膀胱移行上皮癌に対する Bacillus Calmette-Guérin の 作用機序に関する研究

—特に組織内浸潤細胞の変動—

弘前大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 鈴木唯司教授)

工 藤 真 哉 鈴 木 唯 司

豊橋市民病院泌尿器科 (主任: 稲積秀一部長)

稲 積 秀 一

THE ROLE OF LYMPHOCYTES AND HISTIOCYTES AS MECHANISM OF ACTION OF BCG FOR BLADDER CANCER

Shinya Kudo and Tadashi Suzuki

Department of Urology, Hirosaki University School of Medicine

(Director: Prof. T. Suzuki)

Hidekazu Inazumi

Department of Urology, Toyohashi City Hospital

(Director: Dr. H. Inazumi)

Antitumor activity of BCG for transitional cell carcinoma of the urinary bladder was evaluated in 103 patients from October, 1983 to October, 1989 at Hirosaki University Hospital. At the same time, the role of various inflammatory cells infiltrating in the bladder wall after intravesical BCG instillation as mechanism of action of BCG was studied.

Of 72 patients with superficial bladder cancer, 19 showed a complete response and 28 showed a partial response. The effective rate was 65.3 percent. Significant efficacy was obtained in patients received more than 5 times instillation of BCG.

Before intravesical BCG instillation, a small number of lymphocytes or plasma cells infiltrated in the stroma of the tumor. But histiocytes, neutrophils or eosinophils were hardly found. After BCG instillation, the degree of infiltration of each of them tended to increase.

The mean degree of infiltration of those inflammatory cells almost all significantly increased in the stroma of the tumor, while only lymphocyte and histiocyte counts significantly increased in both the basal areas of the advancing margin of tumor cells and the tumor free submucosa after BCG instillation.

Epithelioid granulomas were recognized almost in the basal areas of the advancing margin of tumor cells and the tumor free submucosa after BCG therapy. Langhans' giant cells were occasionally found within these lesions. In 2 patients marked central necrosis (caseation) was noticed in epithelioid granulomas.

In BCG effective cases with superficial bladder cancer lymphocytes and histiocytes increased significantly in all of the stroma of the tumor, the basal areas of the advancing margin of tumor cells and the tumor free submucosa. On the other hand, in BCG noneffective cases they increased significantly only in the stroma of the tumor.

Subsets of lymphocytes which increased after intravesical BCG instillation were mainly T pan cells with the predominance of T helper/inducer cells (T_h/T_s ratio always >1).

Key words: bladder cancer, intravesical BCG instillation, tissue infiltrating inflammatory cells

要旨：1983年10月から1989年10月までの間に弘前大学泌尿器科で膀胱移行上皮癌と診断され、BCG 治療を受けた103症例において、BCG の抗腫瘍効果を判定するとともに、BCG 膀胱内注入(BCG 膀胱注)後に増加する各種組織内浸潤細胞が、BCG の作用機序にいかに関わっているかを検討した。72例の表在性癌において、CR 19例、PR 28例で有効率65.3%を示し、BCG 膀胱回数が多いほど効果が大きかった。リンパ球、形質細胞、組織球、好中球、好酸球の浸潤度を腫瘍間質で経時的にみると、膀胱注前はリンパ球ないし形質細胞の浸潤は認められたが、他細胞はほとんど認めえなかったのに対し、膀胱注後はいずれの細胞も増加する傾向を示した。浸潤細胞の平均浸潤度の変動を比較すると、腫瘍間質では、ほぼすべての細胞が有意に増加したが、腫瘍底部、非腫瘍部では主にリンパ球と組織球が有意に増加した。類上皮細胞肉芽腫は、膀胱注後、特に腫瘍底部または非腫瘍部で形成されることが多く、ときにラングハンス型巨細胞が存在し、2例に鮮明な乾酪壊死を認めた。表在性癌において、リンパ球と組織球は、BCG 治療有効例では、腫瘍間質、腫瘍底部、非腫瘍部のいずれにおいても有意に増加したが、無効例では腫瘍間質において有意に増加したのみであった。BCG 膀胱注後増加したリンパ球は、ほとんど T_H 細胞で、その T_H/T_s 比は1.0以上と T_{H1} 細胞が優位であった。

キーワード：膀胱癌、BCG 膀胱内注入療法、組織内浸潤細胞

緒 言

膀胱移行上皮癌に対する *Bacillus Calmette Guérin* (以下 BCG) の抗腫瘍効果は、Morales ら¹⁾ による再発防止効果の報告以来多くの追試をうけた結果はほぼ認められることとなり、特に表在性癌に対してはその強力な直接的抗腫瘍効果が報告されてきた²⁾³⁾。しかし、その作用機序はなお不明のままである。これまで BCG は種々の腫瘍に対しても抗腫瘍効果が報告されるとともに、その作用機序として局所効果^{4)~6)}、局所作用の全身効果への波及^{7)~10)} が考えられてきた。著者らもこれまでに両面からの検討を行ってきた結果、BCG は膀胱内に注入し、腫瘍に直接接触させてのみ効果をあげることから、局所作用が第一と考えられた¹¹⁾¹²⁾。BCG 膀胱内注入後の組織学的変化をみると、第一は腫瘍細胞の表層からの変性・脱落であり、第二は腫瘍間質、腫瘍周囲を含む膀胱壁内へのリンパ球をはじめとする多彩な組織内細胞浸潤であり、BCG の作用機序にこれら浸潤細胞が大きな役割をもつことが疑われた。そこで、抗腫瘍効果を検討する目的で BCG 治療を行った膀胱移行上皮癌患者において、BCG 膀胱内注入療法(以下 BCG 膀胱注)前後の各種組織内浸潤細胞を詳細に観察し、さらに治療効果とも比較することで、BCG の抗腫瘍作用機序にこれら浸潤細胞がいかに関わっているかを検討した。

対象および方法

1. 膀胱癌症例

1983年10月から1989年10月までの6年間に弘前大学泌尿器科において膀胱移行上皮癌と診断され、BCG 治療を受けた103症例を対象とした。膀胱癌取り扱い規約

に従って病理組織学的に、または画像診断上 T_{10} または T_1 以下と診断された表在性膀胱癌患者は72例(初発例63例、再発例9例)で、 pT_2 または T_2 以上の浸潤性膀胱癌患者は31例(全例初発例)であった。組織学的異型度は、表在性癌では G_1 35例(48.6%)、 G_2 32例(44.5%)、 G_3 5例(6.9%)、浸潤性癌では G_1 4例(12.9%)、 G_2 7例(22.6%)、 G_3 20例(64.5%)であった。また、全例において遠隔転移は認めなかった。

性別と年齢は、表在性癌では男63例、女9例、42歳から89歳(平均年齢65.2歳)であり、浸潤性癌では男25例、女6例、47歳から77歳(平均年齢63.8歳)であった。

2. BCG 治療方法

BCG 治療として BCG 膀胱注を全例に施行した。すなわち、BCG Tokyo 172株80mg(生菌数 $50 \sim 60 \times 10^6$ 個/mg：日本 BCG 研究所製)を生理食塩水30ml に溶解し、この溶液を膀胱内にカテーテルを用いて注入、約2時間保持させた。これを週1回、2～15週連続して行った。症例によっては BCG 皮内接種または経口投与を併用した。皮内接種は上腕外側に管針法で4週に1回、経口投与は腸溶カプセルに封入された BCG (20 mg/cap：日本 BCG 研究所製) 4cap を週1回内服させた。

BCG 治療法別頻度では、表在性癌72例中 BCG 膀胱注単独12例、膀胱注に皮内接種併用19例、膀胱注に経口投与併用8例、膀胱注に皮内接種および経口投与併用33例である。浸潤性癌31例では BCG 膀胱注単独1例、膀胱注に皮内接種併用4例、膀胱注に経口投与併用3例、膀胱注に皮内接種および経口投与併用23例であった。なお、浸潤

性癌においては6症例に放射線療法を併用した。BCG治療後の残存腫瘍は手術的に摘除した。手術は表在性癌で経尿道的膀胱腫瘍切除術44例、膀胱部分切除術10例、膀胱全摘除術2例、膀胱高位切開による腫瘍切除術2例であり、浸潤性癌では経尿道的膀胱腫瘍切除術6例、膀胱部分切除術13例、膀胱全摘除術7例、膀胱高位切開による腫瘍切除術1例、手術不能4例であった。

3. 効果判定

BCG治療前後には原則として4週毎に膀胱鏡、経尿道的超音波検査および膀胱部 Computed Tomographyにて腫瘍の縮小率を算出するとともに、腫瘍生検を行い、組織学的に腫瘍細胞の有無を観察した。BCG治療による抗腫瘍効果は、腫瘍の縮小率および組織学的所見を参考に、日本癌治療学会「固形癌化学療法直接効果判定基準」¹³⁾に準じて、Complete Response (CR), Partial Response (PR), No Change (NC), Progressive Disease (PD)の4段階で判定した。

4. 病理組織学的検討

BCG膀胱注前後の生検標本、および手術摘出標本はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、腫瘍細胞に加え、各種浸潤細胞毎の変化を鏡検した。浸潤細胞

については腫瘍間質・腫瘍底部 (腫瘍直下の粘膜下層または腫瘍に接する部)・非腫瘍部粘膜下 (主に粘膜下層)の3部位にわけ、リンパ球、形質細胞、組織球、好中球、好酸球の浸潤度および浸潤様式を経時的に観察した。判定は、全く認めない(-), 散見する(±), 軽度または散在して認められる(+), 中等度または一部に集簇して認められる(++)、高度またはびまん性に認められる(+++)と5段階に分類して行った (図1)。また、類上皮細胞肉芽腫形成の程度も観察し、全く認めない(-), 軽度(+), 中等度(++), 高度(+++)と4段階に分類して判定した。

5. 免疫組織化学的検討

BCG治療を行った10例 (表在性癌5例、浸潤性癌5例) および対照としてBCG治療を行わなかった浸潤性癌2例の膀胱移行上皮癌患者の手術摘出標本に対して組織内浸潤Tリンパ球サブセットを数種モノクローナル抗体を用いて検討した。

手術摘出標本を急速凍結させ、約5 μ mの連続切片を作製した。染色のための酵素抗体間接法としてはBiotin-Streptavidin-Peroxidase Conjugate Method¹⁴⁾を用いた。一次抗体としてCD6(anti T pan cells: 以下T_p), CD4(anti T helper/inducer cells:

図1 組織内浸潤度の判定 (腫瘍底部, リンパ球)

a: (±) 散見

c: (++) 中等度または一部に集簇

b: (+) 軽度または散在

d: (+++) 高度またはびまん性

以下 $T_{h/I}$), CD 8(anti T suppressor/cytotoxic cells : 以下 $T_{s/c}$) (Boehringer Mannheim Biochemical 製, mouse monoclonal) を用い, その100倍に希釈したものに切片を室温で約 1 時間浸漬した。Phosphate buffered saline (以下 PBS) で洗浄後, 二次抗体として Biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin (BioGenex Laboratories 製) を室温で25分反応させ, PBS 洗浄後, Peroxidase conjugated Streptavidin (BioGenex Laboratories 製) を室温で25分作用させた。切片は DAB H_2O_2 液にて発色させ, ヘマトキシリンで核染後封入した。判定は病理組織学的検討と同様に (一) ~ (卅) の 5 段階に分類して行い, さらに $T_{h/I}$ と $T_{s/c}$ の比率 (以下 T_h/T_s 比) を同部位における約 200~1,000個の T リンパ球測定より算出した。

結 果

1. 臨床効果

表在性癌72例における腫瘍縮小効果を腫瘍の大きさや治療回数に関係なくみると, CR 19例, PR 28例, NC 24例, PD 1例で CR と PR を加えた有効率は65.3%であった。この効果を BCG 勝注回数別でみると, 4 回以下では CR 3 例, PR 4 例, NC 12例であり, 有効率 (CR+PR) は36.8%であったのに対し, 5 回以上では CR 16例, PR 24例, NC 12例, PD 1例であり, 有効率は75.5%で治療回数が多くなるに従い効果は著明となり, BCG 勝注回数と腫瘍縮小効果の間には統計学的にも有意の相関を認めた ($p < 0.01$, χ^2 検定)。また, BCG 治療方法別でみると, BCG 勝注単独例では CR 2 例, PR 3 例, NC 7 例で有効率41.7%, 勝注に皮内接種併用例では CR 3 例, PR 11例, NC 5 例で有効率73.7%, 勝注に経口投与併用例で CR 1 例, PR 2 例, NC 5 例で有効率37.5%, 勝注に皮内接種および経口投与併用例では CR 13例, PR 12例, NC 7 例, PD 1 例で有効率75.8%であるが, BCG 勝注単独例と勝注に経口投与併用例には 4 回以下の比率が多く, 勝注に皮内接種併用例と勝注に皮内接種および経口投与併用例には 5 回以上の比率が多いために差が出たにすぎず, 腫瘍縮小効果は BCG 勝注によることが統計学的にも認められた。

浸潤性癌に関しては, 主に T_2 の 9 症例で表層部腫瘍の脱落により PR を示したが, 壁内浸潤腫瘍細胞の変性・消失は認めえなかった。

2. 各種組織内浸潤細胞の変動

1) 経時的変動

BCG 勝注前および勝注後 4 週毎に 2 回以上腫瘍組

織が採取されていたのは, 表在性癌72例中腫瘍間質では29例, 腫瘍底部では 3 例, 非腫瘍部では 5 例であり, 浸潤性癌31例では, 腫瘍間質については 7 例, 腫瘍底部では 1 例であったため, 腫瘍間質についてのみ BCG 勝注前後の各種組織内浸潤細胞の経時的変動を検討した。

a) 表在性膀胱癌

BCG 勝注前, リンパ球については, 26例は(±), 3 例が (一) であり, 形質細胞についても23例は(±), 6 例が (一) であった。しかし, 組織球については16 例が (一), 13例は(±)であり, 好中球, 好酸球についても, それぞれ24例が (一) であり, BCG 勝注前はリンパ球ないし形質細胞の浸潤は認めたが, 他細胞はほとんど認めえなかった。これに対し, BCG 勝注後はいずれの細胞も増加する傾向を示した。

b) 浸潤性膀胱癌

BCG 勝注前, リンパ球については 7 例中 5 例が (±), 1 例が (+) であったが, BCG 勝注後, 経時的に増加する傾向を示し, この傾向は程度の差はあるものの形質細胞, 組織球, 好酸球についても認められ, 表在性癌に比し一時的に大きく変動する例が多かった。

2) 平均浸潤度による BCG 治療前後の比較

個々の症例によって, BCG 勝注回数, 標本採取回数が異なるが, 経時的変動をみると, 浸潤細胞は概ね増加の傾向にあると判断し, BCG 勝注後については細胞浸潤の最大の変化をもって代表値として, BCG 治療前後の変動を比較しえた症例につき各浸潤細胞毎にその浸潤度を検討した。

すなわち, 表在性癌では腫瘍間質については60例, 腫瘍底部では14例, 非腫瘍部では13例を, また浸潤性癌では, 腫瘍間質については28例, 腫瘍底部では 4 例, 非腫瘍部では 5 例を対象とした。この際, 組織内浸潤細胞の浸潤度を (一) : 1 点, (±) : 2 点, (+) : 3 点, (++) : 4 点, (卅) : 5 点とスコア化し, 全体の平均をそれぞれ求め, BCG 勝注前後で比較した。

a) 表在性膀胱癌

イ) 腫瘍間質 (図 2)

腫瘍間質における各種浸潤細胞の浸潤度を BCG 治療前後で比較するとリンパ球は 2.2 ± 0.4 から 2.7 ± 0.6 , 形質細胞は 1.8 ± 0.5 から 2.5 ± 0.6 , 組織球は 1.5 ± 0.5 から 2.0 ± 0.6 , 好中球は 1.2 ± 0.5 から 1.8 ± 0.7 , 好酸球は 1.3 ± 0.5 から 1.9 ± 0.6 といずれも BCG 勝注後は有意に増加していた ($p < 0.001$, t 検定)。

図2 BCG 膀胱注前後における組織内浸潤細胞の平均浸潤度の推移（表在性癌腫瘍間質，n=60）

※：p<0.001, t 検定

図3 乾酪壊死を伴う類上皮細胞肉芽腫

a: 非腫瘍部（弱拡大），b: 非腫瘍部（強拡大：ラングハンス型巨細胞を認める（↑））

ロ) 腫瘍底部

腫瘍底部における変化ではリンパ球は 2.6 ± 0.5 から 3.1 ± 0.7 ，組織球は 1.8 ± 0.4 から 2.3 ± 0.5 と有意に増加していた（ $p < 0.05$ ， $p < 0.02$ ，t 検定）が，他細胞では有意の増加傾向は認めなかった。

ハ) 非腫瘍部

正常粘膜下においてはリンパ球は 2.3 ± 0.5 から 2.9 ± 0.5 ，組織球は 1.8 ± 0.4 から 2.3 ± 0.5 と有意に増加していた（ $p < 0.001$ ， $p < 0.05$ ，t 検定）が，他細胞では有意の増加は認めなかった。

b) 浸潤性膀胱癌

イ) 腫瘍間質

リンパ球は 2.3 ± 0.6 から 3.4 ± 0.7 ，形質細胞は 1.9 ± 0.7 から 3.0 ± 0.6 ，組織球は 1.6 ± 0.7 から 2.6 ± 0.7 ，好中球は 1.1 ± 0.4 から 1.4 ± 0.7 ，好酸球は 1.5 ± 0.7 から 2.2 ± 0.9 と好中球以外は有意の増加を示した（リンパ球，形質細胞，組織球は $p < 0.001$ ，好酸球は $p < 0.01$ ，t 検定）。さらに表在性癌に比し，前値に差は認めないが変動度が大きい傾向を示した。

ロ) 腫瘍底部

いずれの細胞も増加する傾向を認めたが有意の増加ではなかった。

ハ) 非腫瘍部

リンパ球は 2.6 ± 0.5 から 3.6 ± 0.5 ，形質細胞は 2.2 ± 0.8 から 3.2 ± 0.4 ，組織球は 1.6 ± 0.5 から 2.6 ± 0.9 と有意に増加していた（ $p < 0.05$ ，t 検定）。

3) 類上皮細胞肉芽腫の変動

腫瘍間質では，膀胱前は表在性癌72例，浸潤性癌30例ともに全例（－）であった。膀胱後，表在性癌60例中1例，浸潤性癌では29例中2例が（＋），1例が（++）であった。腫瘍底部でも，膀胱前は表在性癌14例全例，浸潤性癌4例全例が（－）であった。膀胱後，表在性癌65例中10例が（＋），4例が（++）であり，51例では認めなかった。浸潤性癌では19例中3例が（＋）となった。非腫瘍部でも，膀胱前は表在性癌15例，浸潤性癌6例全例で認めなかったが，膀胱後，表在性癌44例中9例が（＋），2例が（++），4例が（+++）となり，浸潤性癌でも19例中11例が（＋），2例が（++），1例が（+++）となった。類上皮細胞肉芽腫周囲には，ラングハンス型巨細胞が腫瘍底部では表在性癌65例中3例に，非腫瘍部では表在性癌44例中3例，浸潤性癌19例中5例に認められ，異物型巨細胞も計8例に認められた。これら類上皮細胞肉芽腫のうち，鮮明に乾酪壊死の所見をみた症例が2例認められ（図3），この病巣では類上皮細胞層内にラングハンス型巨細胞も存在し，通常の結核性変化に類似する所見であった。

3. 組織内浸潤細胞の変動と表在性膀胱癌における臨床効果との比較

BCG 治療後有意に変動した浸潤細胞と臨床効果の関連性をみるため，表在性膀胱癌症例を臨床効果から有効例（CR+PR）と無効例（NC+PD）にわけ，浸潤細胞の変動を比較検討した。検討症例は腫瘍間質については，有効例は35例，無効例は25例，腫瘍底部では，有効例は12例，無効例は2例，非腫瘍部では，有効例は7例，無効例は6例であった。

1) 腫瘍間質（図4）

いずれの細胞も有効例，無効例ともに有意に増加していたがリンパ球，好中球，好酸球では有効例の方がより変動が大きかった。

2) 腫瘍底部

リンパ球，組織球ともに有効例では有意に増加していたが，無効例では不変であった。

3) 非腫瘍部

リンパ球，組織球ともに有効例では有意に増加していたのに対し，無効例では増加する傾向は認めたが有意の増加ではなかった。

4. BCG 治療後の組織内浸潤リンパ球サブセット (表 1)

図 4 BCG 勝注前後における組織内浸潤細胞の変動と臨床効果との比較 (表在性癌腫瘍間質)

●—●：有効例 (n=35) ○—○：無効例 (n=25)

※：p<0.001, ※※：p<0.01, t 検定

1) pan T cell (Tp) の組織内浸潤度

腫瘍間質では，BCG 未治療例および BCG 治療例の表在性癌および浸潤性癌ともに浸潤度は (+) であった。腫瘍底部では，BCG 未治療例の 1 例は (+)，他の 1 例は (++) であった。BCG 治療例では，表在性癌において 1 例は (+) であったが，3 例は (++) となっており，また浸潤性癌でも 3 例は (++)，1 例は (+++) と著明な浸潤を示していた。非腫瘍部では，BCG 未治療例では，1 例は (±)，他の 1 例は (++) であったが，BCG 治療例では，表在性癌においては 4 例すべて (++)，浸潤性癌でも 3 例は (++)，1 例は (+++) と浸潤が著明であった。

2) Th/i と Ts/c との比率

腫瘍間質では，BCG 未治療例では，1 例で 3.25 であったが，BCG 治療例では，表在性癌においては，

表 1 組織内浸潤リンパ球の分布と臨床効果

症例	pan T cell の浸潤度			Th/Ts 比			臨床効果
	腫瘍間質	腫瘍底部	非腫瘍部	腫瘍間質	腫瘍底部	非腫瘍部	
1	+	+	±	3.25	1.63	1.31	CR(18ヵ月後) PR PR PR NC PR NC NC PR NC
2		+	+		1.47	1.45	
3	+	+	+	1.29	1.53	2.54	
4		+	+		3.62	1.39	
5	+	+		1.42	1.65		
6	+	+	+	2.84	3.50	1.78	
7	+		+	2.79		2.48	
8	+	++	+	1.44	2.46	2.48	
9		+			1.90		
10	+	+	+	1.41	1.53	1.36	
11		+	+		11.56	5.74	
12		+	+			4.58	

1~2: BCG 未治療例
3~7: BCG 治療例 (表在性癌)
8~12: BCG 治療例 (浸潤性癌)

Th: T helper / inducer cells
Ts: T suppressor / cytotoxic cells

図 5 同部位における組織内浸潤 T リンパ球サブセット (症例 6, 腫瘍底部×200)

Th/i: T helper/inducer 細胞, Tp: T pan 細胞, Ts/c: T suppressor/cytotoxic 細胞

Th/i 細胞

Tp 細胞

Ts/c 細胞

1.3~2.8であり、浸潤性癌でも1.4前後であった。腫瘍底部では、BCG 未治療例では1.5前後であったのに対し、BCG 治療例では、表在性癌においては1.5前後2例、3.5前後2例であった（図5）。浸潤性癌では放射線療法を併用した1例の11.56を除いては1.5~2.5程度であった。非腫瘍部では、BCG 未治療例では1.4前後であるのに対し、BCG 治療例では、表在性癌においては1.4~2.5、浸潤性癌では1.4~5.7と一定の傾向は認めえなかったが、4.5以上の高値を示した2例は放射線療法併用例であった。

考 察

膀胱移行上皮癌に対し、BCG が直接的抗腫瘍効果を有することが報告されてきたが、著者らが今回検討した72例の表在性癌においても、19例で腫瘍は消失し、28例で著明な縮小を示しており、有効率（CR+PR）は65.3%で、諸家の報告²³⁾とほぼ一致していた。当教室の渡辺らは、表在性膀胱癌に対する検討で、腫瘍長径5mm 未満の腫瘍は8~12回のBCG 膀胱注によりほぼ完全に消失し、5mm 以上の腫瘍も大きさに従って縮小効果を示すことを報告しており¹¹⁾、また、今回の検討で、膀胱注回数が4回以下では有効率36.8%、5回以上では75.7%と、回数が多いほど効果が大きいことが認められ、腫瘍縮小効果は腫瘍の大きさに伴った治療回数に関連していると考えられる。Brosman²⁾によると、上皮内癌（CIS）の33例に対して毎週1回のBCG 膀胱注で12週後に22例（67.0%）の症例で腫瘍が消失したが、その後回数を増やすに従い腫瘍消失症例は、18週後には28例（85.0%）、24週後には31例（94.%）と増加しており、Kelley ら³⁾も表在性癌11例、CIS 12例について、各々6回終了後、6例、12回後には8例に腫瘍消失をみている。さらに自験例におけるBCG 膀胱注単独、膀胱注に皮内接種または経口投与併用、膀胱注に皮内接種および経口投与併用の各方法による治療効果の差が、膀胱注回数に左右されることから、腫瘍縮小効果はBCG 膀胱注によるものと考えられた。Morales¹⁵⁾、Lamm¹⁶⁾は皮内接種を併用しているが、効果に差はなく、皮内接種、経口投与の関与については現在なお不明である。

一方、浸潤性癌に対しては、主にT₂の9症例で表層部腫瘍の脱落によりPRを示したが、壁内浸潤腫瘍細胞の変性、消失は認めえなかった。諸家の治療成績でも、Lamm¹⁶⁾はStage BまたはCの17症例中7例にCRを得ているものの、一般的には浸潤性癌に対する効果は否定的であり、なぜ表在性癌にのみ有効なのかは解明されておらず、作用機序と深く関わっているも

のと思われる。

BCG の抗腫瘍作用の機序として、局所的には、① BCG と腫瘍細胞膜表面に共通抗原が存在するという説⁴⁾、② BCG に特異的な炎症反応が起こり、腫瘍細胞がマクロファージにより非特異的に破壊される、いわゆる“巻き込み効果”とそれに続く腫瘍特異免疫誘導による“アジュバント効果”が主役を演じているという説⁵⁾などがみられる。さらにBCG 注入患者の尿中にinterleukin 2の量が増加しているとの報告⁶⁾もあり、局所で何等かの免疫反応が起こっていることが示唆されてきている。一方、局所作用の全身効果への波及としては、① Natural Killer 活性（NK 活性）の増強⁷⁾、② Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity 活性の増強⁸⁾、③ Interferon (IFN) の誘導⁹⁾、④ Interleukin 1 (IL-1) 産生能の増強¹⁰⁾などの説がみられる。また、Kelley¹⁷⁾はPurified protein derivative (PPD) 皮内反応が効果と関連があり、BCG 膀胱注前に陰性であった症例のうち、注入後に陽転したものでは77%がtumor free の状態であったのに対し、陽転しなかった症例では、34%に効果がみられたにすぎなかったとし、Lamm¹⁶⁾もPPD 皮内反応と効果との相関を報告している。著者らもこれまでに、局所効果と全身効果の両面から検討を行ってきた結果、全身的な免疫パラメータでは、NK 活性の増加している傾向が認められたものの、末梢リンパ球、T 細胞サブセットおよびB 細胞の比率、IFN、IL-1等に変化は認めず、PPD 皮内反応の陽転度と効果との相関も証明しえなかった。

一方、局所的には、①腫瘍細胞の変性、壊死脱落が表層から起こり、腫瘍細胞層の重層性の低下をきたし、②腫瘍部、非腫瘍部を問わずリンパ球をはじめとする多彩な細胞浸潤を認めることが特徴的であった¹¹⁾¹²⁾。そこで著者らは、まずBCG 膀胱注前後の組織内浸潤細胞の経時的変動を腫瘍間質について検討した。BCG 膀胱注前、表在性癌のリンパ球は29例中26例が（±）、3例が（+）であり、浸潤性癌でも7例中5例が（±）、1例が（+）で、さらに形質細胞は表在性癌29例中23例で（±）であった。これに対し、他細胞は表在性、浸潤性の如何を問わず、治療前はほとんどの例で（-）であり、膀胱癌腫瘍間質に浸潤する細胞は、リンパ球および形質細胞が主体であった。癌の浸潤部およびその周囲にリンパ球の浸潤がみられることは、古くから認められており、リンパ球および形質細胞の浸潤が強いものほど予後が良好であるという報告が諸種腫瘍においてみられ、細胞性間質反応を担癌生体の癌に対す

る局所防御反応の一表現であるとする見解が多くなった。しかし、膀胱癌においては、Sarma¹⁸⁾は予後との相関ありとしているが、Mostofi¹⁹⁾は相関なしとして一定しておらず、藤本ら²⁰⁾はこの理由を癌に対する宿主の局所反応にはリンパ球以外の細胞浸潤や線維性間質反応も関係し、とくに膀胱癌の場合は二次感染の存在も考慮すべきであるためと考え、リンパ球浸潤を癌に対する局所免疫の一部であるとは速断できないとしている。自験例でもリンパ球だけは癌の深達度に関係なくほぼ全例に認めており、癌に対する局所反応と思われたが、その浸潤度はほとんどがごく軽度であり、防御的意義をもつか否かについては不明であった。

これに対し BCG 膀胱注後はいずれの細胞も経時的に増加する傾向を示した。BCG 膀胱注後の組織内浸潤細胞について、Lamm ら²¹⁾も慢性炎症性細胞の著明な浸潤を認めており、Lage ら²²⁾は慢性炎症性変化としながらも、特にリンパ球、形質細胞の浸潤を挙げ、好酸球は浸潤が強い場合には認めたとしている。実験的にも、Meijden ら²³⁾が、guinea pig の膀胱内に BCG を注入してリンパ球と組織球を主体とした炎症性変化を認めており、さらに Bloomberg ら²⁴⁾は、PPD で感作した犬膀胱に BCG を注入し、組織球を主体とした多彩な細胞浸潤を認めたとしながらも、急性膀胱炎の際に見られる紅斑などが認められないことから、むしろ immune reaction に似ると報告している。そこで著者らは BCG 膀胱注に対して有意に反応する、換言すれば、BCG の作用機序に関わっている細胞を推測する必要があると考え、BCG 膀胱前後の各浸潤細胞の平均浸潤度を比較することにより、その変動の有意性を検討した。その結果、腫瘍間質においては、表在性癌ではいずれの細胞も、また浸潤性癌でも好中球以外はすべて有意に増加していたが、腫瘍底部では表在性癌でリンパ球と組織球が、非腫瘍部では表在性癌でリンパ球と組織球、浸潤性癌でリンパ球、形質細胞、組織球がそれぞれ有意に増加していた。BCG 膀胱前後の組織内浸潤細胞の変動を癌の深達度別または部位別に検討した報告は見当たらないが、Guinan ら²⁵⁾は、非担癌ラットの膀胱内に BCG または Thiotepa をそれぞれ注入し、BCG 注入群ではリンパ球の増加が優位であったのに対し、Thiotepa 注入群では多核白血球の増加が優位であり、リンパ球の増加が BCG 膀胱注に特徴的であると考えている。また、Khalil ら²⁶⁾はメラノーマ患者への BCG 局所注入でリンパ球と組織球の浸潤を認めたとしており、著者らの検討結果からも、BCG 膀胱注後認め

られる多彩な浸潤細胞のうち、特に有意に反応した細胞はリンパ球と組織球であると思われた。

一方、BCG は弱毒結核菌であるが、結核性病変の場合、組織学的に滲出性変化と増殖性変化の 2 型に大きく分類される。そのうち増殖性変化は、類上皮細胞、ラングハンス型巨細胞の増殖、好銀線維および膠原線維の新生、血管の新生が特徴的であり、結核に特異的な結核結節は、組織学的には、中心部における滲出性反応の結果として生じた乾酪化層の周辺に、組織球由来と考えられている類上皮細胞およびラングハンス型巨細胞からなる特異的肉芽層と、その外層における線維芽細胞、リンパ球を主とする非特異的肉芽層からなるとされている²⁷⁾。Lamm ら²¹⁾、Lage ら²²⁾は BCG 膀胱注後の膀胱壁生検組織内に、異物型巨細胞を伴う類上皮細胞肉芽腫が形成される例があると報告しており、Kelley ら¹⁷⁾によれば 62 例中 37 例 (59.7%) に認められたという。BCG 膀胱注後形成される類上皮細胞肉芽腫には、乾酪壊死を伴わないという報告が一般的であったが、Lage ら²²⁾も 39 例中 1 例のみではあるが乾酪壊死を認めた症例を報告している。自験例においても、BCG 膀胱注前は認められなかった類上皮細胞肉芽腫が、膀胱注後、腫瘍間質では数例に認めたのみであるが、腫瘍底部、非腫瘍部には表在性癌、浸潤性癌ともに形成されることが多く、症例により (++)~(+++) の著しい形成をみたものもあった。類上皮細胞肉芽腫周囲に、ラングハンス型巨細胞または異物型巨細胞が認められるものもあり、さらに、明瞭な乾酪壊死を伴い、通常の結核性変化に類似した所見を呈したものの 2 例に認められた。自験例において、特に有意に増加した細胞がリンパ球と組織球であったという結果も、結核性病変における主に増殖性変化に関連した変動と考えることができるかもしれない。

このように増加するリンパ球、組織球の浸潤度を表在性癌において、BCG 治療有効例と無効例で比較したところ、有効例では腫瘍間質、腫瘍底部、非腫瘍部のいずれにおいても、膀胱注後有意に増加していたのに対し、無効例では腫瘍間質において有意に増加したのみであり、有効例では BCG 膀胱注によって結核類似の炎症が腫瘍部周囲から広範に深層にまで及んでいることが示唆された。すなわち、BCG の抗腫瘍効果発現には、宿主側の BCG に対する強い局所反応性が関与していると思われた。

浸潤細胞の変動が結核に類似した変化であってもリンパ球が主体をなしていることから、増加するリンパ

球の種類が何かを同定することで、リンパ球の抗腫瘍効果における役割が推測できるのではないかと考え、モノクローナル抗体を用いたリンパ球サブセットの検討を行った。その結果、BCG 治療例の特に腫瘍底部、非腫瘍部に T_p 細胞の浸潤が著明に認められた。Guinan ら²⁸⁾も前記動物実験で、BCG 注入群に特徴的に増加したリンパ球は T リンパ球であったとし、Ratliff ら²⁸⁾は、MBT-2 を移植した無胸腺ヌードマウス膀胱内に BCG を注入しても抗腫瘍効果がみられなかったが、BCG で感作した脾細胞を養子移入した後に BCG 膀胱を行うと有意に効果がみられたため、BCG の効果発現に細胞性免疫能が必要で、特に T リンパ球が重要であると報告している。さらに、 T_h/T_s 比を測定した著者らの結果では、BCG 治療の如何を問わずいずれの部位においても 1.0 以上と $T_{h/i}$ 細胞が優位であり、治療後の T_h/T_s 比は症例によって異なるが、同程度かまたは高値であったことから、増加したリンパ球特に T_p 細胞は BCG 治療後もそのサブセットの比率が治療前とほぼ同じであったか $T_{h/i}$ 細胞がやや増加したことを疑わせた。EI-Demiry ら²⁹⁾は、BCG 膀胱後の腫瘍組織内に $T_{h/i}$ 細胞が有意に増加したと述べており、Stefanini ら³⁰⁾も、BCG 膀胱例では腫瘍部、非腫瘍部ともに T リンパ球が著明に増加し、 T_h/T_s 比は常に 1.0 以上であったことを報告している。自験例で、BCG 膀胱後増加した T_p 細胞のうち、 $T_{h/i}$ 細胞が優位であったことが BCG の作用機序といかに関連するかについては現段階では結論できず、今後さらに細かい分類をしたサブセットの変動を検討することが必要であると思われる。

結 語

膀胱移行上皮癌に対し膀胱内注入を中心とする BCG 治療を施行し、その抗腫瘍効果を判定するとともに、BCG 膀胱後に増加する各種組織内浸潤細胞が、BCG の作用機序にいかに関わっているかを検討し、以下の結果を得た。

1. 表在性癌 72 例では、CR 19 例、PR 28 例を示し、有効率 (CR+PR) は 65.3% であった、ただし、浸潤性癌 31 例では PR 9 例を認めたのみであった。

2. 表在性癌において BCG 膀胱回数が 4 回以下では有効率 36.8% であったのに対し、5 回以上では 75.5% であり、注入回数と腫瘍縮小効果の間に有意の相関を認めた。また、効果は BCG 膀胱によると考えられ、皮内接種、経口投与の関与については不明であった。

3. BCG 膀胱前後において、腫瘍間質につき経時的にみると、BCG 膀胱前はリンパ球ないし形質細胞の浸潤は認めたが、他細胞はほとんど認めえなかった。これに対し、膀胱後はいずれの細胞も増加する傾向を示した。

4. BCG 膀胱前後で浸潤細胞の平均浸潤度の変動を比較すると、腫瘍間質では、浸潤性癌の好中球以外はほぼすべての細胞が有意に増加した。しかし、腫瘍底部、非腫瘍部では、リンパ球と組織球、ときに形質細胞が有意に増加しており、BCG に特に有意に反応した細胞はリンパ球と組織球であることが確認された。

5. 類上皮細胞肉芽腫は、膀胱後、腫瘍底部または非腫瘍部で形成されることが多く、類上皮細胞肉芽腫には、ときにラングハンス型巨細胞が存在し、乾酪壊死を伴い通常の結核性変化に類似した所見を呈したものを 2 例に認めた。リンパ球と組織球が特に有意に増加したという結果からも、BCG 膀胱により結核性病変における主に増殖性変化に関連した変動が起きている可能性が示唆された。

6. 表在性癌において、BCG 膀胱後有意に増加したリンパ球と組織球の変動と臨床効果との関連を検討した結果、有効例では腫瘍間質、腫瘍底部、非腫瘍部のいずれにおいても有意に増加したのに対し、無効例では腫瘍間質において有意に増加したのみであった。有効例では結核類似の炎症が腫瘍部周囲から広範に深層にまで及んでいることが示唆され、BCG の抗腫瘍効果発現には、宿主側の BCG に対する強い局所反応が関与していると思われる。

7. 増加するリンパ球の種類をモノクローナル抗体を用い免疫組織化学的に検討した結果、 T_p 細胞の浸潤が著明で、その T_h/T_s 比は 1.0 以上と $T_{h/i}$ 細胞が優位であった。

なお、本論文の要旨は第 78 回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Morales, A., Eidinger, D. and Bruce, W.: Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. J. Urol., 116, 180—183, 1976.
- 2) Brosman, S.A.: The use of Bacillus Calmette-Guerin in the therapy of bladder carcinoma in situ. J. Urol., 134, 36—39, 1985.
- 3) Kelley, D.R., Ratliff, T.L., Catalona, W.J., Shapiro, A., Lage, J.M., Bauer, W.C., Haaff, E. O. and Dresner, S.M.: Intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer; effect of Bacillus Calmette-Guerin via-

- bility on treatment results. *J. Urol.*, 134, 48—53, 1985.
- 4) 佐々木甚一, 神田 進, 沢村大輔, 神谷受利, 稲葉安正, 川嶋通子: BCG と腫瘍細胞の共通抗原性—BCG によるマウス腫瘍の治療—, *癌と化学療法*, 12, 1432—1439, 1985.
 - 5) 徳永 徹: BCG の抗腫瘍作用の機序 (続), *BCG 免疫療法誌*, 4, 25—27, 1980.
 - 6) 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.
 - 7) Thatcher, N. and Crowther, D.: Changes in nonspecific lymphoid (NK, K, T cell) cytotoxicity following BCG immunisation of healthy subjects. *Cancer Immunol. Immunother.*, 5, 105—107, 1978.
 - 8) Hersh, E.M., Murphy, S.G., Quesada, J.R., Gutterman, J.U., Gschwind, C.R. and Morgan, J.: Effect of immunotherapy with *cornebacterium parvum* and methanol extraction residue of BCG administered intravenously on host defense function in cancer patients. *J.N.C.I.*, 66, 993—1002, 1981.
 - 9) Imanishi, J., Kita, M., Sugino, S., Won, S. and Kishida, T.: Enhanced production of interferon in mice infected with *mycobacterium bovis* BCG. *Biken J.*, 24, 123—126, 1981.
 - 10) 早川正道, 秦野 直, 斉藤史郎, 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.
 - 11) 渡辺耕平, 鈴木唯司, 高橋信好, 川口俊明, 工藤達也, 古川利有, 舟生富寿: 膀胱癌の免疫治療成績, *日泌尿会誌*, 78, 1092—1102, 1987.
 - 12) 田中 聡, 鈴木唯司, 川口俊明, 高島 徹, 舟生富寿: 膀胱癌に対する BCG の効果とその作用機序について, *BCG 免疫療法誌*, 12, 41—49, 1988.
 - 13) 日本癌治療学会: 固形がん化学療法効果判定基準, *日癌治誌*, 21, 929—942, 1986.
 - 14) Shi, Z., Itzkowitz, S.H. and Kim, Y.S.: A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 36, 317—322, 1988.
 - 15) Morales, A.: Long-term results and complications of intracavitary *Bacillus Calmette-Guerin* therapy for bladder cancer. *J. Urol.*, 132, 457—459, 1984.
 - 16) Lamm, D.L.: *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy for bladder cancer. *J. Urol.*, 134, 40—47, 1985.
 - 17) Kelley, D.R., Haaff, E.O., Becich, M., Lnge, J., Bauer, W.C., Dresner, S.M., Catalona, W.J. and Ratliff, T.L.: Prognostic value of purified protein derivative skin test and granuloma formation in patients treated with intravesical *Bacillus Calmette-Guerin*. *J. Urol.*, 135, 268—271, 1986.
 - 18) Sarma, K.P.: The role of lymphoid reaction in bladder cancer. *J. Urol.*, 104, 843—849, 1970.
 - 19) Mostofi, F.K. and Sesterhenn, I.: Lymphocytic infiltration in relationship to urologic tumors. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 49, 133—141, 1978.
 - 20) 藤本佳則, 長谷川義和, 加藤直樹, 酒井俊助, 栗山学, 河田幸道, 西浦常雄: 膀胱癌組織内の浸潤リンパ球の検討, *泌尿紀要*, 29, 1037—1045, 1983.
 - 21) Lamm, D.L., Thor, D.E., Harris, S.C., Reyna, J. A., Stogdill, V.D. and Radwin, H.M.: *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy of superficial bladder cancer. *J. Urol.*, 124, 38—42, 1980.
 - 22) Lage, J.M., Bauer, W.C., Kelley, D.R., Ratliff, T. L. and Catalona, W.J.: Histological parameters and pitfalls in the interpretation of bladder biopsies in *Bacillus Calmette-Guerin* treatment of superficial bladder cancer. *J. Urol.*, 135, 916—919, 1986.
 - 23) Van der Meijden, A.P.M., de Jong, W.H., Steerenberg, P.A., Walvoort, H.C., de Boer, E.C., Debruyne, F.M.J. and Ruitenberg, E.J.: Intravesical BCG administration in the guinea pig. A histomorphological study. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.*, 55, 207—215, 1988.
 - 24) Bloomberg, S.D., Brosman, S.A., Hausman, M. S., Cohen, A. and Battenberg, J.D.: The effects of BCG on the dog bladder. *Invest. Urol.*, 12, 423—427, 1975.
 - 25) Guinan, P., Shaw, M. and Ray, V.: Histopathology of BCG and thiotepa treated bladders. *Urol. Res.*, 14, 211—215, 1986.
 - 26) Khalil, A., Rappaport, H. and Misset, J.L.: Kinetics of histologic changes in human melanoma after local immunotherapy with BCG. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1, 193—196, 1976.
 - 27) 鈴江 懐, 小林忠義: 病理学総論, 1 版, p. 522—551, 医学書院, 東京, 1960.
 - 28) Ratliff, T.L., Gillen, D. and Catalona, W.J.: Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J. Urol.*, 137, 155—158, 1987.
 - 29) El-Demiry, M.I.M., Smith, G., Ritchie, A.W.S., James, K., Cumming, J.A., Hargreave, T.B. and Chisholm, G.D.: Local immune responses after intravesical BCG treatment for carcinoma in situ. *Brit. J. Urol.*, 60, 543—548, 1987.
 - 30) Stefanini, G.F., Bercovich, E., Mazzeo, V., Grigioni, W.F., Emili, E., D'errico, A., Lo Cigno, M., Tamagnini, N. and Mazzetti, M.: Class I and class II HLA antigen expression by transitional cell carcinoma of the bladder: Correlation with T-cell infiltration and BCG treatment. *J. Urol.*, 141, 1449—1453, 1989.

(1992年9月7日受理)