日消外会誌　27（12）：2536～2542，1994年

Lymphokine-activated killer 活性からみた胃癌患者における所属リンパ節，脾臓および末梢血単核球の免疫反応

千葉大学第2外科
鈴木　孝雄　　落合　武徳　　永田　松夫
軍司　祥雄　　中島　一彰　　磯野　可一

胃癌患者における免疫反応を評価する目的で，lymphokine-activated killer（LAK）活性を中心とした免疫学的検索を行った．胃癌20例の所属リンパ節，脾臓，末梢血単核球を検索対象とした．組織間の比較では，脾臓，末梢血がリンパ節よりも高いLAK活性を示した（$p<0.05$）．サプレッサーT細胞はリンパ節ではほとんど認められなかったが，末梢血では高値を示した（$p<0.05$）．一方，キラーT細胞は各組織間に差はみられなかった．また癌の進展に伴い，リンパ節転移陽性例ではIL-2非誘導LAK活性が末梢血で低下し（$p<0.05$），メモリーヘルパーT細胞は第1群リンパ節で低下がみられた（$p<0.05$）．しかし漿膜浸潤の有無別の検討では，LAK活性，単核球亜分画に一定の傾向を認めなかった．以上，胃癌患者におけるLAK活性を中心とした免疫学的検索の有用性を報告した．

Key words: gastric cancer, lymphokine-activated killer activity of regional lymph nodes, spleen and peripheral blood

緒　言

癌に対する宿主側の免疫反応が，癌の発育進展に強くかかわっている事実は，癌の免疫療法の発展と相まって数多く報告されている[1]．この免疫反応の主役と考えられている細胞性免疫機能を客観的に評価する方法として，従来よりツベルクリン反応，末梢血単核球のphytohemagglutinin（以下，PHAと略記）幼若化反応，さらにflow cytometryによる単核球亜分画の分析から，近年ではtwo color analysisを用いた単核球機能と関連させた亜分画の詳細な検討がなされている[2)~4)]．一方，lymphokine-activated killer（以下，LAKと略記）細胞の腫瘍免疫における重要性が報告され，すでに癌治療において臨床成果も報告されている[5)6)]．消化器癌，特に胃癌でも，これまで所属リンパ節，脾臓，末梢血単核球の亜分画の検討は報告されているが，おのおののLAK活性にまで言及した報告はまれである[3)4)]．われわれはこのような現状を踏まえ，胃癌において，より客観的で生理的な免疫能の評価法を確立し治療に応用することを目的として，所属リンパ節，脾臓，末梢血の各組織間のLAK活性および単核球亜分画の相違，さらに癌の進行度との相関も検討し，若干の知見を得たので報告する．

＜1994年9月14日受理＞別刷請求先：鈴木　孝雄
〒260　千葉市中央区亥鼻1－8－1　千葉大学医学部第2外科

対象と方法

対象は1992年9月から1993年5月までに千葉大学第2外科で治療された胃癌開腹症例20例であり，男性14例，女性6例，組織学的リンパ節転移陰性10例，陽性10例，組織学的進行度は胃癌取扱い規約第11版のstage I 6例，stage II 3例，stage III 6例，stage IV 5例であった[7]（**Table 1**）．

手術当日，麻酔導入前に末梢血採血を行い，Ficoll-Paque比重遠心法にて末梢血単核球を分離した．次に開腹し，第1群，第2群リンパ節で肉眼的に転移陰性と判断されたリンパ節および腸間膜リンパ節，脾臓合併切除が施行された症例では脾臓の一部を採取した．組織片はハサミで細切り，金属メッシュで組織片を濾過，RPMI-1640で1回洗浄後，以下の解析に供した．

Interleukin-2（以下，IL-2と略記）誘導LAK活性は以下のように求めた．採取した単核球を10%FCS RPMI-1640に2×10^6cells/mlに調整しeffector cellとした．Daudi細胞を^{51}Crでラベルし10%FCS RPMI-1640に2×10^5cells/mlに調整してtarget cellとした．つぎにeffector：target比が20：1となるように96穴U字型にプレーティングし50u/mlのrecombinant

Table 1 Patient characteristics

#	Sex	Depth of invasion	Prognostic serosal invasion	Lymph node metastasis	Histological stage
1	F	ssβ	−	+	III
2	F	ssα	−	+	IV
3	M	se	+	+	III
4	M	se	+	+	III
5	M	sei	+	−	IV
6	M	ssγ	+	−	II
7	M	S3	+*	−	IV*
8	M	se	+	+	IV
9	F	se	+	−	III
10	M	pm	−	−	I
11	M	ssβ	−	+	III
12	M	pm	−	−	I
13	M	ssβ	−	+	II
14	F	sm	−	−	I
15	F	se	+	+	III
16	M	m	−	+	II
17	M	m	−	−	I
18	M	ssβ	−	−	I
19	M	se	+	+	IV
20	F	pm	−	−	I

*Gastric cancer was not resected

IL-2（rIL-2：塩野義製薬）を添加し5%CO_2 37℃の条件下で4時間反応させた後，上澄中に放出された^{51}Crをγカウンターで測定した．%cytotoxicity は次の式で求めた．

%cytotoxicity＝[(experimental release－spontaneous release)/(maximal release－spontaneous release)]×100

IL-2誘導 LAK 活性測定と同様の操作を行い，IL-2を添加せずに effector と target を反応させることでIL-2非誘導 LAK 活性を測定した．

Two color flow cytometry は fluorescein isothiocyanate（以下，FITC と略記），phycoerythrin（以下，PE と略記）の二重染色で測定した．使用した monoclonal 抗体は CD8と CD11b，CD4と CD45R0，CD8と CD25の組み合わせである（FITC-CD11b コールタークローン社製，FITC-CD45R0ニチレイ社製，それ以外は Becton Dickinson 社製）．単核球に FITC 標識抗体と PE 標識抗体とを同時に添加し，室温で15分間反応させた後洗浄し，flow cytometry にて単核球亜分画を測定した．

統計学的な有意差検定は2群間は t 検定，多群間は Scheffe 型多重比較で行った．

成　績

1）組織間の免疫パラメーターの比較

① LAK 活性：IL-2誘導 LAK 活性は脾臓，末梢血が，第1群，第2群，腸間膜リンパ節に比較して有意に高値を示した（$p<0.05$）．しかし各リンパ節群間および脾臓と末梢血では差がなかった（**Fig. 1**）．

IL-2非誘導 LAK 活性は脾臓が末梢血，各リンパ節に比較し有意に高値を示した（$p<0.05$）．また末梢血も各リンパ節に対して有意に高い LAK 活性を示した（$p<0.05$）．しかし各リンパ節群間に有意差は認めなかった（**Fig. 2**）．

② 単核球亜分画：$CD8^+CD11b^+$細胞（サプレッサーT 細胞）は各リンパ節ではほとんど認められず，末梢

Fig. 1 LAK activity of each tissue. Both spleen LAK and peripheral blood LAK activities were significantly higher than each lymph node LAK activity ($p<0.05$). n : number of patients

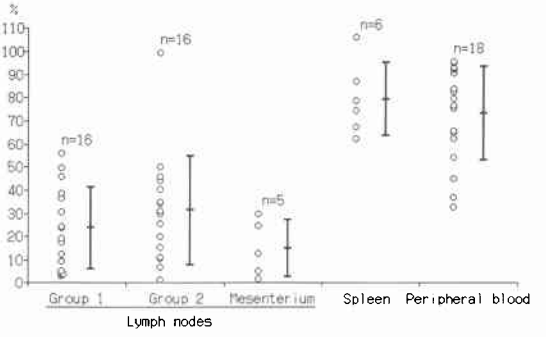


Fig. 2 LAK activity induced without IL-2 of each tissue. Spleen LAK activity was significantly higher than lymph node LAK and peripheral blood LAK activities ($p<0.05$), and peripheral blood LAK activity was significantly higher than each lymph node activity ($p<0.05$).

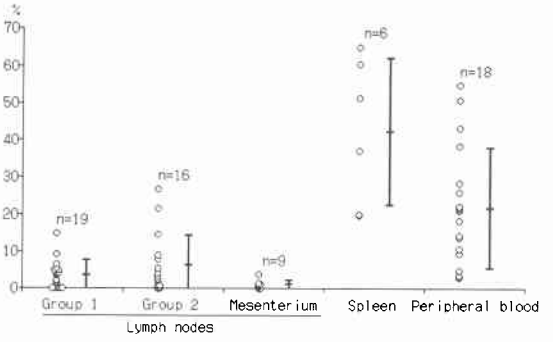


Fig. 3 Percentage of $CD8^+CD11b^+$ mononuclear cells from each tissue. The percentage of $CD8^+CD11b^+$ mononuclear cells from peripheral blood was significantly higher than those of each lymph node and the spleen ($p<0.05$).

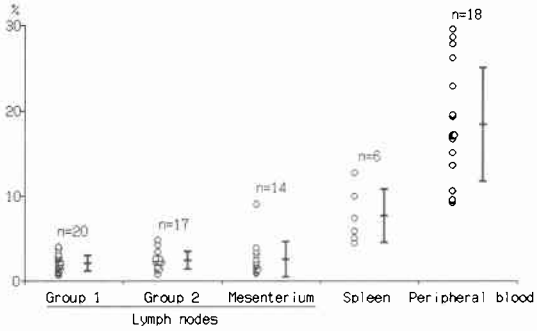


Fig. 4 Percentage of $CD8^+CD11b^-$ mononuclear cells from each tissue. The percentage of $CD8^+CD11b^-$ mononuclear cells was almost the same among these tissues.

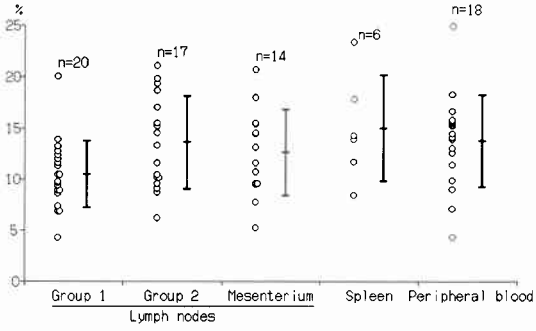


Fig. 5 Percentage of $CD4^+CD45R0^+$ mononuclear cells from each tissue. The percentage of $CD4^+CD45R0^+$ mononuclear cells from the spleen was significantly lower than those from each lymph node and peripheral blood ($p<0.05$).

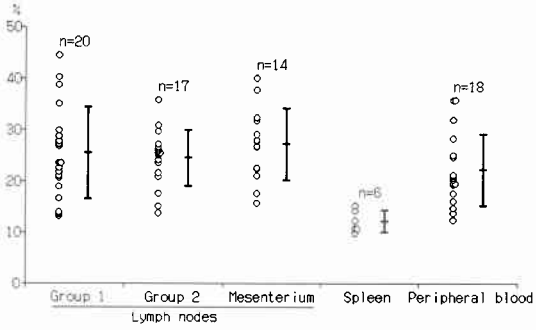
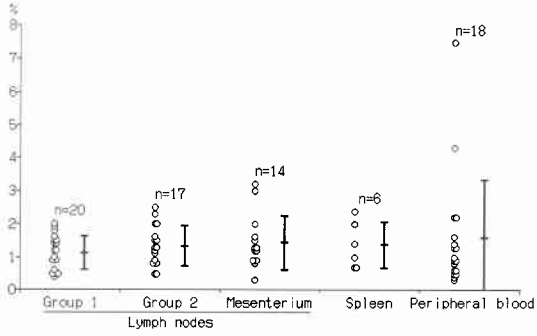


Fig. 6 Percentage of $CD8^+CD25^+$ mononuclear cells from each tissue. High percentage of $CD8^+CD25^+$ mononuclear cells from peripheral blood was observed in a few cases, however there was no significant difference among these tissues.



血では他の組織に比較し有意に高値を示した（$p<0.05$）（**Fig. 3**）.

$CD8^+CD11b^-$細胞（キラーT細胞）は各組織で10～15%の値を示し，組織間に有意差は認めなかった（**Fig. 4**）.

$CD4^+CD45R0^+$細胞（メモリーヘルパーT細胞）は脾臓が他の組織に比較し有意に低値を示した（$p<0.05$）（**Fig. 5**）.

$CD8^+CD25^+$細胞（IL-2 receptor α 陽性キラーT細胞）は末梢血で高値を示す症例が散見されたものの，各組織間に有意差は認めなかった（**Fig. 6**）.

2）組織学的リンパ節転移の有無による免疫パラメーターの比較

① LAK活性：リンパ節転移の有無によりIL-2誘導LAK活性を各組織ごとに比較すると，各リンパ節群，末梢血において転移陽性例で低値を示す症例が多かったが有意差はなかった（**Fig. 7**）.

IL-2非誘導LAK活性も同様に転移陽性例で各組織で低値を示す症例が多く，特に末梢血では有意に低値であった（$p<0.05$）（**Fig. 8**）.

② 単核球亜分画：$CD4^+CD45R0^+$細胞は第1群リンパ節においてリンパ節転移陽性例に有意な低下を認めた（$p<0.05$）．他のリンパ節でも転移陽性例に低値を示す症例が多かった（**Fig. 9**）.

そのほか$CD8^+$, $CD8^+CD11b^+$, $CD8^+CD11b^-$, $CD4^+$, $CD4^+CD45R0^-$, $CD25^+$細胞は，いずれの組織においてもリンパ節転移の有無による有意の差を認めなかった．

3）漿膜浸潤の有無による免疫パラメーターの比較

Fig. 7 Influence of lymph node metastasis on LAK activity of each tissue. LAK activity of each tissue was depressed in patients with lymph node metastasis, however there was no significant difference. n (−) : negative lymph node metastasis, n (+) : positive lymph node metastasis

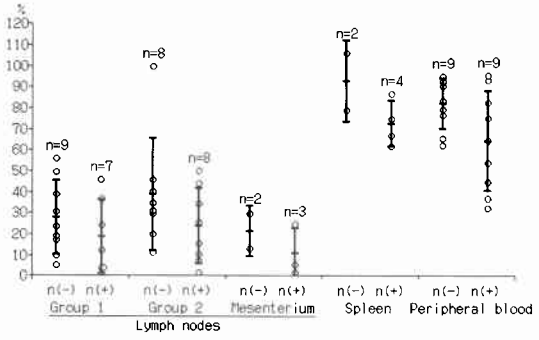


Fig. 8 Influence of lymph node metastasis on LAK activity induced without IL-2 of each tissue. Each LAK activity induced without IL-2 was depressed in patients with lymph node metastasis, and there was a significant difference in peripheral blood LAK (*: $p<0.05$). n (−) : negative lymph node metastasis, n (+) : positive lymph node metastasis

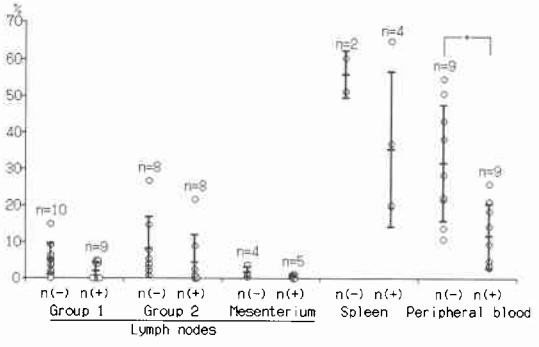


Fig. 9 Influence of lymph node metastasis on the percentage of $CD4^+CD45R0^+$ mononuclear cells from each tissue. The percentage of $CD4^+CD45R0^+$ mononuclear cells from lymph nodes was depressed in patients with lymph node metastasis, and there was a significant difference in the group 1 lymph node (*: $p<0.05$). n (−) : negative lymph node metastasis, n (+) : positive lymph node metastasis

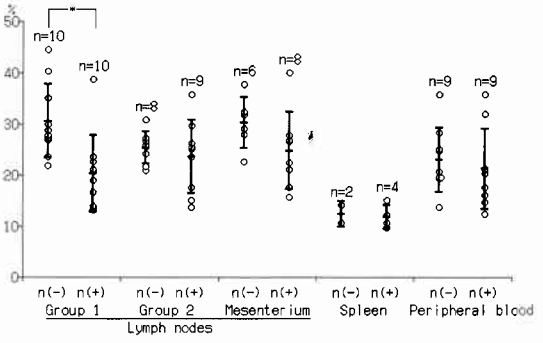
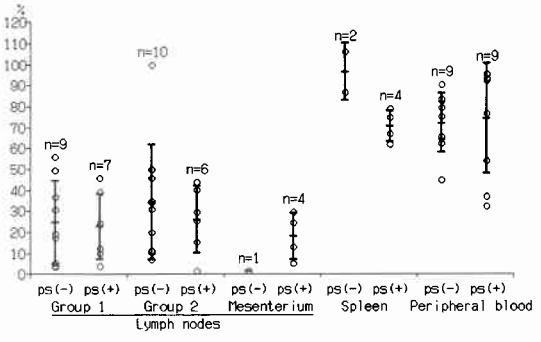


Fig. 10 Influence of serosal invasion on LAK activity of each tissue. LAK activity was not influenced by serosal invasion. ps (−) : negative prognostic serosal invasion, ps (+) : positive prognostic serosal invasion



① LAK 活性：IL-2誘導および IL-2非誘導 LAK 活性を漿膜浸潤の有無から検討したが，両者とも一定の傾向は示さなかった（**Fig. 10**）.

② 単核球亜分画：$CD8^+CD25^+$細胞は，漿膜浸潤例の第 2 群リンパ節および腸間膜リンパ節では有意な低値（$p<0.05$）を示した（**Fig. 11**）. そのほか $CD8^+$細胞，$CD4^+$細胞，$CD8^+CD11b^+$細胞など漿膜浸潤の有無により，一部に有意な相違を認めたが全体としては特異的ではなかった.

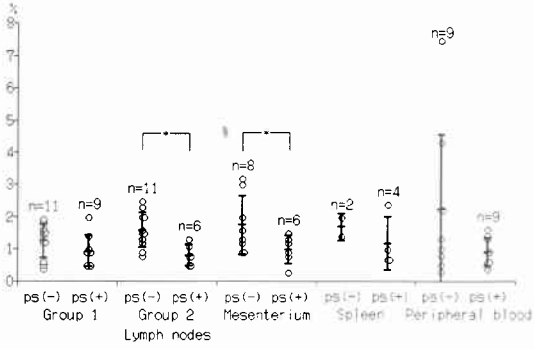
4）組織学的進行度と免疫パラメーターの関連

LAK 活性，単核球亜分画の検討を行ったが特に関連を認めなかった.

考　察

免疫療法の効果判定には，腫瘍に対する生体の抗腫瘍免疫反応を客観的に評価し，その機序を解析することが重要である．従来，ツベルクリンなどの各種皮内反応，末梢血単核球の PHA 幼若化能など非特異的な反応が検討されていたが，その後モノクローナル抗体による単核球亜分画と，その機能の解析が進むにつれ，

Fig. 11 Influence of serosal invasion on the percentage of $CD8^+CD25^+$ mononuclear cells from each tissue. The percentages of $CD8^+CD25^+$ mononuclear cells from the group 2 and mesenteric lymph nodes were depressed significantly in patients with prognostic serosal invasion (*: $p<0.05$). ps (−): negative prognostic serosal invasion, ps (+): positive prognostic serosal invasion



より詳細な担癌患者の免疫状態の把握や免疫療法の評価が可能となった[2)3)]．

われわれは[3)]すでに two color flow cytometry を用いて，胃癌患者における局所リンパ節の単柱球亜分画の検討を行い，内視鏡的に免疫療法剤を局注された群ではキラーT 細胞分画が増加していること，また natural killer (以下，NK と略記) 細胞分画は，免疫療法剤を局注された一部の症例において，遠位リンパ節で増加がみられたことを報告した．これらの事実は，リンパ節の単核球亜分画の検討は免疫療法剤の有効性判定に有用であることを示したが，さらに抗腫瘍活性を機能的に評価する必要があることが指摘された．

一方，Rosenberg らのグループは，癌患者のリンパ球を IL-2存在下で培養すると，腫瘍細胞に強い細胞障害活性を有するリンパ球が誘導され，それは NK 細胞やキラーT 細胞とは異なる細胞であることを観察し，LAK 細胞と名付けた[5)]．さらに，実験動物での有効性や，臨床応用の成果が報告されるにおよんで，LAK 細胞はにわかに脚光を浴びるにいたった[6)]．その後，本邦においても，胃癌所属リンパ節における LAK 活性に関する報告もみられるようになり，飽浦は胃癌所属リンパ節リンパ球の NK 活性，LAK 活性が免疫賦活剤局所投与において増強されることを報告した[8)]．

以上のような経過を踏まえ，本研究では LAK 活性を中心とした免疫パラメーター検索の有用性を検討する目的で，胃癌患者における LAK 活性，単核球亜分画を，腫瘍免疫発現の現場と考えられる所属リンパ節，脾臓，末梢血で測定し，組織間の相違，さらに胃癌進行程度との関連を解析した．

まず，各免疫パラメーターの組織による差異を検討したところ，IL-2誘導 LAK 活性は所属リンパ節に比較して末梢血，とりわけ脾臓で有意に高値を示した．さらに生体内で実際の抗腫瘍効果を反映すると推察される IL-2非誘導の培養細胞も NK 抵抗性の Daudi 細胞に障害活性を示し，しかもこの活性も所属リンパ節に比較して末梢血で高く，脾臓でさらに有意に高値を示すことが判明した．NK をはじめとする非特異的な細胞障害活性は局所リンパ節では微弱であるが，末梢血，脾臓では強く認められると報告されており，われわれの LAK 活性での結果も同様であった[4)]．これらの事実は，もし，NK，LAK といった非特異的な活性を有する細胞群に，生体内での抗腫瘍活性を期待するならば，それは局所リンパ節での抗腫瘍活性よりも，血行性転移の予防，治療といった全身的な抗腫瘍効果を期待すべきであることを示唆している．事実，Rosenberg ら[6)]の臨床例の報告では，melanoma，大腸癌の肺転移など，血行性転移にたいする LAK 療法の有効性が強調されている．また，表面マーカーからの検索，すなわち LAK に発現しているとされる $CD8^+$，$CD8^+CD11b^-$細胞の組織間の分布様式からは脾臓の高い LAK 活性を説明できなかったことから，LAK 活性を有する細胞群は表面マーカーからみていくつかのグループに分かれることが示唆された．

峠ら[9)]は脾臓がサプレッサー細胞誘導の場を提供するとして，進行胃癌における脾摘の意義を強調している．しかし，本研究の結果，および脾臓を LAK 細胞の供給源として注目している Voltarelli ら[10)]の報告から考えると，脾臓が腫瘍免疫において正の方向に働くか負の方向に働くか，現時点では明確でない．上部胃癌に対する脾摘の功罪もこれらの事実を踏まえて再検討する必要があろう．

サプレッサーT 細胞は末梢血では高値であったが，所属リンパ節，脾臓では有意に低く，局所の腫瘍免疫における役割はそれほど重要でないと思われた．しかし，峠ら[9)]の報告もあり，さらに症例を増やして検討する必要がある．

一方，メモリーヘルパーT 細胞は脾臓で有意に低値を示したが，所属リンパ節では末梢血と同等の値を有していた．これは免疫療法剤の局所投与などに際し，

所属リンパ節のヘルパー機能が賦活される可能性を示唆している．

このように，各組織における免疫パラメーターの相違を認識することは，手術術式，免疫療法剤の投与方法などを検討する上に重要な情報となることから，さらなる症例の積み重ねと，新しいパラメーターの出現が待たれる．

次に胃癌の進行程度による各種パラメーターの変動を検討した．リンパ節転移陽性群と陰性群を各組織別に比較すると，IL-2誘導LAK活性よりもIL-2非誘導LAK活性がリンパ節転移陽性群で低下した症例が多く，特に末梢血レベルでは有意に低下していた．このIL-2非誘導LAK活性低下の原因は不明であるが，免疫療法によるLAK細胞の活性化が可能であるか否かは興味深い．また，メモリーヘルパーT細胞分画もリンパ節転移陽性群のリンパ節で低下していた．この変化に対し，泉[11]はOK432の経口投与で所属リンパ節のヘルパーT細胞の増加を報告しているが，その臨床的意義は今後の検討課題である．

一方，深達度，stage別の検討では癌の進展によるパラメーターの有意な低下は認められず，LAK活性を含めた抗腫瘍活性は進行癌でも十分期待できることを示している．

以上のように組織間のLAK活性の相違，リンパ節転移の進展によるLAK活性の低下といった事実から，各組織LAK活性の測定は，免疫状態の把握，抗腫瘍効果の判定にとって有用であることが示唆された．特に，吉野ら[12]もレンチナンを胸腹腔内に投与した症例でIL-2非誘導LAK活性と臨床効果の相関を報告しており，IL-2非誘導のLAK活性の重要性を強調したい．

最後に，本研究では検討しなかったが，これまで免疫療法剤の効果判定としての局所免疫能評価の有用性が報告されている．竹下ら[13]，田中ら[14]はPHA幼若化反応，仁尾ら[15]はNK細胞，T細胞の動きを検討しているが，今後は免疫療法剤投与後のLAK活性を検索することで，生体全体の抗腫瘍免疫の全貌に近づくことが期待される．

本論文の要旨は第43回日本消化器外科学会総会（東京）において発表した．

文　献

1) 藤原大美，須田貴司，吉岡貴幸ほか：腫瘍免疫．藤原大美編．T細胞系の免疫学．中外医学社，東京，1990, p123—145
2) 桜井欽夫：癌の免疫療法剤とその評価．癌と化療 7，1725—1732，1980
3) 鈴木孝雄，落合武徳，浅野武秀ほか：胃癌患者に対する免疫療法剤局所投与による所属リンパ節リンパ球の免疫学的分析．日消外会誌 20：1682—1689，1987
4) 森谷行利：胃癌患者の胃癌組織．健常胃，と各組織におけるリンパ球Subpopulationと NK活性に関する研究．日外会誌 85，132—142，1984
5) 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—1841，1982
6) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM et al: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. N Engl J Med 313：1485—1492，1985
7) 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
8) 飽浦良和：免疫賦活剤局注療法による胃癌所属リンパ節リンパ球のキラー活性の増強．日癌治療会誌 22：2265—2272，1987
9) 峠　哲哉，柳川悦朗，山口佳之ほか：胃がん患者脾の免疫抑制への関与と脾摘の意義．日消外会誌 21：2478—2481，1988
10) Voltarelli JC, Rayner AA, Garovoy MR et al: Human spleen and peripheral blood lymphocytes activated by interleukin-2 have similar phenotypic and functional characteristics. J Biol Response Mod 9：103—107，1990
11) 泉　勝：胃癌患者の術前免疫療法—特に，OK-432経口投与におけるリンパ球サブセットとインターロイキン2からの検討．日外会誌 94：27—32，1993
12) 吉野茂文，岡　正朗，谷　彰一ほか：癌性胸腹水に対するレンチナン胸腹腔内投与有効例における免疫指標の検討．Biother 6：700—702，1992
13) 竹下正昭，小堀哲雄，須藤英仁ほか：胃癌患者の術前免疫化学療法—Levamisoleと Lentinanの細胞性免疫能と所属リンパ節への効果について—．癌と化療 9：1052—1060，1982
14) 田中民弥：PSK局所投与による局所リンパ節免疫能の増強．東京女医大誌 59：898—910，1989
15) 仁尾義則，大垣和久，土谷利晴ほか：OK-432 (Picibanil)経口投与の試み（第8報）．消化器癌の免疫能に及ぼす影響．日癌治療会誌 24：1607—1615，1989

Immune Responses of Mononuclear Cells from Regional Lymph Nodes, Spleen and Peripheral Blood of the Patients with Gastric Cancer with Reference to Lymphokine-Activated Killer Activity

Takao Suzuki, Takenori Ochiai, Matsuo Nagata, Yoshio Gunji,
Kazuaki Nakajima and Kaichi Isono
Department of Surgery II, Chiba University School of Medicine

In order to evaluate the immune response of patients with gastric cancer, immunological examinations including an analysis of lmyphokine-activated killer (LAK) activity were performed. Materials were mononuclear cells derived from regional lymph nodes, the spleen and peripheral blood of 20 patients with gastric cancer. Spleen and peripheral blood LAK activities were higher than regional lymph node LAK activity ($p<0.05$). The percentage of suppressor T cells was lower in lymph nodes than in peripheral blood ($p<0.05$). In contrast, the percentage of killer T cells was almost the same among these tissues. Peripheral blood LAK activity induced without interleukin-2 was lower in patients with lymph node metastasis than in those without metastasis ($p<0.05$). The percentage of memory helper T cells was lower in group 1 lymph nodes of patients with lymph node metastasis than in those of patients without lymph node metastasis ($p<0.05$). However, LAK activity and the subpopulation of mononuclear cells were not influenced by serosal invasion. The present study reported the usefulness of immunological examinations including an analysis of LAK activity in patients with gastric cancer.

Reprint requests: Takao Suzuki Department of Surgery II, Chiba University School of Medicine
1-8-1 Inohana, Chuou-ku, Chiba-shi, 260 JAPAN