頭頸部悪性腫瘍患者における抗腫瘍免疫能の研究

—— 白血球粘着阻止 (LAI) 試験による検索 ——

札幌医科大学耳鼻咽喉科学教室 (主任: 形浦昭克教授)

氷 見 徹 夫

ANTI-TUMOR IMMUNITY IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK CANCER
MEASURED BY LEUKOCYTE ADHERENCE INHIBITION TEST

TETSUO HIMI, M. D.

Department of Otolaryngology, Sapporo Medical College, Sapporo

The Leukocyte Adherence Inhibition (LAI) test was used to study anti-tumor immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. 25.9 percent of the patients with laryngeal cancer (7 of 27) and 33.3 percent of the patients with maxillary cancer (6 of 18) had positive LAI responses to soluble extract from the same type tumor.

LAI responses were demonstrated in KLH sensitized mice peritoneal exudate mononuclear cells and human peripheral mononuclear cells.

The serum blocking factor (B. F.) was not detected in any LAI reactive patients with laryngeal and maxillary cancer. B. F. was measured by the inhibition rate of LAI responses of KLH-sensitized mononuclear cells. The lower reactivity of LAI responses and the higher percentage of the B. F. positive rate were shown in patients at a more advanced clinical stage.

To elucidate the nature of B. F., serum immune complexes (I. C.) were investigated by the anti-C3 solid phase ELISA. 20.7 percent of the patients with laryngeal cancer (6 of 29) and 31.3 percent of the patients with maxillary cancer (5 of 16) had positive serum I. C.. Similarly, patients at a more advanced clinical stage had higher positive rates of serum I. C.. I. C.s in patients with positive B. F. were significantly higher than in those with negative B. F.. This suggests that serum B. F. is related to serum I. C..

Key words: 腫瘍免疫, 頭頸部癌, 白血球粘着阻止 (LAI) 試験, 免疫複合体

A88—0463—94362

は じ め に

悪性腫瘍患者が正常健康人と異なる免疫能を有することは古くから指摘されており, その免疫能の検索は, 腫瘍抗原特異的なもの, 非特異的なものの両面からなされてきている。近年はそれらを癌の診断, 臨床経過との対比, 予後判定のパラメーターなどへ応用する可能性が検討されている。全身的な免疫能の検索には, 担癌患者の血球, 特にリンパ球, マクロファージ, 単球等の数的,

機能的変化, 担癌患者血清中に出現, 消退する種々の因子について検討されてきた。白血球粘着阻止 (Leukocyte Adherence Inhibition: LAI) 試験は, これらの全身的な免疫能の検索方法の一つであり, 担癌宿主の単核細胞 (mononuclear cell) が腫瘍抗原に感作されている場合, 再度腫瘍抗原と反応することにより, その単核細胞のガラス面への粘着能が阻止される現象を利用したものである¹⁾。この LAI 試験が, 他の全身的な免疫能検索の方

法論と異なる点は、どの腫瘍抽出抗原に対しても粘着能低下反応がおこるのでなく、抗原の種類に特徴的に高い反応を示すという点である。

頭頸部領域の悪性腫瘍は、固型癌、特に扁平上皮癌が主体を占め、耳鼻咽喉科領域では喉頭癌、上顎癌が大きな比重を持つことは言うまでもない。頭頸部悪性腫瘍患者の免疫学的動態を調べる上で、種々の方法論はあるものの、頭頸部腫瘍より抽出した腫瘍抗原を用いた LAI 試験は、他の部位の担癌患者の免疫能との相違点、頭頸部領域悪性腫瘍の腫瘍抗原の特異性を検討する上で有用といえる。

頭頸部悪性腫瘍患者における免疫能の検索法として LAI 試験を用いた報告は、喉頭癌²⁾³⁾⁴⁾、口腔内扁平上皮癌⁴⁾⁵⁾についてみられるが上顎癌での報告はまだない。

担癌患者では LAI 反応にみられるような抗原特異的な免疫反応をおこす一方、担癌患者の血清中に、この LAI 反応を抑制する因子 (LAI 阻止因子) が出現することが報告されており、病期の進行した症例には高率に出現するとされている¹⁾⁶⁾。

LAI 試験が、抗原特異的な免疫能の測定として担癌患者への応用が可能であるのみならず、この LAI 阻止因子もまた担癌患者の免疫能を示す一つのパラメーターと考えられ、臨床経過との関連性において重要な情報となりうる。

著者は、頭頸部領域の悪性腫瘍患者における抗腫瘍免疫能を検索する目的で、頭頸部扁平上皮癌より抽出した腫瘍関連抗原を用い、頭頸部担癌患者に対し LAI 試験、および Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を用いた LAI 反応における LAI 阻止因子を検索し、更にこの LAI 阻止因子と関連性の深いとされる免疫複合体を、抗 C3 固相 ELISA 法により測定し、その関連を検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

当科外来を受診し、生検、手術摘出により組織学的に扁平上皮癌と診断された喉頭癌、上顎癌症例を主とし、上咽頭癌、下咽頭癌、悪性リンパ腫、および喉頭、上顎洞良性疾患症例もあわせて検索の対象とした。病期分類は日本頭頸部腫瘍学会案⁷⁾に従った。

2. 腫瘍関連抗原の分離

喉頭癌関連抗原としては、ヒト喉頭癌 cell line (H Ep #2) を、上顎癌関連抗原としては、手術時に得られ

図1 マイクロスライド法による LAI 試験

た腫瘍組織より抽出したものをを用いた。すなわち H Ep #2 は培養後、リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) にて洗浄した後に、細胞沈渣の5倍量の PBS を加え、再浮遊させた後、teflon homogenizer にてホモジナイズし、20000g 30分遠沈し、その上清分画を喉頭癌関連抗原とした。手術時摘出された上顎癌腫瘍組織は、冷却した PBS 内でよく洗浄し、脂肪組織、壊死組織を除去した後、ハサミにて細切し、上記と同様に5倍量の PBS を加えホモジナイズし 20000g 30分遠沈後その上清分画を上顎癌関連抗原とした。それぞれ Lowry 法⁸⁾にてタンパク濃度を測定し、使用時まで -80°C に凍結保存した。

3. マイクロスライド法による LAI 試験

Yonemoto⁹⁾の方法を改変して用いた。すなわち、よく脱脂洗浄した内径 0.3mm×4.0mm のマイクロスライド (Vitro Dynamic 社) をスライドガラスに両面粘着テープを用いて固定し、オートクレーブにて滅菌の後、よく乾燥させた (図1)。悪性腫瘍患者、良性疾患患者、および正常健康人よりヘパリン加採血にて末梢血を採取した。単核細胞分画は Ficoll-Conray 比重遠心法 ($d=1.078$) を用い分離し、単核細胞層を採取し PBS にて3回洗浄した後 RPMI 1640培養液 (Gibco 社) にて $3.0 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。前述した腫瘍抽出抗原は、タンパク濃度 0.2mg/ml に調整した。末梢血より得た単核細胞浮遊液 50 μl と抽出抗原液 50 μl を、また対照として RPMI 1640 培養液 50 μl をそれぞれ加えよく振盪しながら 37°C 30分 インキュベーションした。イン

キュベーション終了後、マイクロスライドに抽出抗原－単核細胞混合液を注入し、水平に設置したスライドグラス支持台に上面、すなわちマイクロスライド接着面を下にして、5% CO₂ インキュベーターにて 37°C 1 時間インキュベーションした。その後、注意深く反転し、さらに 37°C 1 時間インキュベーションを行った。付着細胞はマイクロスライドの上面にとどまり、非付着細胞は下面に落下する。顕微鏡下同一視野にて、上面（付着細胞）の細胞数と下面（非付着細胞）の細胞数をそれぞれ 4 視野につき算定した。下記の式にて付着率（% Adherence: % Ad）および付着指数（Adherence Index: A. I.）を求め、正常健康人対照例では全例付着指数 13 以下であることより、付着指数 13 以上の症例を腫瘍抗原に対する LAI 試験陽性例とした。

付着率（% Adherence: % Ad）

$$= \frac{\text{付着細胞数}}{\text{付着細胞数} + \text{非付着細胞数}} \times 100$$

付着指数（Adherence Index: A. I.）

$$= \frac{\text{対照付着率} - \text{腫瘍抗原添加付着率}}{\text{対照付着率}} \times 100$$

4. ガラスチューブ法による LAI 試験

Grosser and Thomson¹⁰⁾ の方法に準じた。すなわち末梢血単核細胞分画を前述と同様の方法にて採取し、その浮遊液（ $1 \times 10^7/\text{ml}$ ）0.1ml と抗原溶液 0.1ml、RPMI 1640 培養液 0.3ml を脱脂、滅菌したレイトン培養試験管（窓寸法 11mm×38mm, Weaton 社）に、試験管培養面全体を被うように加え、軽く振盪した後、試験管専用ラック（Weaton 社）に固定した。対照として抗原溶液のかわりに RPMI 1640 培養液 0.1ml を用いた。試験管を水平に設置し、37°C 2 時間 5% CO₂ インキュベーターにてインキュベーションした。インキュベーション終了後、専用ラックを静かに垂直に立て、管底に落下した非付着細胞をパスツールピペットにて採取し、Hemolizer（エルマ光学）にて赤血球を溶血させた後、コールターカウンター（エルマ光学 Model ACM 501）にて非付着細胞数を算定した。あらかじめ加えた全体の細胞数を同様の操作でコールターカウンターにて算定し、前述の式にて付着指数を算出した。

5. KLH を抗原として用いた LAI 試験、および

LAI 阻止因子の検出

KLH の精製は Garvey¹¹⁾ の方法に従った。すなわち KLH（Calbiochemie 社）を PBS にて十分に透析し硫

安を除去し、濾紙（東洋 paper filter No. 2）にて濾過した後、78,000g 75 分遠沈し、得られた沈渣に生理食塩水を加え再溶解した。よく攪拌した後、透析および遠沈をくり返し、78,000g 2 時間遠沈を行い、生理食塩水にて再溶解後 Lowry 法にてタンパク濃度を測定し、ミリポアフィルター（pore size 0.45μ）にて濾過滅菌し使用時まで -80°C 凍結保存した。

KLH 感作マウス腹腔単核細胞は、以下の方法にて採取した。BALB/c マウス腹腔内へ精製 KLH 0.1mg を投与し、3% チオグリコレート（ニッスイ）にて腹腔単核細胞を誘発し、4～5 日後に腹腔液を採取し、単核細胞を分離し PBS にて洗浄した後を使用した。

KLH のヒトに対する感作法は、皮内テストとして行い KLH 感作ヒト単核細胞を得た。KLH 皮内テストは、奥田ら¹²⁾ の方法に準じて行った。すなわち、滅菌精製 KLH を正常健康人の上腕伸側へ 0.1mg 皮下注射し、7 日後に前腕屈側へ 0.01mg 皮内注射を行い 24 時間後に判定し 10mm 以上の発赤硬結を認めた場合を皮内テスト陽性とした。皮内テスト陽性、感作成立を確認した後、ヘパリン加採血にて末梢血を採取し、比重遠心法にて単核細胞分画を得、これを KLH 感作単核細胞として用いた。

KLH を抗原とした LAI 試験は、ガラスチューブ法を用い、この際に加える KLH 抗原量は $50\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$ の濃度とした。

担癌患者血清中の LAI 阻止因子の検出は、腫瘍抗原による LAI 試験で陰性を示した喉頭癌、上顎癌症例 27 例を対象として検索した。すなわち、LAI 試験陰性担癌患者より分離した血清を RPMI 1640 培養液にて 10 倍に希釈し、この希釈血清と KLH 感作正常健康人より分離した単核細胞（ $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ ）を等量加え、振盪させながら 37°C 1 時間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後、血清処理後単核細胞を PBS にて 2 回洗浄し、再浮遊させた。次にこの単核細胞を用いて、精製 KLH を抗原とし、ガラスチューブ法にて LAI 試験を行った。対照としては正常健康人より得た血清を用いた、以下の式にて阻止指数（Blocking Index: B. I.）を求め、正常血清では阻止指数 0.7 以下であることより阻止指数 0.7 以上の症例を、血清中の LAI 阻止因子陽性と判定した。

A: KLH 加非付着細胞数

B: 対照非付着細胞数

非付着指数 (Non Adherence Index: NAI)

$$= \frac{A - B}{B}$$

阻止指数 (Blocking Index: B. I.)

$$= 1 - \frac{\text{担癌患者血清処理後 NAI}}{\text{正常健康人血清処理後 NAI}}$$

6. 抗 C3 固相 ELISA 法を用いた血清中免疫複合体の検出

血清中免疫複合体 (Immune Complex: I. C.) の測定は, 抗 C3 固相法¹³⁾ を用い Emzyme Immuno Assay にて測定した. 熱凝集ヒト IgG (Heat Aggregated Human IgG: AHG) は, Cohn Fraction II ヒト IgG (Miles Laboratorie 社) を 63°C 20 分加熱し, 1,500g 15 分遠沈し, その上清分画とした. 抗 C3 F(ab')₂ 分画 (Cappel 社) を 0.01M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) にて 100 倍希釈し, 96 穴マイクロプレート (Dynatech 社: M-129A) の各ウェルに 100μl ずつ入れ 4°C 一昼夜インキュベーションし, プレート上へコーティングを行った. 各ウェルに 2% 牛血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA)-PBS-Tween 20 を 200μl 入れ, 室温にて 30 分以上インキュベーションの後, プレートの水分を十分にきり, 使用時まで -30°C に保存した. AHG のタンパク濃度を Bio-Rad Protein Assay Kit¹⁴⁾ にて測定し, PBS-Tween 20 にて AHG の各希釈倍数溶液を作製し, それぞれに補体 (C3) 源として正常人新鮮血清を等量加え 37°C 15 分インキュベーションした. AHG-C3 複合体溶液を最終 10 倍希釈となるよう 1% BSA-PBS-Tween 20-EDTA (0.01M) を加え標準曲線作製に使用した.

担癌患者血清, および対照正常健康人血清を同様に 1% BSA-PBS-Tween 20-EDTA (0.01M) にて 10 倍希釈し, その 100μl をそれぞれ各ウェルに入れ 37°C 1 時間インキュベーションした. PBS-Tween 20 にて 3 回洗浄後, 500 倍希釈アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG (KPL 社) を 100μl 各ウェルに入れ, 37°C 1 時間インキュベーションを行った. 3 回洗浄後, MgCl₂-0.05M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.8) にて溶解した p-ニトロフェニルリン酸 (片山化学) (2mg/ml) を 100μl 各ウェルに入れ 37°C 3 時間反応させ, 2 波長マイクロプレート比色計 (コロナ MTP-12) を用い 405 nm にて比色測定した. 先に作製した各希釈系列の AHG-C3 複合体溶液も, 同様の操作を行い標準曲線 (図 2) を作製した. この標準曲線より, 免疫複合体量を

図 2 抗 C3 固相 ELISA 法による免疫複合体の標準曲線

AHG に換算して算出した. 対照正常健康人血清では, $1.32 \pm 0.79 \mu\text{g AHG eq/ml}$ ($n=20$) であり, $3 \mu\text{g AHG eq/ml}$ 以上を血清中免疫複合体陽性例とした.

7. 血清 Carcino Embryonic Antigen (CEA) の測定

Roche 社の CEA-EIA キット¹⁵⁾ を用いて測定を行い, 2.5 ng/ml 以上を血清 CEA 陽性例と判定した.

結 果

1. 腫瘍抽出抗原を用いたマイクロスライド法 LAI 試験

喉頭癌関連抗原を用いた LAI 試験の結果を図 3 に示した. H Ep #2 細胞より抽出した喉頭癌関連抗原による LAI 試験では, 対照正常健康人群で, 付着指数 3.22 ± 3.19 であった. 喉頭癌新鮮例 27 例では, 付着指数 8.50 ± 7.96 と対照に比し高値を示し, LAI 試験陽性率は 25.9% (7/27) であった. 一方, 喉頭良性疾患群では, 付着指数 5.66 ± 3.05 であり, 5 例のうち, 付着指数 13 をこえる LAI 試験陽性例は認めなかった. 喉頭以外の頭頸部悪性腫瘍では, 扁平上皮癌と診断された 6 症例で, 付着指数 10.00 ± 3.85 を示し, 喉頭癌症例と同様の高値を示した. また, その LAI 試験陽性率は 16.7% (1/6) であった (表 1).

上顎癌組織よりの抽出抗原を用いた LAI 試験の結果

図 3 喉頭癌抽出抗原を用いた LAI 試験
(● LAI 試験陽性, ○ LAI 試験陰性)

を図 4 に示した。対照正常健康人群では、付着指数 4.10 ± 5.33 であった。上顎癌症例では、付着指数 10.03 ± 8.79 と対照に比し高値を示し、LAI 試験陽性率は 33.3% (6/18) であった。上顎洞良性疾患症例では、付着指数 4.83 ± 3.35 と対照に比し有意の差を認めず LAI 試験陽性例を認めなかった。喉頭癌関連抗原を用いた時と同様に、上顎癌関連抗原使用時も、他の頭頸部扁平上皮癌症例では、付着指数 10.25 ± 5.64 と高値を示し、LAI 試験陽性率は 16.7% (1/6) であった。鼻腔原発悪性リンパ腫の 2 症例では、付着指数 5.50 ± 3.00 であり、いずれも LAI 試験陰性であった (表 1)。

図 4 上顎癌抽出抗原を用いた LAI 試験
(● LAI 試験陽性, ○ LAI 試験陰性)

臨床病期別に喉頭癌症例を分類し検討を加えた結果、病期 I, II 期の早期例では 25.0% (2/8) に LAI 試験陽性例を認め、III 期では、36.4% (4/11) と最も高い陽性率を示し、病期の進行した IV 期では 12.5% (1/8) と陽性率の低下を認めた。手術治療後、あるいは放射線治療後 5 年以上を経て、臨床的に非担癌状態と考えられた 3 例は、いずれも LAI 試験陰性であった (表 2)。

2. KLH を抗原として用いた LAI 試験

KLH にて感作されたマウスより採取した腹腔単核細胞は、KLH の添加により、その粘着能が低下し LAI 反応のおこることが認められた。LAI 反応の経時的变化をみると、感作後 2 週目に付着指数が最高値をとり、4 週を経て LAI 反応が弱まる傾向を認めた (図 5)。

表 1 喉頭癌抽出抗原、上顎癌抽出抗原を用いた、頭頸部悪性腫瘍患者、良性疾患患者における LAI 試験

Tumor extract	Clinical diagnosis	Adherence Index mean $\pm$ SD	Positive rate (%)
Laryngeal Ca.	Laryngeal Ca. (n=27)	*8.50 $\pm$ 7.96	25.9(7/27)
	Benign disease of Larynx (n=5)	5.66 $\pm$ 3.05	0 (0/5)
	Squamous cell Ca. of other sites (n=6)	**10.00 $\pm$ 3.85	16.7(1/6)
	Normal controls (n=9)	3.22 $\pm$ 3.19	0 (0/9)
Maxillary Ca.	Maxillary Ca. (n=18)	*10.03 $\pm$ 8.75	33.3(6/18)
	Malignant Lymphoma (n=2)	5.50 $\pm$ 3.00	0 (0/2)
	Benign disease of Maxillary sinus (n=6)	4.83 $\pm$ 3.35	0 (0/6)
	Squamous cell Ca. of other sites (n=6)	*10.25 $\pm$ 5.64	16.7(1/6)
	Normal controls (n=9)	4.10 $\pm$ 5.53	0 (0/9)

* $p < 0.1$ ** $p < 0.001$

表 2 各臨床病期における LAI 試験陽性率

Clinical stage	No. tested	Positive	% Positive
I, II	8	2	25.0%
III	11	4	36.4%
IV Advanced	8	1	12.5%
Tumor free	3	0	0 %

次に、抗原濃度と LAI 反応との関連をみると、添加した KLH の濃度の上昇とともに、付着指数が上昇し、 $50\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$ 以上ではプラトーを形成した。しかし、牛血清アルブミンの添加では、その濃度の上昇にても LAI 反応はおこらず、KLH 感作マウス腹腔単核細胞では、KLH に特異的に LAI 反応のおこることが認められた (図 6)。

KLH 皮内テストにより感作成立の確認されたヒト末梢血単核細胞と KLH 抗原との LAI 反応も、マウスとほぼ同じパターンをとり、感作後 2 週目にかけ付着指数が上昇し、最高値を示し、LAI 反応が低下した後も再感作を行うことで再び LAI 反応の増強を認めた。すなわち、ヒトの場合にも、抗原感作末梢血単核細胞が、その抗原との免疫応答にて粘着能が低下し、LAI 反応のおこることが認められた (図 7)。

3. LAI 阻止因子の検出

腫瘍抽出抗原に対し、LAI 反応のおこらない LAI 試験陰性例、すなわち喉頭癌、上顎癌症例 27 例につき、血清中 LAI 阻止因子の検出を行った。LAI 反応阻止試験には、KLH による LAI 試験陽性者の LAI 反応を用い、担癌患者血清処理後の LAI 反応の阻止率を検索した。

喉頭癌、上顎癌患者血清処理後の付着指数と対照正常血清処理後の付着指数を図 8 に示した。臨床病期別にみると、病期 I, II 期の早期の喉頭癌症例に比較して、III, IV 期の進行例の担癌患者血清処理例では、著しく付着指数が低下し、LAI 反応が強く抑制されることが判明した。対照群では LAI 反応の強い抑制は認めなかった (図 8)。

阻止指数が 0.7 以上を示し、血清中 LAI 阻止因子が陽性と考えられた症例は、臨床病期別にみると、喉頭癌症例で、I, II 期で 0% (0/6)、III 期 33.3% (2/6)、および IV 期 57.1% (4/7) であり、上顎癌症例では、III 期 50.0% (1/2)、IV 期および進行症例では 50.0%

図 5 KLH 感作マウス腹腔単核細胞を用いた LAI 反応の経時的変化

図 6 KLH 感作マウス腹腔単核細胞を用いた LAI 反応の Dose-Response Curve (感作後 14 日目)

図 7 KKH 感作ヒト末梢血単核細胞における LAI 反応の経時的変化

(3/6) であった。すなわち、病期の進行に伴い、LAI 阻止因子の陽性率の上昇を認めた (表 3)。

4. 担癌患者血清中免疫複合体と LAI 阻止因子
頭頸部悪性腫瘍患者血清中の免疫複合体量、および $3 \mu\text{g AHG eq}/\text{ml}$ 以上を示す免疫複合体陽性例は、喉

図 8 喉頭癌, 上顎癌患者血清処理による KLH-LAI 反応の変化

頭癌症例 29例では, それぞれ $3.22 \pm 5.01 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 20.7% (6/29) であった。臨床病期分類では, I 期 $1.05 \pm 0.09 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 0% (0/4), II 期 $1.22 \pm 0.50 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 0% (0/5), III 期 $1.91 \pm 0.85 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 25% (4/16), および IV 期 $4.78 \pm 4.83 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 50% (2/4) であった。上顎癌症例 16例では, 免疫複合体量, およびその陽性例はそれぞれ $2.19 \pm 1.94 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 31.3% (5/16) であり, 臨床病期分類では, III 期 $1.87 \pm 1.16 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 28.6% (2/7), IV 期および進行例では $2.42 \pm 2.35 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 33.3% (3/9) であった。喉頭癌, 上顎癌症例ともに病期の進行に

伴い免疫複合体量およびその陽性率の上昇がみられた。他の頭頸部悪性腫瘍患者血清の免疫複合体量および陽性率は, 下咽頭癌症例 $1.60 \pm 0.75 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 16.7% (1/6), 上咽頭癌症例 $0.80 \pm 0.23 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 0% (0/5) および悪性リンパ腫症例では $1.12 \pm 0.42 \mu\text{g AHG eq/ml}$, 0% (0/13) であった (表 4)。

発症より長期経過観察が可能であった症例につき LAI 阻止因子と免疫複合体量の変動をみると, 図 9 に示した喉頭癌症例のごとく, 頸部転移の出現とともに LAI 阻止因子 (阻止指数), 免疫複合体量がともに上昇する症例を経験した。同時に測定した CEA 値には変化

表 3 喉頭癌，上顎癌患者血清における阻止指数(B.I.) および LAI 阻止因子(B.F.) 陽性率

Clinical stage	Clinical diagnosis	*B.I. mean±SD	**B.F. Positive rate(%)
I, II	Laryngeal Ca. (n=6)	0.20±0.20	0 (0/6)
III	Laryngeal Ca. (n=6)	0.39±0.36	33.3 (2/6)
	Maxillary Ca. (n=2)	0.42±0.34	50.0 (1/2)
		0.39±0.27	37.5 (3/8)
IV	Laryngeal Ca. (n=7)	0.56±0.26	57.1 (4/7)
	Maxillary Ca. (n=6)	0.48±0.28	50.0 (3/6)
		0.52±0.26	53.8 (7/13)

**B.F. Positive: B.I. > 0.7

*B.I.: Blocking Index

**B.F.: Blocking Factor

表 4 頭頸部悪性腫瘍患者における血清免疫複合体

Clinical diagnosis	Immune Complex mean±SD (μgAHGeq/ml)	Positive rate (%)
Laryngeal Ca. (n=29)	3.22±5.01	20.7 (6/29)
stage I (n=4)	1.05±0.09	0 (0/4)
II (n=5)	1.22±0.50	0 (0/5)
III (n=16)	*1.91±0.85	25.0 (4/16)
IV (n=4)	**4.78±4.83	50.0 (2/4)
Maxillary Ca. (n=16)	*2.19±1.94	31.3 (5/16)
stage III (n=7)	1.87±1.16	28.6 (2/7)
IV (n=9)	*2.43±2.35	33.3 (3/9)
Hypopharyngeal Ca. (n=6)	1.60±0.75	16.7 (1/6)
Nasopharyngeal Ca. (n=5)	0.80±0.23	0 (0/5)
Malignant Lymphoma (n=13)	1.12±0.42	0 (0/13)
Normal Controls (n=20)	1.32±0.79	—

*p<0.1

**p<0.01

Case S.Y. 54/M T₃N₁M₀ Laryngeal Ca.

図 9 喉頭癌症例 (S.Y.) における，阻止指数，血清免疫複合体，および癌胎児抗原 (CEA) の変化と臨床経過

Case I.T. 64/M T₃N₂M₀ Laryngeal Ca.

図 10 喉頭癌症例 (I.T.) における阻止指数，血清免疫複合体，および癌胎児抗原 (CEA) の変化と臨床経過

表 5 LAI 試験, LAI 阻止因子と血清免疫複合体, および癌胎児抗原 (CEA) との関連

	LAI	B. F.	I. C. mean±SD ($\mu\text{gAHG eq/ml}$)	Positive rate	CEA mean±SD (ng/ml)	Positive rate
group A (n=8)	Positive	—	1.58±1.04	12.5%(1/8)	3.29±3.95	25.0%(2/8)
group B (n=7)	Negative	Negative	2.27±1.15	28.6%(2/7)	1.23±1.18	14.3%(1/7)
group C (n=6)	Negative	Positive	6.15±4.26	50.0%(3/6)	2.60±2.66	33.3%(2/6)

A:C $p<0.025$ B:C $p<0.1$

I. C. : Immune Complex

LAI : Leukocyte Adherence inhibition

B. F. : Blocking Factor

と認めなかった。図 10 の喉頭癌症例のごとく、腫瘍の増大とともに CEA 値が上昇し、LAI 阻止因子阻止指数、免疫複合体量はともに低値にとどまり、変化に乏しい症例も経験した。

次に、腫瘍抽出抗原を用いた LAI 試験、血清中の LAI 阻止因子、免疫複合体、および CEA の四者を同時に検査し得た症例につき、LAI 試験陽性群を A 群、LAI 試験陰性を示し血清 LAI 阻止因子も陰性を呈した群を B 群、および LAI 試験陰性かつ LAI 阻止因子陽性群を C 群として比較検討した。A 群の血清中免疫複合体は、 $1.58\pm 1.04\mu\text{g AHG eq/ml}$ であり、血清中免疫複合体陽性率は 12.5%(1/8) であった。B 群ではそれぞれ $2.27\pm 1.15\mu\text{g AHG eq/ml}$, 28.6%(2/7), C 群では $6.15\pm 4.26\mu\text{g AHG eq/ml}$, 50%(3/6) と LAI 阻止因子陽性群で免疫複合体が高値を示し、A 群に比し有意 ($p<0.025$) に高い値を示した。一方 CEA については、A 群で CEA 値 $3.29\pm 3.95\text{ng/ml}$, CEA 陽性率は 25.0%(2/8), B 群ではそれぞれ $1.23\pm 1.18\text{ng/ml}$, 14.3%(1/7), および C 群では $2.60\pm 2.66\text{ng/ml}$, 33.3%(2/6) であり各群に特に差を認めなかった (表 5)。

考 察

1. 頭頸部担癌患者の免疫動態

担癌患者の免疫動態の検索としては、非特異的免疫能, carcino fetal antigen, 各種 isozyme などに代表される腫瘍マーカーの測定、腫瘍特異抗原を用いた検索などがなされている。頭頸部領域悪性腫瘍に関しては、非特異的免疫能の検索として、遅延型過敏反応を利用した皮内テストの成績¹⁶⁾、T リンパ球を主体とした末梢血リンパ球の動態¹⁷⁾¹⁸⁾、などが報告されており、さらに腫瘍マーカーとしての carcino fetal antigen も実際に広く実地臨床に応用されている。しかし、腫瘍抗原に対する免疫能という点での報告は少ない。頭頸部悪性腫瘍患者

の抗腫瘍免疫能を検索する上で、その主体を占める扁平上皮癌の腫瘍抽出抗原を用いた白血球粘着阻止 (LAI) 試験は、多くの有用な情報を提供してくれると考えられる。また、頭頸部扁平上皮癌のうち、上顎癌の臨床的特殊性も、腫瘍抗原の面から検討する必要があると思われる。すなわち、上顎癌は他の悪性腫瘍に見られない進展形式をとることがあり、その治療法も腫瘍の減量手術という他の部位の悪性腫瘍では適応され難い方法が用いられる場合もあり、腫瘍免疫学的に興味深い腫瘍の一つである。このような上顎癌の免疫学的特殊性を解く一つのアプローチとして、腫瘍抽出抗原による LAI 試験は、極めて有用な手段となり得ると考えられる。

2. 白血球粘着阻止 (LAI) 試験について

担癌状態にある患者末梢血単核細胞に同一組織腫瘍よりの抽出抗原を作用させることにより、担癌患者単核細胞のガラス面への粘着能が低下する現象は 1972 年 Halliday¹⁾ が報告し、白血球粘着阻止 (LAI) 現象と呼ばれている。その後この LAI 反応の組織特異性が注目され、担癌患者の診断面への応用、担癌患者免疫能の検索を目的として、多くの施設でその意義や方法論が検討されてきた。実験腫瘍のみならず、ヒトの悪性黒色腫、乳癌、肺癌、前立腺癌など、多岐にわたる悪性腫瘍において検討され、それぞれの腫瘍抽出抗原に特徴的な反応が認められると報告されている⁶⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。

LAI 試験は当初より種々の方法論が考案されている。Halliday の報告した血球計算盤法¹⁾をはじめ、ガラスチューブ法⁹⁾、マイクロプレート法²²⁾、マイクロスライド法⁸⁾、などである。このように手技が多岐にわたると、方法論による成績の差異が問題となるが、これについては 1979 年にコード化されたサンプルを各施設に送付し、いずれの施設にても同一の結果が得られたことで、ある程度問題は解決したとされている²³⁾。しかし各方法論の LAI 現象のメカニズムは異なるとの報告もある²⁴⁾。血

球計算盤法は手技にかなり熟練を要するため、再現性の高い方法として、ガラスチューブ法、マイクロスライド法が考案された。著者もこの二者を用いて LAI 試験を行った。ガラスチューブ法では、測定に客観性を持たせるため、細胞数の算定を自動血球計算器にて行い、良好な結果を得た。Yonemoto⁹⁾ は同様の考え方より、マイクロスライド法に image analyzer を用い LAI 試験を行い、臨床検査レベルへの応用を示唆している。

LAI 反応のメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。Halliday²⁵⁾ は感作 T リンパ球が抗原感作の後にリンホカイン様物質である Leukocyte Adherence Inhibition Factor (LAIF) を産生し白血球の粘着能を阻止すると推定している。一方 Grosser ら²⁶⁾ は抗原応答は monocyte でありその Fc receptor 上へ、特異抗原と cytophilic antibody の複合物が結合することで粘着能の低下がおきると考えている。マウスを用いた実験では、Myers ら²⁷⁾ によれば、T リンパ球、B リンパ球のみでは LAI 反応はおこらず、マクロファージの関与が必要であり LAIF の effector cell はマクロファージであると報告している。Koppi ら²⁸⁾ によれば Thy-1, Ly-1 を表面マーカーに持つ細胞が LAIF を産生するとしている。ヒトに関しては Powell ら²⁹⁾, Tayler ら³⁰⁾ がそれぞれ LAI 反応には IgG Fc receptor 陽性 T リンパ球が必要であると報告している。

3. LAI 試験の問題点

LAI 試験の問題点は、反応の主体となる腫瘍抽出抗原の均一性であり、この点は多く指摘されている³¹⁾。抗原抽出方法も 3 M KCl²²⁾ PBS¹⁾ を用いるなど報告者により異なり、抽出抗原により正常者に非特異的に LAI 反応をおこす場合がある。これは抽出抗原があくまで粗抗原であることに由来し、抽出物中に存在する組織適合抗原、免疫複合体、正常組織抗原等が反応を修飾することが十分に考えられる。上述のように LAI 試験には、まだ未解決の問題が残されているが、簡便かつ短時間で検査でき、腫瘍組織に特徴的な反応を認める検査法であるという点を考え合わせると、現時点における腫瘍免疫能の検索方法としては最も有用なものの一つに挙げられる。現在さらに特異性を高めるため種々の工夫がなされ、Prostaglandin E2 を用いると LAI 試験において組織型の特異性が高まるとの報告がある³²⁾。また正常組織抗原の混入をさけるため、腫瘍 cell line を用いて良好な成績を得たとの報告もあり³³⁾³⁴⁾、著者も喉頭癌に対しこの手法を用い、喉頭癌由来の cell line である H Ep

#2 を用い LAI 試験を行った。

4. LAI 試験の頭頸部悪性腫瘍への応用

頭頸部悪性腫瘍患者の免疫能の検索法として LAI 試験を用いた報告は少なく、喉頭癌症例、口腔内扁平上皮癌症例の報告がみられるのみで、上顎癌症例についての報告はみられず、著者の報告が最初といえる。LAI 試験の判定基準は、一般に非担癌状態の正常人の LAI 反応を基準とし境界を定め、これを基に陽性、陰性が判定されている。腫瘍の種類、報告者によりその陽性率は 30～100%とさまざまである。頭頸部領域では、喉頭癌症例で Hasek ら³⁾ の 81.8% (18/22), Holan ら²⁾ の 51.7% (4/7), 口腔内扁平上皮癌症例では、由井ら⁵⁾ の 95.8% (23/24) と LAI 試験陽性率の高い報告がみられる。一方、Vetto ら⁴⁾ は頭頸部扁平上皮癌 111 例に対し LAI 試験を行い、その陽性率は 32.4% (36/111) であったと報告している。今回の著者の成績は、喉頭癌症例で 25.9%, 最も陽性率の高い病期Ⅲ期で 36.4% であり、上顎癌症例では 33.3% の陽性率を認めた。対照正常健康人に比し、付着指数は高値をとるものの、LAI 試験陽性率からは、Hasek ら、由井らの報告に比し低値を取り、Vetto らの報告に近いといえる。この要因は、使用した腫瘍抽出抗原の抗原性が関与している可能性があるが、著者は担癌患者血清中に出現する LAI 阻止因子の関与が最も重要と考えている。すなわち、LAI 阻止因子の存在が LAI 試験の陽性率に大きく影響するため LAI 試験により担癌患者の免疫能を検索するためには、LAI 反応および LAI 阻止因子を同時に検索する必要があり、どちらか一方のみでは抗腫瘍免疫能を正確に把握できないと考えられる。

5. LAI 阻止因子

LAI 反応は腫瘍免疫の分野のみならず、他の免疫疾患への応用も試みられ、関節炎³⁵⁾、膠原病³⁷⁾、薬物アレルギー³⁸⁾、多発性硬化症³⁹⁾ などに対し、その原因となる抗原の検索等に LAI 試験が応用されている。この意味では LAI 反応は単に腫瘍特異的におこる免疫現象ではなく、抗原感作状態にある単核細胞におこる一般的な免疫現象と考えられている。著者は KLH を抗原とし、KLH に感作されたマウス腹腔単核細胞、ヒト末梢血単核細胞に LAI 反応のおこることを確かめ、患者血清における LAI 阻止因子の検出に用いた。ヒトにおいては遅延型過敏反応による皮内テスト陽性者に、用いた抗原に対し LAI 反応のおこることが報告されており、PPD を用いてツ反強陽性者の末梢血単核細胞で LAI 反

応のおこること⁴⁰⁾、さらに DNCB 陽性者にも同様に LAI 反応がおこることが報告されている⁴¹⁾。著者の KLH を用いた KLH 皮内テスト陽性者で認められた LAI 反応も、上述の PPD や DNCB の場合と同様のメカニズムにより引き起こされたものと考えられる。ツ反陽性者を用いた LAI 試験の場合、その陽性率にかなりのばらつきがみられ、この点 KLH は抗原性が高く、皮内注射のみで感作され、かつ人体に対し無害であり、LAI 反応を一定して引き起こすことが認められた。また KLH 再感作にても LAI 反応が認められた。この意味で LAI 反応のメカニズムの解析や、LAI 阻止因子の検出に KLH を用いた LAI 試験は有用と思われた。

担癌患者血清中には種々の LAI 反応を修飾する因子が出現することが知られている。LAI 阻止因子のみならず、LAI 反応を特異的に引き起こす Arming Factor、LAI 阻止現象を逆に阻止する Un-blocking Factor が存在するとされる。Arming Factor については Thomson ら²⁶⁾ によれば、腫瘍関連抗原に対する cytophilic antibody が抗原との複合物をつくり、これが非担癌正常人の血球に作用し、LAI 反応をおこすものと考えている。Arming Factor を用い、担癌患者血清のみにて LAI 試験の応用の試みもなされている³⁵⁾⁴³⁾。

LAI 阻止因子は Halliday ら¹⁾ が報告し、担癌生体においては腫瘍の増大に従い LAI 反応を抑制する因子が担癌生体血清中に出現することを認めた。この LAI 反応の抑制はリンパ球上の腫瘍抗原に対する受容体が過剰抗原によりブロックされるためと考えられた⁴⁴⁾。ヒトの担癌状態における LAI 阻止因子の検索でも、腫瘍の増大、病期の進行に従い LAI 反応が低下し、担癌患者血清中に LAI 阻止因子が高率に出現することが報告されている⁶⁾。マウスにおける LAI 阻止因子の検索では、LAI 阻止因子陽性例で T 細胞 サプレッサー活性の上昇を認めたとされ⁴⁵⁾、また LAI 阻止因子は抗 I-J 抗体にてその活性が失われることより Major Histocompatibility Complex (MHC) のうち、特に I-J subregion により決定される抗原が関与していると報告されている⁴⁶⁾。特にこの因子は サプレッサー T 細胞が産生すると報告もある。また、LAI 阻止因子と免疫複合体との関連性を示唆する報告もみられる⁴⁷⁾。

6. LAI 阻止因子検出の意義

今回の LAI 試験陰性を示した担癌患者血清中の LAI 阻止因子の検索では、病期の進行したⅣ期、進行癌症例では LAI 試験陰性例の半数以上に LAI 阻止因子の陽

性例を認め、腫瘍抗原を用いた LAI 試験の陰性化に大きく関与していることを認めた。経過観察し得た症例では、再発、転移とともに LAI 阻止因子の血清中出現を認めた症例もあり、担癌患者の抗腫瘍免疫能の低下のパラメーターとして、阻止因子検出の有用性が示唆された。LAI 阻止因子の検出には、常に LAI 反応陽性を示す系を持つ必要がある。今回著者が用いた KLH を抗原とした LAI 試験は非特異的な免疫反応といえる。しかし、腫瘍特異的な LAI 阻止因子は、また他の非特異的な免疫反応の抑制活性を持つとされる報告もある⁴⁷⁾。反応系が常に一定に得られる点から、KLH を抗原とした LAI 試験は、担癌患者血清中 LAI 阻止因子の検出法として合理的かつ有用な方法と考える。

7. LAI 阻止因子と免疫複合体

前述のごとく、LAI 阻止因子と免疫複合体とは深く関連すると報告されている⁴⁷⁾。血清中免疫複合体は、種々の疾患、病態にて血清中に出現することが認められており、悪性腫瘍、特に悪性黒色腫、結腸癌などで高値を示すとされている。病期の進行とともに上昇を示す場合もあり、予後との関連性も報告されている⁴⁸⁾。著者は LAI 試験、LAI 阻止因子と関連するパラメーターを検索する目的で、頭頸部悪性腫瘍患者血清中の免疫複合体を、抗 C3 固相 ELISA 法を用いて測定した。今回の成績では、 $3 \mu\text{g AHG eq/ml}$ 以上の高値を示し血清免疫複合体陽性と考えた症例は、喉頭癌症例で 20.7%、上顎癌症例では 31.3% であり、他の頭頸部腫瘍では、悪性リンパ腫、上咽頭癌ともに低い陽性率であった。喉頭癌、上顎癌症例では、病期の進行とともに免疫複合体量も上昇の傾向がみられ、従来の他領域の報告と一致する。LAI 阻止因子との関連をみると、LAI 阻止因子の出現、消退と免疫複合体の値は、同様の変動を示すことが認められ、LAI 阻止因子陽性群と腫瘍抗原に対する LAI 試験陽性群では、LAI 阻止因子陽性群の免疫複合体量は有意に高値を示し、陽性率の比較でも、LAI 阻止因子と免疫複合体との関連性が示唆された。この両者が同一因子であるとする報告もあるが⁴⁷⁾、今回の結果からは推論の域を脱し得ない。担癌患者の免疫学的なパラメーターとして、CEA を同時に測定したが、CEA と LAI 阻止因子との関連性は認められなかった。

腫瘍免疫の分野の中で、担癌患者の免疫能の測定方法として LAI 試験はいまだ解決しなくてはならない問題点を残すものの、担癌生体の抗腫瘍免疫能の測定と、その免疫能を抑制する因子の測定という異なる二つの免疫

動態を同様の方法にて簡便に測定できる有用な手段といえる。今後さらに癌診断、担癌患者の予後推定などへの応用の可能性を追及する必要があると考える。

ま と め

1. LAI 試験を用いて頭頸部領域における扁平上皮癌患者の免疫能を検索した。同一組織型腫瘍抽出抗原に対する LAI 試験陽性例は、喉頭癌症例 25.9%, 上顎癌症例 33.3% にみられ、付着指数は、対照、良性疾患群に比し高値を示した。

2. 臨床病期の進行とともに LAI 試験陽性率は低下傾向を示した。

3. KLH を抗原とし、KLH 感作単核細胞に LAI 反応のおこることがマウス、ヒトそれぞれに認められた。

4. 腫瘍関連抗原による LAI 試験陰性を示した喉頭癌、上顎癌症例の血清中に LAI 反応を抑制する LAI 阻止因子の出現を認めた。阻止因子の検出は、KLH を抗原とした LAI 反応の抑制率を用いた。喉頭癌Ⅰ、Ⅱ期の症例では、LAI 阻止因子陽性率は 0% であり、喉頭癌、上顎癌Ⅲ期で 37.5%, Ⅳ期で 53.8% の陽性率を認めた。病期の進行に従い LAI 阻止因子の陽性率は上昇傾向を認めた。

5. 頭頸部悪性腫瘍患者血清中の免疫複合体を抗 C3 固相 ELISA 法にて測定し、LAI 阻止因子との関連を検討した。血清免疫複合体陽性率は、喉頭癌症例で 20.7%, 上顎癌症例で 31.3% であり、悪性リンパ腫、上咽頭癌では陽性例を認めなかった。喉頭癌、上顎癌症例では病期の進行とともに免疫複合体量は上昇傾向を示した。LAI 阻止因子陽性例では、免疫複合体量が高値を示し、阻止因子陰性例に比し有意の差を認めた。また臨床経過にて両者は同様の変動を示すことが多く、両者の関連性が示唆された。

参 考 文 献

- Halliday WJ and Miller S: Leukocyte adherence inhibition: A simple test for cell mediated tumor immunity and serum blocking factor. *Int J Cancer* 9: 477-483, 1972.
- Holan V, Sibl O and Hasek M: Monitoring of anti-tumor immunity in patients with larynx cancer by tube leukocyte adherence inhibition assay. *Cancer Res* 39: 651-653, 1979.
- Hasek M, Holan V, Sibl O et al: Application of tube LAI assay in larynx cancer patients. *Neoplasma* 28: 685-689, 1981.
- Vetto RM, Burger DR, Vandenbark AA et al: Changes in tumor immunity during therapy determined by leukocyte adherence inhibition and dermal testing. *Cancer* 41: 1034-1039, 1978.
- 由井俊平 菅原利夫 村松智弘 藤田訓也 作田正義 他: 頭頸部扁平上皮癌に対する LAI assay の診断的価値 日本癌治療学会報 15: 339-346, 1980.
- Halliday WJ, Maluish A and Isbister WH: detection of anti-tumor cell mediated immunity and serum blocking factor in cancer patients by leukocyte adherence inhibition test. *Brit J Cancer* 29: 31-35, 1974.
- 日本頭頸部腫瘍学会編: 頭頸部癌取り扱い規約, p. 57-81, 金原出版, 1982.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AC et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- Yonemoto RH: Clinical application in breast cancer assessment of immune status by the leukocyte adherence inhibition test (edited by Thomson DMP): p. 98-101, Academic Press, New York. 1982.
- Grosser N and Thomson DMP: Cell mediated anti-tumor immunity in breast cancer patients evaluated by antigen induced leukocyte adherence inhibition in test tube. *Cancer Res* 35: 2571-2579, 1975.
- Garvey JS: Method in immunology, 3rd edition (edited by Garvey JS et al): p. 135-139, The Benjamin/Cummings, Massachusetts, 1977.
- 奥田正治 西戸孝昭 宮坂信之: 新たな遅延型アレルギー皮膚反応, とくに PHA 反応と KLH 反応 医学のあゆみ 102: 8-12, 1977.
- Pereira AB, Theofilopoulos AN and Dixon FJ: Detection and partial characterization of circulating immune complexes with solid-phase anti-C3. *J Immunol* 125: 763-770, 1980.
- Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.

- 15) 内田幸男・松崎広子: CEA「ロシュ」-EIA キットに関する基礎的検討. 臨床検査・機器・試薬 5: 597-601, 1981.
- 16) Lundy J, Wanebo H, Pinky C et al: Delayed hypersensitivity reactions in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Am J Surg* 128: 530-533, 1974.
- 17) Parker R, Alexander S, Shabeen OH et al: On the immunology of head and neck cancer. *J Laryngol Otol* 89: 687-695, 1975.
- 18) Mason JM, Kitchens GG, Easthan RJ et al: T lymphocytes and survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol* 103: 223-227, 1977.
- 19) Flores M, Marti JH, Grosser N et al: An overview: Anti-tumor immunity in breast cancer assayed by tube leukocyte adherence inhibition. *Cancer* 39: 494-505, 1977.
- 20) Urist MM, Boddie AW Jr, Holmes EC et al: Capillary tube leukocyte adherence: An assay for cell mediated immunity in cancer patients. *Int J Cancer* 17: 338-341, 1976.
- 21) Macfarlane JK, Thomson DMP, Phelan K et al: Predictive value of tube leukocyte adherence inhibition (LAI) assay for breast, colorectal, stomach and pancreatic cancer. *Cancer* 49: 1185-1193, 1982.
- 22) Goldrosen MH, Howell JH and Holyoke ED: Demonstration of the microtest version of the leukocyte adherence inhibition assay. *Cancer Res* 39: 630-632, 1979.
- 23) Goldrosen NH: Demonstration and evaluation of leukocyte adherence inhibition assay. *Cancer Res* 39: 624, 1979.
- 24) Schimke R, Holan V, Sibl O et al: Comparison of the hemocytometer and tube modifications of the leukocyte adherence inhibition assay; II Application of the both modifications for detection of anti-tumor immunity in man. *Neoplasma* 28: 257-264, 1981.
- 25) Halliday WJ: Histological background and aspects of the mechanism of leukocyte adherence inhibition. *Cancer Res* 39: 558-563, 1979.
- 26) Thomson DMP and Grosser N: Immunological mechanisms of tube leukocyte adherence inhibition. *Cancer Res* 39: 576-581, 1979.
- 27) Myers W, Okeefe ML and Gregory S: Lymphoid source and target of murine leukocyte adherence inhibition factor (LAIF). *Immunol Letter* 3: 277-282, 1982.
- 28) Koppi TA and Halliday WJ: Further characterization of the cells involved in leukocyte adherence inhibition with murine tumor extracts. *Cell Immunol* 66: 394-406, 1982.
- 29) Powell AE, Birch RE, Murrell H et al: Cell population in leukocyte adherence inhibition: Requirement for T lymphocytes with IgG Fc receptors. *Immunol* 46: 689-696, 1982.
- 30) Taylor SG, Saffold PC, Brauh DP et al: T cell involvement in the leukocyte adherence inhibition phenomenon. *JNCI* 68: 549-554, 1982.
- 31) Powell AE: Assessment of immune status by the leukocyte adherence inhibition test (edited by Thomson DMP) p. 44-48, Academic Press, New York, 1982.
- 32) Kaneti J, Thomson DMP and Reid EC: Prostaglandin E2 affects the tumor immune response in prostatic carcinoma. *J Urol* 126: 65-70, 1981.
- 33) Kotlar HK, Eker P, Brennhord I et al: Leukocyte adherence inhibition assay in pulmonary neoplasia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18: 141-146, 1982.
- 34) Machida S, Yamauchi M, Sato M et al: An evaluation of LAI microassay using colorectal cancer cell line. *Gann* 71: 387-392, 1980.
- 35) Sanner T, Kotlar HKR and Eker P: Immune responses in lung cancer patients measured by a modified leukocyte adherence inhibition test using serum. *Cancer Letters* 8: 283-290, 1980.
- 36) Appelboom T, Govaerts A and Wybran J: Leukocyte adherence inhibition test in arthritis. *Lancet* July 8: 62-65, 1978.
- 37) 松本美富士 江口敬子: 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者における Leukocyte Adherence in-

- hibition (LAI) 試験の検討 アレルギー 29: 187-193, 1980.
- 38) 松本美富士 江口敬子 加藤芳郎: 薬物アレルギー患者における Leukocyte Adherence Inhibition (LAI) 試験の応用 臨床免疫 13: 329-395, 1981.
- 39) Angers JW, Korik L, Franklin LS et al: The leukocyte adherence inhibition assay as a diagnostic test for multiple sclerosis. J Lab Clin Med 93: 528-534, 1978.
- 40) Bullen AW and Losowsky MS: Comparison of a leukocyte adherence inhibition test with the leukocyte migration inhibition test and skin reactivity to PPD. Clin Exp Immunol 31: 408-413, 1978.
- 41) Koppi TA, Maluish AE and Halliday WJ: The cellular mechanism of leukocyte adherence inhibition. J Immunol 123: 2255-2260, 1979.
- 42) Holt PG, Fimmel PJ, Finlay-Jones LM et al: Evaluation of the microplate leukocyte adherence inhibition test and its reproducibility, sensitivity and relationship to other tests of cellular immunity. Cancer Res 39: 564-569, 1979.
- 43) Goldrosen MH, Dasmahapatra K, Jenkins D et al: Microplate leukocyte adherence inhibition assay in pancreatic cancer. Detection of specific anti-tumor immunity with patients' peripheral blood cells and serum. Cancer 47: 1614-1619, 1981.
- 44) Thomson DMP, Tataryn DN, Schwartz R et al: Abrogation of the phenomenon of leukocyte adherence inhibition by excess circulating tumor antigen. Eur J Cancer 15: 1095-1106, 1979.
- 45) Raina S, Russo AJ, Jenkins D et al: Role of T cells in the mechanism of reactivity of the microplate leukocyte adherence inhibition assay. Cancer Res 41: 3950-3955, 1981.
- 46) Koppi TA, Halliday WJ and McKenzie IFC: Regulation of cell-mediated immunologic reactivity to Moloney murine sarcoma virus-induced tumors. II Nature of blocking and unblocking factors in serum. JNCI 66: 1097-1102, 1981.
- 47) Tanaka F, Yonemoto RH and Waidman SR: Blocking factor in sera of breast cancer patients. Cancer 43: 838-847, 1979.
- 48) Theofilopoulos AN, Wilson CB and Dixon FJ: The Raji cell radioimmunoassay for detecting immune complexes in human sera. J Clin Invest 57: 169-182, 1976.

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲下さいました札幌医科大学耳鼻咽喉科学教室、形浦昭克教授に深謝致します。またご校閲を賜りました第一病理学教室、菊地浩吉教授に心より感謝の意を表します。直接ご指導頂いた、山中昇講師に感謝の意を表すとともに、教室員の諸兄のご協力に感謝致します。

なお、本論文の一部は第7回、第8回日本頭頸部腫瘍学会において発表した。

(原稿受付 昭和 59. 9. 17日)

別刷請求先 〒060 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学耳鼻咽喉科学教室 氷見 徹夫