

消化器癌における末梢血および癌所属リンパ節リンパ球の 癌選択的幼若化能について

日本大学第1外科

黒須 康彦 萩野 教幸 天野 定雄
石井 郁雄 水野 敏彦 森田 建

STUDY OF TUMOR-SELECTIVE BLASTOGENIC REACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND REGIONAL LYMPH NODE LYMPHOCYTES IN DIGESTIVE SYSTEM CANCER

Yasuhiko KUROSU, Noriyuki HAGINO, Sadao AMANO,

Ikuo ISHII, Toshihiko MIZUNO and Ken MORITA

First Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

索引用語: 消化器癌, リンパ球腫瘍細胞混合培養反応, リンパ節リンパ球

はじめに

がんの外科的療法においては、原発巣の切除に加え
て所属リンパ節を en bloc に、しかも広汎に郭清する
ことが原則とされており、例えば胃癌では第1群およ
び第2群リンパ節を郭清する根治手術や、これらを越
えて第3群リンパ節を郭清する拡大根治手術も行われ
ている。しかしながら、リンパ節の郭清範囲を拡大し
たからといって、その遠隔成績は当初期待されたほど
には必ずしも向上していないようである¹⁾。

一方、最近のがん免疫学の急速な進歩によってがん
の所属リンパ節が、がん免疫の発現や維持に重要な役
割を果していることが動物実験を中心に明らかにさ
れ、その抗腫瘍性が注目されつつある^{2)~4)}。さらに、臨
床的にも、特に早期の乳癌の手術に際しては原発巣の
切除のみにとどめ、所属リンパ節の郭清を加えないほ
うが予後がむしろ良好であるとする報告もみられるよ
うになった⁵⁾。

したがって、従来より行われているがん根治手術に
際してのリンパ節郭清については、ここで再検討を要
するようになると思われる。そのためには、まずがん所
属リンパ節リンパ球の抗腫瘍免疫能を詳細に検討するこ
とが

重要と思われる。

このような観点から、著者らは、今回、消化器癌患
者を対象に、末梢血リンパ球(以下PBL)とがん所属
リンパ節リンパ球(以下LNL)の両者を同時に平行し
て用いてリンパ球腫瘍細胞混合培養反応(以下
MLTR)を行い、これらのリンパ球のがん選択的幼若
化能⁶⁾について検討したので、若干の文献的考察を加
えて報告する。

I. 材料と方法

1. 研究対象

当科で手術をうけた消化器癌患者34例を対象とした
(表1)。これらの症例を、所属リンパ節および遠隔部
位への転移が陰性の localized 群(L)、所属リンパ節
への転移は陽性であるが遠隔部位への転移が陰性の
intermediate 群(I)、遠隔部位への転移が陽性の
widespread 群(W)、の3群に分けて検討した。

2. PBL の分離

手術直前肘静脈より無菌的に採血した静脈血より、

表1 対象症例

	L	I	W	Total
胃癌	5	11	6	22
大腸癌	6	4	1	11
食道癌	1	0	0	1
Total	12	15	7	34

L: Localized群, I: Intermediate群, W: Widespread群

※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: 黒須 康彦

〒173 板橋区大谷口上町30-1 日本大学医学部第
1外科

Ficoll-Conray 400比重遠心法により分離した。リンパ球は、minimum essential medium (MEM) にて3回洗浄後、生細胞数を trypan blue dye exclusion method を用いて算定した。

3. LNL の分離

肉眼的に転移陰性の所属リンパ節を手術時無菌的に採取し、これより機械的に分離した⁹⁾。すなわち、摘出リンパ節を MEM にて3回洗浄後半切し、一半を病理組織学的標本に供し、他半を剪刀で泥状になるまで細切し、10~15分間静置した後、白金メッシュで濾過して分離した。リンパ球は3回洗浄後、生細胞数を PBL と同様の方法を用いて算定した。

4. 癌細胞の分離

手術時に無菌的に採取した癌組織を MEM で3回洗浄し、汚染物質、結合組織、瘀血塊、壊死部などを除去した後、機械的に分離した⁹⁾。癌細胞(以下 TC)は3回洗浄した後、⁶⁰Co (4,000R)で処理し、DNA 合成を阻止した。生細胞数は PBL と同様の方法を用いて算定した。

5. 実験方法

表2に示すごとく、実験群として、① TC 浮遊液0.5 ml (2×10⁶/ml) と PBL 浮遊液0.5ml (1×10⁶/ml)、② TC 浮遊液0.5ml と LNL 浮遊液 (1×10⁶/ml) 0.5ml の混合培養のほか、対照群として、① TC 浮遊液0.5 ml、② PBL 浮遊液0.5ml、③ LNL 浮遊液0.5ml のそれぞれに培養液 (20%非動化 pooled ヒト AB 血清加 MEM) 0.5ml を加えたものを計5種の丸底試験管 (1.3×9.0cm)、でそれぞれ triplicate で設け、炭酸ガス培養器中 (5%CO₂, 37°C) で7日間培養した¹⁰⁾。

6. ³H-thymidine の取り込みと結果の判定

培養終了12時間前に³H-thymidine をそれぞれの組合せの試験管に加え、培養終了と同時に細胞消化法にて処理した⁹⁾¹⁰⁾。次いで、リンパ球中に取り込まれた³H-thymidine の放射活性 (cpm) を liquid scintillation counter で測定し、表3の如く stimulation index (SI) を求め、この SI にて結果を評価した。この際、

表2 実験方法

Stimulator	Responder
TC	PBL
TC	LNL
TC	—
—	PBL
—	LNL

TC : Irradiated tumor cells,

PBL : Peripheral blood lymphocytes

LNL : Regional lymph node lymphocytes

表3 Stimulation Index (SI)

$$SI = \frac{\text{cpm (PBL or LNL+TC)} - \text{cpm (TC)}}{\text{cpm (PBL or LNL)}}$$

TC : Irradiated tumor cells

PBL : Peripheral blood lymphocytes

LNL : Regional lymph node lymphocytes

TC と PBL (以下 PBL responses), TC と LNL (以下 LNL responses) の両混合培養とも、ST ≥ 2.00 を示した症例を、既報⁹⁾¹⁰⁾の理由から MLTR 陽性として検討した。

II. 研究成績

1. 対象34例での成績

まず、overall では、MLTR 陽性例は PBL responses で11例 (32%), LNL responses で15例 (44%) であった。

次に、PBL および LNL responses を陽性、陰性の2群に分けて検討すると、表4に示すごとく、PBL responses が陽性の11例では LNL responses 陽性は5例 (45%)、逆に LNL responses が陽性の15例では PBL responses 陽性は5例 (33%) であった。同様に、PBL responses が陰性の23例では LNL responses 陽性は10例 (43%)、逆に LNL responses が陰性の19例では PBL responses 陽性は6例 (31%) であった。なお、PBL, LNL responses のいずれかが陽性を示した症例は21例 (61%) であった。

2. がんの原発臓器別での成績

まず、対象全体について検討した。その結果、胃癌では PBL responses が、大腸癌では LNL responses が、陽性例数において優位な傾向を示した (表5)。

次に、後述の tumor load の MLTR に及ぼす影響を除外するために、対象を I 群に限定して検討した。その結果、胃癌 (11例) では、PBL responses 陽性は5例 (45%)、LNL responses 陽性は4例 (36%) であり、大腸癌 (4例) では、PBL responses 陽性は1例 (25%)、LNL responses 陽性は3例 (75%) であった。

表4 PBL と LNL 間における陽性率の比較

	No.	No. +	
		PBL	LNL
PBL 陽性	11	11 (100%)	5 (45%)
LNL 陽性	15	5 (33%)	15 (100%)
PBL 陰性	23	0 (0%)	10 (43%)
LNL 陰性	19	6 (31%)	0 (0%)

PBL : Peripheral blood lymphocytes

LNL : Regional lymph node lymphocytes

表5 癌の原発臓器別にみた陽性率の比較

	No.	No. +	
		PBL	LNL
胃癌	22	7 (31%)	6 (27%)
大腸癌	11	3 (27%)	8 (72%)
食道癌	1	1 (100%)	1 (100%)

PBL : Peripheral blood lymphocytes

LNL : Regional lymph node lymphocytes

表6 Tumor load別にみた陽性率の比較

	No.	No. +	
		PBL	LNL
L群	12	2 (16%)	7 (58%)
I群	15	6 (40%)	7 (46%)
W群	7	3 (42%)	1 (14%)

PBL : Peripheral blood lymphocytes

LNL : Regional lymph node lymphocytes

L : Localized

I : Intermediate

W : Widespread

3. tumor load 別での成績

表6に示すごとく、L群(12例)では、PBL responses 陽性は2例(16%)、LNL responses 陽性は7例(58%)で、後者が優位な傾向を示した。I群(15例)では、PBL responses 陽性は6例(40%)、LNL responses 陽性は7例(46%)であった。W群(7例)では、PBL responses 陽性は3例(42%)、LNL responses 陽性は1例(14%)で、本群ではL群とは逆に、PBL responses が優位な傾向を示した。

III. 考 察

まず、LNLを用いてのMLTRの成績に関しては、Vankyら¹¹⁾は、肉腫を対象に検討し、PBLを用いた場合には、MLTR陽性例は12例中7例に認められたが、LNLを用いた場合には、陽性例は認められなかったと報告している。これに対して、Deodharら¹²⁾は、乳癌を対象にLNLを用いて検討し、MLTR陽性例は17例中13例に観察されたとし、Ambusら¹³⁾は、各種がん患者32例を対象に、PBLおよびLNLを用いて検討し、MLTR陽性例は前者で13例(41%)、後者で15例(47%)に認められたと報告している。

今回、著者らが、消化器癌患者34例を対象に検討した成績では、PBLでは11例(32%)、LNLでは15例(44%)がMLTR陽性を示した。したがって、LNLもPBLと同様に抗腫瘍免疫能を有するものと思われる。

ここで、今回の成績で興味深いのは、PBL responses

が強い場合にはLNL responsesが弱く、逆にPBL responsesが弱い場合にはLNL responsesが強い傾向が認められたことであり、Ambusら¹³⁾もほぼ同様の報告をしている。このことはPBLとLNLとは抗腫瘍免疫能において互に相補的である可能性を示唆するものと思われる。

次に、癌の原発臓器別にみたPBLとLNLの反応性の差異に関しては、Ambusら¹³⁾は消化器癌や悪性黒色腫ではPBL responsesが、一方、乳癌や扁平上皮癌では逆にLNL responsesがより強かったとしている。著者らの成績では、特に大腸癌においてLNL responsesがPBL responsesに比べてより強い傾向が認められ、これは後述のtumor loadのMLTRに及ぼす影響を除外するためにI群に限定して検討しても同様であった。したがって、がんの原発臓器の相違によっては、PBLとLNLのどちらか一方が他方に比べてより強力に抗腫瘍免疫能を発揮する可能性が考えられ、さらに検討を重ねたい。

次にtumor loadの相違によるPBLとLNLの免疫応答の変動に関しては、折田⁶⁾はDDマウスの背部皮下に移植したEhrlich腫瘍を用いて、局所腋窩リンパ節リンパ球、遠位腸間膜リンパ節リンパ球、脾リンパ球の殺細胞能を検討し、①腋窩リンパ節では移植8日目にすでに強い抗腫瘍活性があり、22日目にはそれが有意に低下する。②腸間膜リンパ節では移植8日目には抗腫瘍性がわずかに認められるにすぎないが、腫瘍が増大した22日目には強い抗腫瘍活性がみられると報告している。Goldfarbら¹⁴⁾は、C₃H/Hejマウスの乳癌系で、LNLおよび脾リンパ球を用いてMLTRを検討し、LNLは脾リンパ球に比べ腫瘍移植後より早期に最高反応値を示すとしている。ヒトがんでも折田⁶⁾は同様の傾向がみられるとし、著者らが、MLTR陽性率をPBLとLNL responses間で比較検討した結果では、L群ではLNL responsesが優位な傾向を示し、I群では両者ほぼ同様であり、W群ではL群とは逆にPBL responsesが優位な傾向を示した。これらの成績は、リンパ球の抗腫瘍免疫能は、まず所属リンパ節リンパ球に出現し、次いでtumor loadの増大とともに末梢血リンパ球、すなわち全身へと広がっていくが、腫瘍の進展につれて所属リンパ節リンパ球の抗腫瘍活性は低下することを示唆するものと思われる。

最後に、所属リンパ節郭清の抗腫瘍免疫能に及ぼす影響については、Pendergrastら¹⁵⁾は、マウスの実験腫瘍系を用いて検討し、一次腫瘍移植後3日目の局所リンパ節郭清は二次腫瘍の生着率を増加させる、すなわち腫瘍に対する全身の免疫能を低下させるが、7日目

(これは一次腫瘍が触知可能となる1日前に相当する)のそれでは影響はみられなかったとしている。Papaioannou⁵⁾は、諸家の動物実験の成績を総合して、抗腫瘍免疫能が一度 systemic になった時点では、所属リンパ節の抗腫瘍免疫能における役割は減少すると述べている。Irvinら¹⁶⁾¹⁷⁾は、抗腫瘍免疫能の adoptive transfer の実験で、感作後3~5, 7日目のリンパ節リンパ球は tumor graft の拒絶を促進させるが、12, 14日目のそれは逆に tumor graft の生着を促進させるとしている。ここで、これらの成績を著者らの成績と考え併せると、ヒト消化器癌においても抗腫瘍免疫能が、PBLに出現する。すなわち systemic になった時点以降では、所属リンパ節の切除によって個体の抗腫瘍免疫能が影響をうけることは少なく、むしろ所属リンパ節の抗腫瘍免疫能と癌転移の危険性を考慮して、現在広く用いられている所属リンパ節郭清が妥当と考えられる。しかし、systemic immunity が出現する以前の所属リンパ節郭清には慎重な検討を要する点と思われる。

結 語

消化器癌34例を対象に、PBLとLNLの両者を同時に平行して用いてMLTRを行い、以下の結果を得た。

- 1) LNLはPBLと同様に抗腫瘍免疫能を有する。
- 2) PBLの反応が強い場合にはLNLの反応が弱く、逆にPBLの反応が弱い場合にはLNLの反応が強い傾向が認められた。
- 3) 大腸癌ではLNLの反応がPBLのそれに比べ強い傾向が認められた。
- 4) L群ではLNL responsesがMLTR陽性率において優位な傾向を示したが、I群ではLNL, PBL responsesともほぼ同率であり、W群では逆にPBL responsesが優位な傾向を示した。

文 献

- 1) 神前五郎：根治性からみた治療手術術式。外科診療 20 : 786-791, 1978
- 2) Fisher B, Fisher ER: Studies concerning the regional lymph node in cancer I. Initiation of immunity. Cancer 27 : 1001-1004, 1971
- 3) Fisher B, Fisher ER: Studies concerning the regional lymph node in cancer II. Maintenance of immunity. Cancer 29 : 1496-1501, 1972
- 4) Futrell JW, Pories WJ: Physiologic and immunologic considerations of the lymphatic system in tumors and transplants. Surg Gynecol Obstet 140 : 273-290, 1975
- 5) Papaioannou A: The contribution of regional lymph nodes in resistance against breast cancer: Practical implications. J Surg Oncol 25 : 232-239, 1984
- 6) 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
- 7) Crile G Jr: Rationale of simple mastectomy without radiation for clinical stage I cancer of the breast. Surg Gynecol Obstet 120 : 957-982, 1965
- 8) Grimm EA, Vose BM, Chu EW et al: The human mixed lymphocyte-tumor cell interaction test. Cancer Immunol Immunother 17 : 83-89, 1984
- 9) Kurosu Y, Honjo H, Hironaka T et al: Lymphocyte response to autochthonous human solid tumor cells: Relationship to histological types and tumor load. Gann 70 : 821-824, 1979
- 10) Kurosu Y, Saegusa Y, Tominaga M et al: Study of tumor-associated blastogenic reactivity of peripheral blood lymphocytes and regional lymph node lymphocytes in human malignancy. Jpn J Clin Oncol 13 : 25-30, 1983
- 11) Vanky F, Stjernsward J, Nilsson U et al: Differences in the tumor-associated reactivity of blood lymphocytes and tumor-draining lymph node cells in sarcoma patients. J Natl Cancer Inst 51 : 17-24, 1973
- 12) Deodhar SD, Crile G Jr, Besselstyn CB Jr: Study of the tumor cell-lymphocyte interaction in patients with breast cancer. Cancer 29 : 1321-1325, 1972
- 13) Ambus U, Mavligit GM, Gutterman JU et al: Specific and non-specific immunologic reactivity of regional lymph-node lymphocytes in human malignancy. Int J Cancer 14 : 291-300, 1974
- 14) Goldfarb PM, Hardy MA: The immunologic responsiveness of regional lymphocytes in experimental cancer. Cancer 35 : 778-783, 1975
- 15) Pendergrast WJ, Soloway MS, Myers GH et al: Regional lymphadenectomy and tumor immunity. Surg Gynecol Obstet 142 : 385-390, 1976
- 16) Irvin GL, Eustage JC: A study of tumor allograft sensitized lymph nodes in mice-1, biologic activity of transferred cells. J Immunol 106 : 956-961, 1971
- 17) Irvin GL, Eustage JC, McAleer JA et al: A study of tumor allograft sensitized lymph nodes in mice-11, in vitro immunoglobulin synthesis. J Immunol 108 : 207-213, 1972