ブタ腎臓抽出液のコロニー増幅活性について

柏倉幾郎, 早瀬幸俊, 高木良成*

北海道薬科大学

Colony Promoting Activity in Porcine Kidney Extract

IKUO KASHIWAKURA, YUKITOSHI HAYASE, and YOSHINARI TAKAGI*

Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences, 7-1,
Katsuraokacho, Otaru, 047-02, Japan

(Received April 22, 1988)

Aqueous extracts prepared from porcine kidneys (PKE) were found to promote colony formation in agar cultures of mouse bone marrow cells stimulated by colony stimulating factor (CSF) and to exhibit no detectable activity of CSF. The extract (PKE) enhanced colony formation about twice in comparison with control. On the cultures of the marrow cells from 5-FU injected mice with PKE, colony enhancement ratio increased to 3 and 1.5 times in comparison with that of control and that of 5-FU untreated mice, respectively. Furthermore, preincubation of bone marrow cells with PKE for 2 or 3 d caused an increase in the number of colony forming units in culture (CFU-C) by a factor of 1.5 of its initial number, whereas preincubation without PKE caused a considerable decrease of CFU-C number.

These results suggest that the colony promoting activity of PKE influenced colony growth by enhancing the target cells of CSF. And there is a possibility that the colony promoting activity of PKE is a physiological factor in maintaining the number of CSF-responsive cells by proliferating and differentiating pre-CFU-C.

It is found that there is a similarity between the colony promoting activity of PKE and the other sources in regard to heat sensitivity, trypsin sensitivity and some properties of their target cells.

Keywords—colony promoting activity; CFU-C (colony forming unit in culture); kidney; kidney extract; bone marrow culture

白血球系幹細胞 (colony forming unit in culture, CFU-C) が増殖分化し軟寒天培養系でコロニーを形成するためには, colony stimulating factor (CSF) の存在を必要とする.^{1,2)} CSF は血清,³⁾ 人尿,⁴⁾ 組織抽出物⁵⁾ 又は種々の細胞や組織の培養液⁶⁻⁹⁾ に含まれることが知られている. 更に CSF 活性を持たないが, CSF と共存させることによりコロニー数を増加させる因子 (colony promoting activity, CPA) が存在することが知られている. CPA は, 赤血球の溶血液¹⁰⁾ や細菌内毒素を投与したマウスの血清,¹¹⁾ マウス骨髓性白血病細胞培養上清¹²⁾ 及び骨髓細胞の長期培養上清^{13,14)} 中に見い出されており, その作用は CFU-C より未成熟な前駆細胞 (pre-CFU-C) に作用し, pre-CFU-C を CSF 反応性の CFU-C にまで増殖分化させると推定されている. 近年, Aizawa ら¹⁵⁾ は CPA を含むマウス骨髓性白血病細胞培養上清を CSF と共にマウスに静脈内投与した結果, 末梢血中の顆粒球数及び脾臓中の colony forming unit in spleen (CFU-S), CFU-C の数が増加することを報告しており, CPA が *in vivo* でも造血作用をもつことが示唆された.

著者らは, ブタ腎臓の可溶性分画中に CPA が存在することを認め, その作用及び性質について検討した.

実 験 方 法

ブタ腎臓抽出液 (PKE) の調製 屠殺後 3 時間以内のブタ腎臓を使用した. 氷冷下で蒸留水を加え, Waring-blendor により 12% (w/v) ホモジネートを作成した. このホモジネートを 1×10^5 g (Hitachi rotor 42T, 37500 rpm, 4°C, 30 min) で遠心分離し, 得られた上澄を凍結乾燥した. これをもとの超遠沈上澄液量の 1/10 容量の蒸

留水に溶解後、硫安分画を行い、50%以上65%飽和画分を採取した。これを100倍量の蒸留水に対しViskingチューブを用いて3回透析した後凍結乾燥し、超遠沈上澄液量の1/50容量の蒸留水に溶解後、メンブランフィルター(ポアサイズ0.45 μm , 富士フィルム)を通したものをPKEとして使用した。保存は -20°C で行った。実験には同一ロットのものを使用した。

CPAの測定 Tsurusawaら¹⁴⁾の方法に基づき、軟寒天コロニー形成法により行った。CSFとしてマウス腹膜培養液20%, ウマ血清(Gibco)20%, 寒天(Difco)0.32%及びddY系成熟雄性マウス大腿骨より得た骨髓細胞 5×10^4 個を含むF-10培地とPKEの混合液1mlを、直径35mmのプラスチックシャーレ(テルモ)にまき、 37°C , 5% CO_2 存在下で7日間培養した後、細胞50個以上からなるコロニーを計数した。

骨髓細胞のPreincubation マウス大腿骨より得た骨髓細胞を、PKE 0.5ml, ウマ血清20%を含むF-10培地10mlに、細胞濃度が $8-9 \times 10^5$ cells/mlになるように浮遊させ、 37°C , 5% CO_2 存在下で1-3日間preincubateした。PKEの代わりに蒸留水を加えたものを対照とした。次に、細胞をF-10で3回洗浄し適当量のF-10に懸濁して細胞数を計数した後、CSFとしてマウス腹膜培養液を含む軟寒天培養系で7日間培養し、コロニー数を計数した。

CSFの調製 1) 腹膜CSF(マウス腹膜培養液, AWCM): ddY系成熟雄性マウスより腹膜を無菌的に取り出し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後細切し、ウマ血清20%を含むF-10培地10mlに浮遊させ、 37°C , 5% CO_2 存在下で培養した。3日後培養液を回収し、滅菌ろ過し、使用するまで -20°C で保存した。2) ADCM: 前に報告したマウス骨髓細胞長期培養由来の吸着細胞が産生するCSF(adherent cell conditioned medium, ADCM)¹⁶⁾を用いた。長期培養細胞を10% fetal calf serum(FCS)を含むF-10培地で培養し、confluentに達した後serum-free F-10培地に替え、更に4日間培養した。得られた無血清培養液を限外ろ過(PM-10, ADVANTEC)により濃縮し、使用するまで -20°C で保存した。

トリプシン処理 試料0.2ml(蛋白濃度6mg/ml)に対し、4mg/mlのtrypsin(bovine pancreas, Sigma)溶液0.1mlを添加し、 37°C で2時間インキュベートした。反応終了後、4mg/mlのtrypsin inhibitor(soybeans, Sigma)溶液0.1mlを添加し、更に30分間インキュベート後100 μl あたりのCPAを測定した。別に水0.2mlを同様に処理したもの及び試料を 37°C で2.5時間処理したものをそれぞれ対照とした。

コロニー構成細胞種の判定 既報のエステラーゼ2重染色法¹⁷⁾を適用した。培養終了後、軟寒天層をスライドガラス上に移し取り、冷風で乾燥後、10%ホルマリン-メタノール溶液で固定した。非特異的エステラーゼ染色は、基質に α -naphthyl butyrate(Sigma), 色素にfast garnet GBC salt(Sigma)を用い、またクロロアセテートエステラーゼ染色の場合にはそれぞれnaphthyl AS-D chroloacetate, fast blue GBC salt(いずれもSigma)を用いた。後染色は、Mayerのヘマトキシリン染色で行った。

5-Fluorouracil(5-FU)投与マウス骨髓細胞の調製 Sudaら¹⁸⁾の方法を参考に行った。生後10週齢のBDF₁雌マウスに対し、5-FU(協和発酵)を尾静脈投与(120mg/kg of body weight)し、4日後に大腿骨より骨髓細胞を採取し使用した。

結 果

コロニー数に対するPKEの影響

一定量のCSF存在下でPKEの添加量の変化に伴うコロニー数の変化を検討した。Table Iに示すように、PKEの添加量を5-100 μl と増加させるに伴いCSF単独に比べ1.49-2.23倍のコロニー数の増加が認められた。CSFを加えない状態ではPKEを100 μl まで増加させてもコロニー形成は認められなかった。なお、いくつかのPKEのロットについてもCPAの測定を行ったが、いずれのロットにも同程度の活性が検出された。

PKEの作用に及ぼすCSF濃度の影響

PKE 50 μl 存在下で、CSF(AWCM)の添加量を0%-20%まで変え、コロニー数を測定した。CSF単独ではCSF量の増加に伴いコロニー数も増加し15%で最大刺激濃度に達した。これに対してPKEを添加した時には各CSF濃度で2-2.7倍のコロニー数の増加がみられたが、Table IIに示すようにはほぼ最大刺激を示すCSF量においてはPKEの増幅活性に大きな差は認められなかった。

コロニー組成に及ぼすPKEの影響

2種類の性質の異なったCSFについて、コロニー組成に対するPKEの影響を検討した(Table III)。いずれのCSFも最大刺激濃度で行った。AWCMを用いた場合、顆粒球コロニーが73%と最も多く形成されるが、

TABLE I. CPA of PKE

PKE (μ l)	No. of colonies/ 5×10^4 bone marrow cells		Ratio ^{b)}
	Without CSF	With CSF ^{a)}	
0	0	51.2 ± 4.1	1.00
5	0	76.5 ± 3.5	1.49
10	0	83.9 ± 4.4	1.64
20	0	94.5 ± 5.9	1.85
50	0	106.5 ± 4.7	2.08
100	0	114.2 ± 9.2	2.23

Mean $\pm$ S.E. of 6 dishes from two separate experiments.
 a) CSF: mouse abdominal wall conditioned medium.
 (AWCM) 20%. b) Ratio: with PKE/without PKE.

TABLE II. Effect of CSF Concentration on CPA of PKE

CSF ^{a)} (%)	No. of colonies/ 5×10^4 bone marrow cells		Ratio ^{c)}
	Without PKE	With PKE ^{b)}	
0	0	0	
5	31.7 ± 0.7	87.0 ± 7.6	2.74
10	49.4 ± 2.8	99.7 ± 5.3	2.02
15	53.2 ± 5.5	109.2 ± 8.7	2.05
20	51.9 ± 4.7	107.9 ± 4.7	2.08

Mean $\pm$ S.E. of 6 dishes from two separate experiments.
 a) CSF: mouse abdominal wall conditioned medium.
 (AWCM). b) 50 μ l/dish. c) Ratio: with PKE/without PKE.

TABLE III. Effect of PKE on Colony Type

	No. of colonies	Macrophage	Mixed	Granulocyte
AWCM	51.1 ± 3.4 (100%)	5.5 ± 0.5 (10.8%)	8.1 ± 0.6 (15.9%)	37.5 ± 3.7 (73.2%)
AWCM+PKE	107.2 ± 3.2 (100%)	11.1 ± 0.9 (10.4%)	23.5 ± 1.5 (21.9%)	72.6 ± 3.6 (67.7%)
Ratio	2.1	2.0	2.9	2.0
ADCM	40.7 ± 0.9 (100%)	40.7 ± 0.9 (100%)	0	0
ADCM+PKE	80.7 ± 9.1 (100%)	80.7 ± 9.1 (100%)	0	0
Ratio	2.0	2.0	—	—

Mean $\pm$ S.E. of 6 dishes from two separate experiments.

PKE の添加によってもその組成に大きな変化は認められなかった。一方, ADCM では形成されるのはすべてマクロファージコロニーであり, PKE の添加でコロニー数は増加したが, すべてマクロファージコロニーであった。したがって, コロニー組成に対する PKE の影響はほとんど認められなかった。

PKE の安定性

Table IV に示したように, 未処理の PKE の添加により, コロニー数は対照の 2.2 倍に増加するのに対し, 56°C で 30 分間又は 60 分間加熱処理した PKE でのコロニー数の増加は, いずれの場合も 1.4 倍, 70°C, 30 分間加熱処理した PKE では 1.1 倍となり, コロニー増幅活性は熱に対し不安定であることが明らかとなった。一方, トリプシン処理した PKE では Table V に示すように, コロニー数の増加は認められず, コロニー増幅活性はトリプシン感受性であることも明らかとなった。

Preincubation における骨髓細胞に対する PKE の影響

骨髓細胞を 20% ウマ血清を含む F-10 培地に浮遊させ, 1—3 日間 PKE と preincubate した後, 細胞を洗浄し, CSF を加えて軟寒天培養を行った (Table VI)。PKE の有無にかかわらず総細胞数は同程度に減少したが, preincubation 時に PKE を添加したものでは, フラスコあたりの CFU-C 数は開始時に比べて 1 日目で 105%, 2 日目及び 3 日目で約 150% に増加した。これに対して, PKE を添加しなかったものでは CFU-C 数は日を追って減少し, 3 日目には開始時の 12.7% に減少した。また骨髓細胞 1×10^4 個あたりのコロニー数すなわち CFU-C の濃度は, PKE を添加しない場合には開始時と顕著な差は認められなかったが, PKE を添加した場合には日を追って増加し, 3 日目では開始時の約 16 倍に増加した。

TABLE IV. Effect of Heating on CPA of PKE

Treatment	No. of colonies	Ratio
Control	56.7±1.1	1.00
Untreated PKE	125.7±3.8	2.22
56°C, 30 min PKE	79.4±4.9	1.40
56°C, 60 min PKE	78.8±2.3	1.39
70°C, 30 min PKE	63.3±3.2	1.12

Mean±S.E. of 6 dishes from two separate experiments.

TABLE V. Effect of Trypsin Digestion on CPA of PKE

Treatment	No. of colonies	Ratio
Control	48.7±2.4	1.00
37°C, 2.5 h PKE	106.3±0.7	2.18
Trypsinized PKE	50.0±2.5	1.03

Mean±S.E. of 6 dishes from two separate experiments.

TABLE VI. Effect of Preincubation of Bone Marrow Cell with PKE on CFU-C

Incubation time (d)	No. of cells ($\times 10^{-4}$)		Colonies/ 10^4 cells		No. of CFU-C ($\times 10^{-3}$)/flask	
	PKE (-)	PKE (+)	PKE (-)	PKE (+)	PKE (-)	PKE (+)
0	873 (100%)		15.4		13.4 (100%)	
1	232 (26.6%)	238 (27.3%)	26.4	59.4	6.1 (45.5%)	14.1 (105.0%)
2	167 (19.2%)	179 (20.5%)	21.3	115.2	3.6 (26.4%)	20.6 (153.4%)
3	60 (6.9%)	83 (9.6%)	28.6	243.3	1.7 (12.7%)	20.3 (150.8%)

Mean from two separate experiments.

TABLE VII. Effect of PKE on Colony Formation of 5-FU Injected Mouse Bone Marrow Cells

Treatment	Mice	No. of colonies		Ratio
		Without PKE	With PKE	
Control (5×10^4 cells)	8	60.3±1.4	124.5± 8.5	2.07
5-FU (3×10^5 cells)	11	34.0±4.6	102.6±13.7	3.02

Mean±S.E.

5-FU 投与マウス骨髄細胞のコロニー形成に対する PKE の作用

5-FU を投与したマウスの骨髄細胞を用い CFU-C の測定を行った. その結果 Table VII に示すように, 5-FU 非投与マウスの骨髄細胞においては PKE によりコロニー数は約 2 倍に増加したのに対し, 5-FU 投与マウスの骨髄細胞では PKE の添加によりコロニー数の増加は約 3 倍と, 対照に比べより高い増加率を示した.

考 察

Table I に示したように, PKE は CSF 存在下でマウス骨髄細胞による顆粒球-マクロファージ系のコロニー数を増加させることから PKE 中に CPA が含まれていることが明らかになった. PKE によるコロニー増幅率は, CSF の濃度が高い領域では, 一定であった (Table II). また, 2 種の CSF を用いた実験では, CSF の種類を変えても, 形成されるコロニー組成に変化を与えず (Table III), 生成するコロニーの種類は共存する CSF の性質に依存することが示唆された. これらのことから, CPA と CSF の作用点が異なることが推定され, 次に考察する細胞の一連の分化過程のうちの異なった段階に作用するとする考えを支持する.

PKE 添加培地で CSF を加えずに骨髄細胞を preincubate すると, 総細胞数は減少するのに対し CFU-C 数が増加する. 一方, PKE を加えない場合には総細胞数, CFU-C 数ともに減少する (Table VI) ことから, PKE には CFU-C を特異的に維持する作用とともに, 増加させる作用があると考えられる. したがって, PKE は CFU-C より pre-CFU-C に働き, それを CSF 反応性である CFU-C にまで増殖・分化させる作用によりコロ

ニー数を増加させていることが示唆された。

マウスに抗腫瘍剤 5-FU を投与すると、骨髓中に未熟な造血前駆細胞が増加する¹⁹⁾ことを利用して、5-FU 投与マウスの骨髓細胞について、PKE の作用を検討した結果、正常骨髓細胞を用いた場合に比べて 5-FU 投与マウスの骨髓細胞を用いた場合のほうがコロニー増幅率は高い値を示した (Table VII)。このことはやはり、PKE が pre-CFU-C を増殖させる作用をもつことをうらづけている。

また PKE 中の CPA 活性は 70°C, 30 分間の加熱処理で失活し、トリプシン感受性であることが明らかとなった (Table IV, V)。

CPA についての関連する報告には、マウス骨髓性白血病細胞 (WEHI-3) 培養上清,¹²⁾ マウス骨髓細胞長期培養上清¹⁸⁾及びヒト末梢血白血球の培養液²⁰⁾に含まれる CPA がマウス骨髓細胞の CFU-C の維持、増加作用をもつという報告、マウス骨髓性白血病細胞培養上清中に含まれる CPA は、CSF の標的細胞より未熟な造血前駆細胞に対し作用している可能性を示唆した報告、¹²⁾ マウス骨髓細胞長期培養上清中の CPA は CFU-S には作用しないことから、CFU-S と CFU-C の間の cell population に作用することを示唆した報告、¹⁸⁾ 熱安定性及びトリプシン感受性についての報告²¹⁾などある。この報告において著者等が存在を明らかにした腎臓抽出物中に含まれる CPA についても、他の原料に由来するそれらの CPA の性質及び作用と一致する点が多く認められ、類似の物質である可能性がある。

腎臓は赤血球の産生をつかさどる体液性因子であるエリスロポエチンを分泌し、²²⁾ CSF を含有し⁵⁾また腎細胞による *in vitro* での CSF 産生²³⁾など造血に深く関与する臓器の 1 つであることが知られている。一方、ブタ循環器系、消化器系等がヒトのそれに類似していると言われている。²⁴⁾ 既に報告されている他の CPA の多くが各種細胞の培養液中に検出されているのに対し、著者らは CPA を臓器中に初めて見出し、その臓器が腎臓であることを考え合わせると、造血系に果たす腎臓の役割を考える上で興味深い。

引用文献

- 1) M. Paran, L. Sachs, *J. Cell. Physiol.*, **72**, 247 (1968).
- 2) G. Pigoli, A. Waheed, R. K. Shaddock, *Blood*, **59**, 408 (1982).
- 3) R. W. Bolin, W. A. Robinson, *J. Cell. Physiol.*, **92**, 145 (1977).
- 4) K. Motoyoshi, F. Takaku, H. Mizoguchi, Y. Miura, *Blood*, **52**, 1012 (1978).
- 5) J. W. Sheridan, E. R. Stanley, *J. Cell. Physiol.*, **78**, 451 (1971).
- 6) M. J. Cline, B. Rothman, D. W. Golde, *J. Cell. Physiol.*, **84**, 193 (1974).
- 7) T. Okabe, H. Nomura, N. Sato, N. Ohsawa, *J. Cell. Physiol.*, **110**, 43 (1982).
- 8) M.-C. Wu, R. A. Fisher, *Biochemistry*, **19**, 3846 (1980).
- 9) K. Tsuneoka, M. Shikita, *Cell. Struc. Func.*, **9**, 67 (1984).
- 10) K. Tsuneoka, Y. Takagi, K. Hirashima, M. Shikita, *Exp. Hemat.*, **6**, 445 (1978).
- 11) S. Bol, N. Williams, *J. Cell. Physiol.*, **102**, 233 (1980).
- 12) 梶ヶ谷保彦, 生田孝一郎, 小磯良孝, 船曳哲典, 松山秀介, 日本血液学会雑誌, **50**, 575 (1987).
- 13) H. Izumi, M. Tsurusawa, T. Miyanomae, K. Kumagai, K. J. Mori, *Leuk. Res.*, **7**, 155 (1983).
- 14) M. Tsurusawa, T. Miyanomae, H. Izumi, K. J. Mori, *Leuk. Res.*, **7**, 167 (1983).
- 15) S. Aizawa, I. Amaki, M. Tsurusawa, H. Tezuka, H. Izumi, K. J. Mori, *ACTA Haematol. Jpn.*, **49**, 19 (1986).
- 16) 柏倉幾郎, 早瀬幸敏, 高木良成, 日本薬学会第 105 年会講演要旨集, 千葉, 1986, p. 345.
- 17) 柏倉幾郎, 早瀬幸敏, 高木良成, 薬誌, **105**, 42 (1985).
- 18) T. Suda, J. Suda, M. Ogawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 6689 (1983).
- 19) T. Nakahata, T. Akabane, *Acta Haematol. Jpn.*, **47**, 1764 (1984).
- 20) G. Wagemaker, M. F. Peters, *Cell Tissue Kinet.*, **11**, 45 (1978).
- 21) 上代淑人, 菊池吾郎, “続生化学実験講座 8 巻, 血液上,” 第 1 版, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1987, pp. 31—35.
- 22) J. W. Fisher, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **173**, 289 (1983).
- 23) T. R. Bradley, D. Metcalf, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **44**, 287 (1966).
- 24) 谷本義文, “血液学—ヒトと動物の接点—,” 清至書院, 東京, 1982, pp. 111—117.