

## 膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究

—第2報：末梢血リンパ球の subpopulation 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）

西尾正一

STUDIES ON THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN  
PATIENTS WITH URINARY BLADDER CARCINOMA

## II. CHANGES IN SUBPOPULATION OF PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Shyoichi NISHIO

*From the Department of Urology, Osaka City University Medical School**(Chairman : Prof. M. Maekawa, M. D.)*

A nonspecific cellular immunity was measured by PHA induced blastogenesis of lymphocytes in the patients having bladder carcinoma. Peripheral lymphocytes counts of the patients was almost same as the age matched tumor-free patients. However, blastogenesis of lymphocytes with autologous serum was depressed as compared with age matched tumor-free patients. There was a significant converse correlation in lymphocytes blastogenesis to the grade and the stage of the tumor.

Thus, two considerable factors: cellular and humoral factors were suggested to inhibit blastogenesis of lymphocytes in the patients with bladder carcinoma.

Regarding cellular factor, a study was made on lymphocytes subpopulation of 23 patients with bladder carcinoma and of 11 age matched tumor-free patients. Identification of lymphocytes was performed by means of rosette formation with sheep erythrocytes. T-cell was identified by spontaneous rosette formation with sheep erythrocytes (E-rosette), and B-cell was identified by EAC-rosette formation.

There was a tendency of decrease in percentage and absolute count of T-cell in the patients with higher grade and stage of the tumor.

Contrary, percentage of B-cell in the patients with tumor was significantly higher than that of tumor-free patients.

However, percentage of B-cell was not correlated to the grade and stage of the tumor.

## はじめに

著者はこれまで phytohemagglutinin (以下 PHA と略す) 添加培養による末梢血リンパ球の幼若化率 (stimulation index, 以下 SI と略す) を測定する方法により膀胱癌患者の非特異的細胞性免疫能は非癌患者に比して著明に低下し、癌の悪性度ならびに浸潤度と相関して低下することを報告した。しかし SI と末梢血リンパ球数との間には明らかな相関関係はみい出せなかった<sup>1)</sup>。その要因としては第1に PHA に反応す

ると考えられているリンパ球の subpopulation が膀胱癌患者では減少していること、第2に膀胱癌患者血清中にはリンパ球の PHA に対する反応を抑制する因子が存在していることが考えられる。そして PHA に対して反応する細胞は胸腺由来リンパ球 (thymus derived cell, 以下 T-cell と略す) であると考えられており<sup>2,3)</sup>、骨髄由来リンパ球 (bone marrow derived cell, 以下 B-cell と略す) は PHA に対してはほとんど反応しないと考えられている<sup>4)</sup>。そこで今回はまず第1

の要因を調べる目的で膀胱癌患者末梢血リンパ球の subpopulation を調べ若干の成績を得たので報告する。

膀胱癌患者23例で全例とも手術前に採血した。そして化学療法および放射線療法を開始した症例は含まれていない。年齢分布ならびに性別は Table 1 に示すとお

対象および実験方法

1) 対象

対象は大阪市立大学附属病院泌尿器科に入院した膀

Table 1  
AGE AND SEX DISTRIBUTION

Age	Male	Female
40-49	1	0
50-59	8	0
60-69	4	2
70-79	6	1
80-89	1	0
<u>Total</u>	<u>20</u>	<u>3</u>

mean age: 63.4 y.o.

Table 2  
DISTRIBUTION OF 23 BLADDER TUMOR PATIENTS

STAGE	GRADE				Total
	I	II	III	IV	
O,A	1	1	0	0	2
B <sub>1</sub>	0	2	7	2	11
B <sub>2</sub>	0	0	3	0	3
C	0	0	1	0	1
D	0	0	0	2	2
?	0	2	1	1	4
<u>Total</u>	<u>1</u>	<u>5</u>	<u>12</u>	<u>5</u>	<u>23</u>

Table 3  
CONTROL PATIENTS

DISEASE	CASES
BPH	3
Renal Calculus	3
Hypertension	2
Ureteral Calculus	2
Urethral Stricture	1
Total	11

(BPH : Benign Prostatic Hypertrophy)

sex : male 7 and female 4 cases  
mean age : 61.9 years old

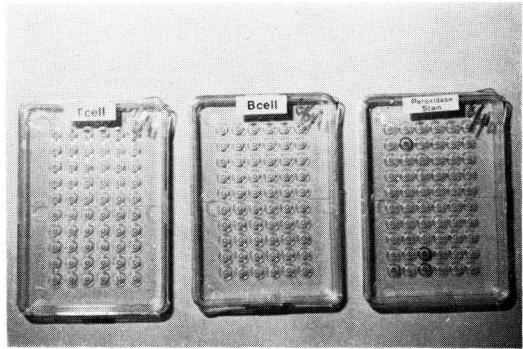


Fig. 1

Outline of Method

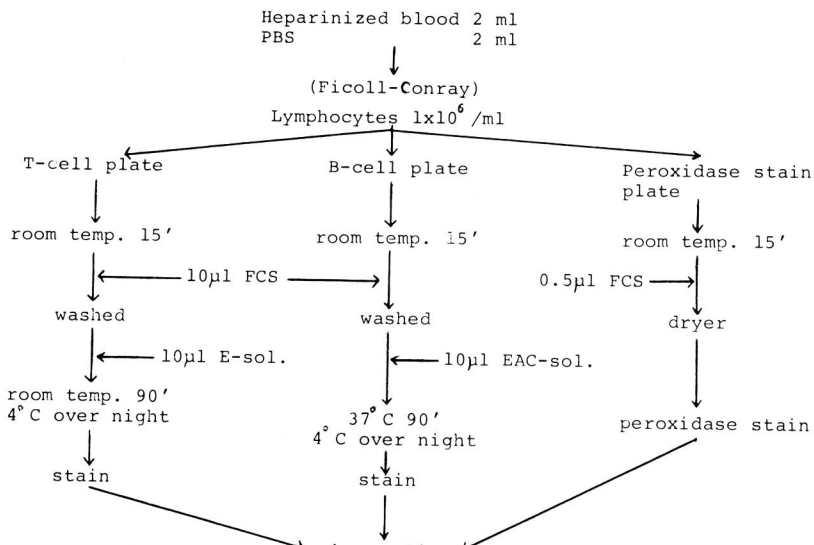


Fig. 2

りで、平均年齢は63.4歳である。患者はすべて移行上皮癌で、癌の悪性度は Broders<sup>5)</sup> の分類にしたがい、grade I, II, III, IV の4段階に区分し、浸潤度は Jewett<sup>6)</sup> and Marshall<sup>7)</sup> の分類にしたがい stage A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, D の5段階に区分した。Table 2 にこれら23例の悪性度および浸潤度の分布を示す。

また、当科に入院した非癌患者で重篤な感染症や腎不全症例を除いた手術前の11例を対照として選んだ。Table 3 は対照群の診断名および年齢分布を示すもので、平均年齢は61.9歳である。

## 2) 末梢血リンパ球の T-cell および B-cell の同定方法

末梢血からのリンパ球の分離は特定の population にかたよることの少ないとされている方法 (Ficoll-Conray 法) によっておこない<sup>8)</sup>、T-cell および B-cell の同定は橋ら<sup>9)</sup> の方法にしたがって微量測定用キット (日本抗体工業, JIMCO T-1) を用いておこなった。Fig. 1 は測定用マイクロプレートで、本方法の特徴はこのマイクロプレートの各小孔を poly-L-lysine で (+) に荷電し、これに (-) 荷電の生リンパ球をかたく付着させ操作中のリンパ球の機械的剝離を防いでいる点である。Fig. 2 に方法の概略を図示したが、T-cell のマーカーとしては羊赤血球 (E) との spontaneous rosette formation (E-RFC) を利用した。また B-cell のマーカーとしてはその細胞表面に補体レセプターが存在することを利用して、E に家兎抗 E 抗体 (A) を結合させ、さらにマウス血清補体 (C) をつけた EAC に対する rosette formation (EAC-RFC) を指標とした。そして4個以上のEを付着した有核細胞を T-cell (E-RFC) とし、4個以上の EAC を付着した有核細胞を B-cell (EAC-RFC) と判定した。Fig. 3 は E-RFC を示している。

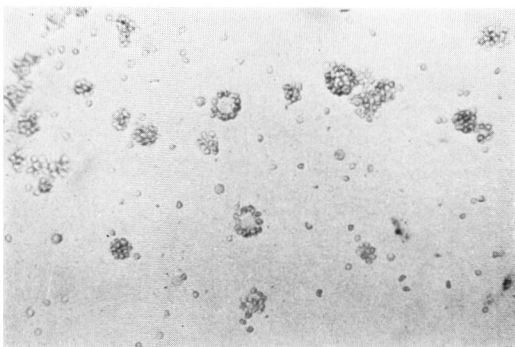


Fig. 3

## 3) T-cell, B-cell の百分率ならびに絶対数の計算方法

原則として200個の有核細胞を算出し、T-cell, B-cell の百分率を求めた。しかし Ficoll-Conray 法で得られた細胞分画中にはリンパ球以外に約10%の単球や幼若顆粒球が混入し、これらは EAC と rosette を形成するのでペルオキシダーゼ染色を同時におこないその百分率を求めた。この操作によると T-cell, B-cell の百分率は次に示す計算式から求められる。ただし、この計算式は E-RFC と EAC-RFC の百分率の和が100に近いとき (100±4) にのみ適用される。

$$\textcircled{1} \text{ T-cell の百分率} = \frac{e+c}{e+(c-p)} \times e (\%)$$

$$\textcircled{2} \text{ B-cell の百分率} = \frac{e+c}{e+(c-p)} \times (c-p) (\%)$$

e: E-RFC の百分率

c: EAC-RFC の百分率

p: ペルオキシダーゼ陽性細胞の百分率

そしてあらかじめ全血液中のリンパ球数 (cells/mm<sup>3</sup>) を求めておき、これに①, ②を乗じて T-cell, B-cell の絶対数 (cells/mm<sup>3</sup>) を算出した。

## 実験成績

### 1) T-cell の百分率 (%)

Fig. 4 は対照群および膀胱癌患者群 (以下患者群と略す) の T-cell の百分率を示したもので、対照群の平均値 66.9±9.6% (mean±S.D.) に対して患者群は 46.1±9.2% と低下しており、統計学的に有意の差 (p<0.05) を認めた。Fig. 5 は T-cell の百分率を low grade 群と high grade 群とに分けて比較したもので、low grade 群は 53.3±10.6%, high grade 群は 43.6±7.9% であり、low grade 群は high grade 群に比して T-cell の占める割合は高い傾向を示しているものの有意の差は認めない。同様に low stage 群と high stage 群とを比較したところ、Fig. 6 に示すとおり low stage 群 56.8±11.2%, high stage 群 44.6±8.4% であり平均値でみれば low stage 群は high stage 群に比して T-cell の百分率は高いが有意の差は認めない。

### 2) T-cell の絶対数 (cells/mm<sup>3</sup>)

Fig. 7 は対照群と患者群の T-cell の絶対数を比較したものである。平均値は対照群 1432±401 cells/mm<sup>3</sup>、患者群 981±325 cells/mm<sup>3</sup> と患者群は明らかに T-cell 数の減少を認めるが、ばらつきが大きく有意の差は認めない。Fig. 8 は low grade 群と high grade 群について T-cell 数を比較したもので、平均値は low grade 群 1288±266 cells/mm<sup>3</sup>、high grade 群 836±368 cells/mm<sup>3</sup> と low grade 群が高い傾向を示してい

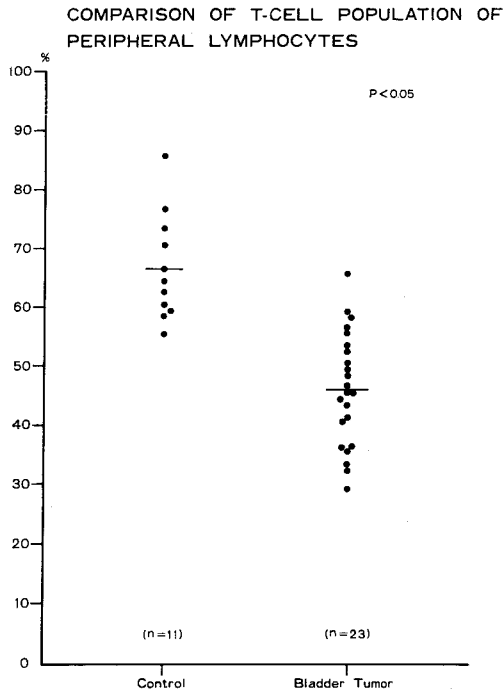


Fig. 4

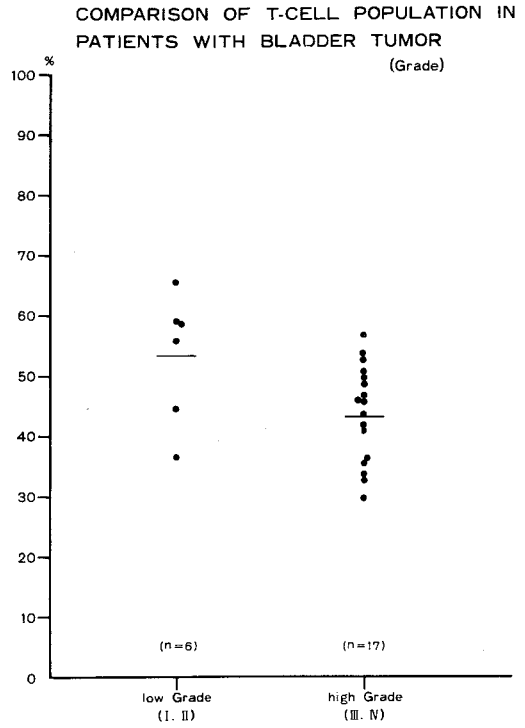


Fig. 5

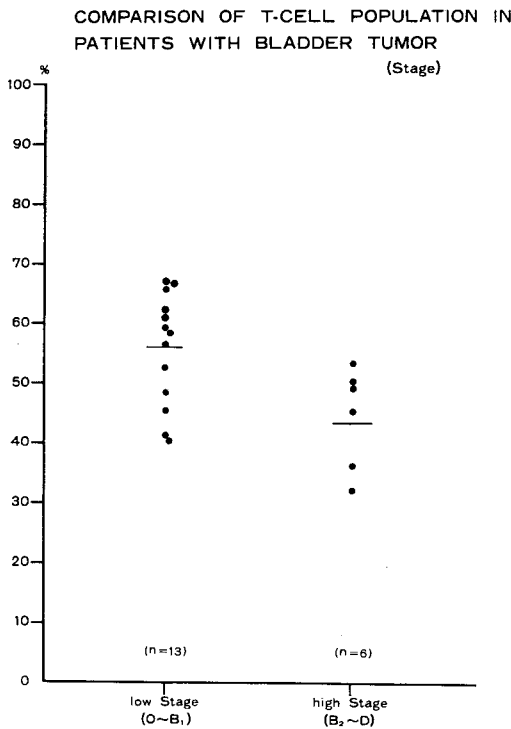


Fig. 6

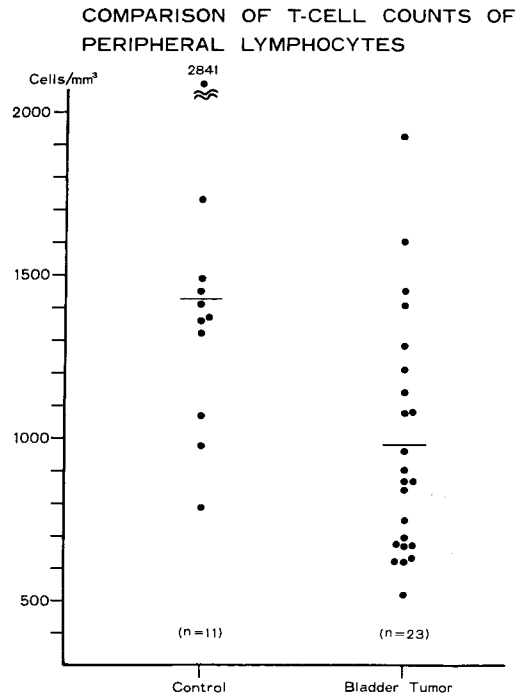


Fig. 7

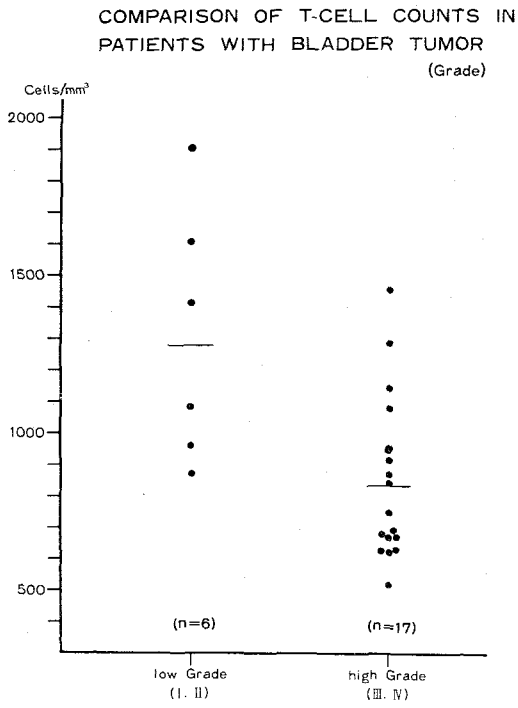


Fig. 8

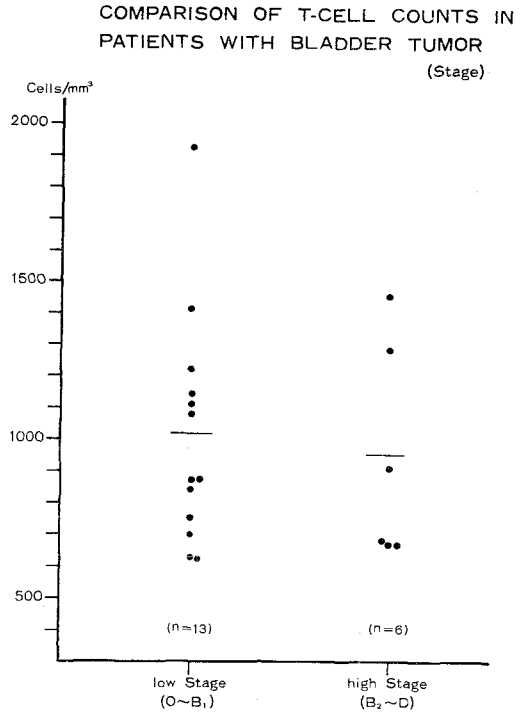


Fig. 9

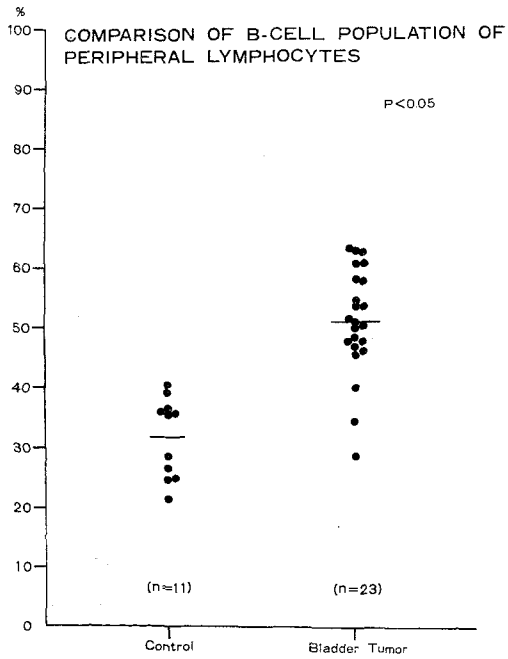


Fig. 10

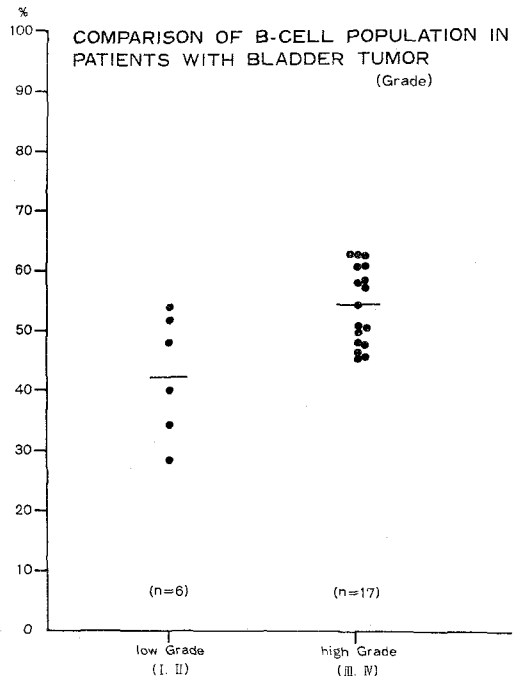


Fig. 11

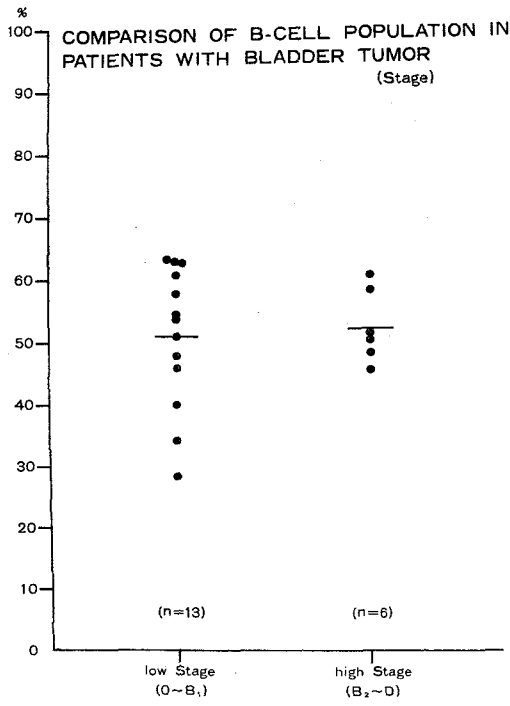


Fig. 12

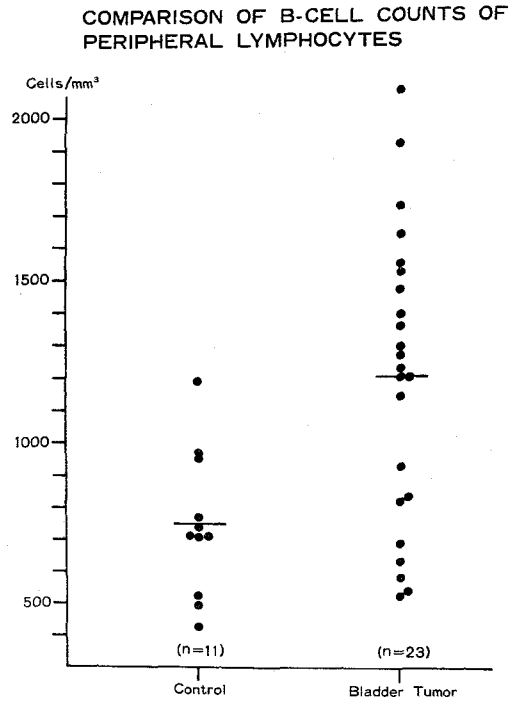


Fig. 13

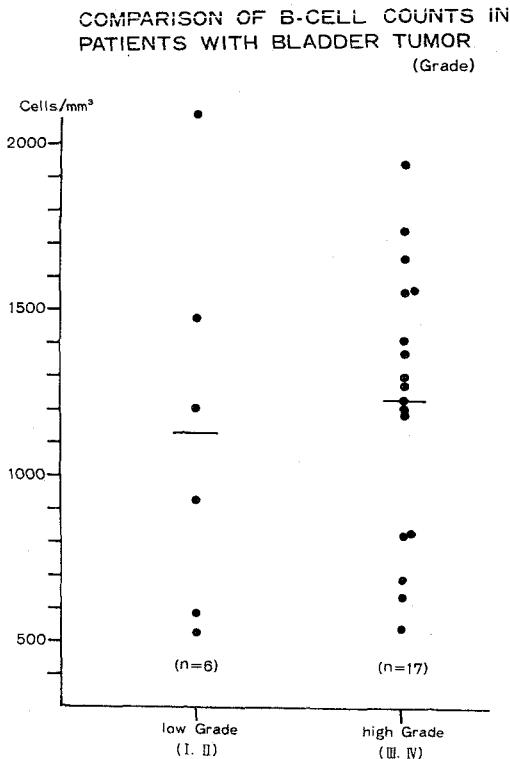


Fig. 14

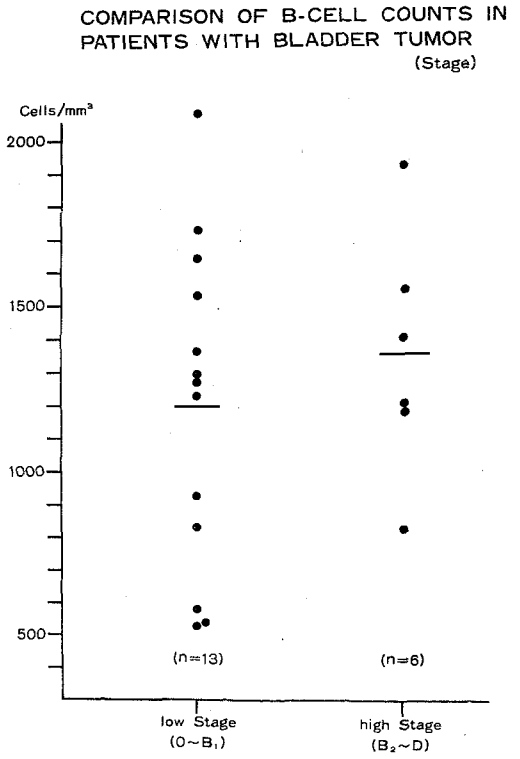


Fig. 15

る。同様に low stage 群と high stage 群とを比較すると、Fig. 9 に示すとおり平均値はそれぞれ  $1031 \pm 298$  cells/mm<sup>3</sup>,  $982 \pm 221$  cells/mm<sup>3</sup> であり、この二者の間にはほとんど差を認めない。

### 3) B-cell の百分率 (%)

Fig. 10 は対照群と患者群の B-cell の百分率を比較したもので、平均値は対照群  $31.8 \pm 6.6\%$ 、患者群  $51.2 \pm 8.9\%$  であり、患者群は著明に上昇している ( $p < 0.05$ )。つぎに low grade 群と high grade 群とを比較すると Fig. 11 に示すとおり、平均値は low grade 群  $42.6 \pm 9.9\%$  で、high grade 群  $54.3 \pm 6.5\%$  と high grade 群はやや上昇する傾向を示しているが有意のものでない。同様に low stage 群と high stage 群とを比較すると Fig. 12 に示すとおり、low stage 群  $50.9 \pm 11.2\%$ 、high stage 群  $52.1 \pm 5.9\%$  でありこの二者の間にはほとんど差を認めない。

### 4) B-cell の絶対数 (cells/mm<sup>3</sup>)

Fig. 13 は対照群と患者群の B-cell 数の比較を示すもので、対照群  $748 \pm 203$  cells/mm<sup>3</sup>、患者群  $1201 \pm 468$  cells/mm<sup>3</sup> であり、患者群の B-cell 数は対照群に比して明らかに増加しているが有意の差は認めない。Fig. 14 は low grade 群と high grade 群との B-cell 数を比較したもので、low grade 群  $1120 \pm 497$  cells/mm<sup>3</sup>、high grade 群  $1214 \pm 337$  cells/mm<sup>3</sup> と二者の間にはほとんど差を認めない。同様に low stage 群と high stage 群との B-cell 数を比較すると、Fig. 15 に示すように low stage 群  $1201 \pm 482$  cells/mm<sup>3</sup>、high stage 群  $1445 \pm 322$  cells/mm<sup>3</sup> と high stage 群はやや増加する傾向を示している。しかし有意のものでない。

## 考 察

癌患者の細胞性免疫能に関する報告はこれまで数多くなされているが、なかでも末梢血リンパ球の PHA 刺激に対する反応で代表される SI を利用した非特異的細胞性免疫能に関する報告が多い。そして癌患者の SI は正常人に比して低下することは諸家の認めるところである<sup>10,11,12</sup>。著者はこれまで自己血清を加えて SI を調べてきたが、その結果膀胱癌患者の SI は対照群に比して著明に低下し、かつ grade, stage とよく相関することが認められた<sup>13</sup>。しかし膀胱癌患者の末梢血リンパ球数は対照群のリンパ球数と比較してほとんど差を認めず、grade および stage と相関しないことを見いだした。そこで膀胱癌患者の SI が低下する要因がリンパ球側にあるのか、それとも血清側にあるのかを明らかにする目的で今回はまず末梢血リンパ球の subpopulation について調べた（血清側の要因

については他報に譲りたい）。リンパ球はその起源および機能面より T-cell と B-cell とに分けられることが明らかとなり<sup>13</sup>、ヒトにおいても T-cell と B-cell の存在することが認められるようになった<sup>14,15,16</sup>。T-cell のマーカーとしては抗胸腺血清による細胞障害試験<sup>17</sup>、ヒツジ赤血球とのロゼット形成試験(E-RFC)<sup>18</sup>などが報告されており、B-cell のマーカーとしては細胞表面免疫グロブリンの証明<sup>19</sup>、補体レセプターの証明 (EAC-RFC)<sup>20</sup>などが利用されている。そしてロゼット形成試験は最も一般化されており、著者も E-RFC および EAC-RFC 測定用キットを用いて T-cell, B-cell の同定をおこなった。現在のところ T-cell, B-cell の機能は単純には区別できないが、大別すると T-cell は主として細胞性免疫をつかさどり、B-cell は主として抗体産生に与っていると考えられている<sup>21</sup>。以下、著者が調べた膀胱癌患者末梢血リンパ球の subpopulation の成績について若干の考察を加える。

### 1) T-cell の百分率および絶対数について

膀胱癌患者の末梢血リンパ球の subpopulation に関する報告は少なく、O'Toole ら<sup>22</sup>は 8 人の膀胱癌患者と 8 人の健康人についてヒツジ赤血球とのロゼット形成試験を用いて T-cell の百分率を調べた結果、T-cell の百分率は膀胱癌患者と健康人との間ではほとんど差を認めなかったと述べている。また西村ら<sup>23</sup>も同様の方法で 20 人の膀胱癌患者（移行上皮癌）と 21 人の age matched control について調べた結果では stage A の患者は control と同様の T-cell の百分率を示し、進行癌患者でも T-cell の百分率の著しい低下は認められなかったと報告している。さらに PHA 刺激によるリンパ球の反応性と T-cell の百分率とは相関しなかったとも述べている。しかし著者の成績では少なくとも患者群の T-cell の百分率は対照群に比して低下していること、および著明ではないが癌の悪性度、浸潤度の高い症例ほど T-cell の百分率は低下する傾向が認められた。一方、T-cell の百分率よりも T-cell の単位容積あたりの数 (cells/mm<sup>3</sup>) のほうが癌患者の免疫能低下状態をよく反映するという報告があり<sup>24,25</sup>、著者も T-cell の絶対数を調べた。その結果、患者群の T-cell 数は対照群のそれに比して減少する傾向が認められ、また high grade 群の T-cell 数は low grade 群よりも減少する傾向にあった。しかし low stage 群と high stage 群との間にはほとんど差を認めなかった。以上のことは第 1 報で報告した内容、すなわち SI は grade and stage dependent である事実と相関するものではない。したがって T-cell の百分率の低下あるいは T-cell の絶対数の減少のみで膀胱癌

患者の SI が低下することを説明するのは困難である。すなわち最近では T-cell は少なくとも 2 種類の細胞 (T<sub>1</sub>-cell, T<sub>2</sub>-cell) に分けられることがわかり、T<sub>1</sub>-cell は短命で、胸腺や脾臓に多く存在し、再循環せず、GVH 反応 (graft versus host reaction) に関与する細胞とされており、T<sub>2</sub>-cell は長命で、リンパ節、胸管や末梢血中に多く存在し、再循環性があり、T<sub>1</sub>-cell の作用を増強したり PHA によく反応する性質を有する細胞であると考えられている<sup>26)</sup>。そのため今後は T-cell の百分率や絶対数のみならず、機能面よりさらに T-cell を細分画して研究する必要がある。また細胞側のみならず癌患者血清がリンパ球の機能に及ぼす影響についても調べる必要があると思われる。最近、著者は健康人のリンパ球を分離してこれに fetal calf serum, 膀胱癌患者血清 (悪性度, 浸潤度別にわけて) および正常人 AB 血清を添加した場合の PHA に対するリンパ球の反応性 (SI) を測定することにより膀胱癌患者血清が SI に与える影響について研究し若干の成績を得ている<sup>27)</sup>。その結果の詳細については他稿で報告する予定である。

## 2) B-cell の百分率および絶対数について

B-cell はその機能が主として抗体産生にあずかっているため、癌患者の細胞性免疫能に関する限りあまり論ぜられないことが多い。これまでの胃癌、肺癌、肝癌についての諸家の報告をまとめると、B-cell の百分率および絶対数は健康人と比較してほとんど差がないか、あるいは軽度上昇していることが多いとされている<sup>24, 25, 28)</sup>。一方、膀胱癌患者に関する報告でも健康人とまったく差を認めないとするもの<sup>22)</sup>、あるいは stage A の患者は control に比較して軽度ながら上昇し、stage B では比較的高い B-cell の百分率を示すとする報告があり<sup>23)</sup>、B-cell の同定方法にも問題があると思われるが諸家の報告は一致していない<sup>29)</sup>。今回の成績では上述したとおり、患者群の B-cell の百分率は対照群のそれよりも著明に高く、かつ high grade 群は low grade 群に比してやや高い傾向にあった。しかし low stage 群と high stage 群との間にはほとんど差を認めなかった。また B-cell の絶対数に関しても同様な傾向が認められ、胃癌、肺癌、肝癌について報告されている成績と類似していた。

このようにリンパ球の機能面およびその subpopulation からみた場合、膀胱癌患者の生体防御能は低下しているわけであるが、その機能は完全に廃絶しているものではなく、進行癌においてもかなりの数の免疫担当細胞が存在しているものと推測される。この点は今後の免疫化学療法に期待できる面を示している。一

方、悪性腫瘍患者血清中には blocking factor や blocking antibody などリンパ球の免疫機能を阻止する物質が存在するといわれており<sup>30-33)</sup>、また癌組織そのものに由来する免疫抑制物質の存在も報告されている<sup>34)</sup>。したがって担癌生体の免疫機能を血清側からも研究する必要があるわけである。

## ま と め

- 1) 膀胱癌患者 23 例, 対照例 11 例の末梢血リンパ球の T-cell, B-cell の百分率ならびにそれぞれの絶対数を調べた。
- 2) 膀胱癌患者群の T-cell の百分率, 絶対数は対照群に比して低下していた。
- 3) 癌の悪性度および浸潤度の高い症例ほど T-cell の百分率はより低下する傾向にあった。
- 4) 膀胱癌患者群の B-cell の百分率, 絶対数は対照群に比して増加していたが、癌の悪性度ならびに浸潤度別について比較すると著明な差は認めなかった。

稿を終えるにあたりご指導、ご校閲を賜った恩師前川正信教授に深謝の意を表します。

本論文の要旨は第 26 回泌尿器科中部連合地方会において発表した。

## 文 献

- 1) 西尾正一：日泌尿会誌, **67**: 589, 1976.
- 2) Radl, J. et al.: Clin. Exp. Immunol., **10**: 367, 1972.
- 3) Blomgren, H. and Svedmyr, E.: J. Immunol., **106**: 835, 1971.
- 4) Greaves, M. et al.: J. Exp. Med., **140**: 1, 1974.
- 5) Broders, A. C.: Ann. Surg., **75**: 574, 1922.
- 6) Jewett, H. T. et al.: J. Urol., **55**: 366, 1946.
- 7) Marshall, V. F.: Brit. J. Urol., **29**: 228, 1957.
- 8) 中川俊郎：臨床免疫, **4**: 1269, 1972.
- 9) 橋 武彦・ほか：免疫実験操作法Ⅲ (本免疫学会編), p. 683, 1973.
- 10) 白神 隼・ほか：最新医学, **24**: 1664, 1969.
- 11) 三輪恕昭・ほか：第 11 回日本癌治療学会, 1973.
- 12) 菊地浩吉・ほか：医学のあゆみ, **91**: 394, 1974.
- 13) Roitt, I. M. et al.: Lancet, **II**: 367, 1969.
- 14) Fundenberg, H. H. et al.: Pediatrics, **47**: 927, 1971.
- 15) Ross, G. D. et al.: J. Clin. Invest., **52**: 377, 1972.
- 16) Wybran, J. et al.: J. Clin. Invest., **51**: 2537, 1972.



- 17) Ishii, Y. et al.: Clin. Exp. Immunol., **19**: 67, 1975.
- 18) Lay, W.H. et al.: Nature, **230**: 531, 1971.
- 19) Fröland, S. et al.: Nature New Biol., **234**: 251, 1971.
- 20) Basten, A. et al.: J. Exp. Med., **135**: 610, 1972.
- 21) 矢田純一：Tリンパ球とBリンパ球, p. 36, 中外医学社, 東京, 1975.
- 22) O'Toole, C. et al.: J. Exp. Med., **139**: 457, 1974.
- 23) 西村泰司・ほか：日泌尿会誌, **67**: 1013, 1976.
- 24) 谷内 昭・ほか：臨床免疫, **6**: 1005, 1974.
- 25) 今井浩三・ほか：臨床免疫, **7**: 1229, 1975.
- 26) Cantor, H. and Asofsky, R.: J. Exp. Med., **135**: 764, 1972.
- 27) 西尾正一・ほか第26回泌尿器科中部連合地方会, 1976.
- 28) 小林良彦・ほか：臨床免疫, **6**: 487, 1974.
- 29) Elhilali, M. M. et al.: Cancer Res., **36**: 132, 1976.
- 30) Sjögren, H. O. et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**: 1372, 1971.
- 31) Hellström, I. et al.: Int. J. Cancer, **7**: 226, 1971.
- 32) 折田薫三：臨床免疫, **4**: 823, 1972.
- 33) Edwards, A.J. et al.: Lancet, **1**: 687, 1973.
- 34) 漆崎一朗・ほか：医学のあゆみ, **91**: 418, 1974.

(1973年3月11日受付)