

肺癌患者免疫機能の検討：末梢血，所属リンパ節 および腫瘍内浸潤リンパ球の比較

鳥取大学医学部外科学第二教室（主任 森 透教授）

中 村 広 繁

Immune functions of human lung cancer patients: Comparison of the activities of peripheral blood, regional lymph node and tumor infiltrating lymphocytes.

Hiroshige NAKAMURA

*Department of Surgery, Tottori University
School of Medicine, Yonago 683, Japan*

ABSTRACT

Immune functions of human lung cancer patients were evaluated among the three different groups of lymphocytes, that is, peripheral blood, regional lymph node and tumor infiltrating lymphocytes (PBL, RLNL and TIL). It was very interesting that they have characteristic subpopulations of lymphocytes and different cytotoxic activities, respectively. The results were as follows.

1. PBL had many natural killer (NK) cells and the highest NK activity, and showed the highest augmentation of NK activity by interferon- γ (IFN- γ) + recombinant interleukin-2 (rIL-2) compared with other groups. Lymphokine activated killer (LAK) activity was highly induced against broad spectrums of cell lines and moderately induced against autologous tumor cells by increased effector to target (ET) ratio.
2. RLNL, not associated with tumor metastasis had lower NK activity than that of PBL. But, LAK activity that was different from NK activity, was almost the same but not beyond that of PBL. All activities of RLNL associated with tumor metastasis were lower than those not associated with tumor metastasis.
3. TIL exclusively consisted of T cells, especially cytotoxic/suppressor T lymphocytes. NK activity and lymphocyte blastogenesis were lower than those in other groups. Induced LAK activity exhibited much differences in each case, and it was very interesting in terms of the specific immune response that the highest LAK activity against autologous tumor cells was induced among the three groups of lymphocytes in 3 of 8 cases.

These results show that RLNL, not associated with tumor metastasis and TIL have the potential anti-tumor activities. Efficient augmentations of the immune responses may lead us to the more reasonable lymph node dissection in surgical operations and the more effective total cancer therapy.

(Accepted on October 30, 1987)

担癌患者の免疫応答は腫瘍に対する生体防御反応の証明として非常に興味深く、これまで多くの論文⁷⁾¹³⁾¹⁶⁾³³⁾³⁵⁾⁴³⁾⁵⁵⁾がヒトの腫瘍に対する免疫応答を定義し特徴づけてきた。そして、それらの多くは癌患者における宿主免疫系の down regulation とそのための予後の悪さを証明してきた¹³⁾³³⁾³⁵⁾⁴³⁾。肺癌の分野においても癌の進行に伴う細胞性免疫の低下が論じられており⁸⁾¹⁵⁾¹⁸⁾⁴⁴⁾最近では Holmes²¹⁾が腫瘍内浸潤リンパ球の低い natural killer (以下 NK) 活性と bacille de Calmette et Guèrin (BCG) 局注によるそれらの回復を証明し局所腫瘍部位での不応答を誘導する特殊腫瘍環境を強調した。また、同様の現象は動物の系でも認められ、Kleinら³²⁾、武田ら⁵⁷⁾が自己癌に対する免疫学的低反応を示している。しかしながら、これまで担癌患者における免疫応答を末梢血、所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の3者について比較した報告は非常に少なく著者らの調べ得た範囲ではわずかにヒトの系で Vose ら⁵⁹⁾⁶⁰⁾、Kimura ら³¹⁾そして藤沢ら¹⁴⁾が報告しているのにすぎない。一方、1976年の Morgan ら³⁷⁾による T細胞増殖因子 (以下 interleukin-2) の発見により、interleukin-2 によって活性化される NK 細胞、lymphokine activated killer (以下 LAK) 細胞、特異的細胞障害性 T細胞等の研究が進んできた。とくに、1982年 Grimm ら¹⁷⁾によって記載された *in vitro* で interleukin-2 にて誘導される LAK 細胞は NK 抵抗性の新鮮自家腫瘍細胞を human²³⁾³⁴⁾、mouse³⁸⁾の両系において溶解させることが知られ、passive あるいは adoptive immunotherapy を目指して熱心に研究されてきている。また、肺癌手術におけるリンパ節郭清を考えた場合、所属リンパ節が癌に対する biological barrier として positive に働くかどうかこれまで多くの議論³⁾¹⁹⁾³⁹⁾⁴⁵⁾のあるところで外科臨床的に重要な問題である。そこで、今回本研究では肺癌患者において、末梢血、所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球といった異なる3者のリンパ球機能を細胞障害活性を中心に検討し担癌患者における全身と局所の免疫応答を比較して、癌免疫療法の有用性並びに、リンパ節郭清の意義を考えた。このことは総合的癌治療を最大限に効果的に行なう上で重要なことであると思われる。

対象と方法

1. 対象患者

1986年5月から1987年7月までの間に鳥取大学医学部附属病院第二外科並びに関連病院にて外科的に切

除した原発性肺癌 39例を対象とした。その内訳は年齢が41才から78才、平均63.4才で男性26例、女性13例であった。組織型は扁平上皮癌14例、腺癌17例、腺扁平上皮癌3例、大細胞癌3例、小細胞癌2例で病期はI期10例、II期10例、III期18例、IV期1例であった。また、コントロールとして肺癌患者と年齢、性の適合した正常ボランティア15例の末梢血を用いた。その年齢は54才から77才、平均64.8才で男性9例、女性6例であった。

2. リンパ球分離法

手術直前に採血したヘパリン加末梢血、手術時採取した所属リンパ節ならびに切除材料から取り得た腫瘍組織の3者から図1のごとくリンパ球を分離した。まず末梢血はハンクス溶液 (半井化学) にて二倍希釈して、リンパ節は細切してスライドグラスで圧挫したのちステンレスメッシュを通して、腫瘍組織は0.1 mg/ml コラゲナーゼ (和光純薬) 溶液中で細切攪拌しスライドグラスで圧挫したのち、それぞれ Ficoll-Paque (Pharmacia Inc., Sweden) 比重遠心法 (700×g, 20分, 室温) でリンパ球を分離した。腫瘍組織から分離したリンパ球はさらに純度を高めるため、Allavena ら⁴⁾の方法に従い75%と100%の Ficoll-Paque 不連続密度勾配上に重層し、500×g, 30分, 室温で遠心した。75%層は腫瘍細胞の多い分画、100%層はリンパ球の多い分画となり100%層を回収した。それでもなおリンパ球の純度が不十分の場合には Percoll (Pharmacia Inc., Sweden) を用いて、45%, 40%, 35%, 31.5%, 26%の不連続密度勾配を作成しその上に重層し、400×g, 60分, 室温で遠心した。40%層と45%層がリンパ球の多い層となりその部位を回収した。その際、腫瘍内浸潤リンパ球の純度は倒立顕微鏡下で90%以上がリンパ球であることを目標とした。こうしてそれぞれ3者から得られたリンパ球をプラスチックディッシュ (No. 25010, Corning) にて2時間培養して可及的に adherent 細胞を除去したものを effector 細胞として、すなわち、peripheral blood lymphocytes (以下 PBL), regional lymph node lymphocytes (以下 RLNL), tumor infiltrating lymphocytes (以下 TIL) として以降の実験に用いた。なお、リンパ節は半切して病理組織学的に転移の有無を確認した。

3. 細胞障害活性測定に用いた標的細胞株

細胞株として K562 細胞 (NK-sensitive erythroleukemic cell line), Daudi 細胞 (EBV-transformed B cell line), PC-3 細胞 (human lung

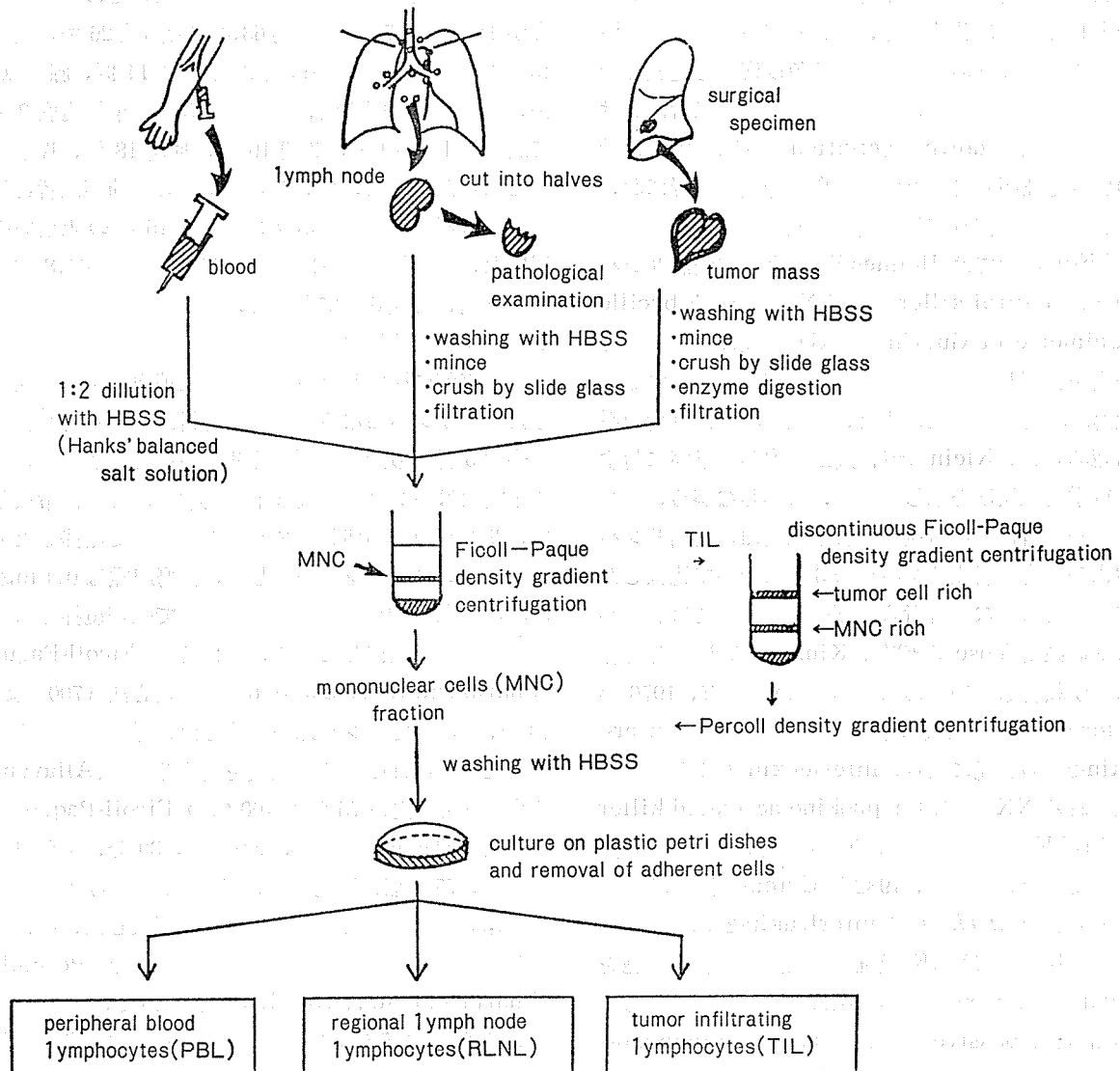


図 1. 末梢血, 所属リンパ節および腫瘍組織からのリンパ球分離法

adenocarcinoma cell line), QG-56 細胞 (human lung squamous cell carcinoma cell line) を用いた。これらの細胞は通常, RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium 1640+10% heat-inactivated fetal bovine serum (M.A. Bioproduct, U.S.A.) + 2mM L-glutamine (Flow Laboratories, Australia) + 2×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (第一化学薬品) + 200 units (以下 U)/ml penicillin + 200 μ g/ml streptomycin (以下 complete medium) にて維持した。また, 自家腫瘍細胞として腫瘍組織浮遊液を 75% と 100% の Ficoll-Paque 不連続遠心法で分離した際の腫瘍細胞の多い層すなわち 75% 層を complete medium にて培養したものをを用いた。腫瘍細胞は通常 2 日目ぐらいより monolayer を

形成し 5 日目に target 細胞として用いた。

4. リンパ球刺激に用いたサイトカイン

Recombinant interleukin-2 (以下 rIL-2) は塩野義製薬のものをを用いた。その力価は 1.0×10^7 U/mg であった。Interferon- γ (以下 IFN- γ) はミドリ十字のものをを用いた。その力価は国際単位に準じた。

5. NK 活性の測定

約 $1-3 \times 10^6$ 個の K562 細胞を 100 μ Ci の 51 Cr (クロム酸ナトリウム) (NEN Research Products, 第一化学) とともに 90 分, 37°C, 5% CO₂ incubator にて培養して, その後 5 回ハンクス溶液にて洗浄したものを target 細胞として用いた。一方, effector 細胞としては PBL, RLNL, TIL の 3 者を用いた。そして, effector 細胞と target 細胞を effector と

target の比 (以下 ET 比) が 100:1 となるようにチューブ (No. 2054, Falcon Labware, U.S.A.) に入れ, complete medium にて最終的に 1 ml として, 4 時間, 37 °C, 5 % CO₂ incubator にて培養した. 培養後チューブを 500×g, 5 分, 室温で遠心して上清を 500 μl ずつチューブ (栄研 1 号, 栄研器材) に取り, 細胞から放出された ⁵¹Cr に由来する放射活性 (以下 cpm) を gamma counter (Aoka, ARC-221 Autowell gamma system) にて測定した. 実験はすべて triplicate で行なった. % cytotoxicity は以下の計算式で求めた.

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

この際の spontaneous release は effector 細胞なしで complete medium のみで target 細胞を培養した時の上清中の放射活性, maximum release は 2 N HCl にて target 細胞をすべて溶解させた時の上清中の放射活性である. spontaneous release が maximum release の 30 % を越える時は実験から除外した.

6. NK 活性の賦活

Target 細胞は K562 細胞を用いた. Effector 細胞は PBL, RLNL, TIL の 3 者を 1×10⁶ cells/ml の濃度で, rIL-2 100 U/ml, IFN-γ 100 U/ml, rIL-2 100 U/ml+IFN-γ 100 U/ml をそれぞれ加え 24 穴マイクロプレート (No. 143982, Nunc, Denmark) で 16 時間, 37 °C, 5 % CO₂ incubator にて培養したものをを用いた. 培養後 effector 細胞は遠心して rIL-2 あるいは IFN-γ を取り除いた. ET 比は 50:1 とし, 以下の assay 方法は上記の方法と同様に行なった.

7. LAK 活性の測定

Target 細胞として K562 細胞, Daudi 細胞, PC-3 細胞, QG-56 細胞, 自家腫瘍細胞を用いた. Effector 細胞は PBL, RLNL, TIL の 3 者を 1×10⁶ cells/ml の濃度で, rIL-2 100 U/ml を加え, 24 穴マイクロプレートで 5 日間, 37 °C, 5 % CO₂ incubator にて培養したものをを用いた. 培養後 effector 細胞は遠心して, rIL-2 を取り除いた. ET 比は細胞株に対しては 10:1, 自家腫瘍細胞に対しては 50:1 とし, 以下の assay 方法は NK 活性の assay 法と同様に行なった.

8. リンパ球幼若化反応の測定

PBL, RLNL, TIL の 3 者を, 1×10⁶ cells/ml

の濃度に調節して, lymphocyte mitogen である phytohemagglutinin-P (以下 PHA-P) 5 μg/ml, concanavalin A (以下 Con A) 5 μg/ml, pokeweed mitogen (以下 PWM) 5 μg/ml, (生化学工業) を加え, 48 時間, 37 °C, 5 % CO₂ incubator にて培養した後, [methyl-³H]-thymidine, (NEN Research Products, 第一化学) を 0.5 μCi 加えてさらに 12-16 時間培養した. その後 cell harvester (Labo Science 社) にて細胞を labomashfilter (Labo Science 社) に吸着させ, シンチレーションカクテル (toluene + 0.1 mg/ml 1, 4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene+2.5 mg/ml 2, 5-diphenyloxazole) (和光純薬) に溶解し液体シンチレーションスペクトロメーター (PACKARD, TRI-CARB 4640, U.S.A.) で測定した. 実験はすべて duplicate にて行なった. Stimulation index (以下 SI) 値を以下の計算式にて算出してリンパ球幼若化反応の指標とした.

$$\text{SI 値} = \frac{\text{mitogen stimulation incorporation}}{\text{control incorporation}}$$

この際の control incorporation は complete medium のみで培養した細胞の放射活性である.

9. リンパ球 subpopulation の分析

PBL, RLNL, TIL の 3 者を一次抗体として leu 2a (cytotoxic/suppressor T), leu 3a (helper/inducer T), leu 4 (pan T), leu 7 (NK), leu 11a (activated NK) (以上 Becton-Dickinson, U.S.A.), B 1 (pan B) (Coulter Corp., U.S.A.), また二次抗体として fluorescein-conjugated-goat-anti-mouse immunoglobulin (Becton-Dickinson, U.S.A.) を用いて染色した. 染色方法は Kikutani ら²⁸⁾の方法に従った. すなわち, first step として 1×10⁶ 個の細胞に一次抗体を加えて 4 °C, 20 分, incubate しその後, 3 回 staining buffer (PBS + 2 % heat inactivated fetal bovine serum + 0.05 % NaN₃) にて洗浄した. 次に second step として二次抗体を加えて同様に incubate し洗浄を行なった. そして, 染色後, 蛍光顕微鏡下で最低 200 個, 通常 500 個の細胞を観察して陽性細胞率を算出した.

10. 統計解析

すべての結果を平均値±標準偏差で表わし, まず多群間の値を Kurskal-Wallis rank test で検定を行ない, 次に有意差のあったものに対して 2 群間の値を Mann-Whitney U test (Wilcoxon U test) の両側検定で解析した. 統計学的有意差は p<0.05 とした.

結 果

1. NK活性

3者のNK活性の結果は図2に示すごとくで肺癌患者のPBLは $51.7 \pm 18.4\%$ でありRLNL(転移陰性群が $6.8 \pm 3.3\%$, 転移陽性群が $2.4 \pm 3.5\%$), TIL($1.5 \pm 3.9\%$)と比較して明らかに有意に高値を示した($p < 0.01$). しかしながら, 正常人のPBL($64.3 \pm 13.3\%$)と比較すると有意に低値を示した($p < 0.05$). RLNLでは転移陰性群が転移陽性群よりも有意に高値を示した($p < 0.01$).

2. NK活性の賦活

肺癌患者のPBL, RLNL, TIL いずれも図3に示すごとくで刺激により活性が賦活され, 特にrIL-2+IFN- γ にて有意に最大の活性増強が認められた($p < 0.01$). すなわち, PBL($45.1 \pm 14.8\%$), RLNL 転移陰性群($4.0 \pm 3.3\%$), RLNL 転移陽性群($3.5 \pm 1.0\%$), TIL($2.8 \pm 2.7\%$)はそれぞれIFN- γ で $58.5 \pm 16.7\%$, $6.5 \pm 3.9\%$, $4.7 \pm 3.6\%$, $6.1 \pm 4.7\%$ に, rIL-2で $71.8 \pm 14.3\%$, $21.9 \pm 7.5\%$, $13.4 \pm 7.0\%$, $14.4 \pm 4.1\%$ に, IFN- γ +rIL-2で $78.3 \pm 7.5\%$, $26.0 \pm 8.1\%$, $14.3 \pm 10.2\%$, $15.9 \pm 7.6\%$ に活性が増強された. しかしながら, 3者の

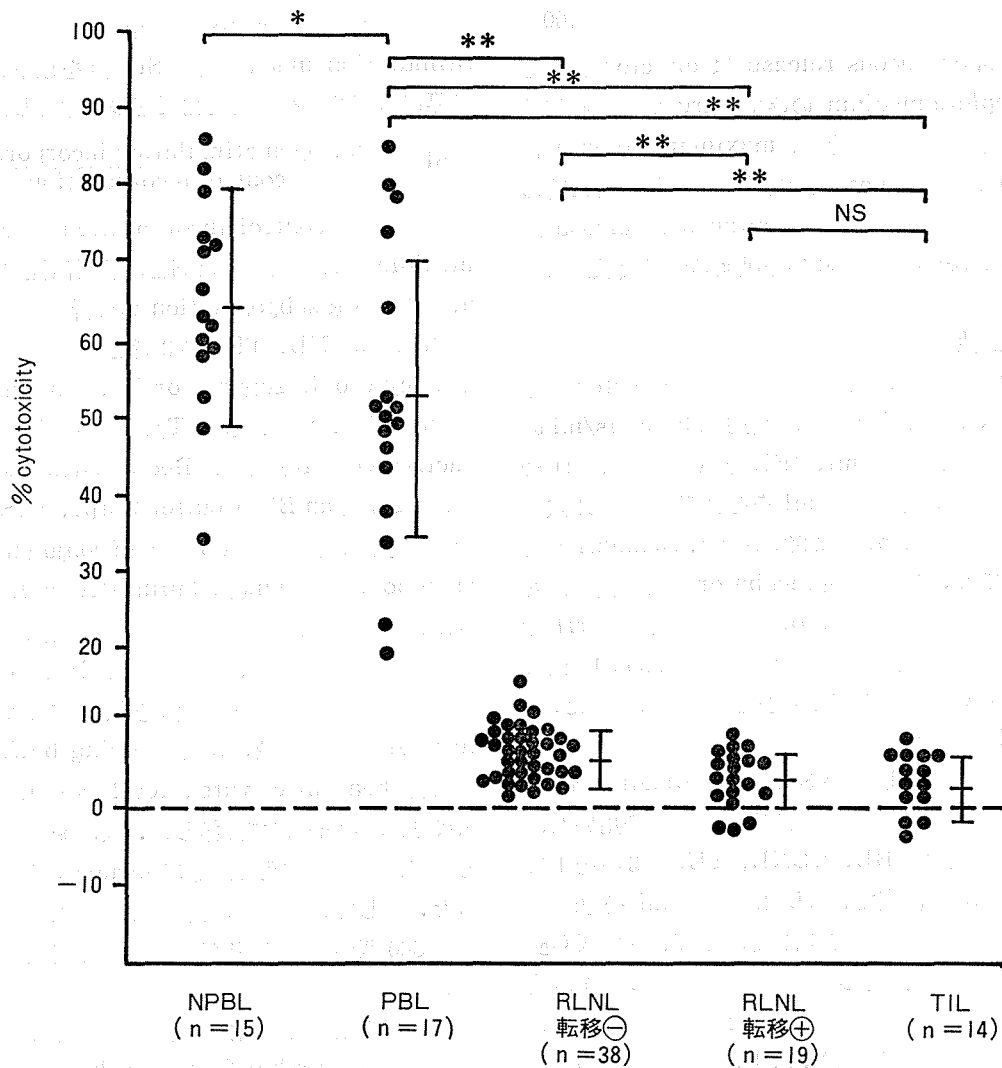


図2. 末梢血, 所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球のNK活性の比較 mean±S.D., ET比=100:1, NPBLは正常人末梢血リンパ球を表わす. 他の略語は本文参照.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS; not significant

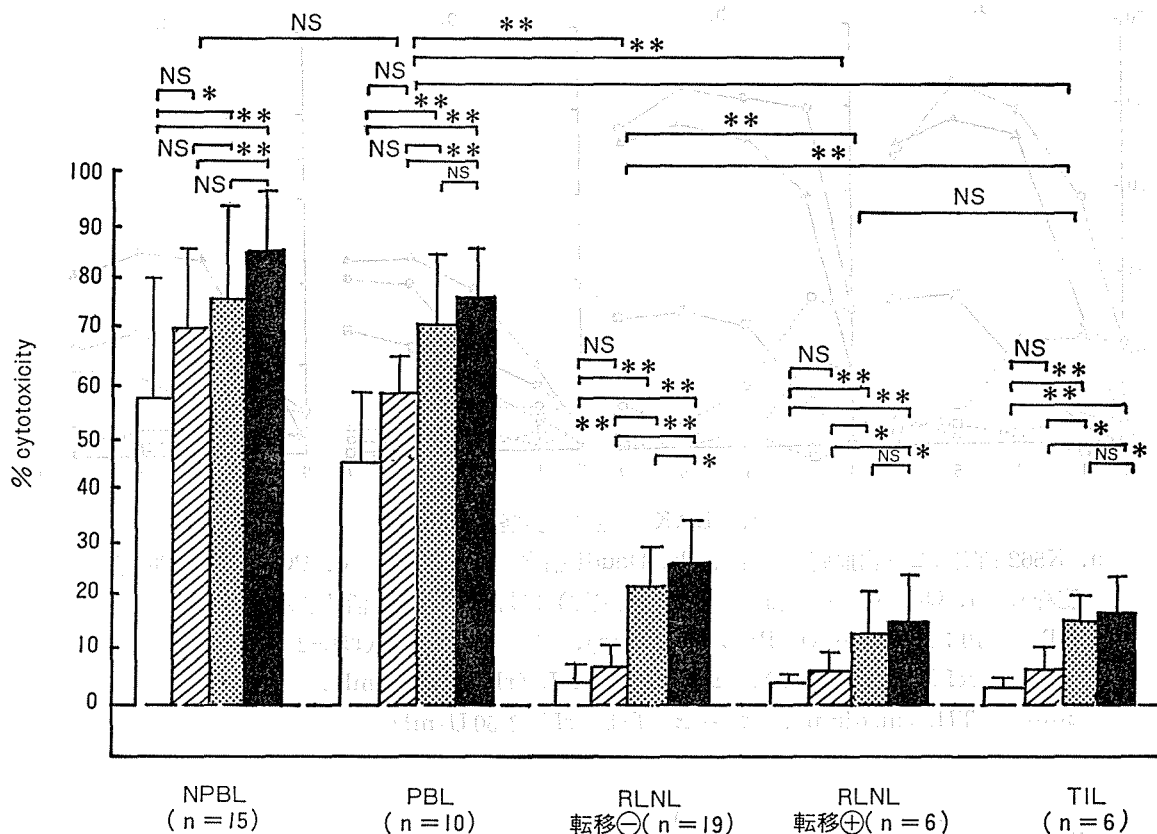


図 3. IFN- γ , rIL-2 による末梢血, 所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の NK 活性の賦活効果の比較

末梢血, 所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の NK 活性を無刺激 control (□), IFN- γ 刺激 (▨), rIL-2 刺激 (▤), IFN- γ +rIL-2 刺激 (■) にて比較した.

mean \pm S.D., ET 比=50:1, NPBL は正常人末梢血リンパ球を表わす.

他の略語は本文参照.

* p<0.05, ** p<0.01, NS; not significant

活性を比較するとなお, PBL の活性が他の 2 者と比較して有意に高値を示した (p<0.01). 正常人の PBL (57.9 \pm 21.7%) は IFN- γ で 70.3 \pm 16.4% に, rIL-2 で 75.0 \pm 19.0% に, IFN- γ +rIL-2 で 85.4 \pm 13.4% に活性増強され肺癌患者の PBL と比較すると活性増強は高値の傾向を示したが有意差は認めなかった.

3. 細胞株に対する LAK 活性

あらかじめ LAK 活性の培養日数による経時的変化と rIL-2 濃度による活性の変化を調べた. その結果, 培養日数に関しては図 4 に示すごとく 4-5 日目にピークを示し, また, rIL-2 濃度に関しては図 5 に示すごとく濃度依存的に最大活性が誘導された. そのため以下の実験設定として LAK 活性は無刺激状態に対して十分な活性が誘導されると見られた rIL-2 濃度 100

U/ml で, 培養日数は 5 日目で調べることにした. 図 6 がその結果である. 肺癌患者の PBL, RLNL 転移陰性群, RLNL 転移陽性群, TIL はそれぞれ K562 細胞に対して 67.9 \pm 19.8%, 48.1 \pm 19.4%, 35.2 \pm 16.8%, 28.1 \pm 27.0%, Daudi 細胞に対して 61.4 \pm 21.1%, 34.1 \pm 19.4%, 33.9 \pm 18.2%, 25.5 \pm 24.7%, PC-3 細胞に対して 50.9 \pm 23.4%, 36.9 \pm 21.6%, 29.2 \pm 19.0%, 25.9 \pm 23.0%, QG-56 細胞に対して 42.6 \pm 18.1%, 37.4 \pm 18.9%, 30.1 \pm 11.6%, 25.2 \pm 23.8% の LAK 活性を示した. これらの中で特に PBL は広いスペクトラムの細胞株に対して有意に高値の活性を認めた (p<0.01). RLNL は転移陰性群では NK 活性と異なり, 中から高値の活性を認め肺癌細胞株である PC-3 細胞, QG-56 細胞に対しては末梢血とほぼ同程度の活性を認めたが, それらを

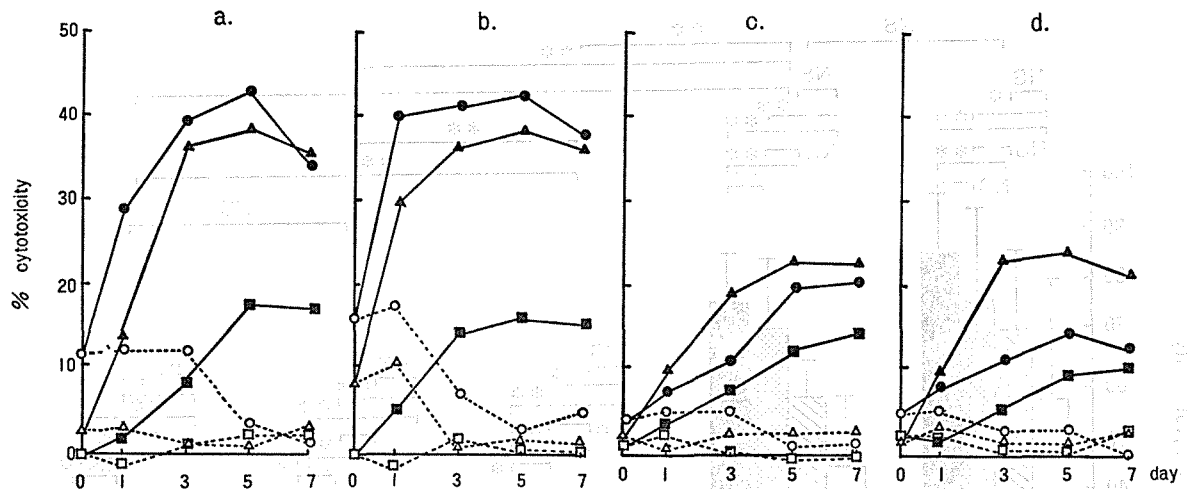


図 4. LAK 活性の培養経日変化

a. K562 細胞 (ヒト白血病細胞株), b. Daudi 細胞 (B 細胞株), c. PC-3 細胞 (肺腺癌細胞株), d. QG-56 細胞 (肺扁平上皮癌細胞株) に対する LAK 活性を示す.

ET 比=10:1, ○……○ PBL (medium), ●——● PBL (rIL-2 50 U/ml),
△……△ RLNL (medium), ▲——▲ RLNL (rIL-2 50 U/ml),
□……□ TIL (medium), ■——■ TIL (rIL-2 50 U/ml)

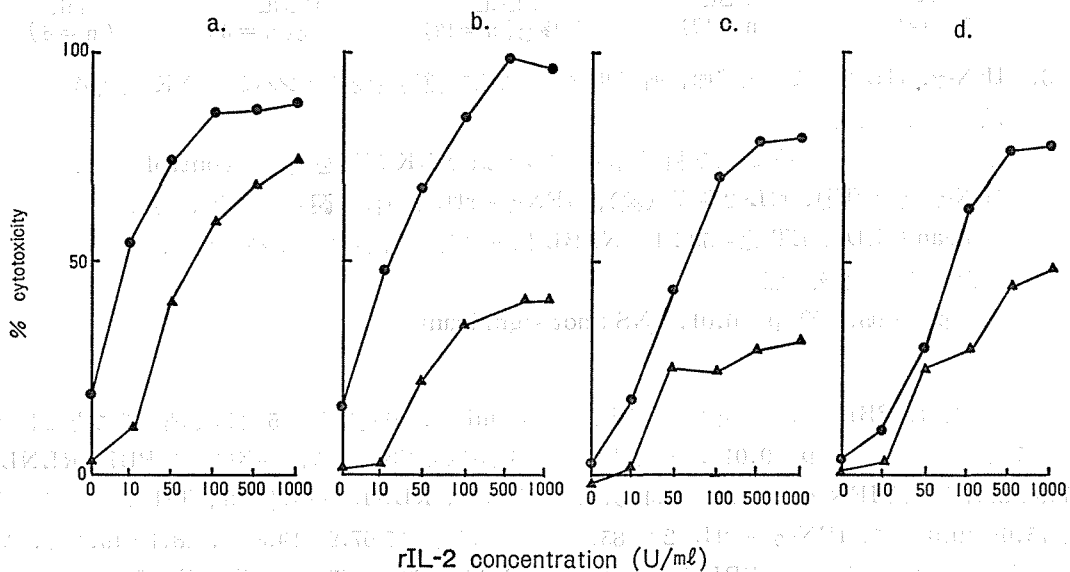


図 5. LAK 活性の rIL-2 濃度による変化

a. K562 細胞 (ヒト白血病細胞株), b. Daudi 細胞 (B 細胞株), c. PC-3 細胞 (肺腺癌細胞株), d. QG-56 細胞 (肺扁平上皮癌細胞株) に対する LAK 活性を示す.

ET 比=10:1, ●——● PBL, ▲——▲ RLNL

上回るには至らなかった。転移陽性群ではすべての細胞株に対して転移陰性群より低値の活性を認めたが有意差はなかった。TIL は他の二者と比較して有意に低値の活性を示した (PBL; $p < 0.01$, RLNL; $p <$

0.05) が症例によって較差の大きい傾向を認めた。正常人の PBL は K562 細胞に対して $76.7 \pm 13.6 \%$, Daudi 細胞に対して $64.8 \pm 23.3 \%$, PC-3 細胞に対して $56.8 \pm 22.2 \%$, QG-56 細胞に対して 43.1 ± 16.8

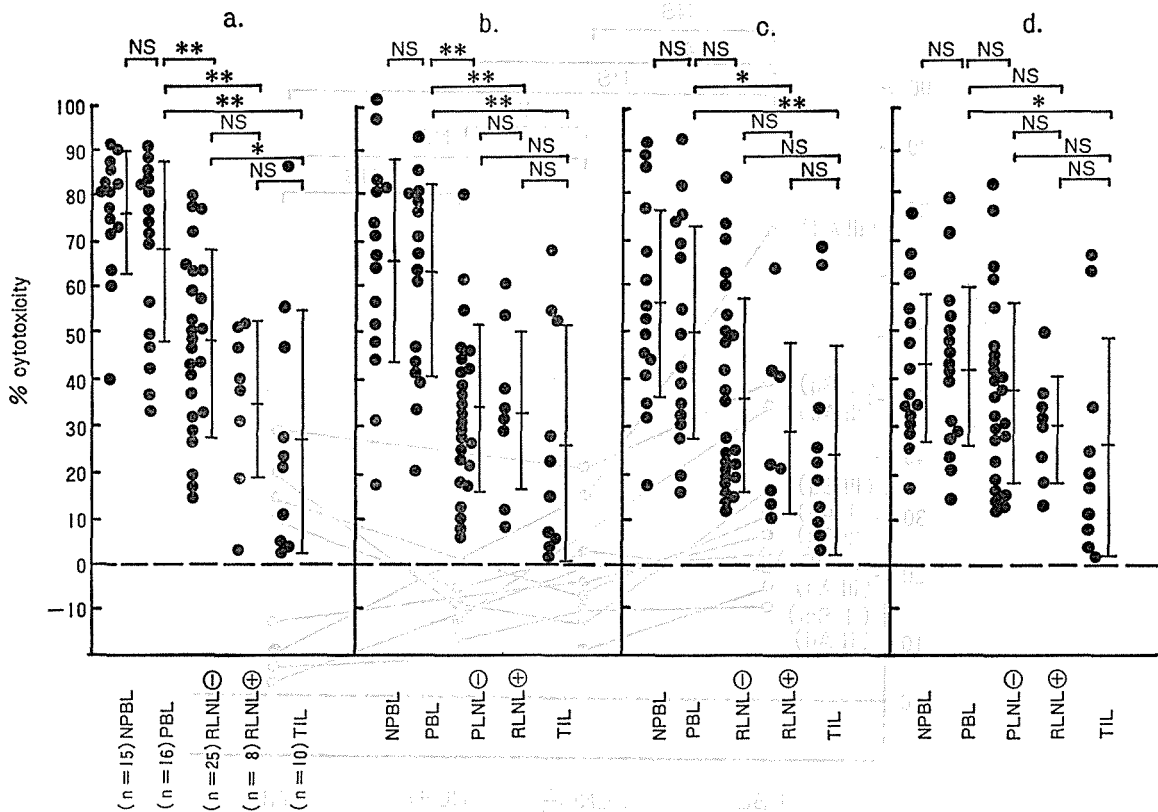


図 6. 末梢血, 所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の各種細胞株に対する LAK 活性の比較
 a. K562 細胞 (ヒト白血病細胞株), b. Daudi 細胞 (B 細胞株), c. PC-3 細胞 (肺腺癌細胞株), d. QG-56 細胞 (肺扁平上皮癌細胞株) に対する LAK 活性を示す.

mean±S.D., ET 比=10:1, NPBL は正常人末梢血リンパ球, ⊕⊖は転移の有無を表わす. 他の略語は本文参照.

* p<0.05, ** p<0.01, NS; not significant

％の LAK 活性を示したが, 肺癌患者の PBL との間には有意差を認めなかった.

4. 自家腫瘍細胞に対する LAK 活性
 3 者の自家腫瘍細胞に対する LAK 活性は図 7 に示すごとくで肺癌患者の PBL は ET 比を 50:1 に上げることで自家腫瘍細胞に対して 34.2±16.5%と中等度の細胞障害活性を認めた. RLNL は転移陰性群では PBL よりも低値の活性を示したが, 有意差は認めなかった. 転移陽性群 (14.5±2.4%) では転移陰性群 (21.6±9.0%) よりさらに低値の傾向を示した. TIL は 20.9±15.8%と低値ではあるものの他の 2 者との有意差は認めず症例により較差の大きい傾向を示した. 中でも 8 例中 3 例で PBL の活性を上回る症例を認めたことは興味深かった. 肺癌患者の組織型, 分化度及び病期による LAK 活性の差は認めなかった.

5. リンパ球幼若化反応
 3 者のリンパ球幼若化反応の結果は図 8 に示すごとくで肺癌患者の PBL, RLNL の転移陰性群は PHA-P に対して 135.8±74.3, 123.3±83.6, Con A に対して 50.1±27.9, 57.2±47.5, PWM に対して 39.5±23.8, 33.0±22.0 と, いずれの mitogen に対しても高値の SI 値を示したが, RLNL の転移陽性群と TIL は, PHA-P の刺激に対して 68.5±48.9, 46.9±37.2, Con A に対して 28.5±20.1, 35.5±28.3, PWM に対して 23.0±17.3, 19.6±16.5 と低値を示し, PHA-P 刺激で特に大きな有意差を認めた (p<0.01). 正常人の PBL は PHA-P に対して 162.2±52.0, Con A に対して 62.0±49.9, PWM に対して 35.3±17.1 とすべての mitogen に対して高い SI 値を認め, 肺癌患者の PBL より高値の傾向を示したものの統計学的には有意差はなかった.

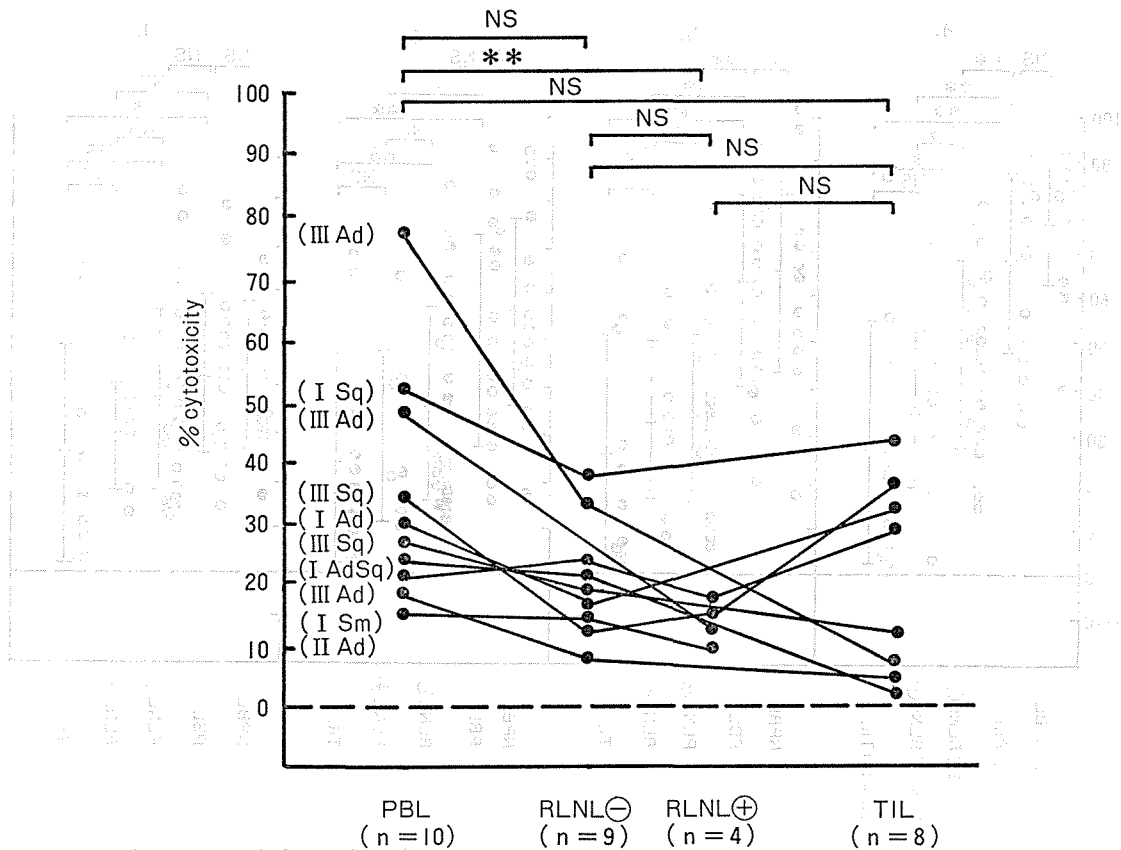


図 7. 末梢血, 所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の自家腫瘍細胞に対する LAK 活性の比較
ET 比=50:1, ** p<0.01, NS; not significant, ⊕⊖は転移の有無を表わす.

I; I 期, II; II 期, III; III 期
Ad; adenocarcinoma, Sq; squamous cell carcinoma,
AdSq; adenosquamous cell carcinoma, Sm; small cell carcinoma

6. リンパ球 subpopulation

リンパ球 subpopulation 分析の結果は図 9 に示すごとくで肺癌患者の PBL は NK 細胞の割合が leu 7 陽性細胞 18.6±6.4%, leu 11a 陽性細胞 14.7±5.2% と RLNL, TIL に比べて有意に多く (p<0.01) 他の 2 者の約 3-10 倍認められた. RLNL は NK 細胞が転移陰性群で leu 7 陽性細胞 2.5±1.9%, leu 11a 陽性細胞 1.3±0.8% そして, 転移陽性群で leu 7 陽性細胞 2.7±1.6%, leu 11a 陽性細胞 1.4±0.3% と PBL に比べて有意に少なく (p<0.01) B 細胞が転移陰性群で 33.5±5.2%, 転移陽性群で 32.5±8.8% と PBL に比べて有意に多かった (p<0.01). さらに転移陰性群では leu 3a/leu 2a (CD4/CD8) = 2.4 となり PBL よりも高値を示し, 転移陽性群では leu 2a 陽性細胞の割合を 26.3±1.1% と PBL に比べて有意に多く認めた (p<0.01). TIL は 84.4±

2.8% と大部分が T 細胞で, しかも leu 2a 陽性細胞の割合を 45.3±8.7% と PBL に比べて有意に多く認めた (p<0.01). 正常人の PBL と比較すると肺癌患者の PBL の subpopulation に有意差は認めなかった.

7. 3 者の免疫機能の比較

PBL, RLNL, TIL の 3 者を比較したまとめの結果が表 1 である. PBL は NK 細胞の割合が多く NK, LAK 活性, リンパ球幼若化反応は高値を示した. RLNL は転移陰性群では helper/inducer T 細胞, B 細胞の割合が多く, NK 活性は低値であり, LAK 活性は中から高値を示した. リンパ球幼若化反応は高値であった. 転移陽性群はすべての反応が転移陰性群よりさらに低値を示した. TIL はほとんどが T 細胞で, cytotoxic/suppressor T 細胞の割合が多く, NK 活性は低値, リンパ球幼若化反応は中等度の値であった. LAK 活性は低値から高値と症例により

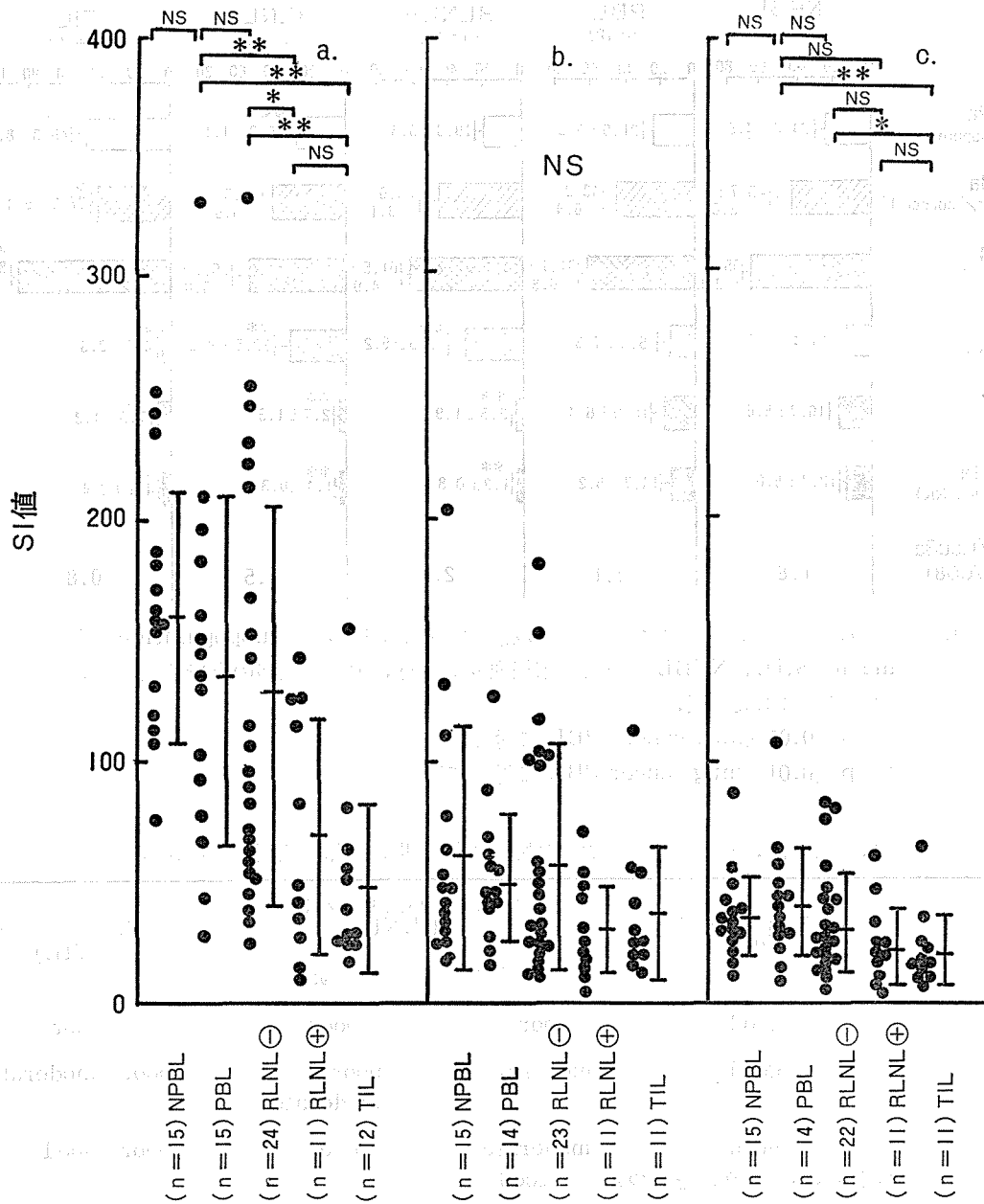


図 8. 末梢血, 所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の mitogen によるリンパ球幼若化反応の比較
a. PHA-P, b. Con A, c. PWM に対するリンパ球幼若化反応を示す。

mean±S.D., NPBLは正常人末梢血リンパ球, ⊕⊖は転移の有無を表わす. 他の略語は本文参照.

* p < 0.05, ** p < 0.01, NS ; not significant

較差が大きい自家腫瘍細胞に対しては PBL を上回る症例も認められた。

考 察

癌患者における免疫機能は癌の進行に伴い低下することが知られている⁷⁾¹³⁾¹⁶⁾³³⁾³⁵⁾⁴³⁾⁵⁵⁾が, 全身と局所で

免疫機能がいかに異なるか, 潜在能力がどれくらい存在するのかわからない点が多い. とくに, 1976年のMorganら³⁷⁾によるT細胞増殖因子(interleukin-2)の発見以来, NK細胞, LAK細胞, 特異的細胞障害性T細胞など, 癌細胞に対する種々のeffector細胞がIL-2にて誘導並びに活性化されることが明ら

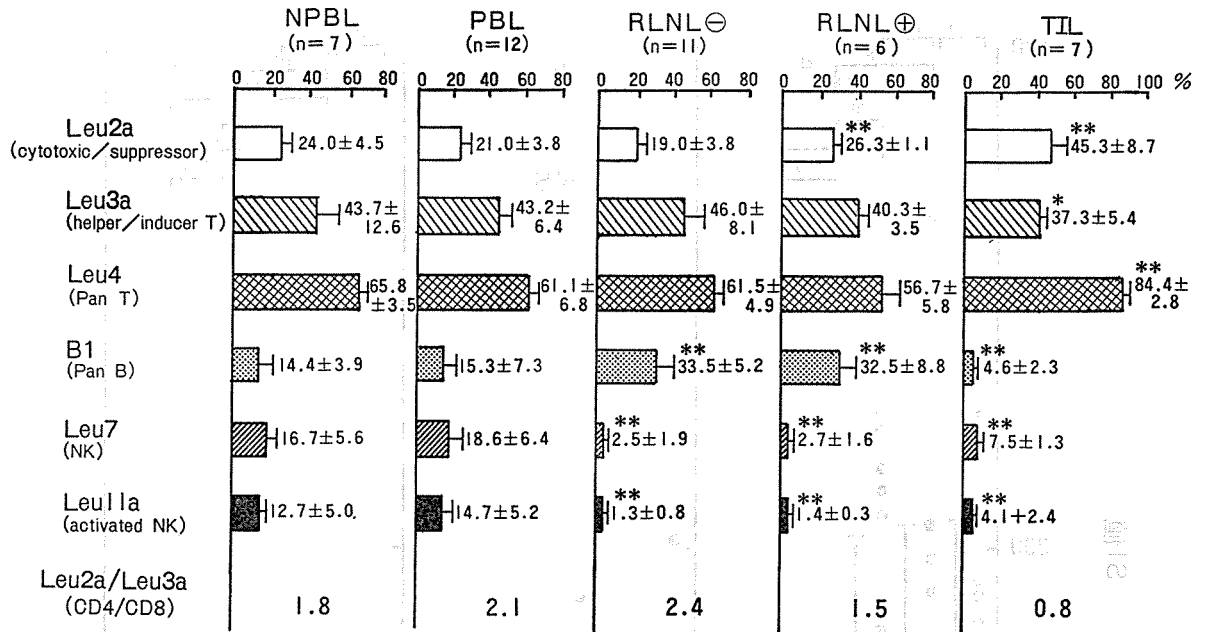


図 9. 末梢血, 所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球のリンパ球 subpopulation の比較
 mean ± S.D., NPBL は正常人末梢血リンパ球, ⊕ ⊖ は転移の有無を表わす.
 他の略語は本文参照.

* p < 0.05 (lung cancer PBL に対して)
 ** p < 0.01 (lung cancer PBL に対して)

表 1. 末梢血, 所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の免疫機能の比較

assay	末梢血リンパ球 (PBL)	所属リンパ節リンパ球 (RLNL)		腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL)
		転移⊖	転移⊕	
NK 活性	good	poor	poor	poor
NK 活性の賦活	good	moderate	poor ~ moderate	poor ~ moderate
LAK 活性 (細胞株)	good (広いスペクトラムを持つ)	moderate ~ good	moderate	poor ~ good
LAK 活性 (自家腫瘍)	moderate	poor ~ moderate	poor ~ moderate	poor ~ moderate
リンパ球幼若化反応	good	good	moderate ~ good	moderate ~ good
リンパ球 subpopulation	CD4/CD8=2.1 NK 細胞多し	CD4/CD8=2.4 B細胞多し NK 細胞少ない	CD4/CD8=1.5 (cytotoxic/suppressor T ↑) B細胞多し NK 細胞少ない	CD4/CD8=0.8 (cytotoxic/suppressor T ↑) ほとんどT細胞 B, NK 細胞少ない

かとなり, それら effector 細胞の起源や発現誘導機構について興味を持たれている. 今回, 本研究では肺癌患者の全身と局所, すなわち末梢血, 所属リンパ節

および腫瘍内浸潤リンパ球の3者において細胞障害活性を中心に免疫機能を比較して, 3者の免疫機能の違い, とくに IL-2 にて誘導される潜在能力としての抗

腫瘍性 effector 細胞の誘導状況を検討した。

それぞれ行なった assay に対して考察を加えると、NK 活性に関してはこれまで多くの報告⁶⁾²⁹⁾³⁶⁾⁴⁹⁾⁵⁹⁾⁶⁰⁾⁶⁴⁾がなされているように末梢血の活性は他の2者と比較して有意に高値の活性を示した。Itoh ら²⁴⁾が最も効果的だと述べる rIL-2 と IFN- γ を用いて NK 活性を賦活すると活性はそれぞれ増強されるが、依然として末梢血の活性が他の2者と比較し高値である状態は変らなかつた。このことは NK 細胞自体の絶対数¹⁾⁵⁰⁾⁵⁴⁾あるいは Abo ら²⁾の述べる NK 細胞の分化に関する点で、リンパ節、腫瘍内浸潤リンパ球が劣っていること、さらには Kadoyama ら²⁵⁾が肺癌患者で、Herr ら²⁰⁾が進行した膀胱癌患者で所属リンパ節に高度の腫瘍関連抗原によって誘導された抑制細胞が存在して宿主の防御機構に対し抑制的に働いていると述べたように、また Vose ら⁶¹⁾が肺癌患者の腫瘍内浸潤リンパ球に suppressor 活性が存在すると示したように、特異的あるいは非特異的 suppressor 活性がリンパ節あるいは腫瘍内浸潤リンパ球に多く存在することが原因として考えられる。正常人末梢血との比較では肺癌患者の末梢血の NK 活性は有意に低値であったが、IFN- γ 、rIL-2 で刺激すると活性は賦活され有意差を認めなくなった。刺激により NK 細胞の反応性が回復することは興味深いと思われた。

LAK 活性に関しては、LAK 細胞自体が NK 細胞から誘導されるもの²⁴⁾、T細胞から誘導されるもの⁵⁶⁾、non-NK、non-T 細胞から誘導されるもの⁵⁾⁵²⁾と heterogeneous な細胞集団であるという最近の見聞からすると、リンパ系臓器のいずれからでも LAK 細胞は誘導可能であると思われるが、著者らの結果が示すごとく、末梢血から最も広いスペクトラムの細胞株あるいは自家腫瘍細胞株に対して、安定して比較的活性高値の LAK 細胞が誘導できたということは、その中心的役割が末梢血に多く存在する NK 細胞であることを示唆するものであると思われる。しかしながら、自家腫瘍細胞に対する LAK 活性を検討した場合、局所とくに腫瘍内浸潤リンパ球において症例により較差があるものの、高値の症例が散見される。この原因として活性高値の症例では cytotoxic T 細胞が多く浸潤しており、LAK 活性と同時に特異的細胞障害性 T細胞が誘導されていることが示唆される。堀ら²²⁾は腫瘍内浸潤リンパ球を5日毎に培養液交換をしながら rIL-2 にて15日間培養して特異的細胞障害性 T細胞を誘導し、自家腫瘍細胞に対して末梢血リンパ球よりも高値の細胞障害活性を誘導している。このことは著

者らの assay 系においても培養日数を延長することでさらに高値の細胞障害活性が腫瘍内浸潤リンパ球にて誘導されることを示唆しているものと思われる。また、LAK 活性が rIL-2 の濃度依存性に増加したことから rIL-2 濃度を上げた際の LAK 活性を検討することも重要であると思われる。IL-2 は cytotoxic T細胞の活性増強は勿論 suppressor T細胞に対しても同様の働きをすることが知られており⁵⁸⁾、推測するに、腫瘍内浸潤リンパ球で、LAK 活性低値の症例では多数浸潤している suppressor 系の細胞の活性が、cytotoxic 系の細胞の活性を上回っていることが考えられる。藤沢ら¹⁴⁾も肺癌患者の腫瘍内浸潤リンパ球を IL-2 で刺激した場合、細胞株及び自家腫瘍細胞に対する LAK 活性は高値例と低値例の2群に分かれたとしており、このことは著者らの結果と一致した。また、今回肺癌患者の病期、肺癌細胞の組織型、分化度による LAK 活性に有意差は認めなかったが、この点に関しては病期によりリンパ球の反応に違いがあるかどうか、分化度および組織型により腫瘍細胞の抗原性に違いがあるかどうかなど興味深い問題を含んでおり、さらに症例を増やして検討を加える必要があると思われる。正常人の末梢血の LAK 活性と比較すると肺癌患者の末梢血は低値の傾向にあるものの有意差を認めなかった。このことは *in vitro* での肺癌患者の末梢血リンパ球が rIL-2 に対して比較的反応が良好であることを示しており、自家血を用いた LAK 療法の有用性を考えるうえでも勇気づけられる結果であった。

リンパ球幼若化反応に関しては、これまで多くの報告⁸⁾¹²⁾¹⁶⁾³⁵⁾⁴⁶⁾⁵⁹⁾が認められよく知られたところであり、癌患者では正常人と比較して有意に低値を示すという報告⁸⁾¹²⁾¹⁶⁾³⁵⁾が多い。しかしながら、中には癌患者でもまれに非常に高い反応を示すことがあり有意差を認めなかったという報告⁴⁶⁾⁵⁹⁾もある。著者らの結果では、まず肺癌患者の腫瘍内浸潤リンパ球、転移陽性リンパ節リンパ球は末梢血リンパ球、転移陰性リンパ節リンパ球に比べて PHA-P、Con A、PWM の刺激で低反応を示した。これは腫瘍細胞によるリンパ球活性化阻害作用の影響によるものと考えられるが、PHA-P の刺激で特に反応が低値であったことは興味深く、PHA-P によって強く活性化されると言われる helper 系が優位に活性阻害を受けている結果を示唆しているものと思われる。次に、正常人の PBL と比較した場合は今回の肺癌患者の PBL では低値の傾向を示したが、Paty ら⁴⁶⁾と同様、高い反応を示す症例

も認められ有意差は認めなかった。Mekori ら³⁵⁾はリンパ球幼若化反応は癌の進行に従って低下すると述べており、著者らの研究で対象として用いた症例がいずれも手術適応症例であり比較的栄養状態が良好であったことも有意差を認めなかった原因と思われる。

リンパ球 subpopulation 分析の結果であるが、これは非常に特徴的であった。末梢血に NK 細胞が多いのは Abo ら²⁾の結果と一致し末梢血の高い NK 活性の要因と考えられる。正常人の末梢血と比較した場合は、CD4/CD8 比が癌患者において有意に低下するという報告²⁶⁾⁵¹⁾がこれまで多く示されたが著者らの結果では有意差を認めなかった。これはリンパ球幼若化反応の結果と同様、対象として扱った症例が比較的全身状態の良好な症例が多かったためと考えられる。リンパ節は B 細胞, helper/inducer T 細胞が多く、NK 細胞は少数しか認めなかった。癌転移がリンパ節に及ぶと CD4/CD8 比が低下するが、この結果は諸家の意見²⁶⁾⁴²⁾⁴⁸⁾と一致するところである。腫瘍内浸潤リンパ球は大部分が T 細胞で cytotoxic/suppressor T 細胞が多く、B 細胞, NK 細胞は少数しか存在しなかった。Vose ら⁶²⁾は腫瘍内浸潤リンパ球では末梢血リンパ球と比較して、自家腫瘍細胞に特異性をもつ killer 前駆細胞の含まれる率が高いとしており、やはり腫瘍内浸潤リンパ球のもつ特異性を強調している。

著者らの *in vitro* の実験結果は癌患者における末梢血、所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球という異なる 3 者の細胞障害活性を明確にしているものと思われる。そして、これらの結果を非癌患者と比較した結果は末梢血においては癌患者で低値を示す傾向があった。リンパ節においては今回症例数が少なく結果を示さなかったが良性肺疾患（肺過誤腫、肺結核腫）のリンパ節を用いて行った免疫機能は肺癌転移陰性リンパ節群と差異を認めず、また秋吉ら³⁾も胃癌と胃良性疾患のリンパ節免疫活性に有意差を認めていないことから癌患者リンパ節の免疫機能は転移陰性群において温存されているものと思われる。リンパ節へ癌転移が及ぶと免疫機能が低下した原因としては癌転移によりリンパ節に suppressor 活性が誘導されたためと推測されるが詳細は不明である。一方、現在行われている IL-2 を用いた癌免疫療法を考えると、adoptive (LAK 療法) あるいは、passive (サイトカインの直接注入) immunotherapy が行われているが、どちらにしろどの程度の細胞障害活性をどの起源の細胞から誘導可能であるかということが重要な問題の 1 つである。細胞障害活性を中心に著者らと同様

に末梢血、所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の 3 者を比較した Vose ら⁵⁹⁾⁶⁰⁾の報告では末梢血リンパ球にて最も高い NK 活性を認め、Kimura ら³⁰⁾³¹⁾の報告では IL-2 と mitomycin (MMC) 処理自己腫瘍細胞の刺激後 7 日目を最大として自家腫瘍細胞に対して所属リンパ節リンパ球で最も高値の細胞障害活性を誘導できたとしており、T 細胞から誘導される特異的細胞障害性 T 細胞の存在を示した。本研究では、LAK 活性という点からみると末梢血リンパ球において安定して比較的高値の活性が広いスペクトラムの細胞株あるいは自家腫瘍細胞に対して誘導可能であった。しかしながら、症例によっては自家腫瘍細胞に対して局所すなわち腫瘍内浸潤リンパ球で末梢血リンパ球を上回る抗腫瘍活性が誘導されたという結果は *in vivo* ですでに感作された特異的免疫応答という点からも非常に興味深い。とくに、担癌状態においては癌が進行するに従って suppressor 系の働きによって免疫に down regulation がかかるという最近の知見⁸⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁸⁾³³⁾³⁵⁾⁴³⁾⁴⁴⁾からしても、これら局所に多く浸潤した suppressor 系の細胞を上手に解除することによってさらに有益な結果を著者らにもたらしてくれるものと考えられる。事実、最近の研究では suppressor 活性を抑えるために、indomethacin⁶³⁾, cyclophosphamide⁴¹⁾, cimetidine²⁷⁾⁵³⁾等の薬剤の投与が試みられており、いずれも、NK あるいは LAK 細胞の活性増強を認め注目されている。

最後に、肺癌手術のリンパ節郭清の意義を考える上で所属リンパ節の免疫機能について考えてみると、過去に橋本ら¹⁹⁾は移植腫瘍によるリンパ節のモデル実験や臨床病理学的成績から検討して、リンパ節の免疫学的防御機構はごく弱いが存在し、早期に出現して速やかに消退するものであらうと述べた。また、Fisher ら⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾, Pendergrast ら⁴⁷⁾はマウスの同系腫瘍移植の実験系で所属リンパ節を郭清した場合に移植腫瘍の生着率の上昇を認め、抗腫瘍免疫の成立に果たすリンパ節の重要な役割を示した。特に、Pendergrast らは移植した腫瘍を触知しえない移植後 3 日目に郭清を行なった群においてのみ非郭清群に比して生着率の上昇を認め、それ以後の郭清群では有意差を認めず、腫瘍移植後早期における抗腫瘍免疫の成立を強調している。一方、各種癌患者における所属リンパ節細胞の抗腫瘍性はリンパ球の細胞障害活性を中心にこれまで多く検討され、秋吉ら³⁾は胃癌患者の所属リンパ節の種々の killer 活性はすべて低く、臨床的に腫瘍を認めるようになった癌患者ではすでに早期の段階を終え免

疫学的抵抗性が低下した段階に至っていると推測している。このように、所属リンパ節の生体防御としての役割は担癌状態では悲観的な報告が多い。しかしながら著者らの結果では肺癌患者の所属リンパ節転移陰性群において、LAK 活性は NK 活性と異なり末梢血リンパ球の値を上回るには至らないが比較的高値の活性を誘導できた。このことは所属リンパ節において潜在能力としての抗腫瘍活性が存在することを示しているものと思われる。著者らの意見と一致するところで、最近、折田ら⁴⁰⁾も胃癌患者の所属リンパ節の低下した抗腫瘍活性を IL-2 等の biological response modifier (以下 BRM) により賦活することでキラー活性が回復し患者の予後の改善が認められたと述べている。また、永野ら³⁹⁾は肺癌患者の所属リンパ節の抗腫瘍活性を検討し、近位リンパ節で高い PHA 反応性および細胞障害活性が認められ、転移陽性リンパ節では有意に低下したと述べている。著者らの症例では転移の有無により細胞障害活性に有意差を認め、近位と遠位のリンパ節では有意差を認めなかったが、このように、所属リンパ節に抗腫瘍活性を認めたという報告で意見の一致を見ている。そして、今後さらに BRM によるキラー活性の増強や癌が進行するに従って所属リンパ節に誘導されてくる suppressor 活性の解除をもっと効果的に行ない得れば所属リンパ節の抗腫瘍活性はさらに高値を示すことが期待出来ると思われる。また注目したいのは中島ら⁴⁰⁾が乳癌腋窩リンパ節の IFN および IL-2 産生能が末梢血に比べ有意に高値であると示したことで、このことは所属リンパ節がサイトカインの産生器官として有用であり、NK 細胞や LAK 細胞を介して抗腫瘍活性を発揮できることが推測出来る。以上のように所属リンパ節に潜在的抗腫瘍活性を認めるということになると、予防的リンパ節郭清は、non-sense であり転移陽性リンパ節のみの郭清が最も理想的ということになる。しかしながら、現実では手術時肉眼的にリンパ節転移を診断することは極めて困難であり、それがリンパ節郭清の難しいところであると思われる。今後、たとえば、腫瘍抗原に特異的モノクロナール抗体を用いて癌転移を imaging するような新しいリンパ節転移の診断技術やサイトカインの経気管支動脈あるいは経リンパ管輸注など所属リンパ節の抗腫瘍活性を有効に高める実際的手段、さらにはリンパ流を考慮に入れた郭清等検討する余地が残されているものと思われる。

以上、今回著者らは本研究により肺癌患者の末梢血、所属リンパ節、腫瘍内浸潤リンパ球の3者の免疫

学的機能を比較検討した。そして、末梢血で最も安定して高値の抗腫瘍活性が誘導されるが、自家腫瘍細胞に対しては腫瘍内浸潤リンパ球で症例により末梢血を上回る高値の抗腫瘍活性が誘導され得ることを明らかにした。これらの特徴を十分に理解して、有効な免疫応答を誘導することが生体防御としての抗腫瘍効果を最大限に発揮することにつながるものと思われる。

結 語

肺癌患者の免疫機能を末梢血、所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の3者について比較検討し以下の結論を得た。

1. 3者がそれぞれ特徴的なリンパ球 subpopulation を有し、異なる細胞障害活性を示した。すなわち、

① 末梢血リンパ球は他の2者と比較してNK細胞の割合が多く、NK活性は高値を示し、IFN- γ +rIL-2にて最大の賦活効果が認められた。また、LAK活性に関しても広いスペクトラムの細胞株に対して高値の活性が誘導でき、自家腫瘍細胞に対してはET比を大きくすることで中等度の活性が誘導可能であった。

② 所属リンパ節リンパ球は転移陰性群ではNK活性は低値であるものの、細胞株や自家腫瘍細胞に対するLAK活性はNK活性と異なり比較的末梢血リンパ球の値に近似した。しかしながら、末梢血の値を上回るには至らなかった。転移陽性群ではすべての反応が転移陰性群よりさらに低値を示した。

③ 腫瘍内浸潤リンパ球はほとんどがT細胞でありしかも cytotoxic/suppressor T細胞の割合が多かった。NK活性、リンパ球幼若化反応は他の2者より低値を認めた。LAK活性は症例によって較差が大きいが、自家腫瘍細胞に対しては末梢血リンパ球の値を上回る症例も認められ特異的免疫応答という点で興味深いと思われた。

2. 所属リンパ節の転移陰性群には賦活することにより潜在能力としての抗腫瘍活性が存在することが認められた。

稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導ならびに御校閲を賜った、森 透教授に深甚なる感謝の意を表します。また、研究材料を御提供頂いた国立米子病院外科池田 貢先生、福井 甫先生、国立療養所松江病院院長武田 弘先生、同外科中井 勲先生、徳島 武先生および本研究に御協力ならびに御助言をいただい

た鳥取大学医学部外科学第二教室荒木 威講師をはじめ教室員各位に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究を遂行するに先立ち免疫学に関する知識、技術を修得する場を与えて下さった大阪大学細胞工学センター免疫細胞研究部門岸本忠三教授および同研究室員各位に深謝致します。

尚、本研究の一部は、第4回日本呼吸器外科学会総会（仙台）、第46回日本癌学会総会（東京）、第27回日本胸部外科学会総会（金沢）、第17回日本免疫学会学術集会（金沢）において発表した。

文 献

- 1) Abo, T. and Balch, C. M. (1981). A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol* **127**, 1024-1029.
- 2) Abo, T., Miller, C. A., Gartland, G. L. and Balch, C. M. (1983). Differentiation stages of human natural killer cells in lymphoid tissues from fetal to adult life. *J Exp Med* **157**, 273-284.
- 3) 秋吉 毅, 木場文男, 辻 秀男 (1986). 癌患者所属リンパ節は抗腫瘍性に働いているか? *Oncologia* **16**, 102-109.
- 4) Allavena, P., Zanaboni, F., Rossini, S., Merendino, A., Bonazzi, C., Vassena, L., Mangioni, C. and Mantovani, A. (1986). Lymphokine-activated-killer activity of tumor associated and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with ascites ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* **77**, 863-868.
- 5) Ballas, Z. K. (1986). Lymphokine-activated killer (LAK) cells. I. Differential recovery of LAK, natural killer cells, and cytotoxic T lymphocytes after a sublethal dose of cyclophosphamide. *J Immunol* **137**, 2380-2384.
- 6) Cunningham-Rundles, S., Filippa, D. A., Braun, D. W., Antonelli, P. and Ashikari, H (1981). Natural cytotoxicity of peripheral blood lymphocytes and regional lymph node cells in breast cancer in women. *J Natl Cancer Inst* **67**, 585-590.
- 7) Eilber, F. R. and Morton, D. L. (1970). Impaired immunologic reactivity and recurrence following cancer surgery. *Cancer* **25**, 362-367.
- 8) Ducos, J., Miguères, J., Colombies, P., Kessous, A. and Poujoulet, N. (1970). Lymphocyte response to PHA in patients with lung cancer. *Lancet* **1**, 1111-1112.
- 9) Fisher, B. and Fisher, E. R. (1971). Studies concerning the regional lymph node in cancer. I. Initiation of immunity. *Cancer* **27**, 1001-1004.
- 10) Fisher, B. and Fisher, E. R. (1972). Studies concerning the regional lymph node in cancer. II. Maintenance of immunity. *Cancer* **29**, 1496-1501.
- 11) Fisher, B., Saffer, E. and Fisher, E. R. (1974). Studies concerning the regional lymph node in cancer. IV. Tumor inhibition by regional lymph node cells. *Cancer* **33**, 631-636.
- 12) Fisher, B., Saffer, E. A. and Fisher, E. R. (1974). Studies concerning the regional lymph node in cancer. VII. Thymidine uptake by cells from nodes of breast cancer patients relative to axillary location and histopathologic discriminants. *Cancer* **33**, 271-279.
- 13) Fudenberg, H. H., Wybran, J. and Robbins, D. (1975). T-rosette forming cells, cellular immunity and cancer. *N Engl J Med* **292**, 475-477.
- 14) 藤沢武彦, 山口 豊, 木村秀樹, 有田正明, 柴光年, 門山周文 (1984). 原発性肺癌の末梢血, 所属リンパ節および腫瘍内浸潤リンパ球の抗腫瘍性に関する検討. *医学のあゆみ*. **131**, 741-742.
- 15) Ginns, L. C., Goldenheim, P. D., Miller, L. G., Burton, R. C., Gillick, L., Colvin, R. B., Goldstein, G., Kung, P. C., Hurwitz, C. and Kazemi, H. (1982). T-lymphocyte subsets in smoking and lung cancer. *Am Rev Respir Dis* **126**, 265-269.
- 16) Golub, S. H., O'Connell, T. X. and Morton, D. L. (1974). Correlation of *in vivo* and *in vitro* assays of immunocompetence in cancer patients. *Cancer Res* **34**,

- 1833-1837.
- 17) Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H., Z. and Rosenberg, S. A. (1982). 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.
- 18) Gross, R. L., Latty, A., Williams, E. A. and Newberne, P. M. (1975). Abnormal spontaneous rosette formation and rosette inhibition in lung carcinoma. *N Engl J Med* **292**, 439-443.
- 19) 橋本邦久 (1979). 肺癌の生物学的性状からみたりンパ節転移と外科療法の検討. *胸部外科* **32**, 492-497.
- 20) Herr, H. W. (1979). Suppressor cells in the pelvic lymph nodes regional to bladder cancer. *J Surg Oncol* **11**, 289-293.
- 21) Holmes, E. C. (1985). Immunology of tumor infiltrating lymphocytes. *Ann Surg* **201**, 158-163.
- 22) 堀 泰祐, 菅 典道, 山崎信保, 中山 昇, 仁尾 義則, 稲本 俊, 大垣和久, 児玉 宏 (1985). ヒト固形癌および癌性胸腹水中の腫瘍浸潤リンパ球の抗腫瘍能とそれを用いた癌治療の試み. *日本癌治療学会雑誌* **20**, 943-953.
- 23) Hoyer, M., Meineke, T., Lewis, Zwillig, B. and Rinehart, J. (1986). Characterization and modulation of human lymphokine (interleukin 2) activated killer cell induction. *Cancer Res* **46**, 2834-2838.
- 24) Itoh, K., Tilden, A. B. and Balch, C. M. (1986). Lysis of human solid tumor cells by lymphokine-activated natural killer cells. *J Immunol* **136**, 3910-3915.
- 25) Kadoyama, C., Kimura, H. and Yamaguchi, Y. (1987). Inhibition of cytotoxicity to autologous tumor cells by the regional lymph node cells of patients with primary lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* **17**, 29-39.
- 26) Kaszubowski, P. A., Husby, G., Tung, K. S. W. and Williams, R. C. (1980). T-lymphocyte subpopulations in peripheral blood and tissues of cancer patients. *Cancer Res* **40**, 4648-4657.
- 27) Kikuchi Y., Oomori, K., Kizawa, I. and Kato, K. (1986). Augmented natural killer activity in ovarian cancer patients treated with cimetidine. *Eur J Cancer Clin Oncol* **22**, 1037-1043.
- 28) Kikutani, H., Kimura, R., Nakamura, H., Sato, R., Muraguchi, A., Kawamura, N., Hardy, R. R. and Kishimoto, T. (1986). Expression and function of an early activation marker restricted to human B cells. *J Immunol* **136**, 4019-4026.
- 29) Kimber, I., Moore, M., Howell, A. and Wilkinson, M. J. S. (1983). Native and inducible levels of natural cytotoxicity in lymph nodes draining mammary carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **15**, 32-38.
- 30) Kimura, H., Yamaguchi, Y., Kadoyama, C., Sato, N. and Fujisawa, T. (1983). Cytotoxicity tests against cultured human lung cancer cells with autologous lymphocytes activated *in vitro* by mitomycin C-treated tumor monolayers in the presence of T-cell growth factor. *Jpn J Clin Oncol* **13**, 3-14.
- 31) Kimura, H., Yamaguchi, Y. and Fujisawa, T. (1984). Cytotoxicity of autologous and allogenic lymphocytes against cultured human lung cancer cells: Optimal conditions for the production of cytotoxic lymphocytes. *Gann* **75**, 1006-1016.
- 32) Klein, G., Sjögren, H. O., Klein, E. and Hellström, K. E. (1960). Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* **20**, 1561-1572.
- 33) Lichtenstein, A., Zigelboim, J., Dorey, F., Brossman, S. and Fahey, J. L. (1980). Comparison of immune derangements in patients with different malignancies. *Cancer* **45**, 2090-2095.
- 34) Lotze, M. T., Grimm, E. A., Mazumder, A., Strausser, J. L. and Rosenberg, S. A. (1981). Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cul-

- tured in T-cell growth factor. *Cancer Res* **41**, 4420-4425.
- 35) Mekori, T., Sher, S. and Robinson, E. (1974). Suppression of the mitogenic response to phytohemagglutinin in malignant neoplasia: Correlation with clinical stage and therapy. *J. Natl. Cancer Inst* **52**, 9-12.
- 36) Moore, M. and Vose, B. M. (1981). Extravascular natural cytotoxicity in man: Anti-K562 activity of lymph-node and tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* **27**, 265-272.
- 37) Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. and Gallo, R. (1976). Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007-1008.
- 38) Mulé, J. J., Shu, S., Schwarz, S. L. and Rosenberg, S. A. (1984). Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* **225**, 1487-1489.
- 39) 永野信吉 (1983). 肺癌患者の所属リンパ節の抗腫瘍活性について. *長崎医学会雑誌* **58**, 1-12.
- 40) 中島芳道, 秋元 実, 俣野重雄, 平川 久, 岩崎秀康, 木村道夫 (1986). 転移の機能的バリアーとしての乳癌腋窩リンパ節の免疫能についての基礎的臨床的検討. *日本癌学会総会記事* **21**, 1799.
- 41) North, R. J. (1982). Cyclophosphamide facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med* **155**, 1063-1074.
- 42) 岡林孝弘 (1987). 胃癌所属リンパ節の免疫組織化学的研究. *日本外科学会雑誌* **88**, 529-542.
- 43) Old, L. D. (1981). Cancer immunology: The search for specificity — G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res* **41**, 361-375.
- 44) Oldham, R. K., Weese, J. L., Herberman, R. B., Perlin, E., Mills, M., Heims, W., Blom, J., Green, D., Reid, J., Bellinger, S., Law, I., McCoy, J. L., Dean, J. H., Cannon, G. B. and Djeu, J. (1976). Immunological monitoring immunotherapy in carcinoma of the lung. *Int J Cancer* **18**, 739-749.
- 45) 折田薫三, 合地 明 (1986). 胃癌所属リンパ節の免疫応答とリンパ節郭清. *消化器外科* **9**, 1877-1885.
- 46) Paty, D. W. and Bone, G. (1973). Response to P. H. A. in cancer patients. *Lancet* **1**, 668-669.
- 47) Pendergrast, W. J., Soloway, M. S., Myers, G. H. and Futrell, J. W. (1976). Regional lymphadenectomy and tumor immunity. *Surg. Gynec Obstet* **142**, 385-390.
- 48) Poppema, S., Bhan, A. K., Reinherz, E. L., McCluskey, R. T. and Schlossman, S. F. (1981). Distribution of T cell subsets in human lymph nodes. *J Exp Med* **153**, 30-41.
- 49) Rey, A., Klein, B., Rucheton, M., Caraux, J., Zagury, D., Thierry, C. and Serrou, B. (1984). Human autologous rosettes. IV. Their relation with interleukin-2 activity production and natural killer cells in cancer patients. *Cell Immunol* **86**, 155-164.
- 50) Ritchie, A. W. S., James, K. and Micklethorp, H. S. (1983). The distribution and possible significance of cells identified in human lymphoid tissue by the monoclonal antibody HNK-1. *Clin Exp Immunol* **51**, 439-447.
- 51) Robinson, E., Segal, R., Vesely, Z. and Mekori, T. (1986). Lymphocyte subpopulations in peripheral blood and malignant effusions of cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin Oncol* **22**, 191-193.
- 52) Rosenberg, S. A. (1984). Immunotherapy of cancer by systemic administration of lymphoid cells plus interleukin-2. *J Biol Resp Modif* **3**, 501-511.
- 53) Sahasrabudhe, D. M., McCune, C. S., O'Donnell, R. W. and Henshaw, E. C. (1987). Inhibition of suppressor T lymphocytes (Ts) by cimetidine. *J Immunol* **138**, 2760-2763.
- 54) Si, L. and Whiteside, T. L. (1983). Tissue distribution of human NK cells studied with anti-leu-7 monoclonal antibody. *J Im-*

munol **130**, 2149-2155.

55) Southam, C. M. (1960). Relationships of immunology to cancer : A review. *Cancer Res* **20**, 271-291.

56) Sugamura, K., Tanaka, Y. and Hinuma, Y. (1982). Two distinct cloned T cell lines that exhibit natural killer like and anti-human effector activities. *J Immunol* **128**, 1749-1752.

57) Takeda, K., Aizawa, M., Kikuchi, Y., Yamawaki, S. and Nakamura, K. (1966). Tumor autoimmunity against methylcholanthrene-induced sarcomas of the rat. *Gann* **57**, 221-240.

58) Ting, C., Yang, S. S. and Hargrove, M. E. (1984). Induction of suppressor T cells by interleukin-2. *J Immunol* **133**, 261-266.

59) Vose, B. M., Vánky, F., Argov, S. and Klein, E. (1977). Natural cytotoxicity in man : activity of lymph node and tumor infiltrating lymphocytes. *Eur J Immunol* **7**, 753-757.

60) Vose, B. M., Vánky, F. and Klein, E. (1977). Human tumour-lymphocyte interaction *in vitro*. V. Comparison of the reactivity of tumour-infiltrating, blood and lymph node lymphocytes with autologous tumour cells. *Int J Cancer* **20**, 895-902.

61) Vose, B. M. and Moore, M. (1979). Suppressor cell activity of lymphocytes infiltrating human lung and breast tumours. *Int J Cancer* **24**, 579-585.

62) Vose, B. M. (1982). Quantitation of proliferative and cytotoxic precursor cells directed against human tumours : Limiting dilution analysis in peripheral blood and at the tumour site. *Int Cancer* **30**, 135-142.

63) Wanebo, H. J., Pace, R., Hargett, S., Katz, D. and Sando, J. (1986). Production of and response to interleukin-2 in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Cancer* **57**, 656-662.

64) Yanagawa, E., Uchida, A. and Micksche, M. (1984). Natural cytotoxicity of lymphocytes from lymph nodes draining breast carcinoma and its augmentation by interferon and OK 432. *Cancer Immunol Immunother* **17**, 1-6.

肺癌患者の免疫機能に関する研究は、近年著しく進歩を遂げ、その重要性がますます認識されるに至っている。特に、自然免疫と獲得免疫の相互作用、および免疫調節因子の役割が注目されている。本研究では、肺癌患者の末梢血リンパ球中の自然キラー細胞活性と、腫瘍浸潤リンパ球の抑制性活性を比較検討し、その臨床的意義を明らかにしようとする。結果として、腫瘍浸潤リンパ球は末梢血リンパ球よりも強い抑制性活性を示し、これは腫瘍の増殖を促進する可能性がある。また、インターフェロンやOK-432などの免疫増強剤を用いた治療が、腫瘍浸潤リンパ球の抑制性活性を抑制し、自然免疫を活性化させることが示された。これらの結果は、肺癌患者の免疫状態を評価し、適切な免疫調節療法を選択するための重要な手がかりを提供する。