

12

ヒト正常細胞を用いた染色体異常試験法の確立に向けた

ヒト正常骨髄細胞の最適培養条件の決定

京都大学工学研究科都市環境工学専攻 佐々木克典 中山亜紀 米田稔 森澤眞輔

Optimization of culture condition for human bone marrow cells aimed at establishing a chromosome aberration test using human normal cells

Department of Environmental Engineering, Kyoto Univ. Katsunori SASAKI, Aki NAKAYAMA, Minoru YONEDA,

Shinsuke MORISAWA

1. 序論

人間社会には数多くの化学物質が利用されており、それら化学物質の使用にあたっては、その安全性を正當に評価して適切に管理することが必要不可欠である。現在の化学物質の毒性の詳細な評価は、主に実験動物を用いて長期的に被検物質を反復投与した結果から得られる情報に基づいて行われている¹⁾が、変異原性の有無等を簡便に評価するスクリーニング試験としては Ames 試験や染色体異常試験、コメットアッセイ等の *in vitro* 試験系が広く用いられている。また、近年の化学物質の多種多様化、国際世論の動物実験に対する批難傾向、企業単位での自社製品の安全性評価に対する社会的要請の高まりに伴う簡便な評価法への需要の増大等の背景を受けて、*in vitro* 試験系が化学物質の安全性評価に果たす役割が一層広がることが予想される。ここで、従来の *in vitro* 試験系は、そのほとんどが簡便のために動物細胞あるいは株化細胞等の不死化細胞を用いたものである。しかしながら、実際に問題とされる対象物質の毒性は、ヒトの標的臓器において正常な細胞が悪影響を受けることによって発現する。従って、*in vitro* 試験にヒト正常細胞を用いることで実験条件が実際の発症機構を再現したものに近付き、より信頼性の高い結果を得られることが期待できる。そこで本研究では、代表的な *in vitro* 毒性試験として染色体異常試験を選び、染色体異常試験にヒト正常細胞を用いる手法の確立を目指す。

染色体異常については発がんをはじめとする様々な疾患との関連が報告されており、特に白血病の発症と密接な関連があるとされている。Ph¹染色体（フィラデルフィア染色体）はヒト9番染色体の長腕部と22番染色体の長腕部との間に起きた相互転座によって発生した異常染色体であり、95%以上の慢性骨髄性白血病患者に認められ²⁾、また、急性骨髄性白血病や骨髄腫などにも低頻度ながら検出されている³⁾。他にも、急性骨髄性白血病における15番染色体と17番染色体との相互転座⁴⁾、急性前骨髄球性白血病に置ける8番染色体と15番染色体との相互転座⁵⁾等、病型に特異的な染色体異常が明らかにされている。そこで本研究では、染色体異常と白血病との関連に注目し、その標的臓器である骨髄に由来するヒト正常細胞を用いた染色体異常試験法の確立を目標とした。

また、染色体は細胞周期間期（S期）を経て有糸分裂（M期）中期に達することで凝集し、光学顕微鏡下で染色体標本として観察可能な形態を取るため、染色体異常試験を行うには対象細胞が良好な増殖傾向を示すことが非常に重要である。更には、発症機構の再現を目的として正常細胞を用いるため、培養後の細胞がヒト骨髄の機能を正常に再現可能な状態にあることを確認することが必要不可欠である。ここで確認すべきヒト骨髄の代表的機能として、myeloperoxidase (MPO) の代謝活性と造血機能とを挙げる。MPOは骨髄中の造血細胞に豊富に発現している分子量約150kDa⁶⁾の代謝酵素であり^{7, 8), 9, 10, 11)}、ベンゼン代謝物の代謝に関わるなど血液毒性との密接な関連が報告されており¹²⁾、骨髄における化学物質に対する応答の中核を成すと考えられる。本研究では培養後の細胞のMPO含有量を、H₂O₂によるベンジジンの酸化における酵素反応を用いて測定した¹³⁾。また、骨髄中には造血系幹細胞が豊富に含まれており、造血作用は骨髄の代表的機能である。幹細胞は培養の進行に従って細胞分化を起こすため、骨髄の造血機能再現には、培養後の細胞におい

でも十分な割合で造血幹細胞が含まれていることを確認する必要がある。従って本研究では、培養後の細胞の造血機能の確認として、フローサイトメトリーによる細胞分化解析を行うことで培養後の細胞の造血幹細胞 CD34⁺の含有率を測定した。フローサイトメトリーは、フローセル中に細胞を1個ずつ流してレーザー光を照射し、その散乱光や蛍光の強度から各細胞のサイズや構造に関する情報を得て細胞を分類・解析する手法である¹⁴⁾。本研究においては、細胞試料を CD34 antibody 及び 7-AAD (7-Aminoactinomycin) を用いて蛍光標識することで死細胞を除去して CD34⁺細胞を検出し、細胞分化解析試験を行った。

以上の背景から、本研究においては、ヒト正常細胞を用いた染色体異常試験法の確立を目指し、ヒト正常骨髄細胞を複数の培養条件に従って培養し、その細胞増殖率から良好な培養条件を選択し、実際に染色体標本を作製すると共に、MPO 測定試験及びフローサイトメトリーを用いた細胞分化解析試験に基づいて培養状態を確認して最適な培養条件を決定した。

2. 方法

2.1 試薬及び細胞

ヒト正常骨髄細胞としては、Bone Marrow Mononuclear Cells (CAMBERX, NJ) 及び Bone Marrow CD34⁺ Cells (Lonza, Switzerland) を用いた。また、細胞培養用試薬としては、無血清培地 STEMPRO™-34 及び L-Glutamine は Invitrogen (CA) 社の、無血清培地 StemSpan® SFEM (Serum-Free Expansion Medium) 及びサイトカインカクテル StemSpan® CC100 は StemCell® Technologies (Canada) 社の、汎用培地 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) は Lonza (Switzerland) 社の、血清 FBS (Fatal Bovine Serum) は MP Biomedicals (OH) 社の、サイトカイン SCF、GM-CSF、G-CSF、IL-3 及び IL-6 は PEPROTECH (NJ) 社の製品を購入して用いた。その他の試薬は特に記載の無い限りは (株) 和光純薬製の生化学用または試薬特級を用いた。

2.2 細胞培養試験

検討した培養条件は、使用する培地、血清やサイトカイン等の増殖因子及び初期細胞密度を変えた4条件であり、その詳細を表1に示す。表1に示した条件の内、条件1は Delay らの研究¹⁵⁾でヒト骨髄由来 CD34⁺細胞の培養に用いられた培養条件と同等の条件であり、条件2は Bone Marrow Mononuclear Cells に対して CAMBEX 社が推奨する培養条件に基づいている。また、条件3は Bone Marrow CD34⁺ Cells の無血清培養に関して Lonza 社が推奨する培養条件であり、無血清培地 StemSpan® SFEM はヒト臍帯血由来 CD34⁺細胞を対象とした Lim らの研究¹⁶⁾においても用いられている。条件4は Bone Marrow CD34⁺ Cells の有血清培養に関して Lonza 社が推奨する培養条件となっており、汎用培地 IMDM 及び FBS は ARAKI らの研究¹⁷⁾でも骨髄由来 CD34⁺細胞の培養に用いられている。

表1 本研究で用いた培養条件の詳細

培養条件	条件1	条件2	条件3	条件4
使用細胞	Bone Marrow Mononuclear Cells		Bone Marrow CD34 ⁺ Cells	
使用培地	STEMPRO-34		IMDM	StemSpan® SFEM
初期細胞密度	5.0×10 ⁵ cells/mL	5.0×10 ⁴ cells/mL	5.0×10 ⁴ cells/mL	1.7×10 ⁴ cells/mL
増殖因子	2mM L-Glutamine	2mM L-Glutamine	15% FBS	1% StemSpan® CC100
	100ng/mL SCF	25ng/mL SCF		
	25ng/mL GM-CSF	10ng/mL GM-CSF		
	50ng/mL IL-3	10ng/mL IL-3		
	10ng/mL IL-6	10ng/mL IL-6		
		1ng/mL G-CSF		

解凍した細胞をそれぞれの条件に従って 37℃、CO₂ 濃度 5%、湿度 100% の条件下のインキュベータ内で 6 日間培養し、それぞれの培養条件での細胞数の経日変化を血球計数板を用いて測定して増殖の程度を比較し

た。なお、以降の各試験には、本試験によって決定した適当な培養条件に従って6日間培養した細胞を回収して用いた。

2.3 染色体標本作製試験

回収した細胞を100mmディッシュに10mLの培養液と共に 5.0×10^5 cellsの細胞を播種し、更に48時間の培養を行った。培養終了の2時間前に、滅菌水で100倍に希釈したMAS (Metaphase Arresting Solution; Genial Genetic Solutions, UK) を200 μ L添加した。培養終了後ただちに細胞を回収し、5mLの0.075M塩化カリウム溶液中で37 $^{\circ}$ C、20分間のインキュベートを行うことで低張処理とした。続いて5mLの固定液(メタノール: 酢酸 = 3:1)を加えて穏やかに混合、細胞を半固定した。この細胞浮遊液を200 $\times$ gで15分間遠心沈降して新しい固定液5mLと交換する操作を3回繰り返して細胞を完全に固定した。固定後の細胞を1mL程度の固定液に再懸濁してスライドガラス上に滴下し、40 $^{\circ}$ Cに設定したパラフィン伸展器PSP-400(井内盛栄堂)上で乾燥させた。作製した標本をpH6.8 PBS (Phosphate Buffer Solution) で25倍に希釈したギムザ液(Merck, Germany)で30分間染色し、光学顕微鏡Axiovert 25(Carl Zeiss, Germany)を用いて観察した。

2.4 MPO 測定試験

回収した細胞を100mmディッシュに細胞密度 5.0×10^4 cells/mLにて播種して24時間の前培養を行った後、細胞を回収し、PBSを用いて2度の洗浄を行った。洗浄後の細胞から 2.5×10^6 cellsまたは 5.0×10^6 cellsを取り、MPO lysis solution (600mM PBS 500 μ L、30% TritonX (MP Biomedicals, OH) 60 μ L、滅菌水 5.44mLを混合して事前調製) 1mL中に懸濁した。この細胞浮遊液に対して液体窒素と37 $^{\circ}$ Cに設定したウォーターバスとによる凍結融解サイクルを3度繰り返すことで細胞を完全に溶解した。細胞浮遊液を4 $^{\circ}$ C、12000rpmにて15分間遠心沈降し、上清を除去した。残った細胞塊にTMB reacting solution (500mM PBS 100 μ L、N,N-ジメチルホルムアミドを用いて20mMに調整したTMBZ(同仁化学) 80 μ L、滅菌水 820 μ Lを混合して事前調製)を90 μ L添加し、37 $^{\circ}$ Cにて5分間インキュベートした。その後10mM H₂O₂を10 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cにて4分間インキュベートすることで青色への呈色反応を行った。4分後100 μ Lの5M H₃PO₄を添加して溶液のpHを変化させることで呈色反応を停止させた。本操作により検出感度が向上することが知られており¹⁸⁾、溶液の吸収極大波長が650nmから450nmへと変化して溶液は鮮やかな黄色を呈する。

TMB反応終了後の溶液を37 $^{\circ}$ C、12000rpmにて2分間遠心沈降し、上清の波長450nmにおける吸光度($O.D._{450}$)を測定した。なお、上述のプロトコールにおいて10mM H₂O₂に代えて滅菌水を用いることでブランク試料を作製し、式(1)に従って細胞試料の正味吸光度を計算した。また、細胞試料とは別に、購入したMPO酵素(ELASTIN Products, MO)を用いて同様の操作を行うことで検量線を作成し、その検量線に基づいて細胞試料中のMPO含有量を決定した。

$$\Delta O.D._{450} = (O.D._{450})_{sample} - (O.D._{450})_{blank} \quad (1)$$

2.5 フローサイトメトリーを用いた細胞分化解析

回収した細胞をwash solution (2%のFBS (MP Biomedicals, OH)を添加したPBS)で洗浄した。洗浄後の細胞から 4.0×10^6 cellsを取り、wash solution 400 μ L中に懸濁した。この細胞浮遊液を100 μ Lずつ4本の試験管に等分し、それぞれ試験管I、II、III、IVとした。試験管Iには20 μ LのPE mouse IgG1 isotype control (Becton, Dickinson and Company, NJ)を、試験管II及びIVにはそれぞれ20 μ Lのanti human CD34-PE antibody (Becton, Dickinson and Company, NJ)を添加し、4本の試験管を室温、暗所にて30分間静置した。各溶液をwash solutionで2度洗浄した後、室温、1500rpmにて5分間遠心沈降し、上清を除去した。その後、試験管III及びIV中の細胞塊にはそれぞれ20 μ Lの7-AAD (Becton, Dickinson and Company, NJ)を加えて室温にて10分間静置した。4本の試験管それぞれに500 μ Lのwash solutionを添加し、FACS CaliburTM (Becton, Dickinson and Company, NJ)を用いて解析を行った。

ここで、CD34⁺細胞は染色操作時にCD34 antibodyを取り込むが、死細胞もまた抗体を取り込んでしまうた

め、CD34 antibody のみによっては死細胞を分別除去して CD34⁺細胞を検出することはできない。そこで本試験においては、膜の形状が保てなくなった細胞に浸透しやすい核染色剤である 7-AAD を組み合わせて用いており、これにより生存 CD34⁺細胞のみを検出可能である¹⁹⁾。なお、本試験では解析に際して 1 試料あたり 4 本の試験管を用いたが、この内 CD34 antibody と 7-AAD の両方を添加した試験管 IV を細胞分化解析に用い、PE mouse IgG1 isotype control を添加した試験管 I は機器の初期設定に、CD34 antibody のみを添加した試験管 II は CD34 の検出感度補正に、7-AAD のみを添加した試験管 III は 7-AAD の検出感度補正に用いた。

3. 結果

3.1 細胞培養試験

細胞培養試験の結果得られたそれぞれの培養条件における増殖曲線を図 1 に示す。なお、縦軸には増殖率として、測定細胞数の、初期細胞数に対する比を取った。

条件 4 では培養 3 日目時点から増殖傾向が見られ、培養 6 日目で約 15.9 倍と十分な増殖が観察された。しかしながら、他の培養条件については、条件 2 で培養 4 日目に約 1.47 倍の増殖率を示したものの正常な培養状態とは考えられず、条件 1 及び条件 3 に至っては全く増殖傾向が見られなかった。

そこで次節の染色体標本作製試験には、初期細胞数からの増殖が見られた条件 2 及び条件 4 に従って培養した細胞試料のみを用いることとした。

3.2 染色体標本作製試験

染色体標本作製試験では、作製した染色体標本の品質を判断する指標として、展開した染色体が確認できる中期分裂細胞数を計数し、観察した総細胞数に対する比を取ることで細胞 100 個あたりの染色体展開中期分裂細胞数を算出し、Mitotic Index (MI) とした。培養

条件 1 及び 3 に対して得られた MI の値を表 2 に示す。条件 3 については十分な頻度で良好に展開した Metaphases が得られたが、条件 1 については MI が 0.20 と非常に小さく、また検出された Metaphases に関しても展開が不十分であり、染色体異常試験を行うに足る品質の染色体標本が得られたと言ひ難い。従ってヒト正常骨髓細胞に対する最適培養条件の候補として培養条件 3 を選択し、以降の MPO 測定試験及び細胞分化解析には条件 3 に従って培養した細胞試料のみを用いて培養状態の確認を行った。

3.3 MPO 測定試験

MPO 測定試験で作成した検量線を図 2 に、その 1 次回帰式を式 (2) に示す。

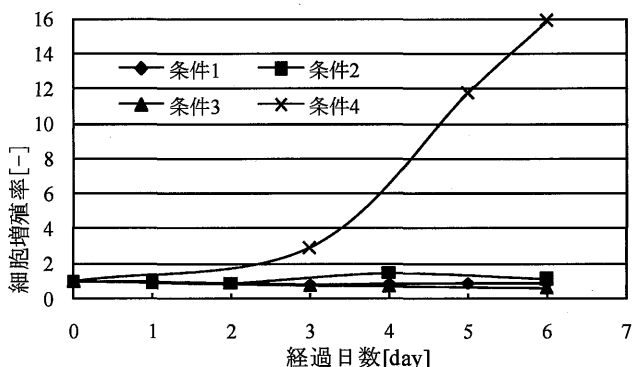


図 1 細胞培養試験結果

表 2 染色体標本作製試験結果

培養条件	細胞数	標本数	MI
条件1	6000	12	0.20
条件3	13617	300	2.20

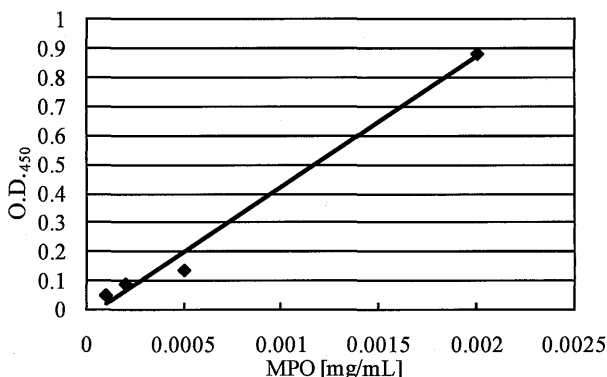


図 2 作成した MPO 検量線

$$y = 448.68x - 0.0246 (R^2 = 0.988)$$

(2)

ただし、

x : 試料懸濁液中の MPO 濃度[mg/mL]

y : 正味吸光度 $\Delta O.D_{.450}$ [-]

である。

この検量線及び測定した $\Delta O.D_{.450}$ に基づいて細胞中 MPO 含有量を決定した。なお、本試験においては細胞数 2.5×10^6 cells にて 2 試料、細胞数 5.0×10^6 cells にて 3 試料の合計 5 試料分の測定を行った。結果を表 3 に示す。5 回の測定を平均すると、条件 3 に従って培養した細胞中の MPO 濃度は $919.9 \text{ pmol}/10^6 \text{ cells}$ となった。

3.4 フローサイトメトリーを用いた細胞分化解析

フローサイトメトリーにおいては、デブリや凝集細胞等の解析に不必要な粒子の情報を除去する必要がある、その操作をゲーティングと呼ぶ。そこで本試験では、前方散乱光 (Forward Scatter (FSC)) 強度及び側方散乱光 (Side Scatter (SSC)) 強度に基づいてゲーティングを行った。FSC は測定粒子の大きさに、SSC は測定粒子の内部構造に関連した情報を提供する¹⁴⁾。ゲーティングの結果を図 3 に示す。図 3 中に多角形で示した領域内の細胞集団を本試験での解析対象とし、他の粒子の情報は除去した。

ゲーティング後の細胞集団を対象として、CD34 による蛍光強度及び 7-AAD による蛍光強度に基づいて細胞分化解析を行った。解析結果を図 4 に示す。図 4 では横軸に CD34 蛍光強度を、縦軸に 7-AAD 蛍光強度を取り、それぞれの検出感度補正結果に基づいて対象細胞集団を 4 領域に分類し、各領域に属する細胞数の百分率を数値で示した。図 4 中の右上領域は CD34 陽性かつ 7-AAD 陽性、すなわち CD34⁺死細胞を示す領域である。同様に右下領域は CD34⁺生細胞を、左上領域は CD34⁻死細胞を、左下領域は CD34⁻生細胞を、それぞれ示す領域である。細胞分化解析の結果、条件 3 に基づいて培養した細胞試料中に占める CD34⁺細胞の割合は 14.16%であった。

4. 考察と結論

本研究ではヒト正常細胞を用いた染色体異常試験法の確立を目指し、表 1 に示した 4 条件のそれぞれに従ってヒト正常骨髄細胞を培養し、その細胞増殖率から良好な培養条件を選択し、染色体標本作製試験、MPO 測定試験及び細胞分化解析に基づいて培養状態を確認し、最適な培養条件を決定した。

培養条件 1 及び条件 3 については細胞培養試験において全く増殖が見られなかった。条件 2 に関しては培養 4 日目に約 1.47 倍とわずかな増殖傾向を示したものの、続く染色体標本作製試験において染色体異常試験に足る品質の染色体標本が得られなかった。すなわち以上の 3 条件に関しては、細胞分裂が正常に進行せずに細胞周期 S 期ではなく静止期 (G_0 期) へと移行して停滞し、染色体を形成する M 期中期に達していないことが考えられ、実際に条件 3 に従って 6 日間培養した後の細胞を用いてフローサイトメトリーによる細胞周期解析を行ったところ、その 99%以上が G_0 期にあることが確認された (data not shown)。従って染色体異

表 3 MPO 含有量測定結果

細胞数 [$\times 10^6$ cells]	O.D. _{.450} [-]	MPO [pmol/ 10^6 cells]
2.5	0.405	510.7
2.5	1.363	1649.4
5	1.221	740.3
5	1.394	843.1
5	1.416	856.2

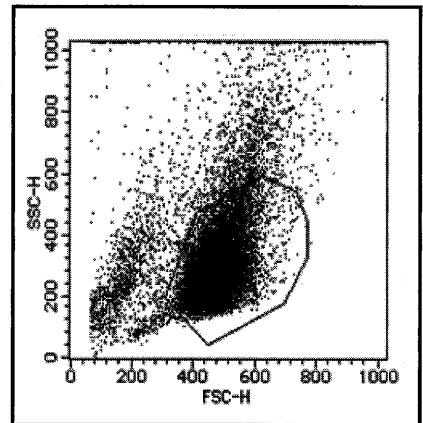


図 3 ゲーティング結果

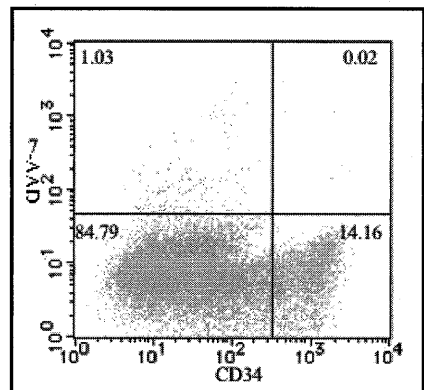


図 4 細胞分化解析結果

常試験に向けた培養条件としては不適切であると言える。

一方、培養条件4では細胞培養試験において培養3日目時点から増殖傾向が見られ、培養6日目で約15.9倍と十分な増殖が観察され、対数増殖期を有する理想的な培養状態であると考えられる。続く染色体標本試験においても十分な頻度で良好に展開した *Metaphases* が得られ、正常な細胞周期を経る細胞分裂が適切に進行していることが予想された。そこで条件4を最適培養条件の候補として選択し、MPO 測定試験及び細胞分化解析による培養状態の確認を行った。

MPO 測定試験の結果、条件3に従って6日間培養した後の細胞中のMPO濃度の平均値は $919.9\text{pmol}/10^6\text{cells}$ となった。この結果はヒト骨髓性白血病株化細胞 HL-60 中のMPO濃度の報告値 $310.3\text{pmol}/10^6\text{cells}$ ²⁰⁾よりも大きい値であった。MPOは骨髓系の造血細胞に発現している代謝酵素で^{7), 8), 9), 10), 11)}、特に好中球に豊富に含まれることが知られており、顆粒球の分化過程の前骨髓球の時期に活発に産生される^{21), 22)}。HL-60細胞は顆粒球への分化過程にある前骨髓球であり、MPOを産生していることが明確にされている培養細胞である^{21), 23)}。従って、本試験において6日間の培養後の細胞においてもMPOがHL-60細胞を上回る濃度で測定されたことは、骨髓細胞として毒性試験に用いるに足る代謝活性を有していることを裏付けていると考えられ、代謝活性の観点から適切な培養状態であることが確認されたと言える。

細胞分化解析の結果、条件3に従って6日間培養した後の細胞中に占めるCD34⁺細胞の割合は14.16%であった。ここで、ヒト骨髓中にCD34⁺細胞が占める割合としては約1%であるとの報告²⁴⁾があり、本研究における測定値はこの報告値を大きく上回っている。従って、培養後の細胞はヒト骨髓の正常な造血機能を再現するに足る分化段階にあると考えられ、細胞分化進行度の観点からも適切な培養状態であることが確認されたと言える。

本研究の成果として、ヒト正常骨髓細胞に対する最適培養条件として表1に示した条件4(増殖因子として1%量のStemSpan® CC100を添加した無血清培地StemSpan® SFEM中における初期細胞密度 $10^4\text{cells}/\text{mL}$ オーダーでの培養)を見出した。本培養条件に従って6日間培養した後の細胞を用いて、実際に良好な品質な染色体標本が作製できることを確認した。また、培養後の細胞の代謝活性及び細胞分化進行度を測定し、両者の観点からもヒト骨髓の機能を正常に再現可能な培養状態にあることが確認できた。従って、本条件に基づいて培養を行うことで、ヒト正常骨髓細胞による染色体異常試験が問題なく実行できると考えられ、白血病に代表される化学物質の血液毒性を簡便かつ正確に評価するツールが開発できたと言える。本研究は、*in vitro* 試験系による毒性評価が重視される昨今にあって、実際の発症機構を再現してより正確な評価が実現できると予想される、正常細胞による*in vitro* 毒性試験の普及の一助となる点で意義深い。

謝辞

本研究を進めるにあたって、医薬基盤研究所の平山知子先生には染色体標本作製に関して貴重なご助言をいただき、また、弘前大学医学部宮越研究室の皆さまにはFACs装置を提供していただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課生活安全対策室(監修), 国立医薬品食品衛生研究所(編集)(1997): 化学物質のリスクアセスメント-現状と問題点-, 薬業時報社。
- 2) 佐藤裕子(1993): 血液学ハイライト, 中外医学社。
- 3) Propp S. and Lizzi F.A.(1970): *Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia*, *Blood*, Vol.36, No.3, p.353-360.
- 4) Sakurai M.(1970): *Chromosome studies in hematological disorders. II. Chromosome findings in acute leukemia*, 日本血液学会雑誌, Vol.33, No.1, p.116-126.
- 5) 平井久丸(1994): 白血病の分子医学, 羊土社。
- 6) Nauseef W.M., Olsson I. and Arnljots K.(1988): *Biosynthesis and processing of myeloperoxidase—a marker for myeloid cell*

differentiation, *European Journal of Haematology*, Vol.40, No.2, p.97-110.

7) Taguchi J., Miyazaki Y., Tsutsumi C., Sawayama Y., Ando K., Tsushima H., Fukushima T., Hata T., Yoshida S., Kuriyama K., Honda S., Jinnai I., Mano H. and Tomonaga M.(2006): Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia, *Leukemia Research*, Vol.30, No.9, p.1105-1112.

8) Babior B.M.(1978): Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts), *The New England Journal of Medicine*, Vol.298, No.12, p.659-668.

9) Babior B.M.(1978): Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts), *The New England Journal of Medicine*, Vol.298, No.13, p.721-725.

10) Koeffler H.P., Ranyard J. and Pertcheck, M.(1985): Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation, *Blood*, Vol.65, No.2, p.484-491.

11) Winterbourn C.C., Vissers M.C. and Kettle A.J.(2000): Myeloperoxidase, *Current Opinion in Hematology*, Vol.7, No.1, p.53-58.

12) Sadler A., Subrahmanyam W. and Ross D.(1988): Oxidation of catechol by horseradish peroxidase and human leukocyte peroxidase: reactions of o-benzoquinone and o-benzosemiquinone, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol.93, No.1, p.62-71.

13) Maelhy, A.C. and Chance B.(1954): in *Methods of Biochemical Analysis* (Glick D., ed.), Interscience.

14) ベックマン・コールター (2010) : サイトメトリードットコム, <http://www.bc-cytometry.com/> (Accessed May 23rd, 2010).

15) Daley J.P., Dadey B.M., Wysocki M.G., Caligiuri M.A. and Biddle W.C.(1996): Ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells in serum-free STEMPRO™-34 medium, *Focus*, Vol.18, No.3, p.62-67.

16) Lim C.K., Sun L., Feng Q., Law P., Chua W.T., Lim S.N. and Hwang W.Y.(2008): Effect of anti-CD52 antibody alemtuzumab on ex-vivo culture of umbilical cord blood stem cells, *Journal of Hematology & Oncology*, Vol.1, No.19.

17) Araki H., Chute J.P., Petro B., Halliday L., Hoffman R. and Mahmud N.(2010): Bone marrow CD34+ cells expanded on human brain endothelial cells reconstitute lethally irradiated baboons in a variable manner, *Leukemia & Lymphoma*, Early Online.

18) Schattenberg D.G., Stillman W.S., Gruntmeir J.J., Helm K.M., Irons R.D. and Ross D.(1994): Peroxidase activity in murine and human hematopoietic progenitor cells: potential relevance to benzene-induced toxicity, *Molecular Pharmacology*, Vol.46, No.2, p.346-351.

19) 塩谷美夏, 長村登紀子, 須郷美智子, 崔硯, 高橋敦子, 平井雅子, 高橋恒夫 (2004) : 凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法-ProCOUNT 法と 7-AAD 法による比較検討, *Japanese Journal of Transfusion Medicine*, Vol.50, No.4, p.605-612.

20) Noguchi Y.(2001): Evaluation of oxidative DNA damage induced by benzene metabolite hydroquinone, 京都大学大学院工学研究科修士論文.

21) Yamada M., Mori M. and Sugimura T.(1981): Purification and characterization of small molecular weight myeloperoxidase from human promyelocytic leukemia HL-60 cells, *Biochemistry*, Vol.20, No.4, p.766-771.

22) Bainton D.F., Ulyot J.L. and Farquhar M.G.(1971): The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow, *The Journal of Experimental Medicine*, Vol.134, No.4, p.907-934.

23) 山田道之, 橋中一也 (1991) : 骨髓性白血病細胞 HL-60 の細胞分化と遺伝子発現の調節, 蛋白質 核酸 酵素, Vol.36, No.1, p.41-53.

24) 三浦恭定 (1983) : 血液幹細胞, 中外医学社.

キーワード : ヒト正常骨髓細胞、細胞培養、染色体異常試験

Key Words : human bone marrow cells, cell culture, chromosome aberration test