

# 肺癌の治療に関する臨床的研究

## 第 2 編

### 肺癌患者の細胞性免疫能に関する研究—癌化学療法症例におけるその経時的変動と溶連菌剤の効果について—

岡山大学医学部第2内科教室 (主任:平木潔教授)

大学院生 藤 井 昌 史

(昭和51年3月30日受稿)

#### 内容目次

#### 第1章 緒 言

#### 第2章 対象ならびに方法

##### 第1節 対象患者.

##### 第2節 実験方法.

##### 第1項 リンパ球幼若化反応.

##### 第2項 ツベルクリン反応.

##### 第3項 Leucocyte migration inhibition test

##### 第4項 末梢リンパ球数.

#### 第3章 成 績

##### 第1節 リンパ球幼若化反応.

##### 第1項 測定条件, 測定精度ならびに正常値に関する検討.

##### 第2項 肺癌症例の治療前のリンパ球幼若化反応に関する成績.

##### 第3項 化学療法症例におけるリンパ球幼若化率の変動について.

##### 第4項 OK-432単独投与におけるリンパ球幼若化率の変動について.

##### 第2節 ツベルクリン反応.

##### 第1項 治療前のツベルクリン反応について.

##### 第2項 化学療法による変動,主としてOK-432併用,非併用の比較.

##### 第3節 末梢リンパ球数.

##### 第4節 肺癌患者におけるリンパ球幼若化反応, ツベルクリン反応, 末梢リンパ球数の相互関係ならびにこれらの総合評価について.

##### 第5節 leucocyte migration inhibition test

##### 第1項 至適抗原濃度および再現性に関する検討.

##### 第2項 肺癌患者,非肺癌々症例,良性呼吸器疾患における検討.

##### 第3項 化学療法による migration index の変動について.

##### 第4項 OK-432単独投与における migration index の変動について.

##### 第6節 肺癌化学療法症例におけるOK-432投与群,非投与群の生存期間に関する検討.

#### 第5章 総括ならびに考案.

#### 第6章 結論

#### 第1章 緒 言

担癌生体では一般に網内系機能が低下していることは古くから認められており<sup>1)</sup>、その進行度と並行して変動し低下しているものはその予後も悪いとされていた<sup>2)</sup>。その後腫瘍に対する免疫反応の主体がリンパ球(特にT細胞)を中心とする細胞免疫反応であり、癌の進行とともにT細胞の機能低下をきたすことが明らかにされてきた。また実験腫瘍の多くに腫瘍特異的移植抗原(TSTA)の存在が証明され、人癌においても微弱ではあるが同様の腫瘍特異抗原(TSA)が存在することが知られており、特異的細胞免疫反応に関する検討がなされてきた。他方、B細胞の産生による液性抗体の抗腫瘍性に関する実験もみられるが、液性抗体はむしろ細胞免疫には不利に作用する場合が多いと考えられている。そこで著者も原発性肺癌患者を中心に、T細胞のもつ非特異的、特異的細胞免疫能の parameter として末梢リ

ンパ球の *in vitro* における phytohemagglutinin (PHA) に対する幼若化反応 (幼若化反応), ツベルクリン反応 (ツ反), 末梢リンパ球数, leucocyte migration inhibition test (LMIT) について肺癌の進展度, 予後などとの相関性を検討し, さらに癌化学療法や放射線療法による臨床経過とこれらのパラメーターの推移との関係を知るにより, これらのパラメーターの臨床における有用性を検討した. 同時に肺癌患者に対し免疫賦活作用を有するとされている溶連菌剤 OK-432 を投与した場合の幼若化反応, ツ反, LMIT に及ぼす影響について検討するとともに, 溶連菌剤導入による免疫化学療法が行われた肺癌症例の生存期間に関する検討を試み, 本剤の免疫療法剤としての有用性を検討した.

## 第2章 対象ならびに方法

### 第1節 対象患者

対象は当科入院中または外来通院中の肺癌患者で, 多くの症例が組織診あるいは細胞診による確診がなされている. 幼若化反応は肺癌症例 52 例, 健康人 46 例について, ツ反は肺癌 65 例について, LMIT は肺癌 19 例, 肺癌以外の悪性腫瘍 8 例, 肺感染症 8 例, 健康人 7 例について検討した. 化学療法に溶連菌剤 OK-432 を併用した肺癌症例の生存期間に関する検討では臨床病期 III, IV 期のものを対象とし, OK-432 併用群 21 例, 非併用群 26 例について生存期間の比較を行った.

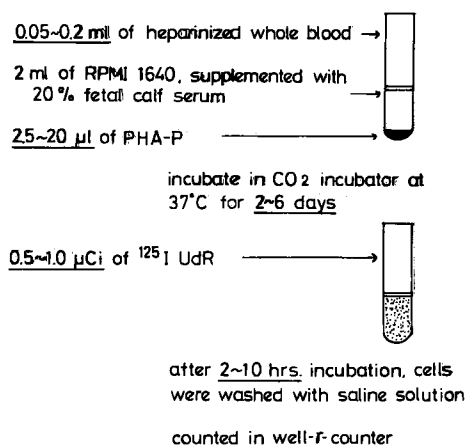
### 第2節 実験方法

以下に述べる方法で幼若化反応, ツ反, LMIT, 末梢リンパ球数の測定を行ったが, いずれも治療開始前に実施した. さらに幼若化反応については OK-432 単独投与前後の推移と, 癌化学療法 (主として前編で述べた 5-fluorouracil, vincristine, bleomycin, cyclophosphamide および mitomycin C 併用 FOBEM 療法) あるいは放射線療法に伴う変動, また OK-432 併用群, 非併用群における変動を検討した. ツ反については化学療法に伴う推移を OK-432 併用群, 非併用群にわけて比較検討した. LMIT は主として化学療法症例における変動を観察し, 若干の症例について OK-432 投与前後の推移を検討した.

#### 第1項 リンパ球幼若化反応.

Pellegrino ら<sup>9</sup> の開発した微量全血法に準じ以下の方法で行った. 図-1 に図示したごとくヘパリン加末梢血 0.05 ml に 20% 牛胎児血清加 RPMI 1640 2 ml を加え, PHA-P (Difco) 5  $\mu$ l を添加し, PHA-P を

図1 微量全血法によるリンパ球幼若化反応



$$\text{Stimulation Index} = \frac{\text{cpm. of stimulated cultures}}{\text{cpm. of control cultures}} \quad (\text{S.I.})$$

加えないものを対照とした. PHA-P 添加, 非添加培養液とも一検体についてそれぞれ triplicate としたが, これらを CO<sub>2</sub> in cubator 内で 37°C, 4 日間静置培養後, <sup>125</sup>I-deoxyuridine 0.5  $\mu$ Ci を加え, さらに 6 時間静置培養し, <sup>125</sup>I-deoxyuridine を取りこませた. 培養終了後冷生理食塩水にて 3000 r. p. m. にて 3 回遠沈洗滌し, リンパ球に取りこまれた <sup>125</sup>I-deoxyuridine の放射活性を well 型  $\gamma$  counter で測定し, 下記のごとく PHA-P 添加培養の平均放射活性に対する非添加培養平均放射活性の比を stimulation index (S. I.) で表わした.

$$\text{S. I.} = \frac{\text{PHA-P 添加培養の平均 C. P. m.}}{\text{PHA-P 非添加培養の平均 C. P. m.}}$$

#### 第2項 ツベルクリン反応.

原則として一般診断用精製ツベルクリン液 0.1 ml を前腕掌側に皮内注射し, 48 時間後に判定した. 判定は紅斑直径 0-4 mm を (-), 5-9 mm を (±), 10 mm 以上を (+), 10 mm 以上の紅斑に硬結を伴うもの (++) , 二重発赤あるいは水泡を伴うものを (+++) とし, (+) 以上を陽性とした. なお経時的観察を行う場合, 一般診断用を用いて初回陰性の症例においては確診用のものを用い, それに対する皮膚反応の推移を検討した.

#### 第3項 Leucocyte migration inhibition test (LMIT)

Clausen<sup>6</sup> の開発した agarose plate 法に基づく

Ax<sup>2</sup>の方法について検討を加え、以下の方法で測定した。

まず agarose plate の作成方法について述べる。蒸留水に 3% 相当の agarose (Behringwerke AG) を加え、autoclave にて滅菌後 42°C の water bath に保ち、同じく 42°C に加温した同容量の 2 倍濃度 Eagle medium と 1/2 容量の馬血清を加えて agarose solution とした。従って agarose の最終濃度は 1.2%，馬血清のそれは 20% となる。この 6 ml を水平に保った径 60 mm の petri dish (Falcon Co) に流しこみ、冷却後径 3 mm の well を 6 個作り agarose plate とした。次に白血球浮遊液の作成方法であるが、ヘパリン加末梢血 20 ml に Hanks' BSS 加 6% Dextran 溶液を 9:1 の割合に加え、よく混和した上 37°C の incubator にて 15~45 分間静置後白血球を含む上層をとり Hanks' BSS にて 2000 r. p. m. 10 分間遠沈し、3 回洗浄した。さらに得られた白血球を PVP 1.8%，ヘパリン 10 u/ml 加 Eagle medium に再浮遊し、最終的に  $0.2 \times 10^6$  個/ $\mu$ l の細胞密度を有する細胞浮遊液を作製した。抗原の作製は腫瘍塊を準無菌的に採取し、細切後リン酸緩衝液を加えホモジネートした。これを超音波処理 300 mA 5 分間行った後 3000 r. p. m. 30 分間遠沈し、上清を抗原含有液として使用した。実施にあたっては前述の白血球浮遊液をそれぞれ 100  $\mu$ l づつ 2 本の小試験にとり、その 1 つに抗原液を蛋白量にして 1 mg/ml 濃度となるように加え、他の 1 本を抗原非添加 Control とし、37°C incubator にて 60 分間反応させた後、その 10  $\mu$ l を agarose plate の well に注入した。その後 37°C CO<sub>2</sub> incubator にて 18 時間静置した。これをメタノールで 20 分間、さらに 40% ホルマリンで 24 時間固定し、petri dish より agarose を除去した後 petri dish 底面に遊走固定された白血球を May-Grünwald-Giemsa にて染色した。拡大鏡で遊走面積を測定し次式により migration index (M. I.) を求めた。

$$M. I. = \frac{\text{抗原添加培養の平均遊走面積}}{\text{抗原非添加培養の平均遊走面積}}$$

判定基準は M. I. 0.80 以下を陽性とし、0.81 以上を陰性とした。図-2 にその概略を示す。

#### 第 4 項 末梢リンパ球数。

末梢白血球数に May-Giemsa 染色によるリンパ球の比率をかけたものを末梢リンパ球数とした。

### 第 3 章 成 績

#### 第 1 節 リンパ球幼若化反応。

図 2 寒天平板法による LMIT

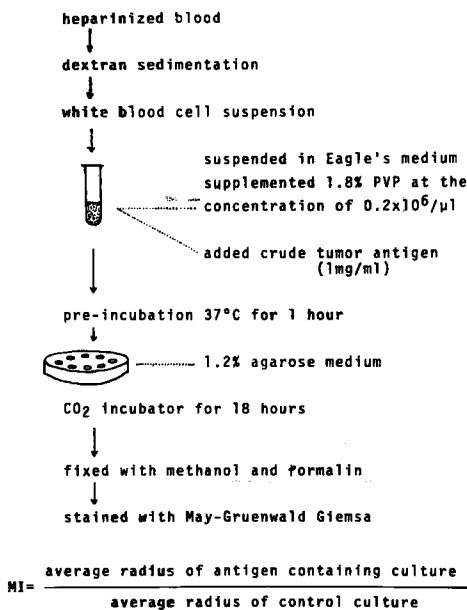
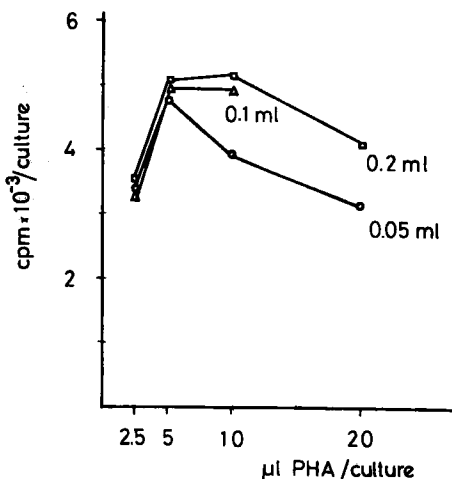


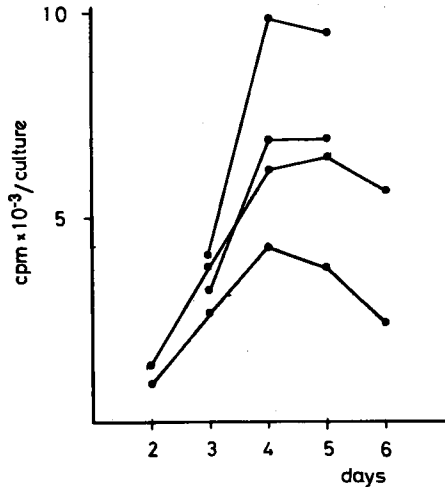
図 3 幼若化反応における至適血液量と至適 PHA-P 量の検討



第 1 項 測定条件、測定精度ならびに正常値に関する検討。

まず種々の測定条件を設定し至適条件について検討した。血液量を 0.05, 0.1, 0.2 ml とし、incubation 時間を 4 日間、<sup>125</sup>I-deoxyuridine 0.5  $\mu$ Ci、その接

図4 幼若化反応における至適培養時間の検討



触時間を6時間とした時, PHA-P量 2, 5, 5, 10, 20 $\mu$ lにおけるそれぞれのc.p.m.を図-3に示したが, PHA-P 5 $\mu$ lで高値を示しPHA-P量が多くなるに従ってc.p.m.が低下した. incubation 時間は健康人4例について血液量0.05ml, PHA-P 5 $\mu$ l,  $^{125}$ I-deoxyuridine 0.5 $\mu$ Ci, その接触時間を6時間とした時, 図-4のごとく4日間において高値を示した.  $^{125}$ I-deoxyuridine 量とその接触時間は0.5, 1.0 $\mu$ Ciについて血液量0.05ml, incubation 4日間とし, それぞれ4, 6, 10時間で検討したがともに6時間でc.p.m.の高値を示し10時間との差は少なかった. 従って血液量0.05ml, PHA-P量 5 $\mu$ l, incubation 時間4日間,  $^{125}$ I-deoxyuridine 添加量0.5 $\mu$ Ci, 接触時間6時間という条件で比較的安定した成績を得たので以後この方法で測定した.

次にこの方法による測定精度を検討した. すなわち3人の健康男子について7回から9回くり返し採血し, その変異係数を検討した結果表-1のごとくその値は8.5~19.1%であった. 続いて triplicate で測定された235検体のS.I.についてそれぞれの変異係数の分布をみると, 表-2のごとく14.9%以下のものが73.7%を占め比較的再現性のよいものと思われた. ついで加齢による検討のため年齢を40歳以下, 40~60歳, 61歳以上の3群にわけて比較した. 表-3のごとく加齢とともに減少傾向を認めたが, これら全症例の平均値を算出し27.7 $\pm$ 5.9を健康人のS.I.

表1 幼若化反応の再現性  
—経時的測定における変異係数—

doner	determination	coefficients of variation
A	9 times	14.4%
B	8	19.1
C	7	8.5

表2 幼若化反応の再現性  
—triplicate samples における変異係数—

coefficients of variation	No. of experiments	%
0 ~ 4.9	73	30.6
5.0~ 9.9	70	29.8
10.0~14.9	34	13.3
15.0~19.9	28	11.9
20.0~24.9	19	8.1
25.0~	11	4.7

表3 幼若化反応における加齢の影響

age	No. of cases	range	mean	SD
~40	25	16.7~53.5	34.0	10.6*
41~60	15	15.9~43.6	27.8	8.0
61~	6	14.5~34.0	21.7	6.6*

\*p < 0.05

とした.

第2項 肺癌症例の治療前のリンパ球幼若化反応に関する成績.

まず各種悪性腫瘍について検討したが図-5のごとく

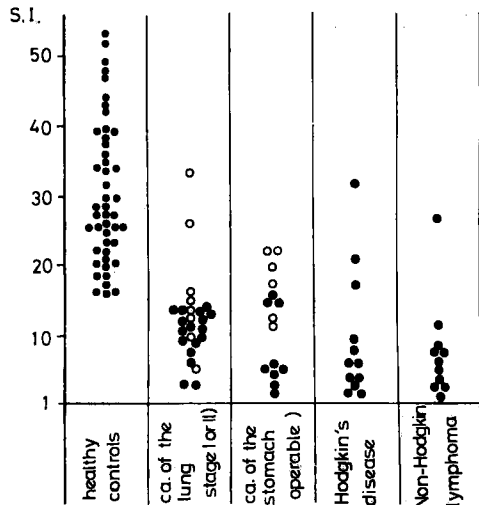


図6 肺癌臨床病期別の幼若化反応

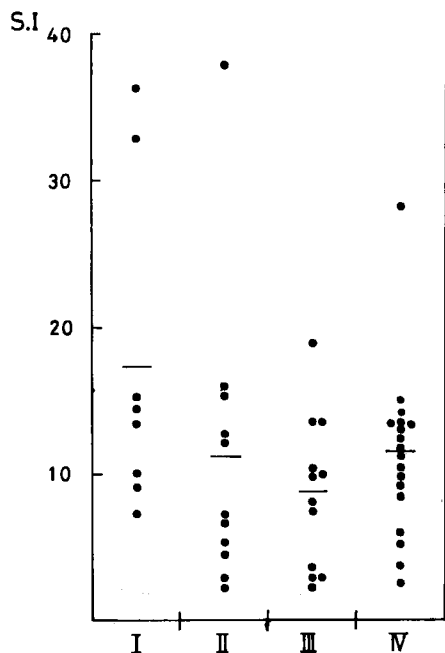
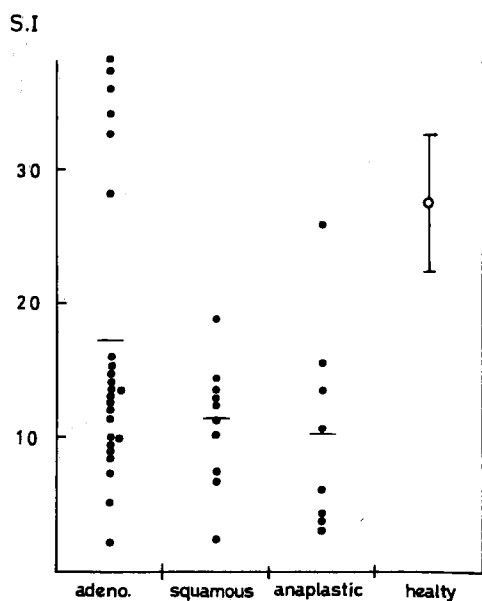


図7 肺癌組織型別の幼若化反応



とく肺癌, 胃癌, 悪性リンパ腫ともに健康人と比較して低値を示した。肺癌, 胃癌では進行癌でより低値であるが, 悪性リンパ腫ではさらにその低下は著明であった。次に肺癌患者52例について臨床病期別に分類して図-6に示した。すなわち臨床病期別に

はI期8例, II期11例, III期12例, IV期21例で, それぞれS.I.の平均値は17.4, 11.1, 8.6, 14.5であり, 各病期ともに健康人S.I.の平均値27.7±5.9に比べ低値を示し, 病期の進行とともに低下傾向を示したが, IV期では若干高値を示す傾向にあった。次に組織型が判明している肺癌患者42例を腺癌24例, 扁平上皮癌10例, 未分化癌8例に分類し, そのS.I.を比較した(図-7)。S.I.の平均値はそれぞれ17, 2, 11.0, 10.2であり, 健康人に比し低値を示した。腺癌のうち6例は健康人の平均値より高値を示したことは注目されるが, 各組織型間に推計学的有意差はなかった。

第3項 化学療法症例におけるS.I.の変動について。

化学療法単独6例, OK-432併用15例について化学療法効果別に縮小群(腫瘍径25%以上の縮小), 不変群(腫瘍径+25%~25%の縮小), 増悪群(腫瘍径25%以上の増大)にわけて, それぞれのS.I.の推移を検討した。図-8のごとく縮小群では治療中一様にS.I.が低下したが, 治療後上昇傾向が示された。しかし治療前のS.I.まで回復する症例はなかった。OK-432併用群, 非併用群におけるS.I.の推移について治療中, 治療後ともに有意差は認められなかった。不変群, 増悪群では治療中S.I.が一様に低下し, 治療後も上昇する例は少なく, OK-432併用群, 非併用群におけるS.I.の推移に有意差は認められなかった。

第4項 OK-432単独投与におけるリンパ球幼稚化率の変動について。

肺癌患者14例についてOK-432を0.2KE(KE:臨床単位)から順次増量し, 原則として1回2.0KE連日投与により平均2週間投与した。総投与量は20~30KEであったが, OK-432投与後のS.I.の変動をみると図-9のごとく14例中8例に上昇傾向が示されたが, その程度とOK-432の投与量との間には相関は認められなかった。これらのうち6例は明瞭な変化として捉えられ, しかも4例は20以上とS.I.の正常化が得られた。

第2節 ツベルクリン反応。

第1項 治療前のツベルクリン反応について。

肺癌臨床病期別では表-4のごとくI, II期で28例中19例(68%)が陽性を示し, III, IV期では37例中23例(62%)が陽性を示し, 病期間に特に差はなかった。全病期では65例中42例(65%)が陽性であった。組織学的分類では表-5のごとく有意差は認

図8 肺癌症例の治療効果別のリンパ球幼若化率の推移

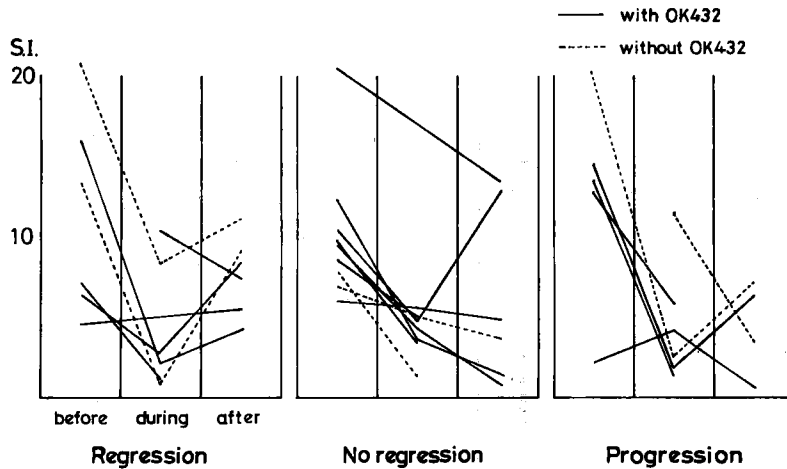
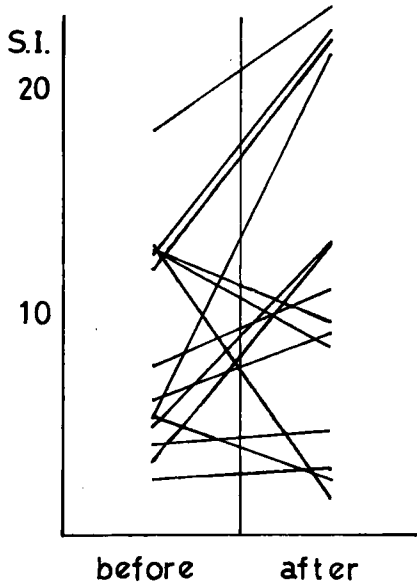


図9 肺癌症例におけるOK-432投与前後のリンパ球幼若化率の変動



本反応に及ぼす影響を検討した。ツ反は2~3週に1回実施したが、治療前後の比較は原則として1コースの化学療法が終了して1~2週以内(化学療法開始後ほぼ2ヶ月)に行った成績を比較した。なお反応度の推移を比較する場合、(-)または(±)が(+)以上、(+)が(++)以上に増強した場合、あるいは発赤または硬結が5mm以上増強した場合を有意の増強とみなし、その逆の場合を減弱、中間に位するものを不変とした。化学療法症例におけるOK-432併用症例と非併用症例の治療後のツ反の推移を一括して表-6に示す。肺癌においてOK-432併用症例で42例中10例にツ反の増強がみられたが、OK-432非併用症例18例の中には増強例はなく両群の間に有意差が示された。

第3節 末梢リンパ球数

図-10のごとく臨床病期別にわけるとI期のcmmあたりの絶対数は平均1940, II期1730, III期1590, IV期1770であり、組織型別にわけると腺癌1900, 扁平上皮癌1570, 未分化癌1650で臨床病期、各組織型の間に有意差を認め得なかった。

第4節 肺癌患者におけるリンパ球幼若化反応、ツベルクリン反応、末梢リンパ球数の相互関係ならびにこれらの総括評価について

次に幼若化反応とツ反、幼若化反応と末梢リンパ球数それぞれについてその相関性を検討した結果、これらの間に特に密な相関を認めなかったが、これら三者の成績を総合して評価する方法を試み臨床病期、生存期間との関係を検討した。すなわち表-7

められなかった。

第2項 化学療法による変動、主としてOK-432併用、非併用の比較

次に化学療法症例についてOK-432併用群、非併用群の2群についてその推移を比較し、OK-432の

表4 肺癌症例におけるツベルクリン反応  
—臨床病期別の検討—

clinical stage	No. of cases	- ~ ±		+ ~ #	
		No. of cases	%	No. of cases	%
I II	28	9	32	19	68
III IV	37	14	38	23	62

表5 肺癌組織型別のツベルクリン反応

	no. of cases	no. of positive cases	% positive
Adenocarcinoma	16	10	63%
Squamous cell ca	11	7	67
Anaplastic ca.	8	5	63
Malignant lymphoma	30	8	27

表6 肺癌化学療法症例の OK-432併用群, 非併用群におけるツベルクリン反応の変動.

response to C. T.	with OK-432				without OK-432			
	no. of cases	PPD skin test			no. of cases	PPD skin test		
		↑	→	↓		↑	→	↓
very effective	3	1	2	0	1	0	1	0
effective	14	3	7	4	6	0	5	1
ineffective	25	6	13	6	11	0	7	4
total	42	10	22	10	18	0	13	5

表7 肺癌症例におけるリンパ球幼若化反応, ツベルクリン反応, 末梢リンパ球数の総合評価と臨床病期の相関.

stage	I	II	III	IV
excellent	1			
good	5	2	2	4
fair		5	8	7
poor			1	1

excellent : All of PPD, PHA test and peripheral lymphocytes count are within normal

good : Two of them are within normal

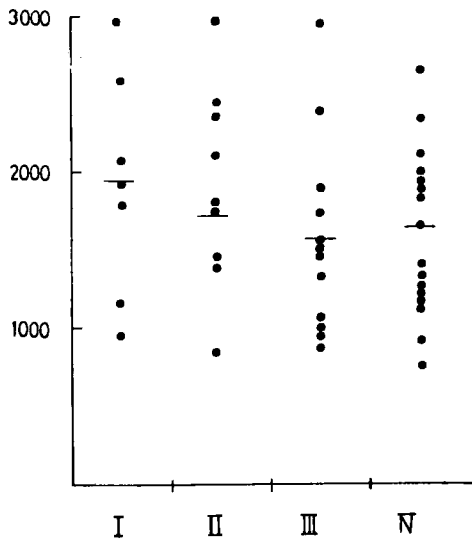
fair : One of them is within normal

poor : None of them is within normal

表8 肺癌症例におけるリンパ球幼若化反応, ツベルクリン反応, 末梢リンパ球数の総合評価と早期死亡例の生存期間.

survival	1 Month	2 M	3 M	4 M	5 M ~
Excellent					
good			1	1	1
Fair	2	2	2	1	1
Poor	2			1	1

図10 肺癌臨床病期別の末梢リンパ球数



のごとく評価の基準をさだめ, 各症例を excellent, good, fair, poor に区分して臨床病期と対比比すると, I, II期では excellent, good が多く III, IV期

表9 LMITにおける至適抗原量の検討.

		concentration of antigen		
		0.1	0.5	1.0 mg/ml
lung cancer	A	-	-	+
	B	-	-	+
	C	-	+	+
	D	-	-	-
	E	-	-	-
	F	-	-	-
	G	-	+	+
	H	-	-	-
	I	-	-	+
	J	-	-	-
healthy	K	-	-	-
	L	-	-	-
	M	-	-	-
	N	-	-	-

表10 LMITの再現性  
—経時的測定における変異係数—

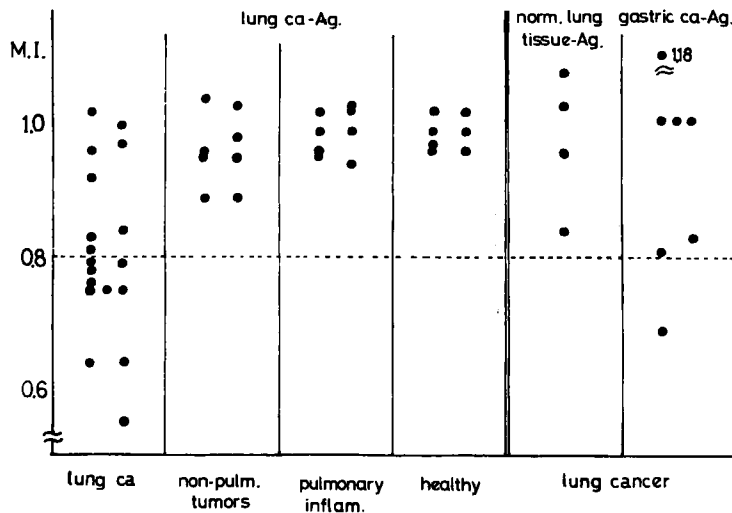
doner	determination	coefficients of variation
A	5 times	1.57
B	7	3.92
C	5	3.59

になるに従い poor が多くなる傾向がうかがわれ総合的評価の有用性が示された. 次にⅢ, Ⅳ期肺癌早期死亡例15例を生存期間別に前述の評価方法で検討すると表-8のごとく全般に excellent, good は少なく12例(80%)が fair ないし poor であり生存期間との相関がみられた.

第5節 Leucocyte migration inhibition test

第1項 至適抗原濃度および再現性に関する検討  
まず肺癌他家抗原の最終濃度を0.1mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/mlにわけその至適濃度を検討した. 同時に測定できた肺癌患者10例と健康人4例におけるM.I. は表-9に示すごとく肺癌においては抗原濃度0.1mg/mlでは全て陰性, 0.5mg/mlでは10例中2例, 1 mg/mlでは5例陽性であり, しかも0.5mg/ml陽性症例は1.0mg/ml濃度でいずれも陽性の成績を示した. 一方健康人においてはいずれの抗原濃度においても陰性であったので, 以後1 mg/ml濃度で検討を行なった. 次に本法の再現性を検討するため健康人3例についてPPDを抗原として5-7回くり返し測定した結果, 表-10のごとくその変異係数は各々1.57, 3.92, 3.59と比較的高い再現性が得られた.

図11 肺癌, 他癌, 肺感染症および健康人におけるLMIT





第 2 項 肺癌患者、非肺癌々症例、良性呼吸器疾患における検討。

肺癌患者19例について本法を施行すると図-11のごとく10例(53%)が陽性を示した。症例が臨床病期 I, II 期に偏り、病期別には比較できなかった。対照として肺癌以外の癌症例 8 例(胃癌 3 例, 肝癌, 大腸癌, 前立腺癌, 偽粘液腫, 原発不明癌各 1 例), 肺感染症群 8 例(肺結核 3 例, 気管支喘息, 肺炎各 2 例, 肺膿瘍 1 例), 健康人 7 例について検討したが全て陰性であった。さらに肺癌患者 4 例に正常肺組織を抗原として検討したが全て陰性であった。同様に胃癌抗原を用いた場合, 肺癌患者 7 例中 1 例のみが陽性であった。遊走促進と思われる症例はみられなかった。

第 3 項 化学療法による migration index の変動について。

次に癌化学療法(一部放射線治療)施行における M. I. の変動について検討した。図-12のごとく治療前陽性を示した 8 例は治療中全て陰性となり, 治療後の検討ができた 4 例のうち胸部腫瘍陰影が縮小した 2 例中放射線治療の 1 例は陽性を示し, 他の 1 例は陰性であった。無効 2 例は化学療法後もひき続き陰性を示した。また化学療法前に陰性であった 1 例は化学療法により著明な胸部腫瘍陰影の縮小を得, 陽性となった。治療後完全寛解を得た 5 例は全て陰性であったが再発を示した 1 例は陽性化した。

第 4 項 OK-432 単独投与における migration index の変動について。

肺癌患者 6 例について OK-432 を 0.2KE から順次増量し, 原則として 1 回 2.0KE 連日投与により平均 4 週間投与し, 総与量 30~40 KE で検討した。図-13のごとく投与前陰性であった 3 例中 2 例は投与後陽性化を示した。

第 6 節 肺癌化学療法症例における OK-432 投与群, 非投与群の生存期間に関する検討。

肺癌症例について化学療法のみが行われた 26 例と, 化学療法と OK-432 同時併用, 続いて OK-432 による維持療法が行われた 21 例の生存期間を比較したところ, 図-14のごとく前群の 50% 生存期間 4 ヶ月, 後群のそれは 6 ヶ月であったが, 後群において長期生存症例が認められたため平均生存期間において前群 4.8 ヶ月, 後群 8.2 ヶ月と OK-432 併用投与群に有意 ( $P < 0.05$ ) の延長が認められた。

第 5 章 総括ならびに考案

図12 肺癌症例の治療によるLMITの推移

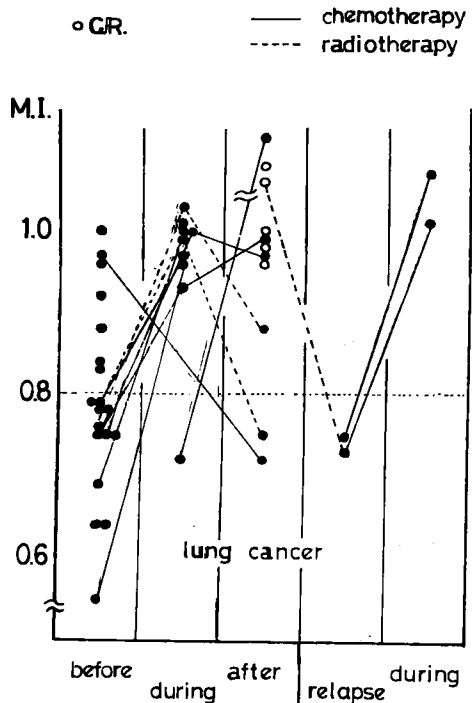


図13 肺癌症例におけるOK-432投与前後のLMITの変動

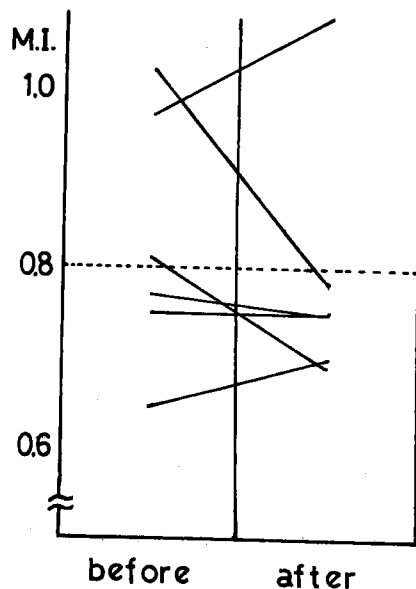
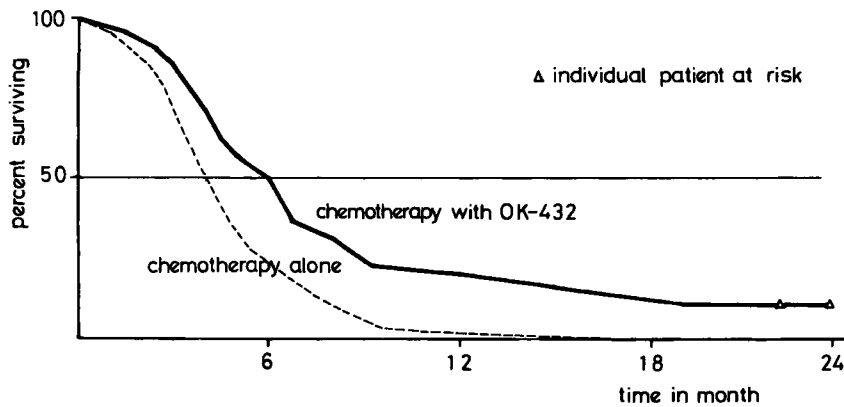


図14 肺癌化学療法症例におけるOK-432併用群, 非併用群の生存期間



肺癌患者に出現する細胞免疫異常の検討を幼若化反応, ツ反, 末梢リンパ球数, LMITをパラメータとして検討した. PHAによるリンパ球幼若化現象は Nowell<sup>8)</sup>の偶然の発見に始まるが, 細胞免疫との関連は Pearmain ら<sup>9)</sup>によりツ反陽性者のリンパ球を培養する際に, 特異抗原である PPD 添加で幼若化が起こることを発見したことから発展した. PHA に反応するリンパ球は T 細胞であり, その PHA に対する幼若化率が T 細胞の機能を表現するといわれている. 幼若化反応には芽球様細胞の鏡検下での算定法や, リンパ球を分離し核酸前駆物質である <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを計測する方法があるが, 前者はやや客観性に欠け後者は煩雑である点を考慮し Pellegrino らによる微量全血法に従った. 本法は比較的簡便であり再現性が高いこと, 全血であるためリンパ球の絶対数と機能を総合した結果をみている点などの特徴がある. 正常状態における *in vitro* test と加齢との関連については, Pisciotta ら<sup>10)</sup>は健康人 293 例の検討から, 0 歳から思春期までの間は漸次上昇するが, 思春期を頂点として以後はその平均値は加齢とともに有意に低下すると述べている. これに対し早川<sup>11)</sup>は小児期と壮年期との比較から年齢による有意差は認められないと報告している. 著者は年齢を三群に分けて検討した結果, 加齢とともに低下傾向を示し, 40 歳以下と 61 歳以上を比較した場合高齢者に明らかな低下が認められた.

癌患者は一般にリンパ球幼若化率が低いとする報告<sup>12) 13)</sup>が多く, 著者も同様の結果を得た. リンパ球

幼若化率の低下と癌の進展度は並行するとする報告が多く,<sup>14) 15)</sup>著者による肺癌患者についての臨床病期別の検討においてもほぼ同様の成績が得られている. 臨床病期 I 期において既に多くの症例が低値を示しており, 胸部異常陰影を示す他の良性疾患との鑑別診断的意義を示唆するが, さらに検討される必要がある. しかし IV 期において比較的高値をとる例があり, これらは原発腫瘍が小さくかつ遠隔転移病巣も限局し, 全身状態も良好であったことから, PHA に対するリンパ球の幼若化は臨床病期よりもむしろ宿主の担う総腫瘍量と並行するのではないかと考えられる. 一方組織型別分類での検討では各組織型に特に有意差はみられず, Barnes ら<sup>16)</sup>の肺癌患者についての報告と一致する成績であった.

癌患者における非特異的免疫能の低下の背景には T 細胞の減少ならびにその機能低下が存在することはほぼ一致した見解であるが, 血清内には免疫抑制的に働く種々の因子があり, 幼若化反応の評価に影響を与えている可能性がある. 現在  $\alpha$ -globulin との関連性, 腫瘍抗原あるいはそれと抗体との immune complex の存在, toxohormone 様因子の存在などが報告されており考慮すべきことと思われる.<sup>17) 18)</sup>

次に化学療法によるリンパ球幼若化率の推移について検討したが, 化学療法中は一様に低下し, 抗癌剤のリンパ球抑制作用が考えられた. 古くから抗癌剤の使用により網内系機能の著明な低下を来し, 腫瘍が逆に増大するとする adverse effect<sup>19)</sup>が指摘され, 副腎皮質ホルモン, azathioprine, L-aspa-

raginase<sup>20</sup>, neocarzinostatin<sup>21</sup>, cyclophosphamide, などそのリンパ球抑制作用が見出されたが、これら以外の抗癌剤についても類似の作用機序が考えられる。リンパ球幼若化率は化学療法後も腫瘍縮小群で軽度の改善が得られたが、化学療法前の値または正常値にまで回復する例はなかった。悪性リンパ腫の完全寛解例の多くでは化学療法後ほとんど正常値にまで改善されており<sup>22</sup>、肺癌において改善の悪いのは悪性リンパ腫に比べ化学療法剤の総投与量が多く、加えて悪性リンパ腫に匹敵する化学療法効果を得られないことに起因するものと思われる。

ツ反は細胞免疫能のパラメーターの代表として常用され、癌患者にその反応能力の障害はないとするものもあるが、多くは低下するとし、進展度との相関が認められている。Brugarolas ら<sup>23</sup>は肺癌108例を limited, widespreadに分類し、後者の陽性率の低下を示しているが、著者は肺癌を臨床病期 I, II 期と III, IV 期に分類して検討した結果、陽性率68%, 62%と推計学的有意差はなく、これには年齢分布の不均一性が関与している様に思われた。全病期では陽性率65%であり、他に報告されている悪性腫瘍症例の陽性率に比べ幾分高値であった<sup>24, 25</sup>。細胞免疫能低下の典型的な疾患である悪性リンパ腫では陽性率が低く、教室の悪性リンパ腫30例では陽性率27%を示し、肺癌患者とは明らかな相違を示した。

末梢リンパ球数について白神ら<sup>26</sup>は進行癌ことに転移癌や末期癌では症例の過半数にリンパ球減少をみているが、著者の肺癌における検討では病期との相関はなかった。また末梢リンパ球数と幼若化反応、あるいはツ反との間にも相関を認めず、これはリンパ球の絶対数よりもむしろその機能が重要であることを示すものであろう。同様に幼若化反応とツ反の間にも相関はなく、後者の反応にはリンパ球のみならず多核白血球、マクロファージ、形質細胞など種々の遊走細胞や多くの化学物質が関与していることが考えられ当然のことかも知れない。そこで幼若化反応、ツ反、末梢リンパ球数の三者を用いて病期との相関をみた結果進展度と関連性がうかがわれ、種々の複雑な因子の関与する担癌生体の細胞免疫能の把握にはさらにT, B細胞 subpopulation, DNCB 皮内反応, PHA皮内反応などのパラメーターを加えたより総合的な検討が必要であろうと考えられた。

LMITは歴史的にはマクロファージ遊走阻止試験から発展したものである。まず Rich and Lewis<sup>27</sup>がツ反陽性動物のリンパ組織片と PPD を同時に培養

すると組織片からの細胞の遊走が阻止されることを発見し、続いて George and Vaughan<sup>28</sup>が BCG 感染モルモットの腹腔細胞をガラス毛細管に詰めて小型シャーレ内で PPD と培養すると毛細管からの腹腔細胞の遊走が著明に抑制されることを証明することにより、遅延型アレルギー反応の *in vitro* における定量化が可能になった。次いで David<sup>29</sup>, Bloom and Bennett<sup>30</sup>がこの現象は感作リンパ球が特異抗原と反応の結果 migration inhibitory factor (MIF) を産生し、マクロファージの遊走を抑制するためであることを発見した。LMIT は Sjøborg and Bendixen<sup>31</sup>が indicator cell として多核白血球を用いた末梢リンパ球と一緒にガラス毛細管につめて特異抗原と培養すると毛細管からの遊走が抑制されることを証明し、本法も遅延型アレルギーを反映すると報告して以来、細胞免疫の検索に応用されてきた。Clausen<sup>32</sup>は Carpenter ら<sup>33</sup>の agar gel 法を応用し、ツ反陽性の人白血球を PPD とともに agarose plate 中に入れて培養すると遊走が抑制されることを証明し、この方法も遅延型アレルギーを反映するとした。さらに Ax らはこれに改良を加え、癌患者白血球と Soluble antigen を用いて消化器癌、乳癌、肺癌など担癌生体の細胞免疫能の証明を試みた。本法は従来の毛細管法に比較して採血量と抗原量が少なくすみ、リンパ球と indicator cell である多核白血球が同一個体から得られる点、手技が簡便で遊走野の境界が鮮明である点、再現性が高い点などの特徴がある。

著者は肺癌患者に応用し、多くの報告者のごとく M. I. 0.80 以下を陽性とする53%の陽性率を得た。しかし他家由来の抗原を用いているため、この陽性の評価は腫瘍共通抗原の存在を示したものであると思われる。また抗原が粗であるため対照として白血球側では他癌群、肺感染症群、健康人で検討し、抗原側では正常肺組織抗原、胃癌抗原を用いて検討した。その多くは陰性であったが、胃癌抗原を用いた肺癌1例に陽性を認め、臓器間の共通抗原の存在も示唆する結果を得た。症例が臨床病期 I, II 期に偏ったため臨床病期別の検討ができなかったが、悪性黒色腫における McCoy ら<sup>34</sup>の報告のごとく早期癌陽性率が高いことが考えられ、たとえ共通抗原であっても临床上早期発見に役立つものと思われる。

この LMIT に関し今回の検討では抗原が粗であるにもかかわらず対照は全て陰性であったが、formalin 処理法、3 mol KCl を用いる方法<sup>35</sup>、過塩素酸抽

出物による方法などさらに純化した抗原の精製による検討が必要になるであろう。また本成績には血清因子の混入, toxohormone の影響や, 抗原濃度とリンパ球の感作の程度により抑制, 促進<sup>36)</sup> の二重の結果が得られることが考えられ, LMIT が遅延型アレルギーを反映するとするには慎重を要すことであろう。

次に治療との関係では治療前陽性であった症例は治療後全て陰性となり, この間癌の進展が著明にみられていないことから抗癌剤, 放射線治療の影響が考えられた。Wahl ら<sup>37)</sup> は glucocorticosteroid が MIF の産生阻害に作用すると述べているが, LMIT においても MIF と分子量の異った leucocyte inhibitory factor (LIF)<sup>38)</sup> に対して類似の作用機序でリンパ球阻害に働いたものと考えられる。治療後腫瘍陰影の縮小とともに陽性化した例, 治療中にもかかわらず陽性例, 完全寛解後再発とともに陽性化した例などを考え合わせると, LMIT 陽性は至適抗原の必要性とともに腫瘍-宿主-薬剤間相互の影響が関係しているものと思われた。

幼若化反応と LMIT との関係を検討したところでは両者に相関性がみられず, 非特異的抗原と特異抗原の認知する部分が異なっているとの報告<sup>39)</sup> や免疫不全症の一型で両者に解離があるとの報告などをみると, 両者間に相関性が示されなかったことは当然のことと思われ, むしろそのために担癌生体の細胞免疫能の把握にいくつかのパラメーターによる総合的な評価が必要であろうと考えられた。

溶連菌剤 OK-432 の抗腫瘍効果については木村ら<sup>40)</sup> による基礎的検討により, 本剤が直接効果の他に宿主を介する作用を有することが報告されている。それ故本剤を臨床における免疫化学療法のスケジュールの中で用いた場合の有用性について幼若化反応, ツ反, LMIT のパラメーターを用いて検討した。化学療法に OK-432 を併用した群と非併用群を幼若化反応で比較したところ, 化学療法前後におけるリンパ球幼若化率の推移は臨床経過にかかわらず有意差は認められなかった。しかし OK-432 単独投与前後におけるリンパ球幼若化率の変動で明らかな上昇が得られたこと, ツ反で有意の差をもって本剤併用群に反応の増強が認められたことは, 複雑な担癌宿主免疫機構の中で一部のパラメーターの改善を示したにすぎないにしても, 動物実験レベルだけでなく人癌においても本剤が非特異的免疫能の賦活に関与していることをうかがうことができた。さらに本剤単独投与例における LMIT で投与前陰性例が投与後陽

性化したことは, 本剤の癌抗原認識における adjuvant 効果を示す作用のあることが示唆された。従って幼若化反応に関する限り本剤は抗癌剤の細胞免疫能低下に対する防止作用は少ないが, 腫瘍が縮小し細胞数の減少した時点では肺癌患者の病態の改善の一助となり得る可能性が考えられ, 本剤の免疫化学療法としての意義があるものと思われた。実際末期肺癌 III, IV 期の症例で本剤併用化学療法群と化学療法のみを比較して生存期間の検討を行ったところ, 前者に有意の延命効果が示され, 50% 生存期間の延長および長期延命症例による平均生存期間の延長が示された。すなわち免疫療法剤としての OK-432 の併用維持療法が延命に対して有利であることが明らかとなった。個々の症例についてみると, 寛解導入療法後本剤を主体として維持療法を行った末期肺癌患者で 2 年以上経過した症例が 4 例あり, これらは完全寛解に近い状態で, 中には OK-432 投与のみで過ぎている症例もあり, 正常人と全く変らぬ勤務をしているものもあることは特筆すべきことであろう。またかかる症例においてはリンパ球幼若化反応はほとんど正常状態に近い傾向を示し, ツ反も増強していることも本剤の効果を表わすものとして興味深い。

## 第 6 章 結 論

肺癌患者においてその細胞性免疫能の検討のため幼若化反応, ツ反, 末梢リンパ球数, LMIT をパラメーターとして用いいくつかの新知見を得, さらに溶連菌剤 OK-432 を単独または癌化学療法剤と併用しその有用性を認めた。すなわち,

- 1) 幼若化反応では肺癌症例は健康人に比べ低値を示し, 臨床病期分類でも病期が進展するに伴い低下傾向にあった。化学療法後も多くは低値であった。OK-432 併用群, 非併用群における比較でも有意差は認められなかった。
- 2) ツ反では陽性率が比較的高値であったが, 病期とは相関がなく, 末梢リンパ球数においても同様であった。
- 3) これら三者すなわち幼若化反応, ツ反, 末梢リンパ球数を総合的に検討すると病期との相関が認められた。
- 4) LMIT では陽性が約半数にみられ, 腫瘍共通抗原の存在が考えられた。さらに化学療法による検討を加えた結果, LMIT の評価には腫瘍-宿主-薬剤相互の影響を考慮することが重要であると思われた。

6) 溶連菌剤 OK-432 を癌化学療法に併用した群と非併用群とを比較すると、前者にツ反の有意の増強が得られ、また OK-432 単独投与例においてリンパ球幼若化率の上昇、LMIT の陽性化がみられ、肺癌に対し本剤の免疫賦活剤としての有用性が示された。

7) 末期肺癌患者症例における OK-432 併用化学療法群は非併用群に比べ 50% 生存期間、平均生存期間の延長が示された。

稿を終るにあたり御指導御校閲を賜った恩師平木潔教授に深甚の謝意を表わすとともに、御懇篤なる御指導を賜った木村郁郎講師に深謝し、終始御助言御鞭達をいただいた大榎泰亮講師に感謝の意を表します。

なお本論文の要旨は第 16 回日本肺癌学会総会(昭和 50 年大阪)ならびに第 23 回日本化学療法学会西日本支部総会(昭和 50 年長崎)において発表した。

## 文 献

- 1) Stern, K.: Investigations on the reticuloendothelial function of cancer patients. *J. Lab. Clin. Med.*, **26**: 809-817, 1941.
- 2) 山形敬一, 三浦清美, 宇塚善郎, 宮森昭郎, 金子昭雄, 杉内巖, 小野田重敏, 萱場利雄, 菊田豊: 内科疾患における網内系機能. *最新医学*, **17**: 1119-1132, 1962.
- 3) Foley, E. J.: Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.*, **13**: 835-837, 1953.
- 4) Eilber, F. R. and Morton, D. L.: Impaired immunologic reactivity and recurrence following cancer surgery. *Cancer*, **25**: 362-367, 1970.
- 5) Pellegrino, M. A., Ferrone, S., Pellegrino, A. and Reisfeld, R. A.: A rapid microtechnique for in vitro stimulation of human lymphocytes by phytohemagglutinin. *clin. Immunol. Immunopathol.*, **2**: 67-73, 1973.
- 6) Clausen, J. E.: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium. *Acta. Allergol.*, **26**: 56-80, 1971.
- 7) Ax, W. and Tautz, chr.: Assay of leucocyte migration inhibition under agarose. *Behring. Inst. Mitt.*, **54**: 72-80, 1974.
- 8) Nowell, P. C.: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Res.*, **20**: 462-466, 1960.
- 9) Pearmain, G., Lycette, R. R. and Fitzgerald, P. H.: Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes. *Lancet*, **1**: 637-638, 1963.
- 10) Pisciotta, A. V., Westring, D. W. and Deprey, C.: mitogenic effect of phytohaemagglutinin at different ages. *Nature*, **215**: 193-194, 1967.
- 11) 早川浩: 培養ヒト末梢血リンパ球の変形現象について. 第 1 編, *Phytohaemagglutinin に対する反応性について. アレルギー*, **17**: 188-209, 1968.
- 12) Garrioch, J. B., Good, R. A. and Gatti, R. A.: Lymphocyte response to phytohemagglutinin in patients with non-lymphoid tumors. *Lancet*, **1**: 618, 1970.
- 13) Harris, J., Bagai, R. and Stewart, T.: Immunocompetence and response to antitumor treatment. *New Engl. J. Med.*, **286**: 494, 1972.
- 14) Thomas, J. W., Coy, P., Lewis, H. S. and Yuen, A.: Effect of therapeutic irradiation on lymphocyte transformation in lung cancer. *Cancer*, **27**: 1046-1050, 1971.
- 15) 三輪恕昭, 折田薫三, 田中早苗: 癌進行度とリンパ球幼若化率との相関—消化器癌を中心に—*医学のあゆみ*, **80**: 634-635, 1972.
- 16) Barnes, E. W., Farmer, A., Penhale, W. J., Irvine, W. J., Roscoe, P., and Horne, N. W.:

- Phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation in newly presenting patients with primary carcinoma of the lung. : *Cancer*, **36** : 187-193, 1975.
- 17) Sample, W. F., Gertner, H. R. Jr. and Chretien, P. B. : Inhibition of phytohemagglutinin-induced in vitro lymphocyte transformation by serum from patients with carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.*, **46** : 1291-1297, 1971.
  - 18) Sjögren, H. O., Hellström, I., Bansal, S. C. and Hellström, K. E. : Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor-bearing individuals may be antigen-antibody complexes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68** : 1372-1375, 1971.
  - 19) Kondo, T. and Tsukui, K. : Effect of nitrogen mustard, N-oxide, X-rays, and cortisone on Yoshida sarcoma metastasis development. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **102** : 384-386, 1959.
  - 20) McElwain, T. J. and Hayward, S. K. : L-asparaginase and blastogenesis. *Lancet*, **1** : 527, 1969.
  - 21) 横幕省三, 小林政英, 若山喜久子, 今井邦之, 大野竜三, 山田一正 : NCSのヒトリンパ球 PHA 反応性 blastogenesis に及ぼす影響, *医学のあゆみ*, **93** : 19-20, 1975.
  - 22) 占部康雄, 大熨泰亮, 安原尚蔵, 杉山元治, 藤井昌史, 町田健一, 木村郁郎 : 各種悪性腫瘍化学療法症例における細胞性免疫能の推移—主に PHA-test を指標として—第13回日本癌治療学会総会抄録集, **185**, 1975.
  - 23) Brugarolas, A. and Takita, H. : Immunologic status in lung cancer. *Chest*, **64** : 427-430, 1973.
  - 24) 三輪恕昭, 小川潔, 金田象頭, 国米昭欣, 折田薫三, 田中早苗 : リンパ球幼若化率, ツベルクリン反応, DNCB 反応による癌進行度の判定. *日癌治療会誌*, **8** : 68-69, 1973.
  - 25) Solowey, A. and Rapaport, F. T. : Immunologic responses in cancer patients. *Surg. Gynec. Obstet.*, **121** : 756-760, 1965.
  - 26) 白神嶋, 岩尾憲人, 今川太仁, 橋詰博仁, 小浜貴良, 久次米隆司, 渋谷和彦 : 担癌症の末梢リンパ球. *最新医学*, **24** : 1664-1671, 1969.
  - 27) Rich, A. R. and Lewis, M. R. : The nature of allergy in tuberculosis as revealed by tissue culture studies. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **50** : 115-131, 1932.
  - 28) George, M. and Vaughan, J. H. : In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **3** : 514-521, 1962.
  - 29) David, J. R. : Delayed hypersensitivity *in vitro* : its mediation by cell-free substances formed lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **56** : 72-77, 1966.
  - 30) Bloom, B. R. and Bennett, B. : Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed type hypersensitivity. *Science*, **153** : 80-82, 1966.
  - 31) Sjöberg, M. and Bendixen, G. : Human leucocyte migration as a parameter of hypersensitivity. *Acta Med. Scand.*, **181** : 247-256, 1967.
  - 32) Clausen, J. E. : Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium. *Acta Allergol.*, **26** : 56-80, 1971.
  - 33) Carpenter, R. R., Barsales, P. B. and Gäuchan, R. P. : Antigen-induced inhibition of cell migration in agar gel, plasma clot and liquid media. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **5** : 472-483, 1968.
  - 34) McCoy, J. L., Jerome, L. F., Dean, J. H., Cannon, G. B., Alford, T. C., Doering, T. and Herberman, R. B. : Inhibition of leucocyte migration by tumor-associated antigens in soluble extracts of human breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53** : 11-17, 1974.
  - 35) Meltzer, M. S., Oppenheim, J. J., Littman, B. H., Leonard, E. J. and Rapp, H. J. : Cell mediated tumor immunity measured *in vitro* and *in vivo* with soluble tumor specific antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **49** : 727-734, 1972.

- 36) Sjøborg, M.: *In vitro* migration of peripheral human leucocytes in cellular hypersensitivity. Acta. Med. Scand., **184**: 135-139, 1968.
- 37) Wahl, S. M., Altman, L. C. and Rosenstreich, D. L.: Inhibition of *in vitro* lymphokine synthesis by glucocorticosteroids. J. Immunol., **115**: 476-481, 1975.
- 38) Rocklin, R. E.: Products of activated lymphocytes: Leucocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migration inhibitory factor (MIF). J. Immunol., **112**: 1461-1466, 1974.
- 39) Vincent, P. C. and Gunz, F. W.: Control of lymphocyte level in the blood. Lancet, **2**: 342-344, 1970.
- 40) 木村郁郎, 大塚泰亮, 高野純行, 大沢汎, 安原尚蔵, 渡辺達夫, 杉山元治: 溶連菌製剤 (PC-B-45) と各種制癌剤併用の試み. 癌の臨床, **18**: 886-891, 1972.
- 41) 木村郁郎: 抗がん剤と溶連菌剤の併用. 最新医学, **28**: 941-951, 1973.

**Studies on treatment in lung cancer**  
**Part II. Studies on cellular immunity in lung cancer:**  
**Changes in cellular immune responses of patients**  
**treated with chemotherapeutic and streptococcal agents**  
**by**  
**Masafumi FUJII**

**Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School**

**(Director : Prof. Kiyoshi Hiraki)**

Cellular immunity in lung cancer was studied by means of lymphocyte transformation by phytohemagglutinin (PHA), purified protein derivative (PPD) skin test, absolute counts of peripheral lymphocytes and leucocyte migration inhibition test. The lymphocyte transformation by PHA was reduced in lung cancer patients in comparison with healthy controls, and correlated with the disease stage, but not with the histology type. The lymphocyte transformation became further depressed by cancer chemotherapy. PPD skin reaction or absolute counts of peripheral lymphocytes did not correlate with the disease stage. However, all the three tests correlated with the disease stage. Therefore, these tests appeared to be general indices of the immunologic status. Inhibition of leucocyte migration was demonstrated in about a half of the patients with lung cancer, but not in patients with other cancers or infectious lung diseases or in healthy controls. These findings suggest the presence of tumor-associated antigens in lung cancer. Concerning the effect of the streptococcal agent, OK-432, enhancement of the function of lymphocyte was observed in the parameters such as lymphocyte transformation by PHA, PPD skin test and leucocyte migration inhibition test. In addition, OK-432 yielded a longer survival in lung cancer patients when used in combination with chemotherapy than with chemotherapy alone.