担癌患者単球—マクロファージ系細胞の免疫調節機能

大 鹿 幸 信

Jpn. J. Clin. Immun., 10(4) : 368~375, 1987.

Immunomodulating Capacity of Monocyte-Macrophage System in Cancer Patients

Yukinobu Ohshika

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka City University, Medical School

【Summary】

To investigate the immunomodulating capacity of monocyte-macrophage system cells ($M\phi$) in cancer patients, we prepared an *in vitro* assay system for interleukin-1 (IL-1) and prostaglandin E (PGE) which are produced and released by these cells. Using this assay, we observed the changes in the $M\phi$ capacity in accordance with the progress of the cancer, and also investigated the $M\phi$ cell surface Ia antigen positive ratio (Ia ratio) with activated $M\phi$ as an index. The results indicated that the $M\phi$ in healthy control showed peak values of IL-1 and PGE production and the Ia ratio on the 3rd day of incubation, which means that both IL-1 and PGE were released simultaneously with the activation. IL-1 production and the Ia ratio decreased as the cancer progressed. However, PGE production tended to be less than that in healthy control in patients in the early stage of cancer, but markedly increased in cases of advanced cancer. Therefore, it was clear that the T-cell activating capacity of $M\phi$ is comparatively well maintained in early cancer cases, but is greatly decreased in advanced cases. To observe the effects of cancer patients' serum on the $M\phi$ capacity, $M\phi$ of healthy control was preincubated in the serum of advanced cancer patients, and IL-1 production and the Ia ratio decreased, while PGE production markedly increased. Therefore, it was assumed that immunosuppressive factors in the serum of cancer patients inhibited the presentation of Ia antigen on the $M\phi$ cell surface, and this resulted in suppression of the capacity.

From the above investigations, one aspect of the immunodeficient condition in cancer patients became clear, and it appeared that when non-specific immunotherapy is considered, consideration should also be given to the suppression of PGE secretion as well as increases in IL-1 production in $M\phi$.

Key words : cancer patients,
macrophage function
immunomodulating capacity,
IL-1,
Prostaglandin

【概 要】

我々は、担癌患者の単球-マクロファージ系細胞 (Mφ) の免疫調節機能について検討するため、それより産生放出される Interleukin-1 (IL-1) および Prostaglandin E (PGE) を定量する *in vitro* の assay 系を作成した。この assay 系を用いて、癌の進展に伴う Mφ 機能の変遷につき観察するとともに、活性化 Mφ の指標とされる Mφ 膜表面 Ia 抗原陽性率 (Ia 率) についても検討を加えた。その結果、健常人 Mφ は培養 3 日目で IL-1, PGE 産生量および Ia 率の peak を示すことから、その活性化に伴い、IL-1 とともに PGE も同時に放出されることが判明した。また、癌の進展に伴い IL-1 産生量および Ia 率は低下を示した。しかし、PGE 産生量は初期癌症例では健常人に比較して、むしろ低下傾向を示し、進行癌症例では著明に上昇した。このことから、初期癌症例群 Mφ の T cell 活性化能は比較的保たれているが、進行癌症例群 Mφ のそれはきわめて低下していることが判明した。さらに、癌患者血清の Mφ 機能に及ぼす影響を観察するため、健常人 Mφ を進行癌患者血清にて preincubation したところ、IL-1 産生量および Ia 率の低下をきたし、PGE 産生量はきわめて上昇した。このことから、癌患者血清中の免疫抑制因子が Mφ 膜表面の Ia 抗原の発現を抑制し、その機能障害を引き起こす機序が推察された。

以上の検討から、担癌患者の免疫不全状態の一面が明らかとなり、非特異的免疫療法を考える場合、Mφ の IL-1 産生量の増加とともに PGE 分泌の抑制も考慮すべきであると考えられた。

I. はじめに

担癌患者の免疫不全状態において、Mφ の補助能の低下が認められており、我々もこれを確認し報告してきた¹⁾。そしてそれは Mφ より産生される液性因子である IL-1 の分泌不全が大きな要因となるものと推察された²⁾。

一方最近、Mφ より細胞性免疫能に抑制的に働く PGE の産生が報告されており³⁾、IL-1 とともに細胞性免疫能に調節的役割を果たしている可能性が考えられる。そこで、Mφ の IL-1 産生量、PGE 産生量を測定する *in vitro* の assay 系を作成し、癌の進展に伴うこれら Mφ 機能の変遷につき検討を加えた。さらに活性化 Mφ の指標とされる Mφ 膜表面の Ia 抗原陽性率 (Ia 率) を検討し、Mφ 機能との相関を推察するとともに、癌患者血清の Mφ 機能および Ia 率に及ぼす影響を観察することによって、担癌患者の免疫不全状態の解析を試みた。

II. 方法および対象症例

1. Mφ 機能測定法作成のための基礎的検討

1) Mφ の採取方法

ヘパリン加末梢血より Ficoll Hypaque 比重遠心法にて単核球分画を採取する。これを tissue culture slide (マイルス三共社製、東京) に加え、30 分間培養を行い、

この slide glass に付着した細胞を Mφ として用いた。なお Mφ の数の調整は、あらかじめ単核球分画を α-ナフチールブチレート染色を用いてその中に占める Mφ の割合を算出しておき、1 culture dish 当たり Mφ の数が 5×10^5 個になるように添加し行った。

2) Mφ の T cell 活性化能の測定方法

tissue culture slide に付着させた Mφ を、10% FCS 添加 medium にて培養を行う。なお培養液中には Mφ 刺激のため lipopolysaccharide (LPS) (Gibco 社製、N.Y., U.S.A.) $40 \mu\text{g}/\text{dish}$ 加えておく。さらに放出された Mφ の液性因子の T cell 活性化能を検討するため、この培養上清を C₃H/He マウス (7 週齢) の胸腺細胞に添加し、その PHA 反応性を ³H-thymidine の取り込みにて観察した。なおこの assay 系には 96 穴 microwell (Becton Dickinson 社製、Ca., U.S.A.) を使用し、1 well 当たり培養上清 0.1 ml, PHA $2 \mu\text{g}$, 6-mercaptoethanol 1×10^{-5} mol/ml 添加 RPMI-1640 medium に浮遊させた thymocyte 1×10^6 個を加えた。これを 37°C, 5% CO₂ 濃度に調整された incubator 内で培養し、培養終了 6 時間前に ³H-thymidine 0.2 μCi を加え、cell harvester にて thymocyte を採取後、液体シンチレーションカウンターにて thymocyte に取り込まれた ³H-thymidine の放射活性を測定し dpm にて示した。

3) Mφ の PGE 産生量の検討

(1) indomethacin (Ind.) の Mφ 機能 (T cell 活性化能) に及ぼす影響

健常人 Mφ を LPS 40 μg/dish にて刺激する系に、同時に Ind. (日本メルク万有社製、東京) を添加し、24 時間培養を行い、T cell 活性化能に及ぼす影響を観察した。Ind. の添加量は 2 μg, 20 μg, 50 μg/dish とした。

(2) Mφ 培養上清中の PGE 濃度と Augmentation Index (A.I.) との比較

健常人 Mφ を medium A (LPS 40 μg のみ添加) および medium B (LPS 40 μg, Ind. 2 μg を添加) にて培養を行い、培養上清の PGE 濃度を RIA 法にて測定するとともに T cell 活性化能についても検討を行った。また A.I. は下記に示すごとく、medium B の medium A に対する T cell 活性化能の増加率 (%) にて求めた。

$$A.I. = \left(\frac{\text{medium B の T cell 活性化能}}{\text{medium A の T cell 活性化能}} - 1 \right) \times 100$$

さらに算出した A.I. と RIA 法にて測定した PGE 濃度との相関性を検討した。

4) Mφ の IL-1 産生量の測定方法

Mφ 培養液中に LPS 40 μg/dish, Ind. 2 μg/dish を加え、その培養液の T cell 活性化能を IL-1 産生量と表現した。

5) Mφ の膜表面 Ia 抗原陽性率 (Ia 率) の検討方法
tissue culture slide の培養上清を採取後、この slide glass に付着した Mφ をパパニコロウ液 (50% ether, 50% ethanol) にて固定する。それに一次抗体として monoclonal 抗体である OKIa₁-抗ヒト Ia 抗体 (マウス IgG, Ortho 社製, N.J., U.S.A.) を 45 分間作用させ、さらに二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG (ヤギ, Cappel 社製, Penn., U.S.A.) を 45 分間作用させる間接蛍光抗体法にて Mφ 膜表面 Ia 抗原を染色した。これを蛍光顕微鏡にて観察し、Mφ 100 個当たりの膜表面に強度に蛍光を発する Mφ の割合を Ia 率 (%) とした。

6) Mφ の IL-1 産生量, PGE 産生量, および Ia 率の経日的検討

健常人 (癌患者) Mφ の IL-1 産生量, PGE 産生量および Ia 率を培養 1 日目, 3 日目, 5 日目, 7 日目にて測定した。

2. 子宮頸癌患者 Mφ の免疫調節能の検討

1) 対象症例

大阪市立大学医学部附属病院にて入院治療を受けた子宮頸癌症例 19 例を対象とした。その内、上皮内癌症例 2 例, stage Ia 期症例 1 例, stage Ib 期症例 6 例の計 9

例を初期癌症例群 (E 群), また stage IV 期症例 7 例および再発症例 3 例の計 10 例を進行癌症例群 (A 群) とした。対照症例 (H 群) としては子宮筋腫症例 3 例, 良性卵巣嚢腫症例 9 例, 子宮脱症例 1 例, および健常人 6 例の計 19 例を用いた。

2) Mφ の免疫調節能の検討方法

図 1 に示すごとく tissue culture slide に Mφ を採取し、24 時間, 10% 自己血清添加 medium にて preincubation し、medium を除去洗浄後 medium A または medium B にてさらに 48 時間培養を行う。IL-1, PGE 産生量についてはその培養上清を用い、Ia 率についてはその slide glass を用いて検討した。

3) 癌患者血清の健常人 Mφ 機能に及ぼす影響

健常人 Mφ を、24 時間, 10% 進行癌患者血清添加 medium にて preincubation し、その medium を除去洗浄後 medium A または medium B にてさらに 48 時間培養を行い IL-1, PGE 産生量および Ia 率を測定した。

III. 結 果

1. Mφ 機能測定法作成のための基礎的検討結果

1) Ind. の Mφ 機能 (T cell 活性化能) に及ぼす影響 (図 2)

Mφ の T cell 活性化能を Ind. 非添加系で検討すると 24,000 (dpm) であるのに対して、Ind. 2 μg, 20 μg, 50 μg/dish の添加でそれぞれ 35,000 (dpm), 38,000 (dpm), 29,000 (dpm) の値を示した。

2) Mφ 培養上清中の PGE 濃度と A.I. との相関 (図 2)

Y 軸に PGE 濃度 (pg/ml), X 軸に A.I. (%) をとり plot したところ $Y=28.6X+10$, 相関係数 $r=0.846$ にてきわめて強い正の相関を示した。 ($p<0.01$)

3) Mφ の IL-1, PGE 産生量および Ia 率の経日的検討

(1) IL-1 産生量 (図 3)

健常人 Mφ は培養 1 日目で 35,000 (dpm), 3 日目 50,000 (dpm), 5 日目 45,000 (dpm), 7 日目 36,000 (dpm) を示した。一方、癌患者 Mφ は培養 1 日目で 20,000 (dpm), 3 日目 36,000 (dpm), 5 日目 32,000 (dpm) と低値を示した。

(2) PGE 産生量 (図 3)

健常人 Mφ は培養 1 日目で 48%, 3 日目 63%, 5 日目 32%, 7 日目 23% を示した。一方、癌患者 Mφ は培養 1 日目で 27%, 3 日目 22%, 5 日目 13%, 7 日目 5% と低値を示した。

図 1 Assay Method of IL-1, PGE Activity and Ia₁Ag Expression of $M\phi$

Effect of Indomethacin on T cell Activating Capacity of $M\phi$ obtained from Healthy Control

Correlation between Concentration of PGE and Augmentation Index

Change of IL-1 Productive Activity on Mφ Cultivation

Change of PGE Productive Activity on Mφ Cultivation

Change of Ia positive Ratio on Mφ Cultivation
(Mφ obtained from Healthy Control)

図 3

(3) Ia 率 (図 3)

健康人 Mφ は採取時 5% であったが培養 1 日目で 35%, 3 日目 68%, 5 日目 62% と増加を示した。

2. Mφ 機能測定法

まず基礎的研究で Mφ を LPS で刺激する系に Ind. を添加したところ, 2 μg/dish にて Mφ の T cell 活性化能が約 50% 上昇したことから, Mφ の刺激により IL-1 および PGE の両者の産生が促進されるものと推察された。

また実際の IL-1 産生量をみる場合, PGE の産生を抑制した系 (Ind. 添加系) での T cell 活性化能をみるのが適当であり, またその添加量は 2 μg/dish が至適と考えられた。さらに Mφ 培養上清中の PGE 濃度を RIA 法で測定したところ, Ind. 2 μg/dish の添加にて 15 pg/ml とほぼ完全に Mφ の PGE 産生は抑制されることが判明した。また Ind. 非添加系の PGE 濃度は T cell 活性化能を指標として求めた A.I. ときわめて強く相関することより (図 2), 今後簡便化のため Mφ の PGE 産生量を A.I. にて代用することにした。

また IL-1, PGE, Ia 率の検討 (図 3) で健康人では 3 日目に peak を示した。しかし癌患者では PGE 産生量は 1 日目にすでに peak を示したが, 3 日目と大きな差はないことから, 健康人, 癌患者ともに Mφ の培養日数は 3 日間とすることにした。以上の成績より, Mφ の IL-1, PGE 産生量および Ia 率の検討方法を図 1 のごとく設定した。

3. 癌患者 Mφ の免疫調節能

1) IL-1 産生量 (図 4)

H 群では $43,000 \pm 22,000$ (dpm) であるのに対して, E 群では $29,000 \pm 15,000$ (dpm) と低下傾向を示し, A 群ではさらに $12,000 \pm 7,100$ (dpm) と有意の低下 ($p < 0.01$) を示した。

2) PGE 産生量 (図 4)

H 群では $32 \pm 27\%$ であるのに対して, E 群では $21 \pm 27\%$ とむしろ低下傾向を示し, A 群では $74 \pm 27\%$ と有意の上昇 ($p < 0.01$) が認められた。

3) Ia 率 (図 4)

H 群では $65 \pm 23\%$ であるのに対して, E 群では $41 \pm 18\%$ と有意の低下 ($p < 0.01$) を示し, A 群では $13 \pm 8\%$ とさらに一層低下することがわかった。

4) 健康人 Mφ 機能に及ぼす癌患者血清の影響

(1) IL-1 産生量 (図 5)

健康人 Mφ を control (健康人, allogenic) 血清にて preincubation したときの値は, $53,000 \pm 23,000$ (dpm) であるのに対して, 癌患者血清にて preincubation したときは $12,000 \pm 12,000$ (dpm) と有意の低下 ($p < 0.01$) を示した。

図 4 Change of Mφ Function with Clinical Stage

図 5 Effect of Cancer Serum to Mφ Function
(Mφ obtained from Healthy Control)

(2) PGE 産生量 (図 5)

健常人 Mφ を control 血清にて preincubation したときの値は $33 \pm 15\%$ であるのに対して、癌患者血清で preincubation したときは $61 \pm 25\%$ と有意の上昇 ($p < 0.01$) を示した。

(3) Ia 率 (図 5)

健常人 Mφ を control 血清にて preincubation したときの値は $76 \pm 16\%$ であるのに対して、癌患者血清にて preincubation したときは $22 \pm 18\%$ と有意の低下 ($p < 0.01$) を示した。

IV. 考 察

免疫学の発展とともに Mφ 機能があらゆる観点から見直され、解析された結果、Mφ は単に異物を貪食するだけでなく、免疫応答の誘導期から発現期に至るすべての段階に作用し、とりわけ T cell が関与する免疫反応に調節的な働きをすることが明らかとされてきた⁴⁾。我々も Mφ の免疫調節作用を補助能として検討してきたが、最近 Mφ は PGE を産生することも知られてきており、その影響も検討する必要が生じた。

そこで種々の基礎的検討の後、Mφ の IL-1、PGE 産生量および Ia 率を検討する assay 系を作成し、これを

用いて子宮頸癌の進展に伴う Mφ 機能の変遷を検討した。その結果、IL-1 産生量は H 群に比較して、E 群、A 群と癌の進展に伴い低下することが認められた。またこれと密接に関連して Ia 率も同様に低下することが判明した。一方、PGE 産生量に関しては H 群に比較して、E 群はむしろ低下傾向を示すが、A 群に至っては著しく上昇する結果を示した。したがって E 群では Ia 抗原の発現の抑制に伴い、IL-1 産生量の低下を認めるが、PGE の分泌抑制により、Mφ の T cell 活性化能は比較的保たれていることがうかがわれた。我々が過去、子宮頸癌の進展に伴う Mφ 補助能の変遷を検討したとき、E 群 Mφ は H 群に比較してむしろ上昇することを報告した⁵⁾ が、その機序として PGE の分泌抑制が関与するものと解釈される。ここで、PGE の生理的意義を考えると、H 群 Mφ もその活性化に伴い IL-1 とほぼ同時に分泌されることから、PGE の産生は IL-1 に対する negative feed back 機構と考えることができる。しかし A 群に至っては IL-1 産生量のさらに一層の低下に加えて、この negative feed back 機構をも障害され著明な PGE の分泌上昇のため、T cell 活性化能は著しく低下しているものと推論された。

以前より、Ia 抗原陽性 Mφ は抗原提示細胞として着目されていた⁶⁾。大山口⁷⁾らも Mφ をその膜表面 Ia 抗原の有無によって subpopulation に分けて、その機能面から検討している。その中で、Ia 抗原陽性 Mφ はリンパ球機能の増強に関与し、Ia 抗原陰性 Mφ はその抑制に関与していると述べている。今回我々の検討においても、Mφ の Ia 率と IL-1 産生量とが密接に関連することから、Ia 抗原陽性 Mφ が IL-1 を dominant に産生していると推察される。しかし、H 群 Mφ に比較して E 群 Mφ は Ia 率が低下するにもかかわらず PGE 産生量はむしろ低下傾向を示すことから、Ia 抗原陰性 Mφ が PGE を dominant に産生しているとはいきれない面がある。だが A 群 Mφ に関しては、Ia 抗原陰性の PGE を dominant に産生する“suppressor Mφ”であると考えられた。

それでは、なぜ担癌患者 Mφ はこのような機能異常を示すのであろうか。古くから、担癌患者の免疫不全状態、すなわち癌が宿主の免疫監視機構から escape する機序については諸説があり、中でも血清中の免疫抑制因子の報告は数多くみられる⁸⁾。我々も癌患者血清中の免疫抑制因子が、健常人リンパ球の PHA 反応性を抑制す

ることから⁹⁾、これを血清効果として卵巣癌の診断に応用する試みを報告してきた。つまり癌患者血清中の免疫抑制因子が、effector cell の blocking を行っていると考えられるわけであるが、今回は Mφ に対して癌患者血清中の免疫抑制因子がいかなる影響を与えるのかを検討した。その結果、健常人 Mφ は進行癌患者血清の作用で、IL-1 産生量および Ia 率が著明に低下し、PGE 産生量は逆に上昇することより、A 群 Mφ の状態に陥ることがよく理解された。この機序は、免疫抑制因子が Mφ の膜表面を干渉することによって、Ia 抗原の発現を抑制し IL-1 の産生不全をもたらす。しかも PGE による negative feed back 機構をも障害し、PGE 産生量の増加に伴い、著しく T cell 活性化能が低下するものと推察された。なお、初期癌患者血清は健常人 Mφ 機能に障害を与えなかった。これは血清中の免疫抑制因子が微量であったためと解釈される。

我々はこれまで Mφ を賦活することによって非特異的免疫療法の治療効果を期待してきたが¹⁰⁾、今回の検討により suppressor factor としての PGE の関与も大きかったことがわかった。したがって、Mφ の IL-1 産生量を増加させるとともに、PGE の分泌抑制を行うことによってさらに非特異的免疫療法の治療効果が期待でき、現在これを検討中である¹¹⁾。

V. 結 論

- 1) Mφ が放出する免疫調節因子として IL-1 とともに PGE が関与する。
- 2) E 群 Mφ の T cell 活性化能は比較的保たれているが、A 群 Mφ はきわめて低下している。
- 3) 進行癌患者血清は Mφ 機能を強く障害することより、血清中の免疫抑制因子の存在が示唆された。
- 4) 非特異的免疫療法を考える場合、Mφ の IL-1 産生量の増加とともに PGE 分泌の抑制も考慮すべきであると考えられた。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました恩師須川 佑教授に深く感謝の意を表します。また本研究に際し直接の御指導を賜りました梅咲直彦講師、また御協力を頂いた産婦人科免疫グループの諸先生、実験助手の吉野雅子様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 梅咲直彦・中出潤子・中森 宏・迫 久男・李東満・須川 佶：担癌宿主の細胞性免疫能における末梢血単球機能の意義。日本産婦人科学会誌, 32 : 1082~1088, 1980.
- 2) 梅咲直彦・中出潤子・李 東満・川端政実・大鹿幸信・迫 久男・須川 佶：担癌個体末梢血単球培養上清の T-cell・mitogen 反応性に及ぼす影響。産婦人科の世界, 41 : 803~807, 1982.
- 3) Charles, M.B., Patricia, A.D., Gretchen, A. C., Arabella, B.T. : Prostaglandin E₂-mediated suppression of cellular immunity in colon cancer patients. Surgery, 95 : 71~76, 1984.
- 4) 見明俊治：マクロファージによる免疫応答の調節。臨床免疫, 15 : 435~441, 1983.
- 5) 梅咲直彦・中出潤子・中森 宏・迫 久男・李東満・須川 佶：担癌個体の細胞性免疫能に果たす末梢血単球の意義（単球添加法を用いての検討）。日本産婦人科学会誌, 33 : 664~670, 1981.
- 6) Miguel, J.S., David, J.W., Jennifer, A.W. : Ia antigen expression and antigen-presenting function by macrophages isolated from hypersensitivity granulomas. The Journal of Immunol., 128 : 2739~2744, 1982.
- 7) 大山口渥・大島駿作：マクロファージによるリンパ球機能の調節。臨床免疫, 15 : 113~120, 1983.
- 8) 漆崎一郎：液性免疫抑制因子。臨床免疫, 14 : 590~597, 1982.
- 9) Ueda, K., Toyokawa, M., Nakamori, H., Sako, H., Umesaki, N., Nakade, J., Lee, T., Sugawa, T. : Immunosuppressive effect of serum in patients with ovarian carcinoma. Obst. and Gynecol., 51 : 225~228, 1978.
- 10) 大鹿幸信・梅咲直彦・須川 佶：マクロファージの Interleukin-1 産生能に及ぼす OK-432 の影響について。第42回日本癌学会総会記事, 1983 pp. 128.
- 11) 大鹿幸信・梅咲直彦・川端政実・迫 久男・須川 佶：非特異的免疫療法における Indomethacin 投与の意義について。日本癌治療学会誌, 21 : 65~71, 1986.