

子宮頸癌領域リンパ節におけるリンパ球サブセットの出現態度と その免疫学的意義に関する検討

神戸大学医学部産科婦人科学教室

衣笠 万里 赤堀泰一郎 望月 真人

兵庫県立成人病センター産婦人科

長谷川和男

Distribution of Lymphocyte Subsets in Regional Lymph Nodes in Uterine Cervical Cancer and its Immunological Significance

Masato KINUGASA, Taiichiro AKAHORI and Matsuto MOCHIZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Kobe University School of Medicine, Kobe

Kazuo HASEGAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical Center for Adults, Hyogo

概要 子宮頸癌領域リンパ節の免疫学的意義を追求するために、広汎性子宮全摘術施行症例の摘出リンパ節におけるリンパ球サブセットの出現態度をモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に観察し、同時に頸癌の進行度やリンパ節転移の有無との関係についても検討を加えた。用いた抗体はそれぞれ pan T, killer/suppressor T, helper/inducer T cell を識別するといわれる抗 Leu 1, 抗 Leu 2, 抗 Leu 3 抗体および NK/K cell を識別するとされる抗 Leu 7, 抗 Leu 11 抗体である。

非転移リンパ節の検討では Leu 11 陽性細胞を除くいずれの細胞も Ib 期非転移群で最も著明に出現し、Ia 期や Ib 期転移群および II 期症例ではその出現は比較的少数であつた。転移リンパ節について転移病巣が微小なものと広範なものとを比較すると、前者において明らかに各細胞の出現が優勢であり、ことに Leu 7 陽性細胞の出現程度は非転移症例以上であつた。

つまり、領域リンパ節における各種免疫担当細胞の出現態度は原発巣や転移巣の tumor volume と密接に関係しており、これらリンパ節が子宮頸癌に対する宿主の免疫学的 Barrier として重要な意義を有していることがリンパ球サブセットレベルで推察された。また転移リンパ節といえども転移巣の大きさによつてはなお活発な免疫能を保持していることが示唆された。

Synopsis We performed an immunohistochemical study on the distribution of lymphocyte subsets in the regional lymph nodes in uterine cervical cancer. The lymph nodes from patients with cervical cancer were stained with monoclonal antibodies to Leu 1,2,3 and 7, as the indicators of pan T, killer/suppressor T, helper/inducer T, and NK/K cells, respectively.

On the lymph nodes without tumor involvement, there were a greater number of lymphocytes of each subset in the nodes in stage Ib without nodal metastasis than in the nodes in stage Ia and stage Ib with nodal metastasis and stage II, suggesting that the regional lymph nodes have active immune reactions in stage Ib cancer without nodal metastasis.

On the lymph nodes with tumor involvement, there were great numbers of lymphocytes of each subset, especially Leu 7⁺ cells, in the nodes with local invasion, suggesting that very strong immune reactions occur in these nodes. On the other hand, there were very few lymphocytes in the nodes with diffused tumor.

The present findings suggest that regional lymph nodes in cervical cancer play important roles in antitumor immune response and, furthermore, even the tumor-involved lymph nodes are of great immunological significance if the metastatic tumor is localized.

Key words: Uterine cervical cancer • Regional lymph node • Monoclonal antibody • Immunohistochemistry

緒 言

近年、腫瘍免疫における生体防御の場として領

域リンパ節の臨床免疫学的意義に関する報告は多い。それらの報告は、主に領域リンパ節の形態学

的所見とリンパ節転移の有無および予後との関係からその意義を論じたもの⁸⁾¹⁹⁾²⁴⁾と採取したリンパ球の *in vitro* cytotoxic assay などによつて癌患者の局所免疫能を機能面から検討したもの¹³⁾¹⁴⁾

とに大別される。近年、リンパ球膜抗原に対する各種モノクローナル抗体の出現により、組織切片上で *in situ* におけるリンパ球の機能をある程度把握することが可能となり新たな局面が開かれ

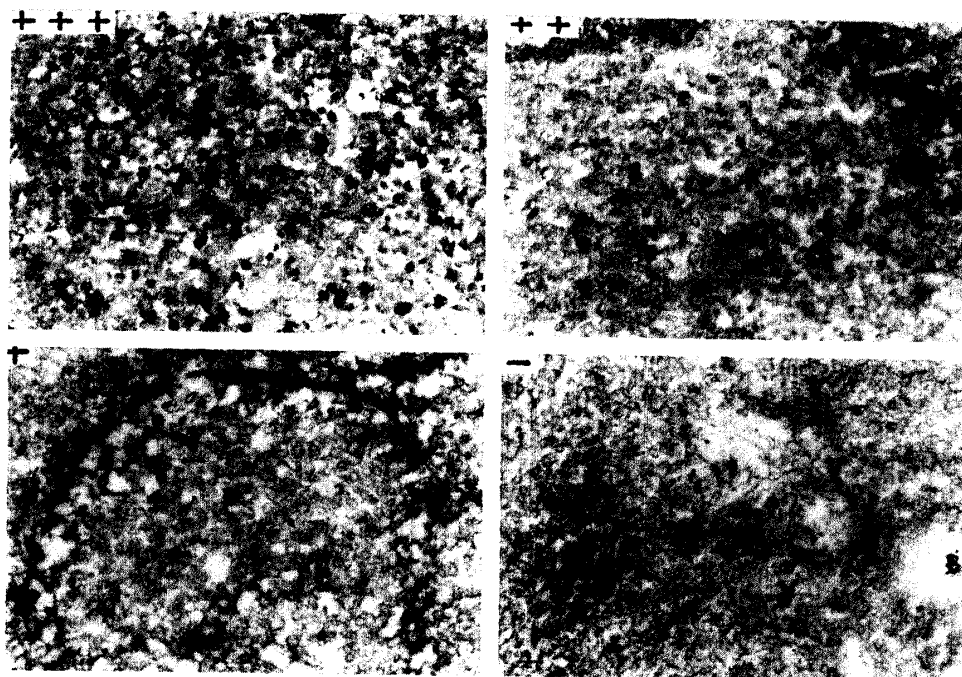


写真1 Leu 7陽性細胞の出現程度の評価基準

++：胚中心において平均50/hpf以上の陽性細胞を認めるもの、++：胚中心において平均10～50/hpfの陽性細胞を認めるもの、+：胚中心において平均10/hpf未満の陽性細胞を認めるもの、-：ほとんど陽性細胞を認めないもの。

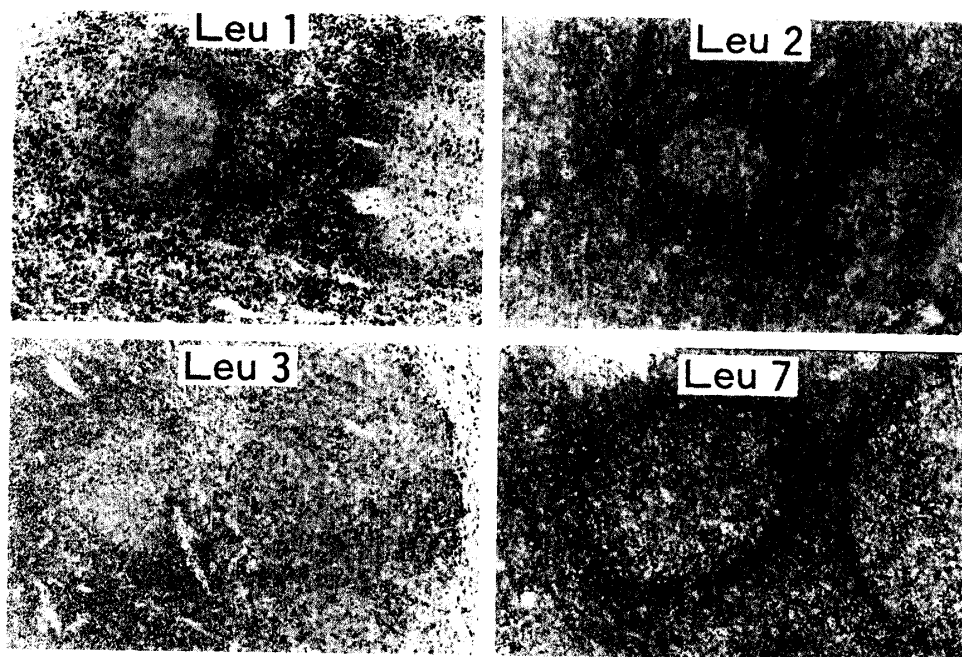


写真2 非転移リンパ節におけるリンパ球各サブセットの出現態度

た。そこで著者らはすでに子宮頸癌領域リンパ節の病理組織像と臨床進行期や予後との関係を報告したので²⁾、今回はモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に領域リンパ節におけるリンパ球サブセットの出現態度とその意義について検討した。

研究対象および方法

広汎性子宮全摘術を行つた臨床進行期 I, II 期の子宮頸癌患者35例を対象とした。症例の内訳は Ia 期 8 例, Ib 期13例(うちリンパ節転移例 4 例), II 期14例(うちリンパ節転移例 4 例)で、平均年齢は 50.9 ± 10.9 歳であつた。リンパ節転移症例に

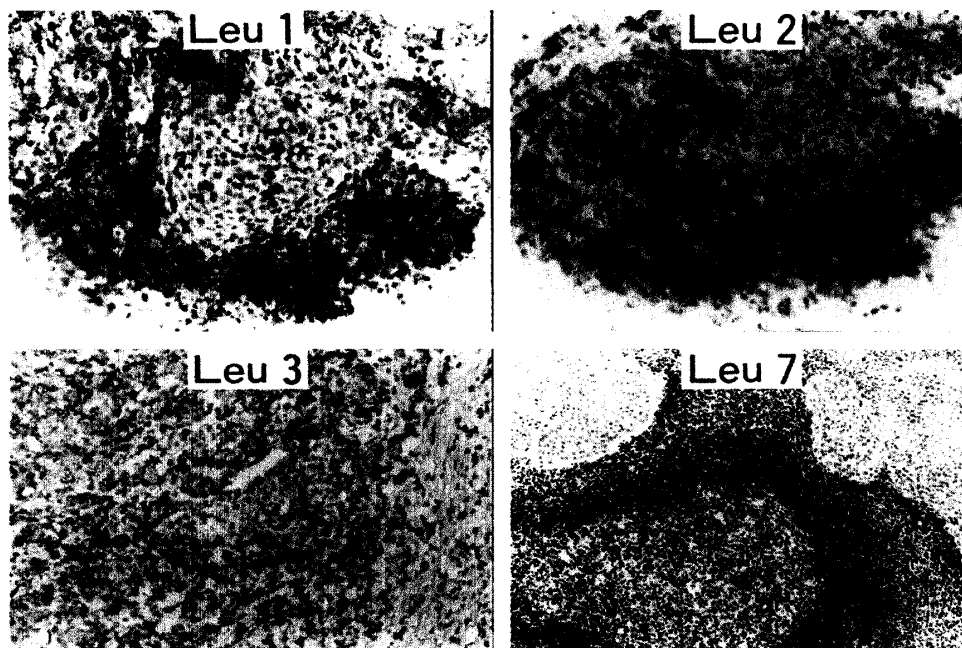


写真3 微小転移巣を有するリンパ節におけるリンパ球各サブセットの出現態度

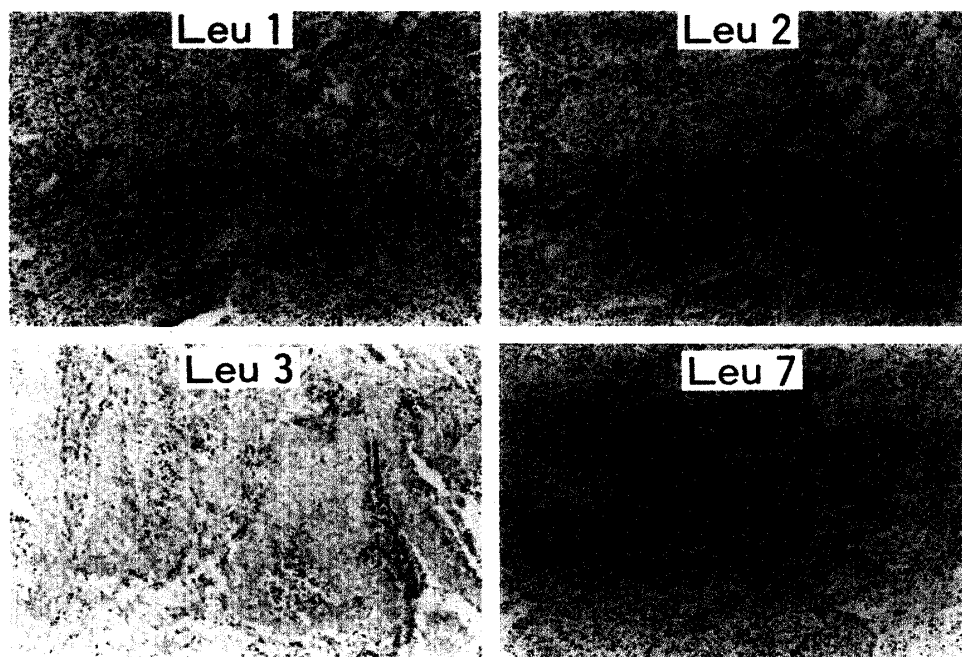


写真4 広範な転移巣を有するリンパ節におけるリンパ球各サブセットの出現態度

おける転移部位は総腸骨節1例、外腸骨節4例、閉鎖節4例、基靱帯節1例（重複例を含む）であった。

それら症例の摘出リンパ節の一部（非転移節37個、転移節8個）を半切し、半分は他のリンパ節とともにホルマリン固定、パラフィン包埋の後、病理学的検索に供し、残り半分から免疫染色用に凍結切片を作成した。病理学的検索にあたっては、リンパ節の腫大の有無にかかわらずそれぞれ最大割面からの切片を作成し転移の有無を検索した。一方、凍結切片はアセトン固定後にABC法による免疫染色に付した。一次抗体はBecton Dickinson社製のモノクローナル抗体Leuシリーズのうち、それぞれpan T, killer/suppressor Tおよびhelper/inducer T cellを識別するといわれる抗Leu 1(CD5), 抗Leu 2(CD8), 抗Leu 3(CD4)抗体, さらにnatural killer/killer cell (NK/K cell)を識別するといわれる抗Leu 7, 抗Leu 11(CD16)抗体を用いた。二次抗体はビオチン化された抗マウスおよび抗ウサギIgG抗体(Lipshaw/Immunon社製)を用い、その後アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(ABC, Lipshaw/Immunon社製)を反応させジアミノベンジジン(DAB)で発色させた。

写真1にLeu 7陽性細胞の出現程度の評価基準を示したが、他の細胞についても同様に一視野あたりの陽性細胞数や陽性細胞が分布する領域の拡がりなどを基準にその出現程度をほとんど認められない(－)から著明に出現している(＋＋)まで4段階に分類した。そして非転移節では臨床進行期や転移の有無と各リンパ球サブセットの出現程度との関係を、転移節では転移巣の大きさとそれらの出現程度との関係を検討した。

研究成績

1. 非転移リンパ節について

1) リンパ球各サブセットの出現態度

写真2は非転移リンパ節における各サブセットの出現態度を示したものである。Leu 1陽性細胞は傍皮質領域に豊富に認められ、胚中心にも散在性に分布していた。Leu 2陽性細胞は主に傍皮質領域に散在性に認められ、胚中心にはほとんど認

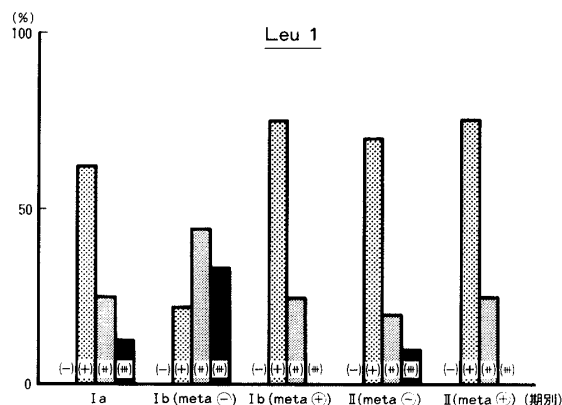


図1 非転移節におけるLeu 1陽性細胞の出現程度と臨床進行期およびリンパ節転移の有無との関係

められなかつた。Leu 3陽性細胞はLeu 1陽性細胞とほぼ同様の分布を示した。Leu 7陽性細胞はよく発達した胚中心に比較的豊富に認められ、傍皮質領域や髄質にはほとんど認められなかつた。Leu 11陽性細胞はどの部位にもほとんど認められなかつた。

2) 臨床進行期および転移の有無と出現程度との関係

Leu 1陽性細胞はIa期では比較的少数の出現がみられる(+)症例の比率が高いのに反して、Ib期非転移群で著明に出現する(++)または(+++)症例の比率が高かつた。Ib期転移群やII期では転移群、非転移群とも(+)症例の比率が高かつた(図1)。

Leu 2陽性細胞はIa期で(+)症例の比率が高いのに対して、Ib期非転移群では(++)症例の比率が高く、Ib期転移群やII期ではその出現の認められない(－)症例がかなりみられた(図2)。

Leu 3陽性細胞は、Ib期非転移群で(++)および(+++)症例の比率が高かつたが、Ia期やIb期転移群およびII期症例では(+)症例がきわめて高率で、(++)や(+++)症例は低率であつた(図3)。

Leu 7陽性細胞の出現程度はLeu 1, 2, 3陽性細胞に比して全体的に乏しく、(－)症例の比率が高かつた。臨床進行期との関係ではIb期非転移群は75%の症例にLeu 7陽性細胞の出現を認めたが、Ia期やIb期転移群およびII期症例ではLeu 7陽性細胞の出現症例は50%以下であつた(図4)。

2. 転移リンパ節について

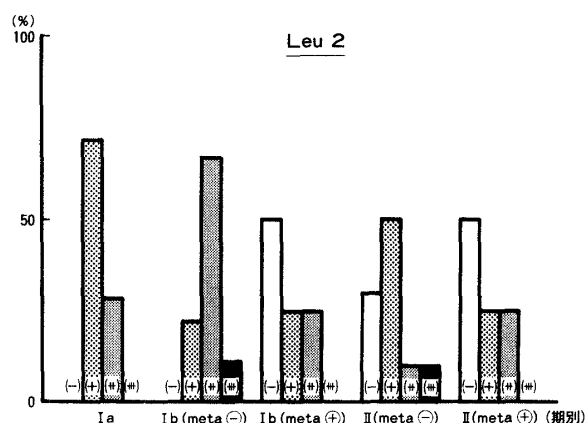


図2 非転移節における Leu 2陽性細胞の出現程度と臨床進行期およびリンパ節転移の有無との関係

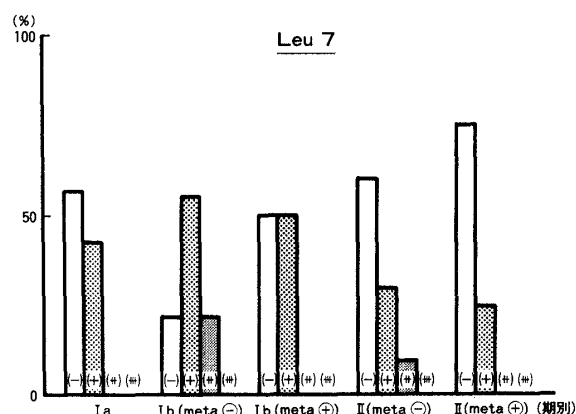


図4 非転移節における Leu 7陽性細胞の出現程度と臨床進行期およびリンパ節転移の有無との関係

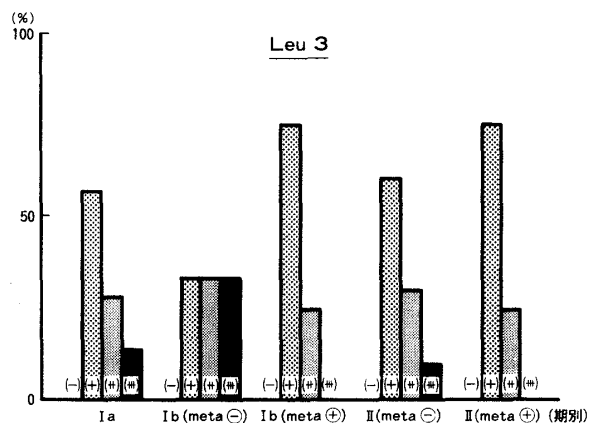


図3 非転移節における Leu 3陽性細胞の出現程度と臨床進行期およびリンパ節転移の有無との関係

1) リンパ球各サブセットの出現態度

写真3のように辺縁に微小転移巣を有するリンパ節では Leu 1, 3陽性細胞は腫瘍を取り囲むように密集して認められ, Leu 2陽性細胞も散在性に認められた. Leu 7陽性細胞は腫瘍周囲の胚中心内に豊富に認められ, さらに腫瘍に近接した部位にも比較的多数認められた.

一方, 写真4のように広範な転移巣を有するリンパ節では Leu 1, 2, 3, 7陽性細胞のいずれもその出現は乏しく散在性に認められた.

2) 転移巣の大きさと出現程度との関係

転移巣がリンパ節全体の10%未満のものをS群, それ以上の大きい転移巣を有するものをL群とし, 両群間で Leu 1, 2, 3, 7陽性細胞の出現程度を比較した. S群ではいずれの細胞も豊富に認められる症例の比率が高く, ことに Leu 7陽性細胞

の出現程度は非転移症例におけるよりも著明であつた. 一方, L群ではいずれの細胞もその出現は乏しく, とくに Leu 7陽性細胞の出現が認められた症例は25%程度であつた(図5).

考 案

腫瘍免疫における領域リンパ節の役割は Crile¹⁰⁾¹¹⁾や Fisher et al.¹⁵⁾¹⁶⁾を初めとする多くの研究によつて次第に明らかにされつつある. 人癌においては主にリンパ節の形態像と予後との関連から, 領域リンパ節の免疫学的 Barrier としての意義を追求した報告が多数みられる⁵⁾⁸⁾²⁴⁾. 著者らは子宮頸癌領域リンパ節の病理組織像が臨床進行期や予後と深く関わっており, 局所における宿主の免疫能を反映していることをすでに報告した²⁾.

近年, モノクローナル抗体の出現によつてリンパ球の分画をある程度識別することが可能となり, 組織切片上で *in situ* にリンパ球の機能を捉えることができるようになった¹²⁾¹⁸⁾. その結果, 消化器癌などにおいては免疫組織学的手法で領域リンパ節のリンパ球サブセットの出現態度とリンパ節転移率との関係などの検討がすでになされている⁴⁾⁶⁾²²⁾. 著者らは子宮頸癌における領域リンパ節の臨床免疫学的意義を機能的な側面から捉えるために, 各リンパ球サブセットの出現態度を免疫組織学的に観察し, 臨床進行期やリンパ節転移の有無, さらにその転移巣の大きさとの関連性について検討を行つた.

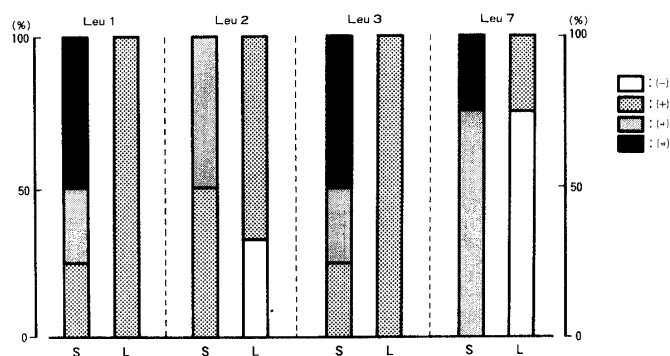


図5 転移節におけるリンパ球各サブセットの出現程度と転移巣の大小との関係

S: 微小転移巣を有するリンパ節, L: 広範な転移巣を有するリンパ節

非転移リンパ節の検討においては pan T, killer/suppressor T および helper/inducer T cell に相当する Leu 1 (CD5), Leu 2 (CD8), Leu 3 (CD4) 陽性細胞はいずれも Ia 期で少数の出現しか認められない症例の比率が高かったのに対して, Ib 期非転移群では著明に出現する症例の比率が高くなった。また Ib 期転移群や II 期症例では Ia 期と同様に少数の出現しかみられない症例の比率が高かった。以前の著者らの病理組織学的検討でも, 傍皮質領域のリンパ節全体に対する面積比が I 期症例で最も大きく, II 期以上の進行癌では小さくなる傾向が認められている²⁾。今回の成績は領域リンパ節における細胞性免疫能が早期癌の間は比較的良好であるが, 臨床期の進行とともに低下していく傾向をリンパ球の機能をも加味した立場から裏付けるものであった。

一方, 著者らの病理組織学的検討では傍皮質領域の発達程度に関して Ia 期と Ib 期非転移群との間にほとんど差がみられなかった²⁾が, 今回の検討では Ib 期非転移群においてリンパ球各サブセットの出現が最も著明となり, Ia 期ではむしろ乏しいという結果が得られた。これは Ia 期という微小浸潤癌では原発巣からの抗原刺激が弱いために免疫担当細胞の出現が乏しく, Ib 期になると原発巣からの抗原刺激が強くなり領域リンパ節へのそれらの動員が活発になるためと解釈できるかもしれない。これに関連して Check et al.⁹⁾は乳癌症例の領域リンパ節で腫瘍に対して近位のものと遠

位のものと二者を比較することにより, 腫瘍からの抗原刺激がある程度以上にならないとリンパ節内リンパ球の細胞障害活性が上昇しないことを指摘しており興味深い。

また, 同じ Ib 期であつても転移群と非転移群のリンパ節の間で各 T cell サブセットの出現態度に差の認められたことは, 他臓器の悪性腫瘍においても同様の傾向が確認されており³⁾, 転移症例が予後不良であることの根拠を考えるうえで免疫学的にきわめて興味深い事象であり今後の検討が必要であらう。

Leu 2 陽性細胞の中には killer T cell, suppressor T cell の両者が含まれるといわれるが, そのうちいずれが優勢であるかという問題は腫瘍細胞障害活性の面から重要である。1987年 Takeda et al.²²⁾は胃癌の領域リンパ節において抗 OKT8 (CD8) 抗体および抗 Leu 15 (CD11) 抗体を用いた組織二重染色を行い, OKT8 陽性細胞 (killer/suppressor T cell) においては killer T cell の方が優勢であることを報告している。著者らの抗 Leu 2 抗体を用いた成績は腫瘍免疫の主役を果たすと考えられる細胞障害活性と最も関係している可能性があり興味深い。さらに彼らはリンパ節における Leu 3 陽性細胞の機能を抗 Leu 3 抗体と抗 Leu 8 抗体による二重染色で検討しており, 約 70% は helper T cell であり, 残りの約 30% が suppressor-inducer T cell であつたと報告している。この事実は腫瘍免疫における Leu 3 陽性細胞が免疫促進的な機能を持つと解釈する一つの根拠となると考えられ, 著者らの抗 Leu 3 抗体を用いた成績は Ib 期では腫瘍細胞障害活性のみならず, それらを誘導するヘルパー機能も活発となつている可能性を示唆するものである。

一方, 田村ら⁷⁾は子宮頸癌原発巣における浸潤リンパ球に含まれる T cell サブセットについての検討で Leu 2 および Leu 3 陽性細胞はいずれも Ib 期に比して II 期ではその出現が減少していることを指摘している。

Leu 7 陽性細胞 (NK/K cell) に関する検討では領域リンパ節内ではよく発達した胚中心に比較的豊富に認められ, さらに T cell サブセットと同様

に Ib 期非転移群でその出現が最も著明となり, Ia 期や Ib 期転移群, II 期群では比較的乏しい傾向にあった. 一方, NK 活性を最も反映すると考えられる Leu 11 (CD16) 陽性細胞は胚中心内にほとんど認められなかつた. これに関して Mori et al.²⁰⁾は, リンパ節の胚中心にみられる Leu 7 陽性細胞の多くは機能的に充分成熟しておらず分化の途上にあるが, しかし胚中心において NK/K cell の分化, 成熟が促進され, 末梢血において細胞障害性を発揮している可能性もあると推察している. また著者らは頸癌患者の末梢血において早期癌症例で NK 活性が比較的高く, 進行癌症例ほどそれが低下していることを以前に報告しており¹⁾, 今回の成績と合わせ考察すると, Leu 7 陽性細胞を腫瘍に対する免疫 Barrier として考えれば, 頸癌 Ib 期非転移群において胚中心内の Leu 7 陽性細胞の出現が最も著明となり, その結果末梢血の NK 活性が高くなるという推論も成り立つかもしれない.

一般に転移リンパ節ではすでに抗腫瘍免疫能はほとんど失われているとする報告が多い³⁾²³⁾. しかし, これらの報告はいずれも転移リンパ節のリンパ球を用いて in vitro に免疫学的パラメーターの測定を行つたものであり, リンパ節において分裂, 増殖過程にある比較的幼若なリンパ球も多く含まれている可能性が無視されており, 転移巣の大小についても何ら考慮が加えられていない. 著者らの転移リンパ節における転移巣の大きさと各リンパ球の出現態度との関係ではいずれのリンパ球も広範な転移巣を有する L 群よりも微小転移巣を有する S 群において豊富に認められた. ことに S 群における Leu 7 陽性細胞の出現が Ib 期非転移群のリンパ節よりもさらに著明であつたことは注目し得る. 著者らは以前に微小転移巣を有する領域リンパ節の病理組織像について検討した際にも, このようなリンパ節では傍皮質領域や胚中心が非常によく発達していることを認めている²⁾が, 今回の検討でもそれを裏付ける結果となつた. またラットに移植されるとリンパ節に転移した後宿主の免疫能を介して自然退縮するという異物化癌細胞に関する Kodama et al. の報告¹⁷⁾や, 大腸癌患者のリンパ節転移陽性症例において転移リ

ンパ節の胚中心の面積と術後の生存率との間に正の相関が得られたという Pihl et al. の報告²¹⁾は著者らの成績を支持するものと言えよう. したがって今後転移リンパ節の免疫能を単に否定的な立場から捉えるよりも, 転移巣の大小を考慮して, これらリンパ節を抗腫瘍免疫の場として認識する必要があるものと考えられる.

稿を終えるに臨み, 兵庫県立成人病センター副院長, 武内久仁生博士および病理検査部長, 指方輝正博士を初めとする病理検査部スタッフの方々の御指導, 御協力に深甚の謝意を表します.

なお本論文の要旨は第25回癌治療学会総会および第40回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した.

文 献

1. 長谷川和男, 衣笠万里, 西野理一郎, 木村あずさ, 大津文子, 武内久仁生: 維持免疫療法を行つた進行子宮頸癌患者のリンパ球サブセットおよび ADCC, NK 活性の動勢について. 日産婦誌, 41: S-171, 1989.
2. 衣笠万里, 赤堀泰一郎, 望月真人, 長谷川和男: 子宮頸癌における領域リンパ節の免疫学的意義に関する病理組織学的検討. 日癌治誌, 24: 7, 1989.
3. 小川健治: 胃癌所属リンパ節の機能的, 形態的抗腫瘍性に関する研究. 日臨外会誌, 42: 101, 1981.
4. 岡林孝弘, 堀見忠司, 合地 明, 小林元壮, 武田功, 平松 聡, 二宮基樹, 吉田栄一, 長江聡一, 向井晃太, 金田道弘, 香川茂雄, 田中紀章, 折田薫三, 小林省二: 胃癌所属リンパ節の免疫組織学的解析. 日消外会誌, 19: 844, 1986.
5. 佐藤安子, 上田外幸, 山崎正人, 吉馴茂子, 早川謙一, 浜中信明, 倉智敬一: 子宮癌所属リンパ節の組織像と予後. 日産婦誌, 27: 175, 1975.
6. 白水玄山, 掛川暉夫, 山名秀明, 戸次史敏, 南 泰三, 藤田博正: 食道癌リンパ節の免疫応答とリンパ節郭清. 消化器外科, 9: 1867, 1986.
7. 田村 元, 神谷博文, 水内英充, 寒河江悟, 工藤隆一, 橋本正淑, 菊地浩吉: 子宮頸癌増殖局所における機能的リンパ系細胞亜群の同定. 医学のあゆみ, 129: 835, 1984.
8. Black, M.M., Kerpe, S. and Speer, F.D.: Lymph node structure in patient with cancer of the breast. Am. J. Pathol., 29: 505, 1953.
9. 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, 1980.
10. Crile, G. Jr.: Rationale of simple mastectomy for clinical stage I cancer of the breast. Surg.

- Gynec. Obstet., 120 : 975, 1965.
11. *Crile, G. Jr.* : The effect on metastasis of removing or irradiating regional nodes of mice. Surg. Gynec. Obstet., 126 : 1270, 1968.
 12. *Dattwyler, R.J.* : T cell antigens defined by monoclonal antibodies : A review. Plasma Ther. Transfus. Technol., 3 : 369, 1982.
 13. *DiSaia, P.J., Rutledge, F.N., Smith, J.P. and Sinkovics, J.G.* : Cell-mediated immune reaction to two gynecologic malignant tumors. Cancer, 28 : 1129, 1971.
 14. *Ellis, R.J., Wernick, G., Zabriskie, J.B. and Goldman, L.I.* : Immunologic competence of regional lymph nodes in patients with breast cancer. Cancer, 35 : 655, 1975.
 15. *Fisher, B. and Fisher, E.R.* : Studies concerning the regional lymph node in cancer. I. Initiation of immunity. Cancer, 27 : 1001, 1971.
 16. *Fisher, B. and Fisher, E.R.* : Studies concerning the regional lymph node in cancer. II. Maintenance of immunity. Cancer, 29 : 1496, 1972.
 17. *Kodama, T., Gotohda, E., Takeichi, N., Kuzumaki, N. and Kobayashi, H.* : Histopathology of immunologic regression of tumor metastasis in the lymph nodes. J. Natl. Cancer Inst., 52 : 931, 1974.
 18. *Lanier, L.L., Engleman, E.G., Gatenby, P., Babcock, G.F., Warner, N.L. and Herzenberg, L.A.* : Correlation of functional properties of human lymphoid cell subsets and surface marker phenotypes using multiparameter analysis and flow cytometry. Immunol. Rev., 74 : 143, 1983.
 19. *Meyer, E.M. and Grundmann, E.* : Lymph node reactions to cancer. Klin. Wochenschr., 60 : 1329, 1982.
 20. *Mori, S., Mohri, N., Morita, H., Yamaguchi, K. and Shimamine, T.* : The distribution of cells expressing a natural killer cell marker (HNK-1) in normal human lymphoid organs and malignant lymphomas. Virchows Arch. [Cell. Pathol.], 43 : 253, 1983.
 21. *Pihl, E., Nairn, R.C., Milne, B.J., Cuthbertson, A.M., Hughes, E.S.R. and Rollo, A.* : Lymphoid hyperplasia. A major prognostic feature in 519 cases of colorectal carcinoma. Am. J. Pathol., 100 : 469, 1980.
 22. *Takeda, I., Horimi, T., Okabayashi, T., Nagae, S., Chono, S., Tokuda, N. and Orita, K.* : Analysis of tissue lymphocytes by double fluorescent staining —Gastric cancer tissue and regional lymph nodes—. Jpn. J. Surg., 17 : 156, 1987.
 23. *Tsakraklides, E., Tsakraklides, V., Ashikari, H., Rosen, P.P., Siegal, F.P., Robbins, G.F. and Good, R.A.* : In vitro studies of axillary lymph node cells in patients with breast cancer. J. Natl. Cancer Inst., 54 : 549, 1975.
 24. *Tsakraklides, V., Anastassiades, O.T. and Kersy, J.H.* : Prognostic significance of regional lymph node histology in uterine cervical cancer. Cancer, 31 : 860, 1973.

(No. 6916 平2・11・6受付)