

## 胃癌所属リンパ節の細胞性免疫能

九州大学生体防御医学研究所外科

木場 文男 秋吉 毅 有永 信哉  
和田 哲哉 辻 秀男

### CELL-MEDIATED IMMUNITY IN REGIONAL LYMPH NODES FROM PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

Fumio Koba, Tsuyoshi Akiyoshi, Shinya Arinaga,  
Tetsuya Wada and Hideo Tsuji

Department of Surgery, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

索引用語: 胃癌, 所属リンパ節, 細胞性免疫能

#### はじめに

癌所属リンパ節が抗腫瘍免疫において、どのような役割を担っているかについては、移植腫瘍を用いた動物実験により多くの検索がなされてきた。その結果、腫瘍免疫の成立に重要な役割をはたしていることが認められてきている。しかし、癌患者の抗腫瘍免疫における所属リンパ節の免疫学的意義については方法論的な問題もあることから十分な検討がなされてきたとはいえない。

最近、腫瘍に対する免疫監視機構において働くと考えられるエフェクターについて多くの検索がなされてきた。そして、抗腫瘍性に働く killer 活性を持った細胞が認められている。そこで、私どもは癌手術におけるリンパ節郭清の意義について検索を試みるという立場から、胃癌所属リンパ節について、抗腫瘍性に働くと考えられる killer 細胞活性を測定し、同一患者末梢血および良性疾患と比較したので報告する。

#### 対象および方法

##### I. 対象

1982年4月より1984年6月までに当科にて手術を施行した良性疾患(胃・十二指腸潰瘍および胆石症)患者49例と、胃癌患者84例を対象とした。

##### II. 実験方法

※第26回日消外総会シンポII: 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: 木場 文男  
〒874 別府市大字鶴見字鶴見原4546 九州大学生体  
研外科

#### 1. リンパ球の分離

末梢血リンパ球(peripheral blood lymphocytes 以下PBL)は、ヘパリン加採血した末梢静脈血よりFicoll-Conray法により分離した。また、胃癌患者の所属リンパ節リンパ球(regional lymph node cells 以下RLNC)は、リンパ節転移の有無を問わず、手術標本より肉眼的に転移の認められないと思われるリンパ節を採取、2分割し、一方よりリンパ球を分離し、他方は病理組織学的検査に用い、転移の認められないものを対象とした。良性疾患については手術時、胃大網動脈に沿うリンパ節(大弯リンパ節)を採取し、リンパ球を分離した。

#### 2. リンパ球混合培養(MLC)における killer 細胞産生能

Raji細胞(Burkit lymphoma由来のB-lymphoblastoid cell line)をMitomycin処理したものをstimulator cellとし、リンパ球と6日間混合培養後、細胞を採取し、そのcytotoxicityをRaji細胞を標的細胞として、<sup>51</sup>Cr release assayにて測定した。

#### 3. NK活性の測定

ヒト赤白血病由来の株化細胞であるK562を標的細胞として<sup>51</sup>Cr release assayを用いて測定した。

#### 4. 各種のactivated killer 活性の測定

anomalous killer cell(以下AK)活性は、10名以上の健常人より採取したリンパ球を混合しMitomycin処理したものをstimulator cellとし、6日間混合培養することにより誘導した。一方、PHA activated killer cell(以下PAK)活性はPHAを1μg/

ml 添加し、また、Lymphokine activated killer cell (以下 LAK) 活性は、Lectin free の IL-2 を 10 単位/ml 添加し、いずれも 3 日間培養することにより誘導した。そして細胞を採取し、Raji 細胞を標的細胞として、その cytotoxicity を測定した。

5. リンパ球 subset の測定

モノクロナル抗体として OKT3, OKT4, OKT8 (Ortho) および Leu-7 (Beckton Dickinson) を用いて、間接蛍光抗体法によりリンパ球 subset を測定した。

成績

1. MLC における killer 細胞産生能

(1) PBL と RINC の比較

良性疾患においては RLNC は PBL と同程度の活性を示したが、胃癌においては RLNC の活性は同一患者 PBL および良性疾患 RLNC に比べ明らかに低下しているのが認められた (図 1)。

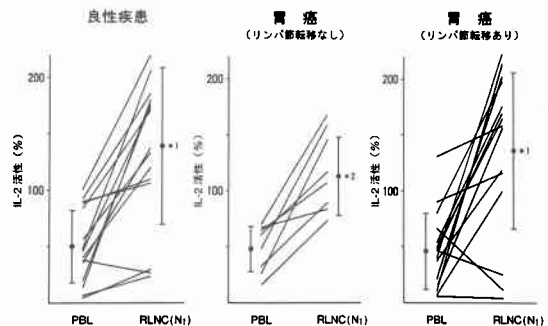
(2) PBL の killer 細胞産生能に及ぼす RLNC 添加の影響

RLNC を同一患者 PBL に添加し、Raji 細胞と混合培養することにより誘導される killer 活性を、PBL のみ Raji 細胞と混合培養した際に誘導される killer 活性を比較した。その結果、PBL の killer 細胞産生能は RLNC 添加によっても抑制されなかった。すなわち、胃癌所属リンパ節に、PBL の killer 細胞産生能に対する suppressor 活性は検出されなかった。

2. IL-2 産生能

良性疾患においては RLNC は PBL に比べ有意に高い IL-2 産生能を示したが、胃癌においてもリンパ節転移の有無を問わず RLNC は PBL に比べ、明らかに高い IL-2 産生能を示した (図 2)。

図 2 IL-2 産生能



\*1 p<0.001 (paired t test), \*2 p<0.01 (paired t test)

3. リンパ球の T cell subset

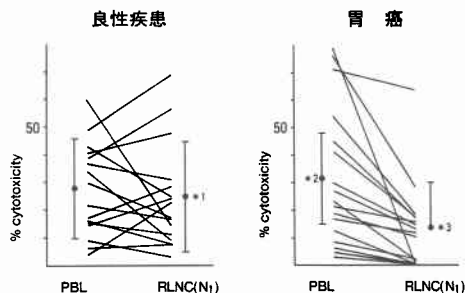
まず、OKT 3 陽性細胞比率については、良性疾患、胃癌のいずれにおいても PBL と RLNC (第 1 群) との間に有意差を認めなかった。そこで OKT4/OKT8 比について検討すると、良性疾患においては PBL と RLNC との間に有意差を認めないものの、胃癌においては RLNC は PBL に比べ有意に高値を示すのが認められた。すなわち、胃癌 RLNC においては OKT4 陽性細胞 (helper/indecder T cell) が相対的に増加し、逆に OKT8 陽性細胞 (suppressor/cytotoxic T cell) が減少しているものと考えられた (表 1)。

4. NK 活性

(1) PBL と RLNC の比較

まず PBL の NK 活性についてみると、良性疾患、胃癌でリンパ節転移を認めない例およびリンパ節転移を有する胃癌患者間に有意差を認めなかった。そこで RLNC と同一患者 PBL とを比較した (図 3)。その結果、良性疾患においては RLNC は PBL に比べ有意に低い活性を示したが、胃癌においてもリンパ節転移の有無を問わず、RLNC の NK 活性は明らかに低いのが

図 1 リンパ球混合培養における killer 細胞産生能



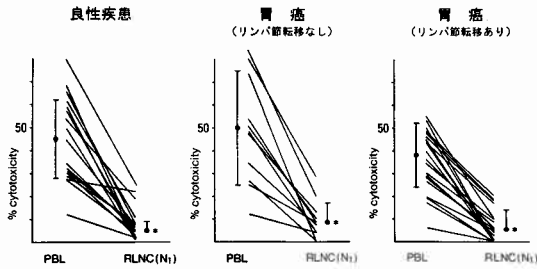
\*2 : \*3 : p<0.01 (paired t test), \*1 : \*3 : p<0.05 (Student's t test)

表 1 リンパ球の T cell subset

	良性疾患(7例)の陽性率(%)		胃癌(7例)の陽性率(%)	
	PBL	RLNC(N1)	PBL	RLNC(N1)
OKT 3	60.3±17.6 <sup>*2</sup>	50.1±16.5	63.5± 7.9	58.9± 7.6
OKT 4	37.1±15.9	31.0±16.7	36.1± 8.6	39.7±12.5
OKT 8	31.5±14.3	24.0± 9.2	30.1±12.8	16.4± 4.8
OKT 4 / OKT 8	1.3± 0.5	1.4± 0.6 <sup>*2</sup>	1.4± 0.7 <sup>*3</sup>	2.6± 1.2 <sup>*4</sup>

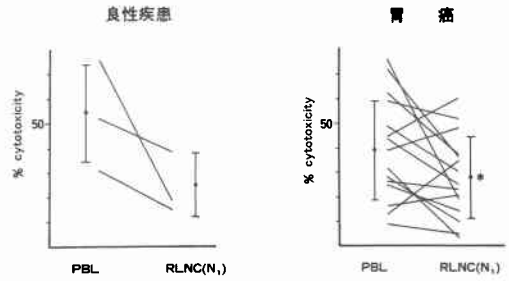
\*1 Mean±S.D., \*3 : \*4 : p<0.05 (paired t test), \*2 : \*4 : p<0.05 (Student's t test)

図3 NK活性



\*p<0.001 (paired t test)

図4 LAK活性



\*p<0.05 (paired t test)

認められた。

(2) Leu-7陽性細胞比率

良性疾患においてはPBLの21.5±3.7%に対して、RLNC(第1群)では5.5±2.7%となりRLNCでLeu-7陽性細胞比率が有意に低いのが認められたが、胃癌においてもRLNCは8.6±6.8%であり、PBLの19.2±5.8%に対して有意に低い比率を示した。

(3) PBLのNK活性に及ぼすRLNC添加の影響

PBL, NK活性はRLNC(第1群)添加によって、良性疾患、胃癌のいずれにおいても有意に抑制されるのが認められた。これは胃周囲リンパ節に末梢血のNK活性に対する suppressor 活性が存在する可能性を示唆する所見と考えられた。なお、この際、suppressor 活性を示す分画は non-adherent cell で、かつ OKT3陽性細胞すなわちT細胞であると考えられた。

5. activated killer 活性

AK活性については胃癌患者についてのみ測定したが、RLNC(第1群)は全例PBLに比べ低い活性を示した。

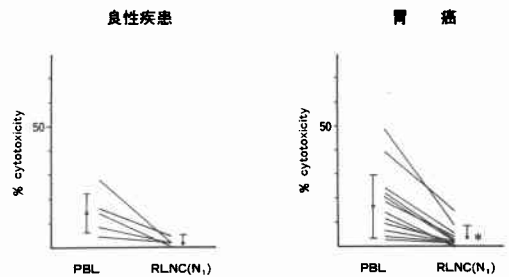
次にLAK活性を検討した(図4)。その結果、良性疾患、胃癌のいずれにおいてもRLNC(第1群)はPBLに比し低い活性を示すのが認められた。

また、PAK活性についてもLAK活性と同様に、RLNC(第1群)の活性は良性疾患、胃癌のいずれにおいても、PBLに比べ低いのが認められた(図5)。

考察および総括

腫瘍に対する免疫監視機構において、腫瘍関連抗原に対する killer T細胞の活性が最も重要な役割をあたしていると考えられてきた。しかし、実際問題としては、癌患者においてこれを測定することは方法的に困難な点が多い。そこで、私どもはリンパ球混合培養(MLC)におけるアロ抗原に対する killer T細胞産生の実験系<sup>3)</sup>を用い、RLNCの killer T細胞産生の基

図5 PAK活性



\*p<0.001 (paired t test)

礎的能力の測定を試みた。その結果、良性疾患においてはRLNCはPBLと同程度の killer T細胞産生能を示したが、胃癌においては明らかに低下しているのが認められた。この胃癌RLNCにおける killer T細胞産生能低下の機序については、PBLの killer細胞産生に対するRLNC添加の影響が認められないので suppressor cellの存在によるものとは考えにくい。また、killer T細胞の誘導・分化に重要な役割をあたしている<sup>2)</sup>と考えられる IL-2産生能が、胃癌RLNCにおいて低下しているのが認められないことからIL-2の関与も否定的である。一方、T cell subsetの検索で、胃癌RLNCにおけるOKT4/OKT8比の上昇が認められ、これが killer T細胞産生能の低下と関連づけられる可能性が示唆された。

癌患者RLNCのNK活性については、乳癌<sup>3)</sup>や大腸癌<sup>4)</sup>について検討されているが、いずれもPBLに比べ低いことが報告されている。また、良性疾患においても低いとの報告がみられる<sup>5)</sup>。胃周囲RLNCに関する私どもの検討でもこれらの報告と一致しており、腫瘍の存在とは無関係に低いNK活性を示した。このようにRLNCのNK活性が低い機序としては、NK細胞に対するモノクローナル抗体と考えられるLeu-7陽性

細胞比率が低く、NK 担当細胞そのものが量的に少ないこと、さらに suppressor 細胞が存在するという質的問題も関与しているのではないかと考えられた。

一方、最近、種々の刺激にもとづいて活性化してくる非特異的な killer 細胞の存在が注目されている。LAK<sup>6)</sup>、PAK<sup>7)</sup>、AK<sup>8)</sup>などと呼ばれる細胞がそれであり腫瘍に対する免疫監視機構における役割が検討されている。Grimm ら<sup>9)</sup>は、どのリンパ組織にも LAK の前駆細胞は存在すると報告しているが、私どもの成績では LAK 産生能は、良性疾患、胃癌のいずれにおいても RLNC は PBL に比して有意に低いのが認められた。また、PAK、AK についても LAK と同様に RLNC においては低い活性しか示さなかった。

以上、所属リンパ節の killer 活性を測定し末梢血と比較した。その結果、RLNC は killer T 細胞を産生する能力を本来 PBL と同程度に有しているものと思われたが、担癌状態においては明らかにその機能が低下していた。また、NK 活性や activated killer 活性などの非特異的な killer 活性も明らかに低いのが認められた。

このような結果が胃癌患者の抗腫瘍免疫における所属リンパ節の *in vivo* での役割を直接反映しているとは言えないが、少なくとも所属リンパ節が積極的に抗腫瘍性に働く結果は得られなかった。すなわち、癌手術において積極的に所属リンパ節を温存する意義は認めなかった。

#### 文 献

- 1) Ware CF, Grager GA: Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity I. The effect of anti-human lymphotoxin antisera on the cytolysis of allogeneic B cell lines by MLC sensitized human lymphocytes *in vitro*. *J Immunol* 126, 1926, 1981.
- 2) Kern DE, Gillis S, Okada M et al: The role of interleukin-2 (IL-2) in the differentiation of cytotoxic T cells: The effect of monoclonal anti-IL-2 antibody and absorption with IL-2 dependent T cell lines. *J Immunol* 127: 1323, 1928
- 3) Cunningham-Rundles S, Fillipa DA, Braun DW et al: Natural cytotoxicity of peripheral blood lymphocytes and regional lymph node cells in breast cancer in women. *JNCI* 67: 585-590, 1981
- 4) Moore M, Vose BM: Extravascular natural cytotoxicity in man: Anti-K562 activity of lymph-node and tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 27: 265-272, 1981
- 5) Antonelli P, Stewart W, Dupont B: Distribution of natural killer cell activity in peripheral blood, cord blood, thymus, lymph nodes and spleen and the effect of *in vitro* treatment with interferon preparation. *Clin Immunol Immunopathol* 19: 161-169, 1981
- 6) Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ et al: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155: 1823-1829, 1982
- 7) Mazumder A, Grimm EA, Rosenberg SA: Characterization of the lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocytes activated *in vitro* with phytohemagglutinin. *J Immunol* 130: 958-963, 1983
- 8) Seeley JK, Golub AH: Studies on cytotoxicity generated in human mixed lymphocyte cultures. I. Time course and target spectrum of several distinct concomitant cytotoxic activities. *J Immunol* 120: 1422, 1978
- 9) Grimm EA, Ramsey KM, Mazumder A et al: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes, and natural killer cells. *J Exp Med* 157: 884-897, 1983