

免疫組織化学的に証明されたG-CSF産生肺癌の1例

A Case of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF)-Producing Lung Cancer Proved by Immunohistochemical Analysis

荒木 潤¹・増本英男¹・浅井貞宏¹・南 寛行²・早田 宏³・阿部良行⁴

要旨：症例は59歳，男性で全身倦怠感および咳嗽を主訴として来院した。胸部X線写真では左下肺野に浸潤影を伴う腫瘤影を認めた。検査成績では，明らかな感染症がないにもかかわらず $32,000/\mu\text{l}$ と著明な白血球増多がみられた。血清中のG-CSF値は酵素標識免疫法で 298pg/ml と高値を示していた。臨床的に病期III Aの肺扁平上皮癌と診断し，左肺全切除術を施行した。手術時に得られた腫瘍組織の抽出液および腫瘍細胞の組織培養上清のG-CSF濃度は高値であった。rhG-CSFに対する特異的モノクローナル抗体を用いた免疫染色法では手術標本の腫瘍細胞は陽性に染まった。術後，白血球数および血清中のG-CSF値はすみやかに正常化した。現在，術後2年経過しているが，再発もなく健在である。

〔肺癌 33(4)：591～597, 1993〕

Key words：G-CSF, Lung cancer, Immunohistochemistry

はじめに

近年，悪性腫瘍における白血球増加症が腫瘍細胞による造血因子Colony stimulating factor (CSF)の産生によることが解り¹⁾，肺癌においてその報告が増えている。そしてその後G-CSF, GM-CSF, その他造血因子が解明され^{2),3)}，定量可能⁴⁾となってきた。今回，我々は肺癌患者で術前の血清中，また手術によってえた腫瘍組織の抽出液および腫瘍細胞培養上清でG-CSFを定量し高値を示し，更に手術材料においてG-CSFモノクローナル抗体の免疫組織化学染色でG-CSF産生を確認できた稀な症例を経験したので報告する。

症 例

59歳，男性，経理事務員。

主 訴：全身倦怠感，咳嗽，発熱。

家族歴：特記すべきものなし。

既往歴：20歳，腎臓結核にて右腎臓摘出。

喫煙歴：30本/日，40年間。

現病歴：1990年6月頃より全身倦怠感出現した。7月より咳嗽，喀痰もみられ，2カ月間で約10kgの体重減少を示した。そのため8月27日近医受診し，胸部X線を撮り異常影を認めたため翌日当科紹介入院となった。

入院時現症：身長158.5cm，体重45kg，体温 37.3°C 。脈拍82/整。眼瞼結膜に貧血を認めた。表在リンパ節は触知しなかった。胸部では聴診上左下肺野にて呼吸音の減弱を認めた。腹部は著変なく，四肢にも浮腫など異常は認めなかった。

1. 佐世保市立総合病院内科
2. 同 外科
3. 長崎大学第2内科
4. 東海大学病理

Table 1. Laboratory findings.

Peripheral blood		ALP	223 mU/ml
RBC	$288 \times 10^4 / \text{mm}^3$	LAP	45 mU/ml
Hb	7.3 g/dl	Ch-E	0.36 Δ pHl
WBC	$32000 / \text{mm}^3$	T-Ch	140 mg/dl
St	11 %	BUN	11.4 mg/dl
Seg	75 %	Cr	0.8 mg/dl
Eo	1 %	Na	134 mEq/dl
Ly	11 %	K	3.6 mEq/dl
Mo	3 %	Cl	98 mEq/dl
Plate	$71.8 \times 10^4 / \text{mm}^3$	Ca	8.3 mg/dl
Blood chemistry		P	3.4 mg/dl
T-Bil	1.0 mg/dl	Serology	
D-Bil	0.2 mg/dl	CRP	8.2 mg/dl
T-P	5.7 mg/dl	Fe	28 $\mu\text{g/dl}$
Alb	47.0 %	TIBC	176 $\mu\text{g/dl}$
$\alpha_1\text{-gl}$	7.3 %	G-elastase	242 mcg/l
$\alpha_2\text{-gl}$	15.6 %	CEA	2.0 ng/ml
$\beta\text{-gl}$	8.1 %	NSE	7.4 ng/ml
$\gamma\text{-gl}$	21.9 %	SCC	14.1 ng/ml
ZTT	7.3 U	AFP	1.8 ng/ml
TTT	0.5 U	ESR	65/130
GOT	21 mU/ml	Urinalysis: normal	
GPT	20 mU/ml	Stool: occult blood(-)	

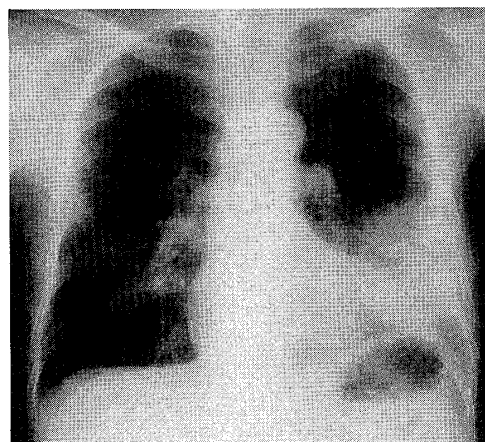
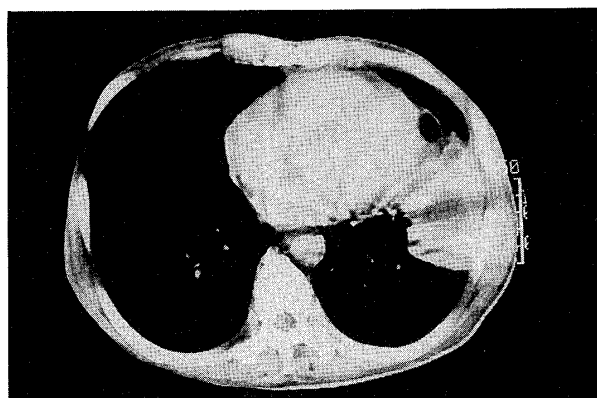
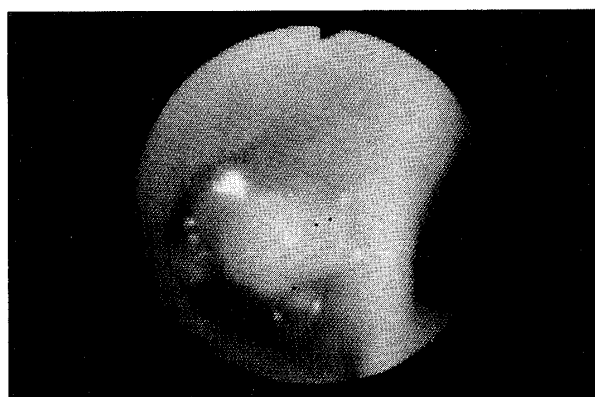
検査所見および臨床検査

入院時検査所見：血液検査(Table 1)にて著明な白血球増加がみられた。ほとんどが好中球で単核球は見られなかった。また血小板の増加も認めしたが、赤血球数およびHbは減少していた。生化学および血清検査では、総タンパクの減少、特にアルブミン値の減少、コリンエステラーゼ低下を認め低栄養状態と考えられた。また α_2 -グロブリン、ムコ蛋白、CRP高値で、炎症所見が強いため閉塞性肺炎に伴う好中球増多も考え、喀痰細菌培養を頻回に施行したが常在菌のみであった。静脈および動脈血細菌培養も行ったが陰性であった。好中球エラスターゼは若干高値を示していた。腫瘍マーカーはSCC抗原のみが高値を示した。

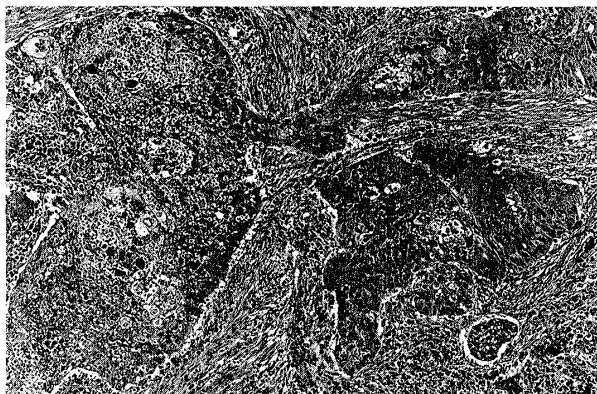
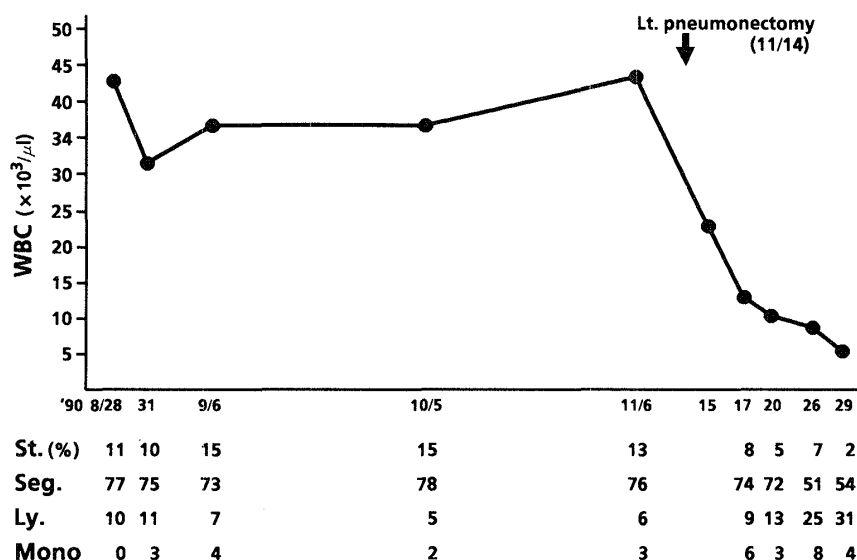
胸部X線写真(Fig. 1)：左下肺野に浸潤影を伴う腫瘤影がみられた。

胸部CT写真(Fig. 2)：左肺門部に腫瘤影とその末梢の下肺野に虚脱像がみられた。

気管支鏡検査(Fig. 3)：左B⁸入口部およびB⁹。

Fig. 1. Chest x-ray film on admission shows consolidation in the left lower lobe.**Fig. 2.** Chest CT scan showing a mass shadow in the S⁸ region of the left lung.**Fig. 3.** Bronchoscopy revealing tumor in the left B⁸.

に腫瘤を認め、同部の生検にて扁平上皮癌の診断を得た。他臓器への転移の有無を検索したが転移は認めず、臨床病期ⅢA期(T3N0M0)と診

Fig. 4. Cut-surface of the resected lung showing an irregular mass.**Fig. 5.** Histological findings of the resected tumor, showing squamous cell carcinoma with marked neutrophil infiltration. (H.E. stain $\times 90$)**Fig. 6.** White blood cell and differential counts of the patient during the hospital course.

断された。

以上より，1990年11月14日左肺全摘，胸壁および心膜合併切除術が施行された (Fig. 4)。

手術標本の病理組織像 (Fig. 5)：ほとんどすべての扁平上皮癌の胞巣の中に著明な好中球細胞浸潤が認められた。そして一部変性がみられた。一方間質ではリンパ球，形質細胞浸潤が主体であった。病理学的病期分類はI期 (T1N0M0) であった。

術後経過 (Fig. 6)：手術翌日の15日には，白血球数 23600，17日は13600，2週間後の29日には6500まで減少した。その後，膿胸を併発したため一時 26200まで増加したが抗生剤にて7000

-8000台に落ち着いた。現在術後2年1カ月経過しているが，白血球増多や再発の徴候は認めない。

G-CSF値 (Table 2)：G-CSF値は，中外製薬試験センターに依頼し recombinant G-CSF に対する抗体を用いたEIA法⁴⁾にて，測定していただいた。術前G-CSFを測定したところ298pg/ml (正常値60以下) と高値を示していた。術後，血中のG-CSF値は正常化した。また手術時に採取した腫瘍細胞を10%FBS加 PRMI 1640溶液内細切しピペティングし残渣を除去後， 2.5×10^4 cell/mlとなるように調節し，24穴ウェルに2mlずつ入れ37℃，CO₂インキュベータ内で培

Table 2. Measurements of the levels of G-CSF by the EIA using anti-recombinant G-CSF antibody.

Serum		
before operation ('90.9.6.)		298 pg/ml
after operation ('91.4.11.)		<60 pg/ml
Culture supernatant	7 days	14 days
control	<60 pg/ml	<60 pg/ml
tumor cells	<60 pg/ml	117 pg/ml
Extract		
tumor tissue		32.1 ng/g wet tissue
normal lung tissue		16.2 ng/g wet tissue

養した。培養上清中のG-CSFを測定したところ14日目で産生がみられた。また手術時に採取した、切除標本の腫瘍部と正常肺と思われる部の組織の抽出液中のG-CSFを測定したところ、著しく高値を示した。

GM-CSFおよびIL-8値(Table 3): GM-CSFおよびIL-8値は三菱油化ビーシーエルに依頼しEIA法(GM-CSFはGenzyme社のhuman GM-CSF Elisaキット, IL-8は東レ富士バイオニクス株式会社製ヒトインターロイキン8 Elisaキットを使用)により測定していただいた。手術で採取された腫瘍組織抽出液および正常部と思われる肺組織抽出液中の濃度を測定したところGM-CSF値は共に高くはなかったが、IL-8は腫瘍組織内でやや高値であった。

腫瘍組織抽出液の好中球走化性: 好中球走化性はFalkらの方法⁵⁾を用い検討したが好中球は腫瘍組織抽出液に対し走化性を示さなかった。

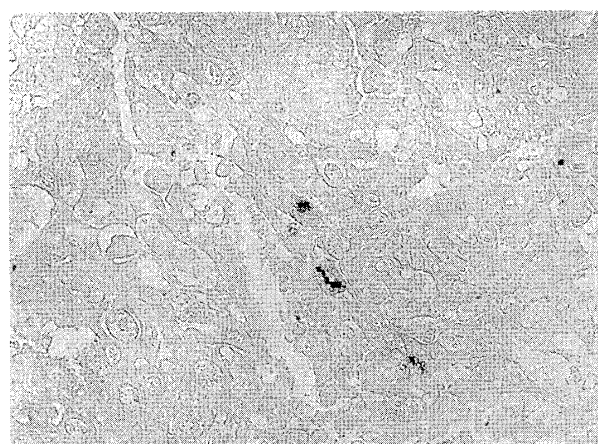
免疫組織学的検討(Fig. 7): 抗G-CSFモノクローナル抗体を用いた免疫染色⁶⁾で腫瘍細胞内に陽性に染まり、G-CSF産生が証明された。

G-CSF遺伝子発現: 原発巣より得られた凍結腫瘍組織よりRNAを分離精製を試みたが、凍結保存の状態が悪かったためかRNAが殆ど分解し、G-CSFの遺伝子発現は確認できなかった。

以上よりG-CSF産生腫瘍と診断された。

Table 3. Concentration of GM-CSF and IL-8 in extract of the tumor tissue and the normal lung tissue.

	tumor tissue	normal lung tissue
GM-CSF	<2 pg/ml	4.4 pg/ml
IL-8	15.8 ng/ml	4.65 ng/ml

Fig. 7. Immunohistological staining using anti-G-CSF antibody, showing positive staining in the cytoplasm of the tumor cells. (×360)

考 察

肺癌におけるCSF産生腫瘍の報告は1977年Asanoら¹⁾によりはじめて報告された。その後、我々の症例を含め、35例の報告がある。年齢は36歳から83歳(平均57.7歳)で、性別は男性27例、女性8例であった。組織型では大細胞癌23例と最も多く、ついで扁平上皮癌7例、腺癌3例、腺扁平上皮癌1例、小細胞癌1例であった。この中でCSFのサブタイプがわかっているのは最近報告された11例のみで、GM-CSF産生腫瘍6例、G-CSF産生腫瘍5例であった。予後に関しては非切除例も含め非常に不良であるとの報告⁵⁾もあるが、その後我々の症例も含め2年以上の再発をみない症例⁷⁾も出てきており、今後症例を増やし病期等の予後因子を含め検討する必要がある。

CSF活性に関し、Asanoら¹⁾はヌードマウスに腫瘍細胞を移植し、その血漿や腫瘍抽出液中にマウスや人の骨髄細胞のCSF活性を有することを証明した。その後、一般に人骨髄細胞を用

いてCSF産生腫瘍の証明がされるようになり，Kimura等⁸⁾は大細胞癌の細胞培養液からガスクロマトグラフィーを用いCSFを分別した．しかしCSFはG-CSF，GM-CSF，M-CSF，IL-3等に分類されるようになり，Nagataら⁹⁾により遺伝子構造が解明され，更には合成されるに至って，1989年，はじめてMotojimaら⁴⁾によってenzyme immunoassay (EIA法)でG-CSFが定量出来るようになった．この方法はG-CSFのみを測定し，他のCSFは測定しないと述べている．今回我々も，この方法で測定しG-CSF産生腫瘍であることが示唆された．そして最終的に免疫組織学的に腫瘍細胞内のG-CSFを確認することで確診された．この免疫組織染色法はShimamuraら⁹⁾により確立されG-CSFに特異的に染まり，他のCSF (GM-CSF，IL-3)には染まらず，一般のホルマリン固定のパラフィン切片を用いて出来ることから，G-CSFの存在を容易に証明でき大変有用である．しかし今までの報告ではG-CSF産生腫瘍の臨床材料で染まった報告がなく，マウスに腫瘍細胞を移植し，そこで増殖した腫瘍細胞中に抗G-CSFモノクローナル抗体で証明されたものがあるが¹⁰⁾，我々の調べ得た範囲では臨床材料で1例目と思われる．臨床材料で免疫組織学的にG-CSFが証明出来にくいことに関し，G-CSFが腫瘍細胞において細胞内貯留時間が短く速やかに細胞外に放出されるため¹¹⁾と考えられている．このことは，今回我々の症例で腫瘍組織抽出液中に大量のG-CSFが測定されたにも関わらず，免疫組織学染色で染まってきた細胞がわずかであったこと，また最近G-CSFが電子顕微鏡学的に細胞内でCisternaの拡張をとまなうことなく，peri-nuclear spaceや粗面小胞体を通して分泌されとの報告¹²⁾からも，これを裏付けるものと思われた．本症例において興味深い点は，血清中G-CSF濃度が298pg/mlであるのに対し，手術時の腫瘍抽出液では，16072pg/dlと著しく高値を示しており，更に同時に採取した正常肺組織

抽出液でも高値を示していたことであるが，これは手術時の操作のため，正常組織中に腫瘍組織からG-CSFが流出したものか，理由が不明であった．また術前，血清中の好中球エラスターゼがやや高値を示していたことは局所や全身に，G-CSF産生腫瘍が悪い影響を与える可能性もあり，今後注意する必要があるのではと思われる．

また興味深いことは，切除標本の組織像でほとんどの腫瘍組織内に，一部では膿瘍を思わせるほど好中球浸潤を認めたことで，その周囲の間質ではリンパ球や形質細胞浸潤が主体であったことである．この所見からするとG-CSF自体には走化性を有していないことから¹³⁾好中球を集めるような走化性因子を腫瘍が出しているのではと思われる．腫瘍組織抽出液中のIL-8の濃度を測定したところ周囲の正常肺組織部分より高値を示していた．しかし腫瘍組織抽出液のそのものを用いて走化能を調べてみたが走化能は示さなかった．従ってIL-8は貪食した好中球自体から産生，放出されとの報告¹⁴⁾もあり，IL-8が高値なのは腫瘍が産生したのではなく二次的に好中球が産生したとも考えられた．また可能性として，IL-8やそれ以外の走化性因子を腫瘍が出すと共に，腫瘍内に逆に走化性を阻止し，遊走能を抑制するような因子が存在することも考えられた．

まとめ

G-CSF産生した肺扁平上皮癌の1手術例を経験したので報告した．血液，腫瘍組織抽出液，腫瘍細胞培養上清中のG-CSF濃度測定でいずれも高値を示していた．また手術材料においてG-CSFモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色でG-CSF産生が確認できた稀な症例であった．

尚，本論文の要旨は第32回日本肺癌学会総会において発表した．

文 献

- 1) Asano S, Urabe A, Okabe T, et al : Demonstration of granulopoietic factors in the plasma of nude mice transplanted with human lung cancer and in the tumor tissue. *Blood* 49 : 845-852, 1977.
- 2) Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, et al : Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 319 : 415-417, 1986.
- 3) Wong GG, Witek JS, Temple PA, et al : Human GM-CSF : Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* 228 : 810-815, 1985.
- 4) Motojima H, Kobayashi T, Shimane M, et al : Quantitative enzyme immunoassay for human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). *J Immunol Method* 118 : 187-192, 1989.
- 5) Falk W, Goodwin RH and Leonard EJ : A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Method* 33 : 239-247, 1980.
- 6) 藤野道夫, 木村秀樹, 山口 豊, 他 : 白血球と血小板の異常高値を示したColony stimulating factor (CSF)産生肺大細胞癌の一手術例. *肺癌* 32 : 245-251, 1992.
- 7) 寺町政美, 宮本信昭, 山本恭通, 他 : G-CSF産生腫瘍と考えられた肺大細胞癌の1例. *日胸疾会誌* 30 : 1327-1331, 1992.
- 8) Kimura N, Niho Y, Yanase T : Characterization of colony-stimulating activity in medium conditioned by a human cell line (KSNY). *Gann* 70 : 811-815, 1979.
- 9) Shimamura K, Fujimoto J, Hata J, et al : Establishment of specific monoclonal antibodies against recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF) and their application for immunoperoxidase staining of paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 38 : 283-286, 1990.
- 10) Shijubo N, Inoue Y, Hirasawa M, et al : Granulocyte colony-stimulating factor-producing large cell undifferentiated carcinoma of the lung. *Int Med* 31 : 277-280, 1992.
- 11) 阿部良行, 中村雅登, 加藤優子, 他 : 顆粒球コロニー刺激因子産生肺癌の一例. *肺癌* 32 : 279-284, 1992.
- 12) Akatsuka A, Shimamura K, Katoh Y, et al : 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.
- 13) 廣田正毅, 門田淳一, 千住玲子, 他 : 顆粒球コロニー形成刺激因子(G-CSF)の感染防御効果に関する研究 I. G-CSFによる好中球polarizationの誘起. *感染症学* 64 : 425-429, 1990.
- 14) Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, et al : Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/Interleukin 8. *J Exp Med* 173 : 771-774, 1991.

(原稿受付 1993年1月25日/採択 1993年3月16日)

**A Case of Granulocyte Colony-Stimulating Factor
(G-CSF)-Producing Lung Cancer Proved by
Immunohistochemical Analysis**

*Jun Araki¹, Hideo Mashimoto¹, Sadahiro Asai¹,
Hiroyuki Minami², Hiroshi Soda³ and Yoshiyuki Abe⁴*

Department of Internal Medicine¹ and Surgery²,
Sasebo City General Hospital

The Second Department of Internal Medicine,
Nagasaki University School of Medicine³

Department of Pathology, Tokai University School of Medicine⁴

A 59-year-old man was admitted to our hospital because of general malaise and cough. The chest X-ray film disclosed a mass shadow with infiltration in the left lower lung field. The laboratory data showed marked leukocytosis ($32,000/\mu\text{l}$) without any evidence of infection. The serum level of G-CSF (298pg/ml) was high by enzyme immunoassay. A clinical diagnosis of lung cancer (squamous cell carcinoma, stage IIIA) was made and left pneumonectomy was performed. The level of G-CSF was high not only in the extract of tumor tissue obtained at operation but also in the supernatants of cultured tumor cells. An immunoperoxidase staining method using specific monoclonal antibodies against rhG-CSF showed positive staining in the tumor cells of the surgical specimen. After the operation, white blood cell counts and the level of serum G-CSF soon returned to normal. The patient has been in good health for two years after surgery without any evidence of recurrence.