頭頸部癌70症例の免疫学的検討
——リンパ球サブセット, 幼若化, NK 活性および LAK 活性について——

米田和典・広田重水・山本哲也
 植田栄作・尾崎登喜雄

Immunological studies on 70 cases of head and neck carcinomas
——On lymphocyte subsets, blastogenesis,
NK and LAK activity——

Kazunori YONEDA・Jusui HIROTA・Tetsuya YAMAMOTO
 Eisaku UETA・Tokio OSAKI

Abstract: To ascertain influences of cancer treatments on cellular immunity and also to study whether cellular immunoreactivity has a relation with lymph node metastasis or T stage, parameters such as lymphocyte subset proportions, T cell blastogenesis and nonspecific cytotoxicities were investigated on peripheral blood from 70 patients with head and neck carcinoma.

Originally, blastogenesis and LAK activity were inferior compared to those in the healthy controls, however other parameters were within each normal range. T stage and lymph node metastasis did not bring any difference except for lowered blastogenesis in T3 and T4. After treatments, CD4⁺Leu8⁺ cells decreased, and proportions of CD8⁺Leu8⁺, CD16⁺CD57⁻ and CD16⁻CD57⁺ cells contrarily increased. Further, blastogenesis in all T stages and LAK activity in advanced T stages were significantly suppressed by treatments while NK activity was scarcely suppressed.

The above changes were stronger in advanced tumor (T3 and T4) cases who received more induction therapies than early stage (T1 and T2) cases. These results indicate that lymph node metastasis does not bring any visible change of the usual immunologic parameters, and that T cells especially CD4⁺Leu8⁺ cells are very sensitive, and LAK activity is suppressed in the pathologic condition, however NK cells are resistant to cancer treatments. Moreover, both CD16⁻CD57⁺ and CD4⁺Leu8⁺ cell populations seem to be useful markers in detection of cellular immunosuppression associated with cancer treatments because the former increased having a correlation with tumor death and the latter decreased exhibiting a reverse correlation with the increase of the former.

Key words: head and neck carcinoma (頭頸部癌), cancer treatments (癌治療), lymphocyte subpopulation (リンパ球亜群), NK and LAK activity (NK および LAK 活性), T cell blastogenesis (T 細胞幼若化)

緒言

対象および方法

今日では、「免疫学的」手段は悪性腫瘍の診断，治療，予後予測にとって必須のものとなっている¹⁻⁷⁾。免疫パラメーターとして，よく取り上げられるのはリンパ球亜群構成比，T細胞の幼若化，非特異的細胞傷害能あるいは遅延型過敏反応であろう。これらは細胞性免疫能を反映する良き指標であるが，それぞれを単独で調べても，あまり意味を有さず，多くのパラメーターを同時に測定し，検討する必要がある。

リンパ球機能をよりよく反映するような検討が進められ，最近では，リンパ球亜群は二重染色による分析が行われ，各T細胞亜群も Leu8 抗原でさらに亜分画されている^{8,9)}。Natural killer (NK) においても，その構成細胞に関する検討が進められ，NK 細胞とT細胞からなることが示されてきた^{10,11)}。

NK 活性とともに，非特異的細胞傷害能である Lymphokine-activated Killer (LAK) 活性は，NK 細胞のみならずT細胞もその一役を担っていることより^{12,13)}，よりリンパ球の機能を全体的に反映するものとして理解することができる。NK, LAK 両活性にT細胞の核酸合成（幼若化）を加えると，TおよびNK 細胞の機能がある程度までスクリーニングすることが可能であるように思われる。そこで，著者らは上述の免疫パラメーターを頭頸部悪性腫瘍患者において検討した。その結果，治療に伴うリンパ球機能の障害さらには予後関連因子が見出されたので報告することとした。

1. 対象患者，対照健常者および採血

対象は過去5年間に当科で加療した頭頸部扁平上皮癌患者70例で臨床病期は，T1：2例，T2：38例，T3：20例，T4：10例であり，頸部リンパ節転移のあるもの [N(+)]：30例，ないもの [N(-)]：40例である。リンパ節転移は T stage の進行に伴い高率となり，T1+T2 では14例 (35%)，T3では11例 (55%)，そして T4 では5例 (50%) となっていた。なお，ここで N(-) とは，リンパ節郭清術を施行した例においては組織学的に転移が否定されたもの，あるいは頸部リンパ節郭清を行わなかった症例においては，1年以上にわたって転移が臨床的に認められなかった例とし，N(+) は組織学的にリンパ節転移が確認されたものとした。一方，患者の性，年齢分布とはほぼ一致するように健常者27人を選び，各検索における対照とした。

治療は手術療法，放射線療法 (⁶⁰Co による外照射 2 Gy/日)，化学療法（ペブロマイシン 5 mg/日，5-FU 250 mg/日，シスプラチン 50 mg/週）を適宜併用した（表1）。各T群におけるこれら化学療法剤の投与量，放射線照射量の平均には差はないものの，T3 および T4 では3者併用が高率であった。その結果，T3 および T4 では，おのおのの療法が T1, T2 よりも高率に適用されていた。

採血は治療前，治療開始2週後および退院時とし，末梢静脈血を採取しリンパ球の分離に供した。ただし，手術単独例（2例）においては，手術後2週および6週の

表 1 対象患者における治療の概要

治 療	T1*+T2* (n=40)	T3 (n=20)	T4 (n=10)
放射線			
⁶⁰ Co	n=30	n=20	n=9
mean ± 1SD	27.2 ± 6.4 Gy	29.6 ± 6.3 Gy	35.8 ± 8.0 Gy
薬 物			
PLM ^a	n=38	n=18	n=9
mean ± 1SD	39.1 ± 13.5 mg	40.8 ± 12.6 mg	44.4 ± 19.4 mg
5-FU ^b	n=27	n=19	n=9
mean ± 1SD	3,618 ± 1,583 mg	3,901 ± 1,695 mg	3,883 ± 1,613 mg
CDDP ^c	n=7	n=8	n=7
mean ± 1SD	148.6 ± 70.8 mg	196.3 ± 61.0 mg	157.1 ± 126.6 mg
手 術			
原病巣	n=31	n=14	n=4
RND ^d	n=10	n=9	n=3

* T1：n=2，T2：n=38，a：peplomycin，b：5-fluorouracil，
c：cis-diamminedichloroplatinum，d：radical neck dissection

図 1 各 T 群における T (CD3) 細胞亜群比の治療に伴う推移

時点で採血を行った。患者の採血とともに事情が許すかぎりにおいて健康人からも採血し両者を同時に実験に供した。各パラメーターは同時に測定した。なお、T1 症例 (2 例) と T2 群との間には結果に差がなかったことから、1 つの群として取り扱った。

2. リンパ球分離

リンパ球は、ヘパリン加末梢静脈血を通法のごとく Ficoll-Paque (pharmacia) による比重遠沈法により分離し、リン酸緩衝液 (PBS) にて 3 回洗浄後、RPMI 1640 培地 (日水製薬) に 10% ウシ胎児血清 (Flow Laboratories) を加えた増殖培養液に浮遊させ実験に供した。

3. リンパ球サブセット

FITC 標識抗 Leu2a (CD8), Leu3a (CD4), Leu4 (CD3), Leu7 (CD57) および PE 標識抗 Leu8, Leu11c (CD16) モノクローナル抗体 (Bacton Dickinson) を用い 2 重染色を行った。抗体の組合わせは抗 Leu2a-8, 抗 Leu3a-8, 抗 Leu7-11c とし、それぞれの抗体を同時に分離リンパ球に加え氷上で 30 分間インキュベートした。そして PBS で洗浄後、EPICS V (Coulter) を用いフローサイトメトリーによる two-color 解析を行った。なお、抗 Leu4 抗体のみは single-color で測定した。

4. NK 活性, LAK 活性

NK, LAK 両活性は通法のごとく、それぞれ K562 細胞および Daudi 細胞を標的として測定した。NK 活性はリンパ球 (2.5×10^5 個/0.1 ml) と ^{51}Cr (200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 日本原子力研究所) で標識した K562 細胞 (1×10^4 個/0.1 ml) を 96 穴 U 型マイクロプレートの各 well に加え (E/T=25:1), 4 時間混合培養後、上清中の ^{51}Cr を γ カウンターで測定した。LAK 細胞はヒトリコンビナント IL-2 (塩野義製薬) を 70 JRU/ml 含む培養液中

で、リンパ球を 3 日間培養することにより誘導した。そして Daudi 細胞に対する傷害能は NK 活性と同様、4 時間の ^{51}Cr 遊離法で測定した。各検体を 3 重に測定し、傷害能は平均の % cytotoxicity で示した。なお、% cytotoxicity は次式によって求めた。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{experimental activity (E)} - \text{spontaneous activity (S)}}{\text{maximum activity (M)} - \text{spontaneous activity (S)}} \times 100$$

M: 1% トリトン X-100 を用い、細胞を融解後の培養液中の放射活性、E: エフェクターを加えた時の培養液中の放射活性、S: 標的細胞のみを 4 時間培養した後の培養液中の放射活性。

5. リンパ球幼若化反応

リンパ球を増殖培養液で 1×10^6 個/ml に調整し、96 穴 U 型マイクロプレートに 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注後、ヒトヘマグルチニン P (PHA, Difco) およびコンカナバリン A (ConA, Difco) をそれぞれ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように加え、72 時間培養した。そして培養終了後 6 時間前に ^3H -サイミジン (New England Nuclear) を 1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ 加え、取り込まれた ^3H を液体シンチレーションカウンターにて測定した。3 重に測定した放射活性 (dpm) を平均し、表中には、その平均値でもって示した。

6. 統計学的解析

得られたデータの中で、危険率 5% の棄却限界を上回る値を除去し、しかるのちに平均値 $\pm$ 1 標準偏差を求めた。各群間の差は Student's t-test あるいは χ^2 -test により検討し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

図 2 各T群における CD4Leu8⁺ 細胞比の推移
a: P<0.05, b: P<0.001 (いずれも治療前に対して)

図 3 各T群における CD4Leu8⁻ 細胞比の推移

結 果

1. サブポピュレーション

T細胞の共通抗原である CD3 を保有する CD3⁺ 細胞の比率は各T群間でほとんど差がなく、健常群とほぼ同率の60%前後であった (図1). T1+T2 群の CD3⁺ 細胞比は治療による影響をあまり受けず、治療前には62.5±11.2%で治療後には60.1±11.6%であったのに対し、T3 および T4 では治療の影響を大きく受け、それぞれ61.0±13.1%, 57.4±13.8% から 54.2±9.1%, 54.4±15.8%に低下した。T細胞の中でCD4⁺ サブセットについてまずみると、治療前の CD4⁺Leu8⁺ サブセット比は、各T群とも25%前後で、健常人との間に有意差はな

かった (図2)。しかしながら、治療に伴い本サブセット比は大きく低下し、T1+T2 群では26.5±10.0%から20.0±7.0%に、T3 群では26.1±10.4%から14.2±7.5%に、T4群では23.6±14.2%から11.3±6.3%となり、治療前、後の間に有意差が認められた (T1+T2 群: P<0.05, T3 群・T4 群: P<0.001)。一方、CD4⁺Leu8⁻ 細胞比は、癌患者でやや高率であるものの健常群との間に有意差はなく、T1+T2 群、T3 群では治療によりむしろ上昇傾向を示した (図3)。

CD8⁺ 細胞サブセットも CD4⁺ 細胞サブセットと同じ様相を呈し、治療前には CD8⁺Leu8⁻ 細胞比は、健常人 (7.3±2.8%) よりも 癌患者 (10~11%) で高い傾向にあったが、各T群間に 差は認められなかった (図4)。これに対して癌患者の CD8⁺Leu8⁺ 細胞比は健常人より

図4 治療における CD8Leu8⁻ 細胞亜群と CD8Leu8⁺ 細胞亜群の構成比

も低率であり、健常群の9.8±6.2%に対し、T1+T2 群 7.8±3.5%, T3 群 5.5±3.5%, T4 群 4.2±2.4%と、T-stage が高くなるに従い低下していた。

T細胞亜群と異なり、NK細胞亜群は治療によりいずれも増加していた。その中で、強いNK活性を有するとされる CD16⁺CD57⁻細胞比は治療前の癌患者では各T群とも健常人とほぼ同じで5%前後であったが、治療後には T1+T2 群は7.7±4.5%, T3 群は7.6±3.8%, T4 群では8.9±4.4%となり、いずれも健常群より有意に高くなっていた(図5, P<0.01)。さらに患者における CD16⁻CD57⁺サブセット比は、治療前にすでに健常人(12.1±7.7%)よりもやや高値(12~15%)であり、治療により本サブセット比はより上昇した(図6)。これを各群についてみると、T1+T2 群では 14.6±6.7%

図5 CD16⁺CD57⁻ (Leu7-11⁺) 細胞比の治療に伴う推移
a: P<0.01 (健常人に対して)

図6 CD16⁻CD57⁺ (Leu7+11⁻) 細胞比の治療に伴う推移

○: N(-)で予後不良, △: N(-)で腫瘍死, ●: N(+)で予後良好, ▲: N(+)で腫瘍死
a: P<0.05, b: P<0.01 (いずれも治療前に対して)

図7 PHAによる幼若化反応の推移

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.001$ (健常人に対して), c: $P < 0.01$ (治療前に対して)

図8 ConAによる幼若化反応の推移

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.001$ (いずれも健常人に対して), c: $P < 0.001$ (治療前に対して)

から $19.0 \pm 10.0\%$ と上昇 ($P < 0.05$) の程度は比較的軽度であったが, T3 群では $12.6 \pm 5.8\%$ から $22.7 \pm 10.1\%$ とより上昇は大きく ($P < 0.01$), T4 群においては $14.6 \pm 7.6\%$ から $22.6 \pm 10.6\%$ へと上昇していた ($P < 0.05$). つまり, T3, T4 群では T1+T2 群よりも上昇する割合が大となっていた. さらに CD16-CD57⁺ 細胞比と予後との関係を見ると, 本サブセット比が健常人の平均値 + 2SD (27%) より高値であった29例の中で, 腫瘍死が11例みられたのに対して, 全経過を通じて27%未満であった41例の中で腫瘍死したものは7例で, 両群間に有意差が認められた ($P < 0.05$).

2. リンパ球幼若化

癌患者のリンパ球幼若化反応は, 健常人よりも劣っており, PHA, ConA に対する反応は T1+T2 群でそれ

ぞれ $17.3 \pm 10.3 - 13.4 \pm 9.5 \times 10^4$ dpm (PHA-ConA 以下同じ), T3 群で $12.3 \pm 5.2 - 6.7 \pm 6.2 \times 10^4$ dpm, T4 群では $12.0 \pm 6.7 - 7.2 \pm 5.6 \times 10^4$ dpm であり, 健常群 ($24.5 \pm 10.0 - 15.2 \pm 5.2 \times 10^4$ dpm) と比べ T3 群および T4 群は有意に低値であった (図7, 8, $P < 0.001$). このように治療前から低値であった幼若化は治療に伴いさらに低下し, PHA に対する反応は T1+T2 群では $11.9 \pm 8.3 \times 10^4$ dpm に, T3 群では $7.6 \pm 4.0 \times 10^4$ dpm に, T4 群では $9.8 \pm 7.1 \times 10^4$ dpm に低下した. ConA の場合治療による影響はより著明で, T1+T2 群は $4.4 \pm 3.5 \times 10^4$ dpm に, T3 群は $3.5 \pm 2.5 \times 10^4$ dpm に, T4 群では $3.7 \pm 2.8 \times 10^4$ dpm と, いずれも有意に低下していた ($P < 0.001$).

図9 治療に伴うNK活性の推移

図10 治療に伴うLAK活性の変動

a: $P < 0.01$ (健常人に対して)

3. 細胞傷害能

NK活性は治療前の癌患者と健常人との間で有意差はみられなかったが、各T群間には多少の違いが認められた(図9)。そして、NK活性は治療による影響をあまり受けず、T3、T4群においても、ほぼ治療前の傷害能(T1+T2群: $42.7 \pm 16.8\%$ 、T3群: $33.0 \pm 7.6\%$ 、T4群: $36.3 \pm 19.3\%$)を維持していた。なお、治療前のNK活性が20%未満であったものが全体で5例認められ、リンパ節転移を有するものが3例、転移のみられなかったものが2例を占め、おのおの例数(リンパ節転移例=30例、非転移例=40例)からすると転移症例においてNK活性の極端に低い例が多い傾向にあった。

NK活性とは異なり、癌患者のLAK活性は健常人より劣っており、健常群の $70.7 \pm 10.1\%$ に対し、T1+T2群では $57.9 \pm 17.5\%$ 、T3群では $57.6 \pm 13.8\%$ 、そしてT4群では $69.2 \pm 11.8\%$ と、T1+T2群とT3群は有意に低値であった(図10、 $P < 0.01$)。そのうえ、NK活性とは異なり、LAK活性は治療に伴い低下し、治療後にはT1+T2群で $55.0 \pm 16.1\%$ 、T3群で $52.1 \pm 8.3\%$ 、

T4群では $52.9 \pm 19.1\%$ に低下していた。

4. 各結果のまとめと相関関係

検索した各結果を転移群、非転移群に分けて検討するとともに、T3群とT4群を合わせ1つの群とし、T1+T2群と対比し、さらには各パラメーター間の相関関係を求めてみた。まずNK活性についてみると、進展群(T3+T4群)では $34.1 \pm 12.8\%$ と非進展群(T1+T2群)の $42.7 \pm 16.8\%$ よりも低値であり、その差は有意であった(表2、 $P < 0.05$)。同じようにリンパ球幼若化は進展群と非進展群との間に差があり、前者では $12.1 \pm 5.9 - 6.9 \pm 6.0 \times 10^4 \text{dpm}$ であるのに対し、後者では $17.3 \pm 10.3 - 13.4 \pm 9.5 \times 10^4 \text{dpm}$ であった($P < 0.01$)。これに対し、LAK活性は、各群ほとんど同じであり、ただ治療後には進展群で低下が大であるにすぎなかった。

治療前のリンパ球サブセット比は進展群と非進展群との間で差を認めず、治療後も両群は同様な変化を示したが、その中にあって Leu8^+ 細胞と $\text{CD16}^+\text{CD57}^+$ 細胞は両群間に差が認められた。 Leu8^+ 細胞の中で CD4^+ Leu8^+ 細胞比は非進展群ではあまり変化がなく、 $26.5 \pm$

表 2 治療前後における各パラメーターの測定平均値

	健常人	T1+T2		T3		T4		T3+T4	
		前	後	前	後	前	後	前	後
NK	38.4±10.6	42.7±16.8	41.4±17.0	33.0±7.6	36.4±13.2	36.3±19.3	39.8±14.2	34.1±12.8 ^a	37.6±13.6
LAK	70.7±10.1	57.9±17.5	55.0±16.1	57.6±13.8	52.1±8.3	69.2±11.8	52.9±19.1	61.0±14.2	52.4±14.1
PHA	24.5±10.0	17.3±10.3	11.9±8.3	12.3±5.2	7.6±4.0	12.0±6.7	9.8±7.1	12.1±5.9 ^b	8.4±5.5
ConA	15.2±5.2	13.4±9.5	4.4±3.5	6.7±6.2	3.5±2.5	7.2±5.6	3.7±2.8	6.9±6.0 ^b	3.6±2.6
CD3	60.4±10.1	62.5±11.2	60.1±11.6	61.0±13.1	54.2±9.1	57.4±13.8	54.4±15.8	59.9±13.4	54.3±11.7
CD4Leu8 ⁻	10.9±5.3	12.3±5.1	14.1±5.3	13.6±4.6	14.6±4.1	16.5±6.9	13.4±4.8	14.5±5.6	14.2±4.4
CD4Leu8 ⁺	25.2±8.5	26.5±10.0	20.0±7.0	26.1±10.4	14.2±7.5	23.6±14.2	11.3±6.3	24.8±11.8	13.3±7.2 ^e
CD8Leu8 ⁻	7.3±2.8	11.3±5.8	15.7±8.5	10.2±5.6	16.0±8.2	11.1±3.3	20.7±4.2	10.4±5.1	17.3±7.6
CD8Leu8 ⁺	9.8±6.2	7.8±3.5	6.7±3.2	5.5±3.5	4.8±3.1	4.2±2.4	7.4±5.2	5.1±3.3	5.7±4.0
CD16 ⁺ CD57 ⁻	5.0±1.9	4.3±2.2	7.7±4.5	5.0±2.0	7.6±3.8	6.9±3.7	8.9±4.4	5.6±2.8	8.0±4.0
CD16 ⁺ CD57 ⁺	7.3±6.1	7.0±5.2	9.8±7.6	8.8±4.9	13.2±10.4	5.8±4.4	7.4±7.9	7.7±4.9	11.7±10.7
CD16 ⁻ CD57 ⁺	12.1±7.7	14.6±6.7	19.0±10.0	12.6±5.8	22.7±10.1	14.6±7.6	22.6±10.6	13.2±6.5	22.7±10.3

a: P<0.05, b: P<0.01 (いずれも T1+T2 群の治療前に対して) c: P<0.001 (T1+T2 群の治療後にに対して)

表 3 転移例と非転移例に分けた各パラメーターの平均値

	T1+T2		T3+T4		Total	
	Meta(-)(n=26)	Meta(+)(n=14)	Meta(-)(n=14)	Meta(+)(n=16)	Meta(-)	Meta(+)
NK	40.9±18.0	45.5±15.0	38.0±13.5	31.5±11.7	39.9±16.7	38.1±15.1
LAK	58.3±15.6	57.4±19.4	59.7±13.1	61.0±14.2	58.6±15.0	59.4±16.9
PHA	15.9±8.8	19.8±12.3	12.2±4.4	12.6±6.9	14.7±7.9	16.0±10.4
ConA	9.7±6.7	9.2±6.6	7.3±6.8	6.8±5.3	8.8±6.8	7.8±6.0
CD3	61.6±12.6	63.9±8.0	58.2±13.7	60.5±13.0	60.4±13.2	62.1±11.1
CD4Leu8 ⁻	12.0±5.0	12.8±5.4	17.5±7.7	15.4±7.9	13.9±6.6	14.2±6.9
CD4Leu8 ⁺	25.3±9.9	28.9±9.8	24.6±13.0	24.6±10.9	25.0±11.1	26.6±10.6
CD8Leu8 ⁻	12.9±6.5	8.4±3.3	11.1±6.0	10.2±4.8	12.4±6.4	9.5±4.3
CD8Leu8 ⁺	8.4±3.8	7.1±3.0	3.3±1.4	5.8±3.6	7.1±4.0	6.3±3.4
CD16 ⁺ CD57 ⁻	4.5±2.5	3.9±1.4	5.6±3.0	5.9±2.7	4.9±2.7	5.0±2.4
CD16 ⁺ CD57 ⁺	6.8±5.8	7.5±4.1	10.0±5.2	6.4±3.8	7.9±5.8	6.9±4.0
CD16 ⁻ CD57 ⁺	14.3±6.1	15.1±7.7	12.1±5.5	14.5±7.2	13.6±6.0	14.8±7.4

10.0%から $20.0 \pm 7.0\%$ へとわずかに低下しただけであったのに対して、進展群では $24.8 \pm 11.8\%$ から $13.3 \pm 7.2\%$ と著明に低下し、治療後における両群間には有意差が認められた ($P < 0.001$)。これとは逆に、 $CD16^+CD57^+$ 細胞比は両群ともに治療後には上昇し、非進展群では $19.0 \pm 10.0\%$ と治療前に比し約4%上昇したのに対して、進展群では上昇はさらに大きく、 $13.2 \pm 6.5\%$ から $22.7 \pm 10.3\%$ へと約10%上昇していた。

転移群と非転移群の間にはNK活性以外に大差は認められず、わずかにT1+T2群中の非転移群とT3+T4群中の転移群とにおけるリンパ球幼若化が異なり、前者では後者に比しDNA合成はやや良好であった(表3)。これに対しNK活性は転移群、非転移群との間にかかなりの差があり、非進展群では転移-非転移群を問わず40%以上の活性が認められたが、進展群の中の転移群では $31.5 \pm 11.7\%$ と著明に劣っていた。

測定した各パラメーター間の関係を検討したところ、 $CD16^+CD57^+$ 細胞比と $CD4^+Leu8^+$ 細胞比とが負に相関しており ($Y = -0.601X + 32.50$, $r = 0.476$, $n = 229$, $P < 0.001$, 図11), さらに $CD16^+CD57^+$ 細胞比と $CD8^+Leu8^+$ 細胞比とは正に相関していた ($Y = 0.45X + 5.00$, $r = 0.660$, $n = 98$, $P < 0.001$)。

考 察

免疫パラメーターの測定は全身状態を知る1つの方法としてだけでなく、免疫抑制をきたす感染症や悪性腫瘍では、その病状・病態を免疫パラメーターは明示することより、病変の性質、進行程度、進行方向、あるいは治療効果を判断するのに有用となる。免疫パラメーターの中でルテン化されたものとして末梢血リンパ球亜群の構成比があげられよう。以前には1つのリンパ球表面抗原でもって亜群に分けていたが、現在では2つ以上の抗原を同時に測定する方法が一般化し、機能とより密接に結びついたリンパ球の亜群化がなされるようになってきた^{8,9,14,15)}。

リンパ球構成に関してみると、著明な変化は認められず、多くは健常人の値の範囲内にあり、特にT1およびT2症例では検索したすべてにおいて異常を見出すことはできなかった。しかしながら進行癌、特にその治療後では、健常人の値と異なるものがいくつか認められ、T(CD3)細胞はやや減少し、中でも $CD4^+Leu8^+$ 細胞は大きく減少し、逆に大きくて豊富な顆粒を有するT細胞(LGT)とされる¹⁶⁾ $CD16^+CD57^+$ 細胞は増加していた。これらの変化は癌治療を進めることによって一層著明となり、T1およびT2症例では変化は軽微なものの、T3ならびにT4症例ではT細胞の減少、中でも $CD4^+Leu8^+$ 細胞の減少と、逆に、 $CD16^+CD57^+$ 細胞の増加が著明であった。これはおそらく、化学療法、放射線療法、

図11 $CD16^+CD57^+$ 細胞比と $CD4^+Leu8^+$ 細胞比との関係

手術の併用が、T3およびT4ではより多くの症例に適用されており、群全体としては影響が大となったためと考えられる。

$CD4^+$ 細胞の中で、 $Leu8^+$ 細胞の中には“Suppressor inducer”が含まれるとされている^{8,9)}が、 $CD4^+Leu8^+$ 細胞は抑制的に働くばかりではなく、“Helper”として働き、B細胞の抗体産生を高めることが確かめられている¹⁷⁾。したがって、 $CD4^+Leu8^+$ 細胞の減少は、免疫応答からすると負の方向、すなわち細胞性免疫応答能の低下としてとらえることができ、進行癌あるいは癌の治療によって、それが生じるのは、治療上不利ではあっても、合理的な現象のように思われる。

T細胞の活性化によって細胞表面から消失する $Leu8$ 抗原^{18,19)}と異なり、 $CD16$ および $CD57$ 抗原はNK細胞の分化抗原としてとらえられ、分化に対応して両抗原陽性細胞から一方のみが陽性の細胞へと変化することが示されている¹⁶⁾。最近に至って、 $CD16^+CD57^+$ 細胞は、LGT細胞であって、抑制性T細胞であり、エイズ患者の末期にはこの亜群が非常に増加すると報告された²⁰⁾。 $CD16^+CD57^+$ 細胞比の上昇は、 $CD4^+Leu8^+$ 細胞比の減少と相関しており、進行癌患者を中心にした両亜群の消息は、他家の報告^{20,21)}をも考え合わせた時、細胞性免疫応答能の抑制を意味するものとして理解し得るであろう。

癌個体あるいは治療に伴うリンパ球の抑制は主にT細胞においてであり、NK細胞の受ける傷害は弱いようである。それを支える一つの証拠として、T細胞の核酸合成をあげることができ、PHAおよびConAによる芽球化はT3ならびにT4症例、それも治療後に著明に低下した。サイミジンの取り込みは $Leu8^+$ 細胞よりも $Leu8^+$ 細胞の方がはるかに強く^{17,22)}、 $Leu8^+$ 細胞の減少が芽球化低下の大なる原因と考えられる。T1、T2ではこのような変化は弱く、T3およびT4症例において幼若化が低下していたことは、T細胞に対する抑制性物質が腫瘍細胞から産生されることを想定せしめる。事実、

癌細胞からの免疫抑制性蛋白の産生は知られており、癌患者の末血中における抑制性蛋白の検索もなされている²³⁻²⁵⁾。

NK 活性は腫瘍の進行度および治療とは全く関係なく、常に健康人の範囲内に収まっていた。このことは、NK 細胞が抵抗性であることを裏付けており、T 細胞も関与する LAK 活性と異なる場所である。LAK 活性は幼若化、CD4⁺Leu8⁺ 細胞比と同一の歩調で、進行癌における治療後において有意に低下していた。LAK 細胞の中で、NK 細胞に由来したものはさほど抑制されていないと想定され、LAK 活性の低下はT細胞からのLAK 細胞 (T-LAK) の傷害能低下が主たる原因ではないかと、他家の報告^{21,26)}および、この度のリンパ球亜群比あるいは幼若化反応の結果から推定される。

非特異的細胞傷害能、特に NK 活性と転移とは深い関係にあることが広い角度より示されてきた²⁷⁻³⁰⁾。にもかかわらず、本検索においては NK 活性とリンパ節転移との明確な関係を見出すことができず、転移群と非転移群との間に NK 活性を含め検索したあらゆる項目において有意差を算出することができなかった。リンパ節転移を抑制するには、リンパ管内あるいは腫瘍細胞の着床した部位で、傷害能の優れた多数の NK 細胞と腫瘍細胞との接触が必要であろう。そのためには、長期間にわたる高レベルの NK 活性の維持が要求されるはずであるが、担癌個体では、そのことは現実的ではないように思える。したがって、リンパ節の転移を左右するほどの NK 活性の違いは認められないこととなるが、ただ、得られた結果をよくみると、NK 活性が20%以下では転移が高率のように見受けられ、症例がさらに増すと有意差が得られるように思われる。

リンパ節転移を明確に支持するパラメーターの変化はあきらかにされなかったが、興味あることに、CD16⁺CD57⁺ 陽性細胞比が 27% を越えた場合には有意に腫瘍死亡率が高かったことである。抑制性T細胞の増加と腫瘍死との関係はいまだ十分には論じられていないが、本細胞の増加が腫瘍細胞の増殖を許すとするならば、関心の持たれるところであり、本細胞と連動して減少する CD4⁺Leu8⁺ 細胞とも合わせて、今後検討されるべき課題であろう。

結 語

リンパ節転移の有無あるいは T stage によって細胞性免疫能に差が存在するか否か、さらには細胞性免疫に及ぼす癌治療の影響を知る目的で、頭頸部悪性腫瘍70例を対象に末梢リンパ球亜群構成比、T 細胞幼若化および非特異的細胞傷害能を検討し、以下の結論を得た。

1. 治療前、リンパ球サブセットおよび NK 活性は健康人の正常範囲内にあったが、幼若化および LAK 活性

は健康人より劣っていた。

2. 治療前には、T3, T4 群における幼若化の低下を除いて、T stage およびリンパ節転移によって各パラメーターの値に差は認められなかった。

3. 治療前には CD4⁺Leu8⁺ 細胞比は低下し、逆に CD8⁺Leu8⁺, CD16⁺CD57⁺ および CD16⁺CD57⁺ 細胞比は上昇し、CD4⁺Leu8⁺ 細胞比と CD16⁺CD57⁺ 細胞比は逆相関していた。また、CD16⁺CD57⁺ 細胞比が 27% (健康人平均+2SD) 以上を示した症例では腫瘍死したものが有意に多かった。

4. NK 活性は治療にほとんど影響されなかったが、治療後、幼若化はいずれのT群においても有意に低下し、T4 群における LAK 活性も有意に低下した。

5. 各パラメーターの治療による影響は、導入治療により強力に行われた進展例 (T3 および T4 症例) において著明であった。

以上の結果より、担癌個体における NK 細胞比・機能には変化はみられないものの、T細胞の反応性 (幼若化)、機能 (LAK 活性) は抑制されていることが確かめられた。さらに、治療による抑制は NK 細胞には及ばず、T細胞、その中でも CD4⁺Leu8⁺ 細胞が最も強く影響を受けることがあきらかにされた。そして、治療に伴う CD4⁺Leu8⁺ 細胞の減少は癌死 (全身状態の悪化) と関連した CD16⁺CD57⁺ 細胞の上昇と相関しており、この両者の消息は、幼若化とともに、癌患者の免疫能を検索するのに適したマーカーであるように思われた。

引 用 文 献

- 1) Valone, F.H., Gandara, D.R., et al.: Interleukin-2, cisplatin, and 5-fluorouracil for patients with non-small cell lung and head/neck carcinomas. *J Immunother* 10: 207-213 1991.
- 2) 加地亮詞, 岡本正人, 他: 頭頸部癌に対する局所養子免疫療法と放射線治療との併用療法. *日口外誌* 36: 1720-1729 1990.
- 3) 米田和典, 山本哲也, 他: OK-432 とともに化学療法, 放射線治療を行った頭頸部癌患者における免疫学的検討. *臨床免疫* 19: 618-626 1987.
- 4) 尾崎登喜雄, 米田和典, 他: 口腔粘膜癌のリンパ節転移に関する免疫学的検討. *日癌治* 25: 621-631 1990.
- 5) Hirota, J., Ueta, E., et al.: Immunohistologic study of mononuclear cell infiltrates in oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 12: 118-125 1990.
- 6) 尾崎登喜雄, 広田重水, 他: 頭頸部癌75症例の臨床的ならびに免疫・組織学的検討. *日口外誌* 34: 274-286 1988.
- 7) 安部まこと, 山本剛史, 他: 乳癌患者の免疫学的パラメーターの検討—とくに two-color 分析

- による末梢血リンパ球の解析について一. 日臨免 14: 158-165 1991.
- 8) Kansas, G.S. and Engleman, E.G.: Phenotypic identification of suppressor-effector, suppressor-amplifier and suppressor-inducer T cells of B cell differentiation in man. *Eur J Immunol* 17: 453-457 1987.
 - 9) Damle, N.K., Childs, A.A., et al.: Immuno-regulatory T lymphocytes in man. Soluble antigen-specific suppressor-inducer T lymphocytes are derived from the CD4⁺CD45R⁻p80⁺ subpopulation. *J Immunol* 139: 1501-1508 1987.
 - 10) Phillips, J.H. and Lanier, L.L.: Lectin-dependent and anti-CD3 induced cytotoxicity are preferentially mediated by peripheral blood cytotoxic T lymphocytes expressing Leu-7 antigen. *J Immunol* 136: 1579-1585 1986.
 - 11) Huwiler, T., Morell, A., et al.: Correlation of natural killer cell function with Leu7 reactivity in patients with humoral immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 56: 486-492 1984.
 - 12) Sawada, H., Abo, T., et al.: Prerequisite for the induction of lymphokine-activated killer cells from T lymphocytes. *J Immunol* 140: 3668-3673 1988.
 - 13) 藤本卓也: 標的細胞上の MHC クラス I およびクラス II 抗原よりみた LAK 細胞の多様性. 日臨免 12: 294-301 1989.
 - 14) Koide, J. and Engleman, E.G.: Differences in surface phenotype and mechanism of action between allo-antigen-specific CD8⁺ cytotoxic and suppressor T cell clones. *J Immunol* 144: 32-40 1990.
 - 15) Mason, D. and Powrie, F.: Memory CD4⁺ T cells in man from two distinct subpopulations, defined by their expression of isoforms of the leucocyte common antigen, CD45. *Immunology* 70: 427-433 1990.
 - 16) Abo, T., Miller, C.A., et al.: Characterization of human granular lymphocyte subpopulations expressing HNK-1(Leu-7) and Leu-11 antigens in the blood and lymphoid tissues from fetuses, neonates and adults. *Eur J Immunol* 14: 616-623 1984.
 - 17) 米田和典, 山本哲也, 他: 口腔癌患者における免疫学的検討—リンパ球サブセット, 幼若化, NK 活性, および血清 IFN 活性について一. 日臨免 13: 373-383 1990.
 - 18) Kanof, M.E. and James, S.P.: Leu-8 antigen expression is diminished during cell activation but does not correlate with effector function of activated T lymphocytes. *J Immunol* 140: 3701-3706 1988.
 - 19) Tedder, T.F., Penta, A.C., et al.: Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J Immunol* 144: 532-540 1990.
 - 20) Ohno, T., Kanoh, T., et al.: Comparative analysis of lymphocyte phenotypes between carriers of human immunodeficiency virus(HIV) and adult patients with primary immunodeficiency using two-color immunofluorescence flow cytometry. *Tohoku J Exp Med* 154: 157-172 1988.
 - 21) 小山捷平, 海老原次男, 他: Two-color flow cytometry による胃癌患者末梢血リンパ球, ならびにリンフォカイン活性化リンパ球・サブセットの解析. 癌の臨 34: 435-441 1988.
 - 22) Takada, S., Koide, J., et al.: Differences in surface phenotype between cytolytic and non-cytolytic CD4⁺ T cells. MHC class II-specific cytotoxic T lymphocytes lack Leu8 antigen and express CD2 in high density. *J Immunol* 142: 3038-3044 1989.
 - 23) Shirakawa, F., Tanaka, Y., et al.: Immunosuppressive factors from adult T-cell leukemia cells. *Cancer Res* 46: 4458-4462 1986.
 - 24) Cornelius, J.G. and Normann, S.J.: Isolation of a low molecular weight inhibitor of lymphocyte proliferation from tumorous ascites. *J Immunol* 141: 2175-2180 1988.
 - 25) 黒河博之, 久保田英朗, 他: 口腔癌患者における血清中免疫抑制物質 (IS 物質) の臨床的検討. 口科誌 39: 737-743 1990.
 - 26) 海老原次男, 小山捷平, 他: 胃癌患者における recombinant interleukin2 による CD4⁺ Leu8⁻ lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の誘導と, 外因性 recombinant interferon γ による LAK 細胞活性の増強とその免疫学的 phenotype の解析. 日臨免 12: 88-96 1989.
 - 27) Saijo, N., Ozaki, A., et al.: Analysis of metastatic spread and growth of tumor cells in mice with depressed natural killer activity by anti-asialo GM1 antibody or anti-cancer agents. *Cancer Res Clin Oncol* 107: 157-163 1984.
 - 28) Gorelik, E., Bere, W.W., et al.: Role of NK cells in the antimetastatic effect of antitumor drugs. *Int J Cancer* 33: 87-94 1984.
 - 29) Lela, P.K., Parhar, R.S., et al.: Indomethacin therapy abrogate the prostaglandin-mediated suppression of natural killer activity in tumor-bearing mice and prevents tumor metastasis. *Cell Immunol* 99: 108-118 1986.
 - 30) Schantz, S.P., Brown, B.W., et al.: Evidence for the role of natural immunity in the control of metastatic spread of head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 25: 141-145 1987.