

Experimental Studies with Adoptive Immunotherapy for the Gastric Cancer Patients

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8192

胃癌に対する養子免疫療法の基礎的検討

金沢大学がん研究所外科学講座 (主任: 磨伊正義教授)

藤 本 敏 博

(平成2年3月22日受付)

胃癌患者に、より効果的な養子免疫療法を施行することを目的として、健常人の末梢血リンパ球と胃癌患者の末梢血リンパ球、所属リンパ節リンパ球および脾リンパ球から、遺伝子組換え型インターロイキン-2 (recombinant interleukin-2, rIL-2) を用いてリンホカイン活性化殺腫瘍リンパ球 (lymphokine activated killer, LAK) 細胞を誘導し、以下の基礎的研究を行なった。すなわち、培養後の LAK 細胞数および腫瘍細胞障害活性の経時的変動についての胃癌の組織学的進行期 (stage) 別の差異、生体外でリンパ球を培養する際のフィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin, PHA) と rIL-2 の併用効果、LAK 細胞の由来臓器別の差異、患者に生体反応修飾物質 (biological response modifiers, BRM) を前投与した場合の LAK 活性増大効果について検討した。その結果、末梢血リンパ球からの LAK 細胞の誘導に際しては、5% ヒト AB 血清を加えた RPMI-1640 培地や無血清培地でも抗腫瘍活性のある LAK 細胞の誘導が可能であった。胃癌患者を各進行期別に見ると、末梢血リンパ球では stage II および III の患者で正常人に劣らない LAK 活性が得られ、養子免疫療法の適応となりうる事が示唆された。一方、細胞数を増加させ LAK 活性を増大させるために、生体外でリンパ球を培養する際 rIL-2 と PHA を併用すると、rIL-2 単独添加培養時よりも細胞数は増加するが、LAK 活性は低値であり、臨床応用には、必ずしも十分な効果が得られないことが予測された。今回の検討で、健常人、胃癌患者いずれの場合も、rIL-2 添加培養後 5 日目に最高値を示す例が多数であったが、一部のものは 10 日目や 15 日目が最高であり、個体差の存在が示唆された。次に、リンパ節由来の LAK 細胞を検討すると、末梢血由来の LAK 細胞より活性が低く、リンパ球亜群についても rIL-2 添加培養によりサプレッサー T 細胞 (CD8+CD11+) が増加してくるという特徴を有したが、一方でヘルパーインデューサー T 細胞 (CD4+4B4+) の増加も認めた。また脾や転移陰性の所属リンパ節由来の LAK 細胞の中に高い活性を示すものがあり、臨床応用の有用性が期待された。さらに、より効果的な腫瘍細胞障害活性を得るため、事前にレンチナンや OK-432 を投与したところ、患者末梢血リンパ球から誘導した LAK 細胞は、未投与患者に比べて、LAK 活性が高値の傾向が認められた。以上の成績より、stage II および III の胃癌患者においては従来の外科療法や化学療法に加えて、養子免疫療法の適応の可能性があると考えられ、また BRM を併用すること、場合によっては脾や所属リンパ節を利用することで、さらに有効な LAK 細胞を誘導できることが判明した。臨床的に養子免疫療法を施行するにあたっては、有効な LAK 細胞を誘導するのに必要な日数には個体差があり、5日、10日、15日に最高値を示す3群に大別されることを考慮し、各症例に独自の培養プロトコルを検討した上で、臨床応用する必要性が示唆された。

Key words gastric cancer, interleukin-2, lymphokine activated killer cell, adoptive immunotherapy

Abbreviations: ABS, AB serum; BRM, biological response modifiers; FCS, fetal calf serum; IL, interleukin; LAK, lymphokine activated killer; NK, natural killer; PBL, peripheral blood lymphocytes; PHA, phytohemagglutinin; rIL-2, recombinant interleukin-2; RLNL, regional lymphnodal lymphocytes; SL, spleen lymphocytes

胃癌の予後を規定する因子としては、従来より癌深達度、脈管侵襲、リンパ節転移ら幾多の所見があげられるが、胃癌の中には著明なリンパ様組織の増生を伴う胃癌 (medullary carcinoma with lymphoid infiltration, MCLI) が存在し、進行癌といえども良好な予後を示す¹⁾。この病態は、癌の増殖進展と担癌宿主の免疫応答の係り合いを如実に示すものであり、癌の免疫療法の有用性を強く支持するものである。一方、今日まで各種の生体反応修飾物質 (biological response modifiers, BRM) の癌患者への投与効果、移植性人癌を用いた実験動物レベルの結果²⁾ から補助療法としての免疫療法の臨床効果も検討されてきた^{3,4)}。現時点での免疫療法は、化学療法剤との併用による BRM の癌患者への直接投与が主体であるが^{5,6)}、近年もう一つの方法として、患者自身の末梢血中のリンパ球を生体外で培養して殺腫瘍細胞効果を持つリンパ球を誘導した後、患者生体内に移入する養子免疫療法が試みられている。T 細胞の増殖活性因子として知られていたインターロイキン-2 (interleukin-2, IL-2) は、Taniguchi ら⁷⁾ によって遺伝子組み換えによるインターロイキン-2 (recombinant interleukin-2, rIL-2) が大量生産可能となり直接投与が試みられたが、生物学的半減期が短いという欠点があり、副作用も認められている⁸⁾。一方、Rosenberg ら⁹⁾ によって rIL-2 を用い誘導されたリンホカイン活性化殺腫瘍リンパ球 (lymphokine activated killer, LAK) 細胞を患者へ移入する LAK 療法の臨床効果が報告され、以来わが国でも臨床応用されてきている。しかし、LAK 療法は皮膚癌、脳腫瘍、口腔領域癌には有効例の報告があるものの、消化器癌ことに胃癌に対して有効であったとする報告¹⁰⁾ は少ないのが現状である。

本研究では、胃癌患者に有効な LAK 療法を施行することを前提として、胃癌の進行に伴うナチュラルキラー (natural killer, NK) 活性および LAK 活性の変動、リンパ球数を増加させ、かつ腫瘍細胞障害活性を増大させることを目的としての、植物凝集素フィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin, PHA) と rIL-2 との併用について検討した。さらに、末梢血リンパ球および所属リンパ節リンパ球から誘導された LAK 細胞の腫瘍細胞障害活性とそのリンパ球亜群の差異、BRM を患者に前投与した場合の LAK 活性増大効果について検討した。

対象および方法

I. 対象

まず、健康人26名 (平均年齢33.1才) について末梢血

リンパ球の至適培養条件、PHA と rIL-2 との併用効果等について検索した。

次に1988年10月より1989年11月までの期間に、金沢大学がん研究所付属病院外科において、胃切除術を施行し、組織学的検索を行った胃癌患者37名を対象として、これらの術前の末梢血リンパ球を用い、また可能な症例では手術時に、胃所属リンパ節リンパ球、脾リンパ球を分離し使用した。年齢は17才〜75才 (平均54.9才) で性別は男性31名、女性6名であった。病理組織学的分類では乳頭状腺癌2名、管状腺癌14名、低分化腺癌17名、印環細胞癌4名であった。病期 (stage) 分類は胃癌取扱い規約¹¹⁾ に従った。なお今回対象とした stage IV 患者は比較的一般状態の良い手術可能症例で、低アルブミン血症・高度の貧血等の所見を認める症例は含まれていない。

II. リンパ球の分離と調整

1. 末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocytes, PBL)

ヘパリン加末梢血を 50ml 採取し、Ficoll-Hypaque 比重遠心法によりリンパ球を分離した。すなわち Ficoll-Hypaque 液 (比重 1.077) (Lymphoprep) (Nycomed, Oslo, Norway) 上に静かに重層し、400×g 室温で40分間遠心後、中間層を採取し、Hanks 液で2回洗浄後、RPMI-1640 液 (Gibco, Grand Island, New York, USA) にペニシリン 100 μg/ml、カナマイシン 100 μg/ml、ファンギゾン 0.1 μg/ml と非働化したヒト AB 血清を 5% 濃度に加えた培養液 [5% AB 血清 (AB serum, ABS) 加 RPMI-1640 培地] で1回洗浄し、単核球を分離し、次いで、5% ABS 加 RPMI-1640 培地中に 2×10⁶/ml に浮遊させた。培養はいずれも 37°C、5% CO₂ 下で行った。なお、リンパ節や脾由来のリンパ球と末梢血リンパ球との比較の際は、非働化したウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を 10% 濃度に加えた RPMI-1640 培地 [10% FCS 加 RPMI-1640 培地] で培養した。

2. 胃所属リンパ節リンパ球 (regional lymphnodal lymphocytes, RLNL)、脾リンパ球 (spleen lymphocytes, SL)

術中採取した所属リンパ節、脾を Hanks 液中で眼科用ハサミを用いて細切し、金属メッシュ (NBC 工業、大阪) で濾過した後、Ficoll-Hypaque 比重遠心法により単核球を分離した。次いで、10% FCS 加 RPMI-1640 培地中に 2×10⁶/ml に浮遊させた。培養はいずれも 37°C、5% CO₂ 下で行った。

III. 細胞数算定

トリパンブルー生体染色法により、顕微鏡下に生細胞

胞数を算定した。

IV. 細胞障害性試験

ヒト赤白血病由来の K-562 細胞株を用いて NK 活性を、またヒトバーキットリンパ腫由来の Daudi 細胞株を用いて LAK 活性をいずれも ^{51}Cr 遊離試験により測定した。すなわちリンパ球を $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、96穴 U 底マイクロプレート (Falcon, Oxnard, California, USA) に1検体につき3穴ずつ $100 \mu\text{l}$ 分注し (triplicate), エフェクター細胞とした。一方ターゲット細胞としては $5 \times 10^5 \text{cells}/\text{ml}$ に調整した K-562 および Daudi 細胞浮遊液に $250 \mu\text{l}$ の $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 2mci/2ml (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, USA) を加え、 37°C , 5% CO_2 下で1時間培養標識後、3回洗浄し10% FCS 加 RPMI-1640 培地に浮遊し、これを $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した後、 $100 \mu\text{l}$ を各エフェクター細胞に加えた。この条件で、エフェクター: ターゲット比は 20:1 となる。このプレートを、 37°C , 5% CO_2 下で4時間培養後、各穴の上清 $100 \mu\text{l}$ を採取し上清中に放出された ^{51}Cr 量をオートウェルガンマーカウンター ARC501 (アロカ, 東京) にて測定し、下記の計算式により NK 活性値, LAK 活性値を算出した。

NK 活性, LAK 活性 (% cytotoxic activity) =

$$\frac{{}^{51}\text{Cr 実測値} - {}^{51}\text{Cr 自然放出量}}{{}^{51}\text{Cr 最大放出量} - {}^{51}\text{Cr 自然放出量}} \times 100$$

なお、 ^{51}Cr 最大放出量はターゲット細胞に1%トリトン \times 100 (和光, 大阪) を $100 \mu\text{l}$ 加え溶解させた後の上清中の値である。ターゲット細胞からの ^{51}Cr の自然放出量は、5% ABS 加 RPMI-1640 培養液または10% FCS 加 RPMI-1640 培養液を $100 \mu\text{l}$ 加え、 37°C , 4時間培養後の上清中の値である。

V. モノクローナル抗体によるリンパ球亜群の分類

胃癌患者の末梢血, リンパ節および脾から分離したリンパ球に対するリンパ球亜分画をヒトリンパ球に対する各種モノクローナル抗体を用い検討した。ヘパリン加全血 $50 \mu\text{l}$ に、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) にて希釈した蛍光色素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識モノクローナル抗体 $50 \mu\text{l}$ を加え混和後、氷中で30分反応させた。ついで反応液に赤血球溶解用試薬 (lysing reagent) (和光) を 1ml 添加, 15分間室温にて反応させた。赤血球の溶血を目視にて確認後、レーザーフローサイトメーター, FCM-1 (日本分光, 東京) にて、蛍光細胞数を測定した。使用した蛍光色素標識モノクローナル抗体は、末梢血 T 細胞に特異的な CD3, ヘルパー/イン

デューサー T 細胞に特異的な CD4, サプレッサー/細胞障害性 T 細胞に特異的な CD8 (Ortho Diagnostic System, Raritan, New Jersey, USA), NK 細胞に特異的な CD57 (LEU7), NK 細胞及び好中球に特異的な CD16 (LEU11) (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA) を用いた。別に、サプレッサー T 細胞に特異的な CD8 \cdot CD11, サプレッサーインデューサー T 細胞に特異的な CD4 \cdot 2H4, ヘルパーインデューサー T 細胞に特異的な CD4 \cdot 4B4 (Coulter, Hialeah, Florida, USA) の3種類の二重染色 (two color) 解析も行った。

VI. 検討項目

1. rIL-2 添加培養における LAK 細胞の至適培養条件

まず rIL-2 (S-6820, 塩野義製薬, 大阪) を添加後、最も活性が高値となる培養時間と培養液を検討した。なお、予備実験の結果、rIL-2 の至適濃度 (リンパ球が標的腫瘍細胞に対して十分な障害活性を示すために必要な培地中の最低濃度) は $1000\text{U}/\text{ml}$ であることが判明したため、rIL-2 を $1000\text{U}/\text{ml}$ 添加して、7日間培養を行い、3日から7日まで経時的に NK 活性および LAK 活性を測定した。またこの際、10% FCS 加 RPMI-1640 培地, 5% ABS 加 RPMI-1640 培地および無血清培地 AIM-V (Gibco) の3種類の培地による活性の差異についても検討した。

2. 胃癌患者病期 (stage) 別の LAK 細胞活性の差異

胃癌患者28名の手術直前の末梢血を採取してリンパ球浮遊液を得、5% ABS 加 RPMI-1640 培地で rIL-2 を $1000\text{U}/\text{ml}$ 添加し、5日間培養後の NK 活性および LAK 活性を測定した。患者の病期 (stage) は胃癌取扱い規約¹³⁾に従って分類し、健常人26名について同様に測定した結果を対照として用いた。なお、BRM 投与症例は除外した。

3. PHA および rIL-2 の併用による LAK 細胞の誘導

健常人21名及び胃癌患者12名の末梢血リンパ球 (PBL) を以下の9群に分け、5% ABS 加 RPMI-1640 培地で15日間培養し、5日目, 10日目, 15日目に細胞数, NK 活性および LAK 活性を測定して、PHA (PHA-p) (Difco, Detroit, Michigan, USA) と rIL-2 の併用効果について検討した。

実験群としては、1) PBL を単独で培養した群、PHA のみを2) 培養開始時に添加した群および3) 10日目に添加した群、rIL-2 のみを4) 培養開始時に添加した群および5) 5日目に添加した群、6)

rIL-2 を培養開始時、5日目および10日目に計3回添加した群、さらに PHA と rIL-2 の併用効果を見るために、培養開始時に PHA を添加し 7) 5日目に rIL-2 を添加した群および 8) 5日目と10日目に rIL-2 を添加した群、9) 培養開始時に rIL-2 を添加し10日目に PHA を添加した群を作成した。また、rIL-2 のみを複数回添加した第6群および PHA と rIL-2 を併用した第8群に関して、rIL-2 を初回投与後、細胞障害活性が最高値をとるまでの日数に基づき、5日型、10日型および15日型の3型に分類し、各

症例の個体差について検討した。

なお、いずれの実験群においても培養5日目と10日目に培地交換を行なった。また PHA は $1\mu\text{g/ml}$, rIL-2 は 1000U/ml をそれぞれ添加した。

4. 末梢血、所属リンパ節および脾から誘導した LAK 細胞の比較

胃癌患者16例の手術時に採取した所属リンパ節リンパ球 (RLNL)、4例から採取した脾リンパ球 (SL) をそれぞれ、10% FCS 加 RPMI-1640 培地で rIL-2 を 1000U/ml 添加培養して LAK 細胞を誘導し、5日目

Table 1. Cytotoxic activity of PBL cultured with rIL-2 in healthy donors (n=5)

Target	Medium	Days after culture				
		3	4	5	6	7
K-562	RPMI-1640 containing 10% FCS	79.6 ± 6.7	97.1 ± 3.8	97.2 ± 4.6	80.1 ± 10.8	65.7 ± 9.0
	RPMI-1640 containing 5% ABS	53.5 ± 14.2	77.7 ± 15.9	82.1 ± 12.3	73.6 ± 12.8	69.4 ± 15.6
	Serum-free medium (AIM-V)	56.7 ± 15.9	83.4 ± 12.5	84.7 ± 13.5	71.2 ± 18.8	47.1 ± 18.1
Daudi	RPMI-1640 containing 10% FCS	34.8 ± 7.0	53.5 ± 17.3	46.3 ± 18.3	33.4 ± 17.8	33.4 ± 23.1
	RPMI-1640 containing 5% ABS	13.0 ± 4.0	31.5 ± 10.1	35.3 ± 12.7	30.9 ± 25.7	44.3 ± 16.9
	Serum-free medium (AIM-V)	24.1 ± 13.8	41.7 ± 14.1	34.5 ± 13.6	27.0 ± 11.1	25.5 ± 14.5

Lymphocytes were suspended with different medium as shown in this table, and cultured with rIL-2 (1000U/ml), and tested for specific ^{51}Cr releases from K-562 and Daudi cells at 3, 4, 5, 6 and 7 days after the culture. Data are shown as mean \pm S.D. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ by unpaired t test.

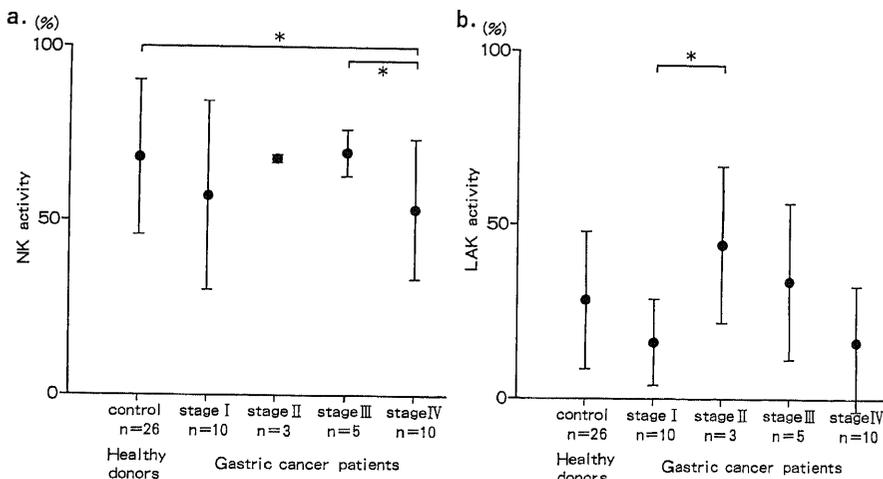


Fig. 1. NK and LAK activity of rIL-2 stimulated PBL from the gastric cancer patients in various stages (n=28). PBL were cultured in RPMI-1640 medium containing 5% ABS in the presence of rIL-2 (1000U/ml) for 5 days. After the culture, stimulated lymphocytes were tested with NK activity (a.) and LAK activity (b.). NK activity was examined with specific ^{51}Cr release from ^{51}Cr -labeled K-562 and ^{51}Cr -labeled Daudi cells were used for LAK activity. Each bar represents mean \pm S.D. *, $P < 0.05$ by unpaired t test.

のNK活性およびLAK活性を、同一症例の末梢血リンパ球(PBL)から同一条件で培養し誘導したLAK細胞と比較検討した。また末梢血リンパ球と、所属リンパ節リンパ球についてはリンパ球亜群の推移についても検討した。

5. BRM投与症例におけるLAK細胞活性の増大効果

胃癌患者14名に対して、BRM(レンチナン, OK-432)の影響を見るための無作為試験(randomized study)を行なった。すなわち封筒法により、レンチナン群5例、OK-432群4例、対照群5例に分け、1週間に2回BRMを患者に投与し、投与前および投与後に末梢血リンパ球を分離して、10%FCS加RPMI-1640培地でrIL-2を1000U/ml添加し、5日間培養後のNK活性およびLAK活性を測定した。なお、レンチナンは計4mg、OK-432は計5.5KE投与した。

VII. 統計処理法

以上の各測定値は平均値±標準偏差値(mean±S.D.)をもって示した。同一症例における2群間の平

均値の有意差検定には、対応のある標本のt検定を用い、また他群間の有意差検定には、等分散のF検定を行ない必要に応じてWelchの補正を行なった後、対応のない場合のt検定を行ない、危険率5%以下を有意差ありと判定した。

成 績

I. rIL-2添加培養におけるLAK細胞の至適培養条件

培養による経時的変動をみると、NK活性はいずれの培地においても5日目に最も高値を示した。LAK活性は10%FCS加RPMI-1640培地および無血清培地AIM-Vでは4日目が最も高値であり、5%ABS加RPMI-1640培地では7日目が最も高値であったが、それぞれの最高値間に有意差は認められなかった(表1)。

II. 胃癌患者病期(stage)別のLAK細胞活性の差異

培養開始時にrIL-2を1000U/ml添加し5日間5%

Table 2. Proliferation of LAK cells

Group	Days after culture				Proliferation rate	
	0	5	10	15		
a.	1	2.1±0.5	1.8±0.4	1.2±0.7	0.6±0.6	0.3
	2	2.1±0.5	1.8±0.7	1.0±0.5	0.9±0.6	0.4
	3	2.1±0.5	1.8±0.4	1.1±0.7	0.7±0.6	0.3
	4	2.1±0.5	2.2±0.5	2.3±1.0	2.2±1.1	1.0**
	5	2.1±0.5	1.8±0.4	1.5±1.2	1.3±0.8	0.6**
	6	2.1±0.5	2.0±0.3	2.0±1.0	2.7±1.2	1.3**
	7	2.1±0.5	1.8±0.7	2.3±1.3	4.6±3.5	2.2**
	8	2.1±0.5	1.9±0.7	2.5±1.4	5.8±4.3	2.8**
	9	2.1±0.5	2.2±0.5	2.4±1.1	1.9±0.8	0.9**
b.	1	2.2±0.3	1.4±0.5	0.7±0.4	0.4±0.3	0.2
	2	2.2±0.3	1.3±0.4	0.8±0.5	0.4±0.3	0.2
	3	2.2±0.3	1.4±0.5	0.8±0.5	0.5±0.6	0.2
	4	2.2±0.3	1.6±0.5	1.4±0.6	1.3±0.7	0.6**
	5	2.2±0.3	1.4±0.5	0.7±0.3	0.7±0.5	0.3
	6	2.2±0.3	1.5±0.5	1.5±0.6	2.1±1.2	1.0**
	7	2.2±0.3	1.4±0.4	1.7±0.9	2.2±1.9	1.0**
	8	2.2±0.3	1.3±0.4	1.6±0.9	2.9±2.1	1.3**
	9	2.2±0.3	1.5±0.6	2.7±0.7	1.3±1.0	0.6**

Lymphocytes from ^a healthy donors (n=21) and ^b gastric cancer patients (n=12) were cultured in RPMI-1640 medium containing 5% ABS in the presence of rIL-2 (1000U/ml) and examined with proliferation at 5, 10 and 15 days after the culture. Data are shown as mean cell number × 10⁶/ml ± S.D.

$$\text{Proliferation rate} = \frac{\text{cell number at day 15}}{\text{cell number at day 0}}$$

** p < 0.01 v.s. control (Group No. 1) by unpaired t test.

ABS 加 RPMI-1640 培地で培養後の、胃癌患者全体の NK 活性および LAK 活性はそれぞれ、 $58.9 \pm 20.7\%$ 、 $22.3 \pm 20.1\%$ であり、健常人の $67.8 \pm 22.1\%$ 、 $28.1 \pm 19.8\%$ と比べて低値であったが、有意差はなかった。病期 (stage) 別の比較では、NK 活性、LAK 活性ともに stage II および III が高い傾向にあり、NK 活性では stage IV が、III および健常人と比べて有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。LAK 活性では stage I が II に比べて、有意 ($p < 0.05$) に低値であった (図 1)。

III. PHA および rIL-2 の併用による LAK 細胞の誘導

1. 細胞数

リンパ球を単独培養した対照群、PHA のみを添加培養した第 2 群および第 3 群では細胞数は漸次減少し、15日間で健常人では0.3倍、胃癌患者では0.2倍に減少した。rIL-2 を初日に 1 回のみ添加培養した第 4 群は健常人では1.0倍であったが、胃癌患者では0.6倍と減少した。rIL-2 を 5 日目に添加した第 5 群でも、健常人、胃癌患者ともに細胞数は培養開始時より減少

した。5日ごとに rIL-2 を 3 回添加培養した第 6 群は、健常人、胃癌患者とも 5 日目から増加し、15日目にはそれぞれ1.3倍、1.0倍となった。PHA 添加後に rIL-2 を添加した第 7 群および第 8 群は、健常人では 2 倍以上に増加したが、胃癌患者では若干の増加であった。rIL-2 添加後に PHA を添加した第 7 群では細胞数は減少した (表 2)。

2. NK 活性

リンパ球を単独培養した対照群では健常人、胃癌患者いずれも 5 日目に最高で、それぞれ $6.3 \pm 8.6\%$ 、 $10.3 \pm 8.8\%$ であった。PHA のみを初日に添加した第 2 群では健常人、胃癌患者とも 5 日目に最高で、それぞれ $16.9 \pm 10.4\%$ 、 $19.2 \pm 13.2\%$ まで増大した。PHA を 10 日目に添加した第 3 群では活性の増大は認められなかった。rIL-2 を初日にもみ添加した第 4 群では 5 日目に最高で、健常人では $63.6 \pm 22.7\%$ 、胃癌患者では $70.4 \pm 13.7\%$ まで増大した。同様に rIL-2 を初日に添加した第 6 群、第 9 群も 5 日目に最高で、後で rIL-2 や PHA を添加しても活性は増大しなかった。rIL-2 を 5 日目に添加した第 5 群では、10日目に

Table 3. Cytotoxic activity (NK activity) of LAK cells

Group	Days after culture			
	5	10	15	
a.	1	<u>6.3 ± 8.6</u>	3.8 ± 7.7	0.4 ± 1.4
	2	<u>**16.9 ± 10.4</u>	5.4 ± 4.9	4.6 ± 4.6
	3	<u>6.1 ± 8.5</u>	3.4 ± 7.0	<u>8.0 ± 9.7</u>
	4	<u>**63.6 ± 22.7</u>	53.0 ± 17.2	14.5 ± 11.9
	5	<u>7.0 ± 8.3</u>	<u>**35.0 ± 22.5</u>	33.2 ± 26.1
	6	<u>**65.2 ± 23.7</u>	58.8 ± 17.4	44.0 ± 18.5
	7	21.3 ± 17.1	<u>**45.4 ± 19.8</u>	7.4 ± 8.5
	8	21.0 ± 14.2	<u>**48.3 ± 18.1</u>	46.6 ± 27.3
	9	<u>**65.4 ± 23.2</u>	51.7 ± 21.2	27.3 ± 21.5
b.	1	<u>10.3 ± 8.8</u>	4.2 ± 10.2	0.3 ± 0.4
	2	<u>19.2 ± 13.2</u>	5.6 ± 4.5	2.2 ± 3.4
	3	<u>9.4 ± 9.0</u>	3.2 ± 6.2	5.9 ± 6.7
	4	<u>**70.4 ± 13.7</u>	42.6 ± 26.3	30.3 ± 28.1
	5	<u>10.6 ± 8.9</u>	<u>26.1 ± 23.5</u>	17.7 ± 18.5
	6	<u>**69.9 ± 14.3</u>	55.3 ± 14.9	52.6 ± 28.2
	7	19.5 ± 12.5	<u>*31.3 ± 22.2</u>	23.0 ± 23.3
	8	18.8 ± 13.3	<u>**35.7 ± 22.1</u>	34.4 ± 28.4
	9	<u>**71.1 ± 13.7</u>	37.6 ± 24.9	17.6 ± 16.8

Lymphocytes from ^a healthy donors (n=21) and ^b gastric cancer patients (n=12) were cultured in RPMI-1640 medium containing 5% ABS and rIL-2 (1000 U/ml). Cytotoxic activity (NK activity) was examined with specific ⁵¹Cr release from 5, 10 and 15 days after the culture. Data are shown as mean % \pm S.D. The highest value of each group is underlined.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ v.s. control (Group No. 1) by unpaired t test.

最高で、健常人では $35.0 \pm 22.5\%$ 、胃癌患者では $26.1 \pm 23.5\%$ まで増大した。PHA 添加後 5 日目に rIL-2 を添加した第 7 群および第 8 群では、10 日目に健常人では $48.3 \pm 18.1\%$ 、胃癌患者では $35.7 \pm 22.1\%$ まで増大したが、rIL-2 を初日に添加した群の最高値より有意に ($p < 0.05$) 低値であった (表 3)。

3. LAK 活性

リンパ球を単独培養した対照群、PHA のみを添加した第 2 群、第 3 群では、健常人、胃癌患者いずれも LAK 活性の増大は見られなかった。rIL-2 を初日に添加した第 4 群では、5 日目に最高となり、健常人では $25.9 \pm 20.5\%$ 、胃癌患者では $17.0 \pm 12.5\%$ となった。同様に rIL-2 を初日に添加した第 6 群、第 9 群も 5 日目に最高で、後で rIL-2 や PHA を添加しても活性は増大しなかった。rIL-2 を 5 日目に添加した第 5 群では健常人では 10 日目に最高となり、 $15.5 \pm 21.2\%$ となった。しかし胃癌患者では活性の増大は見られなかった。PHA 添加後 5 日目に rIL-2 を添加した第 7 群および第 8 群では健常人では 10 日目に $9.8 \pm 17.9\%$ まで増大したが、胃癌患者では増大を認めず、また

rIL-2 単独で培養した群の最高値と比べて有意に ($p < 0.05$) 低値であった (表 4)。

4. 個体差

1) 細胞数

rIL-2 を 5 日ごとに 3 回添加した第 6 群は、健常人では 15 日間で平均 1.3 倍まで増加したが、そのうち 2 倍以上に増加したものが 3 例 (14.3%) で、一方 1 倍以下に減少したものが 9 例 (42.9%) であった。胃癌患者では 15 日間で平均 1.0 倍と増減がなかったが、そのうち 2 倍以上に増加したものが、2 例 (16.7%) で、一方 0.5 倍以下に減少したものが 2 例 (16.7%) であった。

PHA 添加後に rIL-2 を 2 回添加した第 8 群は、健常人では 15 日間で平均 2.8 倍まで増加したが、そのうち 3 倍以上に増加したものが 8 例 (38.1%) で、一方 1 倍以下に減少したものが 4 例 (19.0%) であった。胃癌患者では平均 1.3 倍まで増加したが、そのうち 2 倍以上に増加したものが 2 例 (16.7%) で、一方 1 倍以下に減少したものが 5 例 (41.7%) であった。

2) NK 活性

rIL-2 を 5 日ごとに 3 回添加した第 6 群は、健常人

Table 4. Cytotoxic activity (LAK activity) of LAK cells

Group	Days after culture			
	5	10	15	
a.	1	<u>2.1±6.7</u>	<u>3.0±11.3</u>	0.4±1.2
	2	<u>1.1±2.2</u>	0.1±0.2	0.1±0.2
	3	2.0±6.6	<u>2.8±11.3</u>	0.1±0.3
	4	** <u>25.9±20.5</u>	13.4±19.0	2.5±3.5
	5	2.3±6.7	* <u>15.5±21.2</u>	11.5±14.2
	6	** <u>26.2±21.8</u>	17.1±18.7	9.2±8.9
	7	1.2±2.4	<u>8.9±13.5</u>	0.8±1.6
	8	1.6±2.4	<u>9.8±17.9</u>	8.3±8.9
	9	** <u>27.4±22.7</u>	13.3±17.9	1.1±2.3
b.	1	<u>2.8±3.4</u>	1.3±2.6	0.9±2.2
	2	<u>1.9±2.0</u>	1.5±4.0	0.1±0.3
	3	<u>3.0±3.5</u>	1.5±2.5	2.0±3.0
	4	** <u>17.0±12.5</u>	8.0±11.3	4.0±5.1
	5	3.0±3.5	3.9±4.7	<u>5.4±10.5</u>
	6	** <u>19.9±13.2</u>	18.1±22.4	10.7±15.8
	7	1.9±2.0	3.4±4.5	<u>4.2±9.5</u>
	8	1.9±2.0	4.5±5.2	<u>7.8±17.9</u>
	9	** <u>19.4±12.8</u>	6.7±6.9	2.8±2.4

Lymphocytes from ^a healthy donors (n=21) and ^b gastric cancer patients (n=12) were cultured in RPMI-1640 medium containing 5% ABS in the presence of rIL-2 (1000 U/ml). Cytotoxic activity (LAK activity) was examined with specific ⁵¹Cr releases from K-562 at 5, 10 and 15 days after the culture. Data are shown as mean %±S.D. The highest value of each group is underlined.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ v.s. control (group No. 1) by unpaired t test.

では5日型11例(52.4%),10日型9例(42.9%),15日型1例(4.8%)であった(図2a)。胃癌患者では5日型5例(41.7%),10日型4例(33.3%),15日型3例(25.0%)であった。

PHA 添加後に rIL-2 を 2 回添加した第 8 群は、健康人では 5 日型 12 例 (57.1%), 10 日型 8 例 (38.1%) であった。胃癌患者では 5 日型 8 例 (66.7%), 10 日型 2 例 (16.7%) であった。

3) LAK 活性

rIL-2 を 5 日ごとに 3 回添加した第 6 群は、健康人では 5 日型 11 例 (52.4%), 10 日型 6 例 (28.6%), 15 日型 4 例 (19.1%) であった (図 2b)。胃癌患者では 5 日型 7 例 (58.3%), 10 日型 3 例 (25.0%), 15 日型 2 例 (16.7%) であった。

PHA 添加後に rIL-2 を 2 回添加した第 8 群は、健康人では 5 日型 11 例 (52.4%), 10 日型 9 例 (42.9%) で

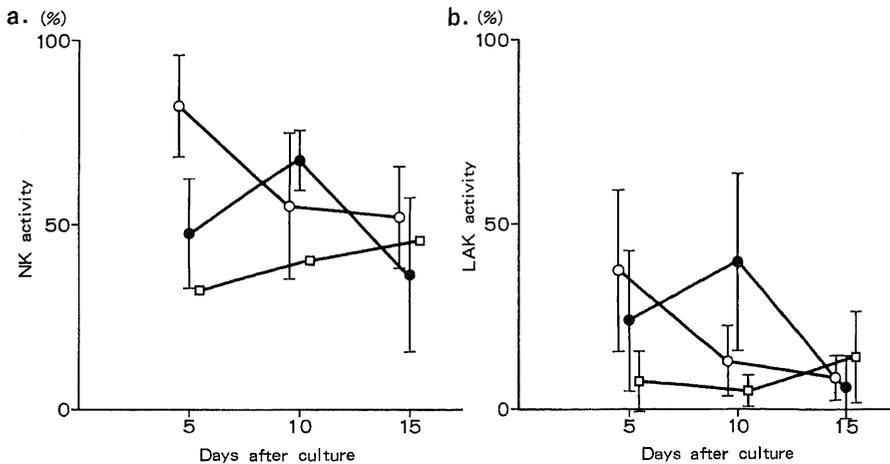


Fig. 2. Changes of NK and LAK activity of rIL-2 stimulated PBL from healthy donors (n=21). Each culture was added with rIL-2 (1000U/ml) at 0, 5 and 10 days after the culture. NK activity (a.) and LAK activity (b.) were tested at 5, 10 and 15 days after the culture with all tested samples. NK activity was examined with specific ⁵¹Cr release from ⁵¹Cr-labeled K-562 and ⁵¹Cr-labeled Daudi cells were used for LAK activity. The results showed that culture periods to acquire the highest cytotoxic activity were quite different among tested samples and three distinctly distinguished groups have been observed. Each bar represents mean±S.D. Open circles (○) show the group with the highest activity at 5 days after the culture (n=11 in a., n=11 in b.). Closed circles (●) show the group with the highest activity at 10 days after the culture (n=9 in a., n=6 in b.). Open squares (□) show the group with the highest activity at 15 days after the culture (n=1 in a., n=4 in b.).

Table 5. Changes in lymphocyte subsets of PBL and RLNL cultured with rIL-2 in gastric cancer patients (n=12)

Day	Ratio (%) of lymphocyte subsets in PBL												
	CD3+	CD4+	CD4+	4/8 ratio	LEU7+	LEU11	CD8+11-	CD8+11+	CD4+2H4+	CD4+2H4+	CD4+4B4-	CD4+4B4+	
0	65.4±16.3	40.4±8.3	29.8±8.5	1.5±0.6	27.4±13.1	20.5±13.7	22.8±6.7	7.1±4.9	29.1±6.4	12.5±6.6	14.8±5.1	25.7±6.4	
5	65.6±13.9	40.4±14.6	42.8±14.3	1.0±0.4	44.3±17.0	29.9±20.3	27.5±8.7	5.3±1.5	22.7±7.6	13.3±7.6	10.3±5.8	22.7±7.8	
	Ratio (%) of lymphocyte subsets in RLNL												
0	6.0±13.0	39.4±14.5	13.2±3.9	3.2±1.4	7.2±4.6	8.2±5.2	10.4±4.6	1.0±0.6	20.7±8.5	17.8±12.2	30.0±17.4	8.2±3.2	
5	61.1±7.2	41.5±17.3	25.7±7.5	1.8±1.1	13.2±10.3	14.7±9.7	11.4±4.2	3.9±3.6	20.5±8.4	16.7±6.8	17.8±10.9	16.7±5.6	

Lymphocytes were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% FCS in the presence of rIL-2 (1000 U/ml) for 5 days. Lymphocyte subsets were examined at 0 and 5 days after the culture. *, p<0.05; **, p<0.01 by paired t test.

あった。胃癌患者では5日型8例(66.7%)、10日型1例(8.3%)であった。

IV. 末梢血, 所属リンパ節および脾から誘導した LAK 細胞の比較

1. 末梢血リンパ球 (PBL) および所属リンパ節リンパ球 (RLNL) より誘導した LAK 細胞の比較

1) NK 活性

16例中13例で末梢血リンパ球由来 LAK 細胞が所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞より NK 活性は高値であった。所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞が末梢血リンパ球由来 LAK 細胞より高値であった3例では、リンパ節はいずれも転移陰性であった。平均値を比較すると、末梢血リンパ球由来 LAK 細胞 $68.2 \pm 15.7\%$ 、所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞 $47.7 \pm 21.7\%$ であり、有意差 ($p < 0.01$) を認めた (図3a)。

2) LAK 活性

16例中11例で末梢血リンパ球由来 LAK 細胞が所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞より LAK 活性は高値であった。所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞が末梢血リンパ球由来 LAK 細胞より高値であった5例では、リンパ節はいずれも転移陰性であった。平均値を比較すると、末梢血リンパ球由来 LAK 細胞 $36.9 \pm 22.2\%$ 、所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞 $26.2 \pm 21.4\%$ であり、有意差はなかった (図3b)。

3) リンパ球亜群

i. 培養開始時

所属リンパ節リンパ球 (RLNL) は末梢血リンパ球 (PBL) と比較して、CD8+, CD8+11-, CD8+11+, CD4+4B4+, LEU7+ および LEU11+ の細胞数が有意 ($p < 0.01$) に低値であり、一方 CD4/CD8 比は有意 ($p < 0.01$) に高値であった。なおリンパ節転移の有無によるリンパ球亜群の差は認めなかった。

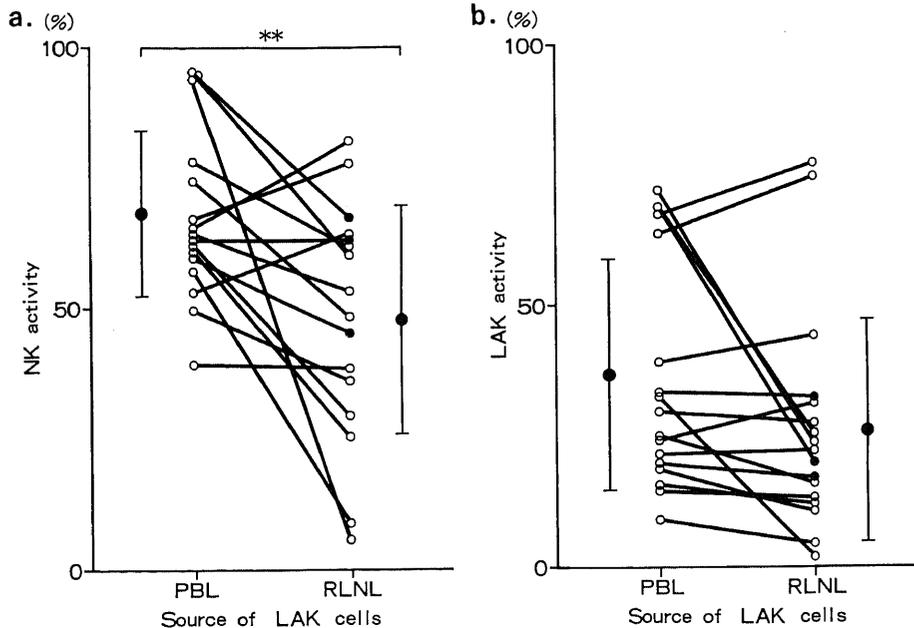


Fig. 3. Relation of cytotoxic activities between LAK cells from PBL and RLNL of the gastric cancer patients ($n=16$). Lymphocytes were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% FCS in the presence of rIL-2 (1000U/ml) for 5 days. After the culture, stimulated lymphocytes were tested with NK activity (a.) and LAK activity (b.). NK activity was examined with specific ^{51}Cr release from ^{51}Cr -labeled K-562 and ^{51}Cr -labeled Daudi cells were used for LAK activity. The large closed circles (●) show mean values and each bar represents mean \pm S.D. Open circles (○) show the highest activity of each sample and straight line that link open circles of PBL with those of RLNL show that these samples derived from the same patient. The small closed circles (●) show RLNL with lymph node metastases. **, $p < 0.01$ by paired t test.

ii. rIL-2 を 5 日間添加培養後の推移

rIL-2 を添加し、5 日間培養すると、末梢血リンパ球 (PBL) では、CD8+, LEU7+ が有意 ($p < 0.01$) に増加した。所属リンパ節リンパ球 (RLNL) では、CD8+, CD8+11+, CD4+4B4+ が有意 ($p < 0.01 \sim 0.05$) に増加した (表 5)。

2. 末梢血リンパ球 (PBL), 所属リンパ節リンパ球 (RLNL) および脾リンパ球 (SL) から誘導した LAK 細胞の比較

1) NK 活性

末梢血, リンパ節および脾を同時に採取できた 4 例中 3 例で所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞が最も低値であった。平均値を比較すると、末梢血リンパ球由来 LAK 細胞 $68.5 \pm 18.2\%$, 所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞 $39.0 \pm 28.0\%$, 脾リンパ球由来 LAK 細胞 $74.9 \pm 14.8\%$ であったが、3 者間に有意差はなかった (図 4a)。

2) LAK 活性

末梢血, リンパ節および脾を同時に採取できた 4 例中 3 例で所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞が最も低値であり、4 例全例で脾リンパ球由来 LAK 細胞が最も高値であった。平均値を比較すると、末梢血リンパ球由来 LAK 細胞 $26.7 \pm 7.5\%$, 所属リンパ節リンパ球由来 LAK 細胞 $16.3 \pm 13.2\%$, 脾リンパ球由来 LAK 細胞 $38.7 \pm 11.7\%$ であったが、3 者間に有意差はなかった (図 4b)。

V. BRM 投与症例における LAK 細胞活性の増大効果

1. NK 活性

レンチナン投与群では 5 例全例で、投与前に比べて投与後の NK 活性が増大し、平均値を比較すると、投与前 $34.5 \pm 26.8\%$ から投与後 $70.3 \pm 4.3\%$ へと有意 ($p < 0.05$) の増大を認めた。

OK-432 投与群では 4 例中 2 例で、投与前に比べて

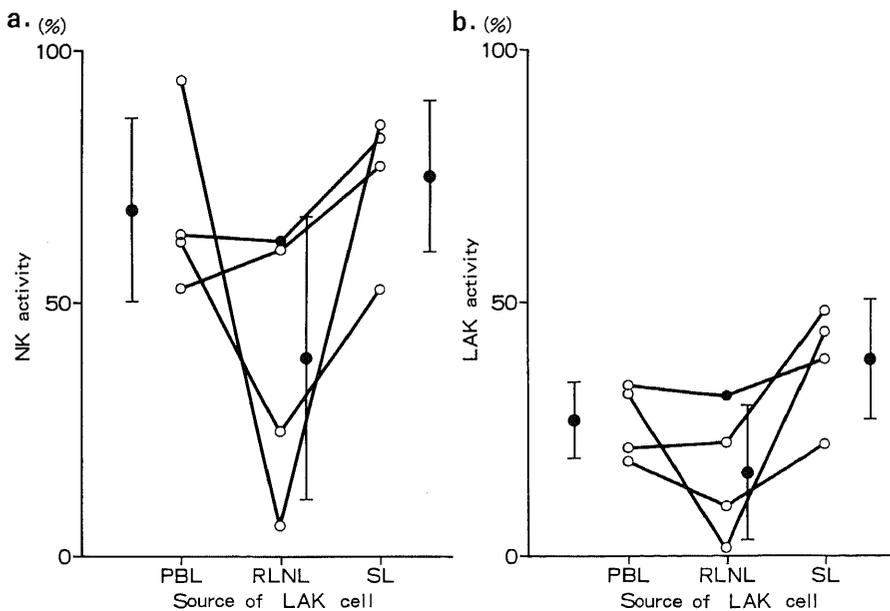


Fig. 4. Comparison of cytotoxic activities of LAK cells from PBL, RLNL and SL of the gastric cancer patients (n=4). Lymphocytes were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% FCS in the presence of rIL-2 (1000U/ml) for 5 days. After the culture, stimulated lymphocytes were tested with NK activity (a.) and LAK activity (b.). NK activity was examined with specific ^{51}Cr release from ^{51}Cr -labeled K-562 and ^{51}Cr -labeled Daudi cells were used for LAK activity. The large closed circles (●) show mean values and each bar represents mean \pm S.D. Open circles (○) show the highest activity of each sample and straight line that link open circles of PBL with those of RLNL and SL show that these samples derived from the same patients. The small closed circles (●) show RLNL with lymphnodal metastases.

投与後の NK 活性が増大した。平均値を比較すると、投与前 $44.8 \pm 36.8\%$ から投与後 $64.7 \pm 20.0\%$ へと増大したが有意差はなかった (図5a)。

2. LAK 活性

レンチナン投与群では5例中3例で、投与前に比べて投与後の LAK 活性が増大した。平均値を比較する

と、投与前 $17.1 \pm 24.7\%$ から投与後 $27.5 \pm 26.7\%$ へと増大したが有意差はなかった。

OK-432 投与群では4例中2例で、投与前に比べて投与後の LAK 活性が増大した。平均値を比較すると、投与前 $13.9 \pm 11.3\%$ から投与後 $20.7 \pm 9.7\%$ へと増大したが有意差はなかった (図5b)。

考 察

悪性腫瘍に対する治療法としては、外科的切除が最も確実かつ効果的な方法と考えられるが、切除不能の癌や可視範囲を越えた遺残腫瘍に起因する再発に対しては、有効な補助療法の確立が急務とされる。この補助療法の一分野として免疫療法があげられるが、これまでは主に非特異的な BRM を患者に直接投与する方法で臨床効果が追究されてきた。その作用機序としては、担癌患者に対する BRM 投与による抗腫瘍効果は宿主介在性であり、各種の免疫担当細胞群を中心とする癌細胞障害機構が存在すると報告されている¹²⁾。しかしながら、担癌末期あるいは全身状態不良の場合には、宿主介在性の抗腫瘍効果が期待できない場合も多いと推察されることから、抗腫瘍活性を持つリンパ球 (effector) を生体外で大量に誘導し¹³⁾¹⁴⁾、担癌生体へ戻す、いわゆる養子免疫療法 (adoptive immunotherapy, AIT) が最近にわかに注目されてきた¹⁵⁾。

胃癌患者の免疫状態については癌の進行とともに NK 活性の低下が認められるとする報告がある¹⁶⁾。その理由として、担癌による栄養状態の低下に誘発されるステロイドの分泌過多、流血中の抑制因子の存在¹⁷⁾¹⁸⁾、単球の増加に伴う免疫抑制状態などが一般に知られている。しかし一方、Peter ら¹⁹⁾のように健康人と癌患者との間に NK 活性の差は認めないとする報告や、Troye ら²⁰⁾のようにむしろ癌患者のほうが健康人より高い NK 活性を示すという報告、さらには癌進行に伴うリンホカインの誘導により、正常より高い NK 活性を示すという報告などがあり²¹⁾、一致した見解は必ずしも得られていない。今回著者は、養子免疫療法を前提としているため、リンパ球を採取して5日間 rIL-2 添加培養後の NK 活性および LAK 活性を測定したが、いずれも stage I および IV で低値をとり、II および III で高値であった。stage I の NK 活性の低値は、NK 細胞が免疫監視機構の一員として生体内腫瘍増殖の初期に作用し消費されることを反映しているのかも知れない。一方、stage II および III という中期の胃癌で stage I よりも高い活性を示したことから、前述のような各種サイトカインの作用が示唆されるとともに、現実に補助療法を必要とする stage II および

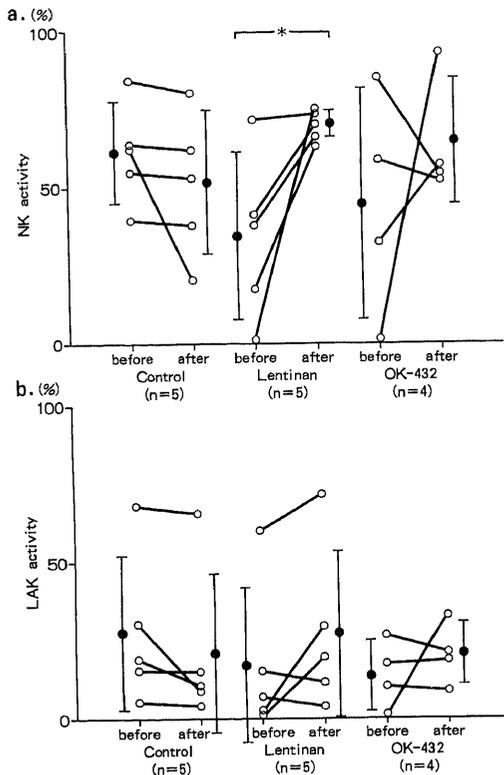


Fig. 5. The augmented effects of administration of BRM on cytotoxic activity of PBL from the gastric cancer patients before surgical operation (n=14). Lymphocytes were cultured in RPMI-1640 medium containing 5% ABS in the presence of rIL-2 (1000U/ml) for 5 days. After the culture, stimulated lymphocytes were tested with NK activity (a.) and LAK activity (b.). NK activity was examined with specific ^{51}Cr release from ^{51}Cr -labeled K-562 and ^{51}Cr -labeled Daudi cells were used for LAK activity. The large closed circles (●) show mean values and each bar represents mean \pm S.D. Open circles (○) show the highest activity of each sample and straight line that link open circles of PBL obtained before BRM administration with those after BRM administration show that these samples derived from the same patient. *, $p < 0.05$ by paired t test.

Ⅲの胃癌患者の末梢血リンパ球は十分に養子免疫療法に応用できることが期待された。また、加齢による活性の変化についても、Oldham²⁹⁾は加齢とNK活性には相関がないと報告しているが、Saksela²⁹⁾は加齢とともに増大する傾向があると述べるなど一致をみていない。今回の著者の結果では加齢による活性の変化は認めなかった。しかしながら、各年齢で個体差による活性の変動が大きく、この点が一定した見解に至らない大きな要因と考えられる。個体差がどのような要因に基づくかの解明は、有効なそして大量のLAK細胞の誘導に重要と考えられる。

LAK細胞の培養条件としては、初日1回のrIL-2添加では培養4～7日に活性は最も高値となり以降は低下するので、細胞増殖も考慮して3～5日ごとに培地交換し、rIL-2を加えていくのが一般的と思われる。血清については、5% ABS加RPMI-1640培地で誘導されたLAK細胞は10% FCS加RPMI-1640培地で誘導されたLAK細胞よりも、NK活性およびLAK活性は低値をとるが、それは血清中に含まれる成長因子(growth factor)の差が原因と考えられる。無血清培地AIM-Vでは5% ABS加RPMI-1640培地とほぼ同等のNK活性およびLAK活性のあるLAK細胞が誘導可能であった。リンパ球亜群を検索すると、10% FCS加RPMI-1640培地の培養では、LEU7+やLEU11+が増加することからNK細胞由来LAK細胞の増殖が示唆されるが、5% ABS加RPMI-1640培地による培養ではLEU7+やLEU11+は減少し、T細胞由来LAK細胞の増殖が示唆される。5% ABS加RPMI-1640培地で誘導されたLAK細胞でNK活性の増加が認められるのは、Phillipら²⁹⁾の指摘のごとく、T細胞由来LAK細胞がK-562に細胞障害性に働くためと考えられる。また単球については、インターロイキン-1(interleukin-1, IL-1)や腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor, TNF)を産生し、T細胞の表面にIL-2レセプターを誘導する働きがあると考えられるので、今回はあえて単球を除かなかった。

さて、RosenbergらがLAK細胞とrIL-2を併用した養子免疫療法の治験を行ない、悪性黒色腫・結腸癌・腎癌・転移性肺癌などの25例中11例に効果が認められたと報告して以来⁹⁾、我が国でも各領域の癌にLAK療法を施行する施設が増加し、臨床例も多々報告されつつある。しかしながら、臨床効果を得るために十分な細胞障害活性を持つLAK細胞を大量に誘導する培養方法は未だ確立されていないのが実情である。そこで著者は、まずレクテンであるPHAの併用

を試みた。PHAは非特異的細胞分裂物質の一種であり、主としてT細胞に働き幼若化を起こす作用があり、またヘルパーT細胞に働きIL-2産生を刺激する²⁹⁾ことや、各種サイトカインに対する誘導能を持つことが知られており、PHAにより殺腫瘍リンパ球細胞を誘導する方法等も報告されている²⁹⁾。しかし、PHA自体は強力な血球凝集素であるので、培養当初の数日間PHA刺激し、十分洗浄後rIL-2を添加する方法を選択し検討した。その結果、PHA単独添加群ではNK活性は軽度増大するが、LAK活性は増大しなかった。またPHAとrIL-2の併用により細胞数は15日間で最高10倍程度まで増加するものの、rIL-2単独で培養したLAK細胞と比べて活性は有意に低下した。経時的変動を見ると、rIL-2添加5日前後に活性の高値を示しながら以後漸減する症例が多くを占めたが、rIL-2を再添加してさらに活性が増大してくる遅延型の症例もあり、個体差が目立った。しかしながら、仮に殺腫瘍効果が細胞数と細胞障害活性の積に比例するとすればPHAの併用も多少期待できるが、細胞障害活性が低値を示すため、臨床応用には不十分と思われる。そこで次に、高い細胞障害活性を持つLAK細胞を得るため、手術時に得られる所属リンパ節や脾の利用に注目してみた。いずれも少量の組織で大量のリンパ球が得られる利点があり、抗腫瘍性の高いLAK細胞を誘導できれば、養子免疫療法に十分活用できると考えられるからである。文献上、所属リンパ節リンパ球由来のLAK細胞は末梢血リンパ球由来のLAK細胞に比べて活性が低いとする報告²⁹⁾が多いが、胃原発巣近傍のリンパ節のリンパ球は腫瘍細胞を認識し、特異的な細胞障害活性を有している可能性が推測される。事実、管ら²⁹⁾も培養リンパ球に可溶性抗原を添加した場合に自己腫瘍に対する障害活性をみると、所属リンパ節リンパ球の方が末梢血リンパ球よりも障害活性の上昇度が高いと報告している。一方、脾リンパ球はサプレッサーT細胞が多いとされるにもかかわらず、活性の高いLAK細胞が得られるとする報告²⁹⁾がある。著者の検討では、所属リンパ節リンパ球由来のLAK細胞は末梢血リンパ球由来のLAK細胞と比べて有意($p < 0.01$)に活性が低かった。リンパ球亜群をみると、所属リンパ節リンパ球由来のLAK細胞では末梢血リンパ球由来のLAK細胞と比較して、サプレッサーT細胞(CD8+11+)の増加とヘルパーインデューサーT細胞(CD4+4B4+)の増加が特徴的であった。また、リンパ節の転移の有無によりリンパ球亜群に差はなかったが、転移陰性のリンパ節から誘導されたLAK細胞の中に、NK活性および

LAK 活性が末梢血リンパ球由来の LAK 細胞より高い症例が数例あり、臨床応用における有用性が期待された。さらに脾リンパ球由来の LAK 細胞は全例、末梢血リンパ球由来の LAK 細胞より高い LAK 活性を示し、しかも細胞増殖も良い傾向にあり、組織を一時保存して段階的に戻す方法等の開発も含め、今後さらに検討する価値があると考えられた。

最後に患者側の処置として、BRM を前投与しておくことで rIL-2 添加培養により誘導した LAK 細胞の活性に変動がないか検討した。レンチナンは、単球系に作用して IL-1 産生を促進する、あるいは NK 活性を増大させる等の作用をもつ BRM であり、IL-2 レセプター陽性の T 細胞を増加させることから、近年とくに rIL-2 との併用において注目されている BRM である。一方、OK-432 は NCI (National Cancer Institute, USA) による BRM スクリーニングでも高い評価を得ており、NK 活性増強や IL-2 産生誘導能が認められるなど、多種類のサイトカインを誘導する物質 (multi-cytokine inducer) として胃癌に対し、広く用いられている。今回の実験結果からは、レンチナンを投与した症例は、NK 活性は 5 例全例、LAK 活性についても 5 例中 3 例に活性増大が認められた。レンチナンは副作用が少ないという長所もあり、リンパ球を採取する前の患者生体に用いる有効性が期待された。一方、OK-432 を投与した症例でも半数で NK 活性および LAK 活性の増大が認められ、BRM 前投与による LAK 細胞の活性増大効果が期待された。

養子免疫療法について、現在は藤本³⁰⁾のいうような、腫瘍特異性をもつ細胞障害性 T リンパ球や、Rosenberg ら³¹⁾のいう腫瘍浸潤リンパ球、あるいは抗原感作リンパ球の優位性が強調されているが、逆に奥野らの指摘³²⁾のように腫瘍細胞自体が抗原性に変調をきたしたり、抗原性が脱落したりすれば、腫瘍特異的な免疫療法はたちまち無力となると考えられ、特に消化器癌のように免疫学的に異種抗原性 (heterogenous antigenicity) を有すると考えられる癌には、LAK 細胞のような非特異的なエフェクター細胞の方が実用的とも考えられる。

さて、細胞障害活性の指標である ⁵¹Cr 遊離試験は著者の検討では、同一個体の同時期の反復する測定でも再現性のある結果は得られた。しかし、本法は測定に長時間を要し、また諸家の報告によれば必ずしも臨床効果と相関しないと言われており、今後の課題となろう³³⁾。従って、蛍光色素 (carboxy fluorescein diacetate, CFDA) 生細胞染色法により細胞障害性を測定する方法³⁴⁾や、あるいは細胞障害性因子である

パーフォリン (perforin)³⁵⁾およびその他の細胞障害効果を持つ未知なる物質を検出する方法など、より臨床効果と密接に相関する指標の測定法を開発する必要はある³⁶⁾。

また LAK 療法を画一のプロトコルで施行している施設が多いが、免疫反応は生理的反応であり種々の制約を受けるため、個体により多様な反応を示すと考えられる。従って、患者のリンパ球を生体外で培養し、細胞数や細胞障害活性の経時的変動を調べ、また PHA や rIL-2 あるいは各種 BRM に対するそれぞれの反応性を検討したうえで、各症例に独自のプロトコルを立案すべきであろう。今後は、個体差の生じる原因の検索を進め、より有効に画一的に活性を持つリンパ球を得る手段を考えるとともに、患者別至適投与方法をさらに詳細に決定していく必要があると考えられる。

結 論

胃癌患者に対する、補助療法の 1 つとして、LAK 細胞を用いた養子免疫療法を行なうことを前提に各種リンパ球の培養実験を行ない、以下の結論を得た。

1. LAK 細胞の培養に際しては、5% ヒト AB 血清加 RPMI-1640 培地あるいは無血清培地で、rIL-2 1000U/ml 添加培養後 5 日前後に高い活性を持つ LAK 細胞が誘導された。
2. stage II および III の中期胃癌患者の末梢血リンパ球より誘導される LAK 細胞は、養子免疫療法に應用するのに十分な抗腫瘍活性を有していた。
3. リンパ球を生体外で培養する際、PHA と rIL-2 を併用すると、LAK 細胞数は増加するが、活性は低下する傾向にあった。しかし、健康人にも胃癌患者にも、PHA や rIL-2 刺激による細胞増殖、細胞障害活性の経時的変動には、個体差が認められた。
4. 脾リンパ球由来の LAK 細胞や転移陰性のリンパ節由来の LAK 細胞には末梢血由来の LAK 細胞より活性の高いものがあり、臨床応用の有用性が期待された。
5. レンチナンや OK-432 を胃癌患者に前投与した後に採取した末梢血リンパ球から、より高い活性を持つ LAK 細胞が得られ、BRM 前投与の有用性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導、ご校閲を賜りました恩師唐伊正義教授に深甚なる感謝の意を表します。さらに研究遂行に当たり、懇切なご助言、ご指導を賜りました本学が研究

所分子免疫部右田俊介教授, 免疫生物部坂井俊之助助教授, ウィルス部田中淳之助教授, 佐藤博士ならびにウィルス学教室の皆様, 終始ご協力いただいた外科教室の諸先生に厚く御礼申し上げます。

なお, 本論文の一部は, 第48回日本癌学会総会, 第2回JBRM学会総会, 第7回北陸腫瘍免疫化学療法研究会において発表した。

文 献

- 1) 磨伊正義, 高橋 豊, 上野雅資: 胃癌の生物学的多様性に基づいた集学的治療の概念. *Oncologia*, **20**, 51-61 (1987).
- 2) Sakai, N. S., Murayama, T. & Koshimura, S.: Production of tumor-specific and -nonspecific immunoglobulins in mice treated with OK-432. In J. Ishigami (ed.), *Recent Advances in Chemotherapy*, 1st ed., p119-125, Excerpta Medica, Amsterdam, 1985.
- 3) Mai, M., Ueno, M., Sakai, N. S. & Koshimura, S.: The evaluation of the immune response induced by OK-432 for gastric cancer (Proc. 15th Int. Congress Chemother.). In H. P. Kuemmerle (eds.), *Progress in Chemotherapy*, 1st ed., p194-195, Ecomed, Landsberg, 1987.
- 4) 磨伊正義, 太田孝仁, 藤本敏博, 董新舒: スキルス胃癌の集学的治療. *臨床医*, **15**, 1880-1883 (1989).
- 5) 藤本敏博, 磨伊正義, 表 和彦, 上田 博, 高橋豊, 荻野知巳: 胃癌の腹膜播種に対する MMC, OK-432 の術中大量腹腔内投与の効果について. *Biother.*, **4**, 95-100 (1990).
- 6) 沢口 潔, 磨伊正義, 山田志郎: OK-432 の経内視鏡的局注が著効を示した進行胃癌の2症例. *Biother.*, **2**, 591-596 (1988).
- 7) Taniguchi, R., Matsui, H., Fujita, R., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. & Hamuro, J.: Structure and expression of cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, **302**, 305-310 (1983).
- 8) Thompson, J. A., Lee, D. J., Lindgren, C. G., Benz, L. A., Collins, C., Levitt, D. & Fefer, A.: Influence of dose and duration of infusion of interleukin-2 on toxicity and immunomodulation. *J Clin. Oncol.*, **6**, 669-678 (1988).
- 9) Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitman, S., Linehan, W. M., Robertson, C. N., Lee, R. E., Rubin, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C. G. & White, D. E.: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.*, **316**, 889-897 (1987).
- 10) Sedman, P. C., Ramsden, C. W., Brennan, T. G., Giles, G. R. & Guillou, P. J.: Augmentation of lymphokine-activated killer cell activity in patients with gastrointestinal cancer. *Br. J. Surg.*, **75**, 591-594 (1988).
- 11) 胃癌研究会: 外科・病理胃癌取扱い規約, 改訂第11版, 12頁, 金原出版, 東京, 1985.
- 12) Uchida, A. & Hoshino, T.: Clinical studies in cell mediated immunity in patients with malignant disease. *Cancer*, **45**, 476-483 (1980).
- 13) Muul, L. M., Director, E. P., Hyatt, C. L. & Rosenberg, S. A.: Large scale production of human lymphokine activated killer cells for use in adoptive immunotherapy. *J. Immunol. Methods*, **88**, 265-275 (1986).
- 14) Hoyer, M., Meineke, T., Lewis, W., Zwilling, B. & Rinehalt, J.: Characterization and modulation of human lymphokine (interleukin2) activated killer cell induction. *Cancer Res.*, **46**, 2834-2838 (1986).
- 15) 田口鐵男, 木本安彦: リンパ球養子免疫療法 - LAK 療法とその問題点 -. *Karkinos*, **1**, 379-386 (1988).
- 16) 大谷洋一: 癌患者の Natural killer (NK) 細胞活性に関する臨床的研究. *日臨外医学会誌*, **45**, 569-583 (1984).
- 17) 佐治重豊, 大岩卓明, 種村広巳, 吉田智彦: 免疫抑制因子除去療法の現況とその展望. *Biother.*, **3**, 506-514 (1989).
- 18) 峠 哲哉, 山口佳之, 高山孝彦, 馬場信年, 家護谷泰秀, 黒井克昌, 服部孝雄: サプレッサー因子と免疫抑制細胞との関連性. *Biother.*, **3**, 487-495 (1989).
- 19) Peter, H. H., Fischer, J. P., Fridman, W. H., Aubert, C., Cesarini, J. P., Roubin, R. & Kourilsky, F. M.: Cell-mediated cytotoxicity in vitro of human lymphocytes against a tissue culture melanoma cell line (IGR3). *J. Immunol.*, **115**, 539-548 (1975).
- 20) Troye, M., Perimann, P., Larsson, A., Blomgren, H. & Johansson, B.: Cellular cytotoxicity in vitro in transitional cell carcinoma of the

- human urinary bladder: ^{51}Cr -release assay. *Int. J. Cancer*, **20**, 188-198 (1977).
- 21) 青池 成: 胃癌患者血中インターフェロンとその産生細胞に関する研究. *日消病会誌*, **82**, 2723-2732 (1985).
- 22) Oldham, R. K.: Cellular microcytotoxicity in human tumor system: Analysis of results. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 1305-1308 (1975).
- 23) Saksela, E.: Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. *Immunol. Rev.*, **44**, 71-100 (1979).
- 24) Phillips, J. H. & Lanier, L. L.: Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis. *J. Exp. Med.*, **164**, 814-818 (1986).
- 25) Palacios, R.: Mechanism of T cell activation: Role and functional relationship of HLA-DR antigens and interleukins. *Immunol. Rev.*, **63**, 73-110 (1982).
- 26) Mazumder, A., Grimm, E. A. & Rosenberg, S. A.: Characterization of the lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocytes activated in vitro with phytohemagglutinin. *J. Immunol.*, **130**, 958-962 (1983).
- 27) 木本安彦, 田中利茂, 田口鐵男: リンパ節リンパ球より誘導された LAK 細胞. *Biother.*, **2**, 708-714 (1988).
- 28) 菅 典道, 沖野 孝, 中西正樹, 佐藤剛平, 三瀬圭一, 大垣和久, 堀 泰祐, 児玉 宏, 戸部隆吉: 培養リンパ球移入療法 (adoptive immunotherapy; AIT) の臨床効果とその増強. *Human Cell*, **1**, 289-296 (1988).
- 29) 高木宏巳, 奥野清隆, 中村哲彦, 国土修平, 岩佐善二, 安富正幸: ヒト脾細胞を用いた抗腫瘍エフェクター細胞の誘導とその臨床応用に関する基礎的研究. *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.*, **21**, 721-727 (1986).
- 30) 藤本重義: 自家癌に対する細胞障害性 T 細胞. *Karkinos*, **1**, 333-342 (1988).
- 31) Rosenberg, S. A., Spiess, P. & Lafreniere, R.: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*, **233**, 1318-1321 (1986).
- 32) 奥野清隆, 高津聖志: 新しい抗腫瘍免疫療法の展望とその問題点—T 細胞増殖因子 (TCGF; IL-2) を用いる新しい癌治療法の開発とその問題点—. *Oncologia*, **1**, 37-42 (1982).
- 33) 佐治重豊, 種村広巳, 坂田一記: IL-2, TNF を用いた癌の治療—第 8 回癌免疫外科研究会のまとめ—. *Oncologia*, **22**, 55-63 (1989).
- 34) Bruning, J. W., Kardol, M. J. & Arentzen, R.: Carboxy fluorescein fluorochromasia assays. I. Non-radioactively labeled cell mediated lympholysis. *J. Immunol. Methods*, **33**, 33-35 (1980).
- 35) Shinkai, Y., Takio, K. & Okumura, K.: Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature*, **334**, 525-527 (1988).
- 36) 押味和夫: LAK 細胞の多様性. *臨免疫*, **21**, 633-642 (1989).

Experimental Studies with Adoptive Immunotherapy for the Gastric Cancer Patients Toshihiro Fujimoto, Department of Surgery, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 420—435 (1990)

Key words gastric cancer, interleukin-2, lymphokine activated killer cell, adoptive immunotherapy

Abstract

In the present study we tried to characterize lymphokine activated killer (LAK) cells, with the eventual aim of using LAK to help cure gastric cancer patients. Lymphocytes were collected from the peripheral blood of healthy donors and gastric cancer patients at various clinical stages and were cultured in the presence of recombinant interleukin-2 (rIL-2) and phytohemagglutinin (PHA). Regional lymphnodal lymphocytes (RLNL) and spleen lymphocytes (SL) were also obtained from gastric cancer patients and tested for their potential to induce LAK activity. Proliferations, natural killer (NK) and LAK activity and subsets of LAK cells were evaluated as immunological parameters. The results indicated that the LAK cells induced from lymphocytes obtained from patients at stage II and III, had significantly higher activity compared with those at stage IV. Therefore, the LAK cells induced from lymphocytes of stage II and III patients appear to be more effective for adoptive immunotherapy (AIT) for patients at relatively advanced stages. We induced LAK cells with high cytotoxic activity against the target cells, by using culture medium containing 5% human AB serum as well as serum-free AIM -V medium. In the presence of PHA and rIL-2, the lymphocytes proliferated 2-10 fold after 15 days of culture, while their cytotoxic activity gradually decreased. The kinetics of cytotoxic activity generated in the cultures with rIL-2, indicated that the culture period required for the highest cytotoxic activity, varied among the tested samples. In many cases, we observed high cytotoxic activity at 5 or 10 days after the initiation of culture, while in other samples the higher activity was observed on the 15 th day. Lymphocytes purified from RLNL were also tested for their LAK activity after being cultured in the presence of rIL-2 and showed lower cytotoxic activity than similarly treated PBL from the same patient, while lymphocytes from either SL or RLNL without metastases, showed higher cytotoxic activity. Flowcytometric analysis with these rIL-2 activated cells derived from lymphocytes of different organs, showed that induced cytotoxic lymphocytes from RLNL, contained many suppressor and helper inducer T cells. When patients were administered with biological response modifiers (BRM), either of Lentinan or OK-432 before surgery, their PBL induced potent LAK activity after the culture with rIL-2. In summary, we showed that the lymphocytes from gastric cancer patients at stage II and III could be induced to LAK cells which may be effective for AIT. We also propose that in each case of AIT we have to examine the kinetics of lymphocyte proliferation and the generation of LAK activity and then establish a specific protocol for each patient before being subjected to AIT.