

# 大腸癌患者における癌特異的免疫能に関する研究

岡山大学医学部第1外科教室（主任：折田薫三教授）

渡 辺 哲 夫

（昭和58年2月22日受稿）

## 緒 言

担癌生体が自己の癌に対して免疫応答していることは多くの動物実験、臨床的事実により支持されている<sup>1)</sup>。癌の免疫応答が成立するためには癌に正常細胞にはない抗原すなわち腫瘍特異抗原 (TSA) が存在し、担癌生体のリンパ球はこの TSA を not self として認識する必要がある<sup>2),3)</sup>。TSA に対する免疫反応が十分に惹起されれば癌細胞を破壊、排除しうることが知られている<sup>4)</sup>。

TSA は動物実験では明らかにされているが、ヒト腫瘍においてもメラノーマ<sup>5)</sup>、急性骨髄性白血病<sup>6)</sup>において検出されている。大腸癌の TSA 及び腫瘍関連抗原 (TAA) についても古くから、colony inhibition test<sup>7)</sup>、さらに、microcytotoxicity test<sup>8)</sup>を用いて Hells-tröm<sup>9)</sup>、Baldwin<sup>10)</sup>らによって証明されており、最近ではKoprowski<sup>11)</sup>らの monoclonal 抗体を用いた実験で大腸癌の TSA を証明した報告がある。

しかし microcytotoxicity test や腫瘍の特異性についての問題点を指摘する報告もみられる<sup>12),13)</sup>。そこで我々は microcytotoxicity test と <sup>3</sup>H-Uridine (以下 <sup>3</sup>H-UdR と略す) を用いた lymphocytotoxicity test を行い、両者を比較し、さらに大腸癌の TSA を検討すべく、大腸癌由来株化細胞 p-4788 と、他癌株化細胞 M-Hela を標的細胞とした大腸癌 lymphocytotoxicity test を行い、比較した。

また大腸癌組織より抽出した蛋白と、大腸癌患者、胃癌患者、良性疾患患者、正常人リンパ

球との mixed lymphocyte tumor reaction (以下 MLT R と略す) を、行った結果、大腸癌の共通抗原の存在を示唆する成績を得た。

現在、癌免疫療法が広く行われているが、癌の特異的免疫動態を把握することは極めて重要である。そこで前述した大腸癌患者の lymphocytotoxicity を stage 別に、また術前後を比較検討するとともに、血清阻止因子を測定した。

さらに癌の腫瘍関連抗体として知られ、広く臨床的に用いられている癌胎児性抗原 (CEA) と lymphocytotoxicity 及び血清阻止因子との関連を検討し興味ある結果を得たので報告する。

## 研究対象と方法

### 1. 研究対象

岡山大学第1外科に入院し手術を受けた大腸癌及び直腸癌 106 例、胃癌 7 例、良性疾患 12 例を用いた。大腸癌の病期は日本大腸癌研究会の大腸癌取扱い規約<sup>14)</sup>より分類した。

### 2. ヒト末梢血リンパ球の分離

リンパ球は Böyum<sup>15)</sup>の方法により分離採取した。つまりヒト末梢血 10ml につき、ヘパリン、0.2ml を添加し、0.9% 生理食塩水で倍希釈し、Ficoll-Conray 液 3ml に静かに重層する。これを 2000 r.p.m. 30 分間遠沈し、リンパ層を採取し、RPMI-1640 (NISSUI SEIYAKU CO LTD) にて 4 回洗浄後、RPMI-1640 に浮遊させる。なお RPMI-1640 には、Penicillin G 100u/ml (Meiji) と Streptomycin 100 $\mu$ g/ml (Meiji) を加えて使用した。

### 3. 血清の採取

大腸癌患者の末梢血を 5ml 採取し、3000 r.p.m.

10分間遠沈し、その上清の血清を採取し、millipore filter (TYPE DA 0.65  $\mu$ m, MiLLiPORE)にて慮過し、56°C、30分非働化後、血清阻止因子の検出に用いた。

#### 4. 標的細胞

##### 1) P-4788

Rowell Park Memorial Institute (RPMI)において大腸癌の転移性胸水より分離株化されたAdenocarcinomaで、CEAを産生する大腸癌株化細胞である<sup>16),17)</sup>。

##### 2) M-Hela

麻疹ウイルスの感染した子宮癌由来株化細胞<sup>18)</sup>で、大腸癌株化細胞の対照として、標的細胞に用いた。標的細胞はいずれも20% fetal calf serum (FCS)加RPMI-1640で継代維持した。

#### 5. <sup>3</sup>H-UdR postlabeling lymphocytotoxicity assay (TPLA) 及び、血清阻止因子の検出法

Microtest Plate II (Falcon Plastics, Oxford, Calif.)の各穴に標的細胞を5000個分注し、36°C、5% CO<sub>2</sub> incubatorにて、12時間培養する。その後各穴の上清を吸引除去し、20% FCS加RPMI-1640に浮遊せるリンパ球を25×10<sup>4</sup>個加え、20時間培養する。その後各穴の底部に付着せる生存標的細胞を剥離させること無く、RPMI-1640で3回洗浄し、リンパ球を除去し、<sup>3</sup>H-UdR (30 ci/m mol, Code TRK 178)を1  $\mu$ Ci HamiltonのRepeating Dispenserにて各穴に加え、4時間培養する。培養終了後、上清を吸引し、phosphate buffered saline (以上 PBSと略す)で3回洗浄後、0.1 N, NaOHを各穴に加え、付着せる標的細胞を破壊し、multiple cell harvester (Skatron, Norway)を用いてグラスファイバーフィルター(Harvester Filters, ラボサイエンス)へ<sup>3</sup>H-UdRを採集した。これらのフィルターを充分乾燥させた後、5 mlの液体シンチレーター (POPOP 50 mg+PPO 2.5 g/トルエン 500 ml)と共に、放射能測定用Vial瓶に入れ、液体シンチレーションカウンター (Aloka, Model LSC-653)にて、<sup>3</sup>H-UdRの取り込みを測定する。実験はトリPLICATEで行い、その平均値を用いた。

#### 6. cytotoxicity index 及び blocking index の

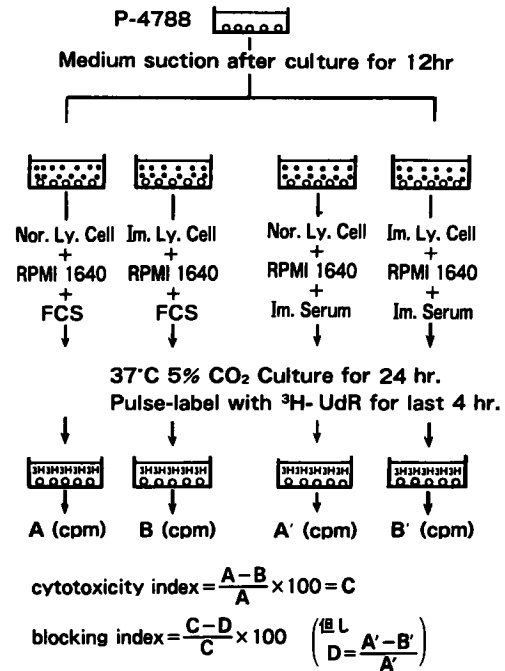


図1. Method of Cell-Mediated Cytotoxic Assay by Postlabeling of Tritiated Uridine

#### 算出法

図1の如く、正常リンパ球と混合培養した標的細胞の<sup>3</sup>H-UdR uptakeをA (cpm)とし、大腸癌患者リンパ球と混合培養した標的細胞の<sup>3</sup>H-UdR uptakeをB (cpm)とする。

血清阻止因子の検出にはFCSの代りに前述の方法で採取した患者血清を用い、患者血清添加時の正常人リンパ球グループの<sup>3</sup>H-UdR uptakeをA' (cpm)とし、大腸癌患者グループをB' (cpm)とし、cytotoxicity index 及び blocking indexを算出した。

#### 7. microcytotoxicity assay (MCA)

Takasugi-KleinのMCAに準じて行った。

すなわちMicrotest Plate I (Falcon 3034, Falcon Plastics, Oxford, Calif.)の各穴に標的細胞を150個分注し、37°C、5% CO<sub>2</sub> incubatorにて24時間培養する。次に各穴の培養液を吸引除去し、20% FCS加RPMI-1640に浮遊せるリンパ球を各穴に15×10<sup>3</sup>個加え、48時間培養する。その後plateを転倒し、振盪後1時間倒立のまま37°C、CO<sub>2</sub> incubatorで培養し、培養液とり

ンパ球及び、死細胞を除去する。その後、1.25%のグルタルアルデヒドで固定しメイ・ギムザ染色を行い、検鏡・計数する。実験は10個の穴を一列とし、その平均値を用いた。cytotoxicity indexはTPLAと同様の計算方法で算出した。

8. 可溶性大腸癌抽出抗原による mixed lymphocyte tumor reaction (MLTR)

Deoxycholic Acid (DOC)を用いた入江<sup>19)</sup>の方法に準じて可溶性抗原を抽出した。すなわち大腸癌組織の壊死部分や血球成分を除き、はさみで細切した後、ペロナール緩衝液(以下VBと略す)で、500×g、10分間遠沈、洗滌を4回行い800×g、10分にて細胞をパックする。パックした大腸癌組織10ml及び大腸正常組織10mlにつきVB 28ml、0.01 M 塩化マグネシウム2 mlを加え、さらにDOC 0.08gを混ぜてマグネチックスターラーで4℃にて4時間かく拌した後、冷凍遠沈し(10000g、60分、0℃)上清を無菌的に0~4℃にてVBで透析し、10500g、60分、0℃にて超遠沈を行い、精製し、可溶性抗原を作製した。

MLTRは20% FCS加RPMI-1640に浮遊した末梢血リンパ球1×10<sup>5</sup>個を microtiter plate U-type (Cooke, USA)の各穴に分注し、25 µg/mlの抽出抗原を加える。37℃、5%

CO<sub>2</sub> incubatorにて4日間培養し、培養終了24時間前に<sup>3</sup>H-thymidine (5.0 Ci/mmol, Code TRA 120, 以下<sup>3</sup>H-TdRと略す)を1 µCi 各穴に Repeating dispenserにて添加し、multiple cell harvesterにて<sup>3</sup>H-TdRをグラスファイバーフィルターに採集し、TPLAと同様の方法で液体シンチレーションカウンターで<sup>3</sup>H-TdRの取り込みを測定した。実験はトリプレートで行い、Stimulation index (S.I.)は次式にて算出した。

$$S.I. = \frac{\text{大腸癌抽出抗原によるリンパ球 } ^3\text{H-TdR up take (cpm)}}{\text{正常大腸癌組織抽出蛋白によるリンパ球 } ^3\text{H-TdR up take (cpm)}}$$

9. 大腸癌患者の血清 CEA の測定

大腸癌患者末梢血より、血清を分離し、ロシュ社のCEAキットを用い、Zirconium-gel(Z-gel)法<sup>20)</sup>で測定した。

実験結果

1. 標的細胞 P-4788 の <sup>3</sup>H-UdR up take

P-4788をMicrotest plate II各穴1250個、2500個、5000個、10000個の各濃度で分注し、<sup>3</sup>H-UdRを1 µCiづつ、Repeating Dispenserで添加し、経時的にP-4788の<sup>3</sup>H-UdR up takeを測定した。

図2の如く、10000個では、24時間でほぼ plateauに達し、各穴200 µlの培養液中での24時

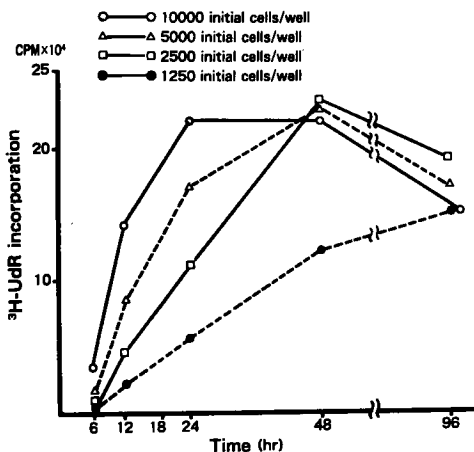


図2 <sup>3</sup>H-UdR incorporation of P-4788 cells

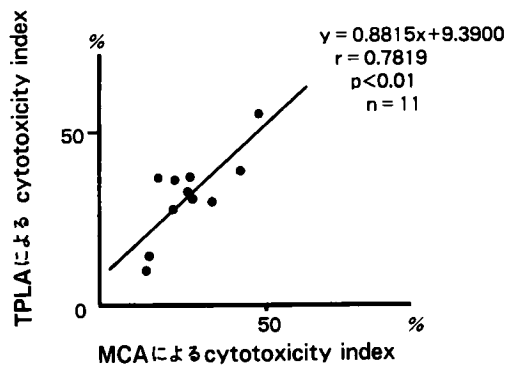


図3

TPLAとMCAによる cytotoxicity indexの関係

間以上の混合培養は細胞数が過剰となり不可能であった。2500個, 5000個では, 48時間までは,  $^3\text{H-UdR}$  up take は増加し, 48時間では同レベルとなり, 以後の up take は低下している。従って48時間以上の混合培養は lymphocytotoxicity test には不適當である。以上より, TPLA には各穴5000個とし, 36時間培養を行った。

## 2. TPLA と MCA の比較

大腸癌患者11名を対象として P-4788 を標的細胞とした末梢血リンパ球 cytotoxicity test を TPLA と MCA で行い, その比較を行った。図3の如く, 縦軸に TPLA による cytotoxicity index をとり, 横軸に MCA による cytotoxicity index をとってそれぞれの組合せを点で描出すると,  $y=0.8815x+9.3900$ ,  $r=0.7819$ ,  $p<0.01$  で正の相関を示した。

## 3. p-4788 と M-HeLa に対する大腸癌患者 lymphocytotoxicity の比較

大腸癌患者25例の術前末梢血リンパ球を用いて, P-4788 と M-HeLa を標的細胞とした TPLA を行うと, 図4の如く, P-4788 の cytotoxicity index は  $30.25 \pm 23.87\%$  ( $n=25$ ) に対し,

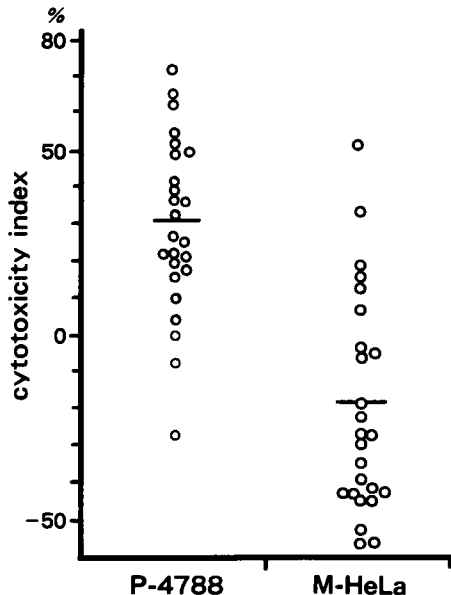


図4 Comparison between cytotoxicity against P-4788 and M-HeLa

M-HeLa は,  $-20.47 \pm 29.69\%$  ( $n=25$ ) と有意の差 ( $p<0.01$ ) を持って, 大腸癌患者リンパ球は P-4788 に対して高い cytotoxicity を示したが, M-HeLa に対しては cytotoxicity を示さなかった。

## 4. 可溶性 DOC 大腸癌抽出抗原による MLTR

大腸癌抽出 allo-antigen を用いて, 大腸癌42例, 胃癌7例, 良性疾患12例, 正常人9例の末梢血リンパ球の MLTR を行った。図5の如く, それぞれの S.I. は, 大腸癌  $1.18 \pm 0.25$  ( $n=42$ ), 胃癌  $0.82 \pm 0.12$  ( $n=7$ ) 良性疾患  $0.91 \pm 0.12$  ( $n=12$ ) 正常人  $1.02 \pm 0.13$  ( $n=9$ ) と大腸癌は胃癌, 良性疾患に比べ, 有意 ( $p<0.01$ ) に高い幼若化反応を示した。

## 5. 大腸癌患者の stage 別及び術前後の cytotoxicity

大腸癌患者106例のうち術前 cytotoxicity が正を示したものは, 91例 (85.8%) でありこのうち69例 (65.1%) に対照との間に有意差を認め, その最低値は 15.0% であった。術前の cytotoxicity index を stage 別に見ると, stage I,  $31.3 \pm 27.5\%$  ( $n=18$ ), stage II,  $16.8 \pm 11.58\%$  ( $n=7$ ), stage III,  $15.2 \pm 22.6\%$  ( $n=26$ ) stage IV,  $25.2 \pm 16.5\%$  ( $n=30$ ) stage V,  $15.8 \pm 16.7\%$  ( $n=25$ ) で各 stage 間に有意差は認めなかつ

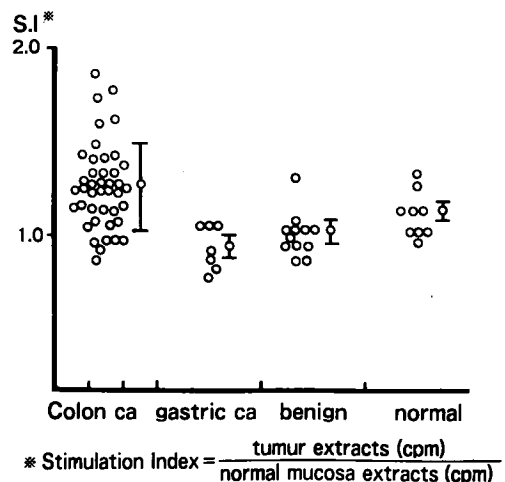


図5 Tumor extract induced lymphocyte blastogenesis in colon cancer

った。

次に術後4週目の cytotoxicity index は、Stage I  $2.8 \pm 14.9\%$  (n=12), Stage II,  $1.9 \pm 9.0\%$  (n=3) Stage III  $3.9 \pm 8.4\%$  (n=7) Stage IV  $0.6 \pm 11.6\%$  (n=8) Stage V  $14.9 \pm$

$10.9$  (n=8) であった。

術後の Stage 間の cytotoxicity は Stage V で有意 ( $p < 0.01$ ) に高かった。それぞれの Stage を術前と比較すると Stage I, Stage IV は有意差 ( $p < 0.01$ ) を持って術後低下し, Stage

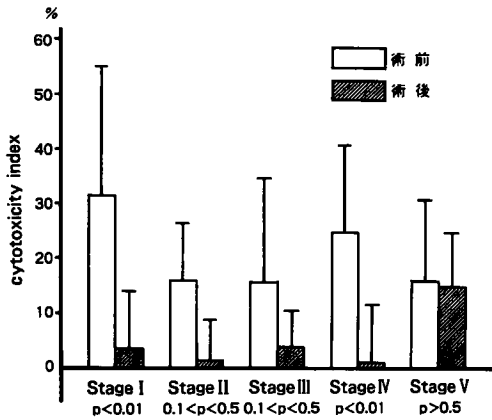


図 6

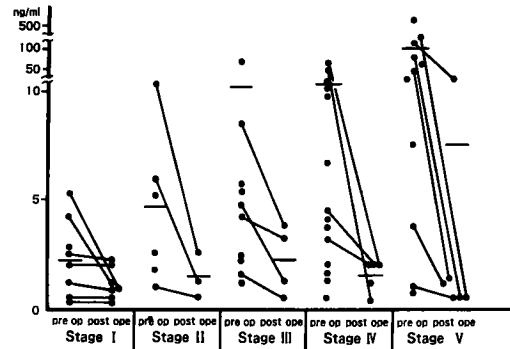


図 8

CEA value of Colonic Cancer Patients

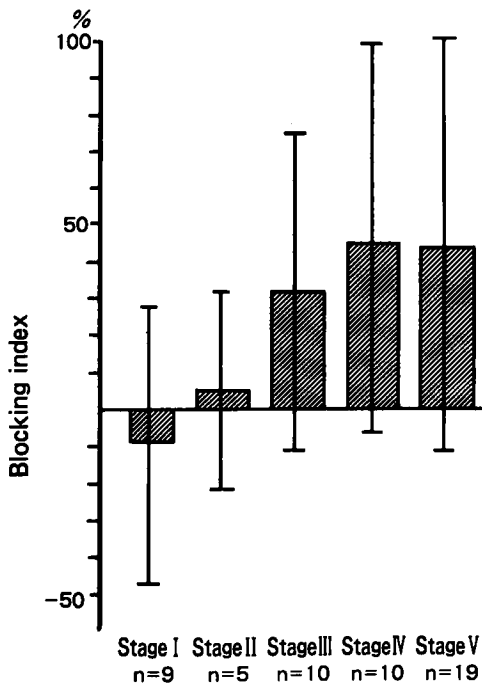


図 7. 大腸癌患者における serum blocking factor の Stage 別分類

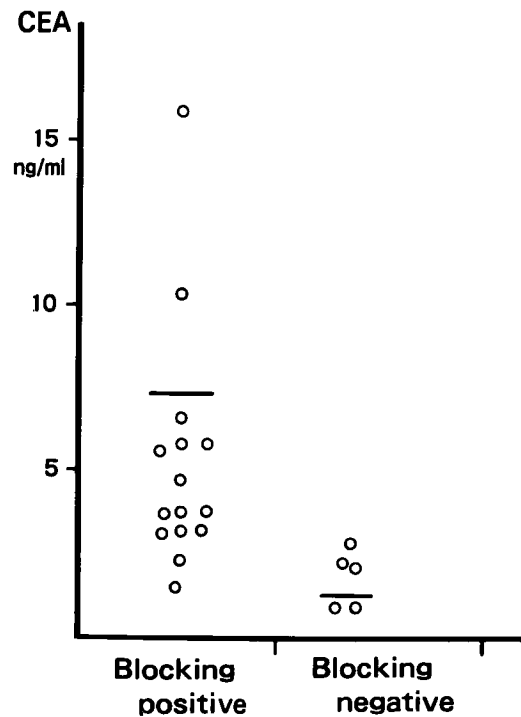


図 9

II, IIIでは症例が少ないが同様の傾向を認めた。しかし、Stage V は、術後低下の傾向を示さなかった。(図6)

6. 大腸癌の血清阻止因子と進行度との関係  
血清阻止因子は cytotoxicity が陽性であった53例のうち、37例(69.8%)に検出した。その blocking index を Stage 別に比較すると、Stage I :  $-8.23 \pm 42.27\%$  (n=9), Stage II :  $5.76 \pm 26.60\%$  (n=5), Stage III :  $31.46 \pm 44.60\%$  (n=10), Stage IV :  $41.81 \pm 54.85\%$  (n=10) Stage V :  $44.27 \pm 59.36\%$  (n=19) と Stage の進行と共に上昇した。(図7)

#### 7. 血清CEA値のStage別及び術前後の比較

大腸癌48例について血清CEA値のStage別、及び術後4週目の比較を行うと、術前の血清CEA値は Stage I :  $2.35 \pm 1.64$  ng/ml (n=8) Stage II :  $4.82 \pm 3.83$  ng/ml (n=6), Stage III :  $14.62 \pm 31.86$  ng/ml (n=10), Stage IV :  $13.8 \pm 21.67$  ng/ml (n=14) Stage V :  $112.63 \pm 217.10$  ng/ml (n=12) と Stage の進行と共に上昇した。

術後の血清CEA値は Stage I :  $1.17 \pm 0.66$  ng/ml (n=7), Stage II :  $1.40 \pm 0.83$  ng/ml (n=3) Stage III :  $2.18 \pm 1.36$  ng/ml (n=4), Stage IV :  $1.54 \pm 0.61$  ng/ml (n=5), Stage V :  $2.45 \pm 3.62$  ng/ml (n=6) といずれも術前値と比較し、著明に低下していた。(図8)

#### 8. 血清CEA値と血清阻止因子との相関

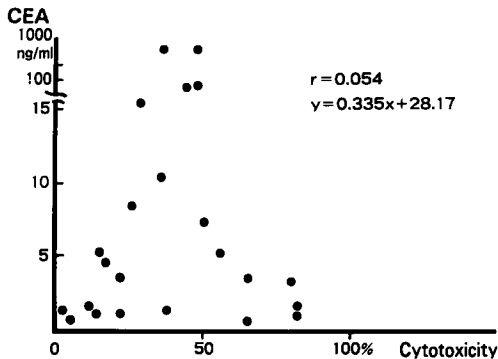


図 10

Relationship between CEA and Cytotoxicity

血清阻止因子を検索した大腸癌患者20例の血清CEA値を測定すると、阻止因子陽性(Blocking positive)群の血清CEA値は  $5.39 \pm 3.63$  ng/ml であったのに対し、阻止因子陰性(Blocking negative)群の血清CEA値は  $1.15 \pm 0.83$  ng/ml であった。阻止因子陽性群の血清CEA値は陰性群に比べ、有意( $p < 0.05$ )に上昇していた。(図9)

#### 9. 血清CEA値と cytotoxicity との相関

血清CEA値と cytotoxicity の相関をみると  $r = 0.054$ ,  $y = 0.335x + 28.17$  と相関はみられなかった。(図10)

## 考 察

最近、癌の免疫療法が広く行われているが真の免疫療法が成立するためには癌細胞に TSA が存在し、担癌生体がこの TSA を not self として認識し、免疫応答が行われなければならない。腫瘍に特異性のあることは多くの動物実験により<sup>21,22,23</sup>、そして人癌においても<sup>24</sup>担癌生体がそれぞれの癌細胞に対して特異的免疫反応を示し、組織型の異なったものには反応を示さないことが報告されている。大腸癌では Hells-tröm<sup>9,25</sup>、Baldwin<sup>10,26</sup>らが Takasugi & Klein の microcytotoxicity assay (MCA) を用いた実験で cross react する TSA が存在することを報告している。しかしその後 MCA の臨床用での問題点が指摘された<sup>27</sup>。技術的な問題として、MCA では検鏡下に多数の腫瘍細胞を計数するために客観性を欠くことである。そこで我々は MCA と同様の方法で混合培養を行い、生存している癌細胞に <sup>3</sup>H-UdR を label する <sup>3</sup>H-UdR postlabeling lymphocytotoxicity assay (TPLA) を行ない、MCA の結果との比較を行った。大腸癌患者11名の両 assay の cytotoxicity index は、 $y = 0.8815x + 9.3900$ ,  $r = 0.7819$   $p < 0.01$  との正の相関を示した。MCA は患者リンパ球が少なくすみ、培養液も少量かつ isotope を用いないため安価で簡便ではあるが TPLA には、MCA と比べ 1) 多数の標的細胞を用いるため安定で再現性が高い。2) 多数の検体を短時間で処理できる。3) 客観的に計算しうる。などの利点がある。また、cytotoxicity

assayにおける specificity の問題については Heppner<sup>13)</sup>は3種類のメラノーマ株化細胞に対してメラノーマ患者リンパ球がcytotoxicityを示したのは1種類のみに対してであり、また5種類の乳癌株化細胞に対して、乳癌患者リンパ球は4種類の株化細胞には、cytotoxicityを示したが、残りの1種類には、cytotoxicityを示さなかったことから、標的細胞の選択が問題であると報告している

大腸癌においても Baldwin<sup>10)</sup>は株化細胞によって抗原性に差があり、cytotoxicity assayに適した細胞のあることを述べている。

我々は大腸癌患者の特異性免疫能を検索する方法として大腸癌株化細胞 P-4788 とその対照として他癌株化細胞 M-HeLa を標的細胞とする大腸癌患者の TPLA を行った。

TPLAの対照は培養液のみの場合と、正常人リンパ球を用いる場合がある。培養液のみを対照とする場合、患者リンパ球を加えた場合の培養条件が異なるため、本実験では、常に同一の正常人リンパ球を用いた。P-4788に対する大腸癌患者リンパ球のcytotoxicity indexが $30.25 \pm 23.87\%$ ( $n=25$ )に対して、M-HeLaに対しては $-20.47 \pm 29.69\%$ ( $n=25$ )と有意の差( $p<0.01$ )を持って、P-4788に高いcytotoxicityを示した。つまり P-4788 は高い抗原性を有し、大腸癌患者の lymphocytotoxicity assay に適した株化細胞であると思われる。一方、M-HeLaに対する大腸癌患者リンパ球のcytotoxicityが陰性であったことは、Herberman<sup>28)</sup>、Takasugi<sup>29)</sup>らのいう natural killer 活性が、対照の正常リンパ球に対して、大腸癌患者リンパ球は低下しているためと思われる。

大腸癌には cross react する抗原の存在が種々の方法で明らかにされている。Baldwin<sup>10)</sup>は MCAの方法で allo の大腸癌患者リンパ球の cytotoxicity test が61%に陽性であったが、cytotoxicity 陽性のリンパ球は、メラノーマ、腎癌、乳癌、正常大腸細胞を標的にした場合 cytotoxicity を示さなかったと報告している。また Halliday<sup>30)</sup>は leucocyte adherence inhibition test (LAI)を用いて cross react する antigen のあることを明らかにしている。癌細胞に

TSAがあるとその患者リンパ球はこれを異物として認識し、幼若化反応を惹起する。このことから我々は大腸癌抽出 allo-antigen を用いた MLTR を行った。その結果大腸癌患者リンパ球は、胃癌患者、良性疾患患者リンパ球に比べ、有意( $p<0.01$ )に高い幼若化反応を示した。これは、大腸癌に cross react する TSA が存在することを示唆している。

癌治療を考える場合、担癌生体の腫瘍拒絶能を高める免疫療法は必要不可欠である。

折田<sup>31)</sup>は消化器癌も一般の癌と同様に、非特異的細胞性免疫は癌の進行と共に低下しつづけて、特異的細胞性免疫は癌の進行と共に出現し増強するが、あるレベルを越えると減弱消失すると述べている。また大腸癌についても同様の報告がみられる<sup>32)</sup>。従って大腸癌の特異的免疫動態を把握することは、診断の上でも治療の上でも重要と思われる。

そこで我々は大腸癌由来株化細胞を標的細胞とした大腸癌患者リンパ球の術前後の cytotoxicity assay を行ない、さらにその cytotoxicity に対する癌患者血清の影響をみた。その結果術前の cytotoxicity index は106例中、有意差( $p<0.05$ )を持って cytotoxicity を示したものは、69例(65.1)であり、各ステージ間に有意差を認めなかった。これは、小長<sup>33)</sup>、太田<sup>34)</sup>らの結果と一致している。術後の cytotoxicity index を Stage 別に術前と比較すると、Stage I、Stage IV は有意( $p<0.01$ )に低下しており、Stage II、IIIでも同様の傾向を認めた。しかし Stage V では、術後全く低下の傾向を認めなかった。術前 cytotoxicity index の程度は Stage 間に有意差のないことから、癌進行度の示標にはなり得ない。術後の cytotoxicity index は治癒切除のし得た Stage I、II、III、IV はほとんど正常であるが、非治癒切除の Stage V では全く低下しないことから O'Toole<sup>35)</sup>、太田<sup>34)</sup>らの言うように術後 cytotoxicity の持続は残存腫瘍の存在又は再発を意味する。一方、術前の血清阻止因子は cytotoxicity が陽性であった53例のうち37例(69.8%)に検出され、その blocking index は癌進行度に一致して上昇する。従って阻止因子は cytotoxicity と異なり、腫瘍が大きくなれば

ば抗原量の増加に伴い、高値を示し、癌進行度及び予後を反映するものと思われる。血清阻止因子の本態について Currie は可溶性抗原であると述べているが<sup>36,37)</sup>、Hellströmは癌細胞を癌患者血清で処理すると cytotoxicity が消失することからこれを blocking antibody と呼んだが、その後抗原がリンパ球に結合して阻止することから、抗原抗体複合体であると述べている<sup>24)</sup>。

CEA は1965年 Gold<sup>38)</sup>らがヒト大腸癌抽出液から、ヒト消化器癌に共通な癌特異抗原を見出し、同じ抗原が胎児消化器中に存在することから、癌胎児性抗原 (CEA) と名付けた。さらに癌組織のみならず、癌患者血清、正常組織からも CEA は証明されているが、CEA が細胞の癌化により著しく増量する物質で腫瘍関連抗原の一つであることは明らかでその臨床応用は広く実用化されている。しかし CEA と lymphocytotoxicity 及び血清阻止因子との関連をみた報告は未だない。そこで CEA の術後の変動と、lymphocytotoxicity 及び血清阻止因子の相関を検討した。

血清 CEA 値の術前を Stage 別に検討すると、癌の進行と共に血清 CEA 値は上昇する。特に Stage V では  $112.63 \pm 21.71$  ng/ml (n=12) と著しい高値を示した。術後の血清 CEA 値は Stage V でも主病巣を除去するために  $2.45 \pm 3.62$  ng/ml (n=6) と低下している。

これは cytotoxicity index が Stage V では低下しなかった点と異なる。そこで CEA と cytotoxicity index との相関をみると  $r=0.054$  と、両者間に相関はみられなかった。この点からも cytotoxicity の出現は癌の進行度や腫瘍の大きさよりも、癌の有無を反映するものと考えられる。

一方 CEA と血清阻止因子との相関をみると Blocking positive 群の血清 CEA 値が  $5.39 \pm$

$3.63$  ng/ml に対し、Blocking negative 群は  $1.15 \pm 0.83$  ng/ml と有意 ( $p < 0.05$ ) の差をもって Blocking positive 群に血清 CEA 値の上昇を認めた。従って血清阻止因子と血清 CEA 値とは癌の進行度に一致して上昇すること、主病巣を切除するのみで低下することも併せて、腫瘍量を反映している。

癌治療にあたり、CEA や非特異的免疫パラメーターのみならず、特異的免疫能を把握するために lymphocytotoxicity assay 及び血清阻止因子の検出は有用と思われる。

## 結 論

1. 従来行われてきた microcytotoxicity assay (MCA) と  $^3\text{H-UdR}$  postlabeling lymphocytotoxicity assay (TPLA) を比較すると両者間に正の相関 ( $p < 0.01$ ) が見られた。
2. 大腸癌患者の大腸癌株化 P-4788 と他癌株化 M-HeLa の lymphocytotoxicity を比較すると、P-4788 に対して有意 ( $p < 0.01$ ) に高い cytotoxicity を示した。
3. 大腸癌抽出 allo-antigen を用いた MLTR において大腸癌患者は、胃癌患者、良性疾患患者に比べ有意 ( $p < 0.01$ ) に高い幼若化反応を示した。
4. 大腸癌患者の術前後の cytotoxicity を比較すると Stage I, II, III, IV は、術後低下を認めたが Stage V では認めなかった。
5. 術前の血清 CEA 値は、Stage の進行と共に上昇し、術後はいずれの Stage も著しく低下した。
6. 血中 CEA 値と、cytotoxicity は相関を示さないが、血清阻止因子とは相関を示した。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜りました折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、心から感謝いたします。



## 文 献

1. Friedman, H. and Southan, C.M.; International Conference On Immunobiology of Cancer. *Ann. N.Y.Acad. Sci.*, Vol 276, 1976.
2. Grosser, N.; Cell-mediated antitumor immunity in breast cancer patients evaluated by antigen-induced leucocyte adherence inhibition in test tubes. *Cancer Res.* 35, 2571—2579, 1975.
3. Dean, J.H.; Demonstration of specific cell-mediated anti-tumor immunity in lung cancer to autologous tissue extracts. *Int. J. Cancer.* 22, 367—377, 1978.
4. Jagarlamoody, S.M.; In vitro detection of cytotoxic cellular immunity against tumor-specific antigens by a radioisotopic technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 1346—1350, 1971.
5. Carey, T.E., Lloyd, K. O.; AU cell-surface antigen of human malignant melanoma.; Solubilization and partial characterization *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 2898—2902, 1979.
6. S.K.Lee and R.T.D.Oliver: Autologous leukemia-specific T-cell mediated lymphocytotoxicity in patients with acute myelogenous leukemia. *J. EXP. Med.* 147, 912—922, 1978.
7. Hellström, I.; A colony inhibition (CI) technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cell in vitro. *Int. J. Cancer* 2, 65—68, 1967.
8. Takasugi, M. and Klein, E; A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation* 9, 219—227, 1970.
9. Hellström, I., Hellström, K.E. and Sjögren, H.O.; Demonstration of Cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types, *Int. J. Cancer* 7, 1—16, 1971.
10. Baldwin, R.W., Embleton, M.J., Jones, J.S.P and Langman, M.J.S; Cell-mediated and humoral immune reactions to human tumours. *Int. J. Cancer* 12, 73—83, 1973.
11. Meenhard, H and Hilary, Koprowski; Colorectal carcinoma-specific antigen; Detection by means of monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. USA.* 76, 1438—1442, 1979.
12. Mitsuo Takasugi, Mickey, M.R., and Paul, I.Terasaki; Studies on specificity of cell-mediated immunity to human tumors. *J. Natl. cancer. Inst.* 53, 1527—1538, 1974.
13. Heppner, G., Henry, E; Problems in the clinical use of the microcytotoxicity assay for measuring cell-mediated immunity to tumorcells, *Cancer Res.* 35, 1931—1937, 1975.
14. 大腸癌研究会：大腸癌取扱い規約 1976.
15. Böyun, A.; Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 97, 77—89, 1968.
16. Moore, G.E. and Koike, A.; Growth tumor cells *in vitro* and *in vivo* *Cancer* 17, 11—20. 1964.
17. Hirai, T., Yamamoto, H., and Hamaoka, T.; Relationship between carcinoembryonic antigen and major histocompatibility antigens on cultured human carcinoma cells. *J. Immunol.* 124, 2765—2771, 1980.
18. Kenneth, A.A and Howard, L.W; Natural killing of measles-infected cells by human lymphocytes. *J. Immunol.* 122, 2611—2616. 1979.
19. 入江礼子：腫瘍特異抗原の精製法実免疫験操作法A 日本免疫学会 富山, pp. 394—399, 1976.
20. Le Gerfo P., Krupey, J. and Hansen, H.J.; Demonstration of an antigen common to several varieties of neoplasia, assay using zirconium phosphate gel. *N. Engl. J. Med.* 285, 134—141, 1971.
21. Taranger, L.A., Chapman, W.H., Hellström, I. and Hellström, K.E.; Immunological studies on urinary bladder tumors of rats and mice. *Science* 176, 1337—1340, 1972.
22. Steel, G. and Sjögren, H.O.; Crossreacting tumor associated antigens among chemically induced

- rat colon carcinomas. *Cancer Res.* **34**, 1801—1807, 1974.
23. Baldwin, R.W. and Embleton, M.J.: Neoantigens on spontaneous and carcinogen-induced rat tumors defined by in vitro lymphocytotoxicity assays. *Int. J. cancer.* **13**, 433—442, 1974.
  24. Hellström, K.E and Hellström, I.; Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Advanc Immunol.* **18**, 209—277, 1974.
  25. Hellström, I., Hellström, K.E. and Shepard, T.H.; Cell-mediated immunity against antigens common to human colonic carcinomas and fetal gut epithelium. *Int. J. Cancer.* **6**, 346—351, 1970.
  26. Baldwin, R.W., Embleton, M.T. and Price, M.R.: Inhibition of lymphocyte cytotoxicity for human colon carcinoma by treatment with solubilized tumor membrane fractions. *Int. J. Cancer.* **12**, 84—92, 1973.
  27. Herberman, R.B. and Oldham, R.K.: Problems associated with study of cell-mediated immunity to human tumors by microcytotoxicity assays. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 749—753, 1975.
  28. Herberman, R.B.; Natural killer cells; Characteristics and regulation of activity. *Immunol. Rev.* **44**, 43—70, 1979.
  29. Takasugi, M., Mickey, M.R. and Terasaki, P.I.; Reactivity of lymphocyte from normal person on cultured tumor cells. *Cancer Res.* **33**, 2898—2902, 1973.
  30. Halliday, W.J. and Maluish, A.E.; An evaluation of leucocyte adherence inhibition in the immunodiagnosis of colorectal cancer *Cancer Res.* **37**, 1962—1971, 1977.
  31. 折田薫三：消化器患者の免疫能，消化器外科，**2**，51—58，1979.
  32. 渡辺哲夫，折田薫三：大腸癌患者の免疫能，日本臨床，**39**，2038—2042，1981.
  33. 小長英二，折田薫三，万波徹也，太田 保，日伝晶夫，田中早苗：大腸癌における同種株化細胞に対する殺細胞試験，癌の臨床，**24**，316—319，1978.
  34. 太田 保：大腸癌患者における術前後のリンパ球殺細胞性及び血清阻止因子の変動について：岡山医学会雑誌，**91**，1551—1558，1979.
  35. O'Toole, C., Perlman, P., Unsgard, B., Almgard, L.E., Tohansson, B. and Moberger, G.; Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma. II. Effect of surgery and preoperative irradiation. *Int. J. Cancer* **10**, 92—98, 1972.
  36. Currie, G.A., and Basham, C.; Serum mediated inhibition of the immunological reactions of the patient to his own tumor; A possible role for circulating antigen. *Br. J. cancer* **26**, 427—438, 1972.
  37. Currie, G.A.; Effect of active immunization with irradiated tumor cells on a specific serum inhibitors of cell mediated immunity in patients with disseminated cancer. *Br. J. Cancer* **28**, 25—35, 1973.
  38. Gold, P. and Freedman, S.O.; Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* **121**, 439—462, 1965.

**Study of tumor specific immunity in human colon cancer.**

**Tetsuo WATANABE**

**First Department of Surgery, Okayama University**

**Medical School, Okayama.**

**(Director: Prof. K. Orita)**

We studied the correlation of a microcytotoxicity assay (MCA) and a 3H-Uridine postlabeling lymphocytotoxicity assay (TPLA). Cells of the P-4788 cell line established from the pleuritis carcinomatosa of a colon cancer patient were used as the target cells. MCA correlated well with TPLA.

The cytotoxicity index in the case of P-4788 cells as the target cells was high in comparison with the cytotoxicity index when M-Hela cells, a cell line from a uterine carcinoma, were used.

A mixed lymphocyte tumor reaction with allo-antigen extracted from colon cancer was done, and the stimulation index of colon cancer patients was found to be high in comparison with that of gastric cancer patients and benign disease patients.

There was no significant difference between the cytotoxicity of each stage of cancer before operation. However, there were significant differences the cytotoxicity before that after operation in all stages except stage V. There was a tendency for the blocking index to increase with the advance of cancer.

Serum carcinoembryonic antigen (CEA) values increased with the advance of cancer and decreased after operation in all stages.

Serum CEA values correlated with the blocking index, but not with the cytotoxicity index.