

膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究

第6報：患者末梢血中の T_H 細胞画分の変動について

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
川喜多順二・前川正信STUDIES ON THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN
PATIENTS WITH URINARY BLADDER CARCINOMAVI. EVALUATION OF T_H CELL POPULATION
IN PERIPHERAL BLOOD

Shoichi NISHIO, Shinichi IKEMOTO,

Yukichi OZAKI, Seiji WADA,

Junji KAWAKITA and Masanobu MAEKAWA

From the Department of Urology, Osaka City University Medical School

(Chairman: Prof. M. Maekawa, M.D.)

Non-specific cellular immunity is depressed in patients with urinary bladder carcinoma. Various immunotherapies have not been very effective against carcinoma even when tumor antigenicity is demonstrated. Therefore there might be some factors suppressing the immune reaction between the tumor and the resistance of the host. Two factors, cellular and humoral, have been suggested to inhibit the immune response of tumor-bearing patients.

We studied the lymphocyte subset (IgG-Fc receptor-positive T lymphocyte, T_H cell) of 45 patients with urinary bladder carcinoma and 12 age-matched control subjects to examine the cellular factors. This subset was identified by means of double rosette formation with sheep erythrocytes and Sc-γ particles. There was a tendency of increase in percentage of T_H cells in the patients with a higher grade and stage of tumor. After removal of the tumor, the percentage of T_H cells was significantly decreased in the higher grade and stage groups, but it was unchanged in lower grade and stage groups. Immunotherapy with NK-421 or OK-432 also reduced the T-cell population to normal. However, whether this lymphocyte functioned as a helper T cell or suppressor T cell is not clear.

Key words: Bladder carcinoma, T_H cell, Rosette formation, NK-421

緒 言

多くの癌患者においては生体の防禦機能が低下する
場合が多く、とくに進行癌患者では著明であるとされ
ている。その要因の1つとして担癌患者の免疫能の
低下が考えられている¹⁻³⁾。著者はこれまで膀胱癌患
者に関しておもに細胞性免疫能の面より研究してきた

が^{4,5)}、生体の反応を全体的に考えると免疫担当細胞
が弱化する場合と、免疫反応を阻害あるいは抑制する
因子の出現が考えられる⁶⁾。今回は免疫抑制細胞ある
いは killer 細胞の1つとされている IgG Fc receptor
陽性T細胞（以下 T_H 細胞と略す）の画分（%）を膀
胱癌患者を対象としてその悪性度別、深達度別あるい
は手術前後における変動に関して検討した。

対象症例および方法

今回対象とした症例は手術目的にて当泌尿器科に入院した膀胱癌患者45例で、男子34例、女子11例、平均年齢63.8歳である。組織学的にはすべて移行上皮癌で癌の悪性度 (grade)、深達度 (stage) は膀胱癌取扱い規約⁷⁾に基づいて判定した。なお制癌剤の投与を受けた症例や放射線治療をおこなった症例は含まれていない。また対照として age match した泌尿器科的良性疾患12例 (前立腺肥大症3例、腎結石3例、副睾丸炎2例、尿道カルンケル2例、腎のう胞1例、水腎症1例で男子7例、女子5例、平均年齢61.7歳) を選んだ。

T_H 細胞の測定方法は JIMRO S-1 キット (日本抗体研究所) を用いた。まず、ヘパリン加末梢血 2 ml を採取しこれに PBS 2 ml を加え倍量としたものを Ficoll-Conray 法を用いてリンパ球の rich fraction をうる。ついで PBS にて3回洗浄し、適当量の PBS にて 1×10^6 cells/ml に調整する。いっぽう、ノイラミニダーゼ処理した羊赤血球 (E) と抗体 (IgG) 感作 SC (SC- γ , antibody (IgG) immunoconjugated *Saccharomyces cerevisiae*) を混合しておく。ついで先のリンパ球浮遊液をマイクロプレートの各 well に 1μ l づつ分注し 400 g, 5 分間遠沈して one layer に付着させる。これに FCS 4 μ l を加え室温にて30分間放置したのち E, SC- γ 混合液 4 μ l を加える。37°C にて60分間静置し反応させたのち 100 g, 5 分間遠沈し、ついでプレートを反転 (60分間放置)、浮遊した細胞を PBS にて洗浄除去する。つぎに各 well 底に付着した細胞にペルオキシダーゼ染色を施し、水中にてプレートを注意深く洗浄したのちクリスタルバイオレットにて染色し検鏡する。観察される細胞には E ロゼット形成細胞 (E-RFC), SC- γ ロゼット形成細胞 (SC- γ -RFC), E と SC- γ のダブルロゼット形成細胞 (E and SC- γ -RFC) および Non-EFC が含まれるが、E あるいは SC- γ が3個以上結合した細胞をロゼット形成細胞とする。また単球は SC- γ とロゼットを形成するが、ペルオキシダーゼ染色にて褐色に染まるので細胞カウント時、単球を除外してカウントできる。総細胞数 300 個以上をカウントし次式によって T_H (%) を算出した。

$$T_H (\%) = \frac{\text{Double-RFC}}{\text{E-RFC} + \text{Double-RFC}} \times 100$$

なお採血は術前および術後 3 ~ 4 週目におこない手術前後における比較は paired *t*-test にて処理した。

成 績

1) 対照群と患者群における T_H 細胞画分の比較

Fig. 1 は対照群 12 例、術前膀胱癌患者 45 例における末梢血 T_H 細胞画分の比較を示す。対照群の平均値

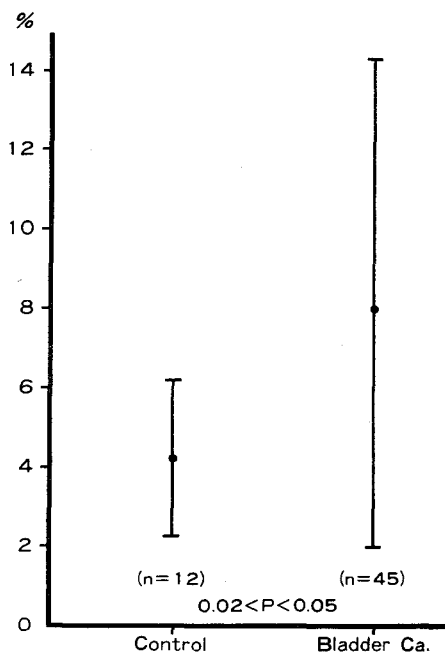


Fig. 1. Comparison of T_H cell population between control subjects and patients with bladder carcinoma.

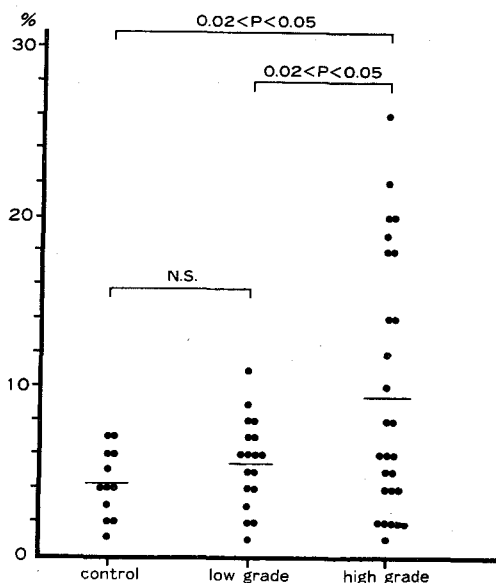


Fig. 2. Comparison of T_H cell population in control subjects and low or high grade bladder carcinoma patients.

4.25%に対して患者群は8.0%で有意差 ($0.02 < P < 0.05$) をもって増加している。Fig. 2 は対照群, low grade 群 (G0, 1) および high grade 群 (G2, 3) の2者間における T₇ 細胞画分を比較したもので、対照群と low grade 群の間には差を認めないが、high grade 群は対照群および low grade 群より有意に増加している ($0.02 < P < 0.05$)。同様に癌深達度の別でも比較したところ Fig. 3 に示すとおり high stage 群 (pT3-pT4) は対照群および low stage 群 (pTa-pT2) に比較して有意に増加している ($0.001 < P < 0.01$)。

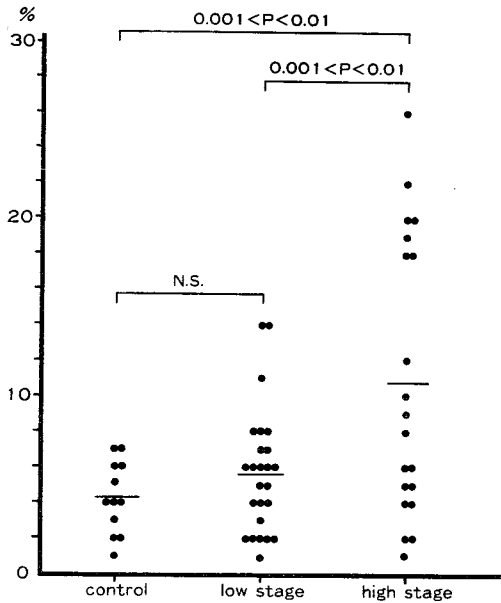


Fig. 3. Comparison of T₇ cell population in control subjects and low or high stage bladder carcinoma patients.

2) 手術前後における T₇ 細胞画分の変動

今回対象とした45症例はすべて何らかの手術をうけている。その内訳は膀胱全摘除術21例, TUR 15例, 膀胱部分切除術7例, 腫瘍単純切除術2例であった。Table 1 は手術前後における T₇ 細胞画分を検索しえた44例全体の変化を示す。術前の平均値8.0%である

Table 1. Comparison of T₇ cell population (%) in patients with bladder carcinoma before operation

	before	after
N	44	44
Mean	8.00	5.71
SD	6.29	3.88
SE	0.93	0.57

paired t-test, $0.001 < P < 0.01$

のに対して術後は5.7%と有意差をもって低下している ($0.001 < P < 0.01$)。しかし grade 別および stage 別に分けてそれぞれ検討すると、まず Fig. 4 は low grade 群の手術前後の比較であるが、とくに差は認めていない。しかし high grade 群でみると Fig. 5 に示すとおり術前に比して術後の T₇ 細胞は著明に低下している ($0.001 < P < 0.01$)。同様に stage 別に分け

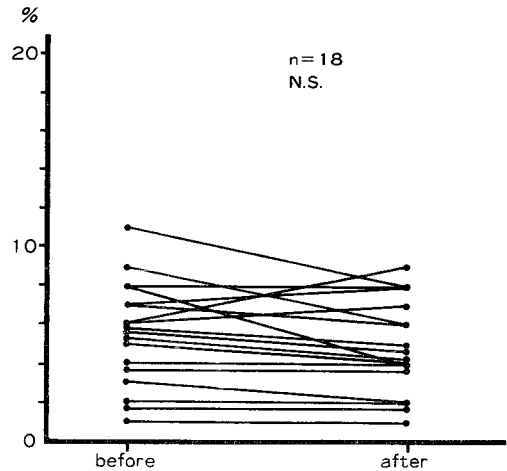


Fig. 4. Comparison of T₇ cell population in low grade bladder carcinoma patients before and after operation.

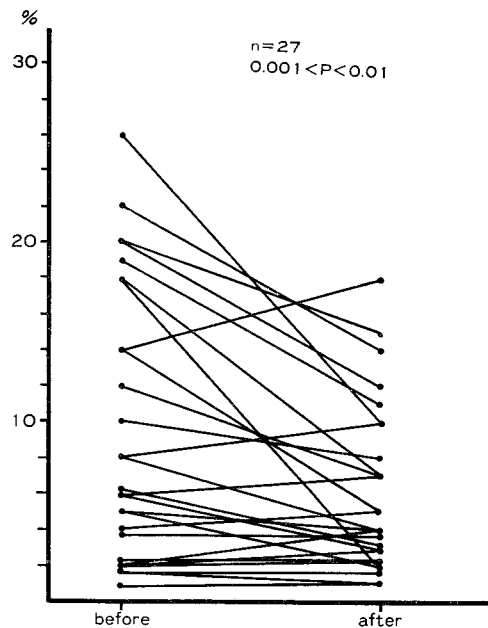


Fig. 5. Comparison of T₇ cell population in high grade bladder carcinoma patients before and after operation.

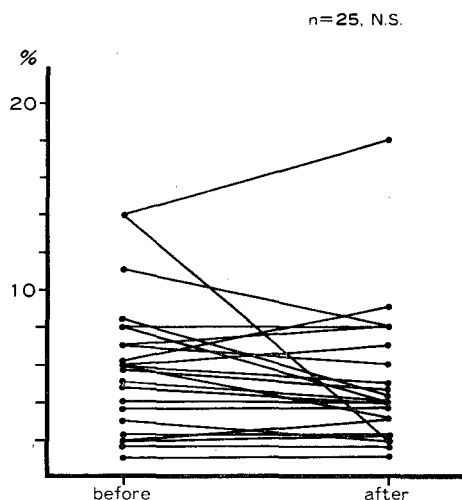


Fig. 6. Comparison of T_7 cell population in low stage bladder carcinoma patients before and after operation.

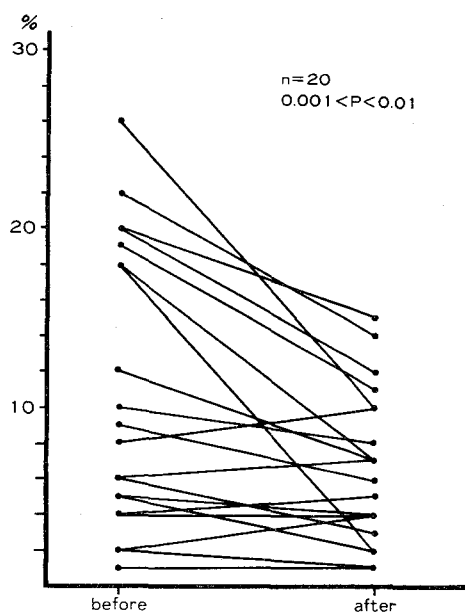


Fig. 7. Comparison of T_7 cell population in high stage bladder carcinoma patients before and after operation.

て検討すると Fig. 6, 7 に示すとおり low stage 群では術前・術後において差を認めないが, high stage 群では術後において有意に低下している ($0.001 < P < 0.01$). すなわち癌の悪性度および深達度の高いものほど, 手術による T_7 細胞画分へ与える影響は大きく, 低下させる傾向にあった。

3) 免疫療法による T 細胞画分の変動

Fig. 8 は *Streptomyces olivoreticuli* の培養濾液より

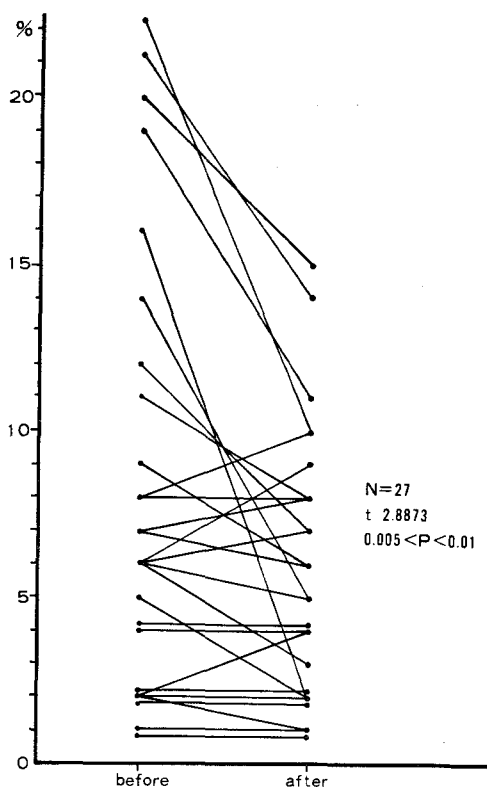
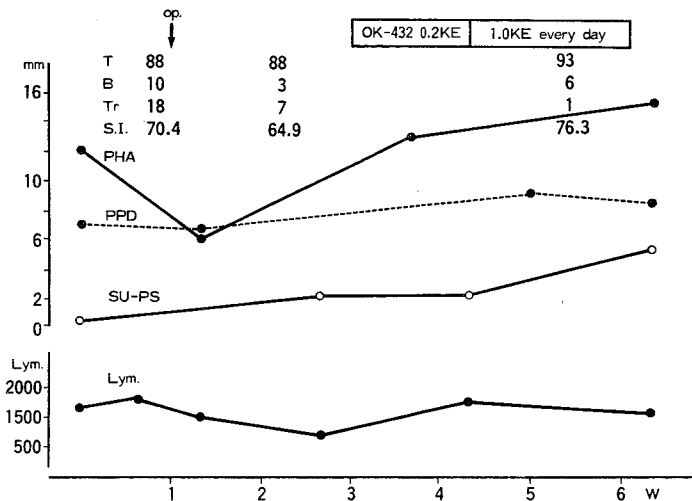


Fig. 8. Comparison of T_7 lymphocyte population before and after NK-421 administration (30 mg/d).

得られた微生物の代謝産物で, leucine aminopeptidase や aminopeptidase B に対する阻害物質 (NK-421) を膀胱癌患者 27 例に連日 30 mg 経口投与した場合の細胞画分に与える効果を検討したものである。投与期間は 2~3 週間であるが, 投与前に比して投与後は著明に低下する症例が認められ, とくに 6 例ではあるが投与前に異常値 (6.0%以上) であったものが投与後に正常値 (2~6%) に改善した。全体的にみても有意差 ($0.005 < P < 0.01$) をもって投与後に低下している。また Fig. 9 は進行膀胱癌症例の術後における OK-432 全身投与例で, 各種免疫学的パラメータを示すが T 細胞画分は術前に 18% であったものが術後は 7% に低下している。その後, OK-432 投与後はさらに低下し 1% となっている。このように免疫療法にて T_7 細胞画分が変動 (低下) する症例が認められた。

考 察

癌細胞は本来自己の体細胞であるもののひとつ癌としての発育方向をとると, 宿主のコントロールを越えて独自の発育をする。いっぽう癌組織の周辺には外

Fig. 9. Case 1. I.M. 68 y.o. male Bladder ca. (T₄ N₁ M₀).

来の異物を処理したり、免疫学的機能を有するマクロファージやリンパ球系の細胞集合が癌の種類を問わずしばしば認められる⁸⁻¹⁰⁾。このような点より癌細胞はもともと self として認識されていたものが not self として認識されるようになった状態とも考えられる。したがって宿主には癌に対する防禦作用が存在すると考えられる一方、癌にはもともとの細胞にはなかった抗原が出現、形成されるものと考えられ、宿主側および癌細胞側の両面において研究がなされた結果、担癌生体の免疫能（とくに細胞性免疫能）は低下していることが多くの臨床癌でも認められている¹⁻⁴⁾。また、動物実験より癌特異的抗原の存在が認められ^{11,12)}、一部の臨床癌でも癌関連抗原としてその存在が確認されている^{13,14)}。したがって癌患者の中には癌に対する特異的免疫反応によって癌を排除できるものが出現してもよいのであるが実際にはこのような現象はほとんど認められない。また現在広くおこなわれている免疫療法も一時的な効果は得られても癌が退縮することはきわめて稀である。したがって癌と宿主防禦作用の間にこの両者の反応を阻害あるいは抑制する因子の存在が考えられ、実験的に証明されている¹⁵⁾。このような抑制因子は血清側、細胞側いずれにも存在するとされており、何種類かは明らかにされている⁶⁾。そこで今回私どもは膀胱癌患者を対象として免疫抑制性T細胞ともキラーT細胞とも考えられている T_r 細胞について癌の進行度、手術、免疫療法との関連において検討した。T_r 細胞は IgG の Fc 部分に対する receptor を持つ細胞群で、その検出方法には羊赤血球および IgG 抗体感作 ニワトリ赤血球によるダブルロゼット形成法¹⁶⁾や羊血球と抗体感作ウシ赤血球とのダブルロ

ゼット形成法などが報告されているが^{17,18)}、私どもはマイクロテストプレートを用い羊赤血球と抗体感作 Sc とによるダブルロゼット形成法にて測定した。

本方法はマイクロテストプレート上にリンパ球を付着させることで安定化し、微量のサンプルで測定可能であり、E-rosette forming cell, T_r cell, Sc-γ-rosette forming cell, Non-rosette forming cell, monocyte が同時に観察できる利点を有している。

1. 癌の進行度と T_r 細胞画分について

膀胱癌患者は対照群に比して T_r 細胞画分の明らかな上昇を認めたものの、low grade 群で異常値を示したものは18例中6例（33.3%）で、low stage 群では25例中8例（32.0%）であった。ところが high grade 群では27例中13例（48.1%）が、high stage 群では20例中11例（55.0%）が異常値を示していた。推計学的にも high grade, high stage 群は対照群より有意に上昇していた。すなわち、膀胱癌患者では癌の悪性度、深達度の高い症例において T_r 細胞画分は上昇する傾向にあるといえる。このことは T_r 細胞を免疫抑制性T細胞と考えるなら生体にとって不利な条件になるわけであるが、進行癌患者における一連の免疫学的パラメータの低下ならびに免疫療法の進行癌患者における効果が弱小であることを考え併せると理論的には納得できると考えられる。しかし T_r 細胞をキラーT細胞の1つと考えるなら進行癌患者における抗腫瘍性の1つの表現とも思われるが免疫学的パラメータの低下が示すように他の抗腫瘍性を有する細胞の減少、減弱が強いため抗腫瘍能力としては低くなるといわざるをえない。また腫瘍抗原の純粋な抽出が不可能な現時点では腫瘍組織から 3 M KCl を用いた抽出物や、

それを Sephadex など各種のカラムを用いて画分したのについて抗原性の検討がおこなわれているが¹³⁾, 動物実験による解析では癌抗原性物質と考えられているもののうちある種のものは宿主に免疫抑制因子を増大させる方向に反応が進み, 生体に不利な反応を惹起させ, 別の抗原性物質は宿主に抗腫瘍性を発揮させ, いわゆる生体にとって有利な免疫反応を惹起するといわれている¹⁵⁾. このように抗癌原には宿主にとって不利な面と有利な面の両方の反応を引き起す可能性がある.

今回の私どもの結果のみでは明らかなことは言えないにしても, 臨床的に癌が進行した状態において T_H 細胞画分が増加していることは癌対宿主抵抗性の関係が癌の量的増加のためアンバランスとなり T_H 細胞が増加しているものと推測される. しかし T_H 細胞の生体に対する作用が有利 (キラー T 細胞) なのか不利 (抑制性 T 細胞) なのか不明であるため, つぎに癌組織を除去あるいは減少させた場合の T_H 細胞の変動を検討した.

2. 手術前後における T_H 細胞の変動について

手術操作により生体の細胞性免疫能は一時的に低下するといわれている. したがって今回の採血時期は術後 3~4 週間経過したのちにおこない, その間に制癌剤や免疫賦活剤, ステロイドホルモン剤を投与された症例は除外した. 膀胱癌症例全体と比較すると Table 1 に示したとおり術前の T_H 細胞 8.0% に対して, 術後は 5.7% と約 30% 低下する結果であったが, これを癌の悪性度, 深達度の強さに分けて分析すると Fig. 4, 6 に示したとおり low grade 群および low stage 群においては手術前後における T_H 細胞の変動はほとんど認められず, それぞれの手術前値は対照群とも差を認めていない. いっぽう high grade 群, high stage 群では Fig. 5, 7 に示すとおり術前に比して術後は有意差をもって低下しており, とくに術前値が 10% 以上であった症例は術後に著明な減少を示していた. したがって異常高値を示す場合は癌組織の除去によって T_H 細胞の減少 (正常化) がみられるものの, もともと正常値に近い症例ではその影響がほとんど認められないといえる.

以上のことより, 癌組織の除去→ T_H 細胞画分の正常化→細胞性免疫能の改善(?) をきたすように考えられ, T_H 細胞は抑制性 T 細胞であった方が都合よいように思われる. しかしながら症例によっては Fig. 9 に示したように術後の T_H 細胞画分が低下しても他の免疫学的パラメータ (S.I., リンパ球数, PPD 皮内反応など) はほとんど変化しなかったり, あるいは逆に低

下する場合がある. このように T_H 細胞は抑制性 T 細胞とも考えがたい. とくに T_H 細胞の検出方法が細胞表面の IgG Fc receptor を目標にしているのでは癌組織由来の物質が Fc レセプターに作用して見かけ上 T_H 細胞が変動しているにすぎないともいえる. 同様なことが免疫療法を施行した場合にもいえる. Fig. 8 は術前の患者に NK-421 を投与した場合の T_H 細胞画分の変動を検討したものであるが, 投与前に異常高値を示した症例では投与後に著明に低下する傾向にあった. この場合も必ずしも S.I. など他のパラメータの変動と平行するとは言えず, NK-421 は細胞表面のマーカーに何らかの変化をおよぼしたにすぎないと考えられる.

したがって T_H 細胞画分の変動は生体に加えた手術や免疫療法の効果をみる 1 つの指標にはなりうるが, それが生体にとって有利なる変化なのか, 不利なる変化なのかは断定できないと考えている. 今後はさらに症例を重ねて検討するいっぽう, T_H 細胞が B リンパ球の抗体産生能に与える影響など細胞相互の反応を利用して T_H 細胞の働きを検討していく予定である.

ま と め

- 1) 膀胱癌患者 45 例, 対照群 12 例について末梢血中の T_H 細胞画分を測定した結果, 膀胱癌患者の T_H 細胞画分は対照群に比して有意差をもって増加していた.
- 2) 手術前後で比較すると high grade 群ならびに high stage 群では術後の T_H 細胞画分は術前に比して著明に低下するものの low grade 群および low stage 群では手術の影響はほとんど認められなかった.
- 3) 免疫療法を施行した場合は T_H 細胞画分異常高値を示す症例は免疫療法後低下するものが多く認められた.
- 4) 以上の結果より T_H 細胞画分の変動は 1 つの免疫学的パラメータと考えられるが, この細胞の増減が生体にとって有利なのか不利なのかは今後の課題である.

本論文の要旨は第 18 回日本癌治療学会総会において発表した.

文 献

- 1) Kikuchi K, Kanaya T, Yamaoka H, Suzuki T, Ishii Y: Lymphoblastogenesis with phytohemagglutinin, local response of mononuclear cells and prognosis of cancer patients. *Tumor Res* 10: 12~19, 1975

- 2) 漆崎一郎：癌患者の免疫能. 癌の臨床 **24**: 378~385, 1978
- 3) 矢田健太郎・中山拓郎・曾根三郎・佐々木春夫・螺良英郎：がん患者の免疫学的パラメーター. 臨床免疫 **13** (suppl. 3): 41~47, 1981
- 4) Nishio S, Horii A, Morikawa Y, Kawakita J, Nishijima T, Kishimoto T, Maekawa M: Studies of the nonspecific cellular immune response in patients with urinary bladder carcinoma. I. PHA-induced lymphocyte transformation. Invest Urol **16**: 336~341, 1979
- 5) Nishio S, Horii A, Morikawa Y, Kawakita J, Nishijima T, Kishimoto T, Maekawa M: Studies of the nonspecific cellular immune response in patients with urinary bladder carcinoma. II. Immunodepressive effect of sera from bladder carcinoma. Invest Urol **16**: 342~345, 1979
- 6) 石谷邦彦：血清の免疫抑制物質の測定. 臨床免疫 **13** (suppl. 3): 297~305, 1981
- 7) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編. 膀胱癌取扱規約, 第1版, 金原出版東京, KK, 1980
- 8) Black MM, Speer FD, Opler SR: Structural representation of tumor-host relationship in mammary carcinoma. Biologic and prognostic significance. Am J Clin Path **26**: 250~265, 1956
- 9) Grumstedt B, Wahlquist L: Prognostic significance of clinical, angiographic and histological findings in renal carcinoma. Scand J Urol **3**: 117~127, 1969
- 10) 井関達男・山本啓介・西尾正一・前川正信・安本亮二・松村俊宏・辻田正昭：膀胱腫瘍の病理組織学的研究. 第1報, 間質反応の臨床的意義. 日泌尿会誌 **72**: 1138~1144, 1981
- 11) Foley EJ: Antigenic properties of methylcholanthrene induced tumor in mice of the strain of origin. Cancer Res **13**: 835~837, 1953
- 12) Prehn RT, Main JM: Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. J Natl Cancer Inst **18**: 769~778, 1957
- 13) Grosser N, Thomson DMP: Cell-mediated anti-tumor immunity in breast cancer patients evaluated by antigen-induced leukocyte adherence inhibition in test tubes. Cancer Res **35**: 2571~2579, 1975
- 14) 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
- 15) 藤本重義：腫瘍免疫における抑制性T細胞. 癌と化学療法 **7**: 901~908, 1980
- 16) 新保敏和・矢田純一・中川俊郎・漆畑修・松元正：ヒト IgG Fc receptor 陽性Tリンパ球の検出法と各種疾患における変動. 臨床免疫 **9**: 141~145, 1977
- 17) 中山拓郎・中井美智代・清水英治・仁井昌彦・田村正和・佐々木春夫・久野悟郎・小川紘一・螺良英郎：各種疾患における T_H 細胞の変動および治療の影響. 臨床免疫 **6** (suppl. 2): 231~237, 1979
- 18) 畠谷昇：膀胱腫瘍患者の IgG Fc receptor 陽性T細胞について. 泌尿紀要 **27**: 637~647, 1981
(1982年1月13日受付)