

消化器癌患者の細胞性免疫に関する研究 リンパ球幼若化反応を中心として

京都府立医科大学第2外科学教室(指導:橋本 勇教授)

松 本 学

STUDIES CONCERNING CELL MEDIATED IMMUNITY IN DIGESTIVE CANCER PATIENTS WITH LYMPHOCYTE BLASTOID TRANSFORMATION

Manabu MATSUMOTO

2nd Department of Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine

(Director: Prof. Isamu HASHIMOTO)

消化器癌患者237例を対象にして、細胞性免疫能を全身的なものと、癌病巣に所属するリンパ節細胞の免疫応答とに区別し、*in vitro*のリンパ球幼若化反応を指標にして検討した。

1) PHA 幼若化反応を指標にした全身的な免疫能は、癌患者(S.I.= 52.9 ± 23.4)では健康人(n=92, S.I.= 103.7 ± 34.4)に比し有意な低下を認め($p < 0.01$)、また癌が進行するに従って低下傾向が認められた。胃癌患者で領域リンパ節の採取できた18例につき局所の免疫能を検討すると、全身的な免疫反応に比べて増強傾向が認められた。

2) 非特異的免疫賦活剤を投与された5例につき特異免疫能(MLTR)の変動を検討すると3例(60%)に改善傾向が認められた。

索引用語: 細胞性免疫, リンパ球幼若化率, 領域リンパ節細胞, 癌免疫療法

I 緒 言

近年の免疫学の進歩により担癌生体の免疫能に関する知見が多く認められている。生体にとって異物ともいべき腫瘍が発生すると、生体では主として胸腺依存性リンパ球(T-cell)がこれを排除しようと働かし、ここに細胞性免疫が成立する。動物の実験腫瘍では細胞性免疫の解析がなされている¹⁾²⁾³⁾、一方人癌においても、種々の方法により免疫能の解析がなされている。解析の方法には感作リンパ球が産生するリンホカインを測定する assay と、感作リンパ球の腫瘍細胞障害能を測定する assay があるが、前者に属するものにはマクロファージ遊走阻止試験、白血球遊走阻止試験、リンパ球幼若化反応などがあり、後者には細胞障害試験、コロニー阻止試験などがある。これらの測定法のうち、いずれを選択するかについては、なお多くの意見がありかならずしも一定の見解は認められないが、本研究では著者は主として

リンパ球幼若化反応を測定することによって担癌生体の細胞性免疫能を解析する方法を選んだ。

1960年 Nowell によって Phytohaemagglutinin (以後 PHA と省略)が生体のリンパ球の芽球化を引き起こす現象が報告⁴⁾されたが、1974年になって Greaves ら⁵⁾は PHA がリンパ球のうち選択的に T-cell を芽球化させることを明らかにし報告した。しかしこの PHA による T-cell の mitogen は非特異的なもので腫瘍に関連する特異的なものではない。そこで著者はリンパ球に PHA を添加して行う非特異的な T-cell の mitogen と以下に述べる腫瘍特異的な検索を併せ行い生体の免疫能を解析しようと試みた。

生体に存在する腫瘍特異抗原(T.S.A)は、最近の一連の動物実験によりその存在が実証され報告されているが⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾、人癌における腫瘍特異抗原の証明が困難なこともよく知られているところである。Stjernswärd ら¹⁰⁾

がリンパ球と自家の腫瘍細胞を混合培養し腫瘍特異抗原の存在を示唆して以来、この方法による特異免疫能の解析が行なわれるようになった。著者も本研究では手術時採取した腫瘍細胞と、リンパ球との間で混合培養 (MLTR) を行い腫瘍特異抗原の解析を行った。

一般に担癌生体では細胞性免疫能が低下していると考えられているが、その原因として、体液性因子および細胞性因子の関与が考えられる。体液性因子としては流血中の血清抑制因子の増加が報告されており¹¹⁾¹²⁾、また細胞性因子としては suppressor cell の影響¹³⁾が考えられ、それぞれが全身的な免疫能に影響を与えると考えられる。また近年癌病巣領域のリンパ節細胞には、腫瘍増殖を抑制する機構が存在すると考えられており、これは全身的なものとは違って局所的免疫反応として理解されている。著者はこの両者に関する検索を行うことを目的として、胃癌患者を対象に全身的な免疫能と、領域リンパ節での変化を指標とした局所的免疫能を比較検討した。

一方進行癌患者では、免疫能が著明に低下することが知られているので、最近では術前からその生体の免疫能を改善することを目的にして非特異的免疫療法が施行されていることも多い。しかしこのような非特異的免疫療法によって、はたして癌に対する特異免疫能の増強さえも期待できるかどうかについては甚だ疑問である。そこで著者はこの問題を解析するため、術前に行う免疫療法に先立って、まず末梢血リンパ球を採取し、これを凍結保存¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾しておいて切除された腫瘍との間で MLTR を行い、この結果を指標として特異免疫能の推移を検討した。同時に術前の免疫療法により局所の免疫能に与える影響を胃癌患者の領域リンパ節リンパ球を指標に検討した。

II 対象および検索方法

対象症例は胃癌161例、食道癌26例、大腸癌43例、膀胱癌7例、良性疾患64例、健康人92例、総数393例である。

1) 末梢血リンパ球の分離

術前数回早朝にヘパリン加末梢静脈血約7~8ml採血し、Ficoll-Conray 400の約3mlの上に重層し、1,550回転で30分間遠心し、分離されたリンパ球層を10% Fetal Calf Serum (F.C.S. Gibco社)を含むRPMI-1,640培養液(Gibco社)に浮遊させ2回洗滌後、細胞数を 1×10^6 /mlに調整した。

2) リンパ節リンパ球の分離

手術時無菌的にリンパ節を採取し、teflon mesh 上に

て眼科用鉗で細切濾過し、以下末梢血リンパ球分離と同様の方法を用いてリンパ球を分離した。なお採取したリンパ節は半切して、一方はリンパ球分離に、残り半分は病理組織標本として転移の有無を検討した。

3) 腫瘍細胞の分離および調整

原発性病巣または転移陽性と判明したリンパ節より癌組織を採取し、ストレプトマイシン $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む生理食塩水で充分洗滌後、眼科用鉗で細切し、teflon meshを用いて濾過し、0.25%トリプシンを含むEagle's Minimum Essential Medium (Eagle's MEM) 培養液中に浮遊させ、 37°C で10分間処理し、中和後1,000回転で10分間遠心した。Eagle's MEMで2回洗滌後、20% FCS加RPMI-1640に 10^7 個/mlになるように浮遊させ、等量のMitomycin C (MMC) $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、 37°C で45分間作用させて癌細胞を不活性化した。その後死細胞を除去するため、Ficoll-Conray 400に重層し、2,000回転で10分間遠心し、中間層をとり浮遊させた。分離後trypan blue dye exclusion法により生細胞を計算し、癌細胞浮遊液を $1 \times 10^6/\text{ml}$ と $2 \times 10^6/\text{ml}$ の2種類作製した。

4) リンパ球の凍結保存

術前の免疫療法開始より1週間前に末梢血リンパ球を採取し、細胞数を $4 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、凍結保存用バイアルに細胞凍害防止剤であるDimethylsulfoxide (DMSO)を最終濃度が10%になるように加え、発泡スチロール製の密封容器中へバイアルを入れ、アルコール加ドライアイス中にて2時間緩徐凍結した。次に液体窒素中にて長期間保存した。解凍は 42°C water bath中に3分間入れ、DMSOの働らきを中和後、Eagle's MEMで1回洗滌し細胞数を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。

5) 培養

i) PHA 添加による培養

培養にはmicro test II tissue culture plate (Falcon Co. #3,040)を用い、各well当りリンパ球浮遊液0.2ml(細胞数 2×10^6 個)を注入し、さらにrepeating dispenserでPHA-P (Difco Co)が0.02ml ($15 \mu\text{g}/\text{ml}$)になるように加えた後5%炭酸ガス培養器内で72時間培養した。培養終了8時間前に ^3H -thymidine (^3H -TdR)を0.02ml(最終濃度 $2 \mu\text{Ci}/\text{ml}$)加えた。

ii) リンパ球—腫瘍混合培養

PHA添加による培養と同様に微量測定法を用いて施行した。腫瘍細胞浮遊液は0.02mlとし、培養は5日間と7日間培養の2群を作成し、腫瘍細胞とリンパ球の比

率は、1:5と1:10で検討した。培養終了8時間前に³H-TdRを0.02ml加えた。

6) 回収および放射活性

回収には Labo Mash Cell Harvester (Labo Science Co) を使用し濾過回収後、フィルターを乾燥し、液体シンチレーション用バイアルに入れ、シンチレーター液を10ml加え、液体シンチレーションカウンター (Packard Co., Tricarb 3,390) で放射活性を測定し、Stimulation Index (S.I.) は、以下の式で算出した。算出は Quadruplicate の median の平均値を用いた。

i) PHA によるリンパ球幼若化率

$$S.I. = \frac{(\text{リンパ球} + \text{PHA-P})^{dpm}}{(\text{リンパ球のみ})^{dpm}}$$

ii) リンパ球—腫瘍混合培養による幼若化率

$$S.I. = \frac{(\text{リンパ球} + \text{腫瘍細胞})^{dpm} - (\text{腫瘍細胞})^{dpm}}{(\text{リンパ球のみ})^{dpm}}$$

dpm*=disintegrate per minute

III 結果

(1) 全身的免疫応答

i) PHA 幼若化率

対象症例は消化器癌237例、良性疾患64例、健康人92例である。PHA 幼若化率は術前の未治療時のものを採用した。各疾患別の PHA 幼若化率 (S.I.=mean±S.D.) をみると、癌患者では52.9±23.4、良性疾患 (胃十二指腸潰瘍、胆石、イレウス) では76.0±29.3、健康人では103.7±34.4であった。癌患者を各臓器別にみると、食道癌50.7±28.9、胃癌61.6±28.2、膵臓癌39.9±19.6、大腸癌47.9±24.0であった。癌患者では健康人に比し、推計学的に PHA 幼若化率の有意の低下を認めた (表1)。

胃癌患者138例を胃癌取扱い規約¹⁷⁾に従って進行度別に分類すると、stage I 33例、stage II 25例、stage III 34例、stage IV 46例である。stage 別の PHA 幼若化率は、stage I 69.0±21.4、stage II 64.1±19.2、stage III 62.4±24.7、stage IV 46.2±20.5であり、stage の進行にしたがって平均値の低下を認めた。stage I と stage IV、stage I と再発症例 (n=23、S.I.=28.1±11.6) では推計学的に有意差を認め (p<0.01)、stage IV、再発症例では stage I に比し有意の低下を認めた (図1)。

以上より癌患者では、非特異的な細胞性免疫能の低下が認められ、また癌の進行にともなって有意な低下を認めた。

ii) リンパ球—腫瘍混合培養反応 (MLTR)

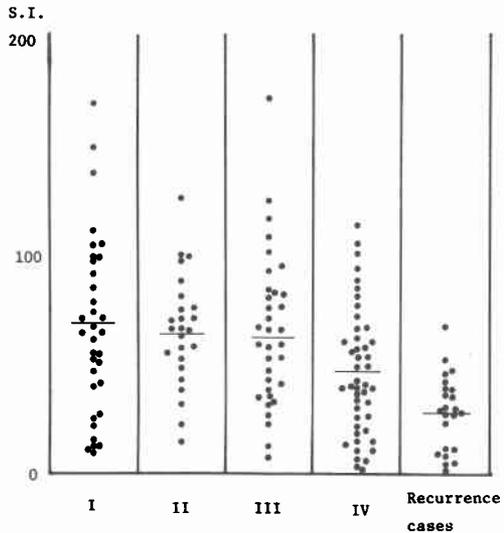
対象症例は食道癌4例、胃癌35例、大腸癌5例の計44

表1 PHA induced in vitro blastoid transformation in various malignant diseases

primary case	n	PHA Blastogenesis mean ± S.D. (S.I.)
gastric ca.	138	61.6 ± 28.2
esophagus. ca.	26	50.7 ± 28.2
colonic ca.	43	47.9 ± 24.0
pancreatic ca.	7	39.9 ± 19.6
total	214	52.9 ± 23.4
benign disease	64	76.0 ± 29.3
healthy	92	103.7 ± 34.4

malignant : healthy
disease : control p<0.01

図1 PHA induced blastoid transformation in each stage of gastric cancer



例である。

1) 腫瘍細胞の生細胞率の向上

手術時いかに多くの生細胞を採取できるかが問題となるが、手術時の病巣摘出から腫瘍細胞採取までに時間がかかると死細胞が多くなる。そこで Ficoll-Conray を使用し、比重遠沈法を用いて死細胞の除去を試みた。結果は図2のごとく腫瘍細胞採取時10%の生細胞率が分離後平均47%に上昇を認めた。

図2 Viability of tumor cells

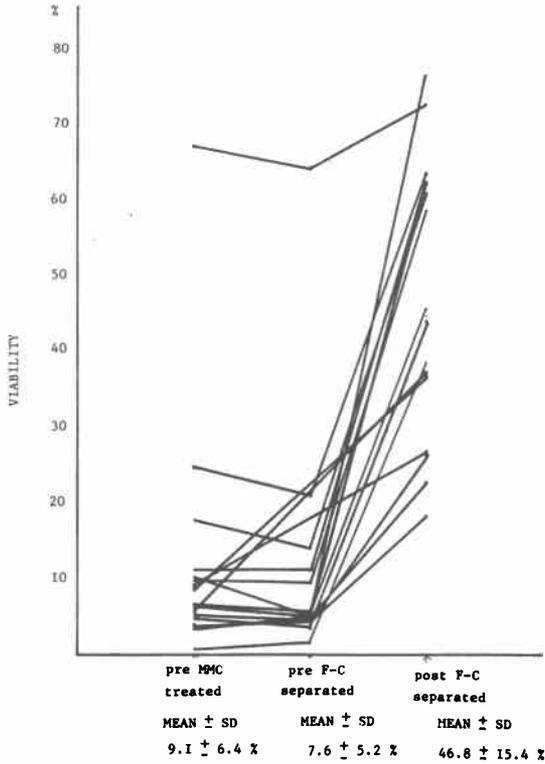
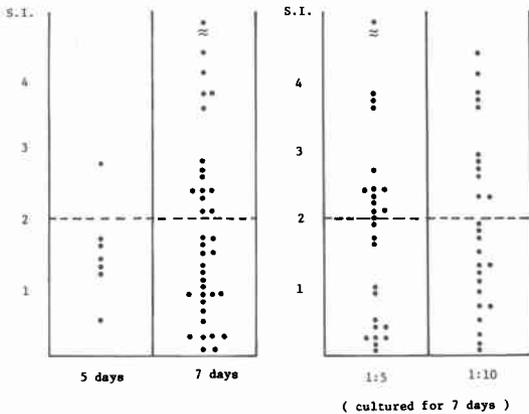


図3 Optimal response of peripheral lymphocytes to autochonus tumor cells



2) MLTR における至適培養条件

培養日数および腫瘍細胞とリンパ球の比率を検討した。培養日数についてみると、5日間培養では7例中1例(14.3%)に陽性例がみられたが、7日間培養では37例中15例(40.5%)に陽性例がみられ、7日培養に陽性

例が高く認められたので以後7日間培養を施行した。腫瘍細胞とリンパ球の比率は、26例中1:5で13例(50%)、1:10で11例(42.3%)と1:5の比率に陽性例がやや高く認められた(図3)。個々の症例についてその比率の推移をみると、症例により一定の傾向は認めなかった(図4)。以後両比率について施行し、反応性の最大値を採用した。

図4 Optimal responses of peripheral lymphocytes to autochonus tumor cells

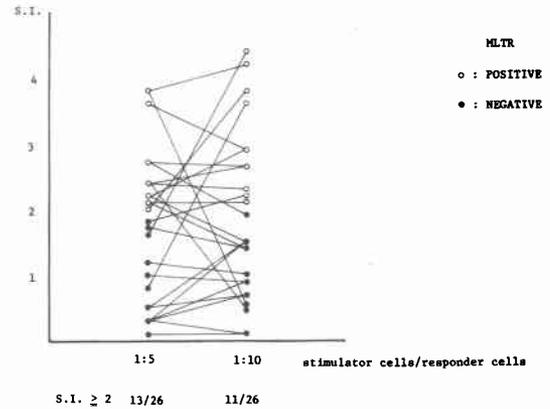
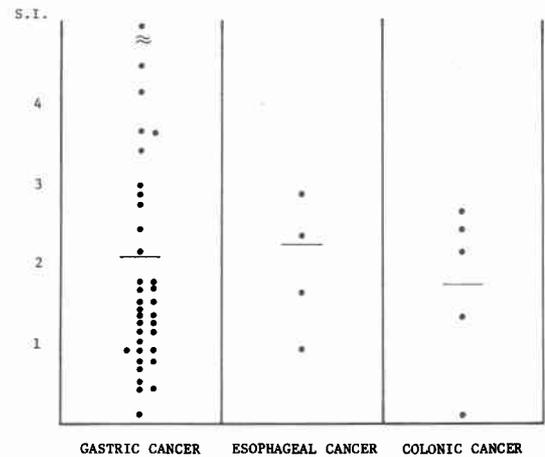


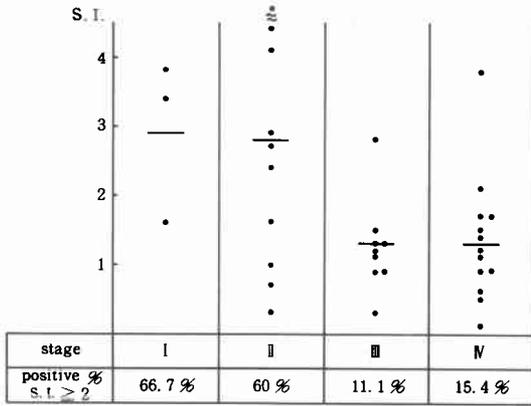
図5 Comparison of mixed lymphocyte tumor culture reaction in malignant disease



3) 各疾患別の MLTR の陽性率

stimulation index (S.I.) 2.0以上を陽性とした。食道癌では4例中2例(50%)、胃癌では35例中11例(31.4%)、大腸癌では5例中3例(60%)で全体で44例中16例(36.4%)が陽性であった(図5)。

図6 Mixed lymphocyte tumor cell culture reaction in each stage of gastric cancer



4) 胃癌における MLTR

胃癌患者35例につき進行度と陽性率の関係をみると、stage Iは3例中2例(66.7%)、stage IIでは10例中6例(60%)、stage IIIでは9例中1例(11.1%)、stage IVでは13例中2例(15.4%)が陽性であり、癌が進行するに従って陽性率は低下する傾向を示した(図6)。

以上よりヒト癌においても腫瘍特異抗原の存在が示唆され、また癌が進行するにつれ感作リンパ球の抗原認識力の低下が認められた。

(2) 局所的免疫応答

対象は胃癌患者で手術時領域リンパ節として第1群リンパ節の採取できた18例である。リンパ節は一症例あたり2~4個採取し、リンパ節リンパ球の反応性は、採取したリンパ節の反応性の総和を、採取リンパ節数で除した平均値を用いた。

i) PHA 幼若化率

末梢血リンパ球、領域リンパ節リンパ球、腸間膜根部より採取した遠隔リンパ節リンパ球の PHA 幼若化率(mean±S.D.)は、それぞれ40.7±17.2, 58.8±27.6, 39.6±24.4であり、末梢、遠隔リンパ節リンパ球に比し、領域リンパ節リンパ球の反応性の上昇が認められた(図7)。進行度と領域リンパ節の PHA 幼若化率の関係をみると、stage Iでは21.3±10.8, stage IIでは108.7±45.9, stage IIIでは39.5±18.3, stage IVでは7.5±1.6であり、stage II症例では、stage I, III, IV症例に比し領域リンパ節リンパ球の PHA 幼若化率の上昇を認めた(図8)。

ii) 特異的免疫能

MLTR を指標にして検討すると、末梢血リンパ球、

図7 Response of PHA induced blastoid transformation between peripheral, regional & distant lymph node lymphocyte in gastric cancer

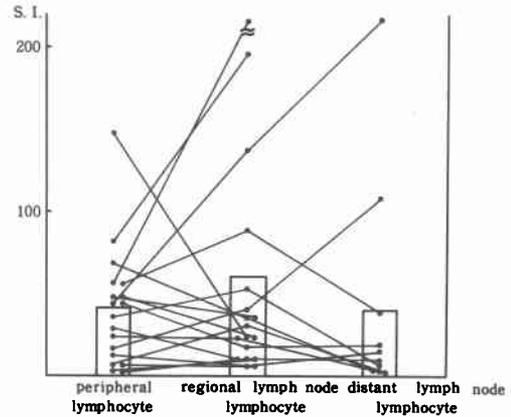
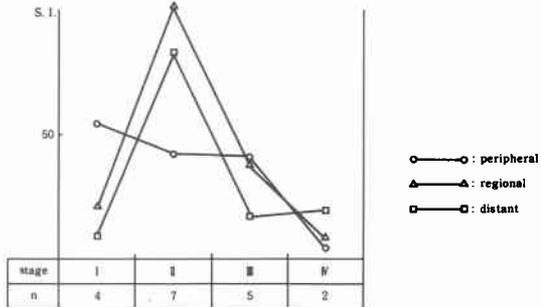


図8 Response of PHA induced blastoid transformation between peripheral, regional and distant lymph node lymphocyte in each stage of gastric cancer



領域リンパ節リンパ球、遠隔リンパ節リンパ球の MLTR (mean±S.D.)はそれぞれ2.4±1.1, 2.7±1.5, 2.3±1.3であり、PHA 幼若化率と同様領域リンパ節リンパ球に反応性の上昇を認めた。また S.I. 2.0以上の陽性例をみると、末梢血リンパ球では17例中7例(41.1%)、領域リンパ節リンパ球では17例中8例(47.1%)、遠隔リンパ節リンパ球では8例中3例(37.5%)であり、領域リンパ節リンパ球にやや多く陽性例を認めた。末梢血リンパ球との反応性を比較すると、17例中9例(52.9%)に領域リンパ節リンパ球での反応性がより高くなる傾向を認めた(図9)。

進行度と領域リンパ節リンパ球の反応性をみると、stage Iでは2.0±0.8, stage IIでは4.3±2.2, stage IIIでは1.9±1.1, stage IVでは1.2±0.2であり、PHA 幼

図9 Response of MLTR between peripheral, regional and distant lymphnode lymphocyte in gastric cancer

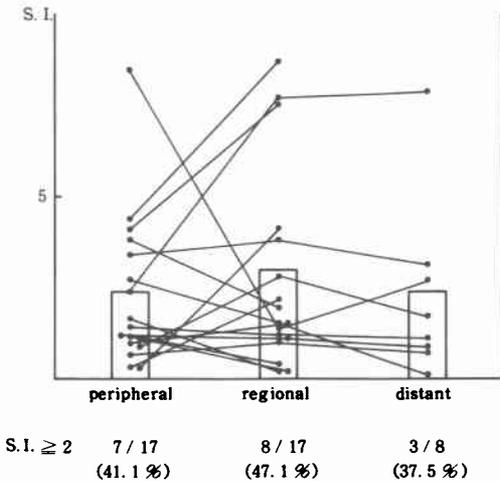
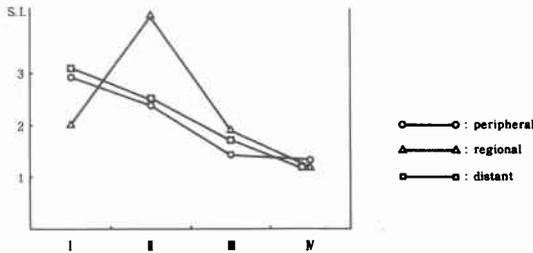


図10 Response of MLTR between peripheral, regional and distant lymph node lymphocyte in each stage of gastric cancer



若化率と同様 stage II 症例に領域リンパ節リンパ球で反応性の上昇を認めた (図10).

(3) 非特異的免疫療法の特異免疫能に及ぼす影響

進行癌患者では免疫能の低下が著明であり、術前より非特異的免疫療法を施行している。非特異的免疫療法により特異免疫能の改善が期待できるかどうかを凍結保存したリンパ球を用いた MLTR を指標にして検討した。

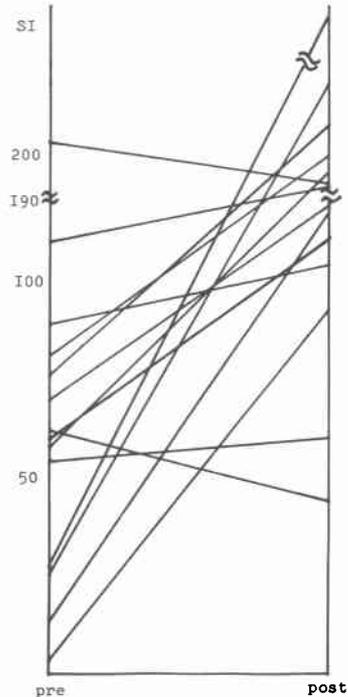
i) 凍結保存リンパ球の機能保持

手術前1週間に末梢血リンパ球を採取し、前記方法で保存した。保存したリンパ球の機能保持は PHA 幼若化率を指標にした。保存前後での PHA 幼若化率は図11のごとく、凍結してもリンパ球の機能は保持されている。

ii) 特異免疫能 (MLTR) の変動

胃癌4例、直腸癌1例の計5例で MLTR を施行し

図11 Corelations between pre and poststored T-lymphocytes on functions in cancer patients



た。非特異的免疫能は全例改善を認めたが、非特異的なものと特異的免疫能が平行して変動したものが5例中3例 (60%) であった (図12).

(4) 術前の免疫療法による領域リンパ節の免疫応答
進行胃癌12例を対象として、術前に免疫賦活剤を投与された群8例 (BCG 4例, Levamisole 2例, Bestatin 2例) と非投与群4例に分け、領域リンパ節の免疫能を比較検討すると、PHA 幼若化率 (S.I.=mean±S.D) では、非投与群17.7±11.4であるのに対して、投与群では36.4±17.5であった。MLTR では、非投与群1.5±0.3、投与群2.1±1.6であり免疫賦活剤投与群では非投与群に比し、非特異的および特異的にも領域リンパ節の反応性の上昇を認めた (図13).

(5) 外科的手術の免疫能に及ぼす影響

対象は胃癌で根治手術の施行し得た40例である。末梢血リンパ球は術後1週目より1カ月まで毎週採取した。術後1週目では、stage I~IIの比較的早期の症例では術前値の30~50%まで低下を認めるが、stage III~IVの進行癌では術前値の20~25%となり低下傾向は一層著明である。術後4週目では、stage Iではほぼ術前値にま

図12 Changes of specific (MLTR) and nonspecific (PHA induced blastogenesis) parameters before & after immunotherapy

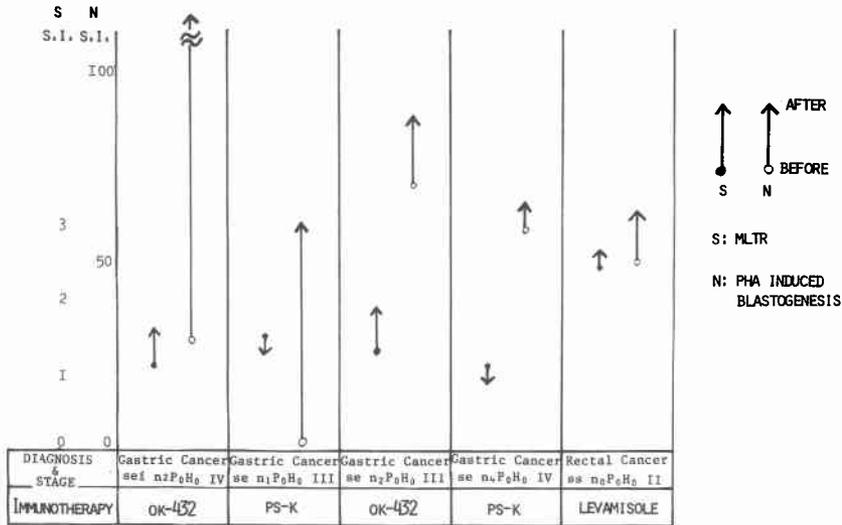
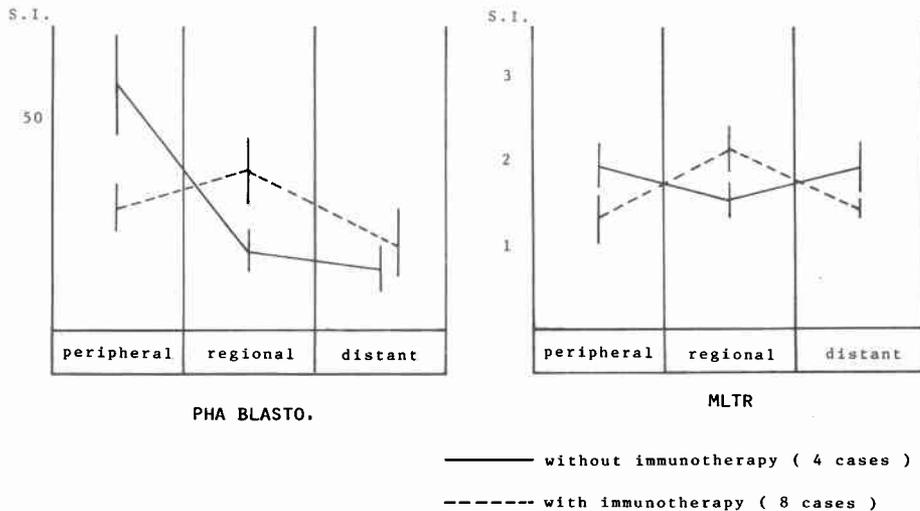


図13 Immunological responses of preoperative immunotherapy



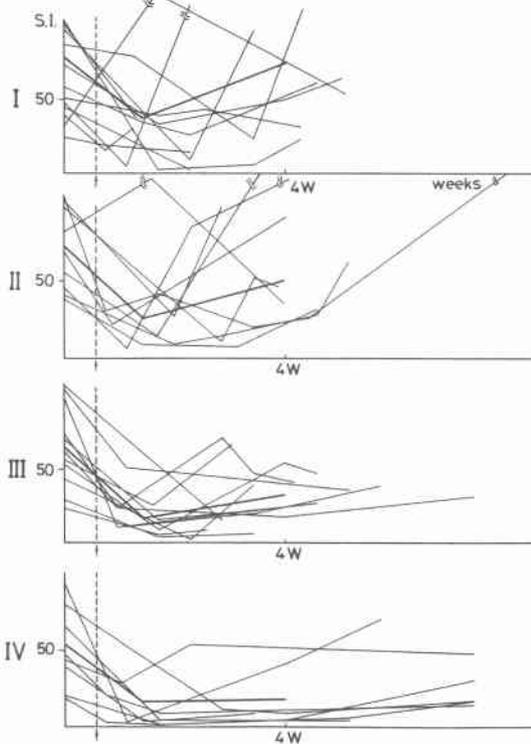
で免疫能の回復を認めるが、stage IIで70%，stage IIIで50%，stage IVで30%であり、stage が進行するにしたがって免疫能の回復傾向の遅延を認めた(図14)。

IV 考 察

担癌生体の細胞性免疫能は、in vitro において種々の方法で検索されている。著者はリンパ球幼若化反応を指

標として検討した。担癌生体の免疫能の低下の原因として、癌患者の血清中に増加する腫瘍関連抗原 (T.A.A)，blocking factor などの体液性因子と、suppressor T cell を中心とした細胞性因子が考えられている。Mannickら¹⁸⁾は、癌患者より採取したリンパ球を6回洗滌することにより、PHA に対する反応性が上昇することから、

図14 Changes of PHA blastogenesis after surgery in each stage of gastric cancer



blocking factor はリンパ球膜面に可逆的に付着し、抗原に対するリンパ球の反応性を低下させていると報告している。また Rangel ら¹⁹⁾は、melanoma の患者の血清を正常のリンパ球に添加することにより、mitogen に対する反応性が低下し、しかも進行度の進んだ患者の血清程強く抑制することから、体液性抑制因子は腫瘍由来ないしは腫瘍自体が産生しているのではないかと述べている。一方細胞性抑制因子は、種々の系の動物実験で担癌状態により増加するとの報告²⁰⁾²¹⁾がある。ヒト癌においても IgG-Fc 陽性 T リンパ球の増加が報告²²⁾されているが、一定の見解はない。著者は PHA 幼若化率を指標に検討したが、癌患者では健康人に比し幼若化率の低下を認め ($p < 0.01$)、また癌の進行に伴っても低下し、正常リンパ球に癌患者血清を添加すると反応性の低下を認めた。このことより担癌状態での非特異的免疫能の低下には、体液性因子の関与が示唆された。非特異的免疫能測定に用いられる mitogen は PHA のほか Concanavalin A (Con A), Pokeweed mitogen (PWM) がある。ヒト

リンパ球に Con A を添加することにより非特異的な suppressor T cell が誘導されるが²³⁾²⁴⁾、この suppressor cell の役割は細胞性免疫を解析する上で重要であると思われる。

担癌生体の腫瘍特異免疫能を *in vitro* で測定する方法として、腫瘍細胞障害試験、コロニー阻止試験、マクロファージ遊走阻止試験、自己腫瘍抗原を用いた幼若化反応などがある。著者はリンパ球自家腫瘍混合培養 (MLTR) を指標にして検討した。MLTR では生きた腫瘍細胞を使用する必要があるが、ヒト癌では高い生腫瘍細胞を得ることの困難さや、培養条件、混合培養する腫瘍細胞の前処置など検討されるべき問題がある。

高率の生腫瘍細胞を得る方法として、Ficoll-Conray 法²⁵⁾により死細胞の除去がなされており、著者は Vanky ら²⁶⁾の方法により死細胞を除去し反応性の向上を認めた。

採取した腫瘍細胞の不活性化に関して、MMC 処理が優れているとの報告²⁷⁾や、⁶⁰Co 照射が安定しているとの報告²⁸⁾があるが、腫瘍系で検討する必要がある。著者の実験系では、MMC 処理のみで検討したが腫瘍細胞への ³H-TdR の取り込みも安定しており、簡便で有効な方法と考えられた。MLTR の至適培養日数、およびリンパ球と腫瘍細胞の比率に関しては報告者によって異っている²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾。著者の成績では 7 日培養に陽性例を多く認めた。腫瘍細胞とリンパ球の比率では症例により一定の傾向は認めなかったが、1:5 で 13 例、1:10 で 11 例の陽性例を認めた。MLTR による消化器癌の陽性率は、胃癌では 20~50%³²⁾³³⁾、食道癌では 60% との報告³⁴⁾がある。著者の成績では、食道癌で 50%、胃癌で 31% の陽性率を認めた。また胃癌症例では比較的早期の癌に高い陽性率を認め、山岡³⁵⁾の報告と同様に進行度と逆相関を示した。胃癌における MLTR の陽性率が低いことは、抗原性の弱いこと、抑制因子の関与が考えられるが今後検討されるべき問題である。

担癌生体の腫瘍免疫を考察する際、全身的なものとは腫瘍に近い局所の免疫能を区別して考える必要がある。とくに癌病巣に所属するリンパ節細胞には、腫瘍細胞の増殖を抑制する biological な barrier が存在すると考えられている³⁵⁾。著者は胃癌患者を対象として、領域リンパ節の免疫能を PHA 幼若化率、MLTR を指標にして検討した。

領域リンパ節の抗腫瘍性について、Ambus ら³⁶⁾は 34

人の種々の癌患者を対象に検討しているが、PHA 反応は末梢血リンパ球に反応性の高い傾向があるが、MLTR の陽性率では末梢血リンパ球が41%であり、領域リンパ節リンパ球では47%に陽性例を認め、さらに進行度にみると、stage I～III症例では末梢血リンパ球に反応性が高く、stage III～IVの進行癌になると領域リンパ節リンパ球に反応性の上昇をみたしと報告している。さらに Deodhar ら³⁷⁾は17人の乳癌患者を対象に PHA 反応、MLTR を施行し、PHA 反応では両者間に差を認めなかったが MLTR では領域リンパ節リンパ球に反応性の上昇を認めたと述べている。一方領域リンパ節の抗腫瘍性に関して反対の意見もある。Nairn ら³⁸⁾³⁹⁾は悪性黒色腫、大腸癌患者を対象に腫瘍細胞障害試験で検討しているが、領域リンパ節リンパ球には殺細胞性は認めなかったと報告している。著者は胃癌患者を対象に検討したが、PHA 幼若化率、MLTR はともに領域リンパ節リンパ球に反応性の増強を認めた。また進行度別にみると、stage I 症例では領域リンパ節リンパ球に反応性の上昇は認めなかったが、stage II 症例では著明に反応性の増強を認めた。stage III～IVの進行癌ではともに低下を認めた。

このことから領域リンパ節には腫瘍巣の拡がりを防御する biological barrier が存在し、腫瘍細胞の転移を防止する機能が存在するものと思われる。

進行癌患者では著明に免疫能の低下が認められているため、手術前より非特異的免疫療法が施行されている。非特異的免疫療法の効果判定を、MLTR を指標にして検討した報告は見当たらない。著者は術前の免疫療法開始前に末梢血リンパ球を採取凍結保存し、手術当日採取した腫瘍細胞との間で混合培養し、特異免疫能の変動を検討した。凍結保存したリンパ球の機能保持に関して Wood ら⁴⁰⁾は8人の腎移植供給者のリンパ球を用いて検討し、PHA 反応は保持されると述べている。Strong ら⁴¹⁾は C3H/HeJ マウスの spleen 中の T-cell は凍結操作により損傷を受けるが、B-cell はほとんど機能が保持されており、この相違は細胞膜の性質によるものではないかと報告している。著者は癌患者のリンパ球を凍結保存し、PHA 幼若化能で検討したが、凍結保存したリンパ球の機能は保持されることが判明した。

免疫療法の免疫能に及ぼす影響に関して Lipson ら⁴²⁾は55例の肺癌患者に thymosin 療法を施行し、投与群では非投与群に比し末梢血中の T-cell の増加が認められ、また T-cell 増加群では予後の良好な症例が多く認

められたと報告している。Cheema and Hersh⁴³⁾ は、*in vitro* で PHA で刺激した自己のリンパ球を腫瘍内に局注することにより、腫瘍の完全消失ないし部分的縮小が認められ、PHA で刺激したリンパ球にも抗腫瘍性が認められると述べている。著者は非特異的免疫療法による特異免疫能の変動を、MLTR を指標にして検討したが、5例中3例に特異免疫能の改善を認めた。また進行胃癌患者4例につき、術前2～1週に BCG cell wall vaccine 3mg を腫瘍内に投与し、領域リンパ節の免疫能を検討したが、末梢血リンパ球に比し領域リンパ節リンパ球では、PHA 幼若化率、MLTR はともに著明に反応性の上昇を認め、非特異的免疫療法によっても、ある程度特異免疫能の改善が期待でき、また免疫賦活剤の腫瘍内投与により領域リンパ節の特異免疫能の上昇を認め、微小に残存する癌細胞に対して効果があるものと思われる。

担癌生体の細胞性免疫能の低下は、癌の進行にともなう体液性および細胞性抑制因子の増加に起因しているが、外科領域の癌に対しては外科手術により腫瘍細胞の除去が可能であり、体液性および細胞性抑制因子の減少をはかることが可能である。事実腫瘍摘出後これら抑制因子の減少がみられたとの報告⁴⁴⁾がある。一方外科手術の影響による T細胞の mitogen に対する反応性について、癌患者以外や外傷患者でも術後早期には低下するが、数日後には急速に回復するとの報告がある⁴⁵⁾⁴⁶⁾。また Espanol ら⁴⁷⁾の報告では、麻酔薬の影響によっても PHA 反応の低下が認められると述べている。癌患者では術前より immunosuppressive の状態が認められている。Watkins⁴⁸⁾ は36人の癌患者を治癒切除例に別け検討しているが、術後6週目の PHA 反応では、非治癒切除例では術前値にまで回復する症例が少ないが、治癒切除例では術前値以上に回復する症例が多く認められ、これは治癒切除により血清中の抑制因子の消失が原因であろうと報告している。著者は胃癌患者を対象に検討したが、stage I～II 症例では術後早期より回復する症例が多く認められ、stage I 症例では術後1カ月ではほぼ術前値にまで回復しているが、stage III～IV 症例では術後の回復傾向の遅延が認められ、特に stage IV 症例では術後数カ月経過しても低値にとどまっている症例が多く認められた。進行癌でも腫瘍摘出によりある程度抑制因子の減少は可能であるが、肉眼的に治癒切除であっても他臓器への micrometastasis が考えられ、術後の免疫能の回復傾向の遅延があるものと考えられ今後手術時検討されるべ

き問題と思われる。事実 Watkins の報告でも治癒切除、非治癒切除にかかわらず術後著明にリンパ球反応の低下した症例では術後3カ月までに死亡しており、術後のリンパ球反応の推移が手術の根治性、予後を判断する指標となり得るとと思われる。

V 結 語

消化器癌患者237例の細胞性免疫能をリンパ球幼若化反応を指標にして検討した。

(1) 末梢血リンパ球を用いた全身的な免疫能は、PHA 幼若化反応でみるかぎり健康人に比し癌患者では有意の低下を認め、血清中の抑制因子の関与が示唆された。

(2) 胃癌患者を対象にリンパ球自家腫瘍混合培養反応による特異免疫能は、stage I～IIの比較的早期の症例に多く陽性例を認め、癌が進行するにしたがって陽性率は低下する傾向を示した。

(3) 胃癌患者で領域リンパ節の採取できた18例を対象に局所の免疫能を検討すると、stage I症例では領域リンパ節の免疫能の上昇は認めなかったが、stage II症例では非特異的および特異的にも著明に反応性の上昇を認めた。stage III～IVの進行癌ではともに低下を認めたが、stage IV症例では遠隔リンパ節にやや反応性の上昇を認めた。

(4) 凍結保存リンパ球を用いて非特異的免疫療法により MLTR を指標とした特異免疫能の変動を検討すると、5例中3例に特異免疫能の上昇を認め、非特異的免疫療法によってもある程度特異免疫能の改善が期待できる。

(5) 胃癌患者を対象に術前 BCG 腫瘍内投与による非特異的免疫療法を施行すると、非特異的および特異的にも領域リンパ節の反応性の上昇を認め、手術時残存する微小癌に対して効果があるものと思われる。

(6) 胃癌患者で治癒切除のできた症例につき、外科手術の免疫能に及ぼす影響につき検討した。術後の adjuvant therapy の開始される術後2週目では、stage I～IVではすべて術前値の20～60%であり、特に stage IV症例では術後1カ月を経過しても術前値まで回復しない症例が認められた。

本論文の要旨は第15, 16, 17回日本癌治療学会総会、第14回日本消化器外科学会、第80回日本外科学会総会において発表した。

稿を終るに臨み、ご指導とご校閲を賜った京都府立医科大学第2外科教室橋本勇教授に深甚なる謝意を捧げる

とともに、終始直接にご指導、ご助言下さった滋賀医科大学第1外科学教室小玉正智教授に深く感謝の意を表する。

文 献

- 1) Shortman, K. et al.: Characterisation and separation of mouse lymphocyte subpopulation responding to phytohemagglutinin and pokweed mitogen. *Cancer Immunol*, 6 : 25—40, 1973.
- 2) Glaser, M. et al.: Study of the cellular immune response to Gross virus-induced lymphoma by the Mixed Lymphocyte-Tumor Interaction. *Cancer Res.* 34 : 2165—2171, 1974.
- 3) Deckers, P. et al. The effect of tumor size on concomitant tumor immunity. *Cancer Res.* 33: 33—39, 1973.
- 4) Nowell, P.C.: Phytohaemagglutinin. An initiation of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20 : 462—466, 1960.
- 5) Greaves, M.F. et al.: Activation of human T and B lymphocytes by polyclonal mitogens. 248 : 698—701, 1974.
- 6) Martyn, W.B. et al.: Refractoriness of lymph node cells from tumor-bearing animals. *Int. J. Cancer* 15 : 99—108, 1975.
- 7) Boyer, P.J.J. et al.: Stimulation of lymphoid cells from normal and immune mice by syngeneic BALB/c plasma cell tumors. *J. Immunol.* 116 : 202—209, 1976.
- 8) Gillis, S. et al.: In vitro generation of umorspecific cytotoxic lymphocytes. Secondary allogeneic mixed tumor lymphocyte culture of normal murine spleen cells. *J. Exp. Med.* 146: 468—482, 1977.
- 9) Kanner, S.P. et al.: Experience with a mixed lymphocyte tumor reaction as a method of detecting antigenic differences between normal and neoplastic cells. *J. Immunol.* 105 : 1052—1055, 1970.
- 10) Stjernsward, J. et al. Indications of cellular immunological reactions against autochthonous tumor in cancer patients studied in vitro. *E. Afr. Med. J.* 45 : 485—497, 1968.
- 11) Foca, N.S. et al.: Impaired responsiveness of lymphocytes and serum inhibitory factors in patients with cancer. *Cancer. Res.* 33 : 2373—2377, 1973.
- 12) Tanaka, F. et al.: Blocking factors in sera of breast cancer patients. *Cancer* 43 : 838—847, 1979.
- 13) Takei, et al.: Charization of suppressor cells in mice bearing syngeneic mastocytoma. *J. Immunol.* 118 : 412—417, 1977.

- 14) Crowley, J.P. et al.: The recovery, structure, and function of human blood leukocytes after freeze preservation. *11* : 395—409, 1974.
- 15) Golub, S.H. et al.: The use of viable frozed lymphocytes for studies in human tumor immunology. *Transplantation* **19** : 195—202, 1975.
- 16) Mangi, R.J. et al.: The in vitro transformation of frozen-stored lymphocytes in the mixed lymphocyte reaction and in culture with phytohemagglutinin and specific antigens. *J. Exp. Med.*, **132** : 401—416, 1970.
- 17) 胃癌研究会：外科，病理，胃癌取扱い規約改訂第10版。金原出版，東京，1979.
- 18) Mannick, J.A.: Improvement of phytohemagglutinin responsiveness of lymphocytes from cancer patients after washing in vitro. *Cancer Res.* **37** : 3066—3070, 1977.
- 19) Rangel, D.M. et al.: Demonstration of lymphocyte blastogenesis-inhibiting factors in sera of melanoma patients. *Surgery.* **82** : 224—232, 1977.
- 20) Argyris, B.F.: Suppressor cells in the spleen of tumor-allo sensitized mice. *Cancer Res.* **37** : 3390—3399, 1977.
- 21) Eisenthal, A. et al.: Induction of allospecific suppressor T cells in vitro. *Cellular Immunol.* **34** : 112—124, 1977.
- 22) 新保敏和ほか：ヒト IgG-Fc receptor 陽性 T リンパ球の検出法と各種疾患における変動。臨床免疫，**9** : 141—145, 1977.
- 23) Hubert, C. et al.: Concanavalin A-activated suppressor cells in normal human peripheral blood lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **26** : 95—98, 1976.
- 24) Sakane T., et al.: Human suppressor T cells induced by Concanavalin A. Suppressor T cells belong to distinctive T cell subclasses. *J. Immunol.* **119** : 1169—1178, 1977.
- 25) Mavligit, G.M., et al.: Cell-mediated immunity to human solid tumors: In vitro detection by lymphocyte blastogenic responses to cell-associated and solubilized tumor antigens. *Natl. Cancer. Inst. Monogr* **37** : 167—176, 1973.
- 26) Vánky, F., et al.: Lymphocyte stimulation test for detection of tumor-specific reactivity in humans (edited by Barry R. Bloom and John R. David), Academic Press. New York, 597—606, 1976.
- 27) Vánky, F., et al.: Cellular immunity to human sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst* **46** : 1145—1151, 1971.
- 28) Anderson, R.J., et al.: Lymphocyte blastogenic responses to cultured allogeneic tumor cells in vitro. *Cancer. Res.* **32** : 988—992, 1972.
- 29) Vánky, F., et al.: Tumor-associated specificity of serum-mediated inhibition of lymphocyte stimulation by autochthonous human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51** : 25—32, 1973.
- 30) Mavligit, G.M., et al.: Lymphocyte blastogenic responses to autochthonous viable and nonviable human tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **51** : 337—343, 1973.
- 31) Dean, J.H., et al.: Cell-mediated immune responses of breast cancer patients to autologous tumor-associated antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **58** : 549—555, 1977.
- 32) 山岡 博：癌患者における癌特異的細胞性免疫能に関する研究。札幌医誌，**46** : 341—353, 1977.
- 33) Ieda, H., et al.: Mixed lymphocyte-tumor cell culture reaction in cancer patients. *GANN* **69** : 417—421, 1978.
- 34) 西平哲郎：各種人癌におけるリンパ球—腫瘍混合培養反応。癌の臨床，**24** : 961—968, 1978.
- 35) Kurokawa, Y.: Experiments on lymph-node metastasis by intralymphatic inoculation of rat ascites tumor cells, with special reference to lodement, passage, and growth of tumor cells in lymph-node. *GANN* **61** : 461—471, 1970.
- 36) Ambus, U., et al.: Specific and non-specific immunologic reactivity of regional lymph-node lymphocytes in human malignancy. *Int. J. Cancer* **14** : 291—300, 1974.
- 37) Deodhar, S.D., et al.: Study of the tumor cell-lymphocyte interaction in patients with breast cancer. *Cancer* **29** : 1321—1325, 1972.
- 38) Nairn, R.C., et al.: Anti-tumor immunoreactivity in patients with malignant melanoma. *Med. J. Aust.* **1** : 397—403, 1972.
- 39) Nairn, R.C., et al.: Immunological reactivity in patients with carcinoma of colon. *Brit. Med. J.* **4** : 706—709, 1971.
- 40) Wood, N., et al.: A simple method of freezing and storing live lymphocytes. *Tissue Antigens* **2** : 27—31, 1972.
- 41) Strong, D.M., et al.: Differential susceptibility of murine T and B lymphocytes to freeze-thaw and hypotonic shock. *Cryobiology* **11** : 127—138, 1974.
- 42) Lipson, S.D., et al.: Thymosin immunotherapy in patients with small cell carcinoma of the lung. Correlation of in vitro studies with clinical course. *Cancer* **43** : 863—870, 1979.
- 43) Cheema, A.R. and Hersh, E.M.: Local tumor immunotherapy with in vitro activated autochthonous lymphocytes. *Cancer* **29** : 982—986, 1972.
- 44) 成木行彦ほか：消化器癌患者の血中 CEA と T

- 細胞の関連について. 日本癌治療学会誌, 13 : 107—117, 1978.
- 45) Slade, M.S., et al.: Immunodepression after major surgery in normal patients. *Surgery* 78 : 363—372, 1975.
- 46) Bauer, A.R., et al.: The depression of T lymphocytes after trauma. *Amer. J. Surg.* 136 : 674—680, 1978.
- 47) Espanol, T., et al.: The effect of anaesthesia on the lymphocyte response to phytohaemagglutinin. *Clin. exp. Immunol.* 18 : 73—79, 1974.
- 48) Watkins, S.M.: The effect of surgery on lymphocyte transformation in patient with cancer. *Clin. exp. Immunol.* 14 : 69—76, 1973.
-