

博士（保健学）学位論文

論文題目

ヒト白血病細胞に対するスピルリナ抽出物フィコシアニンの
分化誘導作用

Effect of Phycocyanin, one of the Extracts of
Spirulina, on Differentiation of Human Myeloid
Leukemia Cells

2010 年

指導教員 林 修 教授

石井 恭子
ISHII, Kyoko

女子栄養大学

要旨

骨髄幹細胞は、マクロファージや顆粒球などの成熟細胞に分化する性質を持つ未分化な細胞である。しかしながら、分化過程がブロックされるなどして正常な増殖が逸脱した場合、最終分化細胞になる前に細胞は癌化、すなわち白血病化する。これら未分化な白血病細胞については、全トランス型レチノイン酸 (ATRA)、ビタミン D₃、ホルボルエステル (TPA)のような化学物質等により多機能に分化することが報告されている。それらのひとつであるβカロテンの代謝物の ATRA は、急性前骨髄球性白血病細胞 (APL)に対する治療の一つ、レチノイン酸療法として導入されている。

本研究は、藍色細菌に属するスピルリナ (*Spirulina platensis*) の抽出物の一つであるフィコシアニン (Phyco; Phycocyanin) に着目した。フィコシアニンは、クロロフィルやβ-カロテンとともにスピルリナに比較的豊富に含まれる 270-kDa の光合成色素タンパク質である。スピルリナ乾燥重量の約 15 %を占める。615 nm に強い最大吸収波長を持ち、主に、食品や化粧品の天然着色料として利用されている。近年、フィコシアニンが、抗酸化作用や抗炎症作用、リンパ球の活性化、粘膜免疫システムの機能を高める等の作用を持つことが明らかになってきた。しかしながら、フィコシアニンの白血病細胞に対する分化誘導作用については報告が少ない。本研究では、フィコシアニンで刺激したヒト末梢血単核球培養上清試料 (Phyco-CM) が未熟な白血病細胞に対して分化誘導能を持つか否か、およびその分化方向性を検討した。

用いた白血病細胞は、ヒト単球性白血病細胞株 U937 細胞 (単球、マクロファージ系へ分化)と前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 細胞 (顆粒球系または単球、マクロファージ系へ分化)である。

本論文は U937 細胞と HL-60 細胞に対するフィコシアニンの直接あるいは間接の分化誘導効果について比較検討した。分化誘導刺激には、フィコシアニンで刺激したヒト末梢血単核球培養上清試料 (Phyco-CM)を用いた。被験者からの末梢血採血については、香川栄養学園医学倫理委員会の承認を得 (香倫委第 113 号)、被験者に文書・口頭にて実験概要を説明した後、その同意を得た。末梢血単核球の分離およびそれらの培養により得られた Phyco-CM を U937 あるいは HL-60 細胞とともに培養後、細胞数の測定、フローサイトメトリー法を用いた表面抗原の検索、形態学的分類、細胞化学的検討等を実施し、分化誘導刺激によりどの方向にどの段階まで分化成熟しているかを検討した。この結果、Phyco-CM は、U937 細胞に対して対照として用いた無刺激ヒト末梢血単核球培養上清試料である Cont-CM に比較して細胞増殖の抑制傾向を示し、有意差はみられないものの約 3 倍の細胞表面 CD14 抗原の発現および高いエステラーゼ活性を示した。Phyco-CM 刺激 U937 細胞は、形態学的観察においても約 57 % の単球とマクロファージ様形態を示した。フィコシアニン単独刺激では、細胞増殖については抑制よりもむしろ増加傾向を示し、細胞表面 CD14 抗原陽性細胞率は、無刺激 Cont の約 2 倍であった。形態学的分類では、成熟細胞への分化はほとんどみられなかった。HL-60 細胞については、いずれの刺激においても細胞表面 CD14 抗原の陽性細胞率は低く、これらの値は U937 細胞に比較

して低値であった。形態学的観察では、Phyco-CM 刺激により HL-60 細胞は単球系と顆粒球系細胞の混在を示したが、顆粒球系細胞において陽性を示す特異的エステラーゼ染色については、ほとんど陽性であった。フィコシアニン刺激 HL-60 細胞では、形態学的観察における成熟細胞の割合は 2 %であった。

次に、分化誘導後の各細胞に Lipopolysaccharides (LPS)を添加し、自然免疫系で働くマクロファージや樹状細胞において病原体を認識しその応答シグナルを伝達する働きをしている Toll-like receptor 4 (TLR4)発現の有無を推測するためにサイトカイン TNF- α 量を測定した。その結果、Phyco-CM は、U937 と HL-60 細胞の両方について、分化誘導刺激後の培養上清中 TNF- α 量を高めたが、LPS 刺激に応答した有意な増加はみられなかった。フィコシアニン刺激では U937、HL-60 細胞ともに LPS の添加に関係なく TNF- α 量は検出限界以下であった。以上のことからフィコシアニンの未熟な白血病細胞に対する分化誘導作用は、直接的よりも間接的に働き、Cont-CM よりもフィコシアニンで刺激することでより分化誘導作用を高めることが示唆された。さらに、Phyco-CM 刺激後の細胞において、特に U937 細胞においては単球、マクロファージ系細胞へ分化誘導したことが示唆されたが、これら細胞の LPS 応答性は低いかあるいは持たないことが示唆された。

Phyco-CM は、分化誘導因子として、高濃度の IFN- γ および GM-CSF を含有していた。本研究の結果から、IFN- γ および GM-CSF、あるいはそれぞれが、U937 細胞と HL-60 細胞の一部を単球、マクロファージ系へ分化したことが推測された。

以上の結果から、フィコシアニンは、リンパ球等に働きかけ、白血病細胞のような未熟な細胞を正常な細胞へ分化するように促す手助けをする可能性が示唆された。

目次

ヒト白血病細胞株 U937 細胞および HL-60 細胞におよぼすフィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清 (Phyco-CM)の分化誘導作用	1
第 1 節 序論	1
第 2 節 材料と方法	4
1. ヒト白血病細胞株	4
1) U937 細胞	4
2) HL-60 細胞	4
2. フィコシアニン (Phyco; Phycocyanin)	5
3. ヒト末梢血単核球細胞の分離	6
4. フィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清試料 (Phyco-CM)の調製	6
5. 分化誘導作用の測定	7
1) 陽性対照	7
1)-1 ホルボルエステル (PMA)	7
1)-2 全トランス型レチノイン酸 (ATRA)	7
2) 分化誘導	7
3) 細胞増殖および生存率の測定	8
4) フローサイトメトリー (FCM; Flow cytometric)法を用いた細胞表面抗原の測定	8
5) 形態学的分析	10
6) 細胞化学的検討	11
6)-1 非特異的および特異的エステラーゼ染色	11
6)-2 Nitro blue tetrazolium (NBT) 還元能試験	11

6.	Phyco-CM 刺激 U937 細胞と HL-60 細胞における Lipopolysaccharides (LPS)応答性	12
1)	オプソニン処理 latex beads (opsonin-treated LB)貪食能	12
2)	Phyco-CM 刺激 U937、HL-60 細胞の TNF- α 量産生	13
7.	フィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清試料(Phyco-CM)中サ イトカインの検出	13
1)	ヒト末梢血単核球浮遊液試料の細胞分類	13
2)	フィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清試料(Phyco-CM)中サ イトカインの検出	14
8.	統計解析	15
第 3 節	結果	15
1.	分化誘導作用	15
1)	増殖曲線および生存率	15
2)	FCM 法による細胞表面抗原の測定	15
3)	形態学的変化	18
4)	細胞化学的变化	19
2.	Phyco-CM 刺激 U937 細胞と HL-60 細胞における LPS 応答性	20
1)	opsonin-treated LB 貪食能	20
2)	Phyco-CM 刺激 U937、HL-60 細胞の TNF- α 量産生	20
3.	フィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清試料 (Phyco-CM) 中 サイトカインの検出	21
1)	ヒト単核球浮遊液試料の細胞分類	21
2)	フィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清試料 (Phyco-CM) 中 サイトカインの検出	21

3) ヒト末梢血単核球培養上清試料 (Phyco-CM、Cont-CM)中サイ トカインと分類細胞との関連	21
第 4 節 考察	22
図表	33
謝辞	54
参考文献	55

ヒト白血病細胞株 U937 細胞および HL-60 細胞におよぼすフィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清の分化誘導作用

第 1 節 序論

骨髄幹細胞は、マクロファージや顆粒球などの成熟細胞に分化する性質を持つ未分化な細胞である。しかしながら、分化過程がブロックされるなどして正常な増殖が逸脱した場合、最終分化細胞になる前に細胞は癌化、すなわち白血病化する¹⁾。これら未分化な白血病細胞については、全トランス型レチノイン酸、ビタミン D₃ (1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃)、ホルボルエステル (TPA; 12-*o*-tetradecanoyl phorbol-13 acetate) のような化学物質等により多機能に分化することが報告されている^{2, 3)}。それらのひとつである β カロテンの代謝物の ATRA は、急性前骨髄球性白血病細胞 (APL) に対する治療の一つ、レチノイン酸療法として導入されている。白血病細胞には分化能があり、*in vitro* だけでなく、*in vivo* (白血病患者) においても成熟細胞に分化し得る能力は持つ。1981 年に *in vitro* で APL 細胞のみが ATRA に反応し、最終分化 (Terminal differentiated cell) することが報告された⁴⁾。その後、1991 年に Chen ら⁵⁾により ATRA が重大な副作用もなく APL 患者の 80 % 以上を単独で分化誘導し、寛解導入に成功したことが示された。この報告により白血病が分化誘導によって治療できることが示された。

本研究では、スピルリナ抽出物の一つであり、クロロフィルや β -カロテンとともに比較的豊富に含まれる 270-kDa の光合成色素タンパク質フィコシアニン (Phyco; Phycocyanin) に着目した。フィコシアニンは、スピルリナ乾燥重量の約 15 % を占める^{6, 7)}。615 nm に強い最大吸収波

長を持ち、主に、食品や化粧品の天然着色料として利用されている。Shinohara ら⁸⁾は、植物性の食品として利用されているサイココッカスやスピルリナなどの好熱性藍藻類の抽出液がヒト由来のリンパ芽球様細胞などの増殖を促進し、その活性の中心が光合成色素のフィコシアニタンパクであることを明らかにした。健康補助食品として市販されているスピルリナの成分のひとつであるフィコシアニンや食品である野菜等の成分などが、未分化の白血病細胞に対して分化誘導することにより、発がん防止や成熟細胞への分化促進を期待できる。Kobori ら^{9, 10)}は、ホウレン草抽出液中の高分子画分がヒト白血病細胞の形態変化を誘導し細胞をマクロファージへ分化誘導することや、ホウレン草の非透析物による前骨髄球性白血病細胞 HL-60 細胞の単球への分化およびヒト単球性白血病細胞 U937 細胞の単球/マクロファージ系への分化について示している。

一方、Chiao ら¹¹⁾は、ヒト末梢血リンパ球培養上清 (CM; lymphocyte conditioned medium) が、前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 細胞を単球、マクロファージ様細胞へ分化させることを示した。この報告によれば、30 %CM 加 RPMI 培地とともに培養した HL-60 細胞の 28 %が 3 日目で、96 %が 8 日目でマクロファージ様形態を示している。また U937 細胞についても、リンパ球の産生するサイトカインにより活性化マクロファージに分化することが知られている¹²⁾。この分化成熟の要因として、活性化 T リンパ球により CM 中に放出された成熟因子の存在を示唆している。動物実験において、熱水抽出物、フィコシアニン、細胞壁成分の各スピルリナ試料を 5 週間摂取したマウスの末梢血液において、好中球とリンパ球割合の増加が観察された¹³⁾。また、フィコシアニンと他のスピルリナ抽出物を含む飼料を摂取させたマウスにおいて、骨髄細胞の増加作用

と脾臓細胞を培養して得た上清によるコロニー形成活性の誘導作用が報告されている^{14, 15)}。これらのことから、スピルリナ成分が骨髓細胞のような未熟な細胞を成熟細胞に分化誘導することが期待されるが、その報告は少ない。フィコシアニンでヒト末梢血単核球細胞を刺激することにより、リンパ球等を活性化し、CM 中の成熟因子の産生を促進し、CM と同等あるいはそれ以上に未熟な白血病細胞の分化を促進することが期待できる。

本研究は、スピルリナの抽出物の一つであるフィコシアニンで刺激したヒト末梢血単核球培養上清試料 (Phyco-CM)の未熟な白血病細胞に対する分化誘導能の有無とその分化方向性を検討したものである。細胞の分化について検討するうえで重要なことは、増殖が抑えられているか、最終分化細胞(Terminal differentiated cell)に特異的な機能が発現しているか否か、である。Phyco-CM 刺激 U937、HL-60 細胞を用いて、分化誘導に関する実験項目 (表 1.)、すなわち細胞数の測定、フローサイトメトリー法を用いた表面抗原の検索、形態学的分類、細胞化学的検討を実施し、分化誘導刺激によりどの方向にどの段階まで分化しているかを推測した。同時に、分化誘導後の各細胞に Lipopolysaccharides (LPS) を添加し、自然免疫系で働くマクロファージや樹状細胞において病原体を認識しその応答シグナルを伝達する働きをしている Toll-like receptor 発現の有無を推測するためにサイトカイン TNF- α 量を測定した。さらに、Phyco-CM 中の U937、HL-60 細胞に対する分化誘導因子の存在について検索するために、Phyco-CM 中サイトカインの測定を行い、フィコシアニンのリンパ球等に対する活性について検討した。

第 2 節 材料と方法

1 . ヒト白血病細胞株

1) U937 細胞

U937 細胞株(JCRB9021)は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、大阪)より入手した。U937 細胞は、単球性白血病細胞で、組織球性リンパ腫患者の胸水から得られ、ウプサラ大学の Sundstrom と Nilsson によって 1976 年に樹立された¹⁶⁾。単球様細胞の形態を示し、リゾチーム産生、フッ化ナトリウム(NaF)によってわずかにしか阻害されない非特異的エステラーゼ活性を保持し、Fc 受容体および C3 受容体陽性であることが知られている。ファゴサイトーシス(貪食)も観察される。リンパ球の産生するサイトカインにより、U937 細胞は活性化マクロファージに分化することが知られている¹²⁾。表面免疫グロブリン、アルカリ性ホスファターゼなどは陰性である¹⁷⁾

2) HL-60 細胞

HL-60 細胞株(JCRB0085)は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、大阪)より入手した。前骨髄球性白血病細胞で、急性前骨髄性白血病細胞(APL)の患者の末梢血から得られ、アメリカ国立ガン研究所の Gallo グループによって 1979 年に樹立された¹⁸⁾。前骨髄球様細胞が 90%以上を占め、若干の骨髄芽球・顆粒球様細胞がみられる。HL-60 細胞は、用いる分化誘導物質により、顆粒球ないし単球・マクロファージ様細胞の二方向性を示す¹⁹⁾。

継代培養については、300 mg/mL L-Glutamine、2,000 mg/mL NaHCO₃、100 U/mL penicillin、100 g/mL streptomycin および 10%不活性化ウシ胎児血清(FBS; fetal bovine serum, GIBCO Lab., NY)を添加

した RPMI-1640 メディウム(日研生物医学研究所、京都) (RPMI-FBS) を用いた。細胞保存液セルバンカー(十慈科学工業株式会社)に懸濁し、
- 80 ℃フリーザー内に保存してある U937 および HL-60 細胞各 1 mL を溶解後、RPMI-FBS を 10 mL 加えた培養フラスコ(25 cm² flask, 住友ベークライト社)に入れ、37 ℃、5%CO₂ インキュベーターにて培養した。3 ~ 4 日に一度の割合で、2 ~ 3 mL の細胞浮遊液を 8 mL の新鮮な培地に移すことによって継代培養した。

2 . フィコシアニン (Phyco; Phycocyanin)

スピルリナ(*Spirulina platensis*)の乾燥菌体から 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)にて 20 ℃、16 時間抽出し、フィコシアニン粗抽出物を得た¹³⁾。この粗抽出物 10g を 30 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.0) 250 mL に溶解し、4 %フィコシアニン粗抽出物溶液とした。そこに、硫酸アンモニウムを 20 %濃度になるように加え、沈殿したタンパク質を 7,000 rpm、30 分間遠心分離した。この上清にさらに硫酸アンモニウムを 60 %になるように加え、7,000 rpm、30 分間遠心分離し、タンパク質を沈殿させた。このタンパク質沈殿物にはフィコシアニンを含む。これをリン酸カリウム緩衝液に再度溶解、透析し硫酸アンモニウムを除去した。透析内液は、DEAE-セルロース-DE-52 イオン交換カラムクロマトグラフィーにかけて 0.1M KCl 溶出画分を採取した。この溶出画分について、再度硫酸アンモニウムと透析を繰り返し、純度 80 %以上のフィコシアニンを得た。フィコシアニン粗抽出物 10 g から 0.6 g の精製品が得られた。この標品は DIC 株式会社より供与された。このフィコシアニン粉末を PBS (-)にて 10 mg/mL 濃度になるように溶解した後、0.45 μm pore size ディスクフィルターにて濾過滅菌し、ストック液とした。実験には PBS (-)にて適宜希釈したものをを用いた。なお、本研究で用いたフィコシアニン

については、開環テトラピロール構造を持ち、A 環でタンパク質サブユニットと共有結合している 1 量体のフィコシアニンが、3 個会合し 3 量体を形成している C-フィコシアニン(分子量 138,000)^{20, 21)}である (図 1.)。

3 . ヒト末梢血単核球細胞の分離

無菌的に採取した健常者 7 名から得た末梢血を、PBS (-)にて 2 倍希釈し、リンパ球比重分離液 (比重 1.077 g/mL、NYCOMED) 5 mL に重層し、遠心(800g、30 分) 分離して分離液と血漿の間にある単核球層を回収してヒト末梢血単核球細胞 (PBMCs; peripheral blood mononuclear cells)を得た。PBMCs 層に 0.83 %塩化アンモニウム・トリス緩衝液を加え、赤血球を除去した後、PBS (-)で遠心洗浄し、RPMI-FBS にて各被験者の PBMCs 1×10^6 cells/mL 浮遊液を調製した。

被験者からの末梢血採取については、香川栄養学園医学倫理委員会の承認を得 (香倫委第 113 号)、被験者に文書・口頭にて実験概要を説明した後、その同意を得た。

4 . フィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清試料 (Phyco-CM)の調製

上述 3 . で得たヒト単核球浮遊液 (1×10^6 cells/mL)を、24 ウェルマイクロプレート (24-well culture plate、CORNING、Cat. No. 3526)1 ウェルあたり 1 mL ずつ播種し、2 mg/mL フィコシアニンを 0.1 mL ずつ添加して 37 °C、5 %CO₂ 条件下にて 7 日間培養した後、培養上清試料 (Phyco-CM)を得た。比較対照として単核球浮遊液に RPMI-FBS 0.1 mL を添加し、培養上清試料(Cont-CM)を得た。各ウェルの単核球培養上清試料は、0.45 μ m pore size ディスクフィルター (IWAKI GLASS、Code 2053-025)にて細胞除去とともに濾過滅菌した(図 2.)。このものは、使用時まで - 80 °C 保存とした。

5 . 分化誘導作用の測定

1) 陽性対照

陽性対照として次の試薬を用いた。

1)-1 ホルボルエステル

(PMA; phorbol-12-myristate-13-acetate、和光純薬工業、No. 545-00261)

ホルボルエステル(PMA)は、分子式 $C_{35}H_{55}O_8$ 、分子量 616.84、水難溶性、有機溶媒に可溶の無色物質である。1 mg を dimethyl sulfoxide (DMSO) 1mL に溶解してストック溶液とした。このものを RPMI-FBS にて 500 倍希釈して 2 μ g/mL 濃度で用いた。

1)-2 全トランス型レチノイン酸

(ATRA; all-*trans* retinoic acid、SIGMA、No. R-2625)

全トランス型レチノイン酸は、分子式 $C_{20}H_{28}O_2$ 、分子量 300.44、脂溶性、黄色粉末物質である。15 mg を純アルコール 10 mL に溶解して 5 mM ストック溶液とし、これを適宜純アルコールにて 1 mM として用いた。

2) 分化誘導

25 cm² flask にて 3 日間前培養した U937 あるいは HL-60 細胞を集めて、遠心、洗浄後、RPMI-FBS にて 0.5×10^6 cells/mL 浮遊液とした。24 ウェルマイクロプレート 1 ウェルあたり U937 あるいは HL-60 細胞懸濁液を 1 mL ずつ分注し、37℃、5 %CO₂ インキュベーターにて 3 日間分化誘導刺激した。すなわち、無刺激対照 (Cont) 群として RPMI-FBS を 0.1 mL/well、比較対照群としてフィコシアニン無刺激単核球培養上清 (Cont-CM) を 0.1 mL/well、実験試料群としてフィコシアニン刺激単核球培養上清 (Phyco-CM) を 0.1 mL/well、陽性対照群として PMA 2 μ g/mL あるいは ATRA 1mM をそれぞれ 10 μ L/well 加え

た。分化誘導刺激後、各ウェル中の細胞をそれぞれ小試験管に回収し、PBS (-)にて遠心洗浄 (1,300 rpm、5 分)後、各分化誘導作用の測定に用いた(図 3.)。

3) 細胞増殖および生存率の測定

2) に従い、分化誘導刺激後に回収し、PBS (-)にて遠心洗浄した細胞の一部を用いて、それぞれの分化誘導刺激細胞における細胞数の算定及び生存率の算出を 0.25 %トリパンブルー染色液を用いて行った。分化誘導刺激後、1、2、3、4、5、7 日目に細胞を回収し、生細胞 (無染色)、死細胞 (青染色)をビルケルチュルクの計算盤にて計数し、細胞生存率 (%)を算出した。同時に細胞数を算出した。なお、細胞回収時に 24 ウェルマイクロプレートへの付着が見られた細胞については、セルスクレイパー (CELL SCRAPER、TPP®、Cat. No. 99002)を用いて回収した。

4) フローサイトメトリー (FCM; Flow cytometric)法を用いた細胞表面抗原の測定

蛍光抗体染色については以下のものを用いた。細胞表面抗原については、分化誘導刺激後の各細胞がどちらの方向にどの段階まで分化誘導されているか推測するために骨髓系細胞の成熟過程と表面抗原の発現を参考を選択した²²⁾ (図 4.)。

< U937 細胞、HL-60 細胞共通 >

蛍光標識モノクローナル抗体：

- ・ 抗 CD11b-FITC (IO Test、IM0530、Clone; BEAR1、mouse IgG1)
- ・ 抗 CD15-PE (BD Pharmingen、555402、Clone; HI98、mouse IgM K)
- ・ 抗 CD14-FITC (IO Test、IM0645U、Clone; RMO52、mouse IgG2a)

蛍光標識アイソタイプコントロール：

- ・ mouse IgG2a-FITC (Cyto-stat、6603855、Clone; 7T4-1F5、mouse IgG2a)
- ・ mouse IgG1-FITC (IO Test、PN IM0639、Clone; 679.1Mc7、mouse IgG1)

< HL-60 細胞のみ >

蛍光標識モノクローナル抗体

- ・ 抗 CD66b-FITC (IO Test、IM0531、Clone; 80H3、mouse IgG1 κ)

蛍光標識アイソタイプコントロール：

- ・ mouse IgG1-FITC (IO Test、PN IM0639、Clone; 679.1Mc7、mouse IgG1)

蛍光抗体染色については、以下の通り実施した。3 日間分化誘導刺激した U937 あるいは HL-60 細胞は、回収、洗浄後、 $2 \sim 3 \times 10^6$ cells/mL に調製し、各蛍光抗体染色に用いた。すなわち、CD11b と CD66b 抗原陽性細胞を測定するために、洗浄後の U937 あるいは HL-60 細胞 ($2 \sim 3 \times 10^6$ cells/mL) 各 0.1 mL と、抗 CD11b 抗体あるいは抗 CD66b 抗体をそれぞれ別のプラスチック製試験管 (12mmφ×75mm; BECKMAN COULTER) に 15 μL ずつ添加し、4 、30 分間遮光してインキュベートした。PBS (-) にて洗浄後、懸濁し、測定試料とした。アイソタイプコントロールについても同様に蛍光抗体染色を行い、刺激ごとに用意したコントロール試料を用いてデータ取得時の閾値を決めた。

CD15 抗原を測定するために、洗浄後の U937 あるいは HL-60 細胞 ($2 \sim 3 \times 10^6$ cells/mL) 各 0.1 mL に、2 % 正常ヒト血清 (AB 型) (Human Serum AB、GEMINI、No. 100-512) を添加し、30 分間室温にてインキュベートした。PBS (-) にて洗浄後、抗 CD15 抗体を 15 μL 添加し、4 、30 分間遮光してインキュベートした。洗浄後、懸濁し、測定試料とした。

閾値を決めるためのアイソタイプコントロールについては、測定時、PE 標識 mouse IgM 抗体が市販されていなかった。従って、分化誘導刺激により発現が推測される Fc レセプター(FcR)の影響を除くこと、IgG より IgM で作られた抗体の方が抗原の凝集が強いことから非特異結合の無い状態で測定するために、抗体を添加する前に正常ヒト血清(AB 型)を添加した。閾値については、刺激ごとに無染色の細胞を用いて設定した。

CD14 抗原の測定については、最初に洗浄後の U937 あるいは HL-60 細胞 ($2 \sim 3 \times 10^6$ cells/mL)各 0.1 mL に、3%正常マウス血清 (Normal Mouse Serum、WAKO、No.146-06551)を添加し、マウス IgG2a に対する Fc レセプターを塞ぎ非特異的結合の無い状態とした。次に、抗 CD14 抗体を各試験管に 15 μ L 添加し、4、30 分間遮光してインキュベートした。洗浄後、懸濁し、測定試料とした。アイソタイプコントロールについても同様に蛍光抗体染色を行い、刺激ごとに用意したコントロール試料を用いてデータ取得時の閾値を決めた。

フローサイトメトリー法は、フローサイトメーター(FCM; EPICS® ALTRA™、Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)を用いて検出した。各表面抗原の陽性については、閾値を越えた蛍光強度を持つ細胞を陽性細胞とした。シングルあるいはダブルパラメーターのヒストグラムは、ログスケールを用いて示した。データは、各試料あたり 5,000 個中の陽性細胞数および蛍光強度で表した。

5) 形態学的分析

分化誘導刺激した U937 および HL-60 細胞は、PBS(-)にて遠心、洗浄後、 2.5×10^5 cells/mL に調製した。その細胞懸濁液 0.2 mL をサイトスピン(Shandon Southern Products, Cheshire, England)にて 300 rpm、

10 分間遠心してスライド標本とした。乾燥後、メイグリュンワルド液およびギムザ染色液 (武藤化学、東京)を用いて染色を行った。細胞形態については、光学顕微鏡下で次の分類に従い、細胞の成熟過程を、U937 細胞については、1) 単芽球、2) 前単球、3) 単球、4) マクロファージの 4 つに分類した (図 5.)。HL-60 細胞については、1) 芽球、2) 中間、3) 成熟の 3 つに分類した。分類 1)の芽球細胞は、骨髓芽球と単芽球を含み、2)の中間については、前骨髓球と骨髓球を、3)の成熟については、後骨髓球と桿状核球および分葉核球を含んでいる (図 6.)。

6) 細胞化学的検討

6)-1 非特異的および特異的エステラーゼ染色

5)で PBS (-)にて 2.5×10^5 cells/mL に調製した細胞懸濁液 0.2 mL を、サイトスピンにて 300 rpm、10 分間遠心して別にスライド標本を作製した。乾燥後、U937 細胞については、単球系細胞に強い反応性を示す α -naphthyl acetate を基質とする非特異的エステラーゼ染色 (NSE; non specific esterase、武藤化学、東京)を行った。HL-60 細胞については、非特異的エステラーゼ染色と骨髓系細胞に強い反応性を示す naphthyl AS-D chloroacetate (3-hydroxy 2-naphtoic-*o*-toluidide chloroacetate) を基質とする特異的エステラーゼ染色 (SE; specific esterase、武藤化学、東京)を用いた二重染色を行った。NSE 陽性細胞は、細胞質内に暗赤色の顆粒を持ち、SE 陽性細胞は、同じく青い顆粒を持つ。染色後の細胞は、400 倍で鏡検し、200 個細胞中の陽性細胞数を計数し、陰性、SE 陽性、SE と NSE ダブルポジティブ、NSE 陽性の 4 つに分類した。

6)-2 Nitro blue tetrazolium (NBT) 還元能試験

NBT 還元能試験は、朝永ら²³⁾の方法を参考に実施した。すなわち、前述 5)と同様に、刺激後の U937 細胞と HL-60 細胞は、ウェルごとに試

験管に回収した。PBS (-)にて遠心洗浄後、RPMI にて 2×10^6 cells/mL に調製した。この細胞懸濁液 1 mL ずつを 1,300rpm、5 分間遠心し、上清を除去して集めた細胞沈渣に、2 mg/mL NBT (SIGMA-ALDRICH、No. N6876) 0.1mL と等量の PMA 400 ng/mL をそれぞれ添加し、37 °C、20 分間インキュベートした。その後、反応懸濁液は、氷冷し、PBS(-) を 0.8 mL ずつ加えた。これらをサイトスピンにて 300 rpm、10 分間遠心し、スライド標本を作製した。乾燥後、400 倍で鏡検し、200 個の細胞中青染色されている細胞を陽性細胞として計数した。

6 . Phyco-CM 刺激 U937 細胞と HL-60 細胞における Lipopolysaccharides (LPS) 応答

RPMI に LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4、SIGMA、No. L2630) 25 mg を溶解して 10 mg/mL ストック溶液とした。このものを RPMI にて適宜希釈して用いた。

5 . 2)と同様に、U937 細胞と HL-60 細胞は 3 日間、24 ウェルマイクロプレートにて各刺激物により分化誘導刺激を行った。刺激後、各ウェルに LPS (0、1,000 ng/mL)を添加し、37 °C、5 % CO₂ 条件下でインキュベートした。60 分後、各ウェルの培養上清試料を回収し、0.45 μm pore size ディスクフィルター (IWAKI GLASS、Code 2053-025)にて細胞除去とともに濾過滅菌した。このものは、使用時まで - 80 °C 保存とした。

1) オブソニン処理 latex beads (opsonin-treated LB)貪食能

貪食作用を促進させるためのオブソニン物質として血清中 IgG 抗体を latex beads の表面に結合させた opsonin-treated LB を調製した。すなわち、RPMI に懸濁した 0.04% latex beads (LB; average diameter 1.1 μm、SIGMA)に、同じく RPMI に懸濁した等量の 10 %正常ヒト血清 (NHS; Normal Human Serum、CHEMICON INTERNATIONAL、Cat.

No. S1-100 mL)を加え、37℃、30 分間振盪 (40 rpm/min.)混和した。
使用前に超音波処理(10 分間)して beads を分散させて用いた。

LPS 応答貪食能については、以下の通り実施した。上記 5 . の操作後にウェルの底に残った細胞を、ウェルごとに試験管に回収し、PBS (-)にて 2 回遠心 (1,300 rpm、5 分間)洗浄した。opsonin-treated LB を用いた貪食能の測定は、Yamamoto-Yamaguchi et al.²⁴⁾の方法を改変して用いた。すなわち、刺激後の U937 細胞あるいは HL-60 細胞 0.5×10^6 cells/mL をそれぞれ試験管に 1 mL ずつ加え、遠心して細胞沈渣を得た。ここに先述した 0.02% opsonin-treated LB を 1 mL ずつ加え、37℃、3 時間振盪 (40 rpm/min.)混和した。PBS (-)にて、細胞を壊さないように注意しながら 3 回遠心、洗浄後、細胞沈渣に PBS (-)1 mL を加えた細胞懸濁液をサイトスピンにて 300 rpm、10 分間遠心し、スライド標本を作製した。乾燥後、メイグリュンワルド・ギムザ染色し、200 個の細胞中 1 個以上の LB を取り込んでいる細胞を陽性細胞として計数した。

2) Phyco-CM 刺激 U937 細胞、HL-60 細胞の TNF- α 量産生

上記で回収した培養上清試料中サイトカイン TNF- α 量は、TNF- α /TNFSF1A ELISA Kit for humans TNF- α (Cat. No. DTA001、R&D Systems、Minneapolis)を用いて測定した。ELISA Kit の測定感度は、15.6-1,000 pg/mL であった。マイクロプレートリーダー (Colona Electronics、Japan)で 450 nm と 570 nm 波長の吸光度差 (OD 450 nm - OD 570 nm)を測定した。

7. フィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清試料 (Phyco-CM)中サイトカインの検出

1) ヒト末梢血単核球浮遊液試料の細胞分類

前述で各被験者から同意を得て採取、調製したヒト単核球浮遊液 (1

$\times 10^6$ cells/mL)の一部を用い PBS (-)にて 2.5×10^5 cells/mL に希釈後、サイトスピンにて 300 rpm、10 分間遠心し、スライド標本を作製した。メイグリュンワルド・ギムザ染色後、200 個の細胞を計数し、リンパ球およびその他含まれている細胞の割合を算出した。

2) フィコシアニン刺激ヒト末梢血単核球培養上清試料 (Phyco-CM) 中サイトカインの検出

第 2 節材料と方法 3 . ヒト末梢血単核球の分離の項に従いヒト末梢血単核球浮遊液 (1×10^6 cells/mL)を調製した。その後、第 2 節 材料と方法 4 . フィコシアニン刺激ヒト末梢血単核球培養上清試料 (Phyco-CM) の調製に従い、培養上清試料を調製した。同時に別のウェルに陽性対照用として Phytohemagglutinin (PHA; Phytohemagglutinin-P、和光純薬、No. 161-15251) $100 \mu\text{g/mL}$ (PHA-CM)をヒト単核球浮遊液 (1×10^6 cells/mL) 1mL/well あたり 0.1mL ずつ添加した。 37°C 、5% CO_2 インキュベーターにて 7 日間培養した。各ウェルの単核球培養上清試料を $0.45 \mu\text{m}$ pore size ディスクフィルター (IWAKI GLASS、Code 2053-025) にて細胞除去とともに濾過滅菌した。このものは、使用時まで -80°C 保存とした。これら単核球培養上清試料中分化誘導サイトカインとして、Human Interferon gamma (INF- γ) (DIF50)、Human Interleukin 3 (IL-3) (D3000) および Human Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (DGM00)について、ELISA 法 (R&D Systems、Minneapolis) にて測定した。それぞれの ELISA Kit の感度は、INF- γ ; $15.6\text{--}1,000 \text{ pg/mL}$ 、IL-3; $31.2\text{--}2,000 \text{ pg/mL}$ 、GM-CSF; $7\text{--}500 \text{ pg/mL}$ であった。マイクロプレートリーダー (Colona Electronics、Japan)で 450 nm と 570 nm 波長の吸光度差 (OD $450 \text{ nm} - 570 \text{ nm}$)を測定した。

8. 統計解析

データは、平均値 $\pm$ SD で表した。統計解析は、StatView J 5.0 (Abacus Concepts、CA)ソフトウェアを用いた。各群間の比較には一元配置の分散分析(ANOVA; One-way Analysis of Variance)を行い、多重比較には、Bonferroni/Dunn t value を用いた。危険率 5 %未満で有意差ありとした。

第 3 節 結果

1. 分化誘導作用

1) 増殖曲線および生存率

無刺激 U937 細胞 (Cont)において、培養 1 日目と 3 日目の細胞数は、それぞれ 0.7×10^6 、 1.8×10^6 cells/mL であった。一方、Phyco-CM 刺激 U937 細胞では、細胞数が 0.9×10^6 cells/mL であり、増殖抑制がみられた。HL-60 細胞においても同様の傾向がみられた。Phyco 刺激では、U937、HL-60 細胞のいずれも増殖抑制はみられなかった。HL-60 細胞では、逆に増加傾向を示した (図 7.-a)。

U937、HL-60 細胞ともに、Phyco、Phyco-CM、Cont-CM 刺激による培養 3 日目の生存率はいずれも約 80 ~ 90 %であった (図 7.-b)。

2) FCM 法による細胞表面抗原の測定

FCM 法では、測定時に細胞がレーザー光を通過するときにレーザー光を散乱させ、標識した蛍光色素から蛍光を発する。レーザーの散乱光は、細胞表面で生じる表面積にほぼ比例する前方散乱(FS; Forward Scatter)と、細胞内顆粒等で生じる側方散乱(SS; Side Scatter)を測定することができる。

U937 細胞と HL-60 細胞における Phyco-CM と他の刺激物を用いた CD 抗原測定時の FS、SS のパターン例を図 8.に示した。図 9.-a に Phyco-CM 刺激 U937 細胞の典型的な細胞表面抗原の測定パターンを示した。U937 細胞では、Phyco-CM 刺激 CD14 と CD11b 抗原において、無刺激 Cont および Cont-CM 刺激に比較してパターンの変化が見られた。これらは、図 8.で示したように Phyco-CM 刺激において SS の値、すなわち細胞内顆粒が増加し、横軸の右方に陽性細胞の出現が見られたことと一致している(図 8.-U937 (4)Phyco-CM)。ログスケールを用いてヒストグラム上に取得されるデータのうち、陽性細胞は閾値を越えた細胞として出現する。その蛍光強度が強いほど横軸右方に出現する。Phyco-CM 刺激 U937 細胞における細胞表面 CD14 抗原陽性細胞率 ($11 \pm 3.3 \%$)は、Cont-CM 刺激と無刺激 Cont の陽性細胞率 (各 $4.2 \pm 2.0 \%$ 、 $3.4 \pm 3.2 \%$)に比較して約 3 倍を示した (表 2.)。この時の蛍光強度 (5.6 ± 0.9)は、無刺激 Cont のそれ(2.8 ± 0.8)に比較して有意な高値 ($p < 0.01$)を示した。Phyco 刺激 U937 細胞の細胞表面 CD14 抗原陽性細胞率 ($7.5 \pm 3.6 \%$)は、Cont ($3.4 \pm 3.2 \%$)の約 2 倍であった。Phyco 刺激における CD14 抗原の蛍光強度は、いずれも Cont と Cont-CM に比較して有意な増加は見られなかった(表 2.)。Phyco-CM 刺激 U937 細胞における、細胞表面 CD11b 抗原陽性細胞率 ($18 \pm 7.3 \%$)は、Cont-CM と Cont のそれら(各 $4.8 \pm 2.3 \%$ 、 $3.9 \pm 1.0 \%$)に比較して有意な差はみられないものの高値を示した (表 2.)。このときの蛍光強度については、Phyco-CM、無刺激 Cont、Cont-CM の間で差はみられなかった。顆粒球系細胞のマーカーである細胞表面 CD15 抗原陽性細胞率は、いずれの刺激においても低値であったが、Phyco-CM、Cont-CM 刺激 (各 $1.8 \pm 0.4 \%$ 、 $1.5 \pm 0.3 \%$)ともに無刺激 Cont ($4.6 \pm 2.2 \%$)における陽性細胞率より低値であった。

Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞における FS、SS については、無刺激 Cont に比較して FS、SS 方向への顆粒の増加が見られた (図 8.-HL-60)。図 9.-b に Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞の典型的な細胞表面抗原の測定パターンを示した。HL-60 細胞では、Phyco-CM 刺激により CD11b 抗原測定時において横軸右方 10^1 付近までに陽性細胞の出現がみられた (図 9.-b (4)Phyco-CM-CD11b)。このことは、図 8.で示したように Phyco-CM 刺激において、無刺激 Cont に比較して FS、SS の顆粒が増加したことと一致した。Phyco 刺激においても、CD11b 抗原測定時に横軸の陽性細胞出現は横軸右方 10^1 付近までに陽性細胞の出現がみられた (図 9.-b、(2)Phyco-CD11b)。HL-60 細胞については、いずれの刺激においても細胞表面 CD14 抗原陽性細胞率は Cont-CM 刺激 U937 細胞の陽性細胞率よりも低値であった (表 2.)。Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞における CD14 抗原の蛍光強度 (10 ± 2.5)は、Cont-CM 刺激、Cont (5.8 ± 2.0 、 5.1 ± 2.0) に比較して 2 倍を示したが有意な増加ではなかった (表 2.)。単球と顆粒球に特異性を示すといわれている細胞表面 CD11b、CD66b 抗原のうち、CD11b 抗原陽性細胞率については、Phyco-CM 刺激、Phyco 刺激 HL-60 細胞 (各 $14 \pm 4.7 \%$ 、 $16 \pm 4.6 \%$)において、Cont-CM 刺激 ($7.7 \pm 3.1 \%$) に比較して有意ではないものの高値を示した。この時の蛍光度 (各 6.6 ± 1.2 、 5.5 ± 2.0)は、それぞれ Cont-CM (4.7 ± 0.6)より高値であった。CD66b 抗原陽性細胞率については、Phyco-CM 刺激 ($1.3 \pm 0.5 \%$)において、無刺激 Cont ($4.5 \pm 1.6 \%$)よりも有意な低値 ($p < 0.001$)を示した。蛍光強度も無刺激 Cont (27 ± 32)より Phyco-CM 刺激 (10 ± 2.0)では低下した (表 2.)。Phyco 刺激 HL-60 細胞における CD66b 抗原 ($6.8 \pm 3.1 \%$)は、Phyco-CM 刺激より高値であった。CD15 抗原陽性細胞率は、Phyco-CM、Cont-CM、Phyco のいずれの刺激においても有意な差はみ

られなかった (表 2)。

3) 形態学的変化

U937 細胞は、単球性白血病細胞である。円あるいは卵型の形で、ほとんどの細胞で細胞質周辺に泡状の突起を持つ。核/細胞質比 (N/C 比; nuclear/cytoplasmic ratio) はやや大、核クロマチンは密であり、核は不規則に分葉している。大きくて顕著な核小体および細胞質内には多数の小さな好塩基性顆粒と多数の空胞を持つ¹⁶⁾ (図 10.-a-1)。U937 細胞は、Phyco-CM 刺激 (図 10.-a-4) により顆粒を持つ大きな細胞質と凝集の無い微細な核クロマチン、核小体の残存する細胞へと変化した。この形態変化は、PMA 刺激 U937 細胞 (図 10.-a-3) と類似していた。Cont-CM 刺激では、一部の細胞にのみ、大きな湾曲を持つ核と淡青色の細胞質を持つ細胞が見られた (図 10.-a-5)。U937 細胞においては、Phyco-CM 刺激と Cont-CM 刺激により単球、マクロファージ細胞がそれぞれ約 57 % と 21 % の割合で存在した (図 11.-a)。これらは、無刺激 Cont の単球、マクロファージ陽性率よりも有意な高値を示した ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$) (図 11.-a)。Phyco 刺激では、核にくぼみがある細胞がみられたが、大部分は前単球様であった (図 10.-a-2)。Phyco 刺激 U937 細胞の単球とマクロファージ細胞の割合は約 3.4 % であった (図 11.-a)。PMA 刺激細胞については、マクロファージ様形態 (図 10.-a-3) に分化誘導された。

前骨髓球性白血病細胞である HL-60 細胞では、大部分を占める前骨髓球様細胞の他に若干の骨髓球、顆粒球様細胞がみられる。前骨髓球様細胞の細胞質は、多数の粗大なアズール顆粒で満たされ、N/C は大きく、核は偏在している (図 10.-b-1)。HL-60 細胞については、特に Phyco-CM 刺激による分化誘導刺激後、様々な特徴を持つ前骨髓球細胞様形態が観

察されたため、メイグリュンワルド・ギムザ染色による細胞分類が困難であった。Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞では、N/C 比が減少し、空胞と青白い細胞質を持つ、形態学的には成熟単球様細胞系へ分化していると推測される細胞が約 15%みられた (図 10.-b-4、矢印)。他の約 85%の細胞は、大きな核と顕著な細胞質顆粒、さらに核小体が縮小あるいは消失したとみられる前骨髄球と骨髄球を含む顆粒球系細胞であった (図 11.-b)。Phyco および Cont-CM 刺激 HL-60 細胞については、ほとんど前骨髄球様細胞であった (図 10.-b-2、5)。ATRA 刺激 HL-60 細胞については、顆粒球様形態(図 10.-b-6)に分化誘導された。図 11.-b に示したように、一部の Phyco-CM 刺激と Cont-CM 刺激 HL-60 細胞については、mature に分類された細胞がみられた。mature とは、成熟様細胞、すなわち、後骨髄球、桿状核球、分葉核球、単球、マクロファージ様細胞の形態を示した細胞のことである。Phyco-CM あるいは Cont-CM 刺激 HL-60 細胞の成熟様細胞の割合 (各約 15 %、約 10 %)は、それぞれ無刺激 Cont 細胞に比較して増加傾向にあったが、これらの間に有意差はなかった。Phyco 刺激では、これら成熟様細胞は 2 %のみであった (図 11.-b)。

4) 細胞化学的变化

特異的 (SE)あるいは非特異的エステラーゼ (NSE)染色により細胞化学的变化について検討を行った。U937 細胞は、もともと NSE 陽性細胞であるが、Phyco-CM 刺激によりさらにこの比率は高まった。一方、HL-60 細胞については、無刺激 Cont において特異的エステラーゼ染色 (SE)陽性細胞の割合は 90 %であり、Phyco-CM、Cont-CM 刺激でも 90%以上であった (表 3.)。

NBT 還元能試験については、Phyco-CM 刺激により U937 細胞と HL-60 細胞の両方の陽性細胞率が、それぞれの Cont-CM 刺激細胞の陽

性細胞率に比較して有意に増加した ($p < 0.01$)。Cont-CM 刺激 U937 細胞および HL-60 細胞の NBT 還元能陽性細胞率は、Cont のそれとほぼ同値であった(表 4.)。

2 . Phyco-CM 刺激 U937 細胞と HL-60 細胞における LPS 応答性

1) opsonin-treated LB 貪食能

Phyco-CM 刺激 U937 細胞における貪食陽性細胞の割合 ($81 \pm 13 \%$) は、Cont-CM 刺激 ($32 \pm 5.5 \%$)に比較して有意な高値を示した ($p < 0.001$)。しかしながら、Phyco-CM 刺激 U937 細胞に LPS を添加しても貪食活性 (%)の有意な増加は見られなかった。Cont-CM 刺激では、LPS (0 ng/mL)に比較して添加後 ($1,000 \text{ ng/mL}$)に貪食活性 (%)は有意 ($p < 0.05$)に増加した(表 5.-a)。HL-60 細胞では、Phyco-CM ($36 \pm 13 \%$)および Cont-CM 刺激 ($35 \pm 12 \%$)の間で貪食細胞の割合に有意差はみられなかったが、いずれも無刺激 Cont ($17 \pm 6.2 \%$)に比較して有意な高値を示した ($p < 0.01$)。HL-60 細胞については、いずれの刺激でも LPS 添加による貪食活性 (%)の有意な増加は見られなかった(表 5.-b)。

2) Phyco-CM 刺激 U937、HL-60 細胞の TNF- α 量産生

Phyco-CM 刺激 U937 細胞における培養上清中 TNF- α 量は、Cont-CM 刺激細胞よりも有意差はみられないものの高値を示した。この TNF- α 量 ($66 \pm 15 \text{ pg/mL}$)は、LPS ($1,000 \text{ ng/mL}$)添加後に増加する傾向がみられた ($84 \pm 21 \text{ pg/mL}$) が、LPS 添加無 (0 ng/mL)の Phyco-CM 刺激細胞培養上清に比較して有意な増加ではなかった(表 5.-a)。Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞についても、Cont-CM 刺激細胞より有意ではないものの高い TNF- α 量を示した。しかしながら、LPS ($1,000 \text{ ng/mL}$)の添加による増加はみられなかった(表 5.-b)。Phyco 刺激では、U937、HL-60 細胞ともに、LPS の添加に関係なく TNF- α 量は検出限界以下であった(表

5.-a、b)。

3 . フィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清試料 (Phyco-CM)中サイトカインの検出

1) ヒト単核球浮遊液試料の細胞分類

各被験者の細胞割合を分類した各種細胞の平均は、リンパ球 63.8%、好中球 17.4%、好塩基球 2.7%、好酸球 1.2%、単球 15.1%であった。7日間培養した後のヒト単核球浮遊液試料試料の形態分類については、無刺激、フィコシアニン刺激ともに種々の形態が出現しており分類が困難であったことから実施しなかった。

2) フィコシアニン刺激ヒト単核球培養上清試料 (Phyco-CM) 中サイトカインの検出

Cont-CM (41 ± 27 pg/mL、n=8)に比較して Phyco-CM (151 ± 75 pg/mL、n=8)および PHA-CM (215 ± 39 pg/mL、n=3)における INF- γ 量は、有意な高値 ($p < 0.001$)を示した(図 12. INF- γ)。

GM-CSF 量については、Cont-CM (273 ± 240 pg/mL、n=7)に比較して Phyco-CM (857 ± 247 pg/mL、n=7)、PHA (1172 ± 27 pg/mL、n=3)において有意な高値 ($p < 0.001$)を示した(図 12. GM-CSF)。

IL-3 量については、Phyco-CM において検出限界 (7.4 pg/mL)以下であった。Cont-CM (n=2)では 59 ± 80 pg/mL、PHA-CM (n=7)では 282 ± 310 pg/mL であった(図 12. IL-3)。

3) ヒト単核球培養上清試料 (Phyco-CM、Cont-CM)中サイトカインと分類細胞との関連

フィコシアニン刺激により Phyco-CM、Cont-CM 中に産生のみられたサイトカイン INF- γ と GM-CSF 産生量について、結果 2)で算出した被験者各人の単核球割合との相関性について検討した(図 13.-a、b)。その

結果、被験者各人のリンパ球割合と Cont-CM、Phyco-CM 中 INF- γ あるいは GM-CSF 産生量との間に有意な相関は見られなかった。他の細胞、すなわち、好中球、好酸球、好塩基球、単球についてもサイトカイン産生量との間に有意な相関は見られなかった。

第 4 節 考察

フィコシアニンとは、スピルリナ等の藍藻類に含まれる 270-kDa の光合成色素タンパク質である。本研究では、フィコシアニンで刺激したヒト末梢血単核球培養上清試料 (Phyco-CM) が未熟な白血病細胞に対して分化誘導能を持つか否か、およびその分化方向性を検討した。細胞の分化誘導を調べる上で重要なことは、増殖が抑えられているか、最終分化細胞に特異的な機能、例えば、NBT 還元能、接着能、貪食能等が発現しているか、である¹⁾。分化過程に特異的な細胞表面抗原の出現からも分化方向性、分化度を知ることが出来る。スピルリナ熱水抽出物やフィコシアニンは、これらを摂取したマウスの骨髓細胞の増加作用と脾臓細胞を培養して得た上清によるコロニー形成活性の誘導作用が報告されている¹³⁾。Shinohara ら⁸⁾は、thermophilic blue-green alga であるフィコシアニンとアロフィコシアニンの両方がヒトリンパ球系骨髓腫細胞株 RPMI 8226 に対し、細胞増殖を促進することを報告している。フィコシアニン (最終濃度 0.1 mg/mL) は、HL-60 細胞に対しては、増殖傾向を示し、U937 細胞に対しても抑制よりも増殖を促す傾向を示した (図 7.-a)。このことは、Shinohara らの報告に一致するが、抑制傾向がみられなかったことから、フィコシアニン単独添加での分化成熟作用は低い可能性を示唆していると思われる。一方、単球系のみでなく赤芽球また

は血小板へも分化可能であるヒト白血病細胞株 K562 細胞に対してフィコシアニンは濃度依存的 (0.02-0.16 mg/mL) に増殖を抑制した^{25, 26)}。増殖抑制効果を示したフィコシアニンの添加濃度については、種々の報告があり、ヒト肝癌細胞である HepG2 に対してはフィコシアニン濃度 7 μ g/mL²⁷⁾、ヒト乳がん由来細胞 MCF-7 に対しては 80 mg/mL²⁸⁾ で増殖抑制効果が示されている。これらの報告からフィコシアニンによる増殖あるいは抑制作用は、細胞種による分化方向の違いや細胞系に依存した効果を持つことが示唆された。また、フィコシアニンの癌細胞に対する直接的な効果として、ミトコンドリアを介したアポトーシス(細胞死)作用経路への関与が報告されている。K562 細胞ではフィコシアニン濃度 50 μ M (13.15 mg/mL)²⁹⁾、MCF-7 細胞に対しては 80 mg/mL の添加²⁸⁾により、いずれも細胞内ミトコンドリアの内膜に結合しているチトクローム C の放出と、この放出を阻止する Bcl-2 タンパクの減少が起こることによる癌細胞の消滅作用が示唆された。これらの癌細胞に対して直接アポトーシスを起こしたフィコシアニンは、本研究で用いた濃度に比較していずれも高濃度であった。U937 細胞と HL-60 細胞に対しても高濃度のフィコシアニン添加により増殖抑制あるいはアポトーシスを起こす可能性が示唆された。フィコシアニンは、UNIDO (国連工業開発機構) 等によってその安全性が認められるとともに³⁰⁾、おもに健康食品として利用されてきた。しかしながら、フィコシアニンのヒトでの利用については、一日推奨量 (体重 60kg の成人で 10mg/kg、0.6 g/day)³¹⁾ を考慮した摂取濃度の検討が必要である。本研究におけるフィコシアニン濃度は、この一日推奨量を参考に算出され、マウスに摂取させた量を目安にした³²⁾。

一方、Phyco-CM は、U937 細胞に対し有意ではないものの無刺激 Cont

と Cont-CM に比較して CD14 抗原と CD11b 抗原陽性細胞の割合を増加させた (表 2.)。同時に、Phyco-CM 刺激は、無刺激 Cont 比較して CD14 抗原測定時の蛍光強度を有意に増加させた ($p < 0.01$)。細胞分類では、57 %の単球/マクロファージ細胞の出現が観察された(図 11.-a)。NBT 還元能も顕著な増加を示した(表 4.)。これらから Phyco-CM は、U937 細胞を成熟細胞である単球/マクロファージ系細胞に分化誘導したことが示唆された。また、Phyco-CM 刺激 U937 細胞は、Cont-CM 刺激に比較して U937 細胞の CD14 抗原陽性細胞割合が約 3 倍 ($4.2 \pm 2.0 \% \rightarrow 11 \pm 3.3 \%$)、CD11b 抗原陽性細胞割合が約 2 倍 ($4.8 \pm 2.3 \% \rightarrow 18 \pm 7.3 \%$) に変化した(表 2.)。形態学的細胞分類における単球、マクロファージの割合 (57 %)も Cont-CM 刺激 (約 20 %)より 3 倍近く高値を示した (図 11.-a)。これらのことから、ヒト末梢血単核球培養上清試料である Cont-CM 刺激よりもフィコシアニンを添加した Phyco-CM のほうが高い分化誘導作用を持つことが示唆された。

HL-60 細胞については、いずれの刺激においても細胞表面 CD14 抗原陽性細胞率は低く、U937 細胞と比較してもその陽性細胞率は低値であった(表 2.)。HL-60 細胞は二つの異なる造血幹細胞の分化プログラム、すなわち、刺激により骨髓系あるいはマクロファージ系いずれかの方向に分化が可能である³³⁾。形態学的観察結果より、Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞において二つの分化方向、単球系と顆粒球系の形態が同時に存在することが示唆された(図 10.-b)。このことは、Phyco-CM 刺激により、水溶性の淡黄色色素であり、好中球などの食細胞に取り込まれると不溶性の黒紫色 (暗青色)のホルマザンを形成する NBT 還元能²³⁾が増加したこと(表 4.)、単球と顆粒球において特異性を示すといわれている細胞表面 CD11b 抗原の割合 (14 %)が Cont-CM 刺激 (7.7 %)に比較して有意で

はないものの高値を示したこと(表 2.)と一致する。Tamagawa ら³⁴⁾は、NBT 還元能の陽性率と非特異的エステラーゼ染色 (NSE)陽性細胞とは相関傾向にあることから、NBT 還元能が分化誘導刺激後の HL-60 細胞について、顆粒球と単球のいずれに分化したかの指標として有用であると述べている。NSE の反応性は、単球/マクロファージ系細胞に特異的であるといわれるが³⁵⁾、Phyco-CM による分化誘導刺激後の HL-60 細胞のほとんどが骨髓系細胞に反応性を示す特異的エステラーゼ染色 (SE)陽性であった (表 3.)。形態学的観察では NSE 陽性を示す単球系形態と SE 陽性を示す顆粒球系形態を持つ細胞が混在しており(図 11.-b)、エステラーゼ染色の結果は必ずしも形態学的観察結果と一致していなかった。Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞において、単球と顆粒球に特異性を示すといわれている CD66b 抗原陽性細胞率 ($1.3 \pm 0.5 \%$)は、無刺激 Cont ($4.5 \pm 1.6 \%$)よりも有意に低値した(表 2.)。これらのことから、Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞の一部は形態学的変化および NBT 還元能と細胞表面抗原の結果からも単球系への分化をし始めているが、ほとんどは未熟な顆粒球系細胞である前骨髓球から骨髓球細胞であることが示唆された。

Chiao ら¹¹⁾は、ヒト末梢血リンパ球培養上清(CM)が、HL-60 細胞を単球、マクロファージ様細胞へ分化誘導することを示している。この報告によれば、30 %CM 加 RPMI とともに培養した HL-60 細胞の 28 %が 3 日目で、96 %が 8 日目でマクロファージ様形態を示している。本研究で用いた Cont-CM、Phyco-CM とともに RPMI に対する CMs の添加割合は 10 %であるが、Cont-CM 刺激では 3 日目で約 10%、Phyco-CM 刺激では約 15 %が単球、マクロファージ様成熟細胞に分化した。HL-60 細胞が CM により分化を示すことについては、Chiao らの結果に一致したといえる。本研究ではフィコシアニンでヒト末梢血単核球細胞を刺激し

て得た培養上清試料である Phyco-CM のほうが特に U937 細胞において成熟細胞の割合を増加させたことから、Cont-CM よりも高い分化誘導作用を持つことを示した。しかしながら、特に HL-60 細胞に対してこれらの大部分を成熟細胞に分化誘導するには培養日数、Phyco-CM の添加量 (%) も含めて不十分であったと推測された。本研究では、Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞における 8 日間の培養を実施していないが、3 日間培養後の形態には、様々な特徴を持つ細胞、すなわち、前骨髄球様細胞と次の段階である骨髄球様の特徴のような特徴の混在した形態が観察された。正常骨髄標本において、単球系の未熟な細胞である幼弱単球と骨髄系の未熟な細胞である前骨髄球はいずれも細胞質内に微細な顆粒を持ち、核内に核小体を持つ等の形態学的特徴から識別は困難であるといわれている³⁵⁾。Phyco-CM 刺激 HL-60 細胞においても様々な特徴を持つ前骨髄球様形態が観察されたため、細胞分類が困難であった。これら形態は、長期培養により顆粒球系へ分化成熟するのか、単球系へ分化成熟するのかさらに明瞭な変化等を示すと思われた。

ヒト単球において、LPS は TNF- α の放出の引き金になることが知られている³⁶⁾。Phyco-CM 刺激により U937 細胞において、Cont、Cont-CM 刺激に比較して増加の見られた CD14 抗原は、LPS と LPS 結合タンパク (LBP; LPS binding protein) のレセプターであることが知られている。CD14 抗原は、単球/マクロファージにおける LBP と LPS の結合に応答した TNF- α 産生を仲介する。近年、自然免疫系で働くマクロファージや樹状細胞において、病原体 (異物) を認識しその応答シグナルを伝達する働きをしている Toll-like receptor の存在が注目されている³⁷⁾。その中のひとつである Toll-like receptor 4 (TLR4) は、単球における LPS 応答の引き金として重要であること、CD14 と結合した LPS に、TLR4

に会合している MD2 分子が結合することで活性を起こすタンパクであることが示された^{38, 39)}。本研究では、Phyco-CM 刺激 U937 細胞において CD14 と CD11b 抗原陽性細胞の発現がみられたことから、分化誘導刺激による単球/マクロファージ系細胞への分化後、異物を認識する TLR4 の発現とそれに伴う TNF- α の産生増加が予想された。そこで、分化誘導刺激後の各細胞に LPS を添加し、その応答性を検討した。TLR4 の発現には、CD14 抗原と LBP が必要である。Phyco-CM は、分化誘導刺激後の U937 と HL-60 細胞の培養上清中に TNF- α を生じた (表 5.-a、b)。しかしながら、それら TNF- α 量は LPS (1,000 ng/mL) 添加による応答性、すなわち、TNF- α 量の有意な増加を示さなかった。LPS は、グラム陰性菌の細胞外壁を構成する糖脂質であり、内毒素(エンドトキシン)として種々の細胞を強く活性化する³⁸⁾。Phyco-CM 刺激後の U937 細胞における貪食活性は、LPS 無添加では Cont-CM 刺激 U937 細胞の貪食活性より有意に増加した。しかしながら、LPS 添加による貪食活性の有意な増加はみられなかった (表 5.-a)。LPS 応答性 TNF- α 量の測定については、3 日間培養後に LPS を添加し、培養上清中の TNF- α 産生について比較した。この時、Phyco-CM 刺激後の各細胞における応答性を比較する目的で、細胞の回収および細胞数の調整を実施しなかった。この結果、各刺激による 3 日間培養後の増殖細胞数の違いを反映し、LPS 応答とこれら各細胞から産生されたサイトカイン TNF- α 量に影響があることが示唆された。しかしながら、Pnyco-CM 刺激 U937、HL-60 細胞のいずれも LPS の添加による TNF- α 量の有意な増加は見られなかった。このことから、3 日間の刺激後に細胞を回収し、LPS を添加した場合、細胞数あたりのサイトカイン産生量を反映し、本結果に比較して陽性対照との差が明確になることが推測された。

CD14 は二つの役割、すなわち、TLR4/MD2 に LPS を運ぶ役割と細胞内に LPS を取り込む役割があり、CD14 を介して細胞内に取り込まれた LPS によって細胞内に存在する TLR4/MD2 の活性化が起こると考えられている⁴⁰⁾。Phyco-CM 刺激 U937 細胞における CD14 抗原の発現量では、CD14 を介した LPS の取り込みあるいは TLR4/MD2 の活性化が起らず、LPS 応答性 TNF- α 量の増加を起こすほど十分に機能しなかったのかもしれない。また、形態的に Phyco-CM 刺激 U937 細胞における単球/マクロファージへ分化した細胞は、LPS 応答性を起こすための貪食能以上の機能を持つ活性化マクロファージにまでには成熟していなかったのかもしれない。あるいは、TNF- α 以外の他の炎症性サイトカイン、例えば、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18 など別のサイトカインの LPS 応答に関連した増加に影響したのかもしれない。また Cherg ら⁴¹⁾は、フィコシアニン(0.12-0.25 mg/mL)存在下でマウス単球マクロファージ細胞 RAW 264.7 を 24 時間培養後に LPS (1,000 ng/mL)で 1 時間刺激して得た培養上清中 TNF- α 産生が、フィコシアニンの濃度依存的に抑制されたことを報告している。このことは、フィコシアニンが、LPS 刺激 RAW 264.7 における NO 形成を抑制し、この NO 形成抑制に関連したと推測される I κ B- α を経由した細胞核 NF- κ B の活性を抑制した結果であると推測している。フィコシアニンの抗炎症作用については、他にも報告がある⁴²⁻⁴⁴⁾。本研究における TNF- α 産生量についても TLR4/MD2 の活性化経路ではなく、LPS の添加により生じた一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase; iNOS)から誘導される一酸化窒素(NO; nitric oxide)と活性酸素を含む炎症性の免疫応答等、別の経路に関連した結果かもしれない。

以上の結果から、フィコシアニンの未熟なヒト白血病細胞 U937、

HL-60 細胞に対する分化誘導作用は、直接的よりもむしろ間接的に働き、フィコシアニンで刺激したヒト末梢血リンパ球培養上清試料である Phyco-CM のほうが成熟細胞の割合を増加させたことから、Cont-CM よりも分化誘導作用を高めることを示唆した。次に、Phyco-CM 中に存在を推測され、U937 細胞と HL-60 細胞を成熟細胞（単球/マクロファージ様細胞）に分化誘導する可能性を持つ因子として IFN- γ 、GM-CSF、IL-3 を測定した。その結果、Phyco-CM は、高濃度の IFN- γ および GM-CSF を含有し、IL-3 については、検出されなかった（図 12.）。ヒト末梢血単核球細胞のうち、リンパ球は本研究で測定した 3 種類のサイトカインを産生する主な産生細胞であるが、これらは他の様々な細胞からも産生される（表 6.）。IFN- γ は、T リンパ球や natural killer (NK) 細胞から産生される、マクロファージ活性やリンパ系細胞の分化誘導因子活性を持つサイトカインで、U937 細胞や HL-60 細胞を単球系へ分化誘導することが知られている^{45, 46)}。このことは、Phyco-CM 刺激 U937 細胞の分化方向が単球/マクロファージ系細胞であり、IFN- γ の存在が分化の一因であることを支持していると思われた。

GM-CSF は、T 細胞、B 細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞等の様々な細胞から、IL-3 も T 細胞、NK 細胞、内皮細胞等の細胞から産生され、それぞれ未熟な造血細胞の増殖と分化に関する機能を持つことが知られている⁴⁷⁻⁴⁹⁾。本研究の結果から、Phyco-CM 中の IFN- γ と GM-CSF および、IFN- γ または GM-CSF が U937 細胞と HL-60 細胞の一部を単球/マクロファージ系へ分化したことが推測された。Chen ら⁵⁰⁾は、中国産の真菌である fu-ling (苓茯、*Poria cocos* Wolf、PC)から抽出した多糖画分(PS)で 5 日間刺激して得たヒト末梢血単核球培養上清(PC-PS-MNC-CM5)により U937 と HL-60 細胞の成熟細胞への分化促進

が見られたことを報告している。この中であらかじめ PC-PS-MNC-CM5 中に見られたサイトカイン IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β それぞれに対する抗体を添加してから U937 と HL-60 細胞の分化誘導刺激を行うと、これらに対する分化促進作用が抑制され、成熟細胞に変化しなかったことを報告している。これらサイトカインに対する抗体の添加は、1 種類よりも複数種類を同時に添加した場合で、より高い分化促進作用の抑制が示された。GM-CSF については、単独よりも ATRA やビタミン D₃ と組み合わせることで U937 細胞の細胞表面 CD14 抗原や CD11b 抗原の割合が増加したとの報告もある⁵¹⁾。ヒト末梢血単核球培養上清中分化誘導因子の相乗効果については、他の報告⁵²⁾にもみられるように、複数のサイトカインが相互に関係することで U937 あるいは HL-60 細胞等の未熟な白血病細胞に対してより高い分化誘導作用を示しているのかもしれない。あるいはフィコシアニンは今回測定した IFN- γ と GM-CSF、IL-3 のようなサイトカインと単独あるいは組み合わせて用いることで、更なる分化誘導効果を引き起こすかもしれない。Niemeyer ら⁴⁷⁾は、PHA あるいは PMA で刺激した単核球細胞に含まれる T 細胞クローン中に IL-3 の遺伝子発現が見られたことを述べている。IL-3 は、T リンパ球からも産生される。本論におけるフィコシアニンの添加濃度 (0.1 mg/mL) では、T リンパ球中の IL-3 産生を引き起こすには不十分だったため、Phyco-CM 中に IL-3 産生がみられなかったのかもしれない。あるいは、Cont-CM 中からは検出されていることから、もともとフィコシアニンは IL-3 産生には関与しないか逆に抑制したのかもしれないが、この点については今後の検討が必要である。

本研究では、フィコシアニンの未熟な白血病細胞に対する形態的、機能的な分化誘導結果について、フィコシアニンが単核球等を刺激してそ

の培養上清中にサイトカインを産生したことに一因することを明らかにした。このことは、自己防衛免疫システムにおいて、フィコシアニンがヒト末梢血単核球のような細胞に働きかけ、白血病細胞のように未熟な細胞を正常な細胞へ分化するような変化を促すように働く手助けをすることを示唆している。IFN- γ については、Th1 細胞から産生されることが知られているが^{53, 54)}、フィコシアニンは、ヒト末梢血単核球細胞培養上清中のサイトカイン IFN- γ 産生を増加させた (図 12.)。PHA 刺激 T 細胞は、IFN- γ を産生することが報告されている⁵⁵⁾。ヒト末梢血単核球に添加されたフィコシアニンは、T 細胞を活性化させ、IFN- γ 、GM-CSF 等のサイトカインの産生を促すと思われる。フィコシアニンを生体内に摂取した場合も T 細胞表面の特定の糖タンパク等と結合し、活性化された T 細胞から IFN- γ 等のサイトカインが産生されと考えられる。生体内での働きについては、アレルギー性鼻炎の症状を持つ被験者が、スピリナ 1 日 1~2 g (フィコシアニン量に換算すると 0.15~0.3 g) を 3 ヶ月間食したところ、末梢血リンパ球において Th1/Th2 のバランスが Th1 有意になり、IgE 抗体の産生亢進に働く IL-4 サイトカイン産生の減少が見られたという Mao ら⁵⁶⁾の報告とオボアルブミンを投与されたマウスにおいて 8 週間の 0.05 %フィコシアニン溶液摂取 (1.25 mg/20 g/day) により血中の IgE 抗体量の抑制がみられた³²⁾という報告からも示唆される。しかしながら、生体内での単核球細胞や白血病細胞に対するフィコシアニンの働きはまだ解明されていない。本研究で述べたように、直接白血病細胞に対して働くよりも T 細胞等を刺激することで間接的に働きかけるのではないかと推測される。このようなフィコシアニンの働きは、ヒトにおいても加齢に伴い低下する T 細胞機能等を維持することに役立つかもしれない。しかしながら、現在、フィコシアニンにつ

いては、食品や化粧品天然着色料としての利用が主である。今後、急性前骨髄性白血病患者に対する分化誘導療法に使用される ATRA のように⁵⁾、実用的な治療用薬品としての使用あるいはフィコシアニンの摂取により加齢に伴う免疫機能の維持あるいは低下の予防が期待される。

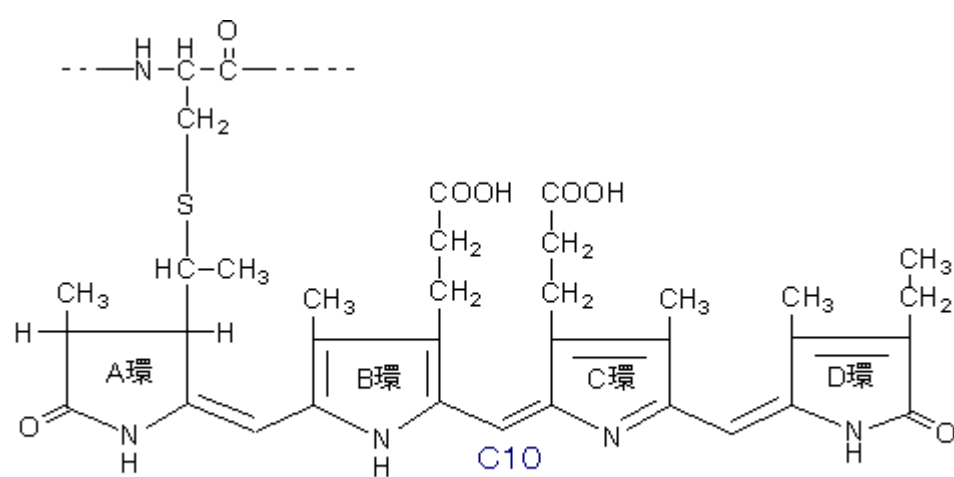


图 1. Phycocyanin 化学构造

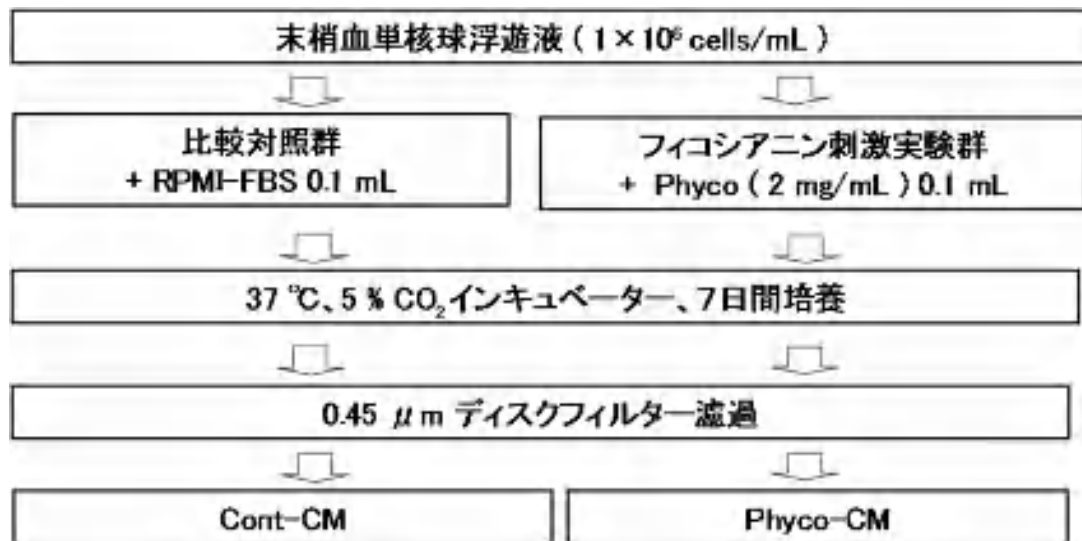


図 2. フィコシアニン刺激ヒト末梢血単核球培養上清試料 (Cont-CM、Phyco-CM)の調製



図 3. ヒト末梢血単核球培養上清試料による U937 および HL-60 細胞の分化誘導

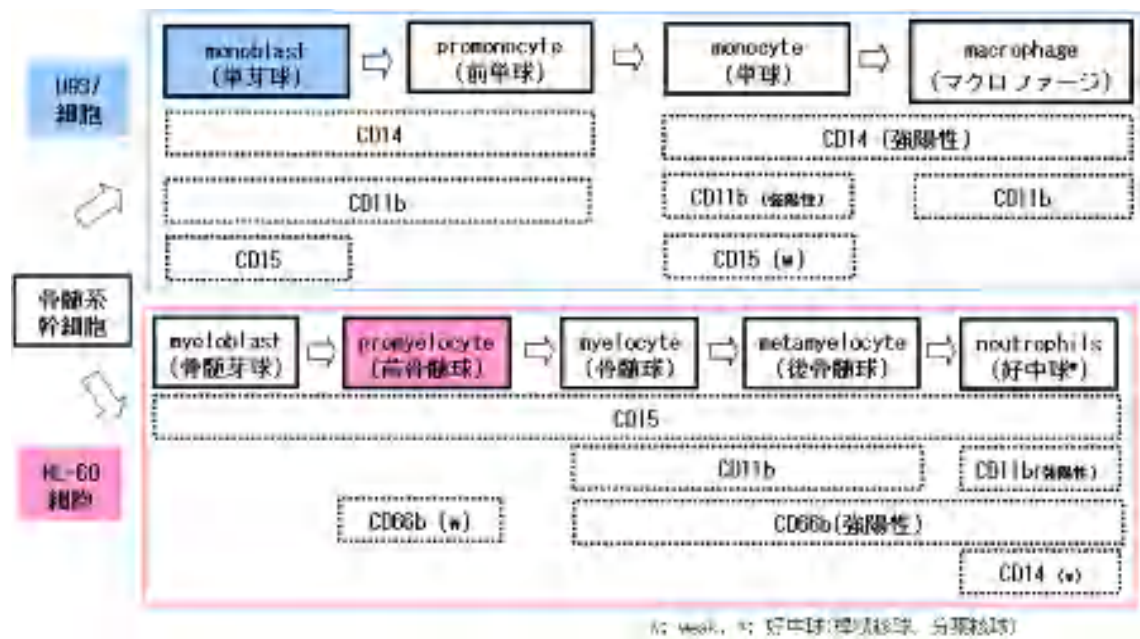


図 4. 骨髓系細胞の成熟過程と表面抗原発現 - U937、HL-60 細胞の表面抗原および細胞形態における分化段階の推測

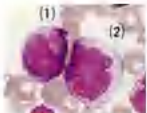
分類	1) 単芽球	2) 前単球	3) 単球	4) マクロファージ
項目	monoblast	promonocyte	monocyte*	macrophage*(Mφ)
CD抗原	CD15, 14, 11b	CD14, 11b	CD14, 11b	CD14, 11b
核	N/C (核/細胞質) 比 やや大	くぼみないし切れ込みあり	腎形、馬蹄形、小湾曲あり	N/C比小、円形、類円形
核構造	微細	クロマチンやや微細	クロマチン結節あり	粗い
核小体	数個	しばしばあり	なし	時にあり
細胞質	小空胞あり	好塩基性、舌状突起あり	空胞あり、豊富、淡青色～淡灰青色、微細なアズール顆粒あり	大きく、色は好塩基性、度合いは細胞により異なる、透明感あり
形	類円形	類円形	不整形	不整、不明瞭
細胞例				

図 5. U937 細胞における細胞分類とそれらの特徴

分類	1) 芽球 (骨髓芽球、単芽球)	2) 中間 (前骨髓球、骨髓球)		3) 成熟 (後骨髓球、桿状、分葉核球)	
項目	myeloblast	promyelocyte	myelocyte	metamyelocyte	band, segment form*
CD 抗原	CD15	CD15, 66b [Ⓜ]	CD15, 11b, 66b	CD66b	CD11b, 66b, 14 [Ⓜ]
核	N/C (核/細胞質) 比大	N/C 比大、偏在	くぼみなし、偏在性	ゴルジ野に押されて偏在、腎形または短いバナナ状	曲がった細長い帯状、複数に分葉して核糸でつながっている
核構造	繊細	クロマチン繊細	クロマチン粗	クロマチン粗大、粗大な結節分散	クロマチン濃縮、塊状
核小体	1〜4個	1〜4個	なし	なし	なし
細胞質	好塩基性強、淡青色〜濃青色、狭い〜広い、顆粒なし	好塩基性(薄い)、アズール顆粒豊富	少量のアズール顆粒、多数の特殊顆粒	広い、特異的顆粒を有する	広い、淡赤、多数の特殊顆粒
形	円形、大	類円	類円	円形	円形
					

図 6. HL-60 細胞における細胞分類とそれらの特徴

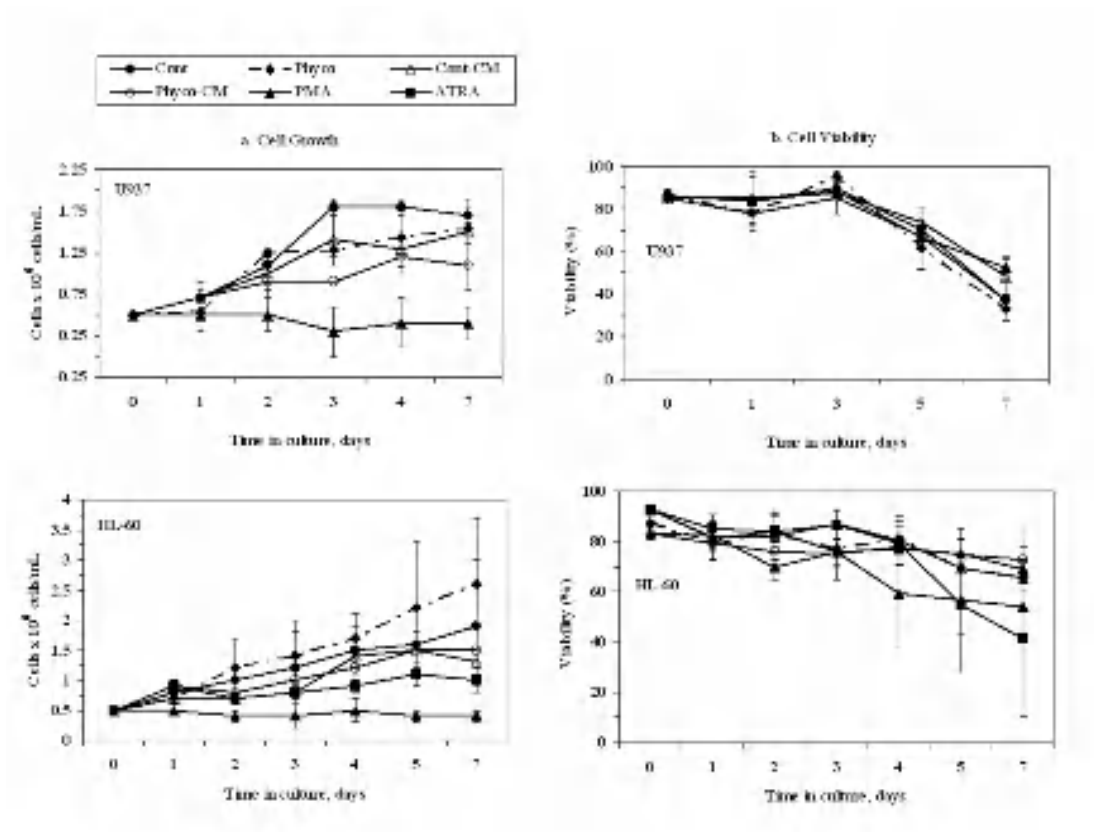


図 7. 各刺激物における U937 と HL-60 細胞の細胞増殖 (a) および生存率 (%) (b)

細胞は、培養後 1、2、3、4、5、7 日目に計数した。生存率 (%) は、トリパンプルー染色法にて測定した。測定 1 回当たり各試料 3 点ずつ、2~3 回の実施により得た結果は、平均値 ± 標準偏差 (n=2~3) で表した。

(1) 無刺激 Cont

(2) Phyco

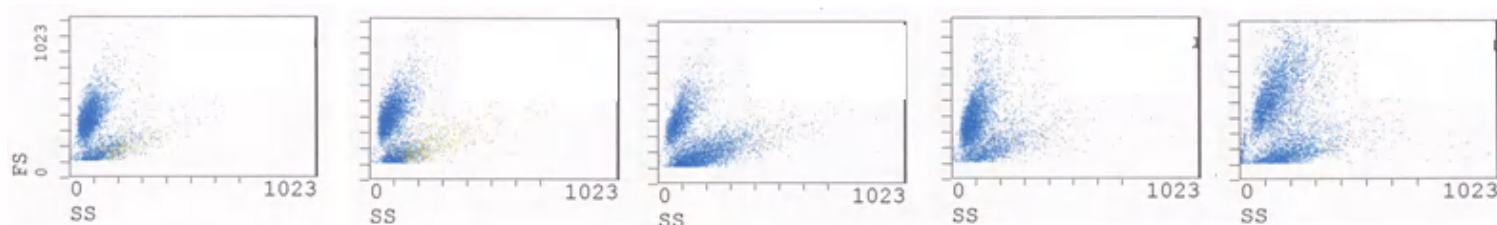
(3) Cont-CM

(4) Phyco-CM

(5) PMA

(6) ATRA

U937 cells



HL-60 cells

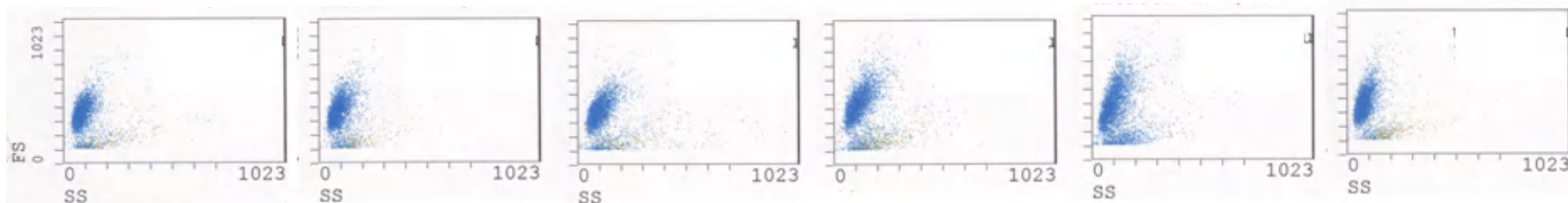


図 8. Phyco-CM と他の刺激物を用いた U937 細胞、HL-60 細胞における FS, SS のパターン

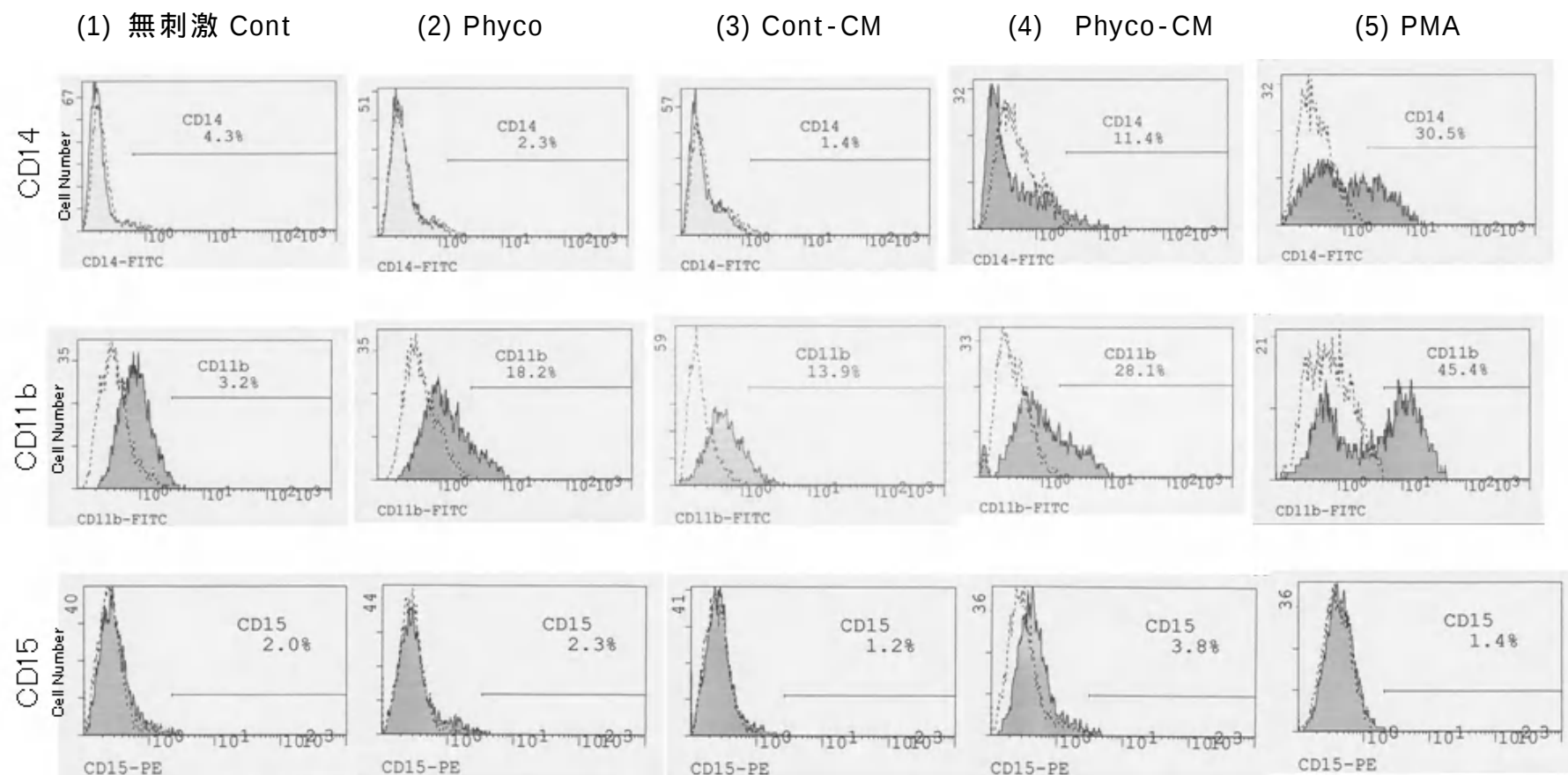


図 9.-a U937 細胞における各 CD 抗原陽性細胞の出現パターン

(1) 無刺激 Cont、(2) Phyco、(3) Cont-CM、(4) Phyco-CM と(5) PMA で刺激した U937 細胞 (0.5×10^6 cells/mL of medium)の各 CD 抗原は、直線で示した。各刺激物のコントロールは、点線で示した。

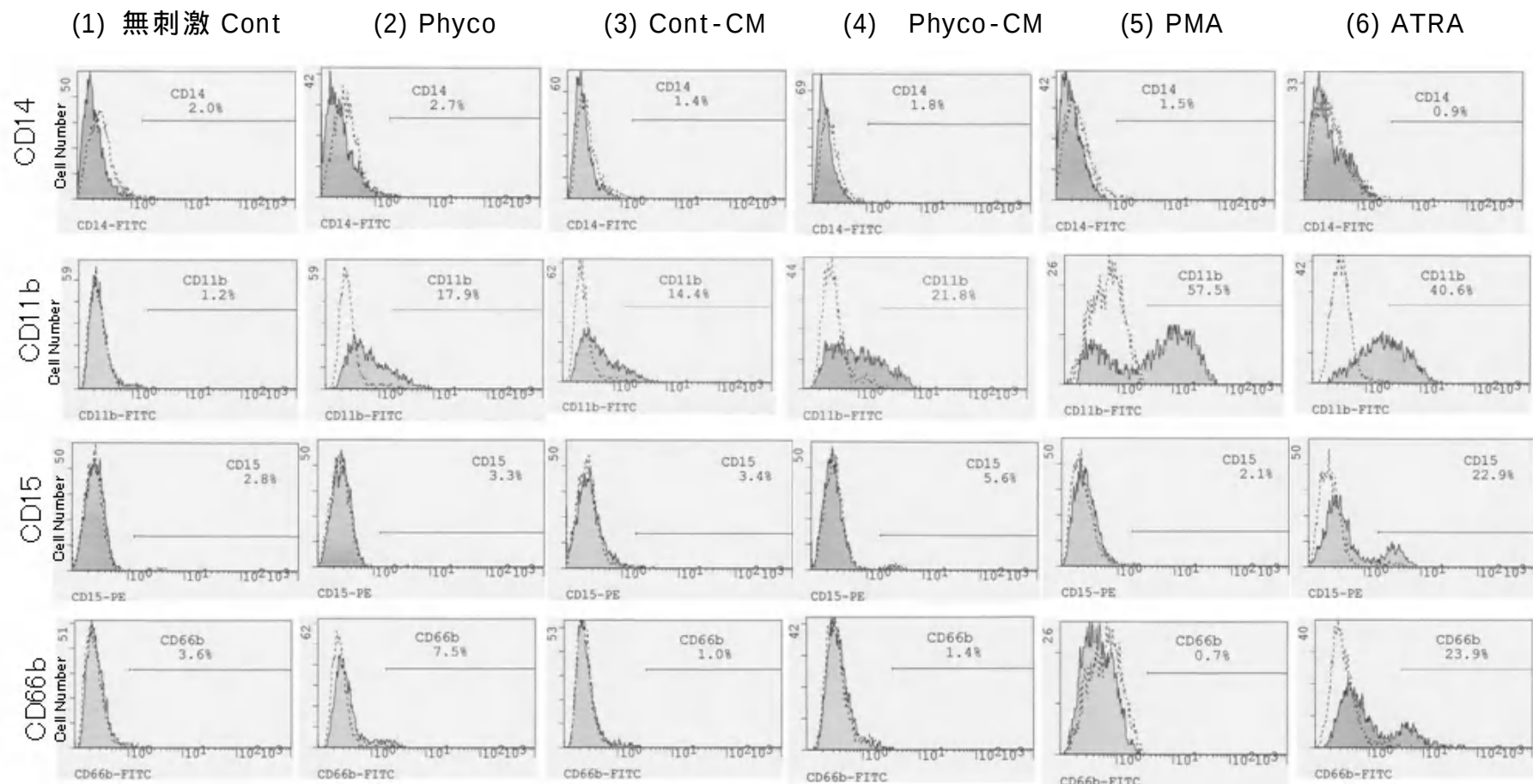


図 9.-b HL-60 細胞における各 CD 抗原陽性細胞の出現パターン

(1) 無刺激 Cont、(2) Phyco、(3) Cont-CM、(4) Phyco-CM と(5) PMA、(6) ATRA で刺激した HL-60 細胞 (0.5×10^6 cells/mL of medium)の各 CD 抗原は、直線で示した。各刺激物のコントロールは、点線で示した。

a. U937

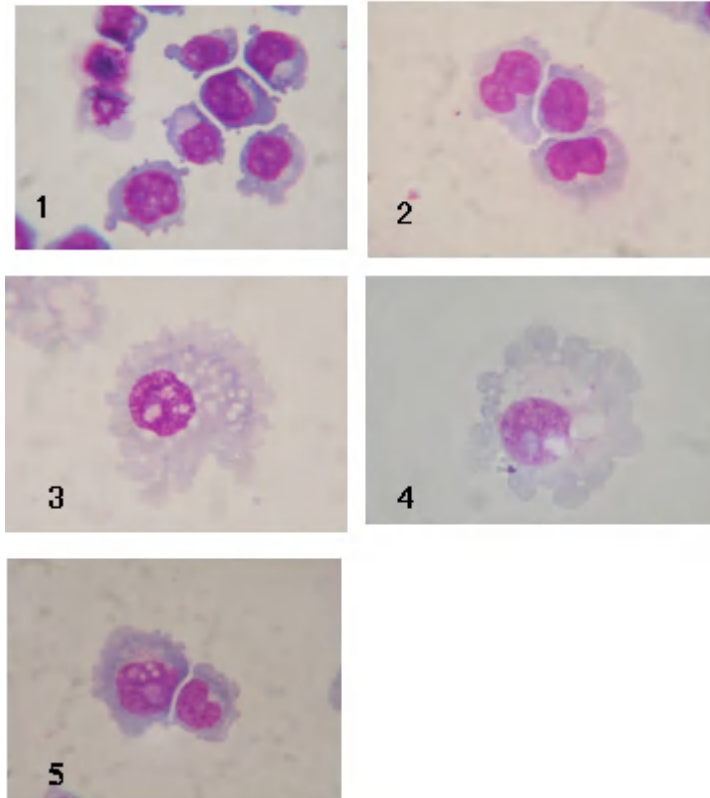


図 10.-a Phyco-CM と各刺激物で刺激した U937 細胞の形態学的変化

細胞形態は、光学顕微鏡下（原図倍率 x 1000）で観察した。

a. U937 細胞 (0.5×10^6 cells/mL)は、(1) RPMI-FBS (Cont)、(2) Phyco、(3) PMA、(4) Phyco-CM、(5) Cont-CM とともに 3 日間培養した。

b. HL-60

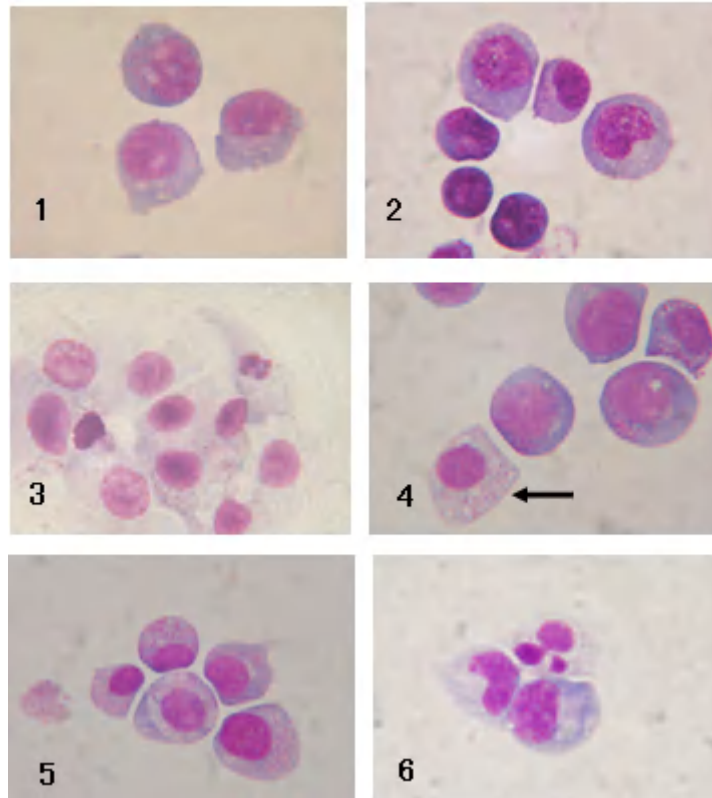


図 10.-b Phyco-CM と各刺激物で刺激した HL-60 細胞の形態学的変化

細胞形態は、光学顕微鏡下（原図倍率 x 1000）で観察した。

b. HL-60 細胞 (0.5×10^6 cells/mL)は、(1) RPMI-FBS (Cont)、(2) Phyco、(3) PMA、(4) Phyco-CM、(5) Cont-CM、(6) ATRA とともに 3 日間培養した。

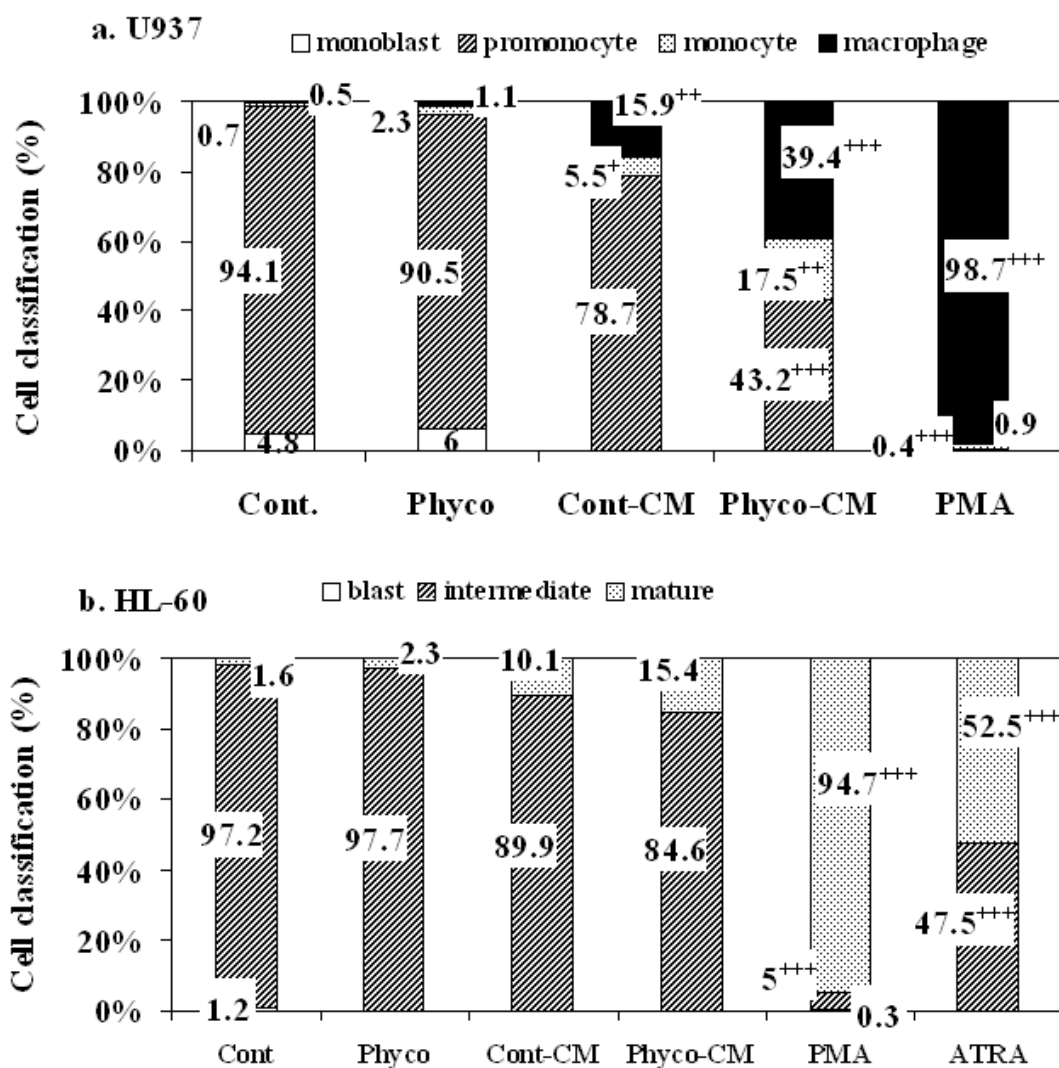


図 11. Phyco-CM と各刺激物で刺激した U937 と HL-60 細胞の形態学的分類

U937 と HL-60 細胞は、メイギリュンワルド・ギムザ染色を行い、材料と方法に示した方法で分けた群に分類した。200 個中の陽性細胞について、光学顕微鏡下(原図倍率 x 1000)で観察した。測定 1 回当たり各試料 3 枚ずつ、3 回の実施により得た結果は、平均値 ± 標準偏差 (n=3)で表した。

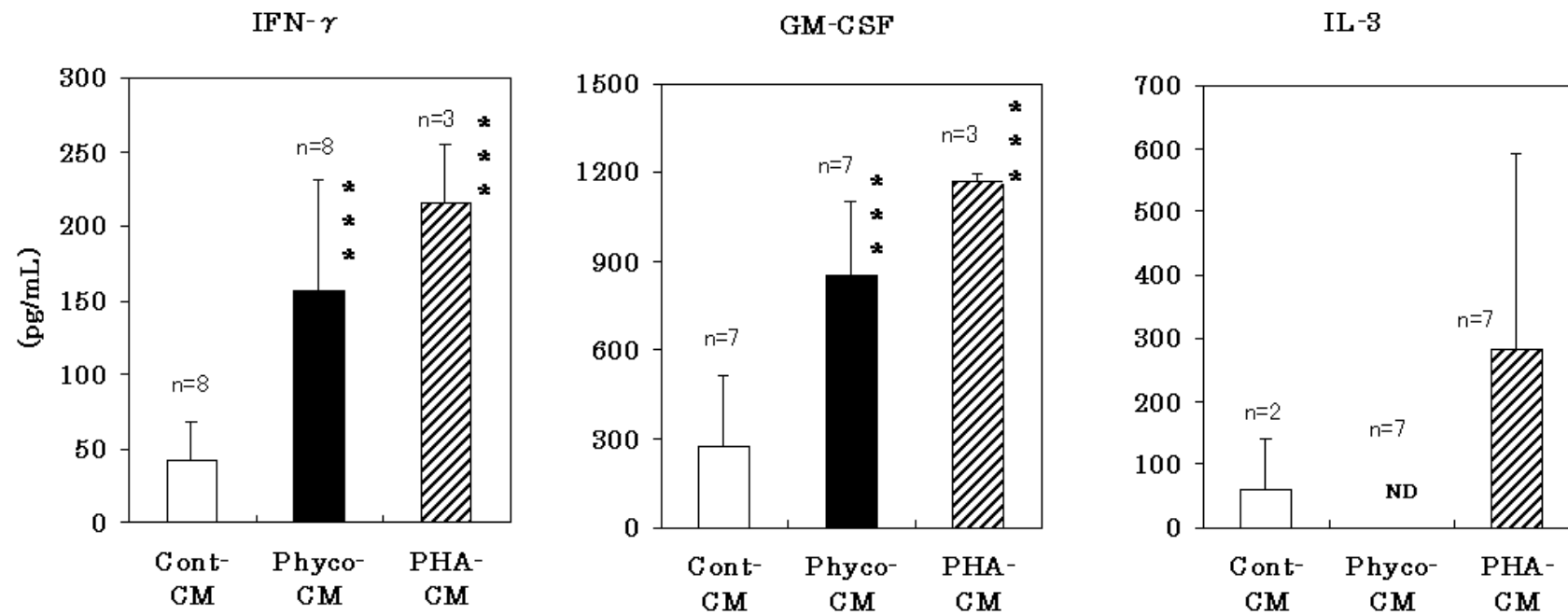


図 12. フィコシアニン刺激ヒト単核球の培養上清試料中 IFN- γ 、GM-CSF、IL-3

被験者毎の培養上清 (CMs) は、材料と方法に述べたように採取した。培養上清 (CMs) 中サイトカイン値は、ELISA 法にて測定した。CMs 中陽性対照は、PHA (10 μ g/mL) とともに培養した。測定 1 回当たり各試料 2 点ずつ行ったそれぞれの値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=2 ~ 8) で表した。Cont-CM と Phyco-CM の n 数は、使用した CMs 数を表している。

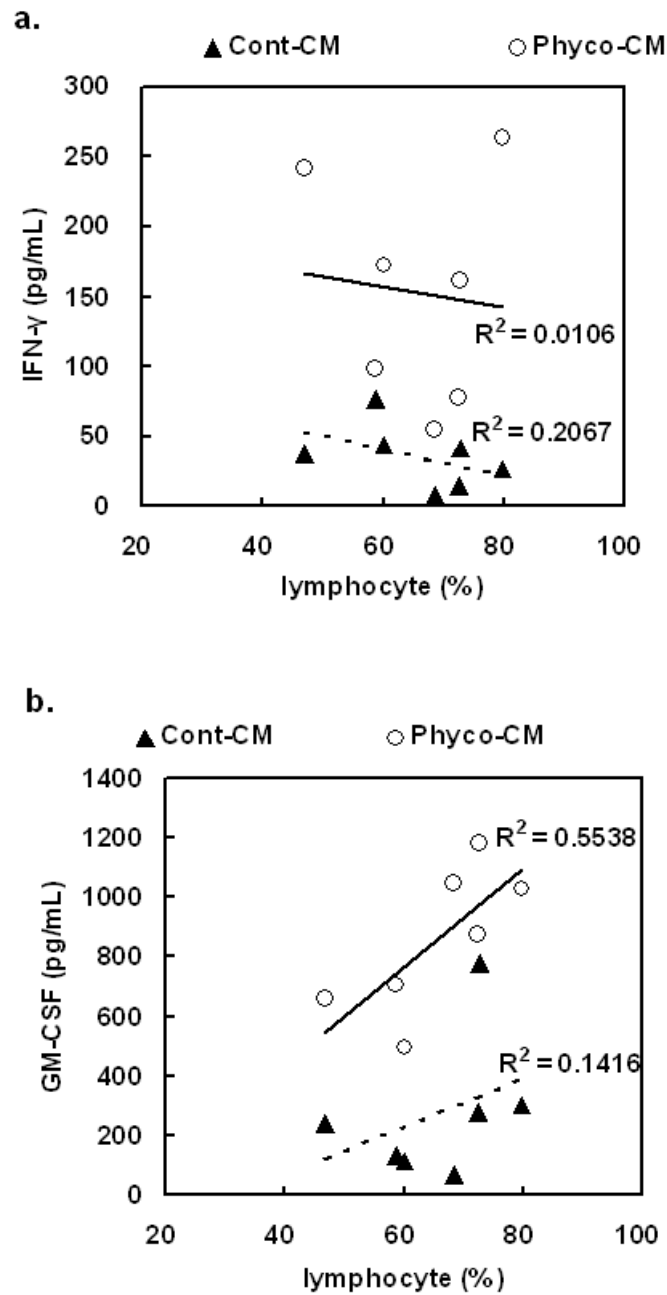


図 13. ヒト単核球培養上清試料 (Phyco-CM、Cont-CM) 中サイトカイン IFN- γ (a)、GM-CSF (b)とリンパ球割合との関係

各被験者 (n=7)における Phyco-CM と Cont-CM 中サイトカイン量は、ELISA 法にて算出した。リンパ球等の割合は、各被験者から得たヒト単核球浮遊液 (1×10^6 cells/mL)をサイトスピンにてスライド標本とし、メイグリュンワルド・ギムザ染色後、200 個の細胞を計数し、リンパ球およびその他含まれている細胞の割合を算出した。

表 1. 機能マーカー (分化方向性マーカー)の検索における顆粒球/単球/マクロファージの反応態度一覧¹⁾

機能マーカー		顆粒球	単球	マクロファージ
特異的エステラーゼ (基質 ; Naphthol AS-D chloroacetate)		++	+	+
非特異的エステラーゼ (基質 ; α -naphthyl butyrate)		±	+++	+++
NBT 還元能		++	+	±
接着能		-	+	+++
貪食能		±	+	+++
表面 抗原例	CD11b	+++	+++	++
	CD14	+ ^w	++	++
	CD15	+	+	-

+++ ; 強陽性、- ; 陰性

表 2. Cont-CM あるいは Phyco-CM 刺激 U937 と HL-60 細胞の各表面抗原と蛍光強度比較

cells	CD 抗原 (%) (蛍光強度)	Cont (n=3)	Phyco (n=3)	Cont-CM (n=5)	Phyco-CM (n=5)	PMA (n=3)	ATRA (n=3)
U937	CD14	3.4 ± 3.2 (2.8 ± 0.8)	7.5 ± 3.6 (3.1 ± 0.9)	4.2 ± 2.0 (5.3 ± 0.8 ⁺⁺)	11 ± 3.3 (5.6 ± 0.9 ⁺⁺)	22 ± 11 ⁺⁺⁺ , ^{***} , ^{###} (5.4 ± 1.6)	-
	CD11b	3.9 ± 1.0 (3.1 ± 2.7)	7.9 ± 7.3 (5.6 ± 1.0)	4.8 ± 2.3 (4.3 ± 0.8)	18 ± 7.3 (4.6 ± 0.6)	60 ± 17 ⁺⁺⁺ , ^{***} , ^{###} (21 ± 11 ⁺⁺⁺ , ^{***} , ^{###})	-
	CD15	4.6 ± 2.2 (4.1 ± 2.3)	3.9 ± 4.0 (13 ± 2.1)	1.5 ± 0.3 (7.5 ± 1.8)	1.8 ± 0.4 (12 ± 10)	2.1 ± 1.0 (7.9 ± 1.2)	-
HL-60	CD14	1.7 ± 1.2 (5.1 ± 2.0)	1.5 ± 0.5 (4.7 ± 1.3)	1.5 ± 0.6 (5.8 ± 2.0)	1.6 ± 0.5 (10 ± 2.5)	1.6 ± 0.7 (7.2 ± 2.3)	1.5 ± 1.0 (3.3 ± 3.2)
	CD11b	10 ± 7.4 (3.9 ± 3.4)	16 ± 4.6 (5.5 ± 2.0)	7.7 ± 3.1 (4.7 ± 0.6)	14 ± 4.7 (6.6 ± 1.2)	43 ± 14 ⁺⁺⁺ , ^{***} , ^{###} (16 ± 5.1 ⁺⁺⁺ , ^{***} , ^{###})	36 ± 4.9 ⁺⁺⁺ , ^{***} , ^{###} (7.6 ± 2.4)
	CD15	5.2 ± 1.9 (20 ± 24)	5.9 ± 2.4 (10 ± 8.1)	7.8 ± 3.6 (4.8 ± 1.4)	7.6 ± 1.9 (5.6 ± 2.0)	1.8 ± 0.3 (27 ± 37)	19 ± 8.1 ⁺⁺⁺ , ^{***} , ^{###} (4.6 ± 1.2)
	CD66b	4.5 ± 1.6 (27 ± 32)	6.8 ± 3.1 (11 ± 5.6)	2.2 ± 0.7 (7.7 ± 1.4)	1.3 ± 0.5 ^{###} (10 ± 2.0)	0.9 ± 0.3 ^{###} (59 ± 40 ^{###})	20 ± 4.0 ⁺⁺⁺ , ^{***} , ^{###} (19 ± 2.7)

測定 1 回当たり各試料 1 点ずつ、3 回の実施により得た結果は、平均値 ± 標準偏差で表した。Cont-CM と Phyco-CM の n 数は、測定 1 回当たり各試料 1 点ずつ、3 回の実施時に使用した CMs 数を表している。

⁺⁺; p < 0.01、⁺⁺⁺; p < 0.001 compared to Cont、^{***}; p < 0.001 compared to Cont-CM、^{###}; p < 0.001 compared to Phyco

表 3. Phyco-CM と各刺激物を用いた U937 と HL-60 細胞の特異的、非特異的エステラーゼ染色

cells	SE or NSE (%)	Cont (n=3)	Phyco (n=3)	Cont-CM (n=7)	Phyco-CM (n=7)	PMA (n=3)	ATRA (n=3)
U937	NSE	94.2 ± 9.5	98.8 ± 1.7	98.9 ± 2.0	99.9 ± 0.2	98.9 ± 1.1	-
HL-60	NSE	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.5	50 ± 11 ⁺⁺⁺ , ***	0
	SE	90 ± 6.5	96 ± 1.4	92 ± 3.2	93 ± 1.4	15 ± 7.1 ⁺⁺⁺ , ***	90 ± 6.5

測定 1 回当たり 3 点ずつ、2～3 回の実施により得た結果は、平均値 ± 標準偏差で表した。Cont-CM と Phyco-CM の n 数は、使用した CMs 数を表している。

⁺⁺⁺; p < 0.001 compared to Cont、***; p < 0.01 compared to Cont-CM

表 4. Phyco-CM と各刺激物を用いた U937 と HL-60 細胞の NBT 還元能

cells	Cont (n=3)	Phyco (n=3)	Cont-CM (n=2)	Phyco-CM (n=2)	PMA (n=3)	ATRA (n=3)
U937	1.2 ± 0.3	5.0 ± 3.0	1.3 ± 0.8	7.5 ± 4.1 **	5.2 ± 2.9	-
HL-60	0.7 ± 0.3	2.0 ± 1.0	2.1 ± 0.7	5.3 ± 1.9 ⁺⁺⁺ , **	1.7 ± 0.8	10.8 ± 3.3 ⁺⁺⁺ , ***

値は、測定 1 回当たり各試料 2～3 枚ずつ実施した結果の平均値 ± 標準偏差で表した。Cont-CM と Phyco-CM の n 数は、使用した CMs 数を表している。

⁺⁺⁺; p < 0.001 compared to Cont, **; p < 0.01, ***; p < 0.001 compared to Cont-CM

表 5. Phyco-CM 刺激 U937 と HL-60 細胞の LPS 応答

a. U937 cells

Stimulators	LPS (0 ng/mL)		LPS (1000 ng/mL)	
	Phagocytic activity (%)	TNF- α (pg/mL)	Phagocytic activity (%)	TNF- α (pg/mL)
Cont	18 $\pm$ 5.2	ND	25 $\pm$ 6.3	ND
Phyco	23 $\pm$ 5.1	< 15.6	26 $\pm$ 8.3 **	ND
Cont-CM	32 $\pm$ 5.5 ++	46 $\pm$ 31	45 $\pm$ 13 +++, #	51 $\pm$ 28
Phyco-CM	81 $\pm$ 13 +++, ***	66 $\pm$ 15	83 $\pm$ 8.2 +++, ***	84 $\pm$ 21
PMA	96 $\pm$ 4.6 +++, ***	968 $\pm$ 150 ***	97 $\pm$ 3.7 +++, ***	2103 $\pm$ 180 ***, ###

b. HL-60 cells

Stimulators	LPS (0 ng/mL)		LPS (1000 ng/mL)	
	Phagocytic activity (%)	TNF- α (pg/mL)	Phagocytic activity (%)	TNF- α (pg/mL)
Cont	17 $\pm$ 6.2	ND	18 $\pm$ 2.4	ND
Phyco	16 $\pm$ 3.8	< 15.6	20 $\pm$ 7.6 ***	< 15.6
Cont-CM	35 $\pm$ 12 ++	32 $\pm$ 29	39 $\pm$ 7.8 +++)	50 $\pm$ 31
Phyco-CM	36 $\pm$ 13 ++	71 $\pm$ 18	40 $\pm$ 11 +++)	74 $\pm$ 18
PMA	84 $\pm$ 13 +++)	585 $\pm$ 39	89 $\pm$ 10 +++, ***	1246 $\pm$ 59 ***, ###
ATRA	72 $\pm$ 5.2 +++)	ND	69 $\pm$ 6.9 +++, ***	28 $\pm$ 18

貪食能は、オプソニン処理 latex beads (opsonin-treated LB)を用いた取り込み細胞数の割合により測定した。Phyco-CM 刺激 U937 と HL-60 細胞の LPS に対する応答について、貪食能および培養上清中 TNF- α の測定により比較した。測定 1 回当たり 3 点ずつ、1~3 回の実施により得た結果は平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)で示した。

++, p < 0.01, +++, p < 0.001 compared to Cont in each LPS (0 or 1000 ng/mL), **, p < 0.01, ***, p < 0.001 compared to Cont-CM in each LPS (0 or 1000 ng/mL), #, p < 0.05, ###, p < 0.001 compared to LPS 0 ng/mL, < 15.6; under detection limit (15.6 pg/mL), ND; not detected

表 6. サイトカイン産生細胞一覧

サイトカイン	主な産生細胞					
	リンパ球		NK 細胞	マクロ ファージ	上皮 細胞	肥満 細胞
	(T 細胞)	(B 細胞)				
IFN- γ	○		○			○
IL-3	○		○		○	
GM-CSF	○	○		○		○

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切丁寧なご指導を賜りました女子栄養大学免疫検査学研究室教授 林 修先生に謝意を表します。終始温かい励ましを賜りました女子栄養大学前教授 奥脇義行先生、細胞の形態学的観察についてご指導賜りました故小野昭治先生に感謝申し上げます。DIC ライフテック株式会社 (旧大日本インキ化学工業株式会社)の故加藤敏光様、太郎田博之様、吉川典孝様、石原光輝様、山西腫瘍医院の石硯海様に感謝申し上げます。最後に、この論文に関する研究テーマを選択した免疫検査学研究室卒研究生の皆さん、支えてくれた家族、友人に感謝します。

参考文献

- 1) 木口薫: 白血病細胞: 羊土社, 1995: 201-209.
- 2) Trayner ID, Bustorff T, Etches AE, et al.: Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, alpha1, 25-dihydroxyvitamin D₃ or 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk Res.* 1998; 22: 537-547.
- 3) Huang ME, Ye YC, Chen SR, et al.: Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1988; 72: 567-572.
- 4) Breimtan.T.R.: Induction of differentiation of human promyelocytic leukemia cel line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; 77: 2936-2940.
- 5) Chen ZX, Xue YQ, Zhang R, et al.: A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood.* 1991; 78: 1413-1419.
- 6) Ciferri O: *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbio Rev.* 1983; 47: 551-578.
- 7) Kay R: Microalgae as food and supplement. *Critical reviews in food science and nutrition.* 1991; 30: 555-573.
- 8) Shinohara K, Okura Y, Koyano T, Murakami H, Omura H: Algal phycocyanins promote growth of human cells in culture. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1988; 24: 1057-1060.
- 9) Kobori M, Miyama Y, Tsushida T, Shinmoto H, Shinohara K: Effecct of non-dialyzable extracts of vegetables on the differentiation of U937 human myeloid leukemia cell line. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* 1995; 42: 61-68.
- 10) Kobori M, Shinohara K: Effects of Spinach extract on the differentiation of the human promyelocytic cell line. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1993; 57: 1951-1952.
- 11) Chiao JW, Freitag WF, Steinmetz JC, Andreeff M: Changes of cellular

- markers during differentiation of HL-60 promyelocytes to macrophages as induced by T lymphocyte conditioned medium. *Leuk Res.* 1981; 5: 477-489.
- 12) Koren HS, Anderson SJ, Larrick JW: In vitro activation of a human macrophage-like cell line. *Nature.* 1979; 279: 328-331.
 - 13) Hayashi O, Ono S, Ishii K, et al.: Enhancement of proliferation and differentiation in bone marrow hematopoietic cells by *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* in mice. *J Appl phycol.* 2006; 18: 47-56.
 - 14) Hayashi O, Katoh T, Okuwaki Y: Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1994; 40: 431-441.
 - 15) Hayashi O, Hirahashi T, Katoh T, et al.: Class specific influence of dietary *Spirulina platensis* on antibody production in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1998; 44: 841-851.
 - 16) Sundstrom C, Nilsson K: Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 1976; 17: 565-577.
 - 17) Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, et al.: Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980; 26: 171-176.
 - 18) Gallagher R, Collins S, Trujillo J, et al.: Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1979; 54: 713-733.
 - 19) Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature.* 1977; 270: 347-349.
 - 20) MacColl R: Allophycocyanin and energy transfer. *Biochimica et biophysica acta.* 2004; 1657: 73-81.
 - 21) Sidler WA: Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures. Netherlands: Kluwer Academic publishers, 1994: 139-216.
 - 22) 新保敏和, 鈴木徹臣, 関口恭子, 石黒精: CD 分類ハンドブック 改訂第 版

- (2000). 東京: 癌と化学療法社, 2003.
- 23) 朝長万左男: NBT 還元能試験. *臨床病理*. 1978; 特集 34 号: 112-124.
- 24) Yamamoto-Yamaguchi Y, Tomida M, Hozumi M, et al.: Combined effects of differentiation-inducing factor and other cytokines on induction of differentiation of mouse myeloid leukemic cells. *Jpn J Cancer Res*. 1989; 80: 115-121.
- 25) Yufeng Liu LX, Ni Cheng, Lijun Lin, Chengwu Zhang: Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *J Appl phycol*. 2000; 12: 125-130.
- 26) Niu ZY, Pan L, Liu YJ, Zhang XJ, Suo XH: Effects of integrin beta1 on phycocyanin inhibiting proliferation of K562 cells. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology*. 2006; 14: 658-661.
- 27) Basha OM, Hafez RA, El-Ayouty YM, et al.: C-Phycocyanin inhibits cell proliferation and may induce apoptosis in human HepG2 cells. *The Egyptian journal of immunology / Egyptian Association of Immunologists*. 2008; 15: 161-167.
- 28) Li B, Chu X, Gao M, Li W: Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2010; 42: 80-89.
- 29) Subhashini J, Mahipal SV, Reddy MC, et al.: Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochemical pharmacology*. 2004; 68: 453-462.
- 30) Chamorro-Cevallos G. Toxicological research on the alga *Spirulina*. *United Nations International Development Organization (UNIDO)*; 1980. Report No.: UF/MEX/78/048, Vienna
- 31) Nakaya N, Goto Y, Yasuhiko H: Cholesterol lowering effect of spirulina. *Nutrition Reports International*. 1988; 37: 1329-1337.
- 32) Nemoto-Kawamura C, Hirahashi T, Nagai T, et al.: Phycocyanin enhances secretory IgA antibody response and suppresses allergic IgE antibody

- response in mice immunized with antigen-entrapped biodegradable microparticles. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2004; 50: 129-136.
- 33) Fontana JA, Colbert DA, Deisseroth AB: Identification of a population of bipotent stem cells in the HL60 human promyelocytic leukemia cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78: 3863-3866.
- 34) Tamagawa K, Fukushima S, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T: Proanthocyanidins from barley bran potentiate retinoic acid-induced granulocytic and sodium butyrate-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998; 62: 1483-1487.
- 35) 西村敏治: 血液細胞アトラス - 細胞分類の基礎と特殊染色 - : 日本臨床衛生検査技師会, 1987: 24-25.
- 36) Tudhope SJ, Finney-Hayward TK, Nicholson AG, et al.: Different mitogen-activated protein kinase-dependent cytokine responses in cells of the monocyte lineage. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324: 306-312.
- 37) Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197-216.
- 38) Beutler B: Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12: 20-26.
- 39) Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS: LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008; 42: 145-151.
- 40) da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, RJ. U: Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*. 2001; 276: 21129-21135.
- 41) Chheng SC, Cheng SN, Tarn A, Chou TC: Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Life sciences*. 2007; 81: 1431-1435.
- 42) Shih CM, Cheng SN, Wong CS, Kuo YL, Chou TC: Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin. *Anesthesia and analgesia*. 2009; 108: 1303-1310.

- 43) Romay C, Gonzalez R, Ledon N, Ramirez D, Rimbau V: C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current protein & peptide science*. 2003; 4: 207-216.
- 44) Ge B, Qin S, Han L, Lin F, Ren Y: Antioxidant properties of recombinant allophycoerythrin expressed in *Escherichia coli*. *Journal of photochemistry and photobiology*. 2006; 84: 175-180.
- 45) Grolleau A, Sonenberg N, Wietzerbin J, Beretta L: Differential regulation of 4E-BP1 and 4E-BP2, two repressors of translation initiation, during human myeloid cell differentiation. *J Immunol*. 1999; 162: 3491-3497.
- 46) Mita Y, Dobashi K, Nakazawa T, Mori M: Induction of Toll-like receptor 4 in granulocytic and monocytic cells differentiated from HL-60 cells. *Br J Haematol*. 2001; 112: 1041-1047.
- 47) Niemeyer CM, Sieff CA, Mathey-Prevot B, et al.: Expression of human interleukin-3 (multi-CSF) is restricted to human lymphocytes and T-cell tumor lines. *Blood*. 1989; 73: 945-951.
- 48) Lotem J, Sachs L: In vivo control of differentiation of myeloid leukemic cells by cyclosporine A and recombinant interleukin-1 alpha. *Blood*. 1988; 72: 1595-1601.
- 49) Ihle JN: Interleukin-3 and hematopoiesis. *Chem Immunol*. 1992; 51: 65-106.
- 50) Chen YY, Chang HM: Antiproliferative and differentiating effects of polysaccharide fraction from fu-ling (*Poria cocos*) on human leukemic U937 and HL-60 cells. *Food Chem Toxicol*. 2004; 42: 759-769.
- 51) Ketley NJ, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC: Modulation of idarubicin-induced apoptosis in human acute myeloid leukemia blasts by all-trans retinoic acid, 1,25(OH)₂ vitamin D₃, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1997; 90: 4578-4587.
- 52) Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, Wang SY: Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life sciences*. 1997; 60: 2349-2359.

- 53) Anderson P, Sundstedt A, Li L, et al.: Differential activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and STAT5 and induction of suppressors of cytokine signalling in T(h)1 and T(h)2 cells. *International immunology*. 2003; 15: 1309-1317.
- 54) Shi M, Lin TH, Appell KC, Berg LJ: Janus-kinase-3-dependent signals induce chromatin remodeling at the Ifng locus during T helper 1 cell differentiation. *Immunity*. 2008; 28: 763-773.
- 55) Christmas SE, Meager A: Production of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha by human T-cell clones expressing different forms of the gamma delta receptor. *Immunology*. 1990; 71: 486-492.
- 56) Mao TK, Van de Water J, Gershwin ME: Effects of a Spirulina-based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. *Journal of Medicinal Food*. 2005; 8: 27-30.