末梢血単球の腫瘍細胞傷害作用に関する研究

第 1 編

腫瘍細胞増殖抑制作用について

岡山大学第2内科学教室(主任:木村郁郎教授)

山 下 二 郎

(昭和58年6月25日受稿)

Key words: 肺癌, 単球, 腫瘍細胞増殖抑制

緒 言

生体における貪食単核球は、病原微生物に対する食菌・殺菌作用、あるいは免疫応答の誘導・発現における種々の役割の他に、悪性腫瘍に対する特異的¹⁾ および非特異的細胞傷害作用²⁾ を有することが明らかにされている。これは生体の抗腫瘍能や免疫監視機構において、貪食単核球が主要な役割を果していることを示唆するものである。そこでその役割の一端を知る目的で、担癌生体における貪食単核球の動態と機能を検討した。

対 象

対象は岡山大学第2内科を受診した原発性肺癌患者39名で、対照疾患は悪性リンパ腫25名、サルコイドーシス16名、肺結核9名であった。年令幅は肺癌で43才から76才、中央値63才であった。診断は生検組織診および細胞診によって確定された。臨床病期は日本肺癌学会 TNM分類によった。

方 法

腫瘍細胞増殖抑制試験:ヘパリン加末梢静脈血15ccを採取し、Ficoll-Hypaque 混合液(9 % Ficoll 24容、Hypaque 10容)に重層して20 ℃、400gで35分間遠沈して単核球層を分離し、phosphate buffered saline (PBS)で2回洗浄した後、非働化10%ヒトAB血清を加えた Hank's balanced salt solution (HBSS)に1.0 ×

10⁷ 個/ml となるよう再浮遊させる。予め10% 牛胎仔血清 (FCS) 加 RPMI 1640 で10時間浸 して前処置した microculture plate (Falcon, Microtest H3042) に1 well あたり100 ul の 単核球浮遊液を入れ、5% CO2 下で90分間孵 置後10% FCS 加 RPMI 1640にて5回洗浄して 非付着細胞を除去して得た付着細胞をエフェク ター細胞として用いた。付着細胞は付着状態の ままで実験に供し、1 well あたりの細胞数は3 つの well の付着細胞を剝離して計測しその平 均値で求めた。付着細胞の単球純度は May-Giemsa 染色による形態的同定にて88.3±4.7%, peroxidase-Giemsa 重染色, non-specific esterase 染色による細胞化学的同定にて各々90.2上 3.4%, 94.6±2.4%, zymosan を用いた貪食能 による同定にて83.9±9.5%であった。

標的細胞は当教室で樹立継代培養中のヒト扇平上皮肺癌由来細胞 (EBC-1 細胞)と HeLa細胞を用いた。

Microculture plate を用い10% FCS 加 R-PMI 1640中で付着細胞と標的細胞を5% CO₂, 37℃で40時間混合培養した後、新たに20点Ci、ml の濃度の³H-thymidine を含む10% FCS 加 RPMI 1640に交換して引き続き培養した。次いで0.05% EDTA 加 0.25%トリプシン溶液でwell 中の細胞を剝離して cell harvester で採取して5 ml の Aquasol (ACSII, Amersham)に入れ、液体シンチレーションカウンターで放射活性 (cpm)を計測した。対照として標的細胞のみ培養して細胞内に取り込まれた ³H-thymi-

dine の放射活性を計測した。腫瘍細胞増殖抑制率は標的細胞のみ培養した場合の標的細胞内のcpm からのフェクター細胞と混合培養した標的細胞内のcpm を引いた値の、標的細胞のみ培養時の標的細胞内のcpm に対する百分率で求めた。全ての実験は triplicate で行なった。

その他の単球機能検査法:単球数は塗抹標本の May-Giemsa 染色にて白血球を500個分類して単球の百分率を求め、コールターカウンターにて計測した白血球数に乗じて算定した。 β-galactosidase 活性は、dextran を加えて分離した白血球層の塗抹標本を 5-Bromo-4-Choloro-3-Indoryl-β-galactoside (Sigma 社)を基材とした調整染色液にて染色した後、顕微鏡下にてβ-galactoside 顆粒を有する単球の百分率をもって活性値とした³3. 単球走性は Boyden Chamber と Millipore filter® を使用して zymosan 活性化ヒト AB 血清を遊走因子として測定した⁴3. 単球食食能はヒト補体結合 zymosan を加え反応させた後、zymosan 粒子を貪食した細胞の百分率をもって貪食指数とした⁵3.

成 績

健康人を対象に、エフェクター細胞数に対する標的細胞数の比率 (E/T比)の腫瘍細胞増殖抑制率に及ぼす影響を検討した(図1).標的細

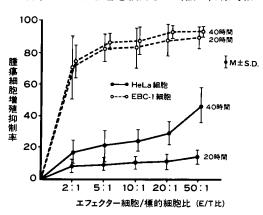


図1 単球の腫瘍細胞増殖抑制率への混合培養時間 とエフェクター/標的細胞比 (E/T 比)の影響

胞が HeLa 細胞で混合培養時間20時間, ³H-thy-midine との反応が5時間とした場合, E/T比2 : 1で7.8±4.1% (平均値±標準偏差値), 5:

 $v_{11.2\pm4.7\%}$, 50: 1 $v_{14.1\pm4.4\%}$ $v_{14.1}$ 混合培養時間を40時間とすると各々16.6±7.3 %, 20.7 ± 9.8%, 24.5 ± 7.1%, 29.1 ± 7.2 %, 46.4±11.8% であった。EBC-1 細胞を標的 細胞とし、混合培養時間20時間、 ³H-thymidine 反応時間 5 時間とした場合, E/T比2:1 $70.7\pm20.3\%$, 5:1 $782.4\pm9.5\%$, 10: 1 \circlearrowleft 83.2 \pm 13.2%, 20: 1 \circlearrowleft 88.2 \pm 10.3%, 50:1で90.2±7.3%であり、混合培養時間を40 時間にすると各々、74.3±10.6%,86.7±5.3%, $87.4\pm8.5\%$, $93.6\pm4.2\%$, $94.0\pm3.1\%$ rb った。臨床例の実験には HeLa 細胞、EBC-1細 胞共に混合培養時間40時間、3H-thymidineとの 反応時間を5時間とし、E/T 比は HeLa 細胞 で50:1, EBC-1細胞で10:1として行なった。

各疾患患者の末梢血単球のHeLa細胞に対する 細胞増殖抑制率は(図2),健康人18人で46.4

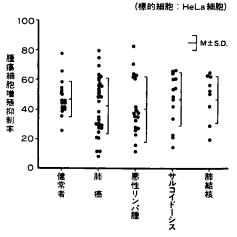


図2 各種疾患における末梢血単球の腫瘍細胞増 殖抑制率

±11.8%であり、肺癌31例41.7±19.2%、悪性リンパ腫19例39.9±21.7%、サルコイドーシス14例46.3±17.7%、肺結核9例48.6±15.7%であった。いずれの疾患も健康人に比して平均値において有意差はなく、疾患相互においても有意差はなかった。肺癌では健康人の平均値から2標準偏差値以上の亢進例は2例(6%)、低下例は5例(16%)、低下例は3例(16%)、サルコ

イドーシスの亢進例はなく低下例は1例 (11%) であった。

EBC-1細胞を標的細胞とした場合(図3), 健

(標的細胞:EBC-1細胞)

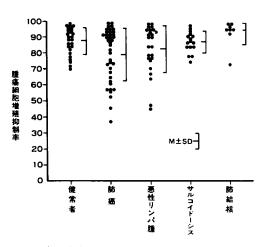


図3 各種疾患における単球の腫瘍細胞増殖抑制率

康人26例87.4±8.8%, 肺癌39例78.9±16.8%, 悪性リンパ腫25例82.5±15.1%、サルコイドー シス16例87.0±6.7%, 肺結核8例94.3±8.5% であった、各疾患患者と健康人との間および各 疾患間に有意差を認めなかったが、健康人の2 標準偏差値を下回る著明な低下例が肺癌患者で 11例(28%), 悪性リンパ腫4例(16%)に認め られた。しかしこの様な低下はサルコイドーシ スと肺結核ではみられなかった. 肺癌において 治療による影響を検討したところ(図4)、未治 療例31例では79.7±17.1%, 化学療法例6例で 83.9±14.5%, 放射線療法 3 例86.5±8.6%, 手 術例 4 例の平均は65.5±10.3%と各群間に差は なかった. 肺癌未治療例について組織型別(図 5),臨床病期別(図6)に検討すると、扁平上皮 癌 9 例で81.0±11.7%、小細胞癌 5 例で79.5± 20.9%, 腺癌17例で78.9±19.3%であり, I期 6例83.0±10.3%, Ⅱ期4例81.7±15.5%, Ⅲ 期5例74.4±30.8%、Ⅳ期16例79.6±15.4%で 組織型、病期共に各群間に有意な差はみられな かった。また低下例数においても同様に各組織 型、病期において有意な傾向はみられなかった。 次に、未治療肺癌患者で同時に検査し得た他の 単球機能, 即ち単球数, 走性, 貪食能, β-ga(標的細胞: EBC-1細胞)

〗 健常者 M±SD

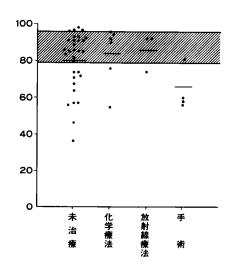


図 4 肺癌患者単球の腫瘍細胞増殖抑制率 治療の影響

変 健常者

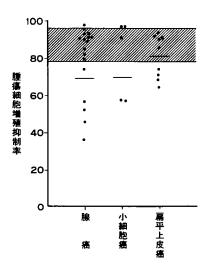


図5 肺癌患者単球の組織型別腫瘍細胞増殖抑制率 lactosidase 活性と腫瘍細胞増殖抑制作用との 関係をみた.しかし、HeLa 細胞、EBC-1細胞 のいずれを標的細胞とした場合も、腫瘍細胞増 殖抑制率と他の4種類の機能との間に有意な相 関は見られなかった.

(標的細胞:EBC-1細胞)

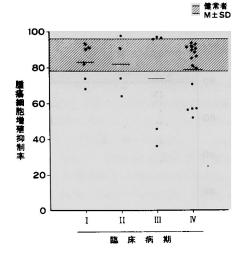


図6 肺癌患者単球の臨床病期別腫瘍細胞増殖抑制率

考 按

網状内皮系 (網内系) が生体の抗腫瘍能に重 要な役割を果していることは古くから知られて いる. 即ち、担癌生体における網内系の機能の 低下は病勢, 転移, 治療効果に影響を及ぼすこ と6)7)、発癌と網内系活性との間に相関がみられ ること8)、網内系の賦活により移植腫瘍への拒 絶作用の増強がみられ、逆に抑制により低下が みられる⁹⁾¹⁰⁾ ことなどが指摘されている。さら に移植腫瘍、自然発生腫瘍共に病巣局所にマク ロファージの著明な浸潤がみられる事実から11)12) 腫瘍に対する網内系の免疫監視機構および抗腫 瘍作用において、そのエフェクター細胞として 単球ーマクロファージ系細胞が主要な役割を果 していると考えられる。しかし、これらの成績 の多くは動物実験におけるもので、ヒトにおい ては組織マクロファージの前駆細胞とされる末 梢血単球の純粋分離, 同定方法が困難なことも あって研究は十分でない13)14)15)16)

単球ーマクロファージ系細胞の腫瘍細胞傷害作用として腫瘍細胞溶解作用(cytolysis)および腫瘍細胞増殖抑制作用(cytostasis)が考えられ、in vitro での測定方法としては、従来、標的細胞とエフェクター細胞を混合培養して標的細胞の数、形態の変化をみる方法、トリパン

ブルー排除試験、³H-thymidine, ¹²⁵I-deoxy uridine 等の放射性標識物質の標的細胞への取り込み抑制をみる細胞増殖抑制試験、さらに予め標的細胞を ⁵¹Cr, ³H-thymidine 等にて標識してその溶出をみる細胞溶解試験が行なわれている。著者が予備実験として行なったところでは、数、形態の変化、トリパンブルー排除試験、腫瘍細胞溶解試験は単球の活性化処置なしでは抗腫瘍作用が弱く、各個体間に差をみつけることが困難であったが、³H-thymidine 取り込み抑制による細胞増殖抑制試験は反応が鋭敏であり、生体固有の単球の腫瘍細胞傷害能を検討するには有用な方法である。

単球ーマクロファージ系細胞の腫瘍細胞増殖 抑制作用の強さは、標的細胞によってかなりの 差がみられる。今回の著者の成績でも混合培養 時間を40時間, E/T 比を10:1と同条件にして も、その腫瘍細胞増殖制は HeLa 細胞では16.6 %, EBC-1細胞では87.4%と両細胞間に大きな 差がみられた. 腫瘍細胞傷害作用は腫瘍性増殖 する細胞に対してより顕著に認められるという 報告があることから10)、単球による増殖抑制に 対するこうした標的細胞の感受性の相違は、腫 瘍細胞自身の増殖速度に関係があるのではない かと考え, 他の若干の培養細胞株を用いた結果 と比較してみたが、標的細胞の増殖速度と傷害 作用の強さは必ずしも相関しなかった.(未発表). HeLa 細胞を標的細胞とした場合、各種疾患患 者のみならず対照健康人においてもその活性値 のバラツキが大きく,同一症例での再現性もや や乏しく, さらに E/T 比が高くないと活性値 が上昇しないことなどから、腫瘍細胞増殖抑制 試験の標的細胞としては HeLa 細胞は適当でな いと考えた、反対に、EBC-1細胞は健康人にお けるバラツキも小さく, 再現性も良く, E/T比 10:1と小さくとも高い活性値が得られること から標的細胞に適していると考えた。以上の結 果から、最適条件として標的細胞としては EBC-1細胞を使用し、混合培養時間を40時間、³Hthymidine 添加培養時間を5時間、E/T比10: 1と設定して臨床例における腫瘍細胞増殖抑制 作用の検討を行なった.

肺癌患者の約30%に EBC-1 細胞に対する腫

瘍細胞増殖抑制作用の低下が認められ、また悪性リンパ腫患者においても16%に低下がみられたのに対し、肺結核、サルコイドーシス患者など非悪性腫瘍患者に低下例はみられなかった。即ち、末梢血単球の腫瘍細胞増殖抑制の低下は悪性腫瘍患者に特異的に多いことを示唆している。これら悪性腫瘍患者における腫瘍細胞増殖抑制作用に対する治療の影響を検討したが、一定の傾向はなかった。また臨床病期および組織型による差も認められなかった。

担癌患者の単球の腫瘍細胞傷害作用については、Thomas, Rら18)は肺癌と乳癌患者における増殖抑制作用の亢進を、Lemarbre. P14)らも同じく肺癌患者の増殖抑制および溶解作用の亢進を報告している。一方 Mantovani16)らは、卵巣腫瘍患者の腹水中のマクロファージおよび末梢血単球の細胞増殖抑制ならびに細胞溶解の両作用の低下を、さらに Kleinerman. E.Sら19)は担癌患者における単球の細胞傷害作用は低下しているが、化学療法によって正常化すると報け、化学療法によって正常化すると報け、とした患者の背景因子、あるいは検査方法の相違に起因するものかもしれない。事実、著者の検討した2種類の標的細胞による結果が必ずしも一致しなかったことからも推測できる。

肺癌患者における単球の腫瘍細胞増殖抑制作 用と他の単球機能との相関を検討したところで は、いずれの機能とも相関を見い出し得なかっ た、β-galactosidase 活性に関しては、本酵素 活性がマクロファージの活性化に伴なって上昇 し、腫瘍細胞増殖抑制作用に関与している可能 性を示唆する報告20)や、マクロファージが腫瘍 細胞に接触して lysosome を直接移入して細胞 傷害を惹起させるとする Hibbs²¹⁾の報告からあ る程度の相関も予想されたが、単球-マクロフ ァージ系細胞の活性化に伴なう lysosomal enzyme 群の酵素活性は、種類によって異なる動 態を示す事実も明らかにされており²⁰⁾, lysosomal enzyme 活性が細胞傷害に一義的に関わっ ているとは言い難い面もある。 貪食との関係は, 腫瘍細胞がマクロファージに貪食されるという 報告もあるものの²²⁾、サイトカラシンB等の貪 食阻害物質で腫瘍細胞傷害作用は阻止されない

ことなどから相互に独立した機能と考えられ²³; 両機能が直接的に関わっている事を確実に証明 し得た成績もみられない。また走性と細胞増殖 抑制作用との間にも相関は認められず、機能的 な関係を明らかにした報告も見当らない。

今回の成績では、肺癌、悪性リンパ腫患者において単球の腫瘍細胞増殖抑制作用の低下している症例が多くみられたが、良性疾患ではそうした傾向はみられなかった。この事実は、既に我々が発表している肺癌患者の単球走性、貪食能、β-galactosidase 活性等の低下とともに5,生体における発癌、腫瘍進展において不利に作用していることが考えられる。単球ーマクロファージ機能との関係、あるいは病巣部とかに、今後はさらに末梢血単球機能と組織マクロファージ機能との関係、あるいは病巣部と非病巣部のマクロファージ機能の差異等の検討を行なうことが重要であろう。

結 論

末梢血単球の腫瘍細胞増殖抑制作用を肺癌、悪性リンパ腫、サルコイドーシス、肺結核の各疾患患者について検討した。末梢血単球は無処置でも著明な腫瘍細胞増殖抑制作用を示した。扁平上皮肺癌由来細胞 EBC-1 細胞に対する単球の細胞増殖抑制作用は、肺癌患者の約30%、悪性リンパ腫患者の約16%に著明な低下がみられたが、サルコイドーシス、肺結核ではみられなかった。単球の腫瘍細胞増殖抑制作用と他の単球機能との間に有意な相関はみられなかった。以上より、担癌生体の単球ーマクロファージ系細胞の腫瘍細胞増殖抑制作用は低下傾向にあり、免疫監視機能や抗腫瘍能の低下の一因となっていることが推測された。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲をいただきま した木村郁郎教授に感謝いたします。

文 献

- 1. Evans, R., and Alexander, P.: Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity. Nature, 228, 620-622, 1970.
- Evans, R., and Alexander, P.: Mechanism of immunologically specific killing of tumour cells by macrophages. Nature 236, 168-170, 1972.
- 3. 高杉健太:ヒト末梢血単球の検討, 第2編. 悪性腫瘍患者における末梢血単球数と lysosomal enzyme の検討。岡山医学会雑誌, 92, 1131-1139, 1980.
- 4. 片岡幹男: ヒト末梢血単球走性に関する研究。第1編,単球走性測定法の検討。岡山医学会雑誌,93,489 -498,1981.
- 5. 中田安成, 片岡幹男, 山下二郎, 佐藤俊雄, 野田憲男, 中田康則, 平木俊吉, 大煛泰亮: 肺癌患者の末梢 血の単球機能異常について. 肺癌, 20, 293-299, 1980.
- 6. Stern, K.: Investigation on the reticuloendothelial function of cancer patients., *J. Lab. Clin. Med.* **26**, 809-817, 1941.
- 7. Eccles, S.A., and Alexander, P.: Macrophage content of tumors in relation to metastatic and host immune reaction. *Nature* 250, 667—669, 1974.
- 8. Stern, K.: Storage of Carmine in mice of inbred strains. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 67, 315-317, 1948.
- 9. Ballif, R.N.: Graduated loading of the reticulo-endothelium and growth rate of the Ehrlich mouse ascites tumor. *Cancer Res.* 16, 479-483, 1956.
- Diller, I.C., Mankowski, Z.T., and Fisher, M.E.: The effect of yeast polysaccarides on mouse tumors. Cancer Res. 23, 201-208, 1963.
- 11. Lubaroff, D.M., and Waksman, B.H.: Bone marrow as source of cells in reactions of cellular hypersensitivity. *Exp. Med.* 128, 1425—1435, 1970.
- 12. Loveren, H.V., and Otter, W.D.: Macrophages in solid tumors. I. Immunologically specific effector cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 1057-1060, 1974.
- Balkwill, F.R., and Hogg, N.: Characterization of human breast milk macrophages cytostatic for human cell lines. J. Immunol. 123, 1451-1456, 1979.
- 14. Lemarbre, P., Hoidal, J., Vesella, R., and Rinehart. J.: Human pulmonary macrophage tumor cell cytotoxicity. *Blood* 55, 612-617, 1980.
- 15. Vose, B.M.: Cytotoxicity of adherent cell associated with some human tumours and lung tissues. Cancer Immunol. Immunother, 5, 173-179, 1978.
- Mantovani, A., Savit, Z.B., Polentarutti, N., Brdignon, C., Sessa, C., and Manginni, C.: Natural cytotoxicity on tumour cells of human macrophages obtained from diverse anatomical sites. *Clin. Exp. Imm*unol, 39, 776-784, 1980.
- Hibbs, J.B., Lambert, L.H., and Resmington, J.S.: In vitro nonimmunologic destruction of cells with abnormal growth characteristic by adjuvant activated macrophages. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 139, 1049—1053—1972.
- Thomas, R., Dean, J.H., Richardson, G., Cannon, G.B., and Herberman, R.B.: Increased monocyte-mediated cytostasis of lymphoid cell lines in breast and lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 23, 768

 —776, 1979.
- Kleinerman, E.S., Zwelling, L.A., Howser, D., Barlock, A., Young, R.C., Decker, J.M., Bull, J., and Muchmore, A.: Deffective monocyte killing in patients with malignancies and restoration of function during chemotherapy. *Lancet* II, 1102-1105, 1980.

- 20. Keller, R., Keist, R., and Ivatt, R.J.: Functional and biochemical parameters of activation related to macrophage cytostatic effects on tumor cells. *J. Int. Cancer* 14, 675—683, 1974.
- 21. Hibbs, J.B.: Heterocytolysis by macrophages activated by Bacills Galmette-Guerin. Lysosome excytosis into tumor cells. *Scinence* 184, 468-471, 1974.
- 22. Carr, I., Underwood, J.C.E., McGinty, F., and Wood, R.: The ultrastructure of the local lymphoreticular response to an experimental neoplasm. *J. Pathol.* 113, 175—182, 1973.
- 23. Temple, A., Loewi, G., Davies, P., and Howard, A.: Cytotoxicity of immune Guinea-pig cells. II. The mechanism of macrophage cytotoxicity. *Immunolgy* 24, 655-669, 1973.

Studies on human peripheral monocyte-mediated cytotoxicity Part I. Monocyte-mediated cytostasis in malignant cells Jiro YAMASHITA

Second Department of Internal Medicine, Okayama University

Medical School, Okayama, Japan

(Director: Prof. I. Kimura)

The monocyte-mediated cytostatic acitivity against human tumor cells was measured in healthy donors and patients with bronchogenic carcinoma, malignant lymphoma, sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. The target cells employed were HeLa cells and squamous cell-type lung cancer derived EBC-1 cells. Cytostatic activity was measured by inhibition of ³H-thymidine uptake by target cells.

The mean value of monocyte-mediated cytostasis in HeLa cells was 46.4 \pm 11.8% in 18 healthy donors, 47.7 \pm 19.0% in 31 patients with bronchogenic carcinoma, 39.9 \pm 21.7% in 19 patients with malignant lymphoma, 46.2 \pm 17.7% in 14 patients with sarcoidosis, and 48.6 \pm 15.7% in 9 patients with pulmonary tuberculosis. The mean value of monocyte-mediated cytostasis in EBC-1 cells was 87.4 \pm 8.5% in 18 healthy donors, 78.9 \pm 16.8% in 39 patients with bronchogenic carcinoma, 82.5 \pm 15.1% in 25 patients with malignant lymphoma, 87.0 \pm 6.7% in 16 patients with sarcoidosis, and 94.3 \pm 8.8% in 8 patients with pulmonary tuberculosis.

No significant difference between healthy donors and patients with the above mentioned disorders was observed in the HeLa cell assay. But there were remarkably low activities, two standard deviations below the mean value of healthy donors, in 30% of the patients with bronchogenic carcinoma and 14% of the patients with malignant lymphoma in the EBC-1 cell assay. In lung cancer patients no significant positive correlation was observed between monocyte-mediated cytostatic activity and other monocyte functions. The data suggest that the tumor cell killing activity of peripheral monocytes was decreased in patients with malignant neoplasma.