<原 著>

肺癌症例における免疫学的検討 末梢血単核細胞画分, NK 細胞活性, IL2産生能に関する検討

松瀬 健 福地義之助 長瀬 隆英
山岡 実 駿田 直俊 石田 喜義
原田 信行 鳥羽 研二 折茂 肇

<要 約> Stage III および Stage IV を中心とした肺癌患者における末梢血 NK 活性及び IL-2産生能は, 年齢をマッチさせたコントロール群に比し有意な低下を認め, 免疫監視機構の低下が示唆された。尚, OKT シリーズの諸指標については両群間に有意差は認められなかった。

肺癌患者において, 抗腫瘍多糖体 Schizophyllan を投与したところ投与前及び2週目投与後との比較において, NK 活性は10例中8例で上昇を認めた。しかし, 4週目におけるNK活性には一定の傾向は認められなかった。なお, NK 活性の変化と IL-2産生能の変とには相関がみられず, 少なくともNK活性の増加はT cell より産生される IL-2の増加に大きく依存していないことが示唆された。

Key words : 肺癌, NK 活性, IL2産生能, 抗腫瘍多糖体, Schizophyllan

緒 言

免疫監視機構の低下は, 癌の発生や進展の上で一つの要因と考えられている。リンパ球の一分画である Natural killer (NK) 細胞は種々の癌細胞を破壊する能力を有するとされる¹⁾。

また, 動物モデルにおいてNK細胞は, 肺への転移を抑制する報告がある。NK細胞は非特異的に標的細胞を傷害し, ヒトの肺において腫瘍抵抗性に関与し, 腫瘍に対する生体防御の上で, 重要な役割を担っていると考えられる^{2)~4)}。

肺癌患者において, 免疫機能がこうした一次的ないし, 担癌に伴う二次的な変化として, 低下ないし障害されている可能性が考えられ, また低下した免疫能を増強することは, 癌の治療上一つの補助的方法とされる。

今回, 老年者を中心に肺癌患者において, 免疫学的諸指標の変化につき, 年齢をマッチさせたコントロール群と比較検討を行った。さらに肺癌患者に対し, 担子菌(スエヒロタケ: schizophyllan commue fries)の培養ろ液より単離された抗腫瘍多糖体である schizo-

phyllan(SPG)⁵⁾を投与し, 投与前後における, これら免疫学的諸指標の変化につき検討した。

対象および方法

1. 対象

肺癌症例は13例, 平均年齢は 68.5 ± 2.7 歳であり, 組織型は9例が腺癌(Adenocarcinoma), また, 腺扁平上皮癌(adenosquamous cell carcinoma), 未分化腺癌(poorly differentiated adenocarcinoma), 及び肺胞上皮癌(alveolar cell carcinoma)が各々1例であり, 他に, 扁平上皮癌(squamous cell carcinoma)が1例であった。コントロール群は62例, 平均年齢は 70.5 ± 1.1 歳である。

対象とした肺癌症例は, Stage Ib が1例, stage III が7例, Stage IV が4例であった。比較的病期の進行した症例が多い一方で, Karnofsky 分類による performance status⁶⁾は60%以上と高く, 日常生活能(ADL)は比較的保たれていた(表1)。

免疫学的諸指標としては, 末梢血における OKT3, OKT4, OKT8, OKT4/OKT8及びNK活性, Interleukin-2(IL-2)産生能を測定した。免疫能の評価において, 基本的には治療に先だって測定した値を用いたが, 症例2, 症例6, 症例8, は術後安定期(回復期)の値を, また症例3及び症例11は, 手術後数年経過後の再発例における治療前の値を検討に供した。

T. Matsuse, Y. Fukuchi, T. Nagase, M. Yamaoka, T. Suruda, K. Ishida, N. Harada, K. Toba, H.

Orimo : 東京大学医学部老年病学教室

受付日, 1989. 2. 28 : 採用日, 1989. 4. 26.

表 1 Subjects (I)

No.	Case	Sex	Age	TNM	Stage	Performance Status	Tissue Type
1	A. K.	F	65	T ₃ N ₀ M ₀	III	60	Adenocarcinoma
2	A. T.	M	71	T ₂ N ₂ M ₀	III	60	Squamous cell carcinoma
3	A. T.	M	56	T ₁ N ₃ M ₁	IV	80	Adenocarcinoma
4	E. T.	M	66	T ₂ N ₂ M ₁	IV	70	Adenocarcinoma
5	O. K.	M	69	T ₂ N ₂ M ₀	III	80	Adeno-squamous cell carcinoma
6	K. R.	F	70	T ₁ N ₁ M ₀	I b	70	Adenocarcinoma
7	K. S.	F	81	T ₂ N ₂ M ₀	III	60	Poorly differentiated adenocarcinoma
8	S. K.	M	60	T ₃ N ₀ M ₀	III	70	Adenocarcinoma
9	S. E.	M	70	T ₃ N ₂ M ₀	III	70	Adenocarcinoma
10	H. K.	F	76	T ₂ N ₂ M ₁	IV	80	Adenocarcinoma
11	N. H.	F	85	T ₂ N ₂ M ₁	IV	80	Alveolar cell carcinoma
12	H. M.	M	50	T ₃ N ₀ M ₀	III	80	Adenocarcinoma
13	S. T.	M	72	T ₃ N ₂ M ₀	III	90	Adenocarcinoma

表 2 Subjects (II)

No.	Case	Therapy
1	A. K.	immunotherapy (SPG)
2	A. T.	operation+immunotherapy (SPG)
3	A. T.	(recurrence after operation) chemotherapy
4	E. T.	chemotherapy
5	O. K.	operation+chemotherapy +immunotherapy (SPG)
6	K. R.	operation+immunotherapy (SPG)
7	K. S.	operation+immunotherapy (SPG)
8	S. K.	operation+chemotherapy +immunotherapy (SPG)
9	S. E.	chemotherapy+immunotherapy (SPG)
10	H. K.	irradiation+immunotherapy (SPG)
11	N. H.	(recurrence after operation) immunotherapy (SPG)
12	H. M.	chemotherapy+immunotherapy (SPG)
13	S. T.	irradiation

なお症例 9 と症例12は化学療法を施行後 2 週間以上経過し、末梢白血球数が回復した後の値を検討に供した。症例 5 はコントロールとの比較においては、治療前の値を用い、一方、化学療法を施行ののち 3 週間経過後で末梢白血球が回復した時点で、以下に述べる schizophyllan 投与の検討を行った (表 2)。

次に、このうち症例 3、症例 4 と症例13を除く、肺癌症例10例に schizophyllan を週 1 回40mg を筋注し、投与前及び、第 1 回目、2 週目、4 週目(一部 3 週目)の筋注 2 日後に採血を行い、先に述べた同様の免疫学

的諸指標を測定し、比較検討した。

2. OKT3、OKT4、OKT8の測定

抗 OKT3モノクローナル抗体、抗 OKT4モノクローナル抗体、抗 OKT8モノクローナル抗体を用いフローサイトメトリーを用い測定した⁷⁾。

3. NK 細胞活性の測定⁸⁾

ヘパリン加末梢血を比重遠沈法にてリンパ球層を分離し、10%FCS 加 RPMI-1640にて 5×10^6 /ml のエフェクター細胞 (effector cell) として調節。一方、NK 感受性細胞 (ヒト慢性白血病由来 K-562細胞) を⁵¹Cr で標識し、同様に10%FCS 加 RPMI-1640にて 1×10^5 /ml の標的細胞 (target cell) として調節した。各々の細胞数が50 : 1 となるよう混合し、4 時間 incubate し、NK 細胞によって傷害された標的細胞から上清中に放出される⁵¹Cr の放射性活性を測定した。以下の式より、NK 活性 (%) を求めた。

NK 細胞活性 (%) =

$$\frac{\text{検体}^{51}\text{Cr 放出 cpm} - \text{SPcpm}}{\text{MAXcpm} - \text{SPcpm}}$$

ここで、SPcpm は自然⁵¹Cr 放出を、MAXcpm は1N HCl による最大⁵¹Cr 放出による放射性活性を示す。

4. IL2産生能の測定

IL2産生能は、Gillis らの方法に準じ測定した⁹⁾。得られたリンパ球浮遊液を一定時間培養後、その上清を IL2依存性マウス cytotoxic T cell と混合培養し、一定時間のチミジンの摂取率を測定し、標準 IL2と比較し、IL2産生能を算出した。

5. 統計学的検討

解析にあたり Statistic analysis system を用い

表3 Comparisons of Immunological Variable between Lung Cancer and Age-matched Normal Subjects

	Broncogenic carcinoma (N=13)	Control subjects (N=62)	p-value
NK activity (%)	59.3±4.4	69.3±1.8	<0.05
IL-2 productivity (Unit)	4.96±0.99	12.31±1.51	<0.05
WBC (×10 ³ /mm ²)	6.58±0.96	6.00±0.22	N.S.
Lymph (%)	36.1±2.1	37.2±1.0	N.S.
OKT3 (%)	67.8±2.0	65.8±1.3	N.S.
OKT4 (%)	40.2±2.1	42.6±1.1	N.S.
OKT8 (%)	27.5±1.6	25.8±0.8	N.S.
OKT4/OKT8	1.50±0.13	1.79±0.11	N.S.
Age (y.o.)	68.5±2.7	70.5±1.1	N.S.

Means±S.E.

unpaired t-test および paired t-test 等の統計学的検討を行い、 $p<0.05$ を有意とした。成績はすべて平均±標準偏差で示した。

結 果

1. 肺癌症例およびコントロール群における免疫学的諸指標の検討 (表3)

NK 活性は肺癌症例で $59.3\pm4.4\%$ に対し、コントロール群では $69.3\pm1.8\%$ と有意に肺癌症例で低下を認めた ($p<0.05$)。また IL-2産生能は、肺癌症例が 4.96 ± 0.99 unit であり、コントロール群 12.31 ± 1.51 unit に比し有意な低下が認められた ($p<0.05$)。

OKT3, 4, 8に関しては、両群間に有意差はみられず、OKT3は肺癌症例で平均 $67.8\pm2.0\%$ 、コントロール群で $65.8\pm1.3\%$ であった。OKT4は肺癌症例で平均 $40.2\pm2.1\%$ 、コントロール群で平均 $42.6\pm1.1\%$ であった。また OKT8はそれぞれ平均 $27.5\pm1.6\%$ 、 $25.8\pm0.8\%$ であった。尚、OKT4/OKT8比は、肺癌症例 1.50 ± 0.13 でコントロール群 1.79 ± 0.11 に比し有意ではないが低い傾向にあった。

2. 肺癌症例における schizophyllan 投与による免疫学的諸指標の検討

肺癌症例に対しての schizophyllan 投与における NK 活性の推移は図1に示すごとく、個々の症例毎に多様であり、最終観察時の3ないし4週時には増加例6例、減少例3例であった。また4週目まで観察した6症例において、NK 活性は投与前が $63.1\pm3.3\%$ であり、4週目投与後は $61.4\pm7.1\%$ であり有意差は認めら

図1 Effect of SPG (Schizophyllan) on NK Activity
—Time Course Study—(Patients with bronchogenic carcinoma)

れなかった。しかし、投与開始2週目におけるNK活性は $60.6\pm5.9\%$ と投与前 $54.5\pm4.7\%$ に比べ有意な増加を認め ($p<0.05$)、10例中8例で増加した (表4) (図2)。

IL-2産生能についての schizophyllan 投与後の変化に関しても、一定の傾向はみられず最終観察時に増加を認めた症例を1例のみで、他は低下ないし不変であり、4週目まで観察した4症例のIL-2産生能の平均

図2 Changes of Activity after SPG (Schizophyllan) injection

表4 Changes of Immunological Variables after SPG (Schizophyllan) Injection in 10 Patients with Bronchogenic Carcinoma

	Pre	Post (2 weeks)
NK activity (%)	54.5±4.7	60.6±5.9
IL-2 productivity (Unit)	4.67±1.44	5.81±2.27
WBC (×10 ³ /mm ²)	5.43±0.61	7.57±0.70
Lymph (%)	35.8±3.7	28.0±3.2
OKT3 (%)	69.2±2.7	63.4±4.8
OKT4 (%)	40.8±2.5	36.1±2.9
OKT8 (%)	27.7±2.0	29.6±1.7
OKT4/OKT8	1.50±0.15	1.17±0.08

Means±S.E.

値は 8.8 ± 5.8 unitであった(図3)。schizophyllan投与開始前及び2週目投与後のIL-2産生能の平均値は表4のごとくであり、有意ではないがやや増加の傾向がみられた。

また他の免疫学的諸指標についても特に一定の傾向は認められなかった。

尚、個々の症例に対して、投与前および2週目投与後のNK活性の変化量とIL-2産生能の変化量との間には有意な相関は認められなかった。

同様にIL-2産生能についても4症例ではあるが4週目における値は 8.8 ± 5.8 unitと一定の傾向はみ

図3 Effect of SPG (Schizophyllan) on IL-2 Productivity

れなかった。

考 察

NK細胞は、細胞障害性マクロファージ、Tリンパ球とともに生体の腫瘍の免疫学的監視機構の一端を担うものとされ、様々な腫瘍細胞に対し細胞障害性に作用する¹⁾。その作用は予め感作を受けることなく発現

し非特異的とされる。

また NK 細胞は、動物モデルにて肺転移を抑制することが知られている³¹⁴⁾。

今回著者らの検討では、Stage III および Stage IV を中心とした肺癌患者における末梢血 NK 活性及び IL-2 産生能は、年齢をマッチさせたコントロール群に比し有意な低下を認め、腫瘍の免疫学的監視機構の低下が示唆された。なお、OKT シリーズの諸指標については両群間に有意差は認められなかった。

北村ら¹⁰⁾は肺癌患者と健康人の比較において NK 活性は有意に肺癌患者で低下していたと報告している。また Lin ら¹¹⁾によると肺癌患者において遠隔転移を有する症例は有しない症例に比べ有意に NK 活性が低下していると報告している。寺沢¹²⁾の報告によると肺癌患者の末梢血 NK 活性は stage の進行にともない低下する傾向を示している。

肺癌患者において末梢血における NK 活性が低下していたことの理由として、NK 細胞の数の減少、腫瘍由来の抑制因子の存在の可能性、宿主のサプレッサー (suppressor) 細胞の活性化、他のリンパ球からの NK 細胞を刺激する因子の産生低下などの可能性が考えられる。

ヘルパー (helper) T 細胞より産生される IL-2 は NK 細胞の増殖、活性を増強するとされる¹³⁾。今回、末梢血 IL-2 産生能の低下が認められたことより、herper T 細胞による NK 細胞の活性化の低下がその一因として考えられた。

スエヒロタケの菌糸体培養液より得られた多糖体である Schizophyllan (SPG) は、これまでにいくつかの報告にて抗腫瘍効果が期待され、その効果は宿主の免疫能の増強を介する生物学的応答修飾物質として作用すると考えられている¹⁴⁾¹⁵⁾。マウスによる *in vivo* の検討で、Schizophyllan は NK 活性を増強する作用を有することが観察されている¹⁶⁾。また臨床症例においては、子宮頸癌および肺癌で Schizophyllan の延命効果が報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。

今回、肺癌患者において、抗腫瘍多糖体 Schizophyllan を投与したところ投与前及び 2 週目投与後との比較において、NK 活性は有意な増加がみられ、10 例中 8 例で上昇を認めた。

なお Schizophyllan により、2 週目投与後における IL-2 産生能は増加した症例が 3 例、不変症例が 3 例、減少症例が 4 例であり、NK 活性の変化と IL-2 産生能の変化とは相関がみられず、少なくとも NK 活性の増

加は T 細胞より産生される IL-2 の増加に大きく依存していないことが示唆された。

一方、投与前と 4 週目における比較検討では、NK 活性、IL-2 産生能ともその変化に一定の傾向は認められなかった。このことは宿主側の要因が影響したものと考えられた。

本論文の論旨は、第 25 回日本老年病学会総会 (昭和 63 年 10 月、長崎) に於いて発表した。

謝辞 御協力頂きました三菱油化メディカルサイエンスの薬業部の方々に感謝します。

文 献

- 1) Ortaldo J, Herberman R: Heterogeneity of natural killer cells. *Ann REV IMMUNOL* 2 : 359—385, 1984.
- 2) Puccetti P, Santoni A, Riccardi C, Herberman R: Cytotoxic effector cells with the characteristics of natural killer cells in the lungs of mice. *Int J Cancer* 25 : 153—158, 1980.
- 3) Hanna N, Burton R: Definitive evidence that NK cells inhibit experimental tumor metastases *in vivo*. *J Immunol* 127 : 1754—1758, 1981.
- 4) Wiltout R, Herberman R, Zhang S, et al: Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *J Immunol* 134 : 4267—4275, 1985.
- 5) Tabata K, Ito W, Kojima T: Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries. *Carbohydrate Research* 89 : 121—135, 1981.
- 6) 黒川利雄 編: 癌の研究. 同文書院, 東京, 1983, 397—436.
- 7) 神保聖一: 形態学的検査と技術—血液と病理. 造血能と免疫学的検査/C. 細胞性免疫に関する検査 3) フローサイトメトリーにより分類. 検査と技術 14 : 496—500, 1986.
- 8) 竹内 実, 泉 孝英, 松井祐佐, 長井苑子, 佐々木義行, 荻原順一, 大島駿作: 肺癌症例における末梢血単核細胞画分の NK 細胞活性と NK 細胞マーカー (Leu-7, Leu-11) に関する検討. 肺癌 27 : 163—171, 1987.
- 9) Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA: T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* 120 : 2027—2032, 1978.

- 10) 北村 曠, 三上理一郎, 坂口泰弘, 米田尚弘, 堅田均, 前川純子, 西川 潔, 成田亘啓: 肺癌患者の免疫スペクトルの検討—NK 活性と DNCB 反応の組合せについて—. 肺癌 26 : 403—409, 1986.
- 11) Lin CC, Kuo YC, Huang WC, Lin CY : Natural killer cell activity in lung cancer patients. Chest 92 : 1022—1024, 1987
- 12) 寺沢明夫: 肺癌患者末梢血単核球 NK 活性の検討. 肺癌 26 : 37—45, 1986.
- 13) Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S : Interleukin-2 augments natural killer cell activity. Nature 291 : 335—338, 1981.
- 14) Sugawara I, Lee KC, Wong M : Schizophyllan (SPG)-treated macrophages and allogeneic tumor cells. Cancer Immunol Immunother 16 : 137—144, 1984.
- 15) Yanaki T, Ito W, Tabata K : Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation indilute aqueous solution. Biophysical Chemistry 17 : 337—342, 1983.
- 16) 菊地幹雄, 岩野勝行, 沼崎洋三, 小室勝利: 抗腫瘍多糖体 Schizophyllan (SPG) の ADCC および NK 活性に対する作用. 近大医誌 6 : 375—381, 1981.
- 17) 浜崎洋一, 倉本雅規, 岡村州博, 他 : 子宮頸癌に対する Schizophyllan (SPG) を用いた免疫療法について. 日産婦会誌 32 : 929—935, 1980.
- 18) 本間日臣, 大島駿作, 渡辺昌平, 他 : Schizophyllan (SPG) の肺癌における臨床効果—Randomized controlled study—. 肺癌 22 : 499—512, 1982.

Abstract

Immunologic Evaluation of Patients with Lung Cancer with Special Regard to Peripheral Blood Natural Killer Cell Activity and Interleukin-2 Productivity

Takeshi Matsuse, Yoshinosuke Fukuchi, Takahide Nagase, Tadatoshi Suruda, Makoto Yamaoka,
Kiyoshi Ishida, Nobuyuki Harada, Kenji Toba and Hajime Orimo

Thirteen patients with lung cancer and 62 age-matched control subjects were investigated in this study (68.5 ± 2.7 y.o. and 70.5 ± 1.1 y.o. respectively). The peripheral blood natural killer (NK) cell activity of patients with lung cancer and control subjects was $59.3 \pm 4.4\%$ and $69.3 \pm 1.8\%$, respectively. The NK cell activity in these patients was significantly lower than the NK activity of control subjects ($p < 0.05$). The Interleukin-2 (IL-2) productivity of stimulated peripheral lymphocytes from patients with lung cancer was 4.96 ± 0.99 unit, and from control subjects was 12.31 ± 1.51 unit. When compared with control subjects, the IL-2 productivity in the patients with lung cancer was

significantly lower ($p < 0.05$). There were no differences in values of OKT series or OKT4/OKT8 ratio between these patients and control subjects. Ten of the 13 patients received schizophyllan intramuscularly once a week (40 mg/ week). The NK cell activity was significantly increased on the second day after the second injection of schizophyllan, but there was no change in IL-2 productivity. We conclude that the peripheral blood NK cell activity and IL-2 productivity of patients with lung cancer was decreased. The antitumor polysaccharide, schizophyllan, temporarily raised the NK cell activity of these patients.

key words: lung cancer, natural killer cell activity, interleukin-2 productivity, antitumor polysaccharide, schizophyllan

(Jpn J Geriat 26: 475—480, 1989)

Department of Geriatrics, Faculty of Medicine, University of Tokyo