

液体培養における顆粒球 (G-CSF) および顆粒球・
マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の
ヒト白血病細胞におよぼす影響

新潟大学医学部第一内科学教室 (主任: 柴田 昭教授)

今 成 朗

Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) and
Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)
on Human Leukemic Cells in Liquid Culture

Akira IMANARI

*The 1st Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Akira SHIBATA)*

The effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on human acute myeloid leukemia cells was examined in vitro. Mononuclear cells obtained from bone marrow or peripheral blood cells of 22 patients with acute myeloid leukemia were incubated in liquid culture system with and without CSFs. In two of 22 cases, leukemic cells proliferated without CSFs. G-CSF stimulated the proliferation of leukemic cells from eight of 22 patients and GM-CSF did from seven of fifteen patients. This stimulation by CSFs appeared to be dose-dependent. In addition, additive and synergistic effects were observed in four of eleven leukemic cells stimulated with combined G-CSF and GM-CSF in vitro. Only one case showed differentiation with G-CSF. Out of nine patients given G-CSF clinically, three showed in vitro growth of their leukemic cells. In one patient with a striking cell proliferation by both CSFs in vitro, his leukemic cells increased in number after the administration of G-CSF (iv). These observations suggest that leukemic clone may have some sensitivity to CSFs in vitro and in vivo. Thus, in vitro culture to see which leukemic cells can respond to CSFs in vitro seems to be necessary before CSF administration in vivo.

Key words: Human leukemic cell, G-CSF, GM-CSF, In vitro liquid culture

ヒト白血病細胞, G-CSF, GM-CSF, 液体培養

Reprint requests to: Akira IMANARI,
The 1st Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第一内科学教室

今 成 朗

はじめに

コロニー刺激因子（Colony Stimulating Factor, CSF）は造血幹細胞に作用しその増殖および分化成熟に関係する重要な糖蛋白であり、*in vitro*においてその存在なしには colony は形成されない。正常造血細胞において、顆粒球コロニー刺激因子（Granulocyte Colony stimulating Factor, G-CSF）は顆粒球系前駆細胞に作用し顆粒球への、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）は顆粒球・マクロファージ系前駆細胞に作用し顆粒球・マクロファージへの分化増殖を促進する。近年各種 CSF が純化され、その DNA がクロニングされ遺伝子工学的技術により CSF の大量生産が可能となり、その臨床投与が行われるようになった。G-CSF, GM-CSF は、悪性腫瘍の化学療法後の無顆粒球期間を短縮することが報告され¹⁾²⁾、また血液疾患においても再生不良性貧血や、Myelodysplastic syndrome などに対する顆粒球増加作用が報告されている^{3)~7)}。さらに急性白血病においても骨髄移植後や化学療法後の白血球の回復促進等を目的に CSF の投与が行われている^{8)~13)}。しかし一方では、白血病細胞のみならず他の腫瘍細胞も、かなりの頻度で CSF に対するレセプターを有し^{14)~17)}、白血病細胞が *in vitro* で増殖することが報告されている^{18)~23)}。

従って、白血病患者に CSF を投与する場合、十分に注意する必要がある。特に白血病細胞の CSF に対する反応は、その heterogeneity²⁰⁾ のため、症例間でばらつきが認められ、その臨床投与には個々の症例でその反応を検討することが重要である。

今回、著者は短期（2～5日間）液体培養法で白血病細胞の CSF に対する反応を評価する目的で、急性骨髄性白血病を中心に、G-CSF および GM-CSF が白血病細胞の分化と増殖におよぼす影響を *in vitro* で検討した。さらに、*in vitro* の結果が、実際に臨床的に CSF を投与した症例に反映されるか否か一部の症例で観察した。

方 法

1. 対象症例

1986年11月より1990年4月までに当科および関連病院にて経験した骨髄性白血病患者22例を対象とした。対象患者22例の FAB 分類、末梢血と骨髄での芽球の比率および G-CSF の臨床投与の有無を表 1 に示した。

その内訳は、M1：4例、M2：4例、M3：2例、M4：3例、M5：1例および M6：1例の計15例の他、慢性骨髄性白血病の骨髄芽球性急性転化（CML BC）3例、Myelodysplastic syndrome（MDS）よりの白血病化した2例、好酸球増多症（HES）から白血病化した1例、さらに Acute Unclassified Leukemia（AUL）1例（ベルオキシダーゼ陰性、CD33 陽性）であった。

2. CSF

CSF は大腸菌由来の recombinant 製剤を用い、G-CSF はキリンアムジェン社より、GM-CSF はヘキストジャパン社より提供されたものを使用した。

3. 培養方法

患者より採取した骨髄または末梢血を Fiquor-Hypack にて 1500 回転/毎分で 30 分遠心し単核球を採取し、penicillin 100 μ g/ml, streptomycin 100 μ g/ml を加えた RPMI medium 1640（GIBCO）にて 3 回洗浄し、単核球の細胞浮遊液を作製した。培養前の細胞浮遊液の芽球の割合は、多くの症例で 90% 以上であったが、症例 3 で 41%、症例 10 で 79.5%、症例 13 で 52%、症例 17 で 35.5%、症例 20 で 59% と低いものもみられた。得られた単核球は 5×10^5 個/ml と調整し、終濃度 1ng/ml~1000ng/ml となるように G-CSF, GM-CSF を加え、10% の fetal bovine serum（FBS）を加えた RPMI medium 1640 に浮遊した。CSF 無添加を対照とし、その 1ml を 24 穴プレート（Nunc）に分注し 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件にて培養した。

G-CSF 添加培養は 22 例の全例に施行し、GM-CSF 添加培養は症例 8 以後の 15 例に行った。さらに症例 12~22 の 11 例については、G-CSF, GM-CSF をそれぞれ 10 ng/ml または 1000ng/ml 同時添加し、その相互作用を検討した。2 日間および 5 日間培養した後に、Tripian blue 染色を行い Turk 計算盤を用い生細胞数を計測した。

4. 増殖および分化の指標

CSF に対する白血病細胞の増殖は、CSF 無添加培養と比較し、その生細胞数が 50% 以上増加した場合 CSF による反応とした。またサイトスピン 2（SHANDON 社製）を用い各 CSF 濃度における標本を作成し、May-Gimsa 染色、ベルオキシダーゼ染色、エステラーゼ二重染色を行ない、各々 200 細胞を観察し、その陽性率を分化の指標とした。

5. CSF の臨床投与

症例 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 21 の 9 例に、G-CSF 200~500 μ g/日の投与が行われた（表 1）。うち

表1 対象患者の内訳

UPN	Dx.	PB		BM		G-CSF administration
		WBC ($\times 10^3/\text{ml}$)	Bl %	NCC ($\times 10^4/\text{ml}$)	Bl %	
1	M 4	30.0	50	52.4	78.4	(-)
2	M 2	1.7	20	41.0	80.4	(-)
3	M 3	1.1	6	55.0	85.2	(-)
4	M 3	50.0	30	36.0	83.4	(-)
5	M 5b	6.8	11.5	6.7	68.8	(-)
6	CML BC	126.0	37	43.6	88.0	(-)
7	M 2	3.0	12	5.8	81.8	(-)
8	RA→M 1	2.1	56	41.7	55.4	(+)
9	RAEB-t→M1	94.0	51.5	Dry Tap		(+)
10	M 1	4.2	21	2.2	29.2	(+)
11	M 1	132.3	90	17.0	94.0	(+)
12	AUL	57.2	86	34.5	86.2	(+)
13	CML BC	36.2	39	19.8	43.6	(+)
14	M 1	29.2	80	58.0	88.6	(-)
15	M 4	11.6	51	12.0	87.6	(+)
16	M 6	1.8	4	10.1	45.4	(+)
17	M 2	97.4	27	79.7	45.6	(-)
18	M 4	110.0	90	Dry Tap		(-)
19	HES→M 2	63.0	80	Dry Tap		(-)
20	M 2	1.6	5	12.5	58.6	(-)
21	M 1	14.9	89	56.1	90.8	(+)
22	CML BC	40.0	75	46.0	68.2	(-)

対象となった22例の患者番号, 診断, 白血球数, 骨髓有核細胞数, 末梢血および骨髓での芽球比率, および G-CSF の臨床投与の有無を示す。

症例8, 10, 16の3例には芽球の分化誘導の目的でビタミンD製剤あるいは Ara-C 少量が併用された。その他は化学療法後に投与された。

結 果

1. CSF 無添加培養の白血病細胞の推移

CSF 無添加において細胞数の増加がみられたものは22例中2例(症例7, 9)であった(図1)。その他の症例では培養日数とともに細胞数は減少傾向を示した。一方, 増加した細胞は, 症例7では検討できなかったが, 症例9においては芽球であった。

2. G-CSF 添加培養の白血病細胞の推移

G-CSF による細胞数の増加は22例中8例(40%)にみられ, かつその反応は dose dependent であったが, ほとんどの症例が高濃度(100~1000ng/ml)でもプラ

トーに至らなかった(図2)。残りの14例は網目の mean \pm SD で示したが dose response はみられなかった。

反応した8例の内訳をみると M1: 2/4例, M2: 2/4例, M3: 2/2例, CML BC: 2/3例であり, 症例数は少ないが, M3, CML-BC で高い傾向がみられた。

3. GM-CSF 添加培養の白血病細胞の推移

GM-CSF 10ng/ml 以上の添加で15例中7例(46.7%) (2例は 1ng/ml 以上)に細胞の増加がみられ G-CSF とほぼ同様の dose response が観察されたが, GM-CSF の低濃度(1~10ng/ml)に反応する例と高濃度(100ng/ml)の反応例に二分された(図3)。反応例の内訳は M1: 3/4例, M2: 1/2例, M3: 0/0, M4: 1/2例, M5: 0/0, M6: 1/1例, MDS: 1/2例で M1 で高い傾向がみられた。

G-CSF, GM-CSF のいずれにも反応しなかった症例

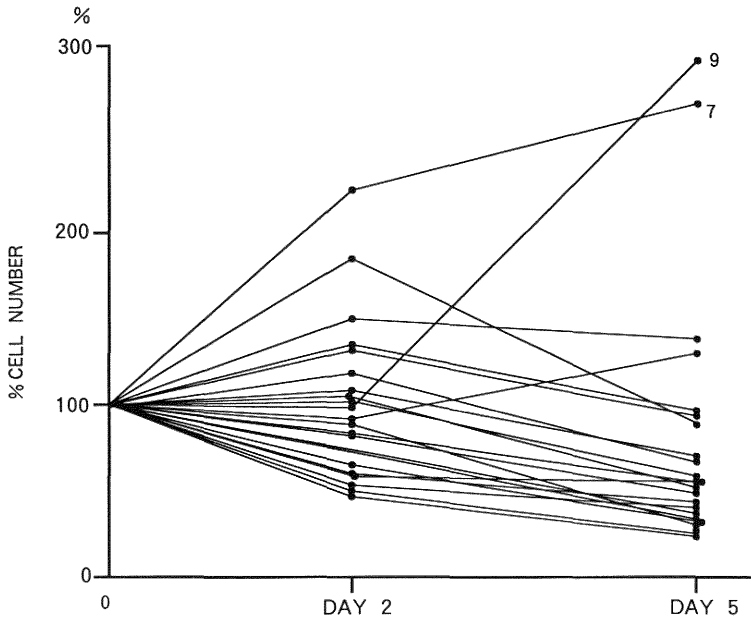


図 1 CSF 無添加における白血病細胞数の変化

培養前の細胞数を 100% とし、培養 2 日および 5 日の経時的な細胞数の変化を示す。(n=22例).

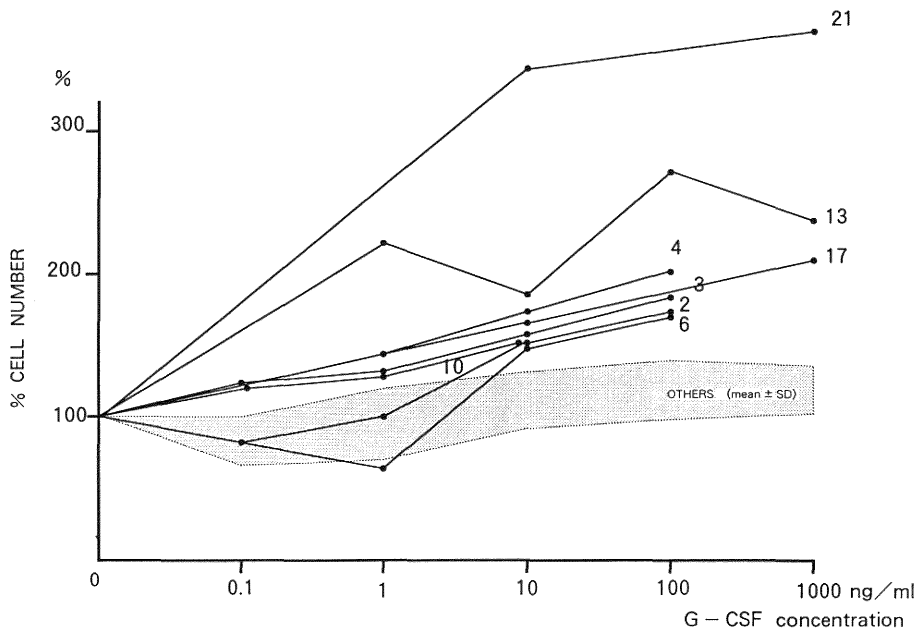


図 2 G-CSF 添加 5 日培養における白血病細胞増加率とその dose response

G-CSF (1~1,000ng/ml) 添加し培養 5 日後の細胞数を、CSF 無添加培養のそれを 100% として比較した (n=22). 網目の部分は増加しなかった症例の平均値±SD である.

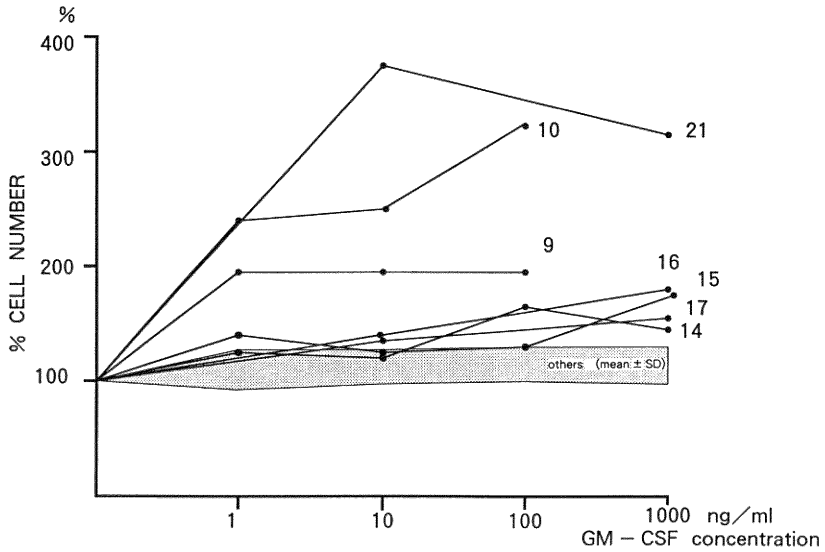


図3 GM-CSF 添加5日培養における白血病細胞増加率とその dose response 説明は図2に準ずる (n=15).

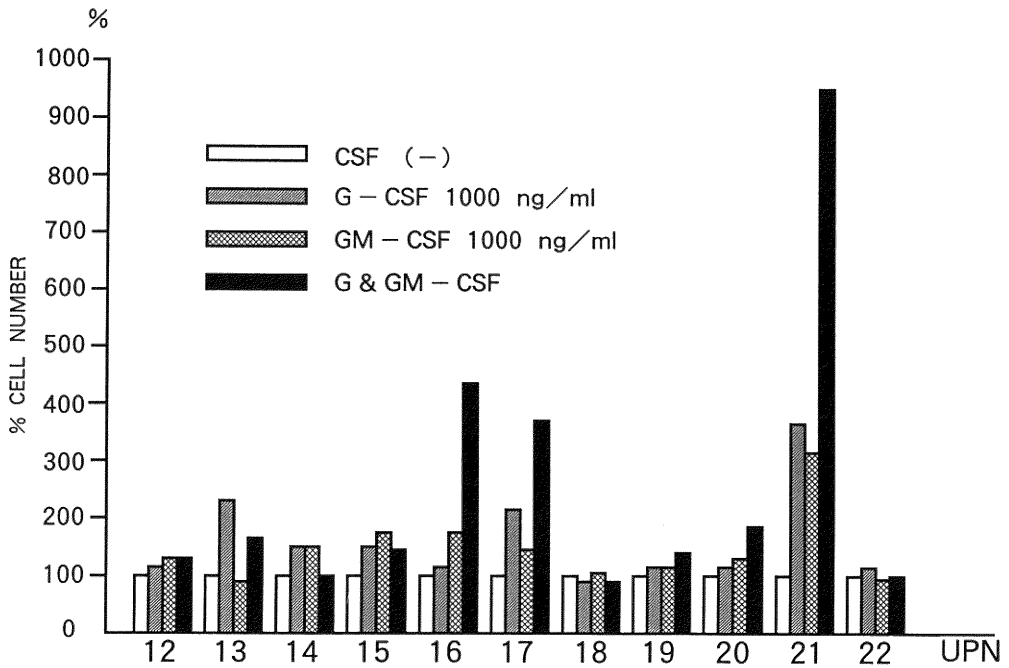


図4 G-CSF および GM-CSF 併用影響

症例12~22における G-CSF 1,000ng/ml, GM-CSF 1,000ng/ml の単独および併用の効果を同一症例の CSF 無添加5日間培養を100%として示した。各症例の左から順に CSF 無添加, G-CSF 1,000ng/ml, GM-CSF 1,000ng/ml および両者の併用を示す。

は、15例中6例（症例11, 12, 18, 19, 20, 22）でありその内訳は、M1：1/4例、M2：1/2例、M3：0/0、M4：1/1、M5：0/0、M6：0/1、CML-BC：1/2例、AUL：1/1例、HES：1/1例であった。

G-CSF, GM-CSF のいずれにも反応し芽球の増加がみられたものは15例中3例で、症例10, 21が M1 であり症例17が M2 であった。

4. G-CSF, GM-CSF の併用による影響

図4のごとく症例12~22の11例のうち、G-CSF 添加にて3例、GM-CSF 添加にて5例で細胞数の増加がみられたが、G-CSF, GM-CSF 同時添加において相加的あるいは相乗的な増加が4例（症例16, 17, 20, 21）にみられた。うち症例16は GM-CSF に、症例17および21は G-CSF, GM-CSF 両方に対し単独でも増殖作用がみられた。

5. 形態変化

培養前および培養5日後の CSF 添加および無添加時の形態変化を比較した（図5）。細胞崩壊のため形態観

察できなかった1例（症例7）を除くと21例中17例は、ほとんど培養前後において CSF 添加にかかわらず形態変化はみられなかった。症例13, 14, 22の3例は培養のみで分化傾向が認められた。症例22の1例で G-CSF で形態的に分化傾向が増強された。一方、CSF 添加で芽球の割合の増加する症例も認められた（症例3, 20）。

6. 臨床例における影響

22例中9例に臨床的に G-CSF (200~500 μ g/body/日) が投与され（表1）、そのうち3例（症例10, 13, 21）において *in vitro* で G-CSF に反応がみられた。図6は症例21の36才男性で AML (M1) の症例であり、G-CSF の投与により *in vitro* および *in vivo* で芽球の増殖を示した1例である。本例は BH-AC DMP 療法で寛解導入後の無顆粒球期間中に発熱し、G-CSF を投与したところ急激な芽球の増加がみられた。本例はすでに図2, 3に示すごとく G-CSF および GM-CSF に dose dependent を示した症例であった。しかし、他の2例は *in vitro* では白血病細胞の増加は認められなかった。

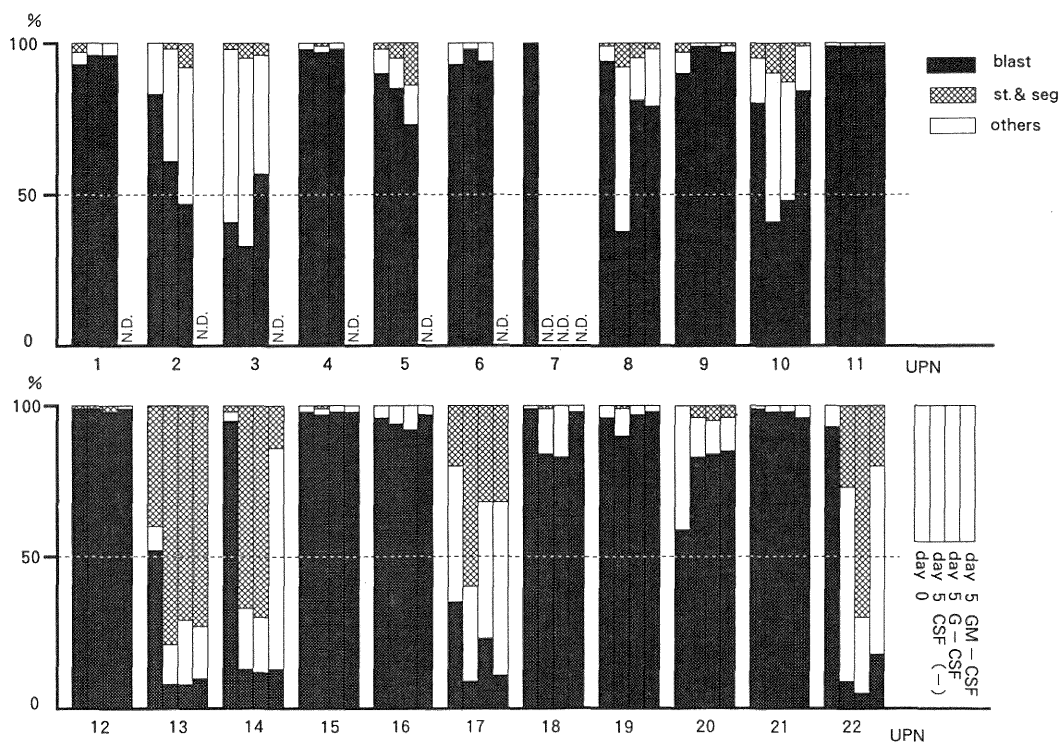


図5 CSF 添加培養における形態変化

培養前および5日間培養後の May-Gimsa 染色における細胞形態の変化（比率）を示す。各症例の左から順に培養前、CSF 無添加、G-CSF 1,000ng/ml、GM-CSF 1,000ng/ml および両者の併用を示す。

Clinical course K.I. 36y. M. AML (M1) 46, XY, t (6q⁺;11q⁻)

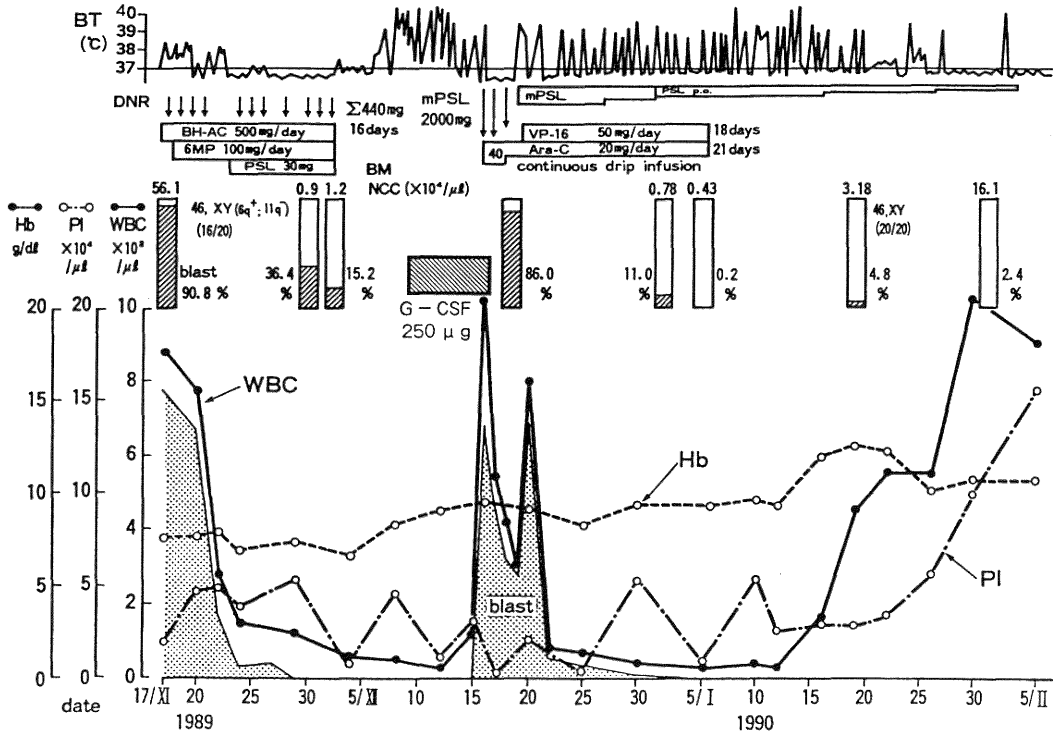


図6 G-CSFの臨床投与により芽球の増加がみられた症例21の経過

考 察

急性白血病の寛解導入療法後における死因は出血，感染などが主な原因を占め，なかでも感染症はいまお早期死亡の80%余りであり，その予防は白血病治療の重要な課題である。従って，白血球刺激因子であるCSFが自由に使えるかどうかは，重要な問題であるが，白血病細胞自身G-CSFやGM-CSFに対するレセプターを有することが知られている¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに，臨床的にCSFを投与しCML-BCでG-CSF投与後に顆粒球と平行して芽球が増殖した例¹²⁾，また，MDSでGM-CSF投与により芽球が増加した例¹⁴⁾などが報告されている。実際，著者もG-CSF投与で，寛解導入後芽球が著しく増加した症例を経験しており，未だ白血病患者にCSF投与が安全であるかどうかは確認されていない。さらに白血病細胞のCSFに対する反応は極めて多様で，著者のin vitroの成績でも，CSFの少量で芽球が著しく増加する症例から分化傾向を示す症例まで認められ，そ

の臨床投与には慎重でなければならない。

以上の理由から，臨床的にCSFを使用する場合，個々の症例でCSFに対する反応を検討し，その安全を予知・確認することが重要と思われる。現在in vitroで白血病細胞のCSFに対する反応を検索する方法として，先のレセプターの検討の他，H³-thymidineの白血病細胞への取り込み²³⁾および白血病コロニー形成法¹⁹⁾⁻²²⁾などがあるが，いずれもやや繁雑であり，かつ経時的な形態変化を観察出来ない欠点もある。今回，著者は簡単な短期の液体培養法を設定し，ヒト白血病細胞に対するCSFの影響，特にその増殖と分化についてin vitroで検討し，本法により，CSFに対する反応を予知しうるか否か，実際にCSFを投与した臨床例と比較した。その結果，G-CSFは22例中8例(40%)に，GM-CSFは15例中7例(46.7%)に芽球の増殖がみられ，その増殖はdose dependentであった。特にG-CSFおよびGM-CSF共に高濃度(1000ng/ml)で反応する傾向がみられることから，白血病患者にCSFを大量に投与

する場合は注意する必要がある。in vitro では G-CSF は GM-CSF より芽球の増殖に与える影響は少ないといわれており²³⁾、著者の液体培養法でも、そのような現象が観察された（図 2, 3）。すなわち、芽球の増殖に対しては GM-CSF の方が作用が強いと思われ、その臨床投与には十分注意する必要がある。症例によっては、G-CSF と GM-CSF の併用で相加、ないし相乗作用も認められた。

一方、CSF による芽球の分化誘導作用も報告されているが²⁴⁾ 今回の経時的な形態観察では CSF による細胞分化の可能性を示したものは22例中1例のみであり、分化誘導効果よりはむしろ増殖作用の方が強いと考えられた。実際、臨床的に G-CSF (200 μ g \sim 500 μ g/日) の投与を受けた9例では、in vitro で3例が反応して、臨床的にはそのうちの1例において末梢血で、芽球の増殖がみられた。この症例は in vitro で G-CSF および GM-CSF とともに少量で強い白血病細胞の増加を示し、両者による相乗作用もみられた（図 2, 3, 4）。in vitro で反応しなかった残りの6例では、G-CSF の臨床投与で白血病細胞の増加はみられなかった。以上の成績から、本法により、比較的短期間（2 \sim 5日）に、CSF に対する反応、特に白血病細胞の増殖と分化成熟の程度を予測することが可能と考えられた。

他方、40 \sim 45%の症例が in vitro で CSF に反応することが明らかになったが、これらの症例に対しては、CSF 投与で白血病細胞をむしろ刺激し、積極的にS期に導入することにより、その治療効果を高めることが検討されている。すなわち S phase specific な Ara-c と G-CSF, GM-CSF の併用により Ara-C の抗腫瘍効果が増強されることが確認されている²⁵⁾。これらの適応症例の選択にも、この短期液体培養法は有用と思われ、今後さらに症例を集積すると同時に、他の cytokine を併用し検討する予定である。

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導、ご校閲を賜った新潟大学第一内科 柴田 昭教授に深謝します。また直接のご指導を頂きました森山美昭助教授に厚く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Duehrsen, U., Villeval, J., Boyd, J., et. al.: Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood*, **72**: 2074 \sim 2081, 1988.
- 2) Antman, K.S., Griffin, J.D., Elias, A., et. al.: Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *N Engl J Med*, **319**: 593 \sim 598, 1988.
- 3) Vadhan-Raj, S., Keating, M., LeMister, A., et. al.: Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, **317**: 1545 \sim 1552, 1987.
- 4) Antin, J.H., Smith, B.R., Holmes, W. and Rosental, D.S.: Phase I/II study of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*, **72**: 705 \sim 713, 1988.
- 5) Ganser, A., Voelkers, B., Greher, J., et. al.: Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes—a phase I/II trial. *Blood*, **73**: 31 \sim 37, 1989.
- 6) Negrin, R.S., Haeuber, D.H., Nagler, A., et. al.: Treatment of myelodysplastic syndromes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: a phase I/II trial. *Ann Intern Med*, **110**: 976 \sim 984, 1989.
- 7) Kobayashi, Y., Okabe, T., Ozawa, K., et. al.: Treatment of myelodysplastic syndromes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: a preliminary report. *Am J Med*, **86**: 178 \sim 182, 1989.
- 8) Kodo, H., Tajika, K., Takahashi, S., et. al.: Acceleration of neutrophilic granulocyte recovery after bone-marrow transplantation by administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Lancet*, **2**: 38 \sim 39, 1988.
- 9) 正岡 徹, 森山美昭, 加藤俊一, 他: 骨髓移植における KRN 8601 (rh-G-CSF) の第II相臨床試験成績。今日の移植, **3**: 85 \sim 93, 1990.
- 10) Nemunaitis, J., Singer, J.W., Buckner, C.D., et. al.: Use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in autologous marrow transplantation for lymphoid malignancies. *Blood*, **72**: 834 \sim 836, 1988.

- 11) **Brandt, S.J., Peters, W.P., Atwater, S.K., et. al.:** Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on haematopoietic reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, **318**: 869~876, 1988.
- 12) **Teshima, H., Ishikawa, J., Kitayama, H., et. al.:** Clinical effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in leukemia patients: a phase I/II study. *Exp Hematol*, **17**: 853~858, 1989.
- 13) **Ohno, R., Tominaga, M., Kobayashi, T., et. al.:** Effect of granulocyte colony-stimulating factor after intensive induction therapy in relapsed or refractory acute leukemia. *N Engl J Med*, **328**: 871~877, 1990.
- 14) **Baldwin, G.C., Gasson, J.C., Kaufman, S.E., et. al.:** Nonhematopoietic tumor cells express functional GM-CSF receptors. *Blood*, **73**: 1033~1037, 1989.
- 15) **Berdel, W.E., Danhauser-Riedl, S., et. al.:** Various human hematopoietic growth factors (Interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal growth of nonhematopoietic tumor cells. *Blood*, **73**: 80~83, 1989.
- 16) **Young, D.C., Demetri, G.D., Ernst, T.J., et. al.:** In vitro expression of colony-stimulating factor genes by human acute myeloblastic leukemia cells. *Exp Hematol*, **16**: 378~382, 1988.
- 17) **Begley, C.G., Metcalf, D. and Nicola, N.A.:** Primary human myeloid leukemia cells: comparative responsiveness to proliferative stimulation by GM-CSF or G-CSF and membrane expression of CSF receptors. *Leukemia*, **1**: 1~8, 1987.
- 18) **Griffin, J.D., Young, D., Herrmann, F., et. al.:** Effects of recombinant human GM-CSF on proliferation of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **67**: 1448~1453, 1986.
- 19) **Hoang, T., Nara, N., Wong, G., et. al.:** Effect of recombinant GM-CSF on the blast cell of acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **68**: 313~316, 1986.
- 20) **Kelleher, C., Miyauchi, J., Wong, G., et. al.:** Synergism between recombinant growth factors, GM-CSF and G-CSF, acting on the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **69**: 1498~1503, 1987.
- 21) **Vellenga, E., Young, D.C., Wagner, K., et. al.:** The effects of GM-CSF and G-CSF in promoting growth of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **69**: 1771~1776, 1987.
- 22) 林 雲峰, 他: 遺伝子組換え G-及び GM-CSF の白血病性幹細胞に対する効果: 日血会誌, **51**: 1115~1121, 1988.
- 23) **Delwel, R., Salen, M., Pellens, C., et. al.:** Growth regulation of human acute myeloid leukemia: Effect of five recombinant hematopoietic factors in a serum-free culture system. *Blood*, **72**: 1944~1949, 1988.
- 24) **Souza, L.M., Boone, T.C., Gabilove, J., et. al.:** Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effect on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, **232**: 61~65, 1986.
- 25) **Cannistra, S., Granshek, P., Griffin, J.D., et. al.:** Granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhances the cytotoxic effects of cytosine arabinoside in acute myeloblastic leukemia and in the myeloid blast crisis phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **3**: 328~334, 1989.

(平成3年2月26日受付)