

尿路性器癌患者におけるポリエチレングリコール沈降物補体消費試験による Circulating Immune Complexes の測定

岐阜大学医学部泌尿器科学教室（主任：西浦常雄教授）

酒井 俊助・加藤 直樹・伊藤 康久

松田 聖士・小出 卓也・出口 隆

栗山 学・坂 義人・西浦 常雄

長浜赤十字病院泌尿器科

鄭 漠 彬

DETECTION OF CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES BY POLYETHYLENEGLYCOL PRECIPITATIONS COMPLEMENT CONSUMPTION TEST IN UROLOGICAL MALIGNANT DISEASES

Shunsuke SAKAI, Naoki KATO, Yasuhisa ITO, Seiji MATSUDA, Takuya KOIDE,
Takashi DEGUTI, Manabu KURIYAMA, Yoshihito BAN
and Tsuneo NISHIURA

*From the Department of Urology, Gifu University School of Medicine
(Director: Prof. T. Nishiura)*

Kanhin TEI

*From the Department of Urology, Nagahama Red Cross Hospital
(Chief: K. Tei)*

Circulating immune complexes (CIC) were detected and quantitated in 49 patients with urological malignant diseases (9 cases of renal cell cancer, 3 cases of renal pelvic and ureter cancer, 21 cases of bladder cancer and 16 cases of prostatic cancer), 9 patients with urological benign diseases and in normal subjects by the polyethylene-glycol precipitation complement consumption test (PEG-CC test).

The average CIC level was $2.7 \pm 3.0\%$ in 18 normal subjects and the normal range was less than 10% of the CIC level.

CIC level of patients with renal cell cancer was $14.3 \pm 20.1\%$, being elevated in 3 of the 9 patients, that of patients with renal pelvic and ureter cancer was $4.7 \pm 4.6\%$, being within the normal range in 3 cases, that of patients with bladder cancer was $4.7 \pm 4.4\%$, being elevated in 1 of 21 patients, and that of patients with prostatic cancer was $8.9 \pm 15.4\%$, being elevated in 3 of 16 patients.

In urological malignant diseases such as renal cell cancer and prostatic cancer the CIC values were relatively high.

Key words: CIC, PEG-CC

緒 言

近年、自己免疫疾患をはじめとする各種の疾患で circulating immune complexes (CIC と略) が測

定され、その意義があきらかになり各科領域にわたって注目されている。

SLE¹⁾ やリウマチ様関節炎²⁾の病理組織病変からは immune complexes が実際に証明されており、また

担癌患者における血清中の CIC 値についてもいくつかの報告がなされている³⁾。

CIC の証明方法の報告は現在まで多数みられるが、従来の方法は精製補体 C_{1q} や Raji 細胞の培養株などの特殊な器具や材料を要し、非常に繁雑で実用化に難点があった。

今回、著者は CIC をより簡便に測定できるポリエチレングリコール沈降物補体消費試験により、尿路生殖器癌患者において測定したので報告する。

対象および方法

対象は岐阜大学附属病院泌尿器科およびその関連病院泌尿器科を受診した腎細胞癌患者 9 例、腎盂尿管腫瘍患者 3 例、膀胱腫瘍患者 21 例および前立腺癌患者 16 例であり、対照群として泌尿器科的良性疾患患者 9 例（腎のう胞患者 3 例、前立腺肥大症患者 6 例）および健常人 18 例についても検討を加えた。対象の症例はいずれも術前であり、制癌剤・ステロイドホルモン剤の投与および放射線療法はおこなわれていない。

なお、癌の浸達度は U.I.C.C. の分類にしたがった。

immune coplexes の測定法は polyethylene glycol (PEG と略) による circulating immune complexes の沈殿物の作製と補体溶血反応とを組合せた Harkiss の原理を改善した手嶋らの方法⁴⁾に準じて測定した。具体的には、検体（血清）300 μ l またはコントロールとして生食水 300 μ l に 0.2 M EDTA (pH 7.2) 50 μ l, ホウ酸緩衝液 (0.1 M boric acid, 25 mM disodium tetraborate, 75 mM NaCl, pH 8.4) 50 μ l をそれぞれ加えて覚拌した後、12.5% PEG 100 μ l をさらに加えて覚拌する。（EDTA と PEG の最終濃度はそれぞれ 0.02 M と 2.5% となる。）4°C にて 90 分間静置した後、1,700 g にて 10 分間遠心する。沈降物を 2.5% PEG で洗浄し、1,700 g で 15 分間遠心する。上清を完全にすて沈降物に 37°C に保たれた 30 μ l のゼラチン加ペロナル緩衝液 (GVB⁺⁺) を加えて溶解する。補体源としてプールした健常人血清 10 μ l を加え、37°C、30 分間免疫複合体と補体を反応させることにより補体の消費がおこる。残存補体量を測定する目的で、 1.5×10^8 cells/ml に調整した感作羊赤血球 (EA) を加え、37°C にて 60 分間反応させる。反応後、ただちに 4°C に保たれた 6.5 ml の生食水を加え反応を止め遠心し、残存する EA を沈殿させる。上清の吸光度を OD₄₁₄ で測定し、以下の式で補体消費率を算出し、Circulating Immune Complexes 値を求めた (Fig. 1)。

circulating immune complexes (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{haemolysis of sample}}{\text{haemolysis of control}}\right) \times 100$$

なお、各測定値の群間比較は、原則として t 検定による推計学的検定によって有意差の有無を検定し、有意水準は 5% と考えた。

成 績

1) 健常人および泌尿器科的良性疾患患者

健常人 18 例の CIC は 0% から 9% までに分布して

```

{ 0.3ml of specimen (serum) or saline for control
  50 $\mu$ l of 0.2M EDTA
  50 $\mu$ l of 0.1M boric acid

add 0.1ml of 12.5% PEG
↓
stand for 90min at 4°C
↓
centrifuge at 1700g for 10min at 4°C
↓
wash pellet in 1ml of 2.5% PEG
↓
centrifuge at 1700g for 15min at 4°C
↓
dissolve pellet in 30 $\mu$ l of GVB++ kept 37°C
↓
add 10 $\mu$ l of pooled normal human serum
↓
add 1ml of  $1.5 \times 10^8$  cells/ml of EA
↓
shake tenderly for 60min at 4°C
↓
add 6.5ml of saline kept at 4°C
↓
centrifuge at 1700g for 10min at 4°C
↓
measure O.D. at 414nm

```

Fig. 1. Detection of circulating immune complexes by polyethyleneglycol precipitation complement consumption test

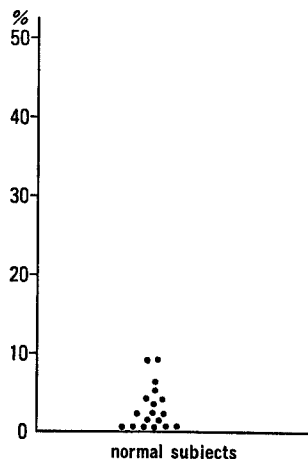


Fig. 2. Detection of circulating immune complexes in normal subjects

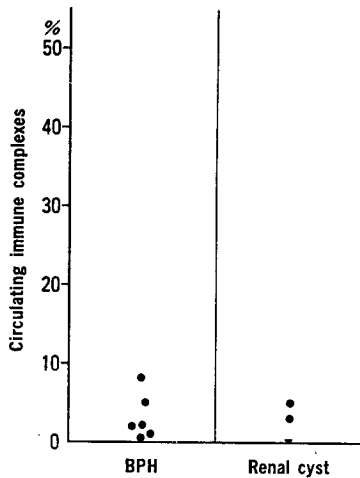


Fig. 3. Detection of circulating immune complexes in sera of patients with urological benign disease

おり、平均は2.7%で、SD は $\pm 3.0\%$ であった。この成績より 2SD に近い10%以下を正常値とした (Fig. 2)。

泌尿器科的良性疾患患者9例の CIC の平均は $2.9 \pm 2.7\%$ であり、0%から8%まで分布しておりいずれの症例も正常値であった (Fig. 3)。

2) 腎細胞癌患者

腎細胞癌患者9例の CIC は2%から63%まで分布しており、3例に異常値を認め陽性率は33%であった (Table 1, Fig. 4)。平均は $14.3 \pm 20.1\%$ であり、健康人のそれと比較した場合には有意の差を認めた ($P < 0.05$)。

つぎに、腎細胞癌患者9例を浸透度別に検討すると、stage pT₁ pT₂ 3例の low stage 群のそれは、2%から31%まで分布しており、stage pT₃ pT₄ 6例の high stage 群のそれは2%から63%まで分布してい

Table 1. Detection of circulating immune complexes in sera of patients with urological carcinoma

Diagnosis	No. cases	No. positive	% positive	Circulating immune complexes (%) mean $\pm$ SD	Range (%)
renal cell carcinoma	9	3	33	14.3 ± 20.1	2—63
renal pelvic or ureter carcinoma	3	0	0	4.7 ± 4.6	2—10
bladder carcinoma	21	1	5	4.7 ± 4.4	0—21
prostatic carcinoma	16	3	19	8.9 ± 15.4	0—62

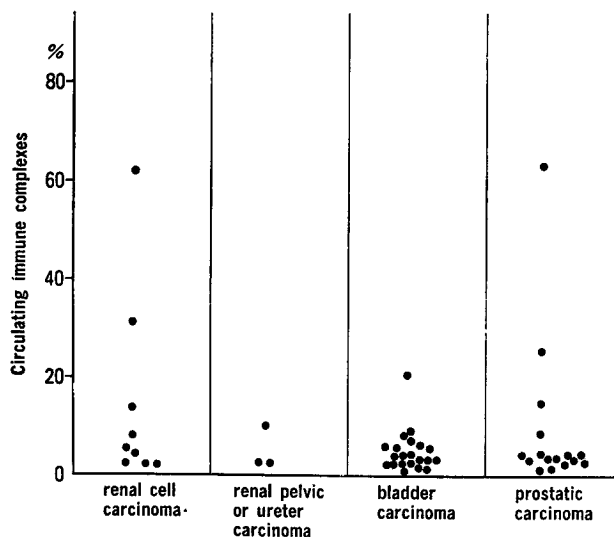


Fig. 4. Detection of circulating immune complexes in sera of patients with urological carcinoma

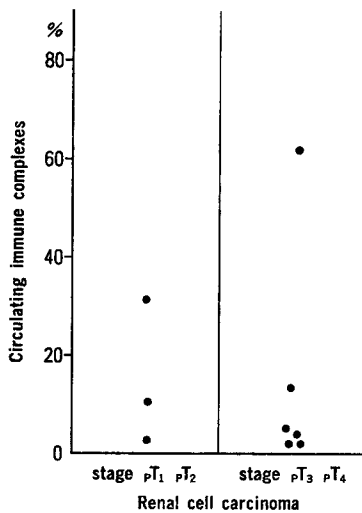


Fig. 5. Detection of circulating immune complexes in sera of patients with renal cell carcinoma

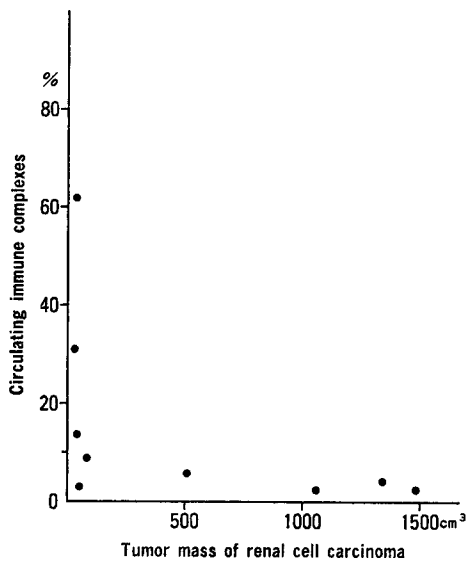


Fig. 6. Correlation between circulating immune complexes and tumor mass of renal cell carcinoma

た (Fig. 5). 前者では1例に異常値を認め陽性率は33%であり、後者でも2例に異常値を認め陽性率は33%であった。low stage 群3例の平均は $13.7 \pm 15.3\%$, high stage 群6例のそれは $14.8 \pm 23.9\%$ であり、健常人のそれと比較した場合にはいずれも有意の差を認めなかった。

さらに、腎細胞癌患者9例において、摘出標本の大

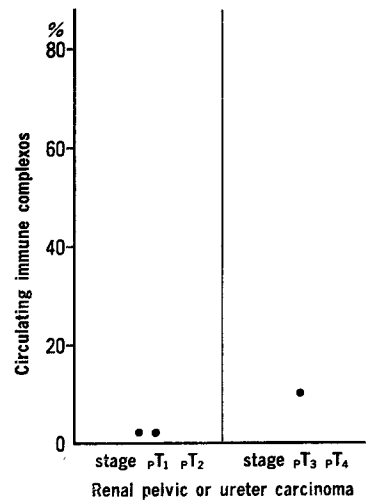


Fig. 7. Detection of circulating immune complexes in sera of patients with renal pelvic or ureter carcinoma

きさと CIC 値の関係を検討した (Fig. 6). CIC 値が63%、31%と高値を示した症例はそれぞれ 52.3 cm^3 , 11.8 cm^3 と比較的小さな腫瘍であった。摘出標本が $1,491.5 \text{ cm}^3$, $1,352.3 \text{ cm}^3$ と大きな腫瘍においては、それぞれ CIC 値が2%、4%と比較的低値を示した。

3) 腎盂尿管腫瘍患者

腎盂尿管腫瘍患者3例の CIC は2%から10%まで分布しており、1例も異常値を認めなかった (Fig. 4) 平均は $4.7 \pm 4.6\%$ であり、健常人のそれと比較した場合には有意の差を認めなかった。

つぎに、腎盂尿管腫瘍患者3例を浸達度別に検討すると、pT₁pT₂ 2例の low stage 群の平均は $2 \pm 0\%$, pT₃pT₄ 1例の high stage 群は10%であった (Fig. 7)。

4) 膀胱腫瘍患者

膀胱腫瘍患者21例の CIC は0%から21%まで分布しており、1例に異常を認め陽性率は4.8%であった (Fig. 4)。平均は $4.7 \pm 4.4\%$ であり、健常人のそれと比較した場合には有意の差を認めなかった。

つぎに、膀胱腫瘍患者21例を浸達度別に検討すると、stage pT₁ pT₂ 12例の low stage 群のそれは0%から5%まで分布しており、stage pT₃ pT₄ 9例の high stage 群のそれは1%から21%まで分布していた (Fig. 8)。前者では1例も異常値を認めず、後者では1例に異常値を認め陽性率は11.1%であった。low stage 群12例の平均は $2.9 \pm 1.6\%$ であり、high stage 群9例のそれは $7.0 \pm 5.8\%$ であり、健常人のそれと比

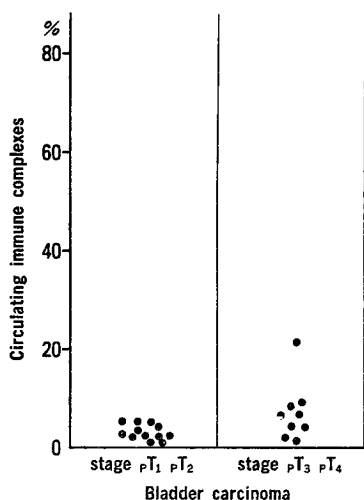


Fig. 8. Detection of circulating immune complexes in sera of patients with bladder carcinoma

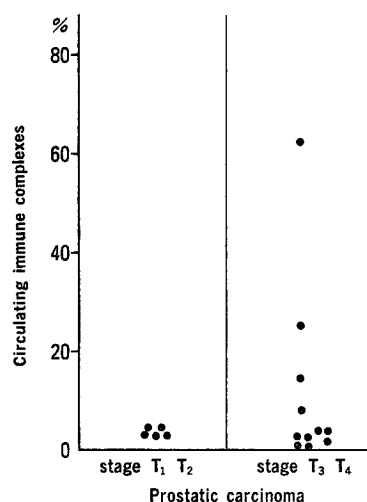


Fig. 9. Detection of circulating immune complexes in sera of patients with prostatic carcinoma

較した場合にはいずれも有意の差を認めなかった。

5) 前立腺癌患者

前立腺癌患者16例は CIG は 0%から62%まで分布しており, 3例に異常値を認め陽性率は18.7%であった (Fig. 4). 平均は $8.9 \pm 15.4\%$ であり, 健常人のそれと比較した場合には有意の差を認めなかった.

つぎに、前立腺癌患者16例を浸達度別に検討すると、stage T₁T₂ 5例の low stage 群のそれは3%から5%まで分布しており、stage T₃T₄ 11例の high stage 群のそれは0%から62%まで分布していた (Fig. 9)。前者では1例も異常値を認めず、後者では3例に異常値を認め陽性率は27.3%であった。low stage 群5例の平均は $3.4 \pm 0.6\%$ 、high stage 群11例のそれは $11.5 \pm 18.3\%$ であり、健常人のそれと比較した場合にはいずれも有意の差を認めなかった。

考 察

近年、泌尿器科領域でも疾患の活動性と Circulating Immune Complexes 値との関連性が報告され⁶⁻⁷⁾、また疾患の発生機序を説明する上で CIC が測定され、その意義が注目されてきている。

immune complexes は生体の防衛反応として形成され、ふつう網内系細胞や貪食作用のある細胞によって処理される。しかし、抗原刺激が持続性のときには immune complexes が大量に生じ、生体の処理能力を越えると糸球体、血管壁、結合織などに沈着してさまざまな障害をおこしてくることが予想される。

著者はポリエチレングリコール沈降物補体消費試験

により、泌尿器科領域の悪性腫瘍患者（腎細胞癌患者 9 例，腎盂尿管腫瘍患者 3 例，膀胱腫瘍患者 21 例および前立腺癌患者 16 例）の circulating immune complexes を測定した。

Circulating Immune Complexes の定量には多くの測定法が開発され、いずれの測定法にも一長一短があり優劣はつけがたい。たとえば、超遠心分析法⁹⁾やポリエチレングリコール沈殿法¹⁰⁾などの物理化学的性質を利用した測定法は immune complexes 以外の高分子物質の混入を除くことができない欠点があり、C₁q を用いる方法¹⁰⁾や Raji cell-radioimmunoassay¹¹⁾ など補体系を利用した測定法は IgA などの補体非結合の immune complexes を測定できない欠点がある。

ポリエチレングリコール沈降物補体消費試験は両者の方法を組合せた測定法であるが、やはり IgA などの補体非結合の immune complexes を測定できない欠点を有している。しかし、特殊な器具や材料を要せず、アイソトープを使用しない長所があり、手技が比較的簡便のためいずれの施設にそいても測定が可能である。

Circulating Immune Complexes の測定法や疾患の種類により陽性率は異なると思われるが、悪性腫瘍患者における CIC は上昇しているとの報告が多くみられる。最近、泌尿器科領域の悪性腫瘍患者における CIC の報告⁵⁻⁷⁾も散見されるが、Perce ら⁶⁾は C₁q-binding assay, double crossed immunoelectrophoresis, ポリエチレングリコール沈殿物, Raji

cell radioimmunoassay の4測定法により膀胱腫瘍患者78例について測定し、15%の陽性率を得ている。小林⁷⁾によれば、ポリエチレングリコール沈殿物補体消費試験により膀胱腫瘍患者37例を測定し、35%の高い陽性率を得たと報告しているが、著者の検討では膀胱腫瘍患者においては進行癌の1例のみ(陽性率5%)に陽性を認めた。さらに、腎盂尿管腫瘍患者においても陽性例は1例も認めなかった。それに比し、腎細胞癌患者および前立腺癌患者においてはそれぞれ33%、19%と比較的高い陽性率を認めており、同じ泌尿器科領域の悪性腫瘍患者といえど、疾患の種類により陽性率はかなり異なっていた。とくに、腎細胞癌患者においては low stage 群でも33%の陽性率を認めており、膀胱腫瘍に比し腎細胞癌には血中へ移行しやすく、生体に認識されやすい腫瘍特異抗原が存在するのかもしれない。いずれにしても腎や前立腺の実質臓器の癌の方が、膀胱や腎盂尿管のような尿路上皮の癌より CIG の陽性率が高かった。

悪性腫瘍患者や担癌マウスなどで blocking factor の存在が報告されており、blocking factor は circulating immune complexes である可能性が考えられている。さらに、blocking factor の存在は腫瘍の大きさや予後の悪さと相関すると報告されており¹²⁾ 著者は腎細胞癌患者9例について腫瘍の大きさと circulating immune complexes の関係を検討した。しかし、報告どおりの結果は得られず、腫瘍の増大とともに circulating immune complexes 値は増加せず、むしろ逆相関の傾向を腎細胞癌においては認められた。手嶋ら⁴⁾は免疫複合物を構成している抗原と抗体の比を測定値との関係を BSA、抗 BSA 抗体を用いて調べた結果、最適比よりやや抗原過剰域で最高の circulating immune complexes 値は低値を示し、抗原あるいは抗体の大過剰域の免疫複合物の circulating immune complexes 値は低値となると報告している。さらに、Heiderberger ら¹³⁾も抗原と抗体の量が均等の時点で immune complexes の形成が最大となり、どちらか片方が過剰になると immune complexes の解離を生じると報告している。これらの結果より、腎細胞癌は比較的早期に抗原が生体に認識されやすく、腫瘍が急速に増大するために抗原が過剰になりすぎて immune complexes が形成されても解離されることが推測される。

ここで言う immune complexes とは単一要素ではなく、多様性に富んでいるのであろうが、現行の immune complexes 証明法はどれも immune complexes を総括的にとらえられており、細分化さ

れていない。この点は将来の問題として残されているが、それでもこうして得られた immune complexes の値はある種の疾患の病態解明に大きな役割を果たすものと考えられる。

最後に、circulating immune complexes の変動が治療上のひとつの指標となりうるかどうかについては、今後治療前に比較的陽性率の高かった腎細胞癌患者および前立腺癌患者について検討していきたい。

結 語

- 1) ポリエチレングリコール沈降物補体消費試験により健康人18例、泌尿器科的良性疾患患者9例(腎のう胞患者3例、前立腺肥大症患者6例)および尿路性癌患者49例(腎細胞癌患者9例、腎盂尿管腫瘍患者3例、膀胱腫瘍患者21例、前立腺癌患者16例)における circulating immune complexes を測定した。
- 2) 健康人18例の CIG の平均は2.7%で、SD は±3.0%であり、この成績より2SD に近い10%以下を正常値とした。泌尿器科的良性疾患患者9例のそれは2.9±2.7%であり、いずれの症例も正常値であった。
- 3) 腎細胞癌患者9例の陽性率は33%、前立腺癌患者16例のそれは19%と比較的高値を示した。膀胱腫瘍患者21例の陽性率は5%と低く、さらに腎盂尿管腫瘍患者3例においては1例も陽性を認めなかった。
- 4) 腎細胞癌患者9例において、摘出標本の大きさと CIG 値の関係を検討した結果、両者の相関は得られずむしろ逆相関の傾向を認めた。

なお本論文の要旨は第33回日本泌尿器科学会中部連合総会にて発表した。

文 献

- 1) Cano PO, Jerry LM, Sladowski JP and Osterland CK: Circulating immune complexes in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 29: 197~204, 1977
- 2) Ramesh CG, Mcduffie KA, Huston KA, Jappeiner G, Meurer M, Jordon RE, Luthra HS, Hunder GG and Ilstrup D: Comparison of three immunoassays for immune complexes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 24: 433~439, 1979
- 3) Theroofilopoulos AN, Andrews BS, Urist M M, Morton DL and Dixon FJ: The nature of immune complexes in human cancer sera. J Immunol 119: 657~663, 1977

- 4) 手嶋秀毅・吾郷晋浩・友岡裕治・宮崎澄雄・平良雅裕・重松信昭・島巢要道：ポリエチレングリコール沈降物補体消費試験（PEG-CC）による circulating immune complexes (CIC) の定量と臨床応用. アレルギー 30: 59~61, 1981
- 5) 松田聖士・藤広 茂・蟹本雄右・栗山 学・河田幸道・西浦常雄：C₁q-Peroxidase を用いた血中免疫複合体の証明. 西日泌尿 42: 951~954, 1980
- 6) Perce AJ, Phillips TM, Ooi BS, Evans A, Shank RA III and Leuris MG: Immune complexes in transitional cell carcinoma. J Urol 123: 486~488, 1980
- 7) 小林克己：尿路悪性腫瘍患者の circulating immune complexes の検出とその変動および担癌患者末梢血リンパ球の cell-mediated cytotoxicity に及ぼす影響. 日泌尿会誌 74: 1674~1686, 1983
- 8) Franklin EC, Holman HR, Miller-Eberhard HJ and Kunkel HG: An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. J Exp Med 105: 425~438, 1975
- 9) Creighton WD, Lambert PH and Miescher PA: Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. J Immunol 111: 1219~1227, 1973
- 10) Agnello V, Winghester RJ and Kunkel HG: Precipitation reactions of the C₁q component of complement with aggregated -globulin and immune complexes in gel diffusion. Immunology 17: 909~919, 1970
- 11) Theofilopoulos AN, Wilson CB and Dixon FJ: The Raji cell radioimmunoassay for detecting immune complexes in human sera. J Clin Invest 57: 169~182, 1976
- 12) Hellström KE and Hellström I: Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. Adv Immunol 18: 209~217, 1974
- 13) Heiderberger M: Lectures en immunochemistry. P.15~72, Academic Press, New York, 1956

(1984年4月27日受付)