

特集 7*

進行胃癌における脾合併切除の検討 —とくに免疫学的検討—

千葉大学医学部第一外科

藤本 茂 高橋 誠 南 智仁
石神 博昭 宮崎 勝 伊藤健次郎

IMMUNOLOGIC STUDIES ON SPLENECTOMY COMBINED WITH TOTAL GASTRECTOMY IN ADVANCED GASTRIC CANCER PATIENTS

Shigeru FUJIMOTO, Makoto TAKAHASHI, Tomohito MINAMI, Hiroaki ISHIGAMI,
Masaru MIYAZAKI and Kenjiro ITOH

The First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

索引用語：胃癌，脾合併切除，腫瘍細胞リンパ球混合培養反応(MLTR)，脾リンパ球，Suppressor T cell.

緒言

悪性腫瘍の治療の原則は宿主よりの腫瘍細胞の根絶であり，外科においては根治手術を行うための努力が重ねられて来た。その1つとしてリンパ節廓清を徹底して行い，R₂，R₃手術としてその生存率の向上に寄与して来た。消化管の内胃はリンパ管の走行が小腸大腸より複雑であり，腫瘍の占拠部位によりリンパ行性転移は異なった走行をとる。特に胃の上・中部の進行癌の場合は脾門リンパ節(N₁₀)，脾動脈幹リンパ節(N₁₁)は第2群のリンパ節となるため，根治手術としてのこれらの廓清の際脾を合併切除することが多い。しかるに，脾は腸管のリンパ節と並んで腹腔内の大きなリンパ組織であるが，胃癌における脾合併切除の際の免疫学的検討は現在迄皆無と思われる。著者ら^{1)~5)}は消化器癌症例の細胞性免疫能より見た検討を行っているが，脾合併切除前後の宿主の細胞性免疫能の消長と摘除された脾内リンパ球の免疫学的検討を行った。

対象ならびに方法

1. 基礎的検討

生後7週前後の雄性 dd-mouse と Ehrlich 癌細胞 (E

細胞) 5.0×10^6 を用い，背部皮内に移植したものを担癌とした。E細胞移植7日後に摘脾，腫瘍摘出などを行い，その後経時的に4週間以下の検討を行った。経時的断頭屠殺の30分前に ^3H -thymidine (^3H -TdR) 1.0 $\mu\text{Ci/g}$ を腹腔内に投与し，胸腺・リンパ節内リンパ球の pulse labelling を行い，屠殺後胸腺，腸骨リンパ節を採取した。これら組織の DNA を Schmidt-Thannhauser⁶⁾ の変法により抽出し，DNA 内の ^3H -TdR 活性を liquid scintillation counter により測定するとともに DNA 量を紫外外部吸収により測定し，CPM of ^3H -TdR/mg DNA をもって胸腺・リンパ節内リンパ球機能の表示とした。さらに，trinitrochlorobenzene (TNCB) を用いて遅延型皮膚反応を，屠殺前にその耳朶の厚さを測定することにより行った。

2. 臨床的検討

胃全摘施行胃癌11例，胃全摘脾合併切除胃癌10例，切除不能胃癌8例と胃部分切除施行消化性潰瘍12例を対象として，術前と術後4週間経時的に末梢リンパ球数，PHA 皮膚テスト，PHA-induced lymphoproliferation (LP) 反応¹⁾を施行した。

次に，胃全摘脾合併切除施行後3年経過した胃癌8例と胃全摘のみで同じく3年経過した胃癌7例(共に再発徴候なし)の末梢リンパ球数，末梢 T cell 数，PHA-

* 第14回日消外総会シンポジウム
進行胃癌における周囲臓器合併切除の意義

induced LP 反応, PHA 皮膚テストを検討した。

3. 脾リンパ球の検討

脾合併切除をした胃癌 8 例 (34~70歳, 平均58歳) の脾より無菌的に脾リンパ球を, Ficoll-Conray 法により採取した. この一部を RPMI 1640+10% AB 血清中に $1.0 \times 10^7/ml$ の濃度とし, 矢田・橋の方法⁷⁾により T cell 比を測定した.

次いで, 0.83% NH_4Cl 処理により羊赤血球を除去し, これら脾リンパ球を T cell (enriched T cell) と B cell (enriched B cell) に分離した後 $2.0 \times 10^6/ml$ とし, PHA-M (Difco, U.S.A.), PWM (Difco, U.S.A.), Sephadex-protein A (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden), OK-432 を至適濃度²⁾に添加し, Falcon Microplate II (flat-bottom) 内で72時間, 5% CO_2 下にて培養した. harvest 24時間前に ^3H-TdR 0.5 $\mu Ci/well$ を加えてこれら mitogen による脾リンパ球の LP 反応を liquid S. counter により測定し, 「CPM with mitogen」を「CPM without mitogen」により除した値を stimulation index (SI) として算出した.

さらに, これら 8 例中 7 例の胃癌組織を Collagenase type IV (Sigma, U.S.A.) の処理により胃癌細胞の浮遊液とし, MMC 処理をする事により抗原性のみを残した後, 術前に採血分離した自己末梢リンパ球と 20:1 の割合での Mixed lymphocyte tumor cell reaction (MLTR) を行った. この際, 末梢・脾リンパ球の混合リンパ球などを作用させる事により, Suppressor T cell の存在の可能性をも検討した. これらの反応の成績は, リンパ球 LP 反応を ^3H-TdR 活性により測定する前述の方法を用いた.

成 績

1. 基礎的検討

背部腫瘍摘出のみ, 腫瘍摘出と摘脾の合併, 脾を腹腔外に出した後腹腔内に戻すのみで腫瘍切除を行わない sham splenectomy (臨床での試験開腹に当る) の 3 つの外科的処置後の胸腺リンパ球の DNA 合成の time course は, 図 1 のようである. これらの処置の 2 日後に胸腺 DNA 合成は最低となり, 外科的侵襲の比較的小さい sham ope で術前値の 27%, 他は約 17% と低下した. 腫瘍摘出のみでは術後 7 日で略術前値に戻ったが, 摘脾合併群では回復が約 3 週間遅れ, また sham ope では術後 2 週を peak として以後低下した.

リンパ節 DNA 合成は図 2 のようであり, 胸腺の場合と類似した経過を辿った. TNCB による遅延型皮膚反

図 1 胸腺リンパ球 DNA 合成に対する摘脾の影響

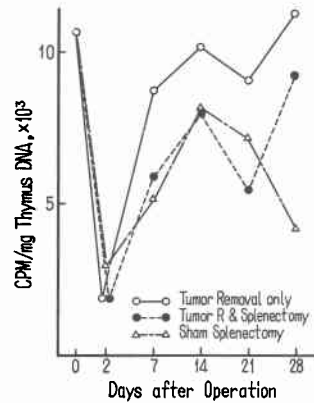


図 2 リンパ節内リンパ球の DNA 合成に対する摘脾の影響

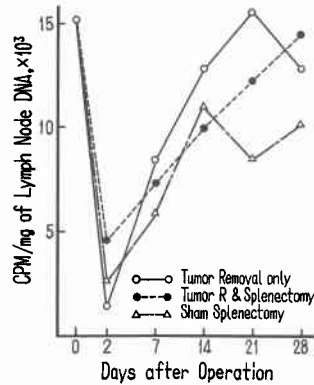
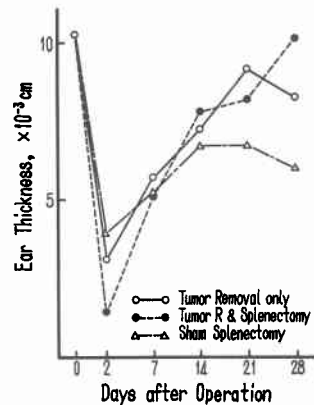


図 3 TNCB による遅延型皮膚反応に対する摘脾の影響



応の経過は図3のようである。腫瘍摘出と摘脾合併の2群の間に有意の差はないが、腫瘍残存の sham ope 群では術後3~4週での低下を認めた。

2. 臨床的検討

胃全摘、胃全摘脾合併切除、切除不能の胃癌症例の末梢リンパ球数の経過は、図4のようである。切除不能胃癌の場合は術直後の減少は少ないが、その後の回復は見られない。一方、胃全摘では術後4週で初めて正常値に戻るが、脾合併切除の場合は術後2週で正常値に復した。これら2群を消化性潰瘍の胃部分切除と比較すると、胃全摘群では回復は3週遅れ、脾合併切除では1週間の遅れを認めた。

図4 胃全摘脾合併切除の末梢リンパ球数に及ぼす影響

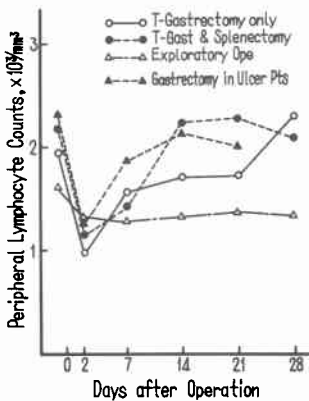
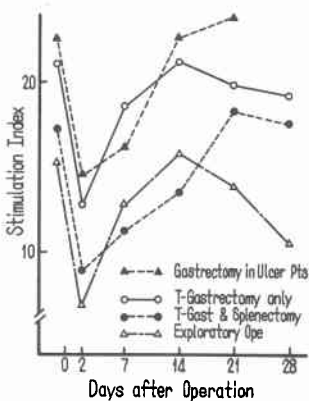
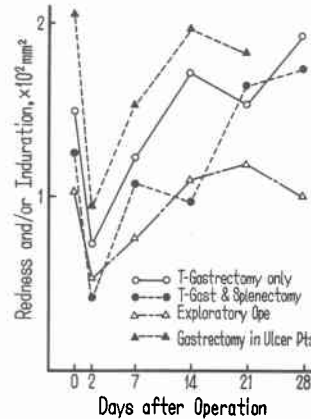


図5 胃全摘脾合併切除の PHA-induced lymphoproliferation に及ぼす影響



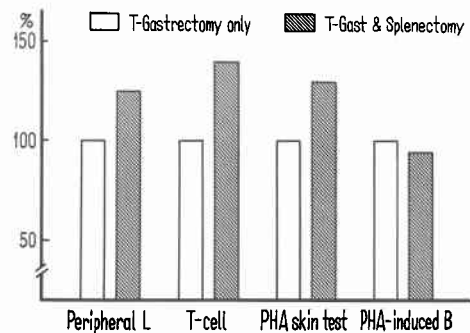
stimulation index は “CPM in cultures with PHA” を CPM in cultures without PHA で除した値である。

図6 胃全摘脾合併切除の PHA 皮膚反応に及ぼす影響



PHA-P (Difco, U.S.A.) 5 μg/ 0.1ml を前腕屈側皮内に投与した後24時間後の計測値をもって表わした。

図7 脾合併切除後長期間経過した胃癌症例 (recurrence-free) の免疫学的検討



PHA-induced B (blastogenesis) は、PHA-induced LP (lymphoproliferation) と同意語として用いた。

PHA-induced LP 反応は図5のようであり、胃癌胃全摘群と消化性潰瘍の胃部分切除群の間には有意差を認めないが、末梢リンパ球の術後の回復の早い胃全摘脾合併切除群は、術後第2病日の低下が切除不能群と略等しく、その後の回復も切除不能群と平行しており術後3週で胃全摘群に近づくが、その回復は胃全摘に比して2週間の遅れを見た。PHA 皮膚反応は PHA-induced LP 反応程の差異はないが、回復傾向は図6のように PHA-induced LP 反応と類似している。

次に、脾合併切除後3年経過した症例の検討は図7のようである。末梢リンパ球と T cell 数はそれぞれ p<0.1, p<0.05をもって脾合併切除群の方が多いが、PHA

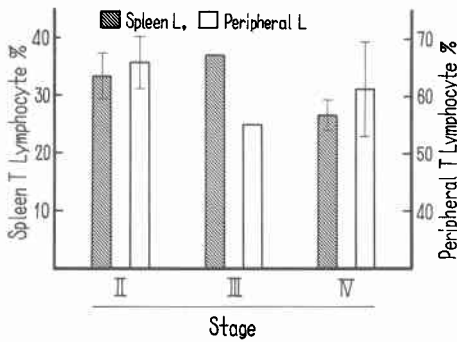
皮膚反応と PHA-induced LP 反応は両群間に有意差を認めなかった。

3. 脾リンパ球の検討

図8は胃癌患者脾内 T cell と末梢血中 T cell 比を示している。少数例ではあるが病期と T cell 数との間に相関は認められない。

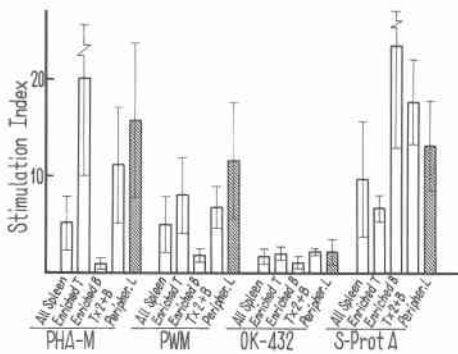
図9は脾リンパ球の mitogen に対する反応性を末梢リンパ球と比較したものである。T cell stimulator と云われている PHA, PWM の添加では Enrich T での反応性が高く、末梢リンパ球の TB 比と同じにした「T×2+B」では、PHA, PWM 共に末梢リンパ球の方が高い反応を示した。S-Prot A は B cell stimulator であるので Enrich B で高い反応性を示しており、この場合は「T×2+B」である脾リンパ球の方が末梢リン

図8 胃癌患者の脾・末梢 T cell の比率



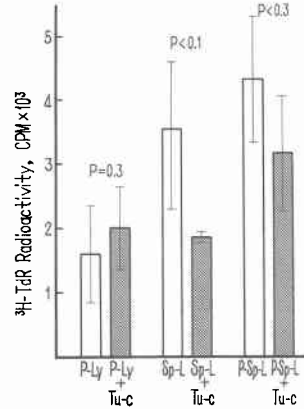
各 column の上の vertical bar は標準偏差を表示している。

図9 脾リンパ球の PAH, PWM, OK-432, Seph-rose Protein A に対する反応



各 column の上の vertical bar は標準偏差を表示している。

図10 自己胃癌細胞を用いた MLTR による脾 suppressor cell の検討



P-Ly : peripheral lymphocyte ; Tu-c : tumor cell ; Sp-L : spleen lymphocyte ; P. Sp-L : peripheral lymphocyte と spleen lymphocyte を 1 : 1 に混じたもの。各 column の上の vertical bar は標準偏差を表示している。

パ球より高い反応性を示した。OK-432はいずれに対しても低い反応性を示した。

MLTR を用いての自己胃癌細胞に対する末梢・脾リンパ球の反応性に対する検討では、7例中3例(43%)に反応性が見られた。図10は反応性を示した3例の平均値と標準偏差を示している。末梢リンパ球に自己胃癌細胞を加えた場合3例中2例に未添加培養の cpm の50%増を見たが、3例の平均では P=0.3であるので癌細胞の添加により cpm が増加したとはいえない。

脾リンパ球と癌細胞の場合は、癌細胞の添加により p<0.1において LP 反応の有意低下を見た。すなわち、脾内 suppressor cell の存在を推定し得た。次に、末梢リンパ球と脾リンパ球を等量に混じた場合は、自己胃癌細胞の添加によって LP 反応の低下を見たが、差検定では p<0.3であるので有意減とはいえない。

考 察

脾はリンパ球, macrophage などの免疫担当細胞がリンパ節と同様に多数存在している臓器であり、白脾髄の中心動脈リンパ球鞘が胸腺依存性、すなわち T cell の存在部位である。骨髄で産生されたリンパ球は直ちに血液を介して脾、リンパ節に移動し得るが、腫瘍免疫に関係しているリンパ球は胸腺を経由して脾に入る。リンパ節に対しても胸腺を介した T cell が流入し、これはさらに胸管を経て血液へと循環している。脾の場合も同様

に脾と血液の間を T cell が循環する事が知られているが、B cell の脾と血液間の循環は遙かに少ないとされている。

このように脾が免疫機能を担当しているにも拘らず、悪性腫瘍の際の摘脾の細胞性免疫への影響に関しては Hodgkin 病以外には報告されていない。Wagener⁸⁾は摘脾を受けた Hodgkin 15例の検討により、末梢リンパ球の PHA-induced LP 反応は stage I, II では摘脾の前後で変化しないが、stage III, IV では LP 反応の上昇が見られたと報告している。Hodgkin 病はリンパ組織の悪性腫瘍である故特殊な範疇に属すべきものと考えられる。本稿の図1より明らかなことは、腫瘍切除のみと脾合併切除の間で後者に回復の遅れを見ていることである。胸腺・リンパ節共に屠殺直前30分に ³H-TdR の pulse labelling をしているのであるから、摘脾をした場合それらの各時点でリンパ球の DNA 合成すなわち細胞分裂の低下があると解釈される。著者らは摘脾により代償的にこれらリンパ組織の DNA 合成は高まるものと推定していたが、逆に摘脾により胸腺の細胞分裂が略4週間に亘って遅れを見せた理由として、(1) 腫瘍切除と摘脾という外科処置が腫瘍切除のみより侵襲が大であるために一般状態の低下を来し、その部分現象としてリンパ球の細胞分裂も低下した。(2) 前述のように胸腺・脾・血液相互間の T cell の動態の内、脾が欠落したので胸腺より脾へ行く。いわゆる seeking lymphocyte が目的地を失ったため、feed back mechanism などにより seeking lymphocyte を産生するための細胞分裂が低下した。この2つが考えられる。(1)の過大な外科侵襲による細胞性免疫能の低下は、図3より見て耳朶の厚さが術後7日後には回復しているの、術後7日以降の DNA 合成の低下は(2)由来と考えるのが妥当であろう。さらに、図2の7, 14, 21, 28日共に図1程の差を見ない事は、本実験ではリンパ節の摘出をしていないため、胸腺・リンパ節・胸管・血液間の循環は正常に保たれていたと解釈すべきであろう。

臨床成績の内 PHA-induced LP 反応と PHA 皮膚反応は類似した消長を示した。PHA 皮膚反応が細胞性免疫能を反映するものとするれば、両者がこのように類似した消長を示すのは当然であろう。図5, 6より脾合併切除は細胞性免疫能の回復を約3週間遅延せしめていると推定された。これは mouse の TNCB による皮膚反応が、摘脾により1週間しか遅延しない事より見ると2週間回復が遅れているといえる。この理由としては、mouse

の摘脾は非常に簡単で2~3分で完了する(mouseの脾は後腹膜に固定されていず容易に腹腔外に出せる)ため手術侵襲そのものが小である事と、ヒトとマウスの骨髓機能の差に由来する。すなわち、マウスの骨髓細胞の turnover がヒトの5~6倍⁹⁾である上に、マウスの年齢がヒトの10歳位に相当する事によると推定している。

次に、図4の末梢リンパ球数は脾合併切除により術後2~3週において有意増を示した。McBride¹⁰⁾も同様の所見を報告しており、特に Lipson¹¹⁾は悪性腫瘍12例の摘脾後その8例(67%)にリンパ球増多を認め、これは血小板増加の50%より高頻度であったと報告している。この現象に対する説明として著者らは、先に述べたリンパ球循環をその因とすべきと思う。担癌症例の年齢より考えて前述のリンパ球の循環経路中胸腺は大きな意味を持たないと考えられ、骨髓・脾・血液の循環経路中の脾の摘除により、これらの循環過程にあるリンパ球が脾という一時的にせよ settle down すべき臓器を失ったため、血液中のリンパ球が多くなったものと推定している。しかもこの現象は図7に示すように手術後3年経過した時点においても存続している事が判明した。Everett¹²⁾は脾リンパ球の内短命型と長命型リンパ球の割合はそれぞれ3:1であるが、リンパ節での割合は逆にそれぞれ1:3と長命型のほうが多く、血液中のそれは1:2であると報告しており、脾内長命型リンパ球が settle down すべき場所を失ったため血液中にその長命型リンパ球が移行したのであろうとする著者らの推定を裏付けている。

以上、脾合併切除後の宿主の細胞性免疫能をその担い手であるリンパ球の消長として捕えた場合、骨髓より胸腺、脾を経て血液に至り次いで再循環するリンパ球の移動経路中、リンパ球の大きな reservoir である脾の欠落は術後末梢リンパ球、T cell の増加を惹かず、機能面では脾非摘除例と差はないものと考えられた。また、術後1~3週に亘る non-specific immunity の低下が観察された。さらに、基礎と臨床成績の不一致の原因は、対象の ageing の相違によるものであろう。

次に、摘除された脾リンパ球についてであるが、脾リンパ球内の T cell の比率は図8のように約30%であり、これは Fiorelli¹³⁾の正常人脾の23~32%、Habeshaw¹⁴⁾の7人の正常人の平均36.5%と略一致している。また、本稿の成績より見て胃癌進行度分類の stage II, III, IVの間でも差を認めないので、脾リンパ球内のさらに細かい subpopulation は別として T-B cell 比は、

正常担癌の如何を問わず大きな差はないといえよう。これは前述の骨髄・脾・血液間の主に T cell の循環を考えた場合当然といえよう。

各 mitogen に対する末梢リンパ球と脾リンパ球の反応性は図9のようである。T cell stimulator である PHA, PWM では末梢リンパ球のほうが脾リンパ球より反応性が高く、脾の T, B cell を 2:1 に混じて末梢リンパ球の T:B 比と略同じにした「T×2+B」と比べても、末梢リンパ球の反応性のほうが高かった。この場合、末梢と脾リンパ球で spontaneous LP 反応 (in vitro での mitogen 無添加である control に起る LP 反応) が末梢リンパ球の16に対して、「T×2+B」の20であることも stimulation index での表示で図9のように、末梢リンパ球の反応性が net count の場合よりもより顕著に高くなった原因である。勿論、PHA, PWM 添加時の net count でも末梢リンパ球のほうが高値を示している。一方、B cell stimulator である S-Protein A では逆の関係を見ており、脾リンパ球の B cell の反応性は末梢リンパ球のそれに比べて高いと考えられた。以上より、脾リンパ球の subpopulation は末梢血のそれとは稍異なっている事が推測され、これは今後さらに検討されるべき問題と思われる。

MLTR を用いての脾 suppressor T cell の検討では、7例中4例は脾リンパ球の添加によっても net count に変動は見られなかったため、変動の見られた3例を図10に図示した。その3例の末梢リンパ球に対して MMC 処理した自己胃癌細胞を添加した場合、net count は上昇一すなわち自己胃癌細胞を“not self”と認識するが、 $p=0.3$ であり有意増とはいえない。脾リンパ球に自己胃癌細胞を添加した場合は、図10のように逆に cpm の有意減少を示しているため脾 suppressor cell の存在を推定し得た。脾 suppressor cell は mouse を用いた Fujimoto ら¹⁵⁾の検討があるが、Sampson ら¹⁶⁾、Hubert ら¹⁷⁾はヒトにおける suppressor cell を夫々脾と末梢リンパ球において検討している。本稿における7例中3例の場合は明らかに脾内 T cell の自己胃癌細胞に対する認識を低下させており、また、末梢と脾リンパ球の混合培養であっても同様の傾向が窺われるので、これらの症例においては脾 suppressor cell は自己の癌細胞に対しての effector cell などの反応を、低下させることはあっても賦活させることはないと思われた。

消化器癌の中特に自己胃癌細胞を用いての MLTR の報告は皆無の状態であり、これは胃癌細胞を free cell

として回収する場合その回収率が極めて悪く¹⁸⁾、さらに多くの間質構成細胞の含有と胃癌組織中に存在する頻度の高い真菌類の汚染など技術的に困難性が高い故であろう。一方、宮崎ら⁴⁾は胃癌組織より solubilized tumor-associated antigen を抽出し、この抽出物質と末梢リンパ球の培養によりリンパ球の LP 反応を検討しているが、検討症例の約30%に著明な LP 反応を認めており、その割合は本稿の3/7 (43%) と略一致していると共に、その net count も同じ order を示している。

以上、脾リンパ球の各 mitogen に対する反応性の低さと、脾内 suppressor T cell の存在より考え、進行胃癌の手術の際の脾合併切除は免疫学的に必ずしも負にはならないと考えられる。また、術直後と術後3年前後の宿主の細胞性免疫能の検討結果と N₁₀, N₁₁ のリンパ節廓清を共に完全に行い得ると利点を考慮に入れる場合、腫瘍占拠部位、臨床病期などの要因が満された場合には、脾合併切除はむしろ積極的に行うべきである。

本研究の一部は厚生省がん助成金 (52-7) により行われた。

文 献

- 1) Fujimoto, S., et al.: Value of lymphocyte reactivity induced by phytohemagglutinin in the treatment of malignant diseases. *Jpn. J. Surg.*, **7**: 35—43, 1977.
- 2) 藤本 茂, 他: 免疫賦活剤の細胞性免疫に関する検討。癌の臨床, **23**: 840—845, 1977.
- 3) 藤本 茂, 他: Levamisole を使用した消化器癌症例に対する免疫学的療法。癌の臨床, **23**: 1239—1245, 1977.
- 4) 宮崎 勝, 他: 可溶性 Tumor-associated antigen による消化器癌患者の特異的免疫能の評価。癌の臨床, **25**: 290—294, 1979.
- 5) Fujimoto, S., et al.: Clinical value of immunochemotherapy with OK-432 or PS-K for stomach cancer patients. *Jpn. J. Surg.*, **9**: 190—196, 1979.
- 6) Schmidt, G. and Thannhauser, S.J.: A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**: 83—89, 1945.
- 7) 矢田純一, 橋 武彦: ヒトリンパ球 subpopulation の分別。免疫実験操作法 A, 451—454, 日本免疫学会編, 金沢, 1975.
- 8) Wagener, D.J., et al.: The influence of splenectomy of cellular immunologic parameter in Hodgkin's disease. *Cancer*, **37**: 2212—2219, 1976.
- 9) Burwell, E.L., et al.: Erythrocyte life span in

- small animals. Comparison of two methods employing radioiron. *Amer. J. Physiol.*, **172**: 718—724, 1953.
- 10) McBride, J.M., et al.: The effect of splenectomy on the leucocyte count. *Brit. J. Haemat.*, **14**: 225—231, 1968.
- 11) Lipson, R.L., et al.: The postsplenectomy blood picture. *Amer. J. Clin. Path.*, **32**: 526—532, 1959.
- 12) Everett, N.B., et al.: Recirculation of lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **113**: 887—897, 1964.
- 13) Fiorelli, G., et al.: T and B lymphocytes in human spleen. *Lancet*, **1**: 99—100, 1974.
- 14) Habeshaw, J.A. and Stuart, A.E.: T and B lymphocyte in human spleen. *Lancet*, **1**: 1164—1165, 1974.
- 15) Fujimoto, S., et al.: Regulation of the immune response to tumor antigens. II. The nature of immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.*, **116**: 800—806, 1976.
- 16) Sampson, D. and Lui, A.: The effect of levamisole on cell-mediated immunity and suppressor cell function. *Cancer Mes.*, **36**: 952—955, 1976.
- 17) Hubert, C., et al.: Concanavalin A-activated suppressor cells in normal human peripheral blood lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, **26**: 95—98, 1976.
- 18) 藤本 茂, 他: Isotope を使用した組織培養による制癌剤感受性試験. *最新医学*, **33**: 2270—2277, 1978.