

胃癌患者の系統的ならびに局所リンパ節の細胞性 免疫応答に関する研究

— 3M KCl 抽出抗原を中心に —

細川幸夫 今井浩三 谷内 昭

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 和田武雄教授)

Studies on Systemic and Local Lymph Node Immune Responses in Patients with Gastric Cancer

— With Special Reference to 3M KCl
Extracts of Tumor Cells —

Yukio HOSOKAWA, Kohzoh IMAI
and Akira YACHI

*Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Wada)*

An investigation was conducted on 104 gastric cancer patients with the focus of attention on the systemic and local lymph node immune responses against 3M KCl extracts of tumor cells and the following results were obtained.

1) KCl antigens were extracted from tumor cells of gastric cancer tissues and cells in ascites and LMI tests were conducted. In the autologous reactions, positive results were recognized in 4 cases out of 19 (21.1%). Even in patients with advanced gastric cancer, it was shown that immune response against autologous tumor cells was present.

2) In a similar manner, positive results were observed in 1 out of 7 cases for lymphocyte transformation test and in 3 out of 15 cases for skin test, respectively.

3) The relationship between immune response against KCl antigen and therapy was investigated and in the patient group receiving immunochemotherapy an increasing trend was seen in the incidence of positive LMI test.

4) The KCl extracts were separated through gel filtration. The 2nd and 3rd fractions obtained revealed an increased activity in the reaction of LMI test and lymphocyte transformation test as compared with crude KCl extracts. No special relation was seen between the CEA concentration in the KCl antigen and LMI tests.

5) It was found that generally the local cell-mediated immune response using lymphocytes of regional lymph nodes was more remarkable as compared with systemic cell-mediated immune response. Further, it was clarified that there was a good correlation between the local lymph node cell-mediated immune response against KCl antigens and the development of gastric cancer.

(Received July 31, 1978 and accepted September 5, 1978)

1 緒 言

癌患者においては一般に細胞性免疫能の低下が知られているが、癌関連抗原に対する免疫応答や癌の局所における免疫学的検索は、十分に検討されているとは言い難い。これまで著者らは癌患者における、いわゆる非特異的細胞性および体液性免疫反応を中心に研究し、その臨床病期に伴う細胞性免疫能の低下や、免疫化学療法における指標とし

ての意義を中心に報告してきた^{1,2)}が、本研究においては胃癌患者について、主として 3M KCl 抽出腫瘍関連抗原(以下 KCl 抗原と略す)を用いて系統的ならびに局所的免疫応答を検討し、免疫化学療法との関連性をも含めて胃癌病態上の臨床的意義を解明すべく、以下の実験を企図した。同時に KCl 抗原の活性分画分離と一部の免疫化学的性質についても、これまで得られた知見を一括して報告する。

2 実験材料および方法

2.1 対象

胃癌 104 例 (男 82, 女 22, 平均年齢 54 歳) を主として, その他に肺癌 6 例 (男 5, 女 1, 平均年齢 51 歳), 肝癌 3 例 (男 2, 女 1, 平均年齢 55 歳) およびその他の癌 5 例 (大腸, 膵, 卵巣, 乳房および原発巣不詳の癌性腹膜炎各 1) の総計 118 例を対象とした。なお KCl 抗原を用いた各種細胞性免疫応答の際には抗原抽出を行った同一症例の白血球やリンパ球との反応を“自家系”の反応と呼び, 他の症例においての反応を“他家系”と表現した。

2.2 3M KCl 癌可溶性抗原の抽出

11 例の癌組織腫瘍細胞ならびに 14 例の癌患者腹水腫瘍細胞を抗原作製の対象とした。その内訳は, 前者では胃癌 9, 大腸癌および肝癌各 1, 後者では胃癌 10, 肺癌, 卵巣癌, 大腸癌および膵癌各 1, である。癌組織腫瘍細胞は外科的手術で得られた癌組織を滅菌 PBS (Dulbecco) 中で眼科用ハサミを用いて細切し, 無菌ガーゼで濾過して結合織などを除き, free cell suspension として滅菌 PBS (Dulbecco) で 3 回洗浄後, Reisfeld ら³⁾, Mavligit ら⁴⁾ に準じて 3×10^8 cell/ml の割合で 3M KCl 処理を施し, 4°C で 16~18 時間ゆるやかに攪拌した。3M KCl の調製は Meltzer ら⁵⁾ に従い作製し, 無菌処理を施して氷室中に保存して使用に供した。その後試料を 4°C で 40,000 g, 1 時間冷却遠沈して得られた上清を 50~60 l の PBS に対して透析し 4°C, 40,000 g, 1 時間冷却遠沈後上清の蛋白濃度を測定⁶⁾, Minicon B (Amicon 社製) を用いて終濃度 3,000 $\mu\text{g/ml}$ に調製後, Milliporefilter で濾過滅菌後 4°C に保存して 2 週間以内に実験に供した¹⁾。長期間にわたり使用する KCl 抗原は液体窒素を用いて -190°C に分注保存した。また腹水腫瘍細胞は, 腹水穿刺により自然排出された 300~2,000 ml の腹水を速やかに冷却遠沈し, 沈渣を PBS に再浮遊させ, 3 回洗浄後の沈渣を得て癌組織腫瘍細胞と同様の方法で KCl 処理を施した。

2.3 胃癌 KCl 抗原のゲル濾過

さらに 3 例の胃癌腫瘍組織抽出 KCl 抗原についてその活性分画を明らかにする目的でゲル濾過を行った。1 M NaCl-0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) を用いてあらかじめ透析された KCl 抗原を Sephadex G 150 (Pharmacia 社製) カラムを通し fraction collector (東洋機器社製) により 1 ml ずつ採取し, 蛋白濃度を測定して白血球遊走阻止 (LMI) 試験およびリンパ球芽球化試験に供した。

2.4 KCl 抗原中の CEA 濃度測定

Radioimmunoassay 法⁷⁾ により KCl 抗原中の CEA 濃度を測定し, LMI 試験の結果と比較した。

2.5 白血球遊走阻止 (LMI) 試験

Clausen の方法⁸⁾ に準じたが, 培養用ゲル組成, 遊走細胞の分離法とその数, well の大きさなどにつき基礎的諸条件を検討した上, 一部に改良を施して用いた。その詳細は既報⁹⁾ のごとくであるが, 本研究においては培養血清にウマ血清を用い, LMI 直接法によった。preincubation は 37°C, 5% CO₂ incubator 中に 1 時間とし, well に細胞浮遊液を入れた後 18~20 時間で反応を止め, 100% メタノールで 10 分間, 40% ホルマリンで 15 分間それぞれ固定後, May-Giemsa 染色し, 遊走面積を測定し次式で遊走阻止能を求めた。すなわち, migration index (MI)=抗原添加時遊走面積/抗原非添加時遊走面積で示した。KCl 抗原には基礎的検閲を経た上で^{1,10)}, その 500 $\mu\text{g/ml}$ を使用したが, 一部ゲル濾過によってさらに分画した KCl 抗原については, それぞれ 150 および 250 $\mu\text{g/ml}$ を使用した。

2.6 リンパ球芽球化試験

いわゆる非特異的細胞性免疫能の測定には PHA-P (Difco) および PWM (GIBCO) を mitogen としたリンパ球芽球化試験を型のごとく行い, Microtest II plate (Falcon) および cell harvester (Minimash, Dynatec) を用いた micromethod により, 結果を ³H-thymidine の摂取率により stimulation index (SI=PHA-P 添加リンパ球の cpm/PHA-P 非添加リンパ球の cpm) として表現した。一方 KCl 抗原を加えたリンパ球芽球化試験も同様の方法により実施した。

2.7 遅延型皮内反応

PPD および Candida を用いた遅延型皮内反応のほかには Millipore filter を用いて慎重に無菌化した KCl 抗原 0.1 ml (150 $\mu\text{g/ml}$) を用いて, 承諾の得られた自家系の胃癌患者のみを対象として皮内反応を実施した。判定は 48 時間後型のごとく行い, 発赤の径が 10 mm 以上の例を陽性とした。

2.8 自家リンパ球—腫瘍細胞混合培養 (MLTR)

胃癌患者の術後 2 時間以内に得られた腫瘍部分を眼科用ハサミで細切し, 無菌ガーゼを用いて浮遊細胞とし RPMI-1640-HEPES (GIBCO) 中で $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整後, Mitomycin C を 0.1 mg/ml の濃度に添加し, 37°C, 5% CO₂ incubator で 30 分間孵置し, RPMI にて 3 回洗浄し使用した。自家リンパ球は末梢血および胃癌近位リンパ節からそれぞれ採取し, $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調節して前記処理細胞と 1:1 の比率¹¹⁾ で混じて Microtest II plate 中で総量 0.2 ml で 6 日間培養し, ³H-thymidine を添加後 24 時間目に cell harvester で処理して測定した。この系の対照としては上記リンパ節細胞単独および Mitomycin C 処理細胞単独培養についても同時に実施した。

3 研究成績

3.1 胃癌患者の KCl 抗原に対する系統的免疫応答

3.1.1 LMI 試験

胃癌患者組織腫瘍細胞および腹水腫瘍細胞より抽出した KCl 抗原を用いて自家系および他家系について LMI 試験を実施し、その結果を Figs. 1, 2 および Table 1 に示した。

癌組織腫瘍細胞より得られた KCl 抗原 (G-Ca Ext) に対する正常末梢白血球 (Controls) の MI は 0.99 ± 0.066

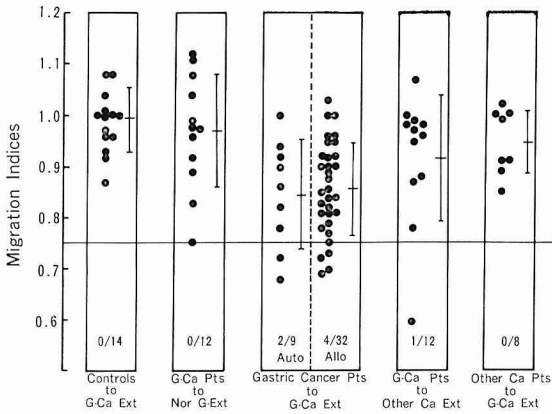


Fig. 1 Leukocyte migration inhibition test to 3M KCl extracts from tumor cells or normal cells from tissues in patients with gastric cancer. G-Ca: Gastric cancer, Nor: Normal, Ext: Extract, Auto: Autologous, Allo: Allogeneic.

($n=14$), 胃正常部分より抽出した KCl 抗原 (Nor. G-Ext) に対する胃癌患者白血球 (G-Ca Pts) の MI は 0.97 ± 0.111 ($n=12$) を示すので、それぞれの 2σ を減じた値、すなわち 0.858 および 0.749 を参考にし、後者すなわち 0.749 未満を以て陽性と判定した。

自家系胃癌 9 例の MI は 0.84 ± 0.108 を示し、いずれの対照群に比較しても低下し ($P < 0.001, P < 0.05$), 9 例中 2

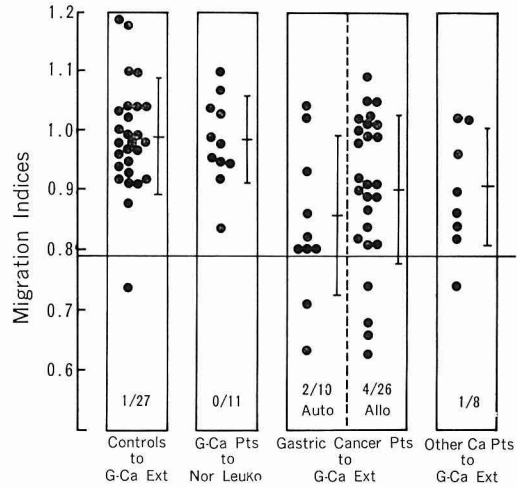


Fig. 2 Leukocyte migration inhibition test to 3M KCl extracts from tumor cells in ascites or from normal peripheral leukocytes in patients with gastric cancer. Nor Leuko: Normal leukocyte extract.

Table 1 Leukocyte migration inhibition test to 3M KCl extracts from tumor cells in patients with gastric cancer

	3M KCl extracts from tumor or normal cells			
	in tissues		in ascites	
	migration indices	positive ^a /tested	migration indices	positive ^b /tested
Controls to G-Ca Ext	0.99 ± 0.066^d	0/14 (0%)	0.99 ± 0.098^g	1/27 (3.7%)
G-Ca Pts to Nor G-Ext	0.97 ± 0.111^e	0/12 (0)	0.99 ± 0.073^c	0/11 (0)
G-Ca Pts to G-Ca Ext (auto)	$0.84 \pm 0.108^*$	2/ 9 (22.2)	$0.86 \pm 0.133^{\#}$	2/10 (20.0)
G-Ca Pts to G-Ca Ext (allo)	$0.86 \pm 0.092^{**}$	4/32 (12.5)	$0.90 \pm 0.126^{\#\#}$	4/26 (15.3)
G-Ca Pts to Other Ca Ext	0.92 ± 0.125	1/12 (8.3)	n. d.	—
Other Ca Pts to G-Ca Ext	0.95 ± 0.063^f	0/ 8 (0)	0.91 ± 0.098	1/ 8 (12.5)

a, b; Migration indices less than 0.749 (a) and 0.794 (b) are judged to be positive. c; KCl extract of normal cell were obtained from the normal peripheral leukocytes. *-d, e, f; $P < 0.001, P < 0.05, P < 0.05$. **-d, e, f; $P < 0.001, P < 0.05, P < 0.05$. #-g, c; $P < 0.05, P < 0.05$. ##-g; $P < 0.05$.

例は陽性を示した。また同系の胃癌 32 例の検討では、MI 0.86 ± 0.092 で、いずれの対照群と比較しても低下し ($P < 0.001$, $P < 0.05$)、このうち 4 例 (12.5%) が陽性を示した。これを胃癌と他の癌との関係でみると、G-Ca Pts と他の癌の KCl 抽出液 (Other Ca Ext) では MI 0.92 ± 0.125 ($n=12$) を示し、12 例中 1 例 (肝臓) が陽性を示した。また他の癌患者と G-Ca Ext の反応の場合には MI 0.95 ± 0.063 ($n=8$) で全例陰性であった。

一方、腹水腫瘍細胞より得た KCl 抗原を用いた場合の LMI 試験の成績を Fig. 2 および Table 1 に示した。この場合には腹水腫瘍細胞の対照として正常人末梢白血球より KCl 抽出液を得たが、Table 1 に示すごとく二種類の対照群の MI は 0.99 ± 0.098 ($n=27$) および 0.99 ± 0.073 ($n=11$) であり、それぞれの平均値より 2σ を減じた値、それぞれ 0.794 および 0.844 より 0.794 未満を陽性とし判定した。自家系胃癌 10 例の MI は 0.86 ± 0.133 を示し、いずれの対照群と比較しても有意に低下し ($P < 0.05$, $P < 0.05$)、10 例中 2 例は陽性を示した。同系の胃癌 26 例の検討では MI 0.90 ± 0.126 で、胃癌 KCl 抗原と正常白血球との反応と比較して有意に低下した ($P < 0.05$)。これを胃癌と他の癌との関係でみると、Other Ca Pts と G-Ca Ext の反応は MI 0.91 ± 0.098 ($n=8$) を示し、8 例中 1 例 (大腸癌) に陽性を示した。

3・1・2 リンパ球芽球化試験および皮内反応

3M KCl 癌可溶性抗原を用いた胃癌患者のリンパ球芽球化試験と皮内反応の成績を一括して Table 2 に示した。リンパ球芽球化試験では正常対照群 7 例の SI は 0.92 ± 0.186 である。これに誤差要因を考慮に入れて SI 2.0 以上を陽性とし判定したが、この場合自家系癌では 7 例中 1 例 (14.3%) に、また同系癌では 30 例中 3 例 (10%) にそれぞれ陽性成績が認められた。

一方、KCl 抗原を用いた皮内反応は 48 時間後の発赤径

Table 2 Lymphocyte transformation and skin test by 3M KCl extracts from tumor cells

Cases	Positive ^a /tested	
	Transformation	Skin test
Normal Controls	0/ 7 (0%)	0/ 3 (0%)
Autologous Cancer Patients	1/ 7 (14.3%)	3/15 (20.0%)
Allogeneic Cancer Patients	3/30 (10.0%)	not done

a, S.I. ≥ 2.0 , Induration (diameter) ≥ 10 mm were judged to be positive, respectively.

が 10 mm 以上を陽性として判定したが、自家系癌の 15 例中 3 例 (20%) に明瞭な陽性成績が得られた。

3・1・3 KCl 抗原に対する免疫応答と免疫化学療法

進行癌患者の治療との関係を明らかにするために、特に免疫化学療法施行時における KCl 抗原に対する LMI 試験を化学療法単独施行時のそれと比較して Table 3 に示した。胃癌のみでこれを比較すると、化学療法単独 (FT 207, MMC+FT 207, あるいは FAMT 療法, 約 2 カ月ないし 8 カ月間, 平均 3 カ月間) 使用時の MI は 0.94 ± 0.092 で、21 例中 2 例 (9.5%)^{#1} に陽性成績を得たが、上記に免疫化学療法 (溶連菌製剤・OK 432, 中外製薬, 植物性多糖類・PSK, 三共, それぞれ約 2 カ月ないし 11 カ月, 平均 5.5 カ月, および約 1 カ月ないし 6 カ月, 平均 3.5 カ月) を併用時には MI 0.90 ± 0.104 で 18 例中 3 例 (16.7%)^{#2} に陽性成績が認められた。したがって免疫化学療法施行時にその陽性率は高い傾向にあった。これを他の癌 (肺, 肝, 大腸) について比較すると、化学療法単独では MI 0.98 ± 0.052 , 陽性 12 例中 0 であるのに対して、免疫化学療法群では MI 0.77 ± 0.146 , 陽性 9 例中 4 例 (44.4%)^{#3} と、両者の間には陽性率が後者で有意 ($P < 0.001$) に高く注目された。 (# MI: table 3 参照)

Table 3 Leukocyte migration inhibition test against 3M KCl antigens in cancer patients with immuno-chemotherapy

Cases	Chemotherapy only		Immuno-chemotherapy*	
	migration indices	positive ^a /tested	migration indices	positive ^a /tested
Pts with Gastric Ca	0.94 ± 0.092	2/21 (9.5%) ^{#1}	0.90 ± 0.104	3/18 (16.7%) ^{#2}
Pts with Other Ca	0.98 ± 0.052	0/12 (0)	0.77 ± 0.146	4/ 9 (44.4%) ^{#3}
Total	0.95 ± 0.064	2/33 (6.1)	0.86 ± 0.138	7/27 (25.9)

*, OK-432 or PSK therapy in addition to chemotherapy. a, Migration indices less than 0.800 were judged to be positive. #1) MI: 0.72, 0.76. #2) MI: 0.61, 0.63, 0.63. #3) MI: 0.74, 0.61, 0.68, 0.63 for positive cases.

3・1・4 ゲル濾過による KCl 抗原の亜分画の免疫応答

3M KCl 粗抗原中の免疫活性分画を検索する目的で、胃腫瘍組織抽出 KCl 抗原について Sephadex G-150 を用い

たゲル濾過を行った 1 例を Fig. 3 に示したが図のごとく 3 峰が得られたので、それぞれについて LMI 試験を実施した。

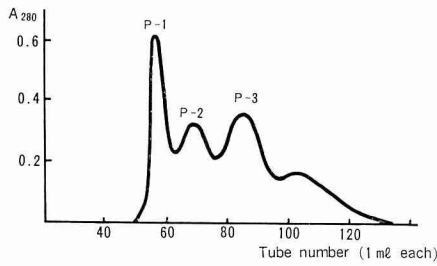


Fig. 3 Sephadex G-150 elution profile of crude 3M KCl extract from patient with gastric cancer.

Table 4 LMI test and lymphocyte transformation test against partially purified 3M KCl extracts

Case	MI values against KCl extracts			
	Crude	P-1	P-2	P-3
1	0.92	0.97	<u>0.77</u>	<u>0.79</u>
2	0.98	0.90	<u>0.81</u>	0.86
3	0.94	0.92	0.94	<u>0.81</u>
4	0.93	0.93	0.90	1.00
Mean	0.94	0.93	0.86	0.87

Case	SI values against KCl extracts			
	Crude	P-1	P-2	P-3
5	0.8	0.9	1.2	1.7
6	0.8	0.7	<u>2.3</u>	1.0
7	1.4	0.3	1.2	0.9
8	1.0	0.5	<u>2.2</u>	1.3
9	1.2	0.6	<u>2.4</u>	n. d.
Mean	1.0	0.6	1.9	1.2

MI: migration index, SI: stimulation index.

その成績は Table 4 に示すごとく、LMI 試験では、KCl 粗抗原を用いた場合には反応を示さないのに対して、第 2 峰 (P-2) および第 3 峰 (P-3) を使用した時には陽性となる例が認められた。

またリンパ球芽球化試験では KCl 粗抗原に対して全体に反応が弱いにもかかわらず、P-2 を用いた場合には 5 例中 3 例に陽性成績が認められた。

3.1.5 KCl 抗原中の CEA 濃度と LMI 試験

3M KCl 粗抗原中の免疫化学的検討を行うべく、腹水中腫瘍細胞 4 例および癌組織腫瘍細胞 2 例より抽出した計 6 例についてその CEA 濃度を測定し、その結果を LMI 試験の結果と対比して Table 5 に示した。

Table 5 CEA concentration in 3M KCl extracts

3M KCl extracts	CEA concentration	LMI test					
		auto.	allo.				
A*-1	32.4 ng/ml	+	+	-	-	-	-
A-2	68.4	-	n. d.				
A-3	265.2	-	+	-			
A-4	728.0	-	+	-			
T**-1	not detected	+	+	+	+	-	
T-2	186.0	-	-	-	-	-	

* from tumor cells in ascites
** from tumor cells in tissues

腹水中腫瘍細胞より得られた A-1 抗原中の CEA 濃度は 32.4 ng/ml と低値であるが、LMI 試験では自家系ならびに同系の一部と陽性反応を示した。一方 A-4 抗原中の CEA 濃度は 728 ng/ml と比較的高値を示したが、LMI 試験では同系の 1 例とのみ反応を示して、自家系の反応は陰性であった。さらに癌組織腫瘍細胞より得られた T-1 抗原の CEA 濃度は検出不能であったが、LMI 試験では自家系および他家系 4 例中 3 例に反応陽性を示した。すなわち KCl 抗原中の CEA 濃度と LMI 試験との成績との間には両者の関係を推測させる結果は見出し得なかった。

3.2 胃癌患者の局所的免疫応答

3.2.1 リンパ球芽球化試験

いわゆる非特異的 mitogen である PHA-P および PWM に対するリンパ球芽球化試験を、未治療の胃癌同一

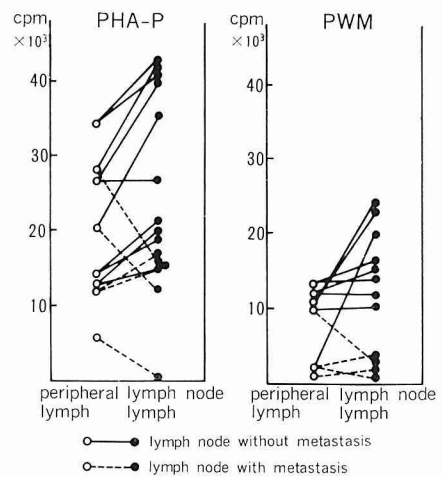


Fig. 4 Lymphocyte transformation to PHA-P and PWM in regional lymph nodes compared against peripheral lymphocytes of gastric cancer patients.

患者の近位リンパ節および末梢血リンパ球について同時に施行し、リンパ節への転移の有無も含めてその結果を Fig. 4 に示した。

PHA-P 刺激に対する転移の認められないリンパ節の反応性は平均 33,373 cpm と末梢血リンパ球の平均 19,204 cpm に比較してやや高い傾向を示した。一方転移を認めるリンパ節では平均 12,740 cpm を示し、末梢血リンパ球に比較してやや低い値を示した。PWM 刺激に対してはほぼ同様の傾向がうかがわれた。一方 KCl 抗原 (他家系) を用いたリンパ球芽球化試験での成績を同様に比較してみると、Fig. 5 に示すごとく胃癌取扱い規約に準じた No. 3 および No. 4 リンパ節中に SI 2.0 以上を示すものが 14 例中 4 例 (28.6%) あるのに対して、同一例の末梢血リンパ球では SI 1.7 を示す 1 例を認めるに止まった。つまり他の 13 例はほとんど反応を示さなかった。

したがって 3M KCl 抗原に対しても局所リンパ節細胞にやや高い反応性が認められた。なおこれを転移の有無と

の関係で検討したが差異は認められなかった。

次に同一症例のリンパ節について、PHA-P および KCl 抗原に対する芽球化試験の成績の関連性を検討したが、この場合には Fig. 6 に示すごとく PHA-P に対して高い反応性を示す症例は KCl 抗原に対しても高い反応性を示す傾向にあり、正の相関 ($n=15, r=0.86, P<0.01$) が認められた。

3・2・2 自家リンパ球腫瘍混合培養 (MLTR)

次にいわゆる特異的免疫応答の 1 つと考えられている自家 MLTR について局所リンパ節と末梢血リンパ球とを同時に比較検討した成績を Table 6 に示した。末梢血リンパ球、局所リンパ節リンパ球単独および Mitomycin C 処理腫瘍細胞では、それぞれ平均 598 cpm, 332 cpm および

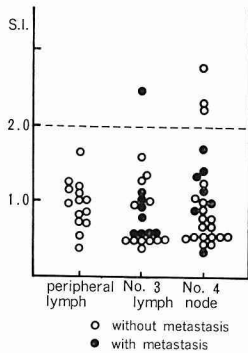


Fig. 5 Comparisons of lymphocyte transformation to 3M KCl extracts between regional lymph nodes and peripheral lymphocytes of gastric cancer patients.

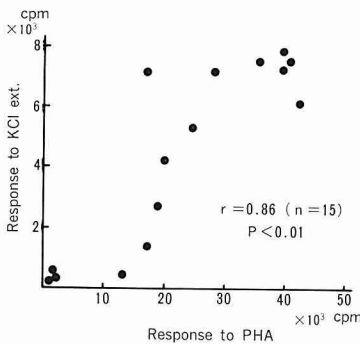


Fig. 6 Relationship between lymphocyte transformations to 3M KCl extracts and those to PHA in regional lymph nodes of gastric cancer patients.

Table 6 Mixed lymphocyte tumor reaction in regional lymph node lymphocytes and peripheral lymphocytes

Case No.	Stage	Lymph nodes No.	Lymph nodes Metastasis	MMC treated tumor cells	MLTR (S. I.)	
					Lymph nodes	Peripheral
1	I	No. 3	(-)	29 cpm*	6179*(5.7)	914*(0.8)
		No. 4	(-)	29	4751 (7.2)	
2	II	No. 3	(-)	35	715 (1.0)	987 (0.9)
		No. 4	(-)	35	226 (0.8)	
3	II	No. 3	(+)	353	72 (0.7)	599 (1.0)
		No. 4	(-)	353	314 (1.0)	
4	II	No. 3	(-)	18	287 (2.0)	1225 (1.3)
		No. 4	(-)	18	411 (3.4)	
5	II	No. 3	(-)	31	26 (0.6)	n. d.
6	II	No. 4	(-)	26	33 (0.7)	32 (0.8)
7	III	No. 3	(+)	25	38 (0.5)	328 (0.7)
		No. 4	(+)	25	41 (0.6)	
8	IV	No. 3	(+)	35	207 (5.8)	45 (0.4)
		No. 4	(+)	35	419 (1.0)	
		No. 6	(+)	35	142 (3.3)	
9	IV	No. 4	(+)	123	183 (0.8)	120 (0.7)
10	IV	No. 3	(+)	205	483 (1.1)	1470 (1.0)
		No. 4	(-)	205	91 (0.8)	
11	IV	No. 3	(+)	52	148 (0.7)	n. d.
		No. 4	(-)	52	118 (0.7)	
12	IV	No. 3	(+)	38	107 (0.8)	303 (0.7)
		No. 4	(+)	38	753 (1.2)	
13	IV	No. 3	(-)	66	1535 (1.1)	317 (0.6)
14	IV	No. 3	(-)	55	142 (0.5)	148 (0.8)

* mean values of cpm in duplicate culture.

78 cpm であり、これらの成績から非特異的な反応陽性成績のないことが確認された。末梢リンパ球では全例高値を示さないのに対して、局所リンパ節細胞では、用いたリンパ節 24 個のうち 2 個に、平均 4,751 cpm (SI 7.2) および 6,179 cpm (SI 5.7) と高い摂取率を示すものが認められ注目された。この例は Stage I であり、転移も認められなかった。Stage IV の 7 例および転移リンパ節 11 例はいずれも MLTR 陰性であった。

3・2・3 各種免疫反応と臨床病期

3・2・2 における局所免疫応答と臨床病期との関係を検討すべく、各種細胞性免疫反応を比較検討し総括的に Table

Table 7 Relationship between clinical stages and cell-mediated immune responses in regional lymph nodes of patients with gastric cancer

Case		Lymph nodes		MLTR*	Reaction to KCl Ag*	PHA-P**
No.	Stage	No.	Meta-stasis			
1	I	No. 3	(-)	+	+	##
		No. 4	(-)	+	+	##
2	II	No. 3	(-)	-	+	##
		No. 4	(-)	-	+	+
3	II	No. 3	(+)	-	-	+
		No. 4	(-)	-	-	##
4	II	No. 3	(-)	-	+	##
		No. 4	(-)	-	+	##
5	II	No. 3	(-)	-	-	-
6	II	No. 4	(-)	-	-	n. d.***
7	III	No. 3	(+)	-	+	+
		No. 4	(+)	-	+	+
8	IV	No. 3	(+)	-	-	+
		No. 4	(+)	-	-	-
		No. 6	(+)	-	-	-
9	IV	No. 4	(+)	-	-	-
		No. 3	(+)	-	-	##
10	IV	No. 4	(-)	-	-	n. d.
		No. 3	(+)	-	-	##
11	IV	No. 3	(+)	-	-	##
		No. 4	(-)	-	n. d.	-
12	IV	No. 3	(+)	-	n. d.	##
		No. 4	(+)	-	n. d.	n. d.
13	IV	No. 3	(-)	-	n. d.	##
		No. 3	(-)	-	n. d.	+

* More than 3000 cpm and SI \geq 2.0 were judged as positive (+).

** 40000 cpm \leq : ##, 39999-20000 cpm : #, 19999-10000 cpm : +, 9999 cpm \geq : -

*** not done

7 に示した。全般的にみて Stage I, II の症例では各種細胞性免疫反応は保持されている傾向がうかがわれるが、個々の症例についてこれを見ると、Case 1 (Stage I) では No. 3 および No. 4 のリンパ節細胞に MLTR 陽性と思われる SI 高値を示し、さらに KCl 抗原に対しても一部反応を認め、PHA-P や PWM に対する芽球化率も良好であった。Case 3 (Stage II) は No. 3 リンパ節に転移を認めたが、この場合には転移のない No. 4 リンパ節に比較して PHA-P に対する反応性は低下していた。また Case 8 (Stage IV) は転移を認める 3 個のリンパ節について検索し得たが、この場合には MLTR, KCl 抗原および PHA-P に対する反応性はすべて低下していた。

4 考 案

3M KCl 抽出腫瘍関連抗原を用いて胃癌患者の系統的ならびに局所リンパ節の細胞性免疫応答を検討した。

全身の系統的細胞性免疫能についてはこれまででも多くの研究があり、著者らも胃癌患者を含めて臨床病期別検討で癌の進行とともに遅延型皮内反応、末梢リンパ球、T cell 数およびリンパ球芽球化率の低下が著しいことを報告してきた^{1,2)}。しかし、これらのいわゆる非特異的免疫能の臨床病期による低下の一部は宿主の悪液質¹²⁾に関連する代謝異常により惹起される可能性もあり、この点臨床レベルにおいても担癌宿主の癌特異的免疫、あるいは少なくともそれに密接に関連する免疫応答をも同時に検討すべく企図すべきであろう。癌の免疫療法が究極的には抗腫瘍効果を期待する以上、これらの検討は単に治療効果をうかがう上の指標としてでなく、免疫強化療法の機序を解明する上にも手がかりを与える可能性を有するものと考えられる。

今回はその試みの一つとして LMI 試験、リンパ球芽球化試験および皮内反応を用いて KCl 抗原に対する系統的免疫応答を検討した。この場合自家系での反応を目標とし、かつ治療経過に伴う変動を検討し得るように、抗原の作製は腹水中の腫瘍細胞からも行ったため、研究の対象の多くは末期癌とせざるを得なかった。

LMI 試験では、その反応の信頼性を高めるために腫瘍抽出 KCl 抗原に対する正常白血球の反応ならびに胃正常組織抽出 KCl 抗原に対する胃癌患者白血球の反応の両者を対照として行い、両者の MI 平均値の上でより低値を示すものを標準に使い 2 σ を減じ、それよりも低値例を MI 陽性と判定した。その結果、組織および腹水中からの抽出抗原の間には反応性の上で大きな差異は認められず、両者を合わせると自家系では 19 例中 4 例 (21.1%) に陽性成績が得られた。さらに KCl 抗原を用いたリンパ球芽球化試験ならびに皮内反応においても自家系でそれぞれ 7 例中 1 例

および15例中3例に陽性を示し、LMI試験を含めてこれらの成績は末期胃癌においても微弱ながら自己腫瘍細胞に対する免疫応答の存在を示唆するものと考えられる。

自家系を用いて KCl 抗原に対する免疫応答を臨床的に検討した報告は極めて少なく、Boddie ら¹³⁾ は肺癌4例、メラノーマ1例、骨および軟部組織肉腫1例について全例が LMI 試験で陽性を示したとし、Lee and Lin¹⁴⁾ は肝癌3例中2例に MI 陽性を報告し、Mavligit ら⁴⁾ はリンパ球芽球化試験の上で自家系24例の諸種癌(メラノーマ、乳癌、肉腫など)のうち10例(41.7%)に陽性反応を認めている。他方同種抗原を用いた報告は、McCoy^{15~17)} らの一連の研究があるが乳癌について20/26(77%)、メラノーマ48/79(61%)、Ewing 肉腫9/15(60%)、と報告し、前述したBoddie ら¹³⁾ は培養メラノーマ細胞に対して19/36(53%)、肺癌23/36(64%)、肉腫18/27(66%)と全体に高い反応を示している。著者らのこれまでの成績¹⁰⁾ ではしかし、消化器癌を中心とした諸種癌で10/39(25.6%)と低率であり、今回の胃癌のみの成績で8/58(13.8%)と諸家に比較して陽性率が低い。これらの陽性成績の差については、LMI試験における判定基準が報告者^{13,17)} により異なるからで、他の報告に比較して著者らの方法は厳しいといえるかもしれない。しかしその他、癌の種類の違いなども考慮に入れなければならぬ。これらの抗原内反応活性分画の問題については後述するが、effector cell をさらに諸種マーカーを用いて分離して反応を検討することは今後に残された課題であろう。

次に KCl 抗原に対する免疫応答と治療との関係を検討した。この場合には化学療法単独施行群に比較して、いわゆる免疫賦活剤を化学療法に併用した群では LMI 試験の上で陽性が比較的多く認められ、注目された。現在同一患者の経過に伴う変動をさらに検討しているが、中には臨床所見や諸種免疫学的検査などの上で免疫賦活剤併用の意義を考えさせる例も経験されるので、これらの研究を導入して経過を追究することは、癌の対症保存療法、経過観察の上に新たな観点をもたらすといえるかもしれない。しかし KCl 抗原を治療指標として用いるには、本抗原の保存に安定を欠くことが問題であるから、今後免疫反応活性分画の精製をはじめ基礎的に検討すべき点が少なくない。

次に 3M KCl 抗原中の免疫反応活性分画を検索する目的で、今回は胃癌抽出 KCl 抗原のゲル濾過を行い得られた各分画による LMI 試験およびリンパ球芽球化試験を試みた。この場合、両試験とも粗抗原に対しては反応を示さないにもかかわらず、これを分画した際にその第2峰、第3峰に相当する分画を使用する時には陽性反応を示す例を経験した。これらの実験を通して反応活性分画は分子量

6~10万と推測された。Roth ら¹⁸⁾ はメラノーマ抽出 KCl 抗原をゲル濾過し、さらにこれを polyacrylamide gel electrophoresis で分画して皮内反応を行い、この分画抗原成分はメラノーマ患者9例中7例に陽性を示したとしている。一方 Wright ら¹⁹⁾ は腎癌より KCl 抗原を作製し、acrylamide gel を用いて抗原の単離を試み、albumin に近い Fraction 7 と称する分画に LMI 試験の上で腎癌のみに5/7とほぼ70%の陽性率を示したとしている。3M KCl 抗原の中には抽出過程からみて当然 HLA 抗原や臓器特異抗原の混在が考えられるから、引き続きイオン交換体ならびに各種電気泳動法を用いて本抗原の純化を図っている²⁰⁾。これらの免疫化学的検索の一環として KCl 抗原中の CEA 濃度と LMI 試験の成績を検討したが、両者の間には何ら関係を認めなかった。

次に胃癌局所の免疫応答を全身のそれと比較しつつ検討した。まず PHA-P および PWM に対するリンパ球芽球化試験の上からみると、組織学的検索の上で転移のみられないリンパ節のこれらの mitogen に対する反応性は、転移を示すリンパ節に比較しより高い。しかもその反応性は末梢循環リンパ球についての反応性よりも高い傾向を示した。また 3M KCl 抗原に対する反応性の上からすると、リンパ球芽球化試験でみ限り転移の有無との直接的関連性は認め難いが、局所リンパ節の反応性は末梢循環血中のリンパ球についてよりも高い傾向をうかがわせた。

さらに特異的免疫応答とされる MLTR についてみると、末梢血中リンパ球では全例が陰性であるのに対して、病巣に近接する非転移リンパ節は13個中2個に明瞭な反応亢進が認められ、転移リンパ節にはこうした反応亢進は認めなかった。これらの成績からすると胃癌の実験を介して考える限り局所リンパ節の細胞性免疫応答は全身性にとらえられる末梢血中リンパ球のそれに比較してよく保たれ、さらに転移のない局所リンパ節ではその反応亢進が認められるといえよう。これを非特異的 mitogen に対する局所リンパ節の反応性の点からみた研究としては、すでに菅沼ら²¹⁾ は胃癌例で Stage I のリンパ節の反応性が Stage II-IV に比較して高いと報告し、胃癌の MLTR については吉野ら²²⁾、西平ら²³⁾ がそれぞれ5/20(25%) および1/15(8%)に陽性成績を得たとし、さらに山岡¹¹⁾ は末梢リンパ球を用いた MLTR と胃癌増殖局所における単核細胞浸潤の強さとの間に密接な関連性を認めている。しかし同一例の局所リンパ節で今回のように系統的に諸種細胞性免疫能を検索した報告は少ない。

なお局所リンパ節での反応を検討する際の方法上の問題としては、転移リンパ節からのリンパ節細胞の採取には腫瘍細胞の混入を避けえない。したがって実際には反応に供

するリンパ球の量が少なくなるから、mitogen に対する反応性や MLTR が低くなることも考えねばなるまい。今回の研究においては、同時に施行した 3M KCl 抗原に対する反応性の上では、転移の有無でその間に有意の差がなく、転移リンパ節でも陽性を示す場合を認めた。この点から考えると、上述の成績はむしろ構成リンパ球集団の反応性の大小とも密接に関連しているものと推測される。関連して抗 T cell および抗 B cell 血清を用いた検索結果をさきに報告²⁴⁾したが、その場合にはリンパ節では概して T cell 優位の像が認められており、今後は個々のリンパ節での T cell subsets を含めた検討が必要といえよう。

さらに著者らは、非特異的ならびに特異的細胞性免疫能の両面から臨床病期との関連性を検討したが、全般的に Stage I, II の症例では Stage IV の症例に比較して、KCl 抗原によるリンパ球芽球化試験、および MLTR を含めたその反応性がよく保持されており注目された。KCl 抗原を用いる局所リンパ節についての研究は見られないから、系統的免疫応答の上で KCl 抗原に対する反応性と臨床病期との関係をみた研究を例にとると、Roth¹⁸⁾ はメラノーマの KCl 抗原に対する皮内反応は臨床病期との間に関係を認め難いと、McCoy¹⁶⁾ も同様にメラノーマ KCl 抗原による LMI 試験で同様に臨床病期との関係は明らかでないとしている。しかし病期を Stage I に限ってみると反応性が高いことを認めている。今回著者らの成績では Stage I, II の癌では 10 個のリンパ節中 6 個について少なくとも 1 種類以上の KCl 抗原に対する反応が認められたが、Stage IV では検索しえた 7 個すべてのリンパ節の反応は陰性であった。この点からみて、KCl 抗原に対する局所の反応性は臨床病期との間にある程度の関連性をもつものと考えたい。今後は前述のごとくさらに精製・分離してこの機序の詳細を明らかにしなければなるまい。

5 結 論

胃癌患者 104 例について、特に 3M KCl 抗原を用いて系統的ならびに局所リンパ節細胞の細胞性免疫応答を検討し、次の成績を得た。

1) 胃癌組織腫瘍細胞および腹水中腫瘍細胞より抽出した KCl 抗原に対する LMI 試験を行い、自家系の反応で 19 例中 4 例 (21.1%) に陽性成績が認められ、進行癌においても自己腫瘍細胞に対する免疫応答の存在が示された。

2) 同様にリンパ球芽球化試験および皮内反応でもそれぞれ 7 例中 1 例および 15 例中 3 例の陽性反応が認められた。

3) KCl 抗原に対する免疫応答と治療との関係を検討し、免疫化学療法施行群では LMI 試験陽性率の増加傾向

が認められた。

4) KCl 抗原内免疫反応活性分画を検討し、ゲル濾過により LMI 試験およびリンパ球芽球化試験で一部の分画に反応の増強を認めた。また KCl 抗原内 CEA 濃度と LMI 試験の間には関係を見出しえなかった。

5) 胃癌局所リンパ節の免疫応答を各種 mitogen による非特異的細胞性免疫能ならびに KCl 抗原による芽球化試験、MLTR などの特異的細胞性免疫反応の上で検討し、これを系統的免疫応答と比較したが、局所免疫反応の方が大体よく保たれていることを見出した。さらに局所の転移のないリンパ節では、転移形成の見られるリンパ節や末梢血中リンパ球よりもそれらの反応はより高い傾向にあり、臨床病期との間に関連性を示すことを認めた。そのうちとくに KCl 抗原に対する局所リンパ節の反応性が意義を有するものと推測した。

本研究は文部省がん特別研究 I (和田, 谷内) の補助によった。

文 献

1. 今井浩三: 細胞性免疫に関する臨床的研究 第 III 編。札幌医誌 **45**, 112-123 (1976)。
2. 谷内 昭, 今井浩三, 細川幸夫, 和田武雄: 溶連菌製剤による免疫化学療法の癌患者の細胞性免疫能に及ぼす影響。癌と化学療法 **5**, 137-147 (1978)。
3. Reisfeld, R. A., Pellegrino, M. A. and Kahan, B. D.: Salt extraction of soluble HL-A antigens. Science **172**, 1134-1136 (1971)。
4. Mavligit, G. M., Ambus, U., Gutterman, J. U., Hersh, E. M. and McBride, C. M.: Antigen solubilized from human solid tumours: Lymphocyte stimulation and cutaneous delayed hypersensitivity. Nature New Biology **243**, 188-190 (1973)。
5. Meltzer, M. S., Oppenheim, J. J., Littman, B. H., Leonard, E. J. and Rapp, H. J.: Cell-mediated tumor immunity measured *in vitro* and *in vivo* with soluble tumor-specific antigens. J. Natl. Cancer Inst. **49**, 727-734 (1972)。
6. Hartree, E. F.: Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry **48**, 422-427 (1972)。
7. Yachi, A., Araki, A., Kawaharada, M., Imai, K., Abe, H., Akahonai, Y. and Wada, T.: Carcinoembryonic antigen and the related antigens in gastric carcinoma. Protides of the Biological Fluids **24**, 473-476 (1976)。
8. Clausen, J. E.: Tuberculin-induced migration

- inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium. *Acta Allergol.* **26**, 56-80 (1971).
9. 今井浩三, 谷内 昭: 白血球遊走阻止試験 (Clausen) の改良法. 右田俊介編: 免疫実験操作法 V. 1485-1488, 日本免疫学会, 金沢 (1976).
 10. Imai, K., Hosokawa, Y., Abe, H., Yachi, A. and Wada, T.: Inhibition of leucocyte migration by potassium chloride extracts of human tumor cells in ascites and from tissues. *Gann* **68**, 581-587 (1977).
 11. 山岡 博: 癌患者における癌特異的細胞性免疫能に関する研究. 札幌医誌 **46**, 341-353 (1977).
 12. 和田武雄: 悪液質. 中外医学社, 東京 (1966).
 13. Boddie, Jr., A. W., Urist, M. M., Chee, D. O., Holmes, E. C. and Morton, D. L.: Detection of human tumor-associated antigens by the leucocyte migration in agarose assay. *Int. J. Cancer* **18**, 161-167 (1976).
 14. Lee, C. and Lin, T.: Inhibition of leukocyte migration by tumor-associated antigen in soluble extracts of human hepatoma. *Cancer Research* **37**, 918-921 (1977).
 15. McCoy, J. L., Jerome, L. F., Dean, J. H., Cannon, G. B., Alford, T. C., Doering, T. and Herberman, R. B.: Inhibition of leukocyte migration by tumor associated antigens in soluble extracts of human breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 11-17 (1974).
 16. McCoy, J. L., Jerome, L. F., Dean, J. H., Perlin, E., Oldham, R. K., Char, D. H., Cohen, M. H., Felix, E. L. and Herberman, R. B.: Inhibition of leukocyte migration by tumor-associated antigens in soluble extracts of human malignant melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 19-23 (1975).
 17. McCoy, J. L., Jerome, L. J., Cannon, G. B., Polymeroy, T. C., Connor, R. J., Oldham, R. K., Weese, J. L. and Herberman, R. B.: Leukocyte migration inhibition in patients with Ewing's sarcoma by 3-M Potassium chloride extracts of fresh and tissue-cultured Ewing's sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 1119-1125 (1977).
 18. Roth, J. A., Slocum, H. K., Pellegrino, M. A., Holmes, E. C. and Reisfeld, R. A.: Purification of soluble human melanoma-associated antigens. *Cancer Research* **36**, 2360-2364 (1976).
 19. Wright, Jr., G. L., Schellhammer, P. F. and Falconer, R. L.: Isolation of a soluble tumor-associated antigen from human renal cell carcinoma by gradient acrylamide gel electrophoresis. *Cancer Research* **37**, 4228-4232 (1977).
 20. 今井浩三, 細川幸夫, 谷内 昭, 和田武雄: 腫瘍特異免疫に関する基礎的研究 第2報; 3M KCl 抗原内免疫特異性分画の追求. 第36回日本癌学会総会記事. 89, 東京 (1977).
 21. 菅沼 靖, 阿部力哉, 渡部 至, 種市 襄, 西平哲郎, 葛西森夫: 胃癌患者所属リンパ節リンパ球の PHA 刺激試験, PWM 刺激試験および RLB 試験による免疫学的検討. 日癌治誌 **11**, 193-202 (1976).
 22. 吉野邦英, 岩佐 博, 関塚宏巳, 村上忠重: 胃癌患者における胃癌組織とリンパ球の混合培養テスト. 第32回日本癌学会総会記事. 271, 東京 (1973).
 23. 西平哲郎, 葛西森夫, 森 昌造, 渡辺登志男, 堤 栄昭, 阿部力哉, 九里孝雄, 菅沼 靖, 丹 正義, 栗谷義樹: 食道癌, 胃癌, 甲状腺癌, 乳癌における所属リンパ節リンパ球の免疫応答 (第2報). 第35回日本癌学会総会記事. 63, 東京 (1976).
 24. 和田武雄, 今井浩三, 細川幸夫, 高見 剛, 阿部 弘, 谷内 昭: 転移と局所ならびに系統的免疫応答. 癌と化学療法 **5** (Suppl. I), 96-102, 1978.