

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

岡山大学第二内科学教室 (主任：木村郁郎教授)

高 杉 健 太

(昭和55年11月12日受稿)

Key words: 悪性腫瘍・末梢血単球数・
 β -ガラクトシダーゼ活性
ライゾゾーム酵素活性

緒 言

従来悪性腫瘍患者においては細胞性免疫能が低下しているとの報告は多いが、それらは主にリンパ球の面からの研究であった。近年動物実験においてはマクロファージが細胞性免疫に重要な役割を演じ、更に腫瘍細胞障害性をも有していることが判明している。又ヒトにおいては末梢血単球は組織マクロファージへの移行が考えられ、生体におけるその役割が注目をあびるようになった。著者は本編ではその末梢血単球の動態を悪性腫瘍患者を中心に検討したので報告する。

対象並びに方法

健康人例は本学職員で採血時になんら疾患を有しない者28名を選んだ。対象患者は当科に入院加療を行った症例で、原発性肺癌60例・悪性リンパ腫28例、その他の悪性腫瘍17例、サルコイドーシス13例である。いづれの症例も診断は細胞学的及び組織学的に確定されたものである。肺癌患者の組織学的分類では腺癌22例、扁平上皮癌15例、小細胞癌20例、大細胞癌3例であった。日本肺癌学会病期分類¹⁾でみると、I期7例、II期10例、III期43例であった。悪性リンパ腫患者の組織型は、ホジキン病7例、リンパ肉腫7例、細網肉腫14例であった。Ann Arberの病期分類²⁾ではI期1例、II期2例、III期12例、IV期13例であった。その他の癌の内訳は胃

癌9例、腎癌2例、胆管癌2例、子宮癌2例、肝癌1例、膵癌1例であった。治療効果判定は肺癌では胸部レ線、腫瘍影の全く消失したものを完全退縮、腫瘍影の長径と短径の積が50%以上退縮したものを部分退縮、50%以下の退縮を無効とした。悪性リンパ腫においては触知可能なリンパ節が完全に退縮したものを完全寛解、リンパ節の長径と短径の積が50%以上縮小したものを部分寛解、50%以下の縮小を無効とした。

方 法

末梢血単球数の測定：末梢血塗抹標本を May-Giemsa, Peroxydase の重染色後、検鏡にて白血球500個を分類し、単球の百分率を求め、コーンターカウンターにて計測した白血球数に乗じて求めた。

β -galactosidase 染色：ヘパリン加にて静脈血2ml採取後、6%デキストラン (Sigma社) 0.2ml 加え30分静置後、白血球浮遊層をとり遠沈後沈渣の塗抹標本を作製する。標本は25%グルタルアルデヒドで1分固定後、あらかじめ調製した染色液で18時間染色し、メタノール、ホルマリン、氷酢酸 (20:2:1) 混合液で1分間固定後、検鏡にて β -galactosidase 陽性顆粒をもつ単球の百分率を算定した。染色液は Pearson B³⁾ の方法に準じ、5-Bromo-4-Chloro-3-Indoryl- β -D-galactopyranoside (Sigma社) 2mg, N.N-Dimethylformaldehyde 0.5ml, pH 5.4酢酸緩衝液31ml, 生食0.5ml, Spermidine-

HCl 8 mg を混合して調製し、1 M Potassium Ferocyanide. 1M Potassium Fericyanide の各各 3 ml を上記調製液に加えた。

成 績

健常人28例の末梢血単球数(図1)は $298.6 \pm 144.1/\text{cmm}$ (平均値±標準偏差)であった。肺癌60例では $296.3 \pm 176.8/\text{cmm}$ 、悪性リンパ腫28症例で $315.6 \pm 160.0/\text{cmm}$ 、その他の悪性腫瘍17例で $303.8 \pm 123.5/\text{cmm}$ であった。サルコイドーシス13例では $217.8 \pm 89.6/\text{cmm}$ であった。以上の成績はすべて未治療時のものである。悪性腫瘍症例の末梢血単球数は平均値でみれば健常人に比較して差は認められないが、 $100/\text{cmm}$ 以下の低値を示すものは肺癌8例と悪性リンパ腫の1例であり、健常人、サルコイドーシス例には1例もみられなかった。

肺癌における臨床病期別にみた単球数は、I

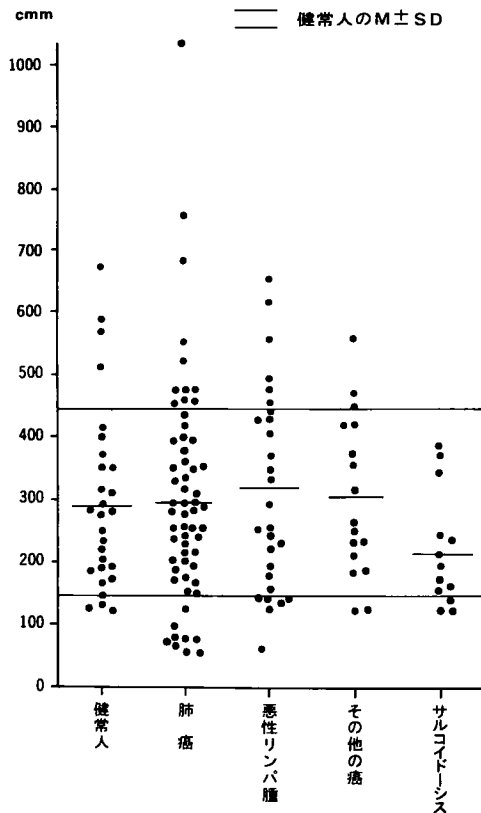


図1 各種疾患における末梢血単球数

期7例で $331.7 \pm 103.7/\text{cmm}$ 、II期10例で $414.5 \pm 265.2/\text{cmm}$ 、III期43例で $264.5 \pm 131.2/\text{cmm}$ であり(図2)、III期症例において減少傾向がみられた。組織型別に単球数を検討すると、腺癌

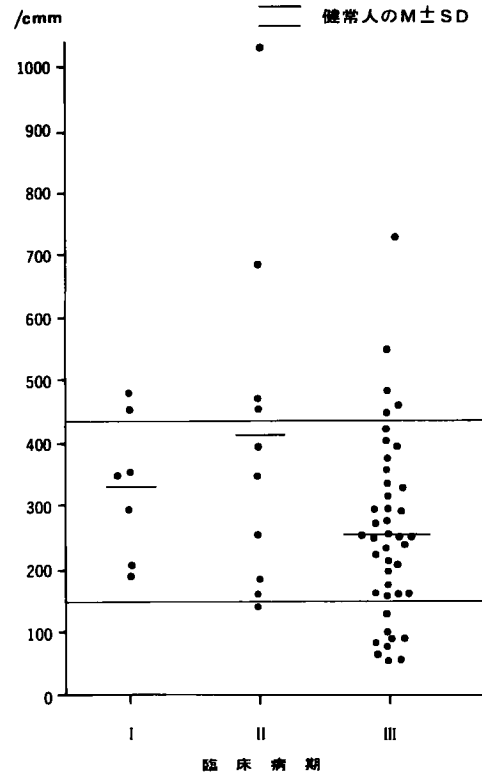


図2 臨床病期別にみた肺癌症例の末梢血単球数

22例で $309.7 \pm 224.3/\text{cmm}$ 、扁平上皮癌15例で $314.2 \pm 133.3/\text{cmm}$ 、小細胞癌20例で $255.5 \pm 125.5/\text{cmm}$ 、大細胞癌3例で $282.3 \pm 152.3/\text{cmm}$ であり(図3)、組織型による差は認められなかった。

肺癌症例中、非特異的免疫療法剤と考えられる溶連菌製剤 OK-432, 0.5K.E/日, 1週間連続に単独投与された8例につき、本剤投与による単球数への影響を検討した(図4)。8例中7例に溶連菌製剤投与後に単球数が増加した。平均値においても投与前 $315.7 \pm 107.7/\text{cmm}$ に対して投与後 $484.9 \pm 267.0/\text{cmm}$ と増加がみられた。

当教室にて肺癌患者に対して施行している合併化学療法である COMP 療法(Cyclophosphamide, Oncovin, Methotrexate, Procarbazine)

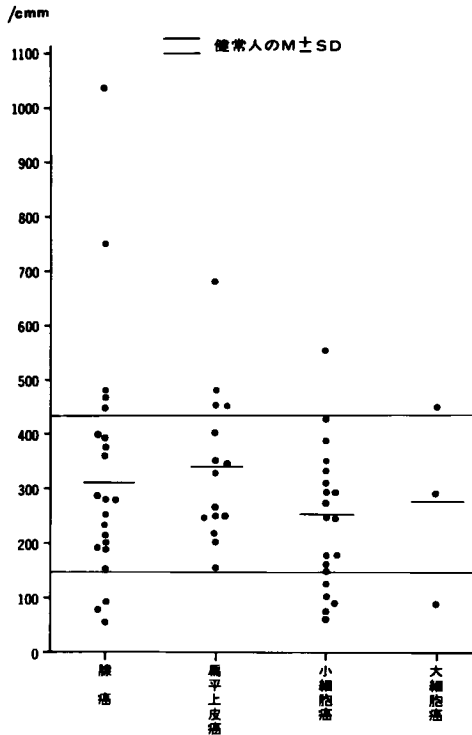


図3 組織型別にみた肺癌症例の末梢血単球数

を施行した22例につき初回治療の直前、1週後、2週後、3週後、4週後の単球実数の変動について検討した(図5)。治療前 302.8 ± 144.6 /cmm、1週後 102.3 ± 65.6 /cmm、2週後 221.9 ± 123.8 /cmm、3週間後 340.7 ± 159.5 /cmm、4週後 399.5 ± 276.1 /cmmであり、単球数は1週後に治療前に比して有意に減少 ($P > 0.001$) を来し、2週後には増加をはじめ、3週後には治療前の値にまで回復を示した。4週後には正常値をはるかに越えるいわゆる over shoot 現象がみられた症例もあった。同時に算定した末梢血白血球数(図6)では治療前で平均 6968.2 /cmm、1週後 4754.4 /cmm、2週後 3046.5 /cmm、3週後 4450.0 /cmm、4週後 6863.6 /cmmであった。即ち白血球数は治療後2週目に最も減少しており、4週目に治療前の値に回復を示した。同様に検討した末梢血リンパ球数は白血球と同様な動きを認めた。

COMP療法を施行した肺癌症例について治療効果別に未治療時の単球数について検討した

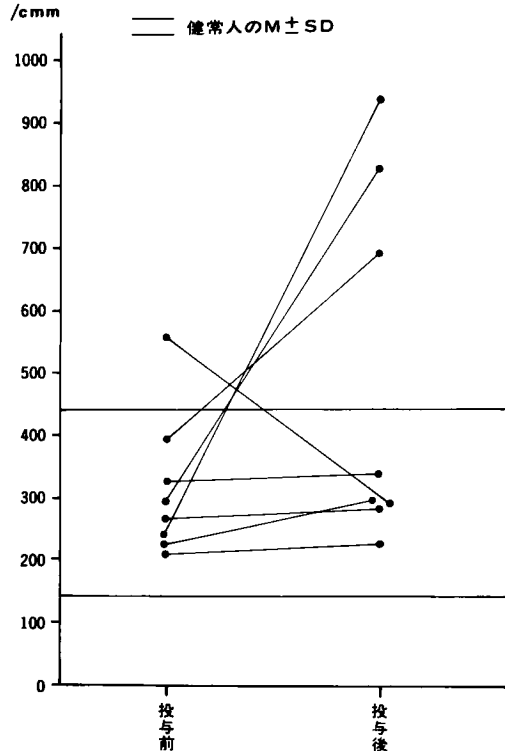


図4 ピシバニール投与前後でみた肺癌症例の末梢血単球数

(図7)。完全退縮例4例で 211.0 ± 110.0 /cmm、部分退縮例14例で 224.5 ± 93.8 /cmm、不変例25例で 310.4 ± 141.6 /cmmであった。治療施行後に単球数の増加が認められたのは、完全退縮を示した4例全例(100%)と、部分退縮14例中7例(50%)、不変25例中11例(44%)であった。なおこの治療後の値とはCOMP投与後3週後のもので化学療法剤の直接的影響が消失した時点での測定値である。

悪性リンパ腫症例の単球数を臨床病期別に検討すると、I期1例 475.0 /cmm、II期2例 150.5 /cmm、III期12例 348.7 ± 168.8 /cmm、IV期13例 310.8 ± 142.3 /cmmであり臨床病期による差は認められなかった。更に組織型別に検討したところホジキン病7例 252.1 ± 177.2 /cmm、リンパ肉腫7例 378.6 ± 203.4 /cmm、細網肉腫14例 345.0 ± 165.1 /cmmであり、単球数と組織型との間に有意な相関は認められなかった。治療効果別により単球の変動を検討すると、完全寛解16

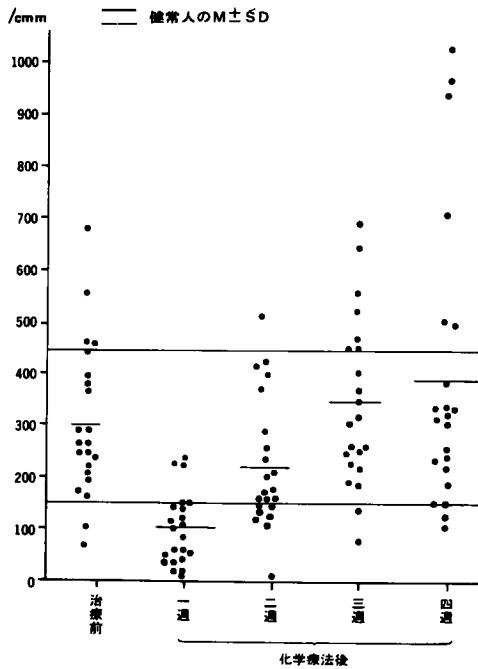


図5 肺癌症例末梢血単球の化学療法による影響

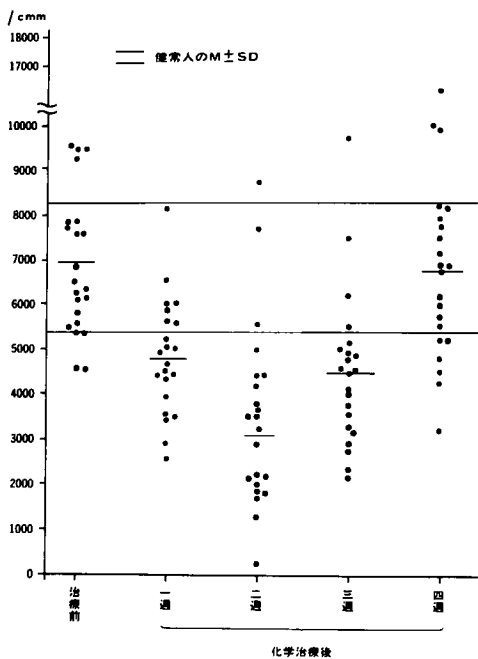


図6 肺癌症例末梢血白血球の化学療法による影響

例中9例(56.2%), 部分寛解4例中1例(25.0%)に治療後に治療前に比して増加がみられ,

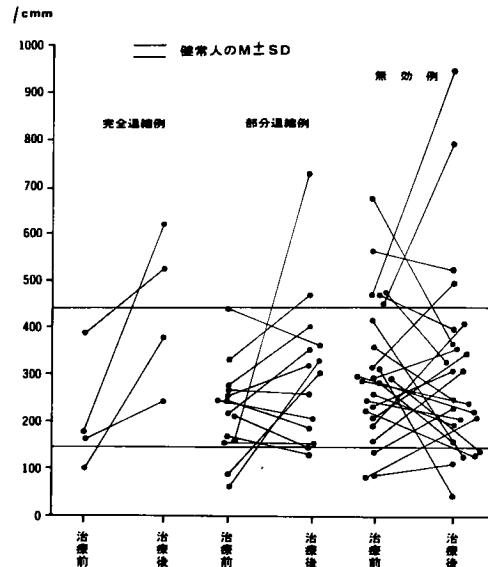


図7 治療効果別にみた肺癌症例の治療前後における末梢血単球数の推移

無効例では2例とも減少を示した。

健常人14例の末梢血単球の β -galactosidase 陽性細胞率は $33.7 \pm 12.1\%$ で、肺癌32例で $23.1 \pm 11.8\%$ 、悪性リンパ腫18例で $20.1 \pm 7.5\%$ 、その他の癌13例で $19.1 \pm 6.8\%$ であった(図8)、肺癌、悪性リンパ腫、その他の癌患者はいづれも健常人に比して有意な低下がみられた。

肺癌患者において臨床病期別に末梢血単球の β -galactosidase 陽性細胞率を検討した。I期5例 $24.1 \pm 11.9\%$ 、II期1例 33.9% 、III期26例 $22.5 \pm 11.8\%$ であった。各病期間に有意の差はなかった。これを組織型別にみると腺癌11例で $21.4 \pm 11.1\%$ 、扁平上皮癌14例 $23.8 \pm 9.8\%$ 、小細胞癌6例 $21.3 \pm 13.5\%$ 、大細胞癌1例 47.1% であった。組織型による特異性は認められなかった。肺癌症例におけるCOMP療法の単球 β -galactosidase 陽性細胞率に及ぼす直接的影響についてみると、COMP療法前では $23.2 \pm 11.5\%$ 、治療後1週目では $21.6 \pm 6.9\%$ であり化学療法実施による直接的変動は認められなかった。

悪性リンパ腫症例において臨床病期別に末梢血単球の β -galactosidase 陽性細胞率を比較した。I期1例 32.0% 、II期2例 10.5% 、III期5

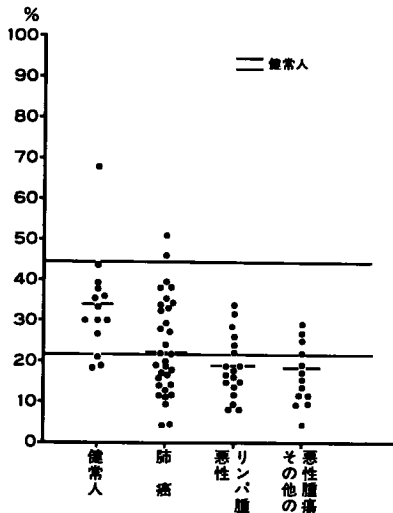


図8 各種疾患における末梢血単球のβgalactosidase陽性細胞率

例17.4±4.3%, IV期10例18.3±7.6%であり病期による差は認められなかった。組織型別にみるとホジキン病5例17.0±8.5%, リンパ肉腫6例19.1±6.8%, 細網肉腫7例19.1±6.8%となり組織型別による陽性率の差は認められなかった。

考 案

悪性腫瘍患者における細胞性免疫能の低下の報告は枚挙にいとまがない。しかし従来これらの免疫能の低下は主としてリンパ球機能の低下としてとらえられてきた。しかし肺癌、乳癌⁴⁾、ホジキン病⁵⁾の末梢血単球はこれら患者リンパ球のPHA刺激による幼若化反応において抑制的に作用していることが報告され、悪性腫瘍患者リンパ球の機能低下の原因のひとつに単球異常が関与していると考えられる。また担癌患者の末梢血単球の走性は健常人に比して低下しており、走性の低下が予後不良因子のひとつとも報告されている⁶⁾。さらに生体において末梢血単球は食菌作用の他に腫瘍細胞に対し直接的に殺細胞作用⁷⁾あるいは腫瘍細胞の増殖抑制作用⁸⁾⁹⁾が認められている。これらの事実から近年担癌患者における末梢血単球の動態が注目されるようになった。今回著者は肺癌、悪性リンパ腫患者を中心として末梢血単球の数および水解酵素

の変動を検討した。

単球数は平均値でみると肺癌、悪性リンパ腫あるいはその他の癌症例では健常人と比較して差は認めなかった。しかし単球数が100/cmm以下と著明な減少を示した症例は肺癌、悪性リンパ腫にのみ認められて健常人、非悪性腫瘍症例には認められず、高度の単球減少は悪性腫瘍患者にのみ観察された。文献的にはBarett, Oら¹⁰⁾は乳癌、消化器癌において、Moldow, R.E.ら¹¹⁾は膵臓癌において、Meuret, Gら¹²⁾はホジキン病において単球数の増加を報告している。一方動物実験においても腫瘍を移植すると一過性に単球数の増加がみられ、腫瘍切除にて正常化するとの報告もある¹³⁾。しかしKjeldsberg, C.R.ら¹⁴⁾は肺癌、前立腺癌においては単球数に異常はないと述べ、更に前述のMeuret, Gらも細網肉腫、リンパ肉腫においては単球数は正常値であると述べている。そしてCarrie, G.Aら¹⁵⁾は悪性メラノーマにおいて単球数は健常人と差が認められないが、単球中のマクロファージ前駆細胞の減少を認め、担癌患者の単球異常は量的なものよりも質的なものであろうと述べている。以上の如く担癌患者における単球数の異常については諸家の意見のわかれるところである。

その原因としてはまず各種細菌感染症の合併の有無であるが、今回の著者の対象症例には臨床上感染症状の認められた症例は除去した。また抗癌剤をはじめとする薬剤投与の影響も未治療症例のみの成績であるので除外出来る。病期による影響をみると、肺癌及び悪性リンパ腫症例いづれにおいてもI, II期の限局期症例に比して、III期以上の進展期症例に単球減少傾向が認められた。また組織型による差は肺癌においても悪性リンパ腫においても認められなかった。健常人においては性別、年齢の差も報告されている¹⁶⁾ので考慮しなければならぬ。更に技術的な問題として単球とリンパ球の鑑別が必ずしも容易でない場合が少なからずあるが、著者はPeroxidaseとの重染色を併せ行い、単球の鑑別には殊に注意を払った。

肺癌患者において末梢血単球数の抗癌剤投与に対する影響をみてみると、抗癌剤投与後1週

目に激減し、3週目には治療前値に回復した。同時に算定した末梢血白血球数、リンパ球数は治療後2週目に最低値をとり、4週目に初めて治療前値に復した。即ち単球は他の白血球成分に比して抗癌剤投与によりすみやかに減少するが回復も早かった。このことは単球の bone marrow compartment transit time が54時間で、peripheral blood compartment transit time が32時間であり^{17),18)}、顆粒球のそれはおのおの347時間、9.5時間である^{19),20)}ことに関連していると考えられる。即ち抗癌剤投与により幼若型単球が障害されても、単球が骨髓から末梢血に出現するまでに要する時間が顆粒球のそれよりも短いために末梢血単球数の回復がよりはやいと考えられた。

治療による単球数の推移をみると、治療効果のあがった症例は治療後も単球の減少はみられず、治療無効例に減少する症例が多かった。このことは悪性腫瘍加療中に各種感染症を伴うことがしばしばであり、単球が細菌をはじめ真菌の感染防禦に重要な働きをして²¹⁾²²⁾充分なる化学療法の実施を可能ならしめた為に治療効果が上ったと考えられる。さらに単球自体の抗腫瘍細胞作用も考えられる。しかし治療前の末梢血単球数と予後との間に関連は認められなかった。

従来リンパ球系細胞の賦活剤として使用されているピシバニールの単球に及ぼす影響を検討したところ、肺癌8例中7例に投与後末梢血単球の増加がみられた。従って本剤は単球に対しても賦活作用の存在が窺われた。

異物の貪食消化が重要な機能のひとつである単球やマクロファージは豊富な水解酵素やライゾゾーム酵素を含有している²³⁾。 β -galactosidase はライゾゾーム酵素のひとつであり、網内系の細胞、小腸の細胞に認められ、³⁾、食細胞

の貪食能、感染の防禦に強く関与し、単球食細胞中の本酵素の増加は食細胞の活性化を示す指標のひとつとなり得ることが判明している。そこで患者末梢血単球の本酵素を染色し単球の活性化の指標とした。しか肺癌、悪性リンパ腫及びその他の悪性腫瘍症例では健常人に比して、臨床病期、組織型にかかわらず有意に低下していた。志摩ら²⁴⁾も同様に肺癌患者の単球 β -galactosidase 活性の低下を報告している。また β -galactosidase 陽性細胞率は抗癌剤投与にても直接的に影響をうけることはなかった。

以上、悪性腫瘍患者における末梢血単球は数量的には健常人に比して有意の差は認められなかったが、質的に機能の低下がみられ、機能的低下が担癌宿主における腫瘍排除に対して負の働きをしていることが推察された。

結 論

- 1) 肺癌、悪性リンパ腫患者末梢血単球は進展期症例に減少傾向を認めたものの、数量的にはあまり異常が認められなかった。
- 2) 抗癌剤投与により他の白血球成分に比して早期に減少するが、回復も早かった。
- 3) 抗癌剤投与を重ねても回復力が早くかつ、治療前よりも増加していく症例は予後が良好であった。
- 4) 免疫賦活剤である溶連菌剤 OK-432 の投与は末梢血単球数の増加を来し、単球系への賦活作用がうかがわれた。
- 5) 単球活性化の示標として β -galactosidase 活性を検討したが、悪性腫瘍患者では健常人に比して有意な活性の低下が認められ、担癌患者において単球の機能低下が窺われた。
- 6) 即ち担癌生体における末梢血単球は数量的には異常を認めないが、質的に異常が認められた。

文 献

1. Ishikawa, S.: Staging system on TNM classification for lung cancer *Jap. J. Clin. Oncol*, **6** : 9—30, 1973.
2. Carbone, P.P. Kaplan, H.S. Musshoff, K. Smithers, D.W. and Tubiana, M.: Report of the Committee on Hodgkin's Staging Classification. *Cancer. Res.* **31**, 1860—1861, 1971.
3. Pearson, B. Wolf, P.L. and Vazquez, J.: A comparative study of a series of new indolyl compounds to localize β -galactosidase in tissue. *Lab. Invest.* **12**, 1249—1259, 1963.
4. Jerrells, T.R. Dean, J.H. Richardson, G.L. McCoy, J.L. and Herberman, R.B.: Role of suppressor cells in depression of *in vitro* lymphoproliferative responses of lung cancer and breast cancer patients. *J. Natl. Cancer. Inst.* **61**, 1001—1009, 1978.
5. Geraldine, P. Schechter, R. and Soehnen, F.: Monocyte-mediated inhibition of lymphocyte blastogenesis in Hodgkin Disease. *Blood*, **52**, 261—271, 1978.
6. Synderman, R. and Pike, M.: Disorder of leukocyte chemotaxis. *Pediat. Clin. North. Am.* **24** : 377—393, 1977.
7. Levine, A.C. Massey, R. and Deinhardt, F.: Spontaneous human mononuclear cell cytotoxicity to cultured tumor cells: Reproducibility of serial measurement with the use of a chromium-51-release microcytotoxicity assay. *J. Natl. Cancer Int.* **60**, 1283—1294, 1978.
8. Manovani, A. Jerrells, T.R. Dean, J.H. and Heberman, R.B.: Cytolytic and cytostatic activity on tumor cells of circulating human monocytes. *Int. J. Cancer.* **23**, 18—27, 1979.
9. Rinehart, J.J. Vessella, R. Lange, R. Kaplan, M.E. and Germus, B.J.: Characterization and comparison of human monocyte and macrophage-induced tumor cell cytotoxicity. *J. Lab. Clin. Med.* **93**, 361—369, 1979.
10. Barret, C.O.: Monocytosis in malignant disease. *Ann. Int. Med.* **73**, 991—992, 1970.
11. Moldow, R.E.: Monocytosis in malignancy, *Ann. Int. Med.* **74**, 449—1971.
12. Meuret, G. Schmitt, E. Tseleni, S. and Widmer, M.: Monocyte production in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Blut.* **37**, 193—200, 1978.
13. Eccles, S.A. Bandlow, G. and Alexander, R.: Monocytosis associated with the growth of transplanted syngeneic rat sarcoma differing in immunogenity. *Br. J. Cancer* **34**, 20—27, 1976.
14. Kjeldsberg, C.R. and Ray, G.D.: A qualitative and quantitative study of monocytes in patients with malignant solid tumors. *Cancer* **41**, 2236—2241, 1978.
15. Currie, G.A. and Hedley, D.M.: Monocytes and macrophages in malignant melanoma. I. Peripheral blood macrophage precursors. *Br. J. Cancer* **36**, 1—6, 1977.
16. Munan, L. and Kelly, A.: Age-dependent changes in blood monocytes in man. *Clin. Exp. Immunol.* **35**, 161—162, 1979.
17. Meuret, G.: Human monocytopoiesis *Exp. Hematol* **2**, 238—249, 1974.
18. Furth, R.V. and Disselhoff, D.D.: The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *J. Exp. Med.* **132**—823, 1970.
19. Cartwright, G.E. Athens, J.W. and Wintrobe, M.M.: The kinetics of granulopoiesis in normal man. *Blood* **24**, 780—803, 1964.
20. Donohue, D.M. Gabrio, B.W. and Finch, C.A.: Quantitative measurement of hematopoietic cells of the marrow. *J. Clin. Invest.* **37** : 1564—1570, 1958.
21. Davis, W.C. Huber, H. Douglas, S.D. and Fudenberg, H.H.: A defect in circulating mononuclear pha-

- gocytes in chronic granulomatous disease of childhood. *J. Immunol.* 101, 1093—1098, 1968.
22. Rodey, G.E. Park, B.H. Windhorst, D.B. and Good, R.A.: Defective bactericidal activity of monocytes in fatal granulomatous disease. *Blood* 33, 813—820, 1969.
23. Dannenberg, A.M. Burstone, M.S. Walter, P.C. and Kinsley, J.W.: Histochemical study of phagocytic and enzymatic function of rabbit mononuclear and polymorphonuclear exudate cells and alveolar macrophages. *J. Cell. Biol.* 17, 465—486, 1963.
24. 志摩清, 樋口定信, 岳中耐夫, 津田富康, 渡辺春海, 徳臣晴比古: 肺癌患者の流血中 Monocyte の β -galactosidase および多核白血球 NTB test. 癌の臨床 21, 1308—1312, 1975.

Monocytes in patients with malignant diseases

Part 2

Kenta TAKASUGI

Department of Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. I. Kimura)

Absolute peripheral blood monocyte counts and the β -galactosidase activity of monocytes were studied in 60 patients with lung cancer, 20 with malignant lymphoma, 17 with other malignant diseases, 13 with sarcoidosis and 28 normal individuals. The monocyte count was $296.3 \pm 176.8/\text{cmm}$ in lung cancer, $315.6 \pm 160.0/\text{cmm}$ in malignant lymphoma, $217.8 \pm 89.6/\text{cmm}$ in sarcoidosis, and $298.6 \pm 144.1/\text{cmm}$ in normal individuals. Although there was no significant differences in the monocyte count of malignant and non-malignant diseases, all patients with lung cancer or malignant lymphoma had monocyte counts less than 100/cmm. In patients with lung cancer and malignant lymphoma, there was no significant differences in histological types or clinical stages. The monocyte count in lung cancer patients treated with streptococcal agent OK-432 was elevated to $484.9 \pm 269.0/\text{cmm}$, as compared with $315.5 \pm 107.7/\text{cmm}$ before administration. A nadir of monocyte counts was found at one week after combination chemotherapy but recovery to normal value was observed by 3 weeks after. On the other hand, white blood cell counts reached a nadir 2 weeks after chemotherapy and recovered by 4 weeks after.

The percentages of β -galactosidase positive monocytes were $21.5 \pm 11.5\%$ in patients with lung cancer, $20.1 \pm 7.5\%$ in malignant lymphomas, $19.1 \pm 6.8\%$ in other malignant diseases and $25.3 \pm 12.4\%$ in normal individuals. There was no significant differences in β -galactosidase activity related to histological types or clinical stages of patients with lung cancer and malignant lymphoma. No changes in β -galactosidase activity were found between before and after combination chemotherapy.