

末梢血リンパ球よりみた肺癌所属リンパ節 リンパ球の免疫応答能

Immunologic Response of Regional Lymph Node Cells in Patients with Lung Cancer, Comparing with Peripheral Blood Lymphocytes

小川純一

抄録：肺癌患者の全身と局所の免疫能を比較するため、末梢血と所属リンパ節のリンパ球の PHA 反応、T細胞の割合、IgG-Fc リセプター陽性T細胞の割合を検索した。PHA 反応では、術前治療のない stage I の患者より採取したリンパ節リンパ球が末梢血リンパ球に比し約 2 倍の反応値を示したが、stage の進展とともに次第に低下し、リンパ節が転移陽性となると末梢血リンパ球の半分以下と著明に減少した。所属リンパ節の位置による変化は、腫瘍に近接したものほど PHA 反応は高く、遠ざかるにつれ低下していく傾向が見られた。

T細胞の割合では、リンパ節は末梢血リンパ球に比し低値を示したが、PHA 反応で見られたごとく、病巣に近接したリンパ節ほどT細胞の割合は高かった。

IgG-Fc リセプター陽性T細胞の割合は、末梢血、リンパ節ともに正常人末梢血より増加していたが、リンパ節相互間では有意差を見なかった。

1. 諸言

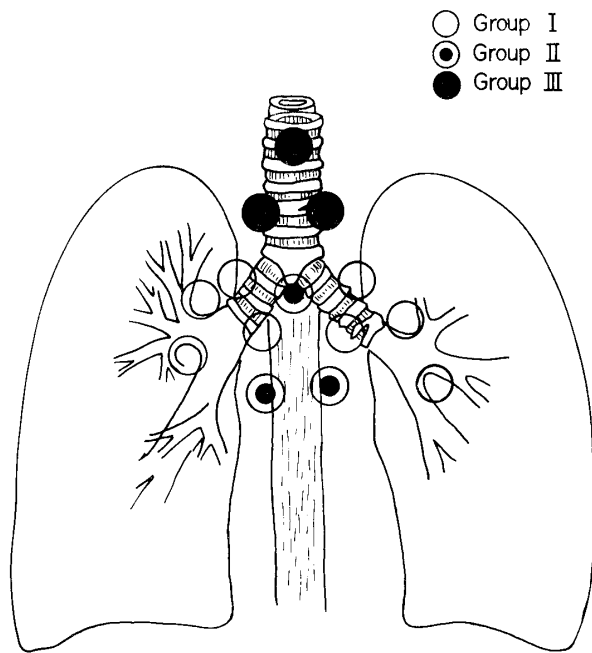
肺癌の手術に際し原発巣とともに所属リンパ節を廓清することは不可欠であるが、リンパ球の免疫能という観点よりみれば癌病巣の進展につれ各所属リンパ節の防禦機能は当然変化するものと思われ、すべての病期に対し画一的にリンパ節を廓清することには一考を要する心要がある。Crile¹⁾は stage I, II の乳癌症例においてリンパ節を温存する simple mastectomy とリンパ節を廓清する radical mastectomy との間に遠隔成績の有意差はないとしており、リンパ節の腫瘍免疫における役割が十分に考えられる。今回は肺癌におけるリンパ節の防禦機能を検索するために、全身と局所の免疫能の比較、即ち末梢血リンパ球（以下 PBLs と略す）と所

属リンパ節リンパ球（以下 RLNC_s と略す）との差異を調べ、癌病巣に近接したリンパ節の反応、及び病巣の進展に伴う反応の変化につき若干の知見を得たので報告する。

2. 実験材料、および方法

対象症例は肺癌19例で、内訳は扁平上皮癌12例、腺癌5例、粘表皮癌1例、転移性肺癌1例である。病期別にみるとTNM分類による stage I が8例、stage III が11例である。所属リンパ節はリンパ球の流れを考慮し便宜上 I 群、肺内及び肺門リンパ節、II 群、分岐下リンパ節、III 群、縦隔リンパ節の3群に大別した。(Fig.1)術中廓清されたリンパ節は上記に従い3群に分け、更にこれを2分して一方を通常の病理組織用に提出して転移の有無を確かめ、残りの半分を本実験用に使用した。リンパ節は鋏で細切した後、

Fig. 1. Sites of Regional Lymph nodes



PBS 中でスライドグラスにて圧挫し単離細胞浮遊液とした²⁾ この浮遊液より Ficoll-Conray 比重遠心法³⁾ でリンパ球を分離してこれを 5×10^5 個/ml に調整し、20% 牛胎児血清加 RPMI 中に浮遊させた。末梢血リンパ球は術中末梢静脈血を採取し、同じく Ficoll-Conray 比重遠心法³⁾ によりリンパ球を分離、 5×10^5 個/ml の濃度で上記培養液に浮遊させた。実験は以下の項目について行った。

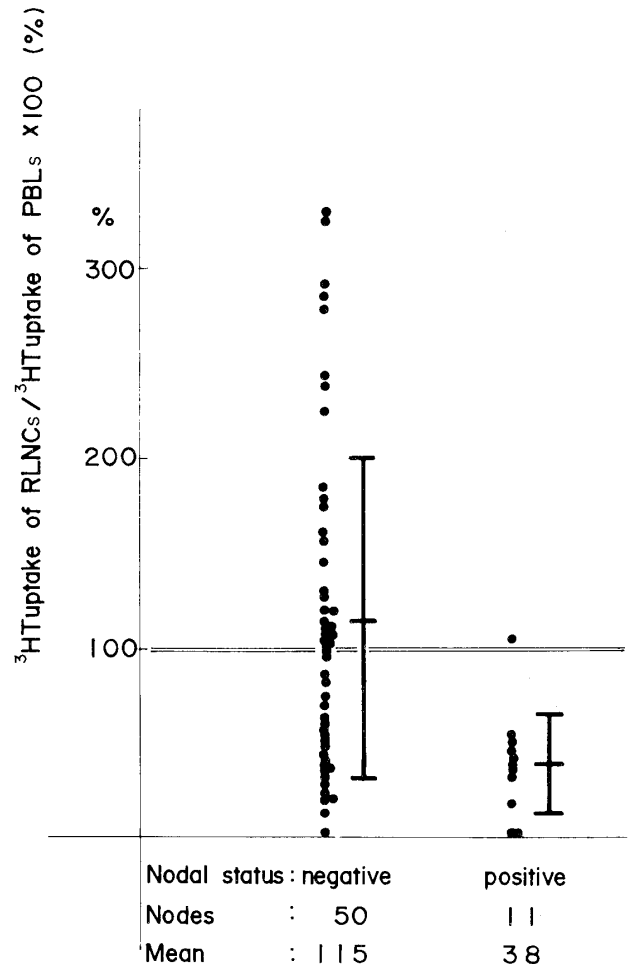
① PHA 刺激試験

② T 細胞の割合

③ IgG-Fc リセプター陽性 T 細胞の割合

上記に調整した RLNCs, PBLs をマイクロプレート (NUNU 社製) に 0.1ml ずつ分注、これに PHA-P (DIFCO 社製) を 5 ml に溶解し、その 50 倍希釈したものを 0.1ml ずつ添加、別に PHA-P 非添加群を対照として設け、これらを炭酸ガス培養器 (5% CO₂) にて 48 時間培養後、 $1 \mu\text{Ci}$ の ³H-thymidine (2.0 Ci/mmol) を添加、更に 24 時間培養し、液体シンチレーションカウンター (PAC-KARD 社) にて細胞内に取り込まれた RI の放射活性を測定した。PHA 添加群、対照群は各々 triplication し、その平均値を cpm で表わした。T 細胞は羊赤血球とのロゼット形成能にて定量

Fig. 2. Ratio of ³HT uptake of RLNCs to PBLs in each patient with PHA stimulation, comparison between negative and positive nodes.

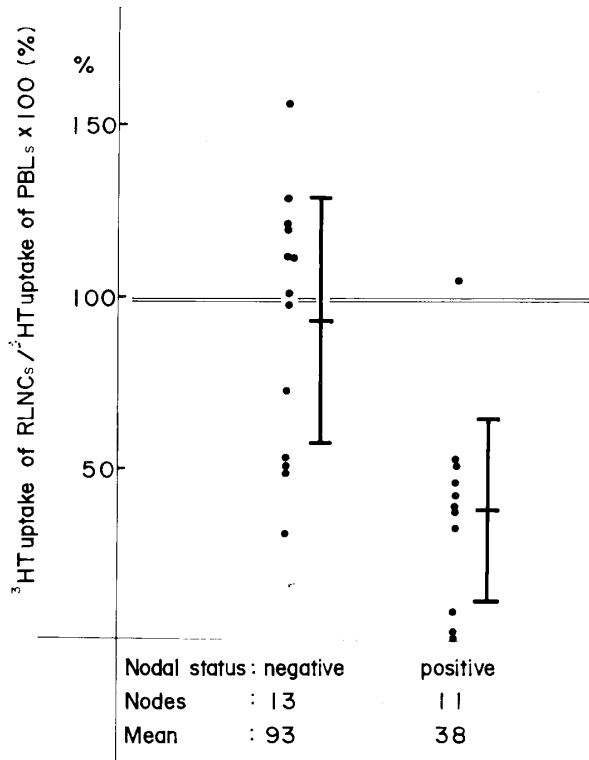


した⁴⁾

IgG-Fc リセプター陽性 T 細胞 (以下 T_G cell と略す) は、新保らの方法に準じた⁵⁾ 即ちニワトリ赤血球膜でウサギを免疫した後得られた血清の IgG 分画をニワトリ赤血球を凝集しない最高濃度 (凝集価の 2 倍希釈) で 1% ニワトリ赤血球と同量混和後、37°C、1 時間反応させ、その感作赤血球を PBS で洗滌し、遊離の抗体を除いて indicator cell とした。この indicator cell とリンパ球を同量混和、4°C で 24 時間反応させた後、牛胎児血清、羊赤血球を加え double rosette を形成するリンパ球を T_G cell とした。T_G cell の定量は

$$\frac{\text{Sheep-E rosette}(\%) + \text{double-rosette}(\%)}{\text{double-rosette}(\%)} \times 100\%$$

Fig. 3. Ratio of ^3HT uptake of RLNCs to PBLs in each patient with PHA stimulation, comparison between tumor-containing and tumor-free RLNCs from positive node patients.



にて行った。

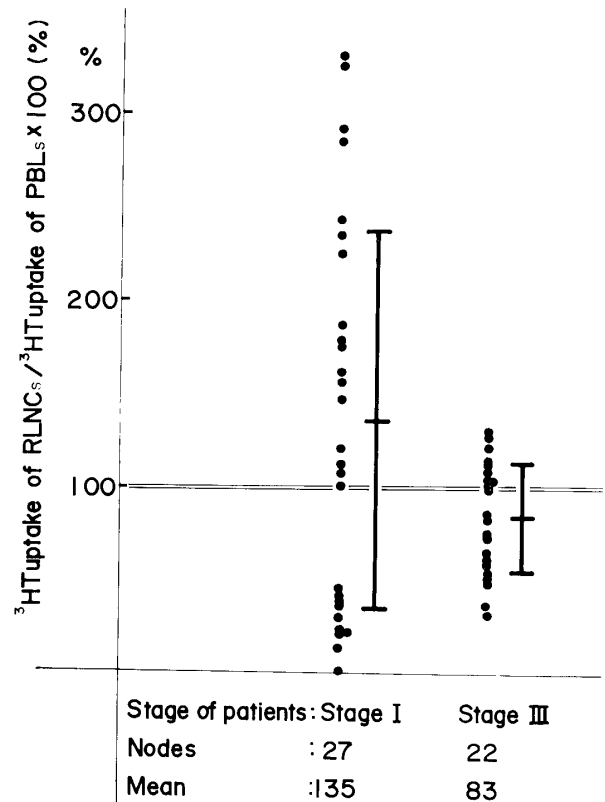
3. 結果

RLNC_sとPBL_sとのPHA反応値を対比させるために、個々の肺癌患者でのPBL_sのPHA反応値を100%とし、それに対するRLNC_sの反応値を算出した。計算は次式に従った。

$$\frac{\text{RLNCs PHA添加反応値} - \text{RLNCs対照群反応値}}{\text{PBLs PHA添加反応値} - \text{PBLs対照群反応値}} \times 100(\%)$$

Fig. 2 はリンパ節転移の有無による差異を示したもので、リンパ節が転移陽性となると $38 \pm 27\%$ であるのに対し、転移陰性群は、 $115 \pm 85\%$ で両者間には有意の差がみられた($P < 0.01$)。次に少なくとも1個以上の転移陽性リンパ節をもった癌患者でのRLNC_sの反応を調べるとFig. 3の如く転移陽性リンパ節が $38 \pm 27\%$ であるのに対し陰性リンパ節は $93 \pm 36\%$ となり両者間には有意差を認めた($P < 0.005$)。病期が進行

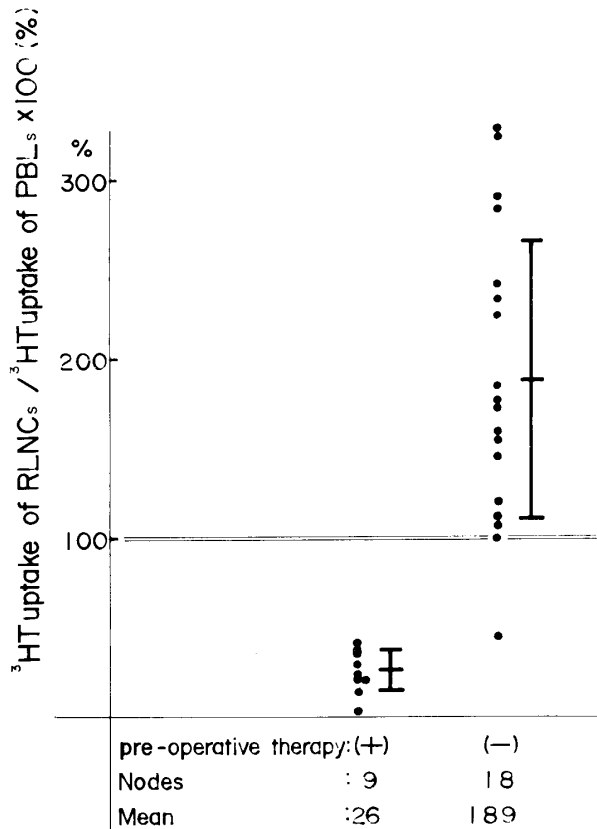
Fig. 4. Ratio of ^3HT uptake of RLNCs to PBLs in each patient with PHA stimulation, comparison between negative RLNCs from stage I patients and those from stage III patients.



するにつれ、いかなる変化が起こるかを調べるために、癌患者をStage IとStage IIIに分け、各々の転移陰性RLNC_sの反応を調べたものがFig. 4である。Stage I癌患者の反応は $135 \pm 102\%$ に対しStage IIIは $83 \pm 30\%$ で有意差があった($P < 0.05$)。更にStage I癌患者を、術前に放射線治療、あるいは長期にわたる制癌剤治療(但し一回のみの気管支動脈内制癌剤注入療法は除く)を受けたもの、受けていないものに分け、術前に行う制癌治療がリンパ節にいかなる作用を及ぼすかを調べたものがFig. 5である。術前治療を受けたものの陰性RLNC_sの反応値が僅か $26 \pm 12\%$ であったのに対し、術前治療を受けていないものそれは $189 \pm 78\%$ で、その差は一層明確であった($P < 0.005$)。

肺癌におけるリンパの流れは転移の面で大きな問題となるが、リンパ節を3群に分け、転移陰性で術前治療を受けていない患者のRLNC_s

Fig. 5. Ratio of ³HT uptake of RLNCs to PBLs in each patient with PHA stimulation, comparison between negative RLNCs from stage I patients with pre-operative radiotherapy or long-term chemotherapy and those from stage I patients without any pre-operative therapy.

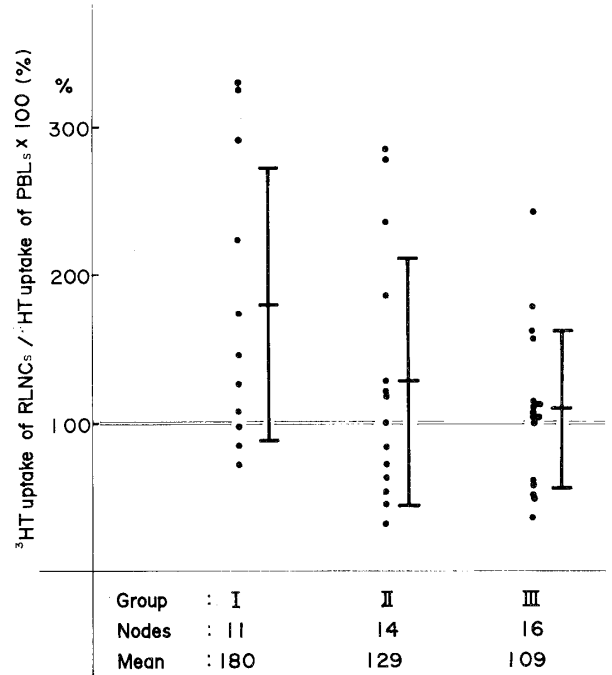


が各群間でどのような免疫能の変化を示しているかを検索すると、I群180±93%, II群129±82%, III群109±53%で3群ともPBLsより高く、I, II, III群の順に反応は低下し、I, III群間には有意差があった(P<0.05) (Fig. 6)。

T cell populationをPBLs, RLNCsにつき調べたものがFig. 7で、転移陽性RLNCs 34±17%, 転移陰性I群RLNCs 51±14%, II群44±16%, III群37±14%, 癌患者PBLs 63±21%でI, III群間、およびI群、転移陽性群間、又、PBLsとIII群、転移陽性群間に、それぞれ有意差を認めた(P<0.05)。即ち、RLNCsはPBLsに比しT cell populationは低いが、RLNCs間ではPHA反応に見られたようにI, II, III群の順に低下し、転移陽性群で最も低い値が得られた。

更にT cell populationのうち、T_G cellの割合

Fig. 6. Ratio of ³HT uptake of RLNCs to PBLs in each patient with PHA stimulation, comparison between three groups of negative RLNCs from the patients without any pre-operative therapy.



を検索するとFig. 8のごとくPBLsで4.9±3.1%, RLNCsではI, II, III群、転移陽性群ともに平均で3~4%で、リンパ節間では、殆んど差を認めず、PBLsで高い傾向が得られた。しかし正常人5例のT_G cell 1.3±0.7%に比べると、癌患者ではPBLs, RLNCsともに高値であった。

4. 考案

腫瘍免疫におけるリンパ節の防禦機能は種々の報告により明らかにされつつあり、Kaufmannら⁶⁾は肺癌リンパ節の組織学的な形態、Fisher^{7), 8)}は乳癌、大腸癌を中心に所属リンパ節のPHA刺激試験、細胞障害試験、Ellis⁹⁾は乳癌リンパ節の白血球遊走阻止試験、Deodhar¹⁰⁾は乳癌リンパ節のPHA刺激試験、細胞障害試験、菅沼ら¹¹⁾は胃癌患者リンパ節のPHA、PWM刺激試験と各々悪性腫瘍患者所属リンパ節において免疫学的検討を加えている。本研究では肺癌患者においてRLNCsとPBLsを対比させ、PHA反応、T cell population、T_G cellの検索を行ない、末梢血に

Fig. 7. T cell population of RLNCs and PBLs

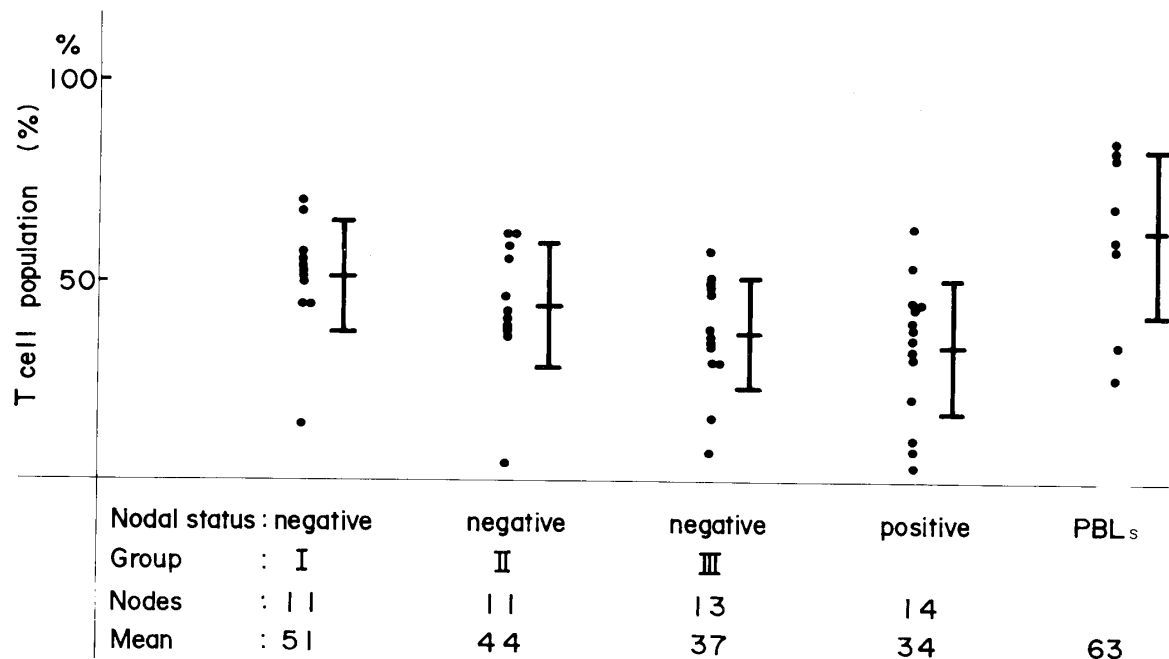
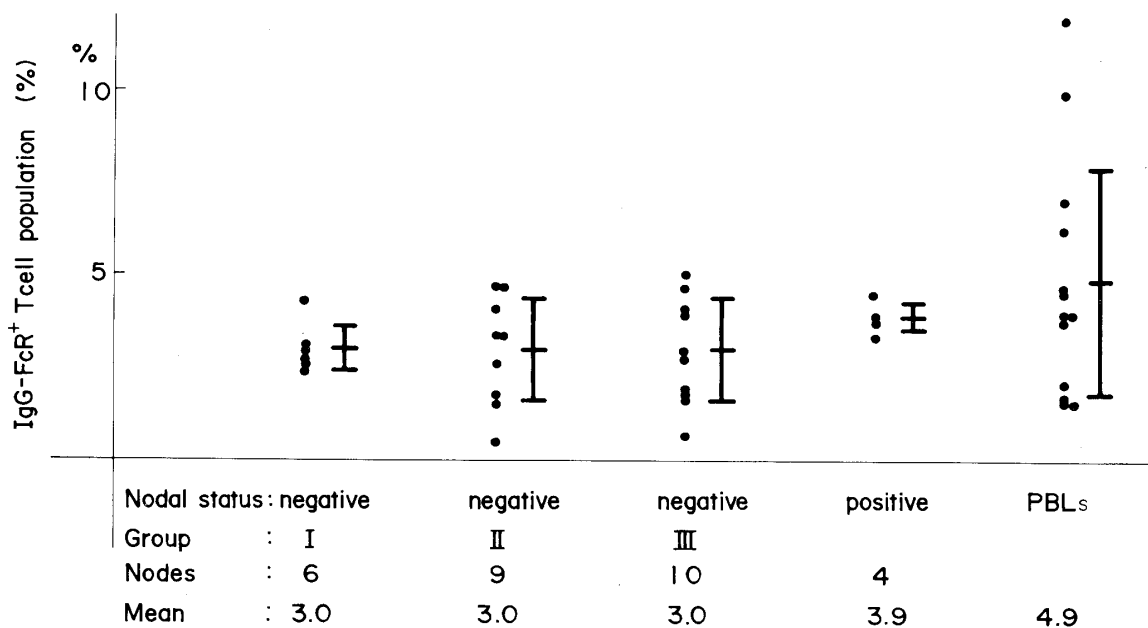


Fig. 8. IgG-FcR⁺ T cell population of RLNCs and PBLs.



比リンパ節が腫瘍の進行に伴い，またリンパ流に沿っていかなる免疫学的機能の変化が起きているかを中心に検討を加えた。PHA 刺激試験では転移陽性リンパ節群と陰性群との間に有意差が見られたのと同時に，陽性群ではPBL_sに比しその反応は著しく低下していた。

一方陰性群は PBL_s よりもやや高値を示しPHA 反応が腫瘍に対する免疫抵抗性を示唆する

ものとすれば陽性群は末梢血に比し著明にその抵抗力を減じているのに対し，陰性群は末梢血とほぼ同等の抵抗力を有していると解釈できる。しかし陰性RLNC_sのPHA 反応値はPBL_s に対し45%から330%までの広範囲にわたっていたため，これを更に詳しく細分した。先ずPBL_s よりも低値を示すRLNC_sにつき検討を加えるため，肺癌患者で転移陽性リンパ節を有するもの

リンパ節を陽性群、陰性群に分けた。また患者を Stage I と Stage III に分けそれぞれの転移陰性 RLNC_S の PHA 反応値を調べた。結果は Fig. 3, Fig. 4 に示されたように両者間に有意差を見、すでに n_1 以上となっている患者、あるいは Stage III 患者の陰性 RLNC_S は陽性 RLNC_S に比べかなり反応性は残されているものの、PBL_S に比し低下、防禦機能から考えれば局所免疫の意義はうすれて PBL_S の方がより重要になってくると考えられる。リンパ節検索数が少ないため結論は出せないが、Stage I 患者のうち術前5000rads の放射線治療を受けたもの、あるいは2週間以上にわたり FT207 の経口投与を受けたもの2例につき陰性 RLNC_S の PHA 反応を調べると PBL_S に対し 26 ± 12% となって転移陽性群より更に低く、リンパ球機能面に対し術前の制癌治療は逆効果となり得る可能性もある。

肺癌のリンパ節に沿った拡大進展様式は成毛¹²⁾ Gordon¹³⁾ らの報告に従い考慮し、所属リンパ節を I 群、肺内、肺門部、II 群分岐部、III 群縦隔、に分け肺内腫瘍が生じた時の RLNC_S の免疫応答を PBL_S と比較した。Fig. 6 の結果より、腫瘍に近接した RLNC_S ほど反応は高く、リンパ流に沿い遠ざかるにつれ低下、I, III 群間には有意差も認められている。同時に3群ともその平均値は PBL_S よりも高かった。リンパ節内での T 細胞の量的割合も PHA 反応と同じく腫瘍に近接したもののほど多くなっていた。即ち Fig. 7 に見られるごとく I, II, III 群の順に少くなり、I, III 群間には有意差が認められた。しかし PBL_S に比べると3群とも T 細胞の割合は低く、PHA 反応が PBL_S よりも高いことを考え合わせると Ellis⁹⁾ らの乳癌報告例で述べられているように RLNC_S の方が PBL_S よりも免疫反応は高いのではないかと思われる。一方陽性群では T 細胞の割合が最も低く、T 細胞に関しては機能的にも量的にも、癌細胞の進展に伴うリンパ節の末期の形ではないかと考えられた。

T_G cell の機能、および PHA に対する反応は種々の報告^{14)~17)} が見られ、必ずしも一定したものではない。新保¹⁴⁾ らは PBL_S 中の T_G cell を調べ、PHA 反応、B 細胞の免疫グロブリン産生能

よりその抑制機能を認めている。我々の検索では症例数が少ないため結論を出すには至らなかったが正常人に比べ、癌患者では PBL_S, RLNC_S ともに T_G cell は高い割合で検出された。しかしリンパ節相互間では特に差を認めず、PHA 反応値と T_G cell の割合との間にも一定の相関は得られなかった。癌患者 PBL_S 中で RLNC_S よりも高い割合が得られたことは、T_G cell の循環性、転移による影響なども考慮し、今後機能面の解析とともに更に検討を加える必要がある。

以上の検索結果より、術前治療を受けていない Stage I の肺癌で、リンパ節転移を認めない症例では、RLNC_S は PBL_S よりも高い免疫能力を有しており、腫瘍の増大、リンパ節への浸潤につれ次第にその能力を減じて PBL_S よりも低下し、遂に転移陽性となると T 細胞は機能的にも、量的にも著明に低くなった。リンパ節の位置による変化は、腫瘍に近接したもののほど、その PHA 反応は高く、この傾向は T 細胞の割合についてもほぼ同様で、腫瘍に対するリンパ流に沿った RLNC_S の免疫抵抗の変化を示唆しているものと思われた。これらを外科的治療の面より考えれば、早期の肺癌でリンパ節転移のない症例では、原発巣の摘出にとどめ、リンパ節を温存することにはむしろ妥当性があるように思われ、Crile が Stage I, II の乳癌症例で提唱しているごとく、肺癌においても radical lobectomy, simple lobectomy という概念がわけて考えられる可能性もあろう。

5. まとめ

肺癌患者の RLNC_S を PBL_S と対比させ以下の結論を得た。

1. PHA 反応において、PBL_S の反応値を 100% とすると、術前治療のない Stage I 患者の転移陰性 RLNC_S のそれは 189% であるが、腫瘍の増大、リンパ節への浸潤とともに次第に低下しリンパ節が転移陽性となると 38% と著明に減少した。
2. 術前の放射線治療、制癌剤治療はリンパ節の免疫能力を低下させる可能性がある。
3. 転移陰性リンパ節の PHA 反応はリンパ節

の位置が腫瘍に近いものほど高く，遠ざかるにつれ低くなる。この傾向はT細胞の割合についても同様であった。

4. IgG-Fcリセプター陽性T細胞は，癌患者PBLs, RLNCsともに正常人PBLsに比べ高かったが，リンパ節相互間では有意差はなかった。

文 献

- 1) Crile, G.: Ann. Surg., 181:26, 1975.
- 2) 木下喜博：臨症病理，特：25：103，1976.
- 3) 辻 公美：免疫実験操作法A：443，日本免疫学会編，金沢，1975.
- 4) 橘 武彦ら：免疫実験操作法III：683，日本免疫学会編，1973.
- 5) 新保敏和ら：臨床免疫，9：141，1977.
- 6) Kaufmann, M. et al: Cancer, 39:2371, 1977.
- 7) Fisher, B. et al: Cancer, 30:1202, 1972.
- 8) Fisher, B. et al: Cancer, 33:631, 1974.
- 9) Ellis, R.J. et al: Cancer, 35:655, 1975.
- 10) Deodhar, S.D. et al: Cancer, 29:1321, 1972.
- 11) 菅沼 靖ら：J.Jap.Soc. Cancer Ther., 11:193, 1976.
- 12) 成毛韶夫：日外会誌，68：1607，1967.
- 13) Gordon, W.: Am. J. Surg., 104:866, 1962.
- 14) 新保敏和ら：臨床免疫，9：487，1977.
- 15) Moretta, L. et al: J. Immunol. 117:2171, 1976.
- 16) Stout, R.D. et al: J. Exp. Med. 142:1041, 1975.
- 17) Krammer, P.H. et al: Eur. J. Immunol. 6:138, 1976.

(原稿受付 1978年9月25日)

**Immunologic Response of Regional Lymph Node Cells in
Patients with Lung Cancer, comparing with Peripheral
Blood Lymphocytes.**

Junichi Ogawa,

1st Department of Surgery
School of Medicine, Tokai University, Isehara

In an attempt to clarify differences between local and systemic immune response, regional lymphnode cells (RLNs) and peripheral blood lymphocytes (PBLs) obtained from 19 patients with lung cancer were tested for PHA stimulation, T cell population, T cell subpopulation bearing IgG-Fc receptor.

PHA response rate of non-metastatic RLNCs was approximately two times higher than that seen with PBLs in stage I patients without any pre-operative therapy. With more advanced disease it became low, and it was less than half of that with PBLs when the nodes had been invaded with the tumor cells.

In relevant to the location of lymph node the closer to the tumor, the higher the PHA response, and vice versa.

T cell population was found to be lower in RLNCs than in PBLs. It tended to be higher in nodes closer to the tumor.

T cell subpopulation bearing IgG-Fc receptor was higher both in RLNCs and in PBLs than in control samples. No significant difference was observed between each of lymphnodes.