

# Two color flow cytometry を用いた消化器癌患者のリンパ球 subsets の検討

木澤病院外科

田辺 博 渡辺 進 今井 直基

担癌患者の免疫能を知るうえで two color flow cytometry を用いたリンパ球サブセットの検討を行った。103名の消化器癌患者を対象とし、その末梢血にて OKT3, OKT4, OKT8, Leu15 をモノクローナル抗体としてリンパ球サブセットを求め、癌患者の stage, performance status, 栄養状態と比較し以下の結果をえた。OKT3は stage の悪化にて低下する傾向を示し、OKT4も同様に低下した。OKT8は stage IV で低下を示した、OKT4/OKT8は stage IV で低下した。OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>+</sup>(suppressor T cell) は stage, PS の低下で有意に低値を示し、OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>-</sup>(cytotoxic T cell) は stage の進行にて不変であり、PS の低下では増加する傾向にあった。

以上より担癌患者の末梢血レベルでは癌の進行により suppressor T cell が減少し、cytotoxic T cell はむしろ増加傾向を示し、癌に対する生体の攻撃反応を示唆するものと考えられた。

**Key words:** lymphocyte subsets, two color flow cytometry, gastrointestinal cancer, performance status of cancer patients

## はじめに

近年、細胞融合法の進歩により数多くのモノクローナル抗体の作製が可能となっている。特にリンパ球細胞膜抗原に対するモノクローナル抗体が作られ、さらに flow cytometry を用いた全血法により、末梢血リンパ球サブセットの解析が容易となったことから、この動態を分析することにより担癌患者の免疫能を評価しようとする研究がなされている<sup>1)~3)</sup>。

従来の報告ではリンパ球のもつ多数の膜抗原に対し単一のモノクローナル抗体で評価する、いわゆる single color flow cytometry が主体であったために性格の異なるリンパ球が同一の群としてとらえられるという不合理があり、これが解析を困難にする原因となってきた。

今回われわれは消化器癌患者の免疫能を知るうえで、従来の single color flow cytometry に加え two color flow cytometry を用いリンパ球サブセットを分析し、その際の癌患者の performance status (以下 PS) および栄養状態と比較検討したので報告する。

## 1. 対象

Table 1 Subject

	n	Age	Sex (M/F)
Gastric cancer	62	64.6±13.3	45/17
Colo-rectal cancer	31	71.1± 9.0	17/14
Cancer of the pancreas	10	70.9± 8.0	9/ 1
Total	103	67.2±12.1	72/32

1986年4月から1988年12月までに当院外科にて経験した消化器癌患者103名を対象とした。内訳は胃癌62名、大腸癌31名、膵臓癌10名で平均年齢67.2±12.1歳、男女比71:32であった (Table 1)。

## 2. 検査項目

103名の消化器癌患者について手術所見によりそれぞれ胃癌取扱い規約<sup>4)</sup>、大腸癌取扱い規約<sup>5)</sup>、膵臓癌取扱い規約<sup>6)</sup>に従い stage を決定し stage I から stage IV までに分類した (大腸癌の stage V は stage IV にふくめる)。

癌患者の手術前の末梢血にてリンパ球数をもとめ、さらに末梢血リンパ球よりモノクローナル抗体 OKT3, OKT4, OKT8, Leu15 を用いてリンパ球サブセットのポピュレーションを測定した。

生化学検査より TP, ALB をもとめ TP=6.5,

<1989年10月11日受理> 別刷請求先: 田辺 博  
〒505 美濃加茂市古井町下古井590 木澤病院外科

**Table 2** Performance status

1. Normal activity or symptoms, but nearly ambulatory.
2. Some bed time, but needs to be in bed less than 50 per cent of normal daytime.
3. Needs to be in bed greater than 50 per cent of normal daytime.
4. Unable to get out of bed.

ALB=3.5以上を栄養良, それ未満を栄養不良とし, その際の PS を **Table 2** の内容により評価した.

3. 測定方法

モノクローナル抗体は Ortho 社製 Orthomune (OKT3, OKT4, OKT8), Becton Dickinson 社製 Leu-series (Leu15) を使用した. 全血100 $\mu$ l に至適濃度のモノクローナル抗体溶液を10 $\mu$ l 添加, 4 $^{\circ}$ C30分間インキュベートの後, 溶血操作を加え遠心後 phosphate buffer saline (以下 PBS) に再浮遊させて flow cytometry (Spectrum III, Ortho 社) を用い細胞解析を行い全リンパ球に対する陽性細胞%をもとめた. さらに同時採血の一般血液像にて白血球 (WBC) (/mm<sup>3</sup>), リンパ球数 (Lymph) (/mm<sup>3</sup>) をもとめ, 各リンパ球サブセットの絶対数を算出した.

なお各モノクローナル抗体について, OKT3は pan T cell, OKT4は helper/inducer T cell, OKT8は suppressor/cytotoxic T cell, さらに two color flow cytometry として OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>+</sup>は suppressor T cell, OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>-</sup>は cytotoxic T cell をそれぞれ標識細胞とする.

4. 評価方法

末梢血リンパ球, リンパ球サブセットを免疫学的指標とし, これらの検査結果を癌患者の PS, 栄養状態と比較検討した. また検査は Students' t-test により  $p < 0.05$  で有意差ありと判定した.

結 果

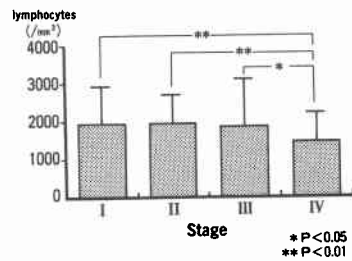
1. 癌患者の stage

103名の癌患者の stage 別の内訳は stage I 36名, stage II 16名, stage III 28名, stage IV 27名であった.

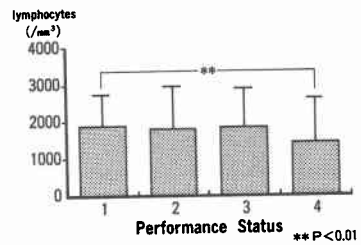
2. stage, PS とリンパ球数

リンパ球数は stage の進行に伴い減少する傾向にあり, stage IV は他の stage に対して有意に低値であった (**Fig. 1**). PS との関係でも, その低下により減少する傾向にあり PS1と PS4に有意差を認めた (**Fig. 2**).

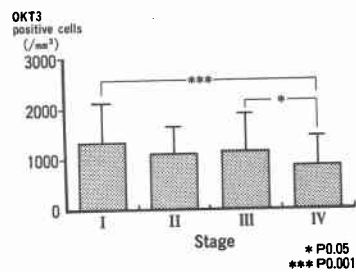
**Fig. 1** Stage and lymphocytes



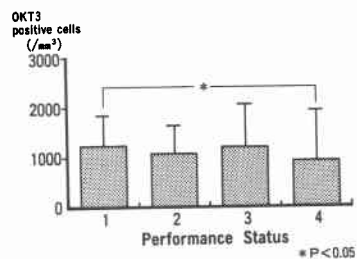
**Fig. 2** PS and lymphocytes



**Fig. 3** Stage and OKT3 positive cells



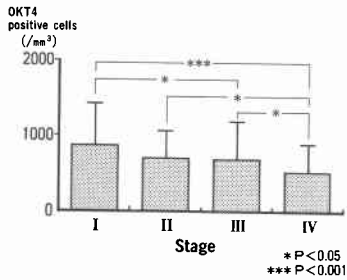
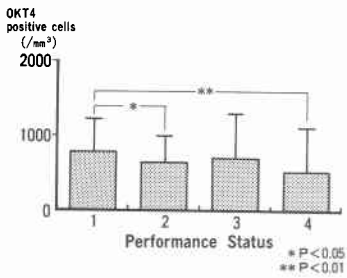
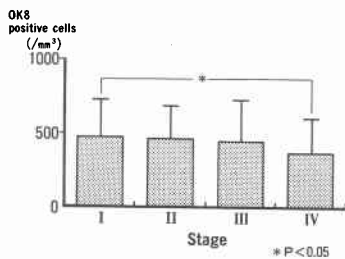
**Fig. 4** PS and OKT3 positive cells



3. stage, PS とリンパ球サブセット

OKT3は stage の進行に伴い低下する傾向を認め, stage IV は stage I, II に対し有意に低値であった (**Fig. 3**). PS との関係では PS4と PS1の間にて有意差を認めた (**Fig. 4**).

OKT4は stage の進行に伴い低下する傾向にあり

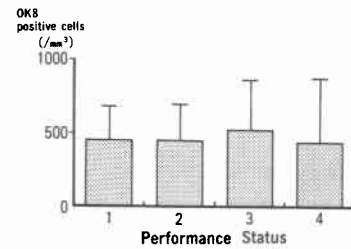
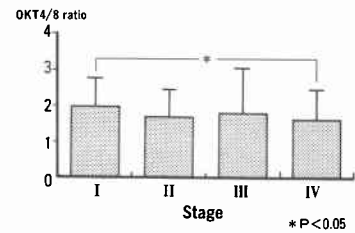
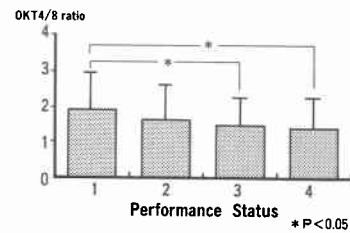
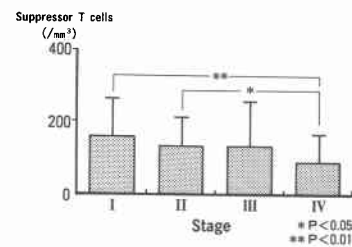
**Fig. 5** Stage and OKT4 positive cells**Fig. 6** PS and OKT4 positive cells**Fig. 7** Stage and OKT8 positive cells

stage IV は他のすべての stage に対し、また stage III は stage I に対しそれぞれ有意に低値であった (Fig. 5). PS との関係でも、その低下により低くなる傾向にあった (Fig. 6).

OKT8 と stage ではその進行に伴い低下する傾向を示し、stage IV は stage I に対し有意に低値であった (Fig. 7). PS との関係では有意差を認めなかった (Fig. 8).

OKT4/OKT8 と stage の関係では進行により低下する傾向にあり stage IV は stage I に対し有意に低値であった (Fig. 9). PS との関係でもその低下により下降する傾向を認めた (Fig. 10).

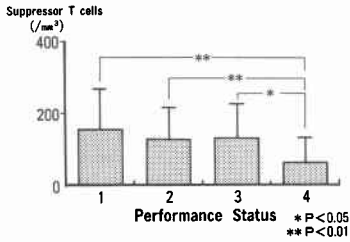
OKT8<sup>+</sup> × Leu15<sup>+</sup> (suppressor T cell) と stage の関係では、進行により低下を示し stage IV は stage I,

**Fig. 8** PS and OKT8 positive cells**Fig. 9** Stage and OKT4/8 ratio**Fig. 10** PS and OKT4/8 ratio**Fig. 11** Stage and OKT8<sup>+</sup> × Leu15<sup>+</sup> (Suppressor T cell)

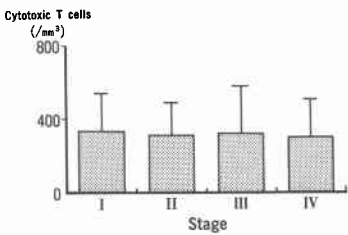
II に対し有意に低値であった (Fig. 11). PS との関係でもその低下で有意に減少を示し PS4 では他群に比べて有意に低値であった (Fig. 12).

OKT8<sup>+</sup> × Leu15<sup>-</sup> (cytotoxic T cell) と stage の関係では進行により有意な変化を示さなかった (Fig. 13). PS との関係では低下により上昇する傾向を示し、PS3 では PS1 に対し有意に高値を示した (Fig. 14).

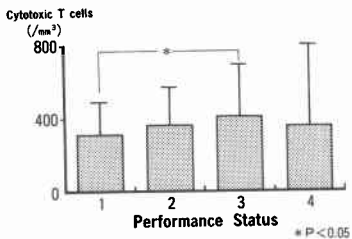
**Fig. 12** PS and OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>+</sup> (Suppressor T cell)



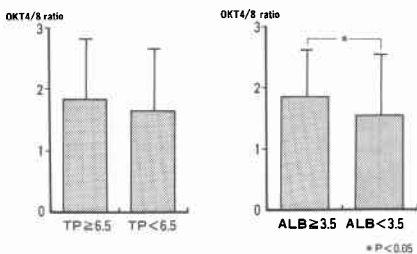
**Fig. 13** Stage and OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>-</sup> (Cytotoxic T cell)



**Fig. 14** PS and OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>-</sup> (Cytotoxic T cell)



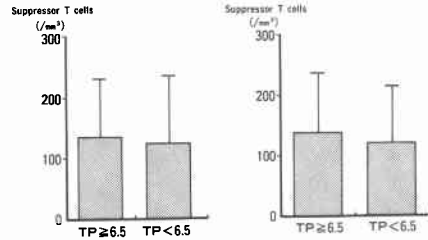
**Fig. 15** Total protein, Albumin and OKT4/8 ratio



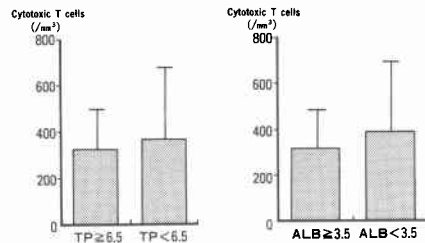
4. TP, ALB と OKT4/OKT8, OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>+</sup>, OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>-</sup>

OKT4/OKT8は、栄養不良群で栄養良好群より低値を示し、特に ALB では両群間に有意差を示した(Fig. 15).

**Fig. 16** Total protein, Albumin and Suppressor T cells



**Fig. 17** Total protein, Albumin and Cytotoxic T cells



OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>+</sup>は栄養不良群で低値を示す傾向にあり(Fig. 16), 逆に OKT8<sup>+</sup>×Leu15<sup>-</sup>は栄養不良群で高値を示す傾向にあった(Fig. 17).

考 察

担癌生体の免疫調節機構に異常を来すことはよく知られており、なかでも細胞性免疫の主体をなすTリンパ球は最も関心の高いところで、癌患者とTリンパ球についての研究報告が多くなされている<sup>7)8)</sup>.

Tリンパ球は癌細胞に対して直接破壊作用を示すことが証明されているが、一方Tリンパ球を機能的に細分類し、個々の分画の機能や相互作用さらには他の免疫系との関わり合いなど、Tリンパ球を全体としてでなく各分画ごとに細分化して免疫系の中で位置づけようとする研究がなされている<sup>9)10)</sup>.

しかも近年の細胞融合法の進行により、モノクローナル抗体の作製が可能となり、さらに flow cytometry を用いることによりリンパ球分画が容易に測定しうるため、臨床面でも広く応用されるに至っている。特に白血病<sup>11)</sup>、悪性リンパ腫<sup>12)</sup>、ウイルス疾患<sup>13)</sup>など造血器疾患、免疫疾患、感染症の分野ではこうした研究がさかんで臨床的にも分画の意義が明らかにされている。これに対し固形癌の領域では癌自体の抗原性が低いこともあってTリンパ球分画の意味が十分解明されていないのが現状である。

従来のリンパ球分画の研究ではリンパ球膜抗原に対しその1種類について認識する single color による解析が主流であったが、この方法では共通する膜抗原を有する場合、異なる性格でありながら同一のリンパ球と認識されるため、その評価に混乱を来してきたものと考えられる。

今回の検討ではモノクローナル抗体として Ortho 社製の OKT3, OKT4, OKT8 と Becton Dickinson 社製の Leu15 を用いたが、従来より OKT3 は T リンパ球全体, OKT4 は helper/inducer T cell, OKT8 は suppressor T cell/cytotoxic T cell を意味すると考えられているが、OKT8 の場合 suppressor T cell と cytotoxic T cell という相反する性格のリンパ球を表わすためこの解釈が問題となってきた。そこで OKT8 陽性細胞にもう1つ別の膜抗原に対するモノクローナル抗体である Leu15 を用いることにより OKT8<sup>+</sup> × Leu15<sup>+</sup> は suppressor T cell, OKT8<sup>+</sup> × Leu15<sup>-</sup> は cytotoxic T cell を標識することが明らかとされ<sup>14)15)</sup>、さらに細分化した検討が可能となった。

従来の報告に基づき癌患者のリンパ球サブセットについて検討すると OKT3 は癌の進行によっても有意な変動は認めなかったとする報告が多い<sup>16)17)</sup>。これはリンパ球数全体が低下するために細胞比率としては変化が少ないとする考えであるが、これに対し中島ら<sup>18)</sup>は消化器癌末期で有意に OKT3 の低下をみたことから進行した状態での指標になりうるとしている。

OKT4 については癌の進行により低下するとの意見が多く、佐藤ら<sup>1)</sup>は良性疾患に比べ胃癌患者では OKT4 細胞比率が特異的に低く、これは最も特徴的な所見であると述べている。また小林ら<sup>19)</sup>は胃癌 stage IV で非切除例では術前すでに OKT4 が低値であったと報告している。今回の検討でも stage の進行により OKT4 陽性細胞は有意に低下しており諸家の報告と同様の結果を得た。PS との関係でも進行により低下することを示し、癌の進行による生活力の低下は OKT4 に反映するものと思われた。

OKT8 についてはさまざまな報告があり、癌の進行に伴い増大するという意見と<sup>17)</sup>、変動はなかったとする意見がある<sup>20)</sup>。従来より OKT8 は suppressor T cell の指標としての考えが強く、癌の進行に基づき suppressor 細胞活性誘導能が上昇するために OKT8 細胞比率が増加するとの報告が認められた<sup>21)</sup>。しかし OKT8 には suppressor の他に cytotoxic という相反する機能の細胞がふくまれることから、OKT8 の変化

のみでは免疫指標といいがたく、横田ら<sup>22)</sup>も胃癌の患者で stage の進行により OKT8 陽性細胞が増加したとしながらも、両者の鑑別が必要であると述べている。

今回われわれの検討では OKT8 は stage の進行で著変を示さず、stage IV でやや低値を得た。ところがこれを two color flow cytometry で検討すると、stage の進行により低下するのは suppressor T cell が著明であり、これは stage IV で特に顕著であった。これに対して cytotoxic T cell は stage 別ではほとんど変化を示さず、PS ではむしろその低下により増加する傾向も示している。すなわち癌の進行に伴い suppressor T cell は有意に減少し、cytotoxic T cell は細胞数としては変化が少なく、リンパ球数全体が低下することから相対的に細胞比率が上昇し、このことが OKT8 細胞比率を上昇させているものと推測された。

OKT4/OKT8 についても従来は免疫調節機構の均衡を表わすマーカーとして評価されており、免疫能の低下した進行癌の状態では比率低下するとの報告も多い<sup>23)</sup>。われわれの検討では OKT4/OKT8 は stage の進行で若干の低下を示したが、このことは癌の進行で helper/inducer である OKT4 は減少し、OKT8 のうち suppressor T cell は減少するものの、cytotoxic T cell に減少がみられないため相対的に OKT4/OKT8 が低下したのと考えられる。

したがって癌の進行した状態において、末梢血のリンパ球では癌と戦うべく cytotoxic T cell は増加しており、免疫に抑制的に働く suppressor T cell は低下していることが示されたことになる。癌という巨大な標的ではあるが、生体はこれに対し攻撃を加えようと何らかの反応を示しているものと考えられた。

こうした傾向は栄養状態との比較からも裏付けがなされている。すなわち癌が進行し栄養不良となった状態でも、患者の末梢血では cytotoxic T cell の細胞数は増加し、逆に suppressor T cell の細胞数は低下する傾向を示し、このことは低栄養状態にありながらも生体の癌に対する障害能の表われを示唆するものである。

従来より癌患者の栄養状態には深い関心もたれ、特にその治療方針を決定するうえで小野寺は<sup>24)</sup>ある一定以上の栄養指数がない場合、化学療法、手術療法などの治療は無意味であることを指摘し、低栄養状態では癌と戦う抵抗力がないと述べている。臨床的な検討からすれば、こうした指摘は評価すべきものである。しかしながら今回の検討で示されたように、癌が進行

し栄養不良となった状態でも、癌と戦うだけの生体の反応は保たれている訳であり、こうした結果をふまえて、この生体反応を生かすべく治療の確立が重要な課題であると考えられた。

#### 文 献

- 1) 佐藤元道, 酒井 堅, 青野幸治ほか: 胃癌患者のリンパ球 Subsets の検討. 日消外会誌 18: 1645-1649, 1985
- 2) 竹下正昭, 大和田進, 中村正治ほか: 胃癌患者の免疫能一特にリンパ球サブセットとインターロイキン2からの検討一. 日外会誌 88: 947-954, 1987
- 3) 寺島雅典, 貝塚広夫, 佐藤雅夫ほか: 胃癌切除症例の各種免疫学的指標の推移および免疫療法による変動. 日消外会誌 20: 2305-2312, 1987
- 4) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約改訂第11版. 金原出版, 東京, 1985
- 5) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約改訂第4版. 金原出版, 東京, 1986
- 6) 日本膵臓学会編: 膵癌取扱い規約改訂第3版. 金原出版, 東京, 1986
- 7) Wybran J, Hellstrom I, Hellstrom KE et al: Cytotoxicity of human rosette-forming blood lymphocytes on cultivated human tumor cells. Int J Cancer 13: 515-521, 1974
- 8) Wybran J, Fudenberg H: Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: Cancer, Lymphomas, Bacterial and Viral infections and other disease. J Clin Invest 52: 1026-1032, 1973
- 9) 江里口直文, 内藤寿則, 友清 明ほか: 胃癌症例におけるリンパ球 Subpopulation の分析. 日消外会誌 18: 36-42, 1985
- 10) 小林一雄, 加藤 肇, 本田亮一ほか: 胃癌手術前後における非特異的免疫学的指標の推移. 日消外会誌 22: 43-52, 1989
- 11) Robert WS, Kenneth AF, Ronald J et al: Immunologic classification of lymphocytic leukemia based on monoclonal antibodydefined cell surface antigens. Blood 59: 207-215, 1982
- 12) Lauria F, Foa R, Grobbi M et al: Increased proportion of suppressor/cytotoxic (OKT8<sup>+</sup>) cell in Hodgkin's disease in longlasting remission. Cancer 52: 1385-1388, 1983
- 13) Carney WP, Rubin RH, Hoffman RA et al: Analysis of T lymphocyte subsets in cytomegalovirus mononucleosis. J Immunol 126: 2114-2116, 1981
- 14) Lanciy A, Gartland GL, Clement LT: Characterization of a phenotypically distinct subpopulation of Leu2<sup>+</sup> cells that suppresses T cell proliferative responses. J Immunol 131: 2757-2761, 1983
- 15) Clement LT, Dagg MK, Landay A: Characterization of human lymphocyte subpopulations: Alloreactive cytotoxic T-lymphocyte precursor and effector cells are phenotypically distinct from Leu2<sup>+</sup> suppressor cells. J Clin Immunol 4: 395-402, 1984
- 16) 西山 潔: 各種免疫機能検査からみた胃癌, 大腸癌の Immune status に関する研究. 日外会誌 80: 512-526, 1979
- 17) 平良朝秀: 胃癌患者における各種非特異的免疫学的パラメーターの総合的検討. 日臨外医会誌 45: 689-705, 1984
- 18) 中島芳道, 秋元 実, 岩崎秀康ほか: 乳癌および消化器末期癌の抹消血リンパ球分画の検討. 癌の臨 32: 1925-1928, 1986
- 19) 小林一雄, 加藤 肇, 本田亮一ほか: 胃癌手術前後における非特異的免疫学的指標の推移. 日消外会誌 22: 43-52, 1989
- 20) 林 良夫, 佐藤光信, 古本奈奈代ほか: 頭頸部癌患者末梢リンパ球サブセットの異常一単クローン抗体による解析. 医のあゆみ 128: 507-508, 1984
- 21) 棚田 稔: がん患者における免疫抑制機序に関する臨床的研究. 日外会誌 86: 514-526, 1985
- 22) 横田美登志, 原田 大, 渡部誠一郎ほか: 胃癌患者末梢血および所属リンパ節リンパ球がはたす抗腫瘍的役割. 臨免疫 18: 953-962, 1986
- 23) 横山三男, 大久保慶二: モノクローナル抗体によるリンパ球膜マーカーの検査とその臨床的意義. 日臨 43 (秋増): 356-366, 1985
- 24) 小野寺時夫: 進行消化器癌に対する抗癌療法と栄養指標. JJPEN 8: 167-174, 1986

### Studies on Lymphocyte Subsets of the Patients with Gastrointestinal Cancer by Use of Two Color Flow Cytometry

Hiroshi Tanabe, Susumu Watanabe and Naoki Imai  
Department of Surgery, Kizawa Hospital

We investigated lymphocyte subsets in order to assess immune activity in patients with cancer by two color flow cytometry. The lymphocyte subsets of 103 patients with gastrointestinal cancer were analyzed with monoclonal antibody (OKT3, OKT4, OKT8, Leu15), and the results were compared according to the stages of the

disease, performance status, and nutritional states of the patients. The numbers of OKT3 and OKT4 cells were decreased in patients with advanced stage cancer compared with those with early stage cancer. The numbers of OKT8 and the OKT4/8 ratio of the patients in stage IV were lower than those of the patients in other stages. The numbers of OKT8<sup>+</sup> × Leu15<sup>+</sup> (suppressor T cells) of the patients either with advanced stage cancer or in advanced performance status, were decreased. The number of OKT8<sup>+</sup> × Leu15<sup>-</sup> (cytotoxic T cells) showed no stage-relative changes, and was increased in showed no stage-relative changes, and was increased in the patients in advanced performance status compared with those in early performance status. The above described data suggests that the peripheral lymphocytes of patients with gastrointestinal cancer react to the aggravation of the disease.

Reprint requests: Hiroshi Tanabe Department of Surgery, Kizawa Hospital  
590 Simokobi, Minokamo, 505 JAPAN

---