日消外会誌　16（1）：87～91，1983年

癌患者腹水の免疫抑制能に関する検討

千葉大学医学部第1外科
雨宮　邦彦　藤本　茂　石神　博昭
橋川　征夫　大山　欣昭　呉　正信
遠藤　文夫　R.D. セレスタ　志村　賢範
高橋　修　奥井　勝二

IMMUNE RESPONSE SUPPRESSION BY ASCITIC FLUID OF PATIENTS WITH GASTROINTESTINAL CANCER

Kunihiko AMEMIYA, Shigeru FUJIMOTO, Hiroaki ISHIGAMI, Nobuaki OHYAMA, Masanobu KURE, Fumio ENDO, R.D.SHRESTHA, Takanori SHIMURA, Osamu TAKAHAHASHI and Katsuji OKUI
lst Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

腹水中の免疫抑制能を癌性腹水を有する胃癌20例，大腸癌10例の腹水について肝硬変7例の腹水を対照として検討した．健康人および癌患者本人のリンパ球を用いてリンパ球混合培養，mitogenによるリンパ球幼若化反応を行い，これらに対する抑制作用を検討するために培養開始時より癌性腹水を加え，対照としては蛋白濃度を等しくした肝硬変腹水を用いた．癌性腹水の免疫抑制はT細胞全体ともいえる抑制を示す場合から，T細胞の一部を選択的に抑制する場合など迄様々な程度の免疫抑制を示し，またdose dependencyを示した．現在迄に，CEA, immunosuppressive acidic protein（IAP）とは異なることが判っているので，これをascitic immunosuppressive factor（AIF）と仮称した．

索引用語：消化器癌，癌性腹水，免疫抑制因子

はじめに

癌患者血清中には免疫機能抑制物質が多量に存在し癌の進展を促進している[1)2)]．一方著者らは癌患者腹水[3)]と胃液中[4)~6)]の免疫抑制因子について検討し，それぞれが肝硬変腹水，胃潰瘍症例の胃液中にはほとんど認められないことを検索した．本稿においては消化器癌患者腹水の免疫抑制に作用する因子をさらに検索して，その濃度による抑制性の相違，ならびにautologousおよびallogenicのリンパ球混合反応とplant mitogenなどによるリンパ球幼若化反応に対する作用の間の相関を調べるとともに，著者らの報告している消化器癌患者腹水中の免疫抑制因子が，immunosuppressive acidic proteinを部分的に含有しているが，その多くは異なるものであることが判明したので，これをascitic immunosuppressive factor（AIF）と仮称し報告する．

研究材料および方法

腹水を有する胃癌20例，大腸癌10例および対照としての肝硬変7例の腹水を無菌的に採取した後7000×g，30分間の遠沈により腹水中の細胞成分を除去し，次いでその上清を0.22μmの膜濾過（Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.A）により滅菌し，Lowry[7)]法によりその蛋白濃度を測定した．この際血液および胆汁を含む腹水は対象から除外した．肝硬変7例についてはα-fetoprotein，肝動脈造影，CT-scanning, echographyなどにより肝癌の合併を否定した．

Ficoll Conray比重遠沈法にて健康人および癌患者のリンパ球を分離し，生食にて4回洗浄した後使用した．リンパ球混合反応は健康人リンパ球の場合はtwo-way MLCであり，autologous MLCを行う場合は癌患者のリンパ球をresponderとするone-way MLCであり，それぞれ2×10^6/mlのリンパ球を用いた．mitogen induced lymphoproliferation-LP-反応の場合は2×10^6/mlのリンパ球を用い，mitogenはPHA（Difco, Detroit, U.S.A），Con A（Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden），B cell stimulatorで

あるSpA（Protein A-Sepharose CL-4B, Sepharose protein A）（Pharmacia Fine chemicals, Uppsala, Sweden）をそれぞれ最終濃度として10μg/ml, 2.5μg/ml, 5mg/mlを培養開始時より添加した．リンパ球混合反応，mitogen induced LP反応共に15%AB血清加RPMI 1640培養液（GIBCO, NY, U.S.A.）を用い，培養はFalconあるいはLinbroのmicroplate（flat-bottom）を使用し，15mg/mlの蛋白濃度の腹水上清を5% CO_2培養器内（37℃）における培養開始時より添加し，48時間後に^{3}H-TdR 0.5μCi/wellを加えて，その24時間後に培養を終了し，^{3}H-TdRの取り込みによる放射活性をWallac 1215 Rack Beta liquid scintillation counterにより測定した．

腹水添加による抑制率は，腹水添加培養で得られたcpmの非添加培養cpmに対する%として表わした．また各測定値間の相関は相関係数に基いたStudent's t値により検定し，各平均値の有意差検定はStudent's t検定により行った．

成　績

PHA-LPおよびCon A-LP反応に対する腹水の抑制作用は図1のように，胃癌患者20名の平均値ではPHA-LP 62%，Con A-LP 40%の抑制を示しており，大腸癌患者10名の平均はそれぞれ53%，60%であり，肝硬変患者腹水のそれぞれ34%, 9%より有意に高い抑制率を示している．

MLCおよびSpA-LP反応における腹水の抑制は図2に示されており，胃癌患者腹水の抑制率はMLCで31%, SpA-LPで51%であり，大腸癌患者腹水のそれはそれぞれ51%，63%であり，肝硬変患者腹水のそれぞれ19%，40%より高い抑制作用を示している．ここでB-cell stimulatorであるSpA-LP反応においては肝硬変患者腹水も40%と高い抑制を示しており，胃癌

図1　PHAとConAによるリンパ球幼若化反応に対する腹水の抑制作用

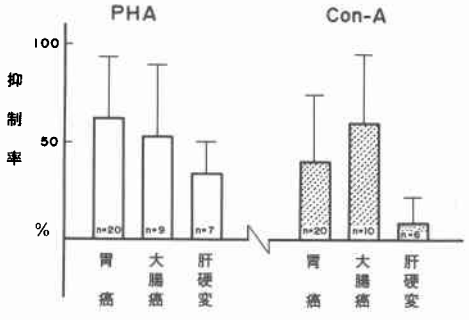


図2　リンパ球混合反応とSpAによる幼若化反応に対する腹水の抑制作用

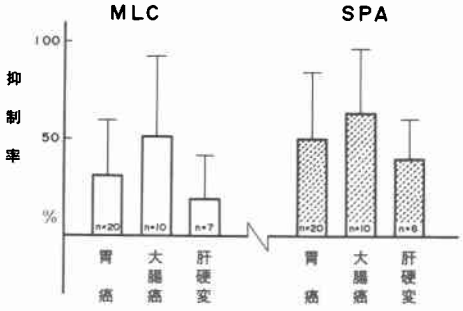
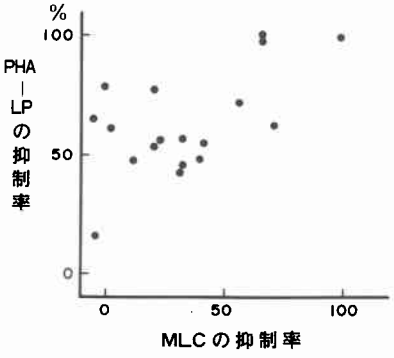


図3　リンパ球混合反応とPHAによる幼若化反応に対する腹水の抑制作用の相関（胃癌）



（t=1.832, p<0.05）および大腸癌（t=1.438, p<0.1）腹水と有意差を認めない．また図1，図2より明らかなごとく，PHA-LPを除いて胃癌腹水より大腸癌腹水の方が常に高い抑制作用を示している．

胃癌腹水の抑制作用についてMLCとPHA-LP反応との相関関係は図3のようであり，r=0.570, t=2.940（p<0.01）で有意の正相関を示している．

胃癌腹水の抑制作用についてMLCとCon A-LPとの相関関係（図4）は，r=0.855, t=6.981であり，p<0.001で有意の正相関を示している．図3，図4より腹水の抑制作用からみた場合，PHA-LPよりCon A-LPの方がMLCにより密接に相関しているといえる．

図は示してないが大腸癌腹水について，PHA-LPとMLC, Con A-LPとMLCの相関関係をみるとそれぞれr=0.9582, t=14.214（p<0.001），r=0.9790, t=20.360（p<0.001）の相関関係を示し，胃癌と同様にMLCとCon A-LPの方がMLCとPHA-LPよりより密接な相関を示した．

一例の胃癌腹水について，腹水中の蛋白濃度と抑制

図4　リンパ球混合反応とConAによる幼若化反応に対する胃癌腹水の抑制作用の相関

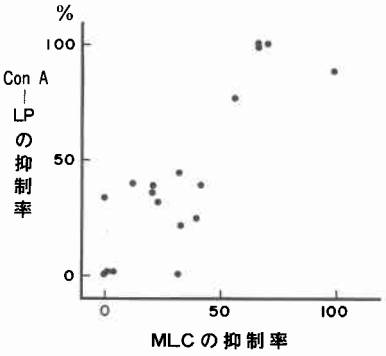
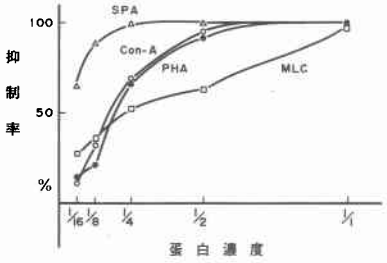


図5　腹水中蛋白濃度と抑制率（原腹水蛋白濃度：10 mg/ml）



率の関係を検討したところ，図5のようにdose dependentに抑制が増加し100%に達した．蛋白濃度は原腹水で10mg/mlである．

弱い抑制作用を示した大腸癌症例の腹水の蛋白濃度と抑制率の関係（図6）においても，dose dependencyを示しているが，その勾配は小さく，また図5と同様にSpA-LPは比較的高いが，Con A-LP，PHA-LP，MLCに対する腹水の抑制作用は低い．その蛋白濃度は原腹水で7mg/mlである．

非常に強い抑制作用を示す胃癌症例について，自己のリンパ球による場合と，健康人であるallogenicのリンパ球による場合の腹水の抑制作用をみたのが図7である．autologousおよびallogenicともに100%近い抑制，すなわちほとんどすべてのT，B細胞を抑制していると推定される．

中等度の抑制作用を持つ胃癌の一症例について，自己のリンパ球反応および健康人リンパ球反応に対する腹水の抑制率を示したものが図8であり，mitogen induced LP反応は両者同程度の抑制作用を示すのに対し，MLCの場合にはallogenic MLCに対する抑制作用は低いのに対し，autologous MLCに対する抑制作用が強いのが目立っている．

図6　腹水中蛋白濃度と抑制率（原腹水蛋白濃度：7 mg/ml）

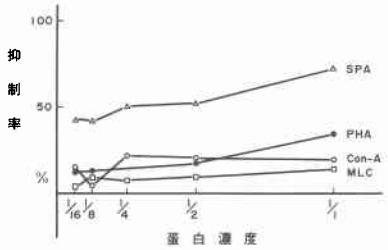


図7　自己および他者リンパ球による反応に対する腹水の抑制作用

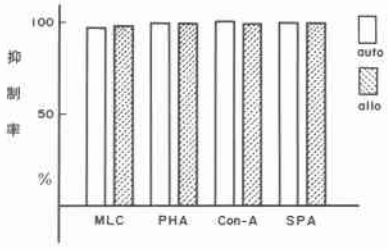
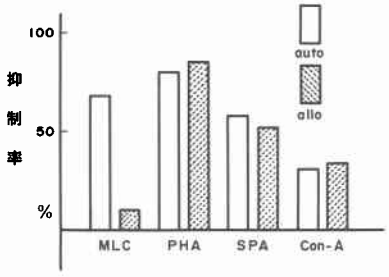


図8　自己および他者リンパ球による反応に対する腹水の抑制作用



考　察

進行消化器癌症例においては免疫反応の低下が漸次進行し，この免疫反応の低下がさらに病勢の進行に対して促進的に働いている．免疫反応，特に細胞性免疫能の低下の機構についてはいまだに充分解明されていないが，リンパ球数の減少とその機能低下，suppressor T細胞の増加とその機能亢進[8]，リンパ球機能を抑制する因子の存在などがいわれている．癌性および肝硬変腹水を用いた今回の検討によって癌性腹水の免疫抑制能が確認された．図1，図2よりPHAあるいはCon Aによるリンパ球の幼若化能を阻害するが，細胞障害

作用を持たない因子が腹水中に含まれることは明らかである．また，20例中16例の胃癌患者の腹水がリンパ球混合反応に対する抑制作用を有し，一方PHA-LPに対する抑制作用は20例中19例に認められている（図3）．さらに，図4に示すようにCon A-LPに対しては20例中16例が抑制作用を示している．

癌患者血清中に存在する免疫抑制能については松田ら[9)10)]，藤本ら[11)12)]によりimmunosuppressive acidic protein（IAP）が報告されており，PHA-LP反応を2.5 mg/mlにおいて約40%抑制し，また，リンパ球混合反応を0.5mg/mlの濃度において60%抑制している．IAPは本論文の抑制因子と類似しているが以下の点において異なる物質であることが判明している．著者らは採取した腹水中のIAPを測定し100～1200μg/mlであることをすでに確認している[13)]が，肝硬変腹水を対照として検討しているために肝硬変腹水の蛋白濃度迄癌性腹水を稀釈して抑制度を測定しており，その稀釈は最低の4倍より25倍に及んでいる．その結果被検癌性腹水のIAP量は5～300μg/ml（平均70μg/ml）となり，IAP以外の抑制因子を大量に含んでいなければ図1，図2の説明は不可能である．これらの理由により本稿における腹水中の免疫抑制因子をascitic immunosuppressive factor（AIF）と名付けた．AIFについては現在その化学的性状を検討中であるが，PHA-LPを抑制しながらリンパ球混合反応を抑制しない4例の胃癌患者の腹水が存在することは，この4例のAIFはPHAに反応するリンパ球のsubpopulationのみを抑制する能力を持っていると推定される．これはリンパ球混合反応において反応するリンパ球はPHAによって幼若化されるリンパ球のsubpopulationとは別のものであるというHayryら[14)]の報告に一致する．

図5，図6に示されるごとく，癌性腹水のAIFはdose dependencyを示すが，図5と図6の症例の蛋白濃度はそれぞれ10mg/ml，7mg/mlであるにも拘わらずその抑制作用に大きな差異を認める．これはAIFの量および質の相違を推測させ，BおよびT細胞のほとんどすべてを抑制すると推定される症例がある一方，allogenicのリンパ球混合反応の抑制作用は弱いのにもかかわらず，autologousのリンパ球混合反応を選択的に抑制していると思えるAIF（図8）があり，これらAIFの性状と予後との関連について検討すべきと考えている．

現在までの悪性腫瘍腹水の免疫学的検索は全てT細胞に対して行われているが，図2，図5および図6のようにB cell mitogenであるSpAによるリンパ球幼若化能をむしろ強く抑制する場合があり，これは後述するように肝硬変腹水にB細胞抑制が顕著であることと関係しているものと推定している．良性疾患による腹水のB細胞抑制の原因について現在説明すべき報告は見当らない．しかしながら石神[4)]は胃癌患者胃液抽出物質のB細胞に対する反応を検討しており，健常人と消化性潰瘍症例の胃液がT，B細胞に対して何らの反応も示さないのに対し，胃癌患者胃液はT細胞よりはむしろB細胞幼若化反応の方をより強く抑制すると報告している．肝硬変腹水の免疫能に対する態度は図1，図2よりT細胞よりむしろB細胞に対し顕著な抑制作用を示している．これは悪性腫瘍により貯留する腹水と良性疾患に帰因する腹水中のAIFの質的相違と考えるべきであろう．

結　語

1．腹水は原疾患の良悪性を問わず，B細胞抑制を来たし，悪性の場合はこれにT細胞の抑制が加わる．

2．癌性腹水の免疫抑制はT細胞全体とも言える抑制を示す場合から，T細胞の一部を選択的に抑制する場合などまで様々な程度の免疫抑制を示し，これをascitic immunosuppressive factor（AIF）と名付けた．

3．癌性腹水のAIFはdose dependencyを示す．

4．AIFによるPHA-LP，Con A-LP，MLC，SpA-LPに対する抑制作用は相互間に有意の相関関係を示した．

文　献

1）Glasgow AH, Nimberg RB, Menzoian JO et al.: Association of anergy with an immunosuppressive peptide fraction in the serum of patients with cancer. N Engl J Med 291：1263—1267, 1964

2）宮崎　勝，藤本　茂，伊藤健次郎：胃癌患者血清の免疫抑制能に関する研究—抗腫瘍性免疫応答よりの回避機構（Escape mechanisms）における役割について—．日外会誌　80：763—773，1977

3）雨宮邦彦，藤本　茂，石神博昭ほか：胃癌患者腹水の免疫抑制能に関する検討．匠のあゆみ．　121：406—408，1982

4）石神博昭，藤本　茂，南　智仁ほか：胃癌患者胃液内の免疫抑制因子の検討．臨免疫　12：791—800，1980

5）石神博昭，藤本　茂，南　智仁ほか：胃癌患者胃液の免疫学的検討．癌の臨　26：30—35，1980

6）石神博昭：胃癌症例胃液抽出物質の免疫学的検討．日外会誌　82：230—236，1981

7) Lowry OH, Roseburgh NJ, Farr AL et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 191：265—275, 1951
8) 失田純一, 中川俊郎, 新保敏和ほか：T細胞の異常と免疫不全. 臨科学 13：647—654, 1977
9) 松田好史, 田村啓二, 北目文郎ほか：癌患者血清中に存在する免疫抑制性蛋白の性状と免疫抑制活性. 医のあゆみ 105：154—157, 1978
10) 松田好史, 本木宏照, 石田名香雄ほか：担癌マウス血清中に見出された免疫抑性活性を示す酸性蛋白. 医のあゆみ 102：747—749, 1977
11) 藤本 茂, 南 智仁, 石神博昭ほか：消化器癌症例における免疫抑制性蛋白（IAP）の検討. 癌の臨 27：222—226, 1981
12) 南 智仁, 藤本 茂, 石神博昭ほか：消化器患者のimmunosuppressive acidic protein(IAP)の検討. 癌の臨 26：1560—1565, 1980
13) 雨宮邦彦, 藤本 茂, 石神博昭ほか：消化器疾患者腹水の免疫抑制能に関する検討. 日消外会誌 15：381, 1982
14) Hayry P, Roberts PJ, Ranki A et al.: Selective response of mouse T lymphocytes to different T mitogens and in mixed lymphocyte culture induced cytolsys reaction. Cell Immunol. 25：121—128, 1976