

中尾治彦(長崎県)昭和30年1月25日生

授与年月日 平成3年3月31日

主論文 Study on Immunosuppressive Substance in Gastric Cancer

### 論文内容の要旨

#### 緒言

担癌患者血清中における免疫抑制因子の存在が近年多数報告されているが、藤井らにより大腸癌患者の腹水中より分離された Immunosuppressive Substance (以下 IS 物質)は、分子量52,000の糖タンパク質である。IS 物質の臨床的意義を明らかにする目的で胃癌患者において血清 IS 濃度を測定するとともに進行度、各種免疫能、手術との関連を検討し、併せて精製 IS 物質を用い、in vitro での PHA リンパ球幼若化能、NK 活性、LAK 活性に対する影響を検討した。

#### 対象及び方法

血清 IS 濃度の測定は、胃癌73例と対照として良性疾患20例、健常者15例を用いた。血清 IS 濃度の測定は、抗 IS 家兎血清プレートによる single radial immunodiffusion 法により行なった。

リンパ球幼若化能の測定は、 $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みを RI 法により求めた。NK 活性の測定は、標的細胞として  $^{51}\text{Cr}$  でラベルした K562 を用い、E:T 比、40:1 で行なった。LAK 活性の測定は、リコンビナント・インターロイキン 2 (以下 rIL2) 20 単位/ml を加え、48 時間培養後、標的細胞に  $^{51}\text{Cr}$  でラベルした RAJI を用い、E:T 比、40:1 で行なった。また、精製 IS 物質(呉羽科学工業研究所提供)を培養液中に添加し、その in vitro での作用機序を検討した。なお、測定結果の統計処理は、測定値を平均±標準偏差で示し、有意差検定は Student t test を用いた。

#### 結果

血清 IS 濃度は、胃癌症例で、 $661 \pm 230 \mu\text{g/ml}$  に対し、健常群、良性疾患群でそれぞれ、 $507 \pm 104 \mu\text{g/ml}$ 、 $527 \pm 119 \mu\text{g/ml}$  であった。進行に伴う病期別の検討では、stage I :  $541 \pm 118 \mu\text{g/ml}$ 、stage II :  $618 \pm 267 \mu\text{g/ml}$ 、stage III :  $696 \pm 237 \mu\text{g/ml}$ 、stage IV :  $898 \pm 413 \mu\text{g/ml}$  となり、stage III, IV では有意に高値 ( $P < 0.01$ ) を示した。 $700 \mu\text{g/ml}$  以上を陽性として stage ごとの陽性率を検討すると健常者群が 5.9%、良性疾患群が 9.1% に対し、stage I : 10.3%、stage II : 25.0%、stage III : 52.4%、stage IV : 66.7% と病期の進行とともに陽性率も増加した。 $1,000 \mu\text{g/ml}$  以上を示した 11 例はすべて進行癌であり、その 73% は stage IV であった。リンパ節転移度別の血清 IS 濃度は  $n_0 : 545 \pm 117$

$\mu\text{g/ml}$ 、 $n_1 : 629 \pm 262 \mu\text{g/ml}$ 、 $n_2 : 876 \pm 438 \mu\text{g/ml}$ 、 $n_3 : 843 \pm 351 \mu\text{g/ml}$  で、それぞれの陽性率は 12%、30%、69%、58% となった。また  $1,000 \mu\text{g/ml}$  以上の症例はすべてリンパ節転移陽性であった。

手術との関連では、手術後、血清 IS 濃度は一過性的上昇を示し、3 週間後より治癒切除症例では術前より低値となるが、非治癒切除例では 3 カ月以上経過後に術前レベルとなり、非切除例では上昇をしたままであった。

リンパ球サブセットの CD4/8 比と血清 IS 値を比較すると血清 IS 値が増加すると CD4/8 比は低下し、負の相関を示し、その相関係数は  $-0.51$  であった。

リンパ球幼若化能は血清 IS 値が増加すると S.I. は低下し負の相関を示し、その相関係数は  $-0.46$  であった。NK 活性、LAK 活性ともに血清 IS 値の増加とともにそれぞれの活性値は低下し、NK 活性、LAK 活性は血清 IS 値と負の相関を示し、それぞれの相関係数は、NK 活性が  $-0.54$ 、LAK 活性が  $-0.62$  であった。

リンパ球幼若化能で、培養液中に精製 IS 物質を添加した群の S.I. は非添加群の  $97.6 \pm 32.9$  に対し、 $500 \mu\text{g/ml}$  群で  $87.0 \pm 30.3$  (抑制率 89.4%)、 $1000 \mu\text{g/ml}$  群で  $70.0 \pm 28.1$  (抑制率 71.0%) であった。

NK 活性測定前に培養液中に IS 物質  $1,000 \mu\text{g/ml}$  を添加し 20 時間培養したときには、非添加群の活性値が  $56.4 \pm 13.1$  に対し、添加群では  $51.1 \pm 13.4$  と軽度の抑制がみられた ( $P < 0.05$ )、これに対し、assay 時に IS 物質を加えた場合の活性値は  $56.0 \pm 12.5$  で NK 活性の抑制はみられなかった。

LAK 活性は非添加群で  $50.1 \pm 11.2$  に対し、rIL2 培養液中に精製 IS 物質を添加すると、 $500 \mu\text{g/ml}$  群で  $41.6 \pm 9.6$ 、 $1000 \mu\text{g/ml}$  群で  $28.7 \pm 7.8$  となり、濃度依存性の抑制が得られた。抑制率は  $500 \mu\text{g}$  は  $500 \mu\text{g/ml}$  群で 83.0% ( $P < 0.01$ )、 $1000 \mu\text{g/ml}$  群で 57.3% ( $P < 0.01$ ) であった。assay 時に精製 IS 物質を加えた際の活性値は  $47.6 \pm 11.5$  となり、抑制はみられなかった。

#### 結果と考察

血清 IS 濃度は胃癌の進行とともに上昇し癌の進行度の予測に有用であったが、早期癌での陽性率は低く癌のスクリーニングとしては不適合であった。各種の免疫状態のパラメーターとの比較検討では、CD4/8 比、リンパ球幼若化能、NK 活性、LAK 活性と血清 IS 濃度との比較検討ではいずれも負の相関を示し、血清 IS 値が担癌患者の免疫抑制状態を反映することが判明した。IS 物質の免疫抑制機序については、末梢リンパ球より産生された IS 物質が末梢リンパ球に作用して種々の免疫抑制を示すことが知られているが、今回の実験では T 細胞の幼若化の抑制が PHA を用い

た培養時に IS 物質に培養液中に添加することにより濃度依存性に得られた。このことは、IS 物質による T 細胞幼若化の抑制が T 細胞の PHA に対する応答能の抑制によるものと推測された。

また NK 活性については抑制が軽度であったが、LAK 活性は強い抑制が見られた。それぞれの抑制作用は、NK 活性、LAK 活性とも cytotoxic assay 前に IS 物質を添加した培養液中で NK 細胞や LAK 細胞を培養することにより cytotoxicity の抑制がみられたが、cytotoxic assay 時に IS 物質を混入しても抑制効果はなかった。これらの事実より、LAK 活性に対する IS 物質の抑制効果は IL-2 に対する LAK 細胞の反応性の抑制に基づくものと推測された。

#### 論文審査の結果の要旨

中尾治彦は昭和54年3月長崎大学医学部卒業後、長崎大学医学部附属病院、北九州市立八幡病院、大分県立病院、三菱病院、田川市立病院、佐世保中央病院などを歴任し、外科の修練を重ねながら消化器外科に専任し、胃癌における免疫機構に関する研究を行いながら平成2年6月主論文 Study on Immunosuppressive Substance in Gastric Cancer を完成し、参考論文26篇を附して長崎大学医学部研究科委員会に医学博士の学位を申請した。

長崎大学医学部研究科委員会はこれを平成3年1月23日の定例委員会に付議し論文内容の要旨を検討し研究歴を審査した結果受理して差支えないものと認めたので上記の通り審査委員を選定した。委員は主査を中心として慎重審査の上に平成3年3月20日の定例委員会でその結果を報告した。

主論文は、大腸癌患者の腹水中より分離された immunosuppressive substance (IS) の臨床的意義について、胃癌症例について検討した。併せてリンパ球幼若化能、NK 活性、LAK 活性との関連性についても検討した。

対象として胃癌73例について良性疾患20例、健常者15例と対比して血清 IS 濃度を測定し検討した。IS 測定には抗 IS 家兎血清プレートによる single radial immunodiffusion 法によって行った。リンパ球幼若化能は<sup>3</sup>H-thymidin 取込みを RI 法で、NK 活性<sup>51</sup>は Cr でラベルした K562 を標的細胞として用い E/T 比 40/1 で行った。LAK 活性 interleukin2 20 単位/ml 加え 48 時間培養後、標的細胞を<sup>51</sup>Cr でラベルし E/T 比 40/1 で、精製 IS 物質を培養液中に添加して行った。

その結果は、血清 IS 濃度をみると胃癌の病期進行で高値を示し Stage III IV では有意に高値 (P < 0.01) を示した。リンパ節転移からみると血清 IS 濃度 1000 μg/ml 以上の症例ではすべてリンパ節転移陽性であった。手術との関係では術後一過性に上昇し 3 週間目より低

下するが、非治癒切除では上昇したままであった。CD 4/8 比と血清 IS 濃度をみると負の相関 (-0.51) を示した。リンパ球幼若化能は血清 IS 上昇で低下し、負の相関 (-0.46) を示したが、NK 活性に対する抑制は軽度であるのに対し、LAK 活性に対しては強い抑制がみられた。

また、血清 IS 濃度は胃癌の病期進行に比例して増加し予測に有用であった。免疫状態を評価するパラメーターとの関係を CD 4/8 比リンパ球幼若能 NK 活性 LAK 活性でみると何れも負の関係を示し、IS が免疫抑制状態を示す指標となることを明らかにした。また IS 物質が T 細胞の PHA に対する応答能の抑制および LAK 活性からみて IL-2 に対する LAK 細胞の反応性を抑制することが示唆された。

胃癌における血清 IS 濃度は早期の診断のスクリーニングには適さないが進行度判定に有用であること、免疫抑制状態をよく反映することが臨床的にリンパ球幼若能 NK 活性 LAK 活性より明らかにしたが、その機序は T 細胞の PHA に対する応答能の抑制および LAK 細胞の IL-2 に対する反応性の抑制にあることを明らかにしたもので、従来から IS の胃癌に対する臨床的意義を明らかにした研究は殆んどみられず、胃癌進行に対する IS の意義を明らかにしたもので胃癌治療に新しい知見を与えたもので合格とした。

審査担当者 主査 教授 富田 正雄  
副査 教授 原 耕平  
副査 教授 珠 玖 洋