

大腸癌患者領域リンパ節リンパ球の 殺細胞性に関する研究

岡山大学第1外科

樋口 康彦

(昭和60年3月29日受稿)

Key words : 大腸癌, TPLA, リンパ節,
リンパ球の殺細胞性, 細胞性免疫
IgG Fc Positive T-cell

緒 言

担癌生体の殺細胞性は癌細胞の特異抗原 (tumor specific antigen) に対して宿主側の免疫応答が成立することによって生じる。この事実は多くの動物実験や臨床例にもとずいて報告されている¹⁾。そして、これから担癌生体の癌細胞に対する殺細胞性を有するものとして, cyto-toxic T lymphocyte (CTL), natural killer cell (NK cell), activated macrophage, K cell 等が報告されている。しかし、これらの報告の多くは担癌生体の末梢血リンパ球において検討されており、ヒトの領域リンパ節リンパ球における検討は少なく、消化器癌、とくに大腸癌についての報告は欧米においても比較的少ない。

また、従来大腸癌を含め悪性腫瘍の切除にさいしては、肉眼あるいは組織学的進行度により、領域リンパ節の予防的完全郭清が原則とされてきた。しかし、腫瘍免疫学の進歩とともに領域リンパ節の免疫応答^{2),3)}に関心が寄せられ、癌の転移に関する barrier としてのリンパ節の役割が注目され、さまざまな研究がなされている^{4)~6)}。そしてそれとともに早期癌手術におけるリンパ節の予防的完全郭清に再考の余地があるのではないかと考えられている^{7),8)}。

本研究では領域リンパ節リンパ球の殺細胞性に注目し、結腸・直腸癌患者の領域リンパ節を1群から4群までに分類し⁹⁾、それぞれのリンパ節リンパ球の殺細胞性をもとめ、癌の進行度、大きさによる推移を検索し、大腸癌手術におけるリンパ節郭清の意義について検討するとともに

に、領域リンパ節リンパ球の殺細胞性低下の機序を検索した。

対象及び方法

1) 対象

岡山大学医学部第一外科に入院し手術を受けた大腸癌患者29例を対象とした。病期はDukes分類により分類し、リンパ節転移、腹腔外臓器転移のあるものをDukes Dとした。領域リンパ節は大腸癌取り扱い規約に従い、1群から4群まで可及的に分類した。但し、4群は小腸間膜リンパ節のものとした。組織型は2例に扁平上皮癌が認められたが他は全て腺癌であった。

上記の如くの種類に従いそれぞれのリンパ節リンパ球殺細胞性を求め、領域リンパ節、Dukes分類、腫瘍最上径、末梢血リンパ球のPHA幼若化率、T cell細胞数、T γ cell数等と比較検討した。

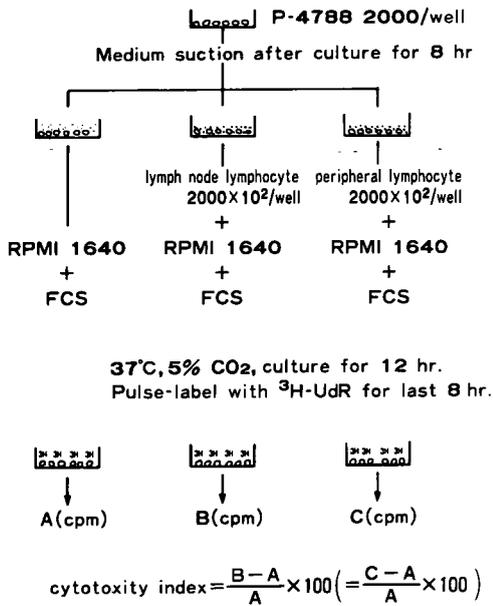
2) 末梢血リンパ球の採取

ヘパリン加末梢血20mlを早期空腹時に採取しBoyum¹⁰⁾の方法に準じFicoll-Conray比重遠沈法にてリンパ球を分離した。これらリンパ球はPRMI-1640培養液〔NISSUI SEIKO Co, LTD, Penicillin G 100 μ /ml, Streptomycin 100 μ g/ml, Hepes (Sigma Co, LTD, USA) 5.9575g/lを含む、以下RPMI-1640と略す〕に浮遊させ以下の実験に供した。

3) 領域リンパ節リンパ球の採取

Eremin¹¹⁾等の方法に準じて以下の如く施行した。

表1 Table 1



i) 手術時無菌的に採取したした各リンパ節に滅菌生理食塩水を適宜加え乾燥を防ぎ、可及的無菌状態で以後の操作を行った。

ii) 採取したリンパ節を1~4群にわけ、それぞれ ϕ 5 cmの滅菌シャーレに入れ、FCS加RPMI-1640 (RPMI-1640にFCS (fetal calf serum) を20%になるよう加えたもの) を2~3滴加え、眼科用ハサミにて可及的に細切した。

iii) 次に5 mlのFCS加RPMI-1640を加え30回以上ピペティング後、150メッシュ (150穴/cm², 浮遊液慮化器, Ikemoto Co, LTD.) を通した。

iv) これらのリンパ節細胞浮遊液を1300rpmにて10分間遠心洗浄した。同様に3回遠心後FCS加RPMI-1640を加え以後の実験に供した。

4) 標的細胞

Roswell Park Memorial InstituteにおいてMoore¹²⁾らによって結腸癌 (adenocarcinoma) の転移胸水中より分離、株化されたP-4788細胞を標的細胞とした。

5) ³H-UdR postlabeling lymphocytotoxicity assay (TPLA)

渡辺¹³⁾の方法に準じ以下の如く施行した (表

1)。

i) P-4788細胞をFCS加RPMIにて3回洗浄後Microtest Plate II (Falcon Plastic, Oxford, Calif.) の各穴にP-4788細胞2000個を分注し、37°C, 5%CO₂ incubatorにて8時間培養した。

ii) 上記の如く培養したplateを取り出し、上清を吸引除去し、末梢血リンパ球及び1群, 2群, 3群, 4群の各リンパ節リンパ球を effector cellとし各穴に20×10⁴個/0.1mlとなるよう加え (E/T ratio=100:1), 再び37°C, 5% CO₂ incubatorにて12時間培養した。

iii) その後plateの各穴底部に付着せる生存標的細胞を剥離させないようにFCS加PRMI-1640で3回洗浄リンパ球を除去した。さらに³H-UdR (30u/mmol, Code TRK 178) を1 μ Ci, HamiltonのRepeating Dispenserにて各穴に加え37°C, 5%CO₂ incubatorにて8時間培養した。

iv) 培養終了後、上清を吸引除去し、phosphate buffered saline (以下PBSと略す) で3回洗浄後、0.1NのNaOHを各穴に加え、付着せる標的細胞を破壊し、multiple cell harvester (Skatron, Norway)を用いて、グラスファイバーフィルター (Harvester Filters, ラボサイエンス) へ³H-UdRを採取した。

これらのフィルターを十分乾燥させ、5mlの液体シンチレーター (POPOP 50mg+PPO2.5g/トルエン500ml) と共に、放射能測定用Vial瓶に入れ、液体シンチレーションカウンター (Aloka, Model LSC-653)にて、³H-UdRの取り込みを測定した。実験は全てtriplicateで行いその平均値を用いた。

vi) cytotoxicity indexの算出

標的細胞2×10³個の浮遊液にリンパ球を加えず培養したものの³H-UdR uptakeをA (cpm)とし、各種リンパ球を20×10⁴個加え混合培養した標的細胞の³H-UdR uptakeをB (cpm)として下式により算出した。

$$\% \text{Cytotoxicity} = \frac{A(\text{cpm}) - B(\text{cpm})}{A(\text{cpm})} \times 100(\%)$$

6) T細胞の測定

リンパ球浮遊液を小試験管にとり、300Gで5

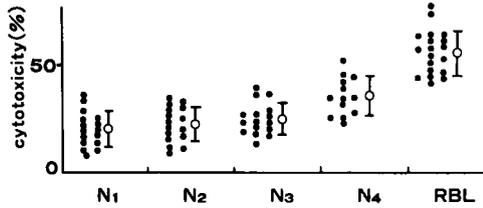


図1. 領域リンパ節リンパ球および末梢血リンパ球の殺細胞性

分間遠心し、試験管底にリンパ球 5×10^5 個の pellet を作り、1% ヒツジ赤血球を含む PBS 0.1ml を加え、静かに攪拌し、200G 5分間遠心し、4℃に6時間以上静置後、pellet の一部をスライドグラスにとり、ブリリアントクリシールブルーで染色し、E ロゼット形成細胞と非形成細胞を測定した。ヒツジ赤血球と3個以上ロゼット形成細胞の百分率（リンパ球400個中）をT細胞とした。

7) IgG⁺Fc receptor 陽性T細胞 (Tr細胞)の測定

矢田らの方法¹⁴⁾に準じ、試験管に 5×10^5 個のリンパ球の pellet を作り、ウサギ IgG 抗ニワトリ赤血球（日本抗体研究所製）で感作したニワトリを含む PBS 0.1ml を加え、よく攪拌した後室温にて1時間反応させ、200G 5分間遠心し、上清を棄て1%ヒツジ赤血球を含む PBS 0.1ml を加え200G 5分間遠心し、4℃に6時間以上静置した。T細胞と同様の方法で染色し、E ロゼット形成細胞、EA ロゼット形成細胞、ダブルロゼット形成細胞を測定した。Tr細胞はT細胞200個をカウントし次式によって算出した。

$$\text{Tr細胞} = \frac{\text{ダブルロゼット数}}{\text{Eロゼット数} + \text{ダブルロゼット数}} \times 100$$

結 果

1) 領域リンパ節リンパ球及び末梢血リンパ球の殺細胞性

図1に示す如くそれぞれの cytotoxicity は N¹ 群リンパ節リンパ球では $20.4 \pm 8.1\%$ 、N₂ 群リンパ節リンパ球では $22.4 \pm 7.9\%$ 、N₃ 群リンパ節リンパ球では $24.9 \pm 7.1\%$ 、N₄ 群リンパ節

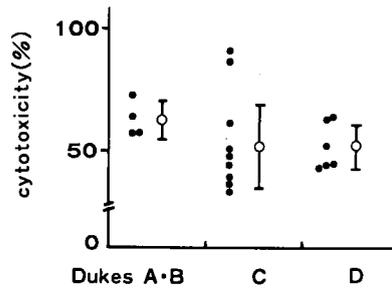


図2. 癌進行度別にみた末梢血リンパ球の殺細胞性

リンパ球では $35.4 \pm 8.7\%$ 、末梢血リンパ球 (PBL) では $55.6 \pm 9.8\%$ であり、癌巣に接近するほど cytotoxicity の低下傾向が認められた。また、N₁、N₂、N₃ 群間のリンパ球リンパ節の cytotoxicity には有意差が認められなかったが、N_{1,2,3} 群と N₄ 群、N_{1,2,3} 群と PBL のそれぞれのリンパ球 cytotoxicity には $p < 0.01$ と有意差を認められた。

2) 癌進行度からみた末梢血リンパ球およびリンパ節リンパ球の殺細胞性

癌進行度は症例数の関係で Duke's 分類を用い、Dukes A・B、Dukes C、Dukes D の3群に分類し比較検討した。Dukes 分類別にみた末梢血リンパ球 cytotoxicity は図2に示す如く Dukes A・B 群で $62.8 \pm 7.5\%$ 、Dukes C 群では $52.1 \pm 17.4\%$ 、Dukes D 群では $51.9 \pm 8.8\%$ であり、Dukes A・B 群と Dukes D 群間に $p < 0.01$ で有意差を認めた。一方、Dukes 分類別にそれぞれの領域リンパ節リンパ球の cytotoxicity をみると図3に示す如く、N₁ 群から N₃ 群までの間には Dukes A・B、C、D 群間に cytotoxicity の差を認めなかった。しかし、N₄ 群では Dukes A・B 群で $37.0 \pm 11.2\%$ 、Dukes C 群で $37.5 \pm 7.9\%$ 、Dukes D 群で $25.4 \pm 6.5\%$ と Dukes A・B、C 群に比し Dukes D 群に cytotoxicity の低下がみられ $p < 0.01$ で有意差を認めた。

3) リンパ節転移の有無からみた領域リンパ節リンパ球の殺細胞性

リンパ節転移の有無による cytotoxicity の変化を図4に示しているが各領域リンパ節において転移陽性のリンパ節リンパ球 cytotoxicity のほうが転移陰性のリンパ節リンパ球 cytotoxicity

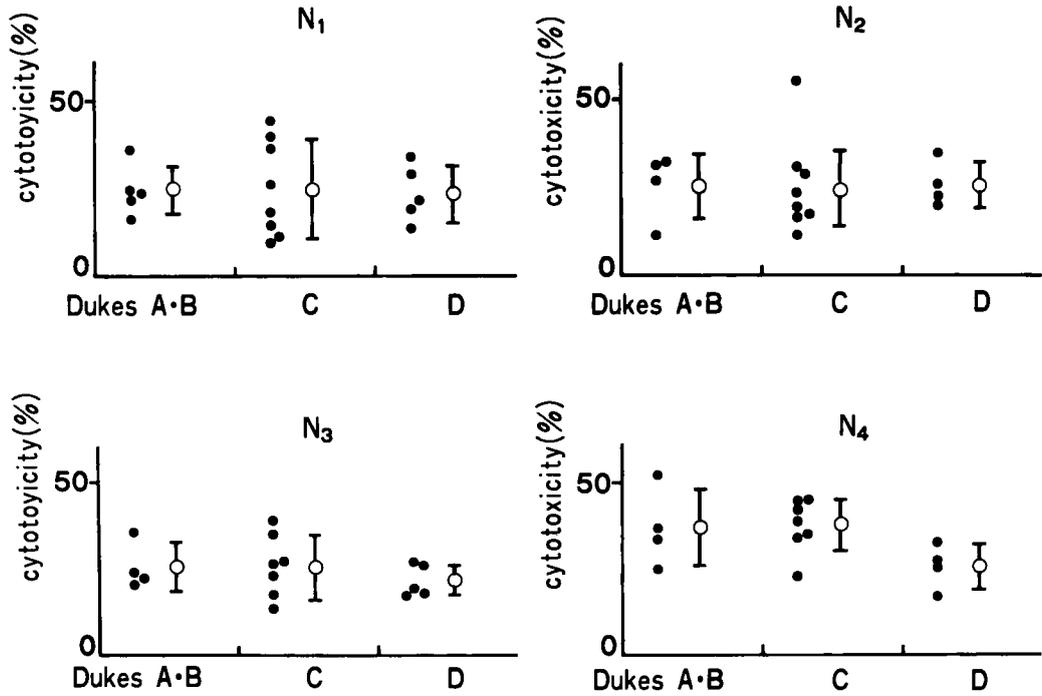


図3. 領域リンパ節別にみたリンパ節リンパ球殺細胞性の癌進行度別推移

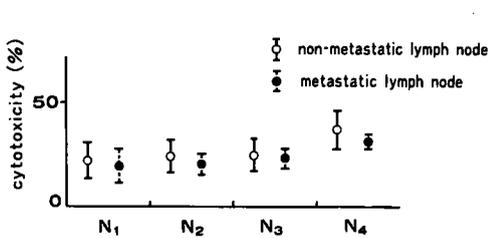


図4. リンパ節転移の有無からみた領域リンパ節リンパ球の殺細胞性

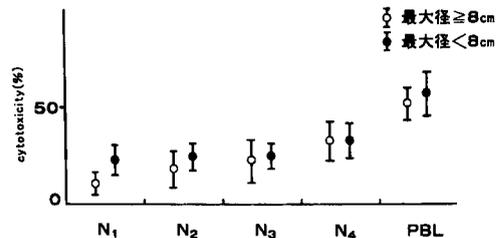


図5. 腫瘍最大径からみた末梢血および領域リンパ節球の殺細胞性

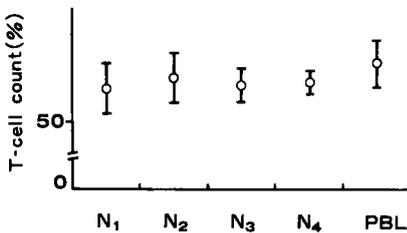


図6. 末梢血および領域リンパ節リンパ球における T cell 数

city に比し低い傾向を示すものの、有意差は認めなかった。

4) 腫瘍最大径からみた末梢血及び領域リンパ球殺細胞性

腫瘍最大径により cytotoxicity を比較してみたが図5に示す如く、最大径8 cm で分離すると N₁ 群においてのみ 8 cm 以上群の方が 11.1 ± 5.5% と 8 cm 以下群の 22.8 ± 7.7% に比し有意 (p < 0.01) の低下を認めた。しかし、その他の N₃, N₄, N₄, PBL 群では 8 cm 以上群がそれぞれ 18.2 ± 9.2%, 22.2 ± 11.1%, 32.8 ± 9.7%,

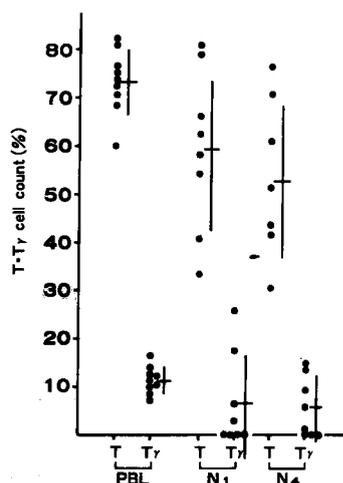


図7. 末梢血及び領域リンパ節リンパ球における IgG·Fc(+) T cell 数

51.4±8.3%で8 cm以下群ではそれぞれ24.6±7.1%, 24.6±6.7%, 32.9±8.8%, 56.4±11.2%と8 cm以上群に比し8 cm以下群の cytotoxicity が高い傾向が認められた。この傾向は8 cm以下の腫瘍最大径で分類した場合も同様であった。

5) 末梢血及び領域リンパ節リンパ球における T cell 及び IgG·Fc(+) T cell 数

図6に末梢血(PBL)及び領域リンパ節リンパ球別の T cell 数(%)を示したがPBLは75.4±10.3%であった。一方、領域リンパ節リンパ球ではN₁群64.9±10.8%, N₂群68.8±10.4%, N₃群66.2±7.2%, N₄群66.8±5.6%でPBLに比しいずれも低値を示したが有意ではなかった。

6) 末梢血及び領域リンパ節リンパ球における IgG·Fc(+) T cell 数

図7に示す如く、PBLでは11.2±2.6%, N₁群では6.5±9.7%, N₄群では5.7±6.4%であり、領域リンパ節リンパ球ではいずれもPBLに比し低値を示した。また、N₁群とN₄群間ではN₁群が高値を示す傾向にあったが有意差を認めなかった。また、領域リンパ節リンパ球ではロゼット形成を示さない症例がN₁群にもN₄群においても認められた。

考 察

癌細胞表面には正常細胞には存在しない抗原、すなわち腫瘍関連抗原が存在し、これらに対し宿主の免疫応答である抗腫瘍性の誘導されることが、Foley¹⁵⁾, Prehn¹⁶⁾らの報告以来明らかにされてきた。ヒト癌においても担癌生体がそれぞれの癌細胞に対して特異的免疫反応を示すことが報告されている。大腸癌では Takasugi & Klein¹⁷⁾の microcytotoxicity assay をもちい患者の末梢血リンパ球を自己または非自己の大腸癌細胞に加えた場合殺細胞性を示す¹³⁾が、膀胱癌やメラノームではそれらが認められないことから、大腸癌には共通の腫瘍特異移植抗原(TSTA)の存在することが明らかにされている。さらに、担癌宿主の免疫学的抗腫瘍性は主に細胞性免疫によってになられており、癌の進行にともない低下することも知られている¹⁸⁾。

一方、癌の発生および進展の経過から癌巣およびその周辺や領域リンパ節に形態学的反応が出現しうるのであろうことが相像される。Mac Carty¹⁹⁾によりヒトの乳癌、胃癌、直腸癌の腫瘍内に円形細胞浸潤が認められる症例の予後が良好であることがはじめて報告されて以来、大腸癌、胃癌、食道癌、肺癌、メラノーマ、咽頭癌、子宮頸癌などのほとんどすべての癌で間質反応が担癌生体の抗腫瘍性に関与することが報告されている²⁰⁾。また、Black²¹⁾らは領域リンパ節に sinus histiocytosis を認める乳癌患者の予後が良好であることを最初に報告した。それ以後、免疫学の進歩にともない領域リンパ節の反応形態が担癌生体の抗腫瘍性を示すもの^{2), 22)}として注目されてきているが、予後的意義については必ずしも一致した見解が得られていない^{23), 24), 25)}。本研究では領域リンパ節が癌の進展の一経路としてではなく、癌の全身転移に対する局所的な barrier とみなされるべきであるとする立場から大腸癌患者の領域リンパ節を大腸癌取扱い規約⁹⁾に準じて、1次、2次、3次(以上を領域リンパ節RLN)、4次(非領域リンパ節NRLN)リンパ節に分類し、そのリンパ節リンパ球の殺細胞性を末梢血リンパ球(PBL)の殺細胞性と比較した。

大腸癌患者の領域リンパ節を本研究のごとく詳細に分類した報告はなく、わずかに Hutchison²⁶⁾らが原発巣からの距離とリンパ節リンパ球との殺細胞性について ⁵¹Cr release assay を用いて報告しているのみである。彼らは自己の大腸細胞に対するリンパ節リンパ球の殺細胞性はリンパ節と癌巣との距離により比例して低下し、有意の相関があったとしている。

本研究では癌巣に近接するほど殺細胞性の低下傾向が認められたが、1次、2次、3次、4次リンパ節のそれぞれの間での殺細胞性には有意差を認めなかった。しかし、1・2・3次と4次のリンパ節を比較した場合、有意の差で後者が高い殺細胞性を示した ($p < 0.01$)。また、榊原²⁷⁾は胃癌の領域リンパ節リンパ球の PHA 幼若化率について検討し、3次、2次、1次リンパ節と原発腫瘍に近接するほど PHA 幼若化率の低下がみられると報告している。本研究と同様この結果は Hutchinson²⁶⁾らの結果と矛盾しているがその原因が、標的細胞や実験方法の違いによるのか不明である。本研究では大腸癌由来株化細胞 P-4788 を標的細胞とする lymphocytotoxicity test を行った。microcytotoxicity test の意義や腫瘍の特異性についての問題点を指摘する報告^{28),29)}もみられるが、渡辺¹³⁾は microcytotoxicity test と ³H-Uridine を用いた lymphocytotoxicity test を比較し両者に有意の相関がみられること、また大腸癌の腫瘍特異抗原を P-4788 と他癌株化細胞 M-Hela を標的細胞とした場合、P-4788 に有意に高い cytotoxicity を示し、その腫瘍特異性の存在することを証明している。さらに、本研究では PBL の cytotoxicity 陽性率は 83%、RLN のそれは 76% であった。したがって、本研究の PBL では P-4788 細胞に対して十分な殺細胞性が認められていることから考えても、大腸癌患者の RLN リンパ球の殺細胞性の低下は進行大腸癌に対する局所リンパ節の細胞性免疫の低下をしめしているものとして問題はないものといえよう。

領域リンパ節への腫瘍の転移の有無によってリンパ節リンパ球の免疫能を検討した報告は比較的多く、いずれの報告においても転移陽性リ

ンパ節リンパ球の免疫能の低下を認めている。また、前術した如く、原発性腫瘍より遠隔になるほどリンパ節リンパ球の殺細胞性が高い値を示し、病期の進行にともなって殺細胞性が低下し、さらに遠隔転移（全身的腫瘍拡大）を来すと、4次リンパ節リンパ球および PBL においても有意にその殺細胞性を低下することなどを考えあわせると Crile³⁰⁾の報告のごとく、全身的腫瘍免疫が成立する以前に領域リンパ節の抗腫瘍活性が癌の転移形成に重要な防禦的役割を担っているものと考えられる。すなわち、彼らは S180 マウス肉腫を用い、移植腫瘍と所属膝窩リンパ節の切除が早期の場合（移植 4~10 日目）同じ腫瘍再移植が可能であるが、移植 10 日目以後に切除を施行した場合は同じ腫瘍の再移植に対し拒絶反応を示し、さらに早期に所属リンパ節を切除すると転移巣の数と大きさが増大したと報告している。また、Fisher^{31),32)}らは領域リンパ節が抗腫瘍性の維持に重要であり領域リンパ節リンパ球が腫瘍細胞に対して増抑制のみならず殺細胞性に働いていることを報告している。すなわち、原発巣が存在している時は領域リンパ節がこれに対し殺細胞性を有するが、転移した 2 次病巣は RLN の殺細胞性を減弱させる働きをするためこの領域のリンパ節は弱い殺細胞性しか発揮できない。しかし、原発巣を摘出した場合、この RLN のリンパ球は急速に殺細胞性の消失を来し、時間の経過とともに転移巣への殺細胞性も低下している。一方、転移巣の RLN リンパ球は強い殺細胞性をいつでも認められるようになる」と報告し、特異免疫抗癌療法の必要性和原発巣とともに RLN を摘除すべきであるとしている。

PBL に比し RLN リンパ球の殺細胞性の低下がみられる報告が多い^{33),34),35)}。本研究においても同様であった。そこで PBL、RLN リンパ球中の T-cell、IgG·Fc(+)T-cell(Tr) を測定した。T-cell は RLN リンパ球において軽度の低下をみるものの有意差は認めなかった。すなわち、RLN リンパ球の殺細胞性の低下は T-cell 数の減少によるものではなく、機能的低下によるものと考えられた。Nind³⁶⁾らも同様の結果を報告し癌の進展にともなって RLN リンパ球は

anergyの状態となり、癌の局所浸潤やリンパ節転移をゆるすとしている。そしてその原因はリンパ球のpopulationの変化ではなく、他の何らかの機序によって阻止されているのではないかと報告している。また、Reiss³⁷⁾も乳癌の病巣の増大によりRLNリンパ球の反応性がPBLに比し弱くなることをStage I・IIの乳癌患者で認めている。同様の傾向は本研究の大腸癌患者においても認められた。

一般に、リンパ球の殺細胞性を低下させる要因としてはblocking factor³⁸⁾、suppressor cell³⁷⁾等が知られている。Hutchinson²⁶⁾らはNK cell活性の可逆性inhibitorであるNH 4 clでPBLおよび腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を処理することによってPBLの殺細胞性は有意に低下したが、6回洗浄した(これによりリンパ球表面に付着したblocking factorが除去され殺細胞性が出現するという)TILでは変化がみられないことから、PBLでの殺細胞性は主にNK cellに由来し、TILやRLNリンパ球の殺細胞性はT-cellによるものであろうとしている。また、Vose^{39),40)}らもshort-term ⁵¹Cr-release assayを用い、大腸癌患者がDukesのStage分類に関係なく、23/47(49.0%)に自己癌に対して殺細胞性を示したが、他人癌に対しては11%しか反応しなかった。また、RLNリンパ球とTILのanti-K562 activityは17%であり、PBでは83%であったことから、RLNリンパ球やTILのeffector cellは抗原特異的に刺激されたT-cell由来の免疫反応を示し、そのために、K-562に対する非特異的な反応性を示さないであろうとしている。同様なRLNリンパ球のNK活性の低下は乳癌患者においても報告されている¹⁵⁾。

リンパ節リンパ球の殺細胞性を示すリンパ球sbpopulationについては前述したごとく、主にT-cellに由来するものと考えられるが、Werkmeister⁴¹⁾らはそれ以外に一部にphagocytic cellの関与や有意のAntibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC)活性が出現するそとを報告している。さらに、paracortical hyperplasiaをとともうリンパ節中に有意に殺作用のあるリンパ球が存在し、T cellの相

対比率が有意に高いとしている。また、PBLとRLNリンパ球の殺細胞性には相関性はなく、癌間質やRLN内で生じる局所免疫反応はPBLの反応性が存在しない時に出現し、PBLの反応性が出現すると消失するのではないかと述べている。

Trは本研究ではPBLに比し、RLNリンパ球中には有意に低く、殆んど検出できなかった。Gupta⁴²⁾らは乳癌患者のPBLおよびRLNリンパ球中のIgM·Fc (T μ)、Tr、IgA·Fc (T α)のT-cell subpopulationを検索し、RLNリンパ球中のT γ 、T α cellが有意に増加し、リンパ節転移の有無には関係を認めなかったと報告している。しかし、PBL中のT γ cellは乳癌患者に有意に増加し、さらにリンパ節転移のある者に有意の増加があったとしている。一方、Heidenreich⁴³⁾らは本研究と同様にRLN中のT-cellはPBLと比較し、その比率に差を認めていない。

Tr cellの増加がNK活性の上昇を意味するのか⁴⁴⁾、suppressor cell活性の上昇を意味するのか⁴⁵⁾現在のところ不明であるが、Cunningham-Rundles⁴⁶⁾らは乳癌患者のRLNのNK活性の上昇を報告している。また、Vose⁴⁷⁾らはPHA反応を用いてPBL、TIL、RLNリンパ球の反応を調べ、PBLのPHA反応を抑制するConA誘導suppressor activityやRLNリンパ球suppressor activityがT cell growth factor (TCGF; interleukin IL-2)によって解除され、その現象はRLNやTILに含まれるactivated T cellがamplifierされたことによると報告している。いずれにしても、RLNリンパ球中のT γ の減少はADCC活性の低下⁴⁸⁾やNK活性の低下を示すもの⁴⁹⁾と考えられる。

リンパ節転移陽性のリンパ節を郭清するいわゆる治療的郭清は当然必要であろう。これに対し、リンパ節転移陰性のリンパ節郭清、いわゆる予防的リンパ節郭清をどこまで施行すべきか問題である。折田⁵⁰⁾は担癌生体の領域リンパ節の自家癌に対する抗腫瘍性を同種移植免疫の立場から検討し、ヒト癌を含めて弱いながらRLNにまず抗腫瘍性が生じ、しだいに第2、第3リンパ節に抗腫瘍性が拡がり、癌が進行すれば

RLN の抗腫瘍性から漸次減弱消失することを明らかにし、癌を取り巻くリンパ節は弱いながらも癌の進展に対して免疫学的な barrier の働きをしているとし、最終的にはリンパ節がどの程度の癌拒絶能を有しているのか、拒絶能をどの程度上昇せしめうるかで、予防的リンパ節郭清の位置づけは決まるはずであると述べ、現時点でこれに解答を与える資料は皆無であるが、諸家の報告を加味すれば N_0 の進行胃癌では R_2 程度の郭清が妥当であるとしている。したがって、本研究の結果から大腸癌での予防的リンパ節郭清の範囲を R_3 とするには RLN リンパ球の BRM (Biological Response Modifiers) たとえば $IFN\gamma$ や $IL-2$ による活性化^{6),51)}、直腸癌特に下部直腸癌における術後の脱落機能障害、リンパ節の免疫組織学的変化と予後との関係、リンパ節中の Macrophage 機能^{47),48)}等々の多くの問題が残されている。

結 語

所所属リンパ節が癌の進展の一経路としてではなく、癌の全身転移に対する局所的なバリアーとみなすべきであるとする立場から大腸癌患者の所属的リンパ節を一次、二次、三次、四次リンパ節に分類し、そのリンパ節リンパ球の殺細胞性を末梢血リンパ球の殺細胞性と比較し検討した結果以下の結論を得た。

1) 所属リンパ節リンパ球の殺細胞性は癌巣に近接するほど低下傾向を示し、特に $N_1 \cdot N_2 \cdot N_3$ 群の殺細胞性は末梢血リンパ球に比し有意の低下を認めた。また、 N_4 群との間にも有意の差を認めた。

2) N_1 群から N_3 群までのリンパ節リンパ球殺細胞性は大腸癌の進行によって差がなく、 N_4 群では Dukes D になると有意の殺細胞性の低下を認めた。また、末梢血リンパ球殺細胞性も Dukes A・B と D 群間に有意差を認めた。

3) 当然の事ながら転移陽性リンパ節リンパ球の殺細胞性は転移陰性群に比し低値を示したが、有意の差は認めなかった。

4) 腫瘤最大径が 8 cm 以上になると N_1 群リンパ節リンパ球の殺細胞性に有意の低下がみられた。

5) 所属リンパ節リンパ球中の T 細胞数は末梢血リンパ球に比し低下の傾向にあったが有意差は認めなかった。

6) 所属リンパ節リンパ球中の Tr 細胞数は T 細胞数と同様に末梢血に比し低値を示したが有意差は認めなかった。

7) 大腸癌での予防的リンパ節郭清の範囲を R_3 とするには多くの解決されるべき問題が残されている。

本研究にあたり終始御指導、御鞭撻いただいた折田薫三教授、淵本定儀助手に深謝致します。

文 献

1. Hellström, I., Hellström, K.E. and Shepherd, T.H.: Cell-mediated immunity against antigens common to human colonic carcinomas and fetal gut epithelium. *Int. J. Cancer* 6, 346—351, 1970.
2. Meyer, E.M. and Grundmann, E.: Lymph node reactions to cancer. *Klin. Wochenschr.* 60, 1329—1338, 1982.
3. Mitchison, N.A.: Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. I. The role of lymph node cells in conferring immunity by adoptive transfer. *J. Exp. Med.* 102, 157—177, 1955.
4. Nairn, R.C., Nind, A.P.P., Guli, E.P.G., Davis, D.J., Rolland, J.M., McGiven, A.R. and Hughen, E. S.R.: Immunological reactivity in patients with carcinoma of colon. *Br. Med. J.* 18, 706—709, 1971.
5. Emeson, E.E.: Migratory behavior of lymphocytes with specific reactivity to alloantigens. II.

- Selective recruitment to lymphoid cell allografts and their draining lymph nodes. *J. Exp. Med.* 147, 13—24, 1978.
6. Fisher, E.R., Kotwal, N., Hermann, C., Fisher, B. and Contributing Investigators of the National Surgical Adjuvant Breast Project.: Types of tumor lymphoid response and sinus histiocytosis. Relationship to five-year, disease-free survival in patient with breast cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 107, 222—227, 1983.
 7. Futrell, J.N. and Hoopes, J.E.: The regional lymph node question. To treat or not to treat: The pros and Cons. *J. Surg. Oncol.* 8, 263—265, 1976.
 8. Pendergrast, W.J. Jr., Soloway, M.S., Myer, G.H. and Futrell, J.W.: Regional lymphadenectomy and tumor immunity. *Surg. Gynecol. obstet.* 142, 385—390, 1976.
 9. Japanese Research Society for Cancer of the Colon and Rectum: General rules for clinical and pathological studies on cancer of the colon, rectum and anus. Part 1. Clinical Classification. *Jpn. J. Surg.* 13, 557—573, 1983.
 10. Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 97, 77—89, 1968.
 11. Eremin, O., Plumb, D. and Goombs, R.R.A.: T and B lymphocyte population in human normal lymph node, regional tumour lymph node and inflammatory lymph node. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 52, 277—290, 1976.
 12. Moore, G.E. and Koike, A.: Growth tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer* 17, 11—20, 1964.
 13. 渡辺哲夫: 大腸癌患者における癌特異的免疫能に関する研究. 岡山医学会雑誌, 95, 611—621, 1983.
 14. 新保敏和, 矢田純一, 中川俊郎, 漆畑 修, 松元 正: ヒト IgG-Fc receptor 陽性 T リンパ球の検出法と各種疾患における変動. 臨床免疫, 9, 141—145, 1977.
 15. Foley, E.J.: Antigen properties of methylchoranthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 13, 835—837, 1953.
 16. Prehn, R.T. and Main, J.M.: Immunity to methylchoranthrene-induced sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 18, 769— , 1957.
 17. Takasugi, M. and Klein, E.: A micro-assay for cell-mediated immunity. *Transplantation* 9, 219—227, 1970.
 18. Humphrey, L., Humphrey, M., Singla, O. and Volenec, J.: Immunologic responsiveness of patients with cancer-relationship to tumour type, stage and prognosis. *Ann. Surg.* 193, 574—578, 1981.
 19. MacCarty, W.C.: Factors which influence longevity in Cancer. *Ann. Surg.* 76, 9—12, 1922.
 20. Tsakraklides, V., Wanebo, H.J., Sternberg, S.S., Stearns, M. and Good, R.A.: Prognostic evaluation of regional lymph node morphology in colorectal cancer. *Am. J. Surg.* 129, 174—180, 1975.
 21. Black, M.M., Kerpe, S. and Speer, F.D.: Lymph node structure in patients with cancer of the breast. *Am. J. Pathol.* 29, 505—521, 1953.
 22. Check, I.J., Cobb, M. and Hunter, R.L.: The relationship between cytotoxicity and prognostically significant histologic changes in lymph nodes from patients with cancer of the breast. *Am. J. Pathol.* 98, 325—338, 1980.
 23. Riegrová, D. and Jausa, P.: Prognostic significance of reactive changes in regional lymph nodes in gastric and mammary carcinoma. *Neoplasma* 29, 481—486, 1982.
 24. Kister, S.J., Sommers, S.C., Haagensen, C.D., Freidell, G.H., Cooley, E. and Varma, A.: Nuclear grade and sinus histiocytosis in cancer of the breast. *Cancer* 23, 570—575, 1969.

25. Moore, R.D., Chapnick, R. and Schoenberg, M.D.: Lymph nodes associated with carcinoma of the breast. *Cancer* 13, 545—549, 1960.
26. Hutchinson, G.H., Symes, M.D. and Williamson, R.C.N.: Cytotoxicity of lymphocytes from blood, tumor and regional lymph nodes against K562 cells and autoplasmic colorectal tumor cells. *Br. J. Cancer* 46, 682—686, 1982.
27. 榊原 宣, 小林健治, 矢川裕一, 大谷洋一, 喜多村陽一: 胃癌リンパ節転移と細胞性免疫. 外科診療, 21, 1193—1197, 1979.
28. Takasugi, M., Mickey, M.R. and Terasaki, P.I.: Studies on specificity of cell-mediated immunity to human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 1527—1538, 1974.
29. Heppner, G. and Henry, G.: Problems in the clinical use of the microcytotoxicity assay for measuring cell-mediated immunity to tumor cells. *Cancer Res.* 35, 1931—1937, 1975.
30. Crile, G. Jr.: The effect on metastasis of removing or irradiating regional nodes of mice. *Surg. Gynecol. Obstet.* 126, 1270—1272, 1968.
31. Fisher, B. and Fisher, E.R.: Studies concerning the regional lymph node in cancer. II. Maintenance of Immunity. *Cancer* 29, 1496—1501, 1972.
32. Fisher, B., Wolmark, N., Coyle, J., Soffer, E. and Fisher, E.R.: Studies concerning the regional lymph node in cancer. VIII. Effect of two asynchronous tumor foci on lymph node cell cytotoxicity. *Cancer* 36, 521—527, 1975.
33. Whitehead, R.H., Roberts, G.P., Thatcher, J., Teasdale, C. and Hughers, L.E.: Masking of receptors for sheep erythrocytes on human T-lymphocytes by sera from breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 1573—1576, 1977.
34. Petrini, B., Wasserman, J., Blomgren, H., Baral, E., Strender, L.E., Wallgren, A.: Blood lymphocyte subpopulations in breast cancer patients following post-operative adjuvant chemotherapy or radiotherapy. *Clin. Exp. Immunol.* 38, 361—365, 1979.
35. Keller, S.E., Loachim, H.L., Pearse, T. and Siletti, D.M.: Decreased T lymphocytes in patients with mammary cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 65, 445—449, 1976.
36. Nind, A.P.P., Nairn, R.C., Rolland, J.M., Guli, E.P.G. and Hughes, E.S.R.: Lymphocyte anergy in patients with carcinoma. *Br. J. Cancer* 2, 108—117, 1973.
37. Reiss, C.K., Volence, F.J., Humphrey, M., Singla, O.M. and Humphrey, L.J.: The role of the regional lymph node in breast cancer: A comparison between nodal and systemic reactivity. *J. Surg. Oncol.* 22, 249—253, 1983.
38. Hellström, I.: A colony inhibition (CI) technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells in vitro. *Int. J. Cancer* 2, 65— , 1967.
39. Vose, B.M., Gallagher, P., Moore, M. and Schofield, P.F.: Specific and nonspecific lymphocyte cytotoxicity in colon carcinoma. *Br. J. Cancer* 44, 846—855, 1981.
40. Gallagher, P., Vose, B.M., Moore, M. and Schofield, P.F.: Role of autologous lymphocyte cytotoxicity in colonic neoplasia. *Gut* 23, 31—35, 1982.
41. Werkmeister, J.A., Pihl, E. and Flannery, G.R.: Lymph node anti-tumour effector cell mechanisms in colorectal carcinoma. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 59, 115—124, 1981.
42. Gupta, S. and Cunningham-Rundles, S.: Subpopulations of human T-lymphocytes. XIX. T-cells and T-cell with receptors for IgMFC($T\mu$), IgGFC($T\gamma$), or IgAFC($T\alpha$) in the peripheral blood and regional lymph nodes of patients with untreated breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 69, 1261—1264, 1982.

43. Heidenreich, W., Jagla, K., Schüssler, J., Börner, P., Dehnhard, F., Kalden, J.R., Leinfeld, W., Peter, H.H. and Deicher, H.: Immunological characterization of mononuclear cells in peripheral blood and regional lymph nodes of breast cancer patients. *Cancer* **43**, 1308—1313, 1979.
44. Gupta, S., Fernandes, G., Nair, M. and Good, R.A.: Spontaneous and antibody-dependent cytotoxicity by human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5137—5141, 1978.
45. Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P.M. and Cooper, M.D.: Functional analysis of two human T cell subpopulations. Help and suppression of B cell responses by T cell-bearing receptors for IgM(TM) and TgG(TG). *J. Exp. Med.* **146**, 184—200, 1977.
46. Cunningham-Rundles, S., Filippa, D., Braun, D.W. Jr., Autonelli, P. and Ashikari, M.: Natural cytotoxicity of peripheral blood lymphocytes and regional lymph node cells in breast cancer in women. *J. Natl. Cancer Inst.* **67**, 585—590, 1981.
47. Vose, B.M., Ferguson, R. and Moore, M.: Mitogen responsiveness and inhibitory activity of mesenteric lymph node cells. Conditioned medium containing T cell growth factor reverses suppressor function. *Cancer Immunol. Immunother.* **13**, 105—111, 1982.
48. O'Toole, C., Saxon, A. and Bohren, R.: Human lymph-node lymphocytes fail to effect lysis of antibody-coated target cells. *Clin. Exp. Immunol.* **27**, 165—171, 1977.
49. Vose, B.M., Vanky, F., Argou, S. and Klein, E.: Natural cytotoxicity in man: Activity of lymph node and tumorinfiltrating lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **7**, 353—357, 1977.
50. 折田薫三：リンパ節と生体防御機構；悪性腫瘍手術におけるリンパ節郭清の位置づけ。消化器外科, **6**, 145—153, 1983.
51. Kimber, I., Moore, M., Howell, A. and Wilkinson, M.J.S.: Native and inducible levels of natural cytotoxicity in lymph nodes draining mammary carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **15**, 32—38, 1983.

**Cytotoxicity of regional lymph nodes lymphocytes from patients
with colon cancer**

Yasuhiro HIGUCHI

First Department of Surgery, Okayama University Medical School

(Director: Prof. K. Orita)

Twenty-nine patients with colon cancer who underwent operations at the First Department of Surgery, Okayama University Medical School were studied. During operations, regional lymph nodes were collected and classified into four groups; groups N₁, 2, 3, and 4. Tumor grades followed Dukes classification. Cytotoxicity of the lymph node lymphocytes in each group and of the peripheral blood lymphocytes (PBL) in each patient was examined. Cell lines of P-4788 isolated from the metastatic ascites of the patients with colon cancer were used as target cells for examining cytotoxicity of the lymph nodes lymphocytes and PBL. As the lymph node lymphocytes and PBL were closer to cancer lesions, their cytotoxicity tended to decrease and was significantly different between N₁, 2, and 3 groups and N₄ group and between N₁, 2, and 3 groups and PBL group ($p < 0.01$). As the cancer progressed, the cytotoxicity decreased and was significantly different between Dukes A, B, and C groups and Dukes D group ($p < 0.01$). Compared between groups of negative and positive metastatic lymph nodes, the cytotoxicity of lymph node lymphocytes and PBL tended to decrease in the positive group, but it was not significantly different. When the tumor of 8 cm in diameter was made to be border for tumor classification, cytotoxicity of PBL and regional lymph node lymphocytes decreased as the diameter of the tumor became greater and significantly different ($p < 0.01$).