泌尿紀要33巻3号
1987年3月

# 膀胱癌患者の非特異的細胞性免疫反応におよぼす仔牛胸腺液性因子の影響について

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室（主任：前川正信教授）
堀　井　明　範

# INFLUENCE OF BOVINE CALF THYMIC HUMORAL FACTOR ON NON-SPECIFIC CELLULAR IMMUNE RESPONSE OF BLADDER CARCINOMA PATIENTS

Akinori Horii
*From the Department of Urology, Osaka City University School of Medicine*
*(Director: Prof. M. Maekawa)*

The thymus humoral factor (THF) was extracted from the bovine calf thymus, and its effect on the non-specific cellular immune response of 34 bladder carcinoma patients was studied using the modified micro-whole blood culture method. As a result, in the early stage of bladder carcinoma, the immuno-deficient state of the lymphocytes was restored under the influence of THF. in vitro, but in the terminal stage of bladder carcinoma, the effect of THF was not observed. This difference was clear between the low stage group and high stage group. This fact indicates that the accumulation of precursor T cells occurs in the peripheral blood of the patients of low stage bladder carcinoma, and THF is thought to be effective on T cell maturation. In the late stage of bladder carcinoma, disturbance of the production of immature T cells in the bone marrow is suspected.

**Key words** : Bladder carcinoma, Thymus humoral factor, Con A response, Micro-whole blood culture

## 緒　　言

最近免疫学の発展にともない，癌など悪性腫瘍の発生や増殖に対する担癌生体の抵抗力と免疫能，特に細胞性免疫能とは密接な関係のあることが示唆されてきた．一般に担癌患者の非特異的細胞性免疫能は健康人に比して低下していると報告されている．膀胱癌患者においても同様の傾向が示されており[1]，さらに担癌患者免疫能の低下の要因として血清中に存在する諸因子，加えて血球側の因子も検索されているが，最近胸腺由来の因子も関与していると考えられるに至った．一方，胸腺については，胸腺はT細胞産生の場であり，T細胞は細胞性免疫に重要な役割りを果たしていることが示唆されてきた．即ち臨床的には胸腺無形成にともなう DiGeorge 症候群であり[2]，この疾患に胸腺を移植することにより，免疫能の回復する例のあることはよく知られている．また生後まもなく胸腺摘除された動物の免疫能は低下するが，これに胸腺を挿入した millipore diffusion chamber を腹腔内移入することにより，再びその個体の免疫能の改善が認められた実験[3]によって，胸腺から免疫能を上昇させると考えられる体液性因子が分泌されることが想定された．この体液性因子については種々の報告[4~7]があり，最近ではその分子構造の明らかになったものもある[8]著者は，細胞性免疫能に大きな影響をもつと報告されている Goldsein ら[5]の抽出した thymosin に注目し，彼らの方法に準じて仔牛胸腺液性因子（THF）を抽出して，研究試料とした．一方，当教室では，n-

Butyl n-hydroxybutyl nitrosamine (BBN) を経口的に投与して，ラットに膀胱癌を発症させ，癌発生前における胸腺リンパ球の concanavalin A (Con A) 刺激に対する応答能の低下[9]，ならびに Con A 添加によるその上昇を見出している．本論文は上記の文献的考察と教室の業績にもとづき，膀胱癌患者の末梢血リンパ球におよぼす THF の影響を，リンパ球の Con A に対する応答能を指標として追求し，癌浸潤度と末梢血液中における THF 感受性リンパ球との関連性について検討を加えた．

## 研究対象および方法

1．対象症例

症例は大阪市立大学医学部付属病院泌尿器科を受診した膀胱癌患者34例で，男子22例，女子12例，平均年齢は66.8歳である．これら症例の組織学的所見は全例移行上皮癌であり，癌の浸潤度の判定は Jewett-Marshall の分類[10]に従った．即ち粘膜内にとどまるものを stage O，粘膜下組織まで浸潤したものを stage B，膀胱筋層の1/2にまで浸潤の及んでいないものを stage $A_1$，膀胱筋層 1/2 をこえて浸潤するものを stage $B_2$，膀胱周囲の脂肪組織にまで広がるものを stage C，リンパ節転移，遠隔転移を有するものを stage D と分類した．また癌の悪性度を Broaders の分類[11]に従い，Ⅰ～Ⅳの4段階に区分した．対象群の stage 別，grade 別の分布は Table 1 の如くで，癌の悪性度と浸潤度の分布は相関する傾向がうかがわれる．

また泌尿器科的良性疾患10例を対照群として用いたが，そのうちわけは Table 2 に示す通りで平均年齢64.8歳であった．なお対照群には臨床的に明らかな免疫不全症と考えられる症例，重症感染症，およびアレルギー性疾患を有するものは含まれていない．また検査試料のサンプリングは，放射線療法中，制癌剤あるいは免疫賦活剤など免疫能に影響を及ぼす薬剤を服用中のものは除外して行なった．

2．仔牛胸腺液性因子の抽出ならびに調整

4カ月齢の仔牛より屠殺時に胸腺を採取し，Goldstein ら[5]の方法に準じ，Fig. 1 に示す操作により液性因子を抽出した．即ち傍胸腺リンパ節，被膜，脂肪組織および血管などを除去した後細切し，その後重量比で3倍容の生理的食塩水を加えて homogenize し，homogenate を 3,000×G，20分間遠沈後上清を採取した．上清は 80°C，15分間攪拌しつつ加熱し，ガーゼを用いて濾過し，濾液を 4°C に冷却した．冷却した濾液に－20°C，99%アセトン5倍容を静かに加え，

Table 1. Stage and grade of bladder carcinoma patients.

| Grade \ Stage | O～A | $B_1$ | $B_2$ | C | D | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ⅰ | 1 | — | — | — | — | 1 |
| Ⅱ | 6 | — | — | — | — | 6 |
| Ⅲ | 2 | 8 | 6 | 3 | 5 | 24 |
| Ⅳ | — | — | 1 | — | 2 | 3 |
| Total | 9 | 8 | 7 | 3 | 7 | 34 |

Table 2. Age, sex and disease of control subjects.

| No. | Age | Sex | Disease |
|---|---|---|---|
| 1 | 56 | M | Lt.renal stone |
| 2. | 62 | F | Rt.renal stone |
| 3. | 59 | M | B.N.C. |
| 4. | 66 | M | B.P.H. |
| 5. | 69 | F | Cystitis |
| 6. | 63 | M | B.P.H. |
| 7. | 71 | F | Cystitis |
| 8. | 65 | M | Lt.ureteral stenosis |
| 9. | 67 | F | Cystitis |
| 10. | 70 | M | B.P.H. |

B.N.C.: Bladder Neck Contracture
B.P.H.: Benign Prostatic Hypertrophy
Mean age 64.8 y.o.

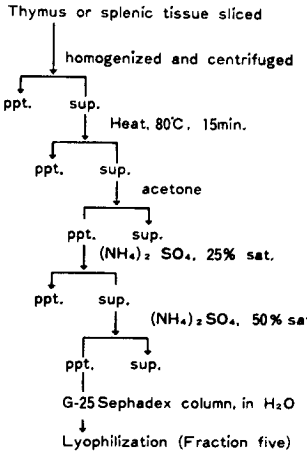


Fig. 1. Purification method for thymus and splenic humoral factor.

1時間 4°C にて静置した．その後，4,000×G，15分間遠沈し，沈澱を採取し乾燥後，燐酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.2) に溶解して，硫酸アンモニウムで25%飽和溶液とした．沈澱を除去後，さらに上清に硫酸アンモニウムを加えて50%飽和溶液となし，折出した沈澱を

採取した．この沈澱を燐酸緩衝液に溶解した後，蒸留水で平衡化した Sephadex G-25 column を用いて脱塩し，Goldstein ら[4]の Fraction 5 に相当する分画を分離し凍結乾燥した．その後，生理的食塩水で稀釈し，蛋白濃度を標準蛋白 bovine serum albumin を使用した Lowry 法[12]を用いて測定し，0.45 μ の membrane filter (Sartorius) を通して滅菌後，－20°C で凍結保存した．試料は使用時ごとに融解して用いた．また4カ月齢の仔牛より胸腺採取時に，同一仔牛より得た脾臓に同様の抽出操作を加えて，脾臓抽出液 (SHF) を作製し，THF との比較実験に供した．

3．微量全血培養法

THF の影響を検索するため，血漿成分を除去し，ならびにリンパ球分離培養法に近い環境を作る目的で従来の微量全血培養法[13]に，Fig. 2 に示す如く若干の修正を加えた方法を工夫した．即ち，正肘静脈よりヘパリン (1,000 μ) 加末梢血 10 ml を採血し，2,000 rpm; 15分間遠沈し，血漿を除去後，buffy coat ならびに赤血球層の上部 1/3 を採取して，10% Fetal Calf Serum (FCS) を添加した培養液 RPMI 1640 (Gibco Grand Island N. Y.) を遠沈前末梢血と同量になるまで加え，さらに 2,000 rpm, 15分間遠沈し，上清を除去後，10% FCS 加 RPMI 1640 液を同量加え，よく混和して血球浮遊液とした．Con A 刺激によるリンパ球の応答能を検討するため，$^3$H-thymidine ($^3$H-TdR) のとりこみを指標として予備実験を行ない，前述の血球浮遊液の至適量が 0.2 ml であることを確めたので，各 tube に 0.2 ml まで分配し，それに10% FCS 加 RPMI 1640 液を 0.8 m まで加え，1.0 ml とした．同時に THF あるいは SHF を予備実験で確かめた至適濃度である 10 μg/ml まで加え，5% CO 95% air incubator 内を 37°C に保ち，24時間培養した．24時間培養後，上清培養液を除去し 10% FCS 加 RPMI 1640 液を新しく同量加えて培地交換を行なった．その際に Con A を 8 μg/ml まで添加し，同一条件下でさらに48時間培養した．なお培養終了24時間前に $^3$H-TdR (Specific activity 5 Ci/mmol) を 1 μCi/ml 加え，培養終了後，各 tube に蒸留水を加えて赤血球を溶血させた直後，血球浮遊液を millipore filter (pore size : 1.2 μ) で減圧濾過した．生理的食塩水で培養管に付着した細胞を洗浄し，filter 上に集め，5% 氷冷三塩化酢酸で酸可溶性物質を除き filter を充分乾燥させ，counting vial に移し，ドータイト試薬 (PPO-POPOP-Toluene solution) 10 ml まで加えて liquid scintillation counter (Nuclear Chicago Mark II) にて放射活性を測定した．一方，同一手段で THF のかわりに生理的食塩水 10 μl/ml を加えたものを同様に培養し，$^3$H-TdR のとりこみ (cpm) を測定して対照培養群とし，THF の効果を Fig. 3 に示す如く% increase として算出した．

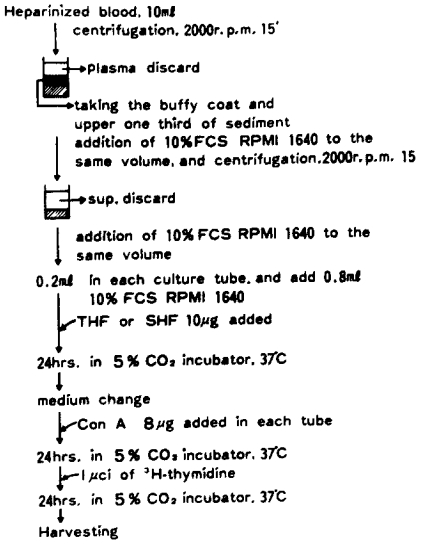


Fig. 2. Modified micro-whole blood culture method.

$$\%\ \text{increase} = \left(\frac{\text{Uptake of } {}^3\text{H-thymidine by THF or SHF and Con A}}{\text{Uptake of } {}^3\text{H-thymidine by Saline and Con A}} \times 100 - 100\right)$$

THF : Thymus humoral factor
SHF : Splenic humoral factor

Fig. 3. Formula calculating percent increase.

## 実 験 成 績

1．予備実験成績

1) 微量全血培養法変法における Con A の至適濃度 (Fig. 4)

微量全血培養変法において，THF 濃度を 10 μg/ml として添加する Con A 濃度を，4, 8, 16, 32, 64 μg/ml と変化させると，48時間培養後の $^3$H-TdR

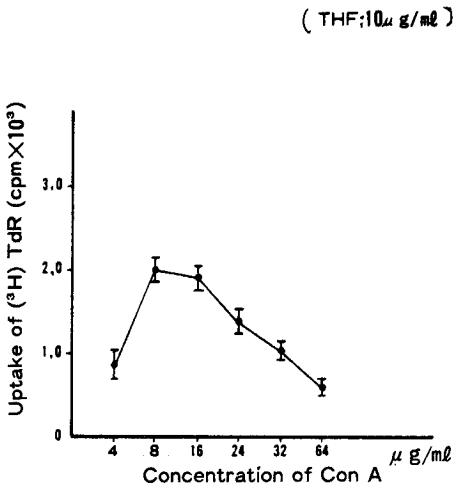


Fig. 4. Optimum concentration of concanavalin A in modified micro-whole blood culture method.

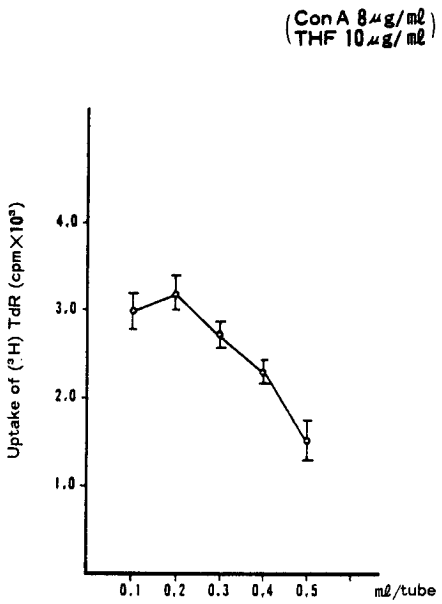


Fig. 5. Optimum blood volume to presence in modified micro-whole blood culture method.

のとりこみをみるに，Fig. 4 の如く，8 μg/ml で 2,060±117 cpm と最大値を示し，この濃度において DNA 合成能が最も高いと思われた．したがって以後の実験においては，Con A を 8 μg/ml 添加し実験を施行した．

2) 至適培養血球浮遊液量 (Fig. 5)

本実験では，血漿ならびに赤血球成分を可及的に除

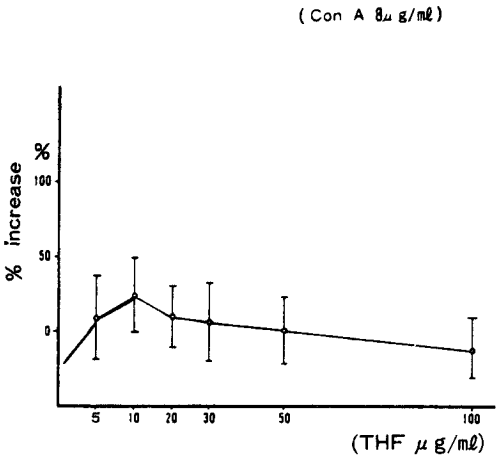


Fig. 6. Optimum concentration of thymus humoral factor in modified micro-whole blood culture method.

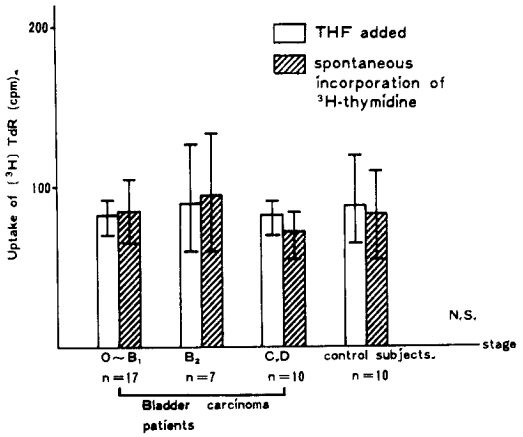


Fig. 7. Mitogenic effect of thymus humoral factor on lymphocytes obtained from various stages of patient with bladder carcinoma.

去するため微量全血培養法変法を施行している．よって培養に供する血球浮遊液の至適量を，決める必要がある．そのため濃度を 8 μg/ml, THF 濃度を 10 μg/ml に設定し，血球浮遊液を 0.1 ml から 0.5 ml に変化させた場合，Fig. 5 の如く 0.2 ml において最大値をとり，また処理操作も容易であったので，以後の実験においては，血球浮遊液量を 0.2 ml に設定し施行した．

3) THF 至適添加濃度 (Fig. 6)

本実験で用いた THF は，Goldstein ら[5] のいう Fraction 5 と相当すると考えられるが，血液培養に添加する至適濃度をその蛋白濃度で検討した．結果は

Fig. 6 に示す如く，Con A 8 μg/ml 血球浮遊液量 0.2 ml として，THF を 5 μg/ml から最大 100 μg/ml に変化させると % increase は THF が 10 μg/ml で最大値を示したため，THF の添加濃度を 10 μg/ml として実験を施行した．

4) THF ならびに SHF の mitogenic 作用

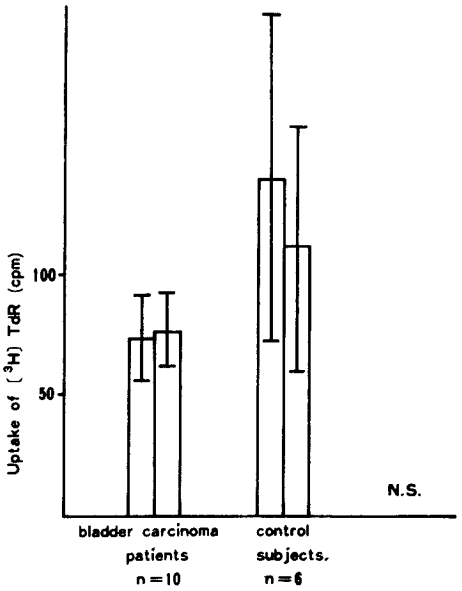


Fig. 8. Mitogenic effect of splenic humoral factor on lymphocytes obtained from bladder carcinoma patients and control subjects.

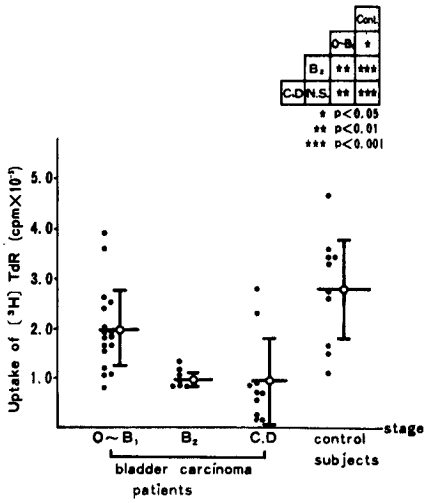


Fig. 9. Comparison of Con A response of lymphocytes obtained from various stages of patients with bladder carcinoma.

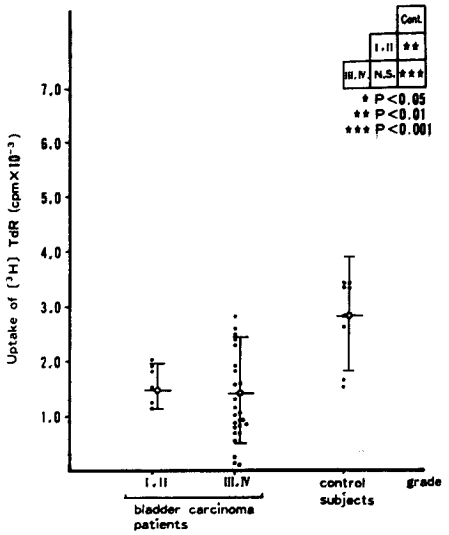


Fig. 10. Camparison of Con A response of lymphocytes obtained from various grades of patients with bladder carcinoma.

膀胱癌の stage 別に THF および SHF の非特異的リンパ球刺激作用を $^3$H-TdR のとりこみ (cpm) を指標として示す．THF については Fig. 7 の如く，stage 0-$B_1$ 群では 80 ± 24 cpm，$B_2$ 群では 98±48 cpm，C，D 群では 80±24 cpm，対照群では 82±36 cpm となり，THF および Con A 無添加の培養群に比し有意差は認められなかった．SHF の非特異的リンパ球刺激作用は Fig. 8 に示す如く，対照群では 140±69 cpm，膀胱癌患者群では 74±18 cpm とそれぞれの SHF および Con A 無添加培養群と有意差はなく，THF および SHF による非特異的リンパ球刺激作用はないと考えられた．

2．膀胱癌患者末梢血リンパ球の Con A 応答能におよぼす Con A の影響

1) 膀胱癌患者群と対照群の Con A 応答能の比較

THF 添加による末梢血リンパ球の応答能を $^3$H-TdR のとりこみを指標として示すと，対照群では 2,849±1,049 cpm とばらつきはあるものの高値を示したものに比し，膀胱癌患者群では 1,466±953 cpm と有意に低値を示した．また癌浸潤度別にみると，Fig. 9 の如く，stage 0-$B_1$ 群では 1,979±788 cpm，$B_2$ 群では 991 ± 199 cpm，C，D 群では 955 ± 860 cpm となり，対照群と膀胱癌患者各群との間には有意の差が認められた．また 0-$B_1$ 群に比し，B 群および C，D群は有意に低下していたが，$B_1$ 群と C，D 群の間に有意差は認められなかった．一方，grade 別にみると Fig. 10 の如く，grade I，II の

low grade 群では 1,505±425 cpm grade III, IV の high grade 群では 1,479±1,001 cpm と対照群の 2,849±1,049 cpm に比し，low grade, high grade 両群とも有意に低下していたが，low grade 群と high grade 群との間に有意差はなかった．上記の結果は，膀胱癌の進展に伴い，末梢血リンパ球の Con A 応答能が低下することを示している．また，Con A を加えない spontaneous な $^3$H-TdR のとりこみは Fig. 7 の如く各群に有意差はなく大きな変化は認められなかった．

2) 膀胱癌患者末梢血リンパ球の Con A 応答能におよぼす THF の影響

(1) Stage 別の成績

Fig. 11 の如く，対照群では 2,800±1,130 cpm であるが，stage 0-$B_1$ 群では 3,085±1,408 cpm, $B_2$ 群では 1,017±328 cpm, C, D 群では 930±905 cpm であり，対照群，0-$B_1$ 群に比し，$B_2$ 群 C, D 群では有意に低値を示した．また，対照群と 0-$B_1$ 群の間，$B_2$ 群と C, D 群の間にはそれぞれ有意差は認められなかった．これを% increase で検討すると，Fig. 12 に示す如く，対照群では 0±15.6%，0-$B_1$ 群では 55.6±28.0%，$B_2$ 群では3.0±25.1%，C, D 群では −0.1±25.2%の値を示し，0-$B_1$ 群は他の群に比し有意の上昇を示したが，対照群，$B_2$ 群，C, D 群の間にはそれぞれ有意差は認められていない．即ち，0-$B_1$ 群では，THF 添加により，末梢血リンパ球の Con A 応答能は有意に上昇したと考えられた．

(2) Grade 別の成績

Fig. 13 の如く，low grade 群では 2,402±674 cpm, high grade 群では 1,928±1,683 cpm となり，low grade 群の方が高い傾向を示したが，両群の間に有意差は認められなかった．しかしこれを，% in-

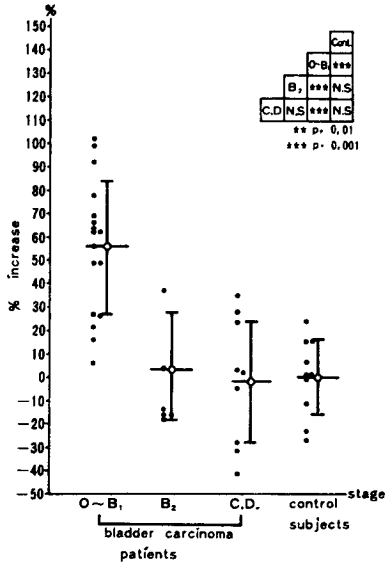


Fig. 12. Effect of THF on Con A response of lymphocytes obtained from various stages of patients with bladder carcinoma.

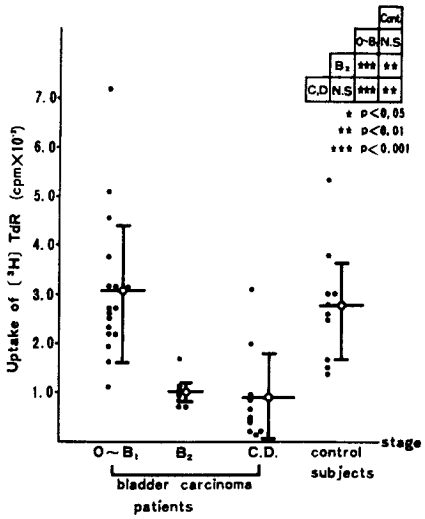


Fig. 11. Effect of THF on Con A response of lymphocytes obtained from various stages of patients with bladder carcinoma.

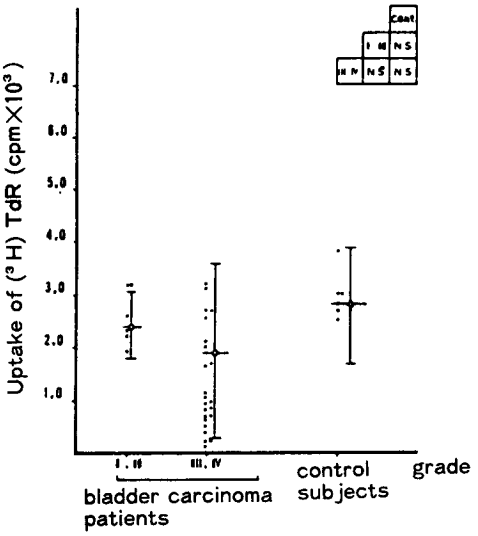


Fig. 13. Effect of THF on Con A response of lymphocytes obtained from various grades of patients with bladder carcinoma.

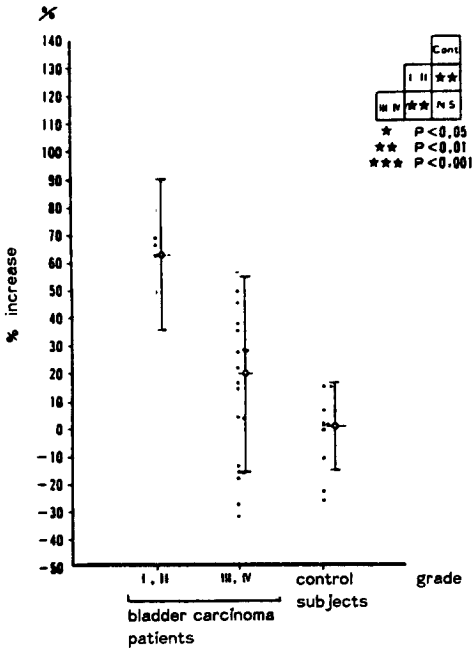


Fig. 14. Effect of THF on Con A response of lymphocytes obtained from various grades of patients with bladder carcinoma.

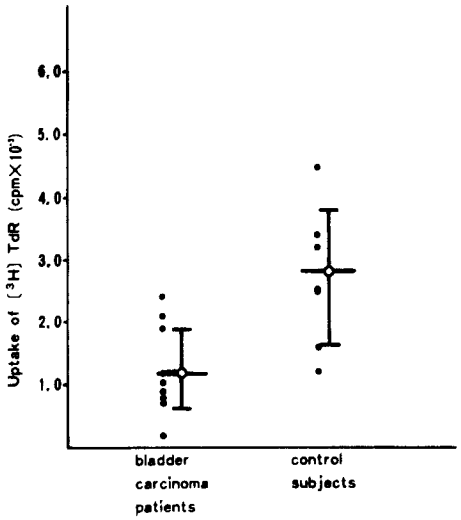


Fig. 15. Effect of SHF on Con A response of lymphocytes obtained from patients with bladder carcinoma.

crease でみると，Fig. 14 の如く，対照群では0±15.6%であるのに対し，low grade 群では 61.7±27.3%，high grade 群では19.7±35.6%であり，low grade 群は他の群に比し有意の上昇を認めたが，対照群と high grade 群との間に有意差は認められなかった．

Table 3. Influence of SHF treatment of Con A response of lymphocytes from bladder carcinoma patients and control subjects.

| No | SHF(+) c.p.m. | SHF(−) c.p.m. | % increase by SHF. |
|---|---|---|---|
| bladder carcinoma patients | | | |
| 1 | 1214 | 1020 | 19 |
| 2 | 915 | 762 | 20 |
| 3 | 1900 | 1900 | 0 |
| 4 | 1283 | 1318 | 2 |
| 5 | 264 | 352 | −25 |
| 6 | 717 | 860 | −17 |
| 7 | 838 | 1034 | −19 |
| 8 | 2401 | 2831 | −15 |
| M±S.D. | 1192±638 | 1259±726 | −4.9±16.1 |
| control subjects | | | |
| 1 | 4596 | 4700 | 2 |
| 2 | 1256 | 1179 | 7 |
| 3 | 2560 | 3350 | −23 |
| 4 | 3446 | 3671 | 6 |
| 5 | 1579 | 1680 | 6 |
| 6 | 3200 | 2857 | 12 |
| M±SD | 2773±1135 | 2849±1049 | −3.0±11.1 |

(3) 末梢血リンパ球の Con A 応答能におよぼす SHF の影響

膀胱癌患者群および対照群の末梢血リンパ球に THF と同様の操作で SHF を加え，培養した．結果は Fig. 15 の如く，対照群では 2,773±1,135 cpm 膀胱癌患者群では 1,192±638 cpm で，それぞれの対照培養群との間に有意差はなかった．これを% increase でみると Table 3 の如く，対照群では −3±11.1%で，膀胱癌患者群では −4.9±16.1%と，やはり有意差はなかった．

## 考　　察

細胞性免疫能は，リンパ球を中心とした生体防御反応と考えられており，リンパ球も大別して2種類の subpopulation に分類されている．その一つは体液性免疫反応に関与する Bone-marrow 由来細胞（B-cell）であり，他の一つは胸腺由来細胞（T-cell）である．中でも T-cell は，遅延型過敏反応，腫瘍免疫，移植免疫，自己免疫疾患などの密接な関連を有することはよく知られており，また T-cell にも種々の subset が存在しまたそれぞれの荷なう役割の異なることは現在明らかになりつつある所である．一方，胸腺が細胞性免疫能に果たす役割は，T-cell 前駆細胞を T-cell へ分化させ，さらに免疫適格細胞へ成熟させる作用であ

ることは最近の研究により明らかにされつつある．その作用機作として，胸腺を挿入した millipore diffusion chamber を腹腔内へ移入することにより胸腺摘出動物の免疫能が回復すること[3]，胸腺上皮細胞には glucoprotein の性質を有する分泌顆粒様物質があり，顆粒様物質をもつ胸腺上皮細胞出現前には，胸腺内におけるリンパ球分裂像のみられないこと，出現後上皮細胞周辺においてリンパ球分裂像がよく認められること[14]，などは胸腺液性因子の存在を示唆するものである．そして実際に仔牛，胎児[15]の胸腺を用いて液性因子の抽出が試みられた．よく知られているものとしては，Bach ら[4]の thymic factor, Goldstein ら[5]の thymosin Goldstein[6]の thymopoietin, Trainin ら[7]の thymic humoral factor などがある．

著者は，Goldstein らが報告した thymosin につき，*in vitro* におけるリンパ球に対する作用を泌尿器科領域の悪性疾患の一つである膀胱癌患者の末梢血リンパ球について検討したものである．胸腺液性因子は，現在のところ，T-cell 前駆細胞に働くと考えられ，thymosin の T-cell 前駆細胞の分化成熟に関する作用を追求する方法として，分離リンパ球に，mitogen として Con A を用いる方法[18]，phytohemoagglutinin (PHA) を用いる方法，ならびに mixed lymphocyte culture (MLC) を用いる方法[17]などがある．

著者は，比較的手技が容易でかつ再現性の高い方法として，微量全血培養法に注目し，さらに操作を容易にし，また全血培養ながらもリンパ球分離培養に近い培養環境を作成するため，現行の微量全血培養法に若干の修正を加えた．即ち，実験方法の項で既述した如く，ヘパリン化した全血を遠心分離し，THF 活性が存在すると考えられる血漿分画を除去した後，buffy coat を含む赤血球層上部1/3を採取した培養液を加えて，さらに遠沈後，培養液をかえて血球浮遊液とした．この操作による白血球の収率は69.6%から94.3%，平均すると85.5%であった．この操作は実験系において，できるだけ赤血症の影響を除去し，リンパ球の純粋培養に近づけ，かつなるべくリンパ球に与える機械的傷害をさけ，*in vivo* に近いリンパ球の反応動態を捕えようと意図したものである．実験方法としては Boyum ら[19]の開発した，Ficoll-Isopaque 比重遠心分離法はリンパ球単独の Con A 応答能を検討するには優れたものと考えられるが，リンパ球の洗浄回数により mitogen への応答能が左右されること[20]，手技が比較的繁雑であることなどから，著者は微量全血培養法を用いた次第である．そしてこの変法により，僅かながらも残存していると思われる既存胸腺液性因子も至適濃度以下に稀釈され，もはや T-cell 前駆細胞への影響は極めて少ないものと考えられる．

Con A は，PHA が成熟した T-cell によく作用するのに比し，thymocyte，特に末分化胸腺リンパ球に対して，DNA 合成能の亢進を誘導するといわれている[18,22]．著者は，THF の T-cell 前駆細胞から T-cell への分化過程におよぼす影響を観察するため，Con A を用い，その応答能の変遷を検討した．結果としては，膀胱癌初期にあたる stage 0-$B_1$ 群において THF の効果は明らかで，Con A 単独刺激で対照群より有意に低かった $^3$H-TdR のとりこみが，THF を添加することにより，対照群と有意差のなくなるまで上昇した．これを% increase でみると55.6±26.0%となり，他の群に比し有意に上昇しているが，一方，$B_2$, C, D と癌の浸潤度が進んでゆくにつれて，リンパ球の Con A 応答能に対する THF の効果は低下し，% increase において対照群との差が認められない．このことから，中森の報告[23]で認められたと同様に，膀胱癌においても発癌早期から既にリンパ球の分化成熟過程が何らかの factor により障害されていることが示唆される．また，Con A 単独刺激に対するリンパ球の応答能も膀胱癌発症後低下していることは，遅延型過敏反応，あるいは PHA による末梢血リンパ球幼若化能などの細胞性免疫能のパラメーターが担癌患者では低いこと[24,25]とよく対応すると考えられる．一方，膀胱癌患者群の grade 別 Con A 単独刺激による応答能は，low grade 群および high grade 群とも対照群に比し，有意に低下していたが，THF 添加により，low grade 群では対照群と有意の差がなくなるまで応答能が上昇し，% increase においても，他の二群と比し，有意の上昇が認められた．この% increase の有意の上昇は，癌発症の比較的早期にあたることを反映していると考えられる．

同様の抽出操作で得た SHF は，膀胱癌患者群ならびに対照群のいずれにおいても，リンパ球の Con A 応答能を上昇させることはできなかった．Blankwater らの報告[26]によれば，脾臓ならびに肝臓抽出因子について，種々の実験の結果，特に細胞性免疫能への影響は認められなかったとされている．以上の成績より，膀胱癌初期の THF によるリンパ球の Con A 応答能の上昇は胸腺液性因子に特異的なものと考えられる．

また，牛などの異種動物から抽出した液性因子であっても，ヒトリンパ球に対し有効であったことは，こ

のホルモン作用が種をこえて発現されることを示すもので，既にそれを示唆する報告も[27]見られる．

Thymosin は，Goldstein らにより抽出された液性因子で，Hooper ら[8]は，Fraction 8 までの精製法を報告した．著者が使用した液性因子に相当すると想定される Fraction 5 は，現在分子量1,000から15,000の数種の polypeptide の集団であることが判明しており，それぞれの polpeptide の生理活性は現在検索中であるが，そのうちの thymosin は上記の thymosin 活性を備えていると報告されている[32,33]．また，THF は T-cell 前駆細胞の cAMP 量を増加させる[16,21]とされていたが，cAMP 量の増加がみられたとする報告[28]もあり，その生化学的作用機序についてはなお検討を要すると考えられる．また，その作用についても，進行癌症例に有効であったとする Sakai ら[29]の報告，癌の進展度と関係がなかったとする Hardy ら[30]の報告も見られるが，著者の成績は，初期癌に有効であったとする中森[23]の報告と一致するものである．また，*in vivo* の成績については，遅延型過敏反応，リンパ球混合培養試験などいくつかの免疫学的パラメーターに効果があったとする報告もみられ，また，悪性腫瘍末期患者に使用し，うち1例に腫瘍の縮少が見られたとする Constanzi ら[31]の報告などもあり，今後検討の予定である．即ち，THF によるリンパ球の生理，生化学的な変化，特に表面抗原の変化に加え，担癌動物で細胞免疫を通じて抗腫瘍効果を高めうるのか，あるいは発癌抑制を誘導しうるかなどの諸点の検討が残されている．また，胸腺液性因子の分子構造が明らかとなり，今後は合成も可能と思われるので，リンパ球の分化に対する作用，担癌患者の早期診断にも応用されるものと期待される．

## 結　　語

1．胸腺液性因子を抽出し，その担癌生体リンパ球におよぼす影響を，膀胱癌患者を対象として，*in vitro* にて検討した．

2．膀胱癌患者は，stage 別および grade 別に分類し，各段階における THF の影響を観察した．

3．検討には，従来の微量全血培養法に若干の修正を加えた独自の方法が有用であった．

4．膀胱癌初期，即ち，stage 0-$B_1$ 群では，他の群に比し，有意に THF によるリンパ球の Con A 応答能の上昇を認めた．$B_2$ 群では，THF の効果は明らかでなく，C, D 群においては，全く認められなかった．

5．Low grade 群では，THF によるリンパ球の Con A 応答能は有意に対照群に比して上昇したが，high grade 群では変化が認められなかった．

6．癌発症により，患者リンパ球の Con A 応答能は低下する．これは発癌早期に，末梢血中に T-cell 前駆細胞の蓄積がおこり，何らかの機作により，T-cell への分化成熟が行なわれ難くなる．この時期に THF を添加すると，その回復，即ち T-cell への分化成熟が誘導され，Con A に対する応答能もほとんど正常にまで上昇することが認められた．進行癌の状態では，THF 添加による効果のみられないことから，骨髄における未分化 T-cell の産生障害も加わっていることが示唆された．

稿を終るにあたり．御懇切なる御指導と御校閲を賜わった恩師前川正信教授に深謝するとともに，本研究に際して直接御指導，御鞭撻を賜わった，本学前学長木村英一名誉教授ならびに本学第二生理学教室木下喜博教授に心から感謝の意を表します．

## 文　　献

1) Nishio S, Horii A, Morikawa Y, Kawakita J, Nishijima T, Kishimoto T and Maekawa M : Studies of the nonspecific cellular immune response in patients with urinary bladder carcinoma. I. PHA-induced lymphocyte transformation. Invest Urol **16** : 336～341, 1979

2) DiGeorge AM : A new concept of the cellular basis of immunity. J Pediat **67** : 907～908, 1965

3) Osoba D and Miller JFAP : The lymphoid tissues and immune responses of neonatally thymectomised mice bearing thymus tissue in millipore diffusion chambers. J Exp Med **119**: 177～209, 1964

4) Bach JF, Dardenne M, Pleau JM and Bach MA : Isolation, biochemical characteristics and biological activity of a circulating thymic hormone in the mouse and in the human. Ann NY Acad Sci **249**: 186～210, 1975

5) Goldstein AL, Guha A, Zatz MM, Hardy MA and White A : Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland. Pro Nat Acad Sci **69**: 1800～1803, 1972

6) Goldstein G : Isolation of bovinethymine : a polypeptide hormone of the thymus. Nature **247**: 11～14, 1974

7) Trainin N and Small M Studies on some physicochemical properties of a thymus humoral factor conferring immunocompetence on lymphoid cells. J Exp Med **132** : 885～897, 1970

8) Hooper JA, Mcdaniel MC, Thurman GB, Cohen GH, Schulof RS and Goldstein AL: Purification and properties of bovine thymosin. Ann NY Acad Sci **249**: 125～144, 1975

9) 西島高明：実験的膀胱腫瘍に関する研究：特に担癌生体の細胞性免疫能について．日泌尿会誌 **69**: 1044～1054, 1978

10) Marshall VF: The relation of the preoperative estimate to the pathologic demonstration of the extent of vesical neoplasma. J Urol **68**: 714～723, 1952

11) Broaders AC : Epithelioma of the genito-urinary organs. Ann Surg **75**: 574～604, 1922

12) Lowry OH, Rosenburg NJ, Farr AL and Randall RJ · Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem **193**: 265～275, 1951

13) Yamada T, Mizoguchi Y, Monna T, Yamamoto S and Morisawa S: An application of the whole blood micro-culture technique to the detection of lymphocyte transformation. Osaka City Med J **24**: 155～164, 1978

14) Clark SL Jr Incorporation of sulfate by the mouse thymus : its relation to secretion by medullary epithelial cells and to thymic lymphopoiesis. J Exp Med **128** : 927～957, 1968

15) Ueda K, Umesaki N, Nakamori H, Sako H, Kinoshita Y and Sugawa T : Effect of fetal thymic extract on maturation of precursor lymphocytes from cancer patients with various stages. Gynecol Oncology **7** : 66～70, 1979

16) Sheid MP, Hoffmann MK, Komuro K, Hammerling U, Abbot J, Boyse EA, Cohen GH, Hooper JA, Shulof RS and Goldstein AL : Differentiation of T cells induced by preparations from thymus and nonthymic agents. J Exp Med **130**: 1027～1037, 1973

17) Cohen GH, Hooper JA and Goldstein AL : Thymosin-induced differentiation of murine thymocytes in allogenic mixed lymphocyte cultures. Ann NY Acad Sci **249** : 145～153, 1975

18) Rotter V and Trainin N : Increased mitogenic reactivity of normal spleen cells to T lectins induced by thymus humoral factor (THF). Cell Immunol **16**: 413～421, 1975

19) Bøyum A: Separation of white blood cells. Nature **204**: 793～794, 1964

20) Mannick JA, Constantian M, Pardridge D, Saporoschetz I and Badger A : Improvement of phytohemoagglutinin responsiveness of lymphocytes from cancer patients after washing in vitro. Cancer Res **37** : 3066～3070, 1977

21) Kook AI and Trainin N : Intracellular events involved in the induction of immune competence in lymphoid cells by a thymus humoral factor. J Immunol **114**: 151～157, 1975

22) Stobo JD: Phytohemoagglutinin and concanavalin A: Probes for murine T cell activation and differentiation. Transplant Rev **11**: 60～86, 1972

23) 中森　宏：T-リンパ球の分化，成熟に与える仔牛胸腺液性因子の影響．産婦進歩 **31** · 117～127, 1979

24) Mekori T, Sher S and Robinson E : Suppression of the metogenic response to phytohemoagglutinin in malignant neoplasia: Correlation with clinical stage and therapy. J Natl Cancer Inst **52**: 9～12, 1974

25) Merrin C and Han T: Immune response in bladder cancer. J Urol **111**: 170～172, 1974

26) Blankwater MJ, Levert LA, Swart ACW and van Bekkum DW · Effect of various thymic and nonthymic factors on in vitro antibody formation by spleen cells from nude mice. Cell Immuni **35**: 242～252, 1978

27) Wybran J, Levin AS, Fudenberg HH and Goldstein AL : Thymosin : Effects on normal human blood T-cells. Ann NY Acad Sci **249**: 300～307, 1975

28) Naylor PH, Camp C, Phillips AC, Thurman GB and Goldstein AL : Effects of thymosin and lipopolysaccharide on murine lymphocyte cyclic AMP. J Immunol Methods **20**: 143～153, 1978

29) Sakai H, Constanzi JJ, Loukas DF, Gagliano RG, Ritzman SE and Goldstein AL : Thymosin-induced increase : E-rossete forming capacity of lymphocytes in patients with malignant neoplasms. Cancer **36**: 974～976, 1975

30) Hardy MA, Dattner AM, Sarker DK, Stoffer JA and Friedman N : The effect of thymosin on human T-cells From cancer patients. Cancer **37**: 98～103, 1976

31) Constanzi JJ, Gagliano RG, Delaney F, Harris N, Thurman, GB, Sakai H, Goldstein AL, Loukas D, Cohen GB and Thomson PD : The effect of thymosin on patients with disseminated malignancies : A phase I study Cancer **40** : 14～19, 1977

32) Low TLK, Thurman GB, McAdoo M, Mcclure J, Rossio JL, Naylor PH and Goldstein AL : The chemistry and biology of thymosin. I. Isolation, characterization and biological activities of thymosin and polypeptide $\beta$ from calf thymus J Biol Chem **254**: 981～986 1979

33) Low TLK and Goldstein AL : The chemistry and biology of thymosin. II. Amino acid sequence analysis of thymosin and polypeptide $\beta$. J Biol Chem **254** 987～995, 1979

(1986年11月1日迅速掲載受付)