

胃癌所属リンパ節の免疫組織学的解析

岡山大学医学部第1外科

香川医科大学病理*

岡林 孝弘	堀見 忠司	合地 明	小林 元壮
武田 功	平松 聡	二宮 基樹	吉田 栄一
長江 聡一	向井 晃太	金田 道弘	香川 茂雄
田中 紀章	折田 薫三	小林 省二*	

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS ON REGIONAL LYMPH NODES OF GASTRIC CANCER

**Takahiro OKABAYASHI, Tadashi HORIMI, Akira GOUCHI,
Genso KOBAYASHI, Isao TAKEDA, Satoshi HIRAMATSU,
Motoki NINOMIYA, Eiichi YOSHIDA, Soichi NAGAE,
Kouta MUKAI, Michihiro KANEDA, Shigeo KAGAWA,
Noriaki TANAKA, Kunzo ORITA and Shoji KOBAYASHI***

The 1st Department of Surgery, Okayama University School of Medicine

*Department of Pathology, Kagawa Medical College

索引用語：胃癌所属リンパ節，免疫組織学的染色，モノクローナル抗体

1. はじめに

消化器癌の手術では、癌再発を予防するため、所属リンパ節郭清が必須のものと考えられ、肉眼的に転移陰性と思われるリンパ節に対しても拡大郭清が行われている。しかし、リンパ節の生体防禦的な免疫学的側面の解析により、いかなる郭清がより適正であるかが最近問題となってきた¹⁾。また、これらのリンパ節が免疫学的なバリアーの役割を果しているならば、それを増強させる試みも当然行われるべきものである²⁾。

そこで、著者らは胃癌患者の所属リンパ節を用いて、基礎的・臨床的な研究を行い、リンパ節の免疫学的抗腫瘍能の解析とリンパ節郭清について検討したので報告する。

2. 対象と方法

1) リンパ節の免疫組織学的解析

※第26回日消外総会シンポジウム：消化器癌リンパ節応答とその郭清

＜1985年11月12日受理＞別刷請求先：岡林 孝弘
〒700 岡山市鹿田町2-5-1 岡山大学医学部第1外科

胃癌手術例24例の所属リンパ節計52個を対象とし、良性疾患手術例2例の胃所属リンパ節3個を正常対照例とした。

リンパ節をOCT compoundで包埋後、液体窒素中で急速凍結し、5μmの凍結切片に薄切して免疫組織学的検索を行った。すなわち、免疫担当細胞サブセットに対応する各種のモノクローナル抗体(表1)を一次抗体とし、Vector社ABCキットを用いて、ABC法³⁾による酵素抗体染色を行った。表1のほか、一部の症例には、抗interleukin-2(IL-2) receptorモノクローナル抗体を活性化T細胞の免疫組織学的検索に使用した。ペルオキシダーゼ反応用として、3,3'-Diaminobenzidine 4HCl(DAB)を使用した。

さらに、OKT8陽性細胞(以下OKT8⁺細胞)すなわち suppressor/cytotoxic T細胞について、より詳細な機能的サブセット解析のため、Leu15モノクローナル抗体を使用し、蛍光抗体法を組み合わせた組織二重染色法⁴⁾を試みた。すなわち、Leu2a⁺-Leu15⁺細胞は suppressor T細胞を示し⁵⁾、Leu2a⁺-Leu15⁻細胞は cytotoxic T細胞を示す⁶⁾。

表1 使用したモノクローナル抗体および反応する細胞群

Monoclonal antibody	Specificity
OKT3	peripheral T lymphocytes
OKT4	helper/inducer T lymphocytes
OKT6	common thymocytes, Langerhans cells
OKT8	suppressor/cytotoxic T lymphocytes
OKT10	precursor cells, activated lymphocytes, circulating null cells
OKM1	monocytes, null cells, granulocytes
OKIa1	B lymphocytes, activated T lymphocytes, some monocytes, Langerhans cells, interdigitating dendritic cells
Leu7	LGL, NK/K cells
Leu10	B lymphocytes, monocytes, interdigitating dendritic cells
Leu11b	NK cells, neutrophils, basophils
Leu12	B lymphocytes

2) 術前免疫賦活剤腫瘍内投与の検討

免疫賦活剤 OK-432あるいは PSK を術前10~14日前に経内視鏡的に腫瘍内投与した胃癌症例で、所属リンパ節のリンパ節反応様式を検討し、また、免疫組織学的検索を行った。

さらに、OK-432腫瘍内投与例のリンパ節リンパ球を用いて、in vitro で K-562 をターゲットとする single cell assay を行い、killer 細胞の出現率を測定し、細胞障害活性について検索した。

3) 生存率の検討

胃癌治癒切除例 stage III における OK-432術前腫瘍内投与群と非投与群で、2年生存率を比較した。また、リンパ節郭清度 (R ナンバー) 別の予後を検討するため、昭和51年から53年の3年間の当科における胃癌治癒切除例のうち、組織学的リンパ節転移度 n₀例および n₁例で、R ナンバー別に5年生存率を比較した。

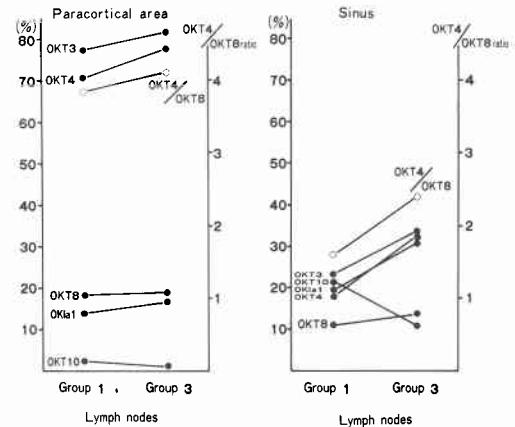
3. 結 果

1) リンパ節の免疫組織学的解析

リンパ節内領域における各モノクローナル抗体陽性細胞の分布様式は、対照の良性疾患リンパ節および胃癌所属リンパ節ともにはほぼ同様で、著変は認めなかった⁷⁾。

また、胃癌取り扱い規約⁸⁾による第1群と第3群リンパ節で、OKT3, OKT4, OKT8, OKT10, OKIa1 各陽性細胞数および OKT4/OKT8比を検索した所、第3群リンパ節は第1群リンパ節と比較して paracortical area および sinus ともに OKT3⁺細胞, OKT4⁺細胞, OKIa1⁺細胞および OKT4/OKT8比が増加を示し、OKT8⁺細胞には変化がみられず、OKT10⁺細胞は減少

図1 胃癌所属第1群および第3群リンパ節における各モノクローナル抗体陽性細胞数の比較 paracortical area と sinus における OKT3, OKT4, OKT8, OKT10, OKIa1 各陽性細胞数および OKT4/OKT8比を第1群リンパ節と第3群リンパ節で比較した。



を示した(図1)。また、転移陽性リンパ節では、転移陰性リンパ節と比較して、OKT4⁺細胞の減少および OKT8⁺細胞の増加がみられた⁷⁾。

natural killer 細胞 (以下 NK 細胞) と反応する Leu7, Leu11b 各陽性細胞は、第1群、第3群の転移陽性および陰性リンパ節ではいずれも少数しかみられなかったが、分布様式は異なっていた。すなわち、Leu7⁺細胞の多くは germinal center に存在するが⁹⁾、Leu11b⁺細胞は germinal center にみられず、germinal center 以外に少数認められ、OKM1⁺細胞や Leu15⁺細胞の分布形態と同様であった。

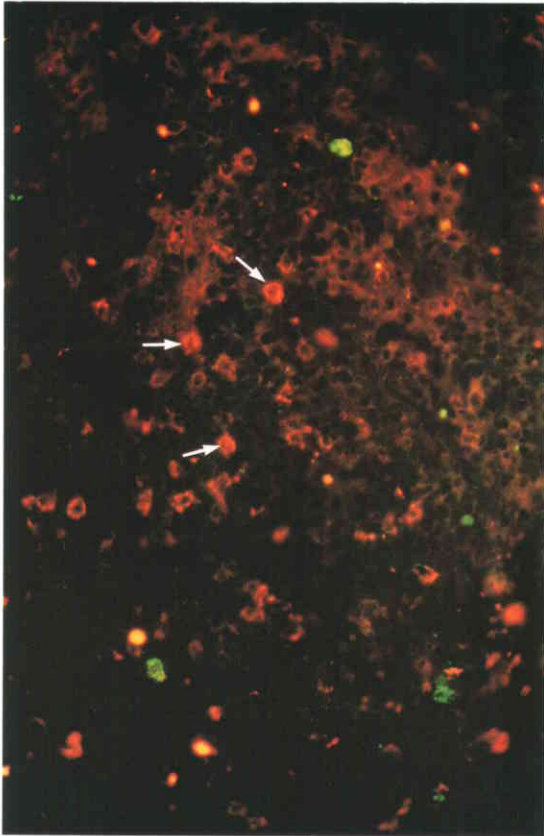
次に転移陰性リンパ節で、Leu2a (OKT8) を FITC で緑に、Leu15 を phycoerythrin で赤に、組織二重染色した結果、Leu2a⁺で Leu15⁺の suppressor T 細胞はほとんど認められず、Leu2a⁺細胞の大多数は Leu15⁻であった。しかしながら、転移陽性リンパ節では、転移癌巣の周囲で、Leu2a⁺-Leu15⁺と判定できるリンパ球が認められた (写真1)。

2) 術前免疫賦活剤腫瘍内投与の検討

n₀症例におけるリンパ節反応様式を第1群、2群、3群リンパ節ごとに検討したところ、pm 早期死亡群では sinus histiocytosis の頻度が第3群リンパ節で低下し、follicular hyperplasia は第3群リンパ節で増大していた。一方、術前免疫賦活剤 OK-432あるいは PSK 腫瘍内投与群では、sinus histiocytosis および par-

写真1 転移陽性リンパ節の Leu2a と Leu15 による組織二重染色法

Leu2a⁺細胞はB筋起で FITC が緑に, Leu15⁺細胞はG筋起で phycoerythrin が赤にそれぞれ蛍光を発するが, 一部 (→) のリンパ球は Leu2a⁺ Leu15⁺ の suppressor T 細胞であろうと判定できた。



acortical hyperplasia が第3群リンパ節でも認められ, follicular hyperplasia は第3群リンパ節で減少を示した (図2)。

これらの免疫組織学的検索では, OK-432腫瘍内投与群で, IL-2 receptor⁺ 細胞が paracortical area で著明な増加を示す例(写真2)や, PSK 投与群で, OKM1⁺ 細胞および OKT4⁺細胞の増加傾向がそれぞれ認められた。

また, single cell assay の結果, OK-432腫瘍内投与例では非投与例に比較して, 第3群, 第4群リンパ節

写真2 OK-432腫瘍内投与例所属リンパ節の抗 IL-2 receptor 抗体による ABC 法 (メチルグリーン核染色)

paracortical area に散在して陽性細胞が認められる。

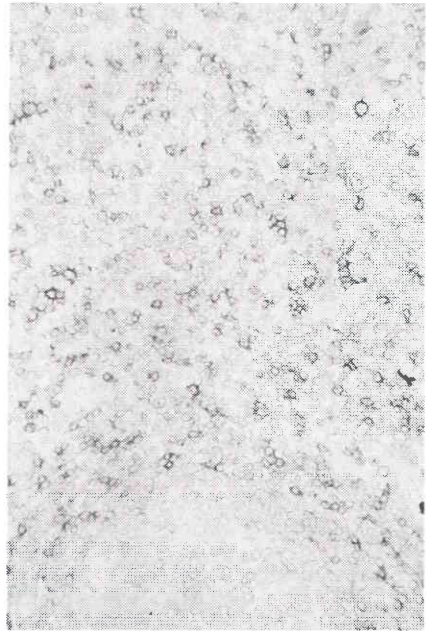


図2 免疫賦活剤腫瘍内投与例(n₀症例)のリンパ節反応様式

OK-432投与群および PSK 投与群のリンパ節反応様式を非投与例の pm 早期死亡群と比較した。

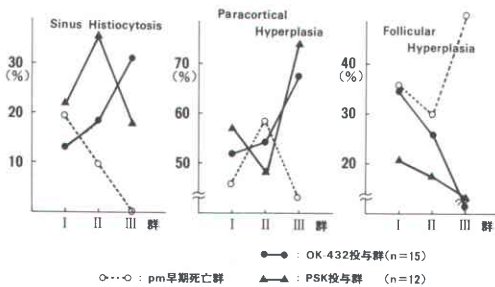
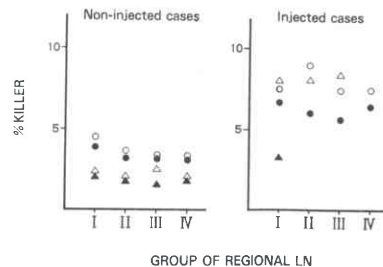


図3 胃癌所属リンパ節リンパ球の single cell assay による killer 細胞の出現率



にまで、細胞障害活性の誘導が認められた(図3)。

3) 生存率の検討

OK-432腫瘍内投与群の2年生存率は、非投与群より良好であったが、n(-)群とn(+)群に分類して比較すると、n(-)群では差が認められなかったが、n(+)群ではOK-432腫瘍内投与群が良好な傾向であった(図4)。

昭和51年から53年までの胃癌治癒切除例の組織学的

図4 胃癌治癒切除例 stage IIIにおけるOK-432腫瘍内投与群と非投与群の累積生存率

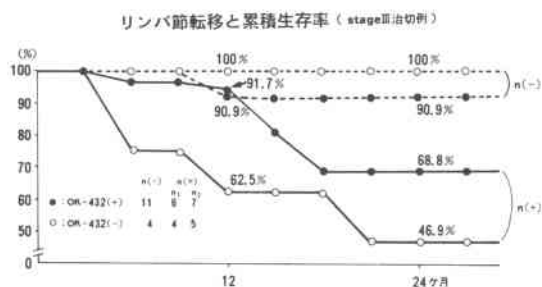
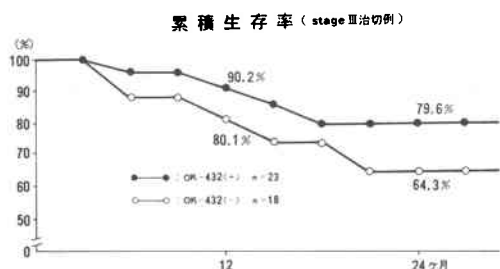
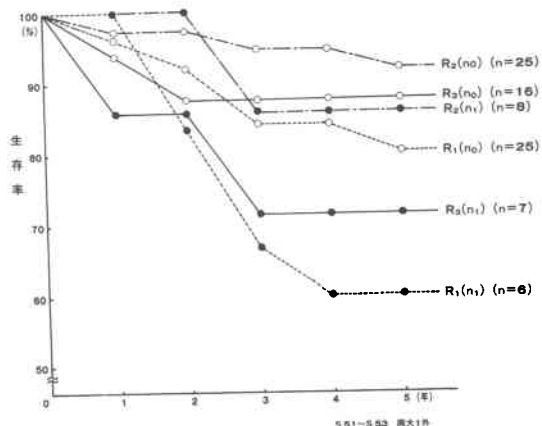


図5 胃癌治癒切除例 (n₀およびn₁症例)におけるリンパ節郭清度別の累積生存率



リンパ節転移度 n₀例および n₁例で、漿膜浸潤を考慮せずに、R ナンバー別に5年生存率を比較すると、n₀例、n₁例いずれも R₂, R₃, R₁ の順に良好な傾向を示した(図5)。

4. 考 察

担癌生体が腫瘍に対して、主にT細胞を中心とする細胞性免疫による免疫監視機構を有し、担癌臓器所属リンパ節は癌の進展に対してバリアーの働きをしているという報告が散見される¹⁰⁾。

suppressor 活性および cytotoxic 活性を同時に持つ OKT8⁺細胞は、組織二重染色により、cytotoxic T細胞あるいはその precursor であろうと判明した。しかしながら、増加が認められた転移陽性リンパ節では、二重染色により suppressor T細胞と判定できるものもあり、抗腫瘍能への関与は少ない可能性があった。逆に OKT4⁺細胞はT細胞領域で多数を占め、免疫賦活剤腫瘍内投与群で増加することから、免疫応答への関与が強く示唆された。第3群リンパ節では、第1群リンパ節に比較して、OKT4⁺細胞数が多く、リンパ節反応様式でも、予後良好の指標である sinus histiocytosis や paracortical hyperplasia の頻度が高く、また、n₀および n₁例で R₃よりも R₂の成績が良好であったことから、第3群リンパ節すなわち遠位のリンパ節には、第1群リンパ節よりも比較的免疫応答能そして抗腫瘍能が温存されているものと推測された。

NK細胞に反応する各抗体陽性細胞はT細胞系のリンパ球に比較して、少数であり、リンパ節リンパ球のNK活性が低値を示すこと¹¹⁾と相関し、抗腫瘍能への関与が少ないものと考えられた。また、これらの Leu7⁺, Leu11b⁺, OKM1⁺, OKT10⁺各細胞は分布形態が異なり、機能あるいは成熟度に差があるものと示唆された¹²⁾。

こういった natural history では微力と思われるリンパ節の免疫学的抗腫瘍能を増強するため、免疫賦活剤の腫瘍内投与により、sinus histiocytosis や paracortical hyperplasia が増加し、抗腫瘍能を阻害する方向に働くと考えられているB細胞優位の follicular hyperplasia は減少した。さらに、小数ではあるが、癌巣や転移陽性リンパ節の癌細胞に変性壊死像がみられた。これらのリンパ節の免疫組織学的検索の結果、OKM1⁺細胞や OKT4⁺細胞の増加により、抗原認識機構の賦活化が、また、IL-2 receptor⁺細胞の増加により、活性化T細胞の増加や Lymphokine Activated Killer (LAK)細胞¹³⁾との関連性が示唆された。また、免疫賦

活剤腫瘍内投与群は非投与群と比較して、2生率の向上がみられたことから、免疫賦活剤腫瘍内投与は所属リンパ節の抗腫瘍能を増強するものと思われた。

したがって、リンパ節転移のほとんどない比較的早期の胃癌では、R₃の必要性に疑問があり、かえて、R₂の郭清により第3群リンパ節を残し、その抗腫瘍能に期待することが、胃癌の予後を良くする可能性があると考えられた。

5. 結 語

1) 胃癌所属の転移陰性リンパ節や遠位リンパ節には、潜在的な抗腫瘍性免疫能が存在するが、転移陽性リンパ節では低下していた。

2) 術前免疫賦活剤腫瘍内投与により、遠隔リンパ節にまで、この抗腫瘍能は増強され、生存率が向上した。

文 献

- 1) 折田薫三：リンパ節と生体防御機構；悪性腫瘍手術におけるリンパ節郭清の位置づけ。消外 6：145—153, 1983
- 2) 合地 明, 三輪恕昭, 松三 彰ほか：胃癌巣内免疫賦活剤注入時の局所組織所見ならびに全身的非特異的免疫反応。消と免疫 12：77—81, 1984
- 3) Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29: 577—580, 1981
- 4) 阿部雅明, 服部 進, 石田康生ほか：モノクローナル抗体を用いた重染色法—免疫組織化学への応用—。病理と臨 2：1512—1514, 1984
- 5) Landay A, Gartland L, Clement LT: Characterization of phenotypically distinct subpopulation of Leu-2⁺ cells with suppresses T

cell proliferative responses. J Immunol 131: 2757—2761, 1983

- 6) Clement LT, Dagg MK, Landay A: Characterization of human lymphocyte subpopulations: Alloreactive cytotoxic T lymphocyte precursor and effector cells are phenotypically distinct from Leu-2⁺ suppressor cells. J Clin Immunol 4: 395—402, 1984
- 7) 岡林孝弘, 堀見忠司, 平松 聡ほか：胃癌所属リンパ節の免疫組織学的検討—モノクローナル抗体による解析—。臨免疫 17：660—668, 1985
- 8) 胃癌研究会編：胃癌取扱い規約。(改訂第11版), 東京, 金原出版, 1985, p4—29
- 9) Si L, Whiteside TL: Tissue distribution of human NK cells studied with anti-Leu-7 monoclonal antibody. J Immunol 130: 2149—2155, 1983
- 10) Fisher B, Saffer E, Fisher ER: Studies concerning the regional lymph node in cancer. IV. Tumor inhibition by regional lymph node cells. Cancer 33: 631—636, 1974
- 11) Vose BM, Vankey F, Argov S et al: Natural cytotoxicity in man: Activity of lymph node and tumor-infiltrating lymphocytes. Eur J Immunol 7: 753—757, 1977
- 12) Abo T, Miller CA, Gartland GL et al: Differentiation stages of human natural killer cells in lymphoid tissues from fetal to adult life. J Exp Med 157: 273—284, 1983
- 13) Grimm EA, Mazumder A, Zhang MZ et al: Lymphokine activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumors by interleukin 2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J Exp Med 155: 1823—1841, 1982