

4) IL-3

マウスおよびヒト IL-3 産生 T 細胞株の樹立と
マスト細胞コロニー形成法を用いた活性測定

新潟大学理学部生物学科 森 和 博

Establishment of mouse and human IL-3 producing T cell lines and a specific technique for quantification of IL-3 activity by mast cell-colony formation in soft agar.

Kazuhiro J. Mori

Department of Biology, Faculty of Science, Niigata University

Radiation-induced L8313 "leukemia" bearing mice of Yoshida and Seki show marked granulocytosis and increase in hemopoietic stem cells and progenitors in the spleen. Serum and spleen-conditioned medium of the mouse induced CFU-mix, BFU-E and GM-CFC derived colonies, and supported growth of IL-3 dependent cell lines, FDC-P2 and DA-1. They also induced mast cell colony formation in semi-solid agar system.

T cell lines (STIL-3) that produce IL-3 were established from the spleen of these mice, with surface markers of helper (STIL-3D), suppressor (STIL-3C) and non-H, non-S (STIL-3A)T cells.

An ATL patient was found to show a similar syndrome with granulocytosis and high level of IL-3 in the serum as L8313. IL-2 dependent helper T cell line (HIL-3) that produces human IL-3 was established from the bone marrow of the patient. This IL-3 acts not only on human marrow cells but also on mouse marrow cells as target, which is completely different from previously reported "human" IL-3. Our human IL-3 appears to be native and innate IL-3.

Soft-agar system was applied for assay of IL-3 activity. This agar system supports 100% pure mast cell colony-formation with high seeding efficiency, when marrow cells were cultured with IL-3 for 2-3 weeks, thus providing a useful technique for quantification of IL-3 activity.

Key words: IL-3, T-cell leukemia, granulocytosis, mast cell colony-formation, IL-3 producing cell lines.

インターロイキン-3, 顆粒球増多症, マスト細胞コロニー, IL-3 産生細胞.

Reprint requests to: Kazuhiro J. Mori,
Department of Biology, Faculty of
Science, Niigata University, Igarashi,
Niigata, 950-21 JAPAN.

別刷請求先: 〒950-21 新潟市五十嵐2の町 8050
新潟大学理学部生物学科 森 和 博

ヌードマウス脾細胞の 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -SDH) を誘導する因子として同定された Interleukin-3 (IL-3) は、その後の研究からマスト(肥満)細胞誘導因子と同一であることが示され、現代では造血幹細胞およびそれに由来する顆粒球・マクロファージ、巨核球、赤血球系の前駆細胞の増殖と分化を促進する細胞成長因子であり、かつてマスト細胞増殖因子 (M-CSF)、多能コロニー形成因子 (multi-CSF)、Burst promoting activity (BPA)、Thy-1 誘導活性 (TIF) と呼ばれていたものの統一的呼称となっている。

本稿では、私達の研究室で樹立したマウス IL-3 産生 T 細胞 (STIL-3)、ヒト IL-3 産生 T 細胞 (HIL-3) について、また IL-3 活性測定の指標として開発した 100% 純粋なマスト細胞コロニー形成法について延べる。

I. 成熟顆粒球増多症を示す L8313 マウス

千葉放医研の関、吉田によって樹立された L8313 マウス (C3H) は末梢血液中の成熟顆粒球数が数十万にも達し (図 1)、脾・骨髓細胞の移植によって継代可能な白血病様症状を示すマウスである。また脾においては造血幹細胞および全系列の前駆細胞の増加が見られる (表 1)。一方、骨髓では多くの白血病の場合と同じく、全ての造血前駆細胞が減少する。

このマウスの血清および脾細胞培養上清中には IL-3

活性が検出されること (図 2)、また脾・骨髓内に Thy 1⁺ 細胞の有意な増加が認められることから、我々はこの L8313 は T 細胞白血病であり、この転異 T 細胞の産生する IL-3 に反応して正常造血幹細胞、前駆細胞の増殖分化が促進し顆粒球増多症に到る白血病様反応 (Leukemoid Reaction) と考えた。事実抗 Thy 1 抗体で処理した L8313 マウス脾細胞を C3H マウスに移植すると、“白血病”は起らないか著しく遅延する。

II. IL-3 産生 T 細胞株 (STIL-3) の樹立

L8313 マウスの脾細胞の培養により、IL-3 産生 T 細胞株を数株得た。最初に同定されたのが Thy 1 \cdot 2⁺, Ly 2 \cdot 1⁺ かつ DNA の rearrangement の起っている suppressor T 細胞株であったため、これを STIL-3 と名付けたが、他の株について調べると 1 つは、helper T、もう 1 つはどちらも言えない Thy 1 \cdot 2 のみ (+) の細胞であったので Suppressor の S をフランス語のマウス (Souris) と解することにしたが、このように suppressor T (STIL-3C series), helper T (STIL-3D series), non-S, non-H T (STIL-3A series) のいずれも IL-3 を産生する (表 2, 3)。これらの細胞を C3H マウスに移植すると L8313 と全く同様な白血病様症状を起し、さらに STIL-3 細胞を含む diffusion chamber をマウス腹腔内に入れることによっても同様

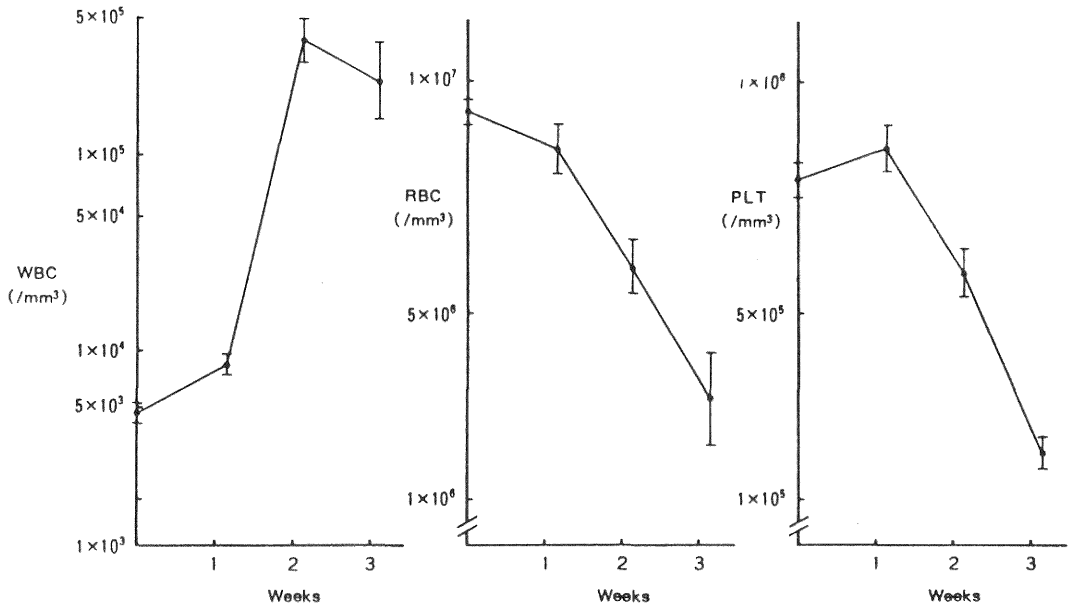


Fig. 1 Change in the number of peripheral blood cells after the injection of 1×10^7 leukemic spleen cells.

Table 1 Changes in the Number of Hemopoietic Stem Cells in The Spleen

Day after L8313 spleen cells injection	Day 0	Day 8	Day 16	Day 22
Spleen weight (mg)	90±6.8 (1)	413±69.4 (4.59)	1160±86.4 (12.9)	1610±60.0 (17.9)
CFU-GM per2×10 ⁵ NC*	30.6±6.8 (1)	105±16.4 (14.4)	146.2±21.1 (52.1)	96±8.5 (43.9)
CFU-E per2×10 ⁵ NC	125±14.7 (1)	100±13.9 (3.36)	88.3±12.4 (7.7)	57.9±7.5 (6.49)
BFU-E per2×10 ⁵ NC	7.2±2.8 (1)	6.6±2.9 (3.85)	3.6±3.2 (5.45)	4.1±2.3 (7.95)
CFU-Mix per2×10 ⁵ NC	4.3±1.0 (1)	3.7±1.9 (3.61)	1.3±2.2 (3.29)	1.1±1.1 (3.58)
CFU-S per2×10 ⁵ NC	10.6±2.8 (1)	27.4±4.8 (10.9)	12.5±4.0 (12.9)	13±3.2 (17.2)

Cells were assayed for hemopoietic stem cell precursors, as described in the text.

Abdominal wall-conditioned medium and pokeweed mitogen stimulated spleen conditioned medium were used as CSFs, at a final concentration of 10% (v/v), respectively.

All results are the mean (±S.D.).

The proportion to day 0 (normal control) values per spleen is indicated in parentheses.

*NC : nucleated cells.

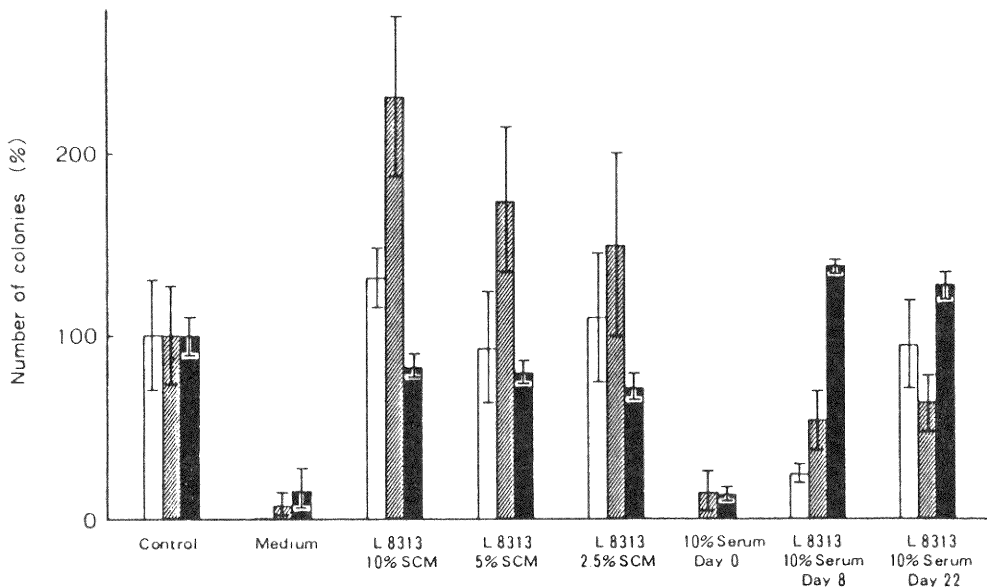


Fig. 2 Hemopoietic stimulating activities of spleen conditioned media and sera from L8313 mice. Open column represents CFU-Mix, shaded column BFU-E, closed column CFU-GM. Five per cent (v/v) normal mouse pokeweed mitogen stimulated spleen conditioned medium and 10% (v/v) abdominal wall conditioned medium were used as controls. Sera were used at a final concentration of 10% (v/v). Controls are represented as 100% (±S.D.).

Table 2 Surface Marker Analysis

	A ₅	A ₁₁	C ₅	C ₁₁	D ₇	D ₁₀
Thy 1.2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Lyt 1.1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)(±)	(-)(±)
Lyt 2.1	(-)(±)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
L ₃ T ₄	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)

Table 3 IL-3 Activity

Conditioned Medium from	IL-3 dependent cells	
	FDC-P2 (cpm)	DA-1 (cpm)
Neg. Cont	632± 123	1371± 266
WEHI-3	135330±10272	65089±4788
A ₅	166405±11300	59470±6745
A ₁₁	142787±11290	57318±5691
C ₅	169189± 1388	49939±8463
C ₁₁	146548± 6371	55754±6846
D ₇	138166± 4750	53655±1502
D ₁₀	167080±10823	60402±7669

WEHI-3 conditioned medium was used as positive control (10%v/v).
STIL-3 conditioned media were used at a final concentration of 10%v/v.
All results are the mean (±S.D.).

な症状が得られることから、IL-3 産生T細胞が L8313 tumor 細胞であることが明らかとなった。ただ、STIL-3D は C3H マウスへの移植が出来ない点が問題であるが、これらの細胞はいずれも IL-2 を添加しない培養液で樹立したので、正常T細胞でないことは明らかであろう。またこれらの細胞を抗 Thy 1 抗体で処理すると IL-3 産生が低下することも知られている。

無血清培養液やそれを使った謂ゆる無血清培養による研究が流行して来ている様であるが、これはいずれもアルブミン (BSA) や下垂体抽出物、トランスフェリン等を含む。このような細胞・組織抽出物あるいは生体産物は結局のところ血清と同様いわば細胞のオシッコであって“無血清”の語は言葉の遊び、すり換えに過ぎないと私は思っている。

そこで我々は、「真の」無血清培地すなわち無蛋白培地に STIL-3 を適応させることを試みた。現在 STIL-3D を RPMI-1640+HamF 12 (1:1) 培養液で増殖させることに成功し、これを STIL-3DF と名付けているが、この STIL-3DF を含む STIL-3 細胞株は IL-3 のみを産生していることを mRNA レベルで確認している。E. coli などに cDNA を組み込み産生させた

recombinant 成長因子が純品としてもはやされているが、当然のことながらこれらの標品はバクテリア産物を含みやはり精製が必要である。さらに DNA 産物としてのタンパクも細胞内での Splicing や modification が起ってはおじめて“Native”な活性因子として分泌される場合が多い。またタンパク分子への糖鎖・脂質等の付加も重要であろう。これらの点から、我々の STIL-3DF はその産生 IL-3 活性の高さ、Native IL-3 であることにおいて、経済的にも充分評価され得るものと考えている。

Ⅲ. ヒト IL-3 産生T細胞株の樹立

STIL-3 細胞を移植した C3H マウスでは脾・骨髄中ともに全有核細胞の約20%を STIL-3 が占めるが、骨髄では他は主として単球系細胞であり、末血では数十万に達する有核細胞の98%以上が成熟顆粒球でありマスト細胞が散見される。このように IL-3 によって顆粒球増多症の起るのは幹細胞の増殖を IL-3 が刺激するが、IL-3 にはマスト細胞を除いて分化方向決定の特異性はなく例えば Erythropoietin (EPO) 共存によって赤血球方向へ、Granulocyte-colony stimulating factor の共存によって顆粒球方向への分化が誘導される。我々は

造血幹細胞は単球マクロファージの方向へ先祖返りとも言うべき成熟を示すものと考えているが、これが IL-3 のもつ GM-CSF 活性 (これについては後述)、あるいは IL-3 刺激の下にマクロファージから出される CSF 活性の共存によって顆粒球への終末分化を促進し、顆粒球増多症をきたすものであろうと考えている。

ATL 患者で顆粒球増多症を起している症例が京大内科手塚裕章によって見いだされたが、この患者もやはり骨髄では単球増多症が見られることから、これは ATL 細胞の 1 clone の産生する IL-3 に正常造血細胞が反応した、丁度 L8313 マウスと相同な症状ではないかと考え、IL-3 産生 T 細胞株の樹立を同内科土井章一が試みた。

この場合は (患者が死亡したため) IL-2 を加えた培養液によって T 細胞株の樹立を試み、IL-2 依存性に増殖する helper T 細胞株 (Human IL-3 producing cell line: HIL-3) を得た (表 4)。この細胞培養上清はヒト骨髄培養系に加えると浮遊培養では全血球系細胞を増殖分化させ、軟寒天培養では好塩基 (またはマスト) 細胞コロニー形成を誘導する点で、マウス IL-3 と全く同じ活性を持つ (表 5)。またヒト造血細胞に活性を持つギボン IL-3 の cDNA を probe として Northern Blotting を行った結果 1.1Kb のところに IL-3 mRNA があることも示された。

この Genetic Institute (GI) グループの “ヒト” IL-3 および、これを probe として ConA および TPA で刺激したヒト Lymphocytes から釣り上げた IL-3 は、いずれもマウス造血細胞には無効であるが、我々のヒト IL-3 はマウス造血細胞にも有効である点が特徴

と言える (表 6)。

一般にヒト細胞成長因子はマウス、ラットには有効であるがその逆は少ないことが知られているが、GI の IL-3 はその点を矛盾する。これはギボンの IL-3 遺伝子をヒト細胞に組込んだ際に DNA の一部が欠損したためではなかろうか、元吉らは彼の発見したヒト CSF-1 の cDNA を cloning し、Stanley の発見した CSF-1 は、元吉の CSF-1 cDNA 塩基配列のうち 691~1584 番までが deplete しているものであることを報告している。おそらく同様な現象が我々のヒト IL-3 と GI の “ヒト” IL-3 との間にも見られ、これがマウス造血細胞に対する作用の有無として現れるのではないかと想像して、現在 IL-3 の精製と cDNA の cloning を進めている。COS 細胞で発現させた “ヒト” IL-3 は分子量 15,000、マウス IL-3 は 28,000 程度であるが、我々のヒト IL-3

Table 4 Cell surface markers for HIL-3

Phenotype	
E-rosette	84% (+)
HLA-DR	97% (+)
OKT 1	95% (+)
OKT 3	67% (+)
OKT 4	79% (+)
OKT 8	0% (-)
OKT 11	96% (+)
Tac	95% (+)
Bl	0% (-)
TdT	0% (-)

Table 5 Culture of human bone marrow cells in a semisolid agar medium in the presence of the HIL-3 culture supernatant

Concentration of HIL-3 culture supernatant (%)	No. of Colonies/10 ⁵ marrow cells	
	7 days	14 days
5	10 ± 2.0 (* a)	NT
10	16 ± 1.2	NT
20	22 ± 1.0 (* a)	59 ± 9.9 (* b)
30	30 ± 1.0	NT

(* a) : 50% of the total colonies were metachromatic cell colonies stained with toluidine blue.

(* b) : 90% of the total colonies were mast cell colonies.

NT : not tested

These results show that in human bone marrow cells, completely pure basophilic cells are produced at a rate of 100 to 400 colonies/10⁵ human bone marrow cells. The metachromatic cells obtained were perhaps mast cells.

Table 6 Culture of mouse bone marrow in a semisolid agar medium in the presence of the HIL-3 culture supernatant

Concentration of HIL-3 culture supernatant (%)	No. of mast cell colonies per 10 ⁵ marrow cells	
	7 days	14 days
0	0	0
5	50 ± 3.6	11 ± 1.0
10	191 ± 15.9	100 ± 9.5
20	248 ± 12.2	181 ± 11.5
30	403 ± 39.8	255 ± 20.1
40	396 ± 40.7	272 ± 14.4

はむしろマウス IL-3 に近い分子量を持つのではなからうか。ただし、我々の IL-3 もその mRNA はマウス IL-3 cDNA とは hybridize せず、またマウス IL-3 依存性細胞 FDC-P2, DA-1 の増殖は支持しない。

IV. IL-3 活性定量のためのマスト細胞コロニー形成法

IL-3 活性の検出同定は、主として 20 α -SDH の誘導、IL-3 依存性増殖細胞 (FDC-P2, DA-1, 32Dcl) の増殖支持などを指標として行われているが、20 α -SDH 誘導は GM-CSF でも起り、また FDC-P2, DA-1 等も IL-3 に特異的に反応するものではないことが知られ絶えざる re-cloning が必要である。さらにこれらの細胞はヒト IL-3 に反応せず (マウス IL-3 との間の cDNA homology が28%程度のためかも知れないが、我々のヒト IL-3 はマウス造血細胞に有効であるにも拘らず、これらの IL-3 依存性細胞には作用しないので結局は分らない)、multi-CSF 活性あるいは BPA 活性として検出されているのが現状である。マスト細胞、好塩基球への分化誘導も指標として用いられるが、これらいずれも Seeding efficiency が低く、例えば CFU-mix

(multi-CSF) は $\sim 10/10^5$ 骨髄細胞、マスト細胞コロニーは in vitro で、 $\sim 20/10^5$, in vivo で 2-5/ 10^5 骨髄細胞であり、定量性に欠ける。

我々は、マスト細胞前駆細胞の増殖分化支持には皮下組織におけるように一種の構造を有した milieu が必要ではないかと考え、methylcellulose に代えて Agar 半固型培地による培養を試みた。

IL-3 を加えた Methylcellulose 培地で既報の通りマスト細胞コロニーは培養7日目で0、14-21日で ~ 15 個/ 10^5 骨髄細胞であり他は殆どマクロファージコロニーであった (表 7)。これに対して軟寒天培養では7日目で全コロニーの70%近くがマスト細胞コロニーであり14日-21日では100%マスト細胞コロニーが形成された (表 8)。一方、GM-CSF を加えた軟寒天培養ではマスト細胞コロニーは14日目にも検出されず、マスト細胞の誘導は少くとも通常の濃度では IL-3 の特異的誘導活性を示すものであることが分った (表 9)。

さらに、このマスト細胞コロニー形成は播種骨髄細胞数と直接的相関を示し (図 3)、また添加 IL-3 濃度と正比例することも示され (図 4)、Seeding efficiency

Table 7 Frequency of mast cell progenitors in fresh bone marrow as assayed in semi-solid methylcellulose culture.

Days of culture	Mast cell colonies	Granulocyte colonies	G-M colonies*	Macrophage colonies	Plating efficiency (per 10 ⁵ cells)
7	0	73 ± 5	41 ± 8	219 ± 11	0
14	15 ± 2	0	18 ± 2	270 ± 17	15
21	11 ± 1	0	0	198 ± 10	11

Femoral marrow cells were plated at a concentration of 1×10^5 cells per dish. STIL-3-CM (20%v/v) was used as a source of IL-3. Colonies were picked up individually and stained with May-Grünwald-Giemsa. *; Granulocyte-Macrophage colonies.

Table 8 Frequency of mast cell progenitors in fresh bone marrow as assayed in semi-solid agar culture.

Days of culute	Mast cell colonies	Granulocyte colonies	G-M colonies	Macrophage colonies	Plating efficiency (per 10^5 cells)
7	6.7 ± 3	0	3 ± 1	1.1 ± 2	6.7
14	13.7 ± 8	0	0	0	13.7

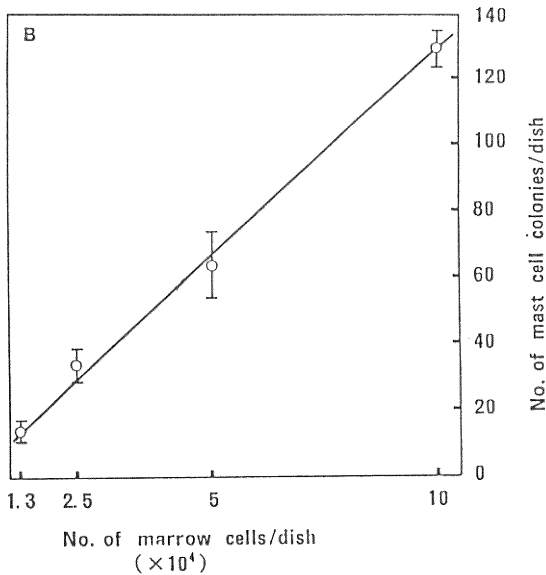
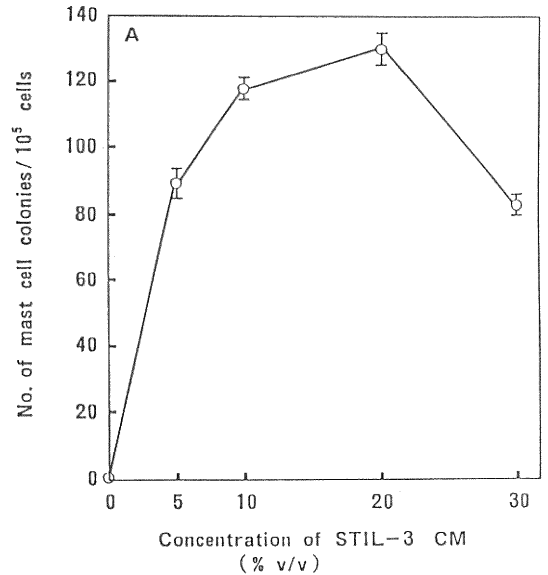
Femoral marrow cells were plated at a concentration of 1×10^5 cells per dish. STIL-3-CM (20% v/v) was used as a source of IL-3. Colonies were stained in situ with May-Grünwald-Giemsa or Toluidine blue for metachromatic granules.

Table 9 Colony types in agar-culture of mouse bone marrow cells stimulated with GM-CSF (mouse abdominal conditioned medium).

No. of colonies (per 10^5 cells)	Colony type				
	Granulocyte	Macrophage	G-M	Immature	Mast cell
166 (100%)	63 (38%)	26 (16%)	34 (20%)	43 (26%)	ND* (0%)

Mouse femoral marrow cells were cultured in 0.3% agar supplemented with the growth medium for CFU-GM assay. * ; not detectable.

Colonies were differentially counted after Giemsa staining on day 7 of culture.

**Fig. 3** Relationship between number of mast cell colonies and number of bone marrow cells seeded.**Fig. 4** Number of mast cell colonies induced by various concentrations of IL-3.

も 100~200 コロニー/10⁵ 骨髄細胞と極めて良好な IL-3 活性の定量法であることが明らかとなった。現在ヒト IL-3 の精製は、このマスト細胞コロニー形成を指標として、また我々のヒト IL-3 はマウス骨髄細胞にも有効であるので、時にヒト骨髄細胞でチェックしながら、主としてマウス骨髄細胞を標的として進めている。

V. まとめ

T細胞白血病によって惹起されたマウスおよびヒト顆粒球増多症について述べ、それらの脾あるいは骨髄細胞から樹立した IL-3 産生T細胞株について報告した。

また、軟寒天培地を用いた骨髄細胞のクローナル的培養、それも2~3週の長期培養により形成される100%純粋なマスト細胞コロニー数を指標とした IL-3 定量法について述べた。常法に従って1マスト細胞コロニー/10⁵ 骨髄細胞誘導能を1UnitとしてIL-3活性を示すことが可能である。

我々の樹立した HIL-3 株の産生するヒト IL-3 はヒトのみならずマウス造血細胞にも有効である点、より真の IL-3 のように思われる。その応用については医師諸兄姉の方が詳しいであろう。

VI. 蛇足—IL-3 分子と GM-CSF 活性について—

一般に IL-3 分子は GM-CSF 活性をも併せ持つ、あるいは IL-3 産生細胞の多くは GM-CSF も産生すると思われているようである。

STIL-3 の産生する IL-3 活性測定の過程で我々は STIL-3 が GM-CSF も分泌するとの報告をしたが、その後の研究により、STIL-3 は IL-3 のみ (IL-1~6, G. M-CSF (-) の意味) を産するものであることを知った。それでは GM-CSF として検出された顆粒状・マクロファージ (GM) コロニー誘導は如何なる条件によってもたらされたものであろうか。

GM コロニーの形成に我々は馬血清 (HS) を含む半固形培地を用いていたが、これを牛胎児血清 (FCS) に代えると、STIL-3 培養上清には GM コロニー形成誘導活性の無いことを見出した (図 5)。一方、GM-CSF による GM コロニー形成誘導は培養系に FCS を用いても HS を用いても差は認められない。これは FCS の阻害作用によるものではなく、HS によってはじめて賦与される活性である。牛血清 (BS) も HS と同様な作用を示す。FCS と HS の総タンパク量、アルブミン量を揃えた濃度にしても、この結果は変わらず、さらに WEHI-3 CM、および recombinant (rIL-3) を用いても同様な結果を得た (図 6)。また同じ FCS を用いた CFU-mix 培養系でみると、やはり GM コロニー形成

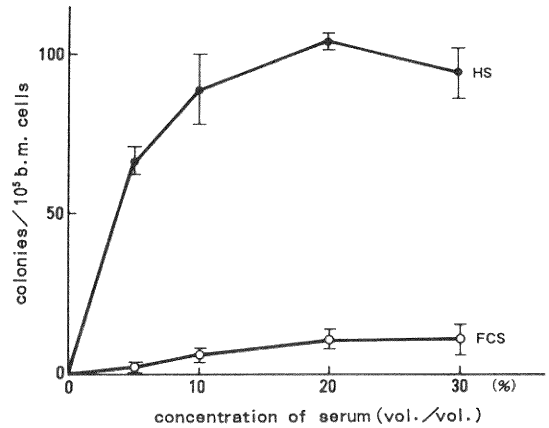


Fig. 5 GM-colony formation in FCS or HS containing semi-solid culture system with IL-3. STIL-3 CM was used as IL-3.

がみられる。

そこで我々は、(i) adult 動物血清 (アルブミン) 中に含まれる未知の因子、(ii) adult 動物血清に含まれる細胞内毒素 (LPS)、(iii) CFU-mix 系に添加される 2-mercaptethanol (2-ME) を容疑者として、FCS を用いた GM コロニー培養系に添加する実験を行った。

BSA は添加濃度に比例して IL-3 に CSA 活性を持たせる (図 7)、また BSA はクリスタルとした純品の方が LPS も濃縮されている。しかし、LPS は BSA 標品に含まれる LPS 量の50倍量を加えても GM-CSA 活性誘導は HS, BSA によるその30%程度である。一方 2-ME の添加は CFU-mix 系に用いる濃度 ($5 \times 10^{-5}M$) で HS, BSA に等しい GM-CSF 活性誘導能を与えることが分った。

すなわち、BSA に混在する何らかの因子が IL-3 分子に GM-CSF 活性をもたせる犯人であり、それは LPS だけではない。また 2-ME はタンパクの S-S 結合を切るものであるが、その結果として起った IL-3 分子の conformation (三次構造) の変化が“mask”されていた GM-CSF 活性を“demask”させるのがその機構ではないかと考えられる。

この証明のために、現在 2-ME 処理 IL-3 を等電点電気泳動で分画して、“変異”IL-3 分子の GM-CSF 活性を見る実験を計画中であるが、細胞成長因子はタンパクの三次構造次第で、その生物活性が変わる様であるし、さらに想像を進めれば GM-CSF, IL-3 等は共通

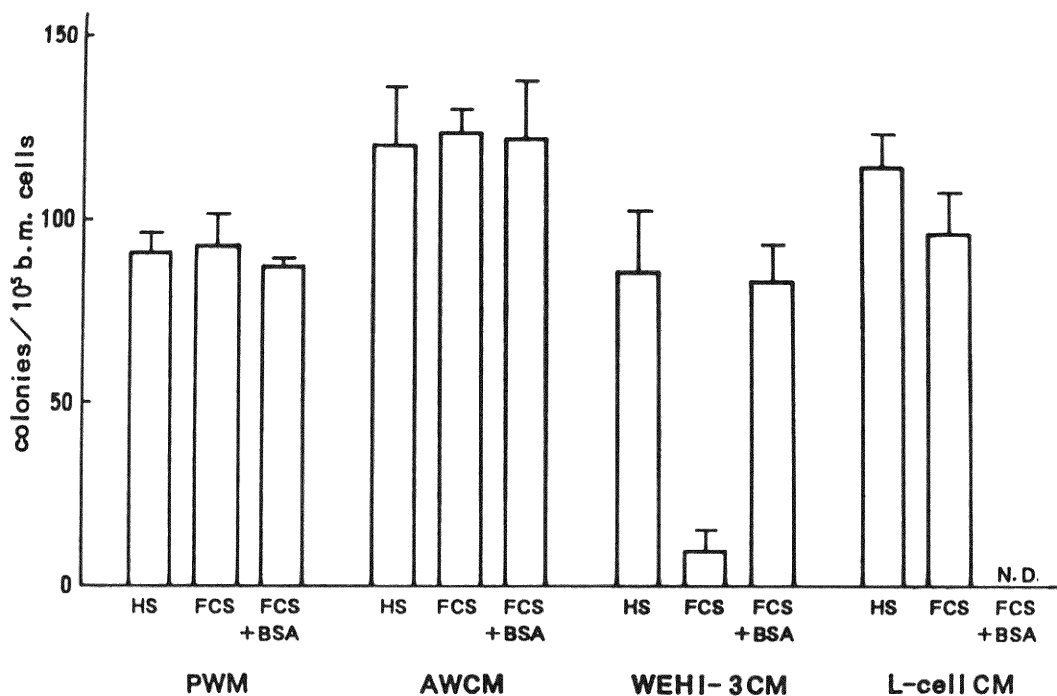


Fig. 6 Effect of HS and BSA on GM-colony formation in semi-solid culture system with FCS. Various sources of conditioned medium were used as GM-CSF or IL-3.

PWM : pokeweed mitogen-stimulated spleen CM, containing both IL-3 and GM-CSF
 AWCM: mouse abdominal wall-CM, containing GM-CSF
 L-cell CM: as Macrophage (M)-CSF
 WEHI-3 CM: as IL-3

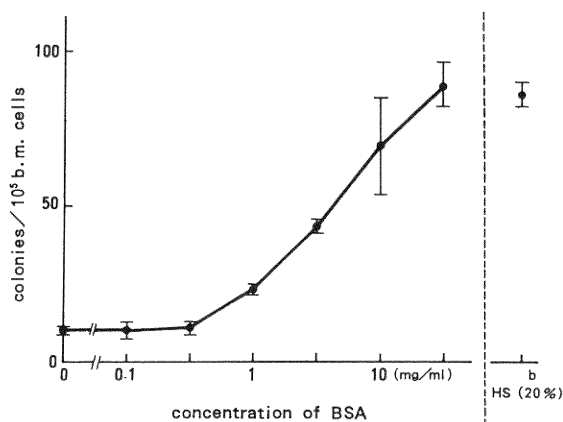


Fig. 7 Effect of bovine serum albumin on GM-colony formation in FCS-containing semi-solid culture system stimulated with IL-3 (STIL-3 CM).

BSA: crystal BSA was used

のタンパクからの splicing 等の「進化」によって分れて来たものかも知れないとの蛇足を加える次第である。

参考文献

- 1) 森 和博: 細胞工学, 2: 1375, 1983.
- 2) 森 和博, 手塚裕章: 病態生理, 6: 648, 1987.
- 3) Yoshida, K., et al.: Leuk. Res., 11: 621, 1987.
- 4) Sawada, H., et al.: Leuk. Res., 10: 1461, 1986.
- 5) Ythier, A.A., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7020, 1985.
- 6) Dorssers, L., et al.: Exp. Hematol., 12: 357, 1984.
- 7) Fung, M.C., et al.: Nature, 307: 233, 1984.
- 8) Ihle, J.N. and Weinstein, Y.: Adv. Immunol.,

- 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