

膀胱腫瘍患者における ADCC 活性について

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・石山 俊次
藤本 佳則・伊藤 康久・村中 幸二
説田 修・栗山 学・河田 幸道
西 浦 常 雄ANTIBODY DEPENDENT CELL-MEDIATED CYTOTOXICITY (ADCC)
IN PATIENTS WITH URINARY BLADDER CANCERShunsuke SAKAI, Naoki KATO, Shunji ISHIYAMA,
Yoshinori FUJIMOTO, Yasuhisa ITO, Koji MURANAKA,
Osamu SETSUDA, Manabu KURIYAMA, Yukimichi KAWADA
and Tsuneo NISHIURA*From the Department of Urology, Gifu University School of Medicine
(Director: Prof. T. Nishiura)*

K cell population, a parameter of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) activity, was determined in patients with urinary bladder cancer, urological benign diseases and in normal subjects by the microplate technique using an antibody concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, lymphocyte concentration of 2×10^6 cells/ml and incubation time of 3 hours.

The K cell population of peripheral lymphocytes was $4.7 \pm 2.0\%$ in 14 patients with urinary bladder cancer, $6.7 \pm 2.0\%$ in 7 patient with urological benign disease and $7.5 \pm 1.5\%$ in 6 normal subjects. The K cell population in patients with high stage bladder cancer was significantly higher than those with low stage cancer.

The K cell population in both high and low stages bladder cancer was not changed after removal of the tumor. ADCC activity did not reflect the immune state of cancer patients during the pre- and postoperative courses.

Key words: ADCC, Bladder Cancer

結 言

癌患者の治療をおこなうにあたっては免疫機能に対する考慮が必要であり, そのため生体の免疫機構の把握が問題となる. 免疫機構の中心はリンパ球により営まれ, リンパ球には T-cell, B-cell, NK cell, K cell などの subpopulation の存在が知られている. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) は抗体により感作された標的細胞と Fc レセプターをもつ作動細胞との結合により生ずる細胞障害現象で, ADCC 活性を有する細胞としてはリンパ球のほかには好中球, 単球, マクロファージの存在があ

る.

近年, リンパ球の中で K cell は IgG 抗体の存在下に標的細胞を障害する ADCC の担い手として注目を集めている. 今回, ADCC の測定法に関する基礎的検討をおこなうと同時に, 膀胱腫瘍患者における末梢血のリンパ球の ADCC 活性を測定し, 泌尿器科的良性疾患患者および健常人と対照として比較するとともに, 深達度および治療による推移についても検討を加えた.

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関連病院泌

尿器科を受診した膀胱腫瘍患者14例で、対照群として age match した泌尿器科的良性疾患患者7例（前立腺肥大症患者4例、尿路結石症患者3例）、健常人6例についても検討を加えた。膀胱腫瘍は組織学的にはすべて移行上皮癌であり、癌の深達度は U.I.C.C. の分類にしたがって分類した。pT₁・pT₂ の low stage 群は6例であり、pT₃・pT₄ の high stage 群は8例であった。なお、全症例とも制癌剤、ステロイドホルモン剤の投与および放射線治療はおこなわれていない。

ADCC 活性の測定は、銭谷ら¹⁾により開発された ADCC Assay Kit（日本抗体研究所）を用いておこなった。K cell population の検出方法において、リンパ球の分離調整はヘパリン加末梢血 3 ml に 5% ミリカ懸濁液 0.3 ml を添加し 37℃ にて 1 時間 incubation した。Ficoll-Conray 法にてリンパ球を分離し、PBS にて 2 回洗浄後、Fetal Calf Serum を 10% 浮遊させた Hepes 加 RPMI 1640 にて 2×10^6 cells/ml に調整しておいた。標的細胞とした羊赤血球は PBS にて 2 回洗浄後、PBS にて 1×10^6 cells/ml に調整浮遊し Poly-L-Lysine 処理したマイクロプレートの各孔に 10 μ l ずつ滴下し、プレートを 1500 回転にて 10 分間遠心した。PBS 中にプレートを反転させて各孔の余分な羊赤血球を除去させ羊赤血球の monolayer を作製した。調整したリンパ球浮遊液に同量の 50 μ g/ml 抗羊赤血球家兎血清 IgG を加え、これをマイクロプレートの各孔の monolayer 上に 2 μ l ずつ添加後、37℃ にて 3 時間 incubation した。incubation 後、1% Sea Plaque Agarose を加えた 0.25% Glutaral Dehyde と 0.0003% Brilliant Cresyl Blue の混合液で固定染色し、各孔の plaque-forming cell の数とそれ以外のリンパ球数を求め、それらより plaque-forming cells の割合を求め K cell を同定した。

さらに健常人において、リンパ球数 2×10^6 cells/ml における抗羊赤血球家兎血清 IgG 濃度と plaque-forming cells の割合の関係、抗羊赤血球家兎血清 IgG 50 μ g/ml におけるリンパ球数と plaque-forming cells の割合の関係、抗羊赤血球家兎血清 IgG 50 μ g/ml における incubation 時間と plaque-forming cells の割合についても検討を加えた。

なお、各測定値の群別比較は原則として、t 検定による推計学的検討によって有意差の有無を検定し、有意水準は 5% とした。

成 績

Fig. 1 は健常人 1 例において、リンパ球数 2×10^6 cells/ml での抗羊赤血球家兎血清 IgG の濃度と plaque-forming cells の割合の関係を示しており、抗体濃度が 30 μ g/ml より安定を示し始め、70~80 μ g/ml まで安定化傾向が認められる。100 μ g/ml の抗体濃度ではやや不安定になることより、30~80 μ g/ml の抗体濃度が至適と考えられた。Fig. 2 は健常人 3 例において、抗羊赤血球家兎血清 IgG 50 μ g/ml でのリンパ球と plaque-forming cells の割合の関係を示しており、リンパ球数の変化においても plaque-forming cells の割合は 5~10% の間に認め、リンパ球数の変動には左右されず一定値を示した。Fig. 3 は健常人 3 例において、抗羊赤血球家兎血清 IgG 50 μ g/ml での incubation 時間と plaque-forming cells の割合の関係を示しており、1 時間の incubation では plaque-forming cells の割合が低値を示すものの、2 時間以降においては一定値を示した。

以上の結果より、前述の測定法にて安定した ADCC 活性の成績が得られるものと考えられた。

膀胱腫瘍患者 14 例における K cell の population の平均は $4.7 \pm 2.0\%$ であり、そのうち最高値を示す症

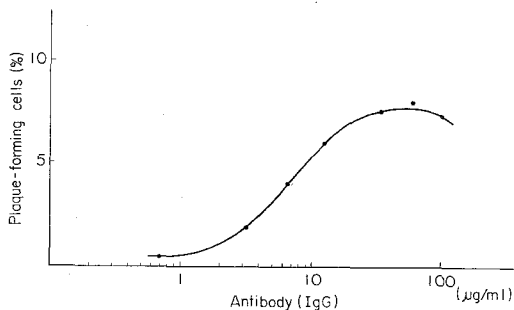


Fig. 1. Correlation between antibody (IgG) and plaque-forming cells (%)

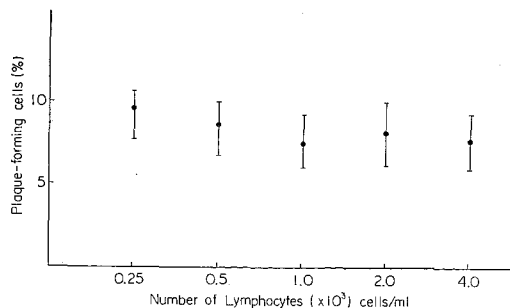


Fig. 2. Correlation of number of lymphocytes and plaque-forming cell (%) at IgG 50 μ g/ml

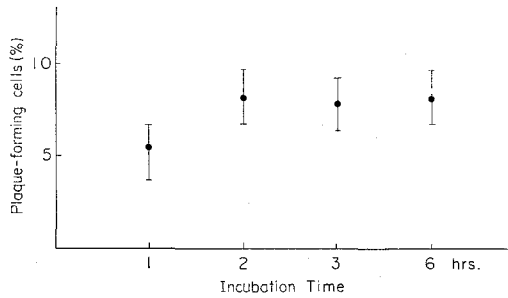


Fig. 3. Correlation between incubation time-course and plaque-forming cell (%) at IgG 50 µg/ml

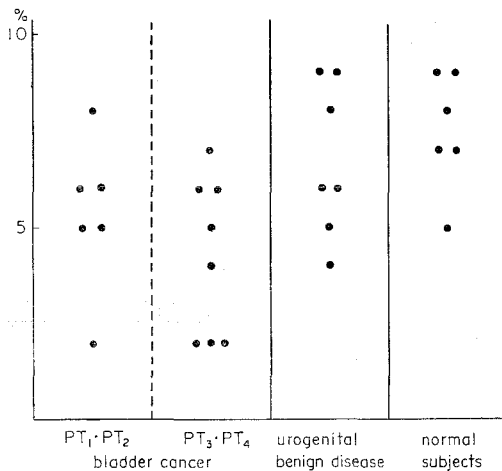


Fig. 4. Comparison of K cell population in low or high stage bladder cancer patients, urogenital benign disease patients and normal subjects

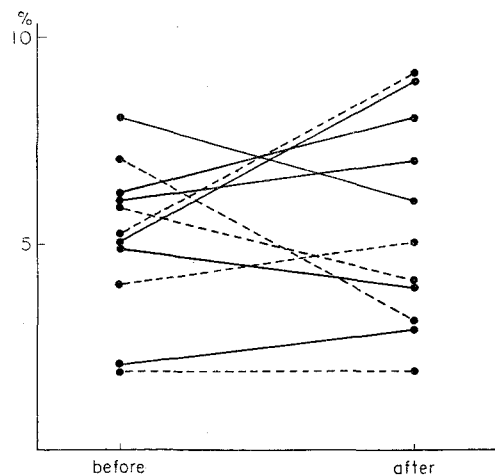


Fig. 5. Comparison of K cell population of bladder cancer patients before and after operation
— low stage high stage

例は8%であり、最高値を示す症例は2%であった。いっぽう、泌尿器科的良性疾患患者7例の平均は $6.7 \pm 2.0\%$ であり、健常人6例の平均は $7.5 \pm 1.5\%$ であった。すなわち、膀胱腫瘍患者14例における K cell の population は泌尿器科的良性疾患患者および健常人のそれと比較して、それぞれに有意の差を認めた ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (Fig. 4)。

膀胱腫瘍患者14例における深達度別検討では、low stage 群である pT₁・pT₂ 6例の平均は $5.3 \pm 2.0\%$ であるのに対し、pT₃・pT₄ 8例の high stage 群の平均は $4.3 \pm 2.1\%$ を示した。膀胱腫瘍患者の high stage 群は low stage 群に対してより低値を示すものの有意の差は認めなかった。しかし、high stage 群は泌尿器科的良性疾患患者および健常人と比較した場合にはそれぞれ有意の差を認めた ($P < 0.01$, 0.01)。low stage 群における同様の検討ではいずれも有意の差を認めなかった (Fig. 4)。

膀胱腫瘍患者の11症例について、それぞれの手術前後の K cell population の変動を検討した。治療法のうちわけは膀胱全摘術2例、膀胱部分切除術9例であり、術後の測定は全症例とも約3週間目におこなった。術前の K cell population の平均は $4.9 \pm 1.9\%$ であるのに対し、術後のそれは $5.2 \pm 2.7\%$ と高値を示したが有意の差は認められなかった。深達度別の検討では、low stage 群は術前 $5.3 \pm 2.0\%$ が術後に $6.2 \pm 2.3\%$ と高値を示したものの有意の差は認められず、high stage 群では術前 $4.8 \pm 2.0\%$ が術後に $4.6 \pm 2.5\%$ となり術後に低値を示した。

考 察

Perlmann ら^{2,3)}の研究により ADCC 活性が腫瘍免疫、自己免疫、移植免疫に関与していることがわかり、IgG 抗体を介する ADCC 活性は生体の重要な免疫反応の1つとして注目されるようになった。

ADCC 活性の従来の測定法は ⁵¹Cr release 法や培養細胞の遊離により判定する細胞計測定法がみられるが、これらの測定法はアイソトープを使用したり、培養細胞を用いるために無菌的操作を要するなど非常に繁雑であった。1975年、Bibelfeld ら⁴⁾は Poly-L-Lysine で coating した petri dish に羊赤血球の単層を作製し、抗体とリンパ球を滴下して plaque の形成を測定した。さらに、1979年、銭谷ら¹⁾は petri dish のかわりにマイクロプレートをもちいて、K cell population を簡便に同定できる方法を報告した。この測定法はマイクロプレートを用いるために、作動細胞の plaque 形成能を鏡検下に測定できる利点

がある。さらに、著者の検討でも認められたごとく、抗体濃度が一定の範囲内であれば安定した plaque-forming cells の割合が得られること、plaque-forming cells の割合がリンパ球数の減少を認める担癌患者でも測定が可能であること、短時間の培養でも安定した plaque-forming cells の割合が得られるため無菌的操作を必要としないなどの利点があり、いずれの施設でも簡便に測定できるものと考えられる。

自己免疫、腫瘍免疫の作用機序として ADCC の関与が考えられており、自己免疫疾患に関しては Feldman ら⁸⁾をはじめさまざまな報告がみられ⁶⁻¹⁰⁾、癌疾患に関しては Ting ら¹¹⁾や Stratton ら¹²⁾の報告がみられる。泌尿器科領域の担癌患者における ADCC 活性の報告は少なく、著者は膀胱腫瘍患者について検討を加えた。

著者の成績では健常人の K cell population は $7.5 \pm 1.5\%$ であり、この成績は Perman ら⁹⁾ および 銭谷ら¹⁾の成績とほぼ一致している。膀胱腫瘍患者の K cell population は $4.7 \pm 2.0\%$ であり、泌尿器科的良性疾患患者および健常人のそれと比較して有意に低く、膀胱腫瘍患者においても ADCC 活性の低下が認められた。深達度別の検討でも、膀胱腫瘍の high stage 群は low stage 群、泌尿器科的良性疾患患者および健常人と比較していずれも有意に低く、担癌状態では ADCC の面より検討しても、生体の免疫機構にとって不利な条件を備えていると考えられる。

担癌患者に対して手術や免疫療法などさまざまな治療法が施されている。その治療効果を免疫能の面より検討する指標として各種のパラメーターが存在する。そのパラメーターの1つである ADCC 活性にて、膀胱腫瘍患者における手術前後の変動を検討した。術後の K cell population は術前のそれに比し高値を示すものの、個々の症例検討では一定の傾向は得られず、さらに深達度別に同様の検討を加えても、low stage 群、high stage 群のいずれも一定の傾向は得られなかった。このことは、癌の進行度、手術の内容および合併症などの要因がからみあっているためと考えられた。

著者は現在まで、膀胱腫瘍患者における治療による免疫能の効果を T・B cell の比率、PPD および PHA 皮内テスト、マクロファージ遊走阻止試験、IgG Fc レセプター陽性 T cell のパラメーターにて検討してきた。これらのパラメーターは治療による免疫能の状態をよく反映していると報告^{13,14)}したが、これに比し ADCC の場合には治療による免疫能の状態

を十分に反映していないと思われた。

今後、症例数を増やすとともにこれらの課題について検討していくつもりである。

結 語

1. microplate 法による ADCC 活性の測定に関し基礎的検討をおこない、以下の結果を得た。

1) 抗体濃度は $30 \sim 80 \mu\text{g/ml}$ で至適と考えられた。

2) $250 \sim 4000 \text{ cells/ml}$ の低リンパ球数でも一定した plaque-forming cells の割合が得られた。

3) incubation time は2時間以上が必要と考えられた。

以上の結果より、plaque-forming cells の割合の検討には抗体濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 、リンパ球数 $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 、incubation time 3時間という条件にて、リンパ球中の K cell の割合を同定した。

2. 膀胱腫瘍患者14例、泌尿器科的良性疾患患者7例および健常人6例について K cell の割合を測定した。

膀胱腫瘍患者の K cell の割合の平均は、対照群に比し有意に低下していた。さらに、深達度別検討でも high stage 群は low stage 群、泌尿器科的良性疾患患者および健常人に比し有意に低下していた。

膀胱腫瘍患者11例について、手術前後の K cell の割合の変動を検討したが、low stage 群、high stage 群とも一定の傾向は認められなかった。

本論文の要旨は第29回日本泌尿器科学会中部連合総会にて発表した。

文 献

- 1) 銭谷幹男・高橋 弘・出浦正倫：マイクロプレート法によるヒト末梢血中 K cell の同定。医学のあゆみ 109: 682, 1979
- 2) Perlmann P and Perlmann H: Contractual lysis of antibody-coated chicken erythrocytes by purified lymphocytes cellular. Immunology 1: 300~308, 1970
- 3) Perlmann P, Perlmann H, Larsson A and Wahlin B: Antibody dependent cytotoxic effector lymphocyte (K cell) in Human Blood. J Reticuloendoth Soc 17: 241~250, 1975
- 4) Biberfeld P, Wahlin P, Perlmann P and Biberfeld G: A Plaque technique for assay and characterization of K cell, Scan. J Im-

- munol 4: 859~864, 1975
- 5) Feldmann JL, Becken ML, Moutsopoulos H, Feye K, Blackman M, Epstein WW and Talal N: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in selected autoimmune Disease. J Clin Invest 58: 173~181, 1976
 - 6) 能勢真人・京極方久：自己免疫に関するリンパ球介在性細胞障害機構の考案—その effector phase について—。臨床免疫 9: 684~691, 1977
 - 7) Calder EA, Penhale WJ and Mc Leman D: Lymphocyte-dependent antibody-mediated cytotoxicity in Hashimoto thyroiditis. Clin Exp Immunol 14: 153~158, 1971
 - 8) Eckhardt R, Kloos P and Dierich MP: K-lymphocytes (Killer-cells) in Crohn's disease and acute virus B-hepatitis. Gut 18: 1010~1016, 1977
 - 9) 銭谷幹男・高橋 弘・出浦正倫：慢性肝疾患における末梢血リンパ球中 K-cell population—マ
イクロプレート法による検討—。肝臓 19: 1188, 1978
 - 10) Ting A and Terasaki P: Depressed lymphocyte-mediated Killing of sensitized targets in cancer patients, Cancer Research. 34: 2694~2701, 1974
 - 11) Stratton ML, Herg J, Leoffler RA, McCullurg FL, Reiter A, Bernstein P, Danley D L and Benjamini E: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in treated and nontreated cancer patients. Cancer 49: 1045~1049, 1977
 - 12) 酒井俊助：膀胱腫瘍患者と比較した上部尿路腫瘍患者の細胞性免疫能とその術後経過。日泌尿会誌 71: 527~543, 1980
 - 13) 酒井俊助・加藤直樹・河田幸道・西浦常雄：尿路性器癌患者における免疫能について，第19回日本泌尿器科学会中部連合総会（演），大阪，1979
(1983年1月17日受付)