

好中球増多動員因子に関する実験的研究

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/2297/8619

好中球増多動員因子に関する実験的研究

金沢大学医学部内科学第三講座(主任:服部絢一教授)

北 尾 武

(昭和51年2月3日受付)

種々の血液疾患のうち、再生不良性貧血、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病の急性転化例は、最近の治療法の進歩にもかかわらず、その予後は非常に悪い。予後を悪くする因子としては、高度の貧血による全身衰弱、成熟好中球の減少による細菌感染症、血小板減少による高度の出血傾向があげられる。貧血に対しては洗浄赤血球輸血、好中球減少による感染症に対しては抗生物質の投与、血小板減少に対しては血小板輸血が行なわれており、かなりの効果をあげているが満足すべきものではない。好中球増多動員因子の研究は障害を受けた骨髄に対して好中球の生成とその放出を促進する因子の精製および、その機序を追求するものであり、再生不良性貧血、急性白血病のみならず、悪性腫瘍に対する抗腫瘍剤の副作用としての好中球減少に対して臨床的応用にも供されるほどの強力な好中球増多因子を開発し、血液疾患患者の治療に応用することである。まず、好中球増多動員因子に関する研究の歴史を顧みると、炎症巣の発生と共に殊に急性炎症の場合、多核白血球増加が末梢血中に認められることは古くから知られた事実である。そしてこの間に向か物質の媒介があることも予想されたところであり、その物質は炎症巣における毒素によって破壊された多核白血球からの物質であって、leucocytosis promoting factor (LPF)、化学的には pseudoglobulin 中の polypeptide であることも明らかにされ¹⁾。又、同時に白血球減少因子もあることがわかった。これらの因子がどのようにして末梢血液に多核白血球増多症をおこさせるかは、詳細には不明であったが、一般には好中球増多症の場合には、骨髄中の成熟多核白血球は急速に消失し、これに続いて顆粒球の分裂像が多数出現し、増殖がさかんになることより、造血の面からみれば、骨髄における骨髄細胞増殖に深い関係をもつことは想像されていた。本邦では、小宮、河北は、家兔に typhoid vaccine を注射して白血球増多に関する研究を行ない、好中球生成促進物質 (neutropoietin)

の抽出を試みて16種のアミノ酸よりなる polypeptide を得ている¹⁴⁾。Steinberg らは、ヒト albumin 分画に好中球増多因子が存在するとし³⁰⁾。Bierman らは、腎 homogenate 中に高い leucopoietin 活性を認め¹⁾、又、Weisberger らは、白血球を超音波処理して、白血球増多因子を抽出した³¹⁾。その他、放射線障害後、生成される因子、泻血後生成される hemopoietin、人胎盤よりの白血球増多因子の抽出結晶化など、種々の観点から種々の実験方法による研究があるが、その多くは血灸内に白血球増多因子が存在することにおいては一致している。

RNA 分解物は、骨髄からの成熟好中球の遊出を促進することにより白血球増多を促し、さらに実験的 nitromin 障害家兔骨髄に対しても積極的な細胞新生促進作用も示す。臨床的には、放射線療法、あるいはこれと、nitromin 注射との併用によって、造血障害とくに白血球減少症をおこした子宮癌患者などに白血球数の回復または白血球減少の進行を阻止するのに有効である¹²⁾。美川は、RNA 分解物注射後の家兔血清を別の家兔に静注すると白血球増多がおこること、すなわち本分解産物注射によって白血球増多因子が血清内に生成されることを認め、血清の硫酸塩析によって、本因子は pseudoglobulin 分画に含まれ、ろ紙電気泳動上、 α 、 β -globulin に一致する易動度を持つことを明らかにした¹¹⁾。幸山はつづいて、RNA 分解物注射家兔の血清を硫酸塩析後、column chromatography で分画し、 α -globulin 主成分分画とに分け、それらの 2mg/kg を家兔に静注して好中球の変動を調べたところ、 α -globulin 主成分分画注射群に核左方移動を伴う好中球増多を認めたが、 β -globulin 主成分分画注射群にはこの変化はみられず、分画精製による白血球増多因子活性の上昇度は、 α -globulin 量を基準にとると、8.3倍であった。最小有効量 2mg/kg の α -globulin 主成分分画を家兔に静注して、各臓器に与える影響をみると、骨髄で

Studies on granulocyte proliferating and releasing factor. Takeshi Kitao, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori) School of Medicine, Kanazawa University.

は注射後12時間目に幼若好中球を主体とした骨髓性細胞の増加を認めた以外には他臓器に著変はみられなかった。以上の実験成績から、本因子は血清蛋白 α -globulin 主成分分画中に存在し、その作用としては骨髓からの成熟好中球の遊出促進作用のみでなく、骨髓幼若好中球の分裂分化を促進させる可能性もあることを明らかにした¹⁵⁾。

本研究は幸山の研究にひき続き、RNA 分解物注射後の家兎血清より、Ampholine isoelectrofocusing, free flow electrophoresis および preparative acrylamide disc gel electrophoresis を使用して、好中球増多動員因子を精製し、その生物学的特性を検討したものである。

実験材料ならびに実験方法

1. 実験対象

実験対象は体重2.5kg内外の雄の成熟白毛家兎を用いた。家兎の白血球数は、きわめて変動しやすいので、実験開始12時間前から絶食させ、1時間前に頭部のみ露出させる固定箱に無れて放置した後、採血を開始した。

2. 実験に使用した薬物

RNA 分解物としては日本臓器製薬会社において、ビール醸造用の酵母 RNA より調製された“ヌクレオ注”を使用した。本剤の1筒20ml中には RNA 分解物である adenylic acid, guanylic acid, cytidylic acid, uridylic acid の各ナトリウム塩の等量混合物50mg含有するもので、これを家兎耳静脈内に注射した。

3. 末梢血白血球数の算定

家兎耳静脈より穿刺採血して型のごとく 1 mm³ 中の白血球数を算定、塗沫標本を作製し、Giemsa 染色を施して、白血球数200につき白血球種別を行ない、これから好中球実数を算定した。

4. 白血球増多因子活性の測定

白血球増多因子活性の有無および程度は、好中球最高増多率と次式に示す好中球増多指数をもとにして検討した。

$$I.I = \frac{\sum_{t=0}^8 (N_t - N_0)}{1000}$$

I.I: 好中球増多指数

Nt: 各種溶液注射各時間における好中球実数

No: 注射前の対照好中球実数

5. 白血球増多因子の精製と注射液の調製

大量の血液を採取すべく、家兎を背臥位に固定して心臓穿刺を行ない、得た血液を37°C、30分間ふ置し、ついで冷室(4°C)に約2時間放置後、200rpm、10分間遠沈して血清を分離した。分離した血清を幸山らの方法により、硫酸1/3飽和で euglobulin を沈澱させて除き上清を硫酸3/5飽和として沈澱する分画をリン酸 buffer に対して透析後、DEAE cellulose column chromatography を行ない、 α および β -globulin 主成分分画を濃縮し、これを蒸留水に対して透析後、electrofocusing 装置に使用した。electrofocusing 装置は LKB 8100 electrofocusing 蛋白分離装置を使用し、carrier ampholite としては pH3-10 のものと pH5-8 のものを使用し、ショ糖による密度勾配をおこない、陽極液には0.1mlの硫酸を10mlの蒸留水でうすめたものを、陰極液には0.4mlの ethylenediamine を14mlの蒸留水でうすめたものに12gのショ糖を溶かしたものを使用した。電圧は300voltで分離時間は24時間でおこなった。終了後3mlづつ fraction collector を使用して分画をとり、280m μ の吸収を測定し、生食液に対して透析し、好中球増多活性を測定した。

大量に試料を得るための血清の電気泳動は carrier free flow electrophoresis を使用した。電気泳動用 buffer としては 0.07M Tris citrate pH8.6 5l を使用し、電極用 buffer としては 0.24M Tris citrate pH8.6 約6lを使用した。電極用 buffer は6時間毎に新しいものとりかえて使用した。血清は泳動用 buffer で約3倍に希釈して、電圧2300V、電流160mA、4°Cで泳動を行ない、流速は 114ml/hour で、試料は90本の tube に分け、それぞれの蛋白量を280nmの吸収で測定した。再泳動の場合は泳動する fraction の試料を集めて同様に泳動を行なった。preparative acrylamide electrophoresis は LKB 7900 Uniphor を使用して行なった。電極用 buffer には 0.05M tris pycine pH8.6 を使用し、gel は acrylamide 8g, 2.5 N, N' methylenediamine acrylamide 0.1g, N, N, N', N' tetramethylethylenediamine 0.02ml, 0.42mM Tris glycine pH8.6 6ml, ammonium persulfate 300mg, 蒸留水で全量50mlとして gel を作成し、sample を蛋白量として約50mgを gel の上端にのせ、電気泳動は500V、20mAで行ない、elution は 20~15ml/hr で行なった。sample は fraction collector で分け、各々の280nmの吸収を測定した。

各々の fraction は限外ろ過で濃縮して、生食液に対して透析し、家兎に注入した。

in vitro におけるヒトおよび C₃HBL マウス骨髄に対する colony stimulating factor としての作用の測定は Bradley らの方法によった⁴⁾。試料を Eagle 培養液と Bacto agar (最終濃度 0.5%) に混和し最終濃度 0.05mg/ml にし、1ml を petri dish に注入し、under layer とする。over layer としては Eagle 培養液、Bacto agar (最終濃度 0.3%) と骨髄細胞 5×10^4 を加え 37°C、10%CO₂ in air 湿度 100% として、10日間培養し、50個以上の細胞からなる colony 数を測定する。control としてはヒトおよび C₃HBL マウス白血球を 1×10^6 を試料のかわりに使用した。

acrylamide disc electrophoresis は Davis らの方法により行なった⁷⁾。蛋白染色は 10分 amidoblack 染色をし 10%酢酸で脱色した。糖成分の PAS 染色は isopropanol 10%硫酸で一晩固定したのち、

1% periodic acid 3%酢酸溶液に 50分、200ml の蒸留水で 10分毎に 6回洗浄する。この時、過ヨウ素酸がなくなったことを 0.1N AgNO₃ 溶液によって調べ gel を fuchsin 亜硫酸溶液に約 50分間浸してから、0.5% メタ亜硫酸ナトリウムの溶液 25ml で 3回 10分毎に洗浄した後に蒸留水で一晩洗浄し、3%酢酸に保存する。

染色された gel は Gilford densitometry で泳動 pattern を観察した。

分子量の測定は SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis を使用し、示標蛋白としては、ovalbumin, chymotrypsin, cytochrome c, myoglobin, γ -globulin を使用した。

糖の定量として、sialic acid の定量は sialic acid を含む試料 100 μ g に 0.1N 硫酸 1ml を加え、80°C 1時間水解する。試料 0.2ml をガラス示付試験管にとり 0.1ml の 0.2M 過ヨウ素酸ナトリウム溶液を加えてときどきよくふり、室温に 20分間おいて酸化を完了させ、0.1ml の 10% 亜ヒ酸ナトリウム溶液を加えて黄褐色が消えるまでふる。ついで 3ml の 0.6% チオバルビツール酸溶液を加えてよく混合し、15分間沸騰浴中で加熱する。冷却してから、4.3ml のシクロヘキサノンを加えてよくふり、抽出し遠心した後、シクロヘキサノン層の 549nm の吸収を測定し、定量する。Hexose の定量は 0.1ml の試料を 95% エタノールで 2回洗浄し、沈澱を 1ml、0.1N NaOH で溶解させ、8.5ml のオルシノール酢酸を加え、80°C、15分加熱し、冷却した後、540nm の吸収を測定する。Hexosamine の定量は 0.1ml の試料を 95% エタノールで 2回洗浄し、沈澱に 2ml の 3N HCl を加え、沸騰浴中で 3時間

加水分解する。その後 3N NaOH で中和し、acetylacetone 溶液を加え、15分間湯浴中に入れ、冷却後 Erlich 試薬を加え、30分後に 530nm の吸収を測定する。

蛋白の定量は Lowry らの方法により測定した¹⁾。

結 果

家兔血清の DEAE cellulose column chromatography 後の isoelectrofocusing による分画では、pH 5-8 の carrier ampholite で図 1 に対するように 4つの peak が認められたが、これらの分画には好中球増多活性は認められず、electrofocusing 中にかなり変性してしまった可能性があり、又、その収量も低かった。

free flow electrophoresis による家兔血清の電気泳動像は図 2 に示すように albumin, α_1 -globulin, α_2 -globulin, β -globulin, γ -globulin の各 fraction に分けられる。しかし、 α_1 -globulin と albumin との分離があまりよくないので、22~30の fract-

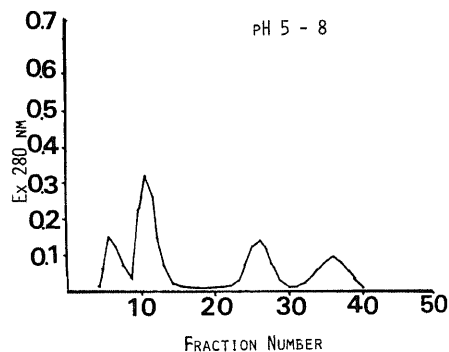


図 1 isoelectrofocusing による泳動像

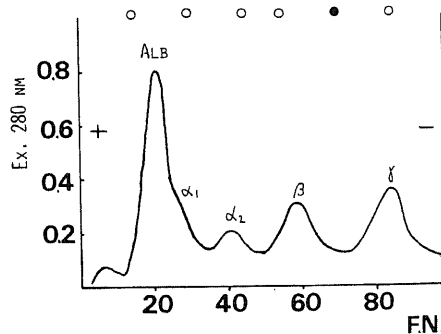


図 2 free flow electrophoresis による泳動像

ion を再び同一の条件で再泳動してみると図3に示すような泳動像が得られ、 α_1 -globulin と albumin の分離が可能となった。albumin, α_1 -globulin, α_2 -globulin, β -globulin, γ -globulin の各 fraction を濃縮し、各々 2 mg/kg を家兔に静注して好中

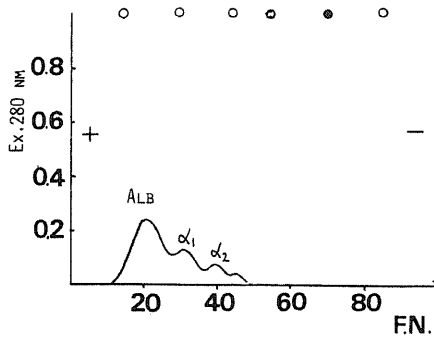


図3 図2の第22~30分画の再泳動像

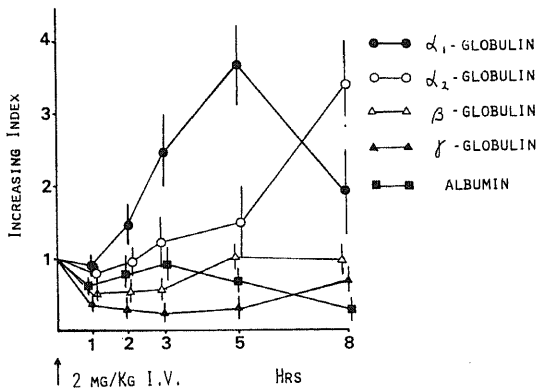


図4 Albumin, α_1 globulin, α_2 globulin, β globulin, γ globulin 各分画の好中球増多作用 N = 5

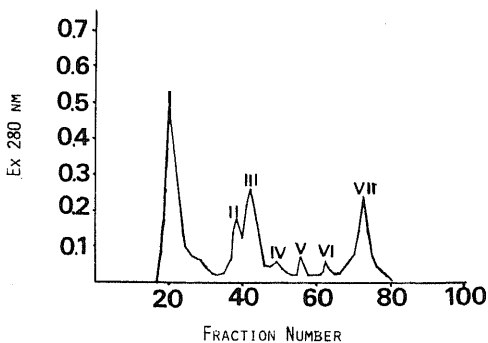


図5 preparative acrylamide disc gel electrophoresis による泳動像

球増多示数を測定したところ図4に示すような結果を得、 α_1 -globulin 分画に好中球増多活性が認められた。 α_1 -globulin fraction を polyacrylamide disc electrophoresis を行なったところ7本の band が得られた。

α_1 -globulin fraction を preparative electrophoresis を行ない、図5に示すような fraction を得た。分離がよくないため、fraction 2と3を濃縮し、再泳動を行ない、I~VIIまでの各 fraction を濃縮し、各々 2 mg/kg を家兔に注射し、好中球増多活性を測定し、fraction Vに認められることが判明した(図6)。この fraction 2 mg/kg 投与により、好中球は5時間目に投与前の 6.9~9.1倍に増加した。fraction Vの投与量と最大好中球増多指数の関係では(図7)、0.125mg/kg の投与量で約3倍の

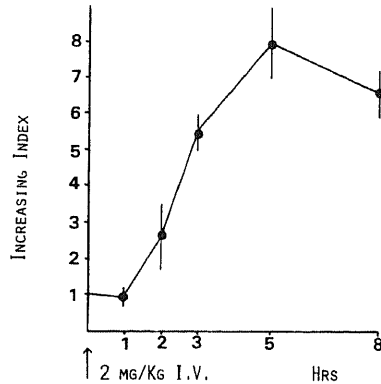


図6 図5の fraction V の好中球増多作用 N = 5

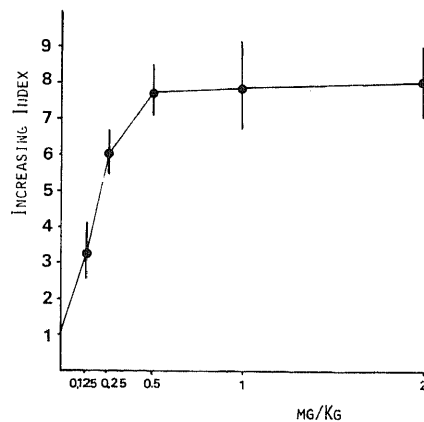


図7 fraction V の投与量と最大好中球増多指数 N = 3

増多が認められ、それ以上の希釈濃度では活性は認められず、最小有効濃度は 0.125mg/kg と考えられた。ヒトおよび $C_{57}BL$ マウス骨髄細胞に対して conditioned medium では、ヒト 65 ± 20 colonies、マウスでは 180 ± 34 個の colony ができたが、試料を入れた culture では colony は認められなかった。SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis を行なったところ、fraction V は 1 本の band であり (図 8)、PAS 陽性の band が認められ、分子量は約 6 万であった (図 9)。しかし、glycoprotein の分子量は電気泳動で測定すると高めにできるため実際の分子量はこれより小さいものと考えられる。glycoprotein の糖成分の定量を行なったところ、sialic acid $20\mu\text{g/mg}$ protein, hexose $70\mu\text{g/mg}$ protein, hexosamine $60\mu\text{g/mg}$ protein であった。この fraction を 60°C 30 分加熱すると好中球増多活性は失われ、heat labile であることを示している。

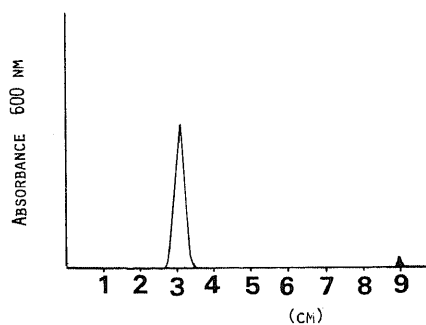


図 8 fraction V の acrylamide disc gel electrophoresis の泳動像 (Gilford densitometry による)

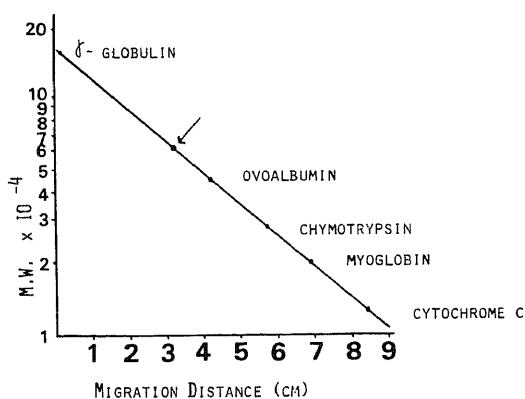


図 9 SDS Acrylamide disc gel electrophoresis による分子量測定

考 察

近年、生体試料の精製法の発展は著しいものである。好中球増多動員因子の純化においても、美川は、RNA 分解物静注後の家兎血清を硫酸塩析し pseudoglobulin 分画に活性があることを認め²¹⁾、さらに幸山は、血清を硫酸 $1/3$ 飽和で euglobulin を添澱させて除き、上清の硫酸濃度を上げて $3/5$ 飽和として沈澱する分画をリン酸 buffer に対して透析後、DEAE cellulose column chromatography を用いて 0.0175M リン酸 buffer pH6.3 で γ -globulin を、 0.04M リン酸 buffer pH5.9 で β -globulin を、 0.1M リン酸 buffer pH5.8 で β -globulin, albumin を、 0.4M リン酸 buffer で α -globulin, β -globulin を溶出させて、その好中球増多活性を測定している¹⁵⁾。幸山の方法により得られた α -globulin と β -globulin fraction を electrofocusing でさらに精製を試みられたが、変性が強く、好中球増多活性は認められず、又、試料の収量も低いため free flow electrophoresis と preparative acrylamide disc gel electrophoresis を使用して精製を試みた。

free flow electrophoresis は Max-Planck 研究所の Hannig らにより開発された細胞ならびに高分子の電気泳動による分離分画装置で¹³⁾、大量の試料を短時間のうちに分離できる能力がある点、細胞から高分子に至るまでの広い範囲の材料を、その荷電状態に応じて native な状態で分画採取できるので、今後の医学、生化学分野での応用が注目される装置であり preparative acrylamide disc gel electrophoresis は分子の電気的性質と分子量により、各々の物質を分離する方法であり、生体試料の精製に大きな進歩をもたらしている。欠点としては、蛋白などが変性しやすいことであるが、十分に冷やしながら行なえば、変性は最小限にいとめることができる。あらかじめ、disc gel electrophoresis で蛋白がどれだけ分離するかをしらべてから preparative acrylamide disc electrophoresis を行なえばよい。SDS disc gel electrophoresis が 1 本の band になったからといった一種の蛋白しかないと考えすることはできないが、少なくとも現在の段階ではこれ以上の精製は難しいものと考えられる。

幸山によれば DEAE cellulose chromatography により精製された α - および β -globulin fraction を 2mg/kg 静注すると、5 時間後に好中球最高増多率は 5 倍となり、又、 1mg/kg の静注では好中球は

増加せず、最小有効量は 2mg/kg であるとしている。著者らの最小有効濃度は 0.125mg/kg であり、約 8 倍の精製が行なわれている。又、美川は pseudoglobulin 分画を 12.5mg/kg 静注すると 3 時間後に好中球増多率は 4 倍になるとしている。

好中球分裂分化の kinetics に関しては多くの schema があるが、ここでは W. A. Robinson の図を修正して図10に示してある²⁶⁾。骨髓内における好中球系は、I. 血液幹細胞 pool, II. 分裂細胞 pool (細胞分裂と細胞分化), III. 非分裂細胞 pool に分けられ、III の pool は marrow granulocyte reserve (MGR) ともいわれる。骨髓外の血管内の好中球は均一に血管内に分布しており、circulatory granulocyte pool (CGP) といわれる。又、毛細血管床にくっついて好中球は marginated granulocyte pool (MGP) であり、CGP と MGP を加えたものを total blood granulocyte pool としている。組織内に入った好中球は機能を営み破壊される。血液幹細胞はまだ形態学的には同定されていないが、好中球のみならず、赤芽球系、巨核球系へも分化しうる可能性をもった細胞である。そのことは慢性骨髓白血病における Philadelphia chromosome が白血球のみならず赤芽球系、巨核球系にも認められることや、マウスにおける spleen colony formi-

ng の実験等により認められている。血液幹細胞 pool から分裂細胞 pool への移動を *in vivo* に規定している因子は現在のところ不明である。分裂細胞 pool では骨髓芽球から前骨髓球、骨髓球、後骨髓球、成熟好中球へと分裂分化がおこなわれる。*in vivo* では骨髓芽球から成熟好中球になるまでに 3~7 回細胞分裂が行なわれ⁶⁾、*in vitro* では 10~11 回までの細胞分裂は可能であるという⁴⁾。³H-thymidine で標識した骨髓芽球は 6~9 日で末梢血の成熟好中球として出現し²²⁾、骨髓芽球から成熟好中球へと経過する時間は約 10 日と考えられている。

分裂細胞 pool から非分裂細胞 pool へと移行した好中球系細胞は後骨髓球、桿核好中球、多核好中球へと成熟する。MGR は末梢からの要求があれば骨髓から放出される。MGR の量に関しては種々、問題があるが現在では一日の骨髓好中球産生量の約 10 倍あると考えられている。骨髓より末梢への好中球の放出は細胞の deformability と粘着性に規定されており、細胞の成熟とともに deformability が高く、粘着性が低くなり、骨髓より遊離し、末梢血内へ流れ込む¹⁶⁾。

末梢血中の好中球は CGP と MGP とに別けられ、2 つの pool は相互に入れ変りうる。これらの pool の半減期はきわめて短く、6~7 時間である。

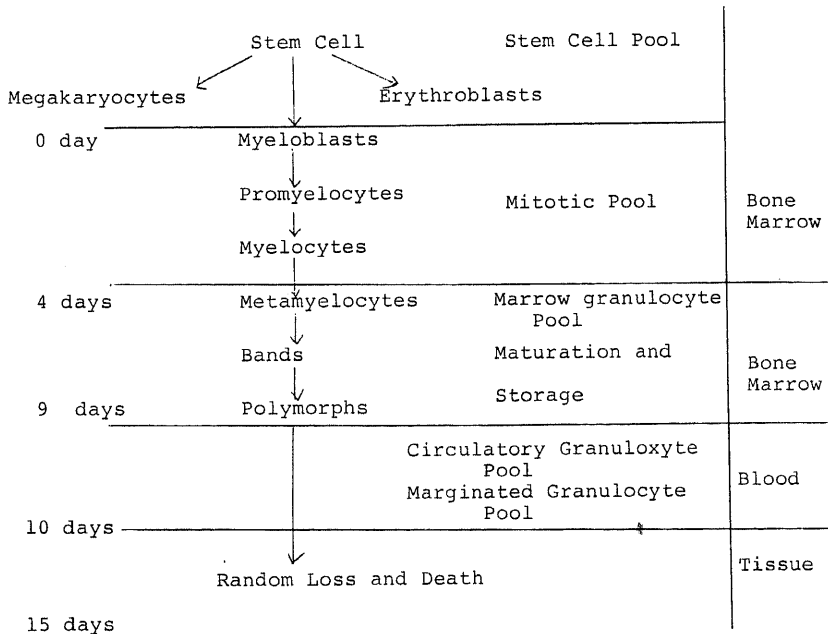


図10 好中球 Kinetics

一度血管内から逸脱して組織に侵入した好中球は血液内にもどることはなく、組織内で破壊されてしまう。組織内での生存期間は4～5日である。

以上の結果、好中球系細胞の発生からその死までは、10～14日であり、好中球系 system は外からの感染、その他の stress に対して、急速に反応できるように精密に調節された system である。

好中球産生率は 1.6×10^9 cells/kg/day の割合でおこり³⁾、赤血球の産生率は約 1.1×10^9 cells/kg/day の割合でおこり、好中球産生と赤血球産生はほぼ同じ割合でつくられることになる⁶⁾。感染や stress のあるときなどは、血液幹細胞より好中球系への移動が多くなり、骨髄内での細胞分裂がさかんになり、分裂時間の短縮、骨髄より末梢への放出が速くなることが認められる。

臨床的に骨髄機能、MGR の測定に使用されているものとしては、細菌毒素、ethiocholanolone, hydrocortisone であり、これらの因子の作用機序は、骨髄に直接作用して好中球を放出するのではなく、間接的なものであると考えられている。臨床的に広く利用されているのは、Salmonella abortus equi から精製された lipopolysaccharide 内毒素と typhoid vaccine である。LPS は $0.05 \sim 5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ を静注すると3～6時間後に $2800 \sim 8500/\text{mm}^3$ 程度好中球がふえるという⁹⁾。typhoid vaccine は 0.5ml を皮下に注射すると3時間以内に好中球はやや減少し、6～12時間に3～4倍に増加する。ethiocholanolone はLPS と似た作用をもち $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ を筋肉内へ注射する。しかし ethiocholanolone は注射部位に炎症をおこすため、現在は臨床的に使用されていない。最近、Bishop らが hydrocortisone を投与することにより、骨髄より好中球が放出されることを見出してから、hydrocortisone が注目されてきている²⁾。Deinard らは hydrocortisone を静注し、好中球減少症や抗癌剤投与中の患者における MGR 測定し、好中球の量的、時間的反応が LPS と同じ程度であるとしている。hydrocortisone 使用による MGR 測定は LPS を使用するよりも副作用が少なく、外来患者でもできるとしている⁸⁾。しかし、

hydrocortisone は MGR の測定には有効であるが、同時に好中球の末梢より組織内への侵入も低下させるので、MGR の測定は3時間以内に行なわなければならない。その他、epinephrine は marginated pool を circulatory pool へと移動させる作用があり、marginated granulocyte pool の測定に使用されている。

著者の精製した factor もその作用時間を考えてみると、第一の可能性としては、直接的、間接的に MGR より末梢への好中球放出を刺激しているのか、又は次の可能性として epinephrine の作用のように肺や脾の marginated pool を末梢へ移動させているのではないかと考えられる。幸山は、 α -globulin 主成分分画を家兎に静注し、12時間後に骨髄では幼若好中球を主体とした骨髄性細胞の増加、24時間目には成熟好中球を主体とした骨髄性細胞の増加を認めている¹⁵⁾。

stress がなかった際や、実験的に作られた好中球減少症の際に骨髄より末梢へ好中球を放出する特殊な因子があることが知られている。Gordon らはこの因子を leucocytosis promoting factor と呼び、比較的小分子の蛋白であり、ラットや犬で好中球減少症を実験的におこすと血清中に認められるとしている¹¹⁾。この血清を他の動物、又は好中球減少症から回復した動物に注入すると、一過性の好中球増多がおこる。この因子の作用機序は不明であるが、骨髄細胞それ自体に働くのではなく、骨髄の血管と sinusoid に作用して、比較的未熟な細胞を放出するものと考えられている³¹⁾。

Chvernick は好中球動員因子は同時に、好中球の分裂、分化を促進するとしているが⁵⁾、緊急に好中球を必要とする時には好中球の放出と分裂分化はほぼ同時におこりうることであり、一つの因子が好中球の放出と分裂分化を促進するという追試はされておらず、Quesenbery らは好中球の放出と、好中球分裂分化を促進する因子は別のものであるとしている²⁰⁾。

好中球の chemotaxis は、炎症において重要な役割を演じている。好中球は直接作用して chemotaxis をおこす物質を chemotaxin という。casein, Witte peptone や細菌から放出される種々の因子は外因性の chemotaxin とされ、血清中では、complement 系, kallikrein 系, plasmin 系が chemotaxin の生成に関与しており、又、chemotaxin は種々の細胞、たとえば、好中球、virus 感染細胞、リンパ球、肥満細胞、破壊された赤血球からも放出されている。これらの chemotaxin が好中球増多動員因子としての作用をもっているのかは不明である²⁸⁾。

骨髄に対する好中球増多産生因子に関する研究は種々行なわれているが、その大部分は *in vitro* 系で行なわれている。動物に人工的に好中球増多症や減少症をおこさせ、その血清を他の動物へ注入し、末梢好中球の増加を測定するものであった。ヒトでも同様の

研究が行なわれている。又、*in vitro* 系で diffusion chamber を使用しての研究も進んでいる。*in vitro* 系における研究で種々の granulopoietin が報告されているが、これらの物質が真の granulopoietin であるためには *in vivo* で好中球系細胞の分裂分化をおこすことを証明しなければならず、現在 *in vivo* 系では granulopoietin は証明されていない。過去においては末梢赤血球が erythropoietin を通じて赤血球産生を制限しているのと同様に末梢好中球が negative feed back 作用していると考えられたが、もしも末梢好中球数が増加すれば、骨髓好中球産生は減少し、末梢好中球数が減少すれば、産生は増加するはずであるが、細菌感染症の時などは、末梢好中球は増加し、骨髓中の好中球系細胞の分裂分化が認められる。もしも negative feed back がはたらけば、好中球産生は減少し、宿主は重大な危機に直面する。現在では、このような特別な状態では、末梢で破壊された好中球より好中球産生を促進する物質が放出され、それが骨髓に対して、positive feed back をおこしていると考えられている²⁵⁾。

一方、chalone を通じての negative feed back 機構も考えられている。chalone は組織特異性のある inhibitor であり、組織の可逆的な細胞分裂分化を阻止する因子であり、現在までに12の chalone system が知られている。好中球から分離された好中球 chalone は一番よく研究されており、*in vitro*、

in vivo で好中球の分裂分化を阻止する。好中球 chalone は成熟好中球や脾から生食水により抽出され、限外口過、sephadex G25 によりかなり精製されており、20~30個のアミノ酸より構成されている。好中球 chalone は *in vitro* で好中球への ³H-thymidine の利り込みを阻止し、ラット chloroma の発育を阻止するが、erythroblast や lymphocyte の分裂分化を阻止しない。chalone の作用機序としては stem cell より分化した好中球 progenitor cell から成熟好中球への分裂分化を制限している。細胞毒性はなく、血液幹細胞に対する作用もなく細胞分裂を阻止するので、急性、慢性骨髄性白血病の治療に応用されている²⁷⁾。

骨髓内の成熟好中球数のみが好中球産生に feed back していることも考えにくい。慢性感染症では骨髓内好中球系細胞の過形成が認められるからである。しかし急性炎症で大量に動員されていた好中球が、炎症がおさまるとともに放出因子が減少し、骨髓内成熟好中球数が増加すると、好中球系細胞分裂分化は低下することは骨髓内成熟好中球が好中球分裂分化になにか negative feed back 機構をもっていることを示している²⁷⁾。

以上のことから、好中球の分裂分化を規定している positive と negative feed back 機構が考えられる(図11)。negative feed back は骨髓内の成熟好中球により cell to cell interaction のよう

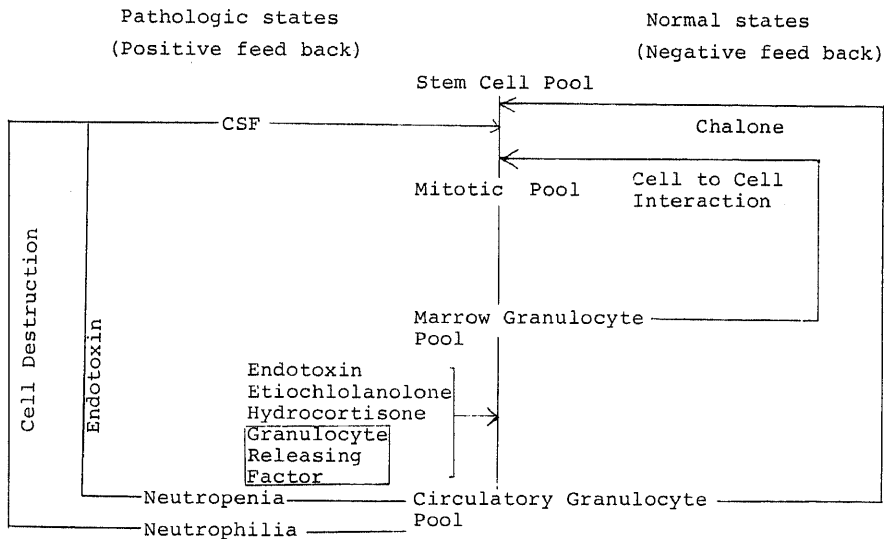


図11 好中球産生動員の制限機構

な短い range のものと、chalone をとおしてのものがあ、positive feed back は erythropoietin のように末梢の好中球数に応じて、やや長い range で行なわれる。この現象は正常の steady state が、急性感染のような末梢好中球要求の増加の場合は説明しうが、抗癌剤投与による好中球減少に続く好中球分裂分化は説明がつかず、別の機構が必要である。しかし、好中球減少症は好中球增多症とは異なり、その多くは医原性疾患か virus 性疾患であり、正常な状態より大きくはなれた状態であり、Queseenberg らは好中球減少症の好中球産生を刺激する物質は endotoxin であるとしている²⁰。

近年、*in vitro* において semisolid tissue culture を用いて好中球の分裂分化を検討する方法が発達してきた。この方法は基本的には petri dish 中に agar 又は methylcellulose と細胞培養液およびウシ胎児血清を加えて、血液細胞を培養すると、好中球と macrophage よりなる colony がつくられることである^{20,23}。colony を作る細胞はサルでは中等大の単核細胞であり、好中球系や赤芽球系のような特徴をもたない。初期にはマウス脾における colony forming cell と *in vitro* colony forming cell は同一のものであるとされていたが、現在では *in vitro* colony forming cell は好中球系 progenitor cell であるとされている²⁰。マウスでは7日後、ヒトでは10~14日後に細胞数が2000個以上となり、colony が形成される。colony は好中球か macrophage であるか、両者の混合細胞よりなっている。

colony の形成は colony stimulating factor が存在しないとおこらない。初期には、CSF は好中球からつくられているとされていたが²⁶、最近では CSF は末梢 monocyte 由来であるとされている³¹。肝や脾からも CSF が由来するし、肺内の macrophage からもつくられ、CSF は一連の reticuloendothelial system よりつくられている²⁹。

CSF の生化学的性質はくわしくしらべられており²⁹、ヒト尿より精製された CSF は glycoprotein であり、分子量は zone sedimentation では45000、gel filtration では190,000であり、電気泳動では α -globulin である。熱不安定であり、chymotrypsin, subtilisin, periodate oxidation で不活化する。これらの諸性質は erythropoietin に似ているが、erythropoietin には CSF 作用はない。

CSF 作用機構に関して詳しいことは不明であるが、細胞分裂の trigger というよりは、細胞分裂の全過

程を通じて必要であり²⁰、培養液中に conconavalin A を加えることにより阻止される。動物に endotoxin や抗好中球抗体を注入すると血清中の CSF が増加する。これは好中球が破壊されて、その結果 CSF が血清中に増加するものと考えられている²⁰。

CSF が *in vivo* において真の granulopoietin であるかは問題のあるところである³¹。Stohlman は CSF が granulopoietin であることを証明するには CSF の投与により持続性の好中球增多がおこることを証明するか、骨髄内において好中球系細胞への分裂分化を促進することを証明しなければならないとしている³¹。Bradley らはマウスで CSF を注入し、好中球の增多および、³H-thymidine の好中球へのとり込みが高くなることを示し⁴、Metcalf らも同様の結果を報告している²⁰。又、臨床的にも手術などの stress の際、好中球の増加と、CSF の増加は平行し³²、周期性好中球增多を示す慢性白血病や、周期性好中球減少症の患者でも好中球と CSF 値とは平行して変化するといわれる^{10,18}。現在のところ CSF は *in vivo* において erythropoietin と同様に好中球系細胞の産生を規制している一応考えられる。

著者の精製した因子も glycoprotein であるが、分子量がやや大きく、その *in vivo* で作用が短かい点、さらに *in vitro* では CSF としての作用が認められなかった点で、その主たる作用は好中球放出作用が強いと思われる。

ま と め

free flow electrophoresis, preparative acrylamide disc gel electrophoresis を使用して家兔血清中の好中球增多動員因子を精製した。

1. その物質は分子量60,000の glycoprotein であり、heat labile であり、その最小有効濃度は0.125 mg/kg で精製により活性値は約8倍に上昇した。

2. その生体内での作用機序はその作用時間や好中球増加が一過性である点、又、*in vitro* で CSF 活性を認めない点より、granulopoietin というよりは一種の releasing factor であろうと考えられた。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師服部絢一教授に深く感謝いたします。

本研究は昭和47年度(757092)及び昭和48年度(844041)の文部省科学研究費によった。

文 献

- 1) Bierman, HR : Ann. NY. Acad. Sci., 113, 753 (1964).
- 2) Bishop, CR., Athens, JW., & Boggs, DR. : J. Clin. Invest., 47, 249 (1968).
- 3) Boggs, DR. : Semin. Hematol., 4, 359 (1967).
- 4) Bradley, TR. : Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 42, 287 (1966).
- 5) Chervenick, P. A. : Blood, 40, 949 (1972).
- 6) Craddock, CG. : Hematology, p.593, New York, McGraw Hill, 1972.
- 7) Davis, B. J. : Ann. NY. Acad. Sci., 121, 404 (1964).
- 8) Deinard, AS., Fortuny, IE. & Theologides, A. : Cancer, 33, 1210 (1974).
- 9) Fink, ME., Calavresi, P. : Ann. Intern. Med., 57, 732 (1962).
- 10) Gatti, RA., Robbinson, WA. & Deinerd, AS. : Blood, 41, 771 (1973).
- 11) Gordon, AS., Handler, ES. & Siegel, CD. : Ann. NY. Acad. Sci., 113, 766 (1964).
- 12) 服部絢一, 福田 肇 : 最新医学, 16, 2362 (1961).
- 13) Hunning, K., Klofat, W. & Endres, H. : Z. Naturf., 196, 1072 (1964).
- 14) 小宮悦造, 河北靖夫 : 日本血液学全書, 2, 435 (1963).
- 15) 幸山 達 : 九血会誌, 17, 267 (1967).
- 16) Lichtman, MA., Weed, RI. : Blood, 39, 301 (1972).
- 17) Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. & Landoll, RJ. : J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 18) Mangalik, A., Robinson, WA. : Blood, 41, 79 (1973).
- 19) Menkin, V. : Lancet, 17, 660 (1947).
- 20) Metcalf, D. : J. Cell. Physiol., 76, 89 (1970).
- 21) 美川隆造 : 九血会誌, 14, 107 (1964).
- 22) Perry, S., Godwin, HA. & Zimmerman, TS. : JAMA, 203, 937 (1968).
- 23) Pulznick, DH., Sachs, L. : J. Cell. Comp. Physiol., 66, 319 (1965).
- 24) Quesenbery, P., Morley, A. & Stholman, F. Jr., : N. Engl. J. Med., 286, 227 (1972).
- 25) Robinson, WA., Mangalik, A. : Lancet, 2, 742 (1972).
- 26) Robinson, WA., Mangalik, A. : Semin. Hematol., 12, 7 (1975).
- 27) Rotymaa, T., Kivimemi, K. : Cell Tissue Kinet., 1, 329 (1968).
- 28) Senn, HJ., Jungi, WF. : Semin. Hematol., 12, 27 (1975).
- 29) Stanley, ER., Bradley, TR. & Sumner, MH. : J. Cell Physiol., 78, 301 (1971).
- 30) Steinberg, B. : Arch. Pathol., 67, 489 (1959).
- 31) Stohlman, F. Jr., Quesenberry, P. & Tyler, WS. : Progress in Hematology, 8, 259 (1973).
- 32) Weiner, HL., Robinson, WA. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 136, 29 (1971).
- 33) Weiseberger, AS., Heinle, RW. & Hannah, R. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70, 749 (1949).

Abstract

The granulocyte proliferating and releasing factor from rabbit serum obtained 2 hours after an injection of RNA degradates was purified and characterized using carrier free flow electrophoresis (VaP₂) and preparative acrylamide disc gel electrophoresis (Uniphor 7900). The factor was a heat labile glycoprotein with a molecular weight of 60,000 estimated by SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis and contained 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein of sialic acid, 70 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein of hexose and 60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein of hexosamine. After the injection of this factor, 2 mg/kg, granulocytes were increased approximately 8 fold within 3-5 hours. The minimal effective dose was 0.125 mg/kg—an about 8 fold increase in activity compared to

α -globulin fraction. The factor might be a releasing factor rather than a proliferating factor because of its temporal neutrophil increasing effect *in vivo* and absence of significant colony stimulating activity *in vitro*.
