著明な白血球増多症を呈した上顎癌患者の1症例と その動物実験系の樹立

西村理行・米田俊之・西川典良・墨 哲郎
加藤逸郎・作田正義・高瀬俊幸*・藤本耕二**

A clinical course of the patient with epidermoid carcinoma of the maxilla associated with marked leukocytosis and an establishment of experimental model in nude mice

Riko NISHIMURA・Toshiyuki YONEDA・Noriyoshi NISHIKAWA
Tetsurou SUMI・Itsuro KATO・Masayoshi SAKUDA
Toshiyuki TAKASE*・Koji FUJIMOTO**

Abstract: Leukocytosis associated with malignant disease is known as a paraneoplastic syndrome. In this paper, we report the clinical course of a patient with maxillary cancer associated with marked leukocytosis. We also report the results of our attempt to establish an animal model in which pathogenesis of leukocytosis was studied.

A 52-year-old man with an epidermoid carcinoma of the left maxillary sinus (T3N2M0) was seen January 18, 1984. He manifested an increase in white blood cell count (29,300/mm³) with no clinical evidence of infection. When the tumor was resected surgically, white blood cell count returned to normal two weeks after surgery.

Recurrence of the tumor resulted in renewed leukocytosis. Furthermore, when he effectively received chemotherapy (VEMF therapy), leukocyte count decreased in parallel with an inhibition of tumor growth. Discontinuation of chemotherapy because of severe side effects renewed leukocytosis and at most serious time, leukocyte number went up to 172,000/mm³. More than 90% of leukocytes were granulocytes. From this clinical course, it is suggested that tumor is responsible for leukocytosis in this patient.

In order to confirm this we implanted the patient's tumor into athymic nude mice and succeeded in establishment of tumor-bearing nude mice. Tumor-bearing mice showed marked leukocytosis similar to that of the patient. Surgical excision of the tumor resulted in a dramatic reduction of leukocyte number. These results led us to presume that this tumor is a colony stimulating factor (CSF) producing tumor. We recently found that cancer cells isolated from the tumor release CSF into the culture medium, which supports our presumption. It is, therefore, proposed that nude mice bearing the patient's tumor are a suitable model to study pathogenesis of leukocytosis associated with malignancy.

大阪大学歯学部口腔外科学第2講座
(主任：作田正義教授)

* 市立豊中病院歯科口腔外科
(主任：高瀬俊幸部長)

** 市立伊丹病院歯科口腔外科
(主任：藤本耕二医長)

The Second Department of Oral and Maxillo-facial Surgery, Faculty of Dentistry, Osaka Uni-

versity (Chief: Prof. Masayoshi Sakuda)

* Department of Dentistry and Oral Surgery, Toyonaka Municipal Hospital (Chief: Dr. Toshiyuki Takase)

** Department of Dentistry and Oral Surgery, Itami City Hospital (Chief: Dr. Koji Fujimoto)

受付日：昭和62年10月22日

Key words: leukocytosis, colony stimulating factor, maxillary cancer

緒 言

悪性腫瘍を有する患者においては、しばしばその原発部位や転移部位と無関係に全身のあるいは系統的症状を呈することがあり、これは、悪性腫瘍随伴症候群 (Paraneoplastic Syndrome) として知られている^{1,2)}。われわれは、この数年、口腔領域悪性腫瘍患者に見られる各種の悪性腫瘍随伴症候群に注目し、臨床的に詳細な検討を重ねるとともに、その発症機序の解明を実験的に試みてきた。そして、すでにわれわれは、その1例として、白血球増多症と高カルシウム血症を呈した舌癌患者の臨床経過および患者の血清と尿を用いた実験結果について報告した³⁾。さらに、別の症例で肋骨および腰椎骨への転移を伴い著明な高カルシウム血症と白血球増多症を呈した舌癌患者の臨床経過と、その患者より得た腫瘍組織のヌードマウスへの移植実験の結果について報告した⁴⁾。

これらの症例と前後して、筆者らは、著明な白血球増多症のみを呈した上顎癌患者を経験したので、その臨床経過の概要について報告する。さらに、その患者の腫瘍組織をヌードマウスに移植することにより、白血球増多症の発症機序の解明を目的とした動物実験系を確立したので、その実験結果についても報告する。

症 例

患 者：52歳 男性。

主 訴：左側頬部の腫脹および圧痛。

既往歴：昭和58年2月より胃潰瘍にて某病院で投薬治療をうけている。他に特記すべき事項は認めない。

家族歴：特記すべき事項は認めない。

現病歴：昭和58年12月初旬頃より上顎左側臼歯の動揺と、同部歯肉に腫脹を覚え、某歯科にて⑤の抜髄処置を受けるも、症状の改善を認めなかった。同12月下旬より左側犬歯窩付近の圧痛と鼻閉感を伴うようになったため、再度、同歯科にて同歯牙の根管治療を受けるも症状は改善されなかった。翌1月初旬には左側眼窩下部から左側頬部にかけて激しい自発痛を覚えるようになったので、某病院歯科口腔外科を受診し左側歯性上顎洞炎と診断された。同院にて行った臨床検査において、末梢白血球数が $27,000/\text{mm}^3$ に増加しており、急性炎症によるものと考えられたため、同日より入院下にて抗生物質の点滴静注を受けるも症状および末梢白血球数の改善を認めないため、当科を紹介され受診した。

初 診：昭和59年1月■日。

現 症

全身所見：体格は中等度、栄養状態は普通に他に特記

写真1 CT 所見

すべき事項は認めない。

口腔外所見：左側頬部から左側眼窩下部にかけて圧痛を伴う慢性性の腫脹を認めた。左側眼窩下部には、知覚麻痺が存在し、左側鼻腔より鼻およびわずかな鼻出血を認めた。左側および右側顎下部に、小指頭大・可動性・弾性硬で圧痛を伴わないリンパ節を、左側肩甲部に小指頭大・可動性・弾性やや硬で圧痛を伴わないリンパ節を触知した。

口腔内所見：③-⑥の齦頬移行部から口蓋側にかけて弾性硬、圧痛を伴う腫脹を認めた。表面粘膜は易出血性で潰瘍を伴い、④に著明な動揺ならびに打診痛を認めた。

レントゲンおよびCT所見：左側上顎洞に腫瘍性のレントゲン不透過像を認め、上顎洞前壁および左側鼻腔側壁の骨破壊を伴っていた(写真1)。

臨床診断：左側上顎癌 (T3N2M0)。

臨床検査所見：末梢白血球数が $29,300/\text{mm}^3$ と高値で、その分画では顆粒球が81%を占めていたが、幼若白血球は認められなかった。また、骨髓穿刺においても白血球の存在は、否定された。CRPは、3+と高く、血沈も23mmと亢進していた。血清カルシウム値、血清リン値は、正常値であり、その他のデータには特に異常を認めなかった。

病理組織診断：低分化型扁平上皮癌(写真2)。

処置ならびに経過(図1)：昭和59年2月10日に左側全顎部郭清術、右側上顎部郭清術、左側上顎骨全摘出術を施行した。その結果、術前 $29,000 \sim 39,000/\text{mm}^3$ と高値を示していた末梢白血球数は、術後約2週間で、 $7,800/\text{mm}^3$ と正常値まで減少し、顆粒球の占める割合も66%と減少した。

しかし同3月中旬に、軟口蓋の手術断端部に腫瘍の再発を認めたため、放射線療法として ^{60}Co を4,500rad外照射し、化学療法としてペブロマイシン80mgを静

図1 患者の臨床経過

写真2 手術摘出物の病理組織像 (H-E, $\times 400$)

注投与し、その後に腫瘍切除術を施行し、一応の腫瘍の消失を見た。この間、末梢白血球数は、 $15,000/\text{mm}^3$ 前後と比較的高値で、術後も漸増傾向を示した。同6月下旬に再度、腫瘍の再発を認めたため、PM療法（ペブロマイシン $3\text{mg} \times 7$ 、マイトマイシンC 10mg ）およびペブロマイシンの腫瘍組織への局注を施行したが効果なく、腫瘍は増大傾向を示し、それに並行して末梢白血球数は、著明に増加した。そこでPM療法を中止し、VEMF療法（ビンクリスチン $0.75\text{mg} \times 2$ 、サイクロフォスファミド $200\text{mg} \times 2$ 、メソトレキセート $10\text{mg} \times 2$ 、5-FU $250\text{mg} \times 5$ ）を施行したところ、腫瘍の増殖は著明に抑制され、注目すべきことに、末梢白血球数も著しく減少した。しかし副作用のためVEMF療法を中止すると、腫瘍の増殖は著明となり、それに伴って末梢白血球数も最高時には $172,000/\text{mm}^3$ まで上昇した。そして、最終的には腫瘍の肺転移による呼吸不全にて死亡

した。

なお、臨床経過中において、血清カルシウム値および血清リン値は正常範囲であった。また、白血球増多症に起因すると思われる症状も認められなかった。

実験方法

詳細についてはすでに報告⁴⁾したので、ここではその概略だけを記す。

1. 患者腫瘍のヌードマウスへの移植と末梢白血球数の測定

腫瘍の移植の前処置として、ヌードマウスのナチュラルキラー活性（NK活性）を抑制する目的で抗ヌードマウス抗血清をヌードマウスの腹腔内に注射した。これにより移植腫瘍の生着率が上昇することを報告しているが⁴⁾、今回も同様の方法を用いた。

試験切除にて本患者より無菌的に得られた腫瘍組織を、 4°C の抗生物質を含むリン酸緩衝生理食塩水中でよく洗浄し、ハサミで細切した。その腫瘍片を移植用トロッカーを用いて、抗ヌードマウス抗血清で前処置した生後4～6週齢の雌のヌードマウス（BALB/c AJ c1-nu/日本クレア社）の皮下に移植を行い、移植後の末梢白血球数を経時的に測定した。なお、採血は心穿刺によった。

2. 担癌ヌードマウスの腫瘍切除とそれに伴う末梢白血球数の変化

担癌となった移植後3週めのヌードマウスの腹腔内にネブタール（ヌードマウスの体重 1g あたり 0.067mg ）を注射し、麻酔後に腫瘍組織を外科的に切除し、その後の末梢白血球数の変化を経時的に測定した。また、切除

写真3 患者腫瘍を移植され担癌となったヌードマウス

写真4 担癌ヌードマウスの腫瘍の病理組織像 (H-E, ×200)

した腫瘍は通法により組織学的に検索した。

実験結果

1. 患者腫瘍のヌードマウスへの移植

腫瘍組織移植3週後には、写真3に示すごとく明らかな腫瘍の形成を認めた。また、担癌ヌードマウスの腫瘍組織は、病理組織学的には本症例の患者と同様な低分化型扁平上皮癌であった(写真4)。

2. 担癌ヌードマウスの末梢白血球数の変化

図2に示したように、腫瘍の増大に伴って、担癌ヌードマウスの末梢白血球数は著明に増加し、移植後4週には、 $650,000/\text{mm}^3$ まで上昇し、その分画においては、顆粒球が90%以上を占めていた。また、移植3週めに腫瘍の切除を行った実験群では、腫瘍切除3日後に、その末梢白血球数は著しく減少し、さらに腫瘍の再発に伴って末梢白血球数は再び増加した。

図2 担癌ヌードマウスにおける白血球増多症の経時的变化

考察

本症例における白血球増多症の発症機序において、その臨床経過から、本患者の腫瘍が強く関与していると思われる。すなわち、腫瘍の増大に伴って末梢白血球数が増加し、腫瘍に対して放射線治療や化学療法などの効果的な治療を行うと末梢白血球数が減少し、さらには、腫瘍の再発に伴って末梢白血球数が再び増加した。このことより、本患者の腫瘍が宿主に対して何らかの影響を及ぼすことにより白血球増多症が誘発されたのではないかと考えられた。このことを確かめるために行ったヌードマウスへの患者腫瘍の移植実験においても、患者の臨床経過と同様な結果が得られた。患者腫瘍を移植され、担癌となったヌードマウスが、その腫瘍の増大に比例して白血球増多症を示し、腫瘍を切除すると白血球数が正常に復し、さらに腫瘍が再発すると、白血球数も増加した。以上より患者腫瘍が白血球増多症を引き起こしている、すなわち、本患者の腫瘍は Colony Stimulating Factor (CSF) 産生腫瘍であると考えられた。CSF 産生腫瘍については文献(4)に詳しく記述したのでここでは省略する。また今回の報告ではデータを示していないが、すでにわれわれはヌードマウスから切除した腫瘍より、腫瘍細胞の分離培養に成功しており、この腫瘍細胞の培養上清中に高い CSF 活性が存在していることを見

い出している。したがってこの腫瘍が CSF 産生腫瘍であることには間違いがない。(培養細胞を用いた実験については後日報告する予定である。)

ところで上顎癌患者で白血球増多症を呈した症例に関しては東家らの 1 例⁹⁾、あるいは尾形らの 3 例の報告⁶⁾がある。これらの症例は、いずれも同時に高カルシウム血症を併発していた。このことは、すでに述べたように⁴⁾ わが国では高カルシウム血症と白血球増多症とが併発する場合がかなり多いという事実によく合致する。われわれも、二つの症状を同時に呈した舌癌患者を 2 症例報告した^{3,4)}。これに対し今回報告した上顎癌患者症例は、高カルシウム血症を伴わず、白血球増多症のみを呈した。悪性患者で高カルシウム血症のみを示す症例は数多く見られるが、白血球増多症のみを呈した今回のような症例は比較的まれである。ではなぜ、白血球増多症が単独で発症する場合と高カルシウム血症を併発する場合があるのであろうか。

腫瘍から産出される CSF が骨髄中の血液幹細胞の増殖および分化を促進させること⁷⁾、分化した血液幹細胞の一つとして、骨吸収において中心的役割を演じている破骨細胞があること⁸⁾、高カルシウム血症の最大の原因は骨吸収の増加であること^{9,10)}、臨床的に白血球増多症は高カルシウム血症を伴うことが多いのに対して、高カルシウム血症は、単独で起こり得ること⁴⁾などから、両症状が併発している場合には、どちらの発症過程においても腫瘍から分泌された CSF がなんらかの役割を演じていると推察することは、論理的に妥当であると思われる。しかしながら、本症例のように白血球増多症のみを伴う悪性腫瘍が存在することは、高カルシウム血症を併発するためには、CSF による血液幹細胞から破骨細胞への分化の促進だけでは不十分であり、また現時点では CSF の骨吸収活性の有無については明確な見解は得られていないことから、CSF とは全く異なる骨吸収促進因子の存在も必要であることを示唆していると考えられる。最近、インターロイキン 1 (IL-1) が血管内皮細胞や線維芽細胞のような正常の細胞において CSF 産生を促進することが報告されている¹¹⁻¹⁵⁾。また、IL-1 が強い骨吸収活性を有していることが明らかにされている¹⁶⁻¹⁹⁾。そして、腫瘍細胞も IL-1 を産生していることが確かめられている²⁰⁾。これらの事実を考え合わせると、高カルシウム血症と白血球増多症が併発する場合には、その発症メカニズムの一つとして次のような仮説が考えられる。腫瘍から産出される IL-1 が骨を吸収して高カルシウム血症を誘発すると同時に、もう一方で、宿主の組織内での CSF 産生を高めることにより白血球増多症をも惹起させるのかもしれない。高カルシウム血症のみの場合には、腫瘍が IL-1 以外の骨吸収促進因子を分泌しており、白血球増多症のみの場合には、腫瘍自身が CSF を分泌するか、あるいは、宿主の組織での CSF

産生を促進する物質で、IL-1 以外のものが腫瘍から放出されていると想像される。この仮説に関しては現在検討中である。

われわれはすでに、高カルシウム血症と白血球増多症とを同時に呈するヌードマウス実験系を確立しており、また後日報告する予定であるが、高カルシウム血症のみを呈するヌードマウス実験系の確立にも成功している²¹⁾。したがって、今回報告した白血球増多症のみを呈するヌードマウス実験系と合せて、3つの実験モデルを利用することにより、これら腫瘍に伴う症候群の発症メカニズムを解明してゆきたいと考えている。

結 語

著明な白血球増多症を呈した上顎癌症例について、その臨床経過の概要について報告した。そして、患者腫瘍を移植され担瘤となったヌードマウスにも患者と同様の白血球増多症を再現することに成功した。したがってこの腫瘍は、いわゆる CSF 産生腫瘍であることが明らかとなった。また、このヌードマウスは白血球増多症の病態、さらには CSF による血液細胞の分化および増殖への作用や、白血球減少症に対する CSF の臨床応用などの研究を進める上で非常に有用な実験系になると思われる。

本論文の要旨は、第23回日本癌治療学会および第10回日本頭頸部腫瘍学会にて発表した。

引 用 文 献

- 1) 有吉 寛：内分泌異常、癌と化学療法 13: 2023-2030 1986.
- 2) 桜田恵右, 宮崎 保, 他：造血器異常、癌と化学療法 13: 2039-2055 1986.
- 3) 米田俊之, 別所正明, 他：高カルシウム血症および白血球増多症を伴った舌癌の 1 症例—その発症機序について— 日口外誌 31: 1917-1924 1985.
- 4) 米田俊之, 西川典良, 他：肋骨および腰椎骨への転移を伴い著明な高カルシウム血症および白血球増多症を呈した舌癌患者と患者腫瘍のヌードマウスへの転移による高カルシウム血症および白血球増多症の再現。日口外誌 33: 1555-1565 1987.
- 5) 東家倫夫, 黒田建彰, 他：著明な白血球増多症と高 Ca 血症を伴った上顎癌の一症例—CSF 産生腫瘍。日耳鼻誌 84: 1554-1562 1981.
- 6) 尾形秀樹, 長峯岳司, 他：高カルシウム血症を生じた下顎骨扁平上皮癌の 2 症例。日口外誌 31: 363-371 1982.
- 7) 高久史磨：CSF、癌と化学療法 14: 1216-1223

- 1987.
- 8) Scheven, B.A.A., Visser, J.W.M., et al.: *In vitro* osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature* 321: 79-81 1986.
- 9) 米田俊之: 破骨細胞活性化因子とその臨床応用. *臨床科学* 21: 503-511 1985.
- 10) Mundy, G.R., Ibbotson, K.J., et al.: Tumor products and the hypercalcemia of malignancy. *J Clin Invest* 76: 391-394 1985.
- 11) Rennick, D., Yag, G., et al.: Control of hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: Lipopolysaccharide and Interleukin 1 inducible production of colony stimulating factors. *Blood* 69: 682-691 1987.
- 12) Sieff, C.A., Tsai, S., et al.: Interleukin 1 induces cultured human endothelial cell production of granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J Clin Invest* 79: 48-51 1987.
- 13) Bagby, G.C., Dinarello, C.A., et al.: Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony stimulating activity release by vascular endothelial cell. *J Clin Invest* 78: 1316-1323 1986.
- 14) Zucali, J.R., Dinarello, C.A., et al.: Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E_2 . *J Clin Invest* 77: 1857-1863 1986.
- 15) Segal, G.M., McCall, E., et al.: Interleukin 1 stimulates endothelial cells to release multilineage human colony-stimulating activity. *J Immunol* 138: 1772-1778 1987.
- 16) Heath, J.K., Saklatvala, J., et al.: Pig Interleukin 1 (Catabolin) is a potent stimulator of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 37: 95-97 1985.
- 17) Sato, K., Fujii, Y., et al.: Stimulation of prostaglandin E_2 and bone resorption by recombinant Interleukin 1 alpha in fetal mouse bones. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 618-624 1986.
- 18) Gowen, M. and Mundy, G.R.: Actions of recombinant Interleukin 1, Interleukin 2 and Interferon- γ on bone resorption *in vitro*. *J Immunol* 136: 2478-2482 1986.
- 19) Stashenko, P., Dewhirst, F.E., et al.: Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* 138: 1464-1468 1987.
- 20) 石田名香雄, 吉田 彪: 癌治療における cytokines の役割. 総説. 癌と化学療法 14: 1187-1193 1987.
- 21) 米田俊之, 西川典良, 他: 悪性体液性高カルシウム血症 (Humoral hypercalcemia of malignancy, HHM) を呈した下顎骨肉癌患者の1症例と患者腫瘍担癌ヌードマウスの樹立. 日口外誌 (投稿中).