

# 臍帯血中の顆粒球・マクロファージ系前駆細胞(CFU-C)の性状について

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8882">http://hdl.handle.net/2297/8882</a>

## 臍帯血中の顆粒球・マクロファージ系前駆細胞 (CFU-C) の性状について

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

上 野 良 樹

(昭和56年1月8日受付)

**Key words** Hemopoietic stem cells, CFU-C cord blood, bone marrow

造血幹細胞 hemopoietic stem cell が骨髓のみならず末梢血中にも、所謂、circulating colony forming cell (circulating CFC) としていくらか存在することは以前から良く知られていた<sup>11-14)</sup>。そして、主に、骨髓の損傷からの回復期に一致して末梢血中に多く出現することより、それは、骨髓の増殖状態を一部反映しているものと考えられてきた<sup>15-17)</sup>。しかし、その起源や役割についての明確な説明は未だ為されていない。また、最近、臍帯血や新生児期の末梢血にも造血幹細胞が存在し、しかも、その数は骨髓に匹敵する程である事が知られる様になった<sup>18-19)</sup>。新生児末梢血中の幹細胞は、生后7日目までに急速に減少していくものの、その存在の生理学的意味は重要と思われる。

一方、マウスを用いた実験では、成人マウスで正常状態でも末梢血中に多能性幹細胞 Colony Forming Unit in Spleen (CFU - S) が存在し<sup>11)</sup>、骨髓の局所的な損傷の際に、その修復にあたる事が観察されている<sup>12)</sup>、また、胎児期から新生児期のマウスの末梢血中にも、やはり造血幹細胞が存在しているが、それは造血組織の ontogeny の立場から、造血部位の移行を示す一つの過程と考えられている、つまり stem cell の最初の起源は卵黄嚢であり、さらに肝臓、骨髓と造血部位が変化するにつれて、流血中に出現し、また、その部位に応じた分化・増殖を促すとされている<sup>13)</sup>。新生児マウスの末梢血中に存在する stem cell は肝臓に由来し、骨髓に定着しつつある stem cell との報告もなされている<sup>14)</sup>。

この様な事実より、ヒト臍帯血、あるいは新生児末梢血中に存在する幹細胞は、成人の末梢血中に出現するものとは異っており、その性質を検討することは、

胎生末期から新生児期の造血能を考える上でも重要であると考えられる。本研究では、臍帯血、および新生児末梢血中の顆粒球・マクロファージ系前駆細胞 Colony Forming Unit in Culture (CFU - C) の性質を種々の面より検討し、その特徴を明らかにした。

### 対象と方法

#### (1) 対象

健康新生児の臍帯より、ヘパリン加試験管に無菌的に採取した臍帯血 (Cord Blood, CB) を用いた。生后3日目、および7日目の静脈血はビリルビン検査時に合わせ約1 mlの採血を行った。対照とした骨髓は穿刺の結果、血液学的に病的細胞を認めなかったものを用いた。成人末梢血は25才から30才の健康男性より採取した。採血は全てヘパリンを加えて行った。

#### (2) 臍帯血、末梢血、骨髓単核球の分離

ヘパリン加臍帯血4容に5%デキストラン (Dextran T 500, Pharmacia Fine Chemicals) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1容を混合し、37℃で30分静置した。得られた上清を Boyum<sup>18)</sup> の方法に従い FicolI-Isopaque (Lymphoprep, Nyegaard & Co. A/S Oslo 比重1.077) に重層し、400 × g、4℃で30分間遠心した。中間層に得られた単核細胞を、PBSで3回洗浄したのち、McCoy 5A 培養液 (Flow Laboratories) に再浮遊した。新生児および成人末梢血、骨髓穿刺液はPBSで、適宜、希釈し FicolI-Isopaque に重層し、同様に単核細胞分画を得た。トリパン青色素排泄試験による単核球の生存率はいずれも98%以上であった。

#### (3) CFU - C 定量法

Characterization of Hemopoietic Stem Cells (CFU-C) in Human Cord Blood. Yoshiki Ueno, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University.

Pike & Robinson の二重軟寒天法<sup>16)</sup>を、やや改変して<sup>17)</sup>用いた。下層にはヒト末梢白血球  $0.5 \times 10^6$  ケを 0.5% agar, 20% Fetal Calf Serum (Flow Laboratories, FCS) 加 McCoy 5 A 培地 1 ml 中にうめこみ、Colony Stimulating Factor (CSF) とした。上層には対象とする単核細胞  $1 \times 10^5$  ケを、0.32% agar, 20% FCS 加 McCoy 5 A 培地 1 ml にうめこみ、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で 7~10 日間培養後、倒立顕微鏡にて CFU-C を算定した。40 ケ以上の細胞集落をコロニー、10~39 ケのものをクラスターとした。

#### (4) 臍帯血 CFU-C の dose response curve

上層にうめこむ単核細胞数を  $0.25 \sim 4 \times 10^6$  まで段階的に増加し、コロニー数との関係のみた。単核細胞は未処理の場合と、Messner ら<sup>18)</sup>の方法に準じてプラスチックプレート内で前処理し、付着細胞を除いて得られて非付着細胞分画 (non-adherent cell fraction) の両者について実施した。

#### (5) 臍帯血 CFU-C の growth curve

CFU-C の算定を、培養開始後、1日目より毎日、行うことにより growth curve を得た。同時に後に述べる二重染色を施し、コロニーの内容についても検討を加えた。

#### (6) 臍帯血、新生児末梢血および成人末梢血の CFU-C 定量

(4), (5) の実験結果に基づき、臍帯血、新生児末梢血より分離した単核細胞の  $1 \times 10^5$  ケを上層にうめこみ、10 日間培養後コロニー数を算定した。また成人末梢血については流液中にある CFU-C が少いため上層には  $1 \times 10^6$  ケをうめこんだ。

#### (7) 軟寒天コロニー二重染色法

Yam & Li<sup>19)</sup> の二重染色を応用し軟寒天コロニーの二重染色を行った。寒天を二層ごと、スライドガラス上にうつし、口紙をあて水分を吸い取り更にドライヤーをあて寒天をスライドガラスに固着させた。最初に  $\alpha$ -naphthyl acetate (Nakarai chemicals) を基質として非特異的エステラーゼ染色を行い、次に Naphthol AS-D chloroacetate (Sigma) と Fast blue BB salt (Sigma) を用いて二重染色を施した。この方法により、マクロファージコロニーは茶、顆粒球コロニーは青に染色された。

#### (8) <sup>3</sup>H - Thymidine 自殺実験による S 期の算定

Iscove ら<sup>20)</sup>の方法を簡略化して用いた。対象とする単核細胞を methyl -<sup>3</sup>H - thymidine (2.0  $\mu$ Ci/mmol, New England Nuclear, ; <sup>3</sup>H - TdR) 20  $\mu$ Ci/ml 存在下で 37℃, 20 分間前処理したのち

100  $\mu$ g/ml 濃度の cold thymidine (和光製薬) で 3 回洗浄した。細胞数を再調整したのち、CFU-C 定量を行った。コントロールとして <sup>3</sup>H - TdR を加えずに、同様の操作を行って CFU-C を算定した。S 期の比率は次式より算出される。

$$S \text{ 期} (\%) = \left( 1 - \frac{{}^3\text{H-TdR 処理の CFU-C}}{{}^3\text{H-TdR 非処理の CFU-C}} \right) \times 100$$

#### (9) Thymopoietin の臍帯血 CFU-C の細胞回転に対する効果

臍帯血単核細胞を、20% 牛胎児血清 (FCS) を含む McCoy 5 A 培養液中で thymopoietin, 10 ng/ml 共存下、37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 24 時間培養後、洗浄し、余分の thymopoietin を除いたのち、(8) に述べた方法に従って、<sup>3</sup>H - thymidine 自殺実験を行い、S 期の比率を算定した。コントロールには PBS を添加し、同時に 24 時間培養したものを用いた。尚、thymopoietin は G. Goldstein 博士より提供された標準品を用いた。

#### (10) 密度勾配法による細胞分画

Dicke ら<sup>21)</sup>の方法に従った。Bovine Serum Albumin (Fraction V, Sigma) の 35% W/V, Tris-aminomethan buffer (pH 7.2) 溶液を作成し、PBS にて 25~17% に希釈し、各段階濃度溶液とした。これを 25% より順に、静かに遠心管に重層していき、最上層に約  $1 \times 10^7$  ケの単核細胞を浮遊させ、400  $\times$  g, 4℃, 30 分間遠心した。遠心後、分離されたそれぞれの中間層より、マイクロピペットで細胞を採取し、比重の軽いもの、すなわち上の方から順に Fraction I から V とし、細胞数、および CFU-C の測定を行った。

(11) 速度沈降法 (Sta - Put 法) による細胞分画 Miller & Phillips<sup>22)</sup>の方法による速度沈降法細胞分画装置 (Jones Scientific 社, SP - 180) を使用した。gradient 溶液には 3%, および 30% FCS を用いた。沈降速度 S は、次式により決定される。

$$S = \frac{2}{9} \cdot \frac{P - P'}{\eta} \cdot g r^2$$

(P...細胞の比重, P'...液体媒体の比重,  $\eta$ ...液体媒体の粘度, g...遠心力 ( $1 \times g$ ), r...細胞の半径) つまり、浮遊細胞の直径の差により沈降速度が異なることを利用し、細胞を分画するものである。この方法により得られた各分画につき、CFU-C の定量やコロニー内容の検討などを行った。

#### (12) 骨髓 CFU-C との比較、検討

骨髓穿刺の結果、血液学的に異常を認めなかった 5

才から11才の小児の骨髓単核細胞を用い、方法(4)より(11)に述べたものと同様の実験を行い、臍帯血、あるいは新生児期末梢血から得られた結果と比較、対照した。その成績は、臍帯血 CFU - C の成績の中で述べることにする。尚、CFU - C の算定、およびコロニーの細胞化学的検討は臍帯血、末梢血、骨髓とも全て培養開始後、10日目に行った。

成 績

(1) 臍帯血 CFU - C の dose-response curve (図1)

付着細胞を除いた分画 non - adherent cell (NA cell) を未処理の単核細胞 unseparated cell (US cell) の両者について、添加した細胞数と形成される CFU - C 数の関係を示した。両群とも、その関係は原点を通る直線を描き、添加細胞数が  $2 \times 10^5$  までは、ほぼ直線的に増加するが、細胞数が  $4 \times 10^5$  になると、US cell 分画では逆に CFU - C 数の減少が見られた。一方、NA cell 分画では、この様な CFU - C 数の減少は観察されず、除かれた付着細胞が CFU - C の増殖に何らかの影響を与えていることが示唆された<sup>23)</sup>。この結果より、以後の実験において、臍帯血 CFU - C は、未処理の単核細胞を用い、細胞数は  $1 \times 10^5$  として定量した。dose-response curve は骨髓でも添加細胞数、 $1 \sim 2 \times 10^5$  でプラトーとなり、それ以上、細胞数を増やしても、CFU - C 数は増加せず、むしろ減少していく。付着細胞(骨髓では主にマクロファージである)の影響についても、臍帯血におけると同様の現象

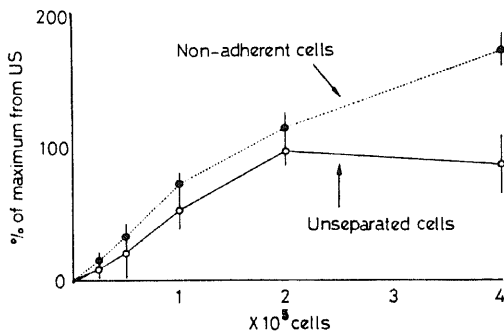


Fig. 1. Dose-response curve for CFU-C from cord blood. Each point represents mean with standard deviation of colony-forming cells from unseparated fraction (○) and non-adherent cell fraction (●). Data normalized to percentage of level with maximum frequency of CFU-C from unseparated cell fraction. (n=3)

が観察されており、付着細胞、おそらくマクロファージの in vitro での効果は骨髓と臍帯血でほぼ同じと考えられた。

(2) 臍帯血 CFU - C の growth curve (図2A, B)

図2Aに示した通り、コロニー数は培養開始後、ほぼ直線的に増加し、14日目に最大値となり、以後、減少していった。骨髓単核細胞より形成されるコロニーは、7日から10日目にすでにプラトーに達しており、臍帯血 CFU - C の発育は骨髓 CFU - C に比し遅いことが分かった。一方、クラスターは、それより早く、培養8日目に最大値をとることから、コロニー形成細胞とクラスター形成細胞は質的に異なると考えられた。また、二重染色によりマクロファージコロニー形成細胞 macrophage colony-forming cell (M - CFC) と、顆粒球コロニー形成細胞 granulocyte colony-forming cell (G - CFC) に分類して、

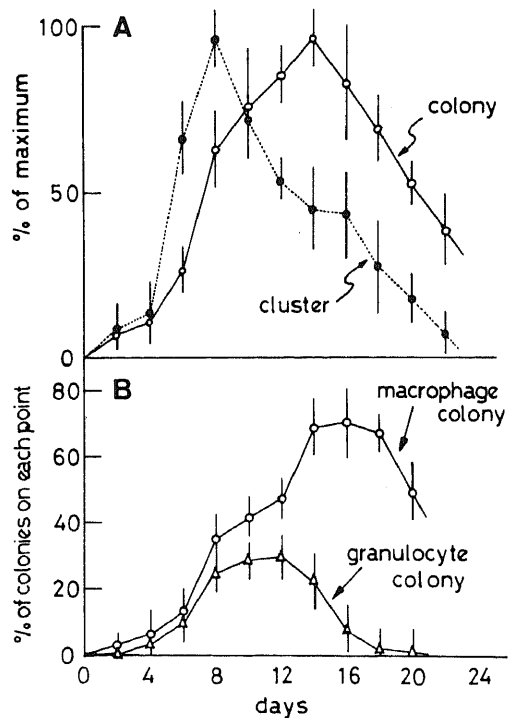


Fig. 2. A. Growth curve for CFU-C from cord blood. Each point represents mean with S.D. of colony (○) and cluster (●) from 7 neonates. B. Growth curve for subpopulations of CFU-C, macrophage (○) and granulocyte (△) colony. Data shows the percentage of these subpopulations on each points.

growth curveを描くと明らかに両者の発育パターンに差が見られ、臍帯血CFU-Cの発育曲線が骨髓CFU-Cのそれより遅れることはM-CFCの発育パターンに支配されているためと思われた。(図2B)

(3) 臍帯血、新生児末梢血および正常成人末梢血中のCFU-C定量(図3)

臍帯血CFU-Cは単核細胞 $1 \times 10^5$ あたり、3から208とかなりのバラツキを示し、平均、 $93.4 \pm 57.8$ であった。新生児末梢血CFU-Cは3日目が $29.8 \pm 16.4$ 、7日目が $7.0 \pm 7.2$ と急速に減少していることが分かった。正常成人末梢血では、添加細胞数を $1 \times$

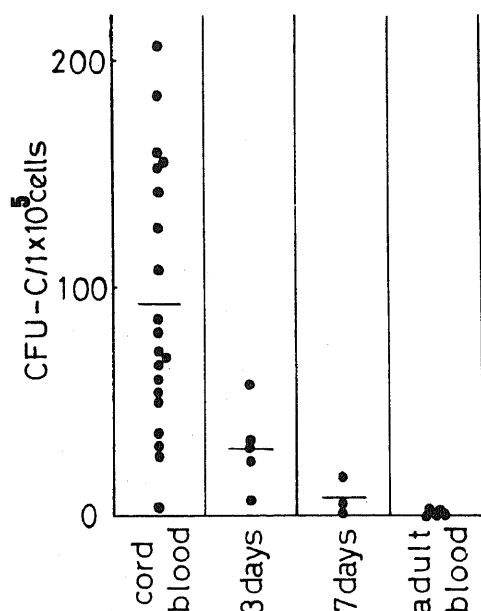


Fig. 3. Number of CFU-C in cultures from cord blood from infants 3 and 7 days old, and from adults.

$10^5$ としてCFU-Cを算定したが、 $11.2 \pm 10.2$ であった。図3では成人末梢血の値は細胞数 $1 \times 10^5$ あたりに換算してプロットした、小児の正常骨髓では、 $1 \times 10^5$ 単核細胞あたり、 $141.2 \pm 36.1$ のCFU-Cが形成され、臍帯血CFU-Cは平均では、やや少ないもの、骨髓に匹敵するCFU-Cを保持しているものも認められた。

(4) 各種CFU-Cのコロニー内容の検討(表1)

臍帯血、末梢血および骨髓より形成されたコロニーに対し、二重染色を行い、マクロファージコロニー、顆粒球コロニー、混合コロニー(二種類の細胞より形成されるもの)の三者に分類し、その百分率を示した。臍帯血および新生児期末梢血では、いずれもマクロファージコロニーが70%前後と多数を占めているのに対し、成人末梢血では逆に顆粒球コロニーが80%以上を占めていた。正常小児骨髓CFU-Cでは顆粒球コロニーの占める比率は $88.3 \pm 6.2\%$ と顆粒球コロニーが極めて優位であり、この優位性が成人の末梢血には反映されていることも考えられた。

(5) 臍帯血CFU-Cのcell cyclingの検討(表2)

$^3\text{H}$ -thymidine 自殺実験により算出した臍帯血CFU-CのS期の比率は $19.2 \pm 3.8\%$ であり、骨髓CFU-Cの $30.0 \pm 7.7\%$ に比較し、低値であった。表には示さなかったが、M-CFCおよびG-CFCに区別し、S期の比率を算出すると、M-CFCは $16.7 \pm 3.3\%$ 、G-CFCは $27.2 \pm 5.4\%$ となり、臍帯血CFU-CのS期の比率が低値であるのは、マクロファージコロニーの優位性と合わせ、M-CFCのcell cycling stateを反映していると考えられた。

(6) Thymopoietinのcell cycleに対する効果(表3)

新生児期の造血能に胸腺、あるいは胸腺因子が強く関与するという事実<sup>24)-26)</sup>より、胸腺因子の一つである

Table 1. Differentiation of CFU-C in cultures from cord blood, infants 3 and 7 days old, and adults. Characterization of CFU-C was determined by double staining method for esterase activity on 10 days culture. Data represents mean percentage with S. D.

source of CFU-C	macrophage colony	granulocyte colony	mixed colony
cord blood	$60.0 \pm 4.6$	$35.6 \pm 5.5$	$4.4 \pm 1.5\%$
3 days*	$68.8 \pm 2.9$	$26.5 \pm 0.9$	$4.7 \pm 1.9\%$
7 days*	$71.4 \pm 4.8$	$21.4 \pm 3.9$	$7.2 \pm 2.1\%$
adult p. b.**	$10.2 \pm 7.6$	$82.6 \pm 12.3$	$7.2 \pm 5.2\%$

\* 3 days, 7 days; peripheral blood from 3(n=5) and 7(n=3) days old infants. \*\* adult p. b.; peripheral blood from 5 normal adults.

thymopoietin<sup>27)</sup>を用いて、臍帯血 CFU - C の細胞回転に対する効果を検討した。その結果、表 3 に示す如く、10ng/ml の thymopoietin の添加により、骨髓 CFU - C では全く変化がないにもかかわらず臍帯血 CFU - C では有意の S 期の比率の増加がおり、かつ CFU - C 数の減少を伴った。

(7) 密度勾配法による細胞分画 (表 4)

臍帯血 CFU - C は、骨髓 CFU - C と同じ分画すなわち Fraction II に最も多く分布したが、Fraction I, III にも、それぞれ 15% 前後分布しており、臍帯血中には、ある程度比重の異なる CFU - C が存在していると考えられた。

Table 2. Proportion of CFU-C in S phase in cell cycling determined by <sup>3</sup>H-thymidine suicide method. Each experiment represents mean CFU-C numbers with S.D. in cultures with or without <sup>3</sup>H-TdR.

Experiment	Without <sup>3</sup> H-TdR	With <sup>3</sup> H-TdR (20μCi/ml)	% in S
1	158.0±8.7	138.0±4.0	13.7
2	59.3±9.9	46.6±5.0	17.4
3	56.0±2.8	44.0±2.8	21.5
4	128.0±10.1	96.0±11.7	25.0
5	24.5±4.5	20.0±1.0	18.4
			19.2±3.8

# The percentage of S phase in bone marrow CFU-C was 30.0±7.7 (mean±S. D.)

Table 3. Effect of thymopoietin on the cell cycling of CFU-C in human cord blood and bone marrow. Mononuclear cells were pretreatment with thymopoietin for 24 hours, washed and cultured an additional 10 days for measurement of CFU-C. The percentage of CFU-C in S phase was determined by <sup>3</sup>H-TdR suicide method before and after treatment with thymopoietin.

Treatment	Cord blood		Bone marrow	
	Total CFU-C* (% of control)	% of S phase	Total CFU-C** (% of control)	% of S phase
Thymopoietin 0	100 %	17.4±4.5	100%	31.6±8.2
10 ng/ml	68.5±15.8	32.9±9.9	100.5±9.8	30.6±3.3
	(p<0.01)	(p<0.05)	(NS)	(NS)

\* mean±S.D. (n=5) \*\* mean±S.D. (n=3) NS ; not significant

Table 4. Distribution of CFU-C by the various albumin concentrations of the gradient. The number of cells collected from each fractions was counted and prepared for measurement of CFU-C. Data shows mean percentage of mononuclear cells and CFU-C numbers separated by density gradient with S.D. (n=4)

Fraction	Density range (gm/cm <sup>3</sup> )	% of MNC±S.D.	% of CFU-C±S.D.
I	<1.048	10.7±5.5	15.2±8.9
II	1.048-1.052	26.8±3.8	67.8±15.7
III	1.052-1.056	27.5±7.3	14.4±9.4
IV	1.056-1.060	15.3±6.1	2.6±2.3
V	>1.060	19.6±6.3	0.1±0.5

(8) 速度沈降法 (Sta - Put 法) による細胞分画 (図 4A, B, 図 5, 表 5)

速度沈降法による分画にもとづき, 図 4A に浮遊した全細胞の分布状態を示した. 図 4B では, 各分画毎に, 顆粒球, 単球, リンパ球を分類し, その分布を, それぞれが占めるパーセントで表わしたが, 沈降速度の大なる方より, 顆粒球, 単球, リンパ球の順に, 比較的明瞭に分画されていた. また, 各分画について CFU - C の定量を行い, その分布を図 5 に示した. 形成されたコロニーは, 全て二重染色を施し, Total, M - CFC および G - CFC に区別して検討したが, いずれも, 7.2 mm/hr に同一かつ単一のピークを持っていた. この数字は, 同様の方法で測定した骨髄 CFU - C の沈降速度 7.4 mm/hr と, 測定上の誤差を考えると有意の差を持つものではなかった. 次に, 沈降速度, 4 mm/hr から 14 mm/hr の間について, 各分画毎に M - CFC, G - CFC, Mixed CFC の割合を表 5 に示した. 沈降速度が大きくなるにつれて, G - CFC の割合が, わ

ずかではあるが増加する傾向を認めた.

考 察

胎生期から新生児期にかけて流血中に多数の造血幹細胞が存在することは早産児末梢血や<sup>28)</sup>, 臍帯血<sup>8)-10)</sup>のコロニー形成法の検討より明らかである. しかし, この時期に見られる末梢血造血幹細胞 circulating CFC の性質は, 本研究で明らかになった如く成人末梢血, あるいは小児骨髄中の幹細胞とは, かなり異っており, 従って, その生理学的意味も成人の場合とは違うことが予想された.

Gidali ら<sup>11)</sup>は成人マウスの circulating CFC の放射線感受性や細胞回転の検討から, この末梢血中に存在する幹細胞は, 骨髄幹細胞の中でも, やや分化した細胞が末梢血中に出て来ていると結論している. また, マウスでも胎児期から新生児期にかけて多数の幹細胞が流血中に存在することが知られているが, Moore ら<sup>14)</sup>は密度勾配法を用いた分布から, 新生児マウスの

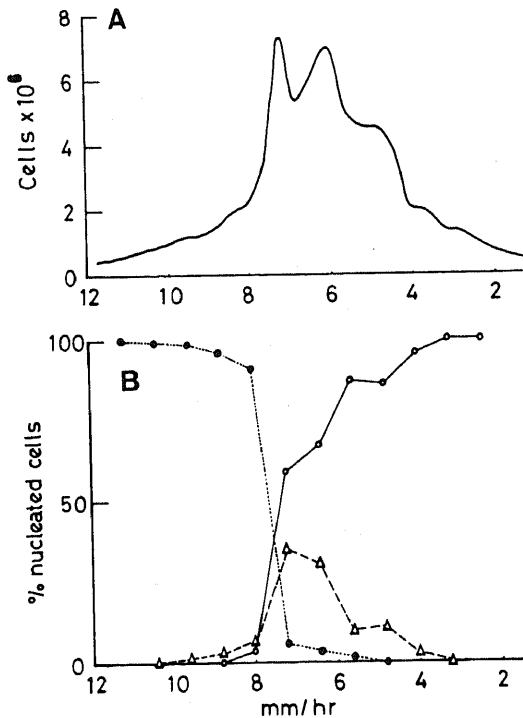


Fig. 4. Distribution of human cord blood mononuclear cells separated by velocity sedimentation. A. Absolute number of nucleated cells recovered per fraction. B. Morphology of cells as percentage of all cells per fraction. (●-●) Granulocyte, (△-△) Monocyte, (○-○) Lymphocyte.

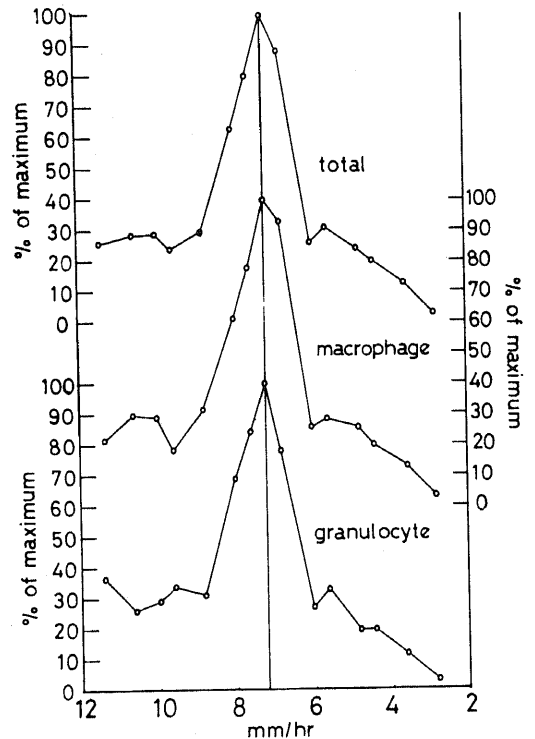


Fig. 5. Profiles of total, macrophage and granulocyte colony-forming cells separated by velocity sedimentation in 10 days culture. Data normalized to percentages of levels in fraction with maximum frequency of colony-forming cells.

末梢血中に見られる幹細胞は胎児期の肝臓由来であろうと述べている。

しかし、ヒトの早産児、あるいは臍帯血を含めて新生児末梢血中に存在する幹細胞が、やはり肝臓から骨髄への造血部位の移行を示しているとするには問題がある。今回、著者の行った実験において得られた臍帯血 CFU - C の性状を正常児骨髄 CFU - C の成績と比較したものをまとめて表 6 に示した。結果的に密度勾配法による CFU - C の分布、速度沈降法 (Sta - Put 法) による CFU - C の沈降速度に殆ど差は見られなかった。つまり臍帯血中および小児骨髄のコロニー形成細胞の直径や比重に有意の差はないことが分かった。一方、臍帯血 CFU - C の成長曲線のピークは 14 日目で、骨髄 CFU - C の 10 日に比べて遅く、その S 期の比率も明らかに骨髄に比し、低値であった。この原因は二重染色によるコロニー内容の検討から、臍帯血 CFU - C が M - CFC 優位性を持ち、主に M - CFC の性質を反映しているためと考えられた。この

様に M - CFC が優位であるという事実は、また、臍帯血 CFU - C が顆粒球、マクロファージ系前駆細胞の中でも、比較的分化した状態にあることを示すものであり、全体としても、その self-renewal の能力は弱いと考えざるを得ない。M - CFC が G - CFC より、さらに分化した幹細胞であるということは、Metcalf らの行った single cell transfer study<sup>29)</sup>や、最近では、Thy - 1 抗原の量が多いほど未熟であることを利用して、Fluorescence - Activated Cell Sorter (FACS) によって分離した細胞の詳細な検討からも明らかである<sup>30)</sup>。しかし、臍帯血中の CFU - C が真に、やや分化した造血幹細胞であることを証明するには今後、in vitro の培養系であることの影響<sup>31)</sup>や、用いたコロニー刺激因子などの性質も考慮していく必要があると思われる<sup>32)33)</sup>。

ところで、成績 (表 3) に示したように、著者は、胸腺因子の一つである thymopoietin が臍帯血 CFU - C の S 期の比率を平均 17.4 % から 32.9 % と著明

Table 5. Distribution of CFU-C subpopulations. Each fraction separated by velocity sedimentation from 4 to 14 mm/hr was collected and cultured. Characterization of CFU-C was determined by double staining method for esterase activity.

sedimentation velocity (mm/hr)	% in vitro colonies		
	M*	G**	Mixed
4	58.3	36.2	5.5
6	57.2	37.6	5.2
8	56.3	40.0	3.7
10	57.4	37.0	5.6
12	51.4	44.8	3.8
14	46.7	48.7	4.6

\*M ; Macrophase      \*\* G ; Granulocyte

Table 6. Comparison of characteristics of CFU-C between cord blood and bone marrow

	Cord blood CFU-C	Bone marrow CFU-C
CFU-C/ $1 \times 10^5$ cells	93.4 $\pm$ 57.8	141.2 $\pm$ 36.1
Colony size	Large	Small
Dominant colony	Macrophage	Granulocyte
% CFU-C in S	19.2 $\pm$ 3.8	30.0 $\pm$ 7.7
Sedimentation velocity (mm/hr)	7.2 $\pm$ 0.1	7.4 $\pm$ 0.2
Peak of density gradient (gm/cm <sup>3</sup> )	1.048 - 1.052	1.048 - 1.052



に増加させることを観察した。これにより、臍帯血 CFU - C は骨髄 CFU - C とは明らかに異なり、thymopoietin がその CFU - C の増殖を引きおこし易い状態にあることが示唆された。また thymopoietin と前処理することによって観察された、この臍帯血 CFU - C の S 期の比率の増加は、CFU - C の数の減少を伴っていたが、この減少によるコロニー内容の変化は見られなかった<sup>34)</sup>。

最後に、特殊な病態として、若年型慢性骨髄白血病の末梢血より形成されるコロニーはマクロファージコロニー優位であることが知られている<sup>35)</sup>。著者の経験では骨髄でも、その CFU - C の約 60% がマクロファージコロニーを形成していた。若年型慢性骨髄性白血病では、このことが著明な monocytosis をもたらし、myelomonocytic leukemia との異同が問題にされているが、病態として強い胎児性を有しており、CFU - C におけるマクロファージコロニーの優位性も、本研究で明らかになった臍帯血 CFU - C の特徴に類似していることは興味深い。

#### 結 論

臍帯血中には多数の造血幹細胞が存在するが、その性質の特異性を明らかにするために *in vitro* コロニー形成法を用い、臍帯血中の CFU - C に対し種々の検討を加え、以下の結論を得た。

1. 臍帯血 CFU - C は  $1 \times 10^5$  単核細胞あたり、 $93.4 \pm 57.8$  であり、骨髄に比しやや低値であった。新生児期末梢血中の CFU - C 数は生后、急速に減少し、7 日目には成人末梢血の値に近くなった。
2. 形成されるコロニーの内容は、骨髄と大きく異なり、臍帯血では M - CFC が優位であり、colony size の大きいことや、S 期にある比率が低いなどの臍帯血 CFU - C の特徴は、この M - CFC の性質を反映しているものであった。また、この特徴は新生児期末梢血の CFU - C に引き継がれていた。
3. 一方、臍帯血 CFU - C の密度勾配法によるピーク、あるいは Sta - Put 法によって測定した沈降速度は正常小児骨髄 CFU - C と同程度であり、その比重や直径に大きな差のないことを示した。
4. 骨髄 CFU - C に比較し低い、臍帯血 CFU - C の S 期の比率を、胸腺因子の一つである thymopoietin が有意に増加させたが、骨髄 CFU - C においては全くこの様な現象は見られず、臍帯血中の造血幹細胞は胸腺因子の影響を受け易い状態にあると考えられた。

これらの結果より臍帯血中に存在する造血幹細胞

(CFU - C) は、正常小児骨髄 CFU - C とはかなり異った態度を示し、それは胎児期から新生児期における造血の特異性を表すものと考えられたが、その生理的意義の解明は今後の課題であろう。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲下さいました恩師谷口昂教授に深く感謝いたします。

また、終始、多大な御協力をいただきました小泉晶一講師はじめ小児科血液グループの諸兄、並びに教室員の皆様にご感謝いたします。最後に thymopoietin を提供していただいた、G. Goldstein 博士、快く臍帯血を御提供下さいました金沢日赤病院産婦人科病棟の皆様にご謝意を表します。

#### 文 献

- 1) Levine, R., Whang, J. & Tjio, J. : Persistent mitosis of transfused homologous leukocytes in children receiving antileukemic therapy. *Science*, **142**, 1305-1307 (1963)
- 2) Barnes, D. W. H. & Loutit, J. F. : Hemopoietic stem cells in the peripheral blood. *Lancet*, **1**, 1138-1143 (1967)
- 3) McCredie, K., Freireich, E. & Herch, E. : Early bone marrow recovery after chemotherapy following the transduction of peripheral blood leukocytosis in identical twins. *Proc. Am. Assoc. Canc. Res.*, **11**, 50 (1970)
- 4) Barr, R. D. & Whang, J. : Hemopoietic stem cells in human peripheral blood. *Science*, **190**, 284-285 (1975)
- 5) Ragab, A. H., Gilkerson, E., Myers, M. & Choi, S. C. : The culture of colony forming units from the peripheral blood and bone marrow of children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, **34**, 663-669 (1974)
- 6) Chu, J. Y., O'Connor, D. M., McElfresh, A. E. & Mueller, J. : Peripheral White - Blood - Cell culture and leukemic relapse. *Lancet*, **1**, 962 - 963 (1976)
- 7) Richman, C. M., Weiner, R. S. & Yankee, R. A. : Increase in circulating stem cells following chemotherapy in Man. *Blood*, **47**, 1031 - 1039 (1976)
- 8) Kundtson, S. : *In vitro* growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*, **43**, 357-360 (1974)
- 9) Prindull, G., Prindull, B. & Meulen, N. V. D. : Haemopoietic stem cells (CFUc) in human cord

- blood. *Acta paediatr. Scand.* **67**, 413-416 (1978)
- 10) **Fausser, A. A. & Messner, H. A.** : Granuloerithropoietic colonies in human bone marrow peripheral blood and cord blood. *Blood*, **52**, 1243-1248 (1978)
- 11) **Gidari, J., Fether, I. & Antal, S.** : Some properties of the circulating hemopoietic stem cells. *Blood*, **43**, 573-580 (1974)
- 12) **Maloney, M. A. & Patt, H. M.** : Migration of cells from shielded to irradiated marrow. *Blood*, **39**, 804-807 (1972)
- 13) **Moore, M. A. S. & Metcalf, D.** : Ontogeny of the haemopoietic system ; Yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Brit. J. Haematol.* **18**, 279-296 (1970)
- 14) **Moore, M. A. S., McNeill, J. A. & Haskill, J. S.** : Density distribution analysis of in vivo and in vitro colony forming cells in developing fetal liver. *J. Cell. Physiol.* **75**, 181-192 (1969)
- 15) **Boyum, A.** : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Lab. Invest.* **21**, 77-89 (1968)
- 16) **Pike, B. L. & Robinson, W. A.** : Human bone marrow colony growth in agar gel. *J. Cell. Physiol.* **76**, 77-84 (1970)
- 17) **Koizumi, S., Yamagami, M., Ueno, Y., Miura, M. & Taniguchi, N.** : Resistance of human bone marrow CFU-C to high-dose methotrexate cytotoxicity. *Exp. Hematol.* **8**, 635-640 (1980)
- 18) **Messner, H. A., Till, J. E. & McCulloch, E. A.** : Interacting cell populations affecting granulopoietic colony formation by normal and leukemic human marrow cells. *Blood*, **42**, 701-710 (1973)
- 19) **Yam, L. T., Li, C. Y. & Crosby, W. H.** : Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* **55**, 283-290 (1971)
- 20) **Iscove, N. N., Till, J. E. & McCulloch, E. A.** : The proliferative states of mouse granulopoietic progenitor cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **134**, 33-36 (1970)
- 21) **Dicke, K., Spitzer, G., Verma, D., Zander, A., Thomson, S. McCredie, K., Peters, L. J. & Vellekoop, L.** : The use of autologous bone marrow transplantsplantation after high-dose cytoreductive therapy in various types of malignancies in man. *Experimental Hematology Today 1979*, Springer-Verlag. 221-230
- 22) **Miller, R. G. & Phillips, R. A.** : Separation of cells by velocity sedimentation. *J. Cell. Physiol.* **73**, 191-202 (1969)
- 23) **Kurland, J. I., Bockman, R. S., Broxmeyer, H. E. & Moore, M. A. S.** : Limitation of excessive myelopoiesis by the intrinsic modulation of macrophage-derived prostaglandin E. *Science*, **199**, 552-555 (1978)
- 24) **Zipori, D. & Trainin, N.** : The role of a thymus humoral factor in the proliferation of bone marrow CFU-S from thymectomized mice. *Exp. Hematol.* **3**, 389-398 (1975)
- 25) **Lepault, F., Dardenne, M. & Frindel, E.** : Restoration by serum thymic factor of colony-forming unit (CFU-S) entry into DNA synthesis in thymectomized mice after T-dependent antigen treatment. *Euro. J. Immunol.* **9**, 661-664 (1979)
- 26) **Sharkis, S. J., Spivak, J. L., Ahmed, A., Misiti, J., Stuart, R. K., Wiktor-Jedrzejczak, W., Sell, K. W. & Sensenbrenner, L. L.** : Regulation of hematopoiesis ; helper and suppression influence of the thymus. *Blood*, **55**, 524-527 (1980)
- 27) **Goldstein, G.** : The isolation of thymopoietin (thymin). *Annal. N. Y. Acad. Sci.* **249**, 177-185 (1975)
- 28) 西平浩一, 高嶋芳樹, 気賀沢寿人, 飯塚敦夫, 長尾大 : 早産児の末梢血中における造血幹細胞の増加. *医学のあゆみ*, **100**, 678-679 (1977)
- 29) **Metcalf, D.** : Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. *J. Cell. Physiol.* **77**, 277-280 (1971)
- 30) **Goldschneider, I., Metcalf, D., Battye, F. & Mandel, T.** : Analysis of rat hemopoietic cells on the Fluorescence-Activated Cell Sorter. (I) Isolation of pluripotent hemopoietic stem cells and granulocyte-macrophage progenitor cells. *J. Exp. Med.* **152**, 419-437 (1980)
- 31) **Haskill, J. S., McCneill, T. A. & Moore, M. A. S.** : Density distribution analysis of in vivo and

in vitro colony forming cells in bone marrow. J. Cell. Physiol. **75**, 167-180 (1969)

32) 市川康夫 : In vitro での血球の増殖と分化. Acta. Haem. Jap. **36**, 445-456 (1973)

33) Metcalf, D. & MacDonard, H. R. : Heterogeneity of in vitro colony- and cluster-forming cells in the mouse marrow ; segregation by velocity sedimentation. J. Cell. Physiol. **85**, 643-654 (1974)

34) 上野良樹, 山上正彦, 三浦正義, 小泉晶一, 谷口昂 : Thymopoietin の granulopoiesis に及ぼす影響について (DiGeorge 症候群の一例を含めて), 第 22 回日本臨床血液学会総会 (1980. 東京) に発表

35) Altman, A. J., Palmer, C. G. & Baehner, R. L. : Juvenile "chronic granulocytic" leukemia ; a panmyelopathy with prominent monocytic involvement and circulating monocytic colony-forming cells. Blood, **43**, 341-350 (1974)

**Characterization of Hemopoietic Stem Cells in Cord Blood.** Yoshiki Ueno, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920. — *J. Juzen Med. Soc.*, **90**, 43—53 (1981).

**Key words:** Hemopoietic Stem Cells, CFU-C, Cord Blood, Bone Marrow

#### Abstract

In this work, some properties of the hemopoietic stem cells (CFU-C) in human cord blood and peripheral blood of neonates were compared with those in bone marrow cells from children without any hematological abnormalities. Mononuclear cells separated from cord blood, peripheral blood and bone marrow were cultured in double layer semisolid agar gel using human peripheral leukocytes in feeder layer as a colony-stimulating factor. After incubation for 10-14 days, colonies containing 40 or more cells were scored.

1. The granulocyte/macrophage colonies in cord blood began to appear in 3-4 days of culture. The number and size of colonies increased gradually until 10-14 days of culture. The number of colonies in cord blood was  $94.3 \pm 57.8$  (Mean  $\pm$  1 S.D.) per  $10^5$  mononuclear cells, which was slightly less than that in bone marrow ( $141.2 \pm 36.1/10^5$  cells). The number of colonies in peripheral blood decreased promptly after birth and almost disappeared by 7 days of life.

2. Most colonies in cord blood belonged to the macrophage colonies ( $60.0 \pm 4.6\%$ ) that were identified by the double staining for esterase activity, whereas those in bone marrow largely belonged to granulocyte colonies ( $88.3 \pm 6.2\%$ ). The growth curve, colony size and turnover state of CFU-C in cord blood differed to some extent from those in bone marrow. These differences seemed, in part, to result from the dominancy of macrophage colonies characterizing CFU-C in cord blood.

3. Cell separation experiments with the velocity sedimentation and the density gradient methods indicated no differences in the cell size and the specific gravity of CFU-C between cord blood and bone marrow.

4. The cell cycling rate of CFU-C in cord blood was remarkably lower than that in bone marrow as judged by relative proportion of CFU-C in S phase which was determined by  $^3\text{H}$ -thymidine killing technique in vitro. However, the treatment with thymopoietin, a kind of thymus humoral factors, increased the percentage of CFU-C in S phase in cord blood to give rise to a level comparable with that in bone marrow. In contrast, thymopoietin showed no appreciable effect on the cell cycling rate of CFU-C in bone marrow. Thus, it was suggested that the hemopoietic stem cells in cord blood might have a unique property being triggered into cell cycling under the inductive influence of thymopoietin.

From these results, it was clarified that the hemopoietic stem cells (CFU-C) in cord blood were different in some aspects from those in bone marrow. However, further works are required to elucidate the precise physiological and functional significance of CFU-C in the peripheral blood in human neonates.