

白血球増多症を伴った非血液非リンパ系悪性腫瘍症例における顆粒球コロニー刺激因子と顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子の関与についての臨床病理学的検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9496

白血球増多症を伴った非血液非リンパ系悪性腫瘍症例における 顆粒球コロニー刺激因子と顆粒球・マクロファージコロニー 刺激因子の関与についての臨床病理学的検討

金沢大学医学部医学科病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

小 島 一 人

白血球増多症を伴った非血液非リンパ系悪性腫瘍における顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) と顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) の関与について臨床病理学的検討を行った。過去20年間に剖検された1778症例のうち、経過中に $10,000/\text{mm}^3$ 以上の白血球増多症を呈した非血液非リンパ系悪性腫瘍439症例485病変 (多重癌症例を含むが、治療による腫瘍消失症例は除く) を対象としてG-CSFおよびGM-CSFに対する免疫組織化学を行ったところ、G-CSFおよびGM-CSF陽性症例が、それぞれ、3症例 (0.7%) と2症例 (0.5%) 認められた。陽性例につきG-CSFとGM-CSFに対する特異的プライマーを用いて逆転写PCR法を行ったところ、ホルマリン固定パラフィンブロック包埋組織ではmRNAを検出することはできなかったが、未固定凍結腫瘍組織が保存されていたGM-CSF免疫組織化学陽性1症例でGM-CSFのmRNAを確認できた。G-CSF陽性例は肺巨細胞型大細胞癌、上行結腸腺癌および胃腺癌で、GM-CSF陽性例は、肺紡錘形細胞癌と悪性胸腺腫であった。胃癌症例では、中分化型管状腺癌の形態をとる原発巣はG-CSF陰性であったが、低分化腺癌の形態を示した肺転移巣がG-CSF陽性であった。これらの結果から、腫瘍が未分化になるにつれCSFが産生されやすくなる可能性が示唆された。陽性例5例中4例の生存期間は6ヵ月以下で、予後は不良であった。CSF陽性5症例の血中白血球数最高値は $29,400 \sim 103,500/\text{mm}^3$ (平均 $59,700/\text{mm}^3$) で、非常に高かった。化学療法の影響を強く受けたと考えられる1症例を除く4症例において骨髄は過形成を示し、顆粒球系細胞が有意に増加していた。したがって、腫瘍細胞で発現されたG-CSFとGM-CSFは生理的活性を有し、ともに主として顆粒球系細胞の増殖を刺激したと考えられる。一方、CSF陽性症例の血中白血球数最高値の平均値以上で、しかも非腫瘍性病変剖検例では観察されないほどの著しい白血球増多 ($60,000/\text{mm}^3$ 以上) を示したにもかかわらず、G-CSF, GM-CSFともに陰性であった症例が3例 (0.7%) あった。このような症例における白血球増多の発生には、他の白血球増殖刺激因子が関与していると思われる。

Key words malignant tumor, non-lymphohematopoietic, leukocytosis, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte-macrophage colony stimulating factor

悪性腫瘍に随伴する症候の一つとして、白血球増多症があり、時に白血病との鑑別を要するほど白血球が著しく増加することが古くから知られていた¹⁾。最近、この白血球増多症の原因として腫瘍が産生する種々の白血球増殖刺激因子の関与が示唆されている。具体的には、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor)、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor α)、インターロイキン1 (interleukin 1)、インターロイキン3 (interleukin 3)、インターロイキン6 (interleukin 6) 等があげられており²⁾、これらの因子が骨髄造血細胞を刺激して増殖をうながし、著しい白血球増多症を引き起こすと考えられている。しかし、実際にはどの程度の頻度で腫

瘍がこれらの増殖因子を産生するのには明らかではない。また、これまでのところ腫瘍が産生する白血球増殖刺激因子として報告されているのはG-CSFがほとんどで、GM-CSF産生悪性腫瘍はまれであり、複数のG-CSFやGM-CSF産生悪性腫瘍症例を解析しその臨床病理学的検討を行った報告はほとんどない。そこで、本研究では、過去20年間に当教室で病理解剖された白血球増多症を伴った非血液非リンパ系悪性腫瘍症例を対象としてG-CSFおよびGM-CSFに対する免疫組織化学を行い、これらのコロニー刺激因子 (colony stimulating factor, CSF) 産生悪性腫瘍について臨床病理学的な検討を行った。

対象および方法

I. 対象

1980年から1999年までの20年間に、金沢大学医学部病理学

平成12年10月27日受付, 平成12年12月6日受理

Abbreviations: CSF, colony stimulating factor; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; RT, reverse transcription

第一講座において剖検された1778症例を対象とした。そのうちで、経過中に $10,000/\text{mm}^3$ 以上の白血球増多を呈した非血液非リンパ系悪性腫瘍症例(多重腫瘍症例を含むが、治療による腫瘍消失症例は除く)すべてについて検討を行った。また対照として、非腫瘍性病変剖検例(主病変として腫瘍性病変のない症例)における白血球増多の程度についても検索した。

II. 免疫組織化学

各症例より代表的な原発巣あるいは転移巣組織を2ないし3カ所選択し、ストレプトアビジン・ビオチン法にて、以下のごとくG-CSFとGM-CSFに対する免疫組織化学を行った。すなわち、ホルマリン固定パラフィン包埋標本より組織切片を作製し、シランコーティングスライド(ダコ・ジャパン, 京都)に張り付けた。脱パラフィン後、室温にて0.3%過酸化水素水を加えたメタノール液中に30分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。G-CSF免疫組織染色用標本についてはTarget Unmasking Fluid (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Netherlands) 処理を行い、抗原の賦活化を行った。その後、G-CSF免疫組織化学用標本は正常ウマ血清(フナコシ, 東京)で、GM-CSF免疫組織化学用標本は正常ヤギ血清(ダコ・ジャパン)で室温にて15分間反応させ、二次抗体の非特異的結合を阻止した。一次抗体として、抗ヒトG-CSFマウスモノクローナル抗体(50倍希釈, 生化学工業株式会社, 東京)と抗ヒトGM-CSFウサギポリクローナル抗体(50倍希釈, R&D Systems, Minneapolis, USA)を用い、一晚4℃にて反応させた。0.01 M PBSで洗浄した後、二次抗体としてビオチン化抗マウスIgGウマ抗体(200倍希釈, Vector Laboratories INC, Burlingame, USA), またはビオチン化抗ウサギIgGヤギ抗体(200倍希釈, Vector Laboratories INC)を用い、室温で30分間反応させた。0.01 M PBSで洗浄後、ストレプトアビジン(ダコ・ジャパン)を室温で30分間反応させた。洗浄後、0.006%過酸化水素水を加えた0.03% 3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩(Sigma, Steinheim, Germany)で発色させた。メチルグリンないしマイヤー・ヘマトキシリンにて染色を行った後、脱水し封入した陰性対照として、G-CSFとGM-CSFのかわりに、それぞれ、マウスIgG(ダコ・ジャパン)と正常ウサギ免疫グロブリン分画(ダコ・ジャパン)を用いた。陰性対照に用いた正常血清は、その蛋白濃度がそれぞれに対応する一次抗体の蛋白濃度と同じになるよう希釈した。

III. 逆転写PCR法(reverse transcription-PCR, RT-PCR)

によるG-CSFとGM-CSFのmRNAの検出

1. 全RNAの抽出

1) ホルマリン固定パラフィンブロック包埋組織

免疫組織化学で陽性と判定された症例のホルマリン固定パラフィンブロック包埋標本より, Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion Inc, Austin, USA)を用いて全RNAを抽出した。すなわち、陽性細胞が認められた組織部位を切片標本より切り取り(直径約5 mm大, 厚さ約 $10 \mu\text{m}$ の薄切片標本2ないし3枚), 脱パラフィンした。風乾後, 1サンプルあたりプロテナーゼK消化緩衝液 $100 \mu\text{l}$ とプロテナーゼK (20 mg/ml) $5 \mu\text{l}$ を加え, 45°C で2時間消化した。次いで, $600 \mu\text{l}$ のRNA抽出用緩衝液と $700 \mu\text{l}$ のフェノール/クロロホルム液を加えて攪拌した後, 遠心(室温, $13,000 \times g$, 5分間)して上清を回収した。この上清にアクリルアミド溶液 $1 \mu\text{l}$ を加え, さらに等量のイソプロパノールを加えて攪拌した後, -20°C にて30分間以上冷却した。その後, 遠心(4°C , $13,000 \times g$, 15分間)して沈澱物を回収した。風乾後, 沈澱物に $10 \mu\text{l}$ のRNA溶解液を加え溶解した。このRNAサンプル $10 \mu\text{l}$ にヌクレアーゼを除去した精製水 $7 \mu\text{l}$, 10倍濃度のデオキシリボヌクレアーゼI反応緩衝液 $2 \mu\text{l}$, デオキシリボヌクレアーゼ I(2U/ μl) $1 \mu\text{l}$ を加え, 37°C で15分間反応させた。次いで, フェノール/クロロホルム液にて除タンパクを行い, イソプロパノールを加えて遠心し, 全RNAを抽出した。抽出されたRNAの状態を2%アガロースゲル電気泳動法により調べた。

2) 未固定凍結組織

未固定凍結組織が保存されていた症例では, 酸グアニジニウムチオシアネート・フェノール・クロロホルム法により全RNAを抽出した。氷上においた遠心チューブに, 組織1gと10 mlの変性溶液(4 M グアニジニウムチオシアネート, 25 mM クエン酸, 0.5% N-ラウロイルサルコシン, 0.1 M 2-メルカプトエタノール)を加えホモジナイザー(ヤマトLK-22, 東京)で組織を均質化した。2 M 酢酸ナトリウム(pH4.5), フェノール, クロロホルム, イソamilアルコールを加え攪拌し15分間氷上に放置した後, 遠心(4°C , $13,000 \times g$, 15分間)して上清を回収した。これに10 mlのイソプロパノールを加え, -70°C にて60分間以上冷却した後, 遠心(4°C , $10,000 \times g$, 20分間)して沈澱物を回収した。沈澱物を再度3 mlの変性溶液に溶解した後, 等量のイソプロパノールを加え, -70°C にて, 60分間以上冷却した。これを遠心(4°C , $13,000 \times g$, 15分間)した後, 上清を除去した。75%アルコール5 mlを加えて沈澱物を洗浄し, 風乾(室温, 5分)後, 1 mlのTE (10 mM Tris-HCl (pH7.4), 0.1 mM エチレンジアミン4酢酸2水素2ナトリウム)を加え溶解した。その後, 上述III, 1, 1)のごとく, デオキシリボヌクレアーゼI処理しDNAを完全に除いた。

2. RT-PCR反応

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers for PCR

Primer name	Forward primer	Reverse primer	Length of PCR product (bp)
β_2 -microglobulin	5'-ACCCCACTGAAAAAGATGA-3'	5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	114
G-CSF 1	5'-CAGAGCCCCATGAAGCTGATG-3'	5'-CTTCCTGCACTGTCCAGAGTG-3'	70
G-CSF 2	5'-TTGGGTCACCTTGGACACA-3'	5'-GGCCATTCACAGTTCTCCAT-3'	87
GM-CSF 1	5'-CTGAACCTGAGTAGAGACACTG-3'	5'-CTGGAGGTCAAACATTCTGAG-3'	75
GM-CSF 2	5'-CATGATGGCCAGCCACTACAAG-3'	5'-GGTGATAATCTGGGTTGCACAG-3'	73

抽出した全RNAを用い、Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, USA) にてRT-PCRを行った。RNA試料9.5 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, 添付RT反応緩衝液2 μ l, 10mM dNTP混合液2 μ l, ランダムプライマー1 μ l (0.5 μ g), リボヌクレアーゼインヒビター0.5 μ l (10単位), 逆転写酵素1 μ l (20単位)を混合し全量を20 μ lとした。これを、37°Cで10分間、42°Cで30分間反応させcDNAを合成した後、99°Cで5分間加熱して酵素を失活させた。

G-CSFとGM-CSF転写産物の検出のために使用したPCRプライマーの塩基配列とPCR産物の大きさを表1に示した。プライマーの設定には、ヒトG-CSF³⁾とGM-CSF⁴⁾のゲノムDNA配列を参考にし、それぞれにつき二組ずつ決定した。増幅される領域にイントロンが含まれるように設計し、RNAに混入した微量のゲノムDNAによって増幅されたPCR産物と区別できるようにした。また、ホルマリン固定パラフィンブロック包埋組織または未固定凍結組織から、PCR可能なcDNAが合成されたかどうかを確かめるため、 β 2-ミクログロブリン⁵⁾も増幅した。プライマーの合成は宝酒造(草津)に委託した。

逆転写によって合成したcDNA溶液2.5 μ lをPCR反応の鋳型として用いた。反応液(最終液量50 μ l)は、プライマー1組(それぞれ50pmol), 0.2mM dNTP 4 μ l, Taqポリメラーゼ2単位(Takara, 大津), 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 0.01% (w/v) ゼラチン, 1.5mM MgCl₂とし、サーマルサイクラーDNA Engine Peltier Thermal Cycler Model PTC-200 (Mj reserch, Massachusetts, USA)を用いてPCR反応を行った。G-CSFとGM-CSFに対しては、94°C1分間、60°C1分間、72°C1分間を1サイクルとし、30サイクルの反応を行った。 β 2-ミクログロブリンに対しては、94°C1分間、57°C1分間、72°C1分間を1サイクルをし、25サイクルの反応を行った。9 μ lのPCR産物を臭化エチジウムを含む4.5%アガロースゲル(3%のアガロースと1.5%のNusieve GTGアガロース)(FMC Bioproducts, Rockland, USA)にて定電圧100V下で電気泳動し、紫外線照射下でPCR産物を可視化した。

IV. 骨髄の解析

免疫組織化学でG-CSFあるいはGM-CSFが陽性となった症例の骨髄について、以下のごとく検討した。また、対照として、白血球数10,000/mm³以下、赤血球数3,500,000/mm³以上、血小板数150,000/mm³以上で、かつ、臨床的に血液像に問題のなかった剖検症例の骨髄も同様の方法で検討した(非血液非リンパ系悪性腫瘍剖検6症例と非腫瘍性剖検6症例)。

1. 骨髄における造血細胞の密度

ホルマリン固定パラフィン包埋した骨髄(腰椎ないし肋骨)より組織切片を作製し、HE染色を行った。造血細胞の多い領域から5視野を無作為に選んで写真撮影した(直接倍率x 100)。その際、骨梁は視野から除いた。撮影した35mmフィルムをQuickscan 35(ミノルタ株式会社, 大阪)にてコンピューターPower Mac G4/500(アップルコンピュータ株式会社, 東京)に取り込み、骨髄画像をデジタル化した。取り込んだ骨髄画像を画像処理ソフトAdobe Photoshop 5.5(アドビシステムズ株式会社, 東京)と画像解析ソフトNIH Image 1.62(Free soft)を用いて解析し、骨髄における造血細胞の密度を計測した。その手順は、取り込んだ骨髄画像よりPhotoshop 5.5を用いて脂肪細胞部分を取り除き、さらにRGB(赤緑青)カラーと色調の補正を行った後、NIH Image 1.62にて脂肪細胞除去後の残りの面積を

測定した。この面積を取り込んだ画像全体の面積で除し、その値を骨髄における造血細胞の密度とした。

2. 骨髄の組織化学および免疫組織化学

ホルマリン固定パラフィン包埋した骨髄より組織切片を作製し、組織化学あるいは免疫組織化学を行って、顆粒球系、赤芽球系、巨核球系、組織球・単球系の4種類の細胞を識別した。顆粒球系の細胞は、クロロアセテートエステラーゼ染色を行って同定した。赤芽球系、組織球・単球系、巨核球系の細胞は、それぞれ、抗グリコフォリンA抗体⁶⁾(200倍希釈;ダコ・ジャパン)、抗CD68抗体⁷⁾(100倍希釈;ダコ・ジャパン)、抗von Willebrand factor抗体⁸⁾(1600倍希釈;ダコ・ジャパン)を用いた免疫組織化学を行って標識した。免疫組織化学はG-CSF, GM-CSFと同様、ストレプトアビジン・ビオチン法を用いた。また、抗原の賦活化にはTarget Unmasking Fluid処理またはマイクロウエーブ処理を用いた。造血細胞の多い領域から5視野を無作為に選んで写真撮影し4倍に引き伸ばしたカラープリントを作成して(最終的な倍率x 200)、それぞれ標識された細胞を計数した。同一カラープリント上で観察されるすべての有核細胞も数え、標識された細胞数を有核細胞数で除して各々の細胞系の相対的構成比を算出した。

また、造血細胞の密度にそれぞれの細胞系の相対的構成比を掛けて、骨髄における細胞系の絶対的構成比を算出した。

V. 統計学的処理

Studentのt検定を行って、対照例とCSF陽性例で、骨髄における造血細胞の密度、各細胞系の相対的構成比と絶対的構成比を比較検討した。

成 績

I. 臨床病理学的事項

1980年から1999年までの20年間に剖検された1778症例のうち、非血液非リンパ系悪性腫瘍は869例あった。これらのうち、経過中に10,000/mm³以上の白血球増多を呈した症例は439例、485病変(単癌397例、二重癌39例、三重癌2例、四重癌1例;治療による腫瘍消失症例は除く)であった(表2, 3)。臓器別にみると、主なものは肺癌、肝癌、胃癌、膵癌、胆嚢癌、大腸癌などであった。経過中の血中白血球数最高値は、大部分が20,000/mm³未満(307症例, 70.0%)であった。最も高い値を示した症例は肺巨細胞型大細胞癌で、その血中白血球数最高値は103,500/mm³であった。一方、非腫瘍性病変剖検例で経過中に10,000/mm³以上の白血球増多を呈した症例は365例あった(表2)。血中白血球数最高値は、大部分が20,000/mm³未満(275症例, 75.3%)であった。最も高い値を示した症例は肺膿瘍から敗血症を併発した症例で、その血中白血球数最高値は54,700/mm³であった。非腫瘍性病変剖検例で60,000/mm³以上の白血球増多を呈した症例はなかった。

II. 免疫組織化学

経過中に10,000/mm³以上の白血球増多症を呈した非血液非リンパ系悪性腫瘍症例すべてについて検索したところ、G-CSFおよびGM-CSF陽性腫瘍は、それぞれ、3例、2例であった(表4)。原発臓器別に見ると、肺癌2例(G-CSF陽性1例, GM-CSF陽性1例)、上行結腸癌1例(G-CSF陽性)、胃癌1例(G-CSF陽性)、悪性胸腺腫1例(GM-CSF陽性)であった。肺癌の組織型は、G-CSF陽性例が巨細胞型大細胞癌で、GM-CSF陽性例は紡錘形細胞癌であった。前者では、一部の大型の腫瘍細胞の細胞

Table 2. Items of 804 cases with leukocytosis among 1778 autopsy cases examined

Cases	White blood cell (/mm ³)								Total
	10000≤ <20000	20000≤ <30000	30000≤ <40000	40000≤ <50000	50000≤ <60000	60000≤ <70000	90000≤ <100000	100000≤ <110000	
Cases with non-lymphohematopoietic malignant tumor	307	84	30	9	4	3	1	1	439
Single cancer	275	76	30(1)	8(1)	4	2	1(1)	1(1)	397
Double cancer	29	8(1)		1		1			39
Tripple cancer	2								2
Quadruple cancer	1								1
Cases without malignant tumor	275	59	21	9	1				365

Numbers in parentheses represent CSF-positive cases.

Table 3. Correlation between primary organs of malignant tumors and degrees of leukocytosis in 485 lesions of 349 cases examined

Primary organ	White blood cell (/mm ³)								Number of lesion
	10000≤ <20000	20000≤ <30000	30000≤ <40000	40000≤ <50000	50000≤ <60000	60000≤ <70000	90000≤ <100000	100000≤ <110000	
Lung	62	20	5	2			1(1)	1(1)	91
Liver	70	12	2	2					86
Stomach	59	11	7(1)	1	2				80
Pancreas	25	14	6		1	3			49
Gallbladder	30	11	4	3					48
Colon	19	7(1)	1						27
Thyroid gland	19	5	1						25
Esophagus	10	2	1	1	1				15
Prostate	10	2	2	10		1			10
Kidney	11	1							12
Urinary bladder	8	2							10
Renal pelvis	4	1	1						5
Ureter	3								4
Breast	3								3
Rectum	3								3
Uterus		3							3
Ovary	1	1							2
Soft tissue	2								2
Thymus	1			1(1)					2
Duodenum	1								1
Anus	1								1
Unknown	1								1
Total	343	92(1)	30(1)	10(1)	4	4	1(1)	1(1)	485

Numbers in parentheses represent CSF-positive cases.

Table 4. Clinicopathological findings of 5 cases with non-lymphohematopoietic malignant tumors positively stained for G-CSF or G M-CSF

Case	Age (year)	Sex	Primary tumor (histopathology)	White blood cell (maximum/mm ³)	Chemotherapy	Inflammatory lesion at terminal stage	Cause of death	Survival time	Imunohistochemical staining	
									G-CSF	GM-CSF
1	67	M	Lung cancer (large cell carcinoma, giant cell type)	103500	+	Focal pulmonary abscess	Tumor	2 months	+	-
2	71	M	Colon cancer (moderately differentiated adenocarcinoma) Gastric cancer (moderately differentiated adenocarcinoma)	29400	-	Sepsis and bronchopneumonia	Multiple organ failure	5 months	+	-
3	74	M	Gastric cancer (moderately differentiated adenocarcinoma)	32300	+	-	Tumor	6 months	- (primary) +	- (metastatic)
4	74	M	Lung cancer (spindle cell carcinoma)	93000	-	Bronchopneumonia	Bronchopneumonia	1 month	-	+
5	64	F	Malignant thymoma (spindle cell type)	40200	+	-	Tumor	6 years	-	+

M, male; F, female.

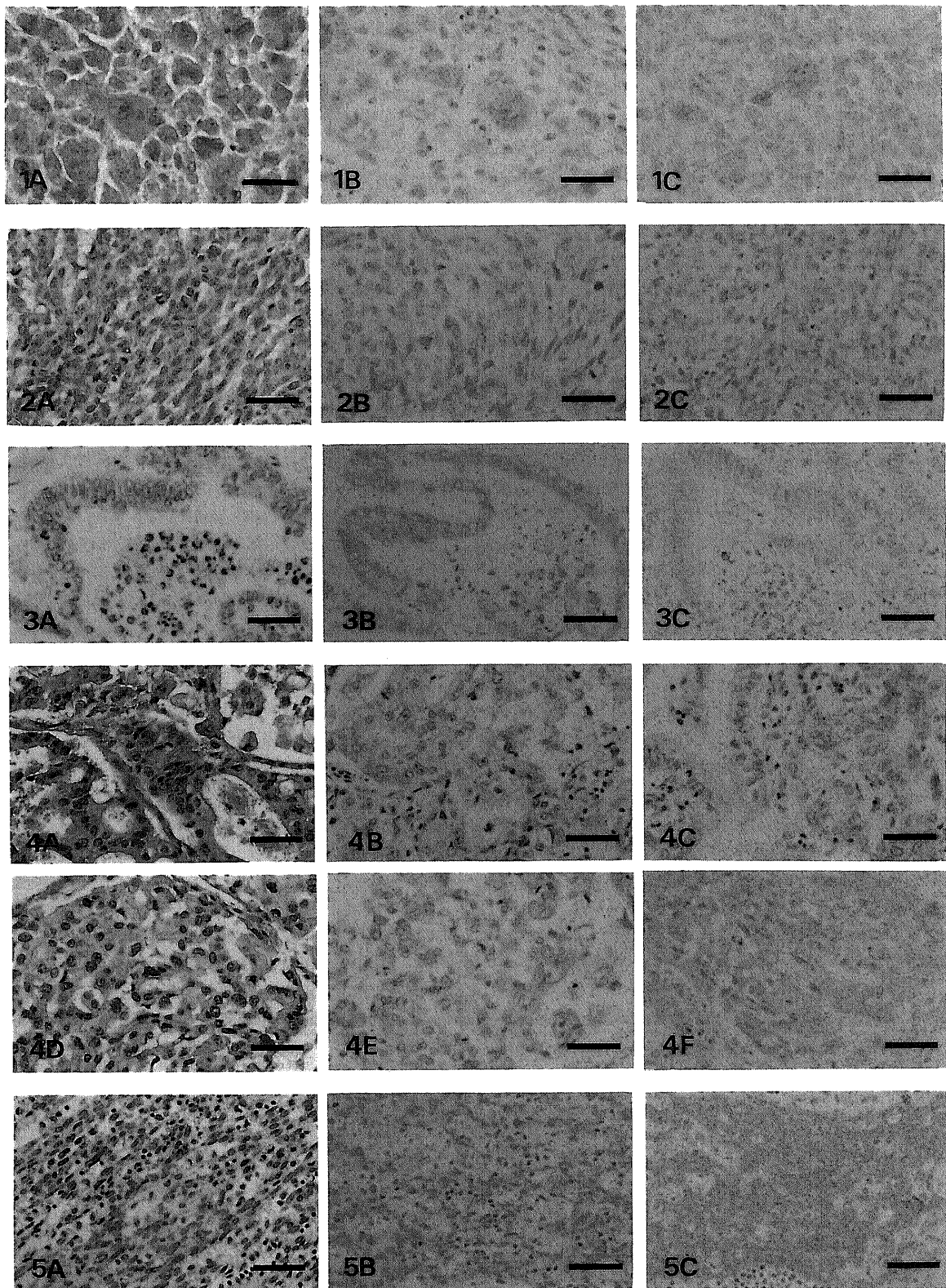


Fig. 1. Histopathology (A and D) and immunohistochemistry for G-CSF (B and E) and GM-CSF (C and F) of 5 positive cases. 1A-1C represent Case 1 (giant cell type-large cell carcinoma of the lung); 2A-2C, Case 4 (spindle cell carcinoma of the lung); 3A-3C, Case 2 (adenocarcinoma of the ascending colon); 4A-4F, Case 3 (4A-4C, adenocarcinoma of the stomach; 4D-4F, metastasis to the lung); 5A-5C, Case 5 (malignant thymoma). Bar=100 μ m.

質が抗G-CSF抗体で陽性に染色された(図1-1). 後者においては, かなりの数の紡錘形細胞の細胞質が抗GM-CSF抗体で陽性に染色された(図1-2). G-CSF陽性上行結腸癌は中分化腺癌で, 陽性に染色された管状腺癌細胞が散見された(図1-3). この症例は胃にも中分化型管状腺癌を合併していた(重複癌症例)が, 胃癌はG-CSF, GM-CSFともに陰性であった. G-CSF陽性の胃癌(症例3)では, 原発巣はG-CSF, GM-CSF共に免疫組織化学染色陰性であったが, 肺への転移巣がG-CSF陽性であった(図1-4). その原発巣の胃癌組織型は中分化型管状腺癌であったが, 肺への転移巣の組織型は低分化腺癌であった. GM-CSF陽性悪性胸腺腫は紡錘細胞型胸腺腫であった(図1-5). G-CSFとGM-CSFが共に陽性となった症例は認められなかった. これら免疫組織化学陽性症例の血中白血球数最高値は29,400~103,500/mm³(平均59,700/mm³)であった. 血中白血球数からみると, 非腫瘍性病変剖検例では観察されなかった

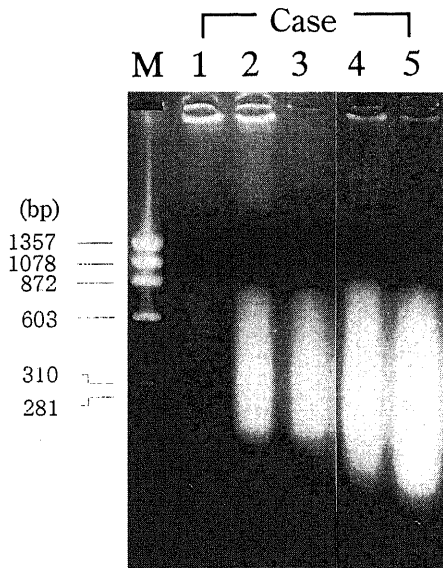


Fig. 2. Agarose-gel electrophoresis of total RNAs isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Various amounts of degraded RNAs were isolated in all cases. M, DNA size marker (ϕ X174 digested with *Hae* III).

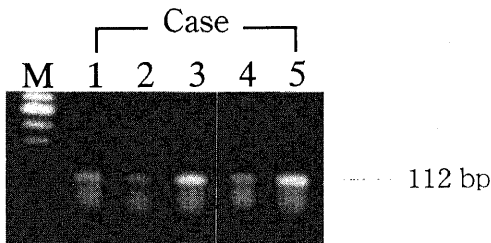


Fig. 3. Agarose-gel electrophoresis of reverse transcription-PCR products for β 2-microglobulin by using total RNAs isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. The β 2-microglobulin was successfully amplified in all cases. M, DNA size marker (ϕ X174 digested with *Hae* III).

60,000/mm³以上の著しい白血球増多を呈した5例中2例がCSF陽性であった(表2). なお, 症例1, 3, 5では化学療法が行われ, そのうち症例1, 3では死亡直前の血中白血球数が, それぞれ, 33,600/mm³, 11,200/mm³に低下していた.

III. RT-PCR法によるG-CSFとGM-CSFのmRNAの検出

1. ホルマリン固定パラフィンブロック包埋組織

図2に示すように, G-CSFまたはGM-CSF陽性5例全例においてホルマリン固定パラフィン包埋の腫瘍組織から全RNAの抽出が可能であった. その量は症例によってばらついていた. いずれの症例でも抽出されたRNAの長さは1 kbp未満と短く断片化していたが, 全例において β 2-ミクログロブリンのmRNAはRT-PCR法によって検出された(図3). しかし, いずれの症例においても, G-CSF, GM-CSFのmRNAは増幅されなかった(図4).

2. 未固定凍結組織

G-CSFまたはGM-CSF陽性5例のうち, GM-CSF陽性肺紡錘形細胞癌症例(症例4)については, 肺原発巣, 肝転移巣, 肝臓組織が未固定の状態凍結保存されていた. これらの組織より抽出した全RNAを用いて, β 2-ミクログロブリン, G-CSF, GM-CSFに対するRT-PCRを行ったところ, どの組織でも β 2-

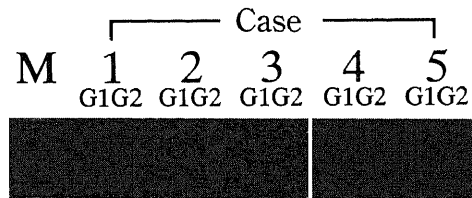


Fig. 4. Agarose-gel electrophoresis of reverse transcription-PCR products for G-CSF (Cases 1-3) and GM-CSF (Cases 4 and 5) by using total RNAs isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. G1 shows a PCR reaction with G-CSF 1 forward and reverse primers; G2, with G-CSF 2 forward and reverse primers; GM1, with GM-CSF 1 forward and reverse primers; GM2, with GM-CSF 2 forward and reverse primers. No PCR products with expected molecular sizes were observed. M, DNA size marker (ϕ X174 digested with *Hae* III).

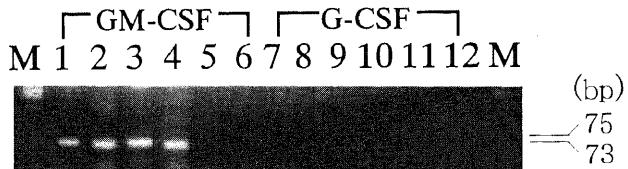


Fig. 5. Agarose-gel electrophoresis of reverse transcription-PCR products for GM-CSF (lanes 1-6) and G-CSF (lanes 7-12) by using total RNAs isolated from unfixed, frozen tissues of the lung carcinoma (1, 2, 7, 8), liver metastasis (3, 4, 9, 10) and liver (5, 6, 11, 12) of Case 4. Lanes 1, 3 and 5 show PCR reactions with GM-CSF 1 forward and reverse primers; lanes 2, 4 and 6, with GM-CSF 2 forward and reverse primers; lanes 7, 9, 11 with G-CSF 1 forward and reverse primers; lanes 8, 10, 12 with G-CSF 2 forward and reverse primers. PCR products of 75 or 73bp in length for GM-CSF were observed in the lung carcinoma (lanes 1, 2) and liver metastasis (lanes 3, 4). M, DNA size marker (ϕ X174 digested with *Hae* III).

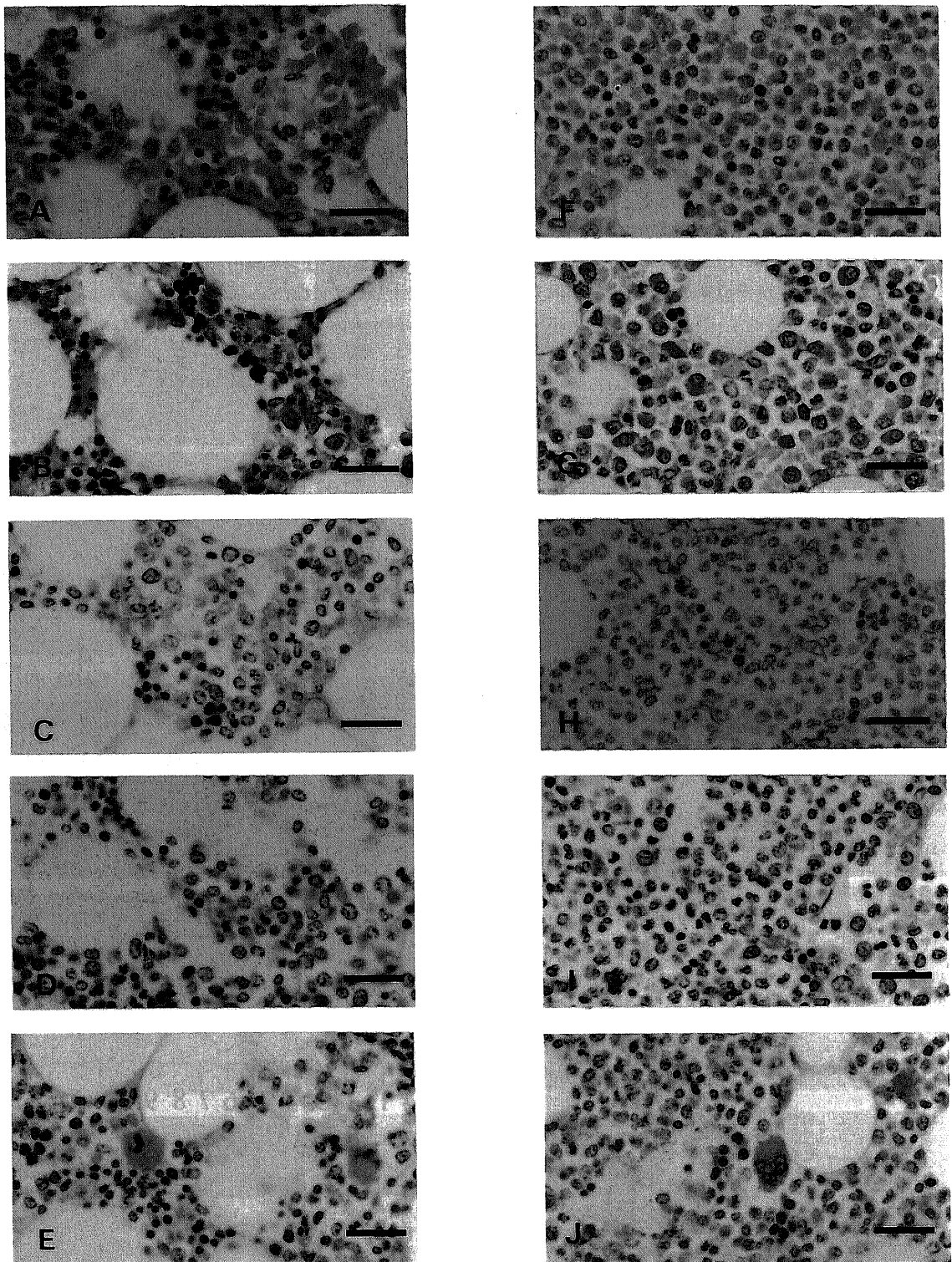


Fig. 6. The bone marrow of Control 14 (A-E) and Case 4 (F-J). A and F, HE staining; B and G, chloroacetate-esterase staining; C and H, immunohistochemistry for glycophorin A; D and I, immunohistochemistry for CD68; E and J, immunohistochemistry for von Willbrand factor. Bar=100 μ m.

ミクログロブリンが増幅された。肺原発巣、肝転移巣でGM-CSFが検出されたが、G-CSFは検出されなかった(図5)。肝臓組織ではG-CSF, GM-CSFともに検出されなかった。すなわち、原発巣および転移巣ともに、GM-CSFのmRNAを確認できた。

IV. 骨髄の解析

図6に代表的な対照症例とCSF陽性症例の骨髄組織のHE染色、組織化学および免疫組織化学の標本を示した。表5に対照12例とCSF陽性5例の骨髄造血細胞の密度と相対的構成比を、表6に絶対的構成比をまとめた。

1. 造血細胞密度

対照として検索した12例の造血細胞密度は31.5~56.2%(43.5±8.1%)であった。一方、G-CSF, GM-CSF免疫組織化学陽性5例の造血細胞密度は29.0~76.7%であった。症例1を除くと、骨髄造血細胞の密度は67.4~76.7%(72.6±4.0%)で、対照に比べ有意に高かった(p=0.016<0.05)。

2. 造血細胞の相対的構成比

対照として検索した12例において、骨髄中に占める顆粒球系、赤芽球系、単球・組織球系、巨核球系細胞の相対的比率は、それぞれ、32.1~62.8%(49.4±9.6%)、12.9~28.3%(22.1±5.8%)、0.8~4.0%(2.2±1.1%)、0.2~1.4%(0.6±0.3%)であった。G-CSF陽性症例1では、対照に比して単球・組織球系の細胞と巨核球系の細胞の相対的比率が高く、他の2系統の細胞の比率は低かった。症例1を除くCSF陽性4症例では、顆粒球系細胞の比率は51.5~68.9%(60.9±8.0%)で、対照に比べ高い傾向にあったが、有意差はなかった(p=0.132)。赤芽球系の細胞は14.3~19.5%(17.4±2.4%)で、対照に比べやや低い傾向にあったが、有意差はなかった(p=0.361)。単球・組織球系の細胞は3.2~8.6%(5.2±2.4%)で、対照に比べ高い傾向にあったが、有意差はなかった(p=0.099)。巨核球系細胞は0.4~1.0%(0.7±0.3%)で、対照と同程度であった(p=0.293)。なお、骨髄に存在する

他の有核細胞としては、未分化幹細胞、脂肪細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞などがあるが、本研究ではこれらの細胞については計測していない。したがって、個々の症例において、検索した4系統の細胞比を加算しても100%とはならない。

3. 造血細胞の絶対的構成比

対照として検索した12例において、骨髄中に占める顆粒球系、赤芽球系、単球・組織球系、巨核球系細胞の絶対的比率は、それぞれ、13.1~32.4%(21.7±6.9%)、5.6~14.3%(9.3±2.8%)、0.4~1.7%(0.9±0.5%)、0.1~0.6%(0.3±0.1%)であった。症例1を除くCSF陽性4症例では、顆粒球系細胞の絶対的比率は44.0~49.0%(44.1±5.1%)で、対照に比べ有意に高かった(p=0.019<0.05)。一方、赤芽球系の細胞は10.6~14.5%(12.6±2.0%)で、対照に比べやや高い傾向にあったが、有意差はなかった(p=0.256)。単球・組織球系の細胞は2.2~6.6%(3.8±1.9%)で、高い傾向にあったが、有意差はなかった(p=0.064)。巨核球系細胞は0.4~0.8%(0.5±0.1%)で、高い傾向にあったが、有意差はなかった(p=0.077)。

考 察

本研究では、免疫組織化学による検索の結果、白血球増多症を伴った非血液非リンパ系悪性腫瘍439症例中5例(約1.1%)において、G-CSF陽性症例(3例, 0.7%)やGM-CSF陽性症例(2例, 0.5%)を認めた。これら陽性例のホルマリン固定パラフィンブロック包埋組織を用いてRT-PCRを試みたが、β2-ミクログロブリンのmRNAを確認できたにもかかわらず、G-CSFやGM-CSFのmRNAを検出することはできなかった。しかし、未固定凍結組織が保存されていたGM-CSF免疫組織化学陽性症例4では、GM-CSFのmRNAを確認できた。ホルマリン固定パラフィンブロック包埋組織で、G-CSFやGM-CSFのmRNAが検出でき

Table 5. Cellularity and relative reions of granulocyte, erythrocyte, monocyte-macropage and megakaryocyte in bone of G-CSF- or GM-CSF-positive cases and controls

Case	Cellularity	Granulocyte	Erythrocyte	Monocyte-macrophage	Megakaryocyte
G-CSF-positive case					
1	29.0%	7.2%	8.9%	28.2%	4.2%
2	67.4%	68.9%	16.7%	3.2%	0.7%
3	76.7%	57.3%	18.9%	8.6%	0.6%
GM-CSF-positive case					
4	72.0%	51.5%	19.5%	4.4%	0.4%
5	74.3%	65.9%	14.3%	4.6%	1.0%
Control without leukocytosis					
Case with malignant tumor					
1	53.0%	* 58.0%	26.9%	0.8%	0.4%
2	32.9%	42.0%	27.3%	1.7%	0.6%
3	42.5%	33.3%	18.5%	4.0%	0.5%
4	43.5%	52.7%	12.9%	1.7%	0.5%
5	55.2%	54.6%	22.5%	1.8%	0.6%
6	42.6%	62.8%	28.3%	2.2%	1.4%
Case without malignant tumor					
7	31.5%	55.8%	24.8%	ND	0.7%
8	41.0%	32.1%	18.9%	0.8%	0.6%
9	56.2%	57.7%	ND	3.1%	0.2%
10	39.6%	47.9%	ND	2.3%	0.6%
11	37.2%	48.7%	27.3%	3.8%	ND
12	47.0%	47.0%	13.6%	1.7%	0.4%

ND, not done.

* significant difference (p=0.016<0.05).

Table 6. Absolute ratios of granulocyte, erythrocyte, monocyte-macrophage and megakaryocyte in bone marrow of G-CSF- or GM-CSF-positive cases and controls

Case	Granulocyte	Erythrocyte	Monocyte-macrophage	Megakaryocyte
G-CSF-positive case				
1	2.1%	2.6%	8.2%	1.2%
2	46.4%	11.2%	2.2%	0.5%
3	44.0%	14.5%	6.6%	0.4%
GM-CSF-positive case				
4	37.0%	14.0%	3.2%	0.3%
5	49.0%	10.6%	3.4%	0.8%
Control without leukocytosis				
Case with malignant tumor				
1	30.8%	14.3%	0.4%	0.2%
2	13.8%	9.0%	0.6%	0.2%
3	14.1%	7.8%	1.7%	0.2%
4	22.9%	5.6%	0.7%	0.2%
5	30.1%	12.4%	1.0%	0.3%
6	26.8%	12.1%	0.9%	0.6%
Case without malignant tumor				
7	17.5%	7.8%	ND	0.2%
8	13.1%	7.7%	0.3%	0.3%
9	32.4%	ND	1.7%	0.1%
10	19.0%	ND	0.9%	0.2%
11	18.1%	10.1%	1.4%	ND
12	22.1%	6.4%	0.8%	0.2%

ND, not done.

* Significant difference ($p=0.019<0.05$).

なかった理由についてははっきりしないが、次のようなことが考えられる。すなわち、恒常的にほとんどすべての細胞に発現している $\beta 2$ -ミクログロブリン⁵⁾に対し、CSFを産生している腫瘍細胞は一部で、しかも、量的に微量と思われること、また図2に示したように、ホルマリン固定パラフィンブロック包埋組織より抽出されたmRNAの断片化が著しいこと、さらにホルマリン固定パラフィンブロック包埋組織より抽出されたmRNAからcDNAへの変換効率やPCRの増幅効率が不良であること⁹⁾¹⁰⁾などである。

本研究では、G-CSF陽性症例は、肺巨細胞型大細胞癌、大腸癌、胃癌で、GM-CSF陽性症例は、肺紡錘形細胞癌と悪性胸腺腫であった。比較的報告例の多いG-CSF産生悪性腫瘍について臓器別に調べてみると、口腔癌¹¹⁾、甲状腺癌¹²⁾、肺癌^{13)~17)}、食道癌¹⁸⁾、胃癌¹⁹⁾、胆嚢癌²⁰⁾、膵癌²¹⁾、肝内胆管癌²²⁾、腎癌²³⁾、膀胱癌²⁴⁾など、さまざまな臓器で報告されているが、肺癌の頻度が高い。一方、GM-CSF産生悪性腫瘍の報告は少なく、現在までに、甲状腺癌4例²⁵⁾、肺癌4例²⁶⁾、結腸癌1例²⁷⁾、腎盂癌1例²⁸⁾、腎癌1例²⁹⁾の計11例にすぎない。しかし、本研究の結果は、GM-CSF産生悪性腫瘍症例もまれならざることを示唆しており、今後、GM-CSFについても血液生化学的な検索が頻繁に行われるようになると、GM-CSF産生悪性腫瘍の出現頻度が高くなるかもしれない。なお本研究の症例4のように、mRNAレベルでGM-CSFの発現を確認できた非血液非リンパ系悪性腫瘍の報告は、これまでに腎癌の1例しかない²⁹⁾。

G-CSF産生腫瘍の組織型については、未分化癌^{15)~17)25)30)}、扁平上皮癌¹³⁾¹⁴⁾¹⁸⁾²¹⁾³¹⁾、腺癌¹⁹⁾²⁰⁾²⁷⁾などの報告があるが、未分化癌が多い^{15)~17)25)30)32)33)}。またGM-CSF産生腫瘍報告例でも、約半数は未分化癌である³⁴⁾。本研究においても、G-CSF陽性肺癌は

大細胞未分化癌で、GM-CSF陽性肺癌症例も分化度の低い扁平上皮癌と考えられている紡錘形細胞癌²⁵⁾であった。また、原発巣は陰性であったが肺への転移巣がG-CSF陽性であった胃癌症例(症例3)では、原発巣に比べ転移巣の分化度はより低くなっていた。したがって、癌が未分化になるにつれ、CSFが産生されやすくなる可能性が示唆される。腫瘍細胞がどのようにしてこれらのCSFを産生するのには未だ不明な点も多いが、G-CSFに関して言えば、遺伝子の変異、遺伝子の増幅、遺伝子調節因子の活性化等があげられている¹⁷⁾。

本研究では、悪性胸腺腫症例を除き、CSF陽性4症例の生存期間は6ヵ月以下で、予後は不良であった。同様の傾向は、過去の症例報告をまとめて分析した論文でも指摘されている。例えば、Furihataら²⁰⁾によると、彼等の報告症例1例を含めたG-CSF産生胆嚢癌5例はすべて1年以内に死亡している。そのうち4症例の生存期間は6ヵ月以下であった。またWatanabeら³⁴⁾は、きわめてまれなGM-CSF産生腫瘍の報告症例6例(肺癌3例、甲状腺癌2例、腎癌1例)を後関し、予後について記載がある4例中3例は4ヵ月以内に死亡したと記載している。患者の予後を決定する因子は複数あり単純ではないが、CSFもそのひとつにあげられるかも知れない。実際、ヒト甲状腺未分化癌より確立したG-CSF産生株を使った培養実験では、腫瘍壊死因子、インターロイキン 1α 、インターロイキン 1β 等の刺激によって腫瘍のG-CSF産生が亢進し、腫瘍細胞の増殖が促進されると報告されている³⁶⁾。その機序のひとつとして、G-CSFレセプターを介したオートクリン的な増殖促進があげられる³⁷⁾。また、マウスを用いた腫瘍皮下接種実験モデルにおいても、CSF産生能が高い腫瘍ほど肺転移巣を生じやすいことが示されている³⁸⁾。したがって、腫瘍が産生するコロニー刺激因子は、骨髄造血細胞

の増殖のみならず腫瘍細胞に対しても増殖を刺激し増殖や転移を促進するため、患者の予後を不良にしていることが推測される。一方、既に述べたように、CSFは一般に予後不良な未分化癌に発現される傾向がある。患者の予後は癌が本来もつ浸潤増殖の強さに左右されているのであって、CSF産生は腫瘍の持つ附随した現象(単なる表現型)である可能性も否定できない。癌の産生するCSFが患者の予後に強く影響しているかどうかは、今後の検討課題である。

腫瘍によって産生されたCSFが骨髄に作用して実際にどのような変化をもたらすのかを明らかにした研究報告は見当たらない。一般的に、G-CSFは好中球の増殖分化を促進し成熟好中球の末梢血への動員を促進する³⁹⁾⁴⁰⁾。またGM-CSFは、顆粒球系細胞のみならず組織球・単球系細胞、赤芽球系細胞や巨核球系細胞の増殖も刺激するとされている⁴¹⁾⁴²⁾。本研究では、免疫組織化学的にCSF陽性であった5症例における骨髄の変化について対照例と比較検討した。通常の病理組織学では、骨髄造血細胞の割合は顕微鏡視野のうち脂肪細胞が占める部分を除いておよそその目算で算出している⁴³⁾⁴⁴⁾。また、造血細胞の構成比についてもHE標本上で形態学的差によっておよそその値を出している。これらの計測方法は、検鏡する個人や状況によってばらつきがかなりあるので、骨髄の正確な評価はできない。そこで本研究では、骨髄造血細胞の割合については画像解析法を用い、造血細胞の構成比については組織化学と免疫組織化学を用いて、それぞれの値を客観的に算出した。症例1では、最終的には低形成性骨髄になっていた。顆粒球系細胞、赤芽球系細胞は減少し、逆に単球・組織球系が増加していたが、これらは化学療法によって生ずる変化であり、G-CSFの積極的な関与は考えにくい。症例1を除く4症例では、対照に比べ骨髄造血細胞密度が高く、しかも、顆粒球系の細胞の絶対的構成比が有意に高かったことから、絶対的に顆粒球系細胞が増加していることは明らかである。その他の細胞系では、絶対的比率は高い傾向にあったが有意差はなかったため、増加しているとは断定できない。したがって、腫瘍が産生したG-CSFとGM-CSFは生理的活性を有しており、生体ではともに主として顆粒球系細胞の増殖を促進したと考えられる。ただし、症例2と4では敗血症や気管支肺炎を合併しているため、顆粒球系細胞増多の程度についてはこれら感染症による影響もあると思われる。また、症例3と5では化学療法の影響も考慮する必要がある。

今回の検討で、まれではあるが非腫瘍性病変でも50,000/mm³台まで白血球数が増多することがあり、この程度までの白血球増多は感染症でもおこりうることが明らかになった。その点では、今回の研究において、これを上回る白血球増多を示した腫瘍症例が5例あり、そのうち2例がCSF陽性であったことは興味深い。すなわち、60,000/mm³以上の白血球増多を示す非血液非リンパ系悪性腫瘍症例では、なんらかの白血球増多因子が高率に存在すると考えられる。逆に、CSF陽性症例の血中最高白血球数の平均値以上で、しかも、非腫瘍性病変では観察されることのなかったほどの著しい白血球増多(60,000/mm³以上)を示したのにもかかわらず、G-CSFもGM-CSFも陰性であった症例が3例(0.7%)存在したことにも注目する必要がある。このような症例では、腫瘍細胞で産生されたG-CSFやGM-CSFが腫瘍細胞内にとどまらず早期に分泌された結果、免疫組織化学染色では陰性になったり⁴⁵⁾、個々の腫瘍細胞が産生するCSF量が少なく免疫組織化学の感度以下であった

り、また腫瘍内でCSF産生細胞の占める割合が小さく採取した組織では同定できなかった可能性を完全には否定できない。実際これまでに、臨床的には血中のG-CSFやGM-CSFが高値であるにもかかわらず免疫組織化学的には陰性であった症例が指摘されている²⁰⁾⁴⁶⁾。しかし、マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン1、インターロイキン3、インターロイキン6など、他の腫瘍産生性白血球増殖刺激因子が関与している可能性が多分に考えられる。今後、白血球増多を伴う悪性腫瘍症例については、G-CSFやGM-CSFだけでなく他の白血球増殖刺激因子の関与も考慮した上で臨床病理学的な検索を行う必要があると考えられる。

結 論

1980年から1999年までの過去20年間に金沢大学医学部病理学第一講座における全例検例1778症例のうち、経過中に10,000/mm³以上の白血球増多症を呈した非血液非リンパ系悪性腫瘍439症例485病変(多重癌症例を含み、治療による腫瘍消失症例は除く)を対象として、G-CSFおよびGM-CSF産生悪性腫瘍についての臨床病理学的な検討を行い、以下の結果を得た。

1. 免疫組織化学的に、G-CSFおよびGM-CSF陽性症例がそれぞれ、3例(0.7%)と2例(0.5%)認められた。
2. 陽性症例のホルマリン固定パラフィンブロック包埋組織を用いたRT-PCRでは、G-CSFやGM-CSFのmRNAを検出することはできなかったが、未固定凍結腫瘍組織が保存されていたGM-CSF免疫組織化学陽性1症例で、GM-CSFのmRNAを確認できた。
3. G-CSF陽性例は肺巨細胞型大細胞癌、上行結腸腺癌および胃腺癌で、GM-CSF陽性例は、肺紡錘形細胞癌と悪性胸腺腫であった。胃癌症例では、中分化型管状腺癌の形態をとる原発巣はG-CSF陰性であったが、低分化腺癌を形態を示した肺転移巣がG-CSF陽性であった。
4. 悪性胸腺腫を除き、CSF陽性悪性腫瘍症例の生存期間は6ヵ月以下で、予後不良であった。
5. CSF陽性症例の血中白血球数最高値は29,400～103,500/mm³(平均59,700/mm³)であった。
6. 1症例を除き、骨髄は過形成を示した。骨髄過形成を示した4症例では、顆粒球系細胞の有意な増加がみられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師中西功夫教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行に直接御指導、御教授頂きました小田恵夫助教授に深く感謝致します。また、多大な御協力を賜った金沢大学医学部病理学第一講座員各位ならびに技術員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Hughes WF, Higley CS. Marked leukocytosis resulting from carcinomatosis. *Ann Intern Med* 37:1085-1088, 1952
- 2) Suzuki A, Takahashi T, Okuno Y, Seko S, Fukuda Y, Nakamura K, Fukumoto M, Konaka Y, Imura H. Liver damage in patients with colony-stimulating factor-producing tumors. *Am J Med* 94: 125-132, 1993
- 3) Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, Yamazaki T. The chromosomal

gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *EMBO J* 5: 571-581, 1986

- 4) Miyatake S, Otsuka T, Yokota T, Lee F, Arai K. Structure of the chromosomal gene for granulocyte-macrophage colony stimulating factor: comparison of the mouse and human genes. *EMBO J* 4: 2561-2568, 1985
- 5) Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder SJ, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, Von Hoff DD, Roninson IB. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7160-7164, 1990
- 6) Greaves MF, Sieff C, Edwards PAW. Monoclonal antiglycophorin as a probe for erythroleukemias. *Blood* 61: 645-651, 1983
- 7) Pulford KAF, Rigney EM, Micklem KJ, Jones M, Stross WP, Gatter KC, Mason DY. KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 42: 414-421, 1989
- 8) Chuang S-S, Yung Y-C, Li CY. von Willebrand factor is the most reliable immunohistochemical marker for megakaryocytes of myelodysplastic syndrome and chronic myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 113: 506-511, 2000
- 9) de Franchis R, Cross NCP, Foulkes NS, Cox TM. A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 16: 10355, 1988
- 10) Lo YM, Mehal WZ, Fleming KA. In vitro amplification of hepatitis B virus sequences from liver tumor DNA and from paraffin wax embedded tissues using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 42: 840-846, 1989
- 11) Yoneda T, Nishimura R, Kato I, Ohmae M, Takita M, Sakuda M. Frequency of the hypercalcemia-leukocytosis syndrome in oral malignancies. *Cancer* 68: 617-622, 1991
- 12) Yazawa S, Toshimori H, Nakatsuru K, Katakami H, Takemura J, Matsukura S. Thyroid anaplastic carcinoma producing granulocyte-colony-stimulating factor and parathyroid hormone-related protein. *Intern Med* 34: 584-588, 1995
- 13) Asano S, Urabe A, Okabe T, Sato N, Kondo Y, Ueyama Y, Chiba S, Ohsawa N, Kosaka K. Demonstration of granulopoietic factor(s) in the plasma of nude mice transplanted with a human lung cancer and in the tumor tissue. *Blood* 49: 845-852, 1977
- 14) Furihara M, Sonobe H, Iwata J, Ido E, Ohtsuki Y, Asahi Y, Kubonishi I, Miyoshi I. Lung squamous cell carcinoma producing both parathyroid hormone-related peptide and granulocyte colony stimulating factor. *Pathol Int* 46: 376-379, 1996
- 15) Shijubo N, Inoue Y, Hirasawa M, Igarashi T, Mori M, Matsuura A, Uede T, Suzuki A. Granulocyte colony-stimulating factor-producing large cell undifferentiated carcinoma of the lung. *Intern Med* 31: 277-280, 1992
- 16) Kodama T, Takada K, Kameya T, Shimosato Y, Tsuchiya R, Okabe T. Large cell carcinoma of the lung associated with marked eosinophilia. *Cancer* 54: 2313-2317, 1984
- 17) Oshika Y, Nakamura M, Hatanaka H, Abe Y, Tokunaga T, Ohnishi Y, Kijima H, Yamazaki H, Tamaoki N, Ueyama Y. A human lung cancer xenograft producing granulocyte-colony stimulating factor and parathyroid hormone-related protein. *Oncol Reports* 5: 359-362, 1998
- 18) Ota S, Kato A, Kobayashi H, Yonezumi M, Yamaguchi J, Musashi M, Imamura M, Asaka M. Monoclonal origin of an esophageal carcinosarcoma producing granulocyte-colony stimulating factor. A case report. *Cancer* 82: 2102-2111, 1998
- 19) Obara T, Ito Y, Kodama T, Fujimoto Y, Mizoguchi H, Oshimi K, Takahashi M, Hirayama A. A case of gastric carcinoma associated with excessive granulocytosis. *Cancer* 56: 782-788, 1985
- 20) Furihata M, Sonobe H, Ohtsuki Y, Enzan H, Tokuoka H, Nakamura Y. An immunohistochemical study on a case of granulocyte-colony stimulating factor-producing gall-bladder carcinoma. *Pathol Int* 49: 1010-1013, 1999
- 21) Uematsu T, Tsuchie K, Ukai K, Kimoto E, Funakawa T, Mizuno R. Granulocyte-colony stimulating factor produced by pancreatic carcinoma. *Int J Pancreatol* 19: 135-139, 1996
- 22) Aizawa M, Koshiyama H, Inoue D, Fukunaga Y, Katakami H, Miki M, Mizuno Y. Postoperative aggravation of hypercalcemia-leukocytosis syndrome in a case of squamous cell type cholangiocarcinoma. *Intern Med* 36: 232, 1997
- 23) 佐藤 勉, 山内尚文, 小林大介, 佐藤康史, 望月智博, 堀千寿子, 渡辺直樹, 新津洋司郎. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)産生腎癌. *臨床血液* 38: 1189-1193, 1997
- 24) Sato K, Terada K, Sugiyama T, Sugiyama T, Masuda H, Kakinuma H, Kato T. Granulocyte-colony stimulating factor produced bladder carcinoma of a patient with leukemoid reaction did not affect proliferation of the tumor cells. *J Urol* 151: 1687-1690, 1994
- 25) Nakada T, Sato H, Inoue F, Mizorogi F, Nagayama K, Tanaka T. The production of colony-stimulating factors by thyroid carcinoma is associated with marked neutrophilia and eosinophilia. *Intern Med* 35: 815-820, 1996
- 26) Sawyers CL, Golde DW, Quan S, Nimer SD. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in two patients with lung cancer, leukocytosis and eosinophilia. *Cancer* 69: 1342-1346, 1992
- 27) 畦西恭彦, 池田弘和, 水木満佐央, 待井隆志, 金倉 譲, 橋本光司. 好中球と好酸球の著しい増多を認めた結腸低分化腺癌の一例. *臨床血液* 38: 980, 1997
- 28) Wetzler M, Estrov Z, Talpaz M, Markowitz A, Gutterman JU, Kurzrock R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a cause of paraneoplastic leukaemoid reaction in advanced transitional cell carcinoma. *J Intern Med* 234: 417-420, 1993
- 29) Kan M, Tamura M, Kojima K, Naruo S, Kanayama H, Kagawa S. A case of renal cell carcinoma producing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Urol* 155: 2022-2023, 1996
- 30) Omura N, Abe S, Hirai K, Aoki T. A case of granulocyte-colony-stimulating factor producing gallbladder cancer. *Am J Gastroenterol* 94: 273-275, 1999
- 31) Satoh H, Abe S, Katoh Y, Komine Y, Nakamura M,

- Tamaoki N. Bladder carcinoma producing granulocyte colony-stimulating factor: A case report. *J Urol* 149: 843-845, 1993
- 32) Robinson WA. Granulocytosis in neoplasia. *Ann N Y Acad Sci* 230: 212-222, 1974
- 33) 北川誠一, CSF産生腫瘍, 日本臨床 (別冊) 血液症候群 II: 25-27, 1998
- 34) Watanabe M, Ono K, Ozeki Y, Tanaka S, Aida S, Okuno Y. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in a patient with metastatic chest wall large cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 28: 559-562, 1998
- 35) 肺癌取扱い規約. (日本肺癌学会編), 第5版, 92-100頁, 金原出版, 東京, 1999
- 36) Oka Y, Kobayashi T, Fujita S, Matsuura N, Okamoto S, Asakawa S, Murata A, Mori T. Establishment of a human anaplastic thyroid cancer cell line secreting granulocyte colony-stimulating factor in response to cytokines. *In Vitro Cell Dev Biol* 29A: 537-542, 1993
- 37) Tachibana M, Miyakawa A, Tazaki H, Nakamura K, Kubo A, Hata J, Nishi T, Amano Y. Autocrine growth of transitional cell carcinoma of the bladder induced by granulocyte-colony stimulating factor. *Cancer Res* 55: 3438-3443, 1995
- 38) Nicoletti G, Lollini P-L, Bagnara GP, De Giovanni C, Del Re B, Bons L, Prodi G, Nanni P. Are colony-stimulating factor-producing cells facilitated in the metastatic process? *Anticancer Res* 7: 695-700, 1987
- 39) Morstyn G, Burgess AW. Hemopoietic growth factors: A review. *Cancer Res* 48: 5624-2637, 1988
- 40) 脇本直樹, 元吉和夫. 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF). *日本臨床* 53 (臨時増刊号2): 800-802, 1995
- 41) Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony stimulating factors. *Science* 236: 1229-1237, 1987
- 42) 木村文彦, 元吉和夫. 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF). *日本臨床* 53 (臨時増刊号2): 806-809, 1995
- 43) Peel R, Krause JR. Bone marrow cellularity and stromal reactions. In JR Krause (ed), *Bone Marrow Biopsy*, 1st ed, p11-32, Churchill Livingstone, New York, 1981
- 44) 糸山進次. 骨髄組織標本の見方 (1). *病理と臨床* 3: 1229-1232, 1985
- 45) Akastuka A, Shimamura K, Katoh Y, Takekoshi S, Nakamura M, Nomura H, Hasegawa M, Ueyama Y, Tamamoki N. Electron microscopic identification of the intracellular secretion pathway of human G-CSF in a human tumor cell line: A comparative study with a chinese hamster ovary cell line (IA1-7) transfected with human G-CSF cDNA. *Exp Hematol* 19:768-772, 1991
- 46) 中島芳樹, 高島輝行, 内藤英二, 吉田 純, 千丸博司, 岡 正直, 武田誠, 田中善之, 谷 俊男. G-CSF産生性と考えられた胆嚢癌の1例. *日本内科学会雑誌* 85: 1931-1933, 1996

Clinicopathological Study of Autopsied Cases of Non-Lymphohematopoietic Malignant Tumors Showing Leukocytosis with Special Reference to Tumor-Producing Granulocyte and Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factors Kazuto Kojima, First Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - *J. Juzen Med Soc.*, **109**, 380 - 391 (2000)

Key words malignant tumor, non-lymphohematopoietic, leukocytosis, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte-macrophage colony stimulating factor

Abstract

A clinicopathological study of autopsied cases of non-lymphohematopoietic malignant tumors showing leukocytosis was performed with special reference to tumor-producing granulocyte and granulocyte-macrophage colony stimulating factors (G-CSF and GM-CSF). Four hundred eighty five non-lymphohematopoietic malignant tumors in 439 cases of leukocytosis (peripheral white blood cell count $\geq 10,000/\text{mm}^3$) were examined immunohistochemically for G-CSF and GM-CSF. Three tumors were positively stained for G-CSF and to tumors for GM-CSF. In one tumor, mRNA for GM-CSF was detected by reverse transcription-PCR. The G-CSF-positive neoplasms were a giant cell-type large cell carcinoma of the lung, an adenocarcinoma of the ascending colon and an adenocarcinoma of the stomach. The GM-CSF-positive neoplasms were a spindle cell carcinoma of the lung and a malignant thymoma. In the case of gastric carcinoma, the primary tumor showing moderate differentiation was negative, but a metastatic tumor in the lung showing poor differentiation was positive for G-CSF. These findings suggest that the production of colony stimulating factors by tumor cells is related to the degree of dedifferentiation of the neoplasm. Prognosis of the colony stimulating factor-positive cases was poor; the survival time in four of the five patients with G-CSF or GM-CSF-positive malignant tumors was six months or less. Maximal counts of peripheral white blood cells in the five cases with colony stimulating factor-positive tumors were between 29,400 and 103,500/ mm^3 (average, 59,700/ mm^3). In four of the five cases, the bone marrow showed hypercellularity with a significantly increased number of granulocytes, suggesting that the expressed G-CSF and GM-CSF were biologically active in stimulating the proliferation of granulocytes in bone marrow. However, there were three colony stimulating factor-negative cases with unusually marked leukocytosis showing the counts higher than the average count of positive cases (60,000/ mm^3 or more). In these cases, the tumor cells may have produced humoral factors other than G-CSF and GM-CSF, which stimulated the bone marrow to induce leukocytosis.