

学位論文題名

In Vitro Expansion of Human Peripheral Blood  
CD34<sup>+</sup> Cells

(ヒト末梢血 CD 34陽性細胞の in vitro 増幅)

学位論文内容の要旨

I. 諸言

末梢血幹細胞移植術(PBSCT)は、悪性腫瘍の新しい治療法として普及しつつある。従来の骨髄移植と比較し、PBSCTは血球回復が迅速で安全性が高いことが利点であるが、それでもなお移植後の骨髄抑制は高度であり、重篤な感染症の発症も皆無ではない。従って、造血幹細胞をin vitroで分化・増殖させ移植に応用することは、PBSCTの安全性の向上に寄与するものと期待される。本研究においては、ヒト末梢血CD34陽性細胞を純化し、ストローマ細胞を用いない液体培養系で増幅を試み、有用な造血因子を選定するとともに増幅細胞の性状を明らかにし、臨床応用の可能性につき検討した。

II. 材料と方法

1. CD34陽性細胞の純化：ヒト末梢血400mlより比重遠沈法により単核細胞を分離、CD34抗体(My10)及び免疫磁性ビーズと反応させ、カイモパイン処理でCD34陽性細胞を回収した。さらに6種類の抗体(CD2、CD7、CD11b、CD16、CD20、CD56)と免疫磁性ビーズで混在する分化細胞を除去し、最終純化細胞を得た。

2. 液体培養法：CD34陽性細胞  $3\sim 10\times 10^3$ を20%FCS、10% human AB serum 添加 1ml溶液に浮遊し、37°Cで7日間または14日間培養した。造血因子として、IL-3(100U/ml)、IL-6(100ng/ml)、IL-11(40ng/ml)、G-CSF(100ng/ml)、M-CSF (100U/ml)、GM-CSF(100U/ml)及びSCF(100ng/ml)を単独または各種組み合わせで添加した。

3. 表面抗原の解析：CD34陽性細胞及び液体培養後細胞をフローサイトメト

リー法により、CD34(HPCA-1)の発現率、及びCD34陽性細胞中のCD33(My9)の発現率を測定した。

4. コロニーアッセイ法：CD34陽性細胞及び液体培養後細胞をフィブリンクロット法を用い、血清含有培地にIL-3、GM-CSF、G-CSF、Epoを添加し、37°C、14日間培養し、混合コロニー(Erythroid-Mix)、赤芽球系コロニー(BFU-E)、非赤芽球系コロニー(Nonerythroid)を算定した。

### Ⅲ. 結果

1. CD34陽性細胞の純化：ヒト末梢血400ml由来単核細胞 $8.41 \pm 4.47 \times 10^8$ より $7.26 \pm 2.11 \times 10^4$ の細胞を回収した。純化細胞のCD34陽性率は $94.5 \pm 1.3\%$ 、コロニー形成率は $27.2 \pm 8.3\%$ であった。

2. 単独造血因子による増幅：7日間培養では、IL-3によりnonerythroid colonyを $13.4 \pm 4.4$ 倍、14日間培養ではIL-3、GM-CSFによりそれぞれ $4.1 \pm 1.2$ 倍、 $5.5 \pm 1.0$ 倍に増加したが、他の因子による増加作用は認めなかった。Erythroid-Mix、BFU-Eはいずれの因子も増加させなかった。以上より、非赤芽球系前駆細胞の増幅にはIL-3、7日間培養が最も有用と考えられ、以下、IL-3と他の因子の組み合わせによる増幅作用を7日間培養で検討した。

3. IL-3との組み合わせによる増幅：SCF、G-CSF、GM-CSFはIL-3存在下で、nonerythroid colonyの強い増加作用を示し、IL-3単独と比較してそれぞれ、1.7、2.3、2.7倍に増加させた。IL-6はSCFとの共同作用を認めた。IL-11はいかなる組み合わせにおいても増加作用を認めなかった。さらにIL-3、IL-6、SCF、G-CSF、GM-CSF(5 Factors)の組み合わせにより、nonerythroid colonyは $56.5 \pm 10.7$ 倍に増幅した。

4. 増幅細胞の性状：コロニー形成細胞の性状をコロニーの大きさによりsmall(分化型)、intermediate(中間型)、large(未分化型)に分けると、5 Factors、7日間培養により、それぞれ、 $351 \pm 238$ 、 $17.8 \pm 1.7$ 、 $5.9 \pm 3.3$ 倍に増加した。また、表面抗原によりCD34陽性細胞を $CD34^+ \cdot CD33^-$ (未分化型)、 $CD34^+ \cdot CD33^+$ (分化型)に分けると、同様に、それぞれ $2.9 \pm 0.8$ 、 $307 \pm 183$ 倍に増加した。以上により未分化細胞の増加も認められるものの、増幅細胞の大部分が分化型造血前駆細胞から成ることが明らかとなった。PBSCT時の早期の血球増加は分化型前駆細胞に依存していることから、増幅細胞の移植への応用により、より早期の血球回復が可能であると考えられる。

### Ⅳ. 結語

1. ヒト末梢血単核細胞より $94.5 \pm 1.2\%$ の純度でCD34陽性細胞を得た。
2. 単独造血因子によるin vitro増幅効果をIL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、M-

CSF、GM-CSF、SCFで検討したところ、IL-3が最も有効であった。

3. IL-3、IL-6、SCF、G-CSF、GM-CSFの組み合わせにより、非赤芽球系コロニーは $56.5 \pm 10.7$ 倍増加した。

4. 増幅された細胞では、コロニーサイズ、表面抗原の解析から大部分が分化型前駆細胞であった。

5. 以上よりin vitro増幅細胞をPBSCTに併用することにより、より迅速な好中球系細胞の回復が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 小池 隆夫  
副査 教授 小野江 和則  
副査 教授 細川 眞澄男

学位論文題名

## In Vitro Expansion of Human Peripheral Blood CD34<sup>+</sup> Cells

(ヒト末梢血 CD 34陽性細胞の in vitro 増幅)

本研究は、ヒト末梢血 CD 3 4 陽性細胞の造血因子による in vitro 増幅を試み、末梢血幹細胞移植術への応用の可能性につき検討したものである。

### I. 材料と方法

1. ヒト末梢血由来の単核細胞より、免疫磁性ビーズ法を中心として CD 3 4 陽性細胞を純化した。
2. 細胞増幅法は、血清含有 1 ml 溶液に CD 3 4 陽性細胞を  $3 \sim 10 \times 10^3$  個を加え、37°C で 7 日間、または 14 日間培養した。造血因子として IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、SCF を単独、または組み合わせで添加した。
3. CD 3 4 陽性細胞、及び培養後細胞はフローサイトメトリー法で表面抗原の解析を、フィブリンクロット法でコロニーの同定を行った。

### II. 結果と考案

1. CD 3 4 陽性細胞は、94.5% に純化し得た。
2. 造血因子の単独作用では、IL-3、GM-CSF のみがコロニー増幅効果を示し、他の因子は効果を認めなかった。IL-3、7 日間培養が最大効果を示し、非赤芽球コロニーを 13.4 倍に増幅した。
3. 造血因子の共同作用では、GM-CSF、SCF が IL-3 との強い共同作用を示し、これに G-CSF、IL-6 を加えた 5 種類の因子で 7 日間培養することにより、非赤芽球コロニーを 56.5 倍に増幅した。
4. 増幅後の細胞を CD 3 4、CD 3 3 の二重染色法により表面抗原を解析すると、大部分が CD 3 4<sup>+</sup>・CD 3 3<sup>+</sup> の分化型前駆細胞であった。また、コロニー形態の観察より、増幅後細胞の大部分は

small sizeの分化型コロニーであった。

5. 以上より、ヒト末梢血CD34陽性細胞を造血因子によりin vitro増幅することが可能であった。また、増幅後細胞の主体が分化型造血前駆細胞であることから、増幅細胞を末梢血幹細胞移植術に併用することにより、迅速な好中球の回復が期待されると考えられた。

### III. 審査の概要

口頭発表に際し、小野江教授から造血再構築可能な細胞とCD34の発現、及びIL-6の増幅に関する作用について、細川教授から造血因子の反応性の個人差、並びに健常人と患者間の差について、浅香教授からは造血因子の種類と増幅するコロニーの関係、及び未熟幹細胞の増幅に可能性について、皆川教授からは5種類の造血因子を同時に使用する妥当性について、さらに斉藤教授からは増幅細胞移植の臨床応用の現状と安全性について質疑及び指摘があった。これらに対して、申請者は概ね適切な答弁をした。また、副査の小野江教授、細川教授による本研究に関する審査と面接を受け、合格と判定された。

以上により、本論文は学位授与に値するものと判定した。