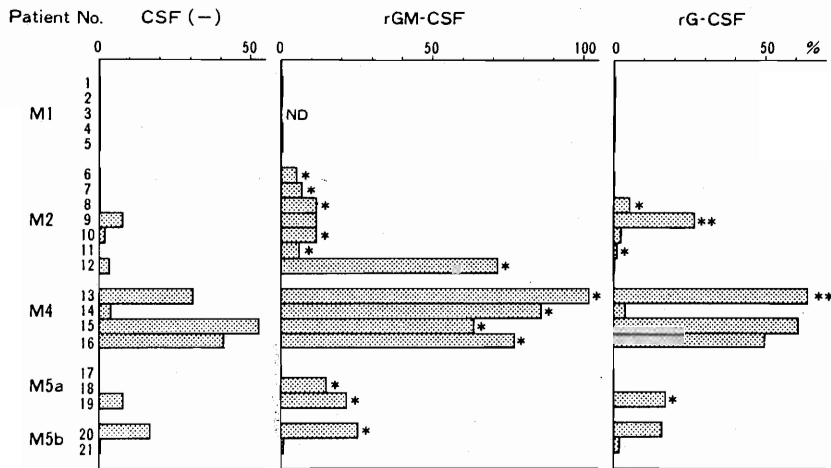


図1 rGM-CSF、rG-CSFの白血病コロニー数

rGM-CSF, rG-CSF, CSF無添加でのコロニー数を、PHA-LCMでのコロニー数を100%として表したもの 星印はコロニーが有意に形成された例を示す

表2、図2はrIL-3によるコロニー数の結果を示す。CSF無添加では27例中15例にコロニー形成をみた。その数は病型M1とM2では少なく、M3、M4、およびM5では多かった。PHA-LCMで形成されたコロニー数は 1×10^5 個あたり60-1441個にわたっていた。rIL-3は27例中12例(44%)でコロニー形成を刺激した。この程度は様々であったが、全体としてPHA-LCMに比べ有意に低値であった($p < .0001$)。rIL-3が特に一定の白血病病型を

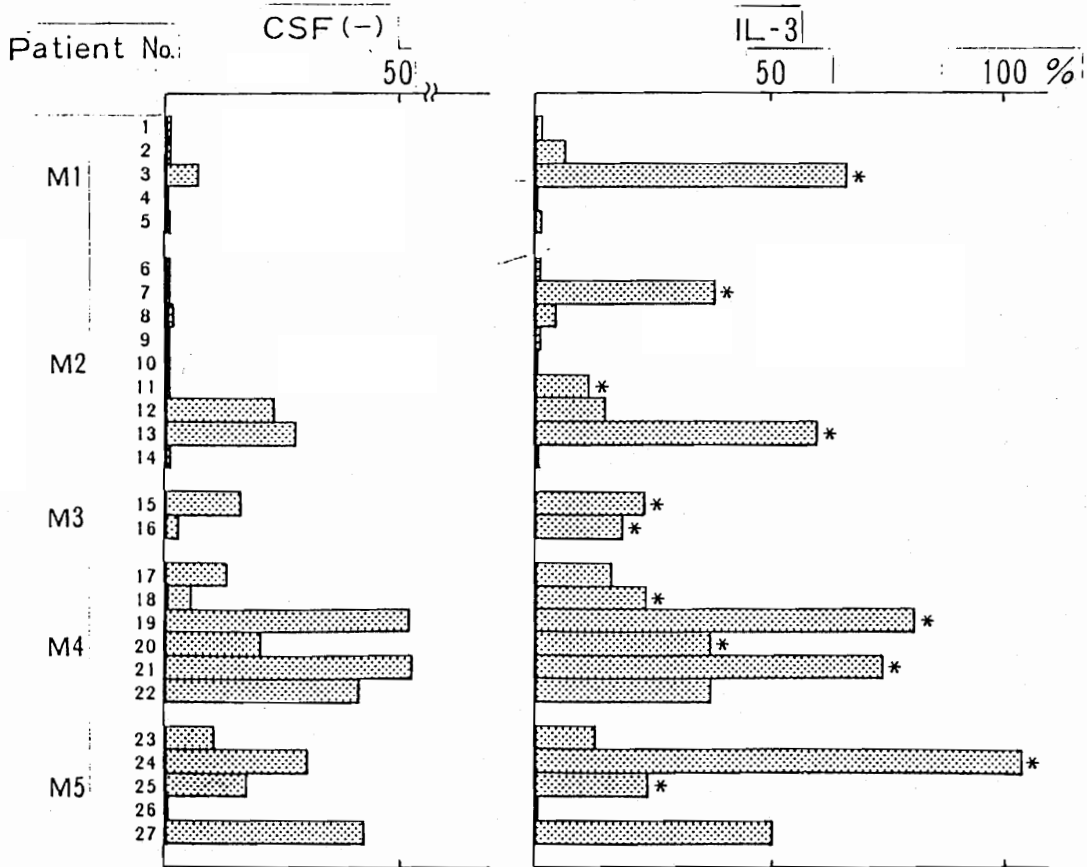


図2 rIL-3の白血病コロニー数

rIL-3、CSF無添加でのコロニー数を、PHA-LCMのコロニー数を100%として表したもの。星印はコロニーが有意に形成された例を示す。

Type	Case No.	Source of cells ⁺	Number of colonies / 1×10^5 cells		
			without CSF	rIL-3	PHA-LCM
M1	1	PB	0	2	234*
	2	PB	0	6	105*
	3	PB	8	75*	114*
	4	PB	0	0	129*
	5	PB	0	5	1,441*
M2	6	PB	0	6	562*
	7	BM	0	104*	274*
	8	PB	0	5	121*
	9	PB	0	1	288*
	10	PB	0	0	368*
	11	PB	0	33*	312*
	12	PB	41	21	147*
	13	BM	17	36*	60*
	14	PB	0	0	144*
	15	BM	51	62*	97*
M3	16	PB	119	164*	742*
	17	PB	13	103*	568*
M4	18	PB	39	49	303*
	19	PB	34	169*	721*
	20	PB	348	535*	659*
	21	PB	101	189*	517*
	22	PB	28	25	68*
M5	23	PB	43	51	427*
	24	PB	125	444*	424*
	25	PB	45	62*	265*
	26	PB	0	0	242*
	27	PB	117	139	278*

表2 rIL-3による白血病コロニー数

右頁・注 PB:末梢血、BM: 骨髓血 (骨髓中の芽球数は80%以上)

星印はコロニーが有意に形成された例を示す

刺激したという傾向はみられなかった。rIL-3の反応頻度および反応程度は、rGM-CSF, rG-CSFでの結果と統計学的に有意差を認めなかった。IL-3は白血病病型に拘らずコロニー形成を刺激するので、その臨床応用は困難と考えられる。

2. rGM-CSF, rG-CSF, rIL-3の白血病細胞の自己再生能に及ぼす影響

rGM-CSF, rG-CSF、PHA-LCMでコロニーを形成した6症例において自己再生能を測定した結果を表3に示す。自己再生能の値 (PE2) は症例により様々であったが、6例全体で見ると、3群間のPE2値には有意差を認めなかった。rGM-CSFで刺激した場合のPE2値とPHA-LCMでのPE2値には相関が見られた ($r=0.97, p<.025$)。またrG-CSFとPHA-LCMのPE2値間にも相関を認められた ($r=0.91, p<.05$)。この2つの回帰直線には有意差を認めなかった。

Patient no.	Primary culture with		
	rGM-CSF	rG-CSF	PHA-LCM
4	186 ± 12 ^a	ND ^b	216 ± 7
10	153 ± 18	200 ± 10 ^a	142 ± 5
11	117 ± 26	109 ± 9	116 ± 8
14	50 ± 2 ^a	46 ± 7	57 ± 3
19	64 ± 9 ^a	73 ± 9 ^a	35 ± 3
20	50 ± 2	16 ± 2	20 ± 5

表3 rGM-CSF, rG-CSFによるPE2値

a: コロニー数はPHA-LCMのそれと有意に異なる例を示す

b: rG-CSFでコロニーが形成されなかったためPE2を施行できず

rIL-3でコロニーを形成した8例で自己再生能を測定した。rIL-3で刺激した場合のPE₂値とPHA-LCMでのPE₂値の間には有意差を認めなかった。図3はrIL-3で刺激したPE₂とPHA-LCMでのPE₂値を図示したものであるが、両者間には直線関係が得られた($r=0.96$, $p<0.0005$)。

PE₂値は白血病性幹細胞の自己再生能を示すと考えられている。rGM-CSF, rG-CSF, およびrIL-3でコロニーを形成した細胞のPE₂がPHA-LCMを用いた場合のPE₂値とほぼ同様であったことは、これらのCSFは白血病細胞の自己再生能を変化させなかったことを示す。

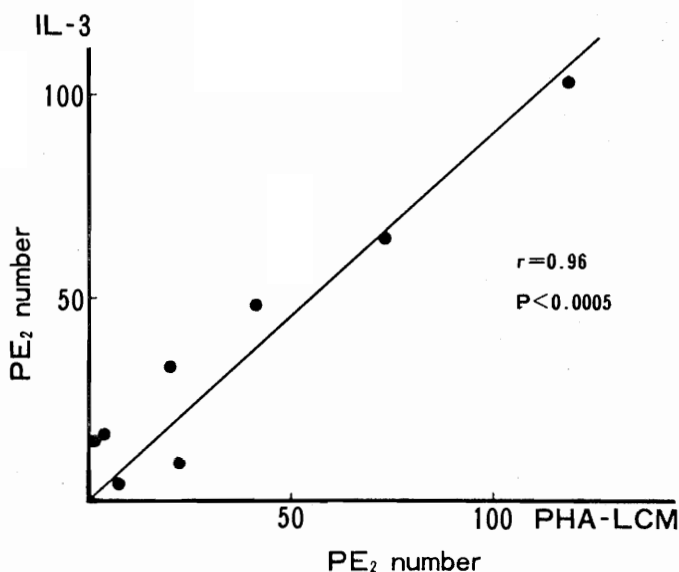


図3 rIL-3によるPE₂

3. 細胞表面形質および形態

表4は培養前の白血病細胞およびrGM-CSF, rG-CSF, PHA-LCMでコロニーを形成した細胞の細胞表面形質を示す。培養前の群、およびrGM-CSF, rG-CSF, PHA-LCM各群におけるコロニー形成細胞の表面形質には差を認めなかった。またrGM-CSF, rG-CSF各群とPHA-LCM群との間にも差を認めなかった。

rIL-3によるコロニー構成細胞の表面形質を6例で検討し、PHA-LCMでのそれを比較した。このうちの代表的な3例を図3に示す。培養前とrIL-3またはPHA-LCMで培養した表面形質、またrIL-3群とPHA-LCMとの間にも差を認めなかった。

Patient no.	MY4 (%)				MY7 (%)				OKM1 (%)				OKIa1 (%)			
	After culture ϵ				After culture ϵ				After culture ϵ				After culture ϵ			
	Before	rGM*	rG	PHA-LCM	Before	rGM	rG	PHA-LCM	Before	rGM	rG	PHA-LCM	Before	rGM	rG	PHA-LCM
9	20	18	13	15	27	25	25	39	8	10	9	10	96	58	67	78
10	3	4	4	11	91	76	62	59	5	3	3	7	92	79	77	76
11	22	37	14	45	90	91	99	90	8	33	14	23	87	94	83	99
13	24	39	25	39	61	79	80	89	34	15	10	18	12	23	23	30
14	32	8	15	11	72	86	66	62	16	18	28	14	94	89	72	74
17	68	68	ND	77	99	70	ND	72	85	64	ND	70	99	92	ND	92
19	40	20	13	21	82	59	64	58	44	21	13	20	70	80	78	80

* rGM, rGM-CSF; rG, rG-CSF.

表4 rGM-CSF, rG-CSFによるコロニー構成細胞の表面形質

rGM-CSF, rG-CSF, rIL-3で形成されたコロニー構成細胞の形態は、PHA-LCMで形成されたコロニー構成細胞のそれと同じ芽球様で、組織化学的な染色性も同様であり、分化の傾向は認められなかった。

これらの結果は、各種CSFが細胞表面形質および形態においても白血病細胞の分化を誘導させなかった事を示している。

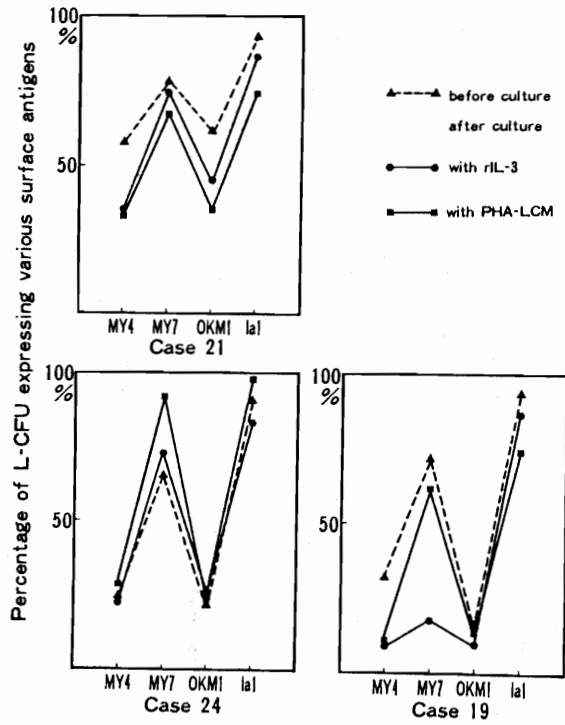


図4 rIL-3によるコロニー構成細胞の表面形質

4. CSF併用によるコロニー形成作用

表5に各種CSFを単独または併用した場合の白血病コロニー数を示す。rIL-3をrGM-CSFと共に添加した場合、9症例中4例ではrIL-3、rGM-CSFそれぞれ単独のコロニー数を合計した値とほぼ同様の値であった。合計した値より統計学的に有意に高い値を示したのは1例、有意に低値を示したのは4例

であった。rIL-3とrG-CSFを同時に添加した場合、9症例中4例ではrIL-3、rG-CSFそれぞれ単独のコロニー数を合計した値とほぼ同様の値であった。合計した値より有意に高い値を示したのは4例、有意に低値を示したのは1例であった。CSF無添加でコロニーを形成しなかった症例(No6-11)では、コロニー数は有意に高値を示す例が多かった。反対にCSF無添加でコロニーを形成した症例(No13-27)では、有意に低値を示す症例が多かった。この結果の再現性をみるために2症例で3回実験を繰り返したが、同様の結果を得た。症例13、24(M2, M5a)ではCSF併用によりコロニーの大きさはあきらかに増大した。

以上の結果をL-CFUのsubsetという点からみると、CSF同時添加によりコロニー数が各CSFのコロニー数とほぼ同じである場合には、各CSFに反応するL-CFUはことなつた集団であると考えられる。併用時のコロニー数がCSF単剤でのコロニー数の和よりも有意に高い場合には、おのおのCSFに反応するに反応するL-CFUの他に2剤のCSFではじめて刺激される第3のL-CFUsubsetが存在すると考えられる。さらに併用時にコロニー数がCSF単剤での和よりも有意に低い場合には、L-CFUsubsetはかなり重なっていると考えられる。またこの現象は、マウス骨髄細胞ではCSF receptorにdown modulationの存在することがWakerらによって報告されているので、同様の機構がヒト白血病細胞にもあるとすれば説明できるものと考えられる。さらにCSF無添加でコロニー形成が見られる例では、白血病細胞自身から分泌されるCSFが外からのCSFの作用を修飾している可能性も考えられる。正常骨髄前駆細胞ではrIL-3は他のCSFと相乗的に働くことが、Paquetteらによって報告されている。白血病細胞は非常に未熟な分化段階での突然変異によって生ずるという説があるが、そのような突然変異によって生じた細胞では、receptorの発現や各CSF receptorの相互作用も正常細胞とは異なっているのではないかと考えられる。

Case No.	Type	Number of colonies				Number of colonies/Evaluation ⁺		
		without CSF	PHA-LCM	IL-3	GM	G	IL-3+GM	IL-3+C
6	M2	0	562	6	42	0	24 ↓	21 ↑
7	M2	0	274	104	76	1	138 →	107 →
9	M2	0	288	1	19	3	18 →	18 ↑
11	M2	0	312	33	8	3	69 ↑	54 ↑
13	M2	17	60	36	48	14	57 ↓	48 ↑
20	M2	47	97	66	58	66	75 →	72 →
22	M4	28	68	25	53	34	31 ↓	19 →
24	M5a	51	208	56	79	60	75 →	75 →
27	M5b	117	278	139	184	154	168 ↓	139 ↓

IL-3, rIL-3; GM, GM-CSF; G, G-CSF.

表5 rIL-3とrGM-CSFまたはrG-CSF併用による作用

は併用時のコロニー数が単独CSFのコロニー数の合計より有意に高いことを示す、
 はコロニー数が合計よりも有意に低いことを示す、
 はコロニー数が合計と有意に変わらないことを示す

5. PHA-LCM中に含まれるコロニー形成刺激因子

表6は3つのCSFを同時添加した場合のコロニー数がPHA-LCMの何%であるかを示す。CSF無添加でコロニーの見られない群では(症例6-11)、3つのCSF同時添加でもコロニー数はPHA-LCMの9-30%であった。CSF無添加でコロニーが見られる群では(症例12-27)、症例13、20ではほぼ100%で、他の症例は約50%であり、全般にCSF無添加コロニーの見られない群に比べて高値を示した。

この結果はPHA-LCM中にはGM-CSF, G-CSF, IL-3以外の物質が存在し、とくに

Case No	Type	Number of colonies			IL-3+GM+G PHA-LCM (%)
		without CSF	IL-3+GM+G	PHA-LCM	
6	M2	0	50	562	9
7	M2	0	85	274	31
9	M2	0	30	288	10 (10)
11	M2	0	63	312	20
13	M2	17	70	60	117
20	M2	47	93	97	96
22	M4	28	24	68	35
24	M4	51	144	208	69 (71)
27	M4	117	132	278	48

表6 3剤のCSF同時添加およびPHA-LCMによるコロニー形成刺激活性の比較

CSF無添加でコロニーを形成しない群では、そのような物質が主なコロニー形成刺激作用を有すると考えられる。

PHA-LCM中に存在するコロニー形成刺激活性と各種CSFとの関係についてみるために、PHA-LCMをあらかじめ各CSF抗体を添加し、室温で30分間ふ置した後培養することにより、コロニー形成刺激活性の変化を調べた。図5は代表的な例(症例9)の結果を示す。PHA-LCMに抗IL-3抗体を加えるとコロニー数は僅かに減少し、その程度はIL-3によって生じたコロニー数とほぼ同程度であった。抗G-CSF抗体添加ではコロニー数はわずかに減少した。抗GM-CSF抗体を加えると、コロニー数は対照群の28%と著しく減少したが、一方GM-CSFによるコロニー形成率は9%であった。この抗GM-CSF抗体によるコロニー形成

刺激活性の差異について、これを説明するいくつかの可能性が考えられる。抗GM-CSF抗体の非特異的な毒性による可能性については、(1)正常骨髄赤芽球系前駆細胞の培養系に抗GM-CSF抗体を添加した場合、しない場合でコロニー数はほぼ同じであったこと、(2)白血病性コロニーでIL-3に抗GM-CSF抗体を添加した場合、しない場合でコロニー数はほぼ同様であったこと、からこの可能性は少ないと考えられる。第2の可能性としては抗GM-CSF抗体と交差反応を示す未知のCSFが存在する可能性、第3の可能性としては、GM-CSFの存在下でのみコロニー形成刺激活性を発現する未知のCSFが存在し、抗GM-CSF抗体を作用させると同時にその活性も低下する可能性が考えられる。

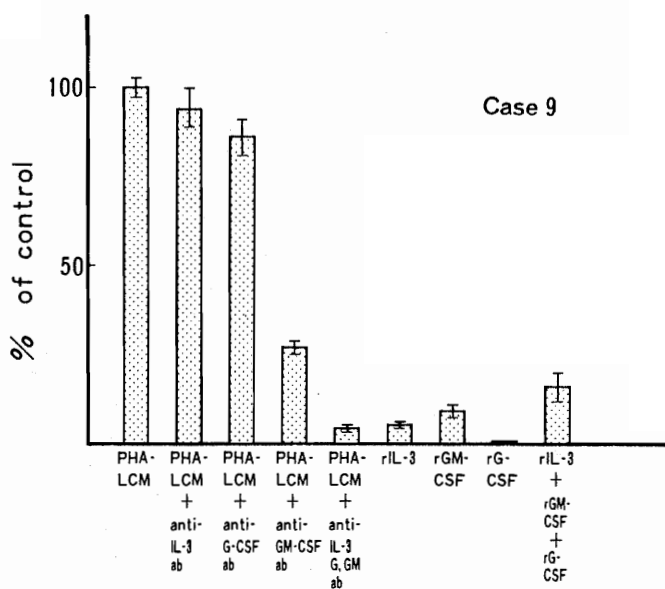


図5 各種CSF抗体によるPHA-LCMコロニー刺激活性の変化