膀胱癌患者末梢血のリンパ球キラー活性

信州大学泌尿器科

岡根谷 利 一 小 川 秋 實

KILLER ACTIVITIES OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER

Toshikazu Okaneya and Akimi Ogawa

Department of Urology Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Akimi Ogawa, M.D.)

Killer activity of peripheral blood mononuclear cells with or without adding interleukin-2 in vitro was measured in 12 patients with superficial bladder cancer, 12 patients with invasive bladder cancer and 13 adult healthy controls. Cultured cell lines, K562, Raji and T-24 (bladder carcinoma), were served as target cells. Killer activity was measured by a 4-hour ^{51}Cr -release assay. Mononuclear cells from patients with superficial bladder cancer had a significantly higher natural killer activity against K562 and T-24 ($50.8 \pm 6.2\%$ and $15.0 \pm 9.5\%$, respectively) than those from patients with invasive bladder cancer ($28.2 \pm 8.0\%$, $9.5 \pm 8.8\%$) and than those from controls ($33.0 \pm 8.9\%$, $3.0 \pm 2.5\%$). When cultured in vitro with recombinant interleukin-2, mononuclear cells from patients with superficial bladder cancer developed a significantly higher killer activity against K562, Raji and T-24 ($58.4 \pm 5.8\%$, $40.1 \pm 15.9\%$ and $49.5 \pm 10.5\%$, respectively) than those from patients with invasive bladder cancer ($48.1 \pm 5.9\%$, $27.9 \pm 13.8\%$ and $40.1 \pm 7.4\%$) and than those from controls ($48.9 \pm 6.7\%$, $30.3 \pm 10.5\%$ and $39.5 \pm 3.8\%$). Flow cytometric analysis showed that there was no significant difference in surface markers between mononuclear cells from patients with superficial bladder cancer and those from patients with invasive bladder cancer. These results suggest that tumor immunity may participate in development and progression of bladder cancer.

Key words: bladder cancer, natural killer activity, IL-2 induced killer activity

要旨: 末梢血単核細胞のナチュラルキラー (NK) 活性とインターロイキン2添加により誘導されたキラー活性を表在性膀胱癌患者, 浸潤性膀胱癌患者および健康人の間で比較した。キラー活性は, 標的細胞として K562, Raji, T-24の株細胞を用いてクロム放出試験で測定した。表在性膀胱癌患者では対照健康人に比べNK活性が増強しており, インターロイキン2添加によるキラー活性の誘導も著明であった。一方, 浸潤性膀胱癌患者ではNK活性もインターロイキン2添加によるキラー活性の誘導も対照健康人と有意差が無かった。表在性膀胱癌患者と浸潤性膀胱癌患者の間にリンパ球表面マーカーには差が無かった。

キーワード: 膀胱癌, NK 活性, IL-2誘導キラー活性

結 言

結核菌の生菌である BCG の膀胱内注入療法は表在性膀胱癌や膀胱上皮内癌の治療および再発予防に有効性が認められている^{1)~3)}。その作用機序の詳細は解明されていないが, 尿中に interleukin 2 (以下 IL2と略す)の産生がみられたり⁴⁾, 局所および全身的に抗腫

瘍免疫能を賦活化していることが明らかにされつつある^{1)~5)}。一方, BCG 膀胱内注入療法は浸潤性膀胱癌に対しては無効である。その理由として浸潤性膀胱癌と表在性膀胱癌では免疫学的に異なった状態にあり, また各種サイトカインに対する応答能にも差があるのではないかと考えられる。この点を明らかにするために,

われわれは、末梢血リンパ球の natural killer 活性と recombinant interleukin-2 (以下 rIL-2 と略す) によるキラー活性の誘導について検討した。

対象および方法

1) 対象患者

術前の表在性膀胱癌患者12例 (pT₁ 4 例, pT_a 8 例) と浸潤性膀胱癌患者12例 (pT₂ 3 例, pT₃ 6 例, pT₄ 3 例) を対象とした。表在性膀胱癌組織の grade は grade 1 が 6 例, grade 2 が 2 例, 両者の混在が 4 例であった。また浸潤性膀胱癌組織の grade は grade 3 が 9 例, grade 2 と grade 3 の混在が 3 例であった。

患者の平均年齢は表在性腫瘍が 69.5 ± 8.9 歳, 浸潤性腫瘍が 69.6 ± 10.5 歳 (平均 ± 標準偏差) であった。対照人は成人健康人13例 (平均年齢 55.9 ± 16.1 歳) とした。

2) 方法

① 完全培養液の作成

組織培養用培地 RPMI1640 に非働化ウシ胎児血清 (以上 Flow Labo.) を10%の割合に加え, さらにゲンタマイシン 16 mg/l を加えて完全培養液を作成した。

② エフェクター細胞の調整

末梢血を完全培養液で希釈後 Ficoll-Paque に重層, 400 G で30分間遠沈後単核細胞を分離, 完全培養液で3回洗浄後 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ となるよう調整した。この標本の半数は直ちに NK 活性測定のため細胞障害性試験に供し, 残りには rIL-2 (TGP-3, 武田薬品) 2 u/ml を添加した24穴平底プレート (Nunc) にて 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 下で培養した。

③ 標的細胞の調整

K562 (人赤芽球性白血病株細胞), Raji (Burkitt lymphoma 由来細胞で NK 非感受性), および T-24 (人膀胱癌株細胞)⁶⁾ を用いた。K562, Raji は培養液を半量交換して24時間培養後1回洗浄した。T-24 は 0.25% トリプシン (半井化学) と 0.02% EDTA (阪大微研) の混合液にて細胞を剥離後, 完全培養液で3回洗浄した。それぞれ $100 \mu\text{Ci}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) を加えて60分培養し, その後完全培養液で3回洗浄後, 1×10^5 個/ml に調整した。

④ Natural Killer (NK) 活性⁷⁾ の測定

^{51}Cr でラベルした K562, Raji, T-24 細胞のそれぞれの 1×10^4 個を完全培養液 0.1 ml に浮遊させ96穴丸底プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に分注し, さらにエフェクター細胞をエフェクター細胞・標的細胞

比が $20:1$ となるよう 0.1 ml 完全培養液に調整して標的細胞に加え, プレートに 100 G で3分間遠心後, 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 下で4時間培養した。その後プレートを 400 G で5分間遠心し上清をマイクロピペットを用いてそれぞれ採取し, γ シンチレーションカウンター (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL) で計数して実験解離値とし, 同時に ^{51}Cr でラベルした標的細胞浮遊液の上清を計数して自然解離値とした。また標的細胞を直接計数したものを最大解離値とし, NK 活性は次式により求めた。

$$\frac{\text{実験解離値} - \text{自然解離値}}{\text{最大解離値} - \text{自然解離値}} \times 100 (\%)$$

測定は全て重複して行ない, その平均値を求めた。なお, 自然解離値は最大解離値の10%を越えなかった。

⑤ rIL-2 添加により誘導されるキラー活性⁸⁾ の測定

rIL-2 2 単位/ml を添加したエフェクター細胞を K562, Raji, T-24 を標的細胞としてキラー活性を④と同じ方法で測定した。

測定結果では培養時間の経過とともにキラー活性が増強し, K562 では20時間後, Raji, T-24 では96時間後にほとんどプラトーに達した。この結果から K562 では20時間後, Raji, T-24 では96時間後の測定値を用いた。

⑥ リンパ球サブセットの測定

モノクローナル抗体は CD3 (OKT3), CD4 (OKT4), CD8 (OKT8: 以上 Ortho Pharmaceutical, Raritan, NJ), Leu7, CD16 (Leu11: Becton Dickinson, Sunnyvale, CA), NKH-1 (Coulter) を用いた。各モノクローナル抗体を末梢血単核細胞に加え, 4°C 暗所で30分反応させた後, リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline) で洗浄し, Epics V flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL) にて測定した。

⑦ 統計的解析

有意差検定は, Student の t 検定法を用い, 有意水準は 0.05 とした。

結 果

① 末梢血単核細胞の NK 活性

各種標的細胞に対する NK 活性の測定結果を図1に示す。K562 に対する NK 活性は, 表在性膀胱癌患者では浸潤性膀胱癌患者と対照健康人に比し有意に増加していたが ($p < 0.05$), 浸潤性膀胱癌患者と対照健康人との間には有意差はなかった。Raji に対する NK 活性はほとんどみられなかった。

T-24 に対しては, 表在性膀胱癌患者では対照健康人

図1 末梢血単核細胞のNK活性
表在性膀胱癌患者では K562, T-24に対してNK活性が有意に増強している。

に比較して有意 ($p < 0.005$) にNK活性は上昇していたが、浸潤性膀胱癌患者との間には有意差はなかった。また浸潤性膀胱癌患者と対照健康人との間にも有意差はみられなかった。

② 末梢血単核細胞のrIL-2添加によるキラー活性の増強

測定結果を図2に示す。rIL-2添加による末梢血単核細胞のK562, Raji, T-24に対するキラー活性は、表在性膀胱癌患者では著明に増強し、浸潤性膀胱癌患者、対照健康人に対して有意差を示した ($p < 0.05$)。浸潤性膀胱癌患者と対照健康人との間に有意差はみられなかった。

③ リンパ球サブセットの比較

CD3, CD4, CD8, Leu7, CD16, NKH-1とも表在性および浸潤性腫瘍間に有意差を認めなかった (表1)。

考 察

われわれの結果では、表在性腫瘍患者では対照健康人および浸潤性腫瘍患者に比べてK562に対するNK

活性が有意に増強し、また対照健康人に比べ、T-24に対するNK活性が有意に増強していた。

表在性膀胱癌では、NK活性が増強するという報告⁹⁾、健康人と変わらないという報告¹⁰⁾¹¹⁾および低下しているという報告¹²⁾があるが、測定法の相違¹²⁾や、患者の年齢、性などの違いに基づくものであろう。癌発生初期に一時的に末梢血NK活性が上昇し、病期が進むにつれて低下するのではないかとの意見¹³⁾もある。

表在性膀胱癌は浸潤性膀胱癌と異なり転移することはきわめて稀で臨床的には良性に近い。この理由は明らかではないが、表在性腫瘍では腫瘍浸潤リンパ球にT細胞が多いという局所免疫能の増強を示唆する報告もある¹⁴⁾。われわれの結果では、浸潤性腫瘍患者のNK活性は健康人と同様であったが、対象とした患者の多くが全身状態が良好な膀胱全摘手術前で、臨床的に転移もない状態であったためと思われる。

NK活性などに代表される全身的免疫能は癌患者で低下している場合でも手術後に正常化することが観察

図2 末梢血単核細胞の rIL-2添加によるキラー活性の増強
表在性膀胱癌患者では K562, Raji, T-24のいずれに対しても, rIL-2添加培養後のキラー活性が有意に増強している。

表1 末梢血リンパ球サブセットの比較

モノクローナル抗体	表在性膀胱癌患者 (n=12)	浸潤性膀胱癌患者 (n=12)
CD 3	61.0±20.7%	70.2± 9.9%
CD 4	42.1±14.6%	41.3± 9.3%
CD 8	26.1± 6.0%	31.5±11.9%
Leu 7	31.1±14.7%	38.5±14.7%
CD 16	29.6±22.3%	25.0±13.1%
NKH-1	25.9±13.6%	24.5±11.7%

* mean±SD

されており¹⁰⁾, 担癌状態が全身的免疫能を抑制しているとされている。癌末期では全身的免疫能は低下することが多い^{10)12)15)~17)}。また動物実験ではNK細胞の減少した状態では有意に転移が起きやすくなることも知られている¹⁸⁾¹⁹⁾。

若年者に表在性膀胱癌がみられることは稀である

が, その場合には比較的予後は良好であるとされ, これは若年者にみられる消化器などの癌が急速に進行し, 極めて予後不良であることが多いという事実と異なっている。NK活性が増強している事実から表在性膀胱癌患者においては癌の進行が免疫監視機構と密接な関連があることが強く示唆される。T-24は腫瘍特異抗原を有する腫瘍といわれている。膀胱癌患者の58%は末梢血リンパ球がT-24に対して細胞傷害性を示すが, 健康人では5%の人でのみT-24に対して細胞傷害性を示すとされている⁹⁾。われわれの結果でも表在性膀胱癌患者では健康人よりもT-24に対するNK活性が有意に高かった。表在性膀胱癌患者ではマクロファージによる抗原提示がより強く行なわれ, リンパ球の感作が既に成立している可能性がある²⁰⁾。さらに表在性膀胱癌患者ではある種のサイトカインが既に誘導されている可能性も考えられる。

リンパ球表面マーカーの測定結果からは, 表在性膀胱癌と浸潤性膀胱癌および健康人の間に差がみられな

かったが、このことはNK活性の差異がリンパ球分画の差によるものでないことを示している。一般にrIL-2添加培養により癌末期患者リンパ球からでもいわずにLymphokine activated killer (LAK) 細胞の誘導が可能である⁸⁾。われわれの結果で、表在性膀胱癌患者においてより高いキラー活性誘導が可能であったことは、表在性膀胱癌患者に対するrIL-2投与が有効である可能性を示唆するものと思われる。

結 語

末梢血単核細胞のNK活性およびrIL-2添加培養によるキラー活性の増強を表在性膀胱癌患者と浸潤性膀胱癌患者の間で比較したところ、表在性膀胱癌では健常人および浸潤性膀胱癌に比べK562に対するNK活性が、また健常人に比べT-24に対するNK活性が有意に増強しており、rIL-2添加培養後のK562、RajiおよびT-24に対するキラー活性の誘導も著明であった。表在性膀胱癌患者と浸潤性膀胱癌患者の間にリンパ球表面マーカーの差異はみられなかった。これらの結果から膀胱腫瘍の進行、治癒機転に抗腫瘍免疫が関与していることが示唆される。

稿を終わるにあたり、御指導をいただいた本学小児科学講師川合 博博士とリンパ球表面マーカーの測定に御協力いただいた輸血部伊藤 進技官、本研究に協力して頂いた泌尿器科学教室の諸先生に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Morales, A., Edinger, D. and Bruce, A.W.: Intracavitary bacillus calmette-guerin in the treatment of superficial bladder Tumors. *J. Urol.*, 116, 180—183, 1976.
- 2) 早川正道, 秦野 直, 斎藤史郎, 宮里朝矩, 仲山 實, 五十嵐正道, 才田博幸: 表在性膀胱腫瘍に対するBCG膀胱内注入療法—BCG局所療法による宿主の免疫反応—. *日泌尿会誌*, 78, 1972—1981, 1987.
- 3) 赤座英之, 亀山周二, 小磯謙吉, 垣添忠生, 小島弘敬, 梅田 隆, 河辺香月, 藤田公生, 西村洋司, 横山正夫, 河村 毅, 三方律治, 石井泰憲, 中内浩二, 仁藤 博, 木下健二, 岸 洋一, 原 徹, 阿曾佳郎, 新島端夫: 膀胱移行上皮内癌および表在性膀胱腫瘍に対するBCG (Tokyo 172株) 膀胱内注入療法効果の解析. *日泌尿会誌*, 80, 167—174, 1989.
- 4) Haaff, E.O., Catalona, W.J. and Ratliff, T.L.: Detection of interleukin 2 in the urine of patients with superficial bladder tumors after treatment with intravesical BCG. *J. Urol.*, 136, 970—974, 1986.
- 5) 橋 政昭, 実川正道, 出口修宏, 田崎 寛: 膀胱腫

- 瘍に対するBCG膀胱内注入療法における宿主免疫応答の賦活化に関する研究. *日泌尿会誌*, 79, 1680—1685, 1988.
- 6) Bubenik, J., Baresova, M., Viklicky, V., Jakoubkova, J., Sainerova, H. and Donner, J.: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumor-specific antigen. *Int. J. Cancer*, 11, 765—773, 1973.
 - 7) Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H.: “Natural” killer cells in the mouse. 1. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, 5, 112—117, 1975.
 - 8) Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z. and Rosenberg, S.A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 155, 1823—1841, 1982.
 - 9) 深沢 潔: 泌尿生殖器系担癌患者におけるNatural killer細胞活性の検討—各種癌疾患の進行度と抗腫瘍療法より観たNatural killer細胞活性の検討—. *日泌尿会誌*, 79, 239—245, 1988.
 - 10) Ma, C.P., Yu, D.S., Yeh, M.Y., Chang, S.Y. and Han, S.H.: Natural killer cell activity in patients with urologic cancer. *Eur. Urol.*, 13, 397—400, 1987.
 - 11) 辻橋宏典: 膀胱腫瘍の宿主機構に関する研究. 膀胱腫瘍組織浸潤リンパ球の免疫能に関する研究. *日泌尿会誌*, 79, 977—984, 1988.
 - 12) Morales, A., Facs, F. and Ottenhof, P.C.: Clinical application of a whole blood assay for human natural killer (NK) cell activity. *Cancer*, 52, 667—670, 1983.
 - 13) 山下元幸, 亀井義広, 藤田幸利: 尿路器悪性腫瘍患者の末梢血および領域リンパ節におけるnatural killer (NK) 活性に関する研究. 1. 尿路器悪性腫瘍患者の末梢血NK活性に関する研究. *日泌尿会誌*, 80, 659—665, 1989.
 - 14) 辻橋宏典, 大西規夫, 秋山隆弘, 栗田 孝, 上島成也: 膀胱癌の宿主機構に関する研究. 膀胱腫瘍組織浸潤リンパ球の免疫組織学的検討. *日泌尿会誌*, 78, 2140—2146, 1987.
 - 15) Lotzova, E.: Several aspect of natural killer cell-mediated cytotoxicity in normal individuals and cancer patients. *Cellular Molecular Biology*, 26, 423—431, 1980.
 - 16) Pross, H.F. and Boines, M.G.: Spontaneous human lymphocyte mediated cytotoxicity against tumor cells. 1. The effect of malignant disease. *Int. J. Cancer*, 18, 593—604, 1976.

- 17) Takasuki, M., Ramseyer, A. and Takasugi, J. : Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. *Cancer Res.*, 37, 413—418, 1977.
- 18) Hanna, N. : Role of natural killer cells in host defence against cancer metastasis. in *Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects*. Ed. by Nicolson, G.L. and Milas, L., New York, Raven Press, p. 309—319, 1984.
- 19) Gorelic, E., Wilttrout, R.H., Okumura, K., et al. : Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer*, 30, 107—112, 1982.
- 20) Sakamoto, K., Yoshioka, T., Shimizu, J., Sato, S., Nakajima, H., Fujiwara, H. and Hamaoka, T. : Role of tumor-specific Lyt-2⁺T cells in tumor growth inhibition in vivo. II. Mechanisms for recognition of tumor antigens and mediation of anti-tumor effect by noncytolytic Lyt-2⁺ T cell subset. *Jpn. J. Cancer. Res.*, 79, 91—108, 1988.

(1989年11月15日受理)