

Three color flow cytometry を用いた消化器癌患者の 末梢血リンパ球サブセットの検討

名古屋市立大学第2外科

隅田 英典 片岡 誠 桑原 義之 川村 弘之
三谷 眞己 佐藤 篤司 服部 浩次 西脇 巨記
中野浩一郎 木村 昌弘 成田 清 小山 浩
加藤 丈博 正岡 昭

担癌生体の免疫機能を評価するために、消化器癌患者73例（胃癌45例，大腸癌16例，食道癌6例，肝臓癌3例，膵臓癌3例）と非担癌患者17例を対象とし、モノクローナル抗体を用い末梢血リンパ球サブセットを測定した。

T細胞のなかでは担癌状態および癌の進展によりCD3(+)HLA-DR(+) (activated T)細胞とCD8(+)CD11b(+) (suppressor T)細胞が増加する傾向が認められた。Natural Killer (NK)細胞は担癌状態により増加し、そのサブセットでは病期の進行により活性の弱いCD57(+)CD16(-)細胞と中間の活性を示すCD57(+)CD16(+)細胞の増加傾向が認められた。また lymphokine activated killer (LAK)細胞については、CD3(+)CD16(-)CD56(+) (T-LAK)細胞が病期の進行により増加する傾向を認めた。

Key words: three color flow cytometry, lymphocyte subsets, gastroenterological cancer

はじめに

担癌生体における癌細胞と細胞性免疫機能のかかわり合いについてはまだ十分には解明されていないが、担癌生体では一般に細胞性免疫機能は抑制状態にあるといわれている^{1)~7)}。今回われわれは、担癌生体での細胞性免疫能を評価する目的で消化器癌患者の末梢血に対し flow cytometry を用い、two color 解析に加えて three color 解析を行い、従来は helper/inducer T と認識していたリンパ球を、helper T, helper inducer T, suppressor inducer T の各サブセットに、さらに lymphokine activated killer (以下、LAK) cell を natural killer (以下、NK) cell 由来の NK-LAK cell と T cell 由来の T-LAK cell に分類し検討を行ったので報告する。

対象および方法

1. 対象

1993年1月から1994年12月までの間に名古屋市立大学第2外科および関連施設にて手術を施行した消化器

癌患者と非担癌患者を対象とし、術前に化学療法、放射線療法およびステロイドの投与をうけたものは除外した。担癌患者は73例(年齢27~88歳,平均62.8±10.7歳),非担癌患者は17例(年齢23~85歳,平均54.8±14.7歳)で、担癌例は男性45例,女性28例で、胃癌45例,大腸癌16例,食道癌6例,肝臓癌3例,膵臓癌3例であった。非担癌例は男性10例,女性7例で、胆石7例,鼠径ヘルニア4例,毛巣洞,十二指腸腺腫,脾嚢腫,脾腫,胃平滑筋腫,後腹膜神経節細胞腫各1例ずつであった。さらに胃癌患者45例を臨床病期によりI, II期群23例とIII, IV期群22例に、大腸癌患者16例をI, II期群8例とIII, IV, V期群8例の2群に分け病期の進行による推移の検討対象とした。

2. 方法

術前に採取した ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 加末梢血を直ちに50 μ l ずつ分注し、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識, phycoerythrin (PE), peridinin chlorophyll protein (PerCP) で標識したモノクローナル抗体を各10 μ l 加え、4°Cにおいて30分間反応させた。

使用した抗体はCD3(Leu4), HLA-DR, CD4(Leu3

<1996年2月14日受理>別刷請求先: 隅田 英典

〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1-1 名古屋

市立大学医学部第2外科

Table 1 Lymphocyte subsets and monoclonal antibodies

pan T	CD3(+)
activated T	CD3(+)/HLA-DR(+)
suppressor/cytotoxic T	CD4(-)/CD8(+)
suppressor T	CD8(+)/CD11b(+)
cytotoxic T	CD8(+)/CD11b(-)
helper/inducer T	CD4(+)/CD8(-)
helper T	CD4(+)/CD45R(-)/Leu8(-)
helper inducer T	CD4(+)/CD45R(-)/Leu8(+)
suppressor inducer T	CD4(+)/CD45R(+)/Leu8(+)
NK cell {most lytic activity}	CD57(-)/CD16(+)
NK cell {moderate lytic activity}	CD57(+)/CD16(+)
NK cell {minimal lytic activity}	CD57(+)/CD16(-)
NK-LAK cell	CD3(-)/CD16(+)/CD56(+)
T-LAK cell	CD3(+)/CD16(-)/CD56(+)

NK : natural killer, LAK : lymphokine activated killer

a), CD8(Leu2a), CD11b(Leu15), CD45R(Leu18), Leu8, CD57(Leu7), CD16(Leu11c), CD56(Leu19) (Becton Dickinson 社) であり, **Table 1** の組合せで two color および three color staining を行った。反応後, 塩化アンモニウム溶剤 (FACS lysing solution, Becton Dickinson 社) (37°C, 10分) で溶血させ,

0.1%NaN₃加 phosphate-buffered saline(以下, PBS)にて洗浄し, 0.5%paraformaldehyde加 PBS 0.6ml中に再浮遊させ, flow cytometry用の検体とした。

flowcytometerはBecton Dickinson社製FACS-canを使用し, 得られた細胞集団に対し forward light scatter (FSC) と side light scatter (SSC) によりお

Table 2 Phenotypes of PBMC from non-cancer and gastroenterological cancer patients

	non-cancer (n=17)	cancer (n=73)
age	54.8±14.7	62.8±10.7
CD3(+){pan T}%	65.7±6.26	63.4±12.5
CD3(+)/HLA-DR(+){activated T}%	15.7±5.66	19.0±8.86
CD4(-)/CD8(+){suppressor/cytotoxic T}%	25.4±7.15	26.7±7.48
CD8(+)/CD11b(+){suppressor T}%	4.50±1.34	6.44±3.22
CD8(+)/CD11b(-){cytotoxic T}%	17.1±8.29	19.7±7.27
CD4(+)/CD8(-){helper/inducer T}%	34.2±7.05	35.8±9.59
CD4(+)/CD45R(-)/Leu8(-){helper T}%	7.31±1.97	7.90±2.89
CD4(+)/CD45R(-)/Leu8(+){helper inducer T}%	14.7±4.23	15.0±4.69
CD4(+)/CD45R(+)/Leu8(+){suppressor inducer T}%	12.2±4.42	13.2±6.99
CD4/CD8 ratio	1.61±0.93	1.47±0.59
natural killer cell%	25.0±5.39	31.5±10.8*
CD57(-)/CD16(+){most lytic activity}%	2.84±1.85	4.18±3.81
CD57(+)/CD16(+){moderate lytic activity}%	12.2±5.70	14.6±8.83
CD57(+)/CD16(-){minimal lytic activity}%	10.0±4.56	12.8±8.22
CD57(-)/CD16(+)/NK cell ratio	0.11±0.06	0.13±0.10
CD57(+)/CD16(+)/NK cell ratio	0.48±0.18	0.46±0.18
CD57(+)/CD16(-)/NK cell ratio	0.41±0.19	0.41±0.21
CD3(-)/CD16(+)/CD56(+){NK-LAK cell}%	13.8±6.90	17.6±9.42
CD3(+)/CD16(-)/CD56(+){T-LAK cell}%	5.46±4.05	4.17±3.33

* : p<0.05, PBMC : peripheral blood mononuclear cells, NK : natural killer, LAK : lymphokine activated killer

のこのリンパ球集団を gating した。解析方法は negative control 群における蛍光強度を設定し、それ以上の蛍光強度をもつ細胞群を陽性とし、全リンパ球に対する陽性細胞の比率を求めた。測定値は平均値±標準偏差で示し、有意差検定には Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 非担癌患者と担癌患者の対比

a. 消化器癌患者との対比

CD8 (+) CD11b (+) [suppressor T]% において、消化器癌患者の平均 $6.44 \pm 3.22\%$ は非担癌患者の平均 $4.50 \pm 1.34\%$ に比べ高値となる傾向を認めた ($p = 0.0533$)。NK cell% において、消化器癌患者の平均 $31.5 \pm 10.8\%$ は非担癌患者の平均 $25.0 \pm 5.39\%$ に比べ有意に高値であった (Table 2)。

b. 胃癌患者との対比

CD8 (+) CD11b (+) [suppressor T]% において、胃癌患者の平均 $6.91 \pm 3.23\%$ は非担癌患者の平均 $4.50 \pm 1.34\%$ に比べ有意に高値であった。また NK cell% においても、胃癌患者の平均 $32.3 \pm 11.8\%$ は非担癌患者の平均 $25.0 \pm 5.39\%$ に比べ有意に高値であった (Table 3)。

c. 大腸癌患者との対比

CD3 (+) HLA-DR (+) [activated T]% において、大腸癌患者の平均 $19.4 \pm 6.18\%$ は非担癌患者の平均 $15.7 \pm 5.66\%$ に比べ高値となる傾向を認めた ($p = 0.0825$) (Table 4)。

2. 病期の進行による推移

a. 胃癌患者

CD3 (+) HLA-DR (+) [activated T]% において、III, IV期群の平均 $19.3 \pm 6.60\%$ は I, II期群の平均 $13.9 \pm 6.96\%$ に比べ有意に高値であった。また CD4 (-) CD8 (+) [suppressor/cytotoxic T]% においても、III, IV期群の平均 $28.9 \pm 8.57\%$ は I, II期群の平均 $23.7 \pm 6.28\%$ に比べ有意に高値であった。CD4 (-) CD8 (+) [suppressor/cytotoxic T] のサブセットである CD8 (+) CD11b (+) [suppressor T]% および CD8 (+) CD11b (-) [cytotoxic T]% において、それぞれ高値となる傾向を認めた ($p = 0.0745$, $p = 0.0624$)。NK cell サブセットでは活性の弱い CD57 (+) CD16 (-)^{8)~10)}/NK cell ratio において、III, IV期群の平均 0.45 ± 0.22 は I, II期群の平均 0.33 ± 0.19 に比べ高値となる傾向を認めた ($p = 0.0530$)。CD3 (+) CD16 (-) CD56 (+) [T-LAK

Table 3 Phenotypes of PBMC from non-cancer and gastric cancer patients

	non-cancer (n=17)	cancer (n=45)
age	54.8±14.7	62.2±11.7
CD3(+)[pan T]%	65.7±6.26	60.8±13.7
CD3(+)/HLA-DR(+)[activated T]%	15.7±5.66	16.5±7.24
CD4(-)CD8(+)[suppressor/cytotoxic T]%	25.4±7.15	26.4±7.93
CD8(+)/CD11b(+)[suppressor T]%	4.50±1.34	6.91±3.23*
CD8(+)/CD11b(-)[cytotoxic T]%	17.1±8.29	19.0±7.60
CD4(+)/CD8(-)[helper/inducer T]%	34.2±7.05	34.7±11.2
CD4(+)/CD45R(-)/Leu8(-)[helper T]%	7.31±1.97	7.51±2.76
CD4(+)/CD45R(-)/Leu8(+)[helper inducer T]%	14.7±4.23	14.1±4.79
CD4(+)/CD45R(+)/Leu8(+)[suppressor inducer T]%	12.2±4.42	13.8±8.04
CD4/CD8 ratio	1.61±0.93	1.44±0.67
natural killer cell%	25.0±5.39	32.3±11.8*
CD57(-)/CD16(+)[most lytic activity]%	2.84±1.85	4.08±3.22
CD57(+)/CD16(+)[moderate lytic activity]%	12.2±5.70	15.6±9.67
CD57(+)/CD16(-)[minimal lytic activity]%	10.0±4.56	12.6±9.01
CD57(-)/CD16(+)/NK cell ratio	0.11±0.06	0.13±0.09
CD57(+)/CD16(+)/NK cell ratio	0.48±0.18	0.47±0.18
CD57(+)/CD16(-)/NK cell ratio	0.41±0.19	0.40±0.21
CD3(-)/CD16(+)/CD56(+)[NK-LAK cell]%	13.8±6.90	18.9±10.2
CD3(+)/CD16(-)/CD56(+)[T-LAK cell]%	5.46±4.05	3.83±3.61

* : $p < 0.05$, PBMC : peripheral blood mononuclear cells, NK : natural killer, LAK : lymphokine activated killer

Table 4 Phenotypes of PBMC from non-cancer and colon cancer patients

	non-cancer (n=17)	cancer (n=16)
age	54.8±14.7	62.4±8.72
CD3(+) [pan T]%	65.7±6.26	65.5±10.3
CD3(+)HLA-DR(+) [activated T]%	15.7±5.66	19.4±6.18
CD4(-)CD8(+) [suppressor/cytotoxic T]%	25.4±7.15	26.7±7.26
CD8(+)CD11b(+) [suppressor T]%	4.50±1.34	5.46±3.21
CD8(+)CD11b(-) [cytotoxic T]%	17.1±8.29	21.3±6.90
CD4(+)CD8(-) [helper/inducer T]%	34.2±7.05	36.2±5.91
CD4(+)CD45R(-)Leu8(-) [helper T]%	7.31±1.97	7.95±3.16
CD4(+)CD45R(-)Leu8(+) [helper inducer T]%	14.7±4.23	16.3±4.55
CD4(+)CD45R(+)Leu8(+) [suppressor inducer T]%	12.2±4.42	12.0±4.57
CD4/CD8 ratio	1.61±0.93	1.48±0.48
natural killer cell%	25.0±5.39	28.8±7.99
CD57(-)CD16(+) [most lytic activity]%	2.84±1.85	4.67±5.86
CD57(+)CD16(+) [moderate lytic activity]%	12.2±5.70	12.9±6.52
CD57(+)CD16(-) [minimal lytic activity]%	10.0±4.56	11.2±6.19
CD57(-)CD16(+)/NK cell ratio	0.11±0.06	0.15±0.15
CD57(+)CD16(+)/NK cell ratio	0.48±0.18	0.44±0.18
CD57(+)CD16(-)/NK cell ratio	0.41±0.19	0.41±0.23
CD3(-)CD16(+)CD56(+) [NK-LAK cell]%	13.8±6.90	15.1±8.50
CD3(+)CD16(-)CD56(+) [T-LAK cell]%	5.46±4.05	4.20±2.77

* : p<0.05, PBMC : peripheral blood mononuclear cells, NK : natural killer,
LAK : lymphokine activated killer

Table 5 Phenotypes of PBMC from stage I, II and III, IV gastric cancer patients

	I, II (n=23)	III, IV (n=22)
age	63.0±12.3	61.5±11.4
CD3(+) [pan T]%	57.1±16.3	64.8±8.56
CD3(+)HLA-DR(+) [activated T]%	13.9±6.96	19.3±6.60*
CD4(-)CD8(+) [suppressor/cytotoxic T]%	23.7±6.28	28.9±8.57*
CD8(+)CD11b(+) [suppressor T]%	5.98±2.30	7.76±3.83
CD8(+)CD11b(-) [cytotoxic T]%	16.9±6.79	21.1±7.94
CD4(+)CD8(-) [helper/inducer T]%	36.1±12.2	33.7±10.6
CD4(+)CD45R(-)Leu8(-) [helper T]%	8.13±2.99	7.01±2.52
CD4(+)CD45R(-)Leu8(+) [helper inducer T]%	14.8±5.46	13.4±3.99
CD4(+)CD45R(+)Leu8(+) [suppressor inducer T]%	14.3±7.56	13.3±8.67
CD4/CD8 ratio	1.62±0.62	1.31±0.69
natural killer cell%	31.2±10.4	33.4±13.2
CD57(-)CD16(+) [most lytic activity]%	4.48±2.98	3.67±3.47
CD57(+)CD16(+) [moderate lytic activity]%	16.2±8.42	15.1±11.0
CD57(+)CD16(-) [minimal lytic activity]%	10.6±8.02	14.7±9.67
CD57(-)CD16(+)/NK cell ratio	0.15±0.09	0.11±0.08
CD57(+)CD16(+)/NK cell ratio	0.52±0.16	0.44±0.19
CD57(+)CD16(-)/NK cell ratio	0.33±0.19	0.45±0.22
CD3(-)CD16(+)CD56(+) [NK-LAK cell]%	19.7±9.21	18.1±11.2
CD3(+)CD16(-)CD56(+) [T-LAK cell]%	2.85±2.73	4.81±4.16

* : p<0.05, PBMC : peripheral blood mononuclear cells, NK : natural killer,
LAK : lymphokine activated killer

cell%)において, III, IV期群の平均 $4.81 \pm 4.16\%$ は I, II期群の平均 $2.85 \pm 2.73\%$ に比べ高値となる傾向を認めた ($p=0.0722$) (Table 5).

b. 大腸癌患者

NK cell サブセットのうち中間の活性を示す CD57(+)/CD16(+) [moderate lytic activity]⁸⁾⁻¹⁰⁾% において, III, IV, V期群の平均 $15.8 \pm 7.02\%$ は I, II期群の平均 $9.92 \pm 4.68\%$ に比べ高値となる傾向を認めた ($P=0.0692$) (Table 6).

考 察

担癌生体の末梢血リンパ球サブセットは, single color 解析の時代より, CD3, CD4, CD8細胞を中心にすすめられてきた。CD3 (+) 細胞は, 成熟 T 細胞のほか一部 NK 細胞を標識するが, 大半は α 鎖, β 鎖をヘテロダイマーとする T 細胞からなり¹¹⁾, 癌の進展によっても有意な変動は認めなかったとする報告や¹²⁾⁻¹⁴⁾, 有意に低下したとする報告もみられる¹⁵⁾⁻¹⁹⁾。CD4 (+), CD8 (+) 細胞は, それぞれ主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; 以下, MHC) のクラス II およびクラス I を抗原レセプターとし, single color 解析の時代は, それぞれ helper

T 細胞および suppressor T 細胞の指標と考えられ, 担癌生体では一般的に CD4 (+) 細胞の減少と CD8 (+) 細胞の増加, それに伴い CD4/CD8 比の減少を示すことが多く, 癌の進展に伴い顕著になるといわれている¹¹⁾¹⁶⁾¹⁸⁾⁻²²⁾。今回 flow cytometry を用いてリンパ球表面抗原の two color および three color 解析を行い, 消化器癌患者の末梢血リンパ球サブセットをより詳細に検討した。

CD3 (+) 細胞は, 分子量 27.36Kd のヒト組織適合性抗原である HLA-DR 抗原を有することにより activated T 細胞 (CD3 (+) HLA-DR (+)) と分類され, T 細胞の活性化を伴うような免疫異常疾患や臓器移植患者などの病態の把握や治療および予後の判定に有用とされている²³⁾⁻²⁷⁾。今回の検討においても, 大腸癌患者では非担癌患者に比べ activated T 細胞が増加する傾向を認め ($p=0.0825$), また胃癌患者では病期の進行により有意に増加しており, 担癌状態および癌の進展に伴うなんらかの免疫異常により T 細胞が活性化されていることが示唆された。

CD8 (+) 細胞は, suppressor/cytotoxic T という異なった細胞集団よりなり, C3bi レセプター (CR3)

Table 6 Phenotypes of PBMC from stage I, II and III, IV, V colon cancer patients

	I, II (n=8)	III, IV, V (n=8)
age	64.4±9.96	60.5±7.43
CD3(+)(pan T)%	64.7±13.8	66.3±5.90
CD3(+)/HLA-DR(+)(activated T)%	17.1±6.60	21.6±5.17
CD4(-)/CD8(+)(suppressor/cytotoxic T)%	25.9±8.94	27.6±5.60
CD8(+)/CD11b(+)(suppressor T)%	4.30±2.54	6.69±3.52
CD8(+)/CD11b(-)(cytotoxic T)%	21.6±9.14	20.9±4.25
CD4(+)/CD8(-)(helper/inducer T)%	37.4±6.73	34.8±4.97
CD4(+)/CD45R(-)/Leu8(-)(helper T)%	8.74±3.83	7.05±2.10
CD4(+)/CD45R(-)/Leu8(+)(helper inducer T)%	16.8±4.33	15.7±5.06
CD4(+)/CD45R(+)/Leu8(+)(suppressor inducer T)%	11.8±4.90	12.1±4.53
CD4/CD8 ratio	1.58±0.52	1.37±0.45
natural killer cell%	26.3±9.35	31.3±5.90
CD57(-)/CD16(+)(most lytic activity)%	6.18±8.18	3.19±1.18
CD57(+)/CD16(+)(moderate lytic activity)%	9.92±4.68	15.8±7.02
CD57(+)/CD16(-)(minimal lytic activity)%	10.2±5.87	12.3±6.70
CD57(-)/CD16(+)/NK cell ratio	0.19±0.20	0.10±0.05
CD57(+)/CD16(+)/NK cell ratio	0.39±0.17	0.50±0.19
CD57(+)/CD16(-)/NK cell ratio	0.42±0.26	0.40±0.21
CD3(-)/CD16(+)/CD56(+)(NK-LAK cell)%	14.3±10.7	16.1±5.80
CD3(+)/CD16(-)/CD56(+)(T-LAK cell)%	3.50±1.96	5.00±3.46

PBMC: peripheral blood mononuclear cells, NK: natural killer, LAK: lymphokine activated killer

上に発現される分子量160KdのCD11b抗原の有無により免疫に抑制的に働く suppressor T細胞(CD8(+), CD11b(+))と細胞障害に働く cytotoxic T細胞(CD8(+), CD11b(-))に分類される^{28)~30)}。またCD4(+), CD8(-)細胞は, helper/inducer Tという異なった細胞集団よりなり, さらに非特異的な細胞をエフェクターに誘導する inducer T細胞は, リンパ球の調節機能をする helper inducer T細胞と suppressor T細胞を成熟, 活性化するといわれる suppressor inducer T細胞³¹⁾に分類される。CD45R抗原は, 分子量220Kdの白血球表面抗原で, 末梢血T細胞, B細胞, 顆粒球, 単球に存在し, three color解析によればCD4(+), CD45R(+), CD8(-)細胞のうち分子量80Kdの白血球表面抗原である Leu8抗原を有する細胞に強いサプレッサー活性があり, CD4(+), CD45R(-)細胞のうち Leu8抗原の存在しない細胞に helper T細胞が含まれ, Leu8抗原を有する細胞に helper 前駆細胞を分化させる helper inducer T細胞が含まれることが示されている³²⁾³³⁾。これより, CD4(+), CD8(-)細胞は helper T細胞(CD4(+), CD45R(-), Leu8(-)), helper inducer T細胞(CD4(+), CD45R(-), Leu8(+)), suppressor inducer T細胞(CD4(+), CD45R(+), Leu8(+))に分類される。

今回の検討の結果, T細胞サブセットの構成は, 非担癌患者と担癌患者との間および病期の進行に伴い種々の変化を示した。消化器癌患者なかでも胃癌患者では, 非担癌患者に比べ suppressor T細胞(CD8(+), CD11b(+))が有意に増加しており, さらに病期の進行により増加する傾向を認めた($p=0.0745$)。CD4(+), CD8(-) (helper/inducer T)細胞には差異は認められなかったものの, 胃癌患者および大腸癌患者では病期の進行に伴い helper T細胞および helper inducer T細胞の減少傾向が認められた。すなわち, 担癌状態および癌の進展に伴い, CD4(+), CD8(-)細胞系も suppressor 優位に shift していた。片山ら³⁴⁾は, 肺癌患者の末梢血の two color 解析にて, inducer T細胞(CD4(+), Leu8(+))を suppressor inducer T細胞(CD4(+), CD45R(+), Leu8(+))と同義としてとらえ, 進行肺癌患者では suppressor inducer T細胞の増加を認めると報告しているが, 今回の three color 解析による検討においては, inducer T細胞のうち helper inducer T細胞は逆に癌の進展により減少傾向を認めた。以上より, 担癌生体では末梢血中の細胞障害機能やヘルパー機能およびそれを誘導する機能

を有する担当細胞が減少し, さらに抑制細胞が増加することにより, 免疫機能の低下が生じているものと考えられた。

担癌生体の免疫機能を検討する場合, 癌が抗原性に乏しいことから特異的な免疫担当細胞の評価だけでは不十分であり非特異的な免疫担当細胞であるNK細胞やLAK細胞の動向についても考えることは重要である。NK細胞は当初, 癌に対する生体の免疫監視機構との関連性が強調されたが, 後の研究で, その活性発現に自己のMHC産生による拘束性を必要とせず非特異的な抗腫瘍作用や, 転移を抑制する効果を示すといわれている³⁵⁾³⁶⁾。NK細胞は多様な形態を示し, 特異的なマーカーを持たないことから, 特定の標的細胞に対するNK細胞の障害性をNK活性として求められており, 癌の進展によりこのNK活性は低下するといわれている^{37)~40)}。この原因については, NK細胞を形態的にとらえることが不能なため不明な点が多かったが, Aboら^{8)~10)}は, NK細胞は分化, 成熟の段階で表面抗原が変化し, NK活性の上昇と相関することを明らかにし, 抗CD57(Leu7)および抗CD16(Leu11)を用いたtwo color解析により, NK細胞を3つの成熟段階に分類した。つまりCD57(-), CD16(+)細胞は成熟型で最も強い活性を示すのに対し, CD57(+), CD16(-)細胞は未熟型で最も弱い活性を示し, CD57(+), CD16(+)細胞をこの中間型とした。今回の検討ではNK細胞は, 胃癌患者を主に消化器癌患者全般にわたり非担癌患者よりも有意に増加しており, また病期の進行により胃癌患者では, 活性の弱いCD57(+), CD16(-)^{8)~10)}/NK cell ratioが増加する傾向を認め ($p=0.0722$)。大腸癌患者では中間の活性を示すCD57(+), CD16(+)細胞が増加する傾向を認めた ($p=0.0692$)。すなわち担癌状態および癌の進展に伴いNK細胞は増殖されるが, 癌の進展によりその成熟分化過程が十分に機能しないためNK活性の低下をきたすものと推測された。

一方, LAK細胞は末梢血リンパ球をInterleukin 2(IL-2)とともに培養することによって, 腫瘍非特異的に自己の固形癌に対して抗腫瘍活性を示すエフェクターとして誘導されることがGrimmら⁴¹⁾により報告されて以来, adoptive immunotherapyの代表として臨床的検討が行われてきた。LAK活性を有するエフェクター細胞とその前駆細胞はともにいくつかの異なる細胞集団よりなるが, これらはNK細胞とT細胞に局限し, NK細胞にもT細胞にも属さない独自の

LAK細胞は存在しないといわれている⁴²⁾⁴³⁾。Saitoら⁴⁴⁾はモノクローナル抗体を用い、CD3(-)分画のCD56(NKH-1)(+)CD16(+)およびCD3(+)分画のCD56(NKH-1)(+)に強いLAK活性を認めたと報告し、またPhillipsら⁴⁵⁾はCD3(+)CD56(NKH-1)(+)のT分画とCD3(-)CD56(NKH-1)(+)のNK分画にLAK活性が認められると報告している。これよりLAK細胞をNK細胞由来のNK-LAK細胞(CD3(-)CD16(+)CD56(+))とT細胞由来のT-LAK細胞(CD3(+)CD16(-)CD56(+))に分類し検討すると、胃癌患者において、病期の進行に伴いT-LAK細胞が増加する傾向が認められた($p=0.0722$)。Cohenら⁴⁶⁾は、LAK・IL-2療法を施行された患者で腫瘍が退縮している組織においてはCD8(+)T細胞が浸潤しているがCD16(+)NK細胞の浸潤は認められないことより、生体ではT細胞が主なエフェクター細胞であると報告しており、今回の検討の結果はこの報告を裏付けるものと考えられた。よって adoptive immunotherapy としてのLAK療法は、T細胞由来のLAK細胞を培養することが効果的であると思われた。

従来、2次元でのtwo color解析では分類不能であったリンパ球サブセットに対し、新たに3次元でのthree color解析を加えることにより、より詳細なサブセットの分類が可能となった。Three color flow cytometryを用いた末梢血リンパ球サブセットの検討は、術前の担癌状態、さらには術後の免疫機能を評価するうえにおいても簡潔かつ客観的な検査法であり有用と思われた。

本論文の要旨は第45回日本消化器外科学会総会(1995年2月、横浜)にて発表した。

文 献

- 1) Pillai MR, Balaram P, Padmanabham TK et al: Immunocompetence in lung cancer. Relationship to extent of tumor burden and histologic type. *Cancer* 64: 1853-1858, 1989
- 2) 小川泰史: 胃癌患者における非特異的免疫能に関する臨床的研究—リンパ球幼若化反応の評価と意義—. *日臨外医会誌* 45: 1016-1033, 1984
- 3) Farinas MC, Rodriguez-Valverde V, Zarateitia MT et al: Contribution of monocytes to the decreased lymphoproliferative responses to phytohemagglutinin in lung cancer. *Cancer* 68: 1279-1284, 1991
- 4) Krant MJ, Manskopf G, Brandrup CS et al: Immunologic alterations in bronchogenic cancer. *Cancer* 21: 623-631, 1968
- 5) Dent RG, Cole P: In vitro monocyte maturation in squamous carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 43: 486-495, 1981
- 6) McCluskey DR, Roy AD, Martin WMC et al: T lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 47: 307-309, 1983
- 7) Orita K, Miwa H, Fukuda H et al: Preoperative cell-mediated immune status gastric cancer patients. *Cancer* 38: 2343-2348, 1976
- 8) Abo T, Miller CA, Balch CM: Characterization of human granular lymphocyte subpopulations expressing HNK-1 (leu 7) and Leu-11 antigens in the blood lymphoid tissues from fetuses, neonates and adults. *Eur J Immunol* 14: 616-623, 1984
- 9) 安保 徹: モノクローナル抗体を用いたヒトNK細胞の解析. *最新医* 39: 51-55, 1984
- 10) 安保 徹: NK細胞のマーカー—その多様性の理由—. *代謝* 20: 1423-1430, 1983
- 11) Clevers H, Alarcon B, Wileman T et al: The T cell receptor/CD3 complex: A dynamic protein ensemble. *Ann Rev Immunol* 6: 629-635, 1988
- 12) 西山 潔: 各種免疫機能検査からみた、大腸癌のImmune statusに関する研究. *日外会誌* 80: 512-526, 1979
- 13) 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の総合的検討. *日臨外医会誌* 45: 689-705, 1984
- 14) 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
- 15) 中島芳道, 秋元 実, 岩崎秀康ほか: 乳癌および消化器癌末期患者の末梢血リンパ球分画の検討. *癌の臨* 32: 1925-1928, 1989
- 16) 竹下正昭, 大和田進, 中村正治ほか: 胃癌患者の免疫能—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—. *日外会誌* 88: 947-954, 1987
- 17) 江里口直文, 内藤寿則, 鎌先清一郎ほか: 胃癌患者における免疫学的指標の検討. *日消外会誌* 18: 918-921, 1985
- 18) 青木克憲, 今野弘之, 西野暢彦ほか: 胃癌切除例における非特異的細胞性免疫能の推移. *外科と代謝・栄* 25: 58-67, 1991
- 19) 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—特に末梢血リンパ球のT-cell subsets, Interleukin-2について—. *日外会誌* 91: 52-61, 1990
- 20) Pierri I, Scudeletti M, Rogna S et al: Immunocompetence in lung cancer patients: Anal-

- ysis of serological and cellular parameters. *Cancer Detect Prevent* 13 : 95—110, 1988
- 21) Masuno T, Ikeda T, Yokota S et al: Immunoregulatory T-lymphocyte functions in patients with small cell lung cancer. *Cancer Res* 46 : 4195—4199, 1986
 - 22) Venkataraman M, Roa DS, Lyer BS et al: The functional deficiency of B lymphocytes in patients with lung cancer is due to inadequate T-cell help and excessive suppression by T and non-T cells. *Cancer Invest* 7 : 7—16, 1989
 - 23) Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M et al: Evolution conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med* 153 : 310—323, 1981
 - 24) Kan EAR, Wang CY, Evans RL: Non-covalently bonded subunits of 22 and 28Kd are rapidly internalized by T cells reacted with anti-Leu-4 antibody. *J Immunol* 131 : 536—539, 1983
 - 25) Kaneoka H, Peres-Rojas G, Sasasaki T et al: Human T lymphocyte proliferation induced by a pan-T monoclonal antibody (anti-Leu-4): Heterobeneity of response is a function of monocytes. *J Immunol* 131 : 158—164, 1983
 - 26) Lampson LA, Levy R: Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol* 125 : 293—299, 1980
 - 27) Yu DTY, Winchester RJ, Fu SM et al: Peripheral blood Ia-positive cells. Increased in certain diseases and after immunization. *J Exp Med* 151 : 91—100, 1980
 - 28) Landay A, Gartland L, Clement LT: Characterization of a phenotypically distinct Leu-2⁺ cells that suppresses T cell proliferative responses. *J Immunol* 131 : 2757—2761, 1983
 - 29) Clement LT, Grossi CE, Gartland GL: Morphologic and phenotypic features of the subpopulation of Leu-2⁺ cells that suppresses B cell differentiation. *J Immunol* 133 : 2461—2468, 1984
 - 30) Gebel HM, Kaizer H, Landay AL: Characterization of circulating suppressor T lymphocytes in bone marrow transplant recipients. *Transplantation* 43 : 258—263, 1987
 - 31) Morimoto C, Letvin NL, Distoso JA: The isolation human suppressor inducer T cell subset. *J Immunol* 134 : 1508—1515, 1985
 - 32) Morimoto C, Steinberg AD, Letvin NL et al: A defect of immunoregulatory T cell subsets in systemic lupus erythematosus patients demonstrated with anti-2H4 antibody. *J Clin Invest* 79 : 762—768, 1987
 - 33) Damle NK, Childs AL, Doyle LV et al: Immunoregulatory T lymphocytes in man. soluble antigen-specific suppressor-inducer T lymphocytes are derived from the CD4⁺ CD45R⁻ p80⁺ subpopulation. *J Immunol* 139 : 1501—1508, 1987
 - 34) 片山良彦: 肺癌患者の末梢血および胸腺中リンパ球の解析. *名古屋市大医学会誌* 45 : 143—160, 1994
 - 35) Uchida A, Mickshe M: Lysis of fresh human tumor cells by autologous large granular lymphocytes from peripheral blood and pleural effusions. *Int J Cancer* 32 : 37—44, 1983
 - 36) Hanna N, Burton RC: Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J Immunol* 127 : 1754—1758, 1981
 - 37) Pross HF, Baines MG: Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells I. The effect of malignant disease. *Int J Cancer* 18 : 593—604, 1976
 - 38) Kadish AS, Doyle AT, Steinhauer EH et al: Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: Deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease. *J Immunol* 127 : 1817—1822, 1981
 - 39) Sibbit WR Jr, Bankhurst AD, Jumoville AJ et al: Defects in natural killer cell activity and interferon response in human lung carcinoma and malignant melanoma. *Cancer Res* 44 : 852—856, 1984
 - 40) LeFever AV, Funahashi A: Phenotype and function of natural killer cells in patients with bronchogenic carcinoma. *Cancer Res* 51 : 5596—5601, 1991
 - 41) 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 at blood lymphocytes. *J Exp Med* 155 : 1823—1841, 1982
 - 42) Ortaldo JR, Mason A, Overton R: Lymphokine-activated killer cells. Analysis of progenitors and effectors. *J Exp Med* 164 : 1193—1198, 1986
 - 43) 押味和夫: LAK細胞の多様性. *臨免疫* 21 : 633—642, 1989
 - 44) Saito H, Oshimi K, Oshimi Y et al: Characterization of interleukin 2-expanded human peripheral blood lymphocytes: Not only NKH-

- 1⁺NK cells but also NKH-1⁺ and NKH-1⁻T cells are LAK effecters. *Cell Immunol* 117 : 253—263, 1988
- 45) Phillips JH, Lanier LL: Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocyte to cytotoxicity. *J Exp Med* 164 : 814—818, 1986
- 46) Cohen PJ, Lotze MT, Roberts JR et al: The immunopathology of sequential tumor biopsies in patients treated with interleukin 2. Correlation of response with T-cell infiltration and HLA-DR expression. *Am J Pathol* 129 : 208—214, 1987

Studies on the Lymphocyte Subsets of the Patients with Gastroenterological Cancer by Use of Three Color Flow Cytometry

Hidenori Sumida, Makoto Kataoka, Yoshiyuki Kuwabara, Hiroyuki Kawamura, Masami Mitani, Atsushi Satou, Kouji Hattori, Naoki Nishiwaki, Kouichirou Nakano, Masahiro Kimura, Kiyoshi Narita, Hiroshi Koyama, Takehiro Katou and Akira Masaoka
The Second Department of Surgery, Nagoya City University Medical School

In order to assess the immune activity in cancer patients, the lymphocyte subsets of 73 gastroenterological cancer (45 gastric cancer, 16 colon cancer, 6 esophageal cancer, 3 hepatoma, 3 pancreatic cancer) patients and 17 non-cancer patients were analyzed with monoclonal antibodies. In T cells, CD3 (+) HLA-DR (+) (activated T) cells and CD8 (+) CD11b (+) (suppressor T) cells tended to increase in cancer patients and with advance in stage. Natural killer (NK) cells increased in cancer patients and in the subsets of NK cells, CD57 (+) CD16 (-) [minimal lytic activity] cells and CD57 (+) CD16 (+) [moderate lytic activity] cells tended to increase with advance in stage. Lymphokine activated killer (LAK) cells and an increase in CD3 (+) CD16 (-) CD56 (+) (T-LAK) cells tended to increase with advance in stage.

Reprint requests: Hidenori Sumida The Second Department of Surgery, Nagoya City University Medical School
1-1 Aza-Kawasumi Kawasumi-cho, Mizuho-ku, Nagoya City, 467, JAPAN
