Glioblastoma 長期生存例の免疫学的検討

峯浦 一喜・森 照明

片倉 隆一・鈴木 二郎

Immunological Study in Long-term Survivals of Glioblastoma

KATSUYOSHI MINEURA, TERUAKI MORI, RYUICHI KATAKURA and JIRO SUZUKI

Division of Neurosurgery, Institute of Brain Diseases, Tohoku University

Summary

Adequate follow-ups were obtained in 173 of 179 cases (96.6%) of histologically verified glioblastoma patients experienced at Tohoku University Hospital during the 30 years from 1947 to 1977. Excluding 10 pre- and the 27 postoperative deaths within one month, the survival rates of the remaining 136 postoperative cases after one, 3 and 5 years were 55%, 24% and 12% respectively.

Of the 14 cases who survived more than 5 years, 6 cases (4/6 males, 12~52 years old) are still alive and were the subject of this immunological study. The results of the study revealed that; 1) cytotoxicity of lymphocytes against KS-1 cells (established cell line derived from human glioblastoma) was augmented both preoperatively and within one month postoperatively in glioblastoma cases without radiation and chemotherapy. In long-term survivals of glioblastoma, cytotoxicity of lymphocytes was depressed significantly ($p<0.01$) to the level of healthy persons. In cytotoxicity-augmented glioblastoma cases, the administration of the anti-cancer drug made the cytotoxicity of lymphocytes depressed; 2) value of T-cells and count of peripheral lymphocytes were not significantly different among the preoperative patients, postoperative cases and the long-term survivals of glioblastoma; other preoperative brain tumor cases; and healthy persons; 3) tuberculin reaction was negative in 2 and positive in 4 of 6 long-term survivals; and 4) titer of serum immunoglobulin in long-term survivals were within the normal range.

Judging from the above results, we concluded that immunity in long-term survivals is similar to healthy individuals.

Key words: glioblastoma, long-term survivals, immunological study, cytotoxicity of lymphocytes

I はじめに

原発性悪性脳腫瘍である glioblastoma は、これまでに手術および種々の補助療法の試みがなされているにもかかわらず、いまだ満足すべき治療成績は得られていない。すなわち、大半が術後1年以内に死亡しており、1年生存率13~40%、5年生存率0~7%という現況である¹⁾²⁾⁶⁾¹⁰⁾²⁰⁾²³⁾²⁴⁾²⁹⁾³⁰⁾。しかし一方では、長期生存例の検討がなされ10年以上の生存例の報告も散見される²⁰⁾²³⁾²⁹⁾。

今回、我々はこれらの長期生存例の特徴を検索するた

め、現在までに当教室で経験した5年以上の長期生存14例中、現在生存中の6例について免疫学的検討を加えたので報告する。

II 対象および方法

1977年3月までの過去30年間に当教室で組織学的に再検討しえた glioblastoma (astrocytoma grade III, IV) は179症例である。そのうち術後1ヵ月以上生存した136例の1年生存率は55%、3年生存率は24%、5年生存率は12%である。

東北大学脳研脳神経外科

[連絡先: 〒982 仙台市長町5-13-1, 東北大学脳研脳神経外科, 峯浦一喜]

1978年9月27日 受稿

Table 1 Clinical summary in long-term survivals of glioblastoma

No.	Case	Sex	Age	Initial Symptom	Location	Operation	Radiation	Chemotherapy	Histology	Survival Period
1	C.K.	F	5	convulsion	L P O	total	—	—	IV	10Y 8M*
2	H.S.	M	3	hemiparesis	R F T	total	+	—	III	9Y *
3	Y.S.	M	16	headache	L lateral ventricle	total	+	—	IV	7Y 3M*
4	H.M.	M	38	headache	R O	total	—	—	III	6Y 1M*
5	T.M.	F	15	headache	R T	total	+	—	III	5Y 5M*
6	S.K.	M	47	headache	Bifrontal	subtotal	— (3)	CQ FT-207	IV	5Y 3M*
7	T.K.	M	26	headache	L F	total	+	—	III	6Y
8	T.H.	F	51	convulsion	L O	total	—	—	III	5Y11M
9	S.S.	F	13	diplopia	L F	subtotal	+	—	IV	5Y 9M
10	Y.S.	F	25	headache	L F	total (2)	— (2)	—	III→IV	9Y 6M
11	S.Y.	F	41	headache	L F	total (1) subtotal (1)	+	—	II→IV	7Y10M
12	T.K.	M	32	convulsion	L F T	total (2)	—	—	I~II→III	6Y10M
13	J.M.	M	18	convulsion	R F P	total (2)	+	—	IV→IV	6Y 2M
14	S.E.	M	27	convulsion	L F	subtotal (3)	— (2)	BLM Vincristin	II→III	5Y 9M

L: left R: right F: frontal T: temporal P: parietal O: occipital CQ: Carboquone BLM: Bleomycin

(): times of operation, or radiation

*: alive on March 31 in 1977

5年以上の長期生存例は14例であり (Table 1), このうち現在生存中の6例 (case 1~6) について免疫学的検討を行った。内訳は、男4例、女2例であり、入院時年齢は3才から47才であり、現在は12才から52才までで、平均29才である。部位は全例テント上である。治療に関しては全例広範囲に腫瘍摘出を行っており、1例 (case 4) を除いては術後放射線療法を併用している。放射線療法は、Tele-⁶⁰Coを用いたクノール4,550~6,560 rad 照射している。化学療法は、再発の1例 (case 6) にも実施しており、合計 CQ 57 mg を持続動注し、FT-20,716 g を経口にて投与し、同時に4,550 rad、さらに6,000 rad の2クールの⁶⁰Co 照射が行われた。

現在全例ステロイド剤および抗癌剤は服用しておらず、最終治療から最短で1年8か月以上経過している (case 6)。4例 (case 1, 3, 4, 5) は有意の日常生活を送っており、2例 (case 2, 6) は介助が必要な状態である。生存期間は術後5年3か月~10年8か月であり、平均8年9か月である。免疫学的検索の対照群として健康人を取り、さらに glioblastoma の術前例および術後1~2か月で化学、放射線療法施行前の例 (glioblastoma 術後例と略す)、他脳腫瘍術前例と比較した。以上の対象につき、下記の項目を検討した。

1. リンパ球の cytotoxic activity

高杉らの方法に準じ測定した⁷⁾²⁸⁾。標的細胞としては、ヒト glioblastoma 由来の established cell line である KS-1 cell を用いた¹¹⁾。リンパ球は被験者の末梢血より Ficoll-Isopaque 法にて抽出した。リンパ球の cytotoxic activity は以下の cytotoxicity で表現した。

$$= \left(1 - \frac{\text{No. of surviving cells/well in MLTC}}{\text{No. of surviving cells/well in control}} \right) \times 100$$

MLTC: mixed lymphocyte—tumor cell culture

2. T-cell

羊赤血球 (SRBC) によるロゼット形成細胞を T-cell (Thymus-derived lymphocyte) として矢田ら³⁵⁾ の変法にて測定した。Ficoll-Isopaque 法にて分離した末梢血リンパ球を cold GVB⁺ (pH 7.2, 0.1% gelatin を含む) で2度洗ったあと、リンパ球が $1 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ となるように非働化ウシ胎児血清 (FCS) を加えた。一方、SRBC 製品 (極東製薬) を cold GVB⁺ で3度洗い、FCS で1%に稀釈しておき、これらのリンパ球、SRBC をそれぞれ0.1 ml ずつ mix した。それを1,000 rpm 5分間遠心し、ただちに再浮遊させてリンパ球を数え、3個以上の SRBC を付着したものを T-cell とした。

3. 末梢リンパ球数

過去2年間の脳腫瘍術前例について検討した。明らかに感染等があり白血球増多症を認めたものは除外した。

4. ツベルクリン反応

精製ツベルクリン液 一般診断用 (日本 BCG 社製) 0.1 ml を前腕屈側皮内に注射し、48時間後に判定し、9 mm 以下を陰性、10 mm 以上を陽性とした。

5. 免疫グロブリン

HYLAND 社製 Immunoplate III を用い、単純放射状免疫拡散法により血清 IgG, A, M を定量した。なお、沈降リングの測定はプレジション法¹⁵⁾によった。

Ⅱ 結 果

1. リンパ球の cytotoxic activity

Glioblastoma 術前6例では $59.8 \pm 13.7\%$ (平均値 $\pm$ SD), glioblastoma 術後6例では $56.5 \pm 14.0\%$ であったが、健常人20例では $4.3 \pm 14.7\%$ 、長期生存6例では $15.3 \pm 19.9\%$ であった。Glioblastoma 術前、術後例と健常人および長期生存例との間に有意差が認められた ($p < 0.01$)。良性脳腫瘍 (neurinoma 7例, meningioma 1例, craniopharyngioma 2例) 術前10例では $42.1 \pm 25.1\%$ であり、健常人との間にのみ有意差を認めた ($p < 0.01$)。 (Fig. 1)

さらに glioblastoma の2症例に関しては抗癌剤投与の前後において cytotoxicity を追跡測定しえたが、抗癌剤投与前の強い cytotoxicity は投与期間中には弱くなり、投与終了後再び増強していることが認められた (Fig. 2)。

2. T-cell

Glioblastoma 術前6例 $55.7 \pm 8.1\%$ 、glioblastoma 術後6例 $58.7 \pm 10.8\%$ 、良性脳腫瘍 (meningioma 3例, neurinoma 2例, ependymoma 1例) 術前6例 $53.3 \pm 12.1\%$ 、長期生存6例 $52.7 \pm 4.1\%$ 、健常人20例 $58.5 \pm 6.6\%$ であり、いずれの間にも統計学的有意差は認められなかった (Fig. 3)。

3. 末梢リンパ球数

Glioblastoma 術前17例 $1,930 \pm 746/\text{mm}^3$ 、astrocytoma 6例 $1,690 \pm 529/\text{mm}^3$ 、pituitary adenoma 20例 $2,190 \pm 820/\text{mm}^3$ 、meningioma 12例 $2,170 \pm 714/\text{mm}^3$ 、neurinoma 9例 $1,750 \pm 789/\text{mm}^3$ 、長期生存6例 $2,010 \pm 849/\text{mm}^3$ 、健常人15例 $2,220 \pm 701/\text{mm}^3$ と全体的にはどの間にも有意差は認められなかった。しかしそのうち、リンパ球数 $1,500/\text{mm}^3$ 以下の症例について検討すると、健常人では15例中1例 (6.7%) であるのに比べ、glioblastoma, astrocytoma, neurinoma では30%以上を占めており、さらに長期生存例でも6例中2例と末梢リンパ

Fig. 1 Cytotoxicity of lymphocytes in patients with brain tumors.

Fig. 2 Changes of cytotoxicity of lymphocytes during the chemotherapy in 2 patients with glioblastoma.

Fig. 3 T-cells value in patients with brain tumors.

球の減少傾向にある症例がみられた (Fig. 4)。

4. ツベルクリン反応

陰性率を比較すると、glioblastoma 術前17例中8例 (47%), neurinoma 9例中4例 (44%), meningioma 12例中5例 (42%), pituitary adenoma 17例中5例 (29%), 長期生存6例中2例 (33%) であった。なお、健常人は22例中1例 (5%) であった。

Fig. 4 Counts of peripheral lymphocytes in patients with brain tumors.

Table 2 Tuberculin reaction in patients with brain tumors

	Case	Negative	Positive	N/N+ P(%)
Pituitary adenoma	17	5	12	29
Meningioma	12	5	7	42
Neurinoma	9	4	5	44
Astrocytoma	5	2	3	40
Glioblastoma	17	8	9	47
Long-term survival	6	2	4	33
Healthy adult person	22	1	21	5

(1975~1976)

Glioblastoma は健常人に比べ明らかに高い陰性率を示している ($p < 0.01$) が、他の良性脳腫瘍との間には差はなく、長期生存例との間にも大差は認められなかった (Table 2)。

5. 免疫グロブリン

長期生存 6 例中 1 例で IgG が 2,300 mg/dl と高値を示したが、他の症例では正常値を示しており、IgA, M は全例正常値であった¹⁶⁾。長期生存 6 例は、血清蛋白および分画、肝機能検査において異常値は認めなかった (Table 3)。

IV 考 察

近年、脳腫瘍患者の免疫状態を示す種々のパラメータに関する報告と腫瘍特異抗原を示唆する報告²⁾⁴⁾⁵⁾⁸⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁸⁾²¹⁾²²⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾³¹⁾³²⁾³³⁾³⁴⁾が多くみられるようになってきた。我々もこれまでに術前および再発 glioblastoma 患

Table 3 Serum immunoglobulin in long-term survivals of glioblastoma

No.	Case	Sex	Age*	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)
1	C.K.	F	20	2300	340	105
2	H.S.	M	12	860	160	84
3	Y.S.	M	24	820	360	130
4	H.M.	M	44	1200	430	200
5	T.M.	F	20	1200	170	160
6	S.K.	M	52	1400	370	98
Normal Titer				887-1940	121-593	65-264

*1977.3.31

者の末梢リンパ球は、健常人のそれと比べて glioblastoma cell に対し有意の差を持って強い cytotoxicity を示すことを明らかにしてきたが⁷⁾¹⁹⁾、今回も同様の結果を得、再確認した。諸家の脳腫瘍患者リンパ球の cytotoxicity に関する報告でも、方法および target cell 等に若干の相違はあるが、ほぼ同様の結果をみており²⁾¹³⁾³³⁾、脳腫瘍特異抗原の存在を示唆している。

Glioblastoma 患者リンパ球の cytotoxicity の変動に関する報告はみられないが、我々の検索では腫瘍摘出後 1~2 カ月では術前と同様に増強したままであるが、術後 5 年以上の長期生存例では健常人と同程度にまで減弱していた。このことは手術および補助療法により腫瘍すなわち抗原が消失減弱するにつれ、免疫監視機構の担い手であるリンパ球の抗腫瘍効果も弱まり、リンパ球の cytotoxicity が減弱したものと考えられた。

したがって再発すれば、リンパ球は再び抗腫瘍効果を持ち cytotoxicity は増強するものと考えられる。このようにリンパ球の cytotoxicity が抗原量に呼応して変動すると思われるので術後の免疫学的パラメーターとして有効と考えられるが、抗癌剤の投与によりリンパ球の cytotoxicity は容易に減弱するため、抗癌剤投与中の症例では再発の指標となりえないこともあり注意を要する。また Heppner らの報告⁹⁾にもみられるように、cell-line 化された細胞を target cell として長期間 cytotoxicity を follow していく場合、target cell の抗原性の変化による cytotoxicity の変動もみられることもあり、さらに注意が必要である。

次に、リンパ球の subpopulation である T-cell に関しては、glioblastoma 術前、術後、他脳腫瘍例、長期生存例、健常人との間に有意差は認めず、祖父江らの報告²⁶⁾と一致した。今後はさらに、Helper-T, Killer-T, suppressor-T 等の subset に関しても検討していくことが必

要と思われた。

末梢リンパ球数およびツベルクリン反応に関しては、従来、脳腫瘍患者で末梢リンパ球数の減少、ツベルクリン反応の陰性化など cell-mediated immunity の低下が報告¹⁷⁾²⁶⁾されてきた。

今回、我々が検討した術前脳腫瘍患者では、末梢リンパ球数に関しては、glioblastoma および astrocytoma 患者において平均値で多少低値を示した程度で健常人との間に明らかな有意差は認めなかったが、ツベルクリン反応にて、脳腫瘍患者、特に glioblastoma 患者は健常人に比べ高い陰性率を示し従来の報告と一致した。長期生存例に関しては、ツベルクリン反応において健常人との間に若干の差を認めるも、末梢リンパ球数および免疫グロブリン値は健常人との間に差は認められなかった。

以上のことより、我々が免疫学的パラメーターとして検索しえた項目においては、結局長期生存例は健常人との間に明らかな有意差は認めず、免疫状態は健常人とほぼ同様であると言える。このことは手術および補助療法が効を奏して腫瘍が減少、消失すれば、腫瘍という抗原に呼応した免疫状態の変化は正常化していくと思われる。この状態は抗原認識および抗体産生力の不顕化であるのか、あるいは消失であるのか、またさらにどの時点でそれが行われるのか、今後長期間にわたる検討が必要と考えられた。

V 結 論

術後5年以上生存している glioblastoma 患者6例について、免疫学的検索として、リンパ球の cytotoxicity, T-cell, 末梢リンパ球数, ツベルクリン反応, 免疫グロブリンについて検討した。

1. リンパ球の cytotoxicity は glioblastoma 術前例、術後例において増強し、長期生存例では健常人と同程度まで低下していた。

2. T-cell, 末梢リンパ球数は、glioblastoma 術前例、他脳腫瘍例、長期生存例、健常人との間に有意差は認められなかった。

3. ツベルクリン反応は、長期生存例6例中2例が陰性であった。

4. 長期生存例において、血清免疫グロブリンは正常範囲であった。

以上より、長期生存例の免疫状態は健常人とほぼ同じであると結論した。

なお本稿の要旨は、昭和52年10月27日第36回日本脳神経外科学会総会（於・大阪）において発表した。

文 献

- 1) BLOOM, H. J. G., PECKHAN, M. J., RICHARDSON, A. E., ALEXANDER, P. A. & PAYNE, P. M.: A controlled trial to assess the value of specific active immunotherapy in patients treated by radical surgery and radiotherapy. *Br J Cancer* 27: 253-267, 1973
- 2) BOUCHARD, J. & PIERCE, C. B.: Radiation therapy in management of neoplasms of central nervous system, with special note in regard to children: Twenty years' experience, 1939-1958. *Am J Roentgenol* 84: 610-628, 1960
- 3) BROOKS, W. H., CALDWELL, H. D. & MORTARA, R. H.: Immune responses in patients with glioma. *Surg Neurol* 2: 419-423, 1974
- 4) EGGERS, A. E.: Autoradiographic and fluorescence antibody studies of the human host immune response to gliomas. *Neurology* 22: 246-250, 1972
- 5) FEBVRE, H., MAUNOURY, R., CONSTANS, J. P. & TROUILLAS, P.: Réactions D'hypersensibilité Retardée Avec des Lignée de Cellules Tumoraes Cultivées in Vitro Chez des Malades Porteurs de Tumeurs Cérébrales Malignes. *Int J Cancer* 10: 221-232, 1972
- 6) FRANKEL, S. A. & GERMAN, W. J.: Glioblastoma multiforme. Review of 219 cases with regard to natural history, pathology, diagnostic methods, and treatment. *J Neurosurg* 15: 489-503, 1958
- 7) 府川 修, 森 照明, 堀 重昭, 荒井澄夫: Cytotoxic activity と transfer factor によるその増強効果について. *Neurol Med Chir* 17 (Part II): 115-122, 1977
- 8) HELLSTRÖM, K. E. & HELLSTRÖM, I.: Cellular immunity against tumor antigens. *Adv Cancer Res* 12: 167-223, 1969
- 9) HEPPNER, G., HENRY, E., STOLBACH, L., CUMMINGS, F., McDONOUGH, E. & CALABRESI, P.: Problems in the clinical use of the micro-cytotoxicity assay for measuring cell-mediated immunity to tumor cells. *Cancer Res* 35: 1931-1937, 1975
- 10) JELSMA, R. & BUCY, P. C.: The treatment of glioblastoma multiforme of the brain. *J Neurosurg* 27: 388-400, 1967
- 11) 神野哲夫, 中沢恒幸, 工藤達之: ヒト悪性神経膠芽腫. 長期継代培養株の細胞学的検索. *神経進歩* 15: 154-163, 1971
- 12) KUMAR, S. & TAYLOR, G.: Specific lymphocytotoxicity and blocking factors in tumours of the central nervous system. *Br J Cancer* 28 (Supple 1): 135-141, 1973
- 13) LEVY, N. L., MAHALEY, M. S. & DAY, E. D.:

- In vitro demonstration of cell-mediated immunity to human brain tumors. *Cancer Res* 32: 477-482, 1972
- 14) MAHALEY, M. S. JR., BROOKS, W. H., ROSZMAN, T. L., BINGER, D. D., DUDKA, L. & RICHARDSON, S.: Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 1: Studies of the cellular and humoral general immune competence of brain-tumor patients. *J Neurosurg* 46: 467-476, 1977
 - 15) MANCINI, G., CARBONARD, A. O. & HEREMANS, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235-254, 1965
 - 16) 松友隆志, 吉田俊一, 工藤泰子, 里中陽子: イムノプレートⅢによる免疫グロブリン正常値の検討. 臨床検査20: 78-81, 1976
 - 17) 三木啓全, 佐野圭司, 高倉公朋, 水谷 弘: 悪性脳腫瘍患者のBCGによる補助免疫療法. 神経外科16 (Part II): 357-364, 1976
 - 18) MITTS, M. G. & WALKER, A. E.: Autoimmune response to malignant glial tumours. Preliminary observation. *Neurology* 15: 474-476, 1965
 - 19) MORI, T., FUKAWA, O., AOKI, A. & SUZUKI, J.: Cytotoxicity of lymphocytes in patients with brain tumors. *Neurol Med Chir* 13: 115, 1973
 - 20) NETSKY, M. G., AUGUST, B. & FOWLER, W.: The longevity of patients with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 7: 261-269, 1950
 - 21) 織田祥史, 武内重二, 半田 肇: 脳腫瘍の特異抗原. 脳外1: 27-35, 1973
 - 22) 小野豪一, 李 文相, 寺門敬夫, 住江寛俊, 石井昌三: 脳腫瘍の免疫学的診断および治療の可能性. 神経外科16: 419-426, 1976
 - 23) ROTH, J. C. & ELVIDGE, A. R.: Glioblastoma multiforme: A clinical survey. *J Neurosurg* 17: 736-750, 1960
 - 24) 佐野圭司, 佐藤 修: 脳腫瘍. 外科治療30: 23-28, 1974
 - 25) 清水 隆, 鬼頭健一, 山崎直美, 久保長生, 喜多村孝一: 脳腫瘍患者の免疫能. 神経外科16: 337-347, 1976
 - 26) 祖父江八紀, 谷村憲一, 寺林 征, 石川尚之, 植木幸明: 脳腫瘍の免疫学的研究 (第1報). 脳神経27: 629-635, 1975
 - 27) 高倉公朋, SATYANEGARA, 佐野圭司, 小林富二男, 江田淳二: 脳腫瘍の免疫学的診断. 脳外1: 219-224, 1973
 - 28) TAKASUGI, M. & KLEIN, E.: A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation* 9: 219-227, 1970
 - 29) 竹内一夫: Glioblastoma の長期生存例と化学療法. 脳外3: 815-820, 1975
 - 30) TAVERAS, J. M., THOMPSON, H. G. & POOL, J. L.: Should we treat glioblastoma multiforme? A Study of survival in 425 cases. *Am J Roentgenol* 87: 473-479, 1962
 - 31) 寺林 征, 関川和代, 谷村憲一, 植木幸明: 脳腫瘍患者の Blastogenesis. 脳外1: 37-42, 1973
 - 32) THOMAS, D. G., LANNIGAM, C. B. & BEHAN, P. O.: Impaired cell-mediated immunity in human brain tumours. *Lancet* 1: 1389-1390, 1975
 - 33) 植村正三郎, 和田伸一, 児玉万典, 松角康彦: 悪性脳腫瘍患者の細胞性免疫. Lymphocytotoxicity と血清および髄液内 blocking factor の術後低下と回復. *Neurol Med Chir* 16 (Supple): 67-68, 1976
 - 34) WAHLSTRÖM, T., LINDER, E., SAKSELA, E. & WESTERMARK, B.: Tumor-specific membrane antigens in established cell lines from gliomas. *Cancer* 34: 274-279, 1974
 - 35) 矢田純一, 橘 武彦: ヒトリンパ球の Subpopulation の分別. 免疫実験操作法Ⅱ, 日本免疫学会編: 473-475, 1972