

自家腫瘍抽出膜蛋白リンパ球混合培養液 による自家皮内反応

岡山大学医学部第1外科学教室（主任：折田薫三教授）

岩 藤 知 義

（昭和58年3月26日受稿）

Key words：腫瘍抗原，末梢リンパ球，
皮内反応，胃癌，
大腸癌

結 言

癌患者の免疫能，とくに細胞性免疫能を適確に把握することは免疫療法を行う上で重要なことである。その際，癌に特異的な反応を見出すことが理想的であるが，免疫反応を惹起すべき腫瘍抗原の存在は間接的には証明されているものの，性状についてはほとんど解明されていない。人癌における抗腫瘍性細胞性免疫反応の検出法は *in vivo* と *in vitro* に大別されるが，*in vitro* の方法についてすでに種々の報告がなされている。今回は *in vivo* の方法，とくに癌細胞抽出物による遅延型皮膚反応（delayed cutaneous hypersensitivity reaction）を中心として研究をすすめた。非特異的な皮内反応，たとえば PPD（purified protein derivative），PHA（phytohemagglutinin），DNCB（dinitrochlorobenzene）などを抗原として用いる皮内反応は，癌患者では著明に低下していることが知られている^{1,2)}。これに対し，癌に対する宿主の特異的免疫反応を知る目的で，人癌組織抽出物による皮内反応が検討されつつある。L. Fass³⁾，B.G. Leventhal ら⁴⁾は腫瘍抗原により免疫されている担癌生体は，自家癌抽出液の皮内接種に対し遅延型皮膚反応（DCHR）を呈することを報告している。腫瘍抗原の抽出法として，凍結融解低調抽出法³⁾，超音波法²⁰⁾，3MKCl 法⁵⁾，DOC（deoxycholate）法⁸⁾などがあるが，黒瀬^{6,7)}によると DOC による可溶性抗原抽出法が 3MKCl 法に比し優れており，人大腸癌，胃癌組織の DOC

抽出膜蛋白の皮内反応で，胃癌症例で陽性率が高く，臨床経過とよく相関していると報告している。本報告では，胃癌，大腸癌における癌組織の DOC 抽出膜蛋白による皮内反応を行う際，反応の感度を上げる目的で，腫瘍抽出膜蛋白と対応の癌患者末梢リンパ球を前もって混合培養し，その細胞浮遊液を自家接種する方法を開発し，優れた成績を取めたので報告し，併せて他の免疫に関する諸因子との相関をも報告する。

対象および実験方法

1. 対象

対象症例は，岡山大学第1外科教室および関連病院において，昭和56年2月より昭和57年8月までの1年半の間に手術が施行され，切除標本より実験に必要な量の組織片の採取が可能であった（早期癌は除外する）胃癌28例，大腸癌25例を対象とした。

2. 可溶性腫瘍抗原の抽出と精製（図1）

胃癌，大腸癌の手術直後，摘出された手術標本より無菌的に，一定量の腫瘍組織および正常粘膜を採取する。抗原の抽出法は入江の方法⁸⁻¹⁰⁾に従った。腫瘍組織より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（PH 7.5，バルビツール酸ナトリウム 0.375g，バルビツール酸 0.575g，塩化ナトリウム 85.0g，aq 1000ml）（以下 VB と略）で 3～4 回遠心洗浄（500×g，10分）する。さらに同様に 800×g，10分間遠心し，細胞をパックする。パックした細胞 10ml につき，冷えた VB 28ml，0.01M 塩化

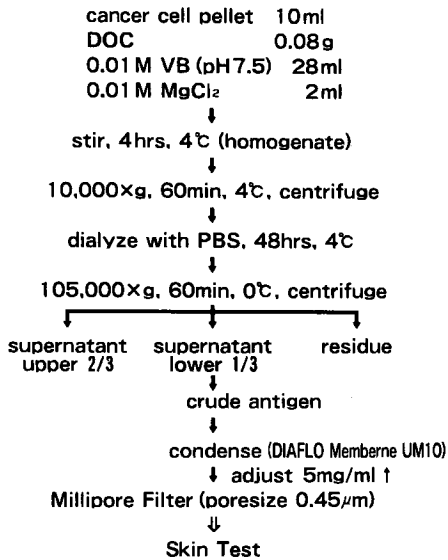


図1. Extraction of soluble tumor specific antigen by deoxycholate (DOC)

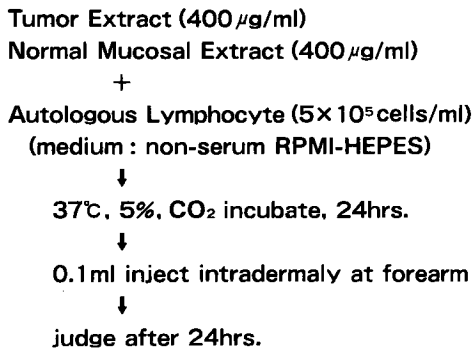


図2. Skin test using mixed culture solution of tumor membrane extracts and lymphocytes

マグネシウム 2 ml を細胞とともに三角コルペンに入れ、陰イオン性界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウム (sodiumdeoxycholate, DOC) を 0.08g 混ぜる。さらにマグネチックスターラーを用いて、4 時間かく拌する。次に 10,000×g, 60分間遠心し、上清を滅菌した透析用チューブ (Visking cellulose tube) に入れ、2 日間透析用リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.5) で透析する。以上の操作はすべて 4 °C の低温

下にて行う。次に 105,000×g, 60分, 0 °C で超遠心機にかけた後、上清の上 2/3 を静かに捨て、下 1/3 (Fluffy 分画と Pellet) を腫瘍抗原として使用した。コントロールとして使用する正常組織は、摘出標本の腫瘍部位より離れた部位の正常粘膜組織のみを採取し、粘膜下層や血球成分を除き、同様の方法で膜蛋白を抽出した。操作はすべて無菌的に行った。抽出した腫瘍抗原および正常粘膜抽出蛋白の蛋白濃度は Folin-Lowry 法により測定した。抽出蛋白は限外濾過器 (Amicon Fareast Ltd) で窒素圧下に UM-10 membrane (DIAFLO) を通し、5 mg/ml 以上に濃縮し、0.45 μ filter (Millipore Corp.) を通して滅菌し、皮内反応に使用した。

3. 末梢リンパ球の調整

自家末梢血を Ficoll-Conray (比重 1.077) による比重遠沈法¹¹⁾にてリンパ球を分離した後、RPMI 1640 培養液に 2 mM HEPES を加えた溶液にて洗浄し、リンパ球数を算定した。

4. 腫瘍抗原リンパ球混合培養液による皮内反応 (図 2)

腫瘍抗原および正常粘膜抽出蛋白と自家末梢血リンパ球を各々最終濃度 400 μg/ml, 5 × 10⁵ 個/ml となるように混合し、炭酸ガス培養器 (5 % CO₂, 37°C) 内で 24 時間培養した。なお培養液は血清無添加 RPMI 1640 に 2 mM HEPES を加えたものを使用した。この際同時に、混合感染をチェックするために、プラスチック製組織培養滅菌シャーレに寒天培地 (5 % Purified Agar, DIFCO Lab., Detroit) を作り、腫瘍抗原、正常粘膜抽出蛋白とリンパ球の混合培養液を滴下し 24 時間培養後、感染のないことを確認の上、皮内反応を行った。皮内反応は腫瘍抗原とリンパ球混合培養浮遊液 0.1ml およびコントロールとしての正常粘膜抽出蛋白とリンパ球混合培養浮遊液 0.1ml を各々、患者の前腕内側皮内に接種し、反応の最も強い 24 時間後の発赤斑の長径と短径を計測した。腫瘍抗原の反応がコントロールのそれを明らかに上回る場合を陽性とした。

5. 皮内反応の Dose Response

大腸癌において腫瘍抗原の蛋白濃度を各々 50, 100, 200, 400, 800, 1600 μg/ml とした時の

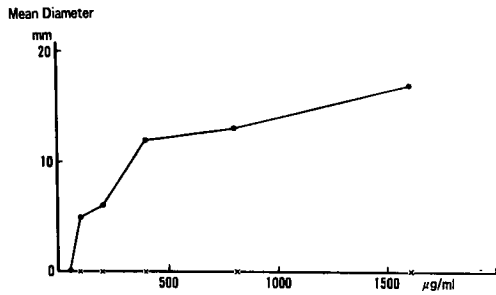


図3. Dose response of skin test using mixed culture solution of autologous tumor membrane extracts and lymphocytes

表1. Skin tests using mixed culture solution of autologous tumor membrane extracts and lymphocytes

	Positive	Negative	Total
Stomach	19 (67.9%)	9 (32.1%)	28
Colon & Rectum	13 (52.0%)	12 (48.0%)	25

表2. Relationship between PPD skin test and skin test using mixed culture solution of autologous tumor membrane extracts and lymphocytes

	Autologous Extracts Skin Test	
	Positive	Negative
Stomach PPD (+)	6	2
Stomach PPD (-)	8	4
Colon & Rectum PPD (+)	2	5
Colon & Rectum PPD (-)	3	3

dose response を検討し、至適抗原濃度を求めた。

6. PPD 皮内反応

一般診断用精製ツベルクリン (PPD, 日本ビーシー製造 K.K.) 0.05µg を含む溶液0.1ml を前腕内側皮内に接種し、型のごとく48時間後に判定した¹²⁾。

7. 血清 CEA 値の測定法

Sandwich 法と Z-gel 法にて測定し、Sandwich 法では男性は 5.9ng/ml 以上、女性は 4.0

表3. Relationship between skin tests and serum CEA level

	Autologous Extracts Skin Test	
	Positive	Negative
Stomach CEA High	2	1
Stomach CEA Normal	13	4
Colon & Rectum CEA High	5	4
Colon & Rectum CEA Normal	4	5

表4. Relationship between skin tests and clinical stage

stage	I	II	III	IV	V
Stomach Positive	3 (75%)	5 (62.5%)	7 (77.8%)	4 (57.1%)	
Stomach Negative	1 (25%)	3 (37.5%)	2 (22.2%)	3 (42.9%)	
Total	4	8	9	7	
Colon & Rectum Positive	4 (80%)	2 (100%)	3 (42.9%)	0 (0%)	2 (40%)
Colon & Rectum Negative	1 (20%)	0 (0%)	4 (57.1%)	4 (100%)	3 (60%)
Total	5	2	7	4	5

表5. Relationship between skin tests and histological classification

	Positive	Negative	total
Stomach Tubular adenocarcinoma well differentiated type (tub ₁)	2 (100%)	0 (0%)	2
Stomach Tubular adenocarcinoma moderately differentiated type (tub ₂)	6 (85.7%)	1 (14.3%)	7
Stomach Poorly differentiated adenocarcinoma	4 (36.4%)	7 (63.6%)	11
Stomach Signet-ring cell carcinoma	5 (100%)	0 (0%)	5
Stomach Mucinous adenocarcinoma	1 (50%)	1 (50%)	2
Stomach Malignant lymphoma	1 (100%)	0 (0%)	1
Colon & Rectum Well differentiated adenocarcinoma	4 (40%)	6 (60%)	10
Colon & Rectum Moderately differentiated adenocarcinoma	7 (63.6%)	4 (36.4%)	11
Colon & Rectum Poorly differentiated adenocarcinoma	1 (33.3%)	2 (66.7%)	3

ng/ml 以上、Z-gel 法では 2.5ng/ml 以上を高値とした。

8. 摘出臓器の臨床病理学的検討

摘出臓器の病理組織学的分類および進行程度 (stage) 分類を、胃癌取扱い規約 (1979年5月改訂第10版)、大腸癌取扱い規約 (1980年3月改訂第2版) に基づいて行った。

実験結果

1. 皮内反応の Dose Response (図3)

大腸癌の腫瘍抗原リンパ球混合培養浮遊液による皮内反応の dose response は抗原濃度 400 $\mu\text{g/ml}$ のところで plateau に達した。400 $\mu\text{g/ml}$ を皮内反応の至適抗原濃度として以後使用した。

2. 腫瘍抗原リンパ球混合培養液による皮内反応 (表 1)

胃癌 28 例, 大腸癌 25 例における腫瘍抗原リンパ球混合培養液による皮内反応の結果, 胃癌では 19 例 (67.9%) が陽性, 9 例 (32.1%) が陰性であった。大腸癌では 13 例 (52.0%) が陽性, 12 例 (48.0%) が陰性であった。陽性率は胃癌にやや高い傾向を認めた。

3. 腫瘍抗原リンパ球混合培養液による皮内反応と PPD 皮内反応 (表 2)

胃癌 20 例中, 腫瘍抗原リンパ球混合培養液による皮内反応陽性例は 14 例であり, このうち 6 例が PPD 皮内反応陽性, 8 例が陰性であり, 腫瘍抗原リンパ球混合培養液皮内反応の陰性例は 6 例であり, このうち 2 例が PPD 皮内反応陽性, 4 例が陰性であった。大腸癌症例では 13 例中, 腫瘍抗原リンパ球混合培養液皮内反応陽性例は 5 例であり, このうち 2 例が PPD 皮内反応陽性, 3 例が陰性であり, 腫瘍抗原リンパ球混合培養液皮内反応陰性例は 8 例であり, このうち 5 例が PPD 皮内反応陽性, 3 例が陰性であり, 両皮内反応間に相関関係は認められなかった。

4. 腫瘍抗原リンパ球混合培養液による皮内反応と血清 CEA 値との相関 (表 3)

胃癌 20 例中, 腫瘍抗原リンパ球混合培養液皮内反応陽性例は 15 例であり, このうち CEA が高値を示すもの 2 例, 正常値を示すもの 13 例であり, 皮内反応陰性例は 5 例であり, CEA 高値を示すものは 1 例, 正常値を示すものは 4 例であった。大腸癌症例では, 18 例中皮内反応陽性例は 9 例であり, このうち CEA 高値を示すものは 5 例, 正常値を示すものは 4 例であり, 皮内反応陰性例は 9 例あり, CEA 高値を示すものは 4 例, 正常値を示すものは 5 例であった。いずれも皮内反応と血清 CEA 値の間に相関を認めなかった。

5. 腫瘍抗原リンパ球混合培養液による皮内反応と臨床病理 (表 4, 表 5)

自家腫瘍抽出抗原リンパ球混合培養液による皮内反応と癌の進行程度 (stage) 分類を検討してみると, 胃癌症例の陽性例は, stage I では 4 例中 3 例 (75.0%), stage II では 8 例中 5 例 (62.5%), stage III では 9 例中 7 例 (77.8%), stage IV では 7 例中 4 例 (57.1%) であり, stage 間に特別な傾向を示さなかった。また大腸癌症例の陽性例は, stage I では 5 例中 4 例 (80.0%), stage II では 2 例中 2 例 (100%), stage III では 7 例中 3 例 (42.9%), stage IV では 4 例中 0 例 (0%), stage V では 5 例中 2 例 (40.0%) であり, stage I, II に高く, stage III, IV, V に低い傾向を認めた。

次に皮内反応と腫瘍の組織分類を比較検討した。胃癌では Tubular adenocarcinoma (tub₁), Malignant lymphoma, Signet-ring cell carcinoma で症例数は少いが, 皮内反応は全例陽性を示した。また Tubular adenocarcinoma (tub₁) は 2 例中 2 例 (100%), Tubular adenocarcinoma (tub₂) は 7 例中 6 例 (85.7%), Poorly differentiated adenocarcinoma は 11 例中 4 例 (36.4%) の陽性率を示し, 低分化になるにつれて陽性率も低下した。大腸癌症例では, Well differentiated adenocarcinoma は 10 例中 4 例 (40.0%), Moderately differentiated adenocarcinoma は 11 例中 7 例 (63.6%), Poorly differentiated adenocarcinoma は 3 例中 1 例 (33.3%) の陽性率を示し, Moderately differentiated adenocarcinoma で高い陽性率を示したが, ほぼ胃癌と同様の傾向であった。

考 察

人の腫瘍免疫についても, 動物癌の場合と同様に, 癌細胞には正常細胞にない特異抗原が存在すると考えられ, Thomas¹³⁾ や Burnet¹⁴⁾ の提唱する発癌に対する自然防御機構あるいは“免疫監視機構 (immune surveillance system)” という概念下で, 癌に対して担癌宿主が免疫応答していると認識されている。腫瘍免疫は本来自家腫瘍抗原とその宿主個体間の免疫応答を指し, この免疫反応を惹起する抗原を腫瘍特異抗原 (tumor specific antigen, TSA) と定義づけられているが, 研究の進展にともない, この中

にウイルス性抗原、胎児性抗原、正常細胞抗原(同種抗原や異種抗原)、分化抗原などが含まれることが明らかとなり、腫瘍関連抗原(tumor associated antigen, TAA)と呼んだ方が適切となっている。胎児性抗原に関しては、Goldら¹⁵⁾は正常大腸粘膜の抽出液で免疫学的寛容状態にしておいた家兎を大腸癌抽出液で免疫し、前者と反応せず後者とよく反応する抗血清を製作した。この抗血清によって検出される抗原がcarcinoembryonic antigen(CEA)であり、大腸癌、胃癌、膵臓癌など内胚葉系の消化器に発生した腺癌、胎生3~6ヶ月の胎児消化管に存在することが証明された。その後radioimmunoassayによるCEAの定量が可能となり、臨床的に応用されている。陽性例の頻度の高い癌としては、大腸癌、肺癌、膵臓癌、胃癌、乳癌があり、非癌疾患としては、肺気腫、アルコール性肝硬変、潰瘍性大腸炎などでも陽性を呈する。その他、 α -fetoproteinも肝細胞癌、yolk sac tumorの診断に有用になり、最近では膵臓癌に対するpancreatic oncofetal antigen(POA)も検出され、臨床に応用されつつある。

腫瘍細胞の膜表面に存在するとされている腫瘍抗原の抽出法としては、凍結融解低調抽出法³⁾、可溶性抗原抽出法である超音波法²⁰⁾、papain¹⁶⁾など蛋白分解酵素、3MKCL⁵⁾など高張塩溶液、DOC⁸⁾など界面活性剤を用いる方法などがある。3MKCL法が現在最も一般的な方法と考えられ、広範囲の腫瘍細胞に応用されているが、水島ら¹⁷⁾はMCA誘発可移植性線維肉腫KMT-17よりHypotonic salt extraction method, 3MKCL method, DOC methodの3種類の方法で抗原を抽出し、radioisotopic foot pad assayを行った結果、DOC methodが蛋白収量、抗原活性の面で最も優れていると報告している。黒瀬⁶⁾もDOC抽出法の有利な点を指摘している上、DOCは陰イオン性の界面活性剤であるが、48時間の透析ではほぼ完全に除去できるとされている。本実験ではDOC抽出法を採用した。

腫瘍特異抗原(TSA)の検出方法として、動物癌では移植実験が可能であるが、人癌の場合は不可能であるため、in vitroの試験、すなわ

ち腫瘍細胞障害試験(CMC)、白血球遊走阻止試験(LIT)、リンパ球腫瘍細胞混合培養(MLTC)、マクロファージ電気泳動試験(MEMT)などが抗原性の指標として多用されているが、臨床的に手技が繁雑であることが欠点である。In vivoの試験としては遅延型皮膚反応(DCHR)があるが、種々の制約のため、本邦での報告例は非常に少ない。しかし、操作が簡単であり、担癌患者の免疫状態の指標となり得、細胞性免疫能の最も敏感な測定法と考えられている。しかも適当なコントロールをおくことにより、皮内反応の結果の正当性が増すとされている。

腫瘍抗原を皮内に注射すると、ツベルクリン型の遅延型過敏症を呈する。皮内投与の抗原と、その場所に流入してきた対応の感作Tリンパ球の分化増殖とともに、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)をはじめとする各種リンフォカインが産生放出され、その結果として発赤、腫脹が生じて、DCHRが成立するものと考えられている。

癌に対する宿主の免疫能を知る目的で、遅延型皮膚反応が試みられる様になったのは、1958年Brentら¹⁸⁾がモルモットを使用して、同種移植免疫の成立を皮膚反応で示して以後である。Hughesら¹⁹⁾は乳癌、大腸癌、肺癌、胃癌など悪性腫瘍患者50人に対し、各々の腫瘍組織より超音波法により得た抽出液で皮内反応を試み、コントロール(正常組織抽出液)に対する反応が陰性であった33例に癌抽出液を皮内接種すると9例(27%)に陽性であったと報告した。Stewart²⁰⁾は134人の各種悪性腫瘍患者に各々の腫瘍組織をhomogeniseして皮内反応をした結果、35人(26.0%)に陽性であったが、細菌抗原の関与もあるとしている。またFassら³⁾は8人の悪性黒色腫患者に自家抗原で皮内反応をすると、腫瘍が限局している3人は陽性であるが、転移症例ではすべて陰性であったと報告している。Orenら²¹⁾も白血病に対し凍結融解低調抽出法で抗原を抽出し皮内反応をすると、寛解期では陽性、再発すると陰性となる傾向があり、予後については12ヶ月以上生存率をみると、陽性例では63.6%、陰性例では36.8%となり、皮膚反応が病期や予後と相関することを報

告している。また Stewart & Orizaga²²⁾ も 56 人の乳癌患者に皮内反応を施行し、12人(21.4%)に陽性であり、陽性例は陰性例に比し生存率が悪いと報告している。Char ら²³⁾ は急性リンパ性白血病 (ALL) と急性骨髄性白血病 (AML) の患者の自家および他家の幼若球抽出液により皮内反応を試みたところ、他家抗原は自家抗原と同様に反応し、臨床病態とも相関したが、これは共通抗原の存在を表わし、急性白血病の病因をウイルスとすれば矛盾がないと述べている。Wells ら²⁴⁾ は子宮頸癌、Alford ら²⁵⁾ は乳癌についても共通抗原の存在を示唆している。Le venthal ら⁴⁾ は急性白血病に対する皮内反応とリンパ球細胞障害試験、リンパ球混合培養 (MLC) の 3 者を行い相関性をみているが、これら 3 者間に相関性はなく、皮内反応が病態と相関性をもっていると報告している。腫瘍抗原の抗原性は弱く、抗原性を高める努力がなされているが、未分画の超音波破壊物には blocking factor が存在し、皮内反応の反応性を妨げる²⁶⁾ とし、抽出物を各分画に分けて抗原を純粋化しようとする試みがなされている。すなわち Hollinshead らは悪性黒色腫²⁷⁾ において、腫瘍組織を sonication した後、Sephadex G200 で chromatography を通して得た Fraction II をさらに gradient polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にかけて、Sephadex fraction II, PAGE region a にメラノーマ関連抗原があると思われる、この分画による皮内反応陽性率は早期癌で 22 例中 17 例 (77.3%)、進行癌では 19 例中 7 例 (36.8%) であった。またメラノーマ抗原の Sephadex fraction III, PAGE region b は早期乳癌症例の 6 例中 5 例に陽性を示し、メラノーマと乳癌との間に交叉反応を認め、腫瘍特異抗原に加えて組織特異抗原 (tissue specific antihen) の検出の可能性が示唆された。また乳癌組織では Fraction II, Region 2b に腫瘍関連抗原が存在すると思われる、これによる乳癌患者に対する皮内反応では 12 例中 10 例 (83.3%) の陽性率が得られ、コントロールの正常組織抽出液や良性乳腺疾患組織抽出液の Resion 2b による皮内反応は全例陰性であった。また乳癌組織の Resion 2a は子宮癌、卵巣癌患者に対しても

DCHR を惹起し、乳癌患者は良性乳腺組織の Resion 2a に対しても DCHR を呈することより、Resion 2a が組織関連抗原または乳癌、婦人科腫瘍の共通抗原である可能性が示唆されると報告している。Fossati ら²⁹⁾ も 3MKCL 抽出抗原にて乳癌と悪性黒色腫の交叉反応を証明している。

黒瀬⁷⁾ は DOC 抽出抗原による皮内反応で大腸癌では 20 例中 9 例 (4.5%)、胃癌では 25 例中 16 例 (64%) の陽性率を示し、術後経過をみると治癒切除例は早期に陰性化の傾向を示し、相対的治癒切除、非治癒切除例では陽性のまま遷延する傾向があると報告している。

諸家の研究で、腫瘍抗原に対する DCHR が宿主の免疫能、臨床経過をよく表現していることがわかったが、臨床に応用するには反応性をもう少し上げる必要がある。本研究は皮膚反応の反応性を上げる目的で、消化器癌症例 (胃癌 28 例、大腸癌 25 例) において、腫瘍抗原リンパ球混合培養液による皮内反応を検討した。ツベルクリン反応に類似した異常反応性炎症を惹起させるリンフォカインとして、skin reactive factor (SRF) が知られているが、1968 年、Bennet & Bloom³⁰⁾ はツベルクリン感作モルモットのリンパ節リンパ球に PPD を添加し、血清を混入せずに培養した培養液で MIF 活性を証明し、非感作モルモットの皮下に注射して SRF を証明した。SRF は部分的な精製では MIF 活性分画に含まれ、現在のところまだ MIF との分離は成功していない。SRF と MIF は明らかな物理化学的性状の相違はなく、ノイラミナーゼ処理にて MIF 活性は消失するが、SRF 活性は残ることが報告されている。この時の皮膚反応は複合のリンフォカイン因子による反応と考えられている。すなわち本研究における皮内反応は in vivo での MIF assay と考えられ、SRF assay は in vitro の MIF assay に比して容易である。SRF による反応を人間に応用した報告は数少ないが、Spirer ら³¹⁾ は免疫不全の患者に対する SRF の皮内反応を報告している。また人癌の細胞性免疫能を検出する目的で、この皮内反応を応用した報告は見当たらない。本実験の皮内反応の陽性率は胃癌では 67.9%、大腸癌では 52.0

%, 両者合わせると60.4%となり, 黒瀬⁷⁾の報告と同じく胃癌でやや高い傾向を示し, 陽性率はやや上昇した。

また病期分類では, 乳癌においては Stewart²²⁾や Weese³²⁾の報告では有意差は認めないが, Hollinshead²⁷⁾は悪性黒色腫で, 早期癌に陽性率が高いとし, 肺癌では Weese³²⁾や桑原³³⁾は有意差は認めないが, 病期の進行とともに陽性率が低下したと報告している。本研究においても大腸癌では同様の傾向を示したが, 胃癌では stage III, IVでも陽性を示す症例が多く, 細胞性免疫能は良く維持されていた。

組織学的分類では, Hollinshead³⁴⁾は肺癌について, oat cell carcinoma に強い遅延型過敏反応を認めたと報告しているが, 本研究の胃癌では tubular adenocarcinoma, signet-ring cell carcinoma, malignant lymphoma で陽性率が高く, 特に signet-ring cell carcinoma では全例陽性であった。大腸癌では, moderately differentiated adenocarcinoma でやや高い陽性率を認め, 組織型によって抗原性の強弱に差がある可能性を認めた。

また非特異的免疫能の指標として一般的に用いられる PPD 皮内反応は, 病期の進行とともに陽性率が低下することが知られているが, 本研究の特異的皮内反応との比較では両者間に相関は認められなかった。黒瀬⁷⁾や桑原³³⁾も同様の結果を報告している。

次に血清 CEA 値との相関を検討してみても, 両者間に何ら関連を認めず, 本皮内反応に CEA が関与するものでないことが明らかとなった。Lejtenyi³⁵⁾は CEA が消化器癌患者のリンパ球を幼若化させないと報告しているし, Hollinshead³⁶⁾も消化器癌患者の細胞膜可溶性分画を polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にて分画し, CEA が皮内反応を惹起する分画と異なることを証明している。

抗原濃度では, Leventhal⁴⁾は 1 mg/ml, 黒瀬⁷⁾は 5 mg/ml で使用しているが, 本研究では 400 μ g/ml を至適抗原濃度として使用した。高濃度では非特異的な反応も避けられない^{21,23,37)}との指摘もあり, 本研究で用いた方法では抗原量が少なくよいため, 元来入手に困難な抗原

抽出材料も少なくすみ, 入癌の免疫能検査としては有効な方法であると考ええる。

皮内反応の反応性を上げるためには, 抗原を純粋なものとする必要があるが, McCube³⁸⁾は 3MKCL 抽出人悪性黒色腫関連抗原より, HLA 抗原を除去して purification を行い皮内反応を試みているが, 本研究は自家癌においてのみ検討しているため, HLA 抗原は無視できる。

また皮内反応の判定基準については, Leventhal⁴⁾は 48 時間後 5 mm 以上の紅斑径をもつものを陽性とし, McCube³⁸⁾は 24 時間後 10 mm 以上の紅斑を呈するものを陽性としている。本研究では, 正常組織にも一部陽性反応を呈するものがあるため, コントロールに比し明らかに紅斑径が大きいものを陽性とした。正常組織にも一部反応することより, 臓器関連抗原の存在を疑わせしめ, 抗原特異性に問題点は残したが, 皮内反応の陽性率は上昇し, 臨床的に癌の診断, 再発の予知に応用可能と考えられる。

結 論

胃癌, 大腸癌の DOC 抽出抗原と自家末梢リンパ球との混合培養液の皮内反応を行い, 従来の抗原単独の皮内反応と比較し, 臨床病期別分類, 組織学的分類, PPD 皮内反応や血清 CEA 値との比較により以下の結論を得た。

- 1) 胃癌28例, 大腸癌25例の皮内反応で, 陽性例は胃癌19例(67.9%), 大腸癌13例(52.0%)であり, 胃癌にやや高い傾向を認め, 従来の抗原単独の皮内反応に比して陽性率が上昇した。
- 2) 臨床病期別に皮内反応を検討した結果, 胃癌では有意差は認めなかったが, 大腸癌では病期の進行しているもの(stage III, IV, V)で低い陽性率を認め, 病期の進行による宿主の細胞性免疫能の低下が示唆された。
- 3) 組織別分類による皮内反応の差をみると, 胃癌では tubular adenocarcinoma, signet-ring cell carcinoma, malignant lymphoma で高い陽性率を認め, 大腸癌では moderately differentiated adenocarcinoma でやや高い傾向を示し, 組織型によって抗原性の強弱に差がある可能性を認めた。
- 4) 非特異的な皮内反応である PPD 皮内反応

と本皮内反応との間に相関性は認められなかった。
5) 血清 CEA 値と本皮内反応との関係では、
両者間に相関性は認められず、本皮内反応において
CEA が関与しないことが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました折田薫三教授、直接の御指導を戴いた黒瀬康平博士、浜崎啓介博士に深甚なる謝意を捧げます。なお本論文の要旨は昭和57年8月、第41回日本癌学会、昭和57年9月、第13回国際癌学会において発表した。

文 献

1. Jousset, MA.: Diagnostic value of skin reactions to tuberculin in adults: Accidental Surgery, *Bull. Mem. Soc. Med. Hop.*, (Paris) 50, 834—837, 1926.
2. Eilber, F.R. and Morton, D.L.: Impaired immunologic reactivity and recurrence following cancer surgery. *Cancer* 25, 362—367, 1970.
3. Fass, L., Fiegler, J.L., Herberman, R.B. and Kiryabwire, J.W.M.: Cutaneous hypersensitivity reactions to autologous extracts of malignant melanoma cells. *Lancet* i, 116—118, 1970.
4. Leventhal, B.G., Halterman, R.H., Rosenberg, E.B. and Herberman, R.B.: Immune reactivity of leukemia patient to autologous blast cells, *Cancer Res.* 32, 1820—1825, 1972.
5. Holmes, E.C., Roth, J.A., and Morton, D.L.: Delayed cutaneous hypersensitivity reactions to melanoma antigen. *Surgery* 78, 160—164, 1975.
6. 黒瀬康平：DOC および 3MKCL 抽出膜蛋白によるマクロファージ遊走阻止活性の比較—特に抽出方法の違いによるマクロファージ遊走阻止活性の差を中心として—岡山医学会雑誌, 95, 185—193, 1983.
7. 黒瀬康平：自家腫瘍抽出膜蛋白による皮内反応と臨床経過, 岡山医学会雑誌, 95, 195—203, 1983.
8. Irie, R.F., Nishioka, K., Tachibana, T. and Takeuchi, S.: Immunological studies on mouse mammary tumors. IV Extraction and solubilization of transplantation antigen of mouse mammary tumor, *Int. J. Cancer*, 4, 150—158, 1969.
9. Irie, R.F.: Antigenic cross-reactivity between primary spontaneous mouse mammary tumors and their transplantable ascites tumors, *Cancer Res.* 31, 1682—1689, 1971.
10. 入江礼子：腫瘍特異抗原の精製法, 免疫実験操作法, 日本免疫学会編, pp. 394—395, 1971.
11. 辻 公美：比重遠沈法によるリンパ球の分離, Conray 400-Ficoll 法, 免疫実験操作法, 日本免疫学会編, pp. 443—446, 1978.
12. 北郷 修：遅延型皮膚反応, 臨床免疫, 13, (Suppl. 3), 429—437, 1981.
13. Thomas, L.: Discussion in "Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States", Hoeder-Harper, New York, 529, 1959.
14. Burnet, F.M.: *Immunological Surveillance*, Pergamon, Oxford, 1970.
15. 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.
16. Carey, T.E., Lloyd, K.O., Takahashi, T., Travassos, L.R. and Old, L.J.: AU cell-surface antigen of human malignant melanoma: Solubilization and partial characterization, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76, 2898—2902, 1979.
17. 水島 豊, 山田雄次, 細川真澄男, 三浪明男, 小林 博：Radioisotopic foot pad assay のための腫瘍特異抗原の抽出, 癌と化学療法, 5, 61—66, 1978.
18. Brent, L., Brown, J. and Medawar, P.B.: Skin transplantation immunity in relation to hypersensitivity. *Lancet* ii, 561—564, 1958.
19. Hughes, L.E. and Lytton, B.: Antigenic properties of human tumors: Delayed cutaneous hypersen-

- sitivity reactions. *Br. Med. J.* 1, 209—212, 1964.
20. Stewart, T.H.M.: The presence of delayed hypersensitivity reactions in patients toward cellular extracts of their malignant tumor. *Cancer* 23, 1368—1379, 1969.
 21. Oren, M.E. and Herberman, R.B.: Delayed cutaneous hypersensitivity reactions to membrane extracts of human tumor cells. *Clin. Exp. Immunol.* 9, 45—56, 1971.
 22. Stewart, T.H.M. and Orizaga, M.: The presence of delayed hypersensitivity reactions in patients toward cellular extract of their malignant tumors. The frequency duration and cross reactivity of this phenomenon in patients with breast cancer and its correlation with survival. *Cancer* 28, 1472—1478, 1971.
 23. Char, D.H., Lepourhiet, A., Leventhal, B.G. and Herberman, R.B.: Cutaneous delayed hypersensitivity responses to tumor associated and other antigens in acute leukemia. *Int. J. Cancer* 12, 409—419, 1973.
 24. Wells, S.A., Melewicz, F.C., Christiansen, C. and Ketcham, A.S.: Delayed cutaneous hypersensitivity reactions to membrane extracts of carcinomatous cells of the cervix uteri. *Surg. Gynecol. Obstet.* 136, 717—720, 1973.
 25. Alford, C., Hollinshead, A.C. and Herberman, R.B.: Delayed cutaneous hypersensitivity reactions to extracts of malignant and normal human breast cells. *Ann. Surg.* 178, 20—24, 1973.
 26. Hollinshead, A. and Herberman, R.: Skin testing with soluble membrane antigens obtained from fetal stomach, and normal and malignant gastric cell. In *Proceedings Second International Symposium on Cancer Detection and Prevention*, Bologna, Italy, 1973.
 27. Hollinshead, A.C., Herberman, R.B., Jaffurs, W.J., Alpert, L.K., Minton, J.P. and Harris, J.E.: Soluble membrane antigens of human malignant melanoma cells. *Cancer* 34, 1235—1243, 1974.
 28. Hollinshead, A.C., Jaffurs, W.T., Alpert, L.K., Harris, J.E. and Herberman, R.B.: Isolation and Identification of soluble skin reactive membrane antigens of malignant and normal human breast cells, *Cancer Res.* 34, 2961—2968, 1974.
 29. Fossati, G., Canevari, S., Pierotti, M.A., Vezzoni, P., Porta, G.D. and Vaglini, M.: Delayed cutaneous hypersensitivity reactions to extracts of breast cancer and melanoma tissue in cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 1381—1385, 1979.
 30. Bennet, B. and Bloom, B.R.: Reactions in vivo and in vitro produced by a soluble substance associated with delayed hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci., (Wash.)* 59, 756, 1968.
 31. Spirer, Z., Rudich, A., Assif, E., Zakut, V. and Bogair, N.: Release of skin reactive factor by human Lymphocytes. *Int. Arch. Allergy* 46, 331—338, 1974.
 32. Weese, J.L., Herberman, R.B., Hollinshead, A.C., Cannon, G.B., Keells, M., Kibrite, A., Morales, A., Char, D.H. and Oldham R.K.: Specificity of delayed cutaneous hypersensitivity reactions to extracts of human tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 255—263, 1978.
 33. 桑原正喜, 池田貞雄, 松原義人, 伊藤元彦, 寺松 孝: 腫瘍特異抗原による肺癌患者の皮内反応, 日本癌学会総会記事, 41, 153, 1982.
 34. Hollinshead, A.C., Stewart, T.H.M. and Herberman, R.B.: Delayed hypersensitivity reactions to soluble membrane antigens of human malignant lung cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 327—338, 1974.
 35. Lejtenyi, M.C., Freedman, S.O. and Gold, P.: Response of lymphocytes from patients with gastrointestinal cancer to the carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Cancer* 28, 115—120, 1971.
 36. Hollinshead, A.C., McWright, C.G., Alford, T.G., Gold, P. and Herberman, R.B.: Separation of skin

- reactive intestinal cancer antigen from the carcinoembryonic antigen of Gold *Science* 177, 887—889, 1972.
37. Herberman, R.B., Hollinshead, A.C., Alford, T.C., McCoy, J.L., Halterman, R.H. and Leventhal, B.G.: Delayed cutaneous hypersensitivity reactions to extracts of human tumors. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 37, 189—195, 1973.
38. McCube, R.P., Ferrone, S., Pellegrino, M.A., Kern, D.H., Holmes, E.C. and Reisfeld, R.A.: Purification and immunologic evaluation of human melanoma-associated antigen. *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 773—777, 1978.

**Autologous skin tests using a mixed culture
solution of autologous tumor membrane
extracts and lymphocytes**

Tomoyoshi IWADO

First Department of Surgery, Okayama University Medical School

(Director: Prof. K. Orita)

Understanding precisely immunocompetence, especially cell-mediated immunocompetence, is important for applying the proper immunotherapy. A tumor specific antigen (TSA), which is considered to be on cancer cells, but not on normal cells, causes an immunoreaction with the cancer bearing host. To detect TSA of gastric and colon cancer, we performed autologous skin tests on 28 gastric cancer and 25 colon cancer patients using a solution prepared from the mixed culture of tumor antigen extracted by deoxycholate (DOC) and autologous peripheral lymphocytes. There were 19 (67.9%) positive reactions among gastric cancer cases and 13 (52.0%) among colon cancer cases. The skin test used in this study showed a higher positive rate than the usual skin test using tumor extracts only. The skin test did not correlate with the clinical stage in gastric cancer cases, but in colon cancer patients in the late stage there was a low percentage of positive reactions. As for histological classification, cancer patients with tubular adenocarcinoma, signet-ring cell carcinoma and malignant lymphoma of the stomach had a high percentage of positive reactions to this skin test. Cancer patients with moderately differentiated adenocarcinoma of the colon had a tendency to have a slightly high positive rate. This skin test did not correlate with the serum CEA level and PPD skin test, which is a nonspecific skin test.