

A Modified Humoral Leukocyte Adherence Inhibition(H-LAI) Assay and Its Evaluation in Renal Cell Carcinoma

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7834

腎細胞癌における humoral leukocyte adherence inhibition (H-LAI) assay とその臨床的意義に関する研究

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

越 田 潔

(昭和60年11月8日受付)

腎細胞癌 (RCC) に特異的な血清学的診断法の確立を目的に、摘出腫瘍組織から腫瘍関連抗原を抽出し、これを試験抗原とする microplate 法による humoral leukocyte adherence inhibition assay (以下 H-LAI assay と略) の臨床的有用性を検討した。腎細胞癌手術材料より抽出した不溶性分画をデオキシコール酸塩で可溶化し、affinity chromatography により脱アルブミン処理した抗原分画を免疫抗原とし、モルモットに抗血清を作製した。正常ヒト血清により十分に吸収を行った抗血清を用い、Sephacryl S-200 のゲル濾過における抗原活性を測定し、分子量約 60,000 のピークを得た。ついで、同ピーク分画を試験抗原として H-LAI assay を改変した microplate 法の実施条件を検討し、至適白血球数、 5×10^6 cells/ml、至適抗原分画濃度、 $50 \mu\text{g}$ 蛋白/ml、至適被検血清濃度、0.25% という結果を得た。これらの条件に基づいて腎細胞癌症例 50 例を含む 126 例に対して、H-LAI assay を施行した。結果は、adherence index (AI) によって示した。腎細胞癌 50 例における陽性率は、22/50 例 (44%) で、病期分類別に見ると、stage I、9/15 例 (60%)；II、5/9 例 (56%)；III、3/12 例 (25%)；IV、5/14 例 (36%) であり、low stage 群 (stage I, II) に高い傾向にあり、AI においても low stage 群は、high stage 群 (stage III, IV) との間に有意差 ($p < 0.01$) を示した。手術後 3 ヶ月以降の検討では、術前に LAI 陽性であり、術後再発兆候が認められなかった 10 例は、いずれも陰性であったが、術後に再発転移を認めた 6 例では、2 例が陽性を、4 例は陰性を示した。以上より、microplate 法による H-LAI assay は、腎細胞癌の血清学的診断上、有用な一手段と考えられた。

Key words humoral leukocyte adherence inhibition assay, microplate, renal cell carcinoma, tumor-associated antigen

腎細胞癌 (RCC) に対する治療に関して、未だ有効な化学療法は確立されておらず、また放射線療法に対する感受性も低いことより、早期の外科的療法のみが、治癒をもたらすであろうことは論をまたないのが現状である。CT スキャンや超音波などの画像診断の普及は、腎細胞癌の早期発見に大いに貢献しているが、しばしば鑑別診断の困難な症例に遭遇する。この見地より、腎細胞癌の血清学的診断は臨床的に非常に重要な意義を担うのであるが、今までのところ臨床的に有用な腎細胞癌に特異的な腫瘍マーカーは見出されていない。最近、免疫学的診断法の一つとされる白血球附着

阻止試験 (leukocyte adherence inhibition assay, 以下 LAI assay と略) の腎細胞癌における成績が、岡田¹⁾によって報告されているが、これは Grosser ら²⁾の方法に準じた tube LAI assay によるもので、患者の新鮮白血球を必要としている。これに対して、Santer ら³⁾は、患者血清を使用する humoral leukocyte adherence inhibition assay (以下 H-LAI assay と略) により、2、3 の癌の血清学的診断を行っているが、腎細胞癌については触れていない。そこで著者は、腎細胞癌組織より腫瘍関連性の高い抗原を抽出して試験抗原とし、H-LAI 法を改変した microplate 法の実施

Abbreviations: NHS, normal human serum; PBS, phosphate buffered saline; RCC, renal cell carcinoma; RPMI 1640, Rosewell Park Memorial Institute Tissue Culture Medium 1640.

条件を設定後、その臨床的有用性を検討したので、その成績を報告する。

対象および方法

I. 対 象

対象は、組織学的に腎細胞癌と証明された50例 (stage I, 15; II, 9; III, 12; IV, 14), およびその対照群として腎細胞癌以外の泌尿器悪性腫瘍19例 (前立腺癌, 8; 膀胱癌, 4; 睾丸腫瘍, 3; 陰茎癌, 1; 腎盂癌, 1; 尿管癌, 1; 腎悪性組織球腫, 1), 泌尿器良性疾患19例 (尿路結石, 7; 前立腺肥大症, 5; 前立腺炎, 4; 副睾丸炎, 2; 腎盂炎, 1), 健康成人38例の合計126例である。腎細胞癌の病期分類はRobusonら⁴⁾のそれに従った。

II. 抗原の作製

手術時に得られた摘出腎を、腫瘍部分と正常実質部分に分け、生食で洗浄し、脂肪組織、結合組織および壊死部分をできるだけ除去した後にそれぞれ -40°C で凍結保存した。凍結された組織を室温で融解し、Okadaらの方法⁵⁾に従って、不溶性蛋白分画を抽出した。この不溶分画に、5倍容量の0.2%デオキシコール酸ナトリウム液 (sodium desoxycholate, 以下DOCと略)を加えてホモジナイズし、 4°C にて48時間攪拌後、10,000gで30分間冷却遠心して上清を得た。沈渣を再び0.2%DOCで48時間、 4°C で攪拌し、2回の抽出上清を合わせて、これに10倍容量の冷アセントを加えて -20°C で一晩静置し、生じた沈殿を低速遠心で集め、少量の蒸留水に溶かして、3,000gで10分間遠心した。その上清をSephacryl 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)のカラム ($1.5 \times 40 \text{ cm}$)に負荷し、0.1MPBS (pH 7.4)で溶出し、O. D. 280 nmによる低分子のピーク ("pfr 2"と呼ぶ)を集め、冷室における風乾法により10 mg 蛋白/ml前後に濃縮した。ついで、Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia)のカラムを使用して、脱アルブミン処理を行った。すなわち、4gのゲルを蒸留水で膨潤後カラムに充填し、0.1MKCl-0.01Mトリス塩酸バッファー、pH 7.0で平衡後、15 mg 蛋白の抗原を負荷して同バッファーで溶出し、O. D. 280 nmのピークを集めた。これをPBSで透析後、蛋白濃度1.0-2.5 mgに濃縮して -40°C で保存した。なお、蛋白定量はLowry法⁶⁾によった。この段階での抗原収量は腎細胞癌組織10g (湿量)あたり2-5 mgで、これは抽出組織重量の0.02-0.05%に相当した。また、摘出腎より得た健常部腎組織および剖検より得た正常臓器 (肝, 肺, 脾)についても、同様な方法により、"pfr 2"を作製し、正常臓器抗原として使用した。

III. 抗血清の作製および吸収

4個の腎細胞癌組織より、上述の方法により作製した部分精製抗原を用い、体重約400gのモルモット4匹をそれぞれ免疫した。抗原分画0.5 ml (蛋白量0.5-1.25 mg)に等量の Freund's complete adjuvantを加えて乳化し、背筋内数ヶ所に分割注射した。1週間隔で4回免疫後、最終免疫より1週目に心穿刺により全採血し、分離した血清を -40°C で保存した。ヒト血清を結合したBrCN-activated Sepharose 4B (Pharmacia)のカラムに、得られた抗血清を負荷し、0.1M重炭酸ナトリウム液で溶出し、O. D. 280 nmのピークを集めて元の血清量にまで濃縮した。ヒト血清との交差反応が、enzyme-linked immunosorbent assay (以下ELISAと略)で陰性を示すまで、吸収操作を反復した後、硫酸アンモニウム33%飽和によりIgG分画を分離し、PBSで透析後、使用した。

IV. ELISA

96 well microplate (Nunk Immunoplate I-96F, Denmark)を使用し、0.05M重炭酸バッファー、pH 9.6で適当濃度に希釈した抗原資料100 μl をwellに入れ、 4°C で一晩吸着させた。PBS-Tween液 (0.05% Tween 20, 0.15M NaCl, 0.01MPBS)で3回洗浄した後、150 μl の blocking buffer (2%ウシ血清アルブミン含有PBS)を入れ、 37°C で2時間静置した。PBS-Tween液で3回洗浄後、吸収抗血清のIgG分画を0.5%ウシ血清アルブミンを含んだPBS-Tween液で500倍に希釈し、その100 μl を各wellに入れ、 37°C で2時間静置した。3回洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗モルモットIgG家兎抗血清 (Cappel Lab. USA)をPBS-Tween液で2,000倍に希釈し、その100 μl をwellに入れ 37°C で2時間静置後、6回洗浄した。o-フェニレンジアミンを加えて1時間室温で静置後、2.5M H_2SO_4 , 100 μl を加えることにより反応を止め、波長492 nmの吸光度をMicroplate Reader CMR 600 (Dynateck, USA)にて測定した。

V. 分子量測定

Sephacryl 4BおよびBlue Sepharoseにより部分精製された抗原 (蛋白量2.5 mg/ml) 10 mlをAmicon YM 30 filterにより4 mlに濃縮し、これをSephacryl S-200 (Pharmacia)のカラム ($4 \times 86 \text{ cm}$)に負荷し、PBSを溶出液としてゲル濾過を行い、溶出液のO. D. 280 nmの測定と、吸収抗血清を用いたELISAによる抗原の活性測定を行った。

VI. Humoral LAI (H-LAI) 法

健康成人よりヘパリン加末梢血、約20 mlを採取後、滅菌試験管に移し、 37°C で1時間直立静置して、白血球の豊富に含まれた上清を採取した。これを200gで

5分間遠心し、沈渣に血清を含まない RPMI 1640 (以下メディウムとする) を 5ml 加え、ピペットにより洗浄後、再び 200 g で 5 分間遠心した。沈渣に対して蒸留水 4ml を入れ、20 秒間ピペットで軽く攪拌して赤血球を破壊した後、6 ml のメディウムを加えて 5 分間遠心し、沈殿した白血球に対して適量のメディウムを加えることにより、 $4 - 6 \times 10^6$ cells/ml の細胞浮遊液を作製した。これに等量の 0.02% トリプシン (Type I, Sigma, USA) を加え、室温にて 45 分間振盪混和により白血球膜表面を処置した後、メディウムで 2 回洗浄し、細胞数 5×10^6 cells/ml に調整した。先に Sephacryl S-200 を用いて部分精製した抗原分画を PBS で $50 \mu\text{g}$ 蛋白/ml に希釈し、microplate (No.3034, Falcon Plastics Co., USA) にツベルクリン注射器と 26 G 注射針を用い well あたり一滴ずつ落とした。ついで、 5×10^6 cells/ml に調整した白血球を一滴、さらに、メディウムで 0.75% に希釈した腎細胞癌症例あるいは対照群の血清サンプルを一滴加え、 37°C のインキュベーター内に $5\% \text{CO}_2$ 環境下で 90 分間培養した。その後プレートを室温で 10 分間、細胞付着面を下にして静置し、非付着細胞を浮遊させたところで、そのまま生食中にプレートを浸し、上下にゆっくりと 10 回往

復させて、非付着細胞の除去を行った。ついでプレートを 100% メタノールで 10 分間固定し、ギムザ液で 20 分間染色後、メタノールで 10 分間脱色をした上で、一晚室温にて乾燥させ、白血球数を Automatic Particle Counter, CP 2000 system (Shiraimatsu, Japan) により計測した。実験は一検体につき 6-10 well を使用し、その平均値をもって付着細胞数とした。また、以下の式より adherence index (以下 AI と略) を求め、腎細胞癌症例群と対照群を比較検討し、さらに腎細胞癌症例における臨床経過との相関を検討した。

Adherence index (AI) =

(Mean No. cells in wells with antigen - Mean No. cells in wells without antigen) / Mean No. cells in wells without antigen

VII. 統計学的検定法

各群の AI の有意差検定は、Student's t-test により行った。

成 績

I. ELISA の成績

吸収抗血清の 4 例の腎細胞癌抗原および正常臓器抗原に対する dose-response curve の一例を図 1 に示

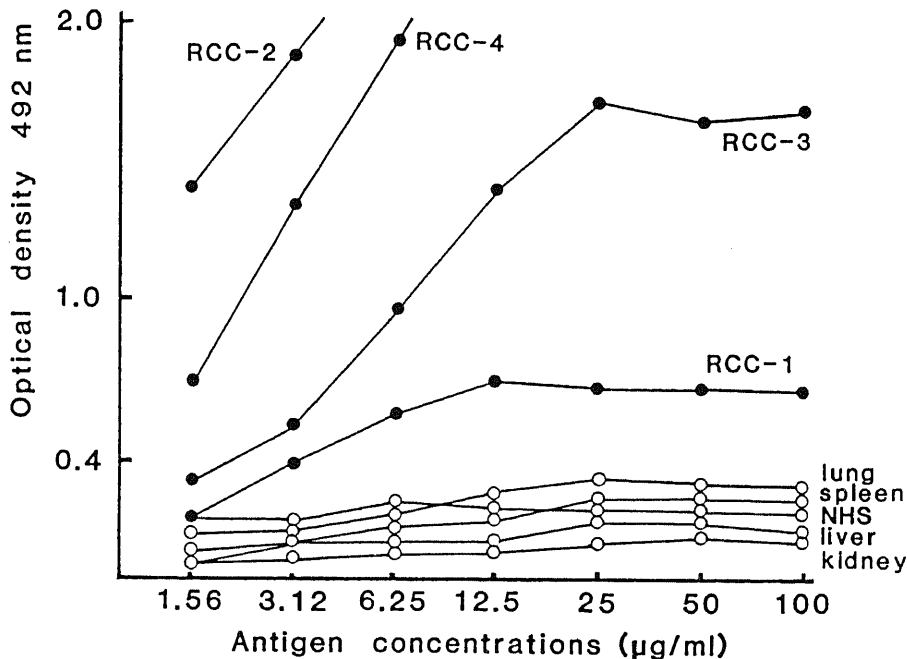


Fig. 1. Dose response curves of antiserum to renal cell carcinomas (RCC 1-4) or several normal tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The tissue extracts from various sources were bound to the wells of a microplate and an antiserum was added. The amounts of reacted antiserum was measured by peroxidase-conjugated anti-guinea pig IgG and o-phenylenediamine, and monitored at 492 nm.

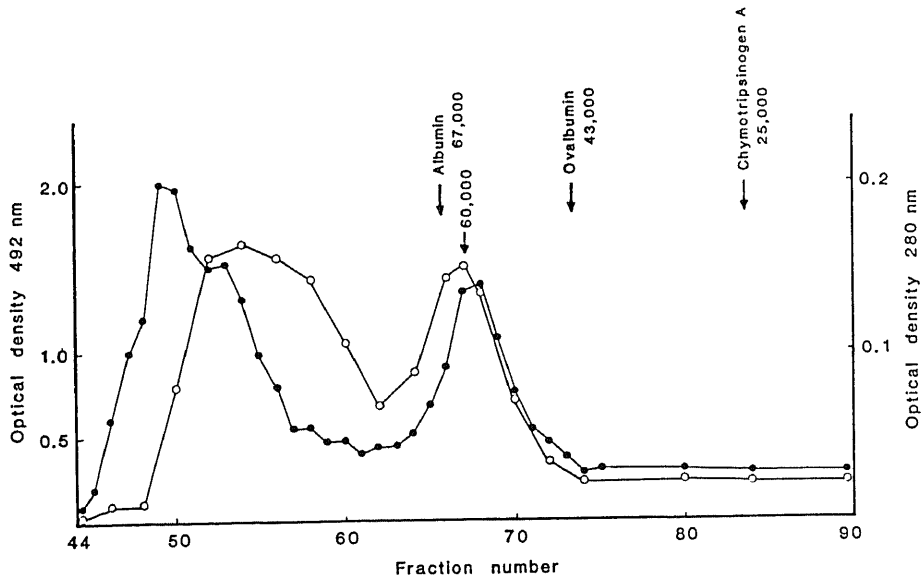


Fig. 2. Sephacryl S-200 chromatographic profile of the antigenic material from renal cell carcinoma. The column was calibrated with proteins of known molecular weight as indicated by arrows. sample, 25 mg protein of RCC extract; flow rate, 18 ml/hr; fraction volume, 3.6 ml; ●—●, optical density at 280 nm; ○—○, optical density at 492 nm.

す。正常ヒト血清により十分な吸収を行った吸収抗血清は、正常腎、肺、肝、脾からの抽出抗原に対しても、ほとんど交差反応を示さなかったが、腫瘍抗原に対しては、明らかに有意な反応を示した。しかし、4例の腫瘍抗原間で図に示すごとく反応強度に差が見られ、しかも免疫抗原に対して最強を示す場合が多かった。分子量マーカーで予めキャリブレーションされた Sephacryl S-200 のカラムにより部分精製抗原分画のゲル濾過を行うと図2のような溶出曲線が得られた。各分画の蛋白濃度を一定とした後、吸収抗血清により抗原活性を測定したところ、O. D. 280 nm のピークと一致して抗原活性のピークが認められた。抗原の最小分子量は約 60,000 と計算された。

II. H-LAI assay の成績

この腫瘍抗原分画を用い、microplate を使用する H-LAI assay を施行するに先立ち、方法の至適条件を明らかにする目的で、下記の予備実験を行った。

1. 至適白血球数の決定

白血球浮遊液濃度を、それぞれ 2.5×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 1.5×10^6 cells/ml として、well あたりの付着細胞数を検討した(図3)。well あたり 500 個以上になると、パーティクルカウンターによる正確な細胞数の算定が困難となるため、 5×10^5 cells/ml を本実験での

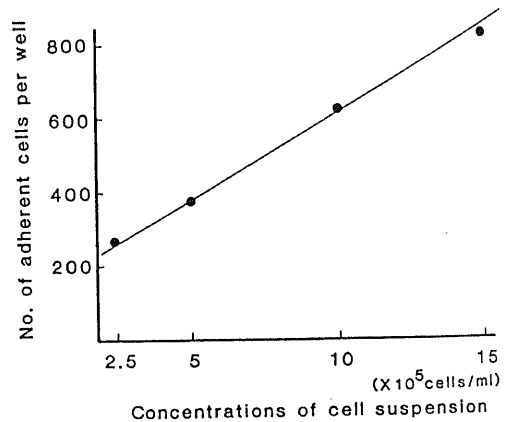


Fig. 3. Determination of optimal cell concentrations in a well for H-LAI assay. Various concentrations of leukocytes were added to microplate wells. After incubation, the adherent cells were stained and counted.

浮遊細胞数とした。これは microplate LAI assay における Goldrosen ら⁷⁾の報告と一致する細胞数であった。

2. 至適抗原濃度の決定

抽出抗原を 12.5, 25, 50, 75, 100 μ g 蛋白/ml の濃

度に調整して、腎細胞癌症例と健康成人、それぞれ3例の血清を用い、H-LAI assayを行った。図4に示すごとく、腎細胞癌症例のAIは抗原濃度50 $\mu\text{g/ml}$ までは、濃度の増加に伴って減少したが、それ以上の濃度では、ほぼ横ばいであった。これに対し、健康成人で

は100 $\mu\text{g/ml}$ までは、抗原量の増加に関係なくほぼ横ばいであった。以上より本実験の抗原分画濃度を50 $\mu\text{g/ml}$ とした。

3. 被検血清濃度

被検血清をメディウムで希釈し、well内での最終濃度を0.05-0.75%とし、腎細胞癌症例と健康成人、それぞれ3例の-40°C保存血清について

Adherence rate (%) =

$$\frac{\text{Mean No. cells in wells with antigen}}{\text{Mean No. cells in wells without antigen}} \times 100$$

およびAIを測定した。図5に示すごとく血清濃度の上昇に伴い adherence rateは抗原の有無にかかわらず低下し、同時にAIも血清濃度0.25%までは低下する傾向が見られた。しかし、0.25-0.75%の範囲では、ほとんど差は認められなかった。本実験では、血清濃度上昇に伴う非特異的付着阻止反応を考慮して、被検血清濃度をwell内最終濃度で0.25%とした。

4. トリプシン処理

Sannerら³⁾の報告に従い、正常ヒト白血球を0.02%トリプシン (Type I, Sigma, USA) で室温にて45分間振盪混和した後、メディウムで2回洗浄し、 5×10^5 cells/mlに調整した。トリプシン処理を行わなかった白血球との間に、wellに対する付着率に差のないことを確認後、腎細胞癌3例、健康成人5例に対して、

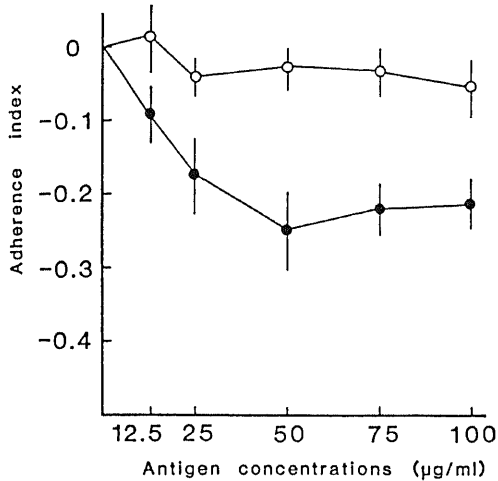


Fig. 4. Effect of antigen concentrations on H-LAI response. Mean values \pm SD were given for each group. \circ , 3 sera from healthy donors; \bullet , 3 sera from RCC patients.

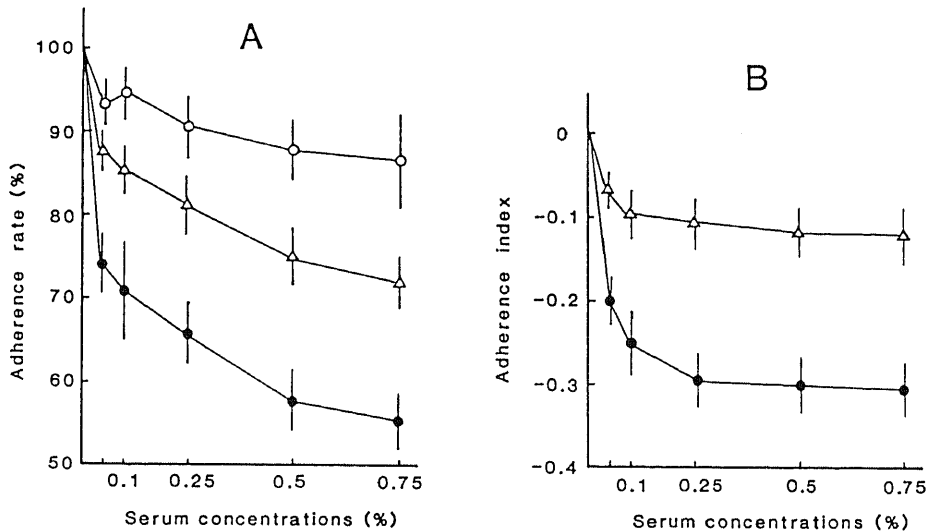


Fig. 5. Effect of serum concentrations on leukocyte adherence rate (A) and adherence index (B). Mean values \pm SD were given for each group. (A): \circ , 6 samples from RCC patients or healthy donors without antigen; \triangle , 3 sera from healthy donors with antigen; \bullet , 3 sera from RCC patients with antigen; (B) \triangle , 3 sera from healthy donors; \bullet , 3 sera from RCC patients.

トリプシン処理の H-LAI assay に対する影響を検討した。図 6 に示すごとく、トリプシン処理を行わなかった白血球を用いた場合は、腎細胞癌群と対照群間に差は認められず、AI は全て -0.1 以内であった。一方、同じ血清サンプルについて、トリプシン処理を行った白血球を用いたところ、対照群では AI に変化を見なかったが、腎細胞癌 3 例はいずれも -0.2 以下に低下した。

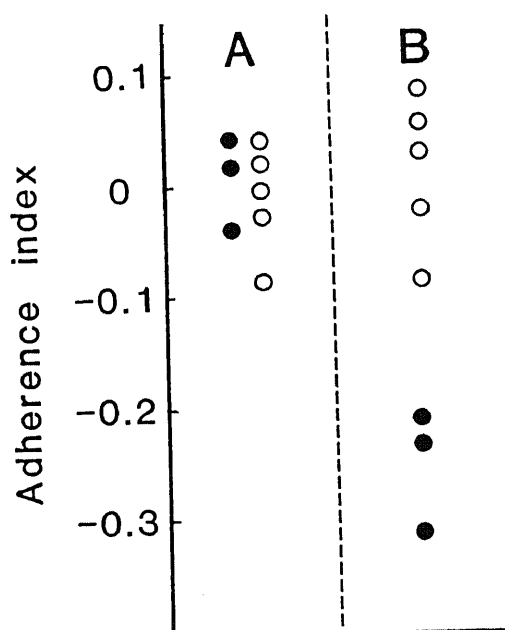


Fig. 6. Effect of mild trypsinization on H-LAI response. A, untreated leukocytes; B, trypsin treated leukocytes; ○, healthy donors; ●, RCC patients.

5. H-LAI assay の成績

表 1 に腎細胞癌の各病期群、および対照群の AI を示す。健康者 38 例の AI は、 -0.06 ± 0.05 (Mean \pm SD), また良性疾患群, 泌尿器悪性腫瘍群では、ともに -0.07 ± 0.06 であった。以上の結果より、Mean $-2SD$ 以下となる -0.2 以下を陽性と判定した。図 7 に各群の AI を図示したが、腎細胞癌の陽性率は、22/50 例 (44%) で、病期分類別に見ると、stage I, 9/15 例 (60%) ; II, 5/9 例 (56%) ; III, 3/12 例 (25%) ; IV, 5/14 例 (36%) であった。一方、対照群においては 76 例中 1 例にのみ陽性例を認めた。次に、図 8 に手術後の follow-up study における AI の動きを示す。術前に LAI 陽性であり、術後再発兆候が認められなかった 10 例 (stage I, 6 ; II, 1 ; III, 3) における術後 3 ヶ月以降の検討では、いずれも陰性であった。一方、術後に再発転移を認めた 6 例では、2 例が陽性を、残り 4 例は陰性を示した。また、これらの症例の術後 1 週目での測定では、すべて陰性であった。

考 察

1972 年、Halliday ら⁸⁾は、hemocytometer を使用して移植腫瘍抗原による担癌マウス白血球の付着阻止試験 (LAI assay) の有用性を報告した。続いてより簡便で再現性の高い tube LAI assay⁹⁾や microplate LAI assay¹⁰⁾が開発され、その有用性が動物移植腫瘍¹¹⁾やヒトの癌¹²⁾において報告されている。LAI の機序に関しては、今なお不明な点が少ないが、Halliday¹³⁾, Holt ら¹⁴⁾は、effector cell は T cell であり、抗原との反応により lymphokine 様物質が放出され、それが白血球の付着を阻止することを報告している。一方、Marti ら¹⁵⁾, Russo ら¹⁶⁾は、腫瘍抗原で感作された B cell より分泌された抗腫瘍 IgG 抗体が、主に monocyte の Fc receptor に付着した状態で腫瘍抗

Table 1. Summary of results

Subjects	No. of patients	No. of positive	Adherence index (Mean \pm SD)
I. Healthy donors	38	0	-0.06 ± 0.05
II. Benign diseases	19	0	-0.07 ± 0.06
III. Other malignancies	19	1	-0.07 ± 0.06
IV. Renal cell carcinoma	50	22	
Stage I	15	9	-0.24 ± 0.14
Stage II	9	5	-0.22 ± 0.13
Stage III	12	3	-0.11 ± 0.18
Stage IV	14	5	-0.13 ± 0.18

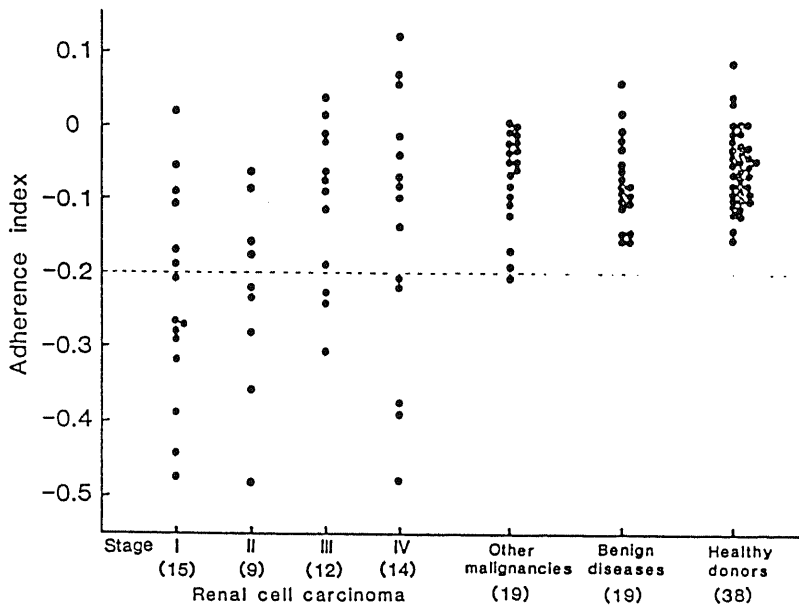


Fig. 7. Adherence index of H-LAI assay in RCC patients and controls. Mean value \pm SD for each group was shown in Table 1.

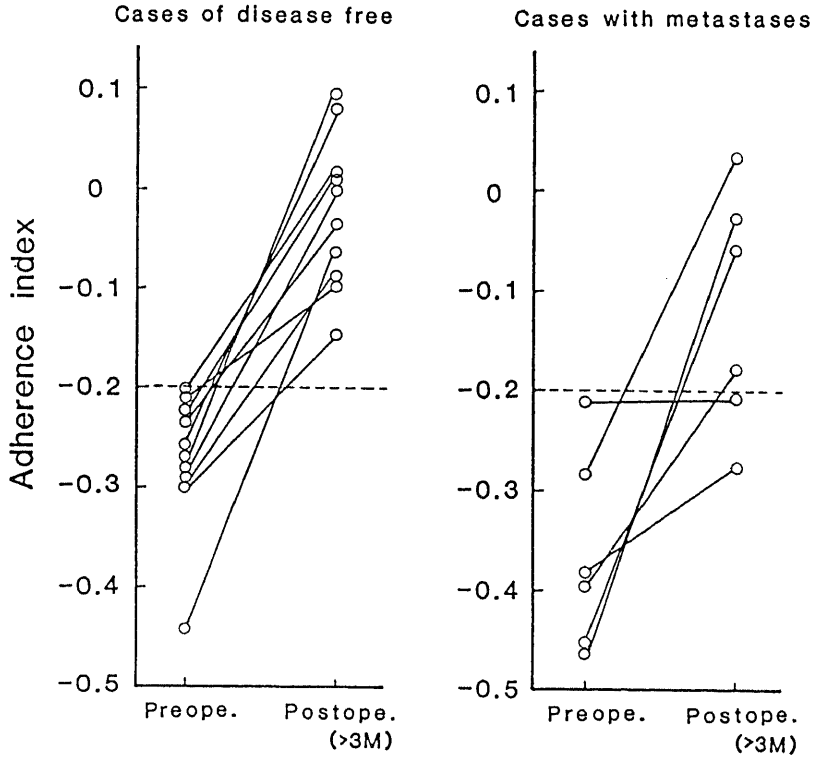


Fig. 8. Follow-up study of 16 nephrectomy patients by H-LAI assay. The sera from patients before and more than 3 months after operation were provided for H-LAI assay.

原と反応を起こすことにより、白血球付着阻止反応が起こるとしている。いずれにせよ、これらの LAI assay は標的細胞として担癌動物あるいは担癌患者の新鮮白血球の分離を必要としている。これに対して Goldrosen ら¹⁷⁾は、serum-arming LAI test として、25%濃度の患者血清と正常ヒト白血球を 37°C で 30 分間保温することにより正常白血球は腫瘍抗原を認識し得、microplate による LAI assay が可能であることを示した。ついで、Sanner ら³⁾、Kotlar ら¹⁰⁾は、トリプシン処理をした正常ヒト白血球を標的細胞として、hemocytometer を用いた LAI assay による癌患者の血清学的診断が可能であることを報告した。この方法により、乳癌、肺癌についてはそれぞれ 83%、95% の高い陽性率が得られ、従来の LAI assay と比べて、特異性、陽性率において劣らないことが示された。その機序は、患者血清中の抗腫瘍 IgG 様物質とトリプシン処理された白血球膜に付着した腫瘍抗原との反応によるとされている¹⁰⁾。しかし、hemocytometer 法は、操作上の労力や客観性の点で tube assay や microplate assay に比べて劣るので²⁰⁾、著者は H-LAI assay に改変を加えた microplate 法の確立を目的に実験を行った。

これまで Wilms' tumor⁹⁾、肺癌²⁰⁾、膀胱癌²¹⁾などについてそれぞれの腫瘍に高度に関連する抗原の抽出が報告されており、著者は LAI assay の特異性を高める目的で、同様の方法により腎細胞癌の抗原分画を抽出し、H-LAI assay の試験抗原とした。本法の特異性について検討してみると、対照群 76 例中、偽陽性は 1 例 (1.3%) とほぼ満足すべき結果であった。これまで腎細胞癌についての LAI assay に関する報告はほとんどなく、わずかに岡田¹⁾が腫瘍の PBS ホモジネートを抗原とした tube assay による 30 例の検討を報告しているにすぎない。その陽性率は 87%、一方、偽陽性は対照群 43 例中 3 例 (7%) であった。抗原が粗であれば、それだけ非特異的の起こる可能性が高くなり、結果として偽陽性が増加するものと考えられる。一方、陽性率について見ると、著者の検討では、50 例中 22 例、(44%) であり、病期分類別に見ると、stage I、60%；II、56%、III、25%；IV、36% であった。low stage 群 (stage I、II) が high stage 群 (stage III、IV) に比べて高い陽性率を示し、さらに両群間で AI について検討してみると有意差 ($p < 0.01$, Student's t-test) が認められるが、これらは Goldrosen ら¹⁷⁾、Lopez ら²²⁾の報告と一致した傾向である。Thomson²³⁾が動物実験モデルで指摘しているごとく、high stage 群では抗腫瘍抗体が過剰な血中遊離抗原により消費される結果、血中に十分な抗体が存在し得ないために陽性率が低下するものと考えられる。

腎細胞癌 16 例の手術後の follow-up study において、1 週目で転移巢の有無とは無関係に全例陰性を示したことは、患者血流中の抗腫瘍抗体の減少あるいは消失を示唆するものであり、これは Grosser ら²⁾が言うように、手術時に多量の腫瘍抗原が血中に遊離し、抗体の消費を促した結果と考えられる。さらに免疫反応を抑制するとされるコルチゾールの血中レベルが術後 4-7 日高いという報告²⁴⁾や、術後低下した血中 IgG レベルは、その回復に 7-10 日を要するという報告²⁵⁾も考慮する必要がある。3 ヶ月以降の検討で、再発兆候のなかった 10 例はいずれも LAI 陰性のままであったが、再発転移例 6 例中、4 例が陰性で陽性を示したものがわずか 2 例であった一因として、検査施行時に、既にかかなり病巣の拡大を認めていたことが考えられる。Lopez ら²²⁾の乳癌の tube LAI assay による follow-up study によれば、再発時、あるいはそれに先立って、14/15 例、93% に LAI 陽性を認めた一方、再発が認められたにもかかわらず、陰性であった症例は、5/34 例、15% あり、このうち 4 例は、遠隔転移症例であったとしている。著者の検討では、再発例において LAI 陰性は必ずしも cancer free を反映しない結果となったが、この点に関しては、再発に先立って、あるいはそれと時期を同じくして評価し直す必要があると考えられる。

著者の H-LAI assay による検討では、新鮮白血球を使用する従来の LAI assay に比べ感度の点で劣るようだが、同法が腎細胞癌のスクリーニングに有用性をもつことが示唆された。ただ、腫瘍抗原として抽出腫瘍材料を用いることは、本法の標準化という点で問題を残している。図 1 に示されたように、抗原材料間で抗原活性にかなりの差が見られ、時には H-LAI assay で抗原活性を認めない分画しか得られないこともあった。検査の特異性と感度を増加させるためには、使用抗原分画の選択と標準化が必要であるが、そのためには有効抗原量の多い腫瘍培養細胞株を選択して抗原材料とし、抗原精製度を更に高めることが必要と考えられる。更に、被検血清内の LAI blocking 因子の前処理方法を考案することなどが必要であろう。

結 論

ヒト腎細胞癌に高度に関連する分子量 60,000 の抗原分子を含む分画を同癌手術材料から抽出し、それを試験抗原とする humoral leukocyte adherence inhibition assay (H-LAI assay) の microplate 変法の至適条件を検討後、同法の腎細胞癌症例の診断における有用性を検討した。

1) 腎細胞癌症例、50 例における陽性率は 22/50 例

(44%)であった。一方、対照群では、1/74例(1.7%)が陽性を示した。

2) 陽性率は low stage 群 (stage I, II) に高い傾向にあり、adherence index (AI) で high stage 群 (stage III, IV) との間に有意差 ($p < 0.01$) を認めた。

3) 術後の follow up study では、術後再発兆候のない症例、10例は全て陰性であったが、再発転移症例では2/6例が陽性であった。

以上より、著者の microplate 法による H-LAI assay は腎細胞癌症例における術前の血清学的診断上、有用な一手段と考えられるが、使用抗原の標準化や術後の follow-up study などについては、より詳細な検討が必要と考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師久住治男教授に心から感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり終始御指導を頂き、御校閲を賜りました金沢大学がん研究所病態生理部倉田自章教授に厚く感謝申し上げます。さらに、御指導、御鞭撻を頂いた同部岡田収司助教授ならびに教室員の皆様に深く感謝致します。最後に、腫瘍材料および患者血清を快く提供して下さいました関連病院泌尿器科の諸先生方に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) 岡田泰長：腎癌における腫瘍免疫の研究。泌尿紀要, 30, 1367-1377 (1984).
- 2) Grosser, N. & Thomson, D. M. P.: Cell-mediated antitumor immunity in breast cancer patients evaluated by antigen-induced leukocyte adherence inhibition in test tubes. *Cancer Res.*, 35, 2571-2579 (1975).
- 3) Sanner, T., Kotlar, H. & Eker, P.: Measurement of humoral anti-tumor immune responses by a modified leukocyte adherence inhibition assay. *Biology of the Cancer Cell*, p179-186. Kugler Publications, Amsterdam, 1980.
- 4) Robson, C. J., Churchill, B. M. & Anderson, W.: The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 101, 297-301 (1969).
- 5) Okada, S., Itaya, K. & Kurata, Y.: Identification of a tumor-specific antigen in the insoluble fraction of human nephroblastoma. *Eur. J. Cancer*, 15, 1085-1093 (1979).
- 6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 7) Goldrosen, M. H., Russo, A. J., Howell, J. H., Leveson, S. H., Moore, M. C., Holyoke, E. D. & Douglass, Jr. H. O.: Evaluation of micro-leukocyte adherence inhibition as an immunodiagnostic test for pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 39, 633-637 (1979).
- 8) Halliday, W. J. & Miller, S.: Leukocyte adherence inhibition: A simple test for cell-mediated tumor immunity and serum blocking factors. *Int. J. Cancer*, 9, 477-483 (1972).
- 9) Holan, V., Hasek, M., Bubenik, J. & Chutna, J.: Antigen-mediated macrophage adherence inhibition. *Cellular Immunol.*, 13, 107-116 (1974).
- 10) Holt, P. G., Roberts, L. M., Fimmel, P. J. & Keast, D.: The L. A. I. microtest: A rapid and sensitive procedure for the demonstration of cell-mediated immunity in vitro. *J. Immunol. methods*, 8, 277-288 (1975).
- 11) Leveson, S. H., Howell, J. H., Holyoke, E. D. & Goldrosen, M. H.: Leukocyte adherence inhibition: An automated microassay demonstrating specific antigen recognition and blocking activity in two murine tumor systems. *J. Immunol. Methods*, 17, 153-162 (1977).
- 12) Koyama, S., Sakita, T., Fukutomi, H., Kawakita, I. & Tamura, N.: Leukocyte adherence inhibition microtest for the detection of cell-mediated immunity to tumor in gastric cancer patients. *Oncology*, 38, 13-17 (1981).
- 13) Halliday, W. J.: Historical background and aspects of the mechanism of leukocyte adherence inhibition. *Cancer Res.*, 39, 558-563 (1979).
- 14) Holt, P. G., Fimmel, P. J., Finlay-Jones, L. M. & Flower, R. L.: Evaluation of the microplate leukocyte adherence inhibition test and its reproducibility, sensitivity, and relationship to other tests of cellular immunity. *Cancer Res.*, 39, 564-569 (1979).
- 15) Marti, J. H., Grosser, N. & Thomson, D. M. P.: Tube leukocyte adherence inhibition assay for the detection of anti-tumor immunity. II. Monocyte reacts with tumor antigen via cytophilic anti-tumor antibody. *Int. J. Cancer*, 18, 48-57 (1976).
- 16) Russo, A. J., Howell, J. H., Leveson, S. H., Holyoke, E. D. & Goldrosen, M. H.: Micro-leukocyte adherence inhibition. I. Cellular basis of the mechanism of reactivity. *J. Immunol.*, 121, 1914

-1919 (1978).

17) Goldrosen, M. H., Dasmahapatra, K., Jenkins, D., Howell, J. H., Arbuck, S. G., Moore, M. C. & Douglass, Jr. H. O.: Microplate leukocyte adherence inhibition (LAI) assay in pancreatic cancer. *Cancer*, **47**, 1614-1619 (1981).

18) Kotlar, H. K. & Sanner, T.: Humoral anti-tumor immune responses in patients with breast cancer measured with the leukocyte adherence inhibition technique. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 265-271 (1981).

19) Kotlar, H. K. & Sanner, T.: Role of circulating antibodies in the humoral leukocyte adherence inhibition response of lung and breast cancer patients. *Cancer Letters*, **11**, 11-19 (1980).

20) Yamada, T., Iwa, T., Kurata, Y. & Okada, S.: Extraction and preliminary characterization of tumor antigens in human bronchogenic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, **16**, 781-792 (1980).

21) Okada, S., Kurata, Y., Kitagawa, K. & Ookawa, M.: Demonstration and preliminary

characterization of an antigen in the insoluble extracts of human transitional cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, **16**, 1451-1458 (1980).

22) Lopez, M., O'Connor, R., MacFarlane, J. K. & Thomson, D. M. P.: The natural history of antitumor immunity in human breast cancer assayed by tube leukocyte adherence inhibition. *Br. J. Cancer*, **38**, 660-673 (1978).

23) Thomson, D. M. P.: Soluble tumor-specific antigen and its relationship to tumor growth. *Int. J. Cancer*, **15**, 1016-1029 (1975).

24) Grosser, N., Thomson, D. M. P., Flores, M. & MacFarlane, J. K.: A mechanism of suppression of antitumor immunity (LAI reactivity) by surgery. *Cancer Immunol. Immunother.*, **7**, 263-269 (1980).

25) Flores, M., Thomson, D. M. P. & MacFarlane, J. K.: Effect of surgery on antitumor immunity measured by tube leukocyte adherence inhibition assay in breast cancer. *Surgical Forum*, **17**, 91-93 (1976).

A Modified Humoral Leukocyte Adherence Inhibition (H-LAI) Assay and Its Evaluation in Renal Cell Carcinoma. Kiyoshi Koshida, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - *J. Juzen Med. Soc.*, **94**, 1051-1061 (1985)

Key words: humoral leukocyte adherence inhibition assay, microplate, renal cell carcinoma, tumor-associated antigen.

Abstract

A soluble fraction which was prepared by extracting the insoluble part of renal cell carcinoma (RCC) with desoxycholate and then partially purified with an affinity column to remove albumin, was provided for producing antisera in guinea pigs. Antisera were then extensively absorbed with normal human serum. A fraction which specially reacted with the antisera was eluted at 60,000 daltons from Sephacryl S-200 column and was utilized for a humoral leukocyte adherence inhibition assay (H-LAI assay). An optimal assay condition was determined by modifying the microplate method. The H-LAI assay was then applied to 126 sera including 50 patients with renal cell carcinoma, 19 patients with other malignancies, 19 patients with benign diseases and 38 healthy donors. Positive responses were detected in 22/50 (44%) with renal cell carcinoma: stage I, 9/15 (60%); II, 5/9 (56%); III, 3/12 (25%); IV, 5/14 (36%). A higher positive rate was observed in low stage groups (stages I&II) than in high stage groups (stages III&IV) with a statistical significance of $p < 0.01$ in adherence index. A false-positive response was observed in one of the 19 patients with other malignancies. Samples from the 19 patients with benign diseases as well as

the 38 healthy donors were negative. In a follow-up study of 16 RCC patients who showed positive LAI responses before operation, 10 patients who were diagnosed as tumor free after three months or more of operation turned to negative, and two of 6 patients who had recurrence and/or metastases, exhibited positive LAI responses. These results suggest that this modified H-LAI assay is a useful strategy to detect a specific antitumor immunity in sera from patients with renal cell carcinoma.