

Annals of Cancer Research and Therapy

掲載原著 / 要旨録

**Ann Cancer Res Ther (Pub quart)
Official Journal of the Japanese Society of
Strategies for Cancer Research and Therapy**

Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by tumor necrosis factor- α (TNF α) in cancer patients

Vol. 4, No. 2, p83~87

Shingo Kameoka et al.

【目的】 担癌患者においては、TGF β をはじめとする多くの免疫抑制因子が存在し、癌は生体の免疫監視機構をすりぬけて増殖する。癌の進行とともに細胞障害性T細胞(CTL)の誘導は困難になり、癌患者からCTLを誘導するためには新たなサイトカインが必要となる。そこで今回、マクロファージから分泌されT細胞活性化作用をもち、CTLの分化にも影響を与えることが知られているTNF α を用い、癌患者末梢血よりCTLを誘導する系でTNF α がCTLの誘導に与える影響について検討した。

【方法】 6人の癌患者により、Ficoll-Hypaqueを用いた比重遠心法により末梢血単核球を分離し、自己癌細胞または当科で樹立したHLA class-Iの明らかな癌細胞株と50:1の割合で混合培養(MLTC)を行い、MLTCの最初に100, 1,000/mlのTNF α を加え、3日間培養をつづけた。その後TNF α を除き、1 μ g/ml固相化抗CD3抗体と1,000U/ml IL-2でさらに3~7日間刺激した。その後は抗CD3抗体を除き500 U/mlのIL-2を含む培養液で培養を行った。CTL活性は細胞が十分増殖した3~4週間後に4時間⁵¹Cr放出試験にて測定され、フローサイトメトリーでT細胞の表面マーカーを測定した。

【結果】 ① 腫瘍リンパ球混合培養時にTNF α を加えなかった場合、6例中4例にCTL活性が誘導できなかった。しかし、TNF α を加えることによって、CTL活性が誘導できなかった4例中2例にCTL活性が誘導できた。この活性は

TNF α の濃度依存性に増強され、1,000U/mlの濃度でもっとも活性が高かった。TNF α を加えなくても活性の高かった2例にTNF α を加えても活性への影響はなかった(Fig. 2)。② CTL活性が得られた2例でHLAの異なる同種癌細胞に対する抗腫瘍活性を測定すると、それらの細胞に対しても活性の増強が得られた(Fig. 3)。③ CTLの増殖はTNF α の濃度依存性に増加し、TNF α 無添加群では3週間後に17倍であったのに対し、100U/ml, 1,000U/mlの濃度でそれぞれ23倍, 34倍まで増加した(Fig. 4)。③ フローサイトメトリーの検討では、活性の増強が得られた症例でCD8⁺Leu15⁻細胞の割合が増加したが、活性の増強は得られなかった症例ではCD8⁺Leu15⁻細胞はまったく増加しなかった(Table 4)。

【考察】 進行癌患者で通常のMLTCのみでCTLが誘導できる確立はかなり限られている。今回の検討では、TNF α はCTL活性の誘導できなかった患者の半数に活性を誘導できた。活性の誘導できなかった症例は癌が進行し、栄養状態のわるい傾向があった。TNF α はHLAの異なる同種癌細胞に対する抗腫瘍活性も増強するため、CTL活性の腫瘍特異性を高める作用はないものと考えられた。CTL療法へのTNF α の併用は有用と考えられたが、腫瘍特異性の高いCTLを誘導するため、他のサイトカインの有用性についてもさらに検討をつづける必要がある。

(亀岡信吾, 東京女子医科大学第二外科学教室)

Breast cancer only detected by thermography ; A case report

Vol. 4, No. 2, p89~90

Takao Yokoe et al.

症例報告：サーモグラフィーで発見された乳癌の1例

サーモグラフィーのみで発見された乳癌症例を報告する。

患者は50歳の女性で、左乳房の硬結を主訴に当

院を紹介された。来院時、左乳房全体に多数の弾性軟な硬結を触れた。乳房撮影では腫瘤影はみられなかった。サーモグラフィーでは乳房全体に異常熱血管像が、内側上方に高温域、および乳頭高温がみられ、いずれも冷却抵抗を示した。このため高温域の内側上方の乳腺を生検した。切除した乳腺のなかに周囲に浸潤する 0.8×0.7 cmの腫瘤を認めた。組織型は硬癌でER, PgRは陽性で

あった。乳腺の追加切除を含めた乳房温存手術を行い、残存乳房に50Gyの照射を行った。リンパ節転移はなかった。

サーモグラフィーは、機能的診断法であり、乳房撮影や超音波検査でとらえられない早期乳癌を発見できる可能性が示された。

(横江隆夫, 群馬大学医学部第二外科学教室)

Immunohistochemical analysis of advanced colon cancer after lentinan administration ; Emperipolesis of tumor-infiltrating lymphocytes

Vol. 4, No. 2, p91~97

Nobuaki Sakamoto

レンチナンの結腸進行癌に対する免疫組織学的効果、特に間質内浸潤Tリンパ球と光顕レベルでのemperipoletic T lymphocyteについて検討した。

【対象と方法】 対象は、結腸進行癌Dukes B, Cの高分化ないし中分化型腺癌57例である。その内訳は、対照群29例、レンチナン投与群28例(2mg 2回投与群10例, 4mg 2回投与群8例, 8mg 2回投与群10例)である。レンチナン投与群は、治癒切除術14日前と7日前にそれぞれ点滴静注した。新鮮凍結標本およびホルマリン固定標本を用い、間質内浸潤Tリンパ球とそのsubset(CD4, CD8)、光顕レベルでのemperipoletic T lymphocyteとそのsubset(CD4, CD8)、HLA-class IとHLA-DRの表出率の変化について比較検討した。

【結果】

① 年齢、性、組織型、進行度において、各群間に統計的偏りを認めなかった。

② レンチナン投与により間質内Tリンパ球浸潤の亢進を認め、対象群に比し4mg群および8mg群において有意に増加した($P < 0.05$)。

③ そのsubsetをみると、CD4は各群間に差を認めなかったが、CD8は投与量依存的に増加し、8mg群において対象群に比して有意差が認められた($P < 0.05$)。

④ HLA-class Iの表出率は、レンチナン投与群と対象群ともに約80%の症例がstrongであり、両群間に差を認めなかった。

⑤ HLA-DRの表出率はレンチナン投与によって有意に増加した($P < 0.05$)。

⑥ 光顕レベルでのemperipolesisは、対象群に比し2mg群, 4mg群, 8mg群において有意に増加した($P < 0.05$)。

⑦ Emperipolesisを呈しているリンパ球subset(CD4, CD8)をみると、そのほとんどはCD8陽性細胞であり、CD4陽性細胞は癌細胞腺管周囲に多数存在するものの、emperipolesisを呈しているものは少なかった。なお、CD8とCD11bの二重染色にてemperipolesisを呈しているCD8の陽性細胞は、cytotoxic T lymphocyteであることを確認した。

【考察】 Cytotoxic T cell, Natural killer cellなどのリンパ球が癌細胞を障害する場合、癌細胞膜との接着は必須である。また、光顕レベルでのemperipolesisは基底膜の存在の有無にかかわらず、リンパ球と癌細胞膜との接着、あるいは接着を経由したことを意味する。したがって、レンチナン投与により光顕レベルでのemperipoletic T lymphocyteが増加することは、レンチナンに抗腫瘍作用があることを示す所見であると推察される。

(坂本啓彰, 東京医科大学外科学第三講座)

Association of the HLA-DPB1*0901-DRB1*1502 haplotype with stomach cancer in Japanese*Vol. 4, No. 2, p99-102*

Fumiya Obata et al.

【目的】 HLA はヒトにおける免疫応答遺伝子であり、かつきわめていちじるしい多型性を示す。したがって HLA 型によっては、結合できる癌抗原ペプチドの種類に差が存在すると想定される。その場合 HLA は、癌発症に影響を及ぼす遺伝因子の 1 候補となりうるだろう。これまで報告されている血清学的タイピングによる研究では、HLA 型と胃癌発症との相関について明瞭な結論は得られていない。また、細胞学的タイピングを必要とする HLA-DP 型についてはまったく報告されていない。筆者らは、血清学的タイピングにより信頼性・精度がすぐれ、かつ簡便に DP タイピングも可能な DNA タイピング法を用い、胃癌患者における HLA 遺伝子型の解析を行った。

【方法】 東海大学病院の胃癌患者 186 人 (男 117 人, 女 69 人) を対象とした。患者末梢血から得たゲノム DNA を鋳型とし、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による遺伝子増幅で DPB1 および DRB 1 遺伝子を増幅した。DPB1 解析は、第 11 回国際組織適合性ワークショップ (11th IHWS) で配られた primer と 26 種の SSOP を用いて行い、20 種の DPB1 遺伝子型に分類した。DRB1 解析は、筆者ら自身が考案した primer と 29 種の SSOP を用い、31 種の DRB1 型に分類した。患者群について各遺伝子型の頻度を算出し、11th IHWS において求められた日本人健常対照群の頻度と比較した。統計学的有意性の検定は Fisher の直接確率比較で行った。

【結果】 DNA タイピング法により胃癌患者群 186 人における各 HLA-DPB1 型の遺伝子頻度を求め、健常対照群と比較した。その結果、

DPB1*0901 の頻度が胃癌患者群では 26.9% であり、健常対照群における 16.5% にくらべて有意に高いことがわかった (相対危険率 = 1.86, $P < 0.003$, corrected $P < 0.05$)。つぎに、HLA-DRB 1 遺伝子頻度について解析した結果、DPB1*1502 の頻度が胃癌患者群では 26.9% であり、健常対照群における 17.6% にくらべて高い傾向がみられた (相対危険率 = 1.72, $P < 0.006$, corrected $P < 0.15$)。さらに患者群において、DPB1*0901 と DRB1*1502 の両方をもつ患者は 45 人 (24.2%) 存在し、この割合は健常対照群における 13.3% にくらべて有意に高いことがわかった ($P < 0.003$)。

【考察】 この研究で筆者らは、胃癌患者群に HLA-DPB1*0901-DPB1*1502 ハプロタイプが高頻度に検出されることをはじめて明らかにした。癌発症と DP については、ホジキン病についての報告があるのみである。興味深いことに、胃癌と相関する DPB1*0901 は、日本人における shorter remission duration 型のホジキン病とも相関することが報告されている。

日本人集団においては、DPB1*0901 は DQB1*0601 および DRB1*1502 と比較的強い連鎖不平衡を示す。胃癌患者群でも、DPB1*0901 と DRB1*1502 がハプロタイプとして高頻度に検出された。したがって現在のところ、胃癌発症に DP, DR のうちどちらがより強く関与するのかを結論することはできない。このハプロタイプに連鎖する他の HLA 遺伝子、あるいはペプチドの生成・運搬に関わる DM, LAMP, TAP 遺伝子のいずれかが真の関与遺伝子である可能性も考えられる。

(小幡文弥, 北里大学医学部医療衛生部免疫学教室)

Patterns of recurrence of gastric cancer following curative gastrectomy depends on adjuvant chemotherapy

Vol. 4, No. 2, p103~107

Sumitaka Arima et al.

北部九州の21施設より集計されたStage II, III, IVの組織学的に治癒切除された胃癌症例163例に対して、術後補助化学療法としてMMC+Futrafal (FT群) とMMC+UFT(UFT群) の2群間比較を封筒法により行った。

7年生存率では、UFT群(66.7%)はFT群(44.8%)に比し有意に高い生存率を示した($P=0.04$)。また、低分化型腺癌において、UFT群の生存率が有意に高かった。再発形式別に検討すると、FTにくらべUFTが特に腹膜再発を強く抑制している傾向がみられ、低分化腺癌に腹膜

再発が多いことを考え合わせると、UFT群の7年生存率が有意に高いことの原因ではないかと推察される。

再発率および再発危険率は、UFT群がFT群より低くなる傾向がみられたが、有意の差ではなかった。

再発時期を検討すると、FTおよびUFT群ともに約70%が2年以内に再発を示しており、術後の維持療法は少なくとも2年間は再発抑制のために必要なことが示唆された。

(有馬純孝, 福岡大学筑紫病院外科)

Prognostic value of DNA ploidy and proliferative activity in gastric carcinoma

Vol. 4, No. 2, p109~112

Toshio Imada et al.

胃癌の予後予測因子として、臨床的または病理学的なステージ分類がもっとも用いられている。しかし、最近は数多くのモノクローナル抗体が作成されるようになって、これらを用いた研究が盛んに行われ、治療成績との関連性が検討されるようになってきた。

【目的】今回、胃癌症例において核DNA量およびKi-67モノクローナル抗体を用いた標識率が予後を規定する因子として有用かどうかを明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】胃癌切除症例102例を対象とし、新鮮切除標本を用いて核DNA ploidy patternとKi-67 labeling indexを求め、臨床病理所見および生存率との関係を比較検討した。DNA ploidy patternの測定はFACScanを用いて測定、解析した。Ki-67 labeling indexは免疫組織染色法(ABC法)を用いて染色し、1,000個の腫瘍細胞に対する染色陽性細胞の率を求めた。

【結果】

① DNA ploidy patternは39.2%がdiploid patternを示し、60.8%がaneuploid patternを示した。

② DNA ploidy patternは性、年齢、リンパ節転移の有無、漿膜浸潤の有無、stageと関連がなかった。

③ 分化型は、低分化型に比しDNA aneuploidの率が有意に高率であった。

④ Ki-67 labeling indexは12.9%から56.9%を示し、平均27.5%であった。

⑤ Ki-67 labeling indexはaneuploid tumorにおいて、より高率であった。

⑥ Ki-67 labeling indexはリンパ節転移、漿膜浸潤、stageと関連性が認められた。

⑦ Diploid tumorの3年生存率は68.5%とaneuploid tumorの45.0%よりも有意に良好であった。

⑧ Ki-67 labeling indexが20%以下の症例の生存率は20%以上の例よりも良好であった。

【考察】胃癌のDNA ploidy patternやBrdUやPCNAなどの増殖能が治療成績と関連性をもつかどうかの研究は数多くあるが、一定の見解に達していないのが現状である。この不一致の原因となるものは、測定材料の違いと癌自身のもつ heterogeneity によると考えられる。

筆者らは、新鮮材料の全層切片を用いて prospective に検討し、3年間の経過観察を行った結果、胃癌症例において核DNA量およびKi-67 labeling index は、重要な予後予測因子であると考えられる結果を得た。

(今田敏夫, 横浜市立大学医学部第一外科学教室)

Relationship between expression of neuron-specific enolase and DNA content in human pancreatic carcinoma

Vol. 4, No. 2, p113-116

Haruhiko Nagami et al.

【目的】筆者らはこれまでに、神経腫瘍において特異的であるとされてきたneuron-specific-enolase (NSE) が膵管癌においても免疫組織学的に発現することを報告してきたが、この膵管癌におけるNSE発現性が生物学的悪性度の指標である腫瘍細胞核中DNA量とどのような関連を有するかについての検討を膵管癌41症例について行った。

【対象と方法】島根医科大学第一外科にて1982年から93年までに外科的切除された膵管癌41症例を対象とした(組織型の内訳: 乳頭腺癌2例, 管状腺癌30例, 粘液癌3例, 粘液嚢胞腺癌3例, 膵管内乳頭腺癌3例)。

ホルマリン固定後のパラフィンブロックから癌部を含む4 μ mの切片を作成後に、NSE免疫組織化学的染色(SAB法)を行い、NSE発現性を検討すると同時に、癌部を含む同様の切片を用いてFeulgen染色しコンピュータ-g画像解析装置(cell analysis system: CAS)を用い約200個の腫瘍細胞核のDNA histogramを作成し、DNA ploidy pattern, DNA index (D.I), histogramにおけるtetraploid(4c)以上の腫瘍細胞の出現率(4c exceeding rate (%): 4c ER)を求め、先のNSE発現性との関連について検討した。数値はmean \pm SDで表現し、統計学的処理はStudents t testを用い5%以下を有意差ありと判定した。

【結果】(1) NSE発現性とDNA ploidy patternとの関連

膵管癌41例中21例(51.2%)にNSEの免疫組織化学的発現を認めた。また、NSE発現例21例中diploid patternは8例(38.1%), aneuploid patternは12例(61.9%)であったのに対し、NSE非発現例ではdiploid pattern12例(60.0%), aneuploid pattern 8例(40.0%)とNSE発現例においてaneuploid patternが多い傾向にあった。

(2) NSE発現性とDNA indexとの関連
NSE発現例のD.Iは 1.80 ± 0.70 , NSE非発現例のD.Iは 1.58 ± 0.69 であり、NSE発現例においてD.Iが高値であった。

(3) NSE発現性と4c ERとの関連

NSE発現例の4c ERは $20.40 \pm 11.68\%$, NSE非発現例の4c ERは $13.17 \pm 8.09\%$ と、NSE発現例の4c ERは有意($P < 0.05$)に高値を示した。

【結語】膵管癌におけるNSE発現は51.2%に認められたが、このNSE発現症例の腫瘍細胞核DNA量の計測ではtetraploid(4c)以上を示す生物学的悪性度の高い細胞の出現率が高値であった。したがって、NSE発現性は核DNA量から判定すれば、膵癌における生物学的悪性度の指標になる可能性が考えられた。

(長見晴彦, 島根医科大学第一外科学教室)

Relationship between DNA content and argyrophilic nucleolar organizer regions of tumor cells in bile duct cancer

Vol. 4, No. 2, p117~119

Haruhiko Nagami et al.

AgNOR カウントは、細胞増殖能と密接な関連がある一方で、イメージサイトメトリーやフローサイトメトリーを用いた DNA 量（腫瘍細胞核中）は各種悪性疾患の予後を判定するうえで有効な方法である。

今回の検討では、外科的治療後のパラフィン固定標本を用い、14例の胆管癌（男性7例、女性7例）の腫瘍細胞核中 AgNOR カウントおよび核 DNA 量について検討した。AgNOR カウントおよび AgNOR 面積は銀染色（Ploton らの方法に準じ）によって行い、CAS200 Image Analysis System を用いて、約200個の腫瘍細胞の平均 AgNOR カウントおよび面積を求めた。DNA 量

については Quantative Ploidy Analysis Program を用いて算出した。

約200個の腫瘍細胞核の平均 DNA 量の histogram から、① DNA ploidy パターン、② diploid rate (2c rate)、③ tetra ploid 以上 (4c+rate) を算出した。

Aneuploid 腫瘍の AgNOR カウントおよび腫瘍細胞面積は、Diploid のものにくらべ有意に ($P < 0.05$) 高値であった。また、Ag NOR カウントと 4c+rate との間には相関を認めた。

以上のことから、胆管癌における DNA ploidy および AgNOR カウントは、予後判定上有用であると考えられた。

(長見晴彦、島根医科大学第一外科学教室)