

原 著

食道癌術後の顆粒球機能の変動と血中 granulocyte colony-stimulating factor 値の意義

広島大学第1外科, *同 総合診療部

村上 義昭 横山 隆* 立本 直邦 児玉 節
竹末 芳生 今村 祐司 松浦雄一郎

開胸, 開腹を伴う食道癌術後の末梢血顆粒球機能と, 顆粒球の主たる増殖刺激因子である granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) の血中濃度の関連を究明するために, 食道癌症例 (E 群, n=12) と胃亜全摘術を施行した胃癌症例 (G 群, n=12, 対照) に対して, 術前および術後, 経時的に末梢血の白血球数 (WBC), 顆粒球数 (GC), 顆粒球化学発光量 (CL), G-CSF 値 (G-CSF) を測定した。E 群の WBC, GC は G 群に比べ, 術後 4, 8 時間において有意の低値を示し ($p < 0.01$), CL は術後 4, 8, 24 時間後に有意の低値を呈した ($p < 0.05$)。しかし, E 群の G-CSF は G 群に比べ, 4, 8 時間後に有意の高値を呈し ($p < 0.01$), 術後 4, 8 時間における PMN と G-CSF の間には有意な負の相関が認められた ($p < 0.01$)。以上より食道癌術後早期には G-CSF をはじめとするサイトカインの過剰な刺激により, 顆粒球の組織への接着, 遊出の増加をきたし, 末梢血顆粒球の数, CL 値の低下状態が生じていることが類推された。

Key words: surgical stress of esophageal cancer, granulocyte, granulocyte colony-stimulating factor, chemiluminescence, cytokine

結 言

消化器外科術後には術後早期より末梢血の顆粒球数は増加し, 大部分の症例においてその数は $10,000/\text{mm}^3$ 以上の値を示す。これは手術という侵襲に対する生体の合目的な防御反応と考えられるが, 開胸, 開腹という過大な侵襲を伴う食道癌症例においては, しばしば, 術後の末梢血顆粒球数が $10,000/\text{mm}^3$ 未満を推移する症例に遭遇する^{1)~3)}。このような末梢血顆粒球数の低値は重症感染症時にもみられるが⁴⁾⁵⁾, その原因は生体への過剰な侵襲によるものと考えられる。仁科ら⁶⁾は末梢血顆粒球数が減少を示した穿孔性腹膜炎症例においては, 幼弱顆粒球はむしろ増加していることより, 末梢血顆粒球数が減少する原因は, 骨髄の抑制ではなく顆粒球の消費の亢進によると報告している。しかし, このような生体への過剰な侵襲により末梢血顆粒球数が低値を呈する病態における顆粒球の産生刺激因子に関する報告はいまだない。そこで, 今回, わ

れわれは顆粒球の主たる増殖刺激因子である granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)⁷⁾ の食道癌術後における末梢血中濃度と顆粒球機能を経時的に測定し, 若干の知見を得たので報告する。

対象および方法

1991年1月より当科において, 開胸, 開腹による2領域郭清の手術を施行した食道癌症例12例 (E 群) を対象とした。同時期に幽門側胃亜全摘術を施行した胃癌症例12例 (G 群) を対照として, これらの症例の術前および術後 4, 8, 24, 72, 120, 168 時間に採血し, 末梢血白血球数 (WBC), 末梢血顆粒球数 (GC), phorbol myristate acetate (PMA) 刺激による顆粒球化学発光量 (CL), 血中 G-CSF 値 (G-CSF) を測定した。末梢血白血球数・顆粒球数は自動血球計算計にて測定した。なお, これらの食道癌, 胃癌症例には全例, 術後7日目まで重症の縫合不全, 敗血症, 出血によるショックなどの合併症は認められなかった。

1) 顆粒球化学発光量の測定

ヘパリン加採血をした血液より Eggleton ら⁸⁾ の方法により顆粒球を分離した。分離した顆粒球は Hank'

<1993年7月7日受理> 別刷請求先: 村上 義昭
〒734 広島市南区霞 1-2-3 広島大学医学部第
1外科

s balanced salt solution (HBSS) に浮遊させ、顆粒球 2×10^6 個あたりの化学発光量を、ウミホタルルシフェリン誘導体 (CLA) を用いた内藤ら⁹⁾の方法により測定した。刺激剤としては phorbol myristate acetate (PMA) を用いた。発光量の測定は、Lumiphotometer TD-4000 (ラボサイエンス社) を用い、最終濃度として顆粒球 1×10^6 個/ml, diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC) 0.1mM, CLA $1.0 \mu\text{M}$, PMA 100 ng/ml を HBSS で 2ml として測定した。経時的に化学発光量を測定し、発光量の最高値をその検体の測定値とした。

2) 血中 G-CSF 値の測定

採血した血液を遠沈後、血清を採取し -70°C にて保存し、適時、測定した。G-CSF の測定は ELISA 法による Quantikine Human G-CSF Immunoassay (Research and Diagnostic Systems, Minneapolis) にて行った。

なお、E 群、G 群の組織学的 stage 分類は、E 群は食道癌取扱い規約¹⁰⁾によると stage I 3 例、stage II 3 例、stage III 2 例、stage IV 4 例で、G 群は胃癌取扱い規約¹¹⁾によると stage I 8 例、stage II 1 例、stage III 3 例であったが、すべての症例は、いずれも絶対的あるいは相対的治癒切除症例であった。また、性、年齢には有意の差を認めなかったが、手術時間、術中出血量、輸血量は食道癌症例において有意に高値であった ($p < 0.01$, Table 1)。

3) 統計学的処理

顆粒球化学発光量は前値を 100 として処理した。また、すべての測定値は、平均値 (Mean) \pm 標準誤差 (SEM) で示し、2 群間の平均値の有意差の検定には Wilcoxon t test を、相関係数およびその検定には

Spearman の検定を用い、ともに $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

結果

1) 末梢血白血球数 (WBC) の変動

G 群の WBC が、術後 4 時間後に $14,700 \pm 800/\text{mm}^3$ と最高値となり、以後、徐々に漸減し、術後 120 時間後にはほぼ前値に復したのに対し、E 群のそれは、術後 4 時間後も $8,300 \pm 1,200/\text{mm}^3$ と低値で、術後 168 時間後まで増加傾向を呈した。E 群は G 群に比べ、特に術後 4、8 時間後において有意な低値を呈していた ($p < 0.01$, Fig. 1)。

Fig. 1 Postoperative changes in peripheral WBC count (M \pm SEM)

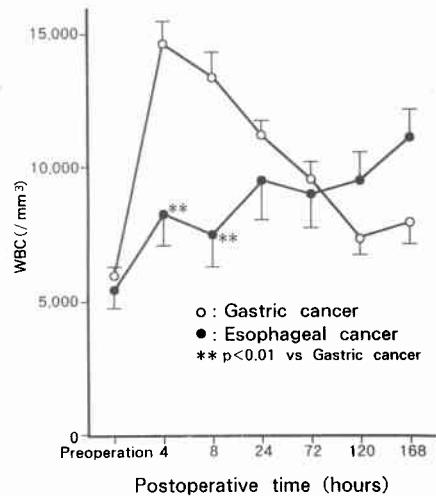


Fig. 2 Postoperative changes in peripheral GC count (M \pm SEM)

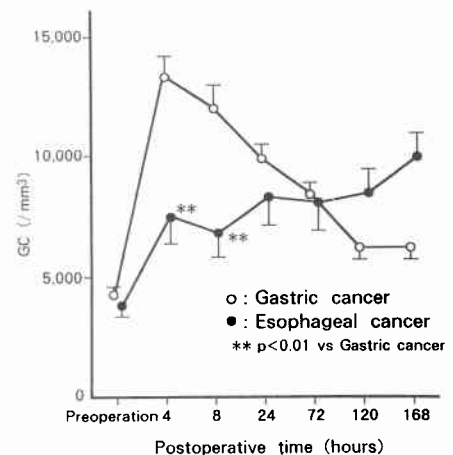


Table 1 Profiles of the patients

	Gastric cancer (n=12)	Esophageal cancer (n=12)	
Sex (Male : Female)	10 : 2	10 : 2	n.s.
Age (years)	54.8 \pm 3.5	61.6 \pm 2.6	n.s.
Operative time (minutes)	160 \pm 7	308 \pm 25	$p < 0.01$
Bleeding volume (ml)	400 \pm 45	987 \pm 173	$p < 0.01$
Blood infusion volume (ml)	0	568 \pm 186	$p < 0.01$

n.s. not significant

2) 末梢血顆粒球数 (GC) の変動

GCにおいてもWBCと同様の傾向を認め、G群のGCが、術後4時間後に13,300±900/mm³と最高値となり、以後、徐々に漸減し、術後120時間後にほぼ前値に復したのに対し、E群のGCは、術後4時間も7,500±1,200/mm³と低値で、術後168時間後まで増加傾向を呈した。E群はG群に比べ、特に術後4、8時間後において有意に低値であった(p<0.01, Fig. 2)。

3) 顆粒球化学発光量 (CL) の変動

G群のCLが、術後4、8時間後に、それぞれ、前値比149±10、145±13と上昇を呈し、以後、漸減したのに対し、E群のCLは、4時間後に前値比120±12とわ

Fig. 3 Postoperative changes in chemiluminescence of GC (M±SEM)

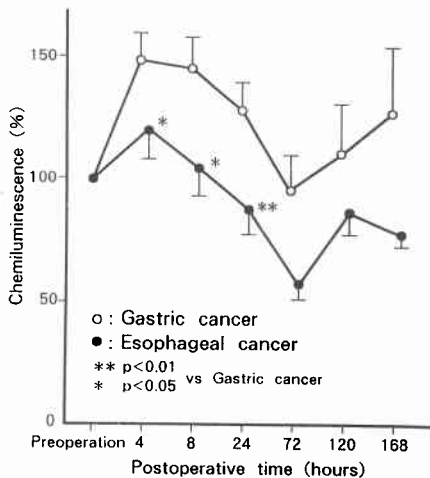


Fig. 4 Postoperative changes in levels of G-CSF (M±SEM)

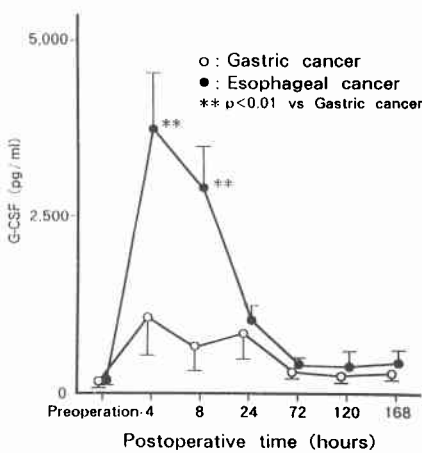
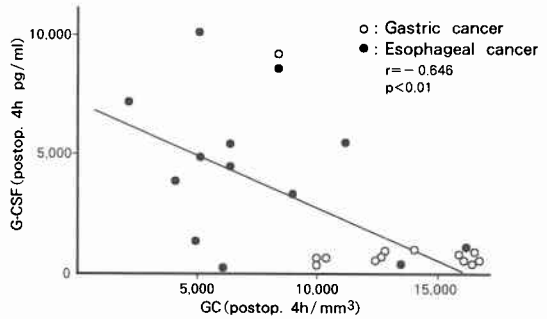


Fig. 5 Correlation between peripheral GC count and serum levels of G-CSF at the 4th postoperative hours.



ずかに上昇したが、以後は低値をとる傾向にあり、E群はG群に比べ、術後4、8、24時間後に有意の低値を呈していた (p<0.05, Fig. 3)。

4) 血中 G-CSF 値 (G-CSF) の変動

G群のG-CSFは、軽度の上昇を示すのみで、4時間後に1,090±520pg/mlと最高値となり、以後、漸減したのに対し、E群のG-CSFは、術後より高度の上昇を示し、4時間後に3,760±790pg/mlと最高値となり、以後、漸減したが、全経過を通してG群より高値であった。E群はG群に比べ、特に術後4、8時間目において有意の高値を示していた (p<0.01, Fig. 4)。

5) 術後早期における末梢血顆粒球数と血中 G-CSF 値の相関

食道癌および胃癌症例の術後4時間における末梢血顆粒球数と血中G-CSF値は相関係数r=-0.646と有意な負の相関を呈した (p<0.01, Fig. 5)。また、術後8時間においても相関係数r=-0.622と有意な負の相関を呈していた (p<0.01)。

考 察

胃、大腸などの消化管手術の術後には、術後早期より末梢血顆粒球数は増加し、その値は大部分の症例において10,000/mm³以上を呈する。しかし、開胸、開腹という過大な侵襲を伴う食道癌術後には、しばしば、術後早期より末梢血顆粒球数が低値を推移する症例が存在し、最近の当科における食道癌切除症例32例においても、21例が術後1日目の白血球数は10,000/mm³未満であった。後藤ら³⁾は、食道癌術後1日目の末梢白血球数の平均は8,040/mm³と報告しており、また、北村ら¹⁾の22例の食道癌症例の検討にてもその半分以上の症例は術後1日目の白血球数は10,000/mm³未満を呈しており、今回、われわれが胃癌症例12例(胃癌

全摘術施行)において測定した術後24時間目の白血球数がほぼ全例 $10,000/\text{mm}^3$ 以上であり、また、その平均も $11,200/\text{mm}^3$ であることを考えると、食道癌症例における術後の末梢血白血球数は明らかに低値を呈しているといえる。

そこで、今回、われわれは術後の末梢血白血球数の大部分を占める顆粒球に着目し、胃癌の亜全摘症例を対照として、食道癌の術後における末梢血顆粒球機能と顆粒球の主たる増殖刺激因子である G-CSF の血中濃度の変動について検討を行った。両群の手術侵襲の程度については、食道癌症例は開胸、開腹という2領域の手術操作を施行したのに加え、手術侵襲の指標となる手術時間、出血量、輸血量ともに有意な高値を呈していた。

まず、末梢血顆粒球機能の指標として、末梢血顆粒球数と、分離法にて採取した末梢血顆粒球の PMA 刺激による化学発光量を測定した。食道癌術後の末梢血顆粒球数は前述したように低値を推移する傾向にあり、特に術後4、8時間においては胃癌症例の平均がそれぞれ $13,300/\text{mm}^3$ 、 $12,000/\text{mm}^3$ と高値をとるのに対し、食道癌症例の平均はそれぞれ $7,500/\text{mm}^3$ 、 $6,800/\text{mm}^3$ と有意に低値を呈していた。また、化学発光量は顆粒球の活性化の程度の指標とされているが⁹⁾、胃癌症例のそれが術後4時間から24時間まで高値を推移するのに対し、食道癌症例においては術後早期より低値を推移し、胃癌症例に比べ、術後4、8、24時間において有意な低値を呈していた。つまり、以上の結果より、食道癌術後に末梢血に存在する顆粒球は、数、活性化ともに乏しい顆粒球が存在しているものと思われる。

それでは、なぜ、胃癌症例より高度の手術侵襲を伴う食道癌症例の顆粒球においてこのような病態が生じるのであろうか。この原因としては、顆粒球の増殖刺激因子の抑制あるいは顆粒球の消費の亢進が考えられる。

そこで、今回、顆粒球の主たる増殖刺激因子である G-CSF の血中変動について検討を行った。G-CSF は、マクロファージ、線維芽細胞および内皮細胞などにより産生され、顆粒球の分化、増殖を促し、また、その機能をも亢進させることが知られているが^{12)~14)}、周術期における血中 G-CSF 濃度に関する報告はない。われわれは、顆粒球機能が低値を呈する食道癌術後には、顆粒球の増殖を刺激し機能を亢進させる血中 G-CSF 値も低値を呈しているのではないかと予測したが、食

道癌術後の血中 G-CSF 値は、顆粒球機能の増加を認める胃癌術後に比べ、全経過を通して高値を示し、術後4時間においては平均 $3,760\text{pg/ml}$ もの高値を示した。Kawakami ら¹⁵⁾は、呼吸器感染および尿路感染患者24症例の末梢血白血球数、血中 G-CSF 値を測定しているが、その平均は、それぞれ、 $13,800/\text{mm}^3$ 、 730pg/ml と報告しており、この値はほぼ胃癌術後症例の値に相当し、これらに比べると、食道癌術後の血中 G-CSF 値はきわめて高い値であった。つまり、食道癌術後においては、顆粒球の増殖刺激因子に関しては、生体は十分に、むしろ過剰な反応を呈しているものと考えられる。以上のような結果より、われわれは、食道癌術後の顆粒球の数および活性化の低下は、消費の亢進が主要因ではないかと考えている。

Lindemann ら⁷⁾は、ricombinant human G-CSF (rhG-CSF) の点滴静注直後には末梢血顆粒球数の一過性の減少が認められ、これは刺激を受けた顆粒球の接着分子である C3bi レセプターの発現が増強し、組織への接着によりその消費が亢進するためと報告している。また、今回の検討においても、術後4、8時間後における末梢血顆粒球数と血中 G-CSF 値は強い負の相関を呈しており、G-CSF が大量に血中に存在すればするほど末梢血顆粒球数は減少する傾向にあった。すなわち、食道癌のような過大な侵襲を伴う手術においては、その手術侵襲により G-CSF をはじめとするサイトカインが大量に産生され、顆粒球の過剰な活性化を促し、接着分子の発現の増強により、活性化された顆粒球の組織へ接着、遊出が増加し、顆粒球の動員を上回る量の顆粒球の消費が生じるものと推測する。その結果、末梢血の顆粒球は減少し、末梢血には活性化の程度の少ない顆粒球が残存するものと推測している。もちろん、上述した現象は G-CSF のみにより説明されうるものではなく、他のサイトカインや chemical mediator による顆粒球、血管内皮細胞への作用も考慮すべきであり^{16)~18)}、G-CSF を含めた高サイトカイン血症による顆粒球の消費の増加が食道癌術後の顆粒球数および CL 値の低下の主因ではないかと考えている。

なお、食道癌術後と同様の顆粒球数の低値は、エンドトキシンショックを伴う重症感染症⁴⁾、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症⁹⁾などにおいてもみられるが、これらの重症感染症時の顆粒球数の低値も生体への過剰な侵襲によりもたらされるもので、食道癌術後と同様の病態と考えられる。仁科ら⁶⁾は、末梢血顆粒球

数が減少した穿孔性腹膜炎症例において、末梢血の幼稚顆粒球数はむしろ増加していることより、末梢血顆粒球数が減少を呈する原因は顆粒球の消費の亢進に起因すると報告している。また、われわれは、顆粒球の減少を伴う重症穿孔性腹膜炎症例数例においても、血中の G-CSF 値の測定を施行したが、これらの症例の血中 G-CSF 値は食道癌症例と同様に異常な高値を呈していた。したがって、食道癌術後と重症感染症とは同様な病態にあることが推測され、食道癌術後にはエンドトキシンショックを伴う重症感染症時と同様の厳重な術後管理が必要と考えられる。

以上、食道癌術後の末梢血顆粒球機能と血中 G-CSF 値の関連について検討を行ったが、食道癌術後には、顆粒球の増殖刺激因子である血中 G-CSF 値は異常な高値を呈しており、過大な手術侵襲により産生された大量の G-CSF などにより、過剰な活性化を受けた顆粒球が、組織へ接着、遊出し、末梢血顆粒球数および CL 値の低下が生ずるものと推測された。しかし、この病態においては、G-CSF のみではなく、複雑な因子が関与していることが推測され、骨髄を中心とする顆粒球の産生系の検討、前述したように G-CSF 以外の他のサイトカインおよび chemical mediator の検討^{16)~18)}などが、今後の課題と考える。

文 献

- 1) 北村道彦, 西平哲郎, 平山 克ほか: 食道癌術後のエンドトキシン血症. 日消外会誌 20: 1648—1653, 1987
- 2) 濱頭憲一郎, 山岸久一, 内藤和世ほか: 食道癌術前照射と手術侵襲が宿主免疫能におよぼす影響—リンパ球, T cell サブセットよりみた検討—. 日消外会誌 22: 2183—2187, 1989
- 3) 後藤正幸, 島 伸吾, 米川 甫ほか: 食道癌手術侵襲に対する Ulinastatin の効果に関する検討. 日消外会誌 23: 2716—2722, 1990
- 4) 村上義昭: 閉塞性黄疸時における胆道内 endotoxin の血中への逆流による endotoxin ショック発来機序に関する実験的研究. 日外会誌 93: 1398—1409, 1992
- 5) 横山 隆, 児玉 節, 竹末芳生ほか: 術後 MRSA 腸炎. 外科 53: 1034—1040, 1991
- 6) 仁科雅良, 藤井千穂: 術前白血球減少をきたした穿孔性腹膜炎症例の検討. 日臨外医会誌 53: 557—562, 1992
- 7) Lindemann A, Herrmann F, Oster W et al: Hematologic effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignancy. Blood 74: 2644—2651, 1989
- 8) Eggleton P, Gargan R, Fisher D: Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. J Immunol Methods 121: 105—113, 1989
- 9) 内藤裕二, 吉川敏一: Superoxide 測定. 臨免疫 22: 221—230, 1990
- 10) 食道疾患研究会編: 食道癌取扱い規約, 第7版. 金原出版, 東京, 1989
- 11) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約, 改訂11版. 金原出版, 東京, 1985
- 12) Yuo A, Kitagawa S, Ohsaka M et al: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as an activator of human granulocytes: potentiations of responses triggered by receptor-mediated agonists and stimulation of C3bi receptor expression and adherence. Blood 74: 2144—2149, 1989
- 13) Ohsaka A, Kitagawa S, Sakamoto S et al: In vivo activation of human neutrophil functions by administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignant lymphoma. Blood 74: 2743—2748, 1989
- 14) Kitagawa S, Yuo A, Souza LM et al: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor enhances superoxide release in human granulocytes stimulated by chemotactic peptide. Biochem Biophys Res Commun 144: 1143—1146, 1987
- 15) Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T et al: Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. Blood 76: 1962—1964, 1990
- 16) Yuo A, Kitagawa S, Suzuki I et al: Tumor necrosis factor as an activator of human granulocyte: Potentiation of the metabolisms triggered by the Ca²⁺ mobilizing agonists. J Immunol 142: 1678—1684, 1989
- 17) Yuo A, Kitagawa S, Ohsaka M et al: Stimulation and priming of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Qualitative and quantitative differences. Biochem Biophys Res Commun 171: 491—497, 1990
- 18) Yuo A, Kitagawa S, Kasahara T: Stimulation and priming of human neutrophils by interleukin-8: Cooperation with tumor necrosis factor and colony-stimulating factors. Blood 78: 2708—2714, 1991

Changes in Granulocyte Functions and Significance of Levels of Serum Granulocyte Colony-stimulating Factor after Surgery for Esophageal Cancer

Yoshiaki Murakami, Takashi Yokoyama*, Naokuni Tatsumoto, Takashi Kodama,
Yoshio Takesue, Yuji Imamura and Yuichiro Matsuura

First Department of Surgery, Department of General Medicine*, Hiroshima University, School of Medicine

This study was undertaken to investigate the relationship between peripheral granulocyte functions and levels of serum granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) after surgery for esophageal cancer with thoracotomy and laparotomy. Patients with esophageal cancer (group E, n=12) and patients with gastric cancer who underwent subtotal gastrectomy (group G, n=12, control group) were examined. The peripheral white blood cell count (WBC), granulocyte count (GC), granulocyte chemiluminescence (CL) and levels of serum G-CSF (G-CSF₀) were measured before and after the operation. WBC and GC of group E were significantly lower at the 4th and 8th postoperative hours (POH) than those of group G ($p < 0.01$), and CL of group E was significantly lower at the 4th, 8th and 24th POH than that of group G ($p < 0.05$). However, G-CSF of group E was significantly higher at the 4th and 8th POH than that of group G ($p < 0.01$), and a significant negative correlation was found between PMN and G-CSF at the 4th POH ($p < 0.01$). These results suggest that the peripheral granulocyte count and CL are decreased early after surgery for esophageal cancer because a lot of granulocytes, which are excessively stimulated by various cytokines including G-CSF, attach to and infiltrate into the tissues.

Reprint requests: Yoshiaki Murakami First Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734 JAPAN
