

消化器癌患者での leukocyte adherence inhibition (L.A.I.) test

名古屋大学第2外科

殿村 邦彦 杉本 一好 寺部 啓介
亀井 秀雄 近藤 達平

A STUDY OF LEUKOCYTE ADHERENCE INHIBITION (L A I) TEST IN GASTROINTESTINAL CANCER

Kunihiko TONOMURA, Kazuyoshi SUGIMOTO, Keisuke TERABE,
Hideo KAMEI and Tatuhei KONDO

2nd Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine

胃癌症例61例, 大腸癌症例39例を対象として allogeneic な腫瘍組織抽出液を抗原として, Leukocyte Adherence Inhibition (LAI) Test を行い術前, 術後の stage 別陽性率, 再発癌症例の陽性率を求めた。根治手術可能であった症例は術前の LAI 陽性率は高く, 非根治手術に終わった症例の陽性率は低かった。再発癌症例でも LAI 値陽性率は高く, 癌補助診断に有用と考えられた。胃癌抗原に対する大腸癌症例の LAI 値陽性率も比較的高く, 抗原の交差性も示唆された。患者自己血清を加え LAI test を行くと陽性例が陰性化した。患者自己血清中に blocking factor の存在が示された。

索引用語 : LAI test, 癌補助診断

緒 言

癌特異抗原の存在は動物実験系においては明らかにされているが^{1)~3)}, 臨床的には癌特異抗原と癌関連抗原とを含めた特異反応としてとらえられており, それらの中には Cytotoxicity Test⁴⁾, Macrophage Migration Inhibition (MMI) Test⁵⁾, Leukocyte Migration Inhibition (LMI) Test⁶⁾ Mixed Lymphocyte-Tumor Reaction (MLTR) Test⁷⁾, コロニー形成阻止試験⁸⁾などがある。

Halliday らの LAI (Leukocyte Adherence Inhibition) Test⁹⁾¹⁰⁾は感作されたリンパ球が抗原と反応した際 liphokine 様物質を放出し, この物質が白血球のガラス板への付着を阻止する現象を用いたものである。また, 患者自己血清を添加した際, この作用が阻止される点から, 担癌患者血清中に blocking factor の存在を示唆した。著者らは, 胃癌, 大腸癌, 正常胃粘膜組織より, Halliday らの方法に従い抗原を抽出し, 胃癌, 大腸癌症例, 他の悪性疾患症例, ならびに

健康人を対象にして LAI Test を施行し胃癌, 大腸癌症例における本反応の臨床的有用性を検討した。

材料および方法

1. 組織抽出液 (抗原) の作製

手術により切除された胃癌, 大腸癌組織より癌組織に富む部分を5~6g 採取し, 滅菌生理食塩水にて数回洗浄後細切した。これを pH 7.2 phosphate buffer saline (PBS) 中にて homogenizer でホモジネートした。この液を1,600×g 30分間遠沈し, 上清をさらに20,000×g 4℃下で60分間遠沈し, その上清を抗原とした(以下胃癌抗原, 大腸癌抗原という)。抗原の平均蛋白濃度は2.1mg/mlであった。実験に使用する抗原は-80℃で保存した。同様に良性疾患にて切除された胃組織より正常と思われる胃粘膜を採取し抗原を作製した(以下正常胃粘膜抗原という)。

2. 白血球採取

ヘパリン加末梢静脈血10mlを採取し, 37℃下で60分間静置後 leukocyte rich plasma を採取。これを200×gで10分間遠沈し上清を捨て遠心管底の白血球に1mlの滅菌蒸留水を加えて混じた赤血球を破壊した。これに15%FCS (fetal calf serum) 加 eagle MEM 液8ml

<1984年7月11日受理>別刷請求先: 殿村 邦彦
〒468 名古屋市天白区植田山4-222 名古屋大学第2外科

を加え、再び200×gで10分間遠沈し白血球を得た。実験に用いる白血球数は15%FCS加 eagle MEMにて2×10⁶/mlに調製した。FCS液は56℃60分間加温し非動化したものを用いた。

3. Leukocyte Adherence Inhibition Test (以下 LAI test)

小試験管に白血球と抗原、また白血球と抗原と患者血清を等量(0.2ml)入れる。対象群として白血球のみ、白血球と患者血清を加えた2つの群を作製する。すべての試験管は0.8mlになるように15%FCS加 eagle MEM 培養液にて調製した。全試験管を37℃ 5%CO₂ 中にて30分間振温、この液を好酸球計算盤に入れ5% CO₂ 37℃100%湿度下にて60分間静置した後、この計算盤の一定区画内の白血球数を数え、さらに計算盤を36℃に保温した TC 用 Hanks 液中に沈め静かに洗浄し、非付着白血球を除去した。洗浄前に数えた同一区画内の付着白血球数を求め、洗浄後の数を洗浄前の数で除して白血球付着率を求めた。抗原を添加した群の付着率を抗原を添加しない対象群の付着率で除したものを LAI 値とした。白血球付着率は計算盤内の異なる3カ所を数え、その平均値で LAI 値を求めた。その値が0.7以上を陰性、他を陽性とした。

4. 皮内反応 (skin Test)

担癌患者の非特異的免疫反応として PPD, PHA skin test を行い LAI test との相関性について検討した。PPD skin test は一般診断用 PPD (日本 BCG 製造株式会社)を0.5μg/mlに調製し、0.1mlを前膊皮内に注射し48時間後の発赤で判定した。径が10mm以下を陰性(-), 10mm以上を陽性(+), これに硬結、水疱をとともうものを強陽性(++)とした。PHA skin test は wellcome 社製 PHA を2.5μg/0.1mlに調製し PPD と同様に注射し24時間後の発赤の径を測定した。20mm以下を陰性(-), 20mm以上を陽性(+), これに硬結をとともうものを強陽性(++)とした。

結果

基礎実験として胃癌患者9例、健康人4例について白血球付着率を求めた。健康人では胃癌抗原を添加しても白血球付着率の低下は認められないが、胃癌患者では明らかに低下した。これに副腎皮質ホルモンを添加すると白血球付着率は再び上昇した(表1)。

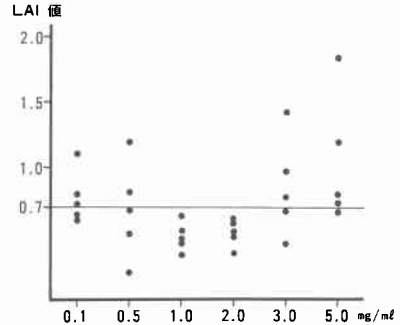
抗原の蛋白濃度の決定は1mg/mlで LAI 値陽性となった胃癌患者5例について胃癌抗原濃度を変えて LAI test を行った(図1)。1~2mg/mlの濃度では全例陽性であったが、他の濃度では陰性例が認められた

表1 白血球付着率

	L+M	L+A+M	L+A+M+S
胃癌症例	78.9±6.9	56.1±7.7	81.3±11.4
健康人	78.5±1.9	72.6±5.6	80.7± 1.7

L: 白血球
M: 15%FCS加 Eagle MEM
A: Antigen
S: 副腎皮質ホルモン(0.1 μg/ml)

図1 抗原蛋白濃度別 LAI 値



ため、以下の実験には抗原蛋白濃度を1mg/mlとした。pH 7.2 PBSで処理した胃癌抗原に対して陽性であった胃癌患者(n=4)にPCA(perchloric acid)にて処理した抗原を用いて LAI test を行くと LAI 値はすべて陰性となった。

本法の胃癌症例に対する特異性をみるために、悪性疾患18例、良性疾患3例健康人6例を対象として胃癌抗原に対する LAI 値を求めた(表2)。胃癌症例 stage I, II, III では13例中11例(84.6%)に陽性を示した。この11例の陽性例に患者自己血清を加え LAI test を

表2 疾患別 LAI 値 (自己血清添加との比較)

	胃癌抗原	胃癌抗原+血清
胃 癌 1	0.43	1.01
2	0.41	1.04
3	0.48	1.05
4	0.44	0.77
5	0.62	0.92
6	0.60	0.74
7	0.42	0.92
8	0.70	1.42
9	0.60	1.02
10	0.43	0.53
11	0.77	1.37
12	0.57	0.81
13	0.71	1.08
結 腸 癌 1	1.00	1.11
2	1.47	1.20
食 道 癌 1	1.48	1.58
2	0.94	0.79
メラノーマ 1	0.86	0.92
胃 潰 瘍 1	0.97	1.59
2	1.63	1.66
肝 硬 変 1	0.50	0.49
健 康 人 1	1.43	0.82
2	0.79	0.82
3	0.34	0.28
4	0.81	1.02
5	0.79	0.85
6	0.96	0.93

行くと10例に LAI 値が0.7以上となり陰性化した。他の悪性疾患症例では LAI test 陽性例を認めなかったが、健康人、肝硬変症例の各1例に陽性例があった。しかし自己血清を添加しても LAI 値は0.7以下で陰性化しなかった。

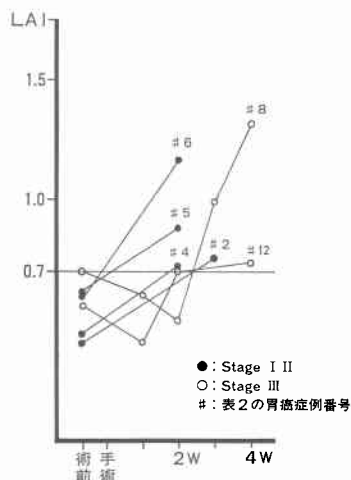
正常胃粘膜抗原に対する LAI 値を求めた(表3)。胃癌症例では17例中7例(41.2%)に陽性を示したが、胃癌症例の胃癌抗原に対する LAI 値陽性率より低かった。7例の LAI 値陽性例に自己血清を添加した場合で5例が陰性化した。一方健康人で4例中3例、メラノーマ、結腸癌の各1例に LAI 値が陽性を示した。

表2の胃癌症例で術前の LAI 値陽性であった症例の内6症例(#2, 4, 5, 6, 8, 12)について LAI 値の経時的変動をみた(図2)。stage I, II 症例(n=4)のうち3症例で手術後2週目に LAI 値は陰性となった。stage III 症例(n=2)のうち1例は手術後2週目でも陽性であり、手術後3週目になり陰性化した。手術

表3 正常胃粘膜抗原に対する LAI 値

血 濁	-	+	血 濁	-	+		
胃 癌	1	0.41	1.20	健 康 人	1	0.16	1.04
	2	0.58	1.05		2	0.64	0.81
	3	1.08	0.95		3	1.92	1.15
	4	0.28	0.44	胃 潰 瘍	4	0.51	0.55
	5	0.51	0.38		1	0.78	
	6	0.92	1.14	肝 硬 変	2	0.95	1.45
	7	0.85	0.66	メ ラ ノ ー マ	1	0.84	
	8	1.22	1.18	食 道 癌	1	0.36	0.79
	9	2.39	1.05		1	1.16	0.97
	10	0.69	1.70	結 腸 癌	2	0.83	0.96
	11	0.78	1.26		1	0.72	0.73
	12	0.65	0.90		2	0.63	1.11
	13	0.73	1.40		3	0.73	0.96
	14	0.80	0.68		4	1.08	0.72
	15	1.06	1.06				
	16	0.68	1.45				
	17	2.09	0.89				

図2 LAI 値の経時変動



後の LAI test は術後3週目以後に行うこととした。

stage 別 LAI 値陽性率をみるために胃癌症例61例に LAI test を行った。再発例が85.7%と最も高く、次いで stage III が80%, stage IV が65%, stage I, II が63.2%の順であった。根治手術可能であった stage I, II, III の術前の LAI 値陽性率は平均70.6%であった。一方手術後の LAI 値陰性化率でも stage IV は23.1%と stage I, II, III に比べて低い値を示した(表4)。

次に大腸癌症例33例について大腸癌抗原に対する stage 別 LAI 値陽性率を求めた。手術前の LAI 値陽性率では stage III が100%と最も高く、次いで再発症例が83.3%, stage I, II が72.2%, stage IV, V が70%の順であった。手術後の陰性化率では stage I, II が84.6%と最も高く、次いで stage III が60%, stage IV, V が28.6%の順であった。stage が進行するにつれ低下した。大腸癌症例でも胃癌症例と同様に根治手術可能であった症例の方が術前の LAI 値陽性率は高い傾向を示した(表5)。

大腸癌症例に対して胃癌抗原を用いて LAI test を行くと LAI 値陽性率は40.9%であったが、胃癌症例に

表4 胃癌症例の stage 別の LAI 値陽性率

	術前陽性率*(B/A)	術後の陰性化率*(C/B)
Stage I II	12/19 63.2%	10/12 83.3%
III	12/15 80%	11/12 91.7%
IV	13/20 65%	3/13 23.1%
再発症例	6/7 85.7%	
計	43/61 70.5%	24/37 64.9%

* A : 症例数
B : LAI 陽性例数
C : LAI 陰性化数

表5 大腸癌患者の stage 別 LAI 値陽性率

	術前陽性率*(B/A)	術後の陰性化率*(C/B)
Stage I II	13/18 72.2%	11/13 84.6%
III	5/5 100%	3/5 60%
IV V	7/10 70%	2/7 28.6%
再発症例	5/6 83.3%	
計	30/39 76.9%	16/25 64%

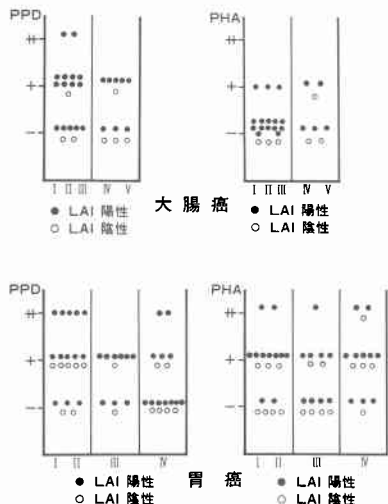
* A : 症例数
B : LAI 陽性例数
C : LAI 陰性化数

表6 悪性疾患に対する抗原別陽性率

症例	抗原	胃癌	大腸癌
胃	(B/A)	43/61 70.5%	7/25 28%
大腸癌	(B/A)	9/22 40.9%	20/33 60.6%
他の悪性疾患		0/5 0%	2/6 33.3%

* A : 症例数
B : LAI 陽性例数

図3 LAI値と skin Test



対して大腸癌抗原を用いて行った LAI 値陽性率は 28%であった (表 6)。

PPD, PHA skin test と癌の進行は図 3 に示すとき相関性を示したが, LAI test とこれら skintest との間には有意な相関は認められなかった。

考 察

ヒトの癌細胞の特異抗原の存在は明らかにされないままになっているが, 特異的な免疫学手法を用いて担癌患者の診断が可能であれば意義がある。現在癌特異抗原, 癌関連抗原を利用して治療に結びつけることは困難であるが CEA, AFP のように診断面への応用は比較的多く行われている。Halliday らによって行われた LAI test もその一つであり, 抗原に感作されたリンパ球が抗原の接触により lymphokine 様物質を出し, この物質が白血球のガラス板への付着を阻止する因子であるとした。Maluish ら¹¹⁾は T-cell が lymphokine 様物質を出すといい, Greemers ら¹²⁾は leukocyte adherence inhibition factor (LAIF) が関与しているとした。Grosser ら¹³⁾は LAI の現象は monocyte が主体であり細胞表面の親和抗体が抗原と反応することにより起るとした。いずれにしろ LAI のメカニズムについてはいまだ定説がない。

PCA で処理した抗原を用いて LAI test を行くと, PBS で処理した抗原使用で LAI 値陽性であった症例のすべてが陰性化した。これらより LAI test に関与する抗原性物質は Gold¹⁴⁾ のいう CEA とは異なる物質と考えられる。

担癌患者における LAI test は allogeneic な抗原を

用いたにもかかわらず, 胃癌症例—胃癌抗原, 大腸癌症例—大腸癌抗原の関係で高い陽性率を示した。一方大腸癌症例に対して胃癌抗原を使用した場合にも陽性率が比較的高くみられ, 抗原の交差性が示唆された。しかし実験に用いられた抗原 preparation 中には癌特異抗原, 癌関連抗原, differentiating antigen 等多種の抗原性物質が含まれていると考えられる。LAI test と腫瘍の進行度との関係で Marti ら¹⁵⁾は malignant melanoma で相関性があるというが, Halliday ら¹⁶⁾, Hellström ら¹⁷⁾は相関がないと述べている。われわれの行った実験では, 手術前の LAI 値陽性率は胃癌症例で stage III が最も高く, 次いで stage IV, stage I, II であった。一方大腸癌症例では stage III, stage I, II, stage IV, V の順であった。LAI test と癌の進行度とはある程度相関するようである。手術の根治性からみると, 根治手術可能であった症例 (stage I, II, III) の術前の LAI 値陽性率は胃癌で 70.6%, 大腸癌で 78.3% と非根治手術に終わった症例 (胃癌—stage IV, 大腸癌—stage IV, V) より高く, 手術後の陰性化率でも同じ傾向を示した。この点より LAI test と手術の根治性とは相関するようである。これらは癌が根治手術不能になるほど進行すると担癌患者の免疫応答能の低下を来すためと考えられる。胃癌, 大腸癌の再発症例で LAI 値陽性率がともに高いのは興味ある現象である。再発症例はすべていったん根治手術を受け外来通院中の症例であり, 患者の performance status が良好で免疫応答能の低下がみられないためと考えられる。したがって LAI test は比較的早期に癌再発を推定するための補助診断として臨床的に有用であろう。

担癌患者の非特異的パラメーターとしての PPD, PHA skin test は癌の進行とある程度相関しているとされている。Vetto ら¹⁸⁾は LAI test とこれら skin test との関係で相関すると述べているが, われわれの行った実験では相関は認められなかった。これは skin test が非特異的であることに起因していると思われる。

結 語

1. LAI test は allogeneic な抗原を用いたにもかかわらず癌患者に高い陽性率を示した。また癌手術の根治性とも相関し, 臨床上有意義や検査法と思われる。

2. LAI test は再発癌症例に高い陽性率を示し, 癌再発に対し有効な補助診断と考えられる。

3. 担癌患者自己血清中に blocking factor の存在が示された。

4. 大腸癌患者に対して胃癌抗原を用いて LAI test

を行った場合に比較的高い陽性率を示し、抗原の交差性が示唆された。

文 献

- 1) Foley EJ: Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* 13 : 835—837, 1953
- 2) Prehn RT, Main JM: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 18 : 769—778, 1957
- 3) Klein G, Sjögen HO, Klein E et al: Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autologous host. *Cancer Res* 20 : 1561—1572, 1960
- 4) McCoy JL, Jerome LF, Dean JH et al: Inhibition of leukocyte migration by tumor-associated antigens in soluble extracts of human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 53 : 11—17, 1974
- 5) Wolberg WH: Inhibition of migration of human autogenous and allogeneic leukocytes by extracts of patients' cancers. *Cancer Res* 31 : 798—802, 1971
- 6) 赤塚 聡ほか: 他家胃癌および結腸癌組織ホモジネート上清による白血球遊走阻止試験. *医のあゆみ* 103 : 749—751, 1977
- 7) 藤井源七郎: 担癌体の細胞性免疫. *医のあゆみ* 91 : 400—405, 1974
- 8) Hellström I: A colony inhibition (CI) technique for demonstration by lymphoid cells in vitro. *Int J Cancer* 2 : 65—68, 1967
- 9) Halliday WJ, Miller S: Leukocyte adherence inhibition; a simple test for cell-mediated tumor immunity and serum blocking factors. *Int J Cancer* 9 : 477—483, 1972
- 10) Halliday WJ, Maluish A, Isbister WH: Detection of anti-tumor cell-mediated immunity and serum blocking factors in cancer patients by the leukocyte adherence inhibition test. *Br J Cancer* 29 : 31—35, 1974
- 11) Maluish AE, Halliday WJ: Quantitation of antitumor cell-mediated immunity by a lymphokine-dependent reaction using small volumes of blood. *Cell Immunol* 17 : 131—140, 1975
- 12) Greemers P: The role of leukocyte subpopulations in the indirect leukocyte adherence inhibition assay in the mammary tumor virus system. *Eur J Immunol* 7 : 48—53, 1977
- 13) Grosser N, Marti JH, Proctor JW et al: Tube leukocyte adherence inhibition assay for the detection of anti-tumor immunity. I. Monocyte is the reactive cell. *Int J Cancer* 18 : 39—47, 1976
- 14) Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption technique. *J Exp Med* 121 : 439—462, 1965
- 15) Marti JH, Thomson DMP: Anti-tumor immunity in malignant melanoma assay by tube leukocyte adherence inhibition. *Br J Cancer* 34 : 116—133, 1976
- 16) Halliday WJ, Maluish AE, Little JH et al: Leukocyte adherence inhibition and specific immunoreactivity in malignant melanoma. *Int J Cancer* 645—658, 1975
- 17) Hellström I, Hellström KE, van Belle G et al: Leukocyte-mediated reactivity to human tumors as detected by the leukocyte adherence inhibition test. I. Demonstration of tumor type-specific reaction. *Am J Clin Pathol* 68 : 706—714, 1977
- 18) Vetto RM, Burger DR, Vandenbark AA et al: Changes in tumor immunity during therapy determined by leukocyte adherence inhibition and dermal testig. *Cancer* 41 : 1034—1039, 1978