

膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究

第9報：末梢血リンパ球の specific S.I. 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・西島 高明・前川 正信

STUDIES OF THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN
PATIENTS WITH URINARY BLADDER CARCINOMA
IX. EVALUATION OF SPECIFIC STIMULATION INDEX (S.I.)Shoichi NISHIO, Shinichi IKEMOTO, Yukichi OZAKI, Seiji WADA,
Akinori HORII, Takaaki NISHIJIMA and Masanobu MAEKAWA*From the Department of Urology, Osaka City University Medical School**(Chairman: Prof. M. Maekawa, M. D.)*

Soluble extracts were obtained from bladder carcinoma tissue treated with a 3M KCl solution and prepared as a tumor associated antigen for the study of specific S.I. Twenty-eight bladder carcinoma patients and 10 control subjects were selected for the study.

The response was the strongest in the low stage group followed by the low grade group. The high stage group gave the lowest response.

The change in specific S.I. suggested that the response starts to decrease one month after surgery in the cases of radical surgery and tends to disappear approximately after 6 months. But, in the cases where radical surgery could not be performed, the response tended to increase from 3 to 6 months after surgery.

Since this method does not require high skill, it may be clinically valuable after improvement of the antigen preparation method.

Key words: Bladder carcinoma, 3MKCl extract, Specific S. I.

はじめに

癌に対する生体の免疫学的抵抗性はしばしば感染症に対する防禦作用と対比して論議される。感染症の場合は抗原としての細菌、ビールスが分離・同定可能であるが、ヒト癌の場合、その癌に特異的な抗原の存在は想定されているものの癌抗原の分離・同定は現在のところ不可能である。したがって癌組織由来の抗原性物質が含まれていると思われる抽出液を用いて *in vitro* における免疫学的反応を検出し、これをもって癌に対する特異的免疫反応とする場合がほとんどであ

る¹⁾。さらに抽出液の分画もなされつつあるが、いまだ *cell type specific* な癌特異抗原はヒトにおいては検出されていない。したがって癌関連抗原 (tumor associated antigen, TAA) と呼ばれることが多い²⁾。私どももこれまで膀胱癌組織より得た TAA を用いて白血球粘着阻止テストや白血球遊走阻止テストを検討してきた^{3,4)}。しかしこれらの方法はかなり複雑であり、日常の臨床に応用するにはさらに改良が望まれる。そこで今回は若干手技の簡単な方法を用いて膀胱癌患者を対象とした TAA に対するリンパ球の反応を検討し、若干の成績を得たので報告する。

対象および方法

1) 対象

対象とした症例は手術目的にて入院した膀胱癌患者28名で、男子25名、女子3名、その平均年齢は66.7歳である。癌病変の組織学的所見はすべて移行上皮癌であり、癌の悪性度 (grade) および深達度 (stage) は膀胱癌取り扱い規約にもとづいて判定した。また対照群として重篤な合併症をとまわらない10名の泌尿器科良性疾患患者を選んだ。その平均年齢は63.4歳で、男子8名、女子2名である。

2) 方法

a) Tumor Extract の作製

Fig. 1 に示すとおり手術にて摘出された膀胱癌組織より無菌的に 3-5 g の組織片を得る。これを培養液 RPMI 1640 (PC-G 10万単位/L, SM 100 mg/L 添加, Gibco Lab.) 5-10 ml 中にて細片化したのちホモジナイザー (Polytron, PT 10/35, Kinematica) にかける。このホモジネートを滅菌ガーゼにて濾過したのち遠心分離 (200 g, 5 min.) し上清を捨て、沈澱物に 1-2 ml の RPMI 1640, DNase 結晶を加え溶解したのち 3MKCl を添加してふたたび遠心分離する。つぎに上清を採取し Amicon UM-10 にて脱塩ののち、超高速高心分離にかけその上清を約10倍に濃縮する (Amicon Model 52 または UM-10)。得られた extract は濾過滅菌し (Sartorius, pore size 0.22 μ) Lowry ら⁵⁾の方法にて蛋白濃度を測定、使用時まで-80℃にて保存した。

b) Specific S. I. の測定

Fig. 2 に示すとおりヘパリン加末梢血 10 ml よりファイバークラム法にてリンパ球を分離し、培養液 RPMI 1640 にて3回洗浄したのち細胞数を 1×10^6 cells/ml に調整、これにあらかじめ至適濃度を測定しておいた tumor extract 100 μ g/ml と非働化 fetal calf serum を20%の割合で加え37℃, 5% CO₂ 下で48時間培養し、³H-thymidine 1 μ Ci/ml を加え、さらに24時間培養したのちリンパ球の DNA への ³H-thymidine の取り込み (cpm) を液体シンチレーションカウンター (Nuclear Chicago, Mark II) にて測定した。いっぽう、tumor extract を添加しない場合の取り込み (cpm) も同時に測定し Fig. 2 の計算式にて stimulation index (S. I.) を算出し、これを specific S. I. とした。

結 果

1) tumor extract の至適濃度

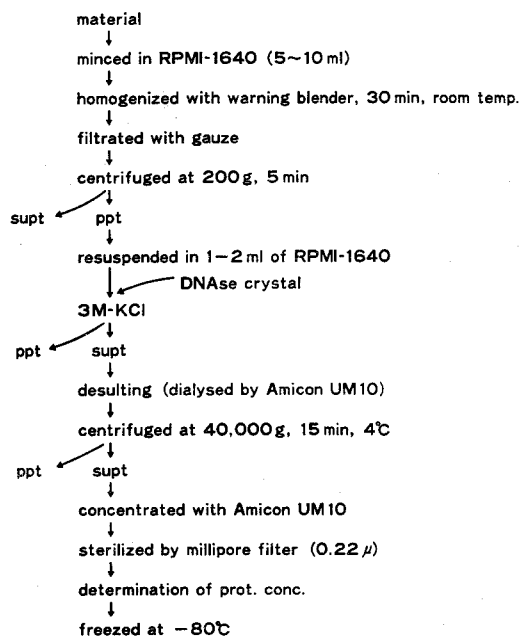


Fig. 1. Procedure of tumor extracts

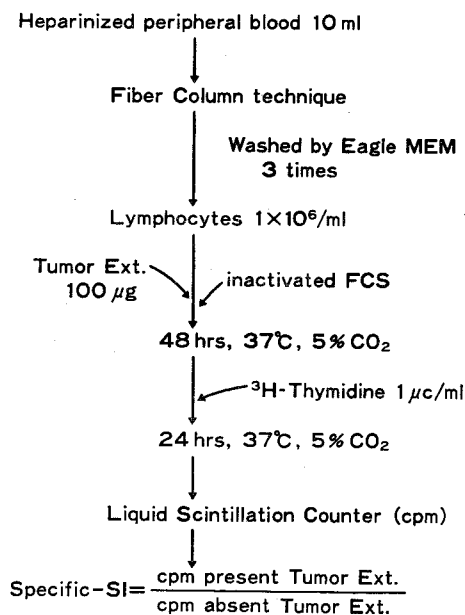


Fig. 2. Measurement of specific S.I.

本実験系における至適な tumor extract 濃度を求める目的で患者群7名より得られたリンパ球に 1 μ g-1,000 μ g (蛋白濃度) の tumor extract を加えた場合の specific S. I. を算出したところ Fig. 3 に示すごとく 100 μ g 添加時にもっとも高い specific S. I. が得られたので tumor extract の添加量は 100 μ g

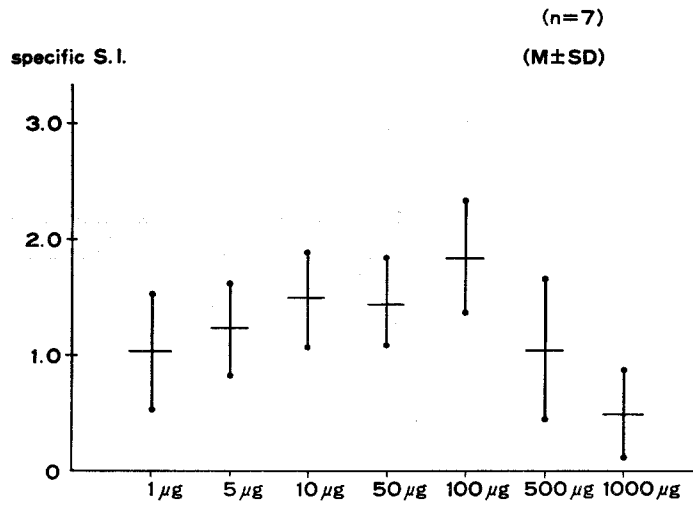


Fig. 3. Responsiveness of lymphocytes in various concentrations of tumor extracts

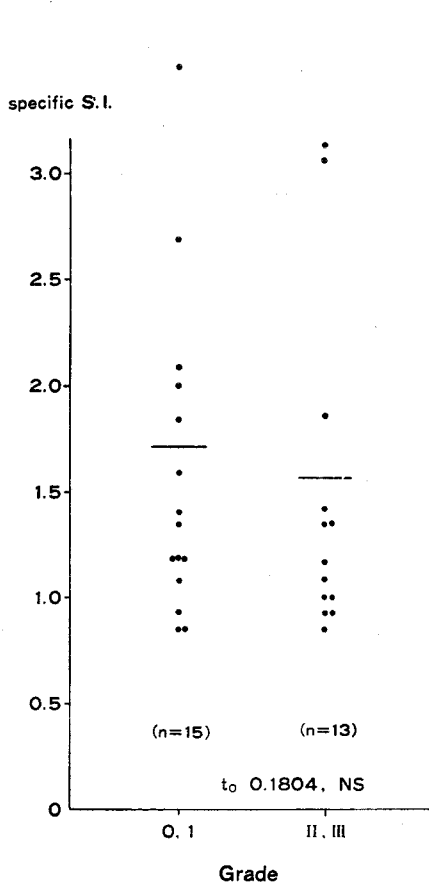


Fig. 4. Comparison of specific S.I. between low and high grade groups

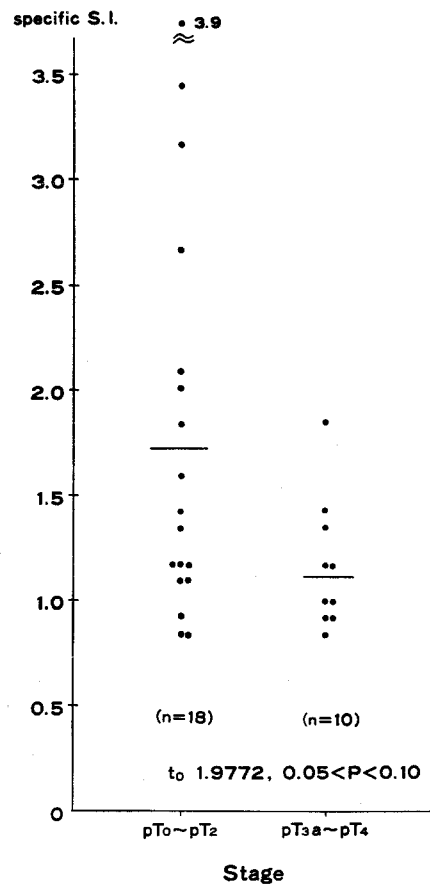


Fig. 5. Comparison of specific S.I. between low and high stage groups

とし以下の実験をおこなった。

2) 対照群と患者群の specific S.I. の比較

まず対照群10名と患者群28名の specific S.I. をみると、前者では 1.22 ± 0.33 であるのに対して後者では 1.55 ± 0.87 と患者群において specific S.I. の上昇傾向が認められる。しかし推計学的にはとくに差を認めなかった。

つぎに患者群を癌の悪性度および深達度により2群において比較検討した。Fig. 4 は悪性度の別に検討したもので grade 0, I 群の specific S.I. は 1.57 ± 0.75 で、grade II, III 群は 1.51 ± 0.95 であり、この両者間ではなら差を認めない。同様に癌の深達度別にみると Fig. 5 に示すとおり、stage pT0-pT2 群では 1.77 ± 0.95 、stage pT3-pT4 群は 1.15 ± 0.29 と low stage 群に比して high stage 群で低下する傾向が認められた。しかし推計学的には有意の差は得られなかった。そこで specific S.I. 2.0以上の症例を陽性例とした場合の各群における陽性率を求めたところ、対照群は 0/10 (0%)、low grade 群 4/15 (26.7%)、high grade 群 2/13 (15.4%)、low stage 群 6/18 (33.3%)、high stage 群 0/10 (0%) であった。したがって low stage 群がもっとも高い陽性率を示し、low grade 群がこれについている結果であった。

Table 1 は以上の結果をまとめたものである。

3) 術後における specific S.I. の変動

Fig. 6 は膀胱全摘除術を施行した症例のうち、宿主の免疫能に影響をおよぼすと考えられる薬剤の投与をうけなかった症例ならびに放射線療法をうけなかつ

た時期の5症例を選びその術後における specific S.I. の経時的変動を示したものである。3症例は根治的に摘除できた症例（根治群、実線で示す）で、そのほかの2症例は高度深達癌のため根治的摘除が不能であった症例（非根治群、破線で示す）である。術後追跡期間は8カ月～13カ月間であったが、その後も調査はつづけている。根治群の specific S.I. は手術直後には低値であるが、創部が治癒し手術侵襲の影響が消える術後1カ月目ころには3症例ともにあきらかな specific S.I. の上昇を示し、3カ月～6カ月目には逆に徐々に低下する傾向が示された。そして6カ月以降は低下したままで大きな変化は示さなかった。いっぽう、非根治群は前者とは異なり術後1カ月目では若干低下するが、そのうち徐々に上昇し6カ月目ころより横ばい状態となる傾向であった。このように根治群と非根治群とではあきらかに術後の specific S.I. の変動パターンに差異が認められた。

Table 1. Summary of specific S.I. in control subjects and patients with bladder carcinoma

	n	M $\pm$ SD	to	signif.
Control	10	1.22 $\pm$ 0.33		
Low grade	15	1.57 $\pm$ 0.75	1.3926	0.25<P<0.50
High grade	13	1.51 $\pm$ 0.95	0.9347	NS
Low stage	18	1.77 $\pm$ 0.95	1.7428	0.05<P<0.10
High stage	10	1.15 $\pm$ 0.29	0.4954	NS

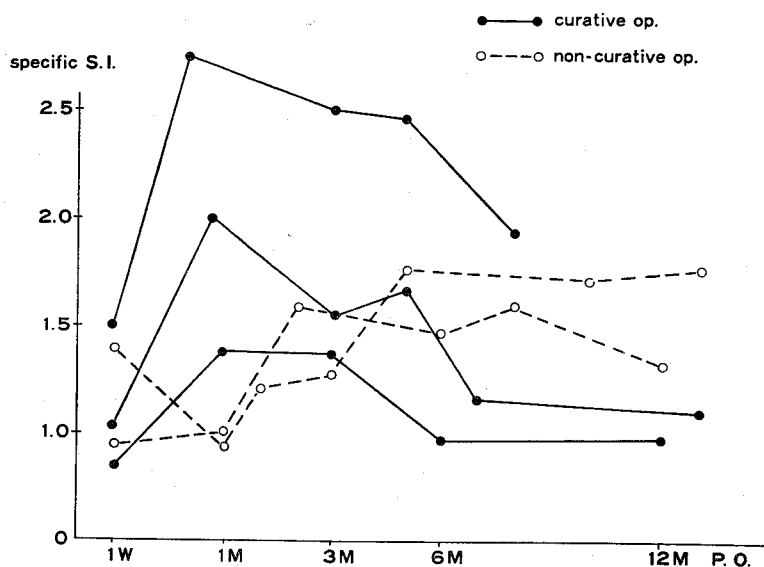


Fig. 6. Changes of specific S.I. after surgery

Table 2. Viability of lymphocytes after incubation with tumor associated antigen, survival rate was calculated by trypane blue dye exclusion test

	incubation time (hrs)	survival rate of lymphocytes incubated with TAA			
		50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
Control	20	92.4 $\pm$ 3.1	90.3 $\pm$ 3.6	86.8 $\pm$ 4.2	49.2 $\pm$ 6.1
(N=5)	48	87.7 $\pm$ 4.3	85.6 $\pm$ 3.7	76.5 $\pm$ 3.8	36.3 $\pm$ 7.6
Bladder ca.	20	92.6 $\pm$ 3.3	91.5 $\pm$ 4.3	85.2 $\pm$ 3.9	48.7 $\pm$ 5.8
(N=5)	48	88.2 $\pm$ 4.0	85.3 $\pm$ 3.4	73.2 $\pm$ 4.6	32.6 $\pm$ 4.9 (%)

考 察

1) 実験方法に関する考察

私どもはこれまで膀胱癌組織の粗抽出液を癌抗原含有抽出液として用いて、白血球遊走阻止テスト、白血球粘着阻止テストをおこなってきた³⁾。しかしこの場合は多くの混入物の存在が大きな問題となり培養白血球、リンパ球があきらかな反応を示しても、それが癌由来の物質による反応なのか、混入物による異物反応なのかをあきらかに判別することは困難である。そこで、今回は癌関連抗原の抽出法として広く用いられている方法に準じて 3MKCl 抽出液を得て、これを TAA として用いた。また今回の実験における TAA の至適濃度は 100 μg であったが、添加濃度を変えた場合のリンパ球の viability をトリパンブルー色素排泄テストで検討すると Table 2 に示すとおり 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加の場合 20 時間培養ではいずれも 90% 以上の生存率を示しているが 500 $\mu\text{g/ml}$ では 85-86% に減少し、さらに 1,000 $\mu\text{g/ml}$ では 50% 以下になる。48 時間の培養でも 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ の場合はともに 85% 以上の生存率であるが 500 $\mu\text{g/ml}$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ではあきらかに viability の低下がみられる。したがって本実験系ではもっとも有効な濃度でかつ細胞障害性の少ない 100 μg を選んで用いた。

2) 対照群の反応について

対照群として選んだ症例は泌尿器科の良性疾患である。既報にて報告したとおり良性疾患患者の非特異的マイトーゲンに対する反応は膀胱癌患者群に比してあきらかに高い値を示したが⁶⁾ 今回の膀胱癌組織抽出液に対する反応はきわめて低く 1.22 ± 0.33 であった。しかし無反応でないのは組織適合抗原の作用と考えられる。この点に関しては 3MKCl 抽出液をカラムクロマトグラフィーで画分し、各分画についての検討をおこなっている。

3) 膀胱癌患者群の反応について

前項で述べたように膀胱癌患者群の非特異的マイト

ーゲンに対する反応性は対照群に比してあきらかに低下しているにもかかわらず、3MKCl 抽出液に対しては逆に対照群より高い反応を示したことは癌生体内を循環しているリンパ球が、あるいはそのほかの免疫担当細胞が癌の存在をなんらかの形で認識している可能性が示唆された。患者群の中でも low stage 群の反応が高く、high stage 群の反応が低かったことは low stage 群の宿主免疫担当細胞の抗原刺激に対する反応性が十分に保持されており、かつ癌組織の抗原性も存在したためであったと思われる。しかし、high stage 群では低い反応しか得られなかったことは生体内での抗原刺激量が過剰であったためか、あるいは進行癌患者血清中に存在するとされている各種の免疫抑制物質の出現のため免疫担当細胞が生体内では十分に反応できなかったものと判断される。同様な結果は膀胱癌患者を対象とした白血球粘着阻止テスト、白血球遊走阻止テストによっても得られている³⁾。以上のことは術後における各個体の specific S. I. の経時的変化からも推測される。すなわち、low stage 群で根治的手術をおこないえた症例では癌抗原による刺激が消失するのに伴って徐々に specific S. I. は低下するが、根治的手術不能例では手術にて抗原量は著明に減少するが消失しないため術後 6 カ月を経てもなお反応性が認められる現象より、宿主の癌に対する免疫学的反応の強さは癌の抗原量によって左右される面も有すると考えられる。しかし、癌の深達度と癌組織の大きさは必ずしも正の相関関係にあるとはいえず、最近私どもは癌組織 3MKCl 抽出液により免疫した家兎抗血清を用いた手法で、膀胱癌患者の尿中に遊離される抗原性の検出ならびに癌の悪性度と深達度との関連性について分析中である⁷⁾。以上、specific S. I. を用いた膀胱癌患者の免疫学的解析を試みたが、本方法はリンホカインを認識する白血球粘着阻止テストや白血球遊走阻止テストに比してきわめて手技は安易である利点を有する反面、直接反応をみるため反応の強さが増幅されない欠点を有している。今後、抗原として用

いる 3MKCl 抽出液の分析をさらに詳細におこない、各分画による反応を検討してゆく予定である。

ま と め

1) 膀胱癌患者28例, 対照群10例について膀胱癌組織 3MKCl 抽出液を抗原とした specific S. I. を検討した。

2) low stage 群の反応性をもっとも高く, ついで low grade 群が高値を示し, high stage 群はもっとも低値であった。

3) 術後の specific S. I. の変動をみると根治的手術例では術後1カ月頃より反応性は低下しはじめ, 6カ月頃より消失する傾向にあったが, 根治的手術不能例では逆に3-6カ月後より上昇する傾向が認められた。

4) 本方法はその手技が安易であり, 抗原作製法の改善が得られれば臨床的に応用することが可能と考えられる。

本論文の要旨は第19回日本 癌治療学会総会において発表した。

文 献

- 1) Anderson V, Bjerrum O and Bendixen G : Effect of autologous mammary tumor extracts on human leukocyte migration in vitro. *Int J Cancer* 5 : 357~363, 1970
- 2) McCoy JL and Jerome LF and Dean JH: Inhibition of leukocyte migration by tumor

associated antigen in soluble extracts of human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 53 : 11~17, 1974

- 3) 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. *日泌尿会誌* 70 : 305~316, 1979
- 4) 西尾正一・和田誠次・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5報. *泌尿紀要* 25 : 897~904, 1979
- 5) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall R: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265~275, 1951
- 6) Nishio S, Horii A, Morikawa Y, Kawakita J, Nishijima T, Kishimoto T and Mackawa M: Studies of the nonspecific cellular immune response in patients with urinary bladder carcinoma. *Invest Urol* 16 : 336~341, 1979
- 7) Nishio S, Wada S, Morikawa Y, Hayahara N, Yuki K, Kawanishi H and Mackawa M: Studies of the cellular immune response in patients with urinary bladder carcinoma. Abstracts of the XIX international congress of the SIU, p 110, 1982

(1982年12月14日受付)