

胃 癌 の 免 疫 学 的 研 究

第 2 編

胃癌患者血中抗体の根治手術前後の変動について

(本論文の要旨は第22回日本癌学会総会において発表した)

岡山大学医学部第1(田中)外科教室(指導:陣内伝之助教授, 田中早苗教授)

大学院学生 桑 原 良 知

[昭和40年1月9日受稿]

目

次

第1章 緒言ならびに文献

第2章 実験方法

第1節 抗 原

第2節 赤血球

第3節 被検血清

第4節 タンニン酸処理抗原感作赤血球凝集反応

1) 予備実験-1

2) 予備実験-2

3) 本実験

第5節 タンニン酸処理赤血球

第6節 抗原感作赤血球

第7節 倍数稀釈法

第3章 実験成績

第1節 自己の癌組織により免疫された患者の血中抗体

第2節 胃癌患者血中抗体と胃癌の進展度

第3節 胃癌患者血中抗体と I.E.P-pattern

第4節 胃癌患者血中抗体の根治手術前後の変動

第4章 総括ならびに考按

第5章 結 論

第1章 緒言ならびに文献

人癌に何らかの意味で免疫に基づく現象があるかどうかということは古今を通して論ぜられている。

Everson & Cole¹⁾ は自然治癒したという人癌 600 例の報告を検討し、稀ではあるが自然治癒は確かにあると報じており、さらに最近 Everson²⁾ は、このいわゆる癌の自然退行現象について、文献および私信例 1,000 例を検討し、この中から組織所見の確実なるもの 130 例を選び、分析を加え、自然退行の要因 8 つをあげているが、アレルギーおよび免疫反応が関与している可能性の強いことを力説している。

現在、癌治療の最善の方法である根治手術にしても、癌細胞を 1 つ残らず取り除くことは不可能であるにもかかわらず何割かは根治している。

また、癌患者の血液中に大量の癌細胞が流れていても、必ずしも生着して転移巣にまで増殖するとは限らない。

これらの事実は、宿主と癌の相互間に何らかの免

疫学的反応が存在するのではなからうかと予想される。

第1編において、胃癌患者血清に特有と考えられる成分を免疫電気泳動法にて認め、癌根治手術による変動を追求したが、果してこれが癌患者血清中の質的に特異な成分であろうか。この成分が癌腫より出た抗原様物質であるのか、あるいは逆に癌腫に対して宿主が反応して産生した抗体様物質であるのか不明である。癌腫より癌特異抗原を抽出し、これに反応する抗体様物質を癌患者血清中に証明し、さきに免疫電気泳動により証明した pattern と比較検討するなら、第1編において証明した特有成分が何であるか解決すべき道が拓かれると思われる。

しかし、この実験系には、癌腫に果して癌特異抗原があるのか、あるとすればどの分画に含まれているのかということ、および血中抗体の証明は、いかなる方法にてやるべきかという2つの問題がある。

古来、種々の方法で人の癌腫より抽出物を採り、これを用いて沈降反応、凝集反応、補体結合反応な

どが行なわれてきたが、比較的陽性の成績をえたのは最後の補体結合反応であつて、Graham & Graham⁸⁾ や Narcissov & Abeleb⁴⁾ などの論文がある。

一方、相沢、Southam⁶⁾ は人癌同種移植免疫を行つた健康人および癌患者の血中抗体は、補体結合反応、沈降反応、中和反応などでは証明されなかつたが、人癌細胞抽出液で感作したタンニン酸処理羊赤血球の凝集反応 (Boyden法) によつて検出されたことを報告している。

Finney⁶⁾ も末期癌患者を、3回凍結融解した患者自身の腫瘍を用いて Adjuvant 法にて免疫し、Boyden 法にて抗体価の上昇を証明し、かつ臨床症状も改善された例を報告している。

以上の事実などより、Boyden のタンニン酸処理赤血球凝集反応が好都合と考えられるので、1例ではあるが、胃癌再発患者を、自身の切除せる腹壁転移巣にレ線照射したものを用い Adjuvant 法にて免疫し、タンニン酸処理感作赤血球凝集価の上昇を認め、この方法で血中抗体を測定できることを確認したので、根治手術による胃癌患者血中抗体の変動をこの方法にて追求した。

他方、癌腫の特異抗原に関しては、研究結果は全く区々であるが、限られた腫瘍には明らかに癌特異抗原が存在し、人癌においては少くともかなり広範な共通抗原があるとする研究がある。これらのうち人癌で最も注目すべき成果をあげたのは、モルモットのアナフィラキシーや寒天拡散法を応用した Zilber⁷⁸⁾ の研究であり、さらに人癌よりのミトコンドリアを抗原として、Schulz-Dale 法を応用して、in vitro で特異抗原を証明した Makari^{9~12)} の論文が注目される。これらの研究より人癌のミトコンドリア分画を癌抗原として用いることとした。また赤血球は異種血清凝集素を吸収する必要のない O 型人赤血球を使用した¹³⁾¹⁴⁾。

第2章 実験方法

第1節 抗原

胃癌患者より手術的に切除した癌組織をただちに -40°C の冷凍室に pool 保存し、9例を混和して使用した。そのさい可及的に壊死部や健常部を除去した。溶媒としては生理食塩水を使用、potter 型 homogenizer にて冷却しながら homogenate し、Makari⁹⁾ にならつてミトコンドリアを遠心分画した。すなわち、冷凍超遠心分離機にて1,000G、15分間の上清を10,000G、45分間再遠心し、その沈渣を生

理食塩水にて稀釈して使用した。

また、予備実験では、癌実質の抽出し易い肺癌組織の手術摘出物を -40°C に冷凍保存したものを用いた。

第2節 赤血球

O 型の同一供血者より無菌的に採血し、等容の Alsever 液に混じ、冷所に3日間以上保存して使用した。Boyden¹⁵⁾ によれば3週間迄は使用可能とのことである。

Alsever 液：一

ブドウ糖	20.50g
クエン酸ソーダ	8.00g
食 塩	4.20g

蒸溜水を加えて1,000.00ml とする。

10%のクエン酸溶液にて pH 6.1 に修正す。

第3節 被検血清

第1編に使用し、保存してある血清を、使用前に 56°C 、30分間で非働化し、蛋白濃度1%に稀釈(約7倍稀釈)して、倍数稀釈血清列の第1列とした。

第4節 タンニン酸処理抗原感作赤血球凝集反応

第1項 予備実験—1

松原¹⁶⁾ は感作した人 O 型赤血球凝集反応にて、癌患者血清で高い陽性率をえている。これにならつて Middlebrook-Dubos¹⁷⁾ 法にて自己の癌組織により免疫された患者の血中抗体の測定を試みた。

抗原としてはまず肺癌組織の生食水抽出液(窒素量として700mg/dl キエルダール)を用い、後には胃癌組織のミトコンドリア分画(窒素量99mg/dl と9.9mg/dl キエルダール)を使用した。

Alsever 液の等容を加え冷所に保存してある人 O 型赤血球を、6倍容の生食水にて1,500rpm、5分間、3回洗滌。前述の稀釈抗原液にて0.25%赤血球浮游液とし、 37°C の温浴中で2時間感作、これを1,500rpm、5分間、2回洗滌。これに生食水を加え0.5%感作赤血球浮游液とする。

非働化した被検血清を、生食水にて倍数稀釈し、各試験管内総量を0.5mlとする、これに前述の0.5%感作赤血球0.5mlを分注し、よく振盪混和して、 37°C 2時間後、凝集鏡にて判定した。

第2項 予備実験—2

予備実験—1の結果、タンニン酸で処理していない感作赤血球凝集反応では、癌患者血中抗体の測定は困難であつた。

そこで次に Boyden 変法¹⁵⁾を試みた。抗原とし

ては予備実験—1と同様、まず肺癌の抽出液を使用、タンニン酸は 4×10^4 倍稀釈液を使用して、自己の癌組織により免疫された患者の血中抗体を測定し、免疫後4週目より凝集価のかなりの上昇を認めた。

次に癌患者の血中抗原検出に好成績をあげているMakari⁹⁾のSchultz-Dale法との相関をみるさい好都合と考え、赤血球感作抗原として胃癌組織のミトコンドリア分画を用いた。

赤血球を処理するタンニン酸、感作に使用する抗原液、両者とも高濃度のものを用いると非特異的凝集の原因となる¹⁸⁾。これらの至適濃度を調べるための予備実験を行なった。タンニン酸は $4 \times$, $8 \times$, 16×10^4 倍稀釈の3組の濃度、抗原液(胃癌組織のミトコンドリア分画)は窒素量19.8, 1.98, 0.198 mg/dlの3組。

これらを組合わせた9組について、正常血清では凝集せず、癌患者血清で凝集する組合わせを求めた。

第3項 本実験

予備実験の結果、タンニン酸は 4×10^4 の濃度が適しており、抗原は19.8mg/dlと1.98mg/dlの中間の濃度が適していることが判り、本実験ではタンニン酸は 4×10^4 、抗原は9.9mg/dlの濃度を使用した。

第5節 タンニン酸処理赤血球

Alsever液の等容を加え冷所に保存してある人O型赤血球を、6倍容の生理食塩水にて1,500rpm, 5分間, 3回洗滌。磷酸緩衝食塩水(pH 7.2)にて2.5%の赤血球浮遊液とする。

これに毎回新しく作った、等容の 4×10^4 稀釈タンニン酸食塩水を加え、37°Cの温浴中で10分間処理する。

これの1,500rpm, 3分間の沈澱を磷酸緩衝食塩水(pH 7.2)で1回洗滌後、同液を加え2.5%タンニン酸処理赤血球浮遊液とする。

磷酸緩衝食塩水: 希望するpHになるような割合に混合したM/15の KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 の溶液に、等容の生理食塩水を加える。

第6節 抗原感作赤血球

2.5%タンニン酸処理赤血球浮遊液に、等容の磷酸緩衝食塩水(pH 6.5)に溶いた抗原液(窒素量9.9mg/dl キエルダール)を加え、室温にて15分間感作する。

自発凝集を防ぐ為に、1:250に正常血清を加えた食塩水で、1,000rpm, 3分間, 2回洗滌し、この稀釈液で2.5%感作赤血球浮遊液とする。

第7節 倍数稀釈法

血清はすべて使用前に、56°C, 30分加温して非働化した。

被検血清及び対照の正常人血清は、1:100に正常人血清を加えた食塩水で稀釈し、蛋白濃度を1%としたものを倍数稀釈血清列の第1列とした。

(表1)の如く、各試験管内総量を0.5mlとし、これに2.5%赤血球浮遊液を0.05ml分注し、よく振盪混和して、室温2時間後の管底像にて判定した。

表1 倍数稀釈法

試 験 管 番 号	I	II	III	X	判 断
被 検 血 清 (血 清 蛋 白 1%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5 0.5
1:100 正 常 血 清 食 塩 水		0.5	0.5	0.5	0.5	
2.5%タンニン酸処理感作赤血球浮遊液	0.05	0.05	0.05	0.05		0.05
2.5%タンニン酸処理未感作赤血球浮遊液						0.05
2.5%未処理赤血球浮遊液						0.05
正 常 血 清 (血 清 蛋 白 1%)						0.5

また被検血清にはすでに試験ずみのものを必ず系列に加えて、陽性対照とするとともに抗体価の対照とした。

対照1: (2.5%タンニン酸処理未感作赤血球浮遊液0.05ml+被検血清0.5ml) タンニン酸の亜鉛混入によると考えられる非特異的凝集¹⁸⁾。

対照2: (2.5%未処理赤血球浮遊液0.05ml+被検血清0.5ml) Rh など血液型因子による凝集¹⁹⁾¹⁴⁾。

対照3: (2.5%感作赤血球浮遊液0.05ml+正常人血清) 陰性対照。

以上の対照を置くことにより、非特異的凝集反応は一応除去できたと考えられる。

第3章 実験成績

第1節 自己の癌組織により免疫された患者の血中抗体

緒言でのべた如く、1例ではあるが、胃癌再発患者を、切除した自身の腹壁転移巣10gにレ線照射10,000レントゲンしたものを用いてComplete Adjuvant法にて腎筋に筋注免疫し、1週間前後の間隔にて9回採血した血清のBoyden変法による赤血球凝集価は(図1)の如くである。

第2節 胃癌患者血中抗体と癌の進展度

手術前の癌患者血中抗体価と、胃癌漿膜面浸潤度¹⁹⁾(S)との関係は(図2)の如くである。

また、胃癌リンパ節転移度¹⁹⁾(n)との関係は(図3)の如くである。

共に有意の相関関係は認められない。

第3節 胃癌患者血中抗体とI.E.P.-pattern

手術前の患者血清に関しては、(図4)の如く相関

図1 自己の癌組織により免疫された患者の血中抗体

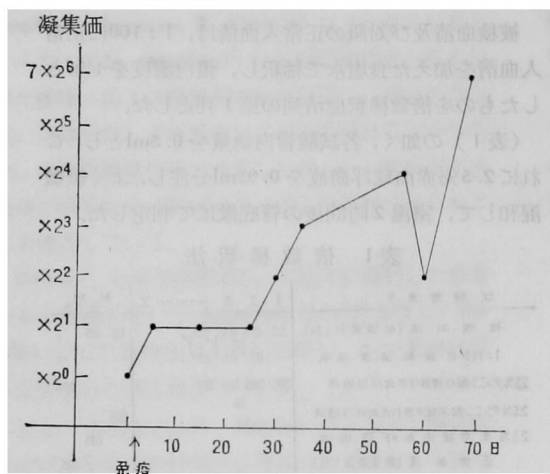


図2 胃癌漿膜面浸潤度と血中抗体

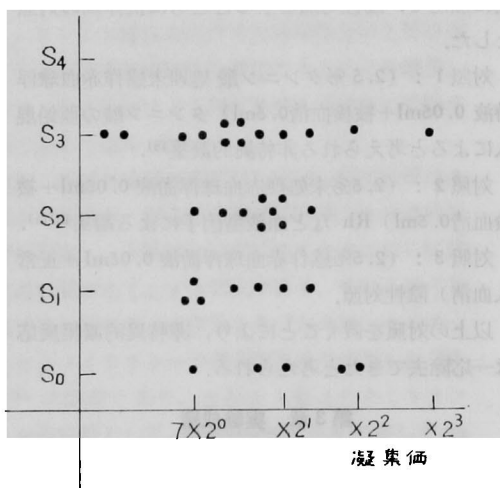


図3 胃癌リンパ節転移度と血中抗体

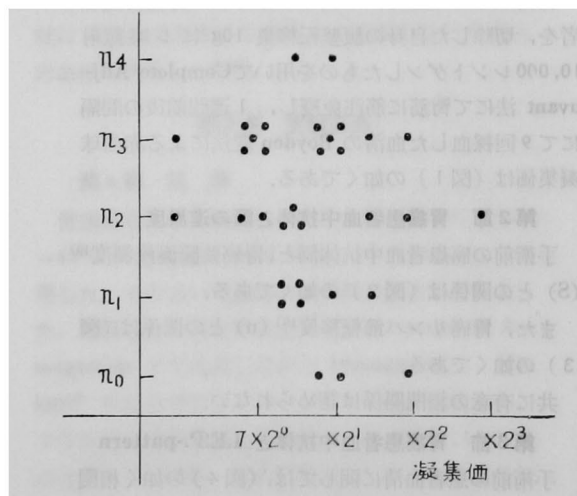


図4 胃癌患者血中抗体と I.E.P.-Pattern

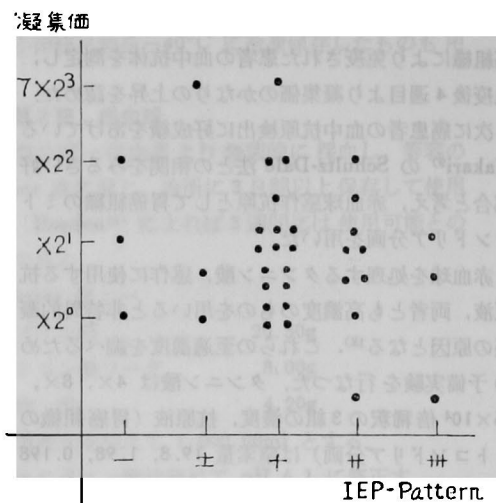
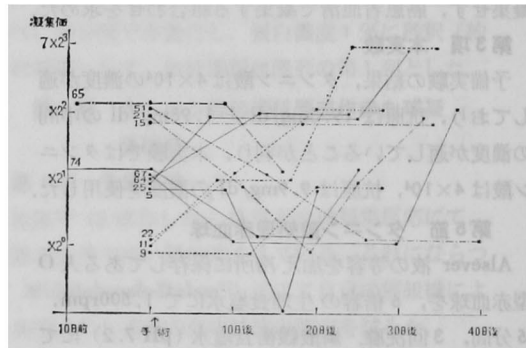


図5 胃癌患者血中抗体の根治手術前後の変動



関係は認められない。

第4節 胃癌患者血中抗体の根治手術前後の変動

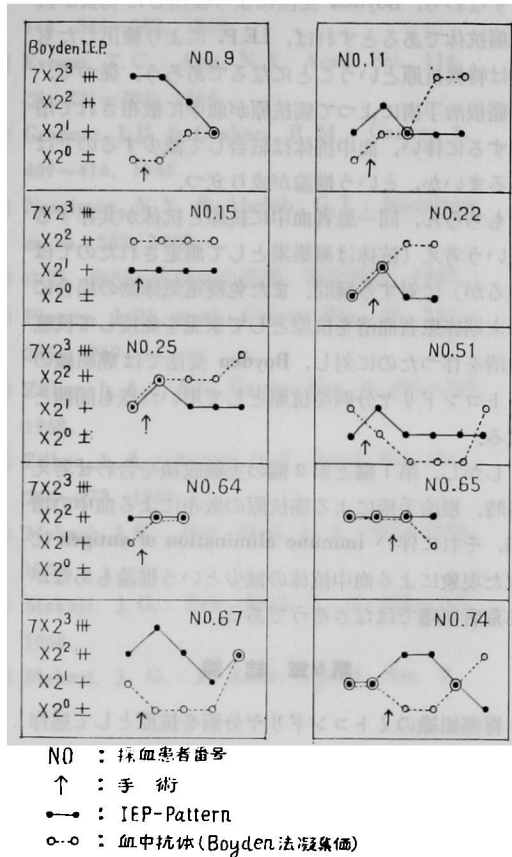
根治手術前後の血中抗体の変動は、(図5)の如く、I.E.P-pattern 程の著しい傾向は認められないが、術後の一時的な抗体価の低下が僅かにうかがわれるようである。

そこで、個々の症例について、根治手術前後の血中抗体の変動と、I.E.P.-pattern を比較してみると、(図6)の如く、明らかに負の相関関係を示すものが存在した。

第4章 総括ならびに考按

抗原感作赤血球凝集反応は、Keogh ら (1948) がインフルエンザ菌体多糖体で赤血球を処理すると、その免疫血清と特異的な赤血球凝集反応を呈することを報告したのに始まり、Middlebrook & Dubos (1948) は結核菌についてこの手技を応用し、「結核の活動性の診断に用いる」と発表したため世の注

図 6 胃癌根治手術前後の血中抗体と
I.E.P.-Pattern



目をあび、Middlebrook-Dubos 反応として、各国においてさかんに検討された²⁰⁾。

熊谷¹³⁾¹⁴⁾ は人 O 型血球を用いる方法で、結核および癩について検討し、緬羊血球と同様の結果をうることができ、異種血清凝集素を吸収する必要がなく、かつ溶血し難いので操作が容易であるとのべている。

松原¹⁶⁾ は新鮮胎盤の多糖類を抗原とし、人 O 型赤血球を感作し、癌患者血清で 74% の陽性率を報告している。

Boyden (1951) は Middlebrook-Dubos 反応において、細菌培養液で赤血球が感作される過程は、2 段階からなつていると考え、第 1 段階は培養液中の植物性多糖類が、赤血球の表面に作用してその性質を変え、第 2 段階はこの性質の変つた赤血球表面に、液中の抗原性物質が吸着されると仮定し、緬羊赤血球に種々の植物性多糖体を作用させるを試み、イヌリンを作用させた赤血球は容易に蛋白質を吸着し、その蛋白質の抗血清によつて特異的に凝集す

ること、濃度によつてはそれのみでも非特異的に赤血球を凝集しうることを観察した。一方タンニン酸が赤血球を非特異的に凝集せしめる作用のあることが報告されていたので、タンニン酸を用いたところ、イヌリンよりも好結果が得られたことを報告した。

抗原の性状に関しては Middlebrook-Dubos 型反応は多糖体性抗原、Boyden 型反応は蛋白性抗原に関係するといわれているが、進藤はこれを否定し、抗原物質が赤血球の表面に吸着され易いか否かが問題であるとのべている。一方 Chen & Meyer のペスト菌に関する研究によれば、純度の高い蛋白抗原は protective antigen であつて、タンニン酸処理赤血球にのみ吸着され、純度の高い多糖体抗原は protective antigen ではなく、タンニン酸処理していない赤血球にも吸着されるとのことである²⁰⁾。

次に赤血球を感作する癌抗原としてどんなものを用いるかということである。一応ミトコンドリア分画を用いて実験をすすめたが、これ自体大変な問題で、これまでに癌抗原としては動物腫瘍では、ミクロゾームの RNA・核蛋白・アルコール抽出物・脂質・生食水抽出物・核酸と脂質の複合体・易熱性不溶性脂蛋白等があげられており、人腫瘍ではアルコール抽出物・生食水抽出物・蛋白分画・脂質・易熱性不溶性脂蛋白等が記載されている²¹⁾。

前述の Finney⁶⁾ は腫瘍の homogenate の生食水稀釈液をそのまま抗原として用いており、相沢 Southam¹⁸⁾²²⁾ は組織培養された癌細胞の生食浮游液の homogenate の 7,000G, 30 分の上清を用いており、これはミクロゾーム分画にミトコンドリア分画の一部が加わつたものと考えられる。

腫瘍特異抗原に関する研究で、モルモットのアナフィラキシーを巧みに用いて有名な Zilber⁷⁾ は各種腫瘍の「核蛋白分画」に特異抗原の大部分が含まれていることを確かめ、ラウス家鶏肉腫のビールスが確実にこの分画に結合していることから、非ビールス性腫瘍も masked virus を有し、この核蛋白分画と共に分離されているのではなかろうかと推定し、動物腫瘍だけではなく人腫瘍の場合にも、モルモット感作抗原としてこの分画を用いて好結果をえている。また腫瘍特異抗原の細胞内局在に関しては、ミトコンドリアとミクロゾームに最大の抗原活性があり、核にはごく僅かしかないとのべている。

しかし、このアナフィラキシー症状によつて定量的データーを導き出すことには批判的な意見もあるようである²³⁾、Makari^{9)~12)} はこれよりも客観的な

観察・記録可能な局所アナフィラキシーである Schultze-Dale 法を用いて、癌患者血清中の特異抗原の検出に好成績をあげている。この際モルモットの感作抗原としては、癌組織の超遠心分離によるミトコンドリア分画が最大の特異抗原活性を有することを確かめ、これを使用している。

以上の研究にならい、1例ではあるが、胃癌再発患者を、切除した自身の腹壁転移巣にレ線照射したものをを用いて、complete Adjuvant 法にて免疫し、1週間前後の間隔で採血した血清の抗体測定を赤血球凝集反応で試み、癌患者血中抗体は Boyden 法にて測定できることを確認し、根治手術による胃癌患者血中抗体の変動をこの方法にて追求したわけである。

ところで、Boyden 法は、他の方法では検出困難な微量の血中抗体を測定できるほど鋭敏であるが、非特異的凝集を起し易いのでこれに対する考慮が必要である。例えば、赤血球を処理するタンニン酸が高濃度であつたり、亜鉛などの不純物が含まれていると非特異的凝集の原因となる（対照1）。また人O型赤血球を使用した場合、異種血清凝集素を吸収除去する必要はないが、Rh 因子などの血液型に対する考慮が必要である（対照2）。このように各実験群に多数の対照を要するので、1日に検査できる血清の数は限定される。従つて多数の血清抗体価を比較する前に、その再現性を調べる必要があり、実験ごとに前回テスト済みの数種の被検血清を重複して調べねばならぬ。このようにして同一血清が大体等しい抗体価を示すならば、多数の血清の抗体価の比較実験として、この方法は充分信頼できるが、あくまで相対的な価であり絶対的のものではない¹⁸⁾。

このような諸問題を考慮しての本編の実験成績から、胃癌根治手術前後の患者血中抗体の変動と I.E. P.-pattern に負の相関が認められた。これは immune elimination of antigen（抗原の免疫反応による除去）に似た現象のあらわれではあるまいか。

この immune elimination of antigen とは、動物を免疫と同時に、¹³¹I でラベルした抗原を静注して、血中の抗原の動向を調べると、7日位経つて抗体の産生が始まると、できた抗体と抗原が結合すること

により抗原が血中から急速に除かれる現象である。

すなわち、Boyden 変法により検出した物質が抗腫瘍抗体であるとすれば、I.E.P. により検出したものは特異抗原ということになるであろう。従つて、胃癌根治手術によつて癌抗原が血中に散布されて増加するに伴い、血中抗体は結合して減少するのではあるまいか、という推論が成り立つ。

もちろん、同一患者血中に抗原と抗体が共存するという考え（抗体は凝集素として測定されたのではあるが）に対する疑問。また免疫電気泳動の場合には末期癌患者血清を抗原として家兎を免疫して抗癌血清を作つたのに対し、Boyden 変法では癌組織のミトコンドリア分画を抗原として用いた点も問題となる。

しかし、第1編と第2編の実験成績を合わせ考える時、根治手術による癌抗原の散布による血中の増加、それに伴い immune elimination of antigen に似た現象による血中抗体の減少という推論もあながち荒唐無稽ではなさそうである。

第5章 結 論

胃癌組織のミトコンドリア分画を抗原として感作したタンニン酸処理人O型赤血球を用い、Boydon 変法の赤血球凝集反応にて胃癌患者の血中抗体を追求した。

(1) 自己の癌組織により免疫された胃癌患者で、血中抗体の上昇を認めた。

(2) 胃癌患者血中抗体と癌の進展度との関係は、漿膜面浸潤度及びリンパ節転移度ともに相関関係は認められない。

(3) 胃癌患者の血中抗体と I.E.P.-pattern との相関関係は認められない。

(4) 胃癌患者の根治手術前後の血中抗体及び I.E. P.-patteru の変動には明らかに負の相関関係を示すものが存在した。

稿を終るにのぞみ御指導、御校閲を賜つた陣内教授、田中教授に深甚の謝意を表するとともに、本実験について種々御指導、御援助を賜つた折田講師に感謝する。

参 考 文 献

- 1) Everson, T.C. & Cole, W.H. : Ann. Surg., 144, 366~383, 1956.
- 2) Everson, T.C. : Ann. N.Y. Acad. Sci., 114, (2): 721~735, 1964.
- 3) Graham, J.B. & Graham, R.M. : Cancer, 8, 409~416, 1955.
- 4) Narcissov, N.Y. & Abeleb, G.I. : Neoplasms, 6, 353, 1959.
- 5) 中原, 吉田 : 癌研究の進歩, 医学書院, 1960.
- 6) Finney, J.W. et al : Cancer Res., 20, 351~356, 1960.
- 7) Zilber, L.A. : Adv. Cancer Res., 5, 291~329, 1958.
- 8) Zilber, L.A. : Annal. N.Y. Acad. Sci. 101, 264~270, 1962.
- 9) Makari, J.G. : Brit. Med. J., 2, 1291~1295, 1955.
- 10) Makari, J.G. : Brit. Med. J., 2, 358~361, 1958.
- 11) Makari, J. G. : J. Amer. Geriat. Soc. 7, 611, 1959.
- 12) Makari, J.G. : Annal. N.Y. Acad. Sci., 101, 274~318, 1962.
- 13) 熊谷 : 日新医学, 38, 481, 昭26.
- 14) 熊谷 : 日新医学, 40, 288, 昭28.
- 15) Boyden, S.V. : J. Exp. Med. : 93, 107~120, 1951.
- 16) 松原 : 日本医新報, 1439, 3259, 昭26.
- 17) Middlebrook, G. & Dubos, R.J. : Exp. Med., 88, 521~528, 1948.
- 18) Itoh, T. & Southam, C.M. : J. Immunol. 91, 469~483, 1963.
- 19) 胃癌研究会 : 胃癌取扱い規約 (案), 1962.
- 20) 熊谷 : 日新医学, 46, 715~719, 昭34.
- 21) 武田 : 癌の臨床, 8, 573~576, 1962.
- 22) 相沢, 伊藤, Southam, C.M. : 癌の臨床, 8, 606~612, 1962.
- 23) Busch, H. : Biochemistry of the Cancer Cell, ACADEMIC PRESS, 1962.

Immunological Studies on Gastric Cancer

Part II. Influences of Extended Radical Operation for Gastric Cancer on Humoral Antibody in Sera

By

Yoshitomo Kuwahara

1st Department of Surgery, Okayama University Medical School

(Director : Prof. D. Jinnai, M.D. Prof. S. Tanaka, M.D.)

Modified Boyden's hemagglutination test was performed with the gastric cancer sera and the tannic acid treated human O-type red cells conjugated with the mitochondria fraction from the pooled gastric cancer tissues for the demonstration of cancer-specific humoral antibody.

1. The increase of humoral antibody was recognized in the serum from the gastric cancer patient sensitized with his own cancer tissue.

2. These titers of the humoral antibody were seemed not to be proportional to the development of cancer, the extent of infiltration in stomach serosa and lymphatic metastasis.

3. No significant relationship could be noted between these titers of humoral antibody and the immunoelectrophoretic patterns in gastric cancer sera.

4. There was some relationship of inverse proportion between the titers of humoral antibody and the immunoelectrophoretic patterns in the cancer sera before and after extended radical operation for the gastric cancer.
