

肝細胞癌診断におけるLeucocyte adherence inhibition(LAI)assayの診断的意義に関する研究

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: 米島, 学 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9062

肝細胞癌診断における Leucocyte adherence inhibition (LAI) assay の診断的意義に関する研究

金沢大学大学院医学研究科内科学第一講座 (指導: 服部 信教授)

米 島 学

(昭和58年2月15日受付)

腫瘍の細胞性免疫反応を利用した特異な癌診断法である白血球附着阻止試験 (leucocyte adherence inhibition assay, 以下 LAI assay と略) を肝細胞癌において行い, 各種腫瘍マーカーとの比較および腫瘍の大きさとの関係などの検討より, LAI assay の診断的意義を明らかにしようとした。

新鮮剖検肝細胞癌組織より作製した抽出液を抗原とし, 同様に健常肝組織よりの抽出液を対照抗原として用いた。ヘパリン加末梢血より比重遠沈法にて mononuclear cells を分離し, メディウムにて 10^7 個/ml に調整し, Grosser らの方法に準じて tube LAI assay を行った。結果は Non-adherence index (以下 NAI と略) を算出して表わした。

肝細胞癌 55 例中 37 例 (67%) が LAI assay 陽性であった。偽陽性は肝硬変 34 例中 6 例 (18%), 他の悪性腫瘍 21 例中 1 例 (5%) であったが, 他の良性肝疾患では陽性例は認めなかった。同時に測定した他の腫瘍マーカーである α -fetoprotein (以下 AFP と略) 値や novel γ -GTP isoenzyme (以下 novel γ -GTP と略) の有無と LAI assay との関係を検討したが, これら 2 つのマーカーと NAI 値との間には相関性は認められなかった。AFP・novel γ -GTP ともに陰性の 20 例中 11 例は本試験陽性であり, これら 3 つのマーカーを組み合わせるにより, 肝細胞癌の 86% に診断が可能であった。

さらに, LAI assay と腫瘍の大きさとの関連も検討した。肝スキャンによる腫瘍のステージ分類と NAI 値との間には相関性はなく, また, CT スキャンより計測した腫瘍体積や腫瘍占拠率と NAI 値の間にも相関性は認めなかった。最大径 3 cm 以下の細小肝癌 8 例中 5 例にも本試験陽性を認めた。

以上より, 肝細胞癌の LAI assay は特異性・陽性率ともにかかなり高く, さらに, 他の腫瘍マーカーや腫瘍の進行度に関係し出現し, 細小肝癌における陽性率も高いことより, 本法は肝細胞癌の血液学的診断法として有用性が高いと考えられる。

Key words LAI assay, α -Fetoprotein (AFP), Novel γ -GTP isoenzyme (novel γ -GTP), 腫瘍体積

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, 以下 HCC と略) は他の癌に比して α -fetoprotein (以下 AFP と略) や novel γ -GTP isoenzyme (以下 novel γ -GTP と略) ¹⁾²⁾ のように癌特異性および感度いづれにおいても優れた腫瘍マーカーに恵まれている。しかも, これらマーカーは, HCC に限れば, 一般にその陽性率も進行度とは無関係であるという成績が得られている²⁾。しかし, AFP や novel γ -GTP などのように腫瘍マーカーとして現在最も優れているものであっても, 腫瘍が産生する蛋白や酵素を直接測定する方法では検出率に

限界があり, 特に細小肝癌での有用性は低く³⁾⁴⁾, 新たな血液学的診断法の開発が急務である。

1972 年, Halliday ら⁵⁾により報告された白血球附着阻止試験 (leucocyte adherence inhibition assay, 以下 LAI assay と略) は, 腫瘍の膜特異抗原に対する細胞性免疫応答を *in vitro* でとらえるものであり, 従来の蛋白や酵素などを直接測定する方法とは異なる特異な癌診断法と期待されている^{5)~7)}。しかし, HCC においても, その診断的意義は未だ十分に検討されていない。本稿では, 1975 年, Grosser ら⁸⁾により開発された

Studies on the Clinical Significance of Leucocyte Adherence Inhibition (LAI) Assay in Hepatocellular Carcinoma (HCC). **Manabu Yoneshima**, Department of Internal Medicine (I), (Director: Prof. N. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

ガラス試験管壁への mononuclear cells の付着阻止を観察する tube LAI assay を HCC において行い、本試験と各種腫瘍マーカーとの比較および腫瘍の大きさとの関連なども検討し、本試験の診断的意義を明らかにしようとした。

対象および方法

1. 対象

対象は、金沢大学第1内科または関連施設に入院した HCC 55 例、HCC を合併しない肝硬変 (以下 LC と略) 34 例、慢性肝炎 (以下 CH と略) 16 例、急性肝炎 (以下 AH と略) 8 例、HCC を除く他の悪性腫瘍 21 例 (9 例は肝転移を伴う) である。さらに対照として、健康者 28 例でも本試験を行った。HCC の診断は、17 例は手術ないしは剖検で確認され、残り 38 例は臨床症状、一般生化学検査に加えて、肝動脈造影所見により診断された。他の疾患の診断は、臨床症状、生化学的検査に加え、各種 X 線検査、生検、腹腔鏡によりなされた。

2) Tumor extracts の抽出

tumor extracts の抽出は Halliday ら⁹⁾の方法に準じて行った。すなわち、手術ないしは剖検によって得られた新鮮 HCC 組織を氷冷した pH 7.3, 0.01 M リン酸緩衝液加食塩水 (以下 PBS と略) 内で壊死部・結合組織を除去後、ハサミにて細切した。これをテフロンホモジナイザーにてホモジネート後、さらに PBS を加え、4°C, 20,000 g, 30 分間遠心した。上清を Folin-Lowry 法にて蛋白濃度を測定し、0.5 ml ずつに分注し、assay に使用するまでは -80°C にて保存した。同様に、健康

肝組織からも extracts を抽出し、分注保存した。

3) Mononuclear cells の分離

ヘパリン加末梢血 10 ml より、Conray-Ficoll による比重遠沈法⁹⁾で mononuclear cells を分離し、medium TC-199 m にて 1×10^7 個/ml に調整した。

4) Tube LAI assay

Grosser らの方法⁹⁾に準じて、tube LAI assay を行った。Fig. 1 に示すごとく、mononuclear cells 浮遊液 100 μ l, 蛋白濃度 1 mg/ml の HCC あるいは健康肝 extracts 100 μ l, medium TC-199 m 300 μ l を 16×255 mm の WHEATON culture tube に注入した。水平位にて 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 2 時間培養後、試験管を垂直に立て、パストールピペットにて管底の液を軽く攪拌後、管底液中の非付着細胞数 (non-adherent cells) を Coulter Counter にてカウントした。測定結果は以下に示す式により、non-adherence index (以下 NAI と略) を算出して表わした⁹⁾。

NAI (non-adherence index)

$$= \frac{\text{non-adherence cells with HCC extract}}{\text{non-adherence cells with normal liver extract}} \times 100(\%)$$

なお、詳細は後述するが、予備実験として、数例の HCC 患者および健康者からの mononuclear cells を用いて、各種蛋白濃度 (0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml) の extracts で tube LAI assay を行った結果、extracts の至適蛋白濃度は 1 mg/ml であった。以後の測定は 1 mg/ml の蛋白濃度で行った。mononuclear cells 分離時の medium, LAI assay 時の medium には fetal calf serum は添加しなかった。また、測定はすべて triplicate で行い、平均値を求めて、NAI を算出した。

5) 各種腫瘍マーカーの測定

同時ないしほぼ同時期に採血した血清を用い、AFP 値、novel γ -GTP の有無を検討した。AFP は Dinabott 社製のキットを使用した Radioimmunoassay 法にて測定し、HCC の特異性の高くなる 400 ng/ml 以上を陽性とした。novel γ -GTP の有無は既報¹¹⁾²⁾¹⁰⁾のごとく、Polyacrylamide gradient gel electrophoresis にて検索した。

6) 腫瘍の大きさの測定

腫瘍の大きさの測定に用いた肝スキャンおよび CT スキャンは LAI assay とほぼ同時期に施行したものをを用いた。

(1) 肝スキャンによる進行度分類

HCC のステージ分類は肝癌研究会の試案³⁾¹⁰⁾に基づいた。すなわち、肝スキャンの正面像における defect の有無、程度により、Table 1 に示すごとく stage I~IV の 4 段階にわけた。

(2) CT スキャンによる腫瘍体積

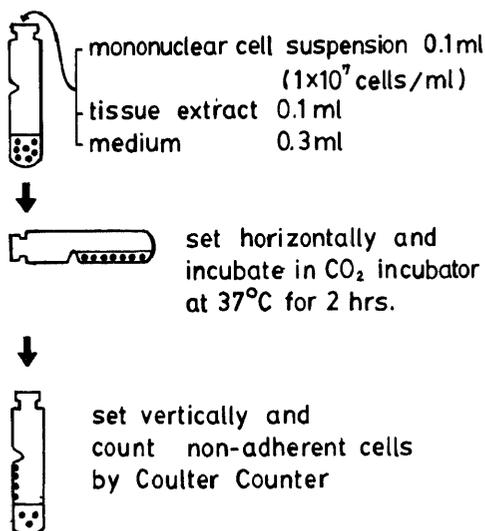


Fig. 1. Procedures for tube LAI (leucocyte adherence inhibition) assay.

Table 1. Stages and tumor volumes of HCC (hepatocellular carcinoma)

- 1). Stages of HCC classified by posterior-anterior view of liver scanning
 - Stage 1: no detectable filling defect.
 - Stage 2: Defect is below 20% in proportion to the whole hepatogram.
 - Stage 3: Defect is from 20% to 70%
 - Stage 4: Defect is above 70%
- 2). Tumor volumes of HCC calculated by measurement in CT scanning
 - S: an area of the section
 - C: constant
 - V: volume

$$V = \frac{1}{C^2} (S_1 + S_2 + \dots + S_n)$$

1 cm 毎にスライスした各断面にて、プランニメーターを用いて、各断面における肝面積・腫瘍面積を求め、Table 1 の式で示すように、それらを積分することにより、肝全体積 (total liver volume)、腫瘍占拠体積 (tumor volume)、腫瘍占拠率 (tumor ratio) を算出した¹¹⁾。

7) 細小肝癌 (Small HCC)

手術や剖検あるいは画像診断にて診断した腫瘍径 3 cm 以下の HCC を細小肝癌として扱った¹²⁾。画像診断にて診断した例は、腹部超音波検査 (ultrasonography)、選択的血管撮影 (infusion hepatic angiography)、血管撮影下 CT スキャン (sequential CT with arterial portography) を行い、細小肝癌と診断した。

なお、平均値の差および陽性率の差の有意差検定はそれぞれ、t 検定、X² 検定にて、相関係数 (r) の有意差は r 表にて行った。

成 績

1) 添加抗原の蛋白濃度の決定

至適蛋白濃度を検討するため、以下の予備実験を行った。

数例の HCC 患者および健康人の mononuclear cells を用い、0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml の各種蛋白濃度の extracts 100 μl を添加して LAI assay を施行した。従って、最終蛋白濃度はそれぞれ 50, 100, 200, 400 μg/ml となった。また、extracts の代わりに PBS 100 μl の添加にても測定を行い、この場合の最終蛋白濃度は 0 μg/ml であった。Fig.2 に示すごとく、HCC 患者の mononuclear cells および健康人の mononuclear cells とともに、最終蛋白濃度 200 μg/ml までは非付着率 (non-adherent ratio) は直線的に増加し、以後はほぼプラトーになり、至適添加蛋白濃度は 1 mg/ml (最終蛋白濃度では 200 μg/ml) と判定された。この至適濃度で

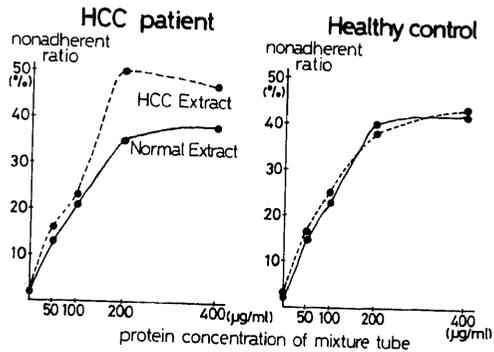


Fig.2. optimal protein concentrations of tissue extracts in LAI assay.

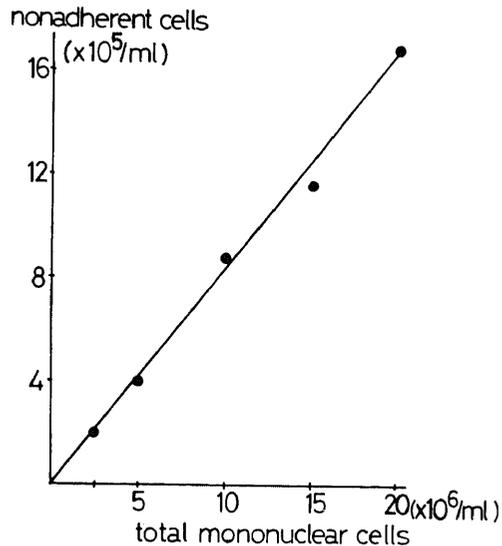


Fig.3. Correlation between total mononuclear cells and nonadherent cells in LAI assay using cells derived from one case of HCC patients and normal liver extracts.

LAI assay を行った。

2) 浮遊 mononuclear cells 数の決定

浮遊 mononuclear cells 濃度をそれぞれ 2.5 × 10⁶, 5 × 10⁶, 1 × 10⁷, 1.5 × 10⁷, 2 × 10⁷ 個/ml として、HCC 患者および健康者で LAI assay を行った (tube 内の最終 mononuclear cell 濃度は 0.5, 1, 2, 3, 4 × 10⁶ 個/ml となる.)。Fig.3 にその 1 例を示すが、assay 後の非付着 mononuclear cell 濃度はそれぞれ 2.0, 4.0, 11.3, 17.0 × 10⁵ 個/ml となり、非付着率はそれぞれ 40.0, 40.0, 42.0, 43.3, 42.5 % とほぼ一定であった。LAI assay 陽性を示す HCC 患者の mononuclear cells と HCC extracts を用いた assay の場合のみ、非付着率は 60~80 % と高値を示したが、やはり各 mono-

Table 2. Mean values (M.±S.D.) of NAI (non-adherence index) of LAI assay in various diseases

Diseases	No. of Cases	NAI (%) by	
		Extract A	Extract B
HCC	55	27.5±21.7	15.6±16.9
LC	34	8.9±11.9	0.9±9.2
CH	16	-1.3±12.0	-4.2±9.0
AH	8	-0.7±9.4	-2.4±14.5
Other malignancy	21	2.4±7.7	0.2±10.2
Healthy	28	0.2±8.9	2.6±6.0

Table 3. Positive ratio of LAI assay in various diseases

Diseases	No. of Cases	LAI positive cases by		
		Ext. A	Ext. B	Ext. A &/or B
HCC	55	34	15	37 (67%)
LC	34	6	1	6 (18%)
CH	16	0	0	0
AH	8	0	0	0
Other malignancy	21	0	1	1 (5%)
Healthy	28	0	0	0

nuclear cell 濃度で非付着率は一定であった。その他の mononuclear cells と extracts の組み合わせでは、非付着率はやはり濃度に関係なく 40%前後と一定であった。この様な予備実験の結果をふまえて、 1×10^7 個/ml の mononuclear cell 濃度で LAI assay を行った。

3) 各種疾患における tube LAI assay

Table 2 に各疾患群の NAI の平均値を示す。2 例の extract A および B を用い、LAI assay を行った。健康者 28 例の NAI はそれぞれ $0.2 \pm 8.9\%$ 、 $2.6 \pm 6.0\%$ (M.±S.D.) であり、いずれの場合もそのほぼ M.+2 S.D.以上である +20%以上を陽性とした。Fig.4 に各疾患における NAI を extract A, B 別に示した。extract A を用いた場合、HCC における LAI assay 陽性率は 55 例中 34 例、62%と高率であったが、LC における偽陽性も 34 例中 6 例、18%に認められた。しかし、他の良性肝疾患や他の悪性腫瘍では陽性例は認められなかった。extract B を用いた場合、HCC における陽性率は 55 例中 15 例、27%と低率であり、LC における偽陽性も 34 例中 1 例、3%と低率で、他の良性肝疾患でも陽性例は認められなかった。しかしながら、肝転移を伴う他の消化器癌で 1 例の陽性を認めた。extract A, B の少なくともどちらか一方が陽性の場合を LAI assay

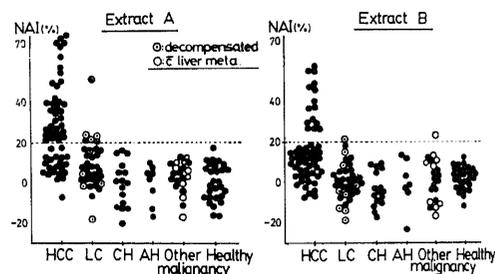


Fig. 4. NAI (%) of LAI assay by using HCC extracts A and B in various diseases.

陽性とすれば、陽性率は HCC 55 例中 37 例、67%であり、偽陽性は LC 34 例中 6 例、18%、他の悪性腫瘍 21 例中 1 例、5%であった (Table 3)。

4) LAI assay と他の腫瘍マーカーとの関連

Fig.5 に novel γ -GTP の出現の有無に分けて、NAI 値と novel γ -GTP との関係を示した。novel γ -GTP 陽性例の NAI は、extract A, B 別でそれぞれ $29.5 \pm 21.1\%$ 、 $17.6 \pm 17.7\%$ (M.±S.D.) であり、novel γ -GTP 陰性例の NAI は、それぞれ $26.9 \pm 21.8\%$ 、 $14.9 \pm 16.2\%$ (M.±S.D.) であり、いずれの場合にも novel γ -GTP の陽性群と陰性群とを比較しても、NAI

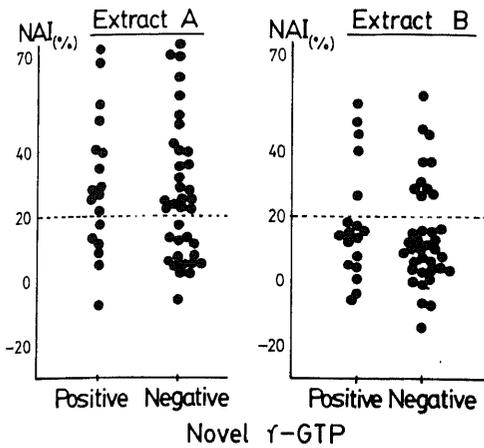


Fig. 5. Correlation between NAI (%) of LAI assay and positive cases of novel γ -GTP (novel γ -GTP isoenzyme)

に有意差は認められなかった。また、novel γ -GTP 陽性例 18 例中、LAI assay 陽性は、extract A, B 別でそれぞれ 12 例 (67%) 5 例 (28%) であり、novel γ -GTP 陰性例 37 例中の LAI assay 陽性は 22 例 (59%) 10 例 (27%) を示し、やはり novel γ -GTP 陽性群と陰性群とは LAI assay の陽性率に差を認めなかった。

Fig.6 に同様に AFP 値と NAI 値との関連性を示すが、extract A, B 別の相関係数はそれぞれ、 $r=0.19$, $r=-0.01$ であり、相関性は認められなかった。extract A, B 別の LAI assay の陽性率は、AFP 陽性群 28 例中、それぞれ 19 例 (68%), 8 例 (29%) であり、AFP 陰性群 27 例では 14 例 (52%), 7 例 (26%) であった。extract A, B のすくなくとも一方が陽性を示す例は、AFP 陽性群では 22 例 (79%), AFP 陰性群では 15 例 (56%) であり、やはり、いずれの場合も AFP 陽性群と陰性群の間には LAI assay の陽性率には有意差を認めなかった。

5) 肝スキャンによる HCC のステージ分類と NAI との関係

Fig.7 に示すように、stage I ~ III の各群の NAI は、extract A では $24.8 \pm 21.2\%$, $25.9 \pm 23.4\%$, $30.3 \pm 19.9\%$ (M. \pm S.D.), extract B では $14.1 \pm 17.1\%$, $13.6 \pm 10.3\%$, $14.9 \pm 17.3\%$ (M. \pm S.D.) であり、extract A, B と各群間に NAI 値に有意差は認めなかった。また、extract A, B 別の LAI assay の陽性率は、stage I 群の 12 例ではそれぞれ 7 例 (58%), 4 例 (33%), stage II 群 15 例では 8 例 (53%), 3 例 (20%), stage III 群 23 例では 16 例 (70%), 5 例 (22%) であった。extract A, B のすくなくとも一方が陽性を示す例は、stage I 群 8 例 (67%), stage II 群 8 例 (53%)

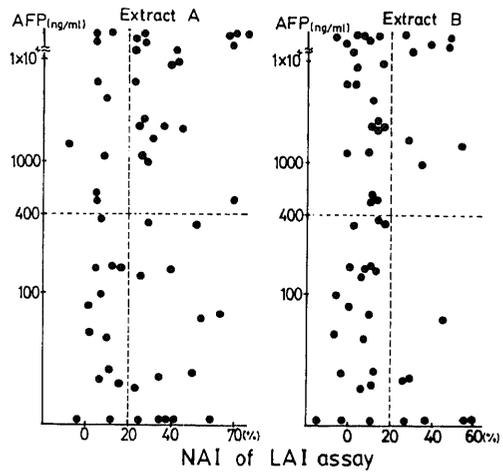


Fig. 6. Correlation between NAI (%) of LAI assay and AFP (α -fetoprotein) levels.

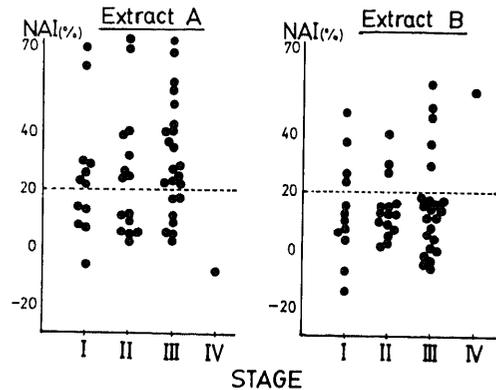


Fig. 7. Correlation between NAI (%) of LAI assay and stages of HCC by posterior-anterior view of liver scanning.

%)、stage III 群 16 例 (70%) であり、stage I ~ III の各群間に LAI assay の陽性率は有意差を認めず、肝スキャン正面像で欠損像のみられない stage I の 12 例中 8 例が LAI assay 陽性を示した。

6) CT スキャン所見より計測した腫瘍の大きさと NAI との関係

NAI 値と腫瘍体積あるいは腫瘍占拠率との関係を Fig.8 および Fig.9 に示す。NAI 値と腫瘍体積との相関係数は、extract A, B でそれぞれ $r=0.10$, $r=0.06$ であり、NAI 値と腫瘍占拠率との相関係数もそれぞれ $r=0.09$, $r=0.06$ を示した。これより、NAI 値は腫瘍体積・腫瘍占拠率のいずれとも相関性が認められず、理論上、細小肝癌の範ちゅうに入る、腫瘍体積 30 cm^3 以下の 10 例中 6 例、腫瘍占拠率 1% 以下の 8 例中 6 例にも LAI assay 陽性を認めた。

7) 細小肝癌における各種腫瘍マーカー

Table 4 に直径 3 cm 以下の細小肝癌 8 例における各

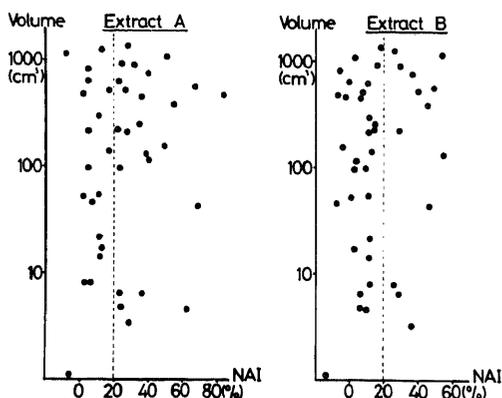


Fig. 8. Correlation between NAI (%) of LAI assay and tumor volumes of HCC by measurement in CT scanning.

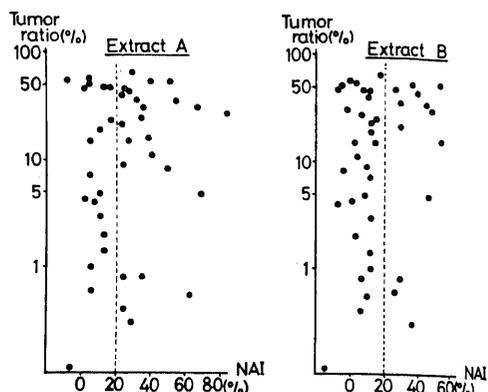


Fig. 9. Correlation between NAI (%) of LAI assay and tumor ratio of HCC by measurement in CT scanning.

Table 4. LAI assay and various tumor markers in patients with small HCC (maximal diameter below 3 cm)

Cases	Age	Sex	LC	Size	Tumor markers		
					Novel γ -GTP	AFP(ng/ml)	NAI (%)
case 1	68	M	(+)	2.4×1.8 1.3×1.0	(-)	984	36.5
case 2	71	M	(-)	3.0×3.0	(-)	22	26.0
case 3	43	M	(+)	2.5×1.2	(-)	23	34.8
case 4	71	M	(+)	2.0×1.5	(+)	134	23.9
case 5	61	F	(+)	1.5×1.5 0.8×0.8	(-)	156	12.2
case 6	63	M	(+)	2.0×2.0	(-)	505	68.9
case 7	67	F	(+)	1.5×1.5	(-)	25	-6.1
case 8	76	M	(+)	2.5×2.0	(-)	10	12.9

LC(+): with liver cirrhosis

LC(-): without liver cirrhosis

種腫瘍マーカー検索結果を示した。細小肝癌8例中、AFP陽性は2例、novel γ -GTP陽性は1例であるのに比較して、LAI assay陽性は5例、63%と、対象としたHCC 55例の陽性率67%と変わらない高い陽性率が得られた。

考 察

LAI現象とは、本来白血球はガラスやプラスチックに付着しやすい性質をもっているが、担癌個体の白血球は同種の癌特異抗原と接触することにより、その付着しやすい性質を失なう現象をいう⁵⁾。このような現象を癌の診断法として初めて応用したのが、1972年のHallidayら⁶⁾の報告に始まる。彼等は血球計算盤を用いるhemocytometer LAI assayを行っているが、1975年にGrosserら⁶⁾によりテストチューブを用いるtube

LAI assayが始められている。さらに、microtest plate¹³⁾¹⁴⁾、capillary tube¹⁵⁾、microslide¹⁶⁾を用いるなど、種々の方法も開発されてきている。LAI assayの機序に関しては未だ不明な点が多く、さらにhemocytometer LAI assayとtube LAI assayとでは、その機序は異なるとされている⁹⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。前者では、effector cellはT-lymphocyteであり、T-lymphocyteが抗原に反応してlymphokine様の物質が放出され、それによりlymphocyteの付着阻止がおこると考えられている¹⁷⁾¹⁹⁾²⁰⁾。後者では、effector cellはmonocyteであり、癌特異抗原に対するIgG抗体とmonocyteのFc receptorが結合し、それによりmonocyteの付着性が失われるとされている⁹⁾¹⁸⁾。

方法論的にみると、hemocytometer LAI assayは非付着白血球を洗い流した後の付着白血球を顕微鏡下

でカウントする方法である。一方, tube LAI assay は試験管底中の非付着細胞を自動血球計算機でカウントする方法であり, 再現性および客観性という点では, 後者の方が優れているといわれている⁶⁾⁹⁾。著者も, Grosser らの方法に準じて, tube LAI assay を行った。

さらに, 使用する抗原に関しても, いくつかの問題点が指摘されている²⁾¹⁾。著者は, 培養 HCC 細胞を含めいくつかの HCC 組織抽出液を用い LAI assay を行ったが, 明らかな反応を示すのはわずかに 2 つ (extract A, B) のみであった。しかも陽性を示さない extracts との間には, 組織型 (Edmondson 分類) や組織 AFP, HBs 抗原, LC の有無において, 明らかな相違を認めていない。従って, 現在著者は, extract A, B の 2 つを抗原に用いて, assay を行っており, しかもどちらか一方でも NAI 高値 (NAI \geq 20%) の場合を LAI assay 陽性とした。また, 健常肝組織抽出液を用いた場合でも, 平均 40% の白血球が付着性を失なう。このように, 非特異的 LAI 反応がかなりの程度で起こるのは, extracts 中に含まれる癌特異抗原はほんのわずかであり, 逆に, かなりの量の非特異抗原が含まれるためと考えられている²²⁾²³⁾。既に癌関連抗原の精製・分離・同定が試みられているが²²⁾²³⁾, 満足のいく成績は得られていないのが現状である。今後, このような抗原が精製され, 標準物質として得られるならば, 極めて低濃度の抗原で特異的反応を測定できる系が確立され, 本法の臨床的有用性はさらに高まるものと考えられる。

LAI assay の臨床的応用に関しては, 悪性黒色腫¹⁷⁾¹⁸⁾・乳癌⁶⁾⁹⁾・大腸癌^{24)~27)}・胃癌²⁵⁾・膀胱癌^{25)28~31)}・肺癌²⁷⁾など各種の悪性腫瘍において報告されている。HCC においても試みられているが, いずれの報告においても検討症例数が少なく, また, 著者の研究のように, 同時に他の腫瘍マーカーの出現や腫瘍の大きさとの関連などについても十分検討された報告はみられていない。Halliday⁷⁾, Dusheiko³²⁾, 恩地²⁾¹⁾, 平田³³⁾, 熊谷³⁴⁾らは, それぞれ 6, 21, 14, 27, 32 例の HCC に LAI assay を行い, 陽性率はそれぞれ, 4 例 (67%), 9 例 (42%), 10 例 (79%), 23 例 (85%), 22 例 (69%) であると報告している。著者の 55 例における検討でも 67% と, これらの成績とほぼ同様の陽性率を示している。偽陽性はついてみると, Dusheiko ら³²⁾の報告では, HCC 以外の肝疾患 9 例中 6 例が陽性を示している。それ以外の報告²⁾¹⁾³³⁾³⁴⁾では, HCC の前駆性病変とも言われる LC での陽性率は 20% 弱にみられるものの, 他疾患での出現は極めて低く, 著者の成績と同様に LAI assay の特異性は高い。

HCC は, AFP や novel γ -GTP のように優れた腫瘍マーカーに恵まれている。しかし, 最近では, LC に

おいて HCC の high risk group の基準などを設けて, 進歩した各種の画像診断法を駆使することにより, 比較的早期の HCC の発見率も向上している。それ故に, HCC に特異性が高いとされている AFP 400 ng/ml 以上の陽性率は, 従来言われている程高くなく, 50~60% くらいである³⁾⁴⁾。これを補うものとして, HCC に特異な novel γ -GTP が登場している¹⁾²⁾¹⁰⁾。本アイソザイムの陽性率は 50% 余りで, AFP 400 ng/ml 以下でも約 40% 弱の陽性率が得られている。しかし, 両者を組み合わせれば 75% 位には診断率は向上するが, それでも 25% 位には血清学的に特異な診断がねされていない現状はある³⁾⁴⁾。このような背景より, 他の腫瘍マーカーとの比較において LAI assay の意義について考察したい。

本法と AFP との関係を検討したもとしては, 熊谷ら³⁴⁾の報告にみるにすぎない。それによると, AFP 400 ng/ml 以上を示した 23 例中 LAI assay 陽性は 17 例 (74%), AFP 400 ng/ml 未満であった 9 例中 LAI assay 陽性は 5 例 (56%) であった。これら両群間の出現率に有意差を認めないことより, LAI assay 陽性は AFP 値と無関係であるとしている。著者も, LAI assay と AFP 値に加えて novel γ -GTP の有無との関連をも検討したところ, いずれとの間にも明らかな相関性は認められず, LAI assay は独立性の高いパラメーターであることが示唆されている。しかも, これら 3 つのマーカーを組み合わせることにより, HCC 55 例中の 84% に特異性の高い診断が可能であるという成績が得られている。このような点からも, 本法の臨床的意義の高いことが窺えよう。

癌の血清学的診断法としての臨床的価値を評価するには, これまでに述べてきたような特異性や検出率などが問題になることはいうまでもないが, 進行度との関連性, 特に早期診断における有用性を検討することが重要である。HCC においては, いずれのマーカーに関しても, このような観点よりなされた研究は極めて乏しい。この従来臨床上問題になっている HCC に限れば, 分泌型腫瘍マーカーの AFP や novel γ -GTP の陽性率は, 進行度とはほとんど無関係であるという成績も報告されている²⁾³⁵⁾。しかし, 細小肝癌での陽性率は明らかに低く, 早期診断における有用性には大きな限界が指摘されている。LAI assay は, 従来の蛋白や酵素を直接測定する方法と異なり, 細胞性免疫反応を *in vitro* でとらえようとする方法であることより, 癌の早期診断法としての有用性が期待されている^{7)28)~3)35)}。また, 本法は末期になると細胞性免疫能の低下あるいは血清中に免疫反応を抑制する因子 (blocking factor) の出現などの原因により, 逆に陰性化するという指摘

もなされている⁶⁾⁹⁾³⁸⁾³⁹⁾。

HCCのLAI assayに関しては、腫瘍の大きさや進行度との関連を検討した報告は未だない。著者は、肝スキャン所見による腫瘍の進行度分類に加えて、CTスキャンに基づいて立体的に算出した腫瘍体積と腫瘍占拠率との関連より、LAI assayの有用性について検討した。その結果、NAIはいずれとの間にも関連性は認められず、肝スキャンで欠損像のみられないstage Iにおいても12例中8例に、また、CTスキャンにより算出した腫瘍体積30 cm³以下の10例中6例と高率に、LAI assayが陽性であった。

さらに、最大径3 cm以下の細小肝癌8例におけるLAI assayの有用性についてみると、AFP 400 ng/ml以上は2例、novel γ -GTP陽性は1例に対し、LAI assay陽性は5例、63%と、対照としたHCC 55例の陽性率67%とほとんど変わらない成績が得られている。

以上述べてきたように、LAI assayはLCでの偽陽性が多少問題になるが、他のマーカーや進行度に無関係に出現し、さらに、細小肝癌における陽性率も高いことより、HCCの血液学的診断法としての有用性は高く、特に早期診断法として、期待できると考えられる。

結 論

HCC組織からの抽出液を用い、tube LAI assayを行い、各種腫瘍マーカーとの比較および腫瘍の大きさとの関連などを検討し、以下の結論を得た。

1) HCCにおけるtube LAI assayは感度・特異性が高く、HCC 55例中37例(67%)が陽性を示した。偽陽性は、LC 34例中6例(18%)、他の悪性腫瘍21例中1例(5%)であり、他の良性肝疾患では陽性例は認められなかった。

2) AFP値やnovel γ -GTPの有無とLAI assay値との関連性はなく、LAI assayを含めた3つのマーカーを併用することにより、HCC 55例中46例(84%)に特異性の高い診断が可能であった。

3) LAI assay値と肝スキャンによるHCCの進行度分類や、CTスキャン所見より計測した腫瘍体積、腫瘍占拠率との関連性は認められなかった。

4) 細小肝癌(最大腫瘍径3 cm以下)においてもLAI assayの有用性は高く、細小肝癌8例中、AFP陽性は2例、novel γ -GTP陽性は1例に対し、LAI assayは5例と高率に陽性であった。

5) 以上の成績より、HCCにおけるLAI assayはかなり特異性が高く、他のマーカーや進行度に無関係に出現し、さらに、細小肝癌における陽性率も高いことより、HCCの診断上、有用性が高いと考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師服部信教授に深甚の謝意を表します。また直接御指導をいただいた澤武紀雄講師(現、金沢大学癌研内科教授)ならびに御協力をいただいた第1内科第2研究室員各位に心から感謝いたします。

なお本論文の要旨は、第18回日本肝臓学会総会(昭和57年度、東京)、第41回日本癌学会総会(昭和57年度、大阪)及び第10回ISOBM(International society for onco-developmental biology and medicine)(昭和57年度、札幌)に発表した。

文 献

- 1) Sawabu, N., Nakagen, M., Yoneda, M., Makino, H., Kameda, S., Kobayashi, K., Hattori, N. & Ishii, M.: Novel γ -GTP isoenzyme specifically found in sera of patients with hepatocellular carcinoma. *Gann*, 69, 601-605 (1978).
- 2) Sawabu, N., Nakagen, M., Ozaki, K., Wakabayashi, T., Hattori, N. & Ishii, M.: Clinical evaluation of specific γ -GTP isoenzyme in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 51, 147-151 (1983).
- 3) 若林時夫: 肝細胞癌における各種腫瘍マーカーの診断能に関する研究—特にAFP陰性例と各進行度における検討を中心に—。肝臓, (投稿中)。
- 4) 澤武紀雄・若林時夫・尾崎監治・登谷大修・米島学・木谷恒・中原雅俊・小林健一・服部信: 肝細胞癌の腫瘍マーカー—組み合わせ診断能および進行度との関係を中心に—。癌の臨床, (印刷中)。
- 5) Halliday, W.J. & Miller, S.: Leucocyte adherence inhibition: A simple test for cell mediated tumor immunity and serum blocking factors. *Int. J. Cancer*, 9, 477-483 (1972).
- 6) Grosser, N. & Thomson, D.M.P.: Cell-mediated antitumor immunity in breast cancer patients evaluated by antigen-induced leucocyte adherence inhibition in test tube. *Cancer Res.*, 35, 2571-2679 (1975).
- 7) Halliday, W.J., Halliday, J.W., Campbell, C. B., Maluish, A.E. & Powell, L.W.: Specific immunodiagnosis of hepatocellular carcinoma by leucocyte adherence inhibition. *Brit. Med. J.*, 2, 349-352 (1974).
- 8) Böyum, A.: Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*, 4, 269-274 (1974).
- 9) Grosser, N., Marti, J.H., Proctor, J.W. &

- Thomson, D.M.P.: Tube leucocyte adherence inhibition assay for the detection of anti-tumor immunity. *Int. J. Cancer*, **18**, 39-47 (1976).
- 10) 澤武紀雄・尾崎監治・若林時夫・登谷大修・米島学・木谷恒・服部信: 酵素 γ -GTP-肝細胞癌に特異な Novel γ -GTP isoenzyme の臨床的意義とその性格—免疫と疾患, **4**, 773-789 (1982).
- 11) 米島学・登谷大修・尾崎監治・若林時夫・中源雅俊・加登康洋・沢武紀雄・小林健一・服部信・角谷真澄・鈴木正行・松井修・高島力: CT スキャン所見よりみた肝細胞癌の腫瘍占拠率と腫瘍マーカーおよび肝予備能との関連. 第 16 回日本肝臓学会西部会, A-67 席 (1981).
- 12) 臨床・病理 原発性肝癌取扱い規約(案). 日本肝臓研究会, 1981 年 6 月.
- 13) Holt, P.G., Roberts, L.M., Fimmel, P.J. & Keast, D.: The LAI microtest; A rapid and sensitive procedure for the demonstration of cell mediated immunity in vitro. *J. Immunol. Methods*, **8**, 277-288 (1975).
- 14) Leveson, S.H., Howell, J.H., Holyke, E.D. & Goldrosen, M.H.: Leucocyte adherence inhibition; An automated microassay demonstrating specific antigen recognition and blocking activity in two murine tumor systems. *J. Immunol. Methods*, **17**, 153-162 (1977).
- 15) Urist, M.M., Boddie, A.W., Jr., Holmes, E. C. & Morton, D.L.: Capillary tube leucocyte adherence inhibition; An assay for cell mediated immunity in cancer patients. *Int. J. Cancer*, **17**, 338-341 (1976).
- 16) Yonemoto, R.H., Chee, D.O., Krulisky, J. F. & Harrison, D.: A new leucocyte adherence inhibition assay—The automated microslide technique. *Proc. 70th annual meeting of the American Association for Cancer Research*, **20**, 157 (Abst. No. 633) (1979).
- 17) Halliday, W.J., Maluish, A.E., Little, J.H. & Davis, N.L.: Leucocyte adherence inhibition and specific immunoreactivity in malignant melanoma. *Int. J. Cancer*, **16**, 645-658 (1975).
- 18) Marti, J.H. & Thomson, D.M.P.: Anti-tumor immunity in malignant melanoma assay by tube leucocyte adherence inhibition. *Brit. J. Cancer*, **34**, 116-133 (1976).
- 19) Powell, A.E., Sloss, A.M. & Smith, R.N.: Leucocyte adherence inhibition: A specific assay of cell-mediated assay dependent on lymphokine-mediated collaboration between T lymphocytes. *J. Immunol.*, **120**, 1957-1966 (1978).
- 20) Koppi, T.A., Maluish, A.E. & Halliday, W.J.: The cellular mechanism of leucocyte adherence inhibition. *J. Immunol.*, **123**, 2255-2260 (1979).
- 21) 恩地森一: 白血球付着阻止試験と肝細胞癌診断. *肝臓*, **20**, 587-594 (1970).
- 22) Thomson, D.M.P., Rauch, J.E., Weatherhead, J.C., Friedlander, P., O'Connor, R., Grosser, N., Shuster, J. & Gold, P.: Isolation of human tumor-specific antigens associated with β_2 microglobulin. *Brit. J. Cancer*, **37**, 753-775 (1978).
- 24) Lopez, M.J. & Thomson, D.M.P.: Isolation of breast cancer tumor antigen from serum and urine. *Int. J. Cancer*, **20**, 934-949 (1977).
- 24) Halliday, W.J., Maluish, A.E., Stephanson, P.M. & Davis, N.C.: An evaluation of leucocyte adherence inhibition in the immunodiagnosis of colorectal cancer. *Cancer Res.*, **37**, 1962-1971 (1977).
- 25) Rutherford, J.C., Walters, B.A.J., Cavaye, G. & Halliday, W.J.: A modified leucocyte adherence inhibition test in the laboratory investigation of gastrointestinal cancer. *Int. J. Cancer*, **19**, 43-48 (1977).
- 26) Shani, A., Ritts, R.E., Jr., Tynne, G.S., Weiland, L.H., Silvers, A., Moertel, C.G. & Go, V. L.W.: A prospective evaluation of the leucocyte adherence inhibition test in colorectal cancer and its correlation with carcinoembryonic antigen levels. *Int. J. Cancer*, **22**, 113-119 (1978).
- 27) Browne, P., Abel, E.W. & Pentycross, C.R.: The leucocyte adherence inhibition test; a study on three groups of cancer patients. *Tumor Diagnostik*, **5**, 266-271 (1980).
- 28) Tataryn, D.N., MacFarlane, J.K. & Thomson, D.M.P.: Leucocyte adherence inhibition for detecting specific tumor immunity in early pancreatic cancer. *Lancet*, **I**, 1020-1021 (1978).
- 29) Russo, A.J., Douglass, H.O., Jr., Leveson, S. H., Howell, J.H., Holyoke, E.D., Harvey, S.R., Chu, T.M. & Goldrosen, M.H.: Evaluation of micro-leucocyte adherence inhibition assay as an immunodiagnostic test for pancreatic cancer. *Cancer Res.*, **38**, 2023-2029 (1978).
- 30) Douglass, H.O., Jr., Russo, A.J., Howell, J. H., Moore, M.C., Arbuck, S.G., Chu, T.M. &

Goldrosen, M.H. : Selectivity of the micro-leucocyte adherence inhibition assay in pancreatic cancer. *Cancer*, **43**, 1084-1088 (1979).

31) Goldrosen, M.H., Russo, A.J., Howell, J.H., Leveson, S.H., Moore, M.C., Holyoke, E.D. & Douglass, H.O. : Evaluation of micro-leucocyte adherence inhibition as an immunodiagnostic test for pancreatic cancer. *Cancer Res.*, **39**, 633-637 (1979).

32) Dusheiko, G.M., Kew, M.C. & Rabson, A.R. : Evaluation of leucocyte adherence inhibition in hepatocellular carcinoma. *Brit. J. Cancer*, **40**, 397-402 (1981).

33) 平田和文: 肝細胞癌における白血球粘着阻止試験 (LAI test) と Blocking test. 第1編: 診断的意義に関する検討. *肝臓*, **22**, 978-985 (1981).

34) 熊谷直樹・森實敏夫・中村達也・渡辺哲・土本寛二・神谷知至・土屋雅春: Tube LAI assayによる肝細胞癌の診断—“repeated LAI assay”の意義と応用—. *肝臓*, **21**, 1188-1195 (1980).

35) 中源雅俊: 肝細胞癌に特異性の高い novel γ -GTP isoenzyme に関する臨床病理学的研究. *日内会誌*, **70**, 1697-1706 (1981).

36) Flores, M., Marti, J.H., Grosser, N., MacFarlane, J.K. & Thomson, D.M.P. : an overview: Antitumor immunity in breast cancer assayed by tube leucocyte adherence inhibition. *Cancer*, **39**, 494-505 (1977).

37) Thomson, D.M.P., Tataryn, D.N., Schwartz, R. & MacFarlane, J.K. : Abrogation of the phenomenon of leucocyte adherence inhibition by excess circulating tumor antigen. *Europ. J. Cancer*, **15**, 1095-1106 (1979).

Studies on the Clinical Significance of Leucocyte Adherence Inhibition (LAI) Assay in Hepatocellular Carcinoma (HCC) Manabu Yoneshima, Department of Internal Medicine (I), (Director: Prof. N. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. *Juzen Med. Soc.*, **92**, 285-295 (1983)

Key words: LAI assay, α -Fetoprotein (AFP), Novel γ -GTP isoenzyme (novel γ -GTP), Volume of hepatocellular carcinoma.

Abstract

Leucocyte adherence inhibition (LAI) assay was investigated for detection of hepatocellular carcinoma (HCC) in comparison with other tumor markers such as α -fetoprotein (AFP) or novel γ -GTP isoenzyme (novel γ -GTP). The correlation between LAI assay and tumor volume was also studied.

HCC specimen and normal liver tissues were obtained from autopsy samples. Tissue extracts were prepared from these materials according to Halliday's method. Mononuclear cells were separated from ten ml of heparinized blood by density gradient on Ficoll-Hypaque and suspended in Medium Tc-199m at a concentration of 10^7 cells per ml. Tube LAI assay was performed according to Grosser's method, and the reactivities were expressed by the non-adherence index (NAI).

The LAI assay was positive in 37 of 55 (67%) patients with HCC, 6 of 34 (18%) patients of liver cirrhosis without HCC and one of 21 (5%) patients with other malignancies, but not in patients with other liver diseases.

The LAI assay was compared with other tumor markers. No correlation between NAI of the LAI assay and levels of AFP was observed. Also, mutual relation between NAI and the existence of novel γ -GTP could not be found. Therefore, the positivity of the LAI assay was independent of levels of AFP or existence of novel γ -GTP. The LAI assay was positive in 11 of 20 patients of

HCC in whom both AFP ($<400\text{ng/ml}$) and novel γ -GTP were negative. Consequently, 46 of 55 (84%) patients with HCC showed the presence of one or the other of the remaining markers.

Furthermore, detectability of the LAI assay was evaluated in relation to tumor size of HCC. No correlation was found between positivity of NAI and staging of HCC classified by posterior-anterior view of liver scanning. Also, there was no interrelation between NAI and tumor volume of HCC calculated by the findings of CT scanning. The LAI assay was positive in 5 of 8 patients with small HCC in which the maximal tumor diameter was below 3 cm.

It was concluded that the LAI assay had high specificity to HCC and high detectability of HCC and there was no correlation between positivity of the LAI assay and those of other tumor markers or tumor size.