



Title	ヒト顆粒球コロニー刺激因子のin vivo活性定量法の確立とその応用
Author(s)	服部, 有宏
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40441">https://hdl.handle.net/11094/40441</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	服 部 有 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 12687 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 9 月 19 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	ヒト顆粒球コロニー刺激因子の in vivo 活性定量法の確立とその応用
(主査)	
論 文 審 査 委 員	教 授 真弓 忠範
(副査)	
	教 授 馬場 明道 教 授 田中 慶一 教 授 宮本 和久

### 論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、ヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の in vivo 活性の定量法を確立することを目的に行ったものであり、さらにその方法を応用して G-CSF と GM-CSF の in vivo 効果の比較及び G-CSF の制癌剤の至適な投与間隔を短縮する効果について検討し、以下の知見を得た。

シクロフォスファミド(CPA)で誘発した好中球減少症マウスに G-CSF を CPA 投与の翌日から連日 4 日間投与したときの 4 日目の投与の 6 時間後の末梢好中球数と G-CSF の用量の対数との間に非常に相関の高い直線関係が成立することを見出し、この直線関係を利用した G-CSF の in vivo 活性の定量法(CPA-mouse 法)を確立した。この直線関係の再現性を検討した結果、回帰直線の Y 切片と傾きの変動係数は、6.1% 及び 14.1% であった。また、定量法の精度の指標である精度係数は、CPA-mouse 法では通常 0.2 程度である。G-CSF は in vivo において、造血前駆細胞から好中球への分化・増殖を刺激し好中球の産生を亢進させる作用と、産生された好中球の骨髄から循環血液中への動員作用という、独立した二つの作用を発揮するが、CPA-mouse 法ではこの 2 つの作用を同時に測定するものであった。このように、CPA-mouse 法は簡便性、再現性、正確性、精度及び測定意義に優れた方法であった。さらに、CPA-mouse 法を改変し、G-CSF の上記の 2 つの作用を別々に定量する方法についても確立した。

G-CSF と GM-CSF はともに生体内における好中球造血に関与する因子であり、また、好中機能に対しても同様の作用を示すと考えられていることから、臨床において各種の好中球減少症の治療薬としてほぼ同様に用いられている。しかし、in vitro における相違が最近になって幾つか報告されるようになったが、両者の in vivo での効果を直接比較した報告はほとんどなかった。そこで確立した定量法を用いて、G-CSF と GM-CSF の好中球減少症モデルマウスに対する作用の比較を行った。その結果、GM-CSF は骨髄での好中球産生亢進作用を有しているが、その効力は G-CSF の 1/10~1/30 程度であった。また GM-CSF は、G-CSF と同様に骨髄から好中球を動員する作用を有していた。しかし、GM-CSF によって動員された好中球は辺縁プールには移行するが、G-CSF とは異なり循環血液中には移行しなかった。また、G-CSF で動員した好中球はカゼイン刺激に反応して刺激局所へ移行することができるが、GM-CSF で動員した好中球は刺激局所へ移行できなかった。これらの結果は、報告されている in vitro での G-CSF と GM-CSF

の作用の相違をよく反映するものであった。また、これらのことから G-CSF の方が好中球減少症治療薬として優れていることが明らかになった。

制癌剤の繰り返し投与の間隔は、制癌効果に大きく影響する因子の一つであるが、同時に骨髄傷害の程度にも大きく影響する。そこで制癌剤の投与間隔と好中球の回復速度との関係を検討するとともに、制癌剤の至適な投与間隔に対する G-CSF の効果を、CPA-mouse 法の再現性の高さを利用して検討した。すなわち、制癌剤として CPA を用い、2 回繰り返して投与した場合の 2 回目の CPA に対するマウスの抵抗性が正常レベルに回復するのに要する CPA の投与間隔を検討し、さらにこの投与間隔に対する G-CSF の効果を検討した。その結果、G-CSF は 2 回目の CPA に対する抵抗性の回復を促進し、顕著な投与間隔短縮効果を示した。この効果は、末梢好中球数が回復した時点で、G-CSF の投与を中止した場合よりも 2 回目の CPA 投与の直前まで投与したほうがより有効であった。この G-CSF の投与間隔短縮効果の機序を検討した結果、G-CSF は好中球の前駆細胞である G-CFC の回復を著明に促進するとともに造血環境にも影響することによって、2 回目の CPA のに対する抵抗性の回復促進効果を示すことが明らかとなった。また、G-CSF を投与した場合の末梢好中球数と 2 回目の CPA に対する抵抗性との間に有意な負の相関が成立することを見出した。これらの結果は、初回の制癌剤投与に G-CSF を連日投与することが、2 回目の制癌剤に対する抵抗性の回復を促進するとともに、2 回目の CPA 投与の至適な投与期間を把握する手段としても有効であることを示しており、G-CSF の医薬品としての新たな有用性を見出す手掛かりを得た。

近年の遺伝子工学的手法の発達に伴い、多くの生理活性因子が新たに見出されつつあり、好中球の産生や機能に作用する因子についても多く発見された。これらの因子の好中球に対する *in vivo* での作用を解析する上で、ここで示した定量法及びその応用法は有効な手段である。さらに、G-CSF を含むこれらの生理活性因子の活性増強を目的とした改変体の開発や低分子代替物質の探索、さらにその評価においても、これらの定量法は有効な手段であると確信している。

## 論文審査の結果の要旨

白血球の一種である好中球は、遊走能、貪食能、殺菌能などの機能を有し、細菌や真菌などの感染から生体を防御する役割を担っている。この好中球は造血幹細胞に由来し、分化・増殖の過程には種々のサイトカインが作用するが、中心的に関与していると考えられているのが、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) と顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) である。このうちヒト G-CSF は、著者らのグループが世界で初めて純化に成功したもので、著者もその一員として、種々の G-CSF の生物活性を明らかにしてきている。その過程で、当然の事ながら、*in vivo* 活性を定量的に評価する系が必要であったが、当時は定量的評価系の報告はなかった。

そこで著者は、G-CSF の *in vivo* 定量法確立を果たすと共に、本定量法を用いて、G-CSF と GM-CSF の *in vivo* での作用の比較研究を行った。さらに、本法を応用することにより、制癌剤の繰り返し投与間隔と好中球造血障害の関係、および制癌剤の至適投与間隔に対する G-CSF 効果などについて検討を行った。

その結果、下記に示す興味深いデータが得られた。

- (1) シクロフォスファミド (CPA) 誘発好中減少症マウスを用いて、G-CSF の *in vivo* 定量法 (CPA-mouse 法) を確立した。本定量法は、G-CSF の独立した 2 つの作用、すなわち、骨髄での好中球亢進作用と骨髄から循環血液中の好中球動員作用を同時に測定するものであり、再現性、正確性、精度および特異性の点で優れたものであった。また、G-CSF の上記 2 つの作用を個々に定量する方法 (Neutrophil-pool assay および Neutrophil-mobilization assay) についても併せ確立した。
- (2) G-CSF が示す骨髄での好中球産生亢進作用は、GM-CSF に比べ 10~30 倍高いものであった。
- (3) G-CSF, GM-CSF 共に骨髄からの好中球動員作用を有しているが、GM-CSF は G-CSF とは異なり、循環血液中には移行せず、またカゼイン刺激局所への移行もできなかった。これらの事実は、G-CSF の方が好中球減少症治療薬

として、より有効であることを示している。

(4) G-CSF は好中球前駆細胞 G-CFC の回復を著明に促進すると共に、造血環境にも影響をおよぼし、CPA に対する抵抗性の回復を促進し、著明な投与間隔短縮効果を示した。

以上の成果は、好中球に対する *in vivo* での作用を解析する上で重要な定量法を開発し、これを縦横に応用することで G-CSF の医薬品としての新たな有用性を見いだしたものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと考える。