

子宮頸癌の臨床進行期分類と Lymphocyte-Subpopulation の変動について

Changes in Cell Numbers and Activities of Lymphocyte-Subpopulations in the Progress of Cervical Cancer

大阪市立大学医学部産科婦人科学教室 (主任 須川 佶教授)

植田 勝間 Katsuma UEDA 稲本 英治 Eiji INAMOTO
山片 重房 Shigefusa YAMAGATA 梅咲 直彦 Naohiko UMESAKI
須川 佶 Tadashi SUGAWA

同第2生理学教室 (主任 木村英一教授)

木 下 喜 博 Yoshihiro KINOSHITA

概要 末梢血内リンパ球の形態と機能は決して一様なるものではないと認識されている。今回我々は、粘着法と細胞比重差による分画遠心分離を組合せた簡易分画化法を用いて、リンパ球 subpopulation を分離し、免疫担当細胞の濃縮された高比重分画の機能を種々検討した結果、その subpopulation における免疫活性の低下と癌進展との間に密接なる関係の存在することを認めた。

(1) 頸癌各期における末梢血内総リンパ球数はⅠ期2202/mm³、Ⅱ期1908/mm³、Ⅲ期1138/mm³、Ⅳ期1159/mm³、対照群2154/mm³のごとくⅢ・Ⅳ期に有意なる低下を認めた。

(2) 頸癌各期における高比重分画中の小リンパ球構成率はⅠ期59.2%、Ⅱ期64.5%、Ⅲ期32.0%、Ⅳ期18.0%、対照群61.4%のごとくⅢ・Ⅳ期に著しい低下が認められ、Ⅰ・Ⅱ期群との間に有意差が存在した。

(3) それに対して、低比重分画中の大リンパ球構成率はⅠ期13.3%、Ⅱ期9.8%、Ⅲ期50.0%、Ⅳ期62.4%、対照群4.3%のごとくⅢ・Ⅳ期に著しい増加が認められ、Ⅰ・Ⅱ期群との間に有意差が存在した。

(4) 頸癌各期における高比重分画中のPHAによる blastoid cell 出現率はⅠ期61.8%、Ⅱ期47.8%、Ⅲ期20.0%、Ⅳ期8.8%、対照群63.8%のごとくⅢ・Ⅳ期に著しい低下が認められた。

(5) 頸癌各期におけるツ反応の結果は頸癌進展とともに陽性率が減少する傾向を認めた。そこで著者らは以上の5項目の criteria をもととして子宮頸癌進展度 Score の作成を企てた。この Score による頸癌進展度の診断は、現行の視診・触診を主体とする臨床進行期診断法と趣きを異にし、5項目 criteria により頸癌進展度を客観的に把握せんとする新しい診断法である。この子宮頸癌進展度 Score を加味することにより、頸癌進展度のより適確なる把握、とくに手術可能性(根治可能性)の予知、さらに再発の早期診断および予後判定などに大きく貢献するものと考えられる。

結 言

悪性腫瘍に対する生体防衛機構には、リンパ球を主体とする細胞性免疫が中心的役割を演じていると考えられている。しかしリンパ球機能の多様

性のために、その作用機序に関し未だ不明な点が多い。近年リンパ球機能検討法の画期的な進展にともない、リンパ球機能の多くは小リンパ球によつて演じられていることが判明してきた。一見

構造上均一にみえる小リンパ球群も 1) 寿命, 2) 機能, 3) 細胞比重などの面から一様な細胞群ではないことが明らかにされ, 「小リンパ球群の不均一性」が問題とされるにいたつた. Kinoshitaら(1970) は細胞間の比重差に基づいて特定細胞を分離する重層遠心分離法を用いて, リンパ球浮遊液よりリンパ球を3分画に分離し, 小リンパ球がⅢ分画のみならず, I・II分画にも混在している事実より「細胞比重の立場から, 小リンパ球群の不均一性」を実証した. この知見をもととして, 植田ら(1973) は粘着法と分画遠心分離法との併用による簡易分画化法を確立し, 正常婦人末梢血内リンパ球の subpopulation と機能的不均一性について報告した.

今回はこの簡易分画化法を用い, 子宮頸癌症例を対象として, その進展度と末梢血内リンパ球 subpopulation の変動推移を追究し, 興味ある知見を得た. それらをもとに頸癌進展度の Score 算定法を創案し, これにより頸癌進展の客観的把握を試み, ここに子宮頸癌進展度 Score を作成し, 提唱する. この Score の提唱は頸癌進展度のより適確なる把握, ならびに再発の早期診断・予後判定の一助となることを期待するものである.

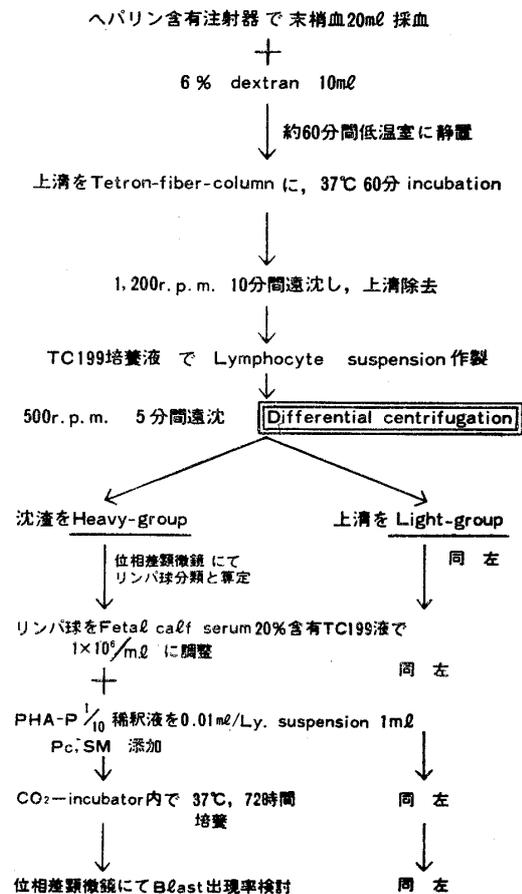
実験方法

実験対象: 昭和47年4月1日より同年9月30日の6ヶ月間に大阪市立大学医学部婦人科病棟に入院した子宮頸癌症例のうち18名を選んだが, それらの臨床進行期分類(昭和46年1月1日, 子宮癌委員会報告による)はI期6名, II期6名, III期1名, IV期5名である. 組織学的検索ではI・II期各々6名中に1名ずつの頸部腺癌を含むが, それ以外はすべて扁平上皮癌であつた. I・II・III期群は入院時迄になんらの治療を受けておらず, IV期の5名に関しては, プレオマイシン静注を受けた症例2名を含んでいるが, いずれも治療終了後3カ月以上経過したものを対象とした. また血液像に大きな影響を与えらる慢性疾患(梅毒, 結核など), 血液疾患および高度炎症併発例などはすべて対象より除外した. なお対照群には22名の18才から68才の健康婦人を対象とした.

末梢血内総リンパ球数算定: 通常朝食前の白血球数に, 白血球中に占めるリンパ球百分率を乗じ, 算出した. 末梢血内総リンパ球数は可成りの日差変動が存在するといわれているので, できる限り2回の検査の平均値をもつて表現した.

末梢血内リンパ球 subpopulation の分画法: 図1のごとく, ヘパリン(Novo)を0.1ml/10ml程度に含有した注射器で末梢血20ml採血し, デキストラン(6% w/v, 生理食塩水で作製, 分子量20万)により赤血球の沈降を速め, 低温室(5°C)にて約60分間静置. 多数の白血球, 血小板などを含有する上清を長さ20cm, 内径15mmの Tetron-fiber-column に注ぎ, 37°C, 60分 incubate 後, カラムより流出液を採集し, 比較的高純度のリンパ球を採取した. 次いで50×g, 5分間遠心分離. 管底に高比重リンパ球(比重1,068~1,072

図1 実験方法(末梢血内リンパ球の採集・分離・Blast化)



に相当)が分離される。上清を集め $240 \times g$, 10分間遠心分離すれば, その沈渣は低比重リンパ球 (比重 $1,060 \sim 1,068$ に相当) である。両群のリンパ球を Adnerら (1965) に従い細胞のサイズを指標とし, 位相差顕微鏡下で分類した。即ち直径 7.5μ 以下を小リンパ球, $7.5 \sim 10 \mu$ を中リンパ球, 10μ 以上を大リンパ球として, 約500~1,000個のリンパ球より大・中・小リンパ球各々の百分率を算出した。H S L% (Heavier Small Lymphocyte %) は高比重リンパ球分画中の小リンパ球の占める百分率で, L L L% (Lighter Large Lymphocyte %) は低比重リンパ球分画中の大リンパ球の占める百分率である。

高比重分画の blastoid cell 出現率: 高・低比重両分画におけるリンパ球数を fetal calf serum 20%含有 T C 199液で $1 \times 10^6/ml$ に調整後, その浮遊液 1 ml に Phytohaemagglutinin (PHA, Difco, Lot No. 572100) 10倍稀釈液を 0.01 ml とペニシリン・ストレプトマイシンを添加し, CO_2 -incubator 内で $37^\circ C$ 72時間静置培養後, 位相差顕微鏡下に blastoid cell 出現率を検討した。blastoid cell の判定は, 次の2つの criteria によりおこなった。

- 1) 明らかな mitosis を呈する比較的大型の細胞
- 2) 核膜は明瞭で大きな核小体を通常2個以上有し, かつ細胞質内に顆粒と空胞をもつ $20 \sim 40 \mu$ の大型細胞。方法の詳細は前報 (植田他, 1973) を参照されたい。

ツベルクリン皮内反応: 日常一般診断用精製ツベルクリン (PPDs) を使用し, 注射後約48時間に判定した。判定は発赤の直径 4 mm以下を陰性, 5~9 mmを疑陽性, 10 mm以上を陽性とした。

子宮頸癌進展度 Score は1) 末梢血内総リンパ球数 2) H S L% 3) L L L% 4) 高比重分画の blastoid cell 出現率 5) ツベルクリン皮内反応の5項目 criteria より作成した。

実験成績

1) 子宮頸癌各期における末梢血内総リンパ球数の変動は図2のごとくI期 $2202 \pm 529/mm^3$, II期 $1908 \pm 700/mm^3$, III期 $1138 \pm 781/mm^3$, IV期 $1159 \pm 842/mm^3$, 対照群 $2154 \pm 648/mm^3$ でIII

図2 子宮頸癌進展における末梢血内リンパ球数の変動

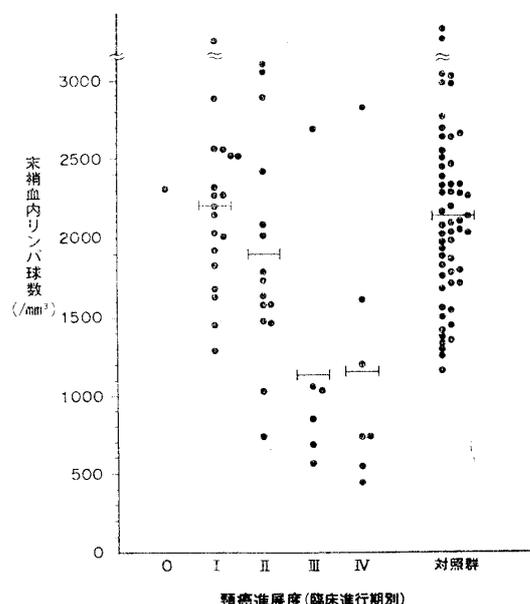
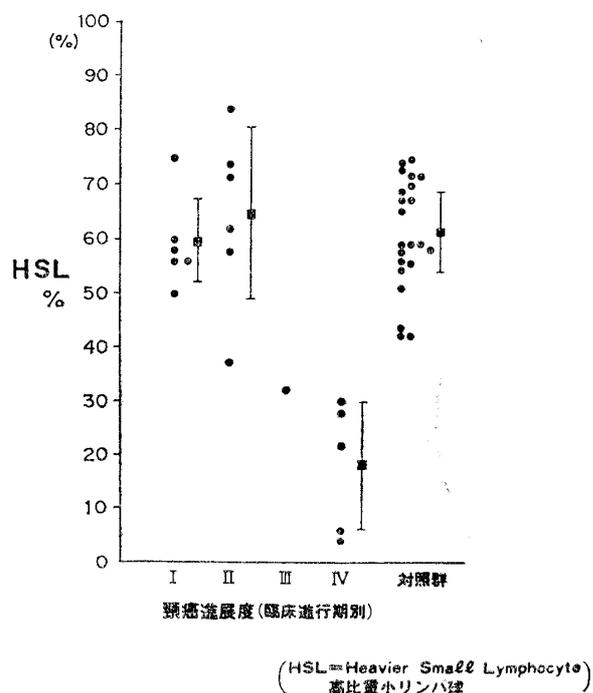


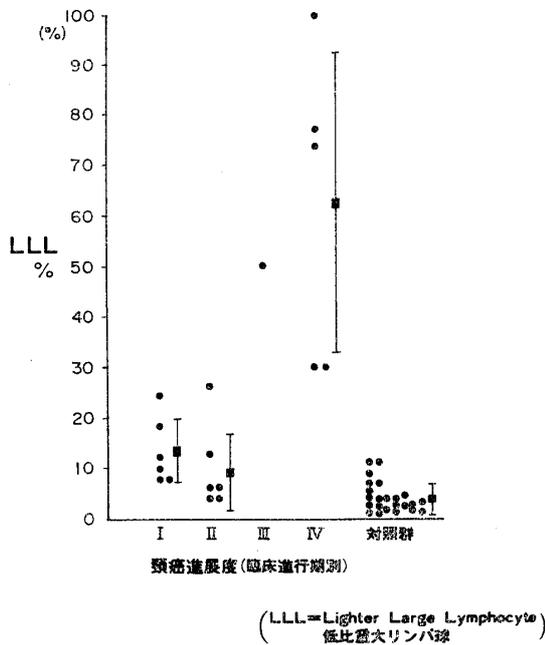
図3 子宮頸癌進展における高比重分画の小リンパ球構成率の変動



・IV期に有意なる低下を認めた。

2) 子宮頸癌各期におけるH S L%の変動は図3のごとく, I期 $59.2 \pm 8.5\%$, II期 $64.5 \pm 16.3\%$, III期 32.0% , IV期 $18.0 \pm 12.2\%$, 対照群 $61.4 \pm 7.5\%$ で, III・IV期に著しい低下が認められ,

図4 子宮頸癌進展における低比重分画の大リンパ球構成率の変動



(I+II) 期群 (61.8±8.6) %と(III+IV) 期群 (20.3±12.4) %の間には有意の差があつた (p<0.01).

3) 子宮頸癌各期におけるLLL%の変動は図4のごとく、I期13.3±6.5%, II期9.8±7.4%, III期50.0%, IV期62.4±30.8%, 対照群4.3±3.0%で、III・IV期に著しい上昇が認められ、(I+II) 期群 (11.6±7.4) %と(III+IV) 期群 (60.3±20.4) %の間には有意差があつた (p<0.01).

4) 子宮頸癌各期における高比重分画のblastoid cell 出現率の変動は図5のごとく、I期61.8±15.9%, II期47.8±12.2%, III期20.0%, IV期8.8±7.1%, 対照群63.8±13.5%で、III・IV期に著しい低下が認められ、(I+II) 期群 (54.2±15.2) %と(III+IV) 期群 (10.7±9.0) %の間に有意の差が存在した (p<0.01).

高比重分画中の小リンパ球構成率(HSL%)とそのblastoid cell 出現率の関係は図6のごとく、また低比重分画中の小リンパ球構成率(LSL%)とそのblastoid cell 出現率の関係は図7のごとくである。両図において強い相関関係が認めら

図5 子宮頸癌進展における高比重リンパ球分画のBlast 出現率の変動

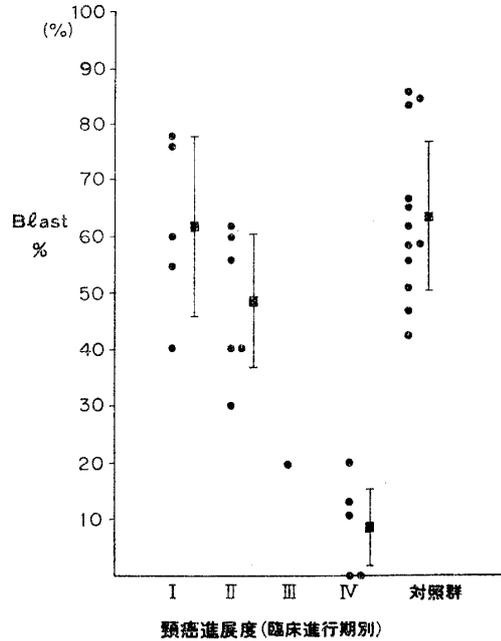
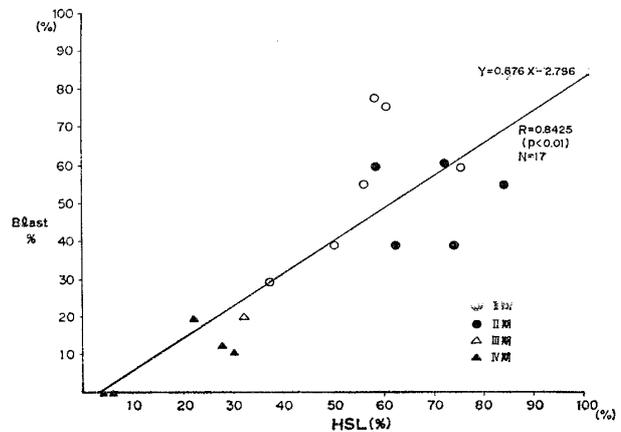
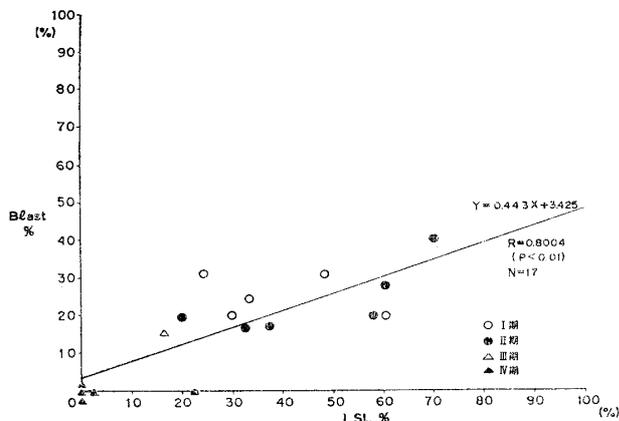


図6 子宮頸癌症例の高比重リンパ球分画における小リンパ球構成率とBlast 出現率との関係



れ、さらにHSL群がLSL群に比し、blastoid cell 出現率が高い事実は小リンパ球の機能面における不均一性の一側面を示し、正常婦人末梢血と同様に、頸癌症例においても高比重分画には免疫担当能を与えられたimmunocompetent cellが低比重分画に比し、より多く分離されたことを示唆している。さらに頸癌III・IV期においては、高比重分画中のblastoid cellの出現率のみならずHSL%も頸癌I・II期に比し、著しく小であつた。

図7 子宮頸癌症例の低比重リンパ球分画における小リンパ球構成率と Blast 出現率との関係



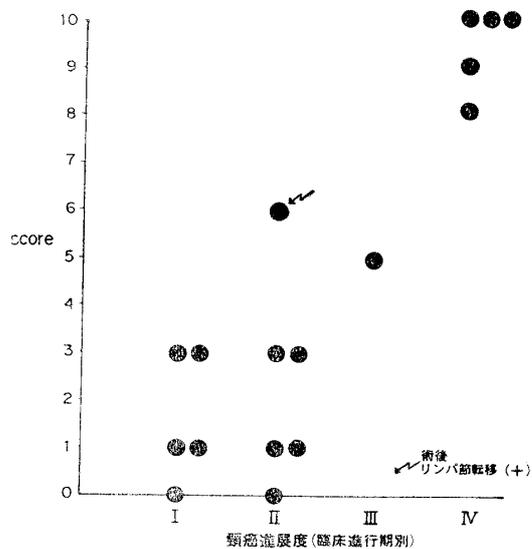
5) 子宮頸癌各期におけるツベルクリン皮内反応の関係は表1のごとく、頸癌進展とともに陽性率は減少し、逆に陰性率が増加する傾向を認めた。

以上記述してきたごとく1) 末梢血内総リンパ球数 2) HSL% 3) LLL% 4) 高比重分画の blastoid cell 出現率 5) ツベルクリン皮内反応の5項目が頸癌進展にともなう一般的免疫能の低下と密接なる変動を示す成績が得られた。そこで上述の5項目に表2のごとく、それぞれの点数を与え、子宮頸癌進展度 Score を作成した。この Score による頸癌進展度の診断は、現行の内診を主体とする診断法とは異なり、頸癌患者の末梢血内リンパ球の機能的不均一性に基ずいた criteria を設定し、それにより頸癌進展度の客観的把握を試みようとする新しい診断法である。図8のごとく頸癌進展度 Score は0点より10点の巾を有し、I・II期では3点以下、IV期では全例8点以上と頸癌進展にともない Score の増加を認めた。II期において6点と高い Score をマークし

表2 子宮頸癌進展度 Score の Criteria

項目	点数	0	1	2
1) Total lymph. count /mm ³		1801以上	1501~1800	1500以下
2) HSL %		51%以上	31~50%	30%以下
3) Blast % in heavier-group		51%以上	21~50%	20%以下
4) LLL %		9%以下	10~29%	30%以上
5) PPD (mm) (発赤の直径)		(+) 10mm以上	(±) 5~9mm	(-) 4mm以下

図8 子宮頸癌進展度 Score



た症例は術後リンパ節転移が認められている。

考 按

1) 末梢血内総リンパ球数：白神皦ら (1969) は外科領域における悪性腫瘍を対象として、担癌症末期では末梢血リンパ球減少がその過半数において認められ、とくに持続してみられる。また症例によつては、リンパ球の減少が初期癌の発見に対して診断的価値をもつと報告している。Riesco (1970) は 589例の担癌症を対象として、末梢血

表1 子宮頸癌進展度と PPD

判定	頸癌進展度	対照群	I 期	II 期	III 期	IV 期
(+) 発赤の直径10mm以上		17/18 94%	10/11 91%	6/10 60%	0/1 0%	0/5 0%
(±) 5~9mm		1/18 6%	0/11 0%	2/10 20%	1/1 100%	0/5 0%
(-) 4mm以下		0/18 0%	1/11 9%	2/10 20%	0/1 0%	5/5 100%

内総リンパ球数の変動と予後を検討し、5年治癒率との間に有意な相関関係の存在することを認め、血中リンパ球を中心とする免疫学的背景が担癌個体の予後に大きな影響を与えているのではないかと報告している。さらに、Zacharski(1971)はリンパ球減少症と悪性腫瘍とは明らかに関係があるとし、相対的(15%以下)および絶対的(1,000/血液 mm^3 以下)リンパ球減少の患者178人を対象として、76人に悪性腫瘍の存在を確認している。又510人の健康人中6%と、消化管に未治療の悪性腫瘍患者227人中22.4%に絶対的リンパ球減少症を認めている。また5325人の患者について悪性腫瘍の出現率をみると、1,500/ mm^3 以上のリンパ球を認める患者では約10%、1,000/ mm^3 以下のリンパ球減少症のある患者では約29%であったとし、リンパ球減少症と悪性腫瘍出現との間に密接な関係ありと強く主張しているが、その因果関係の詳細は不明であると述べている。

著者らは頸癌進展にともない末梢血内リンパ球の著しい減少を認め、とくに頸癌Ⅲ・Ⅳ期には1,000/ mm^3 以下の症例が約62%にも達していることを認めた。

2) 高比重分画中の小リンパ球構成率(H S L%) : 白神嶽ら(1969)は担癌症において減少しているリンパ球がいかなる種類のものであるかをまずリンパ球の大きさの面より検討を加え、8~10 μ と“小さいリンパ球”は正常群で2~20%、担癌症例では多くとも6%で5例中2例は0%であったとし、担癌症例のリンパ球減少はとくに小さいリンパ球の減少によるものと考えられると述べているが、このことはGowans(1962)による抗原を認知し対応する活性は小リンパ球群に賦与されているのではないかと指摘した報告と関連があるように思われる。

著者らは「形態学的に分類された小リンパ球群の機能的不均一性」に注目し、細胞比重差による分画遠心分離をとり入れた簡易分画化法により、小リンパ球群を機能的に異なる2種のsubpopulationに分離し、immunocompetent cellをより多く含有している高比重分画中の小リンパ球構成率(H

S L%)と頸癌進展の関係を検索した。その結果、前記のごとく頸癌進展にともない、ことにⅢ・Ⅳ期において、その構成率の著しい低下が認められた。

3) 高比重分画中の小リンパ球構成率(H S L%)と低比重分画中の大リンパ球構成率(L L L%)の関係: 従来より癌進展にともなう血中総リンパ球数の減少が注目されてきたが上述のごとく、リンパ球群は機能の異なるsubpopulationの集合と考えられ、リンパ球の減少が抗腫瘍性を示すリンパ球数の減少を反映するとは限らないと思われる。著者らはその想定をもとに頸癌患者末梢血内総リンパ球数の減少を解析するため、分離した2種のsubpopulationの構成細胞数の変動を詳細に検討したところ、頸癌進展にともない、H S L%の減少とL L L%の軽度増加がみられるという特筆すべき結果を得た。木下(1972)、稲本(1973)はWalker's carcinosarcomaの実験移植腫瘍において、リンパ節より分離されたH S L(比重1,068~1,072)群に、強い抗腫瘍性が存在することを報告しているが、それは感作高比重小リンパ球が標的腫瘍細胞に付着し、膨化を誘導した位相差像を根拠としたものである。さらにKinoshitaら(1971)はWalker's carcinosarcomaの移植実験をとおして、高比重リンパ球分画に対応する抗血清の投与による高比重小リンパ球の機能低下と悪性腫瘍の発育増大との密接なる関係を指摘した。これらは頸癌進展にともない免疫担当細胞を豊富に含有するH S L分画の活性低下や細胞数の減少がみられるという本報告の結果と矛盾はない。一方頸癌進展によりL L Lの構成率の増加がみとめられ、興味ある事実であるが、それが何によつてもたらされるかは今後の問題として検討を加えてゆきたい。

4) 高比重分画のblastoid cell出現率: 白神ら(1969)はP H Aによるリンパ球の幼若化現象を検索し、正常対照群では0~80%の範囲内にあるが、その大部分は20%以上であり、担癌症例ではほとんど20%以下となることを認め、担癌症ではblastoid cell出現率が低下していると述べて

いる。また、三輪ら(1972)は消化器癌患者の術前末梢血リンパ球のPHAに対する幼若化率を検索し、それと開腹手術時の肉眼的癌進行度との関係を検討したところ、幼若化率の低下と癌進展との間にかかなりの相関がみられ、癌患者末梢血リンパ球の幼若化能の検索は根治可能度を推定するのに好適な指標となると報告している。

著者らの成績では、高比重分画のblastoid cell出現率は頸癌進展とともに減少し、とくにⅢ・Ⅳ期では全例20%以下であった。PHAに反応性の小リンパ球は高比重分画に濃厚に分離されるゆえ、我々の結果は、癌進行度とリンパ球のPHAに対する幼若化活性と密接な関係を指摘した三輪らの成績をさらに発展させたものと考えられる。

5) ツベルクリン皮内反応：岩森ら(1970)は独自の基準に従って判定したツベルクリン反応度は癌進展を鋭敏に反映することをとらえ、癌の進展度を間接的に知り、その予後を推察することが可能であると主張した。また竹内(1972)は頸癌患者のツベルクリン陽性率は対照に比しやや低く、進行癌での陽性率は著しく低下していることを報告している。著者らも同様に頸癌進展にとともに陽性率が低下する傾向を認めた。ツ反応の機作はdelayed hypersensitivityによるといわれ、胸腺由来のリンパ球(T-cell)がその抗原の認知と対応の主役を演ずるといわれ、一方生体の抗腫瘍性はT-cellによつて発揮されるという作業仮説が有力となりつつあることを考慮するとき、癌患者の一般的免疫能推定の一手段として、ツ反応検査は癌の予後を推測する上で意義は大きいと考える。

著者らは上記の知見を基礎として1) 末梢血内

総リンパ球数 2) H S L % 3) L L L % 4) 高比重分画のblastoid cell出現率 5) ツベルクリン皮内反応、以上の5項目をもととして子宮頸癌進展度 Score の作成を企てた。このScoreによる頸癌進展度の診断は、従来の視診と触診を主体とする臨床進行期診断法とは趣きを異にし、5項目のcriteriaを設定し、それにより頸癌進展度を客観的に把握しようとする試みであるが、現在までの検討において、可成りの妥当性を認めている。今後多くの症例に照らして検討を加えて行き度い。

文 献

- 稲本英治(1973):日産婦誌, 25:167.
 岩森 茂, 永田信雄, 石井 毅, 浜井雄一郎, 大屋正章, 村上邦康(1970):臨床免疫, 1:705.
 木下喜博(1972):最新医学, 27:577.
 三輪恕昭, 折田薫三, 田中早苗(1972):医学のあゆみ, 80:634.
 白神 嶽, 岩尾憲人, 今川大仁, 橋詰博仁, 小浜貴良, 久次米隆司, 渋谷和彦(1969):最新医学, 24:1664.
 竹内正七(1972):現代産科婦人科学大系8D:133, 中山書店, 東京都.
 植田勝間, 稲本英治, 山片重房, 梅咲直彦, 須川 信, 木下喜博(1973):日産婦誌, 25:258.
 Adner, M.M., Sherman, J.D., Damshek, W. (1965): Blood, 25:511.
 Gowans, J.L. (1962): Ann. N.Y. Acad. Sci., 99:432.
 Kinoshita, Y., Kimura, S., Takeshita, T., Kimura, E., Yukioka, M. and Morisawa, S. (1970): Exp. Cell Res., 59:299.
 Kinoshita, Y. and Kimura, S. (1971): Exp. Cell Res., 68:471.
 Riesco, A. (1970): Cancer., 25:135.
 Zacharski, L.R., Linman, J.W. (1971): Mayo Clin. Proc., 46:168.

(No. 2608 昭48・1・8 受付)