

骨髓増殖性疾患並びに骨髓異形成症候群 における Endogenous CFU-C の検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

村 瀬 敏 夫

(平成6年2月28日受稿)

Key words: 骨髓増殖性疾患, 骨髓異形成症候群, Endogenous CFU-C
慢性骨髓単球性白血病

緒 言

骨髓増殖性疾患 (Myeloproliferative disorder: MPD) は, 慢性骨髓性白血病 (Chronic myelogenous leukemia: CML), 真性多血症 (Polycythemia vera: PV), 本態性血小板血症 (Essential thrombocythemia: ET), 原発性骨髓線維症 (Primary myelofibrosis: PMF) などの疾患を含む概念で, 1951年に Dameshek¹⁾ によって慢性骨髓増殖性疾患 (Chronic myeloproliferative disorder: CMPD) として提唱された。本症候群は赤血球, 顆粒球, 血小板などの骨髓系造血細胞のいずれか, あるいはすべてが緩徐に増加するが, 一般に血球の分化・成熟障害はみられず, 比較的緩慢な経過をとることを特徴とする。現在, MPD は G 6-PD アイソザイムを用いた研究²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾, 造血幹細胞の染色体分析⁷⁾ から多能性造血幹細胞の異常に基づく clonal hemopathy であることが明らかにされている。

骨髓異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome: MDS) は, 主に高齢者に認められること, 末梢血では血球減少, 骨髓は正形成ないしは過形成で血球形態に異常が認められること, その臨床経過は比較的慢性で種々の頻度で白血病化することなどの特徴を有する。1953年 Block⁸⁾ により初めて前白血病状態という概念として臨床に導入され, 現在は French-American-British (FAB) 分類の中で MDS として位置づけられている⁹⁾。血球の量的異常以外に形態学的,

機能的異常が各血球系に認められることから多能性造血幹細胞の異常に基づく clonal hemopathy と考えられ, G6-PD アイソザイムを用いた研究¹⁰⁾, 造血幹細胞の染色体分析¹¹⁾ からその可能性が強く示唆されている。

このように MPD 並びに MDS は, ともに clonal hemopathy であることからその病因をめぐって幹細胞レベルでの解析がなされてきたが, MPD 及び MDS の一部の症例においては Colony stimulating factor (CSF) 無添加で形成される endogenous colony が存在することが報告されている。その一つとして, 真性多血症 (PV) においてエリスロポイエチン (Erythropoietin: Epo) 無添加で赤芽球系コロニーを形成する, いわゆる Endogenous colony forming unit-erythroid (E-CFU-E) の出現は MPD の病態解析を進めるうえで興味ある所見として注目された¹²⁾¹³⁾。すなわち培地中に Epo を加えなくとも CFU-E が形成され, Epo を加えるとその濃度に応じてコロニー形成数が増加する。その機序としては培養液中にわずかに存在する Epo に鋭敏に反応してコロニーを生ずる population が存在するか, あるいは Epo なしでも自律的に増殖しうる赤芽球前駆細胞が存在するか, などが推定されたが, 未だに問題として残されているところである¹⁴⁾。一方, 顆粒球系では, CSF 無添加で顆粒球マクロファージ系コロニーを形成する Endogenous colony forming unit in culture (E-CFU-C) が種々の疾患で出現することが報告されている。1974年 Altman ら¹⁵⁾ が若年

型慢性骨髄性白血病 (Juvenile CML : JCML) の2例において末梢血, 骨髄血で CSF 無添加でも多数のコロニーが形成され, そのほとんどが単球コロニーであったと報告し, その後PMF¹⁶⁾, 慢性好中球性白血病 (CNL)¹⁷⁾, 慢性骨髄単球性白血病 (CMML)¹⁸⁾¹⁹⁾, CML²⁰⁾などでも E-CFU-C の報告がなされた。しかし未だに E-CFU-C 形成の臨床的意義は明らかでなく, その機序についても, 幹細胞の CSF に対する感受性の亢進²¹⁾, 内因性 CSF の分泌亢進¹⁹⁾²²⁾などが推定されているが明らかでない。今回著者は MPD 並びに MDS における E-CFU-C 形成能を検討し, E-CFU-C 形成症例について臨床的解析を加えるとともに E-CFU-C 形成機序についても検討を加え, MPD 並びに MDS の病態解析への一助とせんとした。

対象と方法

1. 対象症例

1988年から1991年までに岡山大学第2内科及び関連病院を受診した MPD 62例, MDS 25例を対象とした。MPD の内訳は CML 44例 [慢性期 (chronic phase : CP) 24例, 移行期 (accelerated phase : AP) 11例, 急性転化 (blastic crisis : BC) 9例], PV 9例, ET 2例, PMF 2例, CNL 1例, JCML 2例, 分類不能型骨髄増殖性疾患 (Unclassified myeloproliferative disorder : UMPD) 2例であった。また MDS の内訳は, Refractory anemia with excess of blasts (RAEB) 5例, RAEB in transformation (RAEBt) ないし MDS から移行した overt leukemia 10例, CMML 10例であった。CML-CP のうち1例は AP に, 5例は BC に移行し, RAEB のうち2例は RAEBt へと移行した。MPD の年齢構成は7~83歳 (中央値 : 54歳), 男女比は37 : 25であり, MDS では38~81歳 (中央値 : 65歳), 19 : 6であった。

2. 研究方法

1) MPD 並びに MDS における E-CFU-C 形成能の検討

インフォームドコンセントを得た後, 末梢血ないしは骨髄血をヘパリン加で採取し, Ficoll-Hypaque (HISTOPAQUE -1077; 1.077g/ul,

Sigma, St. Louis, MO) を用いた比重遠心法により単核球を分離し, 20%牛胎児血清 (Fetal calf serum ; FCS, Flow General Company, McLean, VA), enriched McCOY's5A 培地 (GIBCO, Gland Island, NY) を含む0.3%軟寒天中に細胞密度 2×10^6 個/ml で埋め込み, CSF 無添加または対照として CSF 添加の条件下で 37°C, 5%CO₂ にて10日間培養した後に構成細胞40個以上の細胞集団をコロニーとして算定した。CSF 添加の条件下では, CSF-chugai (中外製薬, 東京) 50U/ml, または PHA-LCM (PHA stimulated lymphocyte conditioned medium : 健康人単核球を 10^6 個/ml の細胞密度で1% PHA (Difco, Detroit, MI) 10%FCS 加で1週間液体培養した培養上清) 20%v/v を加えるか, recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF, Genzyme corporation, Boston, MA) 2 ng/ml を添加した。PHA-LCM を添加した時には, 微量混入している PHA の T cell への影響を排除するため, 羊赤血球ロゼット形成法により単核球から T cell を除去した。なお CSF を添加してもコロニーが形成されなかった時には対象から除外した。CSF 無添加で形成されたコロニー (Endogenous colony) については, メイギムザ染色, ベルオキシダーゼ染色, エステラーゼ二重染色を施行し, コロニー構成細胞を検討した。

2) E-CFU-C 形成能に及ぼす貪食細胞及び T cell の除去の影響

E-CFU-C の形成を認めた5例 (症例7, 10, 11, 12, 13) については, 前述の比重遠心により分離された単核球から貪食細胞及び T cell を除去し, E-CFU-C 形成能に及ぼす影響を検討した。貪食細胞の除去は単核球浮遊液に1/10容のカルボニール鉄 (KAC-2, 日本抗体研究所, 高崎) を加え37°C, 5%CO₂ の培養器中に時々攪拌しながら60分間反応させた後に同様に比重遠心により行った。T cell の除去は羊赤血球 (日本ラム) と E ロゼットを形成させ, さらに Ficoll-Hypaque 上に重層し単核球層を分離することにより行った。貪食細胞及び T cell 除去の有無で4つの単核球分画に分け, それぞれの分

表1 骨髄増殖性疾患 (MPD) における Endogenous colony 形成能

疾患名	症例数	Endogenous colony 形成症例数
CML		
chronic phase	24	0
accelerated phase	11	2
blastic crisis	9	1
PV	9	0
ET	2	0
PMF	2	0
JCML	2	2
CNL	1	0
UMPD	2	1
合計	62例	6例

画で rhGM-CSF 2 ng/ml 添加, recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF, 中外製薬, 東京) 50ng/ml 添加, 或いは無添加の条件下で10日間軟寒天培養を施行し, 形成されたコロニーについてはエステラーゼ二重染色を施行した。

3) E-CFU-C 形成能に及ぼす各種抗 cytokine 抗体の影響

E-CFU-C 形成を認めた1例(症例10)については, 抗 GM-CSF 抗体 (mouse anti-human GM-CSF monoclonal antibody; Genzyme corporation, Boston, MA), 抗 G-CSF 抗体 (rabbit anti-human G-CSF polyclonal antibody; Genzyme corporation, Boston, MA), 抗 M-CSF 抗体 (rabbit anti-human macrophage colony stimulating factor polyclonal antibody; Genzyme corporation, Boston, MA), 抗 IL-1 抗体 (rabbit anti-human interleukin-1 polyclonal antibody; Genzyme corporation, Boston, MA), 抗 IL-6 抗体 (rabbit anti-human interleukin-6 polyclonal antibody; Genzyme corporation, Boston, MA) を1/100 (v/v%) 添加して, colony assay を行った。

4) 末梢血単核球培養上清中の cytokine 濃度測定

E-CFU-C の形成を認めた4例(症例7, 10, 12, 13)と健常人7例について, 末梢血単核球

表2 骨髄異形成症候群 (MDS) における Endogenous colony 形成能

疾患名	症例数	Endogenous colony 形成症例数
RAEB	5	0
RAEBt or overt leukemia	10	1
CMML	10	7
合計	25例	8例

培養上清中の cytokine 濃度を測定した。すなわち末梢血をヘパリン加採血し比重遠心により単核球を分離した後に, 10%FCS 加 enriched McCOY's5A培養液中で細胞密度 1×10^5 個/ml とし37°C, 5%CO₂の条件下で7日間液体培養した。比重遠心により培養上清を回収し, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1 β , IL-6 濃度を測定した。G-CSF 濃度測定は Radioimmunoassay (RIA) 法で, M-CSF は Hanamura らの方法²⁹⁾に従い測定した。その他の cytokine は Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法で行った。

結 果

1. MPD 並びに MDSにおける Endogenous CFU-C (E-CFU-C) 形成能の検討

MPD における E-CFU-C 形成能については表1に示す如くで, CML-AP 11例中2例, CML-BC 9例中1例, JCML 2例中2例, UMPD 2例中1例に認められたが, CML-CP, PV, ET, PMF, CNL では認められず, MPD 全体では62例中6例にその形成が認められた。MDS における E-CFU-C 形成能は表2に示す如くで, CMML10例中7例, RAEBt ないしは overt leukemia 10例中1例に認められたが, RAEB では認められず, MDS 全体では25例中8例にその形成が認められた。なお, 病像の変化とともに経時的に colony assay を施行し得た10例について E-CFU-C 形成能をみると, CML-CP から CML-AP に移行した1例, CML-CP から CML-BC に移行した5例, RAEB から RAEBt に移行した2例では, 移行後も E-CFU-C 形成を認めなかったが, CML-BC と RAEBt の2例では表3に示す如く, 病態の悪化とともに E-

表3 病勢の悪化に伴う E-CFU-C 形成能の増強

colony assay の回数	material	Number of colonies /2×10 ⁶ cells		E-CFU-C の細胞構成	PERIPHERAL BLOOD						BONE MARROW							
		CSF (-)	CSF (+)		WBC /μl	blast %	sg+st %	Mo %	Hb g/dl	Plt. ×10 ⁴ /μl	NCC ×10 ⁴ /μl	blast %	Mo %					
		症例3. CML-BC	第1回目		PB	0	33											
	第2回目	PB	23	117	GE ₀	129300	9	1	1	9.0	1.9							
	第3回目	PB	154	532		52300	11	0	0	9.7	3.5							
症例7. RAEBt	第1回目	BM	56	146	GM(>G)	12400	5	20	20	7.3	54.9	5.1	11.6	20.8				
	第2回目	PB	0	0														
	第2回目	PB	27	62	G(>GM)	43500	0	33	45	3.5	0.7							

表4 E-CFU-C 形成症例のコロニー形成数、及びコロニー細胞構成症例10, 11では、末梢血からは E-CFU-C は形成されなかった。

- 1) granulocyte colony
- 2) granulocyte-macrophage colony
- 3) granulocyte-eosinophil colony
- 4) monocyte-macrophage colony

material		Number of colonies /2×10 ⁶ cells		E-CFU-C の細胞構成
		CSF(-)	CSF(+)	
		症例1. CML-AP	PB	
2. CML-AP	BM	96	280	G
3. CML-BC	PB	154	532	GE ₀ ⁰
4. JCML	PB	2	34	M ⁰
5. JCML	PB	6	11	M(>GM)
6. UMPD	PB	164	343	G
7. RAEBt	BM	56	146	GM(>G)
	PB	27	62	G(>GM)
8. CMML	PB	70	258	M(>GM)
9. CMML	PB	16	60	G
10. CMML	BM	27	39	M
11. CMML	BM	13	67	G
12. CMML	BM	9	26	G
	PB	1	10	G
13. CMML	PB	58	149	GM
	BM	10	12	GM
	PB	10	14	GM

CFU-C の形成が認められた。E-CFU-C のコロニー数と細胞構成は表4に示す如くで、コロニー数は2~164個/2×10⁶cellsと、いずれもCSFを添加した時よりも少なかった。またコロニー構成細胞を染色性により検討したが、その結果は表4に示す如くで、メイギムザ染色では芽球様コロニーは認められず、すべてペルオキシダーゼ染色陽性であった。さらにエステラーゼ二重染色性の検討では、10例はナフトールAS-D-クロロアセテートエステラーゼ陽性、 α -ナフチルプチレート陰性の顆粒球コロニー(図1-a)

優位か両者陽性の顆粒球マクロファージコロニー(図1-b)優位かであったが、残り4例は前者陰性、後者陽性の単球マクロファージコロニー(図1-c)優位であった。

2. E-CFU-C 形成例並びに非形成例における血液所見の比較検討

E-CFU-C 形成例並びに非形成例で末梢及び骨髓血液所見について比較検討し、特に E-CFU-C 形成例については血液所見を表5に示した。末梢白血球数と末梢血あるいは骨髓血における E-CFU-C 形成との間には相関性は認められなかったが、末梢血において E-CFU-C を形成する症例については、末梢白血球数が多い傾向が認められた。一方、全症例のうち末梢血単球増多(>10%)を示した症例は19例でそのうち12例に E-CFU-C が形成され、E-CFU-C 形成14症例中11例で末梢血単球増多が認められた。骨髓有核細胞数、末梢および骨髓中の骨髓芽球比率、末梢血小板数、ヘモグロビン濃度と E-CFU-C 形成との間には相関関係は認められなかった。

3. E-CFU-C 形成例並びに非形成例における核型所見の比較検討

核型は E-CFU-C 形成例14例中9例で核型について検討し得たが、その結果は表6に示す如くで、5例に染色体異常が認められた。CMLでは全例で Ph¹ 染色体ないしは bcr-abl 遺伝子再構成が認められ、付加的核型異常は CP では24例中全く認められず、APでは11例中2例、BCでは9例中3例に認められた。E-CFU-C 形成例では、症例3の CML-BC に付加的核型異常が認められた。MDSでは RAEB 2例中2例、RAEBt 8例中4例、CMML 7例中3例に核型

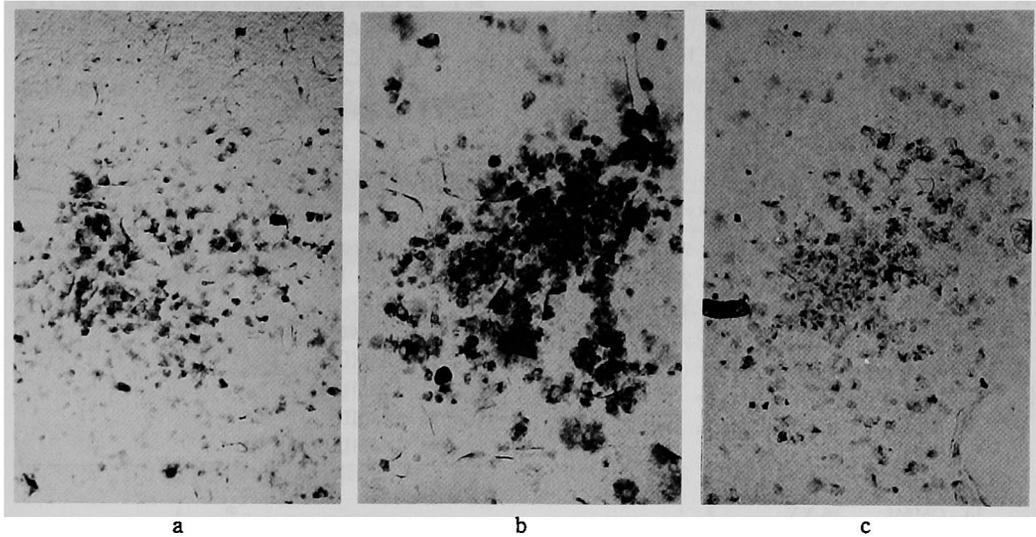


図1-a. 症例10の単球マクロファージコロニー ; α -NB(+), N-ASD-CA(-)
 1-b. 症例10の顆粒球マクロファージコロニー ; α -NB(+), N-ASD-CA(+)
 1-c. 症例11の顆粒球コロニー ; α -NB(-), N-ASD-CA(+)
 * α -NB ; α ナフチルプブチレート N-ASD-CA ; ナフトール-AS-D-クロロアセテート

表5 E-CFU-C 形成症例の血液学的所見

	E-CFU-C		E-CFU-C の細胞構成	PERIPHERAL BLOOD						BONE MARROW		
	形成の有無			WBC / μ l	blast %	sg+st %	Mo %	Hb g/dl	Plt. $\times 10^4/\mu$ l	NCC $\times 10^4/\mu$ l	blast %	Mo %
	BM	PB										
症例1 .CML-AP		+	G(>GM)	4200	4	56	18	12.8	73.5	16.0	12.8	3.0
2 .CML-AP	+		G	8700	3	67	1	10.0	55.1	— dry tap —		
3 .CML-BC		+	GE _o	52300	11	0	0	9.7	3.5	not done		
4 .JCML		+	M	1600	1	61	12	12.2	12.0	24.0	12.0	8.4
5 .JCML		+	M(>GM)	8600	+	50	16	13.4	13.4	43.8	5.4	2.2
6 .UMPD		+	G	14100	4	2	1	6.3	3.1	— dry tap —		
7 .RAEBt	+	-	GM(>G)	12400	5	20	20	7.3	54.9	5.1	11.6	20.8
		+	G(>GM)	43500	0	33	45	3.5	0.7	not done		
8 .CMML		+	M(>GM)	24500	4	18	50	8.9	0.6	11.3	12.4	12.4
9 .CMML		+	G	14700	0	72	10	10.0	4.6	67.7	12.8	4.2
10 .CMML	+	-	M	2700	1	15	50	9.9	7.4	8.5	10.6	22.6
11 .CMML	+	-	G	7200	0	55	15	8.9	12.0	47.9	7.5	9.7
12 .CMML	+	+	G	496000	0	59	18	9.7	11.6	63.0	2.4	18.0
13 .CMML		+	GM	50100	0	59	32	9.9	7.2	53.9	3.6	15.2
14 .CMML	+	+	GM	13800	4	31	12	9.5	32.8	3.2	2.0	11.6

異常が認められた。E-CFU-C 形成 CMML で核型について検討し得たのは5例であったが、そのうち症例9, 13の2例に核型異常を認めた。E-CFU-C を形成した症例7の RAEBt にも核

型異常を認めた。

4. E-CFU-C 形成例, 非形成例の生存期間の比較検討

E-CFU-C 形成例14例中9例で経過観察が可

表6 E-CFU-C 形成症例の核型所見
症例4, 5, 6, 11, 12は不能もしくは未施行
全症例の核型異常は, CML-CP 0/24例, AP
2/11例, BC 3/9例 (付加的核型異常)
RAEB 2/2例, RAEBt 4/8例, CMML
3/7例であった。

karyotype	
症例1. CML-AP	46 XX, t(9q+, 22q-)
2. CML-AP	46 XY, t(9q+, 22q-)
3. CML-BC	47 XY, +8, t(9q+, 22q-), i(17q)
4. JCML	—
5. JCML	—
6. UMPD	—
7. RAEBt	46 XX, t(11q+, 19p-)
8. CMML	46 XY
9. CMML	45 XY, -7
10. CMML	46 XX
11. CMML	—
12. CMML	—
13. CMML	47 XY, +8
14. CMML	46 XY, 1 gh+ (normal variant)

能であった。そのうち CMML の1例は不慮の事故で追跡不能であったが、残りの8例は全例原疾患の増悪により死亡しており、その結果を表7に示した。E-CFU-C 形成例全体では、生存期間0.8ヶ月から36ヶ月、平均生存期間13.5ヶ月であった。疾患別に生存期間を E-CFU-C 形成例と非形成例との間で比較してみると、CML-AP については疾患全体では平均11.6ヶ月であったのに対し E-CFU-C を形成した症例2は4.5ヶ月で、CML-BC については疾患全体では平均4.7ヶ月であったのに対し E-CFU-C を形成した症例3は1.2ヶ月で E-CFU-C 形成例で短い傾向が認められた。症例7の RAEBt は CMML の病態に類似しているため CMML に含めて一括したが、CMML 全体では平均生存期間は12.2ヶ月で生存期間が0.8ヶ月から36ヶ月に広く分布したが、E-CFU-C 形成例と非形成例との間には明らかな差異は見いだせなかった。

5. E-CFU-C 形成に及ぼす GM-CSF, G-CSF 添加並びに 貪食細胞, T cell 除去の影響

症例7, 10, 11, 12, 13について検討したが、その結果は図2-a, b, c, d, eに示す如くであった。GM-CSF を添加することによりコロニ

表7 E-CFU-C 形成症例の生存期間、疾患ごとの平均生存期間 1) E-CFU-C 形成を認めた時から死亡までの期間 2) colony assay から死亡までの期間 3) 症例7. は CMML 類似のため、CMML に含めた。

	生存期間 (月) ¹⁾	疾患別の 平均生存期間 ²⁾
症例2. CML-AP	4.5	11.6±6.6(10例平均)
3. CML-BC	1.2	4.7±3.3(8例平均)
7. RAEBt	5.5	12.2±11.1(8例平均) ³⁾
8. CMML	19.2	
10. CMML	36.0	
12. CMML	1.2	
13. CMML	0.8	
14. CMML	18.4	

一数は全症例において E-CFU-C 数よりも増加を示し、骨髄では $146 \sim 26/2 \times 10^5$ cells, 末梢血では $149 \sim 10/2 \times 10^5$ cells 形成され、症例10(図2-b)以外では2倍以上に著増した。また G-CSF を添加することによりコロニー形成数は E-CFU-C 数よりも、症例13では著増し(図2-e)、症例7, 11では特に貪食細胞を除去した分画で顆粒球コロニーを中心に増加し(図2-c, d)、症例10, 12(図2-a, b)では軽度減少傾向が認められた。貪食細胞を除去すると、5症例全例で E-CFU-C の形成は抑制された。症例13においては E-CFU-C は全く形成されなくなり(図2-e)、症例7, 11, 12においては著明に抑制され特に単球マクロファージコロニーの形成がみられず(図2-a, c, d)、症例10においては抑制は軽度であったが単球マクロファージコロニーの形成は著明に抑制された(図2-b)。また T cell 除去は、全例で E-CFU-C 形成に影響を及ぼさなかった。

6. E-CFU-C に及ぼす各種抗 cytokine 抗体の影響

症例10において E-CFU-C に及ぼす各種抗 cytokine 抗体の影響を検討した。その結果は図3に示す如くで、抗 IL-1抗体、抗 M-CSF 抗体、抗 GM-CSF 抗体の添加によりそれぞれ38.0%、53.7%、62.0%と抑制され、抗 G-CSF 抗体の添加では104.6%と影響は認められず、抗 IL-6抗体の添加では174.0%とやや増加傾向を示

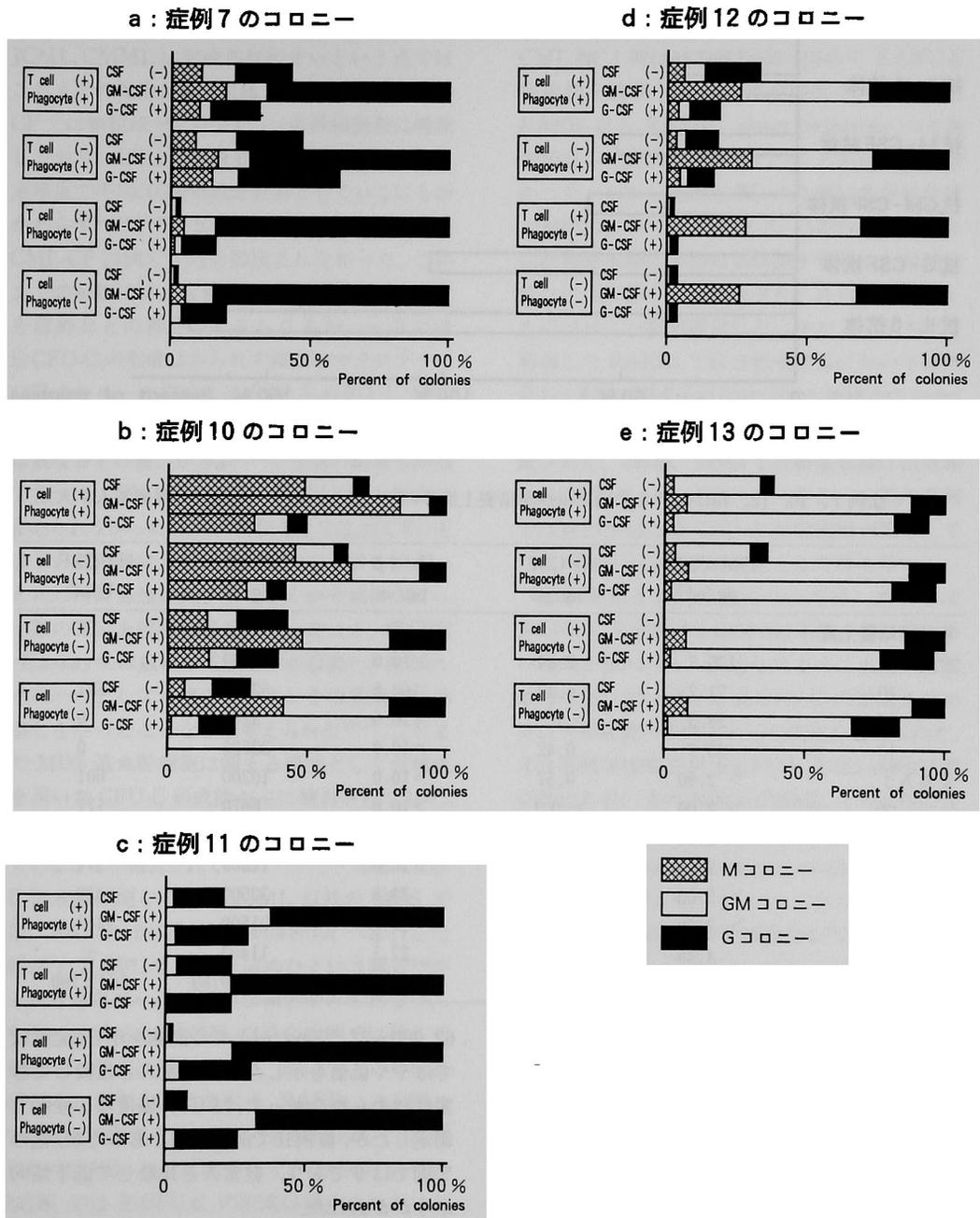


図2 症例7, 10, 11, 12, 13のコロニー

各症例において貪食細胞, T cell の除去, 非除去で4つの分画に分け, それぞれの分画でCSF無添加, GM-CSF 2 ng/ml, G-CSF 50 ng/ml添加の条件で形成されたコロニーの結果を, GM-CSF添加時のコロニー数に対する比率で示した. 全症例においてGM-CSF添加時のコロニー形成数は貪食細胞, T cell除去によって増加した. これは単核球浮遊液中の幹細胞の濃度が細胞除去に伴い濃縮され高まるが, 同じ細胞濃度 2×10^5 個/mlに再調整して播種したためと考えられる. 各々の分画で細胞除去のコロニー形成能に与える影響を評価しやすくするために, GM-CSF添加時の形成コロニー数との相対的比率で比較した.

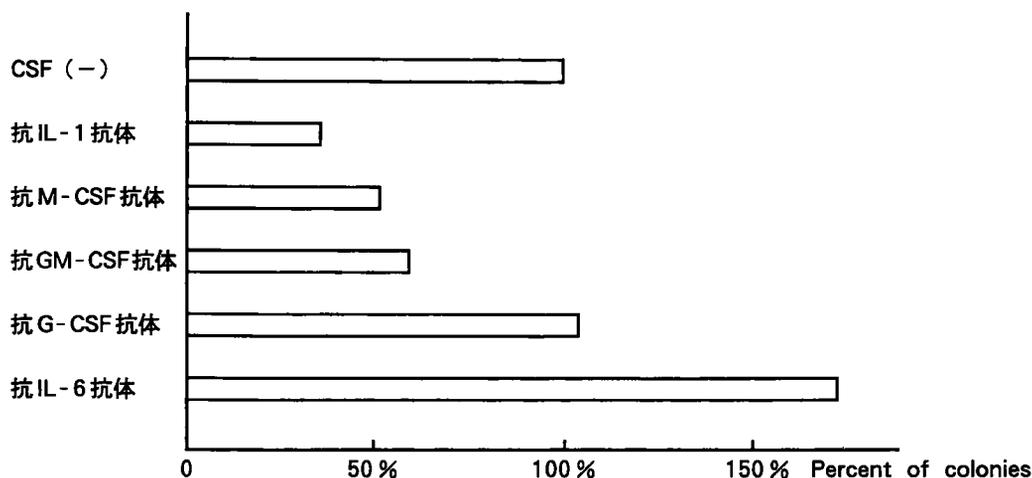


図3 症例10で各 cytokine に対する抗体を添加して行った colony assay

表8 症例7, 10, 12, 13における末梢血単核球培養上清中の cytokine 濃度 (下段に対照健常人7人)

	GM-CSF pg/ml	G-CSF ng/ml	IL-1 β pg/ml	IL-6 pg/ml	M-CSF U/ml
単核球培養上清					
症例 7.	135.7	2.44	>10.0	47100	—
10.	71.2	0.42	162.8	62900	621
12.	28.5	> 0.1	>10.0	3140	0
13.	35.9	0.42	>10.0	32500	0
正常人1.					
2.	> 2.00	> 0.1	>10.0	8670	177
3.	> 2.00	> 0.1	>10.0	11400	461
4.	> 2.00	> 0.1	>10.0	11300	374
5.	> 2.00	1.09	33.5	32500	430
6.	> 2.00	2.24	15.5	31800	141
7.	4.45	> 0.1	27.1	11400	—
				16750 \pm 9780	364 \pm 180

した。

7. 末梢血単核球培養上清中の cytokine 濃度の検討

症例数の関係から統計的処理はできなかったが、測定結果は表8に示す如くで、GM-CSF濃度は全症例で135.7~28.5pg/mlと健常人でほとんど測定感度以下であったのに対し高値を示した。G-CSF濃度は症例7で2.44ng/mlとやや高値を示したが、他の3症例では高値を示さなかった。IL-1 β 濃度は症例10で162.8pg/mlと著明な高値を示したが、他の3症例では測定感度以下であった。IL-6濃度は症例7, 10, 13で

62,900~32,500pg/mlとやや高値を示し、症例12ではやや低値を示したが、健常人と比較して著変は認められなかった。M-CSF濃度は3症例で測定したが、症例10で621U/mlであったが、他の2例では0であり、健常人と比較して低下傾向がうかがわれた。

考 察

MPDとMDSではE-CFU-Cの形成を認めることがあり、病態との関連から注目されている。今回の検討ではCML-AP 11例中2例、CML-BC 9例中1例、UMPD 2例中1例、

JCML 2 例中 2 例, CMML 10 例中 7 例, RAEBt 10 例中 1 例に E-CFU-C の形成が認められ, JCML, CMML に形成されやすいという点ではこれまでの報告とほぼ同様であった。従来 CML-CP では顆粒球マクロファージ系幹細胞数は増加しており, CFU-C は骨髓で正常人の平均15倍, 末梢血で平均500倍形成されるとしているにもかかわらず²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾, E-CFU-C に関しては, 今回 CML-CP 24 例で 1 例も形成されなかった。これまでの報告では, 骨髓, 末梢血双方でその形成を認めたとの報告²⁰⁾もみられるが, 一方では E-CFU-C の形成はみられず顆粒球マクロファージ系コロニーの形成には CSF を必要とし¹⁹⁾²²⁾, PV が Epo 無添加で E-CFU-E を形成するのは異なるとの報告が多く²⁴⁾²⁸⁾, 今回の結果も同様であった。PV においては E-CFU-E の形成が認められなかったが, その原因としては, ①CFU-E は 7 日目後にコロニー形成のピークを示し, それ以降は急速に減少してゆくが今回はコロニー数の算定を培養10日目に行ったこと, ②CFU-E assay には厳密な培養条件が必要とされるが, その一つとして血清アルブミンを培養液中に添加しなかったことなどが考えられた²⁹⁾³⁰⁾。これまで MDS 造血幹細胞に関する研究として骨髓血を用いた CFU-C 形成能が主に検討されており, CMML 以外では正常人に比しその形成能が低率であることが報告されている³¹⁾³²⁾³³⁾。一方 E-CFU-C 形成能に関しては, CMML 以外の MDS では, RAEBt から overt leukemia へ移行した時点で E-CFU-C 形成を認めたという報告³⁴⁾が 1 例なされている以外には報告がみられない。今回の検討でも CMML 以外の症例では総じて CFU-C 形成は低率であり, E-CFU-C 形成は CMML 類似の病態を示す RAEBt の 1 例, CMML 10 例中 7 例に認めたが RAEB, 上記以外の RAEBt には認められず, CMML 以外の MDS では E-CFU-C の形成は認められないとの従来の報告と同様の結果であった¹⁹⁾。

MPD, MDS にはしばしば病型移行がみられるが, 今回 CML-CP から AP または BC に移行した 6 症例で colony assay を施行しえたが, 病型移行後新たに E-CFU-C 形成が認められることはなかった。しかし前述したように CML-CP

では E-CFU-C は形成され難いと考えられ, E-CFU-C の形成が認められた CML-AP 2 例, CML-BC 1 例は病型移行後に初めて E-CFU-C 形成能を獲得した可能性が推察される。また RAEB から RAEBt, overt leukemia へと病型移行した症例でも E-CFU-C の形成を認めなかった。しかし CML-BC の 1 例は急性転化後の初期においては E-CFU-C は形成されなかったが疾患末期に末梢白血球数が著増した時期に新たに E-CFU-C が形成され, さらに経過とともにコロニー数が増加した。また E-CFU-C を形成した RAEBt では当初末梢血においてはコロニー形成が認められなかったが, 単球系の overt leukemia へ移行してゆく過程で E-CFU-C が形成された。MDS, MPD では疾患末期に白血球数の著増がしばしば認められるが, 一部の症例では病型移行に E-CFU-C 形成機構が関与している可能性を示唆する所見として興味深い。

血液所見との関連性については, 末梢血で E-CFU-C を形成する症例では末梢白血球数が多い傾向が認められ, 前述したように末梢白血球数の増加に伴い新たに E-CFU-C の形成またコロニー形成数の増加を示した症例も認められた。また末梢単球増多が E-CFU-C 形成14例中11例に認められ, その内訳は CMML 7 例以外には JCML 2 例, CMML 類似病態を有する RAEBt 1 例, CML myelomonocytic crisis へと移行途中の CML-AP 1 例であった。これらの症例では E-CFU-C 形成において単球由来の CSF (monokine) の関与, すなわち autocrine ないしは paracrine 増殖機構が存在する可能性が考えられた。

CML では 9; 22 転座, すなわち Ph¹染色体異常が 95% 以上に認められるが³⁵⁾, CP から AP, BC へと病型移行するのに伴い付加的核型異常が出現することがある。これらの変化はしばしば臨床所見及び血液所見に先行するので, そうした症例では核型異常に伴い何らかの遺伝子が関与して急性白血病様の病態に移行することが考えられている³⁶⁾。CML-AP 2 例, CML-BC 3 例に付加的核型異常を認めこのうち CML-BC の 1 例で E-CFU-C の形成を認めたが, この症例では clonal evolution に伴い E-CFU-C 形成能

を獲得した可能性が推測される。MDS では20~90%に核型異常が認められるとされ、特にRAEBでは80%前後と高率に数的あるいは構造的異常が報告され³⁷⁾、異常核型を示す症例でovert leukemiaへの移行率が高く生存期間も短いとされている³⁸⁾³⁹⁾。今回CMML類似のRAEBtで核型異常を示し、overt leukemiaへ移行する過程でE-CFU-Cの形成が認められた。さらに核型を検討し得たE-CFU-C形成例では10例中5例と高率に核型異常が認められたことは、E-CFU-C形成能と何らかの関連性を示すものとして興味深い。

また今回経過を観察し得たE-CFU-C形成例は全例とも原疾患の増悪により死亡している。原疾患の性格からみて当然とも考えられるが、MPD、MDSのうちE-CFU-C形成能を示す症例は予後不良ということができよう。なかでもE-CFU-Cを形成したCML-AP例、CML-BC例は、同じ病態の平均生存期間に比較して短く、CMLにおいてE-CFU-C形成能を認めることは予後不良因子と考えられる。Hunterら⁴⁰⁾は急性骨髄性白血病においてEndogenous leukemic blast colony (L-CFU)形成能を有する症例は完全寛解が得られにくく且つ再発をきたしやすいと述べているが、MPD、MDS特にCMLにおけるE-CFU-Cの検討は予後を推測する上で有益であると考えられた。

今回の検討で高率にE-CFU-Cを形成したのはJCMLとCMML症例においてであり、両疾患とも単球増多という共通点を持つ。Altmanら¹⁵⁾は、JCMLにおいて単球マクロファージコロニーからなるE-CFU-Cが形成されたと報告したが、その形成機序については言及していない。小池ら²²⁾は、JCMLにおいて多数のE-CFU-Cが形成されたが食食細胞除去によりコロニー形成数が激減したことから、その形成機序としては食食細胞分画の内因性CSF産生能によるものが考えられると報告した。その後、患者単核球培養上清中のcytokine濃度測定、cytokineに対する抗体を添加したcolony assayなどの検討からE-CFU-C形成機序としてIL-1⁴¹⁾⁴²⁾、GM-CSF⁴²⁾⁴³⁾、tumor necrotizing factor (TNF)⁴²⁾など単球由来のCSFによるpara-

crineが考えられるとの報告がなされた。一方、CMMLは1970年初めてLinman⁴⁴⁾により顆粒球系及び単球系の両系統の増殖に特徴づけられる骨髄増殖性疾患と記載された。その後、赤血球、白血球及び血小板の3系統にわたる異形成、無効造血の存在が報告され⁴⁵⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾、FAB分類⁹⁾の中でMDSの1型に分類されている。またras遺伝子の点突然変異が顆粒球、単球、T及びB cellに検出されたとの報告⁴⁸⁾があり、CMMLも他のMPD、MDSと同様に多能性幹細胞レベルの異常にもとづくclonal hemopathyと考えられる。CMMLでもJCMLと同様に高率にE-CFU-Cを形成し、形成機序としては食食細胞ないしは付着細胞を除去するとコロニー形成数が減少することからG-CSF¹⁹⁾、IL-6⁴⁹⁾⁵⁰⁾、GM-CSF⁴⁹⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾などの単球由来のCSFによるparacrineが推定されたとの報告がなされた。今回のCMML及びCMML類似病態のRAEBtにおける検討でも、食食細胞の除去により全例でE-CFU-C形成の抑制がみられたことから、単球由来のCSFの関与が強く考えられた。食食細胞の除去により特に強く抑制されたのは単球マクロファージコロニーであったので、食食細胞を除去した際に単球マクロファージ系のprogenitor cellを除去した可能性も考えられるが、従来clonogenic cellは食食能を持たないと言われており、実際に症例10について食食細胞よりも未分化な細胞を含む付着細胞を集めてcolony assayを行ったがコロニーは形成されなかった。従って単球由来のCSFが血液幹細胞ないしはprogenitor cellに対して単球マクロファージ系へと増殖を促すように作用しているparacrine増殖の可能性が示唆された。また食食細胞を除去した後でも単球マクロファージコロニーを認めた症例では除去によるE-CFU-C形成能の低下は軽度で依然としてコロニー形成を認めており、autocrine増殖機構としてのCSFの関与、CSF非依存性のautonomousな増殖機構などが存在することも考えられた。後者については、最近Reillyら⁵²⁾は、endogenous colonyを形成する急性骨髄性白血病の一部の症例でその培養上清にはCSF活性が認められず、GM-CSFの細胞内分泌によりおそらくは細胞内に存在する

であろう GM-CSF レセプターと結合し増殖刺激をするのであろうと報告しており、一見 CSF 非依存性のように思われても細胞内のレベルでは autocrine 増殖を営んでいる可能性を示唆している。今回の検討では、GM-CSF の添加により全例でコロニー数の増加が認められたこと、単核球培養上清中の GM-CSF 濃度を測定した 4 症例では全例が高値を示したことから、1 症例においてのみの検討であるが抗 GM-CSF 抗体の添加でコロニー形成が抑制されたことなどから GM-CSF による paracrine ないしは autocrine 増殖機構の存在が示唆された。GM-CSF による autocrine 増殖は、急性骨髄性白血病の一部の症例に認められたとの報告もみられる⁵³⁾。一方 G-CSF 添加でコロニー形成を強く刺激したのは 1 例においてのみであった。貪食細胞を除去した分画においてのみコロニー形成を刺激した症例では部分的な弱い刺激作用を有する可能性が考えられる。G-CSF は monokine のなかの 1 つであり、E-CFU-C の形成に関与している可能性を指摘した報告¹⁹⁾もみられるが、単核球培養上清中の濃度もあまり高値を示さなかったことからして E-CFU-C 形成に関与している可能性は少ないのではないと思われる。その逆に、2 例においては弱いながらも G-CSF が抑制作用を示したことから、これら症例では G-CSF が抑制因子として作用した可能性も推定され、その機序の一つとして clonogenic cell が G-CSF によって顆粒球系へと分化誘導され、その結果単核球マクロファージ系への分化が抑制されたために colony 形成に必要な monokine の分泌を抑制した可能性が考えられた。この他 CMML における E-CFU-C 形成抑制因子については、明石ら⁵⁰⁾が IL-4 による抑制作用を報告している。IL-1 は正常人においてマクロファージに作用して GM-CSF、IL-1 自身の産生を高め、T cell に作用して IL-3、GM-CSF、IL-6 の産生を刺激し、骨髄間質細胞に作用して GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IL-6 の産生を刺激する。また最近、Griffin ら⁵⁴⁾は一部の急性骨髄性白血病症例において白血病細胞の産生する IL-1 が間質細胞からの CSF 産生を刺激し白血病細胞の増殖を促進すると報告しており、Rodriguez-Cimadevilla

ら⁵⁵⁾は一部の急性骨髄性白血病症例において白血病細胞の産生する IL-1 が endogenous inducer として白血病細胞自身に作用した結果 GM-CSF などの cytokine が産生され、それにより白血病細胞の自己増殖が行われると報告している。症例 10 では単核球培養上清中の IL-1 β が唯一高値を示したが、抗 IL-1 抗体の添加でコロニー形成の抑制が認められ、同時に抗 GM-CSF 抗体、抗 M-CSF 抗体の添加でも抑制傾向が認められた。このことから、まず IL-1 β が単球から産生分泌され primer 刺激として単球自身に作用し、その結果産生分泌された GM-CSF、M-CSF が幹細胞ないしは progenitor cell を刺激して細胞増殖を引き起こす paracrine 増殖の可能性など、何等かの形で IL-1 が関与している可能性が考えられた。IL-6 が CMML における autocrine 増殖因子であるとの報告もみられるが⁴⁹⁾⁵⁰⁾、症例 10 では抗 IL-6 抗体の添加でコロニー数はわずかの増加を示したのみで、かつ単核球培養上清中の IL-6 も著明な高値を示しておらず、今回の成績からは否定的であり、むしろ IL-6 による抑制作用の存在さえ疑わせた。CMML は MPD と MDS との中間に位置づけられる特異な疾患であり、臨床的にも細胞化学的にも多様性を示す⁵⁶⁾⁵⁷⁾。今回の検討でも、CSF に対する反応性、コロニー構成細胞、単核球培養上清中の cytokine 濃度などそれぞれ性格を異にした点もあり、疾患自体の多様性が示唆された。また E-CFU-C 形成機序としては GM-CSF の paracrine 増殖が共通点として考えられたが、症例によっては IL-1 の paracrine 増殖の可能性、IL-6、G-CSF の抑制因子の可能性など E-CFU-C 形成機序自体にも多様性が存在するのではないかと考えられる。

近年 MDS においても発癌遺伝子の活性化が報告され⁵⁸⁾⁵⁹⁾、癌遺伝子の活性化が認められた症例では、病態の進行或いは白血病への移行が認められたとされている。MDS で最も研究されているのは、ras 遺伝子で N-ras 遺伝子の活性化が多く検出されており、CMML では特に高率である⁵⁸⁾⁵⁹⁾⁶⁰⁾。また M-CSF レセプターをコードする fms 遺伝子は、チロシンキナーゼ活性を有し、その突然変異は MDS の 5~15%に報告さ

れている⁶⁰⁾⁶¹⁾。MDS の中では CMML に最も高率に認められることは、M-CSF が単球増殖因子であることと関係しているのかもしれない。今後はこの方面からの検討も必要であると思われる。

結 論

今回、MPD 並びに MDS における E-CFU-C 形成能について検討した。その結果、

1. MPD 62例中 6例 (CML-AP 11例中 2例, CML-BC 9例中 1例, JCML 2例中 2例, UMPD 2例中 1例)に E-CFU-C 形成を認めた。また MDS では25例中 8例 (CMML 類似の RAEBt 1例, CMML 10例中 7例)に E-CFU-C の形成を認めた。

2. 末梢血で E-CFU-C の形成を認めた症例では末梢白血球数が多い傾向が認められ、疾患末期に白血球数が著増した時 E-CFU-C が形成される症例も認められた。

3. E-CFU-C 形成例では単球増多を示す症例が多く、さらに CMML 及び単球増多を示した CMML 類似の RAEBt の 5例では、貪食細胞を除去することにより E-CFU-C の形成は抑制され、GM-CSF の添加によりコロニー形成数が増加した。また 4例で末梢血単核球培養上清中濃度を測定した結果 GM-CSF 濃度は高値であり、1例で抗 GM-CSF 抗体を添加すると E-

CFU-C 形成が抑制された。

4. E-CFU-C 形成例では高率に核型異常が認められた。

5. 経過観察が可能であった E-CFU-C 形成例は全例とも死亡に至った。なお、E-CFU-C の形成を認めた CML-AP 1症例, CML-BC 1症例の生存期間は同一疾患の平均生存期間に比較して短い傾向にあった。

以上の成績を得たが、E-CFU-C 形成能と病型、病像の推移に関連性が推定され、hematological malignancy で E-CFU-C 形成能を認めることは予後不良因子と考えられた。CMML における E-CFU-C 形成機序としては単球由来の CSF がコロニー形成に関与している可能性が推察され、特に GM-CSF の paracrine が示唆されたが、同時にその機構に多様性が存在すると考えられた。MPD 並びに MDS における E-CFU-C 形成能の検討は、これら疾患における血球の分化・増殖機構の解析と病態との関連を検討する上で意義深いと考えられた。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った木村郁郎教授並びに高橋功講師、大本英次郎助手に深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨は第53回日本血液学会総会 (京都)、第33回日本臨床血液学会 (東京) で発表した。

文 献

- 1) Dameshek W : Some speculation of myelo-proliferative syndromes. *Blood* (1951) **6**, 372—375.
- 2) Fialkow PJ, Jacobson RJ and Papayannopoulou T : Chronic myelocytic leukemia : Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* (1977) **63**, 125—130.
- 3) Fialkow PJ : Cell lineages in hemato-poietic neoplasia studied with glucose-6 phosphate dehydrogenase cell markers. *J Cell Physiol* (1982) Suppl. 1, 37.
- 4) Jacobson RJ, Salo A and Fialkow PJ : Agnogenic myeloid metaplasia : Clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* (1978) **51**, 189—194.
- 5) Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF and Steinmann L : Polycythemia vera : Stem cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* (1976) **295**, 913—916.
- 6) Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K and Murphy S : Evidence that essential thrombocytopenia in a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* (1981) **58**, 916—919.
- 7) 高橋隆幸, 井谷舜郎, 星野 孝, Messner HA : 慢性骨髓白血病における single colony の染色体分析…

- CFU-GEMM, CFU-Meg, CFU-Eo における Ph¹染色体の証明. 日血会誌 (1984) 47, 377.
- 8) Blook M, Jacobson LoJ and Bethard WFB : Preleukemic acute human leukemia. JAMA (1953) 152, 1018—1028.
 - 9) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR and Sultan C : Proposals for the classifications of the myelodysplastic syndrome. Br J Haematol (1982) 51, 189—199.
 - 10) Raskind WH, Tirumali N, Jacobson R, Singer J and Fialkow PJ : Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome. Blood (1984) 63, 1318—1323.
 - 11) Amenomori T, Tomonaga M, Jinnai I, Soda H, Nonaka H, Matsuno T, Yoshida Y, Kuriyama Y, Ichimaru M and Suematsu T : Cytogenetic and cytochemical studies on progenitor cell of primary acquired sideroblastic anemia (PASA) : Involvement of multipotent myeloid stem cells in PASA clone and mosaicism with normal clone. Blood (1987) 70, 1367—1372.
 - 12) Zanjani ED : Hematopoietic factors in polycythemia vera ; in Polycythemia, Grune and Stratton, New York (1976) pp 111—122.
 - 13) Golde DW, Bersh N and Cline MJ : Polycythemia vera : Hormonal modulation of erythropoiesis in vitro. Blood (1977) 49, 399—405.
 - 14) Casadevall N, Vainchenker W, Lacombe C, Vinci G, Chapman J, Breton-Gorius J and Varet B : Erythroid progenitors in polycythemia vera : Demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum free cultures. Blood (1982) 59, 447—451.
 - 15) Altman AJ, Palmer CG and Baehner RL : Juvenile “chronic granulocytic leukemia” A panmyelopathy with prominent monocytic involvement and circulating monocyte colony-forming cells. Blood (1974) 43, 341—350.
 - 16) Partanen S, Ruutu T and Vuopio P : Circulating haematopoietic progenitors in myelofibrosis. Scand J Haematol (1982) 29, 325—330.
 - 17) 立田 浩, 布出泰紀, 市場茂樹, 奥野芳章, 高橋隆章 : Endogenous CFU-E 及び CFU-C コロニーの形成を認めた慢性好中球性白血病の1例. 日血会誌 (1985) 52, 920.
 - 18) Ohyashiki K, Ohyashiki J, Oshimura M, Miyasaka Y, Sakai N, Osamura S, Tonomura A and Ito H : Cytogenic and in vitro culture studies on chronic myelomonocytic leukemia. Cancer (1984) 54, 2468—2474.
 - 19) Yuo A, Miyazono K, Urabe A and Takaku F : Characteristics of granulocyte-macrophage colony formation in chronic myelomonocytic leukemia : A comparative study with other myelodysplastic and myeloproliferative disorders. Jpn J Cancer Res (1990) 81, 820—826.
 - 20) 真田雅好, 高橋益広, 岸 賢治, 森山美昭, 柴田 昭 : 慢性骨髄性白血病における幹細胞 (CFU-C) の動態. 臨床血液 (1979) 20, 1539—1547.
 - 21) Kobayashi S, Teramura M, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K and Mizoguchi H : Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3. Br J Haematol (1993) 83, 539—544.
 - 22) 小池健一, 長沼邦明, 石井栄三郎, 辻浩一郎, 安藤伯秋, 八木芳雄, 野呂瀬昇, 斉藤寛治, 内海治郎 : In vitro colony 形成法を用いた若年型慢性骨髄性白血病の病態解析. 日血会誌 (1985) 48, 750—755.
 - 23) Hanamura T, Motoyoshi K, Yoshida K, Saito M, Miura Y, Kawashima T, Nishide M and Takaku F : Quantitation and identification of human M-CSF in human serum by ELIZA. Blood (1988) 72, 886—892.
 - 24) Moore MAS, Williams N and Metcalf D : In vitro colony formation by normal and leukemic human

- hematopoietic cells. *J Natl Cancer Inst* (1973) **50**, 603—623.
- 25) Moore MAS : In vitro culture studies in chronic granulocytic leukemia. *Clin Hematol* (1977) **6**, 97—112.
- 26) Berthier R : Cellular factors regulating granulopoiesis in myeloid leukemia. *Blood Cells* (1977) **3**, 461—474.
- 27) Metcalf D : Hematopoietic colonies. Springer-Verlag, Berlin (1977).
- 28) Weinberg RS, Worsley A, Glibert HS, Cutter J, Berk PD and Alter BP : Comparison of erythroid progenitor cell growth in vitro in polycythemia vera and chronic myelogenous leukemia. Only Polycythemia vera has endogenous colonies. *Leuk Res* (1989) **13**, 331—338.
- 29) Terasawa T, Kimura H, Maruyama W and Kasai S : An improved assay method for erythropoietic colony forming units in murine and human bone marrow. *Acta Haematol* (1979) **42**, 72—78.
- 30) Iscove NN, Sieber F and Winterhalter KH : Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow. *J Cell Physiol* (1974) **83**, 309—320.
- 31) Greenberg PL, Nichols WC and Schrier SL : Granulopoiesis in acute myeloid leukemia and preleukemia. *N Engl J Med* (1971), **284**, 1225—1230.
- 32) Milner GR, Testa NG, Geary CG, Dexter TM, Muldal S, MacIver JE and Lajtha LG : Bone marrow culture studies in refractory cytopenia and smoldering leukemia. *Br J Haematol* (1977) **35**, 251—261.
- 33) Verma DS, Spintzer G, Dicke KA and McCredie KB : In vitro agar culture patterns in preleukemia and their clinical significance. *Leuk Res* (1973) **3**, 41—49.
- 34) 朝長万佐男, 陣内逸郎, 塚崎邦彦, 栗山一孝, 松尾辰樹, 雨森龍彦, 市丸道人 : 急性白血病転化時に Spontaneous colony formation を認めた RAEB-t の一例. *日血会誌* (1987) **50**, 438.
- 35) Rpwley JD : A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinecrine fluo-rescence and Giemsa staining. *Nature* (1973) **243**, 290—293.
- 36) 鎌田七男 : 前白血病状態の病態 (染色体) ; 前白血病状態 (1984) pp 30—37.
- 37) Greenberg PL : The smoldering myeloid leukemic states (clinical and biological features). *Blood* (1983) **61**, 1035—1044.
- 38) Knapp RH, Dewald GW and Pierre RV : Cytogenetic studies in 174 consecutive patients with preleukemic or myelo-dysplastic syndrome. *Mayo Clin Proc* (1985) **60**, 507—516.
- 39) Nowell PC : Cytogenetics of preleukemia *Cancer Genet Cytogenet* (1982) **5**, 265—278.
- 40) Hunter AE, Rogers SY, Roberts IAG, Barrett AJ and Russel N : Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia. *Blood* (1993) **82**, 899—903.
- 41) Bagby GC, Dinarello AC, Neerhout RC, Ridgway D and McCall E : Interleukin 1-dependent paracrine granulopoiesis in chronic granulocytic leukemia of the juvenile type. *J Clin Invest* (1988) **82**, 1430—1436.
- 42) Freedman MH, Cohen AC, Grunberger T, Bunin N, Luddy RE, Saunders EF, Shahidi N, Lau A and Estrov Z : Central role of tumor necrosis factor, GM-CSF and inter-leukin 1 in the pathogenesis of juvenile chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematol* (1992) **80**, 40—48.
- 43) Gualtieri RJ, Emanuel PD, Zuckerman KS, Martin G, Clark SC, Shaddock RK, Dracker RA, Akabutu J, Nitscke R, Hetherington ML, Dickerman JD, Hakami N and Castleberry R : Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor is an endogenous regulator of cell proliferation in juvenile chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1989) **74**, 2360—2367.
- 44) Linman JW : Myelomonocytic leukemia and its preleukemic phase. *J Chronic Dis* (1970) **22**, 713—

- 716.
- 45) Miesher PA and Farquet JJ : Chronic myelomonocytic leukemia in adults. *Semin Hematol* (1974) **11**, 129—139.
 - 46) Geary CG, Catovsky D, Wiltshaw E, Milner GR, Schles MC, Van Noorden S, Wardsworth LD, Muldal S, MacIver JE and Galton DAG : Chronic myelomonocytic leukemia. *Br J Haematol* (1975) **32**, 289—302.
 - 47) Zitoun R : Subacute and chronic myelo-monocytic leukemia : A distinct haematological entity. *Br J Haematol* (1976) **32**, 1—7.
 - 48) Janssen JWG, Buschle M and Layton M : Clonal analysis of myelodysplastic syndromes. Evidence of multipotent stem cell origin. *Blood* (1989) **73**, 248—254.
 - 49) Everson MP, Brown CB and Lilly MB : Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are candidate growth factors for chronic myelomonocytic leukemia cells. *Blood* (1989) **74**, 1472—1476.
 - 50) Akashi K, Shibuya T, Harada M, Takamatsu Y, Uike N, Eto T and Niho Y : Interleukin-4 suppresses the spontaneous growth of chronic myelomonocytic leukemia cells. *J Clin Invest* (1991) **88**, 223—230.
 - 51) 堀田友光, 鏡味良豊, 斎藤英彦 : 慢性骨髄単球性白血病における自発性顆粒球・マクロファージコロニー形成機序. *日血会誌* (1985) **53**, 807.
 - 52) Reilly IAG, Kozlovski R and Russell NH : Heterogenous mechanisms of autocrine growth of AML blasts. *Br J Haematol* (1989) **72**, 363—369.
 - 53) Young DC and Griffin JD : Autocrine secretion of GM-CSF in acute myelo-blastic leukemia. *Blood* (1986) **68**, 1178—1181.
 - 54) Griffin JD, Rambaldi A, Vellenga E, Young DC, Ostapovicz D and Cannitra SA : Secretion of interleukin-1 by acute myeloblastic leukemia cells in vitro induces endothelial cells secrete colony stimulating factors. *Blood* (1987) **70**, 1218—1221.
 - 55) Rodriguez-Cimadevilla JC, Beauchemin V, Villeneuve L, Letendre F, Shaw A and Hoang T : Coordinate secretion of interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by the blast cells of acute myeloblastic leukemia : Role of interleukin-1 as an endogenous inducer. *Blood* (1990) **76**, 1481—1489.
 - 56) Hotta T and Utsumi M : Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)-characterization of clinical features and prognosis. *Acta Haematol Jpn* (1988) **51**, 1441—1447.
 - 57) 倉田寛一, 平井真希子, 三輪哲義, 村井善郎, 森真由美 : 慢性骨髄単球性白血病の多様性の検討. *臨床血液* (1990) **31**, 1906—1913.
 - 58) 高久文麿, 平井久丸, 西田淳二 : 前白血病状態におけるトランスフォーミング遺伝子. *癌と化学療法* (1987) **14**, 2170—2175.
 - 59) Hirai H and Ishikawa F : The N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome and leukemia. *Acta Haematol Jpn* (1988) **51**, 1463—1470.
 - 60) Layton DM : The molecular biology of myelodysplastic syndromes (pre-leukemia) ; in *The Myelodysplastic Syndromes*, Mufti GJ and Galton DAG eds, Churchill Livingstone, Edinburgh (1992) pp 151.
 - 61) Bartram CR : Molecular genetic aspects of myelodysplastic syndromes. *Haematol Oncol Clin North Am* (1992) **6**, 557—570.

Endogenous colony formation in myeloproliferative disorder and myelodysplastic syndrome

Toshio MURASE

Second Department of Internal Medicine,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. I. Kimura)

An endogenous colony formation assay was performed on 24 patients with chronic myelogenous leukemia in the chronic phase (CML-CP), 11 patients with CML-accelerated phase (CML-AP), nine patients with CML-blastic crisis (CML-BC), nine patients with polycythemia vera, two patients with essential thrombocythemia, two patients with primary myelofibrosis, two patients with juvenile CML (JCML), one patient with chronic neutrophilic leukemia, two patients with unclassified myeloproliferative disorder (UMPD), five patients with refractory anemia with excess of blasts (RAEB), 10 patients with RAEB in transformation (RAEBt) or overt leukemia, and 10 patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). Endogenous colony formation was observed in two patients with CML-AP, one patient with CML-BC, two patients with JCML, one patient with UMPD, one patient with RAEBt, and seven patients with CMML.

All of these endogenous colonies were identified as CFU-C by chemical staining. In some patients with CML or RAEBt, endogenous colonies were observed when progression of disease occurred. Endogenous colony formation was partially inhibited by the depletion of phagocytes in five patients with CMML or RAEBt. Four of these patients revealed increased releases of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) to the culture medium, and the addition of anti-GM-CSF antibody totally inhibited the formation of endogenous colony in one case. Patients who formed endogenous colonies often had chromosomal abnormalities and short survival.

These findings suggest that paracrine or autocrine GM-CSF plays an important role in endogenous colony formation and that such endogenous colony formation is one of the risk factors in hematological malignancies.