

膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究

第8報：患者末梢血リンパ球のADCC活性について

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・池本 慎一・尾崎 祐吉・和田 誠次

堀井 明範・川喜多順二・前川 正信

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

VIII. ADCC ACTIVITY OF LYMPHOCYTES FROM PATIENTS

Shoichi NISHIO, Shinichi IKEMOTO, Yukichi OZAKI, Seiji WADA,
Akinori HORII, Junji KAWAKITA and Masanobu MAEKAWA*From the Department of Urology, Osaka City University Medical School**(Chairman: Prof. M. Maekawa, M.D.)*

Host resistance against malignant neoplasms is not clear in human tumor bearers. Many immunological parameters are measured in patients with carcinoma, but these are usually not specific to the carcinoma.

As a preliminary experiment for tumor specific assay, ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) activity and NPFC (natural plaque forming cell) population were measured by means of plaque formation of sheep red cells on a microplate.

Twenty-six patients with urinary bladder carcinoma and 20 control subjects were examined. Both ADCC activity and NPFC population were significantly depressed in patients group compared with control subjects. Especially, the ADCC activity was very low in the high grade group of patients whereas NPFC was lowest in the high stage group, but there was no difference between these two groups concerning total host response (ADCC+NPFC).

We discuss about host resistance in patients with advanced urinary bladder carcinoma.

Key words: Bladder carcinoma, ADCC, NPFC, Plaque forming cell

はじめに

悪性腫瘍患者の免疫機能の変動は腫瘍の進展状態によって左右されると考えられており、とくに進行癌患者においては各種の免疫学的検査に対する応答能が低下するといわれている。また、腫瘍と感染症の立場より進行癌患者における生体の防禦能（広い意味の抵抗力）の低下が問題にされている¹⁾。私どもは膀胱癌患者を中心として、その免疫学的機能を癌の進行度との関連において研究してきたが²⁻⁴⁾、今回は患者末梢血中の killer cell (K cell) の population について検

討を試みた結果、興味ある所見を得たので報告する。

対象および方法

1) 対象

対象とした症例は大阪市大病院泌尿器科に入院した膀胱癌患者26例で、男子20例、女子6例、平均年齢は61.6歳である。腫瘍の組織学的所見はすべて移行上皮癌で、癌の深達度および悪性度の判定は膀胱癌取り扱ひ規約にしたがった。また、対照として age match した泌尿器科的良性疾患20例（尿管結石5例、腎結石5例、高血圧2例、尿道狭窄2例、前立腺肥大症2例、

尿道外傷, 尿道カルンケル, 膀胱結石, 神経因性膀胱, 各1例)を選んだ。その平均年齢は59.7歳であった。

2) 方法

K cell の測定には antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) キット (日本抗体研究所) を用いた。操作手順の概要は Fig. 1 に示すとおりで、ヘパリン加末梢血 3.0 ml にシリカを加えマクロファージを除去したのち Ficoll-Conray 法にてリンパ球を分離する。これを PBS にて3回洗浄したのち 2×10^6 cells/ml に調整しておく。

いっぽう、前もって準備しておいた羊赤血球 (SRBC) をマイクロプレートの各 well に1層となるよう附着させる。SRBC 附着マイクロプレート上に Anti-SRBC IgG で処理したリンパ球あるいは培養液 (RPMI 1640) のみを加えたリンパ球をそれぞれ別の well に加えて incubate ののち、染色を施して各 well におけるリンパ球周辺の溶血状態 (plaque) を観察する。あきらかな溶血を認めたものを plaque forming cell (PFC) と判定した。PFC (%) の算出は Fig. 1 に示すとおり、200 個以上のリンパ球を観察し、そのうちの PFC の占める割合で求めた。その場合 Anti-SRBC IgG で処理したリンパ球はいわゆる ADCC 活性をみることになり、K cell population に相当する。また抗体で処理しない場合は natural plaque forming cell (NPFC) として算出した。

結 果

1) 対照群と患者群における NPFC の比較

対照群および術前患者群の NPFC population を Fig. 2 に示す。対照群は $6.07 \pm 1.77\%$ であるが、患者群は $3.80 \pm 1.31\%$ で明らかに患者群は低値であった ($P < 0.001$)。つぎに患者群を癌悪性度の別に low grade (G0,1) 群と high grade (G2,3) 群の2群に分けて比較検討したところ、Fig. 3 に示すとおり、それぞれの平均値は $3.76 \pm 0.94\%$, $3.86 \pm 1.69\%$ でまったく差を認めなかった。同様に癌深達度別に low stage (Ta-T2) 群と high stage (T3-T4) 群の2群に分けて比較検討すると Fig. 4 に示すとおり low stage 群 $4.16 \pm 0.92\%$ で high stage 群は $2.82 \pm 1.59\%$ となり high stage 群は有意差をもって低下していた ($P < 0.05$)。

2) 対照群と患者群における ADCC 活性の比較

Fig. 5 は対照群および患者群の ADCC 活性 (K-cell population) を示す。対照群の平均値は $18.76 \pm 7.73\%$ であるが、患者群は $12.92 \pm 6.59\%$ で患者群の ADCC 活性は明らかに低下していた ($P < 0.01$)。これを NPFC の場合と同様に low grade 群、high grade 群の2者間で比較したものが Fig. 6 である。low grade 群 $16.20 \pm 6.64\%$ 、high grade 群 $9.09 \pm 3.89\%$ で high grade 群の ADCC 活性は推計学的に有意差をもって低下していた ($P < 0.01$)。また

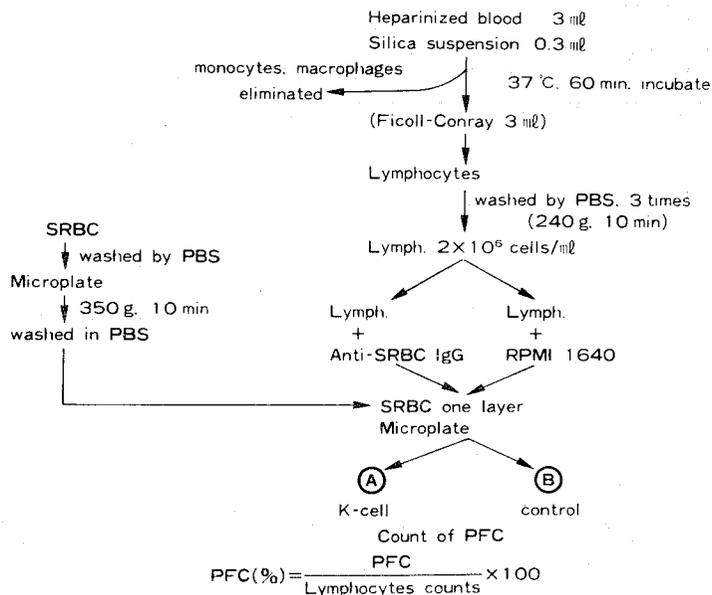


Fig. 1. Flow chart of ADCC assay

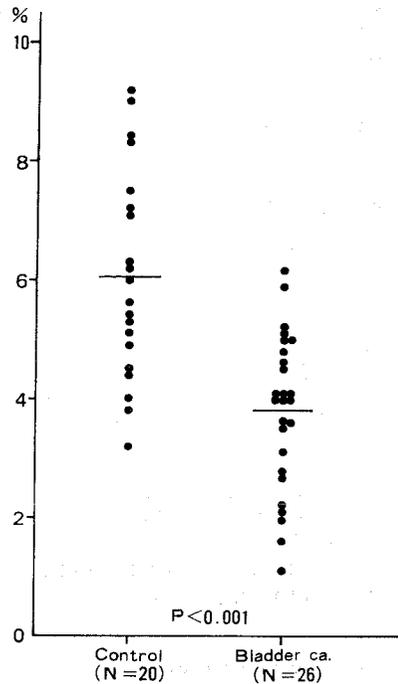


Fig. 2. Comparison of NPFC population between control subjects and patients with bladder carcinoma

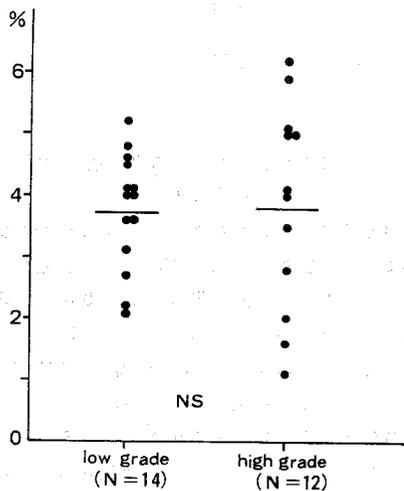


Fig. 3. Comparison of NPFC population between low and high grade groups

stage 別にみると Fig. 7 に示すとおり、low stage 群と high stage 群の ADCC 活性はそれぞれ $12.26 \pm 5.71\%$ 、 $10.99 \pm 4.57\%$ でこの二者間ではなら差を認めなかった。

3) 各群における ADCC・NPFC 比

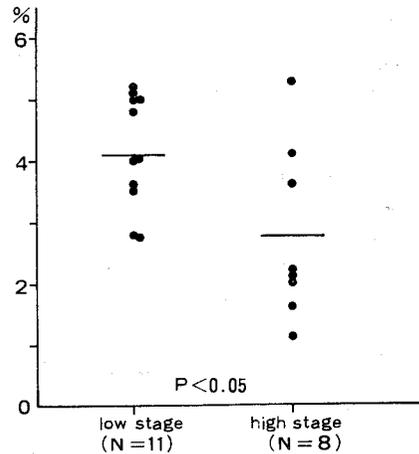


Fig. 4. Comparison of NPFC population between low and high stage groups

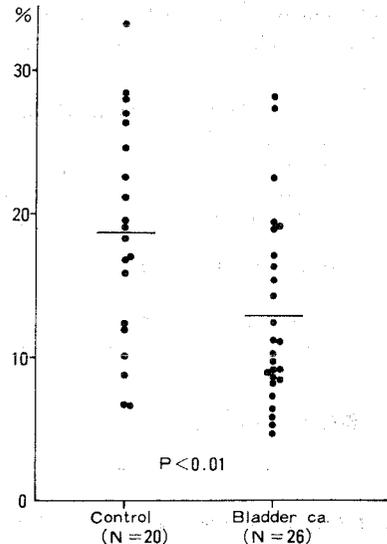


Fig. 5. Comparison of ADCC activity between control subjects and patients with bladder carcinoma

つぎに各群における ADCC と NPFC の比について検討した。Table 1 に示すとおり対照群の A/N-ratio は 3.09 であるが患者群全体では 3.40 と若干上昇している。また low grade 群はもっとも高く ADCC の優位性が示されたが high grade 群はもっとも ratio が低く NPFC の優位性が示された。さらに low stage 群の ratio は 2.95 で対照群に近い値を示したが high stage 群は 3.88 で ADCC の方がやや優位となっている。進行癌と考えられる high grade 群、high stage 群では前者が NPFC 優位であるのに対して後者は

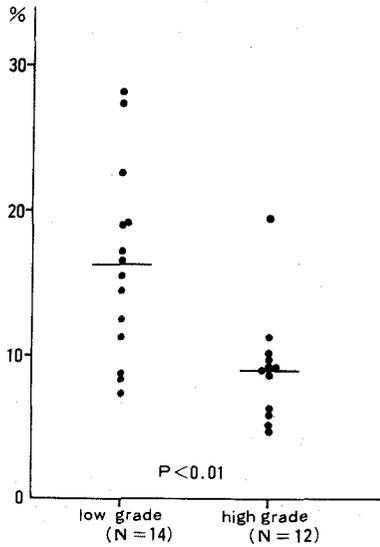


Fig. 6. Comparison of ADCC activity between low and high grade groups

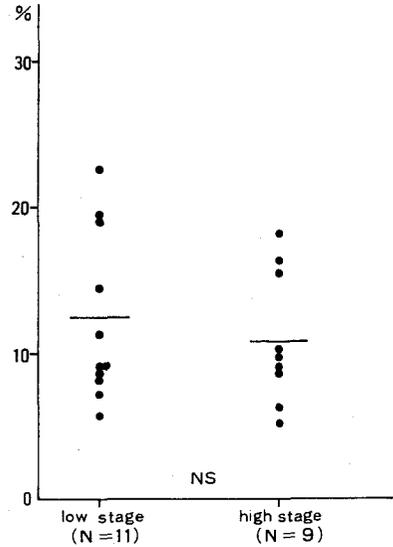


Fig. 7. Comparison of ADCC activity between low and high stage groups

Table 1. Comparison of ADCC/NPFC ratio in various groups

Group	control	bladder Ca.	low grade	high grade	low stage	high stage
ADCC (%) (A)	18.75	12.92	16.20	9.09	12.26	10.99
NPFC (%) (N)	6.07	3.80	3.76	3.86	4.16	2.83
(A)/(N) ratio	3.09	3.40	4.31	2.35	2.95	3.88

ADCC が優位となっている。

考 察

癌に対する宿主の抵抗性は動物実験系においては *in vivo* における直接的反応として観察でき、同系動物間で観れば組織適合性の問題も起らない。しかし、ヒト癌においては *in vivo* の操作はきわめて困難で、多くの場合は *in vitro* における反応をもって代用している状態である。したがって広い意味の宿主の抵抗性を観ているのであって、癌に対する抵抗性を観察しているとは言えない面がある。この点を補い、より *in vivo* response に近づける意味で標的細胞を用いた ADCC assay が広くおこなわれるようになった²⁾。しかし、この場合も標的細胞は株化されたものが使用されることが多く、autologous の組み合わせは容易ではない。今回、私どもは autologous の組み合わせをおこなう前実験として SRBC を標的細胞とした ADCC assay をおこなった。この実験法は特徴とし

ては、1) 培養系細胞と異なり標的細胞の差異、変動がほとんどない、2) SRBC をマイクロプレートに単層付着させるため安定性があり、plaque の観測が容易である、3) 観察者の個人差が少なく客観性の高いデータがえられる、4) 特殊な器具・薬剤を必要とせず、臨床家にも応用しやすい、5) SRBC の表面に癌関連抗原 (tumor associated antigen, TAA) をコートすることにより将来 specific response がおこなえる可能性がある、などの点があげられる。私どもは本法を利用した ADCC assay を膀胱癌患者を対象としておこなったところ、まず NPFC は患者群では対照群に比してあきらかに低下していたものの、grade 間ではとくに差がなく、high stage 群においてのみ著明な低下が認められた。すなわち抗体非依存性の宿主の抵抗力は stage の度合によって強く影響をうけるといえる。また、Fig. 3 でみるように high grade 群では low grade 群よりも高値の NPFC を示すものが数症例あり、high grade 群における抵抗力は抗体の

関与しない反応系において維持されている可能性が示唆された。今回の方法では NPFC を示す細胞が natural killer cell とは言えないまでも、進行した癌患者において抗体非依存性抵抗力が認められたことは興味深い。また ADCC をみると、やはり患者群は対照群に比して明らかに低下していたが、癌の進行状態で比較すると NPFC の場合と異なり high grade 群においてのみ著明な低下が認められた。すなわち high grade 群は NPFC は高値を示す症例がみられたものの、ADCC はきわめて低下している結果であり、ADCC の低下する分を NPFC で補っているとも考えられる。また stage 別ではあきらかな差を示さなかった点より high stage 群の NPFC 低下分を ADCC でカバーしている状態が示された。ちなみに Table 1 で示した ADCC と NPFC の各数値を加算すれば、対照群24.82%、患者群16.72%、low grade 群19.96%、high grade 群12.95%、low stage 群16.42%、high stage 群13.82%となり low grade 群と low stage 群、また high grade 群と high stage 群はそれぞれ同じ程度の値となり総和としての抵抗力は各群間で大きな差はないと考えられる。しかし以上の結果はすべて in vitro におけるものであり、血清中の複雑な諸因子を考慮する場合、標的細胞、effector 細胞、被検血清の組み合わせをさらに検討する必要があることはいうまでもない。また、先にも述べたとおり、標的細胞として SRBC を用いる点にも問題が残されており、私どもは摘出癌組織より 3 M KCl 抽出液を得て、TAA が含まれていると思われる分画を SRBC 表面にコートすることで特異的な ADCC, autologous な組み合わせによる ADCC を検討しつつあることを付記しておく。

ま と め

- 1) 対照群20例、膀胱癌患者群26例について SRBC を標的細胞とした ADCC 活性および NPFC 活性を観測した。
- 2) 膀胱癌患者群は ADCC 活性、NPFC 活性と

もに対照群に比してあきらかに低下していた。とくに ADCC は high grade 群において著明な低下がみられ、NPFC は high stage 群において著明に低下していた。

3) 広い意味での宿主の抵抗力(本研究では ADCC + NPFC 活性)を癌の進行状態で比較すると high grade 群、high stage 群の間ではほとんど差を認めなかった。

本論文の要旨は第69回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) 相川直樹・中田宗彦・今野弘之・石引久弥・阿部令彦：腫瘍と感染—外科より。最新医学 37: 881~884, 1982
- 2) Nishio S, Morikawa Y, Horii A, Kawakita J, Nishijima T, Kishimoto T and Maekawa M: Studies on nonspecific cellular immune response in patients with urinary bladder carcinoma. Osaka City Med J 24: 51~71, 1978
- 3) 西尾正一：膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究、第3報：患者血清のリンパ球幼若化能に与える影響について。日泌尿会誌 69: 347~356, 19978
- 4) 西尾正一・堀井明範・森川洋二・川喜多順二・西島高明・前川正信：膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究、第4報：自家および他家膀胱癌粗抽出液を用いた LAI, LMI test について。日泌尿会誌 70: 305~316, 1979
- 5) Kodera Y and Michael AB: Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity for human monolayer target cells bearing blood group and transplantation antigens for melanoma cells. Int J Cancer 16: 579~592, 1975

(1982年6月29日受付)