日消外会誌　13（7）：837～842，1980年

胃癌患者免疫能の抑制機序について

千葉大学第1外科
石神博昭　藤本　茂

FURTHER IMMUNOLOGICAL STUDIES ON INHIBITORY MECHANISM IN GASTRIC CANCER PATIENTS

Hiroaki ISHIGAMI and Shigeru FUJIMOTO
First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

健常人8例，消化性潰瘍患者8例，胃癌患者10例より早期空腹時テトラガストリン刺激下に，胃内 pH を7前後に保ちつつ胃液を採取した．これら胃液を濾過，遠沈し，8～10℃の流水中にて透析した後真空乾燥し，各群のそれぞれの症例より同一蛋白量づつを取り混合したものを各群の胃液抽出物質とした．健常人および消化性潰瘍胃液抽出物質は，健常人9例の末梢血リンパ球を用いた PHA，Con A あるいは Sepharose protein A によるリンパ球幼若化反応に対してほとんど影響を与えなかった．一方，胃癌胃液抽出物質は上記 mitogen によるリンパ球幼若化反応を30μg/ml の添加で17.3～35.1%，100μg/ml の添加で40.9～55.9%の抑制を示した．また，健常人の末梢血リンパ球を用いた one-way リンパ球混合培養に対し，健常人・消化性潰瘍胃液抽出物質は100μg/ml の添加によりそれぞれ32.8%，33.6%の抑制を示したのに対し，胃癌胃液抽出物質では30μg/ml の添加で86%，100μg/ml の添加で87.3%の抑制を示した．以上より，胃癌患者胃液抽出物質は T，B リンパ球の幼若化を非特異的に抑制する因子を含んでいると考えられた．

索引用語：胃癌，胃液抽出物質，免疫抑制能，腫瘍関連抗原，リンパ球混合培養

緒　言

担癌体の細胞性免疫能低下は周知の事実であるが，その機序に関しては未だ究明されていない．担癌体が腫瘍を "not self" と認めるならば細胞性免疫能が亢進するのは当然であるが，もし腫瘍を "not self" と認識できなければ細胞性免疫能は当然何らの影響も受けないであろう．著者ら[1]は腫瘍細胞の細胞膜に存在する膜抗原を H-2 抗原抽出法に準じた方法で抽出し，これをリンパ球浮遊液に添加，培養した際のリンパ球幼若化反応（Lymphoproliferative reaction—LP 反応）は亢進すると報告しているが，一方，腫瘍よりの抽出物質が PH-ν induced LP 反応を抑制するとの報告[2]や腫瘍細胞より放出されるある種の peptide が担癌体の細胞性免疫能を抑制するとの報告[3]もある．著者ら[4)5)6)]はすでに胃癌組織よりの種々の因子　直接の遊出物を多く含んでいると考えられる胃癌患者胃液の抽出物質を採り上げ，この抽出物質の LP 反応に対する抑制作用について報告したが，今回，各種 mitogen を用いた LP 反応に対して胃液抽出物質がどのような影響を与えるかを観察し，さらにヒトリンパ球を用いた one-way のリンパ球混合培養（mixed lymphocyte culture—MLC）に対する影響についても検討した．

実験材料および研究方法

1．胃液の採取ならびに抽出方法

既報のようであるが略述すれば，健常人8名，消化性潰瘍症例8例，胃癌症例10例（臨床進行度では stage Ⅲ：8例，stage Ⅳ：2例，病理組織分類では poorly differentiated tubular adenocarcinoma 7例，moderately differentiated tubular adenocarcinoma 3例）より，早朝空腹時の貯留胃液を経鼻的に胃管により可及的に除去

し，さらに生理食塩水を用いて胃内を2～3回洗浄した後，テトラガストリン 4μg/kg を筋注，胃内 pH を $NaHCO_3$ 液により7前後に保ちながら90分間経時的に胃液を採取した．この際，血液，胆汁の混入した胃液は廃棄した．採取した胃液は直ちに氷冷，濾過，遠沈のうえ，上清を8～10℃の流水中で48時間透析を行い，それを真空乾燥した後－20℃に保存した．健常人・消化性潰瘍患者・胃癌患者胃液抽出物質はすべて使用時に，その一部を生食水に溶解し，0.22μ の濾過滅菌により無菌化した後，Lowry 法にしたがって蛋白含量を測定し，健常人を含めた前記3群中の各症例の同一蛋白量を混合したものを，それぞれ3群の胃液抽出物質とした．

2．末梢血リンパ球の分離

24歳～36歳の健常人9名から末梢血をヘパリン採血し，Ficoll-Conray 比重遠沈法によりリンパ球を分離し，これを3回洗浄した後，細胞濃度が 2×10^6/ml となるように培養液（15% AB 血清または自己血清，PC 100μg/ml, SM 100μg/ml 加 RPMI 1640）に浮遊させた．この際，AB 血清は56℃，30分間の加熱により非働化した．

3．リンパ球幼若化反応

上記方法により得られたリンパ球浮遊液100μl を Falcon microtest II microplate (flat-bottom) の各 well に分注した後，各種胃液抽出物質30μg または100μg を添加するとともに PHA-P (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.) 10μg/ml, Con A (Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.) 5μg/ml, または Sepharose protein A (SPA) (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) 0.5%を加え，CO_2 incubator (37℃, 5%CO_2 in air) 内で96時間培養した．この際，同時に上記各種 mitogen 単独添加およびリンパ球だけの培養も行った．培養終了24時間前に ^{3}H-thymidine (^{3}H-TdR) 0.5μCi を各 well に加え，自動細胞ハーベスターによるリンパ球の処理後，液体シンチレーション・カウンターにて ^{3}H-TdR 活性を測定した．

4．one-way リンパ球混合培養 (mixed lymphocyte culture—MLC)

前記と同じ方法で健常人末梢血リンパ球を分離し，このリンパ球の一部に 2×10^6個当り50μg の mitomycin C (MMC) を加え，37℃，60分間 incubate することにより stimulating cells とした．MMC 処理を行わない responding cells および stimulating cells をそれぞれ 2×10^6/ml (1：1) となるように培養液（15% AB 血清，PC 100μg/ml, SM 100μg/ml 加 RPMI 1640）に浮遊させた．この際，AB 血清は56℃，30分間の加熱により非働化した．MLC の対照として同一人の細胞浮遊液を stimulating cells と responding cells とした無刺激リンパ球混合培養 (unstimulated lymphocyte culture—ULC) を行った．MLC および ULC を行う際，健常人，消化性潰瘍または胃癌胃液抽出物質を30μg または100μg/ml 添加した．培養時間は72時間とし，培養終了24時間前に ^{3}H-TdR 0.5μCi/well を加え，上記3と同様の方法で ^{3}H-TdR の放射活性を測定した．

成　績

1．各種 mitogen-induced—LP 反応に対する胃液抽出物質の影響

(1) mitogen-induced LP 反応に対する胃液抽出物質の抑制率をつぎの式で計算した場合

$$\%抑制率=\left(1-\frac{\text{mitogen と胃液抽出物質添加時の LP 反応のcpm}}{\text{mitogen 単独添加時の LP 反応の cpm}}\right)\times100$$

a）PHA-induced LP 反応に対する胃液抽出物質の影響

図1-A に示したように PHA-induced LP 反応に対して健常人胃液抽出物質100μg/ml を添加した場合の抑制率は－2.6%であり，消化性潰瘍胃液抽出物質100μg/ml を添加した場合の抑制率は－1.3%である．一方，胃癌胃液抽出物出30μg/ml，または100μg/ml 添加時の抑制率はそれぞれ17.3%，40.9%である．

b）Con A-induced LP 反応に対する影響

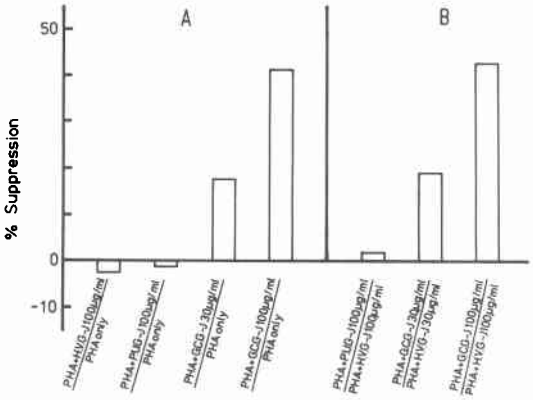
図2-A の如く Con A-induced LP 反応に対して健常人胃液抽出物質を100μg/ml 添加した時の LP 反応抑制率は2.3%であり，消化性潰瘍胃液抽出物質100μg/ml 添加時のそれは10%である．胃癌胃液抽出物質30μg/ml または100μg/ml 添加時の LP 反応抑制率はそれぞれ33.5%，44.9%である．

c）SPA-induced LP 反応に対する影響

図3-A のように SPA-induced LP 反応に対して健常人胃液抽出物質100μg/ml を添加した時の LP 反応抑制率は2%であり，消化性潰瘍胃液抽出物質100μg/ml 添加時のそれは7.9%である．一方，胃癌胃液抽出物質30μg/ml または100μg/ml 添加した時の LP 反応抑制率はそれぞれ35.1%，55.9%である．

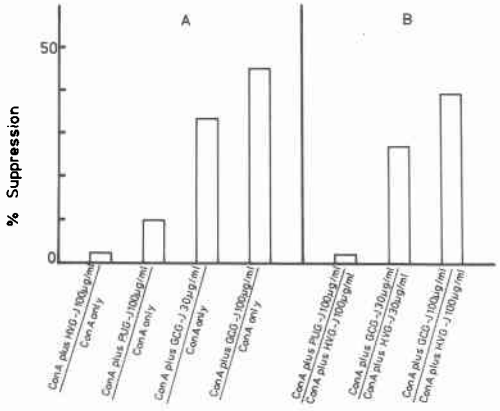
(2) 各種胃液内に共通に存在する物質の影響を考慮して抑制率をつぎの式で計算した．

図1-A：PHA 単独添加時に対する PHA＋各種胃液抽出物質添加時の幼若化抑制率（%）
図1-B：PHA＋健常人胃液抽出物質添加時に対する PHA＋各種胃液抽出物質添加時の幼若化率



H.V. G-J: 健常人胃液抽出物質
P.U. G-J: 消化性潰瘍胃液抽出物質
G.C. G-J: 胃癌胃液抽出物質

図2-A：Con A 単独添加に対する Con A＋各種胃液抽出物質添加時の幼若化抑制率
図2-B：Con A＋健常人胃液抽出物質添加時に対する Con A＋各種胃液抽出物質添加時の幼若化抑制率

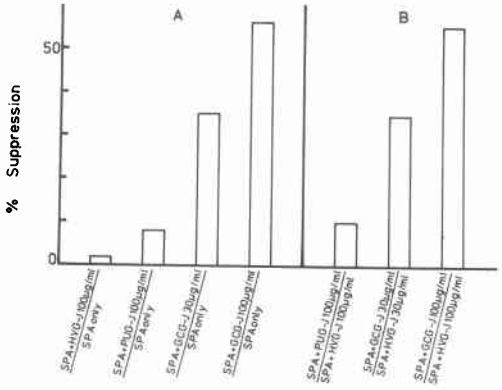


$$\%抑制率 = \left(1 - \frac{\text{mitogen と消化性潰瘍あるいは胃癌患者の胃液抽出物質添加培養時の LP 反応の cpm}}{\text{mitogen と健常人胃液抽出物質の添加培養時の LP 反応の cpm}}\right) \times 100$$

a）PHA-induced LP 反応に対する胃液抽出物質の影響

上記の方法によれば健常人胃液抽出物質を添加した場合の抑制率が0%となる．**図1-B** に示したように消化性潰瘍胃液抽出物質100μg/ml 添加時の LP 反応抑制率は1.7%であり，胃癌胃液抽出物質30μg/ml を添加した場合のそれは18.7%，100μg/ml では42.3%である．

図3-A：SPA 単独添加に対する SPA＋各種胃液抽出物質添加時の幼若化抑制率
図3-B：SPA＋健常人胃液抽出物質添加時に対する SPA＋各種胃液抽出物質添加時の幼若化抑制率



b）Con A-induced LP 反応に対する影響

図2-B のように消化性潰瘍胃液抽出物質100μg/ml を添加した時の LP 反応抑制率は2%である．一方，胃癌患者胃液抽出物質30μg/ml または100μg/ml 添加時の抑制率はそれぞれ26.8%および39.1%である．

c）SPA-induced LP 反応に対する影響

図3-B に示したように消化性潰瘍胃液抽出物質100μg/ml を添加した時の LP 反応の抑制率は10.2%であり，胃癌患者胃液抽出物質添加時のそれは30μg/ml においては34.5%，100μg/ml においては55%であった．

2. MLC に対する各種胃液抽出物質の影響

MLC に胃液抽出物質を添加しない場合の net count に対する健常人胃液抽出物質100μg/ml 添加培養時のそれの比（百分率）の平均値は**図4**のように66.4%であり，消化性潰瘍胃液抽出物質100μg/ml 添加時の net count との比は67.2%である．一方，MLC に胃癌患者胃液抽出物質30μg/ml を添加した場合の比は14.0%であり，100μg/ml 添加時では12.7%であり，MLC 単独の場合の net count の約1/8に低下している．

ここで前記1と同様に各種胃液抽出物質に共通に存在する物質の影響を考えて健常人胃液抽出物質100μg/ml 添加時の net count に対する消化性潰瘍胃液抽出物質添加時の net count の比（百分率）を取るとそれは**図5**の

図4：MLC に対する各種胃液抽出物質添加の影響

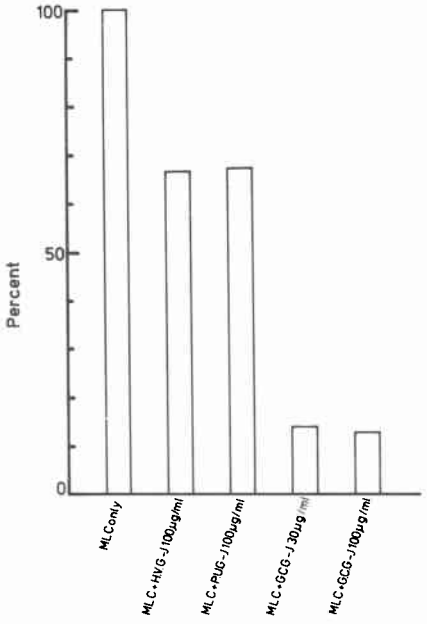
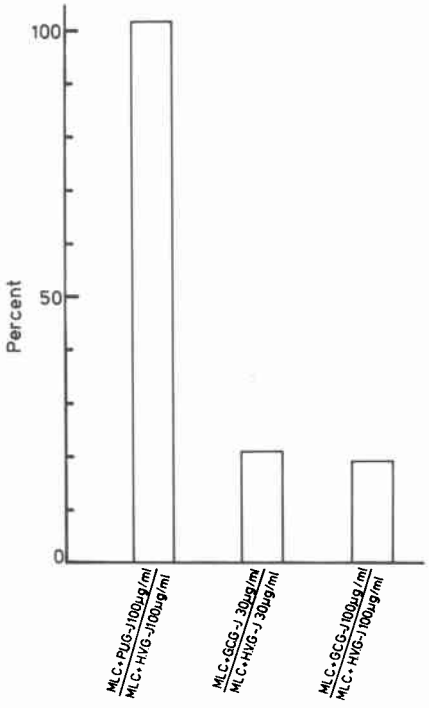


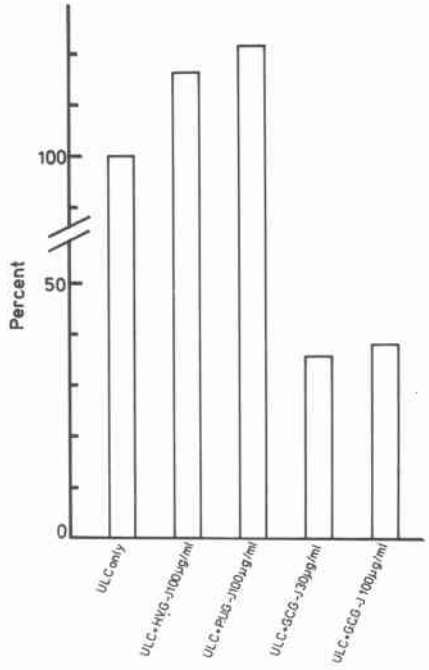
図5：MLC＋健常人胃液抽出物質添加群に対する MLC＋各種胃液抽出物質添加群の比



ように101.4%であり，胃癌胃液抽出物質30μg/ml または100μg/ml 添加時の比はそれぞれ21.1%および19.2%となり，これは健常人胃液抽出物質添加時の net count に比して約1/5の低下を見ている．

つぎに stimulating cells と responding cells を同一健常人より採取した ULC では胃液抽出物質を含まない時の net count に対する健常人胃液抽出物質添加時の net count の比（百分率）の平均値は**図6**のように116.0%であり，消化性潰瘍胃液抽出物質添加時のそれは121.2%である．一方，胃癌胃液抽出物質30μg/ml または100μg/ml 添加時の ULC 単独時の net count に対する比はそれぞれ35.8%および37.9%であり，ULC 単独時の約3/8の低下となる．MLC の時と同様に各種胃液内に共通に存在する物質の影響を考えて健常人胃液抽出物質添加時の net count に対する消化潰瘍胃液抽出物質添加時の net count の比（百分率）は**図7**のように平均104.5%であり，胃癌胃液抽出物質30μg/ml では30.9%，100μg/ml 添加時では32.8%であり，健常人胃液抽出物質添加時の net count に比べ，その低下率は約3/10である．

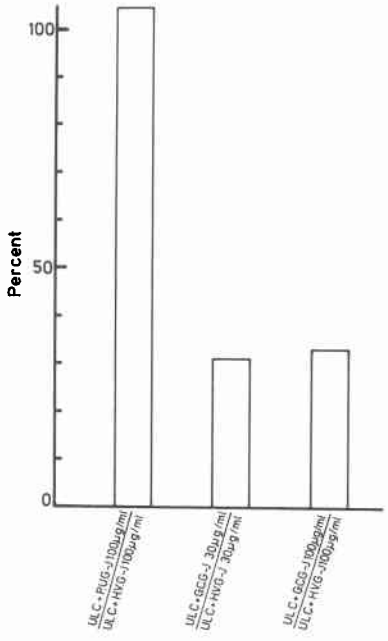
図6　ULC に対する各種胃液抽出物質添加の影響



考　察

悪性腫瘍の存在が，担癌体における細胞性免疫能低下の原因であるか結果であるかは不明であるが，その機構を解明する為の努力がなされている事は事実である．

図7　ULC＋健常人胃液抽出物質添加群に対する ULC＋各種胃液抽出物質添加群の比



Glasgow ら[7]は担癌体の血清内に存在する免疫抑制因子と免疫不全状態との関連について調べているが，癌患者53名中，DNCB による皮膚テスト陰性者は41名おり，そのうち27名の血清は健常人血清を対照とした PHA-induced LP 反応を70％以上抑制したと報告している．血清蛋白添加量と LP 反応抑制度との関係はその3.5 mg/ml の添加で100％，1.75mg/ml では75％であったと述べている．さらにこれら LP 反応を70％以上抑制した血清を DEAE cellulose ion exchange chromatography を用いて6つの分画に分けているが，Fraction I に抑制因子が存在し，その0.4mg/ml の添加で抑制度は100％，0.1mg/ml で約60％，0.05mg/ml でも約35％であったとしている．

Nimberg ら[8]は，Glasgow らの分画した peptide fraction をさらに詳しく検討しており，それが Cooper band ら[9]により報告された immunoregulatory α-globubin と類似していると報告しており，この物質が担癌体において大量に作られ血中に放出されることが免疫能低下の一因であると述べている．一方，Chiu ら[10]は炎症の急性期に血清中に増量する α_1-acid glycoprotein (AAG) のリンパ球に対する影響を mitogen-induced LP 反応および one-way MLC を用いて検討している．それによると AAG は PHA-induced LP 反応を250μg/ml の濃度で約70％，1000μg/ml においてほぼ100％抑制すると報告している．しかし，Con A および PWM-induced LP 反応の AAG による抑制は PHA によるものに比べやや弱いものであったとしている．また one-way MLC においては，AAG の 7μg/ml の濃度において約40％，30μg/ml で約50％抑制されたがそれ以上に AAG の濃度を増しても抑制度は増強されなかったと述べている．以上の原因として各種の mitogen や MLC によって刺激される T-cell の subset の相違をあげている．また AAG はリンパ球の表面に付着し細胞内の代謝経路に影響を与えるのではないかと推測している．

本稿における mitogen-induced LP 反応と one-way MLC の結果を考えると胃癌胃液抽出物質30μg/ml あるいは100μg/ml 添加において MLC の抑制度はともに約80％であり，LP 反応の抑制度に比べて著しく高いことは，Chiu らの報告とよく一致している．また健常人胃液抽出物質によっても MLC が抑制されることは，胃癌胃液抽出物質に含まれる物質と共通したものが健常人胃液内にも微量ながら存在していることの証左といえる．Miller[11] も血清内抑制因子のリンパ球に対する影響を調べているが，DEAE-cellulose chromatography にて分画したものをさらに Sephadex G-150により分けたところ，分子量8,000～25,000と30,000～60,000の部分に抑制が認められ，その1.0 OD_{280} unit/ml は PHA-induced LP 反応を対照に比して40～65％，Con A-induced LP 反応を50～70％抑制すると報告している．さらに MLC に対しては，0.015OD_{280} unit/ml (25±2ng 乾燥重量) 以下で約70％の抑制を示したとしており，Chiu らおよび本稿における報告と一致した見解を述べている．

一方，Murgita ら[12]はマウス脾細胞を PHA，Con A および lipopolysaccharide を用いて幼若化させ，マウス羊水より抽出した α-fetoprotein のこの反応に対する影響を検討しているが，10～100μg/ml 濃度で60～80％の抑制を示し，マウス脾細胞を用いた one-way MLC においては10～100μg/ml の濃度で40～60％の抑制を示したと報告しており，α-fetoprotein の抑制に対する濃度は LP 反応および MLC でほとんど変りないとしている．これは本稿における結果と異なったものであるが，本稿における抑制の主体が α-fetoprotein とは異なる物質であることを間接的に示しているともいえよう．また，Murgita らの MLC に用いた細胞の種類及び responding cells に対する stimulating cells の数が本稿

の場合と異なることも一因であろう．

Hess ら[13]は悪性および良性の卵巣腫瘍患者腹水26検体および嚢胞液11検体のリンパ球に対する抑制能について検討しているが，腹水の12検体および嚢胞液の2検体に対照に比べて30%以上の抑制能があり，それは悪性疾患由来のものだけに限られたものではないとしている．抑制能のある腹水または嚢胞液のうち6検体は健常人末梢血リンパ球を用いた PHA-induced LP 反応および two-way MLC をその40μl の添加により同量の健常人血清添加の対照例に比して95%以上抑制し，3検体は PHA-induced LP 反応を平均52%，MLC を78%抑制し，残りの3検体は PHA-induced LP 反応だけを抑制し，その抑制度は約53%であったと述べている．さらに腹水などの添加量と PHA または Con A-induced LP 反応および MLC の抑制率を比較しているが，MLC>PHA>Con A の順で少量の添加により抑制されることを報告している．腹水および嚢胞液に対する腫瘍細胞の関係を考える時，腫瘍関連抗原の直接遊出，分泌などにおいて比較的環境の似ている胃癌胃液においても胃液内に類似の免疫抑制因子が存在することは容易に推測できることであり，本稿における LP 反応および MLC の抑制もそれらの抑制因子に原因を求めることができよう．以上より，胃癌胃液内には各種 mitogen-induced LP 反応および MLC を非特異的に抑制する物質の存在することが明らかとなったが，今後は胃癌の各病期における胃液とその抑制能との関係，および抑制の機構に関して検討を加えていきたいと考える．

閉塞性黄疸における治療上の大きな問題として黄疸遷延があげられる．

文　献

1) 宮崎　勝ほか：癌患者における免疫学的指標としての tumor-associated antigen (TAA) の臨床応用．医学のあゆみ，**107**：435—437，1978．
2) Remacle-bonnet, M.M., et al.: Inhibition of normal allogeneic lymphocyte mitogenesis by a soluble inhibitor extracted from human colonic carcinoma. J. Immunol., **117**: 1145—1151, 1976.
3) Badger, A.M., et al.: Immunosuppressive activity and tissue polypeptide antigen content of human ascitic fluids. Cancer Res., **38**: 3365—3370, 1978.
4) 石神博昭ほか：胃癌患者胃液の免疫学的検討．癌の臨床，**26**：27—32，1980．
5) 石神博昭ほか：胃癌患者胃液内の免疫抑制因子の検討．臨床免疫，12，6月，1980．
6) 藤本　茂ほか：胃癌患者胃液抽出物質の細胞性免疫能に対する検討．日消会誌，**76**：1888，1979．
7) Glasgow, A.H., et al.: Association of anergy with an immunosuppresive peptide fraction in the serum of patients with cancer. N. Engl. J. Med., **24**: 1263—1267, 1974.
8) Nimberg, R.B., et al.: Isolation of an immunosuppresive peptide fraction from the serum of cancer patients. Cancer Res., **35**: 1489—1494, 1975.
9) Cooperband, S.R., et al.: The effect of immunoregulatory alpha globulin (IRA) upon lymphocytes in vitro. J. Immunol., **109**: 154—163, 1972.
10) Chiu, K.M., et al.: Interaction of alpha-acid glycoprotein with the immune system. Immunology, **32**: 997—1005, 1977.
11) Miller, F.: Serum-derived immunosuppressive substances. Transplantation, **21**: 179—187, 1976.
12) Murgita, R.A., et al.: Suppression of the immune response by α-fetoprotein. J. Exp. Med., **141**: 440—452, 1975.
13) Hess, A.D., et al.: Inhibition of in vitro lymphocyte function by cystic and ascitic fluids from ovarian cancer patients. Cancer Res., **39**: 2381—2389, 1979.