

## 担癌宿主の細胞性免疫能における末梢血単球機能の意義

大阪市立大学医学部産科婦人科学教室

梅咲 直彦 中出 潤子 中森 宏  
迫 久男 李 東満 須川 信

### The Significance of Monocyte Function on the Cellular Immunity in Cancer Patients

Naohiko UMESAKI, Jyunko NAKADE, Hiroshi NAKAMORI, Hisao SAKO,  
Tohman LEE and Tadashi SUGAWA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka City University Medical School, Osaka*

**概要** 担癌宿主においては、リンパ球機能の低下が報告されており、その機序として患者血清中の免疫抑制因子の関与をはじめ種々の要因に関する検討が行なわれている。

最近, Potter et al. は、単球—マクロファージ系細胞がリンパ球の mitogen に対する反応性を増幅させる能力を有していることを報告しているが、リンパ球分離法として一般に用いられている Ficoll-Hypaque 比重遠心法では、得られたリンパ球群に10~20%の単球が混在しており、従つて、この方法により認められてきた担癌宿主のリンパ球機能の低下が、混在する単球の性格によつて影響を受けている可能性は否定できない。

そこで Silica 食食法を用いて単球を完全に除去した実験群（純リンパ球群）のリンパ球 PHA 反応性と、Ficoll-Hypaque 比重遠心法により求めた単球を含有したリンパ球群（リンパ球群）の PHA 反応性を比較する事から、癌患者のリンパ球 mitogen 反応性に及ぼす単球の影響につき検討を加えてみた。

対象は子宮頸癌患者で、進行期により初期癌群、2期癌群および進行癌群にわけた。また、コントロール群として良性腫瘍患者および健康人を用いた。

その結果、いずれの群においても単球を除去することにより、リンパ球 PHA 反応性の低下が認められた。またリンパ球群（単球含有）の PHA 反応性においては進行癌患者でコントロール群に比較し有意の低下が認められたのに反し、純リンパ球群（単球除去）においては、両者に有意な差が認められなかつた。また、

$\frac{\text{リンパ球群（単球含有）リンパ球 PHA 反応性}}{\text{純リンパ球群（単球除去）リンパ球 PHA 反応性}}$  により、単球のリンパ球機能増幅能を求めると、進行癌群において有意な低下が認められた。この成績より、従来報告されている担癌宿主のいわゆるリンパ球機能の低下に関し、単球機能（リンパ球の PHA 反応性に対する増幅能の低下）が大きく関与していることが判明した。

**Synopsis** In 1977, Potter et al. reported that mitogen response in lymphocyte populations depleted of monocytes was reduced and this decreased mitogen response could be restored by adding monocytes. Therefore, mitogen response of lymphocytes should be considered as monocyte dependent.

Recently, depressed lymphocyte reactivity in cancer patients has been reported. Monocytes might be associated with suppression of mitogen response of lymphocyte fractions because lymphocyte fractions obtained from heparinized blood in Ficoll-Hypaque density gradient contained 10~20% monocytes. And so, the interaction of monocytes to PHA response of pure lymphocytes in cancer patients was studied. More specifically, PHA response of highly purified lymphocytes and lymphocyte fractions obtained by Ficoll-Hypaque density gradient was compared in cancer patients. In the highly purified lymphocyte fraction, monocytes were removed from the lymphocyte fraction after a 1-hour incubation period with Silica suspension.

As the results, PHA response of lymphocytes in the former was reduced. The reduction rate of PHA response in cancer patients as compared with healthy volunteers was significantly lower in PHA response of lymphocyte fractions. On the other hand, it was not significantly lower in PHA response of highly purified lymphocytes. These data show that suppression of PHA response of lymphocytes might be associated with monocyte function.

**Key words:** Cancer immunology • Cell-mediated immunity in cervical cancer • Monocyte

## 緒 言

担癌宿主において細胞性免疫能が低下する現象は、今日周知の事実となつている<sup>2)8)</sup>。そしてそれはリンパ球、ことに T-細胞の機能低下を主な根拠として提示されており、また婦人科悪性腫瘍患者においても例外ではなく、同様の傾向が報告されている<sup>4)</sup>。またその機序の検討も種々行なわれ、その一つとして癌患者血清中の免疫抑制物質の関与が取り上げられてきた<sup>4)6)11)</sup>。

最近、Potter et al.<sup>10)</sup> はリンパ球分画中に少数混在する単球マクロファージ系細胞が、リンパ球の PHA 反応性を増幅していることを報告し、従来認められてきたリンパ球機能の低下は、用いられてきた実験系に混在する単球のリンパ球 PHA 反応性増幅機能により大きく影響されている可能性が推察される。

そこで、Ficoll-Hypaque 比重遠心法で求められたリンパ球分画の PHA 反応性と、単球を完全に除去した純リンパ球群のリンパ球 PHA 反応性の比較から、担癌宿主のリンパ球機能低下におよぼす単球の影響を検討してみた。

## 研究対象および方法

### 1. 対象患者

大阪市立大学医学部附属病院婦人科に入院、加療を受けた子宮頸癌患者22名を対象とした。その内訳は、0期+Ⅰ期(初期癌患者)12名、Ⅱ期癌5名、Ⅲ期+Ⅳ期(進行癌患者)5名である。対照として良性腫瘍患者(子宮筋腫、卵巣良性腫瘍患者)、および健常人計24名を用いた。

### 2. 研究方法

#### A. 単球除去法の条件設定の為の基礎実験

##### 1) 単球除去方法選択の為の検討

従来より単球除去法として貪食法と付着法(Tish culture dish および Nylon fiber column)が使用されているが、本検討に最適な方法の選択の為、各方法につき除去率、リンパ球の viability、T-細胞比率に与える影響につき検討を加えた。各方法の手技に関しては次に述べる。

##### (a) Silica 貪食法

本法は単球の貪食能および貪食した細胞の比重

が重くなる事を利用し、単球をリンパ球分画より除去する方法である。すなわち、ヘパリン加末梢血 6ml に Silica suspension (単球除去用試薬 KAC-2, 日本抗体研究所) 0.6ml (1/10容) を加え、37°C, 1時間培養する。この間数回攪拌を行ない、その後生理的食塩水 6ml にてヘパリン加末梢血を2倍に稀釈し、Ficoll-Hypaque 比重遠心法にてリンパ球を採取する方法である。

##### (b) Tissue culture dish 付着法

単球が Tissue culture dish の底に付着することを利用して除去する方法である。ヘパリン加末梢血より Ficoll-Hypaque 比重遠心法を用いて分離したリンパ球分画を Tissue culture dish (60×15mm, Falcon) 中に  $5 \times 10^6$  個/dish の割合で入れ、37°C, 1時間培養し、その後培養液を数回軽く駒込ピペットにて攪拌し、Tissue culture dish の底に付着していない浮遊細胞を集めリンパ球とした。

##### (c) Nylon fiber column 法

単球が Nylon fiber column に付着する性質を利用して除去する方法である。すなわち、10ml ディスポ注射器の外筒に Nylon fiber (T-細胞分離用, 和光純薬 K.K.) 1.5g を均等につめ、エチレンオキサイドガスにて滅菌したものを垂直に保持し、上方より PBS 約 20ml 流し、次いで RPMI-1640 medium を流し、最後に10% fetal calf serum 加 RPMI-1640 medium を流す。ついでヘパリン加末梢血より比重遠心法で分離したリンパ球分画を10% fetal calf serum 加 RPMI-1640 medium 約 3ml に浮遊させたものを上方より流し、その上に10% fetal calf serum 加 RPMI-1640 medium を約 2ml 注いで、Nylon fiber の上端で止め、37°C, 1時間培養する。その後 column 内の溶液を流出させ遠心し、沈査をリンパ球とした。

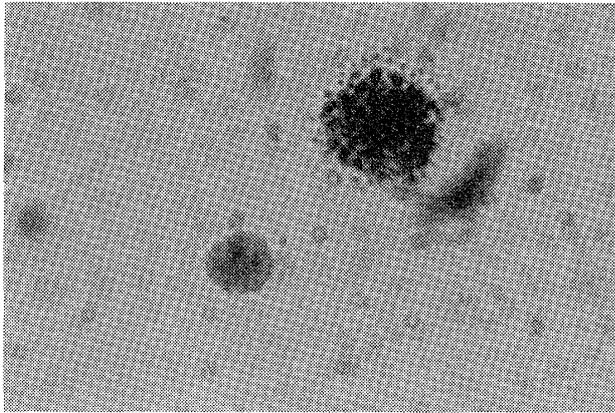
##### 2) 単球除去率の検討

$\alpha$ -naphthyl butyrate 染色<sup>1)</sup>を用い陽性細胞を単球とし、各々の除去率を求めた(写真1)。

##### 3) T-細胞率の検討

リンパ球  $5 \times 10^6$  個/ml および羊赤血球  $1 \times 10^8$

写真1



(左) リンパ球 (右) 単球

個/ml を fetal calf serum に浮遊させ、等量混合し、37°C15分間培養する。次いで低速にて遠心(1,000r.p.m., 5分)し細胞を密着させる。そのまま0°Cにて1時間培養。その後細胞を毛細管ピペットで軽く浮遊させ、1滴を計算盤にとり、顕微鏡下で観察する。羊赤血球4個以上付着しているものをT-細胞とした<sup>7)</sup>。

#### 4) リンパ球の viability の検討

0.02%トリパンブルー染色にて検討した。原則として単球除去直後に検討を加えたが、Silica 貪食法を使用した例では、単球除去後のリンパ球浮遊液を37°C、4日間培養後にも本検討を行なった。

#### 5) PHA 至適濃度の検討

健常人および子宮頸癌Ⅲ、Ⅳ期癌患者の末梢血より単球を除去し、除去前後のリンパ球反応性を各種濃度(0, 10, 20, 50, 100 $\mu$ g/ml)にて検討した。リンパ球PHA反応性は、リンパ球を37°C、72時間培養し求めた。尚<sup>3</sup>H-thymidine 1 $\mu$ Ciは、培養終了3時間前に加え、結果は Stimulation Index  $\frac{\text{PHA } \oplus}{\text{PHA } \ominus}$  にて表現した。

#### 6) 単球添加実験

##### (a) 単球分離法

末梢血より比重遠心法にて、リンパ球分画を採取し、約 $10^7$ 個/dish に調整してCO<sub>2</sub> chamber内にて1時間培養し、上清を除去し、生食にて2回洗浄した後、0.25%トリプシン約3mlを加え、37°C、10分培養し、rubber policemanにて付着細胞を剝離し、駒込ピペットにて十分攪拌後、遠心

して細胞を採取し、洗浄後10% fetal calf serumを加えた medium に浮遊させ、数を調整した。

##### (b) 単球除去と添加によるリンパ球反応性

単球除去後のリンパ球分画に、単球を種々濃度添加した。

#### B. リンパ球 PHA 反応性の変遷におよぼす単球の影響

予備実験において検討した単球除去法を用いて、単球除去前後のリンパ球 PHA 反応性を求めた。その方法の詳細は結果の項に記す。また、リンパ球群(単球含有)リンパ球 PHA 反応性純リンパ球群(単球除去)リンパ球 PHA 反応性により、単球のリンパ球の PHA 反応性の増幅能とし、頸癌の進展に伴う変化を検討した。

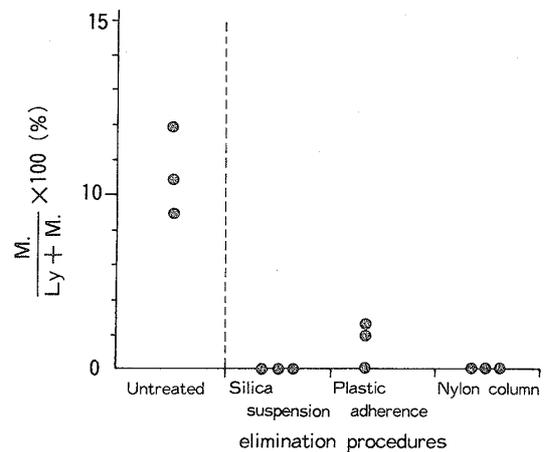
#### 結果

##### 1. 単球除去方法選択の為の検討

###### a. 単球除去率の検討

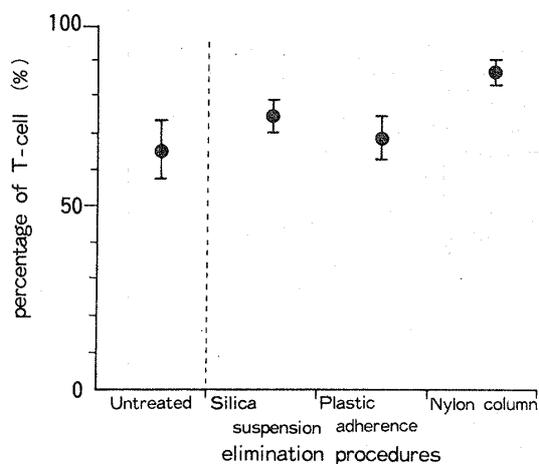
Ficoll-Hypaque 比重遠心法によるリンパ球分画中の単球パーセントを対照として、単球除去後を調べた結果を図1に示した。対照では、9~12

図1 Percentage of monocyte (M.) in mononuclear cells fraction after various M elimination procedures



%であり、Silica 貪食法及び Nylon fiber column 法では、ほぼ100%の単球除去が可能であった。しかしながら Tissue culture dish 法では上清になお数%の単球の混在を認めた。そこで以後単球除去には Silica 貪食法および Nylon fiber column 法を用いるのが適当と考えられた。

図2 Percentage of monocyte (M.) after various M. elimination procedures



### b. T細胞率の検討

羊赤血球4つ以上付着細胞をT細胞とみなし、T細胞率を検討すると、図2に示す如くコントロールにおいてT細胞率は60~70%、およびTissue culture dish法ではほぼ同様であったが、Nylon fiber column法では約70~80%とT細胞率が上昇した。

### c. Viability の検討

各除去法におけるリンパ球の viability は除去時ほぼ100%を示したが、とくに Silica 貪食法においてリンパ球培養後4日目までの viability を検討した結果、除去しないリンパ球分画に比較し若干の低下が認められたにすぎなかった。

### 2. PHA 至適濃度の検討

健常人および進行癌患者の末梢血を試料として検討を行なったが(図3)、両者とも、各 PHA 濃度において純リンパ球群(単球除去)のリンパ球 PHA 反応性は、リンパ球群(単球含有)のリンパ球 PHA 反応性より低下を示していた。また、リンパ球 PHA 反応性の最高値はリンパ球群においては 20 $\mu$ g/tube、一方純リンパ球群においては 10~20 $\mu$ g/tube に認められたので、至適 PHA 濃度を 20 $\mu$ g/tube とした。

### 3. 単球添加実験

Silica 貪食法にて単球を除去後、リンパ球数の5%および10%の単球を添加すると、図4に示す如く低下した PHA 反応性が、除去前値まで回復を示した。尚、単球のみの群では、PHA に対する反応性はほとんど認められなかった。

### 4. 単球機能の検討法(表1)

単球を除去した系のリンパ球 PHA 反応性は、次の方法により求めた。すなわち、ヘパリン加末梢血に1/10容になるよう Silica suspension を添加し、37 $^{\circ}$ C、1時間培養後、Ficoll-Hypaque 比重遠心法にてリンパ球分画を採取し、そのリンパ球  $5 \times 10^6$  を 1ml に浮遊させ、PHA 20 $\mu$ g を 0.1ml に溶解して加え、72時間培養した。培養終了3時間前に、1 $\mu$ Ci/0.1ml の  $^3$ H-thymidine 溶液を 0.1ml 加えた。その後、リンパ球を filter を用いて集め、酸不溶性分画に取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンターにて計測した。結果は、

図3 Influence of removal of monocyte on lymphocyte reactivity to PHA stimulation

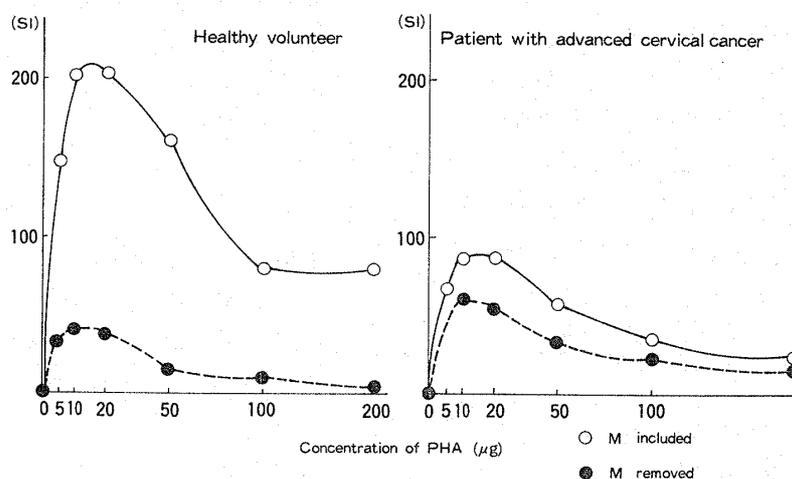


図4 Reconstitution of the PHA responsiveness of silica solution treated lymphocytes by adding monocyte

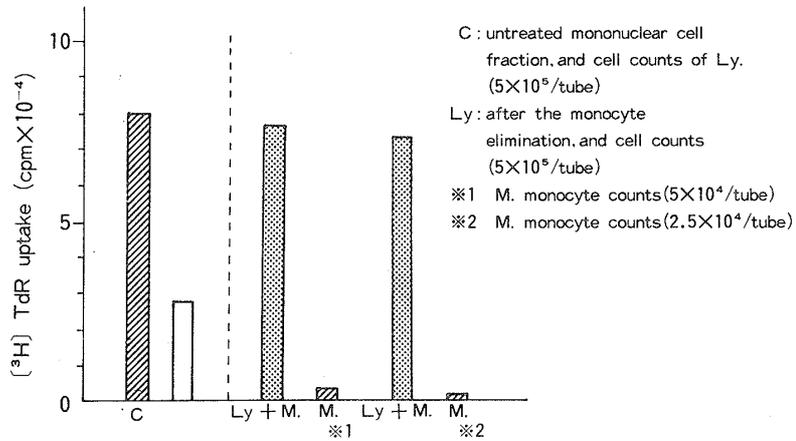
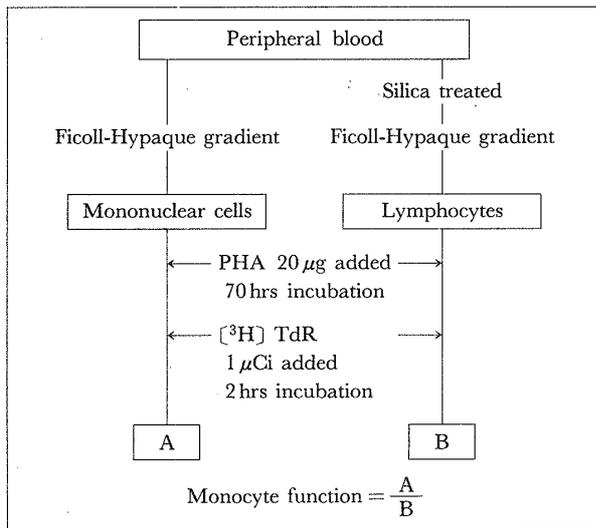


表1 Bioassay of monocyte function (by removal of monocyte from mononuclear cells)



同じ培養系で PHA 非添加群の CPM を分母とした Stimulation Index で表現した。

なお、単球を除去しない系（リンパ球群）のリンパ球 PHA 反応性は、ヘパリン加末梢血より Ficoll-Hypaque 比重遠心法により分離したリンパ球（単球含有）に PHA を添加し前述の方法で Stimulation Index を求めた。そして単球のリンパ球増幅能は、

$$\frac{\text{リンパ球群リンパ球 PHA 反応性}}{\text{純リンパ球群リンパ球 PHA 反応性}}$$

に求めることにした。

5. 子宮頸癌の進展に伴うリンパ球 PHA 反応性の変遷におよぼす単球の影響

図5 Effect of removal of monocyte on the lymphocyte reactivity to PHA stimulation in various stages of cervical cancer

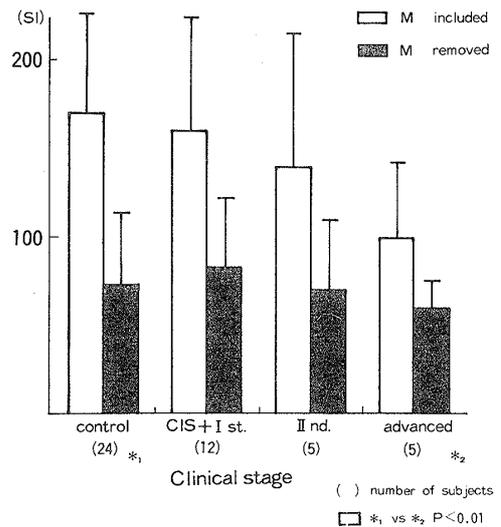
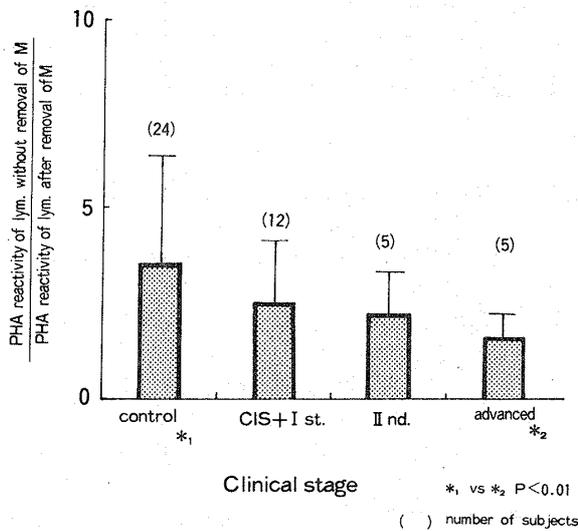


図5に示す如く単球を含んだリンパ球群のリンパ球 PHA 反応性は、癌の進行とともに低下し、特に健常人群と進行癌群の間に有意な差 (p < 0.01) が認められた。

一方、単球を除去した群（純リンパ球群）におけるリンパ球 PHA 反応性においては、いずれも単球を含んだ系におけるリンパ球 PHA 反応性よりも有意に低下を示していた。そして頸癌各群の間には統計上有意の差はなく、健常人群と進行癌の間にはのみわずかな低下傾向が認められている。

単球のリンパ球 PHA 反応性増幅能に関して

図6 Changes of monocyte function with progress of cervical cancer



は、頸癌の進展に伴い低下を示し、特に健常人と進行癌患者の間に有意の差が認められた(図6)。

### 考 察

一般的に、ヘパリン加末梢血からリンパ球を採取する方法として、Ficoll-Hypaque 比重遠心法が用いられているが、この方法では、リンパ球と単球の比重が近接している為、リンパ球分画に10~20%程度の単球の混入は避けられない。本研究は、単球のリンパ球 PHA 反応性に及ぼす影響を検討するものであり、その目的のため、まずリンパ球群(単球を含む)の PHA 反応性と純リンパ球群(単球は除去されている)の PHA 反応性を比較検討することにした。そこで、最初に次の3条件を満たした単球除去法の選択を行なった。その条件とは、① 単球の除去率がほぼ100%であること、② 単球除去法が、単球除去前後のリンパ球の T細胞率に影響を与えないこと、③ リンパ球の viability を低下させないこと、である。単球除去方法としては、Silica 貪食法、Tissue culture dish 付着法、および Nylon fiber column 法を用いた。

はじめに除去率の検討を行なったが、単球とリンパ球の鑑別に現在一番信頼性があると考えられている  $\alpha$ -naphthyl butyrate 染色を用いた<sup>12)</sup>。

この検討においては、Tissue culture dish 法が一番除去率が悪く、他の2法においては、ほぼ

100%単球が除去された。そこで除去率において満足すべき成績を得た2法のリンパ球 T細胞率に対する影響を観察したところ、Nylon fiber column 法においては、T細胞率が著明に上昇するのに反し、Silica 貪食法においては、T細胞率の変動が認められなかつた。そこでさらに Silica 貪食法使用時のリンパ球の viability を検討したところ、その若干の低下が認められたが、これは本検討の成績に影響を与えない程度である為、除去法として Silica 貪食法を選択することとした。

次に、PHA の至適濃度を決定する為、各種 PHA 濃度でリンパ球群(単球含有)、および純リンパ球群(単球除去)のリンパ球 PHA 反応性を検討した。その結果、peak は両群とも 20 $\mu$ g/tube に見られた。また両群のリンパ球 PHA 反応性を比較すると、いずれの PHA 濃度においても、後者において低下を示した。この低下の原因が単球の除去の為である事を確認するため、単球を除去したリンパ球に単球を添加し、その PHA 反応性を測定したところ、除去した単球とほぼ同数の単球を添加することにより、PHA 反応性が除去操作前値に回復することから、単球除去が、PHA 反応性低下の大きな原因であることが判明した。なお単球がリンパ球 PHA 反応性を増幅させる機序として、Mizel et al.<sup>9)</sup> は、マクロファージ・単球系細胞が産生する leucocyte activating factor (LAF) によると述べている。また佐藤ら<sup>3)</sup>は LAF 以外に単球が mitogen のリンパ球への presentation をよくすることや、リンパ球の培養条件をよくすること等をその機序として挙げている。

次に、本検討により設定された方法を用いて単球のリンパ球 PHA 反応性におよぼす影響を観察した。その成績をまとめてみると、① いずれの進行期群においても、単球を除去することによりリンパ球 PHA 反応性の低下が認められた。② リンパ球 PHA 反応性においては進行癌患者で非癌対照群に比較し有意の低下が認められたのに反し、純リンパ球群(単球除去)においては両者に有意な差がなかつた。

③ リンパ球群リンパ球 PHA 反応性  
純リンパ球群リンパ球 PHA 反応性  
により、単球のリンパ球 PHA 反応性増幅能を  
求めると、進行癌群にその機能の有意な低下が認め  
られた。

この成績の②において、単球を除去することによりリンパ球の PHA 反応性が各群間に有意差が認められなくなつたことは、進行癌患者においては T 細胞数が減少するという報告と矛盾を感ずるものである。しかし今日の知見では、T 細胞には、T<sub>1</sub> 細胞と T<sub>2</sub> 細胞があり、PHA に反応するのは主として T<sub>2</sub> 細胞であることから、進行癌患者で減少している T 細胞が T<sub>1</sub> 細胞であると考えれば、T 細胞数の減少にもかかわらず PHA 反応性が顕著には低下を示さないことが理解できる。現在のところ、進行癌患者の T<sub>1</sub> 細胞の低下は、Thymic Humoral Factor (THF) を用いた検討<sup>5)</sup>においてすでに報告されていることから、今後、T<sub>2</sub> 細胞が進行癌患者において顕著な低下を示していないことを確認する必要があると考える。

本検討により、進行癌患者において単球のリンパ球 PHA 反応性の低下が認められ、従来より考えられていたいわゆるリンパ球機能の低下の原因の一つとして、リンパ球分画に10~20%含有されている単球のリンパ球 PHA 反応性増幅能の低下が重要な因子となつていることが推察された。

以上の結果よりみて、単球機能を賦活させる事がリンパ球機能を上昇せしめる一方法として有用なことになり、免疫療法の一方向を示すものと考えられる。同時にまた、単球のリンパ球 PHA 反応性増幅能を、本検討により設定した方法で測定する事が、免疫療法効果判定のパラメーターになりうるものと判断される。

最後に、本研究においては、単球の除去がリンパ球の PHA 反応性に及ぼす影響を観察し、その成績をもとに単球の機能に関する考察を加えてみたが、たしかに単球の細胞性免疫に果す重要な役割が認識された。しかしながら、各種生体環境における単球機能の変遷に関しては、可能なかぎ

り生理的状态にある単球の分離が必要であり、同時にまた一定の条件を備えたリンパ球試料を用意して、単球添加の影響を観察することが、正確な結論を得るに必要な事項と考えるものである。

#### 文 献

1. 丹羽欣正, 寺田信市, 喜多悦子, 梅垣健三: 非特異性エステラーゼ染色について第一法,  $\alpha$ -naphthyl butyrate を中心に. 臨床病理, 123: 174, 1975.
2. 折田薫三: がん患者におけるリンパ球の機能検査. 総合臨床, 22: 2121, 1973.
3. 佐藤京子, 照喜名重一, 荒井澄夫, 滝島 任: リンパ球の Con A 反応性におけるマクロファージの regulating effect. 医学のあゆみ, 103: 515, 1977.
4. 梅咲直彦: 癌の進展と癌塊摘出に伴う細胞性免疫能の変遷・推移に関する研究(子宮頸癌症例を対象として). 日産婦誌, 27: 1169, 1975.
5. 梅咲直彦, 植田勝間, 中森 宏, 迫 久男, 豊川元一, 中出潤子, 李 東満, 須川 俊: 前駆 T 細胞の成熟・分化に与えるヒト胎児胸腺ホルモンの影響(子宮頸癌患者を対象として). 日産婦誌, 30: 664, 1978.
6. 漆崎一朗, 後町洋一, 長井忠則, 西条 登, 小山隆三, 福田守道: がん血清中のリンパ球の PHA 反応性抑制因子. 最新医学, 29: 1775, 1974.
7. 矢田純一, 橘 武彦: ヒトリンパ球の分別. 免疫実験操作法 A (日本免疫学会編), 451, 日本免疫学会, 金沢, 1975.
8. Catalona, W.J., Sample, W.F. and Cretien, P.B.: Lymphocyte reactivity in cancer patients: Correlation with tumor histology and clinical stage. Cancer, 31: 65, 1973.
9. Mizel, S.B., Oppenheim, J.J. and Rosenstreich, D.L.: Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) produced by macrophage cell line, 388 D.I. Enhancement of LAF production by activated T-lymphocytes. J. Immunol., 120: 1497, 1978.
10. Potter, M.R. and Moore, M.: The effect of adherent and phagocytic cells on human lymphocyte PHA responsiveness. Clin. Exp. Immunol., 27: 159, 1977.
11. Silk, M.: Effect of plasma from patient with carcinoma on in vitro lymphocyte transformation. Cancer, 20: 2088, 1968.
12. Yam, L.T., Li, C.Y. and Crosby, W.H.: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. A.J.C.P., 55: 283, 1971.

(No. 4660 昭55・2・7 受付)