

# 尿路性器癌患者の細胞性免疫能に関する研究

## 第I報：PHAによる末梢リンパ球幼若化現象の基礎的検討

長崎大学医学部泌尿器科学教室（主任：近藤 厚教授）

松 尾 栄 之 進

## STUDIES ON CELL-MEDIATED IMMUNOCOMPETENCE IN PATIENTS WITH UROGENITAL CANCER

### I. ELEMENTARY INVESTIGATIONS ON PHA INDUCED BLASTOID TRANSFORMATION OF PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Einoshin MATSUO

*From the Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine*

*(Director: Prof. A. Kondo), Nagasaki, Japan*

For the purpose of evaluating the cell-mediated immunocompetence in patients with urogenital cancer, observations of PHA induced blastoid transformations of peripheral lymphocytes were attempted.

In this report, dose-and time-response of this phenomenon in lymphocytes of the healthy adults and the effects of addition of some kinds of sera on those responses were investigated.

#### 1. The effects of PHA-P concentrations.

In the lymphocyte culture with medium containing 20% AB-serum, 0.1 ml of PHA-P diluted to  $10\times$ ,  $100\times$ ,  $400\times$  and  $800\times$  with the medium was added and the blastoid transformations were periodically observed.

At the 2rd day of culture, the response was developed at the maximum level in each group.

The responses were significantly higher in  $100\times$  and  $400\times$  concentration than in  $10\times$  or  $800\times$  concentration of PHA-P.

#### 2. The effects of some kinds of sera added.

In the lymphocyte culture with medium containing  $400\times$  diluted PHA-P, the responses, at the 3rd day, were highest in addition of FCS and AB-serum, auto-serum were followed.

The responses were slightly higher in medium with inactivated sera than in those with non-inactivated sera. However, there was no significant difference.

Therefore, it is most adequate that the blastoid transformation is observed in the medium containing with  $100\times$  or  $400\times$  diluted PHA-P and inactivated AB-serum at the 3rd day of culture.

## 緒 言

Burnet の免疫学的監視説によれば、腫瘍は腫瘍特異抗原を有しており、これが生体内で放出され、生体はこれを認識し、おもに T-cell を介した細胞性免疫により腫瘍を拒絶する反応が起こるという。したがってがん患者の細胞性免疫能を把握することはその病像

を正確にとらえ、予後を判定するのに大きな助けとなるであろう。

1960年、Nowell<sup>1)</sup>により PHA 刺激によるリンパ球の幼若化現象が報告されて以来、この現象に関する数多くの報告が発表されている。非特異的 mitogen である PHA は in vitro で選択的に末梢血中の T-cell を幼若化する。In vitro におけるリンパ球の幼若化現

象は免疫担当細胞が抗原に反応して免疫遂行細胞になる際の重要な分化の過程を再現するものであるといわれる。担癌生体では *in vitro* での PHA 反応が低下するという多くの報告があり、この反応性の消長は免疫担当細胞としてのリンパ球の機能を量的に表現する 1 つの指標となりうると考えられている。

著者は PHA によるリンパ球幼若化現象を用いて尿路性器癌患者の細胞性免疫能を推定するために、まず基礎的実験として PHA によるリンパ球幼若化の dose-and time-response および 種々の血清添加による影響について検討を加えた。

## 材料と方法

### 1. リンパ球の採取と培養

健康男子成人（平均年齢 28.5 歳）よりそれぞれヘパリン静脈血 100 ml を採血した。これを 2 倍に稀釈し、20 ml ずつ Ficoll-Conray 液 15 ml に静かに重層し、1,500 rpm, 35 分間遠沈し、リンパ球層を採取した<sup>2)</sup>。これを洗浄用 RPMI 1640 で 1,600 rpm, 1,200 rpm, 800 rpm と各 10 分間ずつ洗浄し、培養用 RPMI 1640 (streptomycin 100  $\gamma$ /ml, penicillin 100 u/ml 含有) にて細胞数  $0.5 \times 10^6$ /0.8 ml の浮遊液に調整した。なおこの浮遊液中のリンパ球の purity は 90% 以上, viability は 100% であった。調整したリンパ球浮遊液をガラス製培養用小試験管に 0.8 ml ずつ入れ、各種血清 0.2 ml を加えた。Mitogen として各種濃度の PHA を 0.1 ml ずつ加えた後、ゴム栓で密栓し、37°C ふ卵器にて duplicated に培養した。培養はそれぞれ 1, 2, 3, 4 日間おこない、培養終了 2 時間前に  $^3\text{H}$ -thymidine 5 Ci/m mol（日本アイソトープ協会）を 2  $\mu\text{Ci}$ /tube 加えた。

### 2. 血清

添加血清は AB 型血清（AB 型成人男子 3 人の血清を混合）、自己血清、牛胎児血清（FCS）を 56°C, 30 分間加温して非働化し、それぞれ 0.2 ml を加え 20% となるようにした。このほかに AB 型血清と自己血清については補体の影響をみるために非働化しない血清を添加した sample を作製した。なお対照として血清を全く加えない sample も作製した。

### 3. Mitogen

PHA-P（Difco 社製）を RPMI 1640 5 ml で溶解し、同じ培養液で 10 倍、100 倍、400 倍、800 倍に稀釈し、その 0.1 ml を添加した。

### 4. DNA 合成能の測定

森本ら<sup>4)</sup>の filter disk 法によって測定した。 $^3\text{H}$ -thymidine 添加 2 時間後に各 sample を遠沈し、その

沈渣を直径 24 mm の filter disk（Whatman 3 MM）にのせ、乾燥後ビーカー内の 10% TCA, 5% TCA にそれぞれ 30 分間ずつ浸し、その後エチルアルコール、エチルエーテルに 10 分間ずつ浸した後乾燥させた。各 filter を counting vial ビンに入れ、scintillator（toluene 1,000 ml, DPO 5 g, Dimethyl POPOP 300 mg）5 ml を加え、liquid scintillation counter（Aloka 社製, LSC 602）にて 5 分間その放射能活性（cpm）を測定した。

## 結 果

### 1. PHA 添加濃度と幼若化反応の経時的変化

PHA 濃度を 10 倍、100 倍、400 倍、800 倍、に非添加の各群に作製し、それぞれの経時的変化をみると、Fig. 1 のように 1 日目はほとんど反応を示さないが、PHA 非添加群を除き 2 日目より反応値は上昇し、10 倍添加群  $5,542.83 \pm 3,299.68$  cpm, 100 倍添加群  $3,655.33 \pm 1,610.93$  cpm, 400 倍添加群  $5,294.19 \pm 3,340.87$  cpm, 800 倍添加群  $940.00 \pm 783.87$  cpm であった。3 日目はさらに上昇し、10 倍添加群  $5,941.33 \pm 1,877.14$  cpm, 100 倍添加群  $1,218.67 \pm 5,561.95$  cpm, 400 倍添加群  $11,676.33 \pm 3,269.91$  cpm, 800 倍添加群  $4,185.83 \pm 1,444.57$  cpm と最大値に達したが、4 日目には反応は急速に低下し、10 倍添加群  $4,497.83 \pm 2,704.95$  cpm, 100 倍添加群  $971.33 \pm 640.64$  cpm, 400 倍添加

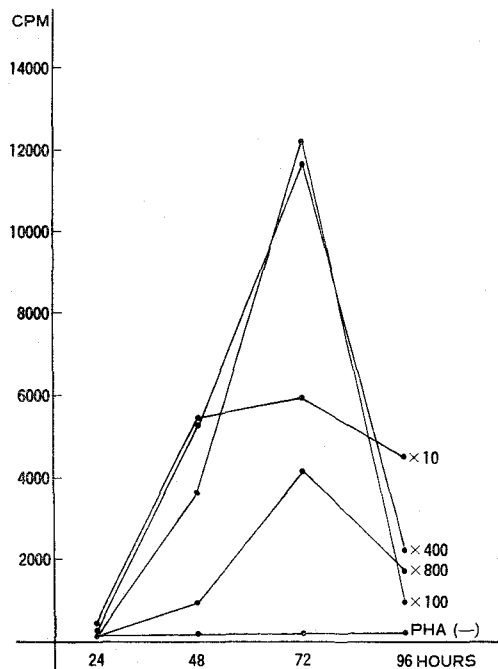


Fig. 1. PHA-dose and time response.

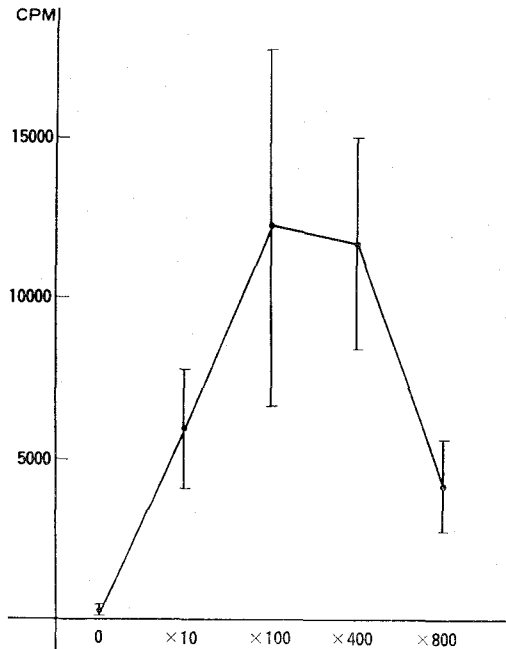


Fig. 2. PHA-dose response after 72 hours of culture.

群  $2,207.50 \pm 2,725.05$  cpm, 800 倍添加群  $1,729.83 \pm 1,525.23$  cpm という結果であった。しかし、PHA 非添加群は時間の経過と関係なく、反応値は全く上昇しなかった。

3 日目の反応値を各濃度別に比較すると Fig. 2 のように 100 倍添加群は  $12,181.67 \pm 5,561.95$  cpm と最も高い反応値を示し、ついで 400 倍添加群の  $11,676.33 \pm 3,269.91$  cpm, 10 倍添加群の  $5,941.33 \pm 1,877.14$  cpm, 800 倍添加群  $4,185.83 \pm 1,444.57$  cpm であった。このうち 100 倍と 400 倍添加群の反応値との間には有意差はなく、培養 72 時間目で観察した場合、 $0.5 \pm 10\%$  ml のリンパ球浮遊液に対する PHA-P の至適濃度は 100~400 倍と考えられる。

## 2. 各種血清および補体の影響

PHA-P 添加濃度を 400 倍とし、AB 型血清 (AB-S), 自己血清 (Auto-S), 牛胎児血清 (FCS) を  $56^\circ\text{C}$ , 30 分間で非働化した後それぞれを 20% 添加した場合と血清を添加しない場合のリンパ球の反応を Fig. 3 に示した。FCS の場合 2 日目より  $9,592.00 \pm 93.03$  cpm と高い反応を示し、3 日目は  $13,183.17 \pm 4,806.86$  cpm と最大値に達し、4 日目には  $3,835.33 \pm 3,563.17$  cpm と低下した。これに対し AB-S, Auto-S 添加群ではそれぞれ 2 日目は  $5,294.17 \pm 3,340.87$  cpm,  $2,026.83 \pm 1,462.39$  cpm, 3 日目は  $11,676.33 \pm 3,269.91$  cpm,  $10,279.17 \pm 3,520.30$  cpm, 4 日目は  $2,207.50 \pm 2,725.05$

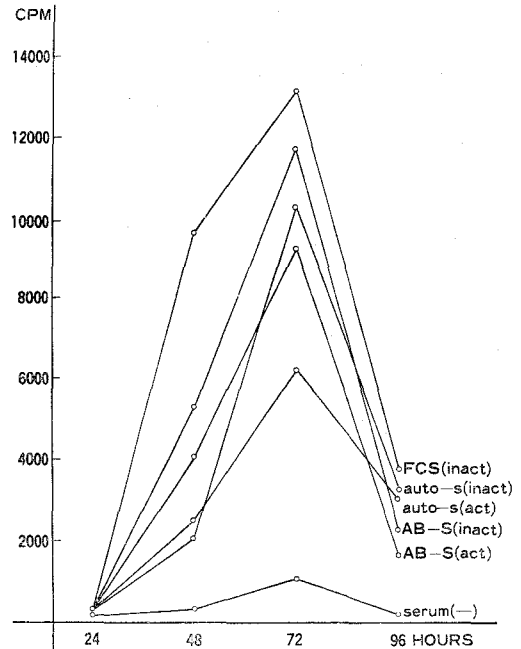


Fig. 3. Effect of serum on PHA induced blastoid transformation.

cpm,  $3,221.17 \pm 3,610.51$  cpm で FCS 添加群に比しやや反応は低いが、経時的反応パターンはいずれも同じであった。一方、血清非添加群では 3 日目に  $1,039.67 \pm 624.05$  cpm とやや上昇したが全経過にわたりほとんど反応は認められなかった。

また AB-S, Auto-S を非働化せず、補体活性をそのままにして血清を添加した場合、それぞれ 2 日目は  $4,072.17 \pm 1,599.57$  cpm,  $2,500.33 \pm 1,356.03$  cpm, 3 日目は  $9,257.67 \pm 4,047.29$  cpm,  $6,172.17 \pm 2,546.03$  cpm, 4 日目は  $1,546.83 \pm 1,491.64$  cpm,  $2,933.00 \pm 2,982.76$  cpm と反応値は低下の傾向にあるが強い抑制はなかった。

## 考 察

リンパ球の幼若化をおこすおもな mitogen のうち PHA, concanavalin A は胸腺由来細胞 (T-cell) に、dextran, trypsin は骨髄由来細胞 (B-cell) に、PWM は T-cell と B-cell に作用するといわれている。著者は尿路性器癌患者の細胞性免疫能を推定する目的で癌免疫の主役を演じるといわれる T-cell の変動を検査するために PHA を mitogen として選んだ。

リンパ球の幼若化反応を評価するためにはおもに次のような方法があげられる<sup>3)</sup>。(1) 培養リンパ球の染色標本作製し、幼若化細胞の出現率を算定する方

法. (2)  $^3\text{H}$ -thymidine を加えてその核酸合成へのとり込みをオートラジオグラフ法でみる. (3) 同様に  $^3\text{H}$ -thymidine の核酸合成へのとり込みを liquid scintillation counter によって計測する. 著者はこのうち最も客観的で簡便な評価法とされる (3) の方法を採用し, filter disk 法<sup>4)</sup>によって計測した.

PHA によるリンパ球の幼若化反応を観察する際, 先ず問題となるのはその至適添加量と観察時間の設定である. 森<sup>5)</sup>は Difco 社製の PHA-P (蛋白質と多糖類を含む PHA-M から多糖類を除いたもの) を 5 ml に溶解し, それを 100 倍希釈したものを 0.1 ml (15/ug) 添加し, 72 時間目に観察した. 著者も Difco 社製の PHA-P を用い, 10 倍, 100 倍, 400 倍, 800 倍と希釈し, その 0.1 ml を添加して比較検討した結果, 培養 72 時間目に 100 倍と 400 倍の濃度群で最も高い反応値を示した. すなわち  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  のリンパ球浮遊液に対しては PHA 濃度は必ずしも 100 倍は必要でなく, 400 倍でも十分に反応しうると考えられる. Rigas ら<sup>6)</sup>は高濃度の PHA を添加すると反応がかえって低下すると述べ, その理由は PHA 濃度に比して反応するリンパ球が少なくなるためであろうと指摘している.

PHA により小リンパ球が若幼化する過程については, 形態学的にもまた生化学的にもかなり詳しく研究されている. DNA 合成の促進については, PHA がリンパ球の細胞膜と結合して 24 時間後に DNA 合成が開始され, 48 時間で増大しはじめ, 72 時間で最大となる. そして 120 時間目より次第に減少するという. 著者の実験においても DNA 合成は 48 時間で上昇しはじめ, 72 時間で最大となった. しかし 96 時間目ではいずれも著しい低下を示した. 本実験ではゴム栓による閉鎖培養のために活潑な代謝活性に対し, 培養液の至適 pH が 96 時間まで維持できなくなり, DNA 合成を著しく阻害する結果となったためであろう. しかし培養開始時の pH を 7.0~7.2 に調整しておけば 72 時間まで活潑な DNA 合成は維持された.

添加血清の濃度と種類については多くの研究があるが, そのほとんどは血清を 10~25% に添加することによりリンパ球の反応を十分に観察しうるとしている. 本実験においても血清を添加しない場合にはほとんど反応を示さなかったが, 血清添加によってはじめて著明な反応がおこった. しかし血清中の栄養成分, 抗原, 抗体, 成長促進因子または抑制因子などリンパ球幼若化反応に与える影響が大きいかを考慮する必要がある. したがってこの検査に用いる血清はできるだけ一定の活性化能を有するものが望ましい. Hughes

ら<sup>7)</sup>は健康者で自己血清を用いてリンパ球幼若化現象を観察したが, この反応に影響を与えるような特定の要因を証明することができなかったとしている. しかし被験者が病的状態とか投薬中などの特別な条件にある場合には自己血清のこの反応に及ぼす影響を無視することはできない. 著者は健康成人男子 AB 型血清 3 人分を混合し,  $56^\circ\text{C}$ , 30 分間で非働化し,  $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存したものを随時溶解して使用し, 安定した結果を得た. 牛胎児血清のような異種血清ではその lot number が異なると反応値が異なるという報告が多い.

Bergman ら<sup>8)</sup>は血漿代用剤添加によりその反応値が高くなるのは, その成分である dextran, glucose, albumin によるものと考えた. また荒井ら<sup>9)</sup>は血清のかわりに 0.25% bovine serum albumin を加えるのみで PHA による反応は充分に高い値を示したと報告している.

大沢ら<sup>10)</sup>によれば, Boyd は植物性赤血球凝集素に対し lectin という名称を提唱したが, これに従えば PHA は *Phaseolus vulgaris* lectin と呼ばれ, 普通細胞毒性はないとされる. 補体の存在で PHA のリンパ球に対する反応をみた本実験結果から AB 型血清, 自己血清いずれの場合でも反応の抑制は著明でなかった. Lectin の中には *Ricinus communis* lectin のように細胞障害作用をもつものもあるが, PHA の場合リンパ球に対する補体の影響は明らかでなかった.

## 結 語

尿路性器 癌患者の細胞性免疫能を測定する目的で PHA による末梢血リンパ球の幼若化反応を取り上げ, まず健康成人 6 人を対象としてこの反応の基礎的検討をおこなった.

### 1. PHA-P の添加濃度による影響

20% AB 型血清添加 培養の場合, PHA-P 10 倍, 100 倍, 400 倍, 800 倍, 各 0.1 ml 添加群の反応を経時的に観察した. 各群共に 1 日目は反応を示さず, 2 日目より反応があらわれ, 3 日目で最高に達し, 4 日目には著明に低下した. 3 日目の反応について各群を比較すると, 100 倍と 400 倍の反応が最も高く, それぞれ  $12,181.67 \pm 5,561.95$  cpm および  $11,676.33 \pm 3,269.91$  cpm であった. ついで 10 倍が  $5,941.33 \pm 1,877.14$  cpm, 800 倍が  $4,185.83 \pm 1,444.57$  cpm であった. 以上より PHA-P の濃度は 100~400 倍が適当であり, 3 日目の値を基準とするのがよいと考える.

### 2. 各種添加血清の影響

400 倍 PHA-P 添加培養の場合, 非働化した AB 型

血清（AB-S）、自己血清（Auto-S）、牛胎児血清（FCS）を20%添加した各群について反応を経時的に観察した。各群共に反応の経時的変動は前記と全く同様であった。最も高い3日目の反応値について各群を比較すると、FCSが最も高く  $13,183.17 \pm 4,806.86$  cpm で、ついで AB-S が  $11,676.33 \pm 3,269.91$  cpm, Auto-S が  $10,279.17 \pm 3,520.30$  cpm であった。非働化しない AB-S, Auto-S を添加した場合には、非働化群に比して反応はやや低値を示したが、補体による強い抑制はみられなかった。

以上よりリンパ球培養における血清は非働化した AB 型血清を20%添加した場合がより安定した反応値を示すと考えられる。

稿を終わるにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜った教室の近藤厚教授に心から感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Nowell, P. C.: *Cancer, Res.*, **20**: 462, 1960.
- 2) 倉持恒雄：移植, **1**: 63, 1972.
- 3) 早川 浩, 林河 宏：臨床免疫, **4**: 371, 1972.
- 4) 森本剛史, 高木 弘, 森田敏照：医学のあゆみ, **85**: 369, 1973.
- 5) 森 陽一：免疫実験操作法 A, 日本免疫学会編, 672, 1971.
- 6) Rigas, D. A., Elsasser, P. and Hecht, F.: *Int. Arch. Allergy*, **39**: 587, 1970.
- 7) Hughes, D. and Caspary, E. A.: *Int. Arch. Allergy*, **37**: 506, 1970.
- 8) Bergman, B., Borjeson, J. and Low, B.: *Scand. J. Haemat.* **4**: 176, 1967.
- 9) 荒井澄夫, 多田正人, 滝島 任, 山根 績：医学のあゆみ, **96**: 697, 1976.
- 10) 大沢利昭, 森 良一：レクテン, 第 I 版, p. 2, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1976.

(1978年5月30日受付)