

健康人ドナーにおけるrHuG-CSF投与後の
末梢血前駆／幹細胞の性状解析

ヒト血液成分幹細胞を含む末梢血前駆／幹細胞の評価と
同種末梢血幹細胞移植への展望

田中 徳平

健常人ドナーにおけるrHuG-CSF投与後の 末梢血前駆/幹細胞の性状解析

ヒト巨核球系前駆細胞を含めた末梢血前駆/幹細胞の評価
と同種末梢血幹細胞移植への展望

田 中 竜 平

序論

血液細胞は赤血球、白血球、血小板など形態も機能も異なる細胞群から構成される。成熟血液細胞の寿命は通常、個体寿命よりはるかに短いため、個体の恒常性を保つためには、これらの血液細胞は常に供給され続けなければならない。この造血システムは、造血幹細胞(hematopoietic stem cell, HSC)、すなわち、全ての種類の血液細胞を供給し(多分化能)、かつ自らが枯渇・疲弊してしまわない能力(自己複製能)を持つ細胞、の存在が証明されたことにより^{1) - 3)}、その分化・増殖機構の解析を通じて精力的に研究が進められている。

当初、これらHSCの性状解析はマウスを用いた*in vivo*の実験系で行われていたが、半固形培地中での*in vitro*コロニー形成法が開発されたことによって^{4) - 5)}、ヒトを含めた造血細胞の性状のみならず、造血細胞の分化・増殖に関わる因子(サイトカイン)の詳細な検討が可能となった。それに依れば、多能性幹細胞は分裂・増殖を繰り返す間に次第にその分化能を失い、oligopotentからmonopotentな前駆細胞へと分化して行くと考えられる^{6) - 9)}。そのプロセスへの増殖因子の関わりは、初期のmultipotentな前駆細胞には種々のサイトカインが重複性を持ちながらその生存・増殖を支持し、次第に系統特異的なサイトカインが最終的な機能的血球の成熟を支持しているものと理解されている^{10) - 11)}。例えば赤血球系や顆粒球系の前駆細胞の初期分化にはc-kit ligand(stem cell factor, SCF)、interleukin(IL)-3、granulocyte/macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)などが作用し、後期分化はそれぞれ、erythropoietin(Epo)、granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)が支持するものとされる^{12) - 13)}。

HSCについて、器官発生学として基礎的な検討が加えられる一方、組織適合性抗原の理解に伴い、同種移植としての造血幹細胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)の臨床応用が積極的になされ、白血病、再生不良性貧血、あるいは先天性免疫不全症など、HSCの異常と理解される一連の難治性疾患群に対する根治的治療法として、その臨床的有用性が確立された¹⁴⁾。

また、HSCの臨床応用のひとつとして、自家幹細胞移植(auto-HSCT)があげられる¹⁵⁾。通常の癌化学療法に於いては、造血組織に対する毒性(骨髄抑制)が用量制限因子

(dose-limiting toxicity, DLT)となり、癌細胞の根絶をねらった大量の抗癌剤投与は高度の骨髓抑制を来すため不可能であることが多い。しかも、実際の臨床では患者の癌細胞は抗癌剤に対し、種々の程度に耐性を有しており骨髓抑制をDLTとする用量設定では治癒をめざすことは困難である^{1,5)}。この骨髓抑制を救済し、骨髓抑制以外の毒性がDLTに達する程度の大量化学療法を可能とし、癌細胞の薬剤耐性を克服し癌患者を治癒に導くことを目的に、auto-HSCTは癌化学療法の進歩に大きく貢献している。

このように、HSCTは医療の現場に大きな福音をもたらし、今後も遺伝子治療など新しい治療戦略の開発に多大に寄与することが期待される¹⁴⁾。

現在のところHSCそのものは同定されておらず、従来のHSCTは専らHSCが存在する造血の場、即ち、骨髓の移植(bone marrow transplantation, BMT)をもってそれとしていた^{3,6)}。ところが動物では、古くから流血中に同種移植可能な造血幹細胞が存在すること^{1,7)}、¹⁸⁾が知られており、さらにヒト成人末梢血中に *in vitro* コロニー形成細胞(peripheral blood progenitor cell, PBPC)が存在すること^{1,9)}、またそれは癌化学療法後の造血回復期に著増する事が示されるにおよび^{2,10) - 2,11)}、それを成分採血装置を用いて大量に採取し、auto-HSCTとする試みが盛んに行われるようになった(peripheral blood progenitor cell transplantation, PBPCT)^{2,21)}。この方法は従来の自家骨髓採取と異なり採取時に患者に全身麻酔をかける必要が無いため患者の負担が軽く、また、移植後の造血能の回復がauto-BMTに比較して速やかであるため患者管理が容易であるという点からも注目され、PBPC併用大量化学療法はその有用性を世に認められるところとなった^{2,5)}。

PBPCは癌化学療法後の骨髓低形成期からの造血回復期だけではなくG-CSFやGM-CSFなどの造血因子投与後にも末梢血中に大量に動員されることが知られており、近年では癌化学療法後に造血因子を併用し、効率的なPBPC採取が行われている^{2,8)}、^{2,7)}。

このようにauto-PBPCTが盛んに行われている一方、最近では健常ドナーにG-CSFを投与し、末梢に動員された造血幹/前駆細胞を同種移植に応用する試みが報告されつつある^{2,8)}、^{3,1)}。しかし、この同種末梢血幹/前駆細胞移植(allo-PBPCT)の臨床応用への経過を観ると、健常ドナーのPBPCの性状やその末梢血中での動態などの基礎検討が十分

為されぬままに臨床応用が先行しているとの感が否めない。

HSCTでは移植前処置により患者自身の造血組織は全く荒廃する。したがって移植されたHSCが生着・増殖し末梢血球細胞が回復するまでの期間、患者は輸血に依存することとなる^{1,6)}。特に血小板輸血は頻回、大量を要することが多く、そこにかかる医療費や血液製剤使用に伴う潜在的な感染のリスクは今後の移植医療を考えるうえで大きな問題である。ところがPBPCでは造血能回復が速やかなため、移植後の血小板輸血回数が従来の骨髄移植に比べ少なくすみ、それらの問題をある程度解消しうることが報告されている^{2,4), 2,5)}。しかしながらPBPCにおいて、なぜ血小板造血の回復が速やかであるのか、という疑問に答える研究はなされていない^{2,3), 2,5)}。

先に述べたように*in vitro*コロニー形成法の開発、発展により、種々の造血前駆細胞系列について、その性状や増殖・分化に関わるサイトカインが詳細に検討されているが、巨核球-血小板系の増殖・分化機構は、特にヒトに於いて巨核球コロニー形成法の困難さから、理解が遅れている。

本研究では末梢血中コロニー形成細胞の内、従来その評価対象となっていた顆粒球/マクロファージ系および赤血球系前駆細胞に加え、巨核球系前駆細胞の定量的および定性的評価を行い、PBPC後の迅速な血小板回復の要因を検索することとした。

すなわち、予備検討にて、従来困難とされたヒト巨核球コロニー形成法の至適な培養条件を、マウスおよびヒト造血細胞を用いて決定した後、健康日本人ボランティアにG-CSFを投与した際の安全性の検討ならびに、先に決定した培養系を用いて、G-CSF投与期間中の、巨核球系前駆細胞を含めたPBPCレベルの変動を明らかにした。さらに動員されたPBPCの性状とG-CSFの投与量との関係を、末梢血中CD34陽性(CD34+)細胞とその亜分画、及びコロニー形成法による前駆細胞測定系を用いて詳細に検討した。

予備検討 巨核球系前駆細胞培養至適条件の探索

はじめに

従来、ヒト巨核球系前駆細胞のメチルセルロース半固形培地での培養法は比較的困難とされている。recombinant human G-CSF (rHuG-CSF)にて末梢血中へ動員されたPBPC中に含まれる巨核球系前駆細胞の評価を行うためにはヒト巨核球系前駆細胞のコロニー培養の至適条件を決定する必要がある。

近年の分子生物学の進歩により種々の増殖因子をコードする遺伝子がつぎつぎと同定され、さらにそれらのサイトカインが遺伝子組み換え体の単一タンパクとして得られ、その生物活性を詳細に検討することが可能となった³⁾⁻¹³⁾。これらのサイトカインのなかで、interleukin (IL)-3は種々の造血前駆細胞系列にcolony stimulating factor (CSF)として作用し、単独でもマウス巨核球コロニーを形成させる能力があると報告されている¹³⁾。また、*in vitro*および*in vivo*でマウス巨核球・血小板系造血の増幅作用が報告されているサイトカインとしてIL-6がある³³⁾⁻³⁵⁾。この予備検討ではこれら*in vitro*巨核球造血に有効な2つのサイトカインに加え、造血幹細胞の極めて未分化な段階から広範囲にわたってその増殖と分化に深く関わると考えられているc-kit ligand (stem cell factor, SCF)³⁶⁾³⁷⁾について、それぞれ単独あるいは組み合わせてコロニー培養を行い、それらの巨核球系造血前駆細胞に対する効果を検討した。

1) マウス巨核球系前駆細胞培養による検討

血小板は造血幹細胞が、巨核球系前駆細胞へと分化増殖し、巨核球を経て産生される^{4,1)}。in vitroでの巨核球造血測定系は、顆粒球あるいは赤血球系のそれに比べてその培養の特殊性、巨核球系前駆細胞の頻度の低さ、巨核球の同定の困難さなどから一般化しているとは言い難い。ここではまず、巨核球コロニー培養が比較的容易なマウス骨髓細胞を用いて、種々の増殖因子の持つin vitroでの巨核球系前駆細胞の増殖・分化に及ぼす効果を検討し、巨核球コロニー培養に至適な条件を探索した。

これまでの通常の培養系ではウシ胎仔血清(fetal bovine serum; FBS)が用いられるが、その場合には添加されたサイトカインと、FBS中に含まれる未知あるいは既知の生理活性物質との協同作用としての効果を観察している可能性が高いため^{4,2), 4,3)}、この検討では無血清培養系を用いた。また骨髓細胞を培養系に撒き込む際に夾雑するリンパ球やマクロファージもまた種々の生理活性物質を産生するので、骨髓細胞をリンパ系・骨髓球系の分化抗原陰性分画に純化して標的細胞として用いた^{4,3)}。

1 材料および方法

1. マウス骨髓細胞

10~15週令のBDF1マウスを用いた。尾静脈より体重あたり150 mg/kg 5-fluorouracil (5-FU、協和発酵)を投与し48時間後に屠殺し両大腿骨より採取した骨髓細胞、および正常(5-FU非処理)マウスから同様に採取した骨髓細胞を用いた。リンパ球やマクロファージなど夾雑する細胞の影響を可及的に除くため、骨髓細胞中の分化抗原陽性細胞を免疫磁気ビーズ法にて除去した。すなわちラット抗マウスL3T4、Lyt-2、B220、Gr-1、Ly-6C(Pharmingen社)およびMac-1(Serotec社)抗体のカクテル(各抗体1 µg/1x 10⁶ cell)を1次抗体として細胞を標識し、ヒツジ抗ラットIgGを固相化した磁気ビーズ(Dynabeads M-450, Dynal社)と反応させ(細胞:ビーズ=1:5)、磁気ビーズの結合した分化抗原陽性細胞をマグネットで吸着除去し、残った分化抗原陰性(lineage marker

negative; Lin⁻)細胞を回収した^{4,5,6)}。

2. コロニー培養

培養は無血清培養にて行った^{4,7)}。すなわち、5-FU処理および非処理マウス骨髄から得られたLin⁻細胞それぞれ2000、5000個を0.9%メチルセルロース(信越化学)、1%脱イオン化結晶凍結乾燥ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA, Sigma社)、 1×10^{-4} mol/L 2-メルカプトエタノール(Sigma社)、300 µg/mL ヒト鉄飽和トランスフェリン(Sigma社)、160 µg/mL 大豆レシチン(Sigma社)、96 µg/mL コレステロール(Nakarai Tesque社)及び後述のサイトカインをそれぞれ加えalpha-modification of Eagle's medium (α -MEM, Flow 社)にて1 mLとし、35mm浮遊培養用プラスチック培養皿(Nunc社)に分注した。培養は37°C、5%CO₂、湿度100%の条件で行った^{4,5,6)}。

用いたサイトカインは上述のごとくrecombinant murine IL-3 (DNAX)、recombinant human IL-6 (Ajinomoto社)、およびrecombinant rat SCF (AMGEN社)の3種類である。コロニー形成におけるIL-3単独での至適濃度は200 U/mLであった。IL-6は無血清条件下に於いて単独ではいかなるコロニーの形成も支持しないが、200 U/mL IL-3の共存下では用量依存性にコロニー形成率が増加し40~80 ng/mLで最大となった。無血清培養に於いて、SCFも単独ではコロニー形成支持能はほぼないが、200 U/mL IL-3の共存下では用量依存性にコロニー形成率が増加し50~100 ng/mLで最大となった。したがって以下の実験は、IL-3; 200 U/mL、IL-6; 80 ng/mL、SCF; 100 ng/mLの濃度を用いた。

3. コロニーの同定および分類

コロニーの種類の同定は倒立顕微鏡下の観察で既報の基準に従って行った^{4,8)}。巨核球コロニーは4個以上の巨核球から構成されるものとし^{4,9)}、それ以外のコロニーは50個以上の細胞集塊からなるものとして算定した。この検討に於けるコロニーの分類は、顆粒球・マクロファージ(GM)、巨核球(MK)、顆粒球・マクロファージ・巨核球(GMM)、肥満細胞(MAST)、芽球コロニー(BLAST)である。

今回用いた無血清培養系にて増殖する巨核球コロニーは図1に示すごとく、中型から大型、辺縁平滑で細胞輪郭のはっきりとした細胞（巨核球）から成り、その同定は倒立顕微鏡下に可能である。これらの巨核球は細胞内が無構造で、マクロファージとは明らかに異なる形態を示す。さらに巨核球の倒立顕微鏡下の同定を確認するため、当初個々の巨核球コロニーを3 μ LのEppendorf pipetを用いてメチルセルローズ培地より釣り上げ、細胞を二分しcytocentrifuge (Cytospin 2, Shandon社)でサイトスピン標本を2枚ずつ作成した。その1枚に齧歯類の巨核球特異的染色法であるアサチルコリンエステラーゼ(AChE)染色⁵⁽¹⁾を、他の1枚にMay-Grünwald-Giemsa染色を行い比較検討した。その結果、巨核球は倒立顕微鏡下に確実に同定可能と判断した。

4. 巨核球系前駆細胞に対する増殖および分化刺激能の評価

各サイトカインの持つ巨核球系前駆細胞に対する増殖刺激の指標としてa)単位骨髓細胞数から成長する巨核球系コロニー(MK + GMM)の数、b)個々のMKコロニーの構成細胞（巨核球）数、をそれぞれ倒立顕微鏡下に算定した。

一方、分化刺激能の指標としてふたつの要素、即ち、c)巨核球系コロニーを構成する個々の巨核球の大きさ、d)個々のMKコロニーを構成する巨核球のDNA量、をそれぞれ評価した⁵⁽²⁾。具体的には、c)についてはMKコロニーとGMMコロニーを釣り上げ、それぞれをプールしサイトスピン標本を作成しAChE染色陽性細胞の長径・短径の平均値を求めた。d)ではMKコロニーを釣り上げプールし、その一部をAChE染色にて巨核球以外の細胞の混入のないことを確認した後、残りを全てサイトスピン標本とした。メタノール固定後、4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI, Sigma社)にて蛍光染色しDNA量を測定した⁵⁽²⁾。すなわち標本をDAPI溶液(DAPI; 50 ng/mL, Tris; 10 mmol/L, EDTA-2Na; 10 mmol/L, NaCl; 100 mmol/L, 2-mercaptoethylamine hydrochloride)に30分間室温で暗所にて浸し、新しいDAPI溶液にて封入しカバーガラスの周囲をマニキュア用エナメルを塗り乾燥を防いだ。DNA量の測光は落射型顕微鏡測光装置(Olympus BHS-RFK, OSP-1)を用いて365 nmの励起光、450 nmの蛍光にて測定した。2Nのコントロールとして、MKコロニーと同一の培養系に生育したGMコロニー中の好中球を用いた。2Nコン

コントロールにおける変動係数は平均で12.7%であった。2Nコントロールの蛍光量を2Cとすると各ploidy (2^nN)の境界蛍光量は $2^{n-0.5}C \leq 2^nN < 2^{n+0.5}C$ で示され、この式に従い各培養条件ごとに各ploidyクラスの比率を算出した^{3,5)}。ploidyの平均値は幾何平均で求めた

34)

5. 統計解析

形成されたコロニー数の群間比較にはStudentのt検定を用いて評価した。MKコロニーの大きさおよびコロニーを構成する巨核球の大きさの群間比較にはWilcoxonの二標本順位和検定を用いた。異なる条件下 (IL-3単独, IL-3+IL-6, およびIL-3+SCF) で培養された巨核球のploidyの分布の比較には2群ごとに通常の χ^2 検定 (自由度 [df] = 4) で評価した後、有意差が認められれば、ploidyをスコア化して分布の型の違い (最高頻度のploidyの変化) を拡張Mantel検定 (df=1) を用いて検討した^{3,2)}。尚、64Nの巨核球は各群とも少数であったので、検定の近似を良くするため64Nと32Nをひとつのploidyクラスにまとめ解析した。統計的有意水準は0.05とした。

II 結果と考案

1. 巨核球系コロニー形成に対する増殖刺激効果

正常マウスから得たLin⁺骨髄細胞5000個から形成されるコロニー数をIL-3、IL-6、SCFの単独あるいは組み合わせで検討した (表1)。正常マウスの場合、IL-3のみでも巨核球系コロニーを含む種々のコロニーが形成されたが、SCF単独では僅かのGMとBLASTコロニーが形成されるのみであった。IL-6単独ではコロニーは全く形成されなかった。IL-3にIL-6を添加した場合、IL-3単独に比しMKコロニーのみの増加にとどまったが、IL-3にSCFを加えるとGMやMASTのみならずGMMコロニーがIL-3単独に比較し有意に増加し、MKコロニーはIL-3+IL-6群とほぼ同数形成された。

5-FU処理マウスLin⁺ 骨髄細胞を用いた場合にはIL-3に対するSCFの相乗効果はより明らかとなった(表2)。IL-3+SCFではIL-3単独およびIL-3+IL-6に比較しMK、GMM、GM、およびBLASTコロニーが有意に多く形成された。この培養条件ではMKおよびGMMコロニーが、IL-3+IL-6に比較し3~4倍多く形成された。

サイトカインの持つ巨核球系前駆細胞に対する増殖刺激の指標のひとつとして、正常マウスLin⁺骨髄細胞から各培養条件下に形成される個々のMKコロニーの構成細胞(巨核球)数を倒立顕微鏡下に算定したところ、IL-3にSCFを添加することにより他の二つの条件に比較し有意に構成細胞数が増加した(図2、いずれも $p < 0.0001$)。

以上の結果より、SCFは、IL-3存在下に生育する単能性巨核球前駆細胞(MKコロニー形成細胞)のみならず多能性巨核球系前駆細胞(GMMコロニー形成細胞)の増殖を刺激し、この効果は、5-FU処理マウス骨髄細胞にみられる未分化造血前駆細胞から、正常マウス骨髄で多く認められる比較的分化の進んだ前駆細胞まで、幅広い分化度の前駆細胞に及ぶものと考えられる。

2. 巨核球系コロニー形成に対する分化刺激効果

巨核球分化の指標として細胞の大きさとDNA量を評価した^{5,11)}。正常マウスLin⁺骨髄細胞から各条件下に形成されたMKおよびGMMコロニーを培養8日目にそれぞれ釣り上げブールし、サイトスピン標本を作製しAChE染色陽性細胞(巨核球)の大きさ、およびDAPI染色にてDNA量を計測した。

MKおよびGMMコロニーを構成する巨核球の大きさを図3および図4に示す。IL-3にIL-6を添加するとこれらの巨核球は明らかに大型化した(いずれも $p < 0.0001$)。ところがSCF添加では細胞の大きさに変化無くIL-3単独と同等であった。

次にそれぞれの培養条件で生育した巨核球のDNA量の測定結果を図5に示す。IL-3単独群とIL-3+SCF群を比較すると最頻値となるploidyは同じ(8N)であったが、IL-3+IL-6群でのそれは16Nへと移動した。ploidyの幾何平均はそれぞれ8.0N(IL-3単独)、8.7N(IL-3+SCF)、および13.0N(IL-3+IL-6)であった。

χ^2 検定による全体的な群間比較では、 χ^2 値がそれぞれ39.26(IL-3 vs. IL-3+SCF)、

113.63 (IL-3+SCF vs. IL-3+IL-6), 129.11 (IL-3 vs. IL-3+IL-6)となりいずれも有意差が認められた($p<0.001$)。漸増あるいは漸減の直線性を仮定したスコア (2N=1, 4N=2, 8N=3, 16N=4, 32N&64N=5)を用いた拡張Mantel検定では、2.299 ($p=0.682$, IL-3 vs. IL-3+SCF), 93.82 ($p<0.001$, IL-3+SCF vs. IL-3+IL-6), および126.09 ($p<0.001$, IL-3 vs. IL-3+IL-6)となり、IL-6添加群との群間比較において有意差が認められた。また、全体的な群間差に対する最頻値となるploidy classの変化の影響をみるため、 χ^2 検定による χ^2 値と拡張Mantel検定による χ^2 値の比をとると、82.6% (93.82/113.63, IL-3+SCF vs. IL-3+IL-6), 97.7% (126.09/129.11, IL-3 vs. IL-3+IL-6)であった。すなわち、IL-3+SCF群とIL-3+IL-6群、IL-3単独群とIL-3+IL-6群の全体的な差違のうち、それぞれ82.6%と97.7%が最頻値となるploidy classの変化によるものと考えられた。これに対し、IL-3単独群とIL-3+SCF群の比較に於いて、両端のploidy classに重みをつけたスコア (2N=1, 4N=0, 8N=0, 16N=0, 32N&64N=1)で拡張Mantel検定を用いて同様に検討したところ有意差が認められた (27.62, $p<0.0001$)。全体的な群間差に対する影響を調べると70.4% (27.65/39.26)であり、両群間の全体的な差違はIL-3+SCF群でのploidy分布が両端部分 (小さいploidyと大きいploidy) において、IL-3単独に比較し多かったためであると考えられた。従って、IL-3単独群とIL-3+SCF群との間に巨核球のDNA量に平均的には差がないと考えられた。

以上の結果から、IL-3を基本とした*in vitro*巨核球造血に於いて、SCFは主にその増殖を刺激し、一方、IL-6は分化を促進するものと考えられた。

これらの作用をさらに確認するためIL-3単独、IL-3+IL-6、IL-3+SCF、およびIL-3+IL-6+SCFの4条件下に形成される巨核球系コロニー数を同様に評価した。IL-3+IL-6+SCFのサイトカイン3種共存下ではIL-3+SCFと同等数の巨核球系コロニーが形成され (表3)、それらを構成する巨核球の大きさは、IL-3+IL-6の条件下に形成されるものよりも小型ではあるが、IL-3+SCFのそれより有意に大型で ($p<0.0001$, 図6)、倒立顕微鏡下での同定は比較的容易であった。

すなわち巨核球への分化能を有する造血前駆細胞を*in vitro*コロニー培養法にて評価する際、IL-3にIL-6及びSCFを加えた条件が有用であると考えられた。

2) ヒト巨核球系前駆細胞培養による検討

前項の結果をふまえ、ヒト巨核球系前駆細胞の*in vitro*での評価に至適な培養条件を検討した。ヒト巨核球系コロニー培養の特殊性として、マウス巨核球と異なり、ウシ胎仔血清(FBS)が添加されたメチルセルロース半固形培養系ではヒト巨核球の増殖が阻害されると報告されている点がある。この原因としてFBS中に含まれる血小板からの放出物質が関与しているとされる^{3,6)}。ここでは健康成人の供血者よりヘパリン加採血にて得られた乏血小板血漿(platelet-poor plasma, PPP)を用い、臍帯血単核球、臍帯血CD34⁺細胞および健康成人末梢血単核球を標的細胞とし至適な培養条件を検討した。

1 材料および方法

1. ヒト血漿の調整

供血の同意を得た健康成人5名より、早朝空腹時に200~400 mLをヘパリン加採血した。正中静脈より、ブタ腸管由来ヘパリン(Sigma社)を終濃度30 U/mLとなるように加えた採血バッグ(テルモ社)内へ、緩徐に採血した。このヘパリン加血を直ちに50 mL遠沈管(Falcon社)に移し、1000gで20分間遠沈し、上清を新しい遠沈管に移し再度、同様に遠沈したのち上清を0.45 μ mのフィルターで濾過し、乏血小板血漿(platelet-poor plasma, PPP)としてプールした。以後の実験はこのプールされたPPPを用いて行った。

2. 臍帯血および末梢血からの細胞調整

臍帯血(cord blood, CB)は正常経膈分娩の際に産婦4名および担当産婦人科医から同意を得たうえで採取した。新生児から切離された娩出後の胎盤・臍帯から怒張した臍帯静脈を穿刺しヘパリン加採血した。ヘパリン加末梢血(PB)10 mLも同様に、同意を得た健康成人より採血した。検体に10% vol. のSifica suspension (IBL社)を加え混和し、37°C

30分間incubateした後、Ficoll-Paque比重遠心法にて単核球(MNC)に分離し、

alpha-modification of Eagle's medium (α -MEM, ICN Biomedicals)にて3回洗浄しコロニー培養に供した。CBMNCについては既報の方法に従って免疫磁気ビーズ法(Dynaheads M-450 CD34, Dynal社)にてCD34+細胞に純化して用いた⁵⁷⁾。

3. ヒト巨核球系コロニー培養

上記の調整された細胞(CB CD34+細胞は500個、CBMNCは 5×10^4 個、PBMNCについては 1×10^5 個)を、25%ヒトPPPあるいは30% FBS (Hyclone社)、0.9%メチルセルロース(信越化学)、1%ウシ血清アルブミン(deionized bovine serum albumin: BSA, Sigma社)、 5×10^{-5} L-メカトエタノール(Sigma社)、に α -MEMに加え1 mLとし、35 mm浮遊培養用プラスチック培養皿(Nunc社)に分注した。サイトカインは20 ng/mL recombinant human interleukin(rhIL)-3 (Amgen社)、80 ng/mL rhIL-6 (Amgen社)、100 ng/mL rhSCF (Amgen社)および2 U/mL rhEpo(Kirin)を種々の組み合わせで添加して検討した。培養は37°C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂、湿度100%の条件で14日間行った。コロニーの培養系は総てtriplicateで行った。

4. コロニーの同定および分類

コロニーの種類の同定および分類は前述のマウスの場合とほぼ同様である。巨核球コロニーは4個以上の巨核球から構成されるものとしたが、その増殖能の多寡に従い、小型のmegakaryocyte colony-forming cell 由来コロニー(MK)と大型のmegakaryocyte burst-forming cell 由来コロニー(BMK)の2つのカテゴリーに分類した。即ち、MKコロニーは100個未満の巨核球の細胞集塊より成り、一方、BMKコロニーは100個以上の巨核球から成り、通常2つ以上のsub-colonyを形成するものである。また、他の細胞系統を含む混合型の巨核球コロニーについてはmegakaryocyte-containing mixed colony (MK-Mix)として分類した。

その他のコロニーについては50個以上の細胞集塊からなるものとし、既報の基準に

従い顆粒球・マクロファージ(GM)、赤血球バースト(B)、巨核球を含まない混合コロニー(Mix)、を分類、算定した^{2,8)}。

半固形培地中で増殖する巨核球形態の特徴はほぼマウスと同様で、中型から大型の辺縁が滑らかで輪郭がはっきりとした細胞で、その同定は倒立顕微鏡下に可能である。巨核球の倒立顕微鏡下での同定を確認するため、個々の巨核球コロニーを3 μ LのEppendorf pipetを用いてメチルセルロース培地より釣り上げ、cytocentrifuge (Cytospin 2, Shandon社)でサイトスピン標本を2枚ずつ作成し、その1枚に抗ヒト血小板糖蛋白IIb/IIIa抗体を用いた免疫アルカリホスファターゼ法 (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase technique, APAAP法) を、他の1枚にMay-Grünwald-Giemsa染色を行い比較検討した^{2,8)}。その結果、巨核球は倒立顕微鏡下に確実に同定可能と判断し、以降のコロニー算定に於いては、顆粒球マクロファージ系及び赤芽球系コロニーの同定と同様に、倒立顕微鏡下に行った。

I I 結果および考察

培養系に、血清あるいは血漿を添加した際の巨核球コロニー形成率の差についてCB CD34⁺細胞を標的として検討した。マウスでの結果をふまえ、培養に加えるサイトカインはIL-3+IL-6+SCFの三者で行った。FBS添加群ではPPP添加群に比較し、巨核球系コロニー形成はほぼ完全に抑制された。しかし、顆粒球系および赤芽球系コロニー形成率に関してはFBS添加群がPPP添加群に比較し有意に良好であった(表4)。すなわち、FBSは顆粒球系および赤芽球系コロニー形成に、PPPは巨核球系コロニー形成に、それぞれ適するものと考えられた。したがって以下の巨核球系コロニー形成に関する検討はPPPを添加した培養系で行った。

次に、ヒト巨核球系前駆細胞の増殖刺激としてもマウス同様、IL-3+IL-6+SCFの条件が優れているか否かを検討した。表5にCB CD34⁺細胞およびCBMNCを用いた実験結果を示す。無血清培養で行ったマウス骨髓細胞ほど顕著な差は無いが、IL-3にSCFが加わると巨核球系コロニーが増加し、CD34⁺細胞、MNCともに、IL-3単独に比較しIL-3+IL-6+SCFの条件では有意に多数の巨核球系コロニーを形成し、ヒトに於いても

IL-3+IL-6+SCFの条件が優れていると考えられた。

また、従来よりEpoが巨核球造血に促進的に働くことが報告されていることから^{2,9)}、IL-3+IL-6+SCFの条件にEpoの添加、非添加で巨核球系コロニーの形成能を比較した。標的細胞として、本研究の本来の対象であるPBMNCを用いた。定常状態の健康成人末梢血中には巨核球系前駆細胞は少ないものの*in vitro*にて巨核球系コロニー形成細胞として検出可能であり、さらにEpoを添加することにより巨核球系コロニー形成率が高まる傾向が認められた(表6)。

以上の結果より、ヒト巨核球系コロニー形成細胞の培養条件としてPPPを添加したメチルセルロース半固形培地にIL-3、IL-6、SCF、さらにEpoの4者を加えたものが優れており、巨核球系前駆細胞の含有頻度の低いと考えられる成人末梢血単核球を標的細胞としても、巨核球系コロニー形成細胞の検出は十分可能と考えられた。

(付記)

最近、巨核球-血小板造血にはほぼ特異的に作用する造血因子としてc-mpl ligand (Tpo) がクローニングされ、*in vivo*および*in vitro*におけるトロンボポエチンとしての作用がわが国と報告されている^{10,11,12)}。本研究を行った時点ではTpoは入手できず、ヒト巨核球系コロニー形成法におけるTpoの活性は検討し得なかった。今後、適正なヒト巨核球系前駆細胞の評価系を確立するためには、Tpoの活性について単独、あるいは他の既知のサイトカインとの組み合わせで検討し、その巨核球造血に於ける意義を明らかにする必要がある。

健常成人男子におけるrHuG-CSF投与時の 安全性ならびに末梢血造血前駆細胞動態の検討

はじめに

日本人健常男子を対象に、造血前駆細胞を末梢血へ動員(mobilization)させるため rHuG-CSFを皮下投与し、その安全性ならびにPBPCの動態を定性的、定量的に検討した。これによりrHuG-CSFにより mobilizeされたPBPCの性状を明らかとし、安全で至的なrHuG-CSFによるPBPC動員法を探索することを目的とした。

1 対象及び方法

1. 被験者

20～32歳の日本人健常男子、30名を1群10名の3群に分け、投与する rHuG-CSFを3段階に増量し、その耐容性ならびに、mobilizeされるPBPCの性状と rHuG-CSFの投与量との間の用量依存関係の有無を検討した。

また、同時期に東京大学医科学研究所附属病院で行われた同種骨髄移植症例の健常ドナー3名の採取骨髄を対照として、コロニー培養を行った。

すべての被験者より文書で同意を得た。

2. rHuG-CSF投与

rHuG-CSFは連続7日間、1日1回の皮下投与とした。投与量は安全性、耐用性を確認するため段階的に100 μ g/m²、200 μ g/m²さらに400 μ g/m²へのdose-escalationを行うこととし、各用量に被験者を順次10名ずつ割り付けた。総ての被験者に対し各投与の直前、

最終投与24時間後、及び投与終了1週間後に一般検血を行い、また血液生化学検査を初回投与直前、最終投与24時間後、及び投与終了1週間後に行った。

rHuG-CSF投与により白血球数が50,000/mm³以上に増加した場合、あるいは対症療法を行っても耐容不能な骨痛が持続する場合は当該用量を1/10に減量し、この減量にても白血球数が50,000/mm³以上、あるいは耐容不能な骨痛が持続する場合はrHuG-CSFの投与を中止することとした。ひとつの用量群において10例中4例以上にこれらの副作用が観察された場合には高用量群へ移行しないこととした。

3. コロニー形成細胞培養

総ての被験者からrHuG-CSF投与の初回、5回、6回、7回目投与直前、及び7回目投与の24時間後の末梢血10mlをヘパリン加採血した。検体はFicoll-Paque比重遠心法にて単核球(MNC)に分離し、 α -MEM (ICN Biomedicals社)にて3回洗浄した後、以下の2つの培養系でコロニー形成細胞培養を行った。対照とした骨髓細胞も同様に分離洗浄し、培養を行った。

(3-1) 顆粒球/マクロファージ系及び赤芽球系コロニー形成細胞培養

上記のMNC 1×10^5 ないし 1×10^4 個を0.9%メチルセルロース(信越化学)、30%ウシ胎児血清(Hyclone社)、1%ウシ血清アルブミン(Sigma社)、 5×10^{-5} L 2-メルカプトエタノール(Sigma社)、10 ng/mL GM-CSF (Amgen社)、20 ng/mL interleukin(IL)-3 (Amgen社)、80 ng/mL IL-6 (Amgen社)、100 ng stem cell factor (SCF, Amgen社)、2 U/mL erythropoietin (Epo, Kirin)、及び α -MEMに加え1 mLとし、35mm浮遊培養用プラスチック培養皿(Nunc社)に分注した。培養は37°C、5%CO₂、湿度100%の条件で16日間行った。^{48)・57)・58)}

(3-2) 巨核球系コロニー形成細胞培養

巨核球系コロニー形成細胞培養は予備検討で検討した方法に依った。即ち、(3-1)

で示した培養条件の内、30%FBSに換え、25%ヒト乏血小板血漿 (PPP)を用い、サイトカインは20 ng/mL IL-3 (Amgen社)、80 ng/mL IL-6 (Amgen社)、100 ng SCF (Amgen社)、2 U/mL Epo (Kirin)を用いた。培養は37°C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂、湿度100%の条件で14日間行った。コロニーの培養系は総てtriplicateで行った。

4. コロニーの同定および分類

顆粒球/マクロファージ系及び赤芽球系コロニーの同定は、上述の(3-1)の培養系に於いて倒立顕微鏡下に既報の基準に従って行った^{4,8)}。

(3-2)の培養系にて増殖する巨核球の倒立顕微鏡下に観察される形態は、CBを用いた場合と同様である。rHuG-CSFでmobilizeされたPBPCから増殖する巨核球の同定を、予備検討で既述したごとく、個々の巨核球コロニーのサイトスピン標本にMay-Grünwald-Giemsa染色と抗ヒト血小板糖蛋白IIb/IIIa抗体によるAPAAP法を行い、両者の比較検討にて確認した。その結果、巨核球は倒立顕微鏡下に確実に同定可能と判断し、以降のコロニー算定に於いては、顆粒球/マクロファージ系及び赤芽球系コロニーの同定と同様に、倒立顕微鏡下に行った。

巨核球コロニー形成細胞は4個以上の巨核球より成る細胞集塊形成する細胞と定義し、さらにその増殖能の多寡に従い、megakaryocyte colony-forming cell (CFU-MK)とmegakaryocyte burst-forming cell (BFU-MK)の2つのカテゴリーに分類した。即ち、CFU-MK由来コロニーは100個未満の巨核球の細胞集塊より成り、一方、BFU-MK由来コロニーは100個以上の巨核球から成り、通常2つ以上のsub-colonyを形成する。また、他の細胞系統を含む混合型の巨核球コロニー形成細胞についてはmegakaryocyte-containing mixed colony-forming cell (MK-Mix)として分類した。

その他のコロニー形成細胞については既報の基準に従いgranulocyte-macrophage colony-forming cell (CFU-GM)、erythroid burst-forming cell (BFU-E)、mixed colony-forming cell (CFU-Mix)、を分類、算定した^{4,8)}。

5. 表面マーカーの解析

コロニー培養と同様に、経時的に採血された末梢血を表面マーカーの解析にも供した。ヘパリン加末梢血にNH₄Cl溶液による溶血操作を行い、その後0.1%NaN₃含リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline, PBS)にて有核細胞濃度 $1 \times 10^6/\text{mL}$ に調整し免疫染色を行った。調整された細胞をfluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗CD34抗体 (HPCA2, Becton Dickinson社)と、以下の数種の抗体で二重染色しCD34陽性細胞の亜分画を検索した^{6,4)}。二重染色に用いた抗体はphycoerythrin (PE)標識抗CD33抗体 (My9, Coulter社)、PE標識抗CD38抗体 (Leu17, Becton Dickinson社)、PE標識抗HLA-DR抗体 (Becton Dickinson社)である。染色は4℃の暗所で行い、isotype controlとして、染色した抗体に応じてFITC標識マウスimmunoglobulin (Ig) G1、PE標識マウスIg G1或いはIgG2a (Becton Dickinson社)を用いた。測定はFACSsort flow cytometer (Becton Dickinson社)を用いて行い、何れの亜分画も総細胞数 1×10^6 個を取り込み解析した。

6. 統計解析

コロニー形成細胞、CD34陽性(CD34⁺)細胞及びその亜分画の血中レベルの変動はrHuG-CSF投与前の基礎値を1として、そこからの変動率で示した。得られたデータの分布はBox-whisker plotにて図示した^{6,5)}。群間比較はWilcoxon検定にて行い、危険率0.05未満をもって有意とした。CD34陽性細胞数とコロニー形成細胞数との相関はSpearmanの順位相関係数にて算出した。

II 結果

1. rHuG-CSF投与の安全性

本研究では日本人健常男子を対象とし、rHuG-CSFの投与量を100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$

および400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ の3段階とし、rHuG-CSFの連続7日間皮下投与を行った。投与量は安全性、耐容性を確認するため段階的にdose-escalationを行うこととし、各用量に被験者を順次10名ずつ割り付けた。100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 及び200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群に於いては全例耐容不能な副作用は観察されず、200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群の4例に於いて軽度の骨痛と筋肉痛が認められたのみであった。しかし、400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群では投与4日目までに全例が耐容不能な骨痛ないし筋肉痛を訴えrHuG-CSFの減量及び投与中止の措置がとられた。したがって本研究では、100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 及び200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群についてPBPC動態の検討を加えた。

末梢血所見では全例で速やかな末梢白血球数の増加が観察されたが、100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 及び200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群では白血球数50,000/ mm^3 以上に増加した例は無く、投与終了1週間後には、ほぼ正常域に復帰した(図7)。ヘモグロビン値や血小板数は変動しなかった。血液生化学検査所見では血清LDH値及びアルカリフォスファターゼ値の軽度上昇(Grade 1)が大部分の被験者で観察されたが全例とも可逆的変化であった。

2. 末梢血中コロニー形成細胞の変動

(2-1) 顆粒球/マクロファージ系及び赤芽球系コロニー形成細胞の変動

図8に、200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群における末梢血1 mL中に含まれるCFU-GM数の変動を、ボランティア10人について個人別、経時的に示す。図8からも明らかなように、末梢血中のコロニー形成細胞数の変動は個人差が著しいため、データの分布をより平易に表記するため以下の図表はBox-whisker plotにて示した。

図9に示すごとく、コロニー形成細胞数の統計学的な最大値は概ねDay 5 (rHuG-CSFを4回投与した24時間後)に観察された。しかし、200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群に於けるBFU-EとCFU-MixはDay 6に最大値が観察された。CFU-GMは従来、造血幹細胞の指標とされてきたが、200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群に於いてDay 5で中央値48倍(10~124倍)、Day 6で中央値40倍(10~148倍)の増加であった(図9 A)。同様に100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群に於けるCFU-GMは、Day 5で中央値26倍(14~58倍)、Day 6で中央値19倍(8~57倍)の増加であった(図9 A)。Day 6の末梢血中BFU-Eは200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群に於いて中央値29倍

(10~70倍)の増加であったが、100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群に於いては中央値11倍(4~50倍)程度の増加であった(図9 B, $p=0.026$)。一方、未分化なコロニー形成細胞のひとつとされるCFU-Mixについてみると^{4,8)}、100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群では大きな変動は見られなかったが、高用量の200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群に於いてはrHuG-CSF投与にて明瞭な増加が観察され、最大値としてDay 6に中央値48倍(25~93倍)の増加であった(図9 C, $p=0.006$)。これらの顆粒球/マクロファージ系及び赤芽球系コロニー形成細胞の合計(CFU-GM + BFU-E + CFU-Mix, Total-CFC)の変動についてみると200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群ではDay 5で中央値39倍(10~103倍)に増加し、Day 6でも中央値35倍(13~110倍)の増加率を保っていたが、100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群ではDay 5で中央値28倍(10~49倍)の増加にとどまり、Day 6では中央値11倍(7~51倍)へと増加率は減少した(図9 D)。200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群での投与前、Day 5およびDay 6に、末梢血1mL中に含まれる顆粒球/マクロファージ系及び赤芽球系コロニー形成細胞の実数を表7に示す。

(3-2) 巨核球系コロニー形成細胞の変動

従来、骨髓再構築能の指標として用いられてきた顆粒球/マクロファージ系及び赤芽球系コロニー形成細胞数の評価に加え、本研究では巨核球系コロニー形成細胞数についても検討を加えた。rHuG-CSF投与による健康人末梢血中の巨核球系コロニー形成細胞数の変動は顆粒球/マクロファージ系コロニー形成細胞数のそれに類似していた(図10)。通常、健康成人の定常状態に於ける末梢血中巨核球系コロニー形成細胞の頻度は非常に低い(表6)、rHuG-CSF投与により増殖能の高い巨核球コロニー形成細胞(BFU-MK)を含む種々の巨核球系コロニー形成細胞が末梢血中にmobilizeされた。表8に示すようにrHuG-CSF投与前には、僅かのCFU-MKとMK-Mixが認められるのみでBFU-MKは認められなかったが、rHuG-CSF 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与によりBFU-MKを含め巨核球系コロニー形成細胞の明らかなmobilizationが観察された。200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群のDay 5の末梢血単核球培養にて形成されたBFU-MKおよびMK-Mix由来コロニーの典型例を図11に示す。

また、骨髓と末梢血に於いて、同一細胞数(1×10^5 MNC)あたりの巨核球系前駆細胞

数を比較した(表9)。rHuG-CSF投与後Day 5の末梢血においては個人間での変動が大きいものの、骨髓に比較し有為にCFU-MKは大量に含まれ、その他の巨核球系前駆細胞に於いても、骨髓に比較し多量の巨核球系前駆細胞が含まれる傾向が認められた。

3. 末梢血中CD34+細胞とその亜分画の変動

末梢血中コロニー形成細胞数の経時的変動の検討に加え、rHuG-CSF投与に於ける末梢血中CD34+細胞とその亜分画の変動をフローサイトメトリーを用いて解析した。亜分画としてはCD34/CD38、CD34/CD33、およびCD34/HLA-DRの二重染色にて検討した。mobilizeされるCD34+細胞数は図12に示すように、顆粒球/マクロファージ系及び赤芽球系コロニー形成細胞数の和(Total-CFC)と良く相関した($r=0.801$)。末梢血中CD34+細胞数の変動はCFU-GM或いはTotal-CFCのそれと類似していた(図13A)。200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群で観察された末梢血中CD34+細胞の増加率は100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群のそれより有意に高かった(Day 5, $p=0.004$; Day 6, $p=0.002$)。CD34+細胞のうち、未分化とされる亜分画として、CD34+/CD38⁻、CD34+/CD33⁻、およびCD34+/HLA-DR⁻の分画を検索した^(6.61-6.8)。図13Bに示すようにCD34+/CD33⁻分画は200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群が100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群に比し高値をもって推移した(Day 6, $p=0.045$)。CD34+/HLA-DR⁻分画の変動は用量依存性がより明瞭であった。この分画は図13Cに示すように100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群ではほとんど変動を示さなかったが、200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群ではDay 6にピークをもって明らかなmobilizationが観察された(Day 5, $p=0.011$; Day 6, $p=0.045$)。今回の検討では、フローサイトメトリーに取り込んだ 1×10^6 個の細胞中には、ごく少数のCD34+/CD38⁻細胞しか存在せずrHuG-CSF投与に伴う変動の解析はできなかった。200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群に於いて末梢血1mL中に含まれるCD34+細胞とその亜分画の実数を表10に示す。

考案

古くから末梢流血中に造血再構築能^{(7) - (8)}、あるいは*in vitro*コロニー形成能を持つ造血幹/前駆細胞が少数ながら存在することは知られていた⁽⁹⁾。また、悪性腫瘍患者に抗癌剤を投与した後、骨髄抑制からの造血回復期に一致してそれらの造血細胞が末梢血中に著増することが報告されていた^{(20) - (21)}。さらに、rHuG-CSFの第I/II相試験が行われた際、末梢好中球数の用量依存的な増加が確認されると同時に、意外にも末梢血中の造血前駆細胞が増加することが観察された^{(6,9) - (20)}。これらの観察結果からrHuG-CSFでmobilizeされたPBPCを自家幹細胞移植に応用することが普及し^{(22) - (26)}、さらに最近ではallo-BMTに代わり、HLA一致同胞ドナーからrHuG-CSFでmobilizeし、成分採血装置で採取したPBPCを同種移植に臨床応用する試みが報告されつつある^{(27) - (31)}。本研究では、健康人にrHuG-CSFを投与した際にmobilizeされるPBPCの性状を検討し、安全で効率的なmobilizationの方法を探索し、同時に日本人に於けるallo-PBPC施行の可能性についても検討することが目的である。

100及び200 µg/m²のrHuG-CSFを連日7日間投与されたボランティア各々10名の末梢血には顆粒球/マクロファージ系及び赤芽球系コロニー形成細胞のみならず、極めて増殖能の高い巨核球系前駆細胞も大量にmobilizeされた(表7, 8)。連日7日間投与の投与では、これらの前駆細胞のピーク値は5日目～6日目に観察され、CD34+細胞のピークも同様の時期に観察された(図9, 10, 13)。PBPC全体のmobilizationの効率から見ると高用量である200 µg/m²投与が優れていた。造血前駆細胞は、コロニー形成能の面からはCFU-Mix、また表面マーカーからはCD34+/CD33-やCD34+/HLA-DR-分画が一般に未分化とされるが^{(4,8) - (6) - (8)}、いずれも200 µg/m²投与群が100 µg/m²投与群に比較しそれらの動員効率は良好であった(図9 C, 13)。

rHuG-CSFの用量差によるPBPCの質的な差はこれまで報告されておらず、また、rHuG-CSFが造血前駆細胞をどのようなメカニズムにより末梢へmobilizeするのも現在のところ不明である^(2,3)。高用量のrHuG-CSFが、より未分化な前駆細胞をmobilizeする機序は今後の検討を要する問題であるが、本研究の結果は、高用量のrHuG-CSF投与でmobilizeされる造血前駆細胞は低用量のそれに比べ大量であり、質的にはより未分化

なものを含むことを示唆すると考えられた。

従来のBMTに比較しPBPCの利点のひとつに造血能回復、特に血小板回復の速やかなことが挙げられる。これにより血小板輸血にかかる医療費や血液製剤を介する感染症のリスクを軽減することが可能である^{[4], [5]}。我々は仮説として、rHuG-CSFでmobilizeされたPBPC中に多数の巨核球系前駆細胞が含まれ、PBPC後の速やかな血小板回復の要因のひとつとなっているのではないかと予測したが、本研究の結果はその予測を裏付けるものであった。通常、健康成人の骨髓細胞を培養しても巨核球系前駆細胞の頻度とその増殖能は表9に示したごとく、今回検討したPBPCに較べ低値であることがほとんどであるが、rHuG-CSFの投与により、末梢血中にはDay 5をピークとして極めて増殖能の高い巨核球前駆細胞(BFU-MK)をはじめ多数の巨核球系前駆細胞が検出された(表8、図10)。一般にrHuG-CSFは*in vitro*で巨核球コロニーの成長を支持せず、*in vivo*投与でも血小板数の増加は観察されない^[7]。rHuG-CSFは巨核球・血小板系に特に作用を示さず、臨床的にはほぼ顆粒球系にのみ作用を示すにもかかわらず、巨核球系前駆細胞を含め前駆細胞レベルにはmobilizationという非特異的な作用を及ぼすということは、mobilizationのメカニズムを考える上で重要な点である。すなわち、rHuG-CSFを含めmobilizationの効果を有するサイトカインは造血幹/前駆細胞そのものに作用するのではなく、他の要因を介する間接的な作用で造血幹/前駆細胞を骨髓環境から末梢血中へmobilizeさせるものと考えるのが妥当であると思われる。

本研究ではrHuG-CSFの耐受性を検討するため、ボランティアの安全性を確認しつつrHuG-CSFの投与量を段階的に上昇させた。100および200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群では全例で連日7日間のrHuG-CSF投与が可能であったが、400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与群では全例で耐受不能な骨痛あるいは筋肉痛が認められた。欧米の報告では健康人に対し、400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ と同等ないしそれ以上の高用量でも継続投与可能であるとされている^{[9]~[11]}。この差違は何に起因するものか不明であるが、ひとつには欧米人と日本人とでrHuG-CSFに対する耐受性に差がある可能性がある。また、これら欧米からの報告は、実際に血液疾患に罹患し同種血液幹細胞移植を必要とする患者の血縁ドナーにrHuG-CSFを投与したものであり、本研究の対象となったボランティアドナーとはその動機付けに於いて根本的に差があると思われる。今後、非血縁者間の造血幹細胞移植としてPBPCを応用するとすると、そ

の耐容性については慎重な検討が必要と思われる。

本研究に於いては100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与に比較し、PBPCの質・量ともに200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与の優位性が明らかとなった。しかしながら200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投与が、長期の造血と免疫能を維持するに足る（同種骨髄移植に匹敵する）造血幹細胞をmobilizeさせるに十分であるか否かについては今後の検討が必要である。また、動物実験で示されているようにSCFなどの他のサイトカインをrHuG-CSFに併用することで、より有効なmobilizationが可能となるかもしれない^{7,8,9,10}。さらに健常人にrHuG-CSFを投与することによる副作用発現の可能性も長期の観察により検討される必要がある。

今後これらの問題を解決し、ドナーにとって安全で負担の少ない造血幹細胞提供を可能とし、患者にとって治療成績の向上につながる有効な造血幹細胞移植療法を確立するため、緻密にデザインされた臨床研究の遂行が望まれる。

まとめ

造血前駆/幹細胞および、その増殖と分化にかかわる因子に関する研究の進歩は、半固形培地でのコロニー培養法の開発・発展に拠るところが大きい。種々の細胞系統についてコロニー培養法が開発されてきたが、ヒト巨核球系のコロニー培養法は従来比較的困難とされ、前駆細胞の定量的評価法として満足すべきものではなかった。

本研究の予備検討として、マウスおよびヒト造血前駆細胞を用い、無血清あるいはヒト乏血小板血漿を添加した培養系で、巨核球系前駆細胞の増殖・分化に於ける種々のサイトカインの意義について解析した。巨核球系前駆細胞はIL-3が添加された培地に於いて、SCFを加えることによりその増殖が支持され、一方、IL-6を加えることによりその分化が促進された。これらの検討からヒト巨核球系前駆細胞の定量的評価法として、ヒト乏血小板血漿を添加した培養系に、増殖因子としてIL-3、IL-6、SCF、およびEpoを用いる培養系が優れていると考えられた。

最近、健康人にrHuG-CSFを投与し、末梢血中に動員された造血前駆/幹細胞を同種移植に用いる試みが報告されつつある。末梢血幹細胞移植の特徴のひとつとして、移植後の血小板回復の速やかさが挙げられるが、その要因についての研究はこれまでなされていない。

そこで、健康人ボランティアにrHuG-CSFを投与し、末梢血中に動員された造血前駆/幹細胞について、幹細胞移植片の評価として従来行われてきた顆粒球系および赤芽球系前駆細胞の定量的評価に加え、予備検討で確立した培養系を用い、巨核球系前駆細胞の定量的評価を行った。今回の検討では、健康人にrHuG-CSFを投与すると顆粒球系および赤芽球系前駆細胞のみならず、増殖能の高い巨核球系前駆細胞が末梢血に多数動員されることが判明し、末梢血幹細胞移植後の血小板回復が速やかである要因のひとつが明らかとなった。さらに、末梢血造血前駆/幹細胞の動員効率およびその未分化度と、rHuG-CSFの投与量との間に用量依存性が見いだされた。

今後、これらの末梢血幹細胞の性状解析をさらに進め、同種移植片として十分な増殖能と分化能を持つか否かについて詳細に検討を行う必要がある。

謝辞

稿を終えるにあたり、小児血液病学の臨床と造血幹細胞研究の楽しさを、常に深い洞察をもって御指導いただいた東京大学医科学研究所癌病態学研究部 中畑龍俊教授に心より感謝の意を表します。着任間もない中畑龍俊教授の当研究部にあって研究部員の支えである辻浩一郎助教授には造血幹細胞の生物学について真摯な討論を通して貴重なご助言を頂き、深謝いたします。また、研究と臨床の両立に協力を惜しまず、常に励まして頂いた、Xingwei Sui博士、村岡健司医師、吉田 真医師、海老原康博医師、そして研究部の実験環境を支えて頂いた田中郁子女史、青島恵美子女史に心から感謝の意を表します。

本研究の統計解析につき御指導いただいた東京大学医学部健康科学・看護学科、疫学・生物統計学教室 大橋靖雄教授に心よりお礼申し上げます。

最後に、私の医師として、また研究者としての生活を支えてくれた妻、直美と二人の娘、渚子と溪子に「ありがとう」と述べさせていただきます。

参考文献

- 1) Till JE, McCulloch EA: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Rad Res* 14: 213, 1961
- 2) Becker AJ, McCulloch EA, Till JE: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197: 452, 1963
- 3) Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE: The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 62: 327, 1963
- 4) Bradley TR, Metcalf D: The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med* 44: 287, 1966
- 5) Pluznik DH, Sachs L: The cloning normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66: 319, 1966
- 6) McCulloch EA: Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis. *Blood* 62: 1, 1983
- 7) Ogawa M, Porter PN, Nakahata T: Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells. *Blood* 61: 823, 1983
- 8) Metcalf D: The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 339: 27, 1989
- 9) Sachs L: The molecular control of blood cell development. *Science* 238: 1374, 1987
- 10) Metcalf D: Hematopoietic regulators: Redundancy or subtlety? *Blood* 82: 3515, 1993
- 11) Ogawa M: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2884, 1993
- 12) Krantz SB: Erythropoietin. *Blood* 77: 419, 1991

- 13) Metcalf D: Control of granulocytes and macrophages: Molecular, cellular, and clinical aspects. *Science* 254: 529, 1991
- 14) Forman SJ, Blume KG, Thomas ED: Bone marrow transplantation. Cambridge, MA, Blackwell, 1994
- 15) Armitage JO, Antman KH: High-dose cancer therapy; pharmacology, hematopoiesis, stem cells. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1992
- 16) Thomas ED, Storb R, Crichton RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CG: Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med* 292: 832, 1975
- 17) Goodman JW, Hodgson GS: Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 19: 702, 1962
- 18) Epstein RB, Graham TC, Buckner CD, Bryant J, Thomas ED: Allogeneic marrow engraftment by cross circulation in lethally irradiated dogs. *Blood* 28: 692, 1966
- 19) McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ: Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 171: 293, 1971
- 20) Richman CM, Weiner RS, Yankee RA: Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 47: 1031, 1976
- 21) To LB, Haylock N, Kimber RJ, Juttner CA: High levels of circulating haematopoietic stem cells in very early remission from acute non-lymphoblastic leukemia and their collection and cryopreservation. *Br J Haematol* 58: 399, 1984
- 22) Bell AJ, Hamblin TJ, Dacie DG: Circulating stem cell autografts. *Bone Marrow Transplant* 1: 103, 1986
- 23) Körbling M, Champlin R: Peripheral blood progenitor cell transplantation: A replacement for auto- or allografts. *Stem Cells* 14: 185, 1996

- 24) Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, McGrath KM, Morstyn G, Fox RM: Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet* 339: 640, 1992
- 25) Chao NJ, Schriber LR, Grimes K, Long GD, Negrin RS, Raimondi CM, Horning SJ, Brown SL, Miller L, Blume KG: Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 81: 2031, 1993
- 26) Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, Lilleby K, Longin K, Rowley S, Clarke E, Clift R, Hansen J, Shields T, Storb R, Weaver C, Weiden P, Buckner CD: Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 81: 3158, 1993
- 27) Bishop MR, Anderson JR, Jackson JD, Bierman PJ, Reed EC, Vose JM, Armitage JO, Warkentin PI, Kessinger A: High-dose therapy and peripheral blood progenitor cell transplantation: Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the autograft. *Blood* 83: 610, 1994
- 28) Russell NH, Hunter A, Rogers S, Hanley J, Anderson D: Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. *Lancet* 341: 1482, 1993
- 29) Bensinger WJ, Weaver CH, Appelbaum FR, Rowley S, Demirer T, Sanders J, Storb R, Buckner CD: Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 85: 1655, 1995
- 30) Schmitz N, Dreger P, Suttorp M, Rohwedder EB, Haferlach T, Löffler H, Hunter A, Russell NH: Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (Granulocyte colony-stimulating factor). *Blood*, 85: 1666, 1995

31) Körbling M, Przepiorka D, Huh YO, Engel H, Van Besien K, Giralt S, Andersson B, Kleine HD, Seong D, Deisseroth AB, Andreeff M, Champlin R: Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: Potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood* 85: 1659, 1995

32) Ihle JN, Keller J, Oroszlan S, Henderson LE, Copeland TD, Fitch F, Prystowsky MB, Goldwasser E, Schrader JW, Palaszynski E, Dy M, Lebel B: Biologic properties of homogeneous interleukin 3: 1. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P cell-stimulating activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J Immunol* 131: 282, 1983

33) Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA: Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5953, 1989

34) Koike K, Nakahata T, Kikuchi T, Takagi M, Ishiguro A, Tsuji K, Naganuma K, Okano A, Akiyama Y, Akabane T: Interleukin-6 enhances murine megakaryocytopoiesis in serum-free culture. *Blood* 75: 2286, 1990

35) Asano S, Okano A, Ozawa K, Nakahata T, Ishibashi T, Koike K, Kimura H, Tanioka Y, Shibuya A, Hirano T, Kishimoto T, Takaku F, Akiyama Y: In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: Stimulated production of platelets. *Blood* 75: 1602, 1990

36) Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA, Karkare SB, Sachdev RK, Yuschenkoff VN, Birkett NC, Williams LR, Satyagal VN, Tung W, Bosselman RA, Mendiaz EA, Langley KE: Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from Buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 63: 195, 1990

37) Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, March CJ, Boswell HS, Gimpel SD, Cosman D, Williams DE: Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 63: 235, 1990

- 38) De Vries P, Basel KA, Eisenman JR, Alpert AR, Williams DE: The effect of recombinant mast cell growth factor on purified murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 173: 1205, 1991
- 39) Migliaccio G, Migliaccio AR, Valinsky J, Langley K, Zsebo K, Visser JWM, Adamson JW: Stem cell factor induces proliferation and differentiation of highly enriched murine hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7420, 1991
- 40) Tsuji K, Lyman SD, Sudo T, Clark SC, Ogawa M: Enhancement of murine hematopoiesis by synergistic interactions between steel factor (ligand for c-kit), interleukin-11, and other early acting factors in culture. *Blood* 79: 2855, 1992
- 41) Williams N: Megakaryocyte growth factors, in Dexter TM, Garland JM, Testa NG (eds): *Colony-stimulating factors: Molecular and cellular biology*, New York, NY, Marcel Dekker, 1990
- 42) Tsukada J, Misago M, Sato T, Ogawa R, Ota T, Oda S, Morimoto I, Chiba S, Eto S: Interaction between recombinant human erythropoietin and serum factor(s) on murine megakaryocyte colony formation. *Blood* 80: 37, 1992
- 43) Shiohara M, Koike K, Kubo T, Amano Y, Takagi M, Muraoka K, Nakao J, Nakahata T, Komiyama A: Possible role of stem cell factor as a serum factor: Monoclonal anti-c-kit antibody abrogates interleukin-6-dependent colony growth in serum-containing culture. *Exp Hematol* 21: 907, 1993
- 44) Okada S, Suda T, Suda J, Tokuyama N, Nagayoshi K, Miura Y, Nakauchi H: Effect of interleukin 3, interleukin 6, and granulocyte colony-stimulating factor on sorted murine splenic progenitor cells. *Exp Hematol* 19: 42, 1991
- 45) Tanaka R, Koike K, Imai T, Shiohara M, Kubo T, Amano Y, Komiyama A, Nakahata T: Stem cell factor enhances proliferation, but not maturation, of murine megakaryocytic progenitors in serum-free culture. *Blood* 80: 1743, 1992
- 46) Tanaka R, Katayama N, Ohishi K, Mahmud N, Itoh R, Tanaka Y, Komada Y, Minami N, Sakurai M, Shirakawa S, Shiku H: Accelerated cell-cycling of hematopoietic progenitor cells by growth factors. *Blood* 86: 73, 1995

- 47) Iscove NN, Guilbert LJ, Weyman C: Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. *Exp Cell Res* 126: 121, 1980
- 48) Nakahata T, Ogawa M: Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3843, 1982
- 49) Nakeff A, D-McQueen S: In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: Colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). *Proc Soc Exp Biol Med* 151: 587, 1976
- 50) Jackson CW: Cholinesterase as a possible marker for early cells of the megakaryocytic series. *Blood* 42: 413, 1973
- 51) Harker LA: Kinetics of thrombopoiesis. *J Clin Invest* 47: 458, 1968
- 52) Hamada S, Fujita S: DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry* 79: 219, 1983
- 53) Paulus JM, Penington DG, Denoel CK, Jackson CW, Odell TT Jr: Determination of megakaryocyte ploidy in human diseases, in Paulus JM (ed): *Platelet kinetics*. Amsterdam, The Netherlands, North-Holland Publishing, 1971, p 330
- 54) Arriaga M, South K, Cohen JL, Mazur EM: Interrelationship between mitosis and endomitosis in cultures of human megakaryocyte progenitor cells. *Blood* 69: 486, 1987
- 55) Koch GG, Edwards S: Clinical efficacy trials with categorical data, in Peace KE (ed): *Biopharmaceutical statistics for drug development*. New York, NY, Dekker, 1988, p 408

- 56) Kimura H, Burstein SA, Thorning D, Powell JS, Harker LA, Fialkow PJ, Adamson JW: Human megakaryocytic progenitors (CFU-M) assayed in methylcellulose: Physical characteristics and requirements for growth. *J Cell Physiol* 118: 87, 1984
- 57) Sui X, Tsuji K, Tajima S, Tanaka R, Muraoka K, Ebihara Y, Ikebuchi K, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Nakahata T: Erythropoietin-independent erythrocyte production: Signals through gp130 and c-Kit dramatically promote erythropoiesis from human CD34⁺ cells. *J Exp Med* 183: 837, 1996
- 58) Okumura N, Tsuji K, Nakahata T: Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. *Blood* 80: 642, 1992
- 59) Nishi N, Nakahata T, Koike K, Takagi M, Naganuma K, Akabane T: Induction of mixed erythroid-megakaryocyte colonies and bipotential blast cell colonies by recombinant human erythropoietin in serum-free culture. *Blood* 76: 1330, 1990
- 60) de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang W-J, Oles KJ, Hultgren B, Solberg LA Jr, Goeddel DV, Eaton DL: Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369: 533, 1994
- 61) Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li Y-S, Lu HS, Martin F, Chang M-S, Samal B, Nichol JL, Swift S, Johnson MJ, Hsu R-Y, Parker VP, Suggs S, Skrine JD, Merewether LA, Clogston C, Hsu E, Hokom MM, Hornkohl A, Choi E, Pangelinan M, Sun Y, Mar V, McNinch J, Simonet L, Jacobsen F, Xie C, Shutter J, Chute H, Basu R, Selander L, Trollinger D, Sieu L, Padilla D, Trail G, Elliott G, Izumi R, Covey T, Crouse A, Garcia A, Xu W, Castillo JD, Biron J, Cole M, HU C-T, Pacifici R, Ponting I, Saris C, Wen D, Yung YP, Lin H, Bosselman RA: Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 77: 1117, 1994

- 62) Lok Si, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkard D, Ching AFT, Mathewes SL, Bailei MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC: Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 369: 565, 1994
- 63) Kaushansky K: Thrombopoietin: The primary regulator of platelet production. *Blood* 86: 419, 1995
- 64) Sun T: Color atlas/text of flow cytometric analysis of hematological neoplasms. Tokyo, Igaku-Shoin, 1993
- 65) Tukey JW: Box-and-whisker plots, in *Exploratory data analysis*, Massachusetts, Addison-Wesley, 1977, p 39
- 66) Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID: Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med* 169: 1721, 1989
- 67) Terstappen LWMM, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR: Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood* 77: 1218, 1991
- 68) Verfaillie C, Blakolmer K, McGlave P: Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med* 172: 509, 1990
- 69) Gabilove JL, Jakubowski A, Fain K, Grous J, Scher H, Stenberg C, Yagoda A, Clarkson B, Bonilla MA, Oettgen HF, Alton K, Boone T, Altrock B, Welte K, Souza L: Phase I study of granulocyte colony-stimulating factor in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Clin Invest* 82: 1454, 1988

- 70) Dührsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D: Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 72: 2074, 1988
- 71) Lieschke GJ, Burgess AW: Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (first & second of two parts): *N Engl J Med* 327: 28 & 99, 1992
- 72) de Revel T, Appelbaum FR, Storb R, Schuening F, Nash R, Deeg J, McNiece I, Andrews R, Graham T: Effect of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor, alone and in combination, on the mobilization of peripheral blood cells that engraft lethally irradiated dogs. *Blood* 83: 3795, 1994
- 73) Yan X-Q, Briddell R, Hartley C, Stoney G, Samal B, McNiece I: Mobilization of long-term hematopoietic reconstituting cells in mice by the combination of stem cell factor plus granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 84: 795, 1994

表 1 Colony Formation of Lin⁻ Normal Marrow Cells in Serum-Free Culture

Factors	GM	MK	GMM	MAST	BLAST	Total
IL-3	73±12	2±1	5±2	2±1	2±2	84±13
IL-6	0	0	0	0	0	0
SCF	6±2	0	0	0	2±1	8±2
IL-3+IL-6	76±8	5±2*	6±3	1±1	2±1	90±11
IL-3+SCF	103±13*†	4±2	9±2*	5±2*†	2±1	123±11*†

Values are mean ± SD of quadruplicate plates containing 5×10^3 lin⁻ bone marrow cells of normal mice from four independent experiments

IL-3, 200 U/mL; IL-6, 80 ng/mL; SCF, 100 ng/mL

Significantly different from IL-3 alone (* p<0.05)

Significantly different from IL-3+IL-6 (†p<0.05)

表 2 Colony Formation of Lin⁻ Post 5-FU Marrow Cells in Serum-Free Culture

Factors	GM	MK	GMM	MAST	BLAST	Total
IL-3	2±1	0±1	1±1	0	2±1	5±3
IL-6	0	0	0	0	0	0
SCF	0	0	0	0	2±1	2±1
IL-3+IL-6	11±4*	4±2*	10±2*	0	17±6*	42±2*
IL-3+SCF	31±11*†	12±2*†	46±11*†	0	12±8*	101±12*†

Values are mean ± SD of quadruplicate plates containing 2×10^3 lin⁻ bone marrow cells of 5-FU-treated mice from three independent experiments.

IL-3, 200 U/ml; IL-6, 80 ng/ml; SCF, 100 ng/ml

Significantly different from IL-3 alone (* p<0.05).

Significantly different from IL-3+IL-6 († p<0.05).

表 3 Colony Formation of Lin⁻ Post 5-FU Marrow Cells in Serum-Free Culture

Factors	GM	MK	GMM	MAST	BLAST	Total
IL-3	2±1	1±1	2±1	0	3±2	8±2
IL-3+IL-6	15±4	5±2	12±3	0	11±3	43±3
IL-3+SCF	42±15 *	12±3*	34±11†	0	5±0†	93±5†
IL-3+IL-6+SCF	57±11	10±4	32±2	0	2±2	101±4

Values are mean ± SD of quadruplicate plates containing 2×10^3 lin⁻ bone marrow cells of 5-FU-treated mice. IL-3, 200 U/mL; IL-6, 80 ng/mL; SCF, 100 ng/mL. The colony numbers detected in IL-3+SCF are significantly different from IL-3+IL-6 (*p<0.05, †p<0.01). There are no significant difference in the numbers of MK or GMM colonies between IL-3+SCF and IL-3+IL-6+SCF.

表 4

Colony Formation from CB CD34⁺ Cells: Comparing the Effect of PPP with FCS

Colony Type	Experiment 1		Experiment 2	
	PPP	FCS	PPP	FCS
Megakaryocytic colony	14±3 *	2±1	30±5 *	1±2
(MK	4±1	0±0	5±2
	BMK	1±2	0±0	2±1
	MK-Mix	9±3	2±1	22±5
				1±2
GM	45±18†	100±12	49±3†	181±18
B	35±8	26±6	9±3	11±8
Mix	25±6	11±2	14±3	13±8
Total colony	120±17	139±10	101±2 *	207±6

Values are mean ± SD of triplicate plates containing 500 CB CD34⁺ cells.
 IL-3, 20 ng/mL; IL-6, 80 ng/mL; SCF, 100 ng/mL.
 Significantly different from the culture supplemented with FCS (* p<0.002, † p<0.01)

表 5

Megakaryocytic Colony Formation from CB Cells:
Comparing Cytokine Combinations

Cytokine	500 CD34 ⁺ cells	5x10 ⁴ MNC
IL3	5±2	29±2
IL3+IL6	7±0	33±2
IL3+SCF	10±2 †	34±9
IL3+IL6+SCF	12±3 *	38±4 †

Values are mean ± SD of triplicate plates containing designated numbers of CB CD34⁺ cells or CB MNC.

Significantly different from IL-3 alone and IL-3+IL-6 (*p<0.05).

Significantly different from IL-3 alone (†p<0.05).

Table 6 Colony Formation from PBMC:
Effect of Epo on the Growth of Megakaryocytic Colony

Colony Type	Experiment 1		Experiment 2	
	-Epo	+Epo	-Epo	+Epo
Megakaryocytic colony	0±1	4±0 *	2±2	4±3
(MK	0±0	1±1	2±2
	BMK	0±0	0±0	0±0
	MK-Mix	0±1	3±1 †	0±1
GM	53±7	41±14	20±8	9±3
B	7±3	20±8	16±2	44±12 †
Mix	5±1	7±1	2±2	6±2
Total colony	65±8	72±14	41±3	64±19

Values are mean ± SD of triplicate plates containing 1×10^5 PB MNC.
Significantly different from the culture without Epo (* $p < 0.001$, † $p < 0.02$).

表 7 Myeloid and erythroid progenitor cells in the peripheral blood
from rHuG-CSF-primed healthy volunteers

Progenitor cells	Pre- treatment	Day 5	Day 6
CFU-GM	116 (27-307)	4055 (669-16174)	4390 (1887-16469)
BFU-E	103 (35-300)	2726 (794-8628)	3246 (1579-8746)
CFU-Mix	3 (0-13)	293 (65- 703)	236 (0-826)
Total CFC	264 (71-597)	6713 (1837-25403)	7712 (4292-21994)

The numbers of progenitor cells in steady state and after mobilization by the treatment with rHuG-CSF at 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ on day 5 and day6 are shown as the median (and range) per ml of the peripheral blood from normal volunteers.

表 8 Megakaryocytic progenitor cells in the peripheral blood
from rHuG-CSF-primed healthy volunteers

Progenitor cells	Pre- treatment	Day 5	Day 6
CFU-MK	0 (0-11)	151 (14-252)	122 (19-844)
BFU-MK	0 (0-0)	58 (0-501)	5 (0-136)
MK-Mix	0 (0-8)	181 (42- 517)	20 (0-392)

The numbers of megakaryocytic progenitor cells in steady state and after mobilization by the treatment with rHuG-CSF at 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ on day 5 and day6 are shown as the median (and range) per ml of the peripheral blood from normal volunteers.

表 9 Megakaryocytic Colony Formation from Mobilized PBPC
and Steady-state BM cells

	No. of progenitors in 1×10^5 MNC			
	BFU-MK	CFU-MK	MK-Mix	Total
Mobilized PB (n=10)	6±7	6±3*	9±8	21±17
Steady-state BM (n=3)	1±1	1±1	4±6	6±7

Values are mean±SD of progenitors in mobilized PB on Day 5 in 200- μ g/m² dose level and steady state bone marrow cells from sibling donors for allogeneic BMT.

Significantly different from steady state BM (*p<0.05).

表10 CD34⁺ cells and their subpopulations in the peripheral blood
from rHuG-CSF-primed healthy volunteers

Progenitor cells	Pre- treatment	Day 5	Day 6
CD34 ⁺	1150 (710-2200)	14815 (10120-99130)	17115 (8800-80750)
CD34 ⁺ /CD33 ⁻	66 (15-215)	569 (106-11212)	801 (107-10449)
CD34 ⁺ /HLA-DR ⁻	24 (6-81)	256 (26- 882)	241 (0-1049)

The numbers of CD34⁺ cells and their subpopulations in steady state and after mobilization by the treatment with rHuG-CSF at 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ on day 5 and day6 are shown as the median (and range) per ml of the peripheral blood from normal volunteers.

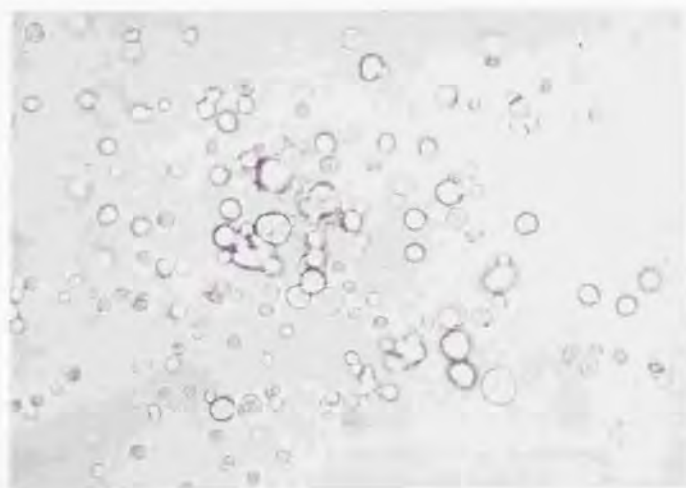


图 1

In situ appearance of a representative MK colony derived from post-5-FU Lin⁻ mice marrow cells. The colony is supported by IL-3+IL-6 in serum-free condition. These megakaryocytes have nongranular, translucent cytoplasm and a highly refractile cell membrane.

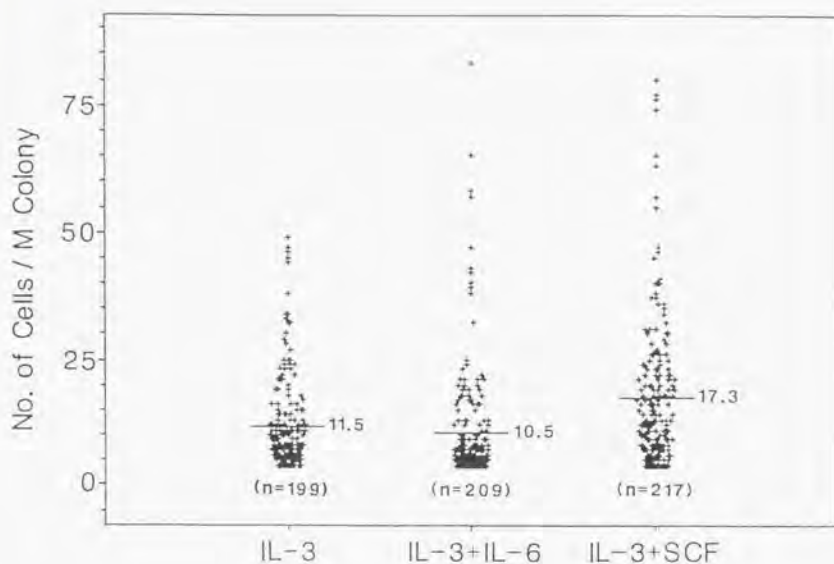


图 2

Effect of IL-3, IL-3 + IL-6, and IL-3 + SCF on megakaryocyte colony size. The horizontal bars and subscribed figures in each group represent the mean number of constituent cells in individual MK colonies. The numbers of analyzed MK colonies are presented in parentheses. MK colonies supported by IL-3 + IL-6 contained a significantly larger number of megakaryocytes than those supported by IL-3 alone or IL-3 + IL-6 ($p < 0.0001$, for both).

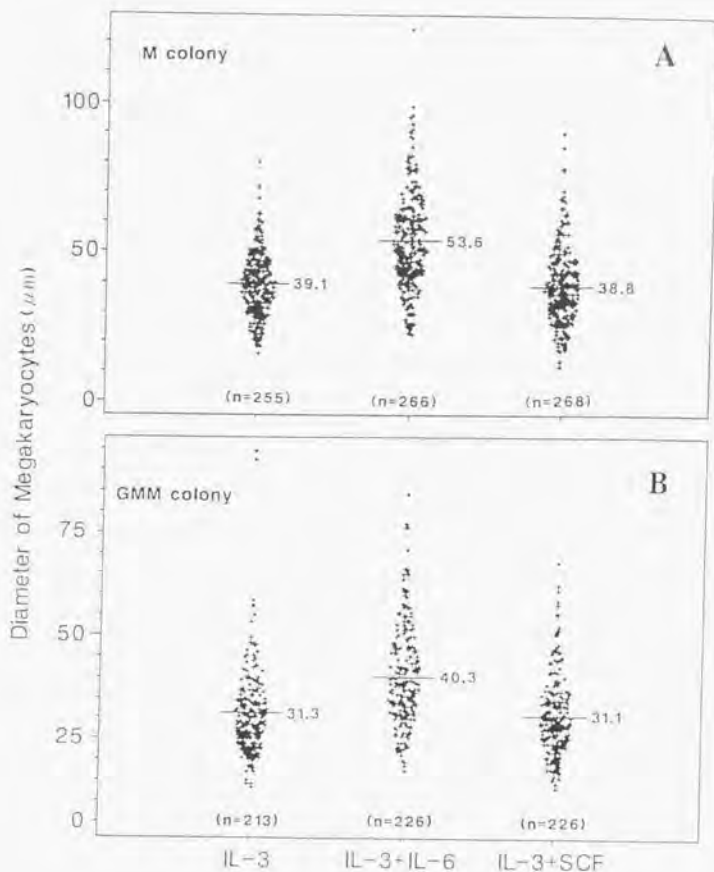


图 3

Effect of IL-3, IL-3 + IL-6, and IL-3 + SCF on megakaryocyte size in (A) MK and (B) GMM colonies. The horizontal bars and subscribed figures in each group represent the mean perpendicular diameters of megakaryocytes in individual colonies. The numbers of measured megakaryocytes are presented in parentheses. The megakaryocytes from MK and GMM colonies supported by IL-3 + IL-6 were significantly larger than those supported by IL-3 alone or IL-3 + SCF ($p < 0.0001$, for both).

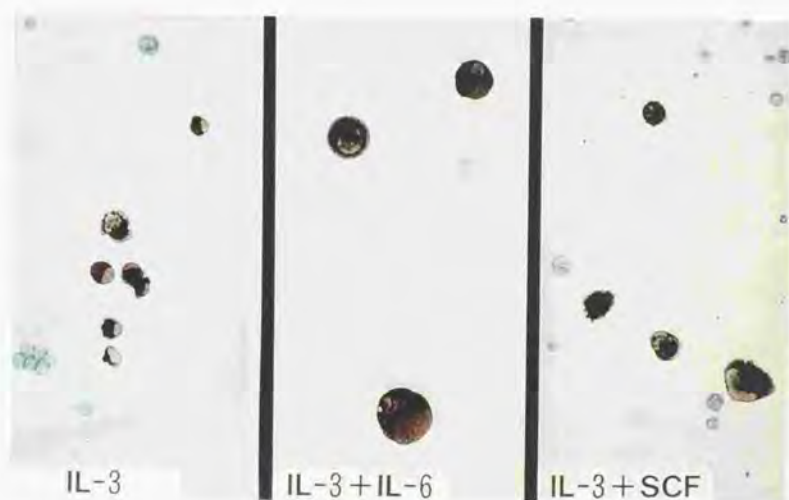


图 4

Megakaryocytes in GMM colonies supported by IL-3, IL-3 + IL-6, and IL-3 + SCF. They were stained with AChE staining. The dark brown cells are AChE-positive megakaryocytes.

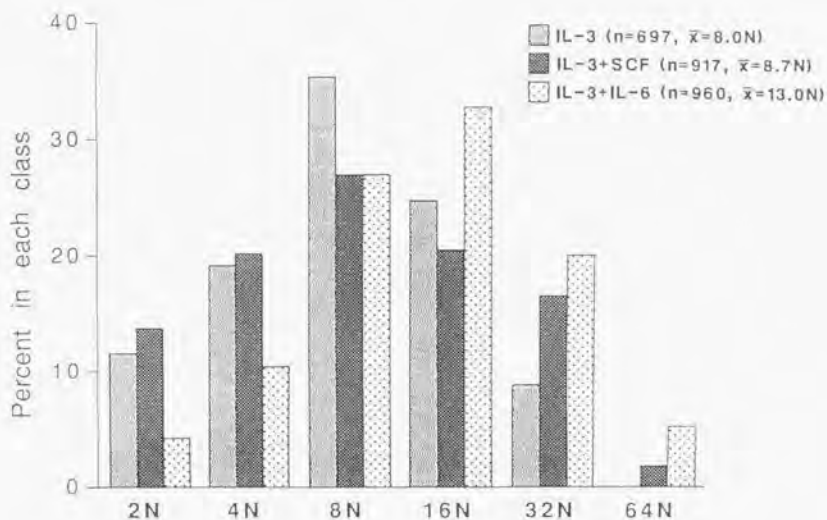


Fig 5

Ploidy distribution of megakaryocytes in MK colonies grown with IL-3, IL-3 + IL-6, and IL-3 + SCF. The analyzed cell numbers (n) and geometric means of megakaryocyte ploidy (\bar{x}) are presented in parenthesis. Statistical analysis in the ploidy distribution is described in the text.

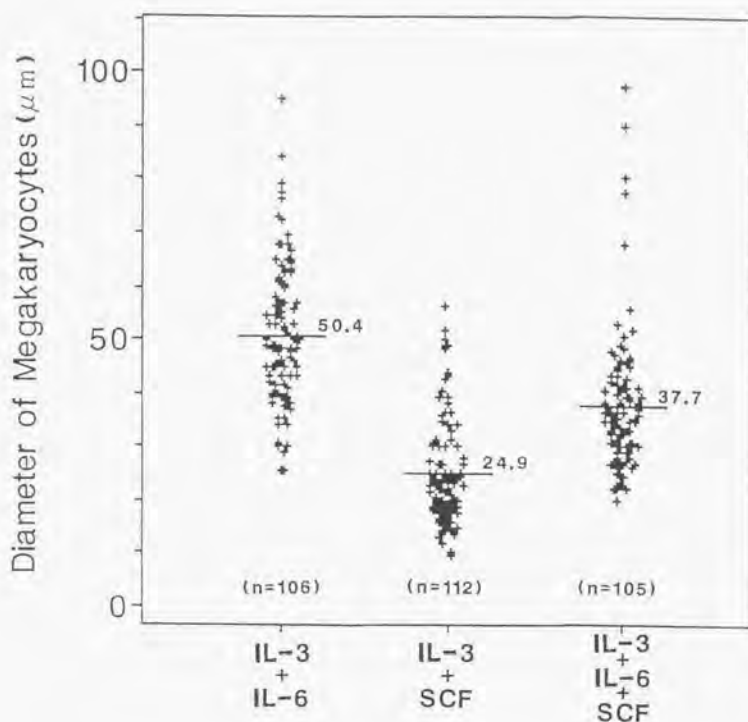
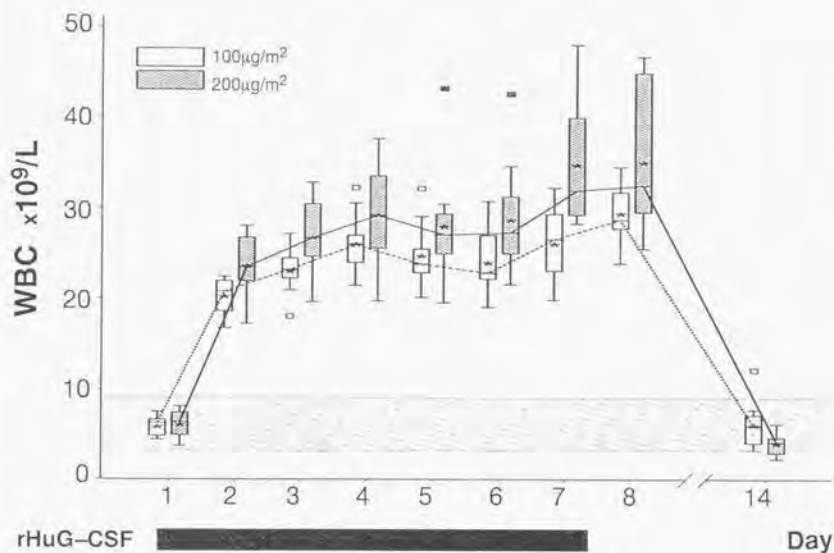


図 6

Effect of IL-3 + IL-6, IL-3 + SCF, and IL-3 + IL-6 + SCF on megakaryocyte size in GMM colonies. The horizontal bars and subscribed figures in each group represent the mean perpendicular diameters of megakaryocytes in GMM colonies.

The numbers of measured megakaryocytes are presented in parentheses. The megakaryocytes supported by IL-3 + IL-6 + SCF were significantly larger than those supported by IL-3 + SCF ($p < 0.0001$).



☒ 7

Serial alterations of WBC counts in volunteers treated with rHuG-CSF are shown in the box-whisker plots. The shadow indicates normal range of the WBC counts. There are no case in which the WBC count exceeds 50,000/ μL .

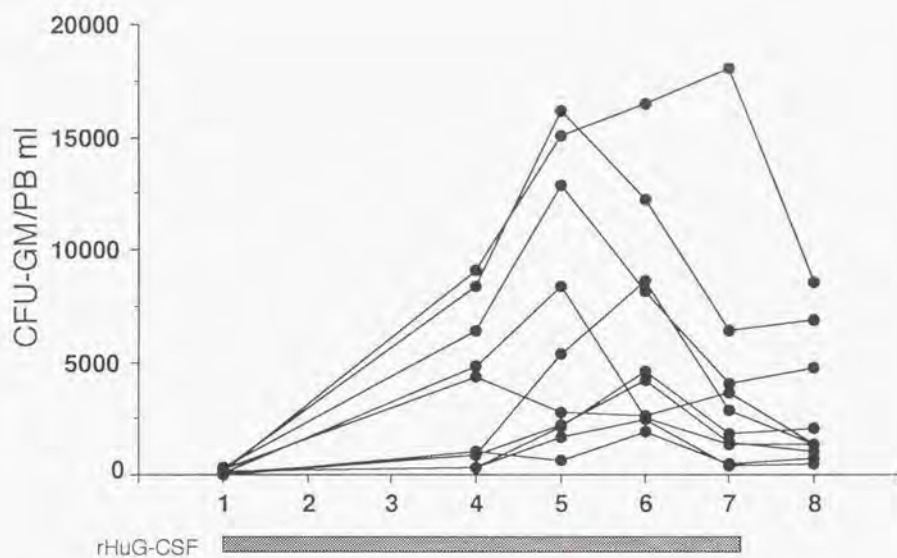


Fig 8

Numbers of CFU-GM in peripheral blood during the course of rHuG-CSF administration (200 mg/m²) in ten normal volunteers.

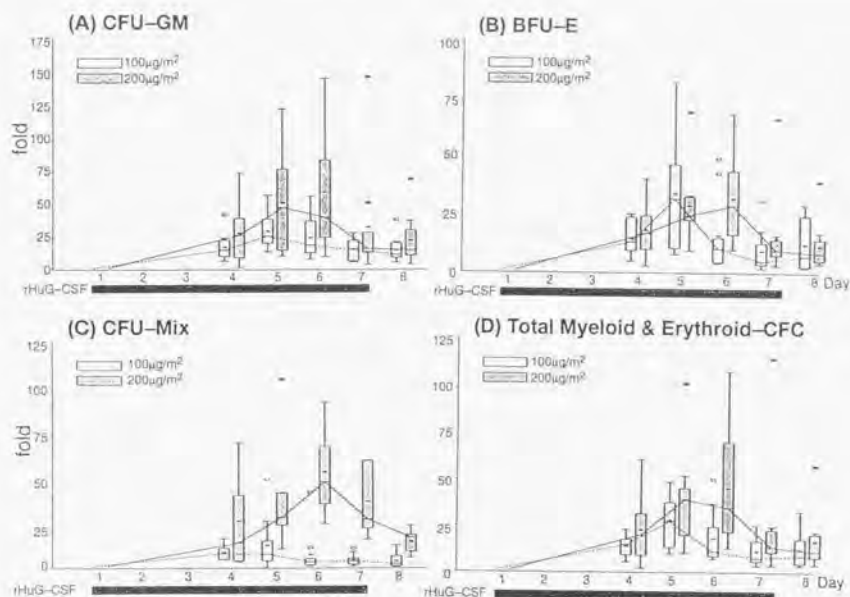


Fig 9

Serial alterations of circulating (A) CFU-GM, (B) BFU-E, (C) CFU-Mix, and (D) total myeloid plus erythroid-CFC are expressed in box-whisker plots as the fold increase from baseline (day 1) values, with the 25th, 50th, and 75th percentiles expressed as "box", with means expressed as "star" and outliers expressed "square". The statistical peaks of clonogenic cell levels are always observed on day 5 except for BFU-E and CFU-Mix found in the 200-µg/m² dose level, which showed the peak on day 6. Statistical analysis in the comparison between the 100- and 200-µg/m² dose level is described in the text.

Total MK-CFC

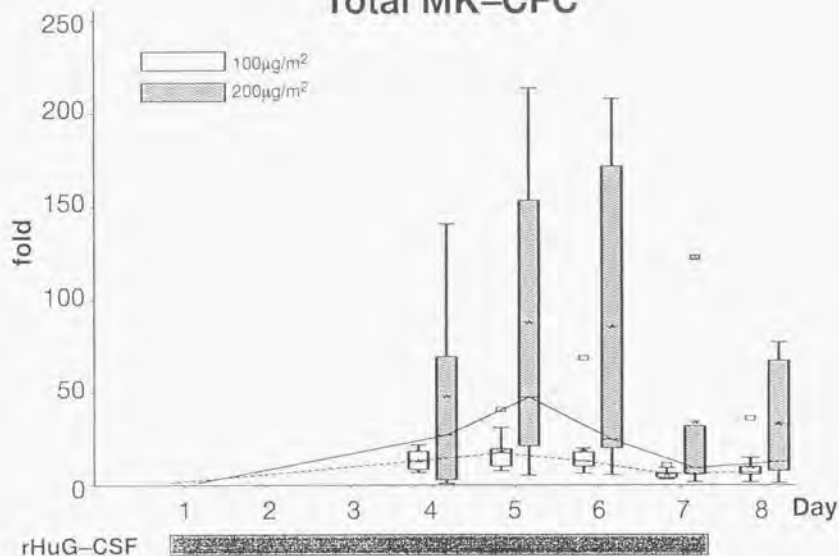


图 10

Serial alterations of total megakaryocytic-CFC (ie, CFU-MK plus BFU-MK plus MK-Mix) are expressed in box-whisker plots as the fold increase from baseline (day 1) values, with the 25th, 50th, and 75th percentiles expressed as "box", with means expressed as "star" and outliers expressed "square".

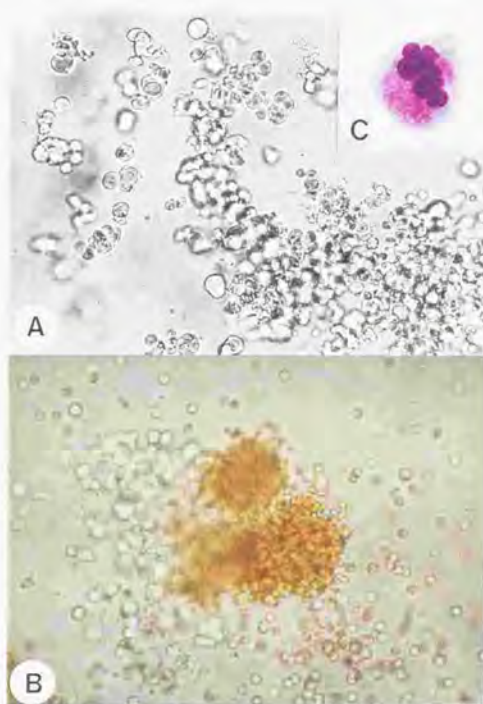


图 1.1

In situ appearance of a representative (A) BFU-MK- and (B) MK-Mix-derived colony from a volunteer treated with rHuG-CSF at 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ on day 5.

(C) Cytospin preparation of the BFU-MK-derived colony stained with May-Grünwald-Giemsa. Original magnification (A), (B) $\times 200$; (C) $\times 1000$.

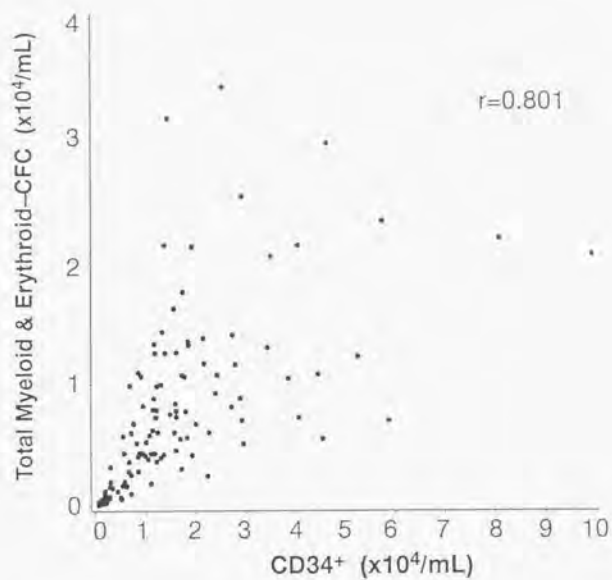


图 1 2

The number of CD34⁺ cells in the peripheral blood of the volunteers correlated with that of total-CFC detected in the myeloid-erythroid culture system ($r = 0.801$).

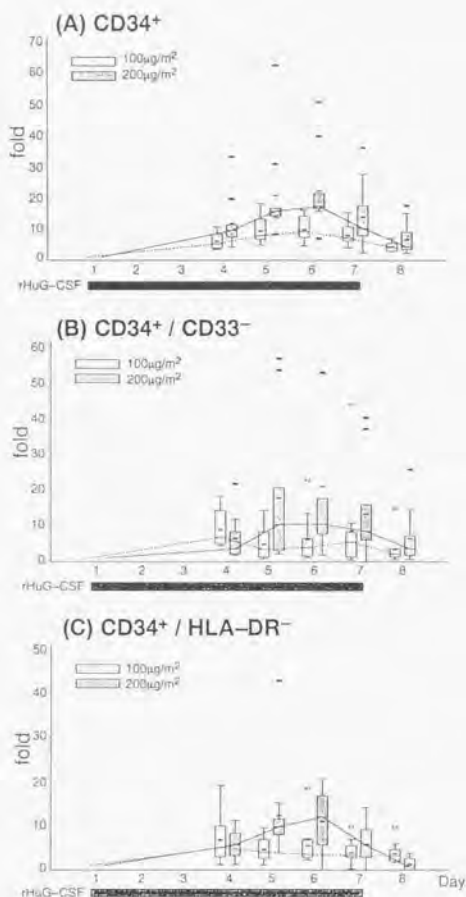


Fig 1.3

Serial alterations of (A) CD34⁺, (B) CD34⁺/CD33⁻, and (C) CD34⁺/HLA-DR⁻ cells are expressed in box-whisker plots as the fold increase from baseline (day 1) values, with the 25th, 50th, and 75th percentiles expressed as "box", with means expressed as "star" and outliers expressed "square". Statistical analysis in the comparison between the 100- and 200-µg/m² dose level is described in the text.

