

胃癌患者における好中球 polarization の検討

長崎大学第1外科

中越 享 渡部誠一郎 平野 達雄
三浦 敏夫 富田 正雄
同 第2内科
朝 長 昭 光

CLINICAL EVALUATION OF NEUTROPHIL POLARIZATION IN SURGICAL PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

**Tohru NAKAGOE, Seichiroh WATABE, Tatsuo HIRANO,
Toshio MIURA, Masao TOMITA and Akimitsu TOMONAGA***
First Department of Surgery and Second Department of Internal
Medicine*, Nagasaki University School of Medicine

胃癌患者60例の末梢血好中球 polarization を測定し、胃癌の病態因子別に検討を加えた。胃癌患者の好中球 polarization は対照群に比べ有意に低下していた。stage IV, n₃, 深達度 ss で示される進行胃癌患者で有意な低下を認めた。術後感染症合併例では、他群に比較して差を認めなかった。死亡例では有意な低下をみた。C領域癌, Borrmann 3型癌, por (低分化腺癌) 癌で有意な低下を示した。これらの成績から進行胃癌患者では、一連の好中球機能の過程で最も初期に位置する polarization という機能においてその低下が示され、担癌患者での好中球機能不全が示唆された。

索引用語：胃癌, 好中球機能, polarization assay

緒 言

走化能 (chemotaxis) は細胞のおかれた環境に存在する刺激物質の濃度により細胞運動の方向性が決められる反応¹⁾をいい、好中球がその機能を果たすための初期段階における重要なメカニズムである。最近、朝長ら²⁾は chemotaxis の簡便法として好中球 polarization assay を報告した。この方法は、ただ単に好中球浮遊液に遊走因子を加えることにより起こる好中球の形態変化をみたもので、容易にかつ短時間でいえる長所を有し、広く臨床に応用できるとした。

一方、担癌患者の易感染性に対して、好中球の食食殺菌能に関する報告³⁾は多いが、その運動能についての報告^{4)~7)}は少ない。今回、著者は胃癌患者60例に対し好中球 polarization assay を応用し、胃癌の病態各因子別に検討を加えたもので報告する。

1. 対 象

長崎大学第1外科で手術を施行した胃癌患者60例を対象とした。年齢は 62.4 ± 12.3 歳 (mean \pm S.D.) で男性36例、女性24例であった。対照群として健康成人46例 (年齢: 29.8 ± 6.1 歳, 男性24例・女性22例) を用いた。参考として同時期の良性消化器疾患28例も対象とした。

2. 方 法

好中球 polarization 測定は手術侵襲・薬剤などの種々の因子を排除する目的から、術前・未治療時に施行した。

1) 好中球 polarization 測定法

a) 好中球浮遊液の作成: 辻⁸⁾の方法に準じて行った。プラスチック注射器に少量のヘパリンを入れ、約10mlの末梢静脈血を採り、6%デキストラン生食水を加えて室温にて約30分間放置し、上層の leukocyte-rich plasma を Ficoll-Conray (9% Ficoll, 33.4% Conray) に重層させ、500g, 30分間遠沈し、pellet に

<1986年3月12受理> 別刷請求先: 中越 享
〒852 長崎市坂本町7-1 長崎大学医学部第1外科

0.87%NH₄Clを加えて溶血させた。150g, 5分間遠沈後, この pellet に Hanks 液 (pH 7.2) を加え洗浄し, 好中球細胞数を1.0×10⁶/ml に調整した。

b) 好中球 polarization 測定法: 朝長ら²⁾の方法を用いた。10⁻⁷M の FMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, Sigma 社) 0.1ml を入れたプラスチックチューブ (栄研 1号) に好中球浮遊液 (1.0×10⁶/ml) 0.9ml を加え (FMLP 最終濃度10⁻⁸M), 37°C 振盪恒温槽で10分間反応させた後, 10%ホルマリン PBS (pH 7.2) 2.0ml を加えて反応を止めた。その後, 氷水中に30分間静置し, 血球計算盤を用いて顕微鏡200倍にて polarized configuration を呈した細胞の割合 (%polarized cells) を数えた。

著者らは, 通常 FMLP 10⁻⁸M 2本, FMLP 9×10⁻¹⁰M 2本, および遊走因子を加えない FMLP 0M 2本の計6本で検査し, 好中球 polarization は FMLP 10⁻⁸M での2本の値の平均値を用い, FMLP 9×10⁻¹⁰M と FMLP 0M での値は参考値とした。

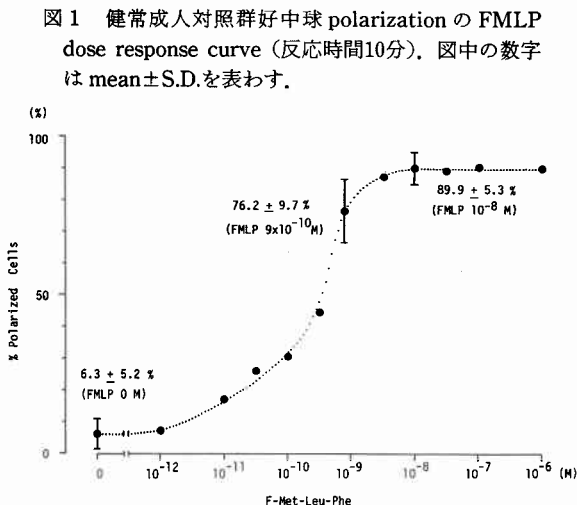
2) 統計的手法

各測定値は平均値で表わし, 平均値の差の検定は Wilcoxon 検定で行い, 危険率5%以下を有意とした。

3. 結果

1) 健常成人対照群好中球 polarization の基礎的検討

図1は健常成人対照群好中球 polarization の FMLP dose response curve である。random polarization において10%以下を示し, 5×10⁻¹¹M より好中球は反応しはじめ, 5×10⁻⁹M から10⁻⁸M にかけて最



大となった。FMLP 10⁻⁸M, 9×10⁻¹⁰M, 0M の3箇所 の polarization を mean±S.D.で図中に示すが, 前述したように FMLP 9×10⁻¹⁰M と0M の2者は参考値とし, FMLP 10⁻⁸M での値を好中球 polarization とした。

健常成人対照群46名の好中球 polarization は 89.9±5.3% (mean±S.D.) で, 男性は89.6±5.1%・女性は90.2±6.0%で男女差は認められなかった。

2) 胃癌患者の好中球 polarization

胃癌患者60例の好中球 polarization は86.4±8.1%と対照群に比べ有意 (p<0.05) に低下を示した。この低下は, 胃癌患者でも多くの症例で対照群と同等の polarization を有するが, 80%以下の低値を示す症例の比率が増加した結果と判断できる。良性消化器疾患々々では88.3±6.9%と対照群と胃癌患者の中間の値を示した (図2)。

次に胃癌患者について「胃癌取り扱い規約」(胃癌研究会編による) で定められた種々の因子別に好中球 polarization を検討した。

a) 肉眼的肝転移 (H) と腹膜播種 (P): 肝転移症例では非肝転移症例に比べ低値を示したが有意差はなかった。一方, 腹膜播種症例では非腹膜播種症例よりやや高値を示した (図3)。

図2 胃癌と良性消化器疾患患者の好中球 polarization. 図中の数字は mean±S.D.. *p<0.05. () は症例数。

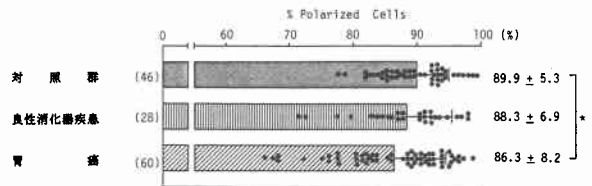
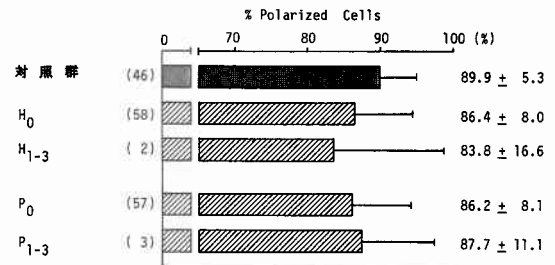


図3 胃癌患者の肝転移と腹膜播種の有無別好中球 polarization. 図中の数字は mean±S.D.. () は症例数。



b) 組織学的リンパ節転移 (n) : n₀~n₂症例では差がみられなかったが, n₃の5症例では著明な低値を示し対照群およびn₀・n₂症例と有意差 (それぞれ p<0.01, p<0.01, p<0.05) を示した (図4).

c) 組織学的深達度 : ss 症例より se, si, sei 症例の方が若干高値であるが, 全体的にみると癌の胃癌内浸潤度が増すにつれ低値を示し, ss 症例では対照群に比べ有意差 (p<0.05) を示した (図5).

d) 組織学的進行程度 (stage) : stage II 症例ではやや低下傾向はあるが stage I と stage III 症例では差

図4 胃癌患者の組織学的リンパ節転移別好中球 polarization. 図中の数字は mean±S.D.. *p<0.05, **p<0.01. () は症例数.

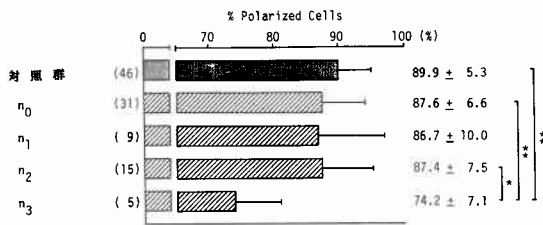


図5 胃癌患者の組織学的深達度別好中球 polarization. 図中の数字は mean±S.D.. *p<0.05. () は症例数.

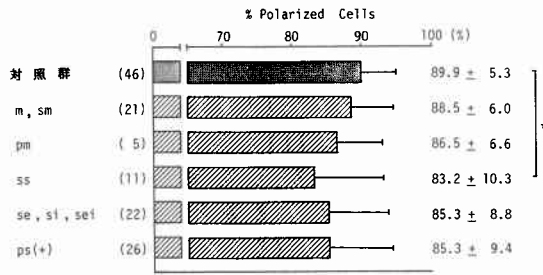
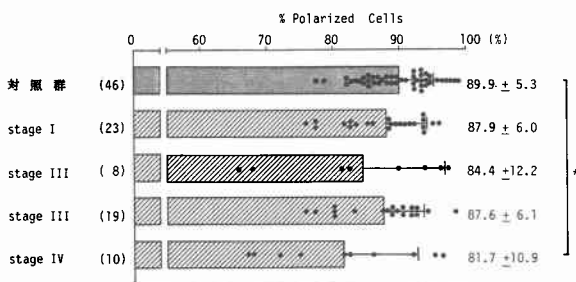


図6 胃癌患者の組織学的 stage 別好中球 polarization. 図中の数字は mean±S.D.. *p<0.05. () は症例数.



が認められない. しかし stage IV 症例では対照群に比べ有意(p<0.05)に低下を示した. この低下は, stage IV 患者でも対照群と同等の polarization を有する例を見られるが, 低値を示す症例の比率が増加した結果と判断できる (図6).

e) 組織学的治癒切除・非治癒切除 : 非治癒切除症例は治癒切除症例より低値を示したが有意差はなく, 対照群に比べ有意差 (p<0.05) を示した (図7).

f) 癌占居部位 : C領域の症例で最も低値を示し対照群に比べ有意差 (p<0.05) を示した (図8).

g) 癌型の肉眼的分類 : Borrmann 2型と3型の症例で低値を示し, 特に Borrmann 3型では対照群と早期癌症例に比べ有意差 (それぞれ p<0.01, p<0.05) を示した (図9).

図7 胃癌患者の治癒切除・非治癒切除別好中球 polarization. 図中の数字は mean±S.D.. *p<0.05. () は症例数.

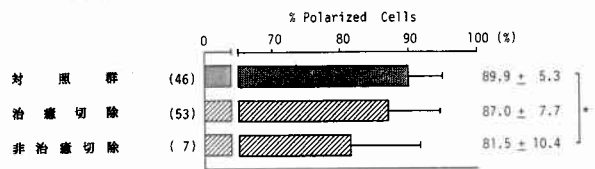


図8 胃癌患者の癌占居部位別好中球 polarization. 図中の数字は mean±S.D.. *p<0.05. () は症例数.

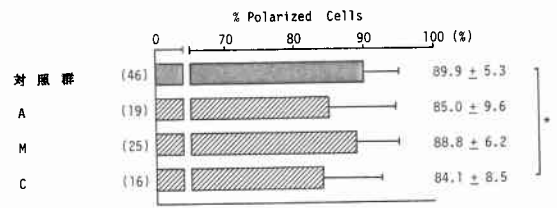


図9 胃癌患者の癌型の肉眼的分類別好中球 polarization. 図中の数字は mean±S.D.. *p<0.05, **p<0.01. () は症例数.

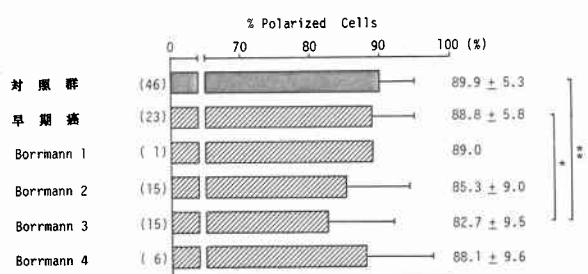


図10 胃癌患者の組織学的分類別好中球 polarization. 図中の数字は mean±S.D.. **p<0.01. () は症例数.

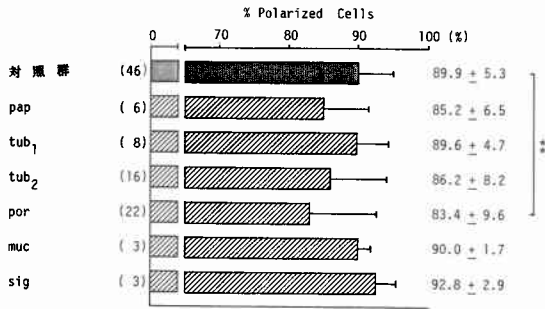
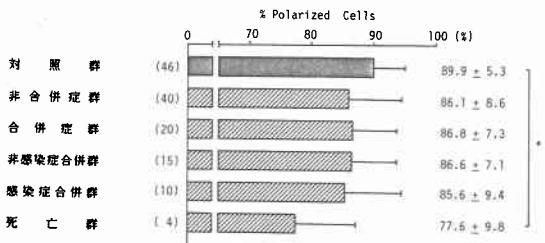


図11 胃癌患者の好中球 polarization と術後合併症と死亡. 図中の数字は mean±S.D.. * < 0.05. () は症例数.



h) 組織学的分類: por (低分化腺癌)の症例で対照群に比べ有意($p < 0.01$)な低下を示し, 一方, sig (印環細胞癌)の症例では亢進傾向を示した(図10).

3) 胃癌患者の好中球 polarization と術後合併および死亡

術後合併症の無い群, 術後合併症を有する群, 術後非感染症合併群, 術後感染症合併群の間には差がみられなかった. しかし, 入院死亡4例は低値を示し対照群に比べ有意差($p < 0.05$)を示した(図11).

4. 考 察

好中球は生体防御の一次機構として重要な役割を果たしている. その機能は, 付着・走化・貪食・殺菌という一連の過程から成り立つが, 近年における各過程の機能検査法の発達は易感染性患者の病態解明に進歩をもたらした. 好中球走化能測定法としては, in vivoでは skin window 法(Rebuck)⁹⁾, in vitroでは Boyden chamber 法(Boyden)¹⁰⁾, agarose plate 法(辻)¹¹⁾が広く用いられている. 最近, 朝長ら²⁾は chemotaxis の簡便法としてヒト好中球 polarization assay を報告した. 好中球が遊走を始めると, その細胞

形態は円形から, 先端は幅広く尾部が細い knob like tail となったいわゆる polarized configuration に変化するが, Smith ら¹²⁾は単に細胞遊液の中に遊走因子を加えることによっても, このような形態変化が起こることを報告した. polarization assay は, このことを応用した好中球機能検査法で, 好中球遊走距離などを測定しているのではなく, ただ単に好中球が遊走因子に反応するかどうかをみたもの, すなわち chemokinesis および chemotaxis の初期の反応をとらえたもので, 従来の chemotaxis 測定法に直接代わりうるものではない. しかし, この方法は細かな手技も必要でなく短時間でいえる長所があり, chemotaxis の簡便法として広く応用できるものと考えられる. さらに, 好中球殺菌能に中心的役割を果たしている活性酸素の産生は FMLP などの遊走因子の刺激によって起こることも知られており, この点からも好中球 polarization は興味を持たれる反応である. 好中球 polarization に関する報告は, 各種抗生剤の影響を検討したもの¹³⁾¹⁴⁾しかなく, 臨床例での応用は今回初めてである.

さて, 宿主抵抗力低下時にみられる感染症での背景因子を分析すると, その基礎疾患には各種悪性疾患が多い¹⁵⁾. ゆえに悪性腫瘍とくに白血球患者の貪食殺菌能を中心とする好中球機能の報告は多くなされている³⁾が, 担癌患者の好中球運動能に関する検討は極めて少ない^{4)~7)}. 山縣ら⁴⁾は, 悪性腫瘍患者10例について Baum 法(Boyden 法改良)を用いた方法での chemotaxis では有意差を認めなかったと報告した. 野田⁵⁾は, 悪性リンパ腫, 神経芽細胞腫, ユーイング肉腫, 網膜芽細胞腫, 横紋筋肉腫患者の好中球運動能は agarose plate 法で正常であったと報告した. Tonooka ら⁶⁾は, 化学療法中の神経芽細胞腫4例と横紋筋肉腫1例の患者では, agarose plate 法ではほぼ正常の chemotaxis を示したと報告した. これらの報告は小児科領域の悪性腫瘍症例が多く, しかも対象症例数が少ないため客観性に欠けるうらみがある. これに反して, Hirano⁷⁾は, 胃癌患者50例の agarose plate 法による好中球運動能の検討では, chemotaxis, random migration とともに低下し, 進行胃癌で著明に低下したが, 早期胃癌では chemotaxis の有意な亢進を認めたと報告した.

今回の著明の成績では, 胃癌患者末梢血好中球 polarization は低下し, 病期の進行度を表わす各因子別の検討では進行胃癌すなわち stage IV, n₃, 深達度 ss の症例で低下を認めた. 好中球の polarization は遊

走因子である FMLP が好中球細胞膜に存在する receptor と結合することによって反応が開始すると考えられる。ゆえに進行胃癌での polarization の低下の原因として、進行胃癌患者血清中に存在する抑制因子が考えられる。Maderazo ら¹⁶⁾は、悪性腫瘍患者の好中球・単球の chemotaxis の低下はその血清中に存在する leukotactic inhibitor によるものであるとし、その因子の性状分析についても言及している。食細胞のみならず生体の抗腫瘍免疫機構に対する種々の免疫抑制因子も次第に解明されており¹⁷⁾今後の研究に期待したい。

進行胃癌での好中球 polarization の低下の他の原因として低栄養があげられる。消化器担癌患者は消化管の閉塞などのため低栄養状態にあることが多く、進行癌ほどそれが著しい。Chandra¹⁸⁾の総説によれば、好中球 chemotactic migration は、低栄養下で感染の合併がなければ、正常かやや低下するといわれている。好中球運動能発現のために必要な細胞膜、microfilament や microtubule の収縮蛋白の構造・成分変化が低栄養によってもたらされることも十分考えられ、今後、「栄養と免疫」の客観的検討の重要性は増すものと思われる。

術後合併症や術後死亡症例と好中球 polarization の関係を検討すると、死亡4例(術死・入院死)では好中球 polarization の低下を認めたが、術後感染症を合併は他群に比べて差は認められず、好中球 polarization の低下が感染と直接結びつく結果は得られなかった。今後、原因がすでに解明されている好中球運動能異常を示す易感染性疾患¹⁹⁾での好中球 polarization の検討が必要と考えられる。

C領域胃癌患者の好中球 polarization の低下は、この領域に進行癌が多いためと考えられる。一方、Borrmass 3型あるいは por (低分化腺癌)患者で好中球 polarization の低下を認めた。Hirano⁷⁾も胃癌患者の agarose plate 法による chemotaxis の検討で低分化腺癌患者での低下を報告している。この原因については明らかではないが、最近、好中球の抗腫瘍性が注目されてきており²⁰⁾、このあたりに解明の鍵があるのかもしれない。

まとめ

胃癌患者60例の末梢血好中球 polarization を測定し、以下の結果を得た。

1) 胃癌患者の好中球 polarization は対照群に比べて有意に低下していた。

2) stage IV, n₃, 深達度 ss で示される進行胃癌患者で有意な低下を認めた。

3) 術後感染症合併群では、他群と比較して差を認めなかった。死亡例では有意な低下をみた。

4) C領域癌, Borrmann 3型癌, por (低分化腺癌)癌で有意な低下を示した。

以上、進行胃癌患者では、付着・走化・貪食・殺菌という一連の好中球機能の過程で最も初期に位置する polarization という機能において、その低下が示された。さらに、その原因と考えられる因子—血清中抑制因子と低栄養—についても述べた。

本論文要旨は第44回日本消化器病学会九州地方会および第71回日本消化器病学会総会にて発表した。

文 献

- 1) 倉辻忠俊：好中球の異常と免疫不全。免疫と疾患 7：49—54, 1984
- 2) 朝長昭光, 門田淳一, 福島喜代康ほか：ヒト好中球 polarization assay の検討—chemotaxis の簡便法として。医のあゆみ 128：450—452, 1984
- 3) Sasada M, Nishiyama H, Sawada H et al：Phagocytic and bactericidal capacities in neutrophils from patients with acute and chronic myelocytic leukemia. Acta Haem Jpn 41：709—918, 1978
- 4) 山縣 香, 滝川清治：好中球機能の臨床的評価。臨血 19：909—916, 1978
- 5) 野田弘之：ヒト顆粒球機能に関する研究。一特に感染症との関係—。炎症 1：65—70, 1980
- 6) Tono-oka T, Nakayama M, Ohkawa M et al：Impaired leukocyte mobility and production of monocyte-derived granulotactic factor in pediatric malignant disease during chemotherapy. Tohoku J Exp Med 134：301—310, 1981
- 7) Hirano T：Changes in polymorphonuclear leukocyte motility under agarose and lunonol dependent chemiluminescence response in patients with gastric cancer. Gastroenterologica Jpn 19：447—456, 1984
- 8) 辻 芳郎：白血球実験法。水上茂樹, 柿沼カツ子編, 白血球と食作用, 東京, 講談社, 1979, p192—193
- 9) Rebeck JW, Crowley JH：A method of studying leukocytic function in vivo. Ann NY Acad Sci 59：757—805, 1955
- 10) Boyden S：The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med 115：453—366, 1962
- 11) 辻 芳郎, Quie PG：白血球遊走能の新しい測定法。医のあゆみ 98：722—723, 1976

- 12) Smith CW, Hollers JC, Patrick RA et al: Motility and adhesiveness in human neutrophils. Effect of chemotactic factors. *J Clin Invest* 63: 221-229, 1979
 - 13) 朝長昭光, 大角良子, 岩永整磨ほか: AC-1370の好中球機能に及ぼす影響. *Chemotherapy* 32: 114-119, 1984
 - 14) 藤川正直, 朝長昭光, 平谷一人ほか: 好中球に及ぼす各種抗生剤の影響. *Chemotherapy* 32: 267-271, 1984
 - 15) 滝下佳寛: 宿主低抗力低下時にみられる感染症での背景因子の検討. *四国医誌* 38: 228-240, 1982
 - 16) Maderazo EG, Anton TF, Ward PA: Serum unassociated inhibition of leukotaxis in humans with cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 9: 166-176, 1978
 - 17) 漆崎一朗: 癌と免疫不全. *免疫と疾患* 6: 825-830, 1983
 - 18) Chandra RK: Immunocompetence as a functional index of nutritional status. *Br Med Bull* 37: 89-94, 1981
 - 19) 辻 芳郎: 好中球不全と疾患. *生体防御* 2: 107-111, 1985
 - 20) 仙道富士郎, 井上富夫: 癌に対する自然抵抗性の one small compartment としての多核白血球. *Oncologia* 1: 10-17, 1982
-