

# Antitumor Immune Responses in Gastric Cancer Patients Assayed by Leukocyte Adherence Inhibition Techniques Using a Partially Purified Antigen Extract

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7792">http://hdl.handle.net/2297/7792</a>

## 部分精製抗原を用いた白血球粘着阻止 (LAI) 試験による胃癌患者の抗腫瘍免疫反応

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

三 好 俊 策

(昭和60年4月15日受付)

Humoral leukocyte adherence inhibition (H-LAI) 試験 (Kotlar & Sanner, 1980) の一部を試験管法に改めた変法と本来の tube leukocyte adherence inhibition (T-LAI) 試験とにより, 胃腺癌患者の抗腫瘍免疫反応を測定した。1例の胃腺癌の不溶分画をデオキシコール酸塩処理で可溶化して得た分画から混在する血清蛋白を除去したものを抗原として使用した。H-LAI 試験変法では胃腺癌血清の50例中32例 (64%), すなわち, 病期 I 19/24 (79.2%), 病期 II 7/9 (77.8%), 病期 III 5/7 (71.4%), 病期 IV 1/10 (10%) が陽性を示した。他癌患者 16例, 非癌患者 11例, 正常人 12例を含む 39例の対照者に陽性反応は見られなかった。T-LAI 試験では胃腺癌 19/27 (70.4%), すなわち, 病期 I 6/7 (85.7%), 病期 II 5/6 (83.3%), 病期 III 5/5 (100%), 病期 IV 3/9 (33.3%) が陽性を示し, 対照 13例は陰性であった。胃腺癌 21例中 18例は両試験で陽性であった。部分精製抗原を使用して, T-LAI のみならず H-LAI も早期胃癌の特異的で有効な免疫診断法となることが示された。

**Key words** leukocyte adherence inhibition (LAI), gastric cancer, tumor-specific antigen.

Halliday ら<sup>1)</sup>によって開発された血球計算盤を使用する白血球粘着阻止 (Leukocyte adherence inhibition, LAI) 試験やその変法である tube-LAI (T-LAI) 試験<sup>2)</sup>, microplate-LAI 試験<sup>3)</sup>, humoral-LAI (H-LAI) 試験<sup>4)</sup>などの各検査方法により, 癌患者における細胞性あるいは液性免疫反応が, 比較的容易に測定出来ることが示され, 癌診断の有力な補助手段になる可能性が高まりつつある。しかし, それらの試験は方法や癌の種類によっても特異性に変動があり, 実用的検査法として確立されるためには, (1)感度と特異性を更に高めること, (2)出来れば, 保存出来ない患者白血球を使用しないで済むこと, (3)操作が簡単で自動化の余地の多いこと, などの条件が満たされる必要がある。

著者は(1)のために多少とも精製された抗原分画を使用し, (2)のために患者血清を使用する H-LAI 法<sup>4)-7)</sup>を利用し, (3)のために細胞数の計測を Coulter counter で行うこととして, 胃癌患者の液性免疫反応の測定条

件を検討した。ついで各病期の胃癌患者と対照群についての測定を行い, 一部の例については比較のため T-LAI の測定も行った。その結果, 本反応はIV期以外の胃癌の診断に実用的価値をもつことを明らかにできたので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 検査対象

H-LAI 試験には同愛記念病院 (東京都墨田区) で受診した胃腺癌患者 50例, 他癌患者 16例 (乳癌 4例, 食道癌 3例, 結腸・直腸癌 3例, 肺癌 1例, 胃扁平上皮癌 1例, 胃細網肉腫 1例, 胃悪性リンパ腫 1例, ホジキン病 1例, 急性骨髄性白血病 1例), 良性疾患 11例 (胃・十二指腸潰瘍 7例, 胃炎 2例, 痔瘻 1例, 外傷 1例) 及び健康人 (同愛記念病院職員) 12例の血清を使用した。なお, 別に肝癌抽出液の検定のため原発肝癌患者 1例の血清を使用した。患者血清はいずれも手

Abbreviations: AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; CEA, carcinoembryonic antigen; H-LAI, humoral LAI; LAI, leukocyte adherence inhibition; PBS, phosphate buffered saline; TC-199, TC medium 199; T-LAI, tube LAI; TSA, tumor-specific antigen.

術または治療前に採血し、使用時まで凍結・融解を避けて $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。一部の患者については手術後一定期間を経て再採血し、血清を保存した。

T-LAI 試験には同病院の胃腺癌患者 27 例、他癌患者 5 例 (乳癌 2 例、結腸・直腸癌 2 例、胆嚢癌 1 例)、良性疾患 4 例 (胃・十二指腸潰瘍 4 例)、健康人 4 例の新鮮白血球を使用した。そのうち胃腺癌 18 例、対照 3 例については後に保存血清を使用して H-LAI も検査した。

胃癌症例は血清保存と T-LAI 試験の後に病理組織学的診断が確定されたが、胃癌の病期分類は胃癌取扱規約の組織学的分類<sup>8)</sup>に従った。

## 2. 抗原分画

抗原標品による測定値のばらつきを無くするため全測定を 1 例の胃腺癌よりの抽出液を使用して行った。剖検時入手した分化型胃腺癌 (湿量約 100 g) から非癌・壊死部分を可及的除去し、Okada ら<sup>9)</sup>、Yamada ら<sup>10)</sup>、および Okada ら<sup>11)</sup>の方法に従い腫瘍部分から粗抗原分画を作製した。すなわち、胃癌ホモジネートから不溶性リポ蛋白質分画を抽出し、同分画に約 5 倍容量の 0.2% デオキシコール酸ナトリウム液を加えて  $4-8^{\circ}\text{C}$  で 48 時間攪拌を行う。その遠心上清に約 10 倍容量の冷アセトンを加えて  $-20^{\circ}\text{C}$  に 1 夜おく。生じた沈澱を遠心して集め、少量の PBS にとかし、セファローズ 4 B カラムによるゲル濾過を行い、低分子側の主ピークを集め、以下の操作を行って混在する血清蛋白を除去する。

抗ヒト全血清家兎抗血清の硫酸アンモニウム 33% 飽和で得た Ig 分画を Bio-gel P-300 ( $-400$  mesh, Bio-Rad Laboratories) に 2 mg/ml に結合させたもので Ternynck ら<sup>12)</sup>に従って batch 法による吸収を行い、4 mg 蛋白/ml 以上の吸収抗原液がゲル内二重拡散法により抗ヒト全血清抗血清 (未希釈) と沈降線を生じないまでにする。なお、抗ヒト全血清家兎抗血清は、ヒト全血清 1 ml を等量の Freund complete adjuvant で乳化して成熟家兎の足蹠及び背部皮下数か所に分割注射し、1 月後から 10 日間隔で 3 回同様組成の追加免疫を背部皮下に行い、その 10 日後に全採血して作製した。血清は使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

このようにして得た胃腺癌抽出液をセロファンチューブに入れ、冷室内で扇風機にあてて濃縮し、ウシ血清アルブミンを標準として Lowry 法<sup>13)</sup>による蛋白定量を行った後 1.0 mg 蛋白/ml に調整し、少量づつ試料瓶にわけて  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存して LAI 用抗原とした。試料瓶 1 本づつを使い捨てにし、抗原の再凍結・融解を避けた。抗原液は  $-80^{\circ}\text{C}$  に 2 年以上保存したもので十分活性があった。この抗原液がヒト胃癌特異

的と思われる 1 抗原を含むことはゲル内二重拡散法により別に確かめられている<sup>14)</sup>。

なお、対照抗原として剖検時入手した原発性肝癌からも同様の方法で抗原液を作製した。

## 3. H-LAI 試験法

Sanner ら<sup>15-17)</sup>の方法に改変を加え以下のよう行った。年令 20-30 才の健康な病院職員の静脈血 10 ml をノボヘパリン 40 単位/ml 存在下でディスポーザブル・プラスチック注射筒で採血し、垂直位に室温 45 分静置して上清 (白血球富化血漿) を得る。これを Ficoll 400<sup>®</sup> (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) と Conray 400<sup>®</sup> (第 1 製薬) をまぜて作製した密度 1.077 の Ficoll-Conray 液または Lymphoprep<sup>®</sup> (Nyegaard & Co., Norway) に重層し、380 g 30 分遠心して界面部より白血球層をとり、PBS を加えて 240 g 10 分遠心することにより洗滌する。PBS で細胞数を  $4 \times 10^7/\text{ml}$  とし、0.02% トリプシン (Type I, Approx. 10,000 DAEE units/mg protein, Sigma Chemical Co.) を等量加えて室温 45 分連続振盪する。TC-199 (千葉血清) で 240 g 10 分の遠心による洗滌を 3 回行った後、TC-199 で  $2 \times 10^7/\text{ml}$  に細胞数を調整する。胃腺癌抗原液 (一部実験には肝癌抗原液) は TC-199 で 40 倍希釈して 25  $\mu\text{g}$  蛋白/ml にする。被検血清は融解後 TC-199 で 1% に希釈する。プラスチック製試料カップ (microsample cup, 容量 0.5 ml, Uniflex Co. Ltd.) に (1) トリプシン処理白血球 0.1 ml, (2) 被検血清希釈液 0.1 ml, (3) 胃癌 (または肝癌) 抗原希釈液 0.1 ml, (4) TC-199 0.1 ml を加えたものと、(1)(2) に TC-199 0.2 ml を加えたものを作る。 $37^{\circ}\text{C}$  に 5 分毎の振盪混和をしながら 30 分おいた後、両カップから 20  $\mu\text{l}$  づつとり、Zap-Oglobin<sup>®</sup> (Coulter Electronics Ltd.) で赤血球を溶血させ、Coulter counter FN (Aperture 100  $\mu$ ) により白血球数を測定し、initial count とする。カップに残った検体の 0.3 ml をピペットでガラス製試料バイアル瓶 (Wheaton 200, 2 ml 容量, No. 224801 & No. 240206) の底に静かに入れてゆるく栓をし、水蒸気を飽和したシャーレ内に横にして  $37^{\circ}\text{C}$  60 分おく。バイアル瓶を静かに立てて内容液全量を 1 回のピペット操作でプラスチック製試料カップに移し、その 20  $\mu\text{l}$  について Coulter Counter で白血球 (ガラス面非粘着白血球数) を測定して final count を得る。

## 4. T-LAI 試験法

Rutherford ら<sup>18)</sup>の方法に準じて以下のように行った。被検者のノボヘパリン加静脈血 20 ml から H-LAI の場合と同様に白血球層を分離し、10% ウシ胎児血清加 TC-199 で 3 回洗滌後同培地で細胞数を  $4 \times 10^7/\text{ml}$  に調整する。プラスチック製試料カップ (前述) に (1)

上記白血球液 0.1 ml, (2)胃癌抗原液 (1 mg 蛋白/ml) 0.1 ml, (3) TC-199 0.2 ml を加えたものと, (1)に TC-199 0.3ml を加えたものを作る。37°C に 5 分毎の振盪混和を加えながら 30 分おく。両カップの 20 μl につき Coulter Counter で白血球数を測定して initial count を得る。カップに残る検体から 0.3 ml をガラス製試料バイアル瓶 (前述) に移し、水蒸気飽和環境下に横にして 37°C 120 分静置後、静かに立てて内溶液全量をピペットで一度にプラスチックカップに移す。その 20 μl について白血球数を測定して final count を得る。

5. LAI index の計算

Rutherford ら<sup>15)</sup>に従って以下の式で白血球粘着%と LAI index を算出した。

$$\text{粘着\%} = 100 - \frac{\text{final count}}{\text{initial count}} \times 100$$

$$\text{LAI index} = \frac{\text{粘着\% (抗原-) - 粘着\% (抗原+)}}{\text{粘着\% (抗原-)}} \times 100$$

判定は Powell ら<sup>16)</sup>や Sanner ら<sup>17)</sup>のように index 10 以上を陽性とした。

成 績

1. LAI の測定条件の検討

抗原液の至適濃度を調べるために、胃癌抽出液の濃度を変えて H-LAI と T-LAI を測定した。H-LAI では、胃癌抽出液量 2.5 μg 蛋白/カップの場合に胃癌患者の index が高く、対照群のそれは 10 以下であった。胃癌抽出液量 1.25 μg 蛋白/カップでは胃癌患者の index の上昇例もあるが、対照群にも上昇例があり、両者に明らかな差はみられなかった。5.0 μg 蛋白/カップ以上でも胃癌患者の index は特に高くはならなかった (図 1 A)。T-LAI では、胃癌抽出液量がカップ当たり 50 μg 蛋白の時 index は低く、100 μg 蛋白になると高くなり、150 μg 蛋白になってもあまり変わらなかった (図 1 B)。

H-LAI の被検血清のカップ内濃度を 0.125-0.5% として index の変化を調べてみると図 2 のようになった。血清濃度が 0.125% では胃癌患者の index は陰性であるが、0.25% では陽性になり、更に血清濃度が上ると対照群の index も上昇した。

H-LAI に使用する健康人白血球のトリプシン処理は本法の重要な段階であるので<sup>4)</sup>、使用トリプシンについての検討を行った。(1)トリプシン Type I (Sigma), (2)トリプシン 1 : 250 (Gibco Laboratories), (3)トリプシン 1 : 250 (Difco Laboratories) の各標品の 0.02% 溶液をそれぞれ白血球懸濁液に等量加えて室温 45 分作用させた白血球を用い、被検血清のカップ内濃

度を 0.25%, 抗原液濃度を 2.5 μg 蛋白/カップとして H-LAI を行ってみると (1)トリプシン Type I (Sigma) を使用した場合に処理後の白血球の分散が良く、陽性患者の index が最も高く出た (図 3)。なお、白血球の分散が悪いと H-LAI が偽陽性に出ることがあるので注意が必要であった。

以上の検討結果に基づき、以後の H-LAI 測定は抗原濃度を 2.5 μg 蛋白/カップ、被検血清を 0.25%/カップとし、白血球処理にはトリプシン (Type I, Sigma) を使用した。T-LAI の抗原濃度は 100 μg 蛋白/カップとした。

2. 胃癌および対照患者の H-LAI 値

各病期の胃癌患者および対照群の H-LAI 値を測定した (図 4)。LAI index は胃腺癌 50 例では mean ± SD = 11.99 ± 18.62, 他癌 16 例は -9.69 ± 12.27, 良性疾患 11 例は -1.04 ± 10.99, 正常人 12 例は 0.49 ± 6.97 であり、胃腺癌群と対照群の index の間には

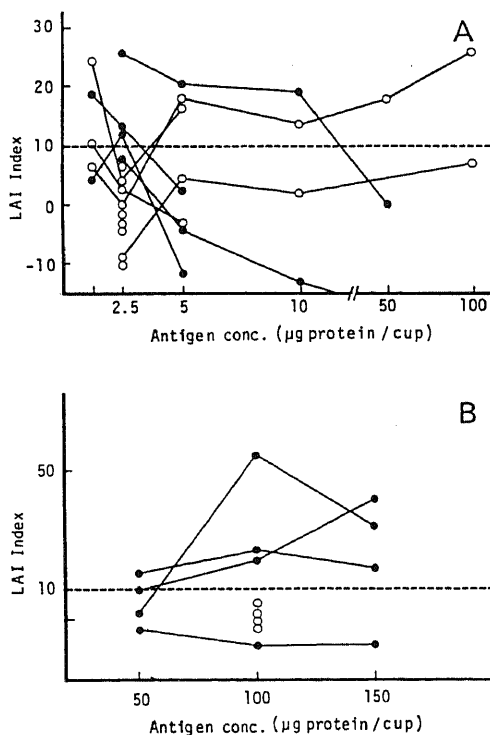


Fig. 1. Effect of antigen concentration on the H-LAI responses (A) and the T-LAI responses (B) of patients with gastric adenocarcinoma and of controls.

Leukocyte adherence was measured in the presence of increasing concentration of extract from a gastric adenocarcinoma. (●), gastric adenocarcinoma; (○), control.

Student's *t* test で  $p < 0.001$  の有意差があった。Index 10 以上を陽性とする胃腺癌の 32/50 (64%) が陽性で、対照群はすべて陰性であった。胃腺癌を病期別にみると陽性率及び index は I 期 19/24 (79.2%),  $18.22 \pm 18.57$ ; II 期 7/9 (77.8%),  $18.27 \pm 8.3$ ; III 期 5/7 (71.4%),  $11.37 \pm 15.07$ ; IV 期 1/10 (10%),  $-8.18 \pm 14.05$  であり、I - III 期の陽性率は高く、IV 期の陽性率は著しく低かった。

胃癌抽出液の特異性を確かめるため、原発性肝癌抽出液 (2.5  $\mu$ g 蛋白/カップ) を使用して胃腺癌 4 例と原

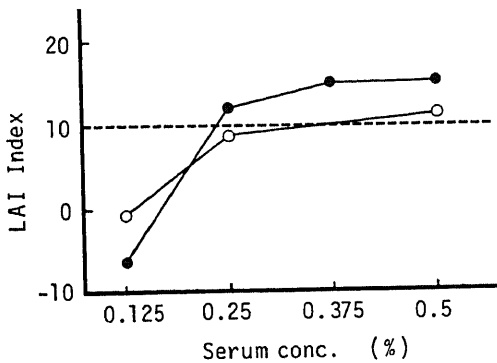


Fig. 2. Effect of serum concentration on H-LAI index.

Leukocyte adherence was measured in the presence of increasing concentrations of serum from a responsive patient with gastric adenocarcinoma and from a control person. (●), gastric adenocarcinoma; (○), normal.

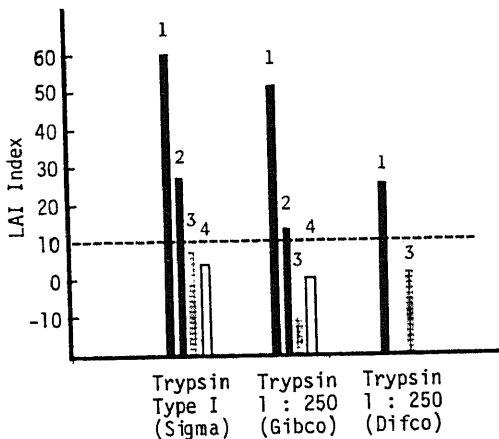


Fig. 3. Effect of trypsinization by three commercially available preparations on the H-LAI responses. 1 and 2, gastric adenocarcinoma; 3 and 4, control.

発性肝癌 1 例および正常人 1 例について H-LAI を行った。肝癌患者は陽性 (index = 13.5) を示したが、胃腺癌患者は  $index = 6.34 \pm 2.45$ , 正常人は 1.7 でいずれも陰性であった。さらに胃腺癌 3 例について同時に胃腺癌抽出液と肝癌抽出液による H-LAI を行ってみると、胃腺癌抽出液を抗原とした場合にのみ陽性の index が得られた (表 1)。

3. 胃癌および対照患者の T-LAI 値

胃癌抽出液を使用した T-LAI の成績では胃腺癌 27 例の LAI index は  $mean \pm SD = 18.4 \pm 27.27$ , 他癌 5 例  $2.7 \pm 7.1$ , 良性疾患 4 例  $-0.65 \pm 2.13$ , 正常人 4 例  $0.65 \pm 4.54$  で、胃腺癌と対照群の index には  $p < 0.001$  の有意差があった。胃腺癌の病期別の陽性率と index は I 期 6/7 (85.7%),  $31.16 \pm 16.92$ ; II 期 5/6 (83.3%),  $20.28 \pm 16.64$ ; III 期 5/5 (100%),  $31.0 \pm 14.42$ ; IV 期 3/9 (33.3%),  $0.23 \pm 36.71$  であり、胃腺癌全体の陽性率は 19/27 (70.4%) であった (図 5)。胃腺癌と対照各疾患の H-LAI と T-LAI の成績を総括して表 2 に示す。

なお、胃腺癌患者の LAI index と血中 CEA 値ある

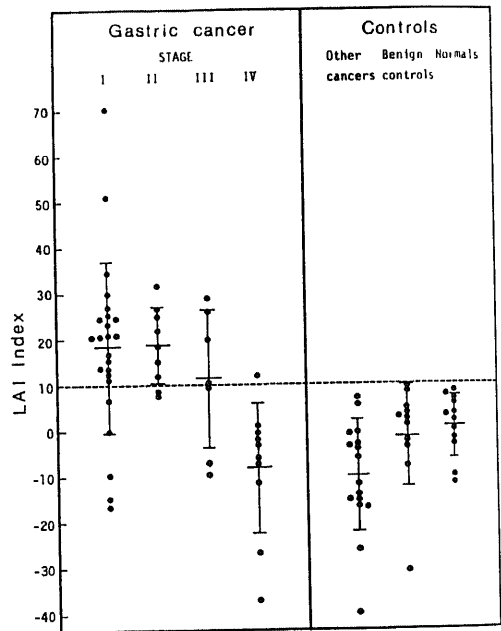


Fig. 4. Tumor-directed H-LAI reactivity of patients with different stages of gastric adenocarcinoma and of controls.

The mean LAI index of the gastric cancer group is significantly different from the control group [gastric cancer patients ( $11.99 \pm 18.62$ ;  $n = 50$ ) versus control persons ( $-4.12 \pm 11.31$ ;  $n = 39$ );  $p < 0.001$  by *t*-test].

いは AFP 値との間には関係が認められなかった。たとえば、CEA 5 mg/ml 以上の胃腺癌 6 例中 T-LAI 陽性が 3 例、CEA 陰性の胃腺癌 11 例中 T-LAI 陽性が 6 例あり、また、AFP 陰性の胃腺癌 6 例中 T-LAI 陽性が 4 例あった。

4. H-LAI と T-LAI の比較

胃腺癌患者 18 例照患者 3 例について入院時行った T-LAI の成績を、同時に採血保存した血清について後日行った H-LAI の成績と比較した (図 6)。T-LAI 陽性の胃腺癌病期 II, III, IV の各 1 例の患者が H-LAI で陰性値を示したが、18/21 例は両者の判定が一致した。H-LAI 陽性で T-LAI が陰性に出た例はなかった。

5. 胃癌手術と LAI

手術前 H-LAI が陽性で、根治手術を受けた後臨床的に再発徴候がない胃腺癌患者 9 例について H-LAI の再検査を行った。術後 1 週 - 1 年の間の再検査はすべて陰性の値を示した。手術前 T-LAI 陽性の 4 例の胃腺癌患者も術後 2 - 4 週の再検査はすべて T-LAI 陰性の成績を示した。再発例の LAI を測定する機会には恵まれなかった。

考 察

LAI 試験は動物やヒトの癌に対する特異的免疫反応を再現性良く、しかも比較的簡単に測定出来る方法であることが国際ワークショップ (1978)<sup>18)</sup>でも認められて以来、広く受け入れられるようになってきている。しかし、その抗原、細胞、反応機作についてはまだ不明な点が残っており、また、LAI を hemocytometer 法、tube 法、microplate 法、H-LAI 法などのいずれの方法で測定しても対照群に数%の偽陽性の現われることが避けられない<sup>19)</sup>。LAI の実用性を更に高めるためには偽陽性を無くし、鋭敏度を上げることが望まれるが、その解決策の一つとして精製抗原の使用に期待がかけられている<sup>20)</sup>。しかし、癌特異抗原 (tumor-specific antigen, TSA) の同定や精製は著しく難しく、その存在自体について悲観論と楽観論がある現状である<sup>21)</sup>。

この問題の根本的な解決には TSA 分子の精製と構造決定、支配遺伝子の解明などが必須であるが、それらが達成されるまでにはまだ相当の日時が必要と思われる。胃癌については従来いくつかの糖蛋白性抗原が見いだされているが<sup>22)-26)</sup>、それらはいずれも胃癌の TSA としては認め難いもので、従ってそれらを抗原とした LAI には特異性や鋭敏度の上で大きな期待は持ち得ない。

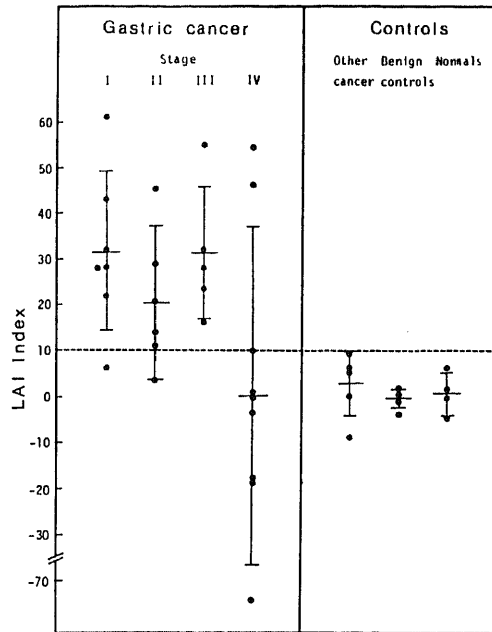


Fig. 5. Tumor-directed T-LAI reactivity of patients with different stages of gastric adenocarcinoma and of controls.

The mean LAI index of the gastric cancer group is significantly different from the control group [gastric cancer patients (18.4 ± 27.27; n = 27) versus control persons (1.04 ± 5.02; n = 13); p < 0.001 by t-test].

Table 1. H-LAI reactivity of patients with gastric carcinoma to extracts of gastric adenocarcinoma or hepatoma

Serum donor	H-LAI (% adherence)	
	Gastric adenocarcinoma	Hepatoma
Gastric adenocarcinoma	1 (Stage I)	4.4
	2 (Stage I)	4.65
	3 (Stage II)	9.7

胃癌のLAIについては過去に Tataryn ら<sup>27)</sup>が胃癌のPBS ホモジネート上清を抗原としてT-LAIの測定を行っている。陽性率はやや低く、胃癌10/17 (58.8%)が陽性で、対照群に3%の誤陽性が出現している。細胞性免疫を反映し、感度もより高いと思われる microplate LAI 法や hemocytometer LAI 法は日本で胃癌ホモジネート上清を抗原として測定が行われており、Koyama ら<sup>28)</sup>は microplate 法で胃癌に56.8%対照群に0%の陽性率を見た。しかし、Koide ら<sup>29)</sup>は同法で非特異反応が強くおこることを認め、interaction analysis による非特異反応の除外法を示した。この場合測定系が複雑になることは避けられない。亀井ら<sup>29)</sup>は hemocytometer 法で胃癌に68.4%の陽性率を認めたが、対照群の偽陽性率もかなり高いことを観察している。

著者は胃腺癌の不溶蛋白をデオキシコール酸塩で可溶化した後、混在する血清蛋白を除去して作製した抽出液<sup>14)</sup>を抗原として胃腺癌患者の液性免疫反応をH-LAIとT-LAI試験で測定した。各種ヒト癌のこのような分画にそれぞれのTSAの存在することが推定されているからである<sup>30)31)</sup>。結果はH-LAIでもT-LAIでも初・中期の胃腺癌患者の80%前後が陽性のindexを示し、他型胃癌や他臓器癌患者および胃潰瘍、胃炎を含む対照疾患群や健康人はすべて陰性のindexを示した。胃癌の陽性反応は肝癌抽出液を抗原とした場合には当然見られない。以上のような成績は逆に著者の用いた胃腺癌抽出液に胃腺癌のTSAが存在することを示唆している。ただ、抽出液はまだ粗製抗原液であって、胃その他の正常組織抗原や非特異的な癌関連抗原を多少とも含んでいることは否定出来ない。胃癌

Table 2. Summary of H-LAI and T-LAI testing of patients with gastric adenocarcinoma and of control subjects

Diagnosis	No. tested	H-LAI	T-LAI	
		No. of positive LAI*(%)	No. tested	No. of positive LAI*(%)
Gastric adenocarcinoma				
Stage I	24	19 (79.2)	7	6 (85.7)
Stage II	9	7 (77.8)	6	5 (83.3)
Stage III	7	5 (71.4)	5	5 (100.0)
Stage IV	10	(10.0)	9	3 (33.3)
Malignant controls				
Other gastric neoplasms				
Squamous cell carcinoma	1	0		
Reticulosarcoma	1	0		
Malignant lymphoma	1	0		
Esophageal carcinoma	3	0		
Colorectal carcinoma	3	0	2	0
Breast carcinoma	4	0	2	0
Lung carcinoma	1	0		
Gallbladder carcinoma			1	0
Hodgkin's disease	1	0		
Acute myelocytic leukemia	1	0		
Benign controls				
Gastric ulcer	3	0	2	0
Duodenal ulcer	4	0	2	0
Gastritis	2	0		
Anal fistula	1	0		
Trauma	1	0		
Normals	12	0	4	0

\*LAI index of greater than 10 was assessed as positive<sup>16)17)</sup>.

抽出液の量を上げると対照群の LAI も陽性化する例のあることがその一つの証拠になる。従って、抗原収量の点に問題はあがるが、別に作製した各種正常組織抗原に対する異種抗血清や抗非特異癌関連抗原抗血清 Ig による逆免疫吸収などを行って抗原分画を一層精製することが望ましい。また、LAI の鋭敏度を上げるためには陰性患者血清について blocking factor を予め処理する必要があるかもしれない。

H-LAI はこれまで乳癌と肺癌についてのみ使用されてきて、胃癌については検討されていなかったが、著者の成績はこの方法が初期胃癌の診断、治療効果や予後の判定などに補助手段として十分役立つことを示した。T-LAI に比較すると鋭敏度がやや低い傾向はあるが、少量の保存血清について測定が行えるので検査の時間的あるいは人的制約がなく、他の方法より勝れ

ている。安定な部分精製抗原、一定のプラスチックカップとガラス製バイアル瓶、Coulter Counter などを使用することで誤差因が減じ、術式は一層簡略化した。まだ成功はしていないが、もし使用するヒト白血球を異種動物白血球などに代えることが可能になれば本方法は更に実用価値を増すであろう。

結 論

胃腺癌の不溶蛋白分画をデオキシコール酸塩処理で可溶化し、セファローズ 4 B によるゲル濾過の低分子ピークをとり、混在する血清蛋白を除去したものを抗原として、胃癌の H-LAI 試験 (変法) と T-LAI 試験の基礎的条件を検討した。ついで胃腺癌 50 例、対照疾患 27 例、正常人 12 例について H-LAI を、胃腺癌 27 例、対照疾患 9 例、正常人 4 例について T-LAI を測定して以下の成績を得た。

1) H-LAI 試験では胃腺癌の I 期 79.2%, II 期 77.8%, III 期 71.4%, IV 期 10% の陽性率が得られた。対照群は全例が陰性を示し、胃腺癌群とは index に有意差 ( $p < 0.001$ ) があつた。胃癌の陽性例は肝癌抽出液を抗原とした場合には陰性値を示した。なお、胃癌根治手術後再発徴候のない患者 9 名は術後 1 週 - 1 年の再検査がすべて陰性であつた。

2) T-LAI 試験では胃腺癌の I 期 85.7%, II 期 83.3%, III 期 100%, IV 期 33.3% の陽性率が得られた。対照群は全例陰性で、index 上有意差 ( $p < 0.001$ ) があつた。胃癌根治手術後には陽性反応は消失した。

3) 胃腺癌 21 例について H-LAI と T-LAI の測定を行った。H-LAI は T-LAI に比しやや感度が落ちるが、18 例については両法で陽性値が示された。

以上の結果から、部分精製抗原を使用した LAI 試験は胃癌の補助診断法として十分価値があり、とくに H-LAI 試験は実用面での価値が高いと判断される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を戴いた金沢大学がん研病態生理部倉田自章教授、抗原標品を御恵与下さった同部程明女史 (現、中国北京生物製品研究所) に深く感謝します。また本研究の遂行に終始多大な御協力を戴いた同愛記念病院病理福島範子医長、外科上竹正躬医長ならびに心よく御供血下さった病院職員各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第 19 回日本消化器外科学会において発表された。

文 献

1) Halliday, W. J. & Miller, S.: Leukocyte adherence inhibition: A simple test for cell-medi-

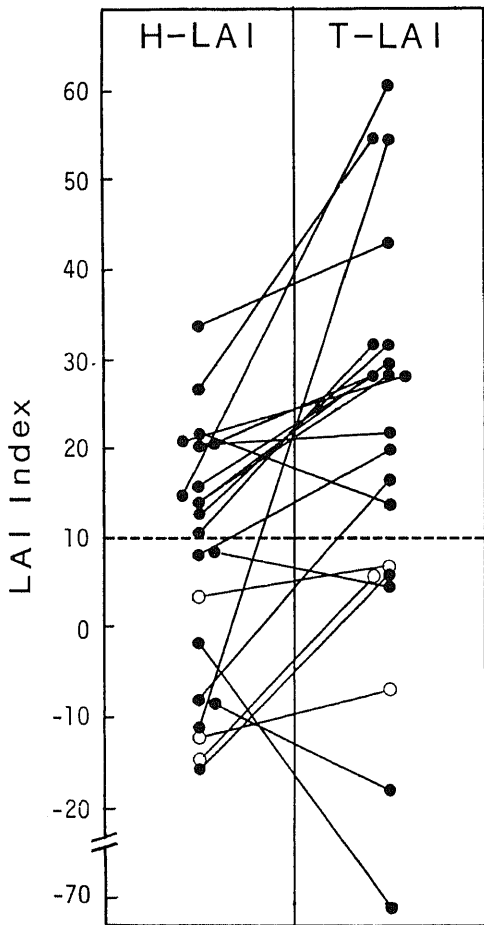


Fig. 6. Comparison of H-LAI and T-LAI measurements. (●), gastric adenocarcinoma; (○), normal.



ed tumour immunity and serum blocking factors. *Int. J. Cancer*, **2**, 477-483 (1972).

2) **Burger, D. R., Vandebark, A. A., Finke, P., Malley, A., Frikke, M., Black, J., Acott, K., Begley, D. & Vetto, R. M.**: Assessment of reactivity to tumor extracts by leukocyte adherence inhibition and dermal testing. *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 317-324 (1977).

3) **Leveson, S. H., Howell, H., Holyoke, E. D. & Goldrosen, M. N.**: Leukocyte adherence inhibition: An automated microassay demonstrating specific antigen recognition and blocking activity in two murine tumor systems. *J. Immunol. Mehtods*, **17**, 153-162 (1978).

4) **Sanner, T., Kotlar, H. K. & Eker, P.**: Measurement of humoral anti-tumour immune responses by a modified leukocyte adherence inhibition assay. p 179-186. *In* K. Letnansky (ed.), *Biology of the cancer Cell*, Kugler Pub., Amsterdam, 1980.

5) **Sanner, T., Kotlar, H. K. & Eker, P.**: Immune responses in lung cancer patients measured by a modified leukocyte adherence inhibition test using serum. *Cancer Lett.*, **8**, 283-290 (1980).

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

7) **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).

8) 胃癌研究会: 外科・病理 胃癌取扱い規約, 第10版, 12-13, 56-57頁, 金原出版, 東京, 1979.

9) **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).

10) **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).

11) **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).

12) **Ternynck, T. & Avrameas, S.**: Polymerization and immobilization of proteins using ethylchloroformate and glutaraldehyde, p 29-35, *In* E. Rouslahti (ed.), *Immunosorbents in protein purification*. *J. Immunol., Suppl.* 3, Universitetsforlaget, Aas & Wahl, Oslo, 1976.

13) **Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

14) 程 明: ヒト胃癌高度関連抗原とその精製. 十全医会誌, **90**, 669-675 (1981).

15) **Rutherford, J. C., Walters, B. A. J., Caraye, G. & Halliday, W. J.**: A modified leukocyte adherence inhibition test in the laboratory investigation of gastrointestinal cancer. *Int. J. Cancer*, **19**, 43-48 (1977).

16) **Powell, A. E., Sloss, A. M., Smith, R. N., Makley, J. T. & Hubay, C. A.**: Specific responsiveness of leukocytes to soluble extracts of human tumors. *Int. J. Cancer*, **16**, 905-913 (1975).

17) **Sanner, T., Brenhord, I., Christensen, I., Jørgensen, O. & Kvaløy**: Cellular antitumor immune response in women with risk factors for breast cancer. *Cancer Res.*, **39**, 654-657 (1979).

18) **Goldrosen, M. H.**: Summary and future prospects of leukocyte adherence inhibition. *Cancer Res.*, **39**, 660-662 (1979).

19) **O' Connor, R., MacFarlane, J. K., Murray, D. & Thomson, D. M. P.**: A study of false positive and negative responses in the tube leukocyte adherence inhibition (tube LAI) assay. *Br. J. Cancer*, **38**, 674-684 (1978).

20) **Koide, Y., Wakazono, K., Yamagata, K., Miyaji, M. & Yamamoto, M.**: Specificity of micro-leukocyte adherence inhibition test in patients with gastric cancer. *Gann*, **70**, 541-544 (1979).

21) **Herberman, R. B.**: Uses and limitations of tumor markers. p 409-418. *In* W. H. Fishman (ed.), *Oncodevelopmental markers*. Academic Press, New York, 1983.

22) 荒川 弥: 胃癌の免疫学的解析. 癌化における組織糖蛋白の変化について. 十全医会誌, **70**, 354-364 (1964).

23) **Häkkinen, I., Järvi, O. & Grönroos, J.**:

Sulphoglycoprotein antigens in the human alimentary canal and gastric cancer. An immunohistological study. *Int. J. Cancer*, **3**, 572-581 (1968).

24) Kimoto, E., Kuranari, T., Masuda, H. & Takeuchi, M.: Isolation and characterization of a glycopeptide from mucinous carcinoma of a human stomach. *J. Biochem.*, **63**, 542-549 (1968).

25) Deusch, E., Apffel, C. A., Mori, H. & Walker, J. E.: A tumor-associated antigen in gastric cancer secretions. *Cancer Res.*, **33**, 112-116 (1973).

26) Pak, K. Y., Randerson, D. H., Blaszczyk, M., Sears, H. F., Stelewski, Z. & Koprowski, H.: Extraction of circulating gastrointestinal cancer antigen using solid-phase immunoadsorption system of monoclonal antibody-coupled membrane.

*J. Immunol. Methods*, **66**, 51-58 (1984).

27) Tataryn, D. N., MacFarlane, J. K., Murry, D. & Thomson, D. M. P.: Tube leukocyte adherence inhibition (LAI) assay in gastrointestinal (GIT) cancer. *Cancer*, **43**, 898-912 (1979).

28) 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).

29) 亀井秀雄・殿村邦彦・杉本一好・近藤達平: LAI と癌診断. *臨床免疫*, **13**, 728-733 (1981).

30) 倉田自章: 人癌特異抗原について. *中部日本整形外科災害外科学雑誌*, **27**, 37-43 (1984).

31) 倉田自章: 人癌抗原の抽出—癌特異または癌高度関連抗原について. *最新医学*, **36**, 927-929 (1981).

**Antitumor Immune Responses in Gastric Cancer Patients Assayed by Leukocyte Adherence Inhibition Techniques Using a Partially Purified Antigen Extract** Shunsaku Miyoshi, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — *J. Juzen Med. Soc.*, **94**, 457-465 (1985)

**Key words:** leukocyte adherence inhibition (LAI), gastric cancer, tumor-specific antigen

#### Abstract

Humoral antitumor immune responses in patients with gastric adenocarcinoma were assayed by the humoral leukocyte adherence inhibition (H-LAI) test developed by Kotlar and Sanner (1980), with a tube modification of the method, and by the ordinary tube leukocyte adherence inhibition (T-LAI) test. The deoxycholate-solubilized extract of the insoluble fraction of a gastric adenocarcinoma, after removing contaminated serum proteins, was used as an antigen. By the modified H-LAI test, 32 of 50 (64%) sera from patients with gastric adenocarcinoma showed positive responses, i.e., 19 of 24 (79.2%) Stage I, 7 of 9 (77.8%) Stage II, 5 of 7 (71.4%) Stage III, and 1 of 10 (10%) Stage IV. No positive responses were found among 39 sera from control subjects, including 16 patients with other cancer, 11 patients with non-malignant disease, and 12 normal healthy donors. By the T-LAI test, 19 of 27 (70.4%) patients with gastric adenocarcinoma responded positively, i.e., 6 of 7 (85.7%) Stage I, 5 of 6 (83.3%) Stage II, 5 of 5 (100%) Stage III, and 3 of 9 (33.3%) Stage IV, whereas 13 control subjects were found negative. Of 21 patients with gastric adenocarcinoma, 18 showed positive responses in both assay systems. The modified H-LAI test as well as the T-LAI test, with the use of the partially purified antigen, is evaluated as a specific and valuable immunodiagnostic test for the presence of early gastric adenocarcinoma.