

悪性腫瘍患者における 細胞性免疫応答に関する研究

第 1 編

原発性肺癌患者における白血球遊走阻止試験について

岡山大学医学部第2内科学教室（主任：木村郁郎教授）

寺 尾 誠 也

Key word : leukocyte migration inhibition test
primary lung cancer
3 M KCl extracts

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。原発性肺癌患者においても、いわゆる非特異的細胞性免疫および体液性免疫能に関する報告は散見されるが^{1, 2)}、腫瘍関連抗原に対する特異的免疫応答は現在までに十分検討されているとはいいがたい。今回著者は同種肺癌組織より 3 M KCl 抽出腫瘍関連抗原を作製し、白血球遊走阻止試験 (leukocyte migration inhibition test, 以下 LMIT と略す) を用いて、肺癌患者における特異的免疫応答存在の可能性を検討し、肺癌患者の病態解明の一助として免疫学的アプローチを行った。

対象および方法

第1節 対象

対象は岡山大学第2内科に入院した肺癌患者46名で、いずれの症例も組織診あるいは細胞診により確定診断された症例である。男性36例、女性10例で、年齢は31才から80才で中央値64才であった。組織型別では腺癌13例、扁平上皮癌13例、小細胞癌19例、大細胞癌1例であった。UICCの臨床病期分類ではI期7例、II期5例、III期14例、IV期20例であった。(表1)。

第2節 方法

第1項 3 M KCl 抽出抗原の作製

表1. 対象患者

Histology	Clinical stage				Total
	I	II	III	IV	
Adeno ca	1	0	5	7	13
Squamous ca	4	2	6	1	13
Small cell ca	2	3	3	11	19
Large cell ca	0	0	0	1	1
Total	7	5	14	20	46

腺癌1例、扁平上皮癌1例、小細胞癌1例において、手術にて準無菌的に得られた肺癌原発巣組織より抗原を Meltzer らの方法³⁾に準じて抽出した。すなわち、肺癌原発巣組織を細切し mesh に通し、肺癌細胞を free cell suspension として Hanks 液で3回くり返し洗滌後、3 M KCl 液を 3×10^8 cell/ml の割合で加え 4℃にて24時間攪拌した。ついで $100,000 \times g$ 、1時間遠沈後、上清を回収しリン酸衝液で32時間透析した。再び $100,000 \times g$ 、30分間遠沈したのち、上清を millipore filter (0.45 μm) にて濾過滅菌後、蛋白濃度を 5 mg/ml に調製したのち使用時まで -80℃ に分注保存した。以下抗原を各々、腺癌-Ag、扁平-Ag、小細胞-Ag と略し、正常肺組織より同様に抽出した抗原を正常肺-Ag と略す。

第2項 LMIT

Clausen⁴⁾の開発した agarose plate 法を改良

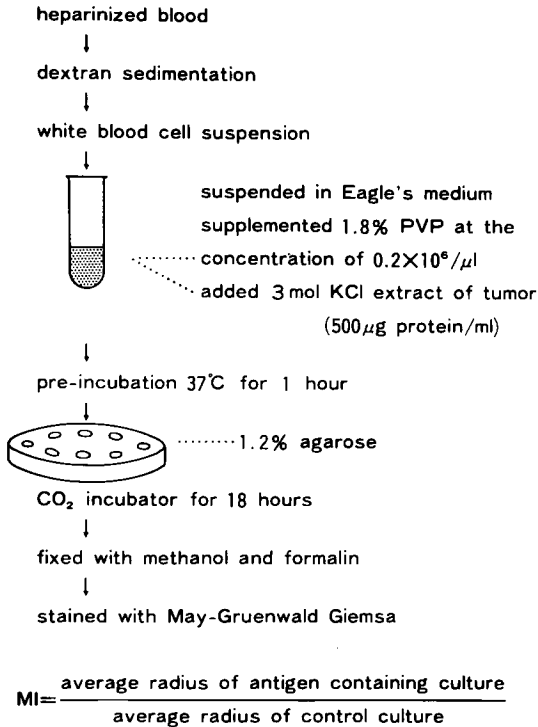


図1. 白血球遊走阻止試験

した Ax ら⁵⁾の方法に従った(図1). 2容の3% agarose (Behringwerke AG)と2容の2倍濃度 Eagle mediumと1容の馬血清を混じて、20%馬血清を含む1.2% agarose Eagle 溶液を作製した。この溶液6mlを径60mmのpetri dish (Falcon Co)に流しこみ、冷却後、径3mmのwellを作り agarose plateとした。白血球浮遊液はヘパリン加末梢血に6%デキストランを加え、白血球層を分離し、Hanks液にて3回洗滌し1.8% PVP, ヘパリン10 u/mlを含む Eagle medium に白血球数が $2 \times 10^5 / \mu\text{l}$ となるよう調整浮遊した。白血球浮遊液に抗原を蛋白量にして500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう加え、37°C 60分間反応させた後、その10 μl を agarose plate のwellに注入し、controlとしてHanks液とのみ同様に反応させた細胞をwellに入れ、37°C CO₂ incubatorに静置した。18時間後、メタノールで20分間、さらに40%ホルマリンで24時間固定し、petri dishより agaroseを除去後、pe-

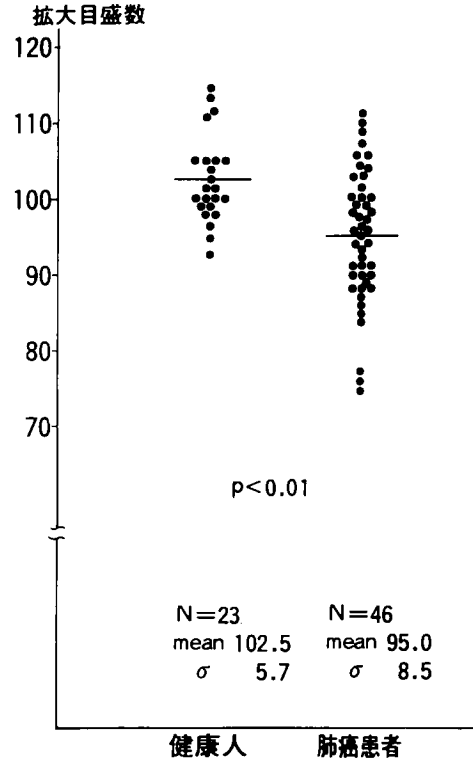


図2. spontaneous migration

tri dish 底面に遊走固定された白血球を May-Giemsa 染色後、拡大鏡で遊走面積を測定し、抗原非添加培養の平均遊走面積の比を migration index (以下 M.I. と略す)として算定した。

結 果

健康人23名、肺癌患者46名において、抗原非添加群における well よりの平均遊走距離を用いて spontaneous migrationの検討を行った。遊走距離は拡大目盛数にて表わした。健康人の spontaneous migration は 102.5 ± 5.7 (平均 \pm 標準偏差, n=23), 肺癌患者では 95.0 ± 8.5 (n=46) であり、健康人に対し肺癌患者において有意 (p < 0.01) の低下が認められた(図2)。

次いで前述の如く作製した3種類の3MKCl抽出抗原を用いて正常健康人12名につき LMIT を施行した。腺癌-Agを使用した場合の M.I. は 0.96 ± 0.08 , 扁平-Ag では 0.96 ± 0.08 , 小細胞

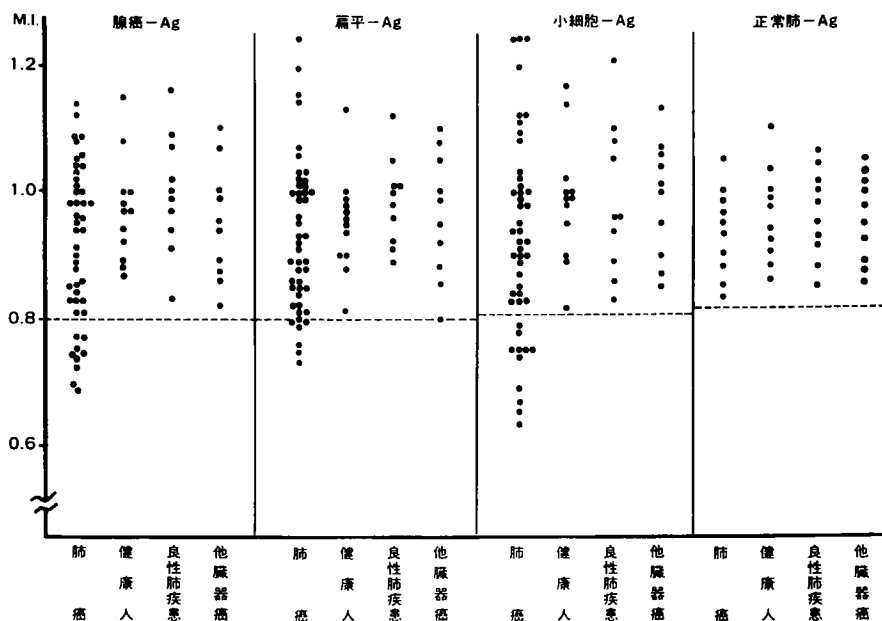


図3. 各種疾患における LMIT

-Ag では 0.99 ± 0.09 であった。そこで平均値より2標準偏差を減じた $0.80, 0.80, 0.81$ 以下を各々の抗原による LMIT 陽性例と判定した。図3のごとく肺癌患者46例のM.I.は腺癌-Agで 0.89 ± 0.18 、扁平-Agで 0.93 ± 0.13 、小細胞-Agで 0.89 ± 0.20 を示し、LMIT 陽性症例は、腺癌-Agで9例(19%)、扁平-Agで7例(15%)、小細胞-Agで11例(24%)であり小細胞-Agに最も陽性率が高かった。良性肺疾患患者10例、他臓器悪性腫瘍患者10例においては全例陰性であった。また、正常肺-Agを用いた検索では肺癌患者、良性肺疾患患者、他臓器悪性腫瘍患者の10例において陰性を示した。

肺癌患者を組織型別に検討すると(表2)、扁

平上皮癌患者にいずれの抗原においても陽性例が多かった。患者の組織型と抗原の組織型を一致させて検討すると陽性率は腺癌で13例中2例(15%)、扁平上皮癌で13例中2例(15%)、小細胞癌では19例中4例(21%)と一致率は低く、組織特異性は認められなかった。

UICCの臨床病期別に陽性率を検討すると(表3)、I、II期の限局期症例12例では腺癌-Agに対して4例(33%)、扁平-Agに対して3例(25%)、小細胞-Agに対して5例(41%)に陽性を示した。一方III、IV期の進展期症例34例では腺癌-Agに対して5例(14%)、扁平-Agに対して4例(11%)、小細胞-Agに対しては6例(17%)に陽性を示し、いずれの抗原におい

表2. 組織型による LMIT 陽性率

	症例数	腺癌-Ag	扁平-Ag	小細胞-Ag
Adeno ca	13	15%	0%	15%
Squamous ca	13	38%	15%	38%
Small cell ca	19	10%	26%	21%
Large cell ca	1	0%	0%	0%

表 3. 臨床病期による LMIT 陽性率

	症例数	腺癌-Ag	扁平-Ag	小細胞-Ag
Stage I	7	28%	14%	42%
Stage II	5	40%	40%	40%
Stage III	14	7%	7%	14%
Stage IV	20	20%	15%	20%
Total	46	19%	15%	24%

表 4. TNM 分類による LMIT 陽性率

	症例数	腺癌-Ag	扁平-Ag	小細胞-Ag
T ₁	4	50%	25%	50%
T ₂	25	24%	20%	32%
T ₃	17	5%	5%	5%
N ₀	9	27%	11%	11%
N ₁	18	14%	16%	16%
N ₂	14	0%	21%	28%
N _x	5	0%	0%	20%
M ₀	27	18%	14%	25%
M ₁	19	21%	15%	21%

表 5. 各種皮膚反応と LMIT 陽性率

	No.	腺癌-Ag	扁平-Ag	小細胞-Ag
PPD (+)	32	19%	12%	31%
(-)	12	25%	16%	8%
PHA (+)	24	25%	20%	25%
(-)	20	15%	10%	5%
DNCB(+)	12	33%	25%	33%
(-)	18	5%	5%	27%

でも、進展期症例に比して限局期症例において高い陽性率が得られた。続いて TNM 分類において各々の因子と LMIT 陽性率の関係を検討した(表 4)。T factor においては T₁ 症例 4 例中腺癌-Ag に対しては 2 例(50%)、扁平-Ag に対して 1 例(25%)、小細胞-Ag に対しては 2 例(50%)陽性を示し、T₂ 症例 25 例では腺癌-Ag に対して 6 例(24%)、扁平-Ag に対して 5 例(20%)、小細胞-Ag に対しては 8 例(32%)陽性を示し、T₃ 症例 17 例では腺癌-Ag、扁平-Ag、小細胞-Ag いずれの抗原に対して

も 1 例(5%)陽性を示したのみであった。T factor では症例数のばらつきはあるが T₁>T₂>T₃ の順に陽性率が高かった。N factor では特に傾向が認められなかった。M factor でも M₀ 群、M₁ 群では差が認められなかったが、さらに転移臓器の数で検討すると 1 臓器転移の 11 例では腺癌-Ag に 2 例(18%)、扁平-Ag に 3 例(27%)、小細胞-Ag に 2 例(18%)陽性を示した。2 臓器転移の 4 例では各抗原に陽性例なく、3 臓器転移の 4 例では小細胞-Ag に 1 例陽性を示した。次に各種皮膚反応と LMIT 陽性率の関係を

みると(表5), PPD 皮膚反応陽性群と陰性群の間には差が認められなかった。PHA 皮膚反応と DNCB 皮膚反応については各々の陽性群

において陰性群に比して高い LMIT 陽性率がみられたが、有意差は認められなかった。

化学療法による M.I. の変動をみると、治療後に陽性例が陰性化し、M.I. が上昇する傾向が認められた。また再発時には陽性化する症例も存在した(図4)。

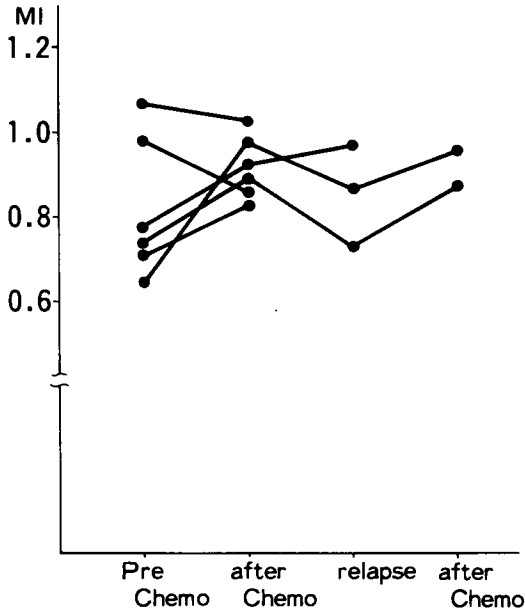


図4. 治療による MI の変動

ついで LMIT と生存期間との関連について検討した(図5), LMIT 陽性に組織特異性が認められなかったことから、1種類以上の抗原に対し陽性を示した例を LMIT 陽性群、いずれの抗原に対しても陰性であった例を LMIT 陰性群とすると、生存期間の中央値は陽性群で9.5ヶ月、陰性群で5.0ヶ月であり、陰性群に比して陽性群において生存期間の延長が認められた。

抽出抗原液中の CEA 濃度を測定すると、腺癌-Ag では465ng/ml, 扁平-Agでは94ng/ml, 小細胞-Agでは109ng/mlであり、腺癌-Ag が特に高値を示したが LMIT 陽性率との間に関連性を認めなかった。

考 案

動物の癌細胞に特異抗原が存在し、担癌宿主がこれに対して免疫学的に反応することは広く認められている事実であるが⁶⁾、ヒト癌につい

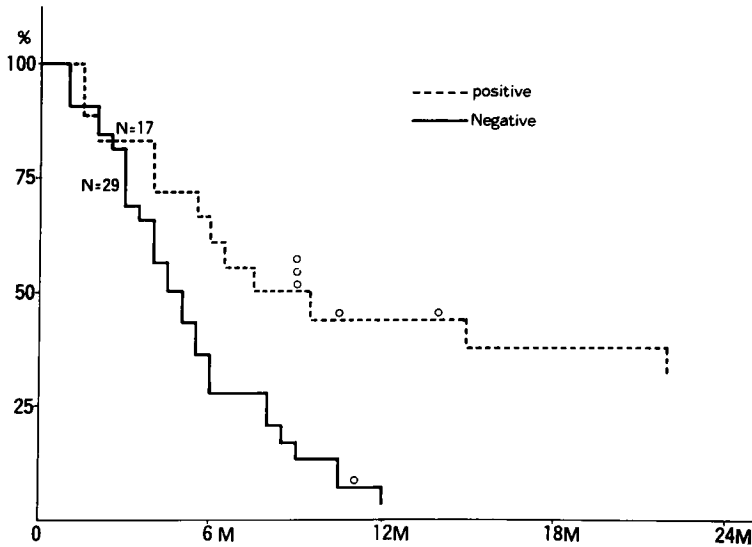


図5. LMIT according to survival time (from onset of therapy)

ても腫瘍特異(移植)抗原の存在が間接的に扱われている^{7,8)}。このような抗原によりひきおこされる宿主の免疫反応としては体液性抗体産生、遅延型アレルギー反応、移植片拒否反応などがある。近年種々の免疫学的方法を用いて担癌患者の免疫能が測定され、癌患者では一般に細胞性免疫能の低下が証明されている⁹⁾。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

部は宿主の悪液質に関連する代謝異常により惹起されている可能性もあり、この点で臨床レベルにおいても担癌宿主の癌特異的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きと考えられる。さらに、癌の免疫療法が究極的には抗腫瘍効果を期待する以上、癌特異的免疫の検討は単に治療効果判定上の指標だけでなく、免疫強化療法としての機序を説明するうえにも重要であると考えられる。今回はその試みの一つとして、LMIT を用いて原発性肺癌患者の 3 M KCl 抽出抗原に対する免疫応答を検討した。

LMIT は Sjöberg と Bendixen¹⁰⁾が多核白血球を indicator cell とするガラス毛細管法を用いて、本法が遅延型アレルギーを反映すると報告して以来、細胞性免疫能の検索に応用されてきた。さらに Clausen は Carpenter¹¹⁾の agar gel 法を応用し、PPD 反応陽性のヒト白血球を PPD と共に agarose plate 中に入れて培養すると白血球の遊走が抑制されることを示し、この方法も遅延型アレルギーを反映するとした。Axらはこれに改良を加え、癌患者白血球と可溶抗原を用いて担癌宿主の細胞性免疫能の証明を試みた。本法は従来の毛細管法に比較して採血量と抗原量が少なくすむこと、リンパ球と indicator cell である多核白血球が同一個体より得られること、手段が簡便で遊走野の境界が鮮明であること、再現性が高いことなどのいくつかの利点がある。

抗原抽出法としては、sonication 法、ホルマリン法、過塩素酸抽出法等がある。Faiferman¹²⁾は卵巣癌における LMIT を検討し、いくつかの抗原抽出法の中で 3 M KCl を用いる方法が最もすぐれていたと報告している。3 M KCl 抽出抗原を用いた細胞性免疫能の検討については、Gutterman¹³⁾は白血病におけるリンパ球幼若化反応について、McCoy¹⁴⁾は悪性黒色腫、乳癌における遅延型皮膚過敏反応について報告し、腫瘍関連抗原に対する細胞性免疫能の存在を示している。そこで著者は 3 M KCl 抽出抗原を用いて、同種の系で原発性肺癌における LMIT を検討した。内科領域においては自己肺癌抽出抗原を得ることが困難であり、ま

た治療前に検索する必要がある、手術による影響をも考慮に入れることになれば、自己抗原を用いる検索は更に困難である。同種肺癌抽出抗原を用いると、HLA 抗原や臓器関連抗原の関与が考えられるので、それぞれに対照をおいて検討した。また転移部位からの抽出抗原は抗原性が低いという報告¹⁶⁾がみられるので抗原は原発部位の癌組織を用いた。LMIT 陽性を示した肺癌患者は約 20% と少数例であったが、肺感染症を含む良性肺疾患患者、他臓器悪性腫瘍患者はいずれも陰性を示し、また正常肺-Ag を用いての検索にても陽性例がなく、腫瘍関連抗原の存在が示唆された。さらに組織型に関連なく反応し、組織型による特異性は認められなかった。著者の成績は諸家の報告より陽性率が低い。この点については LMIT における判定基準が報告者により異なること¹⁷⁾、agarose plate 法と capillary tube 法との相異、癌の種類の違いなどを考慮に入れる必要があると考えられる。

UICC の臨床病期別に検討すると進展期に比して限局期に高い陽性率を得、悪性黒色腫における McCoy¹⁴⁾の報告、及び Black¹⁸⁾、O'Toole¹⁹⁾の報告と一致する結果を得た。しかし、進展期に著明に強い反応を示すという Boddie¹⁷⁾、Elias²⁰⁾、Mazulan²¹⁾らの報告もあり、また臨床病期とは関連を示さないという Roth¹⁵⁾、Guillow²²⁾、Segall²³⁾らの報告もあり一定していない。

著者の成績では比較的高い陽性率を示したのは、宿主の全身状態が良好な限局期と再発時あるいは進展期であっても転移が一部に限局している場合であり、陰性を示したものは腫瘍の増大した進展期、あるいは化学療法の影響により宿主が障害されたとき、あるいは宿主の全身状態が良好であっても腫瘍が消失している場合であった。従って、LMIT が陽性を示すためには、至適量の抗原が存在し、これと反応する宿主の一般免疫能も良好に保たれていること、つまり lymphokine の一種である leukocyte inhibitory factor の産生が低下していないことが必須であると考えられた。

各種皮膚反応との関連では皮膚反応陽性群に LMIT 陽性率が高かった。これは担癌宿主の一

般免疫能が良好である場合に LMIT 陽性率が高いことを裏付けている。しかし、両者の間に明らかな相関性が認められなかったのは免疫担当細胞膜上の非特異的抗原と腫瘍関連抗原を認知する部分が異なっているため²⁴⁾かもしれない。

担癌患者における spontaneous migration の検討では顆粒球、単球等の走性低下が報告されている²⁵⁾。著者の成績においても肺癌患者において、健康人に比して有意に spontaneous migration の低下が認められた。今回は白血球全体を用いての検討であるが、多核白血球と白血球全体との migration がほぼ相関するという報告²⁶⁾もあり、実際 migration area の観察で周囲は顆粒球が占め、中心部にリンパ球がみられた。また関与する細胞の絶対数の点からみても spontaneous migration 低下の主体は顆粒球であると考えられる。

最後に生存期間との関連を検討したが、LMIT 陽性患者群では LMIT 陰性群に比して生存期間の延長がみられた。しかし、LMIT と予後の相関を論じた報告はほとんどなく、臨床病期のばらつき、治療の相異、performance status などの背景因子の関与も十分考慮に入れる必要があり、今回の成績からはこれらの因子を加味

した結論は困難かと考えられた。

結 語

原発性肺癌患者46例について腺癌-Ag, 扁平-Ag, 小細胞-Ag の3種類の 3 M KCl 抽出抗原を用いて LMIT を施行し、肺癌患者における細胞性免疫応答を検討し、次の結果を得た。

1) 腺癌-Ag にて9例(19%), 扁平-Ag にて7例(15%), 小細胞-Ag では11例(24%)の患者が陽性を示し、同種腫瘍細胞に対する免疫応答が示され、腫瘍関連抗原の存在が示唆された。

2) 臨床病期では、進展期症例に比して限局期症例に高い陽性率が認められた。

3) 白血球の spontaneous migration では健康人に対して肺癌患者において有意 ($p < 0.01$) の低下が認められた。

4) LMIT と生存期間との関連では LMIT 陽性群において、陰性群に比して生存期間の延長を認めた。

稿を終るにあたり御指導御校閲をいただいた木村郁郎教授に深謝し、終始御助言いただいた藤井昌史博士に感謝の意を表します。

参 考 文 献

1. Brugarolas, A and Takita, H.: Immunologic status in lung cancer. *Chest*. **64**, 427—430, 1973.
2. Morton, D.L., Holmes, E.C. and Golub, S.H.: Immunologic aspects of lung cancer. *Chest*. **71**, 640—643, 1977.
3. 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.
4. Clausen, J.E.: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leukocytes in agarose medium. *Acta Allerg (Kobenhavn)*, **26**, 56—80, 1971
5. Ax, W. and Chr, T.: Assay of leukocyte migration inhibition under agarose. *Behring Inst. Mitt.* **54**, 72—80, 1974.
6. Kikuchi, K., Kikuchi, Y., Phillips, M.E. and Southam, C.M.: Tumor-specific, cell-mediated immune resistance to autochthonous tumors. *Cancer Res.* **32**, 516—521, 1972.
7. Hsu, C.S. and Morgan, E.R.: Detection of B-lymphocyte (B-cell) associated antigens on human leukemic lymphocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* **70**, 741—747, 1978.
8. Shiku, H., Takahashi, T. and Oettgen, H.F.: Cell surface antigens of human malignant melanoma. II. Serological typing with immune adherence assays and definition of two surface antigens. *J. Exp. Med.* **144**, 873—881, 1976.

9. 菊池浩吉, 内沢公伸: 細胞性免疫の臨床的意義: がんと免疫, 総合臨床, 26: 2874—2882, 1977.
10. Sjöborg M. and Bendixen, G.: Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity. *Acta Med. Scand.* 181, 247—252, 1967.
11. Carpenter, R.R., Barsales, P.B. and Ganchan, R.P.: Antigen-induced inhibition of cell migration in agar gel, plasma clot, and liquid media. *J. Reticuloendothel. Soc.* 5, 472—483, 1968.
12. Faiferman, I., Gleicher, N., Cohen, C.J. and Koffler, D.: Leukocyte migration in ovarian carcinoma: Comparison of inhibitory activity of tumor extracts. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 1583—1597, 1977.
13. Gutterman, J.U., Mavligit, G., McCredie, K.B., Bodey, G.P., Freireich, E.J. and Hersh, E.M.: Antigen solubilized from human leukemia: Lymphocyte stimulation. *Science.* 1, 1114—1115, 1972.
14. 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.
15. Roth, J.A., Slocum, H.K., Pellerino, M.A., Holmes, E.C. and Reisfeld, R.A.: Purification of soluble human melanoma-associated antigens. *Cancer Res.* 36, 2340—2364, 1976.
16. Cannon, G.B., McCoy, J.L. and Connor, R.B.: Use of the leukocyte migration inhibition assay to evaluate antigenic differences in human breast cancers and melanomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 969—978, 1978.
17. Boddie, J.A.W., Urist, M.M., Chee, D.O., Holmes, E.C. and Morton, D.L.: Detection of human tumor-associated antigens by the leukocyte migration in agarose assay. *Int. J. Cancer,* 18, 161—167, 1976.
18. Black, M.M. and Leis, H.P.: Cellular responses to autologous breast cancer tissue. *Cancer,* 28, 263—273, 1971.
19. O'Toole, C., Perlmann, P., Unsgaard, B., Moberger, G. and Edsmyr, F.: Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma. I. Correlation to clinical stage and radiotherapy. *Int. J. Cancer,* 10, 77—91, 1972.
20. Elias, E.G., Elias, L.L., Didolkar, M.S. and Hebel, J.R.: Cellular immunity in patients with colorectal adenocarcinoma measured by autologous leukocyte migration inhibition. *Cancer,* 40, 687—692, 1977.
21. Mazulan, R., Mujagic, H., Malenica, B. and Silobrcic, V.: *In vitro* detection of cellular immunity to melanoma antigens in man by the monocyte spreading inhibition test. *Int. J. Cancer,* 17, 14—20, 1976.
22. Guillow, P.J. and Giles, G.R.: Inhibition of leukocyte migration by tumor-associated antigens of the colon and rectum. *Gut,* 14, 733—738, 1973.
23. Segall, A., Weiler, O., Genin, J., Lacour, J. and Lacour, F.: *In vitro* study of cellular immunity against autochthonous human cancer. *Int. J. Cancer,* 9, 417—425, 1972.
24. Vincent, P.C. and Gunz, F.W.: Control of lymphocyte level in the blood. *Lancet,* 2, 342—344, 1970.
25. McCormack, R.T., Nelson, R.D., Bloomfield, G.D., Quie, P.G. and Brunning, R.D.: Neutrophil function in lymphoreticular malignancy. *Cancer,* 44, 920—926, 1979.
26. Nelson, R.D., McCormack, R.T. and Fiegel, V.D.: Chemotaxis of human leukocyte under agarose in leukocyte chemotaxis: methods, physiology, and clinical implications, eds, Gallin J.L., and Quie, P.G., Raven Press, New York, 25—42, 1978.

Studies on cell-mediated immunity in patients with malignant tumor.

**Part 1. Leukocyte migration inhibition test in patients
with lung cancer.**

Seiya TERAO

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,

Okayama, 700, Japan.

(Director: Prof. I. Kimura)

Leukocyte migration inhibition tests (LMIT) were performed in 46 patients with primary lung cancer. The three kinds of antigens were allogeneic 3 M KC1 extracts of lung cancer tissues obtained from patients with adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and small cell carcinoma. Nine of the 46 patients (19%) had positive LMITs using adenocarcinoma antigen, seven patients (15%) with squamous cell carcinoma antigen and eleven patients (24%) with small cell carcinoma antigen. LMITs were all negative in 10 patients with benign lung disease, 10 patients with non-pulmonary cancer and 12 healthy volunteers.

These findings suggested that some patients with lung cancer had cell-mediated immunity against a lung tumor-associated antigen not restricted to a given histologic type of lung cancer. Further study on the relationship between LMIT and the clinical stage of lung cancer revealed that the percentage of positive LMITs in patients with localized disease was higher than in patients with extensive disease.