G-CSF にて動員された顆粒球輸血の好中球機能

— G-CSF 投与は正常ヒト好中球の遊走活性には無影響 —

加藤雅子・高田雅史・中山道弘・梅田正法*

Neutrophil functions in granulocyte transfusions mobilized by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) : Chemotaxis of neutrophils unchanged in healthy donors after the administration of G-CSF

We attempted to investigate whether chemotaxis of neutrophils from healthy donors could be enhanced by G-CSF therapy. Two donors for granulocyte transfusions received intravenous administration of 2 μ g/kg G-CSF 16 hours before leukapheresis. Phagocytic activity of neutrophils from healthy donors after administration of G-CSF increased compared to those taken before G-CSF administration.

In contrast, random mobility and chemotaxis toward Zymosan-activated serum and filtrate of *E. coli* were unchanged. After G-CSF administration, neutrophils collected by leukapheresis showed augmented chemotaxis and random mobility as compared with those collected by venipuncture. However, leukapheresis procedure had no effect on phagocytosis. Neutrophil function was not affected by irradiation. Concerning the discrepancy between chemotaxis and phagocytosis, an increased neutrophil adhesion may result in depressive chemotaxis and enhanced phagocytosis.

And the fact that random mobility and chemotaxis of neutrophils enhanced after leukapheresis suggests that during the continuous flow centrifugation process, secondary cytokines may be released into circulation in response to G-CSF, which leads to the enhancement in neutrophil migration.

Rec. 11/21/1995, Acc. 12/4/1995, pp 187~190

Masako Katoh • Masafumi Takada • Michihiro Nakayama • Masanori Umeda*

key words : granulocyte colony-stimulating factor, chemotaxis, phagocytosis, granulocyte transfusions, leukapheresis

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) を *in vivo* で投与すると末梢血好中球の数を増加させ、好中球の寿命を延長させ¹⁾、さらに貪食能^{3,3)}、スーパーオキシドなどの活性酸素生成能^{3~5)}および好中球アルカリホスファターゼ活性²⁾などの好中球機能を亢進させることが知られている。そのなかで、好中球遊走能に関しては一定の見解がまだなく、G-CSF の投与により、それまで減弱していた好中球遊走能が回復した⁶⁾という報告と、不変であった^{3~5,7)}との報告や、かえって低下したとの報告^{7,8)}がある。また、*in vitro* では、G-

CSF が健常者好中球の遊走能を低下させる⁹⁾とも報告されている。

今回、顆粒球輸血の健常者ドナーに G-CSF を投与する機会があったので、G-CSF の投与が健常ヒト好中球の遊走活性と貪食活性に及ぼす影響について検討した。

また、G-CSF 投与後、leukapheresis 法にて分離した好中球と、leukapheresis 開始直前にフィコール法で分離した好中球との間の比較、さらには radiation 照射による影響についても検討した。

対象と方法

(1) 顆粒球輸血

G-CSF で動員された顆粒球輸血を受けたの

* First Department of Internal Medicine, Toho University 東邦大学医学部第一内科学教室
Offprint requests to : Masako Kato, First Department of Internal Medicine, Toho University 6-11-1, Ohmori-nishi, Ohta-ku, Tokyo 143, Japan

は、17歳、男性の急性骨髄性白血病病例で、化学療法後の好中球減少期に急性虫垂炎を併発し緊急手術を要した例である。また、 $2\mu\text{g/kg}$ G-CSFの静脈内投与を受けた健康者ドナーは、同症例の父親(47歳)と姉(19歳)であった。G-CSF投与直後はかえって一過性の好中球減少をきたす^{2,7,8)}ので、G-CSF投与後、好中球数の増加する16時間後に連続自動血球分離装置(Fresenius AS-104, Amco Co.)で約2時間かけ leukapheresis を行い、得られた顆粒球分画はコバルト照射後に輸血した。

(2) 好中球分離および機能測定

好中球機能の測定は、イースト粒子取り込み法による貪食能²⁾およびアガロース法による遊走能¹⁰⁾を行い、遊走因子としては大腸菌培養濾液(BCF)と活性化補体であるザイモザン活性化血清(ZAS)の2種類を用いた。

好中球分離は、ヘパリン加採血、デキストラン生食法、フィコール・コンレイ法および低浸透圧赤血球破碎法の順で分離し^{2,10)}、好中球数は $5 \times 10^7/\text{ml}$ (遊走能測定)、および $5 \times 10^6/\text{ml}$ (貪食能測定)に調整して行った。

G-CSF投与前と投与16時間後に、末梢血からフィコール法で分離した好中球につき、これらの機能を比較した。また、G-CSF投与後、末梢血からフィコール法で分離したものと、leukapheresis法で分離されたもの、さらには radiation 後においてもこれらの好中球機能を比較した。

結 果

(1) 好中球数の推移

各健康者ドナーでのG-CSF投与前、投与16時間後の好中球数の推移は、父親で $6,700/\mu\text{l}$ から $23,500/\mu\text{l}$ に、また、姉では $5,200/\mu\text{l}$ から $14,500/\mu\text{l}$ にいずれも増加していた。G-CSF投与による副作用はみられなかった。

(2) 遊走能の推移

図1Aに1名のドナーでの好中球遊走能の成績を示した。ZAS, BCFいずれの遊走因子に対するchemotaxisも、また、random mobilityも、 $2\mu\text{g/kg}$ G-CSF投与16時間後では、G-CSF投

図 1

A : Chemotactic activity of neutrophils before and after G-CSF administration isolated from blood collected by venipuncture and by leukapheresis.

B : Phagocytosis of neutrophils before and after G-CSF administration isolated from blood collected by venipuncture and by leukapheresis.

Data are expressed as mean $\pm$ SD.

The number of evaluation was 6 in chemotaxis, 12 in random mobility and 3~4 in phagocytosis.

Statistical significance was determined by Student's *t*-test.

与前とくらべ、変化は認められず、亢進も減弱もみられなかった。

一方、G-CSF投与後、leukapheresis開始直前にフィコールで分離した好中球とくらべると、leukapheresisで分離された好中球のrandom mobility, chemotaxis to BCF および chemotaxis

to ZAS はそれぞれ $166.1 \pm 9.7\%$ (mean $\pm$ SD) ($P < 0.001$), $145.8 \pm 1.2\%$ ($P < 0.001$) および $115.8 \pm 5.2\%$ ($P < 0.01$) に増加しており、いずれも明らかに亢進していた。また、放射線照射の前後では、ZAS に対する chemotaxis のみが約 $111.4 \pm 5.7\%$ ($P < 0.01$) と照射前とくらべ、照射後に軽度の亢進を認めた以外には radiation による影響は認められなかった。もう 1 例についても同様の成績が得られた。

(3) 貪食能の推移

つぎに、貪食能の変化(図 1 B)であるが、G-CSF 投与前とくらべ、G-CSF 投与後では、好中球の貪食活性が約 $147.3 \pm 10.7\%$ に亢進しており、 $P < 0.001$ 以下で有意に亢進していた。一方、遊走能の成績とは異なり、G-CSF 投与後、フィコールで分離した好中球と、leukapheresis で分離された好中球との間では、貪食活性には差は認められなかった。さらに、コバルト照射の前後でも貪食能には変化はみられなかった。他の 1 例でも同様の結果が得られた。

考 察

(1) G-CSF 投与後の健常者好中球機能

今回の成績から、G-CSF が *in vitro* で健常者の好中球遊走能を低下させる⁹⁾との報告とは異なり、 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ G-CSF の 1 回 *in vivo* 投与は、16 時間後の健常者の好中球遊走活性には影響を与えず、減弱も亢進もさせないことが示された。Spiekermann らは、健常者に G-CSF を 1 回投与してから 96 時間後までの好中球遊走能を経時的に測定しており、投与 3～4 時間後に一過性の遊走能の低下がみられたが、6 時間後には G-CSF 投与前のレベルに戻り、96 時間後まで投与前のレベルを維持したと報告している⁷⁾が、今回の筆者らの成績もこれを支持する結果となった。

一方、貪食能は、G-CSF 投与 16 時間後には健常者好中球に対して、好中球機能低下症例での報告^{2,3)}と同様に明らかに貪食能を亢進させることを確認した。

この遊走能と貪食能との解離については、G-CSF 投与による粘着能の亢進が関与しているも

のと思われる。

(2) G-CSF 動員・顆粒球輸血の好中球機能
いままでに G-CSF で動員された顆粒球輸血の好中球機能を測定した報告¹¹⁾はあっても対照成人好中球との比較のみで、同一人での G-CSF 投与前、後での推移、さらには leukapheresis 開始前、後での比較までは検討されていなかった。

今回の成績から、G-CSF 投与後、leukapheresis 開始直前に末梢血からフィコール法で分離した好中球とくらべ、leukapheresis 法で分離された好中球では、貪食能は不変であったが、遊走能が明らかに増強していた。

本来は、leukapheresis 法で分離した好中球は機能には差がないといわれている^{12,13)}ことから、G-CSF 投与により、生体内でのサイトカインネットワークに変化が生じ、それに伴い leukapheresis 施行中に 2 次的なサイトカインが放出され、それらによる遊走能の増強がみられた可能性も考えられる。

このように、G-CSF で動員された顆粒球輸血の好中球機能は明らかに亢進していることが示され、遊走能では chemotaxis to ZAS, chemotaxis to BCF, そして random mobility の順で亢進の程度が強かった。Caspar らの報告¹¹⁾でも、メンブラン法による遊走能を遊走因子 ZAS で測定しているが、random mobility は、対照正常人と比較して約 211% に亢進していたが、chemotaxis to ZAS は約 112% の亢進のみであったとしており、今回の筆者らの成績と同様の傾向であった。

(3) G-CSF 動員・顆粒球輸血の臨床効果

高齢者での G-CSF 併用化学療法の際に、たまに併発がみられる間質性肺炎^{14,15)}がそうであるように、G-CSF によって好中球が過剰に活性化されると、粘着能が亢進して末梢血管床にとどまり、その場で有害な活性酸素の放出や脱顆粒が起こり、組織障害の原因ともなりうるため、個々の状況に合った適正な G-CSF の使用量、使用法を選択する必要がある。

今回の症例では、好中球数がゼロの状態で重症感染症を併発しており、G-CSF と leukapheresis で機能が亢進した好中球を輸注しても組織障害は

みられず、術後の緑膿菌性敗血症は改善し、輸血好中球数もながい間保たれ、nadir を切り抜けた、救命できた。

結 語

急性骨髄性白血病に直接 G-CSF を投与すれば白血病細胞を増加させる危険性が高い。そのため、好中球減少期に併発した重症感染症に対して外科的手術を要するなどの場合、ドナーに G-CSF を投与して動員した顆粒球輸血は、好中球の数を増やし、turn over time を延長させ、さらに機能も増強させ、感染対策に非常に有効な手段であることを確認した。急性骨髄性白血病の顆粒球減少時に併発した重症感染症に対し、今後も試みるべき方法と思われる。

本論文の要旨は、第 16 回日本炎症学会で発表した。

文 献

- Colotta, F., Re, F., Mantovani, A. : Granulocyte transfusions from granulocyte colony-stimulating factor-treated donors : also a question of cell survival ? *Blood* 82 : 2258, 1993.
- Katoh, M., Shikoshi, K., Ishii, M., Saito, M., Kitagawa, S. : Neutrophil kinetics shortly after initial administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Neutrophil alkaline phosphatase activity as an endogenous marker. *Eur. J. Haematol.* 49 : 19-24, 1992.
- Roesler, J., Emmendoerffer, A., Elsner, J., Zeidler, C., Lohmann-Matthes, M. L., Welte, K. : *In vitro* functions of neutrophils induced by treatment with rhG-CSF in severe congenital neutropenia. *Eur. J. Haematol.* 46 : 112-118, 1991.
- McCawley, L. J., Korchak, H. M., Douglas, S. D., Campbell, D. E., Thornton, P. S. et al. : *In vitro* and *in vivo* effects of granulocyte colony-stimulating factor on neutrophils in glycogen storage disease type 1B : Granulocyte colony-stimulating factor therapy corrects the neutropenia and the defects in respiratory burst activity and Ca^{2+} mobilization. *Pediatr. Res.* 35 : 84-90, 1994.
- Schroten, H., Roesler, J., Breidenbach, T., Wendel, U., Elsner, J. et al. : Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors for treatment of neutropenia in glycogen storage disease type 1b. *J. Pediatr.* 119 : 748-754, 1991.
- Ishiguro, A., Nakahata, T., Simbo, T., Amano, Y., Yasui, K. et al. : Improvement of neutropenia and neutrophil dysfunction by granulocyte colony-stimulating factor in a patient with glycogen storage disease type 1b. *Eur. J. Pediatr.* 152 : 18-20, 1993.
- Spiekermann, K., Emmendoerffer, A., Elsner, J., Reader, E., Lohmann-Matthes, M. L. et al. : Altered surface marker expression and function of G-CSF-induced neutrophils from test subjects and patients under chemotherapy. *Br. J. Haematol.* 87 : 31-38, 1994.
- Bronchud, M. H., Potter, M. R., Morgenstern, G., Blasco, M. J., Scarffe, J. H. et al. : *In vitro* and *in vivo* analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients. *Br. J. Cancer* 58 : 64-69, 1988.
- Humphreys, J. M., Rugman, F. P., Davies, J. M., Mimmagh, P., Hart, C. A., Edwards, S. W. : Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil function *in vitro* and *in vivo* following chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J. Clin. Lab. Immunol.* 34 : 55-61, 1991.
- 加藤雅子 : ヒト好中球遊走能の deactivation. *東邦医学会誌* 28 : 106-117, 1981.
- Caspar, C. B., Seger, R. A., Burger, J., Gmuer, J. : Effective stimulation of donors for granulocyte transfusions with recombinant methionyl granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 81 : 2866-2871, 1993.
- Szymanski, I. O., Teno, R. A., Gandhi J. G., Newburger, P. E. : Studies on low-dose hydroxyethyl starch leukapheresis. Rate of elimination of HES *in vivo* and function of the harvested granulocytes *in vitro*. *Vox-Sang* 47 : 325-329, 1984.
- Glasser, L., Fiedlerlein, R. L. : The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function. *Am. J. Clin. Pathol.* 93 : 662-669, 1990.
- 加藤雅子, 志越 顕, 高田雅史, 梅田正法, 塚原敏弘, 白井達男 : G-CSF 投与により間質性肺炎を併発した 2 例を含む高齢者非ホジキン・リンパ腫症例の G-CSF 投与と好中球機能. *日老医学会誌* 30 : 953-957, 1993.
- Katoh, M., Shikoshi, K., Takada, M., Umeda, M., Kitagawa, S. et al. : Development of interstitial pneumonitis during treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *Ann. Hematol.* 67 : 201-202, 1993.