日消外会誌　27（1）：23～29，1994年

胃癌所属リンパ節における抗腫瘍性免疫能の検討

秋田大学医学部第1外科
曽根　純之　　小玉　雅志　　小山　裕文　　小山　研二

胃癌患者における所属リンパ節の抗腫瘍性免疫能を明らかにするため，胃癌所属リンパ節のCD4/CD8比，$CD4^{+}CD45^{RA-}$細胞の陽性率，およびBright $CD8^{+}CD11^{b-}$細胞の陽性率をflow cytometry法にて測定し，臨床病理学的因子との関連を検討した．その結果，所属リンパ節の抗腫瘍性免疫能が保持されているのは，深達度ではm症例，sm症例，pm症例，腫瘍径が40mm以下，リンパ節転移陰性例，脈管侵襲陰性例，stage I症例であった．これらの免疫能保持に関わる因子は，ほとんどが早期胃癌のもつ因子であり，癌占居部位や腫瘍径，肉眼型の検討から転移のないリンパ節の一部を温存することが免疫学的見地からも有意義であると考えられた．また，原病死例と生存例との比較では，死亡例の所属リンパ節の抗腫瘍性免疫能が低下していた．

Key words: regional lymph node of gastric cancer, antitumor immunity of gastric cancer, lymphcyte subset

はじめに

癌病巣近傍のリンパ節細胞は，腫瘍増殖を抑制するbarrierとしての機能をもつことが，移植腫瘍を用いた動物実験により明らかにされている[1)~3)]．また最近，ヒトの癌病巣近傍リンパ節はmechanical barrierとしての機能をもつだけでなく，局所のbiological barrierとして抗腫瘍性に機能していることが報告[4)~13)]されてきている．所属リンパ節が抗腫瘍能を有するとすれば，リンパ節を予防的に郭清することは必ずしも適切とはいえないこととなる．温存されたリンパ節が，再発時，あるいは残胃癌発生時のbarrierとなるからである．しかし，癌に対する絶対的な補助療法がなく，また，すべてのリンパ節について転移の有無を，術中組織学的に確認することは不可能であることから，肉眼的に転移陰性と思われるリンパ節に対しても，一律に予防的郭清をすることが標準術式とされている．そこで著者は，胃癌患者における所属リンパ節の抗腫瘍性免疫能が，癌進行程度や臨床病理学的因子とどのように関連するかを明らかにするため，胃癌所属リンパ節のT細胞の構成比を検討した．

対象と方法

1．対象リンパ節と検索リンパ球サブセット

1989年1月から1991年12月の期間，秋田大学第1外科で手術した胃癌110症例の胃所属リンパ節を対象とした．胃癌取扱い規約[14)]に基づき，原発巣が小彎側寄りの場合は#3リンパ節を，大彎側寄りの場合は#4dリンパ節を第1群リンパ節とし，#7または#8リンパ節を第2群リンパ節として，胃切除施行直後におのおの1～2個を採取した．いずれも，組織学的に転移陰性と判断したものである．対照は5例の胆石症手術例と2例の胃良性疾患手術例，計7例の胃大彎リンパ節とした．

検索したリンパ球サブセットは，抗腫瘍性に働いているとされるCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の比率であるCD4/CD8比，Helper inducer T細胞を認識するとされる$CD4^{+}CD45^{RA-}$細胞および，Cytotoxic T細胞を認識するとされるBright $CD8^{+}CD11^{b-}$細胞の陽性率である[15)16)]．

2．リンパ球サブセットの測定方法

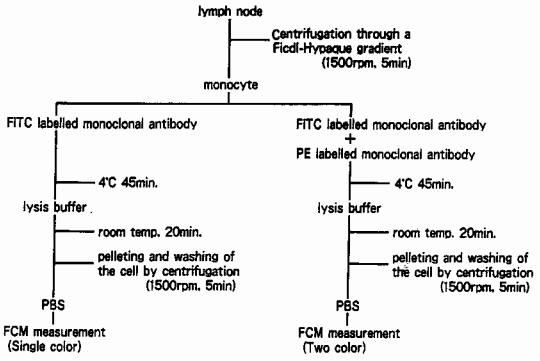
リンパ節中のリンパ球サブセットを，single color, two color flow cytometry法にて測定した[17)]（**Fig. 1**）．

（1）Single color flow cytometry法

約100mgの摘出リンパ節を細切し，200メッシュ（約77μ）を通してPhosphate buffer saline（以下，PBSと略記）100mlに浮遊させた．比重遠心法で単核球を分離し，FITC標識モノクローナル抗体と反応させた．溶血試薬を2ml加えてかくはん後，室温で放置した．1回遠心後，PBSで洗浄し，1mlのPBSに再浮遊させ，

＜1993年10月13日受理＞別刷請求先：曽根　純之
〒010　秋田市本道1－1－1　秋田大学医学部第1外科

Fig. 1　Procedures of flow cytometry.



氷水中で遮光し，Ortho 社製スペクトラム III で flow cytometry を行い，リンパ球サブセットを測定した．

(2) Two color flow cytometry 法

single color と同様に単核球を分離し，FITC 標識モノクローナル抗体と反応させた．PBS で 2 回洗浄後，PE 標識モノクローナル抗体を加えてよくかくはんし，反応させた．溶血試薬を2ml 加えてかくはん後，室温で放置した．1 回遠心後，PBS で 1 回洗浄した．1ml の PBS に再浮遊させ，氷水中で遮光し，flow cytometry を行い，リンパ球サブセットを測定した．なお，モノクローナル抗体は，CD4は OKT4（Ortho 社），CD8は OKT8（Ortho 社），$CD11^b$は Leu15（Becton. Dickinson 社），$CD45^{RA}$は$2H^4$（Coulter 社）を用いた．

3. 検討項目

前述 3 者のリンパ球サブセットの構成比率を，胃癌の深達度，組織型，腫瘍占居部位，肉眼型，腫瘍径，年齢，リンパ節転移の有無，脈管侵襲の程度，胃癌の進行程度（stage），予後で比較し，所属リンパ節中の抗腫瘍性免疫能と胃癌の臨床病理学的因子との関連を検討した．臨床病理学的事項は胃癌取扱い規約[14]に従った．

統計学的検討は t 検定を用い，危険率 5 %未満を有意とし，5 %以上10%未満を傾向ありとした．

結　果

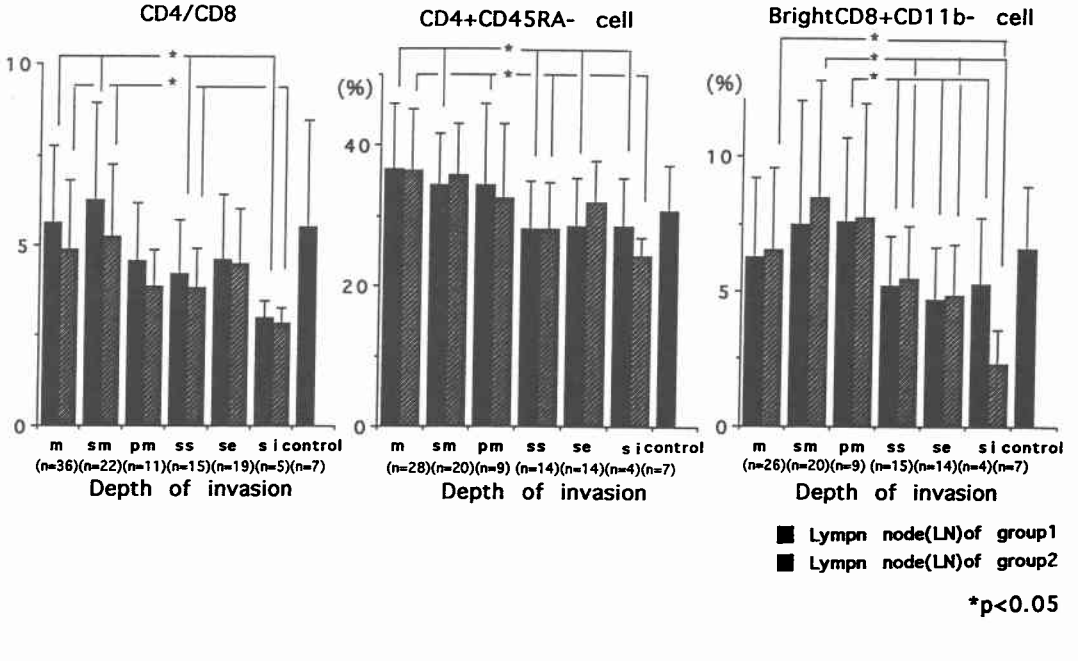
1. 深達度との関係

CD4/CD8比は m 癌，sm 癌の 1 群，2 群リンパ節がともに，ss 癌以上に対し有意に高値であった．1 群リンパ節と 2 群リンパ節間に差はなかった．

$CD4^+CD45^{RA-}$細胞の構成比率も，CD4/CD8比と同様，m 癌，sm 癌が，1 群，2 群リンパ節ともに，ss 癌以上に対し有意に高値であった．1 群リンパ節と 2 群リンパ節間に差はなかった．

Bright $CD8^+CD11^{b-}$細胞の構成比率は，1 群リンパ節で pm 癌が ss 癌以上に対し有意に高値であった．2 群リンパ節では，m 癌が si 癌より，sm 癌が ss 癌以上より有意に高値であった（**Fig. 2**）．

Fig. 2　Lymphocyte subsets of regional lymph node and depth of invasion.



2. 組織型との関係

tub_1, tub_2, por, muc, pap のリンパ節について検討した．各サブセットの構成比率と，組織型間で一定の傾向を示さなかった．

3. 肉眼型との関係

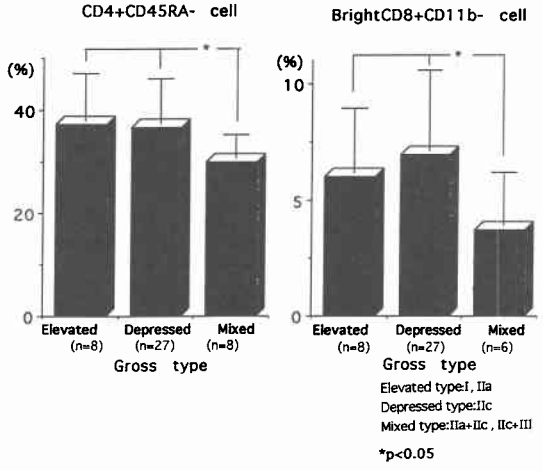
早期癌は早期癌分類にて，進行癌は Borrmann 分類に準じた肉眼型分類を用いて検討した．

早期癌では $CD4^+CD45^{RA-}$細胞の構成比率，Bright $CD8^+CD11^{b-}$細胞の構成比率ともに，混合型(IIa＋IIc, IIc＋III）が隆起型（I, IIa），陥凹型（IIc）に比べて有意に低値であった（**Fig. 3**）．

進行癌では，サブセットにより異なる結果で，一定の傾向を示さなかった．

4. 腫瘍占居部位との関係

Fig. 3 Lymphocyte subsets of regional lymph node and gross type in early gastric cancer.



占居部位別（C, M, A）に各サブセットの構成比率をみたが，一定の傾向を認めなかった．

5. 腫瘍径との関係

腫瘍径との関係を，腫瘍長径20mm 以下，21から40 mm 以下，41から80mm 以下，80mm を超えるものに分けて検討した．

CD4/CD8比は，20mm 以下が80mm を超えるものより有意に高く，41から80mm 以下のものより高い傾向であった．

$CD4^+CD45^{RA-}$細胞の構成比率は，20mm 以下，40mm 以下が80mm を超えるものより有意に高かった．Bright $CD8^+CD11^{b-}$細胞の構成比率は，20mm 以下が41から80mm 以下，80mm を超えるものより有意に高く，40mm 以下より高い傾向であった（**Fig. 4**）．

6. 年齢との関係

50歳未満，50歳代，60歳代，70歳以上に分類し，各サブセットの構成比率をみたが，一定の傾向は認められなかった．

7. リンパ節転移との関係

$CD4^+CD45^{RA-}$細胞の構成比率は，n_0症例と n_1症例の1群リンパ節が，n_2症例，n_3以上の症例より有意に高値であり，Bright $CD8^+CD11^{b-}$細胞の構成比率は，n_0症例の2群リンパ節で n_1症例，n_2症例，n_3以上の症例の2群リンパ節より有意に高かった（**Fig. 5**）．

8. 脈管侵襲との関係

静脈侵襲との関係は，CD4/CD8比は，v_0症例が v_3症例より有意に高く，v_2症例より高い傾向であった．$CD4^+CD45^{RA-}$細胞の構成比率は，v_0症例が v_1症例，v_2症例より有意に高かった．Bright $CD8^+CD11^{b-}$細胞の構成比率は，v_0症例が v_1症例より有意に高く，v_2症例

Fig. 4 Lymphocyte subsets of regional lympho node and size.

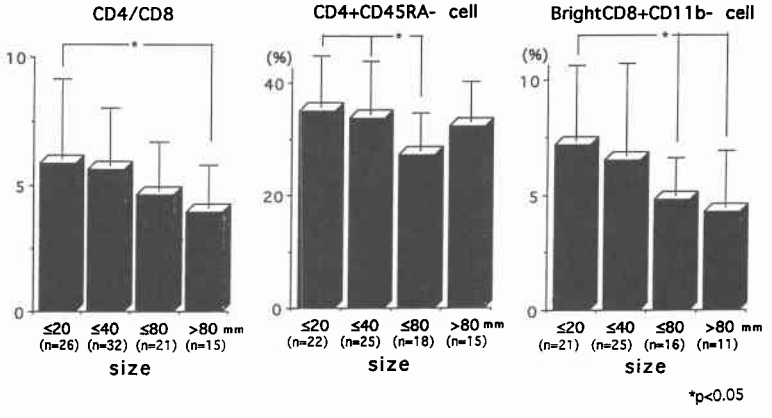
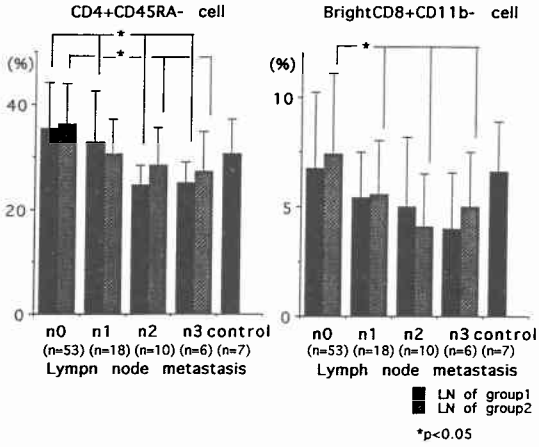


Fig. 5 Lymphocyte subsets of regional lymph node and lymph node metastasis.



より高い傾向であった（**Fig. 6**）.

リンパ管侵襲との関係は，CD4/CD8比は，ly_0症例がly_3症例より有意に高く，ly_1症例もly_3症例より高い傾向であった．$CD4^+CD45^{RA-}$細胞の構成比率は，ly_0症例がly_1症例とly_2症例より有意に高く，ly_3症例より高い傾向であった．Bright $CD8^+CD11^{b-}$細胞の構成比率は，ly_0症例がly_2症例より有意に高く，ly_1症例もly_2症例より高い傾向であった（**Fig. 7**）.

9．stageとの関係

CD4/CD8比は，stage I 症例がstage IV 症例より有意に高く，stage III 症例より高い傾向であった．$CD4^+CD45^{RA-}$細胞の構成比率は，stage I 症例がstage III 症例，IV 症例より有意に高かった．Bright $CD8^+CD11^{b-}$細胞の構成比率は，stage I 症例がstage III 症例，IV

Fig. 6 Lymphocyte subsets of regional lymph node and blood vessel invasion.

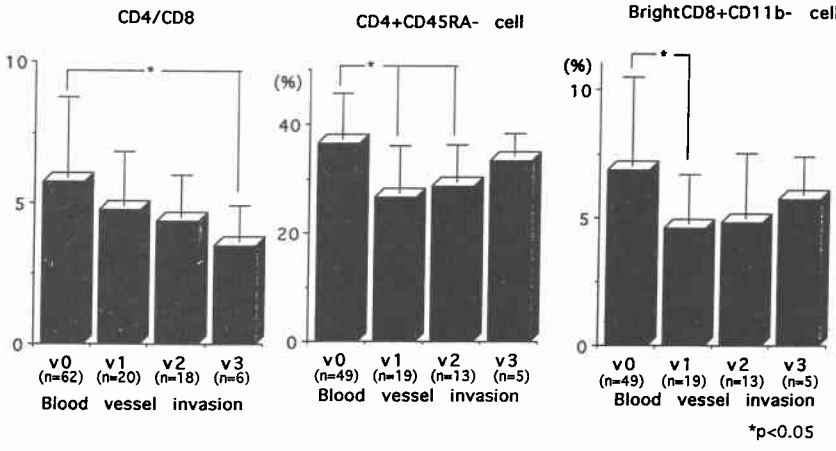


Fig. 7 Lymphocyte subsets of regional lymph node and lymphatic invasion.

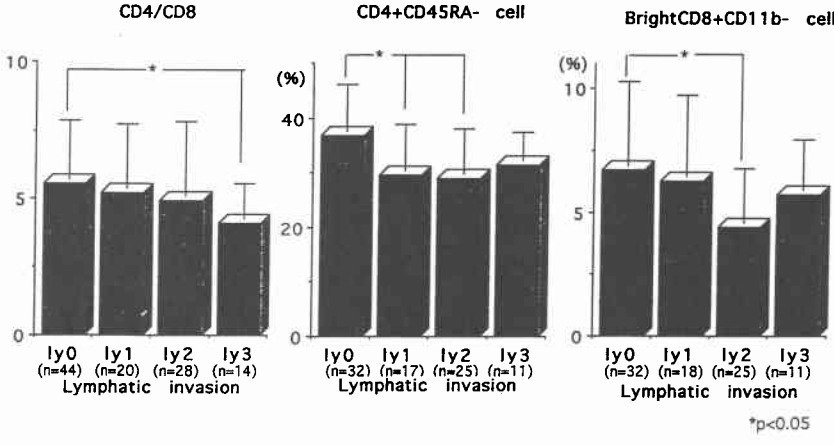


Fig. 8 Lymphocyte subsets of regional lymph node and stage.

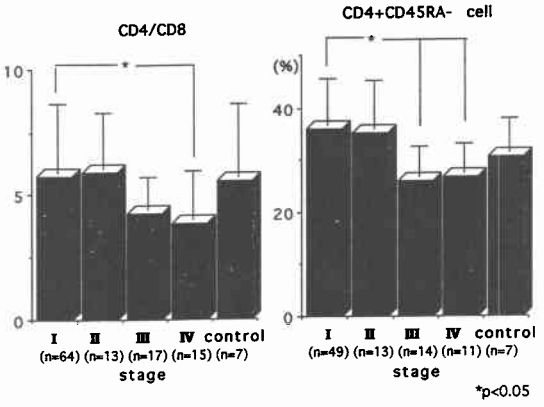
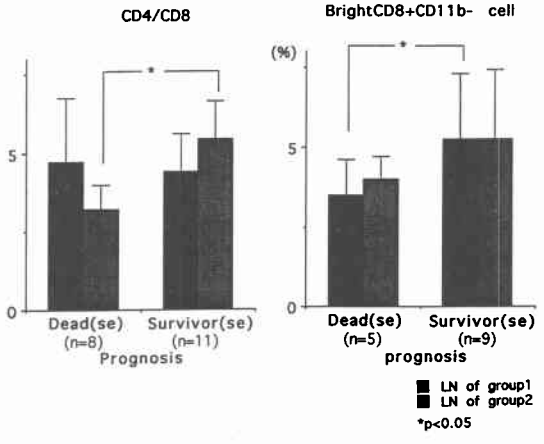


Fig. 9 Lymphocyte subsets of regional lymph node and prognosis.



症例より高い傾向であった（**Fig. 8**）.

10. 予後との関係

se癌の他病死を除く8例の原病死例と，se癌生存例の所属リンパ節の免疫能を比較検討した.

CD4/CD8比は，死亡例の2群リンパ節が生存例より有意に低値を示した．Bright $CD8^+CD11^{b-}$細胞の構成比率は，1群リンパ節で死亡例が生存例より有意に低値を示した（**Fig. 9**）.

考　察

近年，細胞性免疫の主体をなし，癌細胞に対する直接的な細胞障害性を示すTリンパ球による免疫機構が明らかにされつつある．さらに，モノクローナル抗体作製法の確立と普及は，リンパ球の分化，成熟過程の識別を可能にし，白血病，悪性リンパ腫，自己免疫疾患などの診断，治療に応用されている．しかし，固形癌ではその抗原性が低く，その臨床的意義は明らかではない．本研究では，リンパ球の表面抗原に対するCD4, CD8, CD11, CD45などのモノクローナル抗体とflow cytometryを用いて，胃癌における所属リンパ節の抗腫瘍性免疫を検索し，その臨床的意義を検討した.

今回検索したサブセットはCD4/CD8比，$CD4^+CD45^{RA-}$細胞，Bright $CD8^+11^{b-}$細胞とした．CD4/CD8比は従来より細胞性免疫の指標の1つとされており，single color法で行った．また，$CD4^+CD45^{RA-}$細胞，Bright $CD8^+CD11^{b-}$細胞は，two color法により行った．前者はCD4陽性細胞のなかで腫瘍抗原を認識し，種々のEffector細胞を活性化するHelper inducer T細胞を認識するといわれている$CD4^+CD45^{RA-}$細胞の構成比率で，後者はCD8陽性細胞の中でもHelper T細胞の存在下に活性化，増殖し，直接腫瘍細胞を破壊するCytotoxic T細胞を認識するといわれているBright $CD8^+CD11^{b-}$細胞の構成比率である.

検索リンパ節は，1群リンパ節として#3または#4dリンパ節を，2群リンパ節とし，#7または#8リンパ節をとした．これは，これらのリンパ節が比較的量が多く採取でき，手術手技上も採取しやすいためである．また，転移陰性のものとしたが，これは，原発巣転移陽性リンパ節では，癌細胞によって置換され本来の機能が欠如していると考えたためである．リンパ節転移の陰性リンパ節における免疫能の検討は少ないが，渡会[13]は著者と同様の結果を報告している.

今回の検討で所属リンパ節の抗腫瘍性免疫能が保持されていたのは，深達度ではm, sm, pmで，深達度が進むにつれ低下していた．また，腫瘍長径でみると40mm以下では免疫能が保持され，腫瘍径が大きくなるにつれ低下する傾向であった．これらの結果は，より腫瘍量が多いもので免疫能が低下していることを示している．さらに，リンパ節転移陰性例で免疫能が保持され，リンパ節転移が高度になるにつれ低下していた．進行程度では，stage Iで免疫能が保持されており，進行程度が進むにつれ低下していた．また，脈管侵襲に関しても，侵襲の軽度なものは免疫能が保持されており，進んだものほど低下していた．すなわち，より進行したもので免疫能が低下していた．以上より，免疫能が保持され抗腫瘍性に働くことが期待できるものは，ほとんどが早期胃癌のもつ因子であった．早期胃癌の術前診断は可能であり，癌占居部位や腫瘍径，肉眼型の検討から転移のないリンパ節の一部を温存する

ことが免疫学的見地からも有意義であると考えられた．

リンパ節転移との関連では，2群リンパ節においてn_0症例とn_1症例を比べるとBright $CD8^+CD11^{b-}$細胞では有意にn_1症例が低値を示し，$CD4^+CD45^{RA-}$細胞でもn_1症例が低値を示した．これは，転移により亢進した1群リンパ節のSuppressor機能により，転移のない2群リンパ節の抗腫瘍能も低下したと考えられた．

1群リンパ節と，2群リンパ節における免疫能を比較すると，両者間に有意差がなかった．岡林[6]は癌病巣からより遠位（3群）のリンパ節に免疫応答能が保持されていたと報告しており，また大和田ら[12]もCD4細胞，CD8細胞では近位リンパ節（1群）より遠位リンパ節（3群）で高値であると報告している．著者と同様，1群，2群で検討した黒井ら[8]も差がないと述べている．その理由は，2群リンパ節すなわち#7リンパ節は，1群リンパ節（近位リンパ節）としての免疫動態を示し，3群リンパ節は遠位リンパ節として存在するからと考えられた．当教室でのリンパ流，リンパ節転移の検討から，#7リンパ節転移が2群のうちで最も高頻度にみられ，#7リンパ節は1群に近いと報告してきた[18]が，免疫学的にもこれらを支持する結果と考えられた．

所属リンパ節の免疫能と予後との関連は，同じ深達度の癌でも，死亡例の所属リンパ節の免疫能は低下しており，予後を推測するうえで胃癌所属リンパ節の抗腫瘍性免疫能が有用であることが示唆された．これまで，生存例と死亡例を，深達度をそろえて胃癌所属リンパ節の免疫能を比較した報告はないが，この結果はより進行した胃癌で抗腫瘍性免疫能がより低下するという諸家による多くの報告[5~10,13]を裏付けるものである．

今回検討した3種類のサブセットは，現在用いられている免疫能の指標としては，信頼性の高い代表的なものである．しかし，各サブセットにおける値のパターンが異なる場合も散見された．これは，各サブセットがそれぞれ免疫能のある一面しかとらえていないことを示すもので，免疫能のすべてを表現しているものとはいいがたい．今後，免疫能をより正確に，かつ詳細に検討していくためには，最近実用化されたthree color flow cytometry法[19]や，新たなリンパ球サブセットでの検討が不可欠であると思われる．

文　献

1) Kurokawa Y: Experiments on lymph node metastasis by intralymphatic inoculation of rat ascites tumor cells, with special reference to lodgement, passage, and growth of tumor cells in lymph nodes. Gann 61：461—471, 1970
2) Fisher B, Fisher ER: Studies concerning the regional lymph node in cancer. I. Initiation of immunity. Cancer 27：1001—1004, 1971
3) 小川健治，矢川裕一，勝部隆男ほか：胃癌所属リンパ節の抗腫瘍的な免疫応答について．日消外会誌 19：862—866, 1986
4) 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
5) 丁野真太郎：Double staining法による胃癌所属リンパ節リンパ球の機能的サブセットの解析．日外会誌 91：36—46, 1990
6) 岡林孝弘：胃癌所属リンパ節の免疫組織化学的研究．日外会誌 88：529—542, 1987
7) 山岸久一：ヒト胃癌におけるリンパ節防御機構に関する研究—リンパ節内細胞反応と細胞性免疫—．京都府医大誌 86：161—179, 1977
8) 黒井克昌，峠　哲哉，山口佳之ほか：Two color解析による胃がん所属リンパ節におけるT細胞亜群の同定．Oncologia 20：100—106, 1987
9) 山田哲司，橋爪泰夫，山下良平ほか：胃癌患者局所リンパ節の免疫学的検討．日消外会誌 19：858—861, 1986
10) 竹村和郎，広川勝昱，平山廉三ほか：胃癌増殖局所および所属リンパ節におけるリンパ球サブセットの分布様式に関する免疫組織化学的検討．日消外会誌 19：849—853, 1986
11) 木場文男，秋吉　毅，有永信哉ほか：胃癌所属リンパ節の細胞性免疫能．日消外会誌 19：854—857, 1986
12) 大和田進，竹下正昭，宮本幸男ほか：胃癌患者の免疫能に関する臨床的研究—第2報，所属リンパ節のT細胞サブセットについて—．日外会誌 91：1560—1566, 1990
13) 渡会伸治：胃癌所属リンパ節内のT細胞各種亜群の構成比率の変化．日外会誌 90：1009—1018, 1989
14) 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
15) 宮坂昌之：T細胞分化と膜抗原．臨免疫 21：1006—1021, 1989
16) 佐野晴夫，小玉正智，寺田信國：腫瘍免疫と免疫療法．消外 13：2023—2032, 1990
17) 高瀬浩造：細胞表面抗原染色法．臨検査 34：654—660, 1990
18) 小玉雅志，石川浩一，小山裕文ほか：A領域進行胃癌の予後の特殊性とその向上策．日外会誌 89：1008—1013, 1988
19) 田辺　博，今井直基，渡辺　進ほか：Three color flow cytometryを用いた胃癌患者のリンパ球サブセットの検討．日臨外医会誌 53：2040—2046, 1992

Clinical Study on Anti-cancer Activities of Regional Lymph Node Lymphocytes in Gastric Cancer

Sumiyuki Sone, Masashi Kodama, Hirofumi Koyama and Kenji Koyama
First Department of Surgery, Akita University School of Medicine

This study was done to elucidate whether or not the regional lymph nodes of gastric cancer have an immunological anti-caner function. The lymphocyte subsets were analyzed with monoclonal antibodies and flow cytometry. The monoclonal antibodies were for CD4 (helper/inducer T cell) and CD8 (suppressor/cytotoxic T cell). The percentages of lymphocyte subsets were compared with clinico-pathological factors. The level of antitumor immunity was significantly higher in early gastric cavcer or small-sized cancer than in advanced gastric cancer or large-sized cancer. The level was also higher in patients without lymph node metastasis or without cancer cell invasion into the lymphatic vessels and veins than those with them. Antitumor immunity was higher or retained in stage I, but had a tendency to be lower in more advamced stages. Antitumor immunity in the patient with cancer recurrence was significantly lower than in those without recurrence. These results suggest that it may be important to retain some lymph nodes without metastasis in patients with early stage gastric cancer.

Reprint requests: Sumiyuki Sone First Department of Surgery, Akita University School of Medicine
1-1-1, Hondo, Akita, 010 JAPAN