

氏 名 (本籍)	わた 渡 なべ 邊 やす 泰 あき 章
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 第 2416 号
学位授与年月日	平成 4 年 2 月 26 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
最終学歴	昭和 55 年 3 月 22 日 川崎医科大学医学部医学科卒業
学位論文題目	rG-CSF, rGM-CSF および rIL-3 による食道癌 患者肋骨骨髓細胞の性状と増殖動態

(主 査)

論文審査委員	教授 森 昌 造	教授 今 野 多 助
	教授 松 野 正 紀	

論 文 内 容 要 旨

近年、食道癌の治療成績は、手術々式の改良や、栄養管理、術後呼吸循環管理の進歩により向上してきた。しかし外科手術のみで完全治癒や長期生存を得難いことは過去の多くの報告からみても明らかであり、そのため、術前後の放射線療法、化学療法、免疫療法を駆使する集学的治療が必要とされている。当教室においても術後強力癌化学療法を行ない、ある程度の再発予防効果を認め、長期生存例も少数ながら出現するに至っている。しかし、治療対象となる症例のほとんどが60歳以上の高齢者で、もともと骨髓機能が低下していると考えられ、化学療法の副作用である骨髓機能抑制による白血球減少症のため、本法を完遂し得ない症例もかなり多い。

このため、当教室においても手術時、開胸操作に際して必然的に切除される肋骨片を無菌的に処理して骨髓細胞を採取し、凍結保存しておき、必要に応じて術後強力癌化学療法に頻発する白血球減少に対する自家骨髓移植を試みたが、解凍時の生細胞数に問題があり、いまだ実用化に至っていない。幸い当教室ではrG-CSF、rGM-CSF、rIL-3等の増殖因子を入手することが出来たので、これらを用いてin vitro下にヒト骨髓細胞の増殖動態がどのように変化するかを検討した。

【対象と方法】

昭和62年9月より平成元年2月まで当科で開胸術を施行した47例を研究対象とした。男女比は9:1で平均年齢は61.2歳であり、疾患の内訳は、食道癌45例、非食道癌2例で、食道癌症例は全例骨転移を認めず、また術前治療も受けていなかった。骨髓細胞採取に供した肋骨片は、現在、標準術式となっている肋間開胸法の際に切除されたものを用いた。採取した肋骨片を無菌的に処理し、骨髓細胞浮遊液を作製、rGM-CSFを用い軟寒天一層培養法により10日間培養し、GMコロニー形成を観察した。GMコロニーは食道癌13例、非食道癌2例の計15例について計測した。又、各種増殖因子を添加して一週間培養した。この間、連日、骨髓細胞数を算定するとともに、メイ・ギムザ染色による骨髓細胞標本作製し形態学的変化を観察した。

【結 果】

肋骨片より採取出来た骨髓細胞数は平均 3.2×10^7 個/cmであり、加齢ともなって漸減する傾向にあった。GMコロニーは、1症例あたり平均51個のコロニー形成を認めた。食道癌患者は平均47個、非食道癌患者は平均75個であり後者に多い傾向を認めた。この結果は、非食道癌患者の方が年齢も若く術前の栄養状態も良好であったことに起因するのではないかと思われた。骨髓細

胞数の変化をみると、無添加培養群では、培養開始後日を追って細胞数が減少し、7日目には約50%にまで減少した。一方、rG-CSF 10ng/ml 添加培養群では対毎比較において統計学的に有意差をもって、骨髓細胞の減少に対する抑制効果を認めた。他方、rGM-CSF 100units/ml 添加培養群では、骨髓細胞は培養1日目、2日目に幾分かの減少を認めたが3日目より増加傾向を示し5日目に最高となったが、対毎比較において統計学的に有意差は認められなかった。

rIL-3 (5単位/ml) 添加培養群では、骨髓細胞数は培養1日目に減少を示した後特に増加傾向も示さず、対毎比較においても統計学的に有意差は認められなかった。又、経日的な骨髓細胞の分画比率の変化をみると、骨髓芽球は各種増殖因子添加の有無に関係なく漸減傾向を示した。rG-CSF 添加時の好中球の各成熟分化像をみると、前骨髓球は培養1日目に増加を示し、以後同水準で推移した。骨髓球は培養1日目に明らかな減少を示した後2日目以降増加傾向を示したが、後骨髓球はほとんど変化を示さなかった。杆状核球は培養1日目に軽度増加を認めたが、以後変化を示さなかった。一方、分節核球は培養1日目に増加し3日目に最高となった。rGM-CSF 添加培養時には、前骨髓球は培養1日目に増加し3日目まで同水準であったが、以後は減少傾向を示した。骨髓球は培養3日目まで減少したが、その後増加傾向を示し、後骨髓球も培養5日目まで増加傾向を示した。杆状核球は微増を示したが、分節核球は培養3日目を最高に以後減少した。rIL-3 添加時には、前骨髓球はほとんど変化を示さず、骨髓球は培養3日目まで変化を示さなかったが、以後漸減した。後骨髓球、杆状核球は増加傾向を示したが、分節核球は培養4日目以降減少した。この結果は、ほとんど無添加群と同様であった。

【結 論】

今回の実験結果より、食道癌患者骨髓細胞に対する *in vitro* での各種増殖因子添加の効果が示された。今後、食道癌に対する新しい治療手段として術後強力癌化学療法施行時に、増殖因子の添加培養を行った自家肋骨骨髓細胞移植と増殖因子の全身投与の併用の臨床応用を積極的にすすめていきたいと考えている。

審査結果の要旨

食道癌患者は高齢者が多く、本患者の骨髄機能も一般的には年齢相応に低下しているとされている。本論文は、予後不良遠隔リンパ節転移陽性例 ($n_{3(+)}$, $n_{4(+)}$) に対し、当科にて行っている食道癌術後の合併療法、特に術後強力癌化学療法中に必発する副作用（骨髄機能抑制）を軽減させるため患者骨髄細胞を採取し、高齢者骨髄細胞が増殖因子によってどの程度反応するかを調べた基礎研究である。実験は、増殖因子として3種のサイトカイン（ γ G-CSF, γ GM-CSF, γ IL-3）を用い、骨髄細胞採取に供した肋骨片は、現在当科で標準術式となっている肋間開胸法の際に切除し、従来は廃棄されていた肋骨片を活用した。採取骨髄細胞数は平均 3.2×10^7 個/cm であり、加齢とともに漸減した。通常右第5, 6肋骨をそれぞれ約1~2cm 切除するので $6.4 \times 10^7 \sim 1.28 \times 10^8$ 個程度採取可能であるが、この細胞数では低骨髄機能を正常機能に再構築させ得る数には遠く及ばないことが分かった。このため、骨髄細胞の増殖に関する各種サイトカインを添加する in vitro 実験（骨髄細胞培養）を試みた。

① 細胞数の経時的変化：骨髄細胞数は、無添加培養群では培養7日目に約50%まで減少を示したが、 γ G-CSF 10mg/ml 添加培養群では、統計上、有意差をもって細胞の減少に対する抑制効果を認めた。これは、G-CSFの作用点がCFU-Gであり、顆粒球系がより早い分化増殖を示すため経日的な減少率が少なかったものと考えられた。 γ GM-CSF, 100 μ /ml 添加培養群、 γ IL-3, 5 U/ml 添加培養群においては、ともに統計学上の有意差は認められなかった。GM-CSFはより成熟したCFU-GMに作用するために、他方IL-3はmultipotent stem cellの分化増殖の初期段階にTriggerとして作用するために上記のごとき結果となった事が示唆された。

② 細胞分画の経時的変化：経日的な骨髄細胞の分画比率の変化では、骨髄芽球は、サイトカイン添加の有無に関係なく漸減傾向を示した。 γ G-CSF 添加群では培養3日目まで著明な顆粒球の増加傾向を示したが以後漸減し、本剤の短期可逆性作用が示された。一方、 γ GM-CSF 添加群では培養後半にも増加傾向を示したが、顆粒球がより未熟な段階より分化増殖してくるためと思われる、 γ G-CSFとの効果は明らかに異っていた。IL-3 添加培養群では、低あるいは高濃度でも骨髄細胞の増加傾向を示さず、無添加群と同様に減少傾向を示した。

本論文は、従来、手術時廃棄していた肋骨より骨髄細胞を採取し実験に応用することに思いついたこと、さらに高齢者の骨髄細胞を対称としたこと、また3種のサイトカインを用いて本剤の作用の薬効を解析したことは、これまでの報告には見られぬ新知見を得たものとして貴重である。これらの結果をふまえ骨髄移植を行う意図にあり、将来のこの種の研究の展開も期待でき、学位授与に値するものとする。