頭頸部癌における免疫学的応答

第 2 報

— 腫瘍摘出前後の動向 —

河原田 和夫

Immunological Response in Patients with Head and Neck Cancer. II. Parametric Changes before and after Operation.

Kazuo Kawarada

(Shinshu University)

As possible indicators in carcinoma-affected individuals, the following parameters were adopted: 1) The ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) activity, 2) The rate of active E rosette formation and 3) *in vitro* PPD.

Examination was made with respect to these parameters on the pre- and post-operative changes in 5 patients with laryngeal carcinoma and ethmoid sinus carcinoma.

Although no particular changes were noted in the first two parameters, there was a tendency that PPD negatives turned positive postoperatively.

は じ め に

担癌個体における免疫学的パラメーターとして、血清やリンパ球を用いたものが多用されており、そのいくつかは日常診療にもとり入れられている。著者は、細胞性免疫の動向を把握しようとした観点から、前報¹⁾においてヒト末梢血リンパ球に関しての1) active E ロゼット形成率²⁾(以下 act E と略す)と2) 試験管内ツベルクリン反応³⁾ (*in vitro* purified protein derivative of tuberculin 以下 PPD と略す)を用いて、頭頸部腫瘍患者の経過を観察し、末期にいかなる変動を示すか検討した。

本報においては、上期のふたつのパラメーターのほかに、ADCC (Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity 以下 ADCC と略す)をパラメーターのひとつに加え、腫瘍摘出前後にいかなる変動を示すか検索した。その結果、act E と ADCC については、特定の傾向を示しえなかったが、PPD に関しては、腫瘍摘出後、陽性の傾向を示した。そのことから、PPD については、パラメーターとしての役割があると考え、若干の考察を加え報告する。

対象および方法

対象は、表1に示した5例であるが、信州大学医学部附属病院耳鼻咽喉科で、1979年4月から1980年の6月までの間治療を行っている。いずれの症例の腫瘍摘出は、1979年10月から1980年3月までの間に行なわれている。この間の検査は、月2～4回行っているが、図示してあるのは、その一部である。治療に関しては、腫瘍摘出のほかに、摘出前に4000～7000radの照射を行っている。化学療法は行っていない。

検査項目は、act E, PPD および ADCC であるが、次の様に行った。

active E ロゼット形成率：

橘ら⁴⁾の方法にもとづき、羊赤血球および牛胎児血清をふくむヒトリンパ球微量測定用キット (JIMCO T-1, 日本抗体研究所KK) を用い、ヘパリン加静脈血 2ml から得たリンパ球浮遊液を 10^6 個/ml に調整し、マイクロプレート上で、附着、反応 (反応温度 4°C 、反応時間 2時間)、固定染色を行い、E ロゼット形成細胞数を算出した。active E ロゼット形成は、E ロゼット形成と全く同様の方法であるが、反応温度のみ、 4°C ではなく 37°C とした。active E ロゼット形成率は、E ロゼット形成細胞数を分母に、active E ロゼット形成細胞数を分子として、百分率で算出した。

in vitro PPD：

原法³⁾を簡易にし、次の様に行った。ヘパリン加静脈血 2ml とツベルクリン一般診断 (20人) 用 0.2ml ($0.1\mu\text{g}$) を、小口径試験管 (9mm 直径) に入れ、200g 5分遠心後、 37°C 、24時間保温したあと、buffy coat にみられる aggregation による clump を観察した。clump が明らかなもの (+), ないもの (-), はっきりしないもの (±) とした (図1)。

ADCC Assay：

Perlmann⁵⁾らのプラークアッセイ法に依拠し、羊赤血球を標的細胞としている ADCC Assay Reagents (日本抗体研究所KK) を用

い、次の様に行った。

a) リンパ球の分離調整：ヘパリン加静脈血 3ml に、単球除去用試薬 (KAC-2) を10分の1量加え、転倒混和し、 37°C 1時間培養後、あらかじめリンパ球分離試薬 (SMF) を入れておいた小試験管に静かに重層した。室温30分、2,300rpm で遠心したあと、中間層のリンパ球分画を別の小試験管にあつめ、リン酸緩衝生理食塩水 (以下PBSと略す) を加え、パラフィルムで封じ、試験管を転倒混和したあと、1,200rpm 10分遠心した。上清をすてPBSを加え、同様のことを再度行ったあと、最後に

図1 in vitro PPD

左側より対照++±の順である

図2 プラークアッセイ法による ADCC 活性の測定

1,000rpm 10分遠心し、HEPES (Hydroxyne ethyl pyperagine ethan sulfomic acid) 加培養液で 2×10^6 個/ml に調整した。

b) 標的細胞の洗浄：標的細胞 (羊赤血球) (図2) 1×10^6 個/ml, 1ml を試験管にとり P B S 7ml 加え転倒混和し、2,000rpm 10分遠心し、上清をすて再度 P B S を同量加え、2,000rpm 10分遠心し、完全に上清を除去した後 P B S 1ml に再浮遊した。

c) 標的細胞の単層付着：浮遊した標的細胞 (羊赤血球) をマイクロシリンジにとり、10μl ずつマイクロテストプレートの各孔に静かに加えたあと、プレート専用ホルダーにセットし、1,500rpm 10分遠心し、P B S 溶液中で約1時間静置し、検鏡により単層付着を確認した。

d) リンパ球-抗体懸濁液の調製：調整したリンパ球懸濁液 (HEPES 加培養液) 2×10^6 個/mlの100μl と抗標的細胞抗体 (anti SRBC IgG) に HEPES 加培養液 0.6ml 加えたものの

うち 100μl と 1 対 1 で混和した。対照として、リンパ球懸濁液と HPES 加培養液を 1 対 1 で混和したものをを用いた。

e) プラーク形成：標的細胞を付着させたマイクロテストプレートに、リンパ球-抗体懸濁液2μl、対照としての HEPES 加培養液 2μl を入れ、37℃ 3時間培養した。その後あらかじめ調整した固定封入染色液 (固定封入液を80℃で加熱溶解し、固定染色液を加熱せずに等量加え混和したもの) をパスツールピペットで1滴ずつ各孔に入れ、37℃15分培養静置した。その後4℃一夜放置し、プレートを反転し、各孔のプラーク形成細胞数を光学顕微鏡で観察した。

f) プラーク形成判定：検鏡の際、1孔につき300個のリンパ球をかぞえ、そのうちのプラーク形成細胞数を把握し、次のように算出した。

$$\text{プラーク形成率 (\%)} = \frac{\text{プラーク形成細胞数}}{300} \times 100$$

症

対象とした症例の臨床経過 (大要) は、下記に述べるが、検査値の主な動向については表1としてまとめている。

症 例 1：25才 女 右篩骨洞腫瘍 (T3 NOMO)

初 診 1979年11月5日鼻出血および髄液漏出あり、他医の紹介で来院。初診時、右鼻腔内は、腫瘍 (扁平上皮癌) で充満していた。放射

例

線照射後、腫瘍の摘出および頭蓋底廓清 (1980年3月6日) を行った。

検査値の動向 (図3) ADCC, act E に関しては、特定の傾向を示さなかったが、PPD については、術前陰性傾向であったのに対し、術後は陽性となった。

症 例 2：56才 女 右篩骨洞腫瘍 (T2 NOMO)

表1 腫瘍摘出後のパラメーターの動向

症 例	A D C C	active E ロゼット 形成率	<i>in vitro</i> PPD
1 篩骨洞腫瘍	—	—	+
2 篩骨胞腫瘍	—	—	+
3 喉頭腫瘍	—	—	—
4 喉頭腫瘍	—	+	—
5 喉頭腫瘍	+	—	+

(+ 摘出後上昇傾向あり)
(— 摘出後上昇傾向なし)

図3 穂○敏○ 25才女 篩骨洞腫瘍

初 診 1970年1月5日

鼻出血がしばしばみられ、他医で鼻腔腫瘍を指摘され来院。篩骨胞および中鼻道の一部に局限した腫瘍（扁平上皮癌）で、放射線治療後、経上顎洞にて腫瘍を摘出（1979年10月22日）した。

検査値の動向（図4）ADCC とact E は、特定の傾向を示さなかったが、PPDは、術前陰性傾向、術後陽性傾向であった。

症 例 3：71才 男 喉頭腫瘍

（T3 NOMO）

初 診 1979年6月9日

1年前から嗄声あり。喉頭声門部腫瘍（扁平上皮癌）のため、照射（2,600r）後、喉頭を摘出（1979年10月19日）した。

検査値の動向（図5）ADCC の変動が手術とは無関係に大きかったのに対し、act E と

図4 55才女 篩骨洞腫瘍

PPDは、術前術後とも差はみられなかった。

症 例 4：68才 男 喉頭腫瘍

（T2 NOMO）

初 診 1978年1月6日

1年前から嗄声があり、喉頭腫瘍（扁平上皮癌）として照射（7,000r）後、治癒した。1年後再発し、喉頭を摘出（1979年11月2日）した。

検査値の動向（図6）ADCC, PPD については、術後の変動ははっきりしていないが、act E については、摘出後1ヶ月してから上昇傾向にあった。

症 例 5：70才 男 喉頭腫瘍

（T2 NOMO）

初 診 1977年3月17日

6ヶ月前から嗄声となった。扁平上皮癌のた

図6 68才男 喉頭腫瘍

図5 71才男 喉頭腫瘍

図7 70才男 喉頭腫瘍

め、7000rad 照射し治癒した。2年後に再発したので、喉頭を摘出(1979年12月14日)した。

検査値の動向(図7)ADCCは、術後上昇傾向にあるが、act Eは、変動し一定していない。PPDは、術前陰性であったが、術後は

陽性となった。

以上の5例についてまとめたのが、表1である。術後上昇を示したのは、ADCCに関しては1例、act Eについては1例、PPDについては3例であった。

考

担癌個体における免疫学的なパラメーターに関しては、特異的な応答を把握できるものがあれば好都合だが、現在のところ不可能である。一方、非特異的な反応からのパラメーターは数多くあるが、それぞれ一長一短で、絶対的なものはない。

こうした多くの非特異的なパラメーターのうち、手技が簡便で日常的に用いられる方法が採用されることになるわけであるが、著者も同様の観点から、腫瘍摘出前後という限られた時期について、どう変動するか把握しようと試みた。

腫瘍を摘出することによって、免疫学的パラメーターが変化することは当然予測されるし、上昇改善したと述べている報告⁹⁾がある。頭頸部領域に関しても、腫瘍摘出後改善したと述べたものがある⁷⁾。

免疫学的パラメーターとして用いられるものの多くは、細胞性免疫に関連しているが、著者は、ADCCをパラメーターのひとつとしてとりあげた。ADCCは、細胞性免疫のパラメーターではないが、体液性免疫との接点としての意義があり、さらに腫瘍の免疫を考える場合には、重要なパラメーターとなるので、この報告で検討しておく必要があると考えた。

ADCCの腫瘍免疫上の位置づけは、この活性が高まることによって腫瘍細胞が破壊されるといわれ、この活性値が高いと予後がよいとされている⁸⁾。一方、肝疾患があると、この活性

察

は低下する⁹⁾といわれているが、本例については、肝機能検査上も異常は認められなかった。

兼ら¹⁰⁾は、頭頸部悪性腫瘍14例のADCC活性について述べているが、活性があるということのみで、その経過については述べられていない。著者らの5例については、症例5を除き、特定の傾向がみられず、しかもそれらの値にばらつきがみられた。こうしたことから、パラメーターとしての役割は少ないものと考えた。

act Eに関しては、大竹ら¹¹⁾が、active T細胞ということで述べているが、それによると、治療後腫瘍が縮少または消失したときから上昇し正常値になるという。

本例では、60%以下を異常とみているが、症例4を除き、そのような異常値を示したものはない。症例4も、腫瘍摘出後まもなく正常範囲に復帰している。前報¹⁾において、癌末期にいたると、act Eの著しい低下がみられたと述べたが、本例では、異常値を示したことはなかった。

PPDについては、腫瘍摘出前陰性傾向にあったが、摘出後陽性となった例が5例中3例にみられている。前報での末期癌の症例において陰性化したことから、腫瘍発育との関連がうかがえる。従来、皮内反応はパラメーターとして有用であるが、繰り返しかえし行うことができないという難点があったが、その点今回用いた*in vitro* PPDは、用いてみるべきパラメーターのひとつと考えた。

ま と め

担癌個体におけるパラメーターとして、① ADCC 活性② active E ロゼット形成率③ *in vitro* PPD を用い、喉頭癌 (T2NOMO)、篩骨洞癌 (T2NOMO) など5例について、腫瘍摘出前後、それぞれ検索した。

前2者については、特定の傾向を示さなかったが、*in vitro* PPD では、腫瘍摘出後、陰性だった症例が陽性となる傾向を示したので、パラメーターとして役立つと判断した。

本論文の要旨は、日本耳鼻咽喉科学会第28回中部地方部会連合会 (1980年7月5日、愛知県豊明市) において発表した。

文 献

- 1) 河原田和夫, 平林 源, 広瀬 毅, 友野時雄: 頭頸部癌における免疫学的応答 (第1報) 末期癌における動向. 耳鼻 27: 672~674, 1981.
- 2) Wybran, J. and Fudenberg, H. H.: Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases. J. Clin. Invest. 52: 1026~1032, 1973.
- 3) Nicholls, E. M.: Aggregation of buffy-coat leucocytes. Clin. exp. Immunol. 17: 673~680, 1974.
- 4) 橘 武彦, 吉田明子: ヒトのT細胞・B細胞の微量測定法. 免疫実験操作法A. p 455~462, 日本免疫学会, 1975.
- 5) Perlmann, P. and Perlmann, H.: Antibody dependent cytolytic effector lymphocytes (K cells) in human blood. J. Reticuloendoth. soc. 17: 241~250, 1975.
- 6) 三輪恕昭, 福田範三, 小川 潔, 他癌患者におけるリンパ球幼若化率の手術前後および再発による変動. 医学のあゆみ 89: 328~329, 1974.
- 7) 大竹英夫, 竹山 勇, 河合清隆, 他: 術後経過よりみた担癌生体における免疫能の診断パラメーターに関する考察. 日耳鼻 82: 1486~1494, 1976.
- 8) 仙道富士郎: ADCC (細胞性免疫の臨床検査法の1項目) 臨床検査 MOOK No. 3. p155~162, 金原出版, 1980, より引用.
- 9) 野々村昭孝, 谷野幹夫, 原武讓二, 他: 慢性活動性肝炎患者末梢血リンパ球の培養ラット肝細胞に対するADCC (K cell) 活性の検討. 臨床免疫 13 [Supp 1, 2]: 1~8, 1981.
- 10) 兼 典子, 棕代光夫, 嶽良 博, 田端敏秀: 頭頸部悪性腫瘍の免疫学的研究—患者リンパ球におよぼす自己血清の影響. 日耳鼻 83: 1137~1138, 1980.
- 11) 大竹英夫, 中島幸洋, 漆畑 保, 竹山 勇: 治療経過よりみた免疫パラメーターの検討. 日耳鼻 83: 1140~1141, 1980.

原稿到着: 昭和57年3月5日

別刷請求先: 河原田和夫

〒985 塩釜市錦町16-5

宮城厚生協会坂総合病院耳鼻咽喉科