原 著

癌患者におけるリンパ球サブセットおよびNK細胞活性の検討

岐阜県 木澤病院外科
田 辺 博 渡 辺 進

担癌患者の免疫能を評価する目的で97名の癌患者について末梢血リンパ球, リンパ球サブセット, NK細胞活性(NK活性)を測定しStage, Performance Status (PS), 栄養状態とを比較検討し以下の結果を得た。

担癌患者のNK活性はStage IVで有意に低値を示した, NK活性はPSの進行にともない低下する傾向にあり, PS3, 4では有意に低値であった。また栄養不良の担癌患者のNK活性は有意に低値であった。

リンパ球サブセットのうち, OKT3, OKT4はStage I, PS1で有意に高く, OKT8は進行により上昇する傾向を示した, OKT4/OKT8はStage別では有意差を示さなかったが, PSが進行するほど低下する傾向にあった。

NK活性は癌患者の状態を良く反映し, 特に栄養状態と関連することが示唆された。栄養状態によりリンパ球サブセットの比率の変動は一定の傾向を示したがNK活性ほどの相関性はないと考えられた。

索引用語: 担癌患者, 細胞性免疫, リンパ球サブセット, NK細胞活性

はじめに

近年, 免疫学の進歩にともない担癌患者では細胞性免疫, 単球機能などの生体防御機構に異常をきたすことが明らかにされつつある¹⁾²⁾。したがって担癌患者の免疫能を把握することは治療内容を決定し, 予後を推察する上でも重要なことと思われる。しかしヒトの癌は一般に抗原性が低いため特異的な免疫能を評価することはむずかしく, 非特異的な免疫能を評価し総合的に判断されるのが現状である。

今回著者らは各種の担癌患者の免疫能を評価する目的で末梢血でのリンパ球数, リンパ球サブセット, さらにNK細胞活性を測定しこれらの値とStage, Performance Status, 栄養状態と比較することにより, これらの免疫学的因子が癌患者の状態を把握し予後を知る指標となりうるかを検討したので報告する。

対 象

1986年4月から1988年の9月までの2年半に当院外科にて経験した癌患者97名を対象とした。内訳は胃癌51名, 大腸癌24名, 膵臓癌11名, 乳癌11名で平均年齢 65.2 ± 13.0 歳, 男女比66:31であった(表1)。

検査項目および評価方法

表1 対象症例

昭和61年4月から, 昭和63年8月までに当院で経験した癌患者のうち97名を対象とした。

	症例数	年 齢	平均年齢	男 女 比 (男:女)
胃 癌	51	35~89	65.4 ± 13.0	39:12
大腸癌	24	51~85	69.5 ± 9.9	15:6
膵臓癌	11	55~86	70.6 ± 7.9	9:2
乳 癌	11	34~73	49.4 ± 11.4	0:11
計	97	34~89	65.2 ± 13.0	66:31

97名の癌患者についてそれぞれ胃癌取扱い規約³⁾, 大腸癌取扱い規約⁴⁾, 膵臓癌取扱い規約⁵⁾, 乳癌取扱い規約⁶⁾にしたがいStageを決定しStage IからIVまでに分類した(大腸癌のStage VはStage IVにふくめる)。

癌患者の末梢血にてリンパ球数をもとめ, 末梢リンパ球よりリンパ球サブセットとしてOKT3, OKT4, OKT8, OKT4/OKT8, およびNK細胞活性(NK活性)をもとめた。

生化学検査よりTP, ALBをもとめ, TP=6.5, ALB=3.5以上を栄養良, それ未満を栄養不良とした。さらにその際のPerformance Status (PS)を表2の内容により評価した。

1989年2月18日受付 1989年5月16日採用

表 2 Performance Status

Grade 1: 無症状又は、軽度の症状はあるが、歩行、軽労働以上の仕事が可能である。
Grade 2: 歩行や身の回りのことはできるが、時に少し介助がいることもある。軽労働はできないが、日中の50%以上は起居している。
Grade 3: 身の回りのある程度のことはできるが、しばしば介助がいり、日中の50%以上は就床している。
Grade 4: 身の回りのこともできず、つねに介助がいり、終日就床を必要としている。

検査方法

1. リンパ球サブセット

T リンパ球サブセットの解析には Ortho 社の蛍光標識モノクローナル抗体の、OKT3, OKT4, OKT8, を使用した。全血100 μ l 至適濃度のモノクローナル抗体を10 μ l 添加、4 $^{\circ}$ C、30分間インキュベートの後、溶血操作を加え遠心後 phosphate buffer saline (PBS) に再浮遊させて Flow cytometry (Spectrum III, Ortho 社) を用い細胞解析を行い全リンパ球に対する陽性細胞をもとめた。また同時採血の一般血液像にて白血球(WBC) (/mm³) リンパ球数(Lymph) (/mm³) を求めた。

なお、OKT3は末梢血 T リンパ球、OKT4は Inducer/Helper T リンパ球、OKT8は Suppressor/Cytotoxic T リンパ球を標識するとされる。

2. NK 活性

末梢血リンパ球のNK活性は以下の方法にて求めた。すなわち検査対象例の末梢血7~8mlをヘパリン加採血し、PBSにより2倍希釈した後、Ficoll-Iroaque 比重遠心法にて単核球を分離し effector 細胞とする。これに対し⁵¹Crに標識したヒト慢性骨髄性白血病株 K562をTargetとし、これらを一定の比率(1/20)にて混和し37 $^{\circ}$ C 5%CO₂、4時間培養後、放出された⁵¹CrをAuto well gamma system ARC-30 (Aoka 製) にて測定しNK細胞のK562細胞に対する細胞障害性、すなわち%lysisを次式により測定しNK活性とした。

NK 活性 (%) =

$$\frac{\text{Experimental CPM} - \text{Control CPM}}{\text{Maximum CPM} - \text{Control CPM}} \times 100$$

評価方法

末梢血リンパ球数、リンパ球サブセット、NK活性を免疫学的指標とし、これらの検査結果をStage, PS, 栄養状態と比較検討した。

また検定はStudents't-testによりP<0.05で有意差

ありと判定した。

結 果

1. リンパ球サブセットと Stage, PS との関係

OKT3はStage, PSともに癌の進行の低い状態で高い傾向を示し、Stage別ではStage Iが他群に比して有意に高値であり、PSではPS1がPS2, PS4に比して有意に高値であった(図1, 2)。

OKT4もOKT3と同様の傾向を示し、Stage Iは他のStageに比して有意に高値を示し、PS1は他群に比して有意に高値を示した(図3, 4)。

OKT8とStageの関係では、Stageの進行にともな

図1 StageとOKT3陽性細胞の割合

図2 PSとOKT3陽性細胞の割合

図3 StageとOKT4

図4 P.S.と OKT4

図5 Stageと OKT8

図6 P.S.と OKT8

い上昇する傾向を認めたが有意差は認められなかった。PS との関係では PS の進行にともない上昇する傾向を認め PS3, 4 は PS1 に比して有意に高値であった (図 5, 6)。

OKT3/OKT4 と Stage の関係では, Stage の進行によりやや低下する傾向があり Stage I と II, IV で有意差を認めた。PS との関係では PS の進行にともない低下する傾向にあり PS3, 4 では PS1 に比して有意に低値であった (図 7, 8)。

2. NK 活性と Stage, PS, 栄養状態との関係

NK 活性は, Stage の進行にともない低下する傾向

図7 Stageと OKT4/8比

図8 PSと OKT4/8比

図9 Stageと NK細胞活性

を認め Stage IV で特に低く有意差を認めた (図 9)。NK 活性では PS の進行にともない低下を示し, PS4 では他群に比して有意に低値であり, PS3 でも PS1, 2 に対し有意に低値であった (図 10)。栄養状態と NK 活性の関係では栄養不良ほど低値を示し, 栄養良と不良との間には有意差を認めた (図 11)。

3. リンパ球数と Stage, PS, 栄養状態との関係

リンパ球数は進行にともない減少する傾向にあり Stage II, IV は Stage I に対し有意に低値であった (図

図10 PS と NK 細胞活性

図11 Total protein, Albmin と NK 細胞活性

図12 Stage とリンパ球数

12). PS とリンパ球数とでは PS の進行により、リンパ球数は減少する傾向にあり PS4では PS1に比してリンパ球数は有意に低値であった(図13)。リンパ球数は栄養不良で低値を示す傾向にあり ALB では有意差を認めた(図14)。

考 察

担癌生体においては免疫の調節機構に異常をきたし、これが癌の発生、転移、再発といった問題に大きく関与するものと考えられている⁷⁾ことから癌患者の免疫能の状態を正確に把握することは患者の治療方針

図13 PS とリンパ球数

図14 Total Protein, Albmin とリンパ球数

を決定し予後を推察するうえでも重要な問題となる。理想的には個々の癌に対する特異的免疫反応が検出されることが必要であるが、現状では特異的な免疫反応を一般化し、さらに臨床応用するという事は非常に困難である。したがって実際にはリンパ球数、T・B細胞比率⁸⁾T細胞のサブセット⁹⁾¹⁰⁾Mitogenによるリンパ球幼若化反応¹¹⁾PPD, PHA などに対する皮膚反応¹²⁾など非特異的細胞性免疫能の検査を含めたいいくつかのパラメーターを併用して総合的に判断されているのが現状である。

こうしたパラメーターの中でも癌に対する細胞性免疫の主体をなし癌細胞に対する直接的な細胞障害性を示すTリンパ球は特に重要な位置をしめ、その機構について解明されつつある¹³⁾¹⁴⁾。さらに、最近ではこうしたTリンパ球のような抗原認識にもとづく免疫性の細胞障害機構とは無関係に、腫瘍細胞障害活性を有する Natural Killer (NK) 細胞が主体の腫瘍監視機構の中で重要な役割を担っていることが注目されている^{15)~17)}。Tリンパ球, NK細胞に関する研究は、近年さかんになされるようになってきているが、これらのパラメーターを同時に評価し得た報告は少なく、今回の研究でその意義について検討した。

細胞性免疫の主体をなすTリンパ球の癌細胞に対する直接の細胞障害性については多くの報告がなされている¹⁴⁾。最近の研究ではTリンパ球における個々の分画の機能、相互作用、他の免疫能との関係など基礎

的關係も明らかにされつつある。また細胞融合法によるモノクローナル抗体作製技術の開発によりリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体が得られるようになり、さらに Flow Cytometry を用いた全血法によるリンパ球サブセットの解析が容易になったことから、臨床研究にも応用されリンパ球分画の面からの癌患者の免疫能に対する報告がなされている¹⁸⁾¹⁹⁾。

今回の研究でモノクローナル抗体は Ortho 社製の OK シリーズ (OKT3, TKT4, OKT8) を用いたが、従来の研究で OKT3 は末梢血 T リンパ球, OKT4 は Inducer/Helper T リンパ球, OKT8 は Suppressor/Cytotoxic T リンパ球を標識することが明らかとされ、担癌患者におけるリンパ球分画の解析という面から免疫能を評価する試みがなされている。

OKT3 については癌の進行に対し有意な変動がないとする報告も多いが¹⁸⁾¹⁹⁾これはリンパ球数全体が低下してくるため細胞比率としては変化が少ないとする考えである。これに対し中島²⁰⁾は消化器癌末期では有意に OKT3 の低値の出現率が高く進行した状態での指標になりうるとしている。

OKT4 については癌の進行により低下するとの意見が多く¹⁸⁾¹⁹⁾²¹⁾佐藤¹⁸⁾は良性疾患に比し胃癌患者では OKT4 細胞比率が特異的に低く、これは最も特徴的な所見であると述べている。また小林²¹⁾は胃癌 Stage IV で非切除例では、術前すでに OKT4 が低値であったことを報告している。著者らの研究では Stage I, PS1 と癌の進行が低い状態で高値を示すという従来の報告と少し異なる結果を得たが、これは数種類の癌患者を検討し、進行した状態では平均化されたものと考えられた。

OKT8 は Suppressor T cell と Cytotoxic T cell という相反するリンパ球をふくむが、従来は Suppressor T cell の指標としての考えが強く、癌の進行にもとづき Suppressor 細胞活性誘導性が上昇するために OKT8 細胞比率は増加するとの報告が認められる⁹⁾。

したがって OKT4/OKT8 は癌の進行にもとづき、OKT4 の低下、OKT 8 増加がみられるとの理論からは比較が低下することになり、実際そうした報告も多くみとめられる²⁰⁾²²⁾。しかし比率は有意差がなかったとの報告も多く¹⁸⁾²³⁾単純に OKT4/OKT8 の低下が免疫能の低下を示すものとしてよいのか疑問のむきもある。

今回の研究では OKT4/OKT8 は癌の進行により低下する傾向が認められ、さらに Stage の進行より PS

の進行によく相関するとの結論を得たが、いずれにしても OKT8 は Suppressor T cell と Cytotoxic T cell という相反する性格を有する細胞を含むことから、これだけでは理解しがたく今後はこれら 2 種類を識別する Two Color 解析による検討が望まれる。

一方 T リンパ球を代表とする宿主の免疫により獲得される監視機構とは別に、非特異的に腫瘍細胞への障害能力を示すリンパ球様細胞の存在することが明らかにされてきた。このことは 1973 年 Takasugi¹⁵⁾により正常人の末感作リンパ球が種々の培養腫瘍細胞に対して細胞障害性に働く現象 (Natural Killing) として報告され、さらに 1975 年 Herberman¹⁶⁾と Kiessling¹⁷⁾のグループにより、この細胞障害性を有する末感作リンパ球のことを Natural Killer (NK) 細胞と命名された。

NK 細胞の腫瘍免疫における意義として発癌に対する主体の免疫監視機構との関連が注目されたが、その後の研究で NK 細胞自体が腫瘍破壊作用や転移抑制効果を有することが in vivo で確認され担癌患者における NK 細胞の役割が一層認識されている。

NK 活性と癌の進行度との関係については Stage の進行にともない活性が低下するとの報告が多く認められる^{24)~26)}。大谷²⁶⁾は Stage の進行にともない NK 活性が低下し、P 陽性で NK 活性が著しく低下していることから NK 細胞のもつ腫瘍破壊作用や転移抑制作用が癌の進行より抑制されると述べている。一方田中²⁷⁾は早期胃癌において NK 活性が有意に低いと報告し、大下²⁸⁾も Stage I で NK 活性が低いことを指摘しており NK 活性の低下が発癌の促進因子となりうるとの意見も認められる。

今回の研究では Stage の進行により NK 活性は低下するとの結論を得たが、この検討で興味のあることは Stage 別にみた場合、ある程度癌の Stage が進行すると急速に NK 活性が低下するのに対し、PS との比較では PS の進行により徐々に NK 活性が低下を示したことである。このことから PS すなわち癌患者の一般状態と NK 活性がより密接な関係にあるものと考えられた。

また担癌患者の免疫能に影響を与える要素の中で近年栄養との関連を指摘する意見がある²⁴⁾。NK 活性と栄養についての報告は少ないが従来より栄養状態と主体の感染防御能の関連については、興味をもたれてきた³⁰⁾。さらに最近の免疫学の進歩に伴い栄養の改善が感染免疫のみならず、腫瘍免疫や移植免疫においても

重大な関連性を有することが指摘されてきている³¹⁾³²⁾。

Akimoto ら³³⁾は、低蛋白食で飼育された C3H/He マウスの YAC-1 細胞に対する Natural・Cytotoxicity を調査し、正常飼育マウスでは OK-432 や Lentinan などの免疫賦活剤を投与しても NK 活性の増強は、みられなかったとしている。また辻ら³⁴⁾は、食道癌患者と NK 活性との関連について述べ、早期に低栄養状態となる食道癌患者の NK 活性は他の消化器癌患者より著しく低下していると報告し、血清 ALB 値が 3.5g/dl 以下の低栄養状態では NK 活性の増強は期待できないとしている。

今回の研究でも担癌患者の栄養状態と NK 活性はきわめてよく相関することが示されたが、このことは栄養のもつ腫瘍免疫への影響の大きさを示唆するものと考えられた。したがって Stage の進行した癌患者においても栄養状態を改善させ、一般状態すなわち PS を向上させることが NK 活性を回復させ、生体の免疫能を賦活することになり、このことは今後の癌の治療においても大いに期待しうるものと考えられた。

結 語

癌患者 97 名について、その末梢血リンパ球サブセット、NK 活性を測定し Stage 栄養状態との関係について検討し次の結果を得た。

- 1) OKT3, OKT4 は Stage I, PS I と癌の進行の低い状態で高値を示した。
- 2) OKT8 は癌の進行により低下する傾向にあり、OKT4/OKT8 も同様であった。
- 3) NK 活性は Stage IV で低く、他の Stage に比して有意に低値であった。
- 4) NK 活性と PS では PS の進行にともない有意に低下を認めた。
- 5) NK 活性と栄養状態は良く相関し、栄養不良であるほど NK 活性は低値を示した。
- 6) 末梢リンパ球数は Stage, PS の進行にともない低下する傾向を示した。

本論文の要旨は、第 50 回臨床外科学会総会にて報告した。

文 献

- 1) Rokinson JC: Assays of immuno competence in the staging and prognosis of cancer Surg. Gynecolobset 153: 909—921, 1981
- 2) Unger SW, Bernhard ML, Pace RC, et al: Monocyte dysfunction in human cancer. Cancer 51: 669—674, 1983
- 3) 胃癌研究会編：胃癌取扱い規約改訂第 11 版。金原出版、東京、1985
- 4) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約改訂第 4 版。金原出版、東京、1986
- 5) 日本膵臓学会編：膵癌取扱い規約改訂第 3 版。金原出版、東京、1986
- 6) 乳癌研究会編：乳癌取扱い規約改訂第 8 版。金原出版、東京、1986
- 7) 小川泰央：胃癌患者における非特異的免疫能に関する臨床的研究—リンパ球幼若化反応の評価と意義—。日臨外医会誌 45: 1016—1033, 1984
- 8) Yao EH, Li D, Cu H: T cell subpopulation in Hepatoma. Am J Gastroenteol 79: 227—228, 1984
- 9) Ginns LC, Miller LG, Goldenheim PD, et al: Alteration in immunore gulatory cells in Lung cancer and smoking. J Clin Immunol 2: 90—94, 1982
- 10) Kaszubowski PA, Husby G, Tung KSK, et al: T-lymphocyte subpopulations in peripheral blood and tissues of cauce patients. Cancer Res 40: 4648—4657, 1980
- 11) Currie GA, Basham C: Serum mediated inhibition of the patient to his own tumor: A possible role for circlating antigen. Br J Cancer 26: 427—437, 1972
- 12) 久野悟郎、曾根三郎、大口秀利他：皮膚反応、癌の臨 24: 483—487, 1978
- 13) Wybran J, Hellstrom I, Hellstrom KE, et al: Cytotoxicity of human no sette-forming blood lymphocytes on cultivated human tumor cells. Int J Cancer 13: 515—521, 1974
- 14) Wybran J, Fudenberg H: Tlymusderived vosette-forming cells in various human disease states: Cancer, lymphom as, bacterial and viral infections and other disease. J clin Invest 52: 1026—1032, 1973
- 15) Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI: Reactivity of lymphocytes from normal person on cultured tumor cells. Cancer Res 33: 2898—2902, 1973
- 16) Herberman RB, Hunn ME, Davin DH: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against symgeneic and allogeneic tumors 1. Distribution of reactivity and specificity. Int J Cancer 16: 216—229, 1975

- 17) Kiessling R, Klein E, Wigzell H: "Natural" killer cells in the mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *pe Eur J Immuno* 5: 112—117, 1975
- 18) 佐藤元通, 酒井 堅, 青野幸治他: 胃癌患者リンパ球 subsets の検討, 日消外会誌 18: 1645—1649, 1985
- 19) 林 良夫, 佐藤光信, 古本奈奈代他: 頭頸部癌患者末梢リンパ球サブセットの異常—単クローン抗体による解析, 医のあゆみ 128: 507—508, 1984
- 20) 中島芳通, 秋元 実, 岩崎秀康他: 乳癌および消化器末期患者の末梢血リンパ球分画の検討, 癌の臨 32: 1925—1928, 1986
- 21) 小林一雄, 加藤 肇, 本田亮一他: 胃癌手術前後における非特異的免疫学的指標の推移, 日消外会誌 22: 43—52, 1989
- 22) 横山三男, 大久保慶二: モノクローナル抗体によるリンパ球膜マーカーの検査とその臨床的意義, 日臨43 (秋増): 356—366, 1985
- 23) 江里口直文, 内藤寿則, 友清 明他: 胃癌症例におけるリンパ球 Subpopulation の分析, 日消外会誌 18: 36—42, 1985
- 24) Pross HF, Baines MG: Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor forgoes 1. The effect of malignant disease. *Int J Cancer* 8: 593—604, 1976
- 25) 前之原茂穂, 高尾尊身, 愛甲 孝他: 消化器癌患者における Natural Killer (NK) 活性に関する臨床的研究, 日消外会誌 18: 1824—1830, 1985
- 26) 大谷吉明: 胃癌患者における予後推定因子としての末梢血 Natural Killer 活性の検討, 日消外会誌 21: 2535—2541, 1988
- 27) 田中義憲, 青地 晟, 細川友秀他: 胃癌患者における Natural Killer 活性, 医のあゆみ 111: 438—441, 1979
- 28) 大下裕夫, 佐治童豊, 杉山保幸他: 胃癌症例における術前 NK 活性の意義と術後 NK 活性低下に対する非特異的免疫賦活剤術前・術後投与の効果について, 日外会誌 86: 1417—1425, 1985
- 29) 小野寺時夫: 進行消化器癌に対する抗癌療法と栄養指標, *JJPEN* 8: 167—174, 1986
- 30) Law DK, Dudrick SJ, Abdou NI: The effects of protein calori malnutrition on immune competence of the surgical patient. *Surg Gynecol Obstet* 139: 257—266, 1974
- 31) McHugh MI, Wilkinson R, Elliott RW et al: Immunosuppression with polyunsaturated fatty acids in renal transplantation. *Transplantation* 24: 263—267, 1977
- 32) 西平哲朗, 秋元 実, 平山 克他: 癌患者の栄養と免疫能, 輸液栄養ジャーナル 2: 257—263, 1980
- 33) 秋元 実, 西平哲朗, 葛西森夫他: 低蛋白栄養下におけるマウス免疫能の検討, 臨免疫 13: 396—402, 1981
- 34) 辻 和男, 阿保七三郎, 工藤 保他: 食道癌患者における Natural Killer 活性値の臨床的意義, 日消外会誌 18: 8—14, 1985

STUDIES ON LYMPHOCYTE SUBSETS AND NATURAL KILLER CELL ACTIVITY OF THE PATIENTS WITH CANCER

Hiroshi TANABE and Susumu WATANABE

Department of Surgery, Kizawa Hospital

To evaluate the immune reactivity of the patients with cancer, peripheral lymphocytes, lymphocyte subsets, and natural killer cell activity (NK activity) were determined in 97 cancer patients, and their stages, performance status (PS), and nutritional status were comparatively studied.

A significant low level of NK activity was noted in stage IV patients, NK activity was decreased with advanced PS. It was significantly low at PS 3 and 4. A good correlation between nutritional status and NK activity was observed, and a significantly decreased NK activity was noted in oligotrophia.

Among lymphocyte subsets, OKT 3 and 4 were significantly higher in stage I and PS1, and OKT8 appeared to increase with more advanced stage and PS. The OKT 4/OKT8 did not show significant difference depending on stages, however, tended to decrease with advanced PS.

It was suggested that NK activity reflects the condition of a cancer patient. Especially the good correlation with nutrition was impressive. Though a certain tendency has been noted in the ratio of lymphocyte subsets, it appears to lack as good a correlation as that in NK activity.