

学 位 論 文 題 名

Lymphokine - activated killer (LAK) 細胞の
腫瘍組織集積性と養子免疫療法の効果

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

養子免疫療法の治療効果の発現は、移入されたエフェクターが効率よく標的腫瘍組織に到達し、そこに滞留集積するか否かに左右される。そこで、マウス実験腫瘍に対するlymphokine-activated killer (LAK) 細胞養子移入の治療効果の化学療法併用による増強を腫瘍組織集積性の観点から検討した。また、化学療法併用によるLAK細胞の腫瘍集積性増強の機序を検索した。さらに、動物実験の成績の臨床的意義を明らかにするために根治的外科手術を受けた原発性肝癌患者を対象とし、化学療法と自己脾臓LAK細胞移入との併用効果の検討を試みた。

II. 動物実験

(1) 材料と方法

動物：雌性8週齢C57BL/6マウスを用いた。

腫瘍：C57BL/6マウスの3-メチルコラントレン誘発線維肉腫BMT-11あるいは肺癌3LLの培養株細胞 1×10^6 個を背部皮下移植して担癌状態としたマウスを使った。

エフェクター細胞：

LAK細胞：正常マウス脾細胞をヒトリコンビナントインターロイキン2 (rIL-2) $1,000 \text{ JRU/ml}$ を含むRPMI1640+10%FCS培地で 37°C 、5% CO_2 条件下4日間培養して誘導した。

Cytotoxic T lymphocyte (CTL)：BMT-11培養細胞 1.0×10^7 個/ 10 ml に ^{60}Co 8,000 radsを照射して不活化し腫瘍細胞ワクチンを作成した。このワクチンを背部皮下に2週間隔で2回接種した。最終免疫から2週間後にこのマウス脾細胞をResponderとし、Mitomycin C $100 \mu\text{g/ml}$ で1時間処理したBMT-11細胞をStimulatorとして、R:S比=40:1でリンパ球腫瘍混合培養し5日目の増殖リンパ球をCTLとした。

細胞障害活性の測定：エフェクターの細胞障害活性は4時間クロム浮遊試験により，BMT-11，YAC-1，3LLを標的細胞として測定した。

治療方法：移植腫瘍径が平均約5mmに達した10日目に化学療法としてCyclophosphamide (CY) 150mg/kg を静脈内投与した。この4日後に，LAK細胞，或はCTLの 1×10^7 個の尾静脈内移入1回とrIL-2 1×10^4 JRU/日の連続5日間静脈内投与とによる養子免疫療法を開始した。

腫瘍集積率測定：エフェクター細胞を 111 Indium-oxineで標識して移入し，24時間後屠殺して主要臓器と腫瘍組織を摘出し重量及び放射活性を測定し，各臓器と腫瘍組織1g当りにどの程度エフェクターが集積するのかを示す%dose/gの値を計算した。

LAK-attractant活性の測定：腫瘍移植後10日目にCY 150mg/kg静脈内投与を行い，その後経日的に腫瘍組織を摘出した。これを無血清培地で24時間培養し，上清をConditioned medium (CM)として採取した。このCM内のLAK-attractant活性を寒天内遊走法によって測定した。LAK細胞 2.0×10^5 個を中心well内に入れ，周囲のouter well内にはControl mediumとConditioned mediumを別々に各10 μ lずつ入れた。これを37℃，5%CO₂で24時間培養すると，中心well内の細胞は移動し全体として卵円形の分布を示した。測定サンプルであるCMによる移動距離AとControl mediumによるrandom migrationの距離Bとを顕微鏡下測定し，これらの差(A-B)をLAK-attractant活性とした。

LAK-attractantの性質：CY投与後5日目の腫瘍組織のCMを56℃ 30分間，100℃ 10分間処理，またpH 2.0と7.0の2条件でも処理しLAK-attractant活性を測定した。さらに，HPLCゲル濾過によって50のfractionに分け各fractionのattractant活性を測定した。

(2) 結果

Effector細胞の活性：エフェクターの細胞障害活性値は，E:T=20:1において，標的YAC-1，3LL，BMT-11細胞に対して，LAK細胞はすべて60%前後を示し，CTLはBMT-11に対して最も高い65.6%を示したが，これ以外の2種の標的細胞にも30%程度の弱い障害活性を有していた。新鮮脾細胞はすべて標的細胞を障害しなかった。

治療効果とEffector細胞の腫瘍集積性：未治療群，CY単独群，LAK・rIL-2単独群の3群では，それぞれ8例中全例のマウスが死亡し，平均生存期間もそれぞれ 45.3 ± 6.7 ， 51.8 ± 5.3 ， 45.9 ± 5.6 日と有意差はなかった。CY+LAK・rIL-2群は死亡率63%(5/8)，死亡マウスの平均生存期間 64.4 ± 3.9 日と有意な効果を認め，LAK細胞の腫瘍集積率はLAK・rIL-2単独の7倍以上に増強された。一方，CTL・rIL-2単独はLAK・rIL-2単独と異なりある程度の治療効果を示し，集積率も単独で十分高かったが，CY併用によるそれらの増強はLAKの場合より小さかった。

LAK-attractant の活性及び性質：BMT-11, 3LLの両者で非治療腫瘍組織のCM中には検出されないLAK-attractant活性が化学療法を実施した3日後から腫瘍組織のCM中に検出されるようになった。また, attractant活性はCY投与後5日目にピークとなり, 腫瘍組織中の宿主反応細胞が産生していることが明かになった。

また, 56℃ 30分処理では活性はほぼ完全に残ったが, 100℃ 10分処理では消失した。pH 7.0から2.0へ下げることにより活性がほぼ完全に消失した。HPLCゲル濾過では, 分子量4～5万と1～2万の大きく2つの活性部分の存在が推定された。

Ⅲ. 臨床試験

対象：年齢75歳以下, Performance statusが0あるいは1, 他の悪性疾患の既往がない, 癌が肉眼的に根治切除されている, の4点を条件として北大第一外科入院患者から対象患者を選択した。

方法：免疫化学療法群と化学療法群の2群に分け, 各群15例ずつを封筒法で無作為抽出した。全員に対しリザーバーを腹部皮下に埋設し治療は全てこの動脈ルートを用いた。また, 全例摘脾し免疫化学療法群ではLAK細胞誘導に用いた。術後8日目にアドリアマイシンを全例に動注し, 免疫化学療法群ではその2日後に自己脾細胞より調整したLAK細胞初回移入とrIL-2動注を開始し, 原則としてLAK細胞は合計3回移入し, rIL-2 (3.5×10^5 JRU/日)は3週間にわたって毎日投与した。

結果：各群12例ずつが評価可能と判断され, 両群間で背景因子にはほとんど有意差はなかった。免疫化学療法群では, 2回移入の2例を除いて残り10例が3回LAK細胞の移入を受け, 移入総数は $3.2 \sim 18.0 \times 10^3$ 個であった。平均観察期間12カ月の時点における再発者数は, 前者2例, 後者4例で数の上では前者が良好であり, 累積無再発率も全体としての有意差はないが, 4カ月以降には養子免疫療法付加による再発抑制傾向が認められた。

Ⅳ. 考 察

養子免疫療法の効果は移入したエフェクターの腫瘍組織集積率に依存することを動物実験で明らかにした。しかも, この集積率を適切な化学療法の併用により増強させ, 治療効果を向上せしめうることも明らかにした。このような変化は, LAK細胞とCTLの化学療法による増強パターンの違いから考えて, 単なる体内suppressorの抑制等のメカニズムによるのではないと考えられる。この集積性増強の機序の一つとして化学療法

後腫瘍組織からLAK-attractant産生が明らかになった。これは腫瘍組織中の宿主反応細胞によって産生されており、非治療腫瘍組織からは産生されなかった。この因子は、検索した範囲内では、分子量1～5万の2種のもので、CM中のTNFとIL-8を測定してみたが陰性であったことから、これら以外の既知の因子あるいは未知の因子の存在が現在考えられている。

以上の実験的免疫化学療法の治療効果は、原発性肝癌根治切除術後の患者においても、アドリマイシンと自己脾臓LAK細胞を用いた免疫化学療法により術後再発抑制傾向として観察された。

V. 結 語

- 1) 養子免疫療法の治療効果は、移入したエフェクターの腫瘍集積性に依存することを明らかにした。
- 2) この腫瘍集積性は、適切な化学療法併用により増強された。
- 3) 化学療法による移入LAK細胞集積性増強の一機序として、腫瘍組織内宿主反応細胞からのLAK-attractantの産生が化学療法によって増強することが明らかになった。
- 4) 以上の実験成績は、予備的臨床試験の結果から、ヒトの原発性肝癌患者に対する養子免疫化学療法にも応用できると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

Lymphokine-activated killer (L A K) 細胞の腫瘍組織集積性と養子免疫療法の効果

養子免疫療法により良好な成績を得るには、移入したエフェクターが
いかに効率よく標的腫瘍組織に到達しうるかということが一つの条件と
なる。そこで、申請者は、まず動物実験として、C57BL/6マウスの線維
肉腫 BMT-11に対するlymphokine-activated killer (L A K) 細胞を用
いた養子免疫療法と化学療法の併用による影響を治療効果及び腫瘍組織
集積性の両面より検討した。

方法として、8週齢雌C57/BL6マウス背部皮下にBMT-11
細胞 (10^6 個)を移植し、10日後平均腫瘍径が5mmに到達した時点で
サイクロフォスファミド (CY) 150 mg/kg I.V.した。その4日後エ
フェクター (L A K細胞あるいはCTLそれぞれ 10^7 個)を尾静脈内移
入し、この日より5日間 r I L - 2 10^4 J R U / 日を静脈内投与した。
さらに、この実験に用いたエフェクターと同一のものを 111 Indium-oxine
にて標識して移入し24時間後これを屠殺して各臓器及び腫瘍を摘出し
てその重量と放射活性値を測定した。

成績は、未治療群、CY単独群、L A K・r I L - 2単独群の3群で
は全例死亡し、平均生存期間はそれぞれ45.3, 51.8, 45.9日
であり、有意差はなかった。CY + L A K・r I L - 2群は死亡率63
% (5/8)平均生存期間64.4日と有意な効果を認め、L A K細胞の腫

瘍集積率（%dose/g）はLAK・rIL-2単独の7倍以上に増強された。一方BMT-11に対するcytotoxic T lymphocytes(CTL)単独はLAK・rIL-2と異なりある程度の治療効果を示し、集積性及び治療効果のCY併用による増強はともにLAKより小さかった。

次に、申請者は腫瘍組織の培養上清に産生されるLAK-attractant活性を測定した。方法は、治療効果と集積性に関する実験と同じプロトコルで行い、腫瘍移植後14日目にマウスを屠殺して腫瘍組織を摘出し無血清培地内で24時間組織培養し、その培養上清を採取しこれをConditioned medium(CM)とし、このCM中のLAK-attractant活性を寒天法によって測定した。結果はCY投与後5日目をピークにattractant活性が検出された。また、この因子産生源は、腫瘍組織内の宿主反応細胞であり、HPLC gel濾過を用いた分析によって分子量約1ないし5万の2分画に強いLAK-attractant活性が存在することが明かになった。しかし、非治療腫瘍組織の培養上清にはいずれの時期にもLAK-attractant活性は認められなかった。

以上よりLAK・rIL-2による養子移入免疫療法は単独では無効であるが、LAK・rIL-2療法の前に化学療法を併用すると腫瘍組織より産生されるLAK-attractantによりLAK細胞の腫瘍集積性が高まり治療効果が著明に増強することを明かにした。

さらに、申請者は、以上の動物実験に基づき原発性肝癌外科摘出患者に対しadriamycinと自己脾臓LAK細胞を用いた免疫化学療法を予備的に行った。結果は、全体としての有意な効果は見られなかったが術後再発抑制傾向が一時期観察され、ヒト原発性肝癌患者に対する有効な術後補助療法としての応用の可能性が示唆された。

審査に当たって、小野江教授よりattractant産生のメカニズムやその中におけるCYの作用機序等について、また、小柳教授より臨床での術前後における固形癌特に腎癌に対する養子免疫療法の適応や実施方法等についての質疑があったが、申請者は概ね妥当な回答を行った。

養子免疫療法の化学療法併用による治療効果増強を化学療法後腫瘍組織が産生するattractantの作用によるエフェクター集積性増強という観点から検討した報告は少なく，さらに，本研究はこれを臨床において試験的に応用した点でも大きな意義があり，学位授与に値するものと考え
る。