

Ex vivo Expansion of Cord Blood Hemopoietic
Stem Cells by Stem Cell Factor(SCF)
Interleukin-3 Interleukin-6 and Cord Plasma: A
Fundamental Study for Cord Blood Stem Cell
Transplantation

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8540

正 誤 表

金沢大学十全医学会雑誌 第103巻 第2号 381-393 (1994)

幹細胞因子, インターロイキン-3, インターロイキン-6 および
臍帯血血漿による臍帯血造血幹細胞の体外増幅に関する研究:
移植術への応用の可能性

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)
小 西 道 雄

誤	正
<p>p. 386 Fig. 11. 説明</p> <p>Fig. 11. Suppressive effect of anti-<i>c-kit</i> antibody, SR-1, on colony formation from cord blood CD34 positive cells in the FBS culture system. Data were shown by percent of the controls without SR-1. Each bar represents the mean±SEM. * p<0.001, ★ p<0.05 as compared to colony formaton without SR-1. ☆ p<0.01 as compared to day 0 colony formation. ■, CFU-E; ■, BFU-E; ▨, CFU-GM-d7; □, CFU-GM-d14.</p>	<p>■, CFU-E; □, BFU-E; ▨, CFU-GM-d7; ▩, CFU-GM-d14.</p>

幹細胞因子, インターロイキン-3, インターロイキン-6 および 臍帯血血漿による臍帯血造血幹細胞の体外増幅に関する研究: 移植術への応用の可能性

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

小 西 道 雄

臍帯血幹細胞移植に対して十分な量の造血幹細胞を供給する目的にて, 組換え型ヒト幹細胞因子 (recombinant human stem cell factor, SCF) を含むサイトカインの組み合わせおよび臍帯血血漿を添加することによる体外での臍帯血幹細胞の増幅能について検討した. 非分画および幹細胞分画を含む CD34 陽性分画ヒト臍帯血細胞に SCF, 組換え型ヒトインターロイキン-3 (recombinant human interleukin-3, IL-3), 組換え型ヒトインターロイキン-6 (recombinant human interleukin-6, IL-6) を種々の組み合わせで液体培養に添加した. サイトカインを含む培養液は6日毎に半量ずつ交換した. 培養液交換時に取り出した細胞をコロニー形成法にて造血前駆細胞を検索した. 顆粒球系/マクロファージ系コロニー形成細胞 (colony forming unit-granulocyte/macrophage, CFU-GM) は, 組換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子 (recombinant human granulocyte stimulating factor G-CSF) を含む0.8%メチルセルロースによる半固形培地にて算定した. 赤芽球系前駆細胞の赤芽球バースト形成細胞 (burst forming unit-erythroid, BFU-E) と赤芽球コロニー形成細胞 (colony forming unit-erythroid, CFU-E) は, 同培地に組換え型ヒトエリスロポイエチン (recombinant human erythropoietin, EPO) を加えて算定した. CFU-GM, BFU-E, CFU-E によるコロニーは SCF+IL-3+IL-6 の組み合わせで添加されたとき最も多く形成された. CD34 陽性細胞分画を SCF+IL-3+IL-6 の組み合わせで液体培養したとき総細胞数は増え続けたが, CFU-GM は培養18日で15.6±3.3倍 (平均値±標準誤差) に増幅されピークに達した. また BFU-E や CFU-E も培養6日目ですれぞれ5.5±1.6倍, 3.5±0.9倍でピークに達した. CD34 陽性細胞の自己複製能力は培養6日目ですれぞれ5.2±0.9倍とピークに達した. しかしながら今回の実験条件における造血幹細胞の体外増幅は臍帯血幹細胞移植に十分なものとはいえなかった. 今回の実験条件では組換え型ヒトインターフェロン- γ , (recombinant human interferon- γ , IFN- γ) や組換え型ヒト顆粒球/マクロファージ形成刺激因子 (recombinant human granulocyte/macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) の添加は体外細胞増幅に関して有効ではなかった. さらに今回の実験においては培養液に自己, および同種の臍帯血血漿を添加することによる細胞増幅の効果をみた. 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) 培養系に比べ臍帯血血漿培養系は CD34 陽性細胞の増幅には有効ではなかったが, BFU-E, CFU-E ともに有意に多く形成した. 次に臍帯血造血幹細胞および臍帯血血漿中の成長因子の特徴について, SCF のレセプターである *c-kit*, その他 GM-CSF, EPO に対するモノクローナル抗体を使い検討した. 抗 *c-kit* 抗体により CFU-GM に比べ BFU-E や CFU-E はより強く抑制された. これは BFU-E/CFU-E と CFU-GM での *c-kit* 発現状態の違い, 造血前駆細胞間での SCF の感受性の違いを示唆するものであった. これらの研究より SCF+IL-3+IL-6 の組み合わせによる培養により臍帯血中の造血幹細胞および造血前駆細胞のかんりの量の体外増幅は可能であることが示唆されたが, 臍帯血幹細胞移植に対しては十分な量とはいえず, さらなる研究が必要である.

Key words stem cell factor (SCF), *c-kit*, cord plasma, cord blood stem cell transplantation

ヒトの造血系全体の細胞のターンオーバーは 10^{12} 個/日におよぶが, それらはすべて骨髄中の造血幹細胞と呼ばれる比較的少数の細胞亜集団が維持している. 即ち, 造血幹細胞は, 1個の細胞から, 赤血球, 顆粒球, 血小板, リンパ球などの成熟血液細胞を造り出す能力 (多分化能, multipotentiality) を有すると同時に, 自己複製能 (self-renewal capacity) を持つ細胞として定義される¹⁾. 形態学的には造血幹細胞の同定は困難であ

たが, Till ら²⁾によるマウス脾コロニー形成法により造血幹細胞の定量的算定の一方法がみいだされ, その後軟寒天やメチルセルロース等の半流動培地でコロニーを形成させ, 生体外実験で造血幹細胞を定量する生体外コロニー形成法³⁾などが確立し, 造血幹細胞の定量的研究が進歩した. その結果, 幹細胞の自己複製, 増殖, 分化には液性因子として外界から造血幹細胞に作用する各種のサイトカインが関与することが明らかになっ

平成5年12月16日受付, 平成6年2月3日受理

Abbreviations: BFU-E, burst forming unit-erythroid; CFU-E, colony forming unit-erythroid; CFU-GEMM, colony forming unit-granulocyte/erythrocyte/macrophage/megakaryocyte; CFU-GM, colony forming unit-granulocyte/macrophage; CFU-Mix, colony forming unit-mix; EPO, recombinant human erythropoietin;

てきた。特に造血の初期段階にはインターロイキン-3, インターロイキン-6, そして幹細胞因子が重要と考えられる^{9)~11)}。幹細胞因子はマウスおよびヒトの造血幹細胞に発現するチロシンキナーゼ型受容体である *c-kit* 受容体のリガンドとして同定, クローニングされたもので^{9)~12)}, 現在のところ最も未熟な細胞に働くサイトカインとみられている⁹⁾。多分化能を持つ造血幹細胞の性状も次第に解明され, 成熟分化抗原を全く発現せず, CD34¹³⁾や *c-kit*¹⁴⁾抗原を発現していることが知られた。本研究では, CD34 陽性の純化した造血幹細胞の分化・増殖に与える幹細胞因子やその他各種のサイトカインの相互作用を研究する。

一方臨床面では, 今日, 造血器系悪性腫瘍や遺伝性酵素欠損による先天性代謝異常症が, 骨髄移植によって, 正常の造血幹細胞を移植することによって治療され効果をあげている。骨髄と同様に臍帯血は血液幹細胞の豊富な供給源であることは以前よりいわれており^{15)~21)}, 事実臍帯血中には 1.3% 前後と骨髄とほぼ同程度の造血幹細胞が算定されている²²⁾。1989年 Gluckman ら²³⁾によりファンコニ貧血の男児に対して初めて臍帯血幹細胞移植が行なわれて以来, 現在のところ白血病, 神経芽細胞腫, 重症再生不良性貧血, Wiskott-Aldrich 症候群など計15例に移植が施行された^{24)~26)}。臍帯血幹細胞移植の利点として 1) 提供者に苦痛を与えない, 2) ウイルス感染の危険性が少ない, 3) 移植片対宿主疾患 (graft-versus-host-disease, GVHD) が少ない, 4) 骨髄よりも未熟な細胞が多い, などがあげられる。一方不利な点として, 1) 取りうる細胞数が限られている, 2) 母親の T細胞の混入, 3) 採取の際の細菌の混入, 4) 移植片対白血病細胞効果 (graft-versus-leukemia-effect, GVL) が少ない, などがあげられる。特にこの中で最も問題になるのが採取量不足である。本研究ではこの問題を解決するため, 臍帯血を使い幹細胞因子に他のサイトカインを組み合わせた生体外培養系において造血幹細胞を自己複製, 増幅しうるか, また臍帯血幹細胞と骨髄および末梢血中の幹細胞との分化増殖能の比較, さらに培養液として臍帯血血漿を使用したときの効果など臍帯血幹細胞移植の可能性について基礎的検討を加えたので報告する。

対象および方法

1. 臍帯血中非付着単核細胞の分離

臍帯血は石川県立中央病院で分娩した新生児 (妊娠, 分娩経過に異常を認めなかった児) より, 末梢血は白血病寛解中患児より, 骨髄液は白血病寛解中の児, 骨髄転移のない固形腫瘍の児および骨髄移植供血者よりヘパリン加採取し, フィコールハイパーク (Ficoll-Hypaque) 比重遠心法にて単核細胞 (mononuclear cells, MNC) を分離した。得られた単核細胞を 5% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Nipro, 大阪), 25mM HEPES, 0.3mg/ml L-グルタミン, 200U/ml ペニンリンならびに 10 μ g/ml ゲンタマイシンを含む RPMI 1640 培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) に浮遊してプラスチックフラスコ No.3375 (Costar Cambridge, MA, USA) にて 37 $^{\circ}$ C, 30分間培養し, 臍帯血中非付着単核細胞 (nonadherent cells, NAC) を採取した。細胞の洗浄には 0.1M リン酸緩衝塩化

ナトリウム液 (pH 7.4) (phosphate-buffered saline, PBS) を使用した。

II. CD34 陽性細胞の分画

NAC を 2-アミノエチル臭化イソチオウロニウム (aminoethyl-isothiuronium bromide) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 処理羊赤血球を用いたロゼット形成とフィコールハイパーク比重遠心法にて, E-ロゼット形成細胞 (E+細胞) と E-ロゼット非形成細胞 (E-細胞) とに分画した。E-細胞を PBS に再浮遊し, 次にダイズアグルチニン (soybean agglutinin, SBATM) 陽性細胞分離培養フラスコ (AIS Micro CELLectorTMT-125Cell Culture Flask No.9100, Applied Immune Sciences, Menlo Park, CA, USA) に移して室温 1 時間静置し, 非付着細胞 (SBA-細胞) を回収した。この SBA-細胞 (2 \times 10⁷/ml) 50 μ l にフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗 CD34 抗体 (Anti-HPCA-2, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) 5 μ l を加え 4 $^{\circ}$ C, 20分静置, PBS で洗浄後, EPICS-ELITE (Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL, USA) を用いて CD34 陽性細胞をソーティングした。

III. サイトカイン

組み換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子 (recombinant human granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) は中外製薬 (東京) より, 組み換え型ヒト顆粒球/マクロファージコロニー形成刺激因子 (recombinant human granulocyte/macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) は住友製薬 (大阪) より, 組み換え型ヒトインターロイキン 3 (recombinant human interleukin 3, IL-3, 比活性 10⁸U/mg), 組み換え型ヒトインターロイキン 6 (recombinant human interleukin 6, IL-6, 比活性 10⁷U/mg 以上), 組み換え型ヒト幹細胞因子 (recombinant human stem cell factor, SCF), および組み換え型ヒトエリスロポイエチン (recombinant human erythropoietin, EPO) はキリンビール (東京) より, 組み換え型ヒトインターフェロン- γ (recombinant human interferon- γ , IFN- γ) は塩野義製薬 (大阪) よりそれぞれ供与された。なお予備実験として NAC を使い種々のサイトカイン濃度で液体培養, コロニー形成を行ない以下のごとくに各サイトカインの至適濃度を決定した。G-CSF 20ng/ml (コロニー形成のみに使用), EPO 3U/ml (コロニー形成のみに使用), GM-CSF 10ng/ml (液体培養のみに使用), IFN- γ 100U/ml (液体培養のみに使用), IL-3, IL-6, SCF は液体培養には 10ng/ml, コロニー形成には 20ng/ml とした。

IV. 抗サイトカイン抗体および抗 *c-kit* 抗体

ウサギ抗 EPO 抗血清 (10ng/ml EPO を 20 μ g/ml で完全中和) はキリンビールより, ウサギ抗 GM-CSF 抗血清 (800倍希釈で GM-CSF 10ng/ml を完全中和) は住友製薬より, 抗 *c-kit* 抗体 (SR-1, 1,100,000倍希釈で SCF 10nmol/l を 90% 以上中和)²⁷⁾ は, V. C. Broudy 博士 (University of Washington, Seattle, Washington) よりそれぞれ供与された。

V. ヒト臍帯血血漿

石川県立中央病院で採取したヘパリン加臍帯血を単核細胞分離前に 450g, 5分間で遠心し上清を採取し, 0.45 μ m フィル

FBS, fetal bovine serum; G-CSF, recombinant human granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, recombinant human granulocyte/macrophage colony stimulating factor; GVHD, graft-versus-host-disease; GVL, graft-versus-leukemia-effect; IFN- γ , recombinant human interferon- γ ; IGF, insulin-like growth factor;

ター (マイレクス HA, SLHA0250S, 日本ミリポア工業, 山形) を 2 回通した後非働化せずそのまま使用した。

VI. 液体培養

10%非働化 FBS または10%ヒト臍帯血血漿を加えた RPMI 1640培養液に NAC, CD34 陽性細胞をそれぞれ $10^5/ml$, $3 \times 10^4/ml$ の濃度で浮遊した。これに種々のサイトカインを加え, 24穴平底プレート (Corning Grass Works, Corning, NY, USA) に 1ml ずつ分注し 5% CO₂, 37°C, 湿度100%で液体培養を開始した。3日または6日毎に細胞浮遊液を半量取り除き新たに培養液およびサイトカインを半量ずつ追加した。取り除いた細胞浮遊液を使用して総細胞数および CD34 陽性細胞数を算定し, コロニー形成を行なった。なお培養液に FBS を使用したものを FBS 液体培養系, 臍帯血血漿を使用したものを臍帯血血漿液体培養系とした。

VII. 総細胞数および CD34 陽性細胞数の算定

経時的に液体培養中より取り出した細胞を0.16%トリパンブルー (trypan blue) (和光純薬工業, 大阪) を含む PBS で染色し, 総生細胞数を算定した。CD34 陽性細胞は, PE 標識抗 CD34 抗体による免疫蛍光染色で細胞数を算定した。染色は 4°C, 20分間で, その後 3%非働化 FBS および0.1%アジ化ナトリウムを含む PBS で洗浄しフローサイトメーター Cytoran Absolute (オーソ・ダイアスティック・システム, 東京) で解析した。

VIII. コロニー形成

経時的に液体培養中より取り出した細胞を Iscove らの方

法²⁰⁾を一部改変し³⁰⁾, $10^3 \sim 10^5$ 個の細胞を0.8%メチルセルロース (methylcellulose) (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), 30% FBS, または30%ヒト臍帯血血漿, 1%脱イオン化牛胎児アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma), 各種サイトカイン (SCF+IL-3+IL-6+G-CSF+EPO) を含むイスコフによる改良型ダルベッコ培養液 (Iscove's modified Dulbecco's medium, IMDM) (Sigma) に加え 1ml とし, 24穴平底プレートに 0.25ml ずつ分注した。なお FBS を使用したものを FBS コロニー形成系, 臍帯血血漿を使用したものを臍帯血血漿コロニー形成系とした。コロニー形成のための培養は 3穴培養で, 5% CO₂, 37°C, 湿度100%で行ない, 培養7日目と14日目にそれぞれ倒立顕微鏡で, 40個以上の細胞よりなる集団をコロニーとし, 7日目, 14日目に顆粒球系, マクロファージ系の細胞集団を形成する前駆細胞をそれぞれ顆粒球系/マクロファージ系コロニー形成細胞 (colony forming unit-granulocyte/macrophage, CFU-GM-d7, CFU-GM-d14) とした。7日目に血色素を保持する細胞集団を形成する前駆細胞を赤芽球コロニー形成細胞 (colony forming unit-erythroid, CFU-E), 14日目に CFU-E より大きいか, 火花がはじけたように広がる細胞集団を形成する前駆細胞を赤芽球バースト形成細胞 (burst forming unit-erythroid, BFU-E) とした。また14日目に赤芽球系の細胞に加え, 同時に顆粒球系, マクロファージ系およびその他の系の細胞を含む細胞集団を形成する, より未熟な前駆細胞を混合コロニー形成細胞 (colony forming unit-mix, CFU-Mix) とした。なお各コロニーの細胞形態は, マイクロピペットでコロニーをつり上げ, メイ・グリェンワルド・ギムザ (May-Grunwald-Giemsa) 重染色で確認した。なお実験のロット毎のコロニー数のばらつきが大きいため, 結果は液体培養0日目の値(コントロール)で除した増幅度で表示した。

IX. 統計学的検定法

得られた成績は, 平均値±標準誤差で示した。平均値の差の

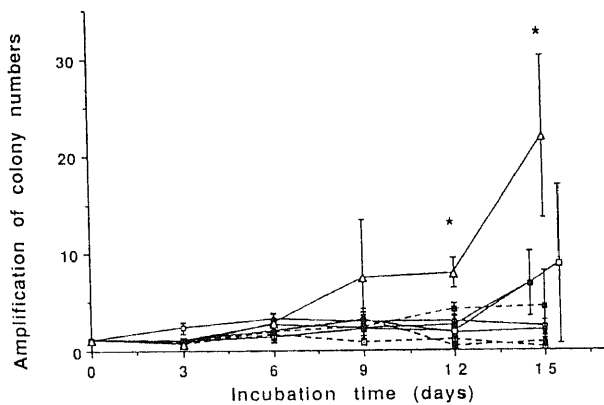


Fig. 1. Amplification of colony forming unit-granulocyte/macrophage counted after incubation for 14 days (CFU-GM-d14) from cord blood nonadherent cells (NAC) after incubation with combination of IL-3+IL-6+SCF. NAC were incubated in a liquid culture medium containing 10% FBS and cytokines. After incubation for 3 to 15 days, cells were harvested and prepared for the assay of CFU-GM-d14 colonies as described in "Materials and Methods". Data were shown by the amplification ratio of the colony numbers as compared to the colony number of day 0. Each point represents the mean±SEM. * p<0.05 as compared to none or single cytokine. ---□---, none; ---●---, SCF; ---○---, IL-3; ---●---, IL-6; ---■---, IL-3+SCF; ---□---, IL-6+SCF; ---■---, IL-3+IL-6; ---△---, IL-3+IL-6+SCF.

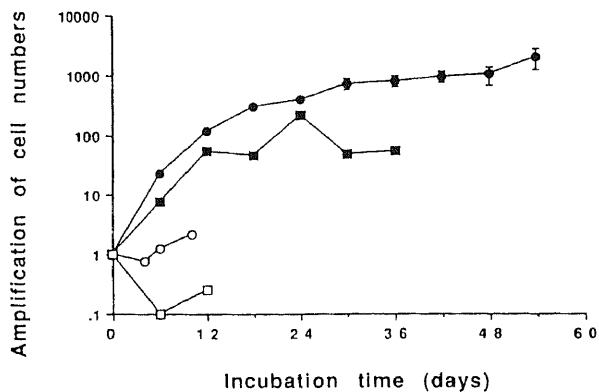


Fig. 2. Amplification of total cell numbers of cord blood CD34 positive cells after incubation with cytokines. Data were shown by the amplification ratio of the numbers as compared to the cell number of day 0. Each point on the IL-3+IL-6+SCF curve represents the mean±SEM. ■, IL-3+SCF; ○, IL-6+SCF; □, IL-3+IL-6; ●, IL-3+IL-6+SCF.

IL-3, recombinant human interleukin-3; IL-6, recombinant human interleukin-6; IMDM, Iscove's modified Dulbecco's medium; MNC, mononuclear cells; NAC, nonadherent cells; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; SBA, soybean agglutinin; SCF, recombinant human stem cell factor

検定には, Student's t-検定を用い, $p < 0.05$ を有意とした.

成 績

I. ヒト臍帯血 NAC に対する IL-3, IL-6, SCF の影響 (図 1)

ヒト臍帯血 NAC の FBS 液体培養系に, 至適濃度の IL-3, IL-6, SCF を単独または種々の組み合わせで添加し, これらサイトカインの CFU-GM-d14 コロニー形成に与える影響をみた. 結果は液体培養開始時 (day 0) の NAC 10^5 個当たりの CFU-GM-d14 数に換算し, 0 日目の CFU-GM-d14 数で除して増幅度で示した. 図 1 に示すごとく IL-3+IL-6+SCF の組み合わせによる液体培養 15 日目の CFU-GM-d14 は, 21.9 ± 8.3 倍 (平均値 \pm 標準誤差) であり, IL-3+IL-6 の 4.4 ± 3.7 倍, IL-3+SCF の 6.7 ± 3.3 倍, IL-6+SCF の 8.8 ± 8.2 倍とは有意差はなかったが一番多かった. また IL-3+IL-6+SCF による培養系は, IL-3, IL-6, SCF それぞれ単独のものおよび無添加の場合と比べると, 培養 12 日目以降では有意に CFU-GM-d14 を多く形成した ($p < 0.05$).

II. 臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅 (図 2, 3, 5)

次に細胞ソーティングでえられたヒト臍帯血 CD34 陽性細胞分画を使いサイトカインの影響を検討した. 図 2 に示すごとく IL-3+IL-6+SCF の 3 者を同時に添加した FBS 液体培養系ではヒト臍帯血 CD34 陽性細胞分画の総細胞数は増え続け, 培養 54 日目には, 培養開始時の $2,050 \pm 830$ 倍 (最高 $3,070$ 倍) にまで増幅され, また IL-3+IL-6, IL-3+SCF, IL-6+SCF 添加群と比べてもその増幅度は大きかった. さらに, IL-3+IL-6+SCF の組み合わせに IFN- γ または, GM-CSF を添加しても総細胞数は, 非添加群と有意差はなかった (図 3). 培養後の総細胞の大部分は光顕的にある程度分化成熟した細胞群とみられた. 造血幹細胞の自己複製を示唆する CD34 陽性細胞数に関しては, 図

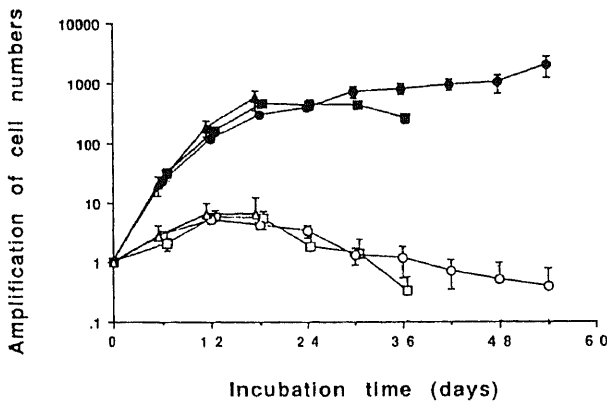


Fig. 3. The effect of GM-CSF or IFN- γ on the amplification of cord blood CD34 positive cells after incubation with IL-3+IL-6+SCF in a liquid culture. Amplification of total and CD34 positive cell numbers were measured after incubation with cytokines for 6 to 54 days. Data were shown by the amplification ratio of the cell numbers as compared to the cell number of day 0. Each point represents the mean \pm SEM. ●, total cell counts for IL-3+IL-6+SCF; ▲, total cell counts for IL-3+IL-6+SCF+GM-CSF; ■, total cell counts for IL-3+IL-6+SCF+IFN- γ ; ○, CD34 positive cell counts for IL-3+IL-6+SCF; △, CD34 positive cell counts for IL-3+IL-6+SCF+GM-CSF; □, CD34 positive cell counts for IL-3+IL-6+SCF+IFN- γ .

3, 図 5 に示すごとく培養 0 日目から培養 6 日目にかけては有意差 ($p < 0.001$) をもって上昇し, 培養 12 日目には 5.2 ± 0.9 倍 (最高 16.0 倍) まで増幅されたがそれ以降は漸減していった. また, CD34 陽性細胞数に関しても IFN- γ または GM-CSF 添加群は, 非添加群と有意差はなかった. よって以後の実験では液体培養時添加するサイトカインは IL-3+IL-6+SCF の 3 者の組み合わせとした.

III. ヒト臍帯血, 骨髄および末梢血 CD34 陽性細胞の細胞増幅の比較 (図 4, 5)

図 4 はヒト臍帯血, 骨髄および末梢血 CD34 陽性細胞を FBS 液体培養系で IL-3+IL-6+SCF を添加して液体培養した後の総細胞数を示す. 骨髄は培養 6 日目より臍帯血に比べ有意に総細胞数は少なく (培養 6 日目で $p = 0.001$, 培養 12 日目で $p < 0.01$, 培養 18 および 24 日目で $p < 0.05$), 培養 18 日目のピークでも培養開始時の 28.4 ± 12.4 倍 (最高 53.3 倍) に留まり以後減

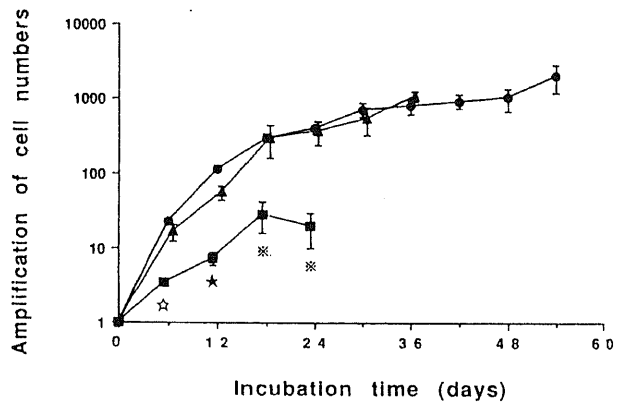


Fig. 4. Comparison of total cell numbers after incubation with IL-3+IL-6+SCF among cord blood, bone marrow and peripheral blood CD34 positive cells. Data were shown by the amplification ratio of the cell numbers as compared to the cell number of day 0. Each point represents the mean \pm SEM. ☆ $p = 0.001$, ★ $p < 0.01$, ※ $p < 0.05$ as compared to cord blood. ●, cord blood; ■, bone marrow; ▲, peripheral blood.

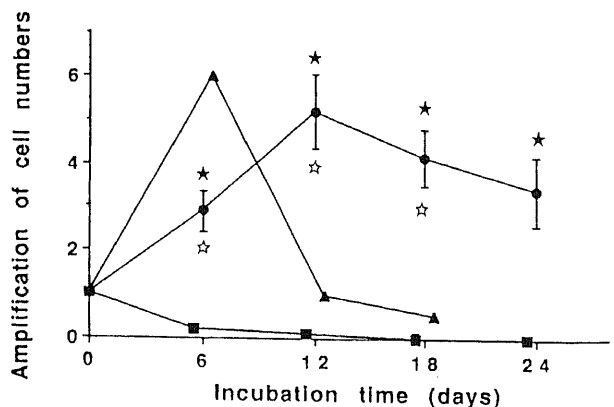


Fig. 5. Amplification of CD34 positive cell numbers of cord blood, bone marrow and peripheral blood CD34 positive cells after incubation with IL-3+IL-6+SCF. Data were shown by the amplification ratio of the cell numbers as compared to the cell number of day 0. Each point represents the mean \pm SEM. ☆ $p < 0.05$ as compared to bone marrow. ★ $p \leq 0.001$ as compared to day 0. ●, cord blood; ■, bone marrow; ▲, peripheral blood.

少した。末梢血 CD34 陽性細胞は36日目まで培養したかぎりにおいて総細胞数は臍帯血と有意差なく、培養36日目で培養開始時の $1,100 \pm 179$ 倍(最高1,280倍)となった。

次に液体培養後の CD34 陽性細胞数の変化についてであるが、図5に示すごとく骨髓は培養後より減少し特にピークを作らなかった。一方臍帯血 CD34 陽性細胞は培養開始時と比べ培養6日目より培養24日目に有意に増幅された ($p \leq 0.001$)。また骨髓との間にも培養6日目より培養18日目まで有意差を認めた ($p < 0.05$)。末梢血に関しては症例数が1例しかなく統計学的評価はできなかったが臍帯血と同等に増幅されるかあるいは臍帯血と骨髓の中間を推移するように思われた。

IV. コロニー形成能 (図6)

図6に FBS 液体培養系において培養した臍帯血、骨髓、および末梢血 CD34 陽性細胞の FBS を使用したコロニー形成結果を示す。結果はヒト臍帯血の液体培養開始時 (day 0) のコロニー数をコントロールとした増幅度で示した。なおコロニー培養時のサイトカインは、いずれも IL-3+IL-6+SCF+G-CSF+

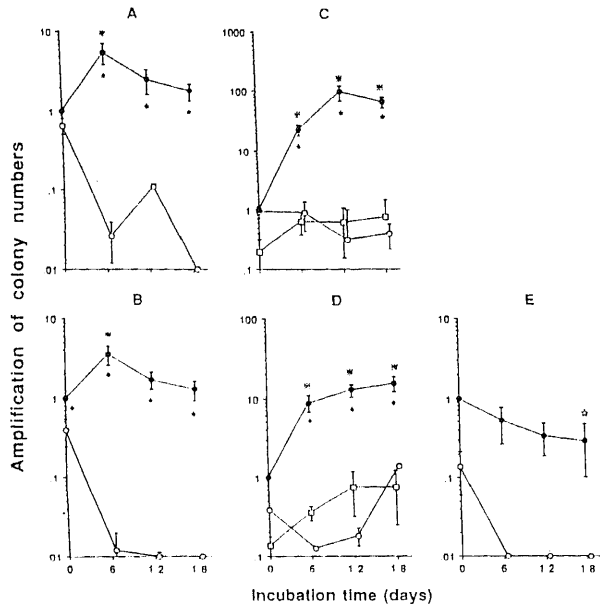


Fig. 6. Amplification of colony numbers of cord blood, bone marrow, and peripheral blood CD34 positive cells after incubation with IL-3+IL-6+SCF. A, colony forming unit-erythroid (CFU-E); B, burst forming unit-erythroid (BFU-E); C, colony forming unit-granulocyte/macrophage counted after incubation for 7 days (CFU-GM-d7); D, colony forming unit-granulocyte/macrophage counted after incubation for 14 days (CFU-GM-d14); E, colony forming unit-mix (CFU-Mix). Cells were incubated in a liquid culture medium containing 10% FBS with IL-3+IL-6+SCF. After incubation for 6 to 18 days, cells were harvested and prepared for assays of colonies as described in "Materials and Methods". Data were shown by the amplification of the colony numbers as compared to the colony numbers of day 0. The control (day 0) colony numbers of cord blood were as follows: CFU-E, $6,900 \pm 740$ (mean \pm SEM) per 10^6 CD34 positive cells; BFU-E, $10,470 \pm 1,250$; CFU-GM-d7, $2,700 \pm 390$; CFU-GM-d14, $4,890 \pm 670$ and CFU-Mix, $3,670 \pm 730$. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ as compared to bone marrow and/or peripheral blood. ※ $p < 0.05$ as compared to day 0. ☆ $p < 0.005$ as compared to day 0. ●, cord blood; ○, bone marrow; □, peripheral blood.

EPO の組み合わせとした。図6に示すごとくヒト臍帯血では赤芽球系の CFU-E, BFU-E は、培養6日目で培養0日目と比較して有意差をもって増加しており、それぞれ CFU-E が 5.5 ± 1.6 倍(最高17.9倍) ($p < 0.05$), BFU-E が 3.5 ± 0.9 倍(最高10.3倍) ($p < 0.05$) とピークに達し、以後漸減した。また顆粒球/マクロファージ系の CFU-GM が有意差をもって増加したのは培養6日目のみであったが ($p < 0.05$), その後も緩やかに増加し、ピークはやや遅れて CFU-GM-d7 は培養12日目に 98.2 ± 28.4 倍(最高441倍)となり、CFU-GM-d14 は培養18日目に 15.6 ± 3.3 倍(最高38.1倍)となったが、やはりそれ以後は漸減した。より未熟な混合コロニー形成細胞である CFU-Mix は、はっきりしたピークは認めず漸減し培養18日目において培養0日目と比較して有意に減少を認めた ($p < 0.005$)。一方、骨髓 CD34 陽性細胞はいずれの系統のコロニー数も培養途中にピークを持たず漸減した。臍帯血と比較するとまず液体培養開始時

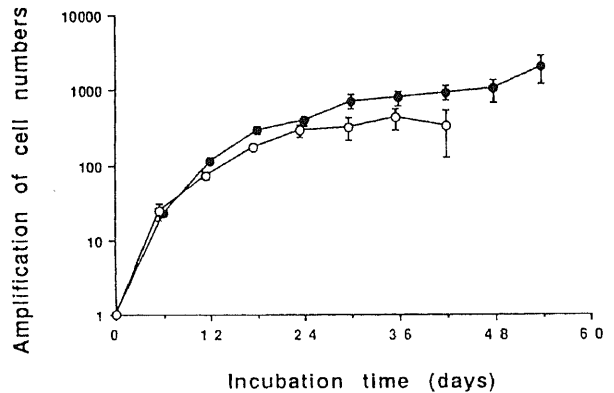


Fig. 7. Amplification of total cell numbers of cord blood CD34 positive cells incubated in a liquid culture medium containing 10% FBS or 10% cord blood plasma with IL-3+IL-6+SCF. Data were shown by the amplification ratio of the cell numbers as compared to the cell number of day 0. Each point represents the mean \pm SEM. ●, FBS; ○, cord plasma.

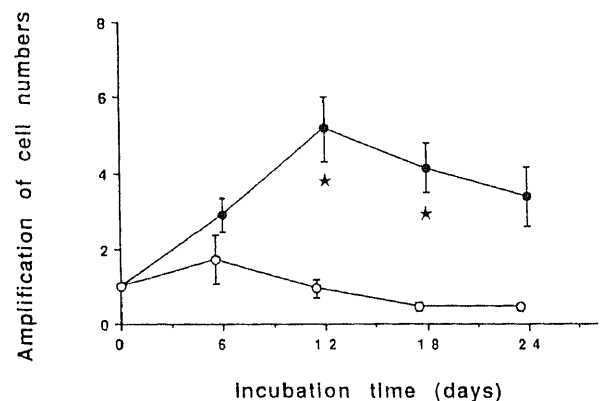


Fig. 8. Amplification of CD34 positive cell numbers of cord blood CD34 positive cells incubated in a liquid culture medium containing 10% FBS or 10% cord plasma with IL-3+IL-6+SCF. Data were shown by the amplification ratio of the cell numbers as compared to the cell number of day 0. Each point represents the mean \pm SEM. ★ $p \leq 0.005$ as compared to cord plasma culture system. ●, FBS; ○, cord plasma.

(day 0) のコロニー自体臍帯血より少なく、特に BFU-E に有意差を認めた ($p < 0.05$)。また液体培養開始後も骨髄と臍帯血間には CFU-Mix を除いてコロニー数に有意差を認めた。末梢血の CFU-GM-d7, CFU-GM-d14 を臍帯血と比較すると経時的にみても、有意に少なかった ($p < 0.05$)。なお骨髄、末梢血の間には特に有意差は認めなかった。

V. FBS 液体培養系とヒト臍帯血漿液体培養系の比較 (図 7, 8, 9)

図 7 はヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を FBS 液体培養系またはヒト臍帯血漿液体培養系で培養した時の総細胞数を示す。42 日間培養した限りでは FBS 液体培養系の方がやや総細胞数が多い感があったが、両者間には有意差は認めなかった。培養 36 日目で臍帯血漿液体培養系は 446 ± 140 倍 (最高 1,200 倍)、FBS 液体培養系は前述のごとく培養 54 日目に $2,050 \pm 830$ 倍 (最高 3,070 倍) となった。図 8 は、両培養系における CD34 陽性細胞数の経時的变化を示す。臍帯血漿液体培養系での CD34 陽性細胞は総細胞数ほどの増幅度は見られずむしろ FBS 液体培養系に比べ明らかに少なかった。ピークも早く培養 6 日目で 1.7 ± 0.6 倍 (最高 5.3 倍) であり、培養 12 日目、18 日目で両者間に有意差が認められた ($p \leq 0.005$)。次にコロニー形成能であるが、図 9 に示すごとく CFU-GM は FBS 液体培養系の方が多かった。一方 CFU-E, BFU-E では、FBS 液体培養系は培養初期 (6 日目) にピークがあり、ヒト臍帯血漿液体培養系はやや遅れて培養 12 日目頃にピークを認めた。ただし統計学的有意差

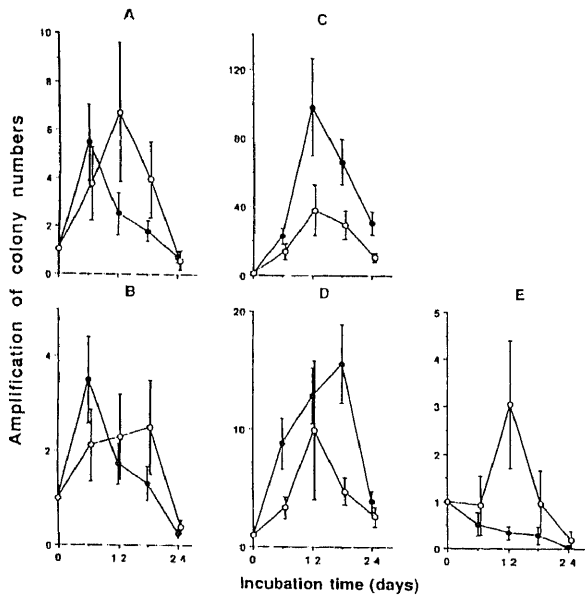


Fig. 9. Amplification of colony numbers of cord blood CD34 positive cells after incubation in a liquid culture medium containing IL-3+IL-6+SCF. A, colony forming unit-erythroid (CFU-E); B, burst forming unit-erythroid (BFU-E); C, colony forming unit-granulocyte/macrophage counted after incubation for 7 days (CFU-GM-d7); D, colony forming unit-granulocyte/macrophage counted after incubation for 14 days (CFU-GM-d14); E, colony forming unit-mix (CFU-Mix). After incubation for 6 to 24 days, cells were harvested and prepared for assays of colonies as described in "Materials and Methods". Data were shown by the amplification ratio of the colony numbers as compared to the colony numbers of day 0. Each point represents the mean \pm SEM. ●, FBS; ○, cord plasma.

はなかった。

VI. FBS を使用したコロニー形成とヒト臍帯血漿を使用したコロニー形成の比較 (図 10)

図 10 は臍帯血 CD34 陽性細胞を FBS 液体培養系で培養した後、経時的に採取し、FBS コロニー形成系およびヒト臍帯血漿コロニー形成系で形成されたコロニー数を示す。CFU-E, BFU-E は有意にヒト臍帯血漿コロニー形成系の方が多く ($p < 0.05$)、FBS コロニー形成系の培養開始時のコロニー数 (コントロール) に比べ培養 6 日目に CFU-E は 12.1 ± 3.0 倍 (最高 37.9 倍) BFU-E は 7.4 ± 1.4 倍 (最高 17.0 倍) のコロニーを形成した (FBS コロニー形成系では CFU-E が 5.5 ± 1.6 倍, BFU-E が 3.5 ± 0.9 倍)。加えてコロニーサイズも明らかにヒト臍帯血漿コロニー形成系の方が大きかった。CFU-GM は全体的に FBS コロニー形成系の方が多く、特に CFU-GM-d14 では培養開始時より培養 12 日目まで有意差を認めた ($p < 0.05$)。

VI. 抗サイトカイン抗体および抗 *c-kit* 抗体によるヒト臍帯血 CD34 陽性細胞の増殖抑制 (図 11, 図 12, 図 13, 表 1)

図 11 はヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を FBS 液体培養系において培養した後、FBS を使用してコロニーを形成させる時点でサイトカイン (IL-3+IL-6+SCF+G-CSF+EPO) に抗体 *c-kit* 抗体 (SR-1, 1:1,000) を加えコロニー形成の抑制を経時的にみた

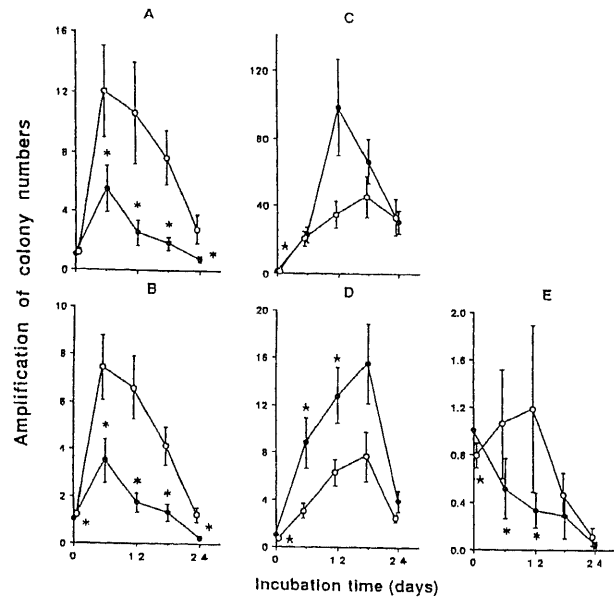


Fig. 10. Comparison between FBS and cord plasma in the amplification of colony formation of cord blood CD34 positive cells. A, colony forming unit-erythroid (CFU-E); B, burst forming unit-erythroid (BFU-E); C, colony forming unit-granulocyte/macrophage counted after incubation for 7 days (CFU-GM-d7); D, colony forming unit-granulocyte/macrophage counted after incubation for 14 days (CFU-GM-d14); E, colony forming unit-mix (CFU-Mix). After incubation for 6 to 24 days, cells were harvested and prepared for assays of colonies in a semi-solid culture medium containing 30% FBS or 30% cord plasma as described in "Materials and Methods". Data were shown by the amplification of the colony numbers compared to the colony numbers of day 0 in FBS culture system. Each point represents the mean \pm SEM. ★ $p < 0.05$ (FBS > cord plasma) and * $p < 0.05$ (FBS < cord plasma) as compared to cord plasma. ●, FBS; ○, cord plasma.

ものである。なお結果はそれぞれの日の抗体を加えなかったものをコントロールとした比で表した。CD34 陽性細胞分離時 (day 0) におけるコロニー抑制は BFU-E, CFU-GM-d7, CFU-GM-d14 で有意差を認めた (BFU-E, $p < 0.001$; CFU-GM-d7, $p < 0.001$; CFU-GM-d14, $p < 0.05$)。赤芽球系の抑制はその後も顕著となり CFU-E も培養 6 日目 (day 6) より有意に抑制された ($p < 0.001$)。一方顆粒球系・マクロファージ系に関しては逆の傾向を認め、CFU-GM-d7 は培養 6 日目を降はコントロールと有意差は認めず、CFU-GM-d14 も培養 12 日目 (day 12) にはコントロールと有意差は認めなくなった。CFU-Mix は培養開始時でコントロールに比べ有意に抑制されていたが ($p < 0.001$) それ以降はコントロール自体コロニー形成少なく統計学的評価は行われなかった。図12は図11で使用した FBS コロニー形成系の代わりにヒト臍帯血血漿コロニー形成系を使い、サイトカインも SCF を除いた IL-3+IL-6+G-CSF+EPO の組み合わせで行なった結果を示す。ヒト臍帯血血漿コロニー形成系における SR-1 による抑制試験では FBS コロニー形成系の場合と違い、どの時期においても、どの系統の

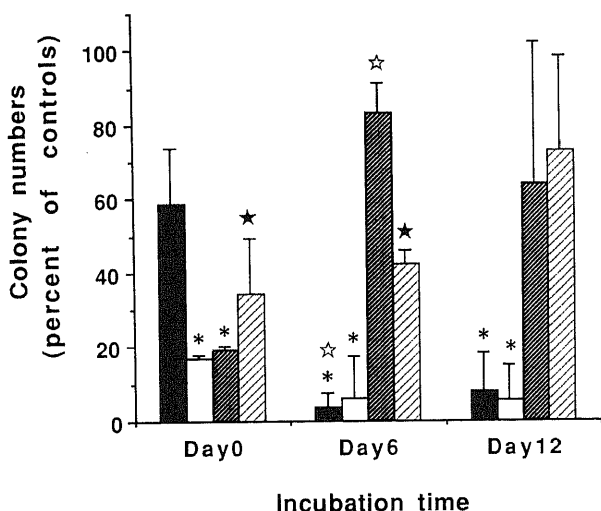


Fig. 11. Suppressive effect of anti-*c-kit* antibody, SR-1, on colony formation from cord blood CD34 positive cells in the FBS culture system. Data were shown by percent of the controls without SR-1. Each bar represents the mean±SEM. * $p < 0.001$, ★ $p < 0.05$ as compared to colony formation without SR-1. ☆ $p < 0.01$ as compared to day 0 colony formation. ■, CFU-E; ▨, BFU-E; ▩, CFU-GM-d7; □, CFU-GM-d14.

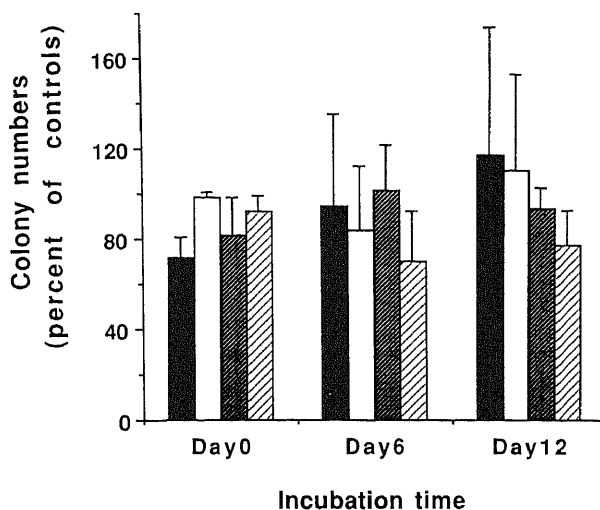


Fig. 12. Suppressive effect of anti-*c-kit* antibody, SR-1, on colony formation from cord blood CD34 positive cells in the cord plasma culture system not including SCF. Data were shown by percent of the controls without SR-1. Each bar represents the mean±SEM. ■, CFU-E; □, BFU-E; ▨, CFU-GM-d7; ▩, CFU-GM-d14.

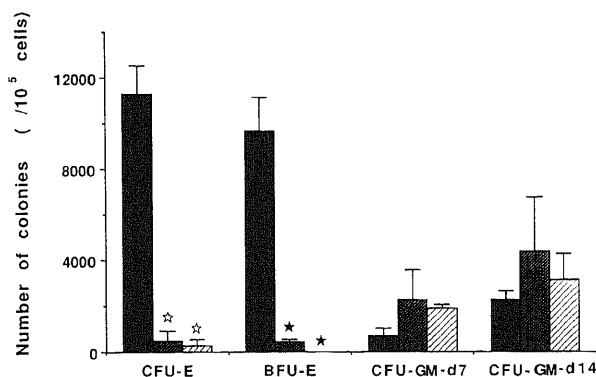


Fig. 13. Suppressive effects of anti-EPO antibody on colony formation from cord blood CD34 positive cells. Data were shown by the colony numbers/ 10^5 cells. Each bar represents the mean±SEM. ☆ $p < 0.05$ and ★ $p < 0.005$ as compared to the control (without anti-EPO antibody). ■, control; ▨, anti-EPO antibody 0.67 μg/ml; ▩, anti-EPO antibody 6.7 μg/ml.

Table 1. Suppressive effects of anti-GM-CSF antibody on hematopoietic progenitor cell colonies

Sample	Number of colonies/ 10^5 CD34 positive cells				
	CFU-E	BFU-E	CFU-GM (day 7)	CFU-GM (day 14)	CFU-Mix
Cord blood 1					
Control	2,800	11,067	2,178	2,844	667
Anti-GM-CSF 1 : 800	3,156	11,400	578	1,533	600
Anti-GM-CSF 1 : 160	4,400	12,222	533	1,333	577
Cord blood 2					
Control	1,040	1,467	640	1,333	107
Anti-GM-CSF 1 : 800	1,147	960	480	773	187

Cord blood CD34 positive cells were prepared for assays of colonies in a semi-solid culture medium containing 30% cord plasma and SCF+IL-3+IL-6+EPO+G-CSF with or without anti-GM-CSF antibody.

ローも有意に抑制されなかった。ただし結果は示していないが SCF を加えたものと比較すると SCF を除いたものは赤芽球系のコロニーの数、大きさとも減少していたがそれでも FBS コロニー培養系、IL-3+IL-6+SCF+G-CSF+EPO 添加群と同等あるいはそれ以上の赤芽球系コロニーを形成した。図13はヒト臍帯血を使用したコロニー形成に対するウサギ抗 EPO 抗血清の影響を示す。IL-3+IL-6+SCF を組み合わせたものをコントロールとし、ウサギ抗 EPO 抗血清を 0.67 μ g/ml または 6.7 μ g/ml 加え、コロニー数の変動を調べた。CFU-E、BFU-E 共に 0.67 μ g/ml で有意差をもって抑制された (CFU-E, $p < 0.05$; BFU-E, $p < 0.005$)。表 1 はヒト臍帯血コロニー形成系に対するウサギ抗 GM-CSF 抗血清の抑制を示す。ヒト臍帯血コロニー形成系にサイトカインとして IL-3+IL-6+SCF を加えたものをコントロールとしたが、臍帯血 1 (cord blood 1), 臍帯血 2 (cord blood 2) 共に顆粒球系・マクロファージ系は 25~75% 抑制されたが、赤芽球系は有意な抑制は認めなかった。

考 察

発生学的に造血は、マウスにおいて胎生 7-12 日頃より卵黄嚢にて始まり、胎生 12 日目以降、肝臓に移りそして骨髄へと移って行く。この造血の場の移動はヒトでも同様で、誕生後もその生体の流血中及び臍帯血には多数の血液幹細胞が含まれ、また GVHD が少ないことから臍帯血幹細胞移植が骨髄移植の代用として試みられるようになった。しかし移植を行なうにあたっては、例えば、Wagner ら²⁴の施設で使用した臍帯血量は 103 \pm 49ml でさらに胎盤静脈より 31 \pm 61ml 採取しており、一般にこの量の臍帯血を採取するのは困難を要し、臍帯血幹細胞移植の普及に大きな障壁になっている。自己複製能力を有する血液幹細胞および各系統の血液前駆細胞の体外増幅が今後の重大な研究課題となるゆえである。またその背景には近年造血幹細胞における *c-kit* の発現およびそのリガンドである SCF の発見が大きく貢献している。従来再生不良性貧血および Diamond-Blackfan 貧血のモデルマウスとして有名な W 突然変異の W/W^o マウスおよび Sl 突然変異の Sl/Sl^o マウスの分子生物学的解明がなされ^{6, 123, 31-33}, W 遺伝子はチロシンキナーゼ型受容体である *c-kit* をコードし、Sl 遺伝子は *c-kit* のリガンドである SCF をコードしていることが判明した。この *c-kit*, SCF は生体内では生殖細胞、色素細胞、神経細胞、血液細胞に分布しており、特に胎生期において前述した造血の場の移動に一致して *c-kit*, SCF 遺伝子の発現も移ってゆき、以前の造血の場における *c-kit*, SCF 遺伝子の発現量は発生が進むにつれ減少していくことが報告されている³⁴⁻³⁶。また、*c-kit* を発現している血液細胞株としては、肥満細胞株、赤芽球細胞株、骨髄球系細胞株、巨核球系細胞株、多能性造血前駆細胞株などがあげられ、このリガンドである SCF は、非常に未熟な細胞に働くサイトカインとされている。

SCF は単独ではほとんど細胞増殖活性を持たない各種のサイトカインと協同し *c-kit* を発現している上記細胞に対し増殖促進作用が示されている。従来マウス、ヒトの骨髄細胞を使用した報告が多いが³⁷⁻⁴⁰, 臍帯血造血幹細胞の増幅に関する発表は少ない。Broxmeyer ら¹⁰は、未分画臍帯血を SCF と他のサイトカインを組み合わせて培養することにより、血液前駆細胞を他のサイトカインのみに比べ 2~16 倍に増幅されたと報告しており、また Migliaccio ら⁴¹は SCF+IL-3 の条件下で臍帯血

SBA 陰性 CD34 陽性細胞を培養しコロニー形成細胞を 20 倍近くまで増幅した。さらに Mayani ら⁴²は、臍帯血より CD34 陽性 45RA 弱陽性 CD71 弱陽性細胞を分画し SCF に IL-3, IL-6, GM-CSF, さらに EPO, G-CSF, マクロファージコロニー形成刺激因子 (recombinant human macrophage colony stimulating factor, M-CSF) を加え CD34 陽性細胞を 123 倍まで、顆粒球系前駆細胞を 70 倍まで、赤芽球系前駆細胞を 55 倍まで、多能性前駆細胞を 4 倍に増幅させた。今回の著者の実験においても、SCF と未分化な細胞に働くと考えられているサイトカインの IL-3+IL-6 の組み合わせが、臍帯血の NAC および CD34 陽性細胞に対して著明な細胞増殖を促すことが示された。特に CD34 陽性細胞分画は、IL-3+IL-6+SCF による液体培養下で、総細胞数は増え続け約 50 日目には培養開始時の約 2,000 倍となり、従来の報告に比べ非常に大きな増幅率であった。一方 SCF は、GM-CSF と組み合わせても明らかな細胞増殖を促すことが認められており³⁷⁻³⁹, IL-3+GM-CSF の組み合わせについて Saeland らによれば、臍帯血 CD34 陽性細胞の液体培養では IL-3 の方が GM-CSF より素早くかつ強力に細胞増殖に働くが、両者の組み合わせは特に好酸球コロニーに相乗的に働くとしている⁴³。同様の促進作用は他の研究者によっても認められているが⁴⁴⁻⁴⁶, 今回の著者の実験条件では、GM-CSF の添加培養後の総細胞数および CD34 陽性細胞数を、GM-CSF 非添加群と比較したが両者間には有意差は認めなかった。また Shiohara ら⁴⁰によって以前は血液前駆細胞の抑制因子として知られていた IFN- γ がマウスの SCF と共に骨髄球系産生の幼若細胞に働いて細胞のサイトカインに対する反応性を促進するとする報告がされた。また Caux ら⁴⁷によりヒト CD34 陽性細胞に対しても同様の効果があったことが示されている。しかし著者の実験では SCF+IL-3+IL-6 の培養系における IFN- γ の相加相乗作用について、IFN- γ 添加群と非添加群の総細胞数、CD34 陽性細胞数を比較したが両者間には共に有意差は認めなかった。いずれも培養系、各サイトカインの濃度など実験条件の違いによると考えられた。

総細胞数増幅といった面においては SCF 添加した著者の培養系は確かに有効であったが、増幅された細胞は光顕的にも分化傾向がみられ、CFU-GM-d7 や CFU-E が増加したごとく血球各系統に分化が進んでしまっていた。臍帯血幹細胞移植で最も必要とする細胞は多分化能と自己複製能を有する最も未熟な造血幹細胞と、コロニー形成前駆細胞の中でも、より未熟な CFU-Mix や CFU-GM-d14 や BFU-E である。本研究の自己複製能に関しては、1) CD34 陽性細胞数は培養 12 日目までは約 5 倍に増えるがそれ以降は減少する、2) コロニー形成能について FBS 培養系では幼若な細胞と考えられる CFU-Mix は特にピークを作ることなく減少する、3) CFU-GM-d14 も培養 18 日目に一時は 15 倍まで増幅されるがその後減少する、4) BFU-E も培養 6 日目の 3.5 倍をピークとし以後減少する。という結果であった。以上より考えると今回の実験条件では、細胞は培養によって分化の方向に進む傾向があり、自己複製能を有する造血幹細胞の体外増幅については十分に満足できるものではなかった。ちなみにこれまでの臍帯血幹細胞移植成功例を見ると、全体で 5~60 \times 10⁶ 個 (21.5 \pm 3.1 \times 10⁶) の CFU-GM が移植されている²⁰。著者の今回の体外増幅実験では臍帯血 20ml から得られる CFU-GM は必要量の約 21% であり、それから計算すると移植に必要な臍帯血量としては約 90ml と思われた。

しかしそれほど大量な臍帯血を採取することは現実には困難なことが多く、さらなる幹細胞増幅が必要であると考えられた。

本研究ではヒト臍帯血と骨髓、末梢血における造血幹細胞増幅の差についても検討した。臍帯血と骨髓では総細胞数、CD34 陽性細胞数、コロニー数いずれをとっても臍帯血がより大きく増幅されており、臍帯血にも、より多くの幼若な血液前駆細胞の存在が考えられた。Carow ら⁴⁸⁾は臍帯血と骨髓の顆粒球/赤芽球/マクロファージ/巨核球コロニー形成細胞 (colony forming unit-granulocyte/erythrocyte/macrophage/megakaryocyte, CFU-GEMM) を再コロニー形成した結果、臍帯血は再び CFU-GEMM を形成したが骨髓はほとんど CFU-GEMM は形成せず、ほとんどがより分化した CFU-GM であり臍帯血の方がより多くの幼若な血液前駆細胞が存在すると報告している。末梢血中にも CD34 陽性細胞は 0.9%~5.6% 存在し⁴⁹⁾、今回著者が臍帯血と同様な方法で分離した結果では、総細胞数をみるかぎり臍帯血とはほぼ同等であった。CD34 陽性細胞数は症例が少なく統計学的評価はできなかつたが、末梢血においては、臍帯血と同等あるいは臍帯血と骨髓の中間の分化段階、および量の血液前駆細胞の存在が考えられた。

以上までの実験において今回の SCF を含んだサイトカインの組み合わせによる FBS 培養系は総細胞数の著明な増幅には明らかに有効であることは示されたが、血液幹細胞の自己複製促進およびその数の維持に関しては満足のものではなく、新しいサイトカインおよび新しいサイトカインの組み合わせの必要性が考えられた。

本研究では、造血の場の微小環境を多少でも提供する目的で自己および同種臍帯血血漿を培養系に添加することを試みた。総細胞数は FBS 培養系と臍帯血血漿培養系の間には有意差はなかったが、CD34 陽性細胞数は培養 6 日目、12 日目で有意差を認め FBS 培養系の方が多かった。培養中の細胞を形態学的にみても臍帯血培養系の方がより分化した細胞を認め、これは臍帯血血漿中に、未熟な細胞に働くと思われるサイトカインと同時に存在する、分化方向に働くサイトカインによる影響と思われる。

コロニー形成能についてみると、CFU-GM は FBS 液体培養系の方が多く、より未熟な CFU-Mix は臍帯血血漿液体培養系の方が FBS 液体培養系より経時的にみても多く形成された。また BFU-E に関しては FBS 液体培養系より臍帯血血漿液体培養系の方がピークが遅くかつより多く形成されたことより、臍帯血血漿液体培養系は FBS 液体培養系より、より未熟な血液前駆細胞特に赤芽球系の細胞を増幅し長期に保持できる可能性が示唆された。この性質は、他人の臍帯血血漿を使っても同様の結果が得られた。Zsebo らのグループは BFU-E の増殖には SCF の影響が大きいことを報告しており⁵⁰⁾⁵¹⁾、著者の結果は臍帯血中の SCF の作用かもしれない。FBS コロニー形成系に抗 *c-kit* 抗体である SR-1 を添加しコロニー形成の抑制をみると赤芽球系の抑制は長期間持続したのに対して、顆粒球・マクロファージ系は培養 12 日目以降では抑制されなかったことは興味深い。これは、*c-kit* の発現が赤芽球系と顆粒球・マクロファージ系の分化過程で差があり、赤芽球系の方が分化増殖に長期間 *c-kit* を必要とするのに対し、顆粒球・マクロファージ系は比較的早期に *c-kit* の発現が消失するか、たとえ *c-kit* が発現していてもそれを必要としない細胞集団が出現することが示

唆された。しかし SR-1 の赤芽球系のコロニーの抑制は臍帯血血漿コロニー形成系では FBS コロニー形成系で認めるほど著明ではなく単に SCF の作用のみではなく他の因子の関与が示唆された。

さらに臍帯血血漿コロニー形成系に抗 EPO, GM-CSF 抗体血清を加えコロニー形成の抑制をみたが、赤芽球系のコロニーを抑制できたのは抗 EPO 抗体血清のみであった。しかし以前の報告では⁵²⁾⁵³⁾臍帯血中の EPO 濃度は、今回のコロニー形成系に加えた量に比べはるかに少なく、前記のような臍帯血血漿の特性が EPO 単独によるものとは考えにくい。また他のサイトカインの臍帯血血漿中の濃度も培養液に加えた量と比べはるかに少なく無視しうるものと思われた。さらに SCF についても臍帯血血漿コロニー形成系において SCF 非添加群では添加群と比較し明らかなコロニーのサイズ、数の減少を認めており、臍帯血血漿中の SCF 濃度が著しく高いとは考えられない。臍帯血血漿中にはインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF 1 および IGF 2) がありこれが赤芽球系の造血を EPO とは独立して促すことが示されている⁵⁶⁾⁶¹⁾。しかし血中 IGF の濃度は臍帯血よりもむしろヒト成人末梢血の方が高い⁶²⁾⁶⁴⁾。Metcalf ら⁶⁵⁾の報告では一部のヒト末梢血血漿で赤芽球系コロニーをつくるとの報告もあるが、著者の検討では正常ヒト血漿を使用してコロニー形成を試みたがコロニーは形成されなかった (未発表)。臍帯血血漿中の赤芽球系前駆細胞の増殖を促す因子は特定できなかったが、臍帯血中の赤芽球系増殖は EPO を中心に IL-3, IL-6, SCF またはその他の因子が複雑に相互作用をなしているものと思われる。

以上臍帯血幹細胞移植を念頭におき造血幹細胞の体外増幅の基礎的研究を行なった。現在のところ血液幹細胞の自己複製のみに働く因子は見つかっておらず今後、新たなサイトカインの発見、およびその組み合わせ、培養条件の工夫がなされ、臍帯血幹細胞移植がより身近なものとなることが望まれる。

結 論

ヒト臍帯血造血幹細胞培養を行ない以下の結論を得た。

1. ヒト臍帯血造血幹細胞の培養において著者の培養条件では、IL-3+IL-6+SCF の組み合わせが最も効率良く細胞を増加させたが、自己複製率は数倍に留まり十分に有効と言えなかった。
2. 上記サイトカインの組み合わせに GM-CSF または IFN- γ を加えても有意な効果はなかった。
3. ヒト臍帯血と骨髓、末梢血との比較では臍帯血に、より多数の造血幹細胞が存在した。
4. 培養液として臍帯血血漿を使用した場合、CD34 陽性細胞数は FBS 培養系よりも少なかったが、CFU-Mix, BFU-E コロニー形成が多く、臍帯血血漿は、より未熟な血液前駆細胞、特に赤芽球系細胞の長期間保持、および分化誘導に有効であることが示唆された。
5. 赤芽球系前駆細胞と顆粒球/マクロファージ系前駆細胞では *c-kit* の発現には差があり赤芽球系分化、増殖には長期間 *c-kit* の発現が関与するのに対し、顆粒球/マクロファージ系は比較的早期より *c-kit* が消失することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に心

よりの深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を頂きました小泉晶一助教授、片山啓太先生、市原強先生ら小児科血液グループに深謝いたします。また CD34 陽性細胞をソーティングして頂いた宮脇利男講師、関秀俊講師、谷内江昭宏助手に深謝いたします。さらに教室員の諸先生方に深謝いたします。研究遂行に当たり貴重な検体を提供していただきました石川県立中央病院産婦人科矢吹朗彦先生をはじめ諸先生方、ならびに同病院小児科畑田成紀先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ogawa, M.: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 81, 2844-2853 (1993).
- 2) Till, J. E. & McCulloch, E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, 14, 212-222 (1961).
- 3) Pike, B. L. & Rorinson, W. A.: Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J. Cell. Physiol.*, 76, 77-84 (1970).
- 4) Worton, R. G., McCulloch, E. A. & Till, J. E.: Physical separation of hematopoietic stem cells from colonies in culture. *J. Cell. Physiol.*, 74, 171-182 (1969).
- 5) Bodine, D. M., Orlic, D., Birkett, N. C., Seidel, N. E. & Zsebo, K. M.: Stem cell factor increases colony-forming unit-spleen number in vitro in synergy with interleukin-6, and in vivo in *Sl/Sl^d* mice as a single factor. *Blood*, 79, 913-919 (1992).
- 6) Zsebo, K. M., Wypych, J., McNiece, I. K., Lu, H. S., Smith, K. A., Karkare, S. B., Sachdev, R. K., Yuschenkoff, V. N., Birkett, N. C., Williams, L. R., Satyagal, V. N., Tung, W., Bosselman, R. A., Mendiaz, E. A. & Langley, K. E.: Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from Buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell*, 63, 195-201 (1990).
- 7) Martin, F. H., Suggs, S. V., Langley, K. E., Lu, H. S., Ting, J., Okino, K. H., Morris, C. F., McNiece, I. K., Jacobsen, F. W., Mendiaz, E. A., Birkett, N. C., Smith, K. A., Johnson, M. J., Parker, V. P., Flores, J. C., Patel, A. C., Fisher, E. F., Erjavec, H. O., Herrera, C. J., Wypych, J., Sachdev, R. K., Pope, J. A., Leslie, I., Wen, D., Lin, C. H., Cupples, R. L. & Zsebo, K. M.: Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*, 63, 203-211 (1990).
- 8) Anderson, D. M., Lyman, S. D., Baird, A., Wignall, J. M., Eisenman, J., Rauch, C., March, C. J., Boswell, H. S., Gimpel, S. D., Cosman, D. & Williams, D. E.: Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*, 63, 235-243 (1990).
- 9) Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Ness, K. V., March, C. J., Park, L. S., Martin, U., Mochizuki, D. Y., Boswell, H. S., Burgess, G. S., Cosman, D. & Lyman, S. D.: Identification of a ligand for the *c-kit* proto-oncogene. *Cell*, 63, 167-174 (1990).
- 10) Flangan, J. G. & Leder, P.: The *kit* ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell*, 63, 185-194 (1990).
- 11) Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Brody, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R. Y., Birkett, N. C., Okino, K. E., Smith, K. A., Takeishi, T., Cattanaach, B. M., Galli, S. J. & Suggs, S. V.: Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the *c-kit* tyrosine kinase receptor, *Cell*, 63, 213-224 (1990).
- 12) Huang, E., Nocka, K., Beier, D. R., Chu, T. Y., Buck, J., Lahm, H. W., Wellner, D., Leder, P. & Besmer, P.: The hematopoietic growth factor KL is encoded by the *Sl* locus and is the ligand of the *c-kit* receptor, the gene product of the *W* locus. *Cell*, 63, 225-233 (1990).
- 13) Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F. & Shaper, J. H.: Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.*, 133, 157 (1984).
- 14) Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Miura, Y. & Suda, T.: Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express *c-kit* molecule. *Blood*, 78, 1706-1712 (1991).
- 15) Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, I. & Boyse, E. A.: Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3828-3832 (1989).
- 16) Broxmeyer, H. E., Hangoc, G., Cooper, S., Ribeiro, R. C., Graves, V., Yodaer, W., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L. & Rubinstein, P.: Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation of adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4109-4113 (1992).
- 17) Broxmeyer, H. E., Hangoc, G. & Cooper, S.: Clinical and biological aspects of human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.*, 9 (suppl. 1), 7-10 (1992).
- 18) Ueno, Y., Koizumi, S., Yamagami, M., Miura, M. & Taniguchi, N.: Characterization of hematopoietic stem cells (CFUc) in cord blood. *Exp. Hematol.*, 9, 716-722 (1981).
- 19) Thierry, D., Hervatin, F., Traineau, R., Brossard, Y., Stark, R., Benbunan, M. & Gluckman, E.: Hematopoietic progenitor cells in cord blood. *Bone Marrow Transplant.*, 9 (suppl. 1), 101-103 (1992).
- 20) Hows, J. M., Marsh, J. C. W., Bradley, B. A., Luft, T., Coutinho, L., Testa, N. G. & Dexter, T. M.: Human cord blood: a source of transplantable stem cell? *Bone Marrow Transplant.*, 9, (suppl. 1), 105-108 (1992).
- 21) Meister, B., Sperl, W., Tötsch, M. & Hunter, O.: Umbilical cord blood progenitor cells for clinical transplantation. *Lancet*, 340, 1408 (1992).
- 22) Reisbach, G., Bartke, I., Kostka, G., Ellwart, J., Birner, A., Thalmeier, K., Mahammer, R., Bornkamm, G. W., Ullrich, A. & Dörmer, P.: Characterization of

- hematopoietic cell populations from human cord blood expressing *c-kit*. *Exp. Hematol.*, **21**, 74-79 (1993).
- 23) Gluckman, E. I., Broxmeyer, H. E., Auerbach, A. D., Friedman, H. S. & Douglas, G. W.: hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.*, **321**, 1174-1178 (1989).
- 24) Wagner, J. E.: Umbilical cord blood stem cell transplantation. *Am. J. Pediatr. Hematol./Oncol.*, **15**, 169-174 (1993).
- 25) Vilmer, E., Sterkers, G., Rahimy, C., Denamur, E., Elion, J., Broyart, A., Lescoeur, B., Tiercy, J. M., Gerota, J. & Blot, P.: HLA-mismatched cord-blood transplantation in a patient with advanced leukemia. *Transplantation*, **53**, 1155-1157 (1992).
- 26) Wagner, J. E., Broxmeyer, H. E., Byrd, R. L., Zehnbauser, B., Schmeckpeper, B., Shah, N., Griffin, C., Bias, W. & Santos, G. W.: Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood*, **79**, 1874-1881 (1992).
- 27) Reisner, Y., Kapoor, N., Hodes, M. Z., O'Reilly, R. J. & Good, R. A.: Enrichment for CFU-C from Murine and human bone marrow using soybean agglutinin. *Blood*, **59**, 360-363 (1982).
- 28) Broudy, V. C., Lin, N., Zsebo, K. M., Birkett, N. C., Smith, K. A., Bernstein, I. D. & Papayannopoulou, T.: Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human *c-kit* receptor. *Blood*, **79**, 338-346 (1992).
- 29) Iscove, N. N., Senn, J. S., Till, J. E. & McCulloch, E. A.: Colony formation by normal and leukemic human bone marrow cells in culture: effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood*, **37**, 1-5 (1971).
- 30) Horita, S., Koizumi, S., Miura, M., Nakarai, T., Saikawa, Y., Katayama, K. & Taniguchi, N.: Impaired ability of T4⁺ lymphocytes in active stage of congenital hypoplastic anemia to promote in vitro growth of blood erythroid burst forming units (BFU-E). *Acta hematol. JPN.*, **51**, 985-993 (1988).
- 31) Geissler, E. N. & Ryan, M. A.: The dominant-white spotting (*W*) locus of the mouse encodes the *c-kit* proto-oncogene. *Cell*, **55**, 185-192 (1988).
- 32) Tan, J. C., Nocka, K., Ray, P., Tratman, P. & Besmer, P.: The dominant *W*⁴² spotting phenotype result from a missense mutation in the *c-kit* receptor kinase. *Science*, **247**, 209-212 (1990).
- 33) Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Cho, B. C., Donovan, P. J., Jenkins, N. A., Cosman, D., Anderson, D., Lyman, S. D. & Williams, D. E.: Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell*, **63**, 175-183 (1990).
- 34) Matsui, Y., Zsebo, K. M. & Hogan, B. L. M.: Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the *Sl* locus and the ligand for *c-kit*. *Nature*, **347**, 667-669 (1990).
- 35) Orr-Urteger, A., Avivi, A., Zimmer, Y., Givol, D., Yarden, Y. & Lonai, P.: Developmental expression of *c-kit*, a proto-oncogene encoded by the *W* locus. *Development*, **109**, 911-923 (1990).
- 36) Manova, K. & Bachvarova, R. F.: Expression of *c-kit* encoded at the *W* locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblasts. *Developmental Biology*, **146**, 312-324 (1991).
- 37) McNiece, I. K., Langley, K. E. & Zsebo, K. M.: Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp. Hematol.*, **19**, 226-231 (1991).
- 38) Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Lu, L., Hangoc, G., Anderson, D., Cosman, D., Lyman, S. D. & Williams, D. E.: Effect of murine mast cell growth factor (*c-kit* proto-oncogene ligand) on colony formation by human marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **77**, 2142-2149 (1991).
- 39) Ulich, T. R., Castillo, J., McNiece, I. K., Yi, E. S., Alzona, C. P., Yin, S. & Zsebo, K. M.: Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) or granulocyte-macrophage CSF synergistically increases granulopoiesis in vivo. *Blood*, **78**, 1954-1962 (1991).
- 40) Shiohara, M., Koike, K. & Nakahata, T.: Synergism of interferon- γ and stem cell factor on the development of murine hematopoietic progenitors in serum-free culture. *Blood*, **81**, 1435-1441 (1993).
- 41) Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Druzin, M. L., Giardina, P. J. V., Zsebo, K. M. & Adamson, W.: Long-term generation of colony-forming cells in liquid culture of CD34⁺ cord blood cells in the presence of recombinant human stem cell factor. *Blood*, **79**, 2620-2627 (1992).
- 42) Mayani, H., Dragowska, W. & Lansdorp, M.: Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood*, **81**, 3253-3258 (1993).
- 43) Saeland, S., Caux, C., Favre, C., Duvert, V., Joséphe, M. P., Mannoni, P. & deVries, J. E.: Combined and sequential effect of human IL-3 and GM-CSF on the proliferation of CD34⁺ hematopoietic cells from cord blood. *Blood*, **73**, 1195-1201 (1989).
- 44) Migliaccio, G., Migliaccio, A. R. & Adamson, J. W.: In vitro differentiation of human granulocyte/macrophage and erythroid progenitor: comparative analysis of the influence of recombinant human erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, and IL-3 in serum-supplemented and serum-depleted cultures. *Blood*, **72**, 248-256 (1988).
- 45) Sieff, C. A., Niemeyer, C. M., Nathan, D. G., Ekern, S. C., Bieber, F. R., Yang, Y. C., Wong, G. & Clark, S. C.: Stimulation of human hematopoietic colony formation by recombinant gibbon multi-colony-stimulating factor or interleukin 3. *J. Clin. Invest.*, **80**, 818-823 (1987).
- 46) Bot, F. J., Dorssers, L., Wagemaker, G. &

Löwenberg, B.: Stimulation spectrum of human recombinant multi-CSF (IL-3) on human marrow precursors: importance of accessory cells. *Blood*, **71**, 1609-1614 (1988).

47) Caux, C., Moreau, I., Saeland, S. & Banchereau, J.: Interferon- γ enhances factor-dependent myeloid proliferation of human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **79**, 2628-2635 (1992).

48) Carow, C. E., Hangoc, G., Cooper, S. H., Williams, D. E. & Broxmeyer, H. E.: Mast cell growth factor (*c-kit* ligand) supports the growth of human multipotential progenitor cells with a high replating potential. *Blood*, **78**, 2216-2221 (1991).

49) Fritsch, G., Emminger, W., Buchinger, P., Printz, D. & Gadner, H.: CD34-positive cell proportions in peripheral blood correlate with colony-forming capacity. *Exp. Hematol.*, **19**, 1079-1083 (1991).

50) Dai, C. H., Krantz, S. B. & Zsebo, K. M.: Human burst-forming unit-erythroid need direct interaction with stem cell factor for further development. *Blood*, **78**, 2493-2497 (1991).

51) Broudy, V. C., Mogan, D. A., Lin, N., Zsebo, K. M., Jacobsen, F. W. & Papayannopoulou, T.: Stem cell factor influences the proliferation and erythroid differentiation of the MB-02 human erythroleukemia cell line by binding to a high-affinity *c-kit* receptor. *Blood*, **82**, 436-444 (1993).

52) Meister, B., Herold, M., Mayr, A., Widschwendter, M., Maurer, H. & Sperl, W.: Interleukin-3, interleukin-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin cord blood levels of preterm and term neonates. *Eur. J. Pediatr.*, **152**, 569-573 (1993).

53) Forestier, F., Daffos, F., Catherine, N., Renard, M. & Andreux, J. P.: Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood*, **77**, 2360-2363 (1991).

54) Lin, C. H., Ju, S. H. & Wu, C. H.: Umbilical plasma erythropoietin, hematocrits and their relationship to umbilical arterial blood gas. Apgar score and perinatal risk factors. *Acta Paed. Sin.*, **31**, 90-96 (1990).

55) Ireland, R., Abbas, A., Thilaganathan, B., Melbye, O., Snijders, R., Layton, M. & Nicolaides, K. H.: Fetal and maternal erythropoietin level in normal pregnancy. *Fetal*

Diagn. Ther., **7**, 21-25 (1992).

56) Sanders, M., Sorba, S. & Dainiak, N.: Insulin-like growth factors stimulate erythropoiesis in serum-substituted umbilical cord blood cultures. *Exp. Hematol.*, **21**, 25-30 (1993).

57) Kurtz, A., Härtl, W., Jelkmann, W., Zapf, J. & Bauer, C.: Activity in fetal bovine serum that stimulates erythroid colony formation in fetal mouse liver is insulin-like growth factor I. *J. Clin. Invest.*, **76**, 1643-1648 (1985).

58) Akahane, K., Tojo, A., Urabe, A. & Takaku, F.: Pure erythropoietic colony and burst formations in serum-free culture and their enhancement by insulin-like growth factor I. *Exp. Hematol.*, **15**, 797-802 (1987).

59) Merchav, S., Tatarsky, I. & Hochberg, Z.: Enhancement of erythropoiesis in vitro by human growth hormone is mediated by insulin-like growth factor I. *Br. J. Haematol.*, **79**, 267-271 (1988).

60) Sawada, K., Krantz, S. B., Dessypris, E. N., Koury, S. T. & Sawyer, S. T.: Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor I and/or insulin for erythroid development. *J. Clin. Invest.*, **83**, 1701-1709 (1989).

61) Correa, P. N. & Axelrad, A. A.: Production of erythropoietic bursts by progenitor cells from adult human peripheral blood in an improved serum-free medium: Role of insulinlike growth factor I. *Blood*, **78**, 2823-2833 (1991).

62) Gluckman, P. D., Johnson-Barrwtt, J. J., Butler, J. H., Edgar, B. W. & Gunn, T. R.: Studies of insulin-like growth factor -I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clin Endocrinol.*, **19**, 405-413 (1983).

63) Bennet, A., Wilson, D. M., Liu, F., Nagashima, R., Rosenfeld, R. G. & Hintz, R. L.: Level of insulin-like growth factor I and II in human cord blood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **48**, 609-612 (1983).

64) 竹谷良平: インスリン様成長因子 II (IGF-II) およびその結合蛋白の生理的役割と疾患における変動. *十全医会誌*, **102**, 214-227 (1993).

65) Metcalf, D., Johnson, G. R. & Mandel, T. E.: Colony formation in agar by multipotential hemopoietic cells. *J. Cell. Physiol.*, **98**, 401-420 (1979).

Ex vivo Expansion of Cord Blood Hemopoietic Stem Cells by Stem Cell Factor (SCF) Interleukin-3 Interleukin-6 and Cord Plasma: A Fundamental Study for Cord Blood Stem Cell Transplantation Michio Konishi Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 103, 381—393 (1994)

Key words stem cell factor (SCF), *c-kit*, cord plasma, cord blood stem cell transplantation

Abstract

For the purpose of providing an enriched source of hemopoietic stem cells for cord blood (CB) transplantation, cytokine combinations including recombinant human stem cell factor (SCF, *c-kit* ligand) and cord plasma were studied for their ability to amplify, ex vivo, human CB stem cells. Unfractionated and fractionated CD34 positive human CB cells were incubated in a liquid culture medium with or without cytokine combination: SCF, recombinant human interleukin-3 (IL-3) and recombinant human interleukin-6 (IL-6). The culture medium including cytokines was changed every 6 days. At each medium change, cells were harvested and prepared for hemopoietic progenitor assays. A colony-forming unit of granulocyte/macrophage (CFU-GM) was assayed in a 0.8% methylcellulose culture system using recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). Erythroid progenitors, a burst-forming unit of erythroid (BFU-E) and a colony-forming unit of erythroid (CFU-E) were assayed by the addition of recombinant human erythropoietin (EPO). The numbers of CFU-GM, BFU-E and CFU-E colonies all increased when combined with the three cytokines, IL-3+IL-6+SCF. When the CD34 positive cell fraction was incubated in the complete liquid culture medium containing IL-3+IL-6+SCF, the total cell count continuously increased, but CFU-GM increased 15.6 ± 3.3 -fold at the peak period after 18 days incubation. BFU-E and CFU-E increased 5.5 ± 1.6 -fold and 3.5 ± 0.9 -fold respectively at the peak period after 6 days incubation. The number of self-renewal CD34 positive stem cells also increased (5.2 ± 0.9 -fold at the peak period after 6 days incubation). However, such ex vivo expansion does not appear to be sufficient for CB stem cell transplantation. The addition of recombinant human interferon- γ (IFN- γ) and recombinant human granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) were not effective in stimulating ex vivo expansion of stem cells in this experimental condition. The effects of autologous and allogeneic cord plasma were also tested in this study. Cord plasma from both origins were less effective in stimulating the ex vivo expansion of CD34 positive cells, but BFU-E and CFU-E formed in the cord plasma culture system were greatly increased in number in comparison with results using the FBS culture system. Futheswore characteristics of CB stem cells and growth factor(s) in cord plasma were examined in this work by using monoclonal antibodies against *c-kit*, GM-CSF and EPO. The anti-*c-kit* antibody suppressed BFU-E and CFU-E markedly as compared to CFU-GM, indicating some differences in the expression of *c-kit* between BFU-E/CFU-E and CFU-GM and also differences in the responsiveness of SCF among hemopoietic progenitors. From these studies, a considerable degree of ex vivo amplification of CB stem cells and hemopoietic progenitors was demonstrated in the culture system with IL-3 plus IL-6 plus SCF. However, these results were not satisfactory for CB stem cell transplantation and further studies will be needed.