肺癌患者の末梢血，局所リンパ節および腫瘍浸潤リンパ球の自己腫瘍細胞傷害活性の研究

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 荒能, 義彦
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8525

肺癌患者の末梢血，局所リンパ節および腫瘍浸潤リンパ球の自己腫瘍細胞傷害活性の研究

金沢大学医学部外科学第一講座（主任：渡辺洋宇教授）
荒　能　義　彦

肺癌患者における全身免疫能および局所免疫能のより正確な評価を目的として，採取直後に分離されたリンパ球と自己腫瘍 (autologous tumor, AT) を用い，抗腫瘍活性についての基礎的研究を行った．肺癌患者の末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte, PBL)，領域リンパ節リンパ球 (regional lymph node lymphocyte, RLNL)，腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte, TIL) を採取し，AT に対する細胞傷害 (autologous tumor killing, ATK) 活性ならびにそれぞれのリンパ球亜群の変動について検討した (本研究では，生体外環境の影響を少なくするため，検体採取から測定までの時間を特に短くすることに留意した)．PBL の ATK 活性と RLNL, TIL の ATK 活性に関連は認められなかった．また，ATK 活性と同種肺癌細胞株に対する傷害活性には相関がなかった．PBL の ATK 活性は病期の進行およびリンパ節転移により低下し，RLNL のそれはリンパ節転移により低下した．また，TIL の ATK 活性と癌の進行とに関連は認められなかった．健常対照群と肺癌患者の PBL のリンパ球亜群の比較から，肺癌患者では担癌初期から細胞傷害性T細胞が減少し，サプレッサーT細胞が増加しており，癌に対する全身の免疫反応が初期から生じていることが示された．RLNL ではリンパ節転移の進展により，ヘルパーT細胞，細胞傷害性T細胞，活性化T細胞が減少し，サプレッサーインデュサーT細胞が増加していた．ATK 活性とリンパ球亜群の検討から，PBL では CD16 陽性，CD57 陽性のナチュラルキラー細胞が，RLNL, TIL では細胞傷害性T細胞が主な作働細胞であることが示された．また，RLNL, TIL ではサプレッサーインデュサーT細胞が抗腫瘍活性を抑制していることが示唆された．以上の成績から，ATK 活性は腫瘍に特異的な免疫反応であること，全身の抗腫瘍活性と局所の抗腫瘍活性には関連がないことが明らかにされた．また，リンパ節におけるリンパ球亜群の測定が，リンパ節での抗腫瘍活性の推測に有用であることが示唆された．

Key words lung cancer, autologous tumor killing activity, peripheral blood lymphocyte, regional lymph node lymphocyte, tumor infiltrating lymphocyte

近年，増加傾向のみられる肺癌は，外科的切除，化学療法，放射線療法などの集学的治療が試みられているにも関わらず，その予後は極めて不良である．その要因として，肺癌患者では他臓器癌患者に比べ宿主の全身および局所の免疫能が著明に低下していることがあげられ，そのために潜在的に全身転移を生じ易く，その結果，遠隔成績を不良にしている．

このように低下している全身或は局所リンパ節の免疫反応を，生物学的応答修飾物質 (biological response modifier, BRM) を用いて賦活し，その生存率を向上させようとする非特異的免疫療法や，インターロイキン2 (interleukin-2, IL-2) とともに培養し誘導されたリンホカイン賦活化キラー (lymphokine activated killer, LAK) 細胞を用いた養子免疫療法 (adoptive immunotherapy, AIT) などの免疫療法が考え出され，その臨床応用が積極的に行われている．教室でも，BRM を用いた臨床比較試験[1)~5)]，LAK 細胞に対する基礎実験[6)7)]，その臨床応用としての LAK 細胞の気管支動脈内注入や胸腔内注入による局所的 AIT[8)9)] を行ない，その成果を報告してきた．

しかし，非特異的免疫療法，AIT とも極めて有効な症例がある一方で，これらの療法に全く反応しない症例も少なくない．生体外の実験では充分な抗腫瘍活性を示したにも関わらず，生体内では抗腫瘍活性を全く示さない場合もあり，生体外での実験結果と臨床効果とは必ずしも一致しないことが明らかになってきた．すなわち，培養腫瘍細胞を標的とした抗腫瘍活性は，免疫療法の効果を予測し，評価する指標としては不適当なことがわかってきた．免疫学的指標の条件としては，腫瘍特異抗原に対応した免疫反応が最も理想的である．その意味で，個々の患者での自己腫瘍 (autologous tumor, AT) に対する抗腫瘍活性に着目し，癌患者自身のリンパ球が AT に対して持つ傷害活性である，自己腫瘍細胞傷害 (autologous tumor killing, ATK) 活性が注目されるようになってきた．

本研究では，肺癌患者における ATK 活性の基礎的研究として，末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte, PBL)，所属リンパ節リンパ球 (regional lymph node lymphocyte, RLNL)，腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte, TIL) を用い，全身或は局所の腫瘍細胞傷害活性について検討した．また，二重染色を用いたリンパ球亜群の測定を行い，肺癌患者で

平成5年12月17日受付，平成6年1月19日受理

Abbreviations: AIT, adoptive immunotherapy; ANOVA, analysis of variance; AT, autologous tumor; ATK, autologous tumor killing; BRM, biological response modifier; CD, cluster of differentiation; FCS, fetal calf serum; HLA, human leukocyte antigen; HBSS, Hanks' balanced salt solution; IL-2, interleukin-2; LAK,

の全身，局所のリンパ球亜群の変動と ATK 活性との関連について検討を加えた．

対象および方法

Ⅰ．対　象

1993年1月より1993年9月までに金沢大学第1外科で手術を施行し，病理組織学的に肺癌と診断された症例のうち54例を対象とし，その末梢血，局所リンパ節および腫瘍組織を用いた．症例の内訳は，男性41例，女性13例で，年齢は40～78歳（平均64.2歳）であった．病理組織型は，腺癌25例，扁平上皮癌22例，大細胞癌4例，小細胞癌2例，混合型（腺癌＋小細胞癌）1例であった．病期分類は，肺癌取扱い規約（1987）[10]による腫瘍，リンパ節，転移（tumor-nodes-metastasis, TNM）の分類によった．同時に対照として健康成人10人の末梢血を用いた．

Ⅱ．リンパ球の分離と浮遊液の調整

1．PBL

単核球の分離はフィコール・パック比重遠心法により行った．手術当日の麻酔導入前に採取したヘパリン加末梢血 20ml を，0.1M リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）(phosphate-buffered saline, PBS) で2倍に希釈し，フィコール・パック液（比重1.077）(リンフォプレップ) (Nyegaad, Olso, Norway) 上に静かに重層させ，400×g で20分間遠心後，中間層を採取しペニシリン 200U/ml，ゲンタマイシン 10μg/ml を添加した RPMI-1640 液 (Gibco, Gran Island, New York, USA) で3回洗浄し，単核球を分離した．直径 6cm のプラスチックシャーレ (Falcon, Oxnard, California, USA) に RPMI-1640 液を薄く敷き，その上に単核球浮遊液を散布し，37℃，5%CO_2 下で1時間静置後，上清液を採取してプラスチック付着細胞を除去した．非付着細胞を 200×g で5分間遠心した後，その沈渣を非動化した牛胎児血清 (heat-inactivated fetal calf serum, FCS) (Gibco) を 10% 濃度に加えた RPMI-1640 液に浮遊させ，濃度を 1×10^6 個/ml に調整した．前もって作製した脱脂洗浄したナイロンウール（和光，大阪）を 10ml のプラスチック注射筒に詰め，2%FCS 添加 RPMI-1640 液で平衡化し 37℃ に加温したナイロンカラムに，濃度を調整した細胞浮遊液を浸透させ，37℃，5%CO_2下で1時間静置した．カラムのピンコックを開き，ナイロンウール非付着細胞を点滴状に集めこれを実験に用いる細胞浮遊液とした（これらの操作によりB細胞が除去され，T細胞成分が豊富な細胞層が得られる）．

2．RLNL

術中採取した縦隔リンパ節を PBS 中で眼科用ハサミで細切し，金属メッシュ (NBC 工業，大阪) で濾過した後，フィコール・パック比重遠心法によって単核球を分離し，PBL と同様の方法により得られた細胞を RLNL とした．各リンパ節の一部から病理組織標本を作製し，転移の有無を検索し，転移陽性のものは除外した．

3．TIL および AT

切除した肺癌組織から直ちに採取された標本を健常組織，壊死組織を除いて，PBS で2回洗浄した．0.01% ヒアルロニダーゼ (hyaluronidase type I-S, Sigma, St. Louis, USA), 0.25% コラゲナーゼ (collagenase type I-A, Sigma), 0.1% デオキシリボヌクレアーゼ (deoxyribonuclease type I, Sigma) を添加した RPMI-1640 液中で標本を眼科用ハサミで細切し，金属メッシュで濾過した．ついで細胞浮遊液を 0.25% トリプシン (trypsin) (Sigma) を 10ml 添加した PBS に浮遊させ，マグネチックスターラーにて15分間攪拌した．上清を2枚重ねのガーゼで2回濾過し，ハンクス液 (Hank's Balanced salt solution, HBSS) で2回洗浄した後，その沈渣を非動化した 10%FCS 添加 RPMI-1640 液に浮遊させた．直径 6cm のプラスチックシャーレに RPMI-1640 液をうすく 1ml 程度敷き，細胞浮遊液を加え，37℃，5%CO_2 下で1時間清置後，上清液を採取してプラスチック付着細胞を除去した．次に 10%FCS 添加 RPMI-1640 液を用いて，25%, 15%, 10% パーコール (Sigma) を作製し，それぞれ 2.5ml づつ重層し，室温，25×g で7分間遠心後，上層，下層をそれぞれ採取し，HBSS にて2回洗浄した．下層から AT を得，上層から得られた単核球を PBL と同様の方法でナイロンカラムで濾過したものを TIL とした．

Ⅲ．細胞傷害活性の測定

分離した PBL, RLNL, TIL の各リンパ球を 10%FCS 添加 RPMI-1640 液で 2×10^6 個/ml に調整し，その 100μl 宛を96穴平底型マイクロプレート (Falcon) の各穴に分注し，作働細胞 (effector cell) とした．一方，標的細胞として AT, PC-3 (NK 抵抗性ヒト肺腺癌由来培養細胞株), PC-9 (NK 抵抗性ヒト肺扁平上皮癌由来細胞培養株) を用いた．2×10^6 個/ml 濃度の標的細胞浮遊液 1ml に，200μCi の $Na_2{}^{51}CrO_4$ (200μl) (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, USA) を加え，37℃，5%CO_2 下で1時間インキュベーションを行った後，RPMI-1640 液で3回洗浄し，10%FCS 添加 RPMI-1640 液に浮遊させたものを ^{51}Cr 標識標的細胞浮遊液とした．次いで，5×10^4 個/ml 濃度に調整した ^{51}Cr 標識標的細胞浮遊液 100μl を先の作働細胞液 100μl に加えた（この条件で作働細胞と標的細胞は40：1の数比となる）．37℃，5%CO_2 下で6時間インキュベーションした後，上清を各穴から 100μl 宛採取し，上清中の ^{51}Cr 放出量をオートウェルガンマーカウンター ARC501（アロカ，東京）にて測定した．下記の計算式に基づき特異的 ^{51}Cr 放出量を算出して，これを細胞傷害活性とした．

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = \frac{{}^{51}\text{Cr 実測値} - {}^{51}\text{Cr 自然放出量}}{{}^{51}\text{Cr 最大放出量} - {}^{51}\text{Cr 自然放出量}} \times 100$$

最大放出量は標的細胞に 0.1N 塩酸 100μl を加えた時の ^{51}Cr 放出量を示し，自然放出量は 10%FCS 添加 RPMI-1640 液 100μl を加えて6時間インキュベーションした後の標的細胞 ^{51}Cr 放出量である．

Ⅳ．モノクロナール抗体によるリンパ球亜群の分類

肺癌患者から分離したリンパ球分画中のリンパ球亜分画をヒトリンパ球に対する各種モノクローナル抗体を用い検討した．4×10^6 個/ml に濃度調整したリンパ球浮遊液 100μl に，標識する蛍光色素が異なる2種類のモノクロナール抗体を各 20μl ずつ加え，4℃，30分間静置し二重染色を行った．これに PBS 1ml を加え，レーザーフローサイトメーター (EPICS PROFI-

---

lymphokine activated killer; MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer; PBL, peripheral blood lymphocyte; PBS, phosphate buffered saline; RLNL, regional lymph node lymphocyte; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte; TNM, tomor-nodes-metastasis

LE Ⅱ, COULITER, Miami, Florida, USA) によって蛍光陽性細胞を測定し解析した．使用モノクロナール抗体はすべて市販で，蛍光標識されたものであり，T細胞に特異的な分化群 (cluster of differentiation, CD) 3，ヘルパー/インデュサーT細胞に特異的な CD4，サプレッサーインデュサーT細胞に特異的な Leu8，サプレッサー/細胞傷害性T細胞に特異的な CD8，サプレッサーT細胞に特異的な CD11，ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞および好中球に特異的な CD16，NK 細胞およびT細胞の一部に特異的な CD57，B細胞，単球，マクロファージ及び活性化T細胞に特異的なヒトリンパ球抗原ーDR (human leukocyte antigen-DR, HLA-DR) (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA) に対する抗体を用いた．CD4-CD8, CD4-Leu8, CD8-CD11, CD16-CD57, CD3-HLA-DR の5種類の組合せにより二重染色を行い測定した．

Ⅴ．測定値の有意差検定

細胞傷害活性の測定値は，平均値±標準偏差 (mean±SD) をもって示した．対応のある場合の平均値の有意差検定には，t 検定を用い，多群間の有意差検定には，分散分析後，Scheffé の多重比較法を用い，危険率 5% 以下を有意差ありと判定した．

成　　績

Ⅰ．肺癌患者リンパ球の腫瘍細胞傷害活性の変動

1．PBL, RLNL, TIL 間での腫瘍細胞傷害活性の変動

^{51}Cr 放出度を指標とした ATK 活性は，肺癌患者54例の PBL では 4.38±3.6% であり，35例の RLNL では 2.98±1.7%，18例の TIL では 5.53±2.4% と，TIL, PBL, RLNL の順に高く，TIL と RLNL との比較では有意に ($p<0.05$) TIL が高値であった (図 1a)．PC-3 に対する細胞傷害活性は PBL, RLNL, TIL でそれぞれ，7.24±4.3%, 2.38±1.1%, 3.08±1.8% であり，PC-9 に対する細胞傷害活性はそれぞれ，7.10±4.5%, 2.38±1.1%, 2.85±1.4% であり，PBL が RLNL, TIL に比べ有意に ($p<0.05$) 高値であった (図 1b，図 1c)．また，PBL, RLNL, TIL 間でそれぞれの傷害活性に相関は認めなかった．

2．組織型による腫瘍細胞傷害活性の変動

組織型別の腫瘍細胞傷害活性を PBL では，腺癌25例，扁平上皮癌22例，大細胞癌4例，小細胞癌2例について，RLNL では腺癌14例，扁平上皮癌16例，大細胞癌2例，小細胞癌2例について，TIL では腺癌10例，扁平上皮癌8例について測定した (表1)．

PBL, RLNL, TIL とも組織型による腫瘍細胞傷害活性の差は認められなかった．

3．病期別の腫瘍細胞傷害活性の変動

小細胞癌を除いた病期別の細胞傷害活性を，PBL ではⅠ期24例，Ⅱ期8例，ⅢA 期14例，ⅢB 期4例，Ⅳ期1例の51例について，RLNL ではⅠ期15例，Ⅱ期6例，ⅢA 期8例，ⅢB 期2例，Ⅳ期1例の32例について，TIL ではⅠ期11例，Ⅱ期2例，ⅢA 期5例の18例について測定した (表2)．

PBL の ATK 活性は，Ⅰ期，5.53±4.5%，Ⅱ期，4.40±2.7%，ⅢA 期，3.68±2.7%，ⅢB 期，1.82±1.4%，Ⅳ期，2.1% であった．病期が進むにしたがって低下する傾向が認められ，ⅢB 期はⅠ期，Ⅱ期に比べ有意に ($p<0.05$) 低値であった．PC-3 に対する傷害活性は，Ⅰ期，7.76±5.0%，Ⅱ期，7.86±5.6%，ⅢA 期，6.29±3.0%，ⅢB 期，4.57±1.9%，Ⅳ期，

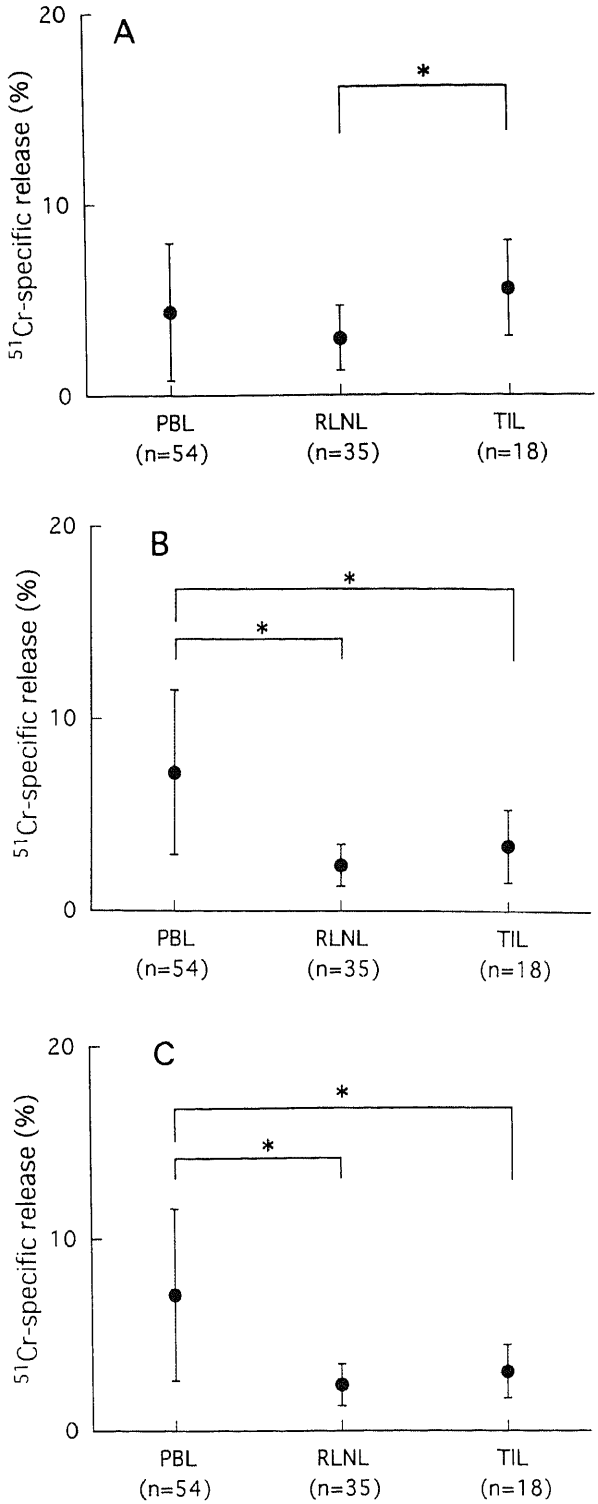


Fig. 1. Cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes (PBL), regional lymph node lymphocytes (RLNL) and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in patients with lung cancer. Lymphocytes were tested for lysis of autologous tumor (AT) (A), PC-3 (B) and PC-9 (C) cells. Tests were performed in ^{51}Cr-specific release assay. Date are shown as mean±S.D.. *, $p<0.05$ by ANOVA with Scheffé's multiple comparison. Autologous tumor killing (ATK) activity of TIL is significantly high in comparison with that of RLNL. Cytotoxic activities of PBL are siginificantly high in comparison with that of RLNL and TIL against allogenic tumor cell lines (PC-3 and PC-9).

Table 1. Cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes (PBL), regional lymph node lymphocytes (RLNL), and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in various cell types

Cell type	Number of cases examined	Cytotoxic activity (mean±S.D., %. ^{51}Cr specific relase)		
		Against AT	Against PC-3	Against PC-9
PBL				
Ade.	25	4.56±3.7	6.84±4.4	7.36±5.7
Epi.	22	4.43±3.9	7.39±4.7	6.99±3.8
Large	4	3.85±1.8	6.72±1.9	6.22±1.6
Small	2	3.10±3.1	11.30±1.7	8.05±0.1
RLNL				
Ade.	14	2.71±1.8	2.17±1.2	2.49±1.4
Epi.	16	3.41±1.7	2.31±1.2	2.05±0.9
Large	2	2.35±0.9	1.85±0.3	1.85±0.1
Small	2	3.35±0.7	2.50±1.5	2.50±0.4
TIL				
Ade.	10	5.34±2.4	2.36±1.3	2.36±1.2
Epi.	8	6.16±2.4	4.36±1.9	3.87±1.3

Ade., adenocarcinoma ; Epi., epidermoid carcinoma ; Large, large cell carcinoma ; Small, small cell carcinoma.

Table 2. Cytotoxic activity of PBL, RLNL, and TIL in each stage

Stage	Number of cases examined	Cytotoxic activity (mean±S.D., %. ^{51}Cr specific relase)		
		Against AT	Against PC-3	Against PC-9
PBL				
I	24	5.53±4.5	8.18±6.2	7.77±5.0
II	8	4.40±2.4 *	6.63±3.2 *	7.86±5.6 *
III A	14	3.65±2.7 *	6.46±2.7	6.29±3.0
III B	4	1.83±1.4	3.68±1.7	4.58±1.9
IV	1	2.10	7.90	7.00
RLNL				
I	15	3.61±1.9	2.42±1.3	2.32±1.1
II	6	2.03±2.1	1.96±1.9	2.32±1.3
III A	8	2.70±1.5	2.36±0.6	2.59±1.4
III B	2	2.05±0.9	1.05±1.4	1.25±0.3
TIL				
I	11	5.28±2.5	3.77±2.0	3.23±1.5
II	2	8.00±0.8	2.55±0.7	3.30±1.1
III A	5	5.13±2.4	2.36±0.6	2.26±0.6

*, $p<0.05$ by ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

Table 3. Cytotoxic activity of PBL, RLNL, and TIL according to N-factors

N-factor	Number of cases examined	Cytotoxic activity (mean±S.D., %. ^{51}Cr specific relase)		
		Against AT	Against PC-3	Against PC-9
PBL				
N 0	29	5.09±4.3	7.53±4.7	7.79±5.6
N 1	9	4.09±1.9 *	7.32±5.5	6.42±3.0
N 2	13	3.28±2.4	5.85±2.3	5.96±3.0
RLNL				
N 0	21	3.60±1.8 *	2.45±1.3	2.31±1.1
N 1	7	1.93±1.0 *	1.83±0.9	1.99±1.4
N 2	4	2.07±0.5	2.42±0.4	3.05±1.1
TIL				
N 0	11	5.28±2.5	3.77±2.0	3.23±2.0
N 1	2	8.00±0.8	2.55±0.7	3.30±1.1
N 2	5	5.13±2.4	2.36±0.8	2.26±0.6

*, $p<0.05$ by ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

Table 4. Lymphocyte subset of PBL, RLNL, and TIL in patients with lung cancer

Lymphocyte	Number of cases examined	Ratio (mean±S.D., %) of lymphocyte-positive in reaction to monoclonal antibody								
		CD4+Leu8−	CD4+Leu8+	CD8+CD11−	CD8+CD11+	CD16+CD57−	CD16+CD57+	CD16−CD57+	CD3+HLA−DR+	CD4/8
PBL	54	10.61±5.5**	37.77±12.3	19.68±12.7	19.24±9.8**	4.18±2.4	10.59±6.0**	9.09±6.2	17.13±10.4**	1.34±0.7
RLNL	35	19.22±10.5	46.62±14.1**	18.51±7.6	4.9 ±9.0	1.97±4.1	0.51±1.2	4.00±2.7*	36.77±12.4	3.13±1.8*
TIL	18	19.83±6.8	30.88±12.6	25.22±7.2*	6.94±4.9	3.88±2.8	3.94±3.9	9.88±4.3	43.27±15.7	1.70±0.6

*, P<0.05;, **, P<0.01 vs the other lymphocytes by ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

6.3% で，PC-9 に対する傷害活性は，Ⅰ期，8.13±6.2%，Ⅱ期，6.63±3.2%，ⅢA 期，6.46±2.7%，ⅢB 期，3.67±1.7%，Ⅳ期，8.1% であった．PC-3, PC-9 とも ⅢB 期はⅠ期に比べ有意に ($p<0.05$) 低値であった．

RLNL, TIL では，病期による腫瘍細胞傷害活性の変動は認められなかった．

4．N因子別の腫瘍細胞傷害活性の変動

小細胞癌を除いたN因子別の細胞傷害活性を，PBL では NO 群29例，N1 群 9 例，N2 群13例の51例について，RLNL では NO 群21例，N1 群 7 例，N2 群 4 例の32例について，TIL では NO 群11例，N1 群 2 例，N2 群 5 例の18例について測定した (表 3)．

PBL の ATK 活性は，NO 群，5.09±4.3%，N1 群，4.09±1.9%，N2 群，3.28±2.4% であり，NO 群に比べ，N2 群が有意 ($p<0.05$) に低値であった．PBL の PC-3, PC-9 に対する傷害活性には，N因子による差は認められなかった．

RLNL の ATK 活性は，NO 群，3.60±1.8%，N1 群，1.93±1.0%，N2 群，2.07±0.5% と NO 群が，N1 群，N2 群に比べ，有意に ($p<0.01$) 高値を示した．PC-3, PC-9 に対する傷害活性には，N因子による差は認められなかった．

TIL の ATK 活性は，NO 群 5.28±2.5%，N1 群 8.00±0.8%，N2 群 5.13±2.4% で，PC-3, PC-9 に対する傷害活性と同様に，N因子による差は認められなかった．

Ⅱ．肺癌患者におけるリンパ球亜群の変動

1．PBL, RLNL, TIL 間でのリンパ球亜群の変動

リンパ球亜群を PBL, RLNL, TIL の 3 群で測定した．PBL では他の 2 群に比べ，CD4 陽性 Leu8 陰性 (ヘルパーT細胞に反応性) 細胞と CD3 陽性 HLA-DR 陽性 (活性化T細胞に反応性) 細胞が有意に ($p<0.01$) 低値を示し，CD8 陽性 CD11 陽性 (サプレッサーT細胞に反応性) 細胞と CD16 陽性 CD57 陽性 (NK 細胞に反応性) 細胞が有意に ($p<0.01$) 高値を示した．RLNL では他の 2 群に比べ，CD4 陽性 Leu8 陽性 (サプレッサーインデュサーT細胞に反応性) 細胞が有意に ($p<0.01$) 高値を示し，CD16 陰性 CD57 陽性 (NK 細胞に反応性) 細胞が有意に ($p<0.05$) 低値を示した．TIL では他の 2 群に比べ，CD8 陽性 CD11 陰性 (細胞傷害性T細胞に反応性) 細胞が有意に ($p<0.05$) に高値を示した (表 4)．

2．組織型別のリンパ球亜群の変動

リンパ球亜群を組織型別に測定し検討したが，有意差は認められなかった (表 5)．

3．病期別のリンパ球亜群の変動

PBL, RLNL, TIL のリンパ球亜群の変動を病期別に検索した．

PBL, RLNL, TIL とも各病期間に有意な変動はなかったが，PBL では対照群 (健康成人10人) に比べ，CD8 陽性 CD11 陰性細胞がⅠ，Ⅱ，ⅢA, ⅢB 期で有意に ($p<0.05$) 低値を示し，CD8 陽性 CD11 陽性細胞がⅠ，Ⅱ，ⅢA 期で有意に ($p<0.05$) 高値を示した．また CD4/8 比が，病期の進行とともに高くなる傾向を認めた (表 6)．

4．N因子別のリンパ球亜群の変動

RLNL では NO 群に比べ，N1 群では CD4 陽性 Leu8 陰性細胞と CD8 陽性 CD11 陰性細胞が有意に ($p<0.01$) 低値を示し，CD4 陽性 Leu8 陽性細胞が有意に ($p<0.05$) 高値を示した．N2 群でも同様の傾向を認めたが，有意差はなかった．ま

Table 5. Lymphocyte subset of PBL, RLNL, and TIL in patients with lung cancer in various cell types

Cell type of lung cancer	Number of cases examined	Ratio (mean±S.D., %) of lymphocyte-positive in reaction to monoclonal antibody								
		CD4+Leu8−	CD4+Leu8+	CD8+CD11−	CD8+CD11+	CD16+CD57−	CD16+CD57+	CD16−CD57+	CD3+HLA−DR+	CD4/8
PBL										
Adeno.	25	11.68±6.3	33.40±13.6	16.44±6.9	16.20±8.7	3.96±1.9	10.40±5.7	7.76±4.5	14.96±8.7	1.57±0.8
Epi.	22	10.18±5.1	32.22±12.1	21.54±9.1	20.95±8.1	3.68±2.0	9.31±4.9	11.81±7.7	20.95±12.5	1.14±0.7
Large	4	9.75±3.8	37.75±7.1	12.75±2.9	15.75±8.0	5.00±3.7	10.75±7.5	5.25±0.9	13.50±4.0	1.52±0.6
Small	2	6.50±2.1	26.00±14.1	17.50±10.6	34.00±22.6	6.50±0.7	19.50±10.6	6.50±2.1	15.00±4.2	0.64±0.4
RLNL										
Adeno.	14	18.42±11.9	49.57±15.2	16.21±2.0	3.35±3.5	1.64±2.0	0.64±1.3	3.14±2.3	33.78±10.5	3.54±1.8
Epi.	16	21.12±10.4	42.31±13.4	20.93±7.9	6.87±13.0	2.37±6.0	0.37±1.2	4.93±3.0	40.06±14.8	2.76±2.1
Large	2	10.60±11.3	60.00±9.8	16.50±8.7	2.00±0.0	1.00±0.0	0.00±0.0	1.50±0.7	25.00±9.8	2.97±0.3
Small	2	23.50±9.1	40.50±9.1	18.50±6.7	4.50±2.5	2.50±0.5	1.00±0.0	6.00±2.8	40.50±0.9	2.47±0.2
TIL										
Adeno.	10	22.56±6.4	32.33±12.0	25.11±7.2	5.11±3.5	3.22±2.1	2.00±1.5	9.00±4.6	47.00±13.5	1.89±0.6
Epi.	8	18.75±5.2	27.12±13.5	26.62±7.6	7.62±7.6	4.37±3.7	4.75±3.8	11.75±3.6	43.87±14.2	1.47±0.7

Adeno., adenocarcinoma ; Epi., epidermoid carcinoma ; Large, large cell carcinoma ; Small, small cell carcinoma.

Table 6. Lymphocyte subset of PBL, RLNL, and TIL in patients with lung cancer in each stage

Stage of lung cancer#	Number of cases examined	Ratio (mean±S.D., %) of lymphocyte-positive in reaction to monoclonal antibody								
		CD4+Leu8−	CD4+Leu8+	CD8+CD11−	CD8+CD11+	CD16+CD57−	CD16+CD57+	CD16−CD57+	CD3+HLA−DR+	CD4/8
PBL										
Ⅰ	24	12.17±6.3*	32.73±11.7	17.65±7.8*	19.87±8.9*	3.65±2.0	10.43±5.7	8.87±6.5*	18.08±11.4	1.30±0.7
Ⅱ	8	8.37±3.8	37.50±15.5	17.00±4.8*	16.37±7.3*	3.62±1.0	12.00±7.2	7.00±5.3	11.00±5.4	1.46±0.6
ⅢA	14	10.86±5.0	36.13±12.2	19.93±11.0*	17.46±7.9*	4.73±2.7	8.40±4.3	10.53±6.4	17.66±8.7	1.45±0.9
ⅢB	4	9.50±6.8	34.50±11.1	17.25±2.6*	11.25±7.4	3.25±2.0	9.00±4.0	8.25±2.6	17.25±3.8	1.68±0.6
Ⅳ	1	19	22	17	22	3	7	12	12	1.15
control##	10	7.00±4.2	32.88±13.2	35.56±12.1	9.44±4.4	2.88±0.6	5.88±3.7	17.44±14.1	12.66±9.4	0.92±0.4
RLNL										
Ⅰ	15	23.46±13.1	40.66±14.3	20.86±9.0	6.93±13.5	2.80±6.4	0.27±0.5	3.60±2.3	38.93±15.2	2.92±2.1
Ⅱ	6	12.66±3.5	58.16±11.3	14.00±7.7	3.83±4.6	1.33±1.0	0.83±2.0	4.50±4.6	36.50±6.0	3.93±2.1
ⅢA	8	15.75±9.0	48.50±12.8	17.87±6.1	3.25±2.6	1.37±0.9	0.75±3.2	4.37±2.6	29.00±8.6	2.73±1.3
ⅢB	2	21.00±14.1	52.00±22.66	14.50±4.9	3.00±2.8	0.50±0.7	0	2.50±2.1	32.00±7.0	4.18±2.0
Ⅳ	1	31	36	17	5	1	0	1	27	2.71
TIL										
Ⅰ	11	17.45±6.5	35.81±12.6	23.27±7.1	7.27±4.7	3.18±1.7	4.45±4.2	9.63±4.2	40.72±16.4	1.88±0.6
Ⅱ	2	24.00±2.0	25.00±3.0	27.50±1.5	2.50±0.5	2.50±0.5	1.00±0.0	6.00±1.4	58.00±1.4	1.63±0.1
ⅢA	5	23.40±7.8	22.4±12.0	28.60±8.9	8.00±6.5	6.00±4.6	4.00±4.6	12.00±5.3	43.00±17.8	1.32±0.8

*, $P<0.05$ vs control by ANOVA with Scheffé's multiple comparison.
#, non small cell lung cancer.
##, Healthy adults.

Table 7. Lymphocyte subset of PBL, RLNL, and TIL in patients with lung cancer in various N-factors

N-factor of lung cancer#	Number of cases examined	Ratio (mean±S.D., %) of lymphocyte-positive in reaction to monoclonal antibody								
		CD4+Leu8−	CD4+Leu8+	CD8+CD11−	CD8+CD11+	CD16+CD57−	CD16+CD57+	CD16−CD57+	CD3+HLA−DR+	CD4/8
PBL										
N 0	29	11.41±6.0	30.24±12.1	18.82±8.9	20.37±9.0	3.82±2.0	10.00±5.9	9.89±6.7	19.51±12.2	1.24±0.7
N 1	9	8.44±3.6	38.44±14.8	16.55±4.7	15.66±7.2	3.55±1.0	11.33±7.0	7.11±4.9	11.33±5.1**	1.54±0.6
N 2	13	11.38±5.7	35.69±11.8	18.53±8.9	15.15±7.6	4.38±3.0	8.92±4.9	9.53±6.5	17.00±8.2	1.57±0.9
RLNL										
N 0	21	22.47±11.6	42.00±14.3	20.76±8.2	6.04±11.5	2.28±5.4	0.42±1.1	3.81±2.0	38.38±15.0	2.80±1.9
N 1	7	12.28±3.4**	57.85±10.3*	13.14±7.4**	3.42±4.3	1.14±1.0	0.71±1.8	4.71±4.3	36.71±5.5	4.07±1.9*
N 2	4	14.50±12.1	51.00±12.8	16.75±3.2	2.50±1.7	1.75±0.9	0.25±0.5	3.25±3.8	25.25±5.1**	3.10±0.8
TIL										
N 0	11	17.45±6.5	35.81±12.6	23.27±7.1	7.27±4.7	3.18±1.7	4.45±4.2	9.63±4.2	40.72±16.4	1.88±0.6
N 1	2	24.00±2.0	25.00±3.0	27.50±1.5	2.50±0.5	2.50±0.5	1.00±0.0	6.00±1.4	58.00±1.4	1.63±0.1
N 2	5	23.40±7.8	22.4±12.0	28.60±8.9	8.00±6.5	6.00±4.6	4.00±4.6	12.00±5.3	43.00±17.8	1.32±0.8

#, non small cell lung cancer.
*, $P<0.05$; **, $P<0.01$ vs N0 patients by ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

た，N2 群では NO 群，N1 群に比べ CD3 陽性 HLA-DR 細胞が有意に ($p<0.01$) 低値を示した．PBL, TIL ではN因子によるリンパ球亜群の有意な変動は認められなかった (表7)．

Ⅲ．自己腫瘍細胞傷害活性とリンパ球亜群との関連

ATK 活性とリンパ球亜群との相関関係について検討した．

PBL では，ATK 活性は CD16 陽性 CD57 陽性細胞比率と相関係数0.527の弱い順相関を示した (図 2)．RLNL では，ATK 活性は CD8 陽性 CD11 陰性細胞比率と相関係数0.806の強い順相関 (図 3a) を，CD3 陽性 HLA-DR 陽性細胞比率とは相関係数0.550の弱い順相関 (図 3b) を示し，CD4 陽性 Leu8 陽性細胞比率とは相関係数−0.624の弱い逆相関を示した (図 3c)．TIL では，ATK 活性は CD8 陽性 CD11 陰性細胞比率と相関係数0.602の弱い順相関 (図 4a) を，CD4 陽性 Leu8 陽性細胞比率とは相関係数−0.714の弱い逆相関を示した (図 4b)．

考　　察

免疫療法の臨床的効果の予測あるいは評価の指標として，非特異的免疫療法の創世期には，皮膚反応[11]，リンパ球幼若化反応[12]，マクロファージ・白血球遊走阻止機能[13][14]などの非特異期反応が用いられていた．やがて，Rosenberg らによる LAK 細胞を用いた AIT の創始に伴い[15][16]，株化腫瘍細胞を標的とした抗腫瘍活性が免疫反応の指標として用いられるようになった．しかし，免疫療法の臨床応用が進むに従い，臨床的な抗腫瘍活性と実験系での抗腫瘍活性が必ずしも一致しないことが明らかとなってきた．教室での AIT の臨床応用でも，著効例，不変例と生体外での LAK 細胞の抗腫瘍活性とは相関がないことが確認されている[9]．その原因として，非自己である培養細胞と生体内で実際に標的となる AT とでは主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex, MHC) などの腫瘍特異抗原が異なること，生体内とは異なる環境での免疫反応であること

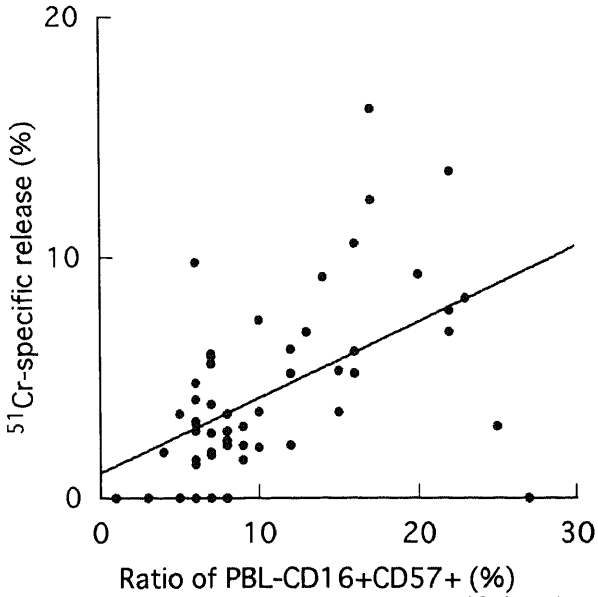


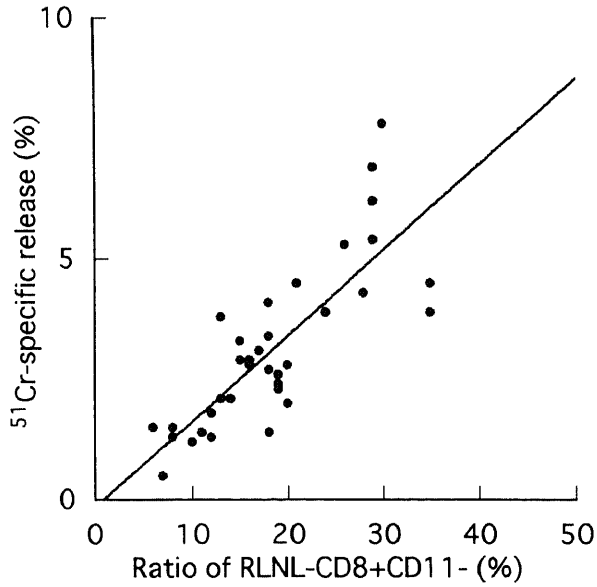
Fig. 2. Correlation between the ratio of CD16-postive CD57-postive lymphocytes (PBL−CD16+CD57+) and ATK activity in PBL. The ATK activity of PBL is directly proportional to the ratio of CD16-positive CD57-positive lymphocytes. The regression line, $Y=1.03+0.315X$; correlation coefficient (r), 0.527; number of sample (n), 51.

があげられる．腫瘍抗原に特異的な免疫反応としてリンパ球腫瘍細胞混合培養反応 (mixed lymphocyte tumor cell reaction, MLTR) によるリンパ球増殖能を指標とする方法がある[17]が，これは抗原認識機構と類似した免疫応答を表すのみであり，抗腫瘍活性の指標とはなりがたい．

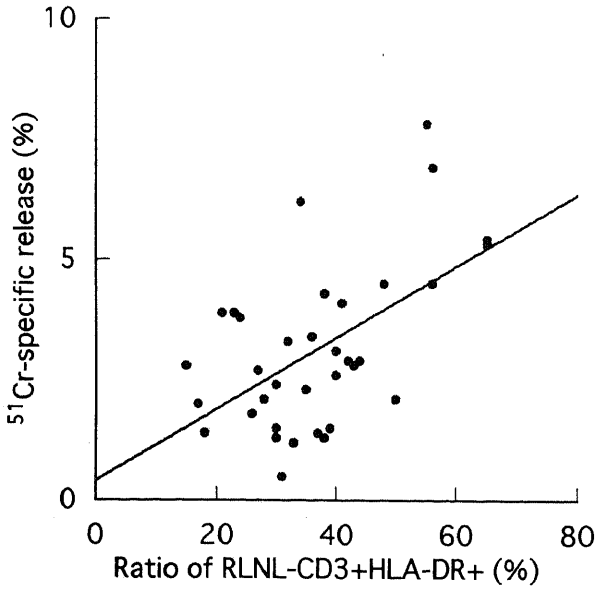
腫瘍特異抗原を一致させること，生体内の環境を再現することができれば理想的な免疫反応の指標が得られる．これに近似するものとして，生体内と限りなく近い状態に置かれた AT に対する傷害活性の測定が考えられる．Uchida らは，1）腫瘍細胞は培養により NK 細胞あるいはT細胞による細胞傷害に対する感受性が変化する，2）生体外での細胞培養は，培養条件にあった腫瘍細胞のみを選択的に増殖させる，3）培養により腫瘍抗原を含む表面抗原の消失や新たな抗原を獲得する可能性がある，4）T細胞による標的細胞の特異的認識および傷害には両者の MHC 遺伝子産物の一致が必要である，などの理由から傷害活性の測定には分離直後の AT を用いるべきだと述べている[18][19]．しかし，この測定は癌患者からの分離直後の新鮮腫瘍細胞を必要とするためこれまでは困難な手技とされてきた．最近の細胞生物学の進歩により，純度が高く，生存率の良い腫瘍細胞とリンパ球の分離が可能となり，ATK 活性の測定とその臨床的意義が注目されるようになってきた．

Vanky らは，PBL の ATK 活性は腫瘍の組織型，部位，転移などの因子に影響されるが，ヒト癌患者の 5～60% に観察されると報告している[20][21]．同時に，PBL の ATK 活性は，病期分類，TNM 分類とは関連しないと報告しているが，本研究では PBL の ATK 活性は病期の進行，リンパ節転移の進展により低下する傾向が認められ，癌の進行により PBL の ATK 活性は低下すると考えられた．同様に RLNL の ATK 活性はリンパ節転移により有意に低下し，転移に対する防御機構としての機能の低下を示した．しかし，TIL の ATK 活性に病期の進行との相関は認められなかった．ATK 活性と同種培養肺癌細胞株に対する傷害活性とは，PBL. RLNL, TIL とも全く相関はみられず，これは組織型を合わせた検討でも同様であった．

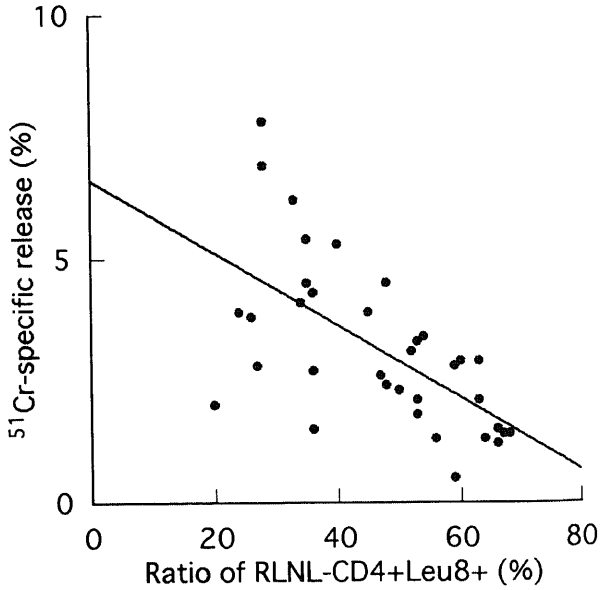
三枝は MLTR を各種癌患者を対象に行い PBL とリンパ節リンパ球の抗腫瘍活性は互いに相補的であり，リンパ球の抗腫瘍活性はまずリンパ節リンパ球に出現し，ついで PBL に広がってゆくものと思われると報告している[22]．しかし，本研究では PBL, RLNL, TIL の ATK 活性に関連は認められず否定



(A)



(B)



(C)

Fig. 3. Correlation between the ratio of lymphocyte subsets and ATK activity in RLNL. (A) The ATK activity of RLNL is directly proportional to the ratio of CD8-positive CD11-negative lymphocytes. The regression line, Y=−0.148+0.1776X; correlation coefficient (r), 0.806; number of sample (n), 32. (B) The ATK activity of RLNL is directly proportional to the ratio of CD3-positive HLA-DR-positive lymphocytes. The regression line, Y=0.414+0.7413X; correlation coefficient (r), 0.550; number of sample (n), 32. (c) The ATK activity of RLNL is inversaly proportional to the ratio of CD4-postive Leu8-postive lymphocytes. The regression line, Y=6.608−0.743X; correlation coefficient (r),−0.624; number of sample (n), 32.

的であった．Uchida らは PBL と胸水中から採取された TIL の ATK 活性に関連はなかったと報告し，その理由として TIL に混在する胸水中のマクロファージが ATK 活性を抑制するためであると述べている[23]．Uchida らの治癒切除可能な癌患者を対象とした検討では，手術施行時に測定した PBL の ATK 活性が高い患者は低い患者に比べ有意に予後が良いと報告している[24]．そして，術前の BRM 投与により手術時の PBL の ATK 活性を高めることが予後を改善するとして，肝癌での臨床比較試験を行いその有効性を報告している[25]．また，PBL の ATK 活性は患者のパーフォーマンス・ステータス，病期，性，年齢，栄養状態といった背景因子，および他の免疫反応とは相関しない独立した予後因子であると述べている．しかし，全身の免疫反応である PBL の ATK 活性が，局所の免疫反応である RLNL, TIL の ATK 活性を反映しないとなると，リンパ節転移，腫瘍の直接浸潤に対する免疫は予後と関連しないこととなるため，検討を要する問題といえる．予後との関連はともかく，ATK 活性は生体内での特異的な抗腫瘍活性を反映する免疫反応としては最良のものと考えられ，ATK 活性を高める免疫療法に期待が持てるのは事実であり，今後の免疫療法への応用が望まれる．

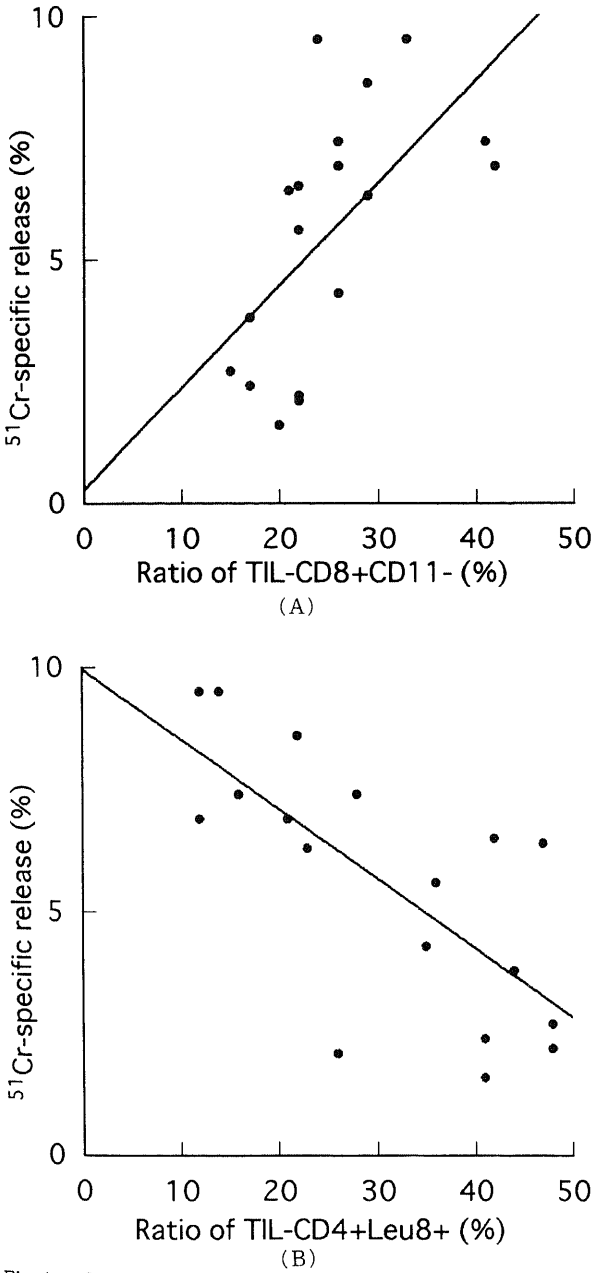


Fig. 4. Correlation between the ratio of lymphocyte subsets and ATK activity in TIL. (A) The ATK activity of TIL is directly proportional to the ratio of CD8-positive CD11-negative lymphocytes. The regression line, Y=0.279+0.209X; correlation coefficient (r), 0.602; number of sample (n), 18. (B) The ATK activity of TIL is inversely proportional to the ratio of CD4-positive Leu8-positive lymphocytes. The regression line, Y=9.966−0.143X; correlation coefficient (r), −0.714; number of sample (n), 18.

抗腫瘍活性とリンパ球亜群との関連をみるために，フローサイトメーターを用いた二重染色法によるリンパ球亜群の測定を行った．癌患者の PBL においては，T細胞，NK 細胞を中心とする細胞性免疫が抗腫瘍免疫の主体をなし癌の進行とともにその機能が低下するとされている．PBL, RLNL, TIL のリンパ球亜群の分別を行なうことにより，肺癌患者の全身および局所の抗腫瘍免疫について検討した．

T細胞は CD4 陽性 Leu8 陰性のヘルパーT細胞，CD4 陽性 Leu8 陽性のサプレッサーインデュサーT細胞，CD8 陽性 CD11 陰性の細胞傷害性T細胞，CD8 陽性 CD11 陽性のサプレッサーT細胞に大別される．これらT細胞は生体の免疫反応の調節に関与しており，その増減や比率の変動が宿主の免疫能を反映しているものと考えられている．肺癌患者の PBL では健常対照群に比べ，有意に細胞傷害性T細胞の減少とサプレッサーT細胞の増加が認められT細胞性免疫の低下が示唆された．この変動は，比較的早期であるⅠ期症例にも著明であり，肺癌に対する全身の免疫反応が早期から減じていることを示している．病期の進行による変動は認められず，横瀬らの乳癌における報告[26]と同様であった．田辺らは胃癌では癌の進展により，サプレッサーインデュサーT細胞とサプレッサーT細胞の減少がみられたと報告している[27]．癌種によりリンパ球亜群の変動には差があるようである．一方，RLNL ではリンパ節転移陰性群に比べリンパ節転移陽性群で有意にヘルパーT細胞の減少，サプレッサーインデュサーT細胞の増加，細胞傷害性T細胞の減少，CD3 陽性 HLA-DR 陽性の活性化T細胞の減少が認められ，リンパ節の免疫能の低下が示唆された．黒井らは胃癌リンパ節では，転移陽性リンパ節は転移陰性リンパ節に比べヘルパーT細胞が減少しサプレッサーT細胞が増加していると報告している[28]．癌種により，転移に対するリンパ節のリンパ球亜群の変動にも差があると思われる．これに反し，TIL では，病期の進行度，T因子，N因子のいずれの比較でも変動はみられず，局所に限定した免疫反応であると思われた．

一方，NK 細胞は，腫瘍細胞に対する生体の自然抵抗力の要因となっているものである．Takasugi らによって試験管内における正常ヒトリンパ球の腫瘍細胞に対する傷害性が報告され[29]，Kiessling らにより NK 細胞と命名された[30]．その機能について今までに多くの研究がなされ，免疫監視機構としての非特異的抗腫瘍活性が明らかにされてきた．NK 細胞は，その表面抗原として CD16, CD56, CD57 を持つことが知られているが，著者は CD16, CD57 を用いて，CD16 陽性 CD57 陰性，CD16 陽性 CD57 陽性，CD16 陰性 CD57 陽性の 3 群に分別し検討し

た．RLNL では NK 細胞がきわめて小数であり，リンパ節での免疫反応は PBL, TIL に比べより特異的な反応であることが示唆された．また，PBL, RLNL, TIL とも病期，T因子，N因子との関連は認められなかった．

Uchida は，ATK 活性の主な作働細胞は CD3 陰性の NK 細胞または CD3 陽性のT細胞であると報告している[18]．本研究では PBL の ATK 活性は CD16 陽性 CD57 陽性の NK 細胞と，RLNL. TIL の ATK 活性は細胞傷害性T細胞と有意の相関が認められたことから，これらが ATK 活性を担う主な作働細胞であることが強く示唆された．従って，全身と局所における抗腫瘍活性を担当する細胞は異なると考えられる．RLNL, TIL ではサプレッサーインデュサーT細胞が ATK 活性を抑制していることが示唆され，RLNL, TIL には少ないサプレッサーT細胞に代わってサプレッサーインデュサーT細胞が免疫抑制機能を担っていると思われる．

肺癌患者では，局所リンパ節転移の有無が予後を左右する重要な因子として知られ，教室でもリンパ節転移症例の予後が不良であることを報告し[31)~34)]，リンパ節転移についての基礎的並びに臨床的検討を行ってきた[2)35)~37)]．本研究では，リンパ節転移と ATK 活性，RLNL のリンパ球亜群変動には有意な関連が認められ，リンパ球亜群の変動が抗腫瘍活性を反映していることが強く示唆された．これは，転移のないリンパ節を温存する縮小手術の適応決定に対する臨床応用の可能性を示すものと考える．

転移のない所属リンパ節の予防的郭清に対して，間島らはリンパ節の抗腫瘍活性の面から早期胃癌については温存を考慮すべきと述べており[38)]，Papaioannou は乳癌について転移のない腋窩リンパ節は転移を抑制し，全身免疫能を賦活する可能性を有するので温存すべきであると述べている[39)]．生存率の面からは，Crile ら[40)]，Fisher ら[41)] は乳癌患者を対象とした臨床検討で，Veronesi らはⅠ期のメラノーマ症例を対象とした臨床検討[42)] で予防的リンパ節郭清施行例と非施行例では予後に差はなかったと報告している．本邦の胃癌を対象とした検討においても，一群リンパ節転移以下の症例では，二群リンパ節郭清症例が三群リンパ節郭清症例よりも予後が良好であったと報告している[43)]．これに対し，Pendergrast ら[44)]，Irvin ら[45)46)] は腫瘍移植に関する実験において，リンパ節リンパ球は移植後早期には移植腫瘍を拒絶するが，全身の免疫反応が生じるようになった晩期にはむしろ腫瘍の生着を促進させると報告し，全身免疫反応のある症例ではリンパ節温存の意義がないことを示唆している．また，山口らは胃癌患者における予防的郭清としての脾臓摘出について，脾臓の免疫能は担癌初期では抗腫瘍的に，後期には免疫抑制的に働くとして症例に応じた適応を選択すべきであると述べている[47)]．すなわち，リンパ節温存術式を考慮する場合，リンパ節転移がないこと，リンパ節の抗腫瘍活性が保たれていることの確認が必要である．従って，リンパ球亜群の測定は腫瘍傷害活性の測定より短時間で測定でき，かつ抗腫瘍活性をよく反映する指標として有用と考えられる．今後の臨床研究に期待したい．

結　　論

肺癌患者の生体内での抗腫瘍活性をより正確に評価する目的で，採取後直ちに分離した，AT, PBL, RLNL, TIL を用い，それぞれの ATK 活性とリンパ球亜群を測定し，癌患者の全身および局所の免疫能について検討した．これらの研究より，以下の結論を得た．

1．ATK 活性は TIL, PBL, RLNL の順に高く，特に TIL と RLNL の比較では有意に TIL が高値であった．PBL, RLNL, TIL の ATK 活性に相関はなく，全身の抗腫瘍活性と局所の抗腫瘍活性は独立したものと思われた．また，PBL の ATK 活性は病期およびリンパ節転移の進行とともに低下し，RLNL ではリンパ節転移の進行とともに低下していた．TIL では病期の進行度との関連はみられなかった．

2．ATK 活性と同種培養肺癌細胞株に対する傷害活性とは相関せず，ATK 活性は AT に対する特異的な抗腫瘍活性を示すものと考えられた．

3．リンパ球亜群の測定により，肺癌患者の PBL では健常対象群に比べⅠ期から CD8 陽性 CD11 陰性細胞の減少と CD8 陽性 CD11 陽性細胞の増加が認められ，担癌早期から全身の免疫反応が生じていることが明らかとなった．RLNL ではリンパ節転移の有無により CD4 陽性 Leu8 陰性細胞の減少，CD4 陽性 Leu8 陽性細胞の増加，CD8 陽性 CD11 陰性細胞の減少，CD3 陽性 HLA-DR 陽性細胞の減少が認められ，リンパ節での細胞性免疫の低下が示唆された．

4．ATK 活性とリンパ球亜群の検討から，PBL では CD16 陽性 CD57 陽性の NK 細胞が，RLNL と TIL では CD8 陽性 CD11 陰性の細胞傷害性T細胞が ATK 活性の主な作働細胞であることが示された．また，RLNL, TIL では CD4 陽性 Leu8 陽性のサプレッサーインデュサーT細胞が ATK 活性に対し抑制的に働いていることが示唆された．

5．RLNL ではリンパ節転移と ATK 活性，およびリンパ球亜群の変動とが密接に関連していることが示された．このことは，肺癌の治療においてリンパ節温存手術や局所免疫療法を考える上で，リンパ球亜群の変動が有用な指標となる可能性を示すものと言える．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に心から謝意を表します．また直接御指導，御鞭撻を賜りました第一外科清水淳三講師に深謝いたします．さらに本研究遂行に際し，多大な御協力を頂きました第一外科肺グループの諸先生に厚く御礼申し上げます．

なお，本論文の要旨は第46回日本胸部外科学会（札幌，1993），第34回日本肺癌学会（東京，1993）において発表した．

文　　献

1） **Watanabe, Y. & Iwa, T.**: Clinical value of immunotherapy for lung cancer by the streptococcal preparation OK-432. Cancer, **53**, 248-253 (1984).

2） **Watanabe, Y., Hashizume, Y., Shimizu, J., Yoshida, M., Watanabe, S., Iwa, T., Koshimura, S. & Saito, M**: Functional character and augmentation of lymphocytes in regional lymph nodes of patient with lung cancer. Am. Rev. Respir. Dis., **142**, 769-774 (1990).

3） **Watanabe, Y. & Iwa, T.**: Clinical value of immunotherapy with the streptococcal preparation OK-432 in non-small cell lung cancer. J. Biol. Response Modif., **6**, 169-180 (1987).

4） **Watanabe, Y., Shimizu, J., Hashizume, Y., Tsunamura, Y., Yamada, T., Yoshida, M., Iwa, T.,**

Sakai, S., Sato, H., Migita, S., Murayama, T. & Koshimura, S.: Immunotherapy for lung cancer; Final results of prospective randomized study, changes of immunological parameters, and new horizen of treatment. *In* M. Torisu & T. Yoshida (eds.), New Horizons of Tumor Immunotherpy, 1st ed., p. 597-615, Excerpta Medica, Amsterdam, 1989.

5) **渡辺洋宇，清水淳三，吉田正之，橋爪泰夫，山田哲司，岩喬**：肺癌に対する OK-432 免疫療法－現状と将来－．日外会誌，**9**, 1432-1435 (1989).

6) **橋爪泰夫**：肺癌患者末梢血および局所リンパ節リンパ球の抗腫瘍活性の誘導に関する研究．十全医会誌，**95**, 251-267 (1986).

7) **吉田正之**：肺癌患者末梢血リンパ球の抗腫瘍活性の誘導に関する研究－特に自己腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性について－．十全医会誌，**99**, 815-826 (1990).

8) **清水淳三**：肺癌の免疫療法に関する研究－特に腫瘍局所における抗腫瘍活性の誘導とその応用に関する研究－．十全医会誌，**98**, 161-174 (1989).

9) **渡辺進一郎**：肺癌浸潤リンパ球の抗腫瘍活性の誘導とその賦活に関する研究．十全医会誌，**99**, 947-962 (1990).

10) **日本肺癌学会**：臨床・病理肺癌取扱い規約，改訂第3版，15-21頁，金原出版，東京，1987.

11) **西山　潔，伊藤　進，国松尚一，神谷周明，犬尾武彦，土屋周二**：消化器癌と遅延型皮膚反応－とくに PHA skin test の有用性－．臨床免疫，**8**, 1027-1034 (1976).

12) **峠　哲哉**：担癌宿主の抵抗性に関する基礎的並びに臨床的研究第二編．広医誌，**23**, 421-441 (1975).

13) **矢田健太郎**：癌患者免疫能の診断パラメーター．日内会誌，**67**, 1495-1498 (1978).

14) **Ishii, Y., Yamaoka, H., Toh, K. & Kikuchi, K.**: Inhibition of tumor growth in vivo and vitro by macrophages from rats treated with a streptococal preparation, OK-432. Gann, **67**, 115-119 (1976).

15) **Rosenberg, S. A. & Mule', J. J.**: Immunotherpy of cancer with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. Surgery, **98**, 437-444 (1985).

16) **Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitmann, S., Chang, A. E., Vetto, J. T., Steipp, C. A. & Simpson, C.**: A new approach to the therapy of cancer based on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. Surgery, **100**, 262-272 (1986).

17) **吉田誠一，高井信行，小野　晃，斉藤隆史，田中隆一**：腫瘍リンパ球混合培養反応を用いた悪性脳腫瘍患者における腫瘍特異的免疫反応の検討．脳神経，**40**, 1067-1073 (1988).

18) **Uchida, A. & Mizutani, Y.**: Autologous tumor killing activity in humans: mechanism and biological significance. *In* M. Torisu & T. Yoshida (eds.), New Horizons of Tumor Immunotherpy, 1st ed., p. 201-216, Excerpta Medica, Amsterdam, 1989.

19) **Uchida, A. & Micksche, 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).

20) **Vanky, F., Willems, J., Kreicbergs, A., Aparisi, T., Andreen, M., Brostrom, L. A., Nilsonne, U., Klein, E. & Klein, G.**: Correlation between lymphocyte-mediated auto-tumor reactivities and clinical course. I. Evaluation of 46 patients with sarcoma. Cancer Immunol. Immunother, **16**, 11-16 (1983).

21) **Vanky, F., Peterffy, A., Book, N., Willems, J., Klein, E. & Klein, G.**: Correelation between lymphocyte-mediated auto-tumor reactivities and clinical course. II. Evaluation of 69 patients with lung carcinoma. Cancer Immunol. Immunother, **16**, 17-22 (1983).

22) **三枝孝文**：がん患者の免疫動態－特に末梢血およびがん所属リンパ節リンパ球のがん特異的幼若化能について－．日大医誌，**41**, 431-443 (1982).

23) **Uchida, A. & Micksche, M.**: Lysis of fresh human tumor cells by autologous peripheral blood lymphocytes and pleural effusions lymphocytes activated by OK432. JNCI, **71**, 673-680 (1983).

24) **Uchida, A., Kariya, Y., Okamoto, N., Sugie, K., Fujimoto, T. & Yagita, M.**: Prediction of postoperative clinical course by autologous tumor killing activity in human lung cancer patients. J. Natl. Cancer Inst., **82**, 1697-1701 (1990).

25) **Uchida, A., Kariya, Y., Okamoto, N., Kihara, T., Inoue, N. & Sugie, K.**: Biological significance of autologous tumor killing activity in human cancer patients and its modulation by biological therapy. *In* U. Pastorino. & W. K. Hong. (eds.), Chemo-Immuno Prevention of Cancer, 1st ed., p. 9-14, George Thieme Verlag, New York, 1991.

26) **横瀬裕義，小森山広幸，赤石　治，森久保雅道，山中豊太，山口　晋，片山憲寺**：乳癌患者末梢血リンパ球サブセットの変動と各種予後因子の関連性の検討．日外会誌，**94**, 615-620 (1993).

27) **田辺　博，今井直基，渡辺　進，橋本高志，加納宣康**：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).

28) **黒井克昌，峠　哲哉，山口佳之，沢村明広，世戸芳博，服部孝雄**：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).

29) **Takasugi, M., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I.**: Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. Cancer Res., **33**, 2898-2902 (1973).

30) **Kiessling, R., Kleine, E. & Wigzell, H.**: "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur. J. Immunol., **5**, 112-117 (1975).

31) **Watanabe, Y., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Iwa, T., Nonomura, A., Kamimura, R. & Takashima, T.**: Proposals regarding some deficiencies in the new international staging system for non-small cell lung cancer. Jpn. J. Clin. Oncol., **21**, 160-168 (1991).

32) **Watanabe, Y., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Watanabe, S., Tatsuzawa, Y., Iwa, T., Suzuki, M. &**

Takashima, T.: Aggressive surgical intervention in N2 non-small cell cancer of the lung. Ann. Thorac. Surg., **51**, 253-261 (1991).

33) Watanabe, Y., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Watanabe, S. & Iwa, T.: Results of surgical treatment in patients with stage ⅢA non-small cell lung carcinoma. Thorac. cardiovasc. Surgeon, **39**, 44-49 (1991).

34) Watanabe, Y., Hayashi, Y., Shimizu, J., Oda, M. & Iwa, T.: Mediastinal nodal involvement and the prognosis of non-small cell lung cancer. Chest, **100**, 422-428 (1991).

35) Watanabe, Y., Shimizu, J., Tsubota, M. & Iwa, T.: Mediastinal spread of metastatic lymph nodes in bronchogenic carcinoma. Chest, **97**, 1059-1065 (1990).

36) Watanabe, Y., Ichihashi, T. & Iwa, T.: Median sternotomy as an approach for pulmonary surgery. Thorac. cardiovasc. Surgeon, **36**, 227-231 (1988).

37) Watanabe, Y., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Tatsuzawa, Y., Watanabe, S., Yoshida, M. & Iwa, T.: Improved survival in left non-small N2 lung cancer after more extensive operative procedure. Thorac. cardiovasc. Surgeon, **39**, 89-94 (1991).

38) 間島 進，藤田佳宏，西岡文三，咲田雅一，小島 治，大内孝雄，山根哲郎，春日正巳：早期胃癌における手術の合理化ーとくに遠隔成績・リンパ節転移状態および腫瘍免疫能からの検討ー．手術，**36**，279-287 (1982).

39) Papaioannou, A.: The contribution of regional lymph nodes in resistance against breast cancer. Practical imilications. J. Surg. Oncol., **25**, 232-239 (1984).

40) Crile, G. J.: Retionale of simple mastectomy without radiation for clinical stage I cancer of the breast. Surg. Gynecol. Obstet., **120**, 957-982 (1965).

41) Fisher, B., Montague, E., Redmond, C., Barton, B., Borland D., Fisher, E, R., Deutsch, M., Schwarz, G., Margolese, R., Donegan, W., Volk, H., Konvolinka, C., Gardner, B., Cohn, I., Lesnick, G., Cruz, A. B., Lawrence, W., Nealon, T., Butcher, H. & Lawton, R.: Comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. Cancer, **39**, 629-634 (1977).

42) Veronesi, U., Adamus, J., Bandiera, D. C., Brennhovd, I. O., Caceres, E., Cascinelli, N., Claudio, F., Ikonopisov, R. L., Javorskj, V. V., Kirov, S., Kulakowski, A., Lacour, J., Lejeune, F., Mechl, Z., Morabito, A., Rode', I., Sergeev, S., Slooten, E., Szczygiel, K., Trapeznikov, N. N. & Wagner, R. I.: Inefficacy of immediate node dissection in stage I melanoma of the limbs. N. Eng. J. Med., 627-630 (1977).

43) 胃癌研究会：全国胃がん登録調査報告第23号．昭和52年度症例の治療成績，116-117 (1986).

44) Pendergrast, W. J., Soloway, M. S., Myers, G. H. & Futrell, J. W.: Regional lymphadenectomy and tumor immunity. Surg. Gynecol. Obstet., **142**, 385-390 (1976).

45) Irvin, G. L. & Eustage J. C.: A study of tumor allograft sensitized lymph nodes in mice-Ⅰ, biologic activity of transfered cells. J. Immunol., **106**, 956-961 (1971).

46) Irvin, G. L., Eustage J. C., Mcaleer, J. A. & Levi, D. F.: A study of tumor allograft sensitized lymphnodes in mice-Ⅱ, in vitro immunoglobulin synthesis. J. Immunol., **108**, 207-213 (1972).

47) 山口佳之，峠 哲哉：脾摘と免疫．外科診療，**35**，1229-1235 (1993).

Studies on the Autologous Tumor-Killing Activity of Peripheral Blood, Regional Lymphnode and Tumor Infiltrating Lymphocytes in Patients with Lung Cancer

Yoshihiko Arano, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
－J. Juzen Med Soc., **103**, 207－219 (1994)

Key words lung cancer, autologous tumor-killing activity, peripheral blood lymphocyte, regional lymphnode lymphocyte, tumor infiltrating lymphocyte

Abstract

The present study attempted to obtain a more precise method for evaluation of the systemic and regional immune activities in patients with lung cancer by analyzing the tumoricidal activities of lymphocytes, which were freshly separated to react against autologous tumor (AT). Autologous tumor killing activity (ATK) and proportional change in the subsets in the peripheral blood lymphocytes (PBL), regional lymph node lymphocytes (RLNL), and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) were analyzed. The experiments were conducted with special attention to shortening the interval between separation of the specimen and measurements, so that unfavourable effects from the in vitro environment could be minimized. As a result, the autologous tumor killing (ATK) activities of PBL had no correlation with those of RLNL or TIL. The ATK activities were not correlated with the tumoricidal activities against allogenic tumor cell lines. The ATK activities of PBL decreased with the progression of the disease and nodal metastasis, while those of RLNL decreased with the progression of nodal metastasis. On the other hand, those of TIL were not affected by the tumor progression. A comparitive study of lymphocyte subsets between patients with lung cancer and normal controls revealed a decrease in the number of the cytotoxic T cells and an increase in the number of the suppressor T cells. This indicated that the systemic immune response against the tumor in

lung cancer patients occurs in the initial phase of the disease. The RLNL' subsets demonstrated a decrease in the number of the helper T cells, cytotoxic T cells and activated T cells, and an increase in the number of the suppresor inducer T cells wit progression of nodal metastasis. Analyses on the ATK activities and lymphocytes' subsets demonstrated that the main effector cells in PBL were $CD16^+$ $CD57^+$, natural killer cells, in RLNL and TIL were cytotoxic T cells, while those in RLNL and TIL were supposed to suppress the tumoricidal activities by suppresor inducer T cells. These results suggest that the ATK activity is a tumor specific immune response, and that the systemic immune activity has no correlation with the regional immune activity. In RLNL analyses of the lymphocyte subsets appeas to be useful as an index for deduction of the presense of tumoricidal activities.