

- 39: 1, 1986.
- 9) Kindler, V., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 1001, 1986.
- 10) Yang, Y-C., et al.: Cell, 47: 3, 1986.
- 11) Yokota, T., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: , 1984.
- 12) Dorssers, L., et al.: Gene, 55: 115, 1987.
- 13) Wong, G.G., et al.: Science, 235: 1504, 1987.
- 14) Sawada, H., et al.: Acta Haematol. JPN, 51: in press (1988), Interleukin 3-producing T cell lines derived from a mouse with granulocytosis and characteristics of the colony stimulating activities.
- 15) Sakoda, H., et al.: Biomedicine, in press, Clonal assay of mast cell progenitors in semi-solid culture with a high seeding efficiency.
- 16) Itoh, K., et al.: submitted, Long-term cultivation of an interleukin-3 producing cell line in chemically defined protein-free medium.

## 5) CSF

新潟大学医学部第一内科 鳥羽 健・古川 達雄  
岸 賢治・伊藤 正毅  
森山 美昭・柴田 昭  
新潟大学医学部第二病理 福田 剛明

## Colony Stimulating Factor: The distribution in human organs

Ken TOBA, Tatsuo FURUKAWA, Kenji KISHI,  
Seiki ITO, Yoshiaki MORIYAMA and Akira SHIBATA

*1st Department of Internal Medicine,  
Niigata University School of Medicine*

Takeaki FUKUDA

*2nd Department of Pathology,  
Niigata University School of Medicine*

The cloning of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) has been recently established. Thereafter, purified recombinant hG-CSF have been able to be used for study. However there is no report demonstrating the distribution of G-CSF in human organs. In order to clarify this point, we made ginea pig antisera against hG-CSF, and immunohistological studies were done. A human CSF producing cancer cell line SPT-3.25, established in our laboratory, was also examined as a positive control.

Reprint requests to: Ken TOBA,  
1st Department of Internal Medicine,  
Niigata University School of Medicine  
Niigata City, 951 JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部第一内科学教室  
鳥羽 健

The immunohistological study revealed that G-CSF like substance is present in SPT-3.25 cells, chief cells of gastric gland, exocrine cells of pyloric gland, salivary gland and pancreas and syncytial trophoblast of placenta. On the other hand, it was absent in liver, spleen, lung, kidney and lymph node.

For the purpose of determining the expression hG-CSF messenger RNA, northern blotting analysis was then done using 40-mer oligo DNA encoding hG-CSF. Poly (A<sup>+</sup>) RNA extracted from SPT-3.25 was hybridized with the probe, and the messenger size appeared to be 1.5kb. However none of poly (A<sup>+</sup>) RNA extracted from spleen, gastric mucosa and placenta was found to be hybridized with it. Based on this preliminary study, G-CSF content must be analyzed in the extract of organs which were positively stained with anti G-CSF antisera, to determine if these organs be able to produce G-CSF in vivo.

Key words: human G-CSF, Immunohistology, messenger RNA.

ヒト G-CSF, 免疫組織学, mRNA.

血液細胞の増殖と分化は生理的には骨髄内で行われている。このしくみを研究する造血幹細胞学は、1) 各種造血因子の発見と、2) in vitro コロニー形成法の開発の、両者が密接に関連し合って、近年目ざましい発展を遂げ、エリスロポエチン<sup>1)</sup>や各種 CSF<sup>2)3)</sup>のように、すでに臨床治験に供されているものもある。しかし、これら造血因子の生体内における分布、あるいは産生臓器については、一部のものをのぞいてまだ明らかとなっていない。

今回我々は、大腸菌由来純化 rhG-CSF を手に入れ、モルモットに免疫して抗体を作成し、免疫組織学的にヒト臓器内分布を調べ、またそのうちいくつかの臓器については、hG-CSF に対するブローベを用いて、Northern blotting を行い、G-CSF の mRNA の発現を調べた。

## 方 法

rhG-CSF は中外製薬(株)新薬研究所より供与を受けた、大腸菌由来純化 rhG-CSF 凍結乾燥品を用いた。免疫には、8~10週齢 Hartley 種モルモットのオス6匹をもちいた。免疫組織学には、剖検材料より得た正常臓器をホルマリン固定パラフィン包埋後切り出した連続切片を用い、HE 染色標本と比較した。Northern blotting analysis には、持田製薬(株)細胞科学研究所より供与を受けた。hG-CSF の 40 mer oligodeoxynucleotide

5' TCCCATCTGCAGAGCTTCTTGGAGGTGTCGTA

CCGCGTTC3'

をブローベとし、<sup>4)</sup> 臓器は手術時に得られた胃粘膜・脾臓および胎盤で、いずれも採取後すみやかに冷生理食塩水にて還流水洗後、液体窒素中で凍結したものを用いた。免疫組織および Northern blotting analysis には positive control として、当科で樹立した CSF 産生腫瘍細胞株 SPT-3.25 を用いた。

1) 抗 hG-CSF 抗体の作製: rhG-CSF 凍結乾燥品を Bolate-Borax buffer (0.1M, pH 9.0) 中に溶解し、1% Glutar aldehyde 存在下に CSF の3倍量の bovine serum albumin (fraction V) と2時間反応させ1昼夜生理食塩水に透析したものを、等量の Freund's complete adjuvant と混和乳化し、モルモットに1匹あたり rhG-CSF 量で約 20 $\mu$ g 皮下注射した。4週間間隔で合計3回免疫し、最後の免疫の10日後に胸腔内より採血し、抗血清を得た。抗血清は等量の BSA 3mg/ml 加生理食塩水と混和し、BSA を吸収したものを、各濃度に希釈して用いた。抗体の吸収試験は、終濃度 10 $\mu$ g/ml となるように rhG-CSF を加えておこなった。

2) 抗体力値の検定: chloramine T 法にて <sup>125</sup>I を導入し、セファデックス G-10 カラムで精製した <sup>125</sup>I-G-CSF を、各濃度の抗血清と反応させ、RIA を行った。

3) 免疫組織: 各臓器切片標本をキシレンで脱パラフィン化し各濃度のアルコール水で順次洗い、最後にリン酸 buffer で洗った後、150倍に希釈した抗 hG-CSF 抗体を約2時間反応させ、洗浄後抗モルモット IgG ウサギ抗体 FITC にて1時間反応後洗浄し、蛍光顕微鏡にて

観察した。

4) Northern blotting analysis : 各臓器材料および細胞株より, guanidium-thiocyanates cesium chloride 法<sup>5)</sup>にて total RNA をとり, さらに Poly A RNA を oligo dT cellulose column により分離精製した. poly A RNA 5 $\mu$ g または total RNA 10 $\mu$ g を 1.1% agarose formamide ゲルにて電気泳動後, ニトロセルロース膜に移し,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP にてラベルしたプローブでハイブリダイゼーション後, オートラジオグラフィーを行った。

## 結 果

1) 抗体の力値 : 6 匹のモルモットより得られた血清を用いて <sup>125</sup>I-G-CSF を抗原とした RIA を行ったところ, 5 匹の血清で, 希釈濃度 1,000 倍から 512,000 倍まで濃度依存性に <sup>125</sup>I-G-CSF と反応した。

2) 免疫組織 : 得られた抗血清のうち 1 匹の血清を 150 倍希釈で免疫組織に用いた。CSF 産生腫瘍株 SPT-3.25 培養細胞 (図 1) は, 抗血清により胞体内に陽性物質が検出され, rhG-CSF で吸収した抗血清では陰性であった。臓器切片では, 胃の胃底腺主細胞 (図 2) および幽門腺細胞で陽性のほか, 唾液腺・脾の外分泌腺細胞および胎盤の合胞体細胞で陽性であった。一方, 肝・脾・肺・

表 1 hG-CSF 様物質の組織分布

肝	(-)
脾	(-)
肺	(-)
腎	(-)
リンパ節	(-)
胃	胃底腺主細胞 幽門腺細胞
唾液腺	外分泌腺細胞
脾	外分泌腺細胞
胎 盤	合胞体細胞

腎およびリンパ節では, 陰性であった (表 1)。

3) Northern blotting analysis : SPT-3.25 より抽出した mRNA からは, hG-CSF のプローブとハイブリダイズする 1.5kb の RNA<sup>4)</sup> が検出されたが, 脾・胃粘膜および胎盤より抽出した RNA からは, 検出されなかった (図 3)。

## 考 察

hG-CSF のヒトにおける臓器分布に関する報告はない。単球あるいはマクロファージの培養上清中に G-CSF

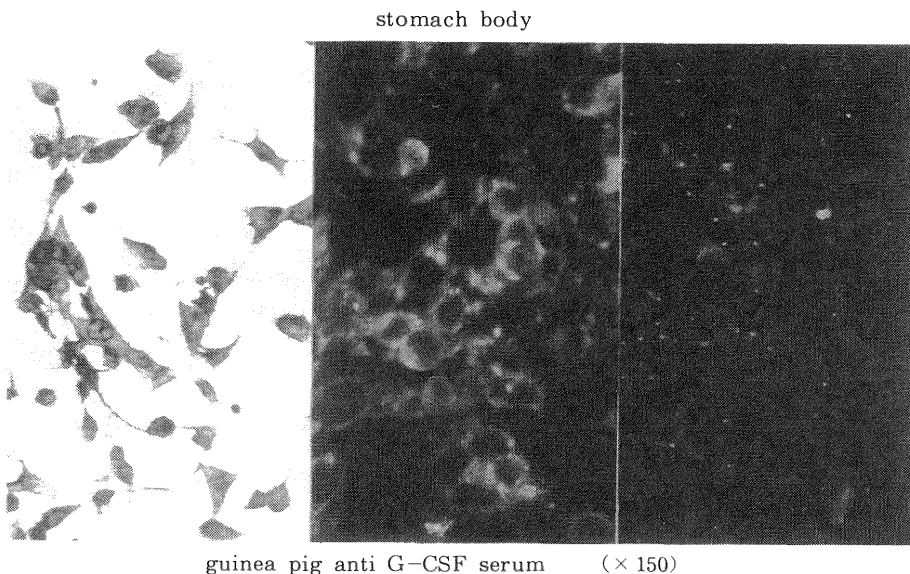


図 1 CSF 産生腫瘍株 SPT-3.25 細胞 (写真左: May-Gimsa 染色) は抗 hG-CSF 抗体に陽性の物質を有し (写真中), rhG-CSF で吸収した抗体では陰性 (写真右) となる。

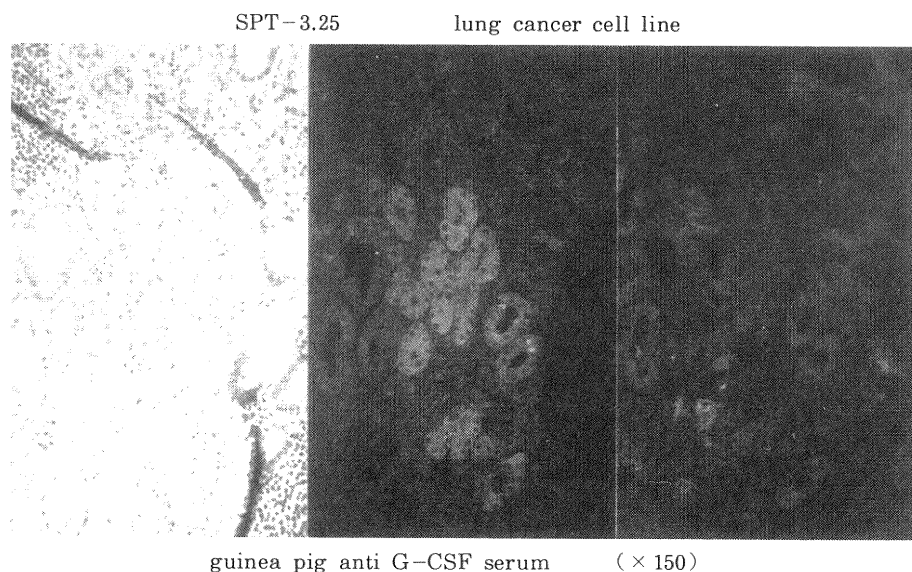


図2 胃底腺(写真左: HE 染色)では, 主細胞が抗 hG-CSF 抗体で陽性(写真中)となり, rhG-CSF で吸収した抗体では陰性(写真右)となる。

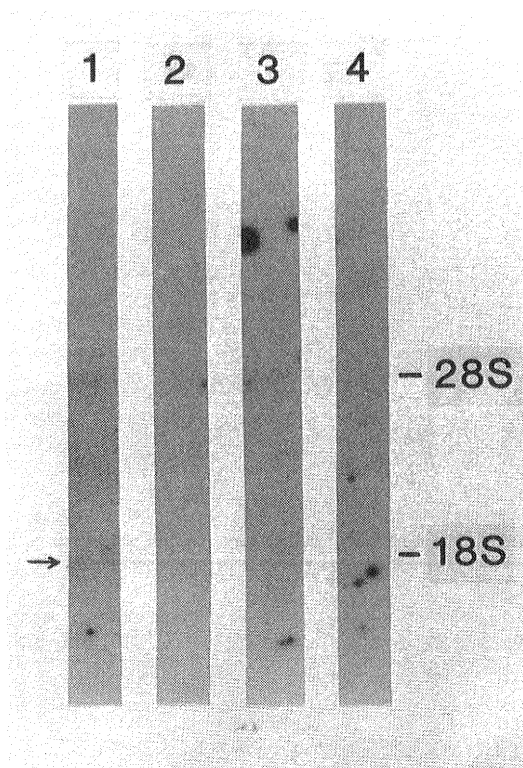


図3 hG-CSF の 40mer oligoDNA をプローベとした Northern blotting analysis では, SPT-3.25(lane 1) の 1.5kb poly (A<sup>+</sup>) RNA とハイブリダイズするが(矢印), 脾(lane 2)・胃粘膜(lane 3)・胎盤(lane 4)より抽出した poly (A<sup>+</sup>) RNA とはハイブリダイズしない。

活性が存在するという報告<sup>6)</sup>があり, 我々は当初より hG-CSF が網内系臓器に分布していることを予想していたが, 今回の検討では hG-CSF と共通抗原性をもつ物質はリンパ節・肺・肝・脾の網内系臓器には検出されず, むしろ内胚葉由来の外分泌細胞に陽性であった。これら陽性臓器は, 外界からの細菌の進入門戸であり, 細菌の感染に際してすみやかに白血球が増加することと合致するように思われる。しかし一方, 内分泌細胞ではなしに外分泌細胞に陽性であったことは, CSF の予想される作用機序と矛盾する。

これら外分泌細胞は, 免疫組織的にしばしば非特異的に陽性となることが知られており, hG-CSF で吸収した血清により組織における陽性物質の抗原特異性を確認したとはいえ, 非特異的反応である可能性も否定できない。また, 実際に胃粘膜や胎盤で G-CSF を産生しているとしても, その産生細胞の組織における割合は少なく, またこれら臓器のように蛋白合成のさかんな臓器で

は G-CSF 以外の RNA の量も多いため, Northern blotting で検出されないことも十分うなずける.

今後, 各臓器抽出物中の hG-CSF 濃度の測定など, さらに詳しい検討が必須である.

#### 略 語 表

G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor

rhG-CSF: recombinant human G-CSF

mRNA: messenger RNA

#### 参 考 文 献

- 1) Eschbach, J.W., Egrie, J.C., Downing, M.R., Browne, J.K. and Adamson, J.W.: Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin (Results of a combined phase I and II clinical trial), *New Engl. J. Med.*, **316**: 73~78, 1987.
- 2) Motoyoshi, K., Takaku, F., Maekawa, T., Miura, Y., et al.: Protective effect of partially purified human urinary colony-stimulating factor on granulocytopenia after antitumor chemotherapy, *Exp. Hematol.*, **14**: 1069~1075, 1986.
- 3) Vadhan-Raj, S., Keating, M., LeMaistre, A., Hittelman, W.N., et al.: Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes, *New Engl. J. Med.*, **317**: 1545~1552, 1987.
- 4) Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T., et al.: Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor, *Nature*, **319**: 415~418, 1986.
- 5) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (New York), 1982.
- 6) Ishizaka, Y., Motoyoshi, K., Hatake, K., Saito, M., Takaku, F. and Miura, Y.: Mode of action of human urinary colony-stimulating factor, *Exp. Hematol.*, **14**: 1~8, 1986.

#### 6) Epo の臨床

信楽園病院 平 沢 由 平