

消化器癌患者の末梢血 T cell の Helix pomatia A hemagglutinin 結合活性の検討

第 2 編

臨床検討

岡山大学医学部第 1 内科教室

安 原 高 士

(昭和61年3月18日受稿)

Key word : Helix pomatia A hemagglutinin, 結合活性, 消化器癌, 末梢血 T cell, neuraminidase

緒 言

最近, 諸種レクチン (PNA, LPA, SBA など) を用いて, マウスあるいはヒトリンパ球を分画する試みがなされている。更にこれ等レクチンのリンパ球に対する結合活性の有無とその機能との関連性が報告¹⁻⁵⁾されつつある。

このリンパ球とレクチンとの結合活性の差が機能に関連している事実に注目し, 著者等はヒト末梢血 T cell の surface marker の1つと考えられる Helix pomatia A hemagglutinin (HP) の T cell に対する結合活性を検討した。HP は Helix pomatia のアルブミン腺より単離されるレクチンで N-acetyl-D-galactosamine (D-GalNAc) に結合特異性を示す⁶⁻⁹⁾。ヒトリンパ球に対しては活性化能はない^{8,10)}。無処理のリンパ球には結合しないが neuraminidase 処理によりリンパ球表面のシアル酸を除くことにより, HP に対する receptor が表出し, HP 結合活性が出現することが示されている^{8,11)}。さらに HP receptor を有するリンパ球の大部分が T cell であることが知られている¹²⁻¹⁴⁾。

一般に悪性腫瘍患者においては免疫能, 特に細胞性免疫能が低下していると云われている¹⁵⁻²¹⁾。今回の検討では, HP がほぼ特異的に T

cell に結合する性質を利用し, 消化器悪性腫瘍患者を対象に末梢血 HP 結合 T cell の変動を検討し, 消化器癌患者での細胞性免疫能の変化について考察した。

対 象 と 方 法

1. 対象

肝癌10例, 胆管癌3例, 結腸癌3例, 胃癌1例の消化器癌17例と消化器癌以外の悪性腫瘍3例の計20例 (男性14人, 女性6人, 平均年齢55.1才), 良性肝疾患コントロール16例 (慢性肝炎9例, 肝硬変症7例), (男性14人, 女性2人, 平均年齢50.5才), 及び健常人コントロール11例 (全例男性, 平均年齢30.1才) を検討した。悪性腫瘍患者は2例を除き残り18例は手術不能な進行癌であった。

2. 方法

1) [¹²⁵I]HP の作成 (Fig. 1)

Green Wood の方法に従った。50 μ l 0.5M Na-phosphate buffer, pH 7.5に 1mCi Na-¹²⁵I (Amersham IMS 30), 1mg HP, 30 μ l 0.1% (W/V) chloramine T を順次加え60秒反応させた。その後, 0.24% (W/V) sodium metabisulfite 50 μ l を加え 反応を停止し, さらに 50 μ l 0.8% (W/V) KI, 0.5ml 5% BSA (SIG-

[at room temperature in 0.05 M Na-phosphate buffer (PH 7.5)]

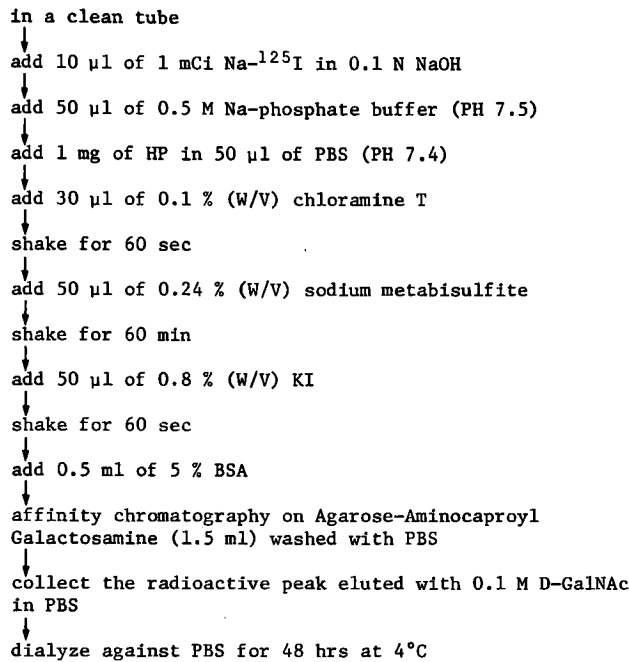


Fig. 1. Preparation of ¹²⁵I-labelled HP.

MA, RIA grade) を加えた。 [¹²⁵I]HP の精製は Agarose-Aminocaproyl-D-Galactosamine (P.L biochemicals inc.) affinity chromatography を用いておこなった。標識反応液をただちに Agarose-Aminocaproyl-D-Galactosamine カラム (1.5ml) にのせ、PBS にて free の ¹²⁵I を十分溶出させた後、0.1M D-GalNAc で [¹²⁵I]HP を溶出した。標識 HP の放射活性の peak を PBS に対して透析した後、無標識の HP を standard として phenol 法で蛋白量を定量して [¹²⁵I]HP の濃度を決定した。 [¹²⁵I]HP 溶液は 100 μ l ずつ分注し -25°C で凍結保存した。

2) 末梢血リンパ球の [¹²⁵I]HP binding assay (Fig. 2)

ヒト末梢血リンパ球の分離は Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals) を用いた比重遠心法でおこなった。分離したリンパ球を 4°C でトリス緩衝化 Hank 生理食塩水、pH 7.4 (HBSS) で 1 回洗浄し、次に NH₄Cl buffer (0.155M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM

EDTA, pH 7.4) で 1 回洗浄し混入する赤血球を溶血した。さらに HBSS で 3 回洗浄の後 HBSS に再浮遊 (4 × 10⁶/ml) し、neuraminidase (SIGMA, type VI) を最終濃度 0.05U/ml となるよう加え、37°C、45 分間 incubate した。処理後、リンパ球は HBSS で 2 回洗浄し、0.2% BSA, 0.02% NaN₃ を含む HBSS に再浮遊 (2 × 10⁶/ml) した。このリンパ球浮遊液 0.5ml に [¹²⁵I]HP 0.4 μ g を加え、25°C で 90 分振盪、incubate した。その後、assay mixture の 0.4 ml を氷冷した HBSS 2ml に重層し、2000rpm で 15 分間遠心し沈殿したリンパ球結合放射活性を γ -counter で測定した。なお assay は duplicate で行った。

3) リンパ球 subpopulation と neuraminidase 処理リンパ球の T cell 比率

リンパ球 subpopulation は [¹²⁵I]HP binding assay に使用した同じ検体を用いて橋ら²³⁾のリンパ球 subpopulation 微量測定法でおこなった。また neuraminidase 処理リンパ球の一部を使用し、同様の方法で neuraminidase 処理リンパ球の T cell 比率を測定した。

4) 末梢血 T cell の HP 結合量

neuraminidase 処理リンパ球分画 (1 × 10⁶) の HP 結合量と neuraminidase 処理リンパ球の T cell 比率より次式にて 10⁶個の T cell あたりの HP 結合量を算定した。

T cell の HP 結合量 (ng/1 × 10⁶ T cells)

$$= \frac{\text{リンパ球分画の HP 結合量 (ng/1} \times 10^6 \text{ lymphocytes)}}{\text{リンパ球分画の T cell 比率 (\%)}}$$

結 果

1) 末梢血リンパ球の T cell 比率 (Fig. 3)

末梢血リンパ球の T cell 比率は健康人 (81.9 ± 8.1%, M ± SD) と良性肝炎患者 (80.3 ±

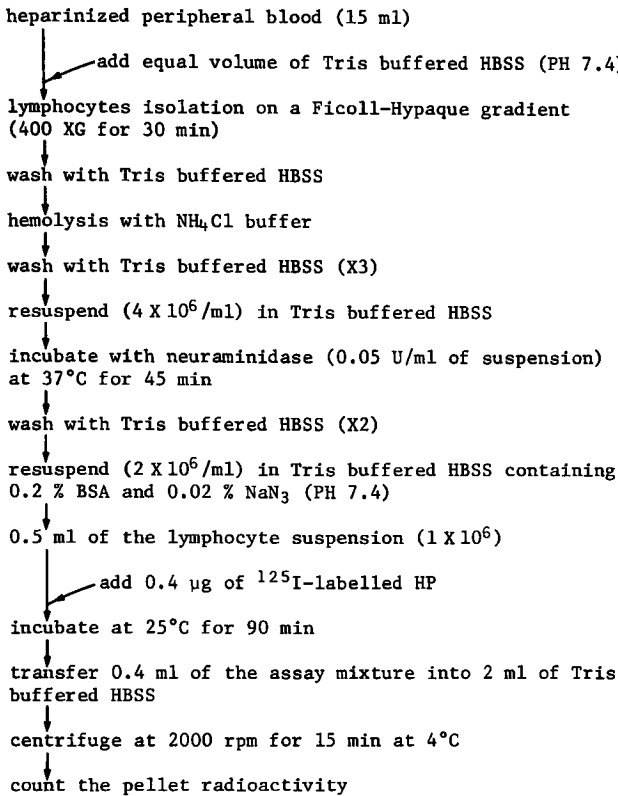


Fig. 2. Assay methods of ¹²⁵I-labelled HP binding to neuraminidase treated peripheral lymphocytes.

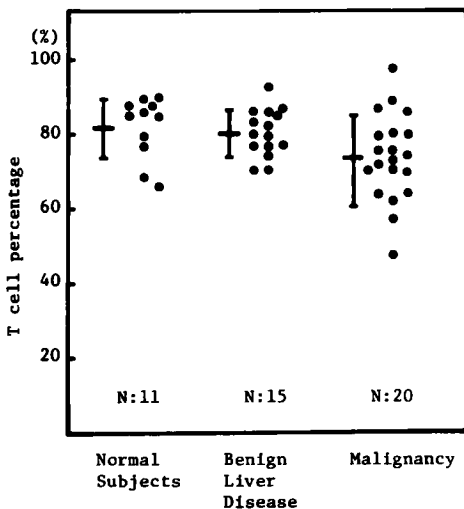


Fig. 3. Ratio of peripheral T cells to total lymphocytes in malignancies, benign liver diseases and normal subjects. N; number, (M±SD)

6.3%)との間に有意差はなかった。悪性腫瘍患者では健常人に比し低い比率を示す症例があり、73.4±11.6%と低下の傾向を示したが有意の差はなかった。

2) 末梢血リンパ球のHP結合量 (Fig. 4)

末梢血リンパ球の [¹²⁵I]HP 結合量は健常人では53.9±8.2ng/1×10⁶lymphocytes(M±SD)であった。良性肝疾患患者は健常人に比しHP結合量の高い症例が少数あるが平均54.7±12.8ng/1×10⁶lymphocytes と健常人との間に有意の差はなかった。悪性腫瘍患者では結合量の高い症例が多く、平均62.1±13.7ng/1×10⁶lymphocytes と健常人、良性肝疾患患者に比しHP結合量が高い傾向を示したが有意の差はなかった。なお良性肝疾患患者を肝硬変症と慢性肝炎に分けて結合量を検討したが、肝硬変症50.1±6.4ng/1×10⁶lymphocytes, 慢性肝炎57.8±15.3ng/1×10⁶lymphocytes と慢性肝炎が高い傾向を示したが有意

の差はなかった。また悪性腫瘍患者を肝癌とその他の悪性腫瘍に分けて検討したが、肝癌60.7±14.3ng/1×10⁶lymphocytes, その他の悪性腫瘍63.6±13.6ng/1×10⁶lymphocytes と差はなかった。

3) 末梢血 T cell の HP 結合量 (Fig. 5)

「方法」で述べた如く、末梢血 T cell の HP 結合量を算定し検討した。健常人の平均は71.2±8.4ng/1×10⁶ T cells (M±SD)であった。良性肝疾患患者では一部高値を示す症例があったが78.9±19.4ng/1×10⁶ T cells と健常人に比し有意の差はなかった。悪性腫瘍患者では、99.0±32.6ng/1×10⁶ T cells と高値を示し、健常人 (P<0.01)、良性肝疾患患者 (P<0.05) との間に有意の差を認めた。悪性腫瘍患者を肝癌とその他の悪性腫瘍に分けての検討では、肝癌101.8±38.1ng/1×10⁶ T cells, その他の悪

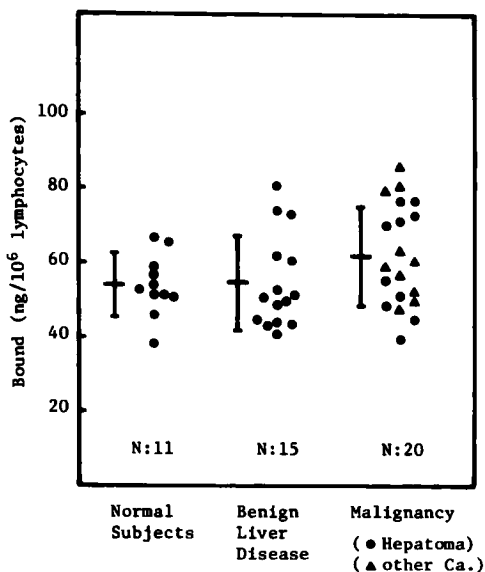


Fig. 4. ¹²⁵I-labelled HP binding to neuraminidase treated peripheral lymphocytes in malignancies, benign liver diseases and normal subjects. N; number, (M±SD)

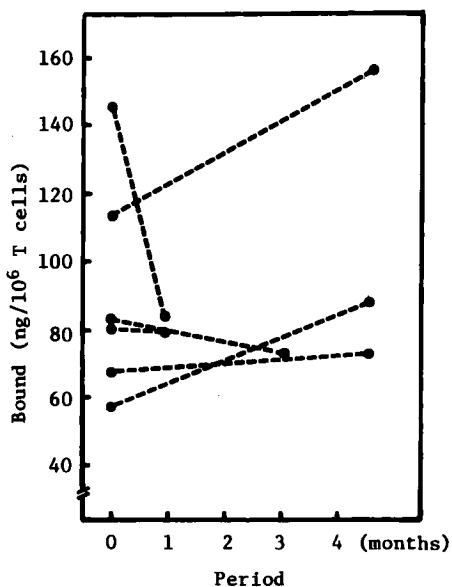


Fig. 6. Changes of ¹²⁵I-labelled HP binding to neuraminidase treated peripheral T cells in 6 malignant patients.

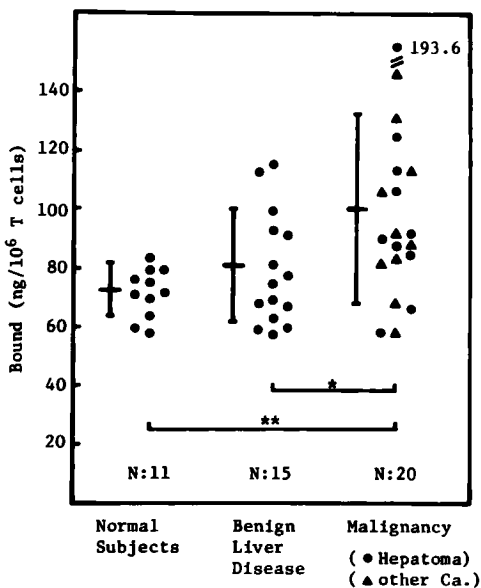


Fig. 5. ¹²⁵I-labelled HP binding to nearaminidase treated peripheral T cells in malignancies, benign liver diseases and normal subjects. N; number, *, P<0.05, **, P<0.01, (M±SD)

性腫瘍 $96.3 \pm 27.8 \text{ ng} / 1 \times 10^6 \text{ T cells}$ と有意の差はなかった。さらに良性肝疾患を肝硬変症と慢性肝炎に分けて検討したが、肝硬変症 $78.5 \pm 18.9 \text{ ng} / 1 \times 10^6 \text{ T cells}$ 、慢性肝炎 $79.1 \pm 20.9 \text{ ng} / 1 \times 10^6 \text{ T cells}$ と有意の差はなかった。

4) HP 結合量の経時的変化 (Fig. 6)

消化器癌患者4例、その他の悪性腫瘍患者2例の計6例を対象に末梢血 T cell の HP 結合量の経時的変化を測定検討した。6例のうち経過中に増加を示したものが3例、軽度低下を示したものが2例、残りの1例は短期間に著明な低下を示した。以上の如く約40ヶ月の観察期間における結合量の変化には一定の傾向を認められなかった。

5) HP 結合量と生存期間

悪性腫瘍患者を HP 結合測定日より6ヶ月以上生存した群と6ヶ月以内に死亡した群に分け、末梢血 T cell の HP 結合量を検討した。6ヶ月以上生存した群の末梢血 T cell 比率 ($76.4 \pm 7.7\%$, M±SD), 末梢血 T cell 数 ($1010 \pm 420/\text{mm}^3$, M±SD) に比し、6ヶ月以内に死亡した群では T cell 比率 (69.3 ± 11.4

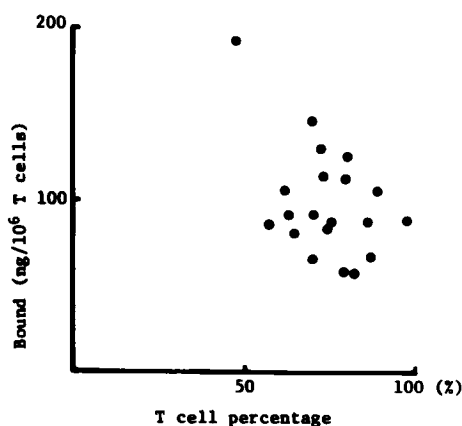


Fig. 7. Correlation between ¹²⁵I-labelled HP binding to neuraminidase treated peripheral T cells and T cell percentage in malignancies.

%), T cell 数 ($660 \pm 370/\text{mm}^3$) と両者ともに低下傾向を示した。しかし末梢血 T cell の HP 結合量は 6 ヶ月以上生存した群 ($95.8 \pm 30.8 \text{ ng} / 1 \times 10^6 \text{ T cells}$, $M \pm SD$) と 6 ヶ月以内に死亡した群 ($100.9 \pm 38.1 \text{ ng} / 1 \times 10^6 \text{ T cells}$) との間に有意差はなかった。

6) HP 結合量と末梢血 T cell 比率, 末梢血 T cell 数との相関 (Fig. 7)

悪性腫瘍患者を対象に, 末梢血 T cell の HP 結合量と末梢血 T cell 比率との相関を検討したが, 相関を認めなかった。また HP 結合量と末梢血 T cell 数との間にも相関はなかった。良性肝疾患と悪性腫瘍を対象に HP 結合量と年齢との関連も検討したが, 相関を認めなかった。

考 案

悪性腫瘍患者における細胞性免疫担当細胞である T cell の surface marker の一つである HP の結合能を末梢血 T cell を用いて検討し以下の結論を得た。

- ①悪性腫瘍患者の末梢血 T cell の HP に対する平均結合活性は良性肝疾患患者, 健康人に比べて有意に高かった。
- ②しかし悪性腫瘍患者末梢血 T cell の HP に対する結合活性は癌の進行に伴う一定の経時的変化を示さなかった。

従来の報告の如く^{15,19)}, 今回の検討でも悪性

腫瘍患者の末梢血リンパ球の T cell 比率は良性肝疾患患者, 健康人に比べ低い傾向を示した。

最近, リンパ球を諸種レクチンとの結合活性の差により分画する試みがなされている。Reisner¹¹⁾らはマウスのリンパ球を用い, PNA の高い結合能を持つ T₁細胞 (未成熟 T 細胞) を低い結合能しか持たない T₂細胞 (成熟 T 細胞) から分離した。PNA は β-D-Gal-(1-3)-D-GalNAc に特異的に結合するが, 末端にシアル酸が存在する場合には結合活性を失う。従って T₁細胞の方が表面糖鎖のシアル酸が少ないと結論された。Nakano⁴⁾らは PNA を用い Con A で誘導した T cell のなかから suppressor T cell を分離し, PNA が suppressor T cell に対して結合活性をもつことを示した。また LcA により誘導された helper T cell が LPA により分離可能なことを報告している。さらに Reisner⁵⁾らはヒト末梢血 T cell を SBA を用いて細分画し, SBA に結合活性を示した T cell 分画に抗体産生に対する helper 機能を, また SBA に結合活性を示さなかった T cell 分画に抗体産生に対する suppressor 機能をみだした。以上の如くレクチンによる細胞膜表面構造の識別によりリンパ球を分画し, 細胞膜表面構造とリンパ球の機能をむすびつける試みがなされている。

一方, Hammarström^{12,13)}らにより HP に対する receptor を有するリンパ球がほぼ T cell であることが示され, この receptor が T cell の特異的な surface marker の一つと考えられて来た。この点に注目した今回の検討では悪性腫瘍患者では末梢血 T cell の HP に対する receptor の平均活性は良性肝疾患患者, 健康人に比べて上昇していた。悪性腫瘍患者では一般に細胞性免疫能は低下していると云われており¹⁵⁻²¹⁾, 今回の検討でも末梢血 T cell 比率が低下していた。しかし T cell 表面の HP に対する receptor 活性はむしろ上昇していた。このことは細胞表面構造の変化が T cell 機能の異常に関与している可能性を示唆している。また HP receptor が T cell 機能発現の為の或る種の情報獲得の receptor として働いている可能性を仮定すれば, 著者等の結果は癌患者におい

ては T cell の情報獲得において post receptor の異常が存在するかもしれないと考えさせるものであった。

一方、悪性腫瘍患者末梢血 T cell の HP に対する平均結合活性が上昇していた原因としては、T cell のなかで HP に対して強い結合活性をもつ特殊な T cell 分画の割合が増加し、その結果として T cell の平均結合活性が上昇したか、あるいは全体的に T cell の膜表面に変化がおこっているかのいずれかの可能性が考えられた。しかし、いずれにしても悪性腫瘍患者では末梢血 T cell の細胞表面糖鎖に変化が起り、何らかの T cell 機能の変化が生じていることは十分予測される。

現在まで、HP レクチンを用いたリンパ球の分画と機能の検討では、Haller²⁴⁾らはマウスのリンパ球を HP 結合セファロースカラムで分画し、HP に対して比較的弱い結合活性を示す分画に NK 活性が強いことをみだしている。最近 NK 活性をもつ細胞の腫瘍細胞に対する障害性が指摘され^{24,25)}注目されている。しかし NK 活性を示す細胞は HP に対する結合活性が低いため、今回の検討ではこの細胞に関連する情報は得られなかった。

ヒト末梢血リンパ球の HP 結合活性測定の実臨床応用に関しては、末梢血リンパ球の HP 結合量実測値は悪性腫瘍患者では良性肝疾患患者、健康人に比し軽度上昇傾向を認めたが有意の差はなかった。しかし HP 結合実測値と測定に使用したリンパ球の T cell 比率より、末梢血 T cell の HP 結合量を算定し検討すると、悪性腫瘍患者では良性肝疾患患者、健康人に比し T cell 数あたりの結合量の有意の上昇を示し、臨床的に悪性腫瘍の marker となりうる可能性が示された。更に悪性腫瘍患者における HP 結合

量の経時的変化では悪性腫瘍の進行に伴った一定の傾向は認められず、また生存期間との間にも一定の相関はなく悪性腫瘍の進展に関連した marker にはなりえないものと考えられた。

今回の研究で悪性腫瘍患者では末梢血 T cell の HP に対する結合活性の上昇が確認されたが、今後 HP 結合活性と T cell 機能の関連を併せ検討する必要があると考えられた。また、HP 結合活性の上昇に現われる T cell の変化が生体の癌に対する免疫機構の亢進を現わしているのか、その逆であるかの検討も今後の課題と考えられた。

結 語

- 1) 消化器癌患者を中心とする悪性腫瘍患者を対象に末梢血 T cell の HP 結合活性を検討した。
- 2) 悪性腫瘍患者末梢血 T cell の HP 結合活性は良性肝疾患患者、健康人に比し有意に高値を示し、臨床的な腫瘍の marker になりうる可能性が示された。結合活性と悪性腫瘍の進行程度、生存期間などの間に関連性はなかった。
- 3) 末梢血 T cell の HP 結合活性が高い悪性腫瘍患者では、T cell の subset の変化、或いは T cell 全体の細胞表面の変化のいずれかの生じている可能性が示された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲頂いた長島秀夫教授ならびに終始直接御指導下さった有馬暉勝講師に深謝致します。

なお、本論文の要旨は、第23回日本消化器病学会合同秋季大会、ならびに第5回国際免疫学会で発表した。

文 献

1. Reisner, Y., Linker-Israeli, M. Sharon, N. : Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell Immunol.* 25, 129-134, 1976.
2. Imai, Y., Oguchi, Y., Nakano, T., Sawada, J., Osawa, T. : Separation of mouse T cell subsets by a fluorescent-activated cell sorter using fluorescence-labelled peanut agglutinin. *Immunol. Commun.* 8, 495-503, 1979.

7. Nakano, T., Oguchi, Y., Imai, Y., Osawa, T. : Induction and separation of mouse helper T cells by lectins. *Immunology* **40**, 217-222, 1980.
4. Nakano, T., Imai, Y., Naiki, M., Osawa, T. : Characterization of mouse helper and suppressor T cell subsets separated by lectins. *J. Immunol.* **125**, 1928-1932, 1980.
5. Reisner, Y., Pahwa, S., Chiao, J.W., Sharon, N., Evans, R.L., Good, R.A. : separation of antibody helper and antibody suppressor human T cells by using soybean agglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6778-6782, 1980.
6. Hammarström, S., Kabat, E.A. : Purification and characterization of a blood-group A reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining site. *Biochemistry* **8**, 2696-2705, 1969.
7. Hammarström, S. : Structure, specificity, binding properties, and some biological activities of a blood group A- reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia*. *Ann. NY. Acad. Sci.* **234**, 183-197, 1974.
8. Hammarström, S. : Snail (*Helix pomatia*) hemagglutinin. *Methods Enzymol.* **34**, 368-383, 1972.
9. Hammarström, S. : Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine-specific lectins: *Helix pomatia* A hemagglutinin, soy bean agglutinin, lima bean lectin, and *Dolichos biflorus* lectin. *Biochemistry* **16**, 2750-2755, 1977.
10. Dillner, M.-L., Hammarström, S., and Perlmann, P. : The lack of mitogenic response of neuraminidase-treated and untreated human blood lymphocytes to divalent, hexavalent, or insoluble *Helix pomatia* A hemagglutinin. *Exp. Cell Res.* **96**, 374-382, 1975.
11. Hammarström, S. : Binding of *Helix pomatia* A hemagglutinin to human erythrocytes and their cells. Influence of multivalent interaction on affinity. *Scand. J. Immunol.* **2**, 53-66, 1973.
12. Hammarström, S., Hellström, U., Perlmann, P., Dillner, M.-L. : A new surface marker on T lymphocytes of human peripheral blood. *J. Exp. Med.* **138**, 1270-1275, 1973.
13. Hellström, U., Hammarström, S., Dillner, M.-L., Perlmann, H., Perlmann, P. : Fractionation of human blood lymphocytes on *Helix pomatia* A hemagglutinin coupled to Sepharose beads. *Scand. J. Immunol.* **5**, 45-55, 1976.
14. Schremf-Decker, G.E., Baron, D., Wernet, P. : *Helix pomatia* agglutinin (HpA) affinity chromatography: The isolation of pure B and T cell population and their use for the routine HLA-DR (Ia) serology. *J. Immunol. Methods* **32**, 285-296, 1980.
15. Bone, G., Lauder, I. : Cellular immunity, peripheral blood lymphocyte count and pathological staging of tumours in gastrointestinal tract. *Br. J. Cancer.* **30**, 215-221, 1974.
16. Bolton, P.M., Mander, A.M., Davidson, J.M., James, S.L., Newcombe, R.G., Hughes, L.E. : Cellular immunity in cancer: Comparison of delayed hypersensitivity skin test in three common cancers. *Br. Med. J.* **3**, 18-20, 1975.
17. Garrioch, D.B., Good, R.A., Gatti, R.A. : Lymphocyte response to P.H.A. in patients with non-lymphoid tumours. *Lancet.* **21**, 618, 1970.
18. 菊地浩吉, 井口進 : 細胞性免疫異常および不全と内科疾患-悪性腫瘍-. *日本臨床* **36**, 1002-1010, 1978.
19. 折田薫三 : 消化管癌と細胞性免疫. *最新医学* **31**, 1902-1910, 1976.
20. Pross, H.F., Barnes, M.G. : Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. I. The effect of malignant disease. *Int. J. Cancer* **18**, 593-604, 1976.

21. 漆崎一郎, 新津洋司郎, 石谷邦彦, 池田晃: 消化管癌と免疫-NK活性など. *最新医学* 37, 1186-1195, 1982.
22. 安原高士: 消化器癌患者の末梢血 T cell の Helix pomatia A hemagglutinin 結合活性の検討. 第1編: ^{125}I 標識 Helix pomatia A hemagglutinin のリンパ球への結合活性測定の基礎的検討. *岡山医誌*, 98, 457-464, 1986.
23. 橋武彦, 吉田明子: ヒトの T 細胞, B 細胞微量測定法. 免疫実験操作法 A: 455-462, 1978.
24. Haller, D., Gidlund, M., Hellström, U., Hammarström, S., Wigzell, H.: A new surface marker on mouse natural Killer cells: receptors for Helix pomatia A hemagglutinin. *Eur. J. Immunol.* 8, 765-771, 1978.
25. Talmolge, J.E., Meyers, K.M.: Role of natural killer cells in tumor growth and metastasis, C57BL/6 normal and benign mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 65, 929-935, 1980.

**Helix pomatia A hemagglutinin binding activity to peripheral
T-lymphocytes in malignant digestive tract diseases**

Part 2: Clinical studies

Takashi YASUHARA

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. H. Nagashima)

Helix pomatia A hemagglutinin (HP) binding activity, a surface marker of peripheral T cells, to neuraminidase-treated peripheral T cells was studied in patients with digestive tract cancer or benign liver disease and in normal subjects. The HP binding activity (ng/10⁶ T cells) to T cell subpopulations in peripheral lymphocytes was calculated as:

**$$\frac{\text{Amount of bound HP to total peripheral lymphocytes (ng/10}^6 \text{ cells)}}{\text{Ratio of T cells to total peripheral lymphocytes (\%)}} \times 100.$$
 The calculated HP binding activity to T cells was significantly higher in digestive tract cancer patients than in benign liver disease patients ($p < 0.05$) and normal subjects ($p < 0.01$). These results suggest that either the subsets of peripheral T cells with high HP binding activity may be significantly increased or HP receptors of all peripheral T cells may be increased to the same degree in digestive tract cancer patients. This activity may be a useful index of cellular immunity in digestive tract cancer patients, although it seems to have no relevance to the progression of cancer.**