

Studies on the Induction of Tumoricidal Activity of Peripheral Blood and Regional Lymphnode Lymphocytes in Patients with Lung Cancer

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/2297/7863

肺癌患者末梢血および局所リンパ節リンパ球の 抗腫瘍活性の誘導に関する研究

金沢大学医学部第一外科学講座 (主任: 岩 喬教授)

橋 爪 泰 夫

(昭和61年2月15日受付)

肺癌患者における末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte, PBL) 及び局所リンパ節リンパ球 (regional lymphnode lymphocyte, RLNL) の免疫学的抗腫瘍活性の様相を, モノクローナル抗体によるリンパ球亜群の分別, natural killer (NK) 活性, recombinant interleukin 2 (rIL-2) あるいは IL-2 誘起剤である OK-432 刺激による lymphokine activated killer (LAK) 活性及び IL-2 産生能などを指標として検討した。PBL におけるリンパ球亜群では, IV期の患者で OKT3 陽性細胞 (末梢血 T細胞) 及び OKT4 陽性細胞 (helper/inducer T細胞) の減少, OKT8 陽性細胞 (suppressor/cytotoxic T細胞) の増加, T4/T8 値の低下がみられた。NK 活性は病期の進行とともに低値を示した。PBL を rIL-2 存在下で 3~5 日間培養すると, NK 抵抗性のヒト肺癌培養株, PC-3 細胞や PC-10 細胞に対する細胞傷害活性 (LAK 活性) が出現した。PBL の IL-2 産生能は, 術前にはほとんどなかったが, 術後, 回復してくる症例がみられた。RLNL のリンパ球亜群では, 転移陽性群で OKT3 陽性細胞, OKT4 陽性細胞の減少, OKT8 陽性細胞の増加, T4/T8 値の低下がみられた。転移陰性群では, T細胞の構成で OKT4 陽性細胞が優位を占めていた。NK 活性はほとんど検出されなかったが, rIL-2 による LAK 活性の誘導がみられ, RLNL の IL-2 産生能は PBL の 10~100 倍と高値を示した。また, OK-432 処理により, PBL 及び RLNL で LAK 活性の誘導がみられた。以上の成績から, 肺癌患者に対し, IL-2 や OK-432 を利用する免疫療法の有用性が示唆された。また, 転移のない肺癌局所リンパ節が, 悪性腫瘍の全身転移に対する biological barrier としての機能を果していることが明らかにされた。

Key words lung cancer, interleukin 2, OK-432, lymphokine activated killer cell

肺癌は近年著しく増加の傾向にあるが, 一般に肺癌患者では宿主の免疫能が他臓器癌患者に比較して著明に低下しており¹⁾, そのために潜在的に全身性転移を生じ易く, 結果として予後は不良で遠隔成績も決して良好とはいえない²⁾。そこで, 特異的あるいは非特異的に宿主免疫機能を賦活することによって, 肺癌の進展を制禦しようとする, いわゆる免疫療法の試みが積極的に行われるようになってきた³⁾。

また, 肺癌の予後が不良であるもう 1 つの要因には, 腫瘍浸潤が, 特にリンパ行性に進展することがあげられる⁴⁾。一般に腫瘍局所あるいはその領域のリンパ節

は, いわゆる biological barrier として腫瘍の進展を防禦する機能を有しているものと考えられている⁵⁾。しかし, 肺癌患者では, 容易にリンパ節転移が生じ, ひとたび肺門, 縦隔リンパ節転移が生じると容易に遠隔転移をきたし, 予後を著しく不良にする。

このような基盤において, 肺癌患者の末梢血及び局所リンパ節リンパ系細胞の抗腫瘍能を把握することは, 免疫療法を施行する上できわめて重要である。同時にこれらリンパ系細胞の抗腫瘍活性を上昇させる方法の検討と開発は, リンパ系細胞の治療への応用に不可欠である。

Abbreviations: BRM, biological response modifier; C, complement; FCS, fetal calf serum; IL-2, interleukin 2; KE, Klinische Einheit; LAK, lymphokine activated killer; NK, natural killer; PBL, peripheral blood lymphocyte; PBS, phosphate buffered saline; PHA,

本研究では、健康人あるいは肺癌患者を対象とし、末梢血及び局所リンパ節におけるリンパ球亜群の相違、natural killer (NK) 活性の比較、in vitro での interleukin 2 (IL-2) による腫瘍細胞傷害活性の増強効果や IL-2 産生能、さらに biological response modifier (BRM) の一つ、OK-432 による細胞傷害活性や IL-2 産生能の増強効果⁵⁾について比較検討した。

本研究で IL-2 に主点を置いた理由は、T 細胞の増強、活性化及び種々のリンホカインの産生、促進に IL-2 が関与していることが最近明らかにされていること⁶⁾、そして、Taniguchi ら⁷⁾によって IL-2 遺伝子がクローニングされ、大腸菌を利用した遺伝子組換えによる IL-2 (recombinant interleukin 2, rIL-2) が一種の蛋白として比較的容易に入手できるようになり、且つ、治療面への応用が期待されているからである。

対象および方法

I. 対 象

1984年5月より1985年11月までに金沢大学第1外科及び石川県立中央病院胸部外科に入院し、病理組織学的に肺癌と確定診断された63例を対象とし、末梢血及び局所リンパ節を用いた。年齢は39~79才(平均62.4才)、性別は男性42例、女性21例であった。病理組織型分類では、扁平上皮癌32例、腺癌29例、大細胞癌1例、小細胞癌1例であり、病期分類はUICC(1978)によるTNM分類⁸⁾によった。末梢血の対照として健康成人10人(男性7人、女性3人、平均年齢42.6才)について検索した。また、局所リンパ節の対照としては、良性肺炎患者6例(結核性肉芽腫4例、非特異的炎症性肉芽腫2例)から術中採取したリンパ節について検索した。性別は男性4例、女性2例、平均年齢50.8才であった。

II. リンパ球の分離と浮遊液の調整

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

単核球の分離はFicoll-Hypaque比重遠心法⁹⁾により行った。術前に採取したヘパリン加末梢血を0.1Mリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)(phosphate buffered saline, PBS)にて2倍に希釈後、Ficoll-Hypaque液(比重1.077)(Lymphoperp)(Nyegaard, Oslo, Norway)上に静かに重層させ、400×g、4°Cで20分間遠心した。遠心後、中間層を採取し、ペニシリン200U/ml及びゲンタマイシン10μg/mlを添加したRPMI-1640培養液(Gibco, Gran Island, New York,

USA)にて3回遠心洗浄し、単核球を分離、細胞浮遊液を調整した。次いで、直径6cmのプラスチックシャーレ(Falcon, Oxnard, California, USA)に単核球浮遊液6mlを撒布し、37°C、5%CO₂下で1時間静置後、上清液を静かに採取することによりプラスチック付着細胞を除去した。非付着細胞(PBL)浮遊液を200×gで5分間遠心した後、その沈渣を非働化仔牛血清(heat-inactivated fetal calf serum, FCS)(Gibco)を10%濃度に加えたRPMI-1640培養液中に浮遊させた。

2. 局所リンパ節リンパ球(regional lymphnode lymphocyte, RLNL)

術中採取した局所リンパ節をPBS中で眼科用尖刃で細切し、金属メッシュ(NBC工業、大阪)で濾過した後、Ficoll-Hypaque比重遠心法によって単核球を分離し、PBLと同様の方法によりプラスチック非付着細胞を集め、これをRLNLとした。また、リンパ節の一部は肺癌の転移の有無を検索する病理組織標本用とした。

III. モノクロナール抗体によるリンパ球亜群の分類

ヒトリンパ球に対する各種モノクロナール抗体を用い、肺癌患者からのPBLとRLNLについてリンパ球亜群を測定した。3.5×10⁶ cells/mlの濃度に調整したリンパ球浮遊液100μlにモノクロナール抗体10μlを加え、4°C、30分間静置した。これにPBS1mlを加え、レーザーフローサイトメーターSpectrum III(Ortho Diagnostic System, Raritan, New Jersey, USA)によって蛍光陽性細胞を測定した。使用モノクロナール抗体は、すべて市販で蛍光標識されたものであり、末梢血T細胞に反応性のOKT3, helper/inducer T細胞に反応性のOKT4及びsuppressor/cytotoxic T細胞に反応性のOKT8(Ortho Diagnostic System)、活性化T細胞及び末梢血B細胞に反応性のHLADR、NK細胞に反応性のLeu7、NK細胞及び好中球に反応性のLeu11a(Beckton-Dickinson, Mountain View, California, USA)、末梢血B細胞に反応性のB₁(Coulter, Hialeah, Florida, USA)を用いた。

IV. モノクロナール抗体と補体を用いた補体依存性細胞傷害反応によるリンパ球亜群の除去

モノクロナール抗体と補体(complement, C)を用いた細胞融解法¹⁰⁾により、特定のリンパ球亜群を分離、除去した。すなわち、Ficoll-Hypaque比重遠心法で調整したリンパ球浮遊液(3.5×10⁶ cells/ml)にモノクロ

phytohemagglutinin; rIL-2, recombinant interleukin 2; RLNL, regional lymphnode lymphocyte.

ナル抗体を1/200容量に加え，4°C，30分間静置した。次いで，リンパ球をRPMI-1640培養液で2回遠心洗浄後，新鮮家兎血清(Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada)を細胞浮遊液の1/4容量に加え，37°C，1時間反応後，0.2%トリパンブルー染色法により生細胞を算出し，10%FCS添加RPMI-1640培養液中で生細胞数 1×10^6 cells/mlに調整した。使用モノクローナル抗体は，OKT3, OKT4, OKT8, Leu7, 及びLeu11b (Beckton-Dickinson)の計5種であり，各れも補体結合性を有している。なお，家兎血清単独ではリンパ球に対し細胞傷害活性を有しないことを別途に確認した。

V. NK活性の測定

Ficoll-Hypaque比重遠心法により分離した新鮮リンパ球を10%FCS添加RPMI-1640培養液中で 2×10^6 cells/mlに調整し，その100 μ l宛を96穴平底型マイクロプレート(Falcon)の各穴に分注し，effector細胞とした。一方，in vitroで継代培養したヒト赤白血球細胞由来のK-562細胞をtarget細胞として用いた。1 $\times 10^6$ cells/ml濃度のK-562細胞浮遊液1 mlに100 μ Ciの ^{51}Cr (100 μ l) (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, USA)を加え，37°C，5%CO₂下で1時間反応後，RPMI-1640培養液で3回遠心洗浄した後，10%FCS添加RPMI-1640培養液に浮遊させたものを ^{51}Cr 標識K-562細胞浮遊液とした。次いで 1×10^5 cells/ml濃度に調整した ^{51}Cr 標識K-562細胞浮遊液100 μ lをeffector細胞液100 μ lに加えた(この条件ではeffector細胞とtarget細胞数比は20:1である)。37°C，5%CO₂下で4時間培養後，プレートのまま200 \times gで5分間遠心後，上清を各穴から100 μ l宛採取し，上清中の ^{51}Cr 放出量をauto well gamma counter ARC-501(アロカ，東京)にて測定した。リンパ球特異的細胞傷害活性を次式より算出し，NK活性の指標とした。

$$^{51}\text{Cr specific release}(\%) = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

maximum releaseはtarget細胞からの最大 ^{51}Cr 放出量で，target細胞に0.1 N HCl 100 μ lを加えた場合の ^{51}Cr 放出量を示し，spontaneous releaseは10%FCS添加RPMI-1640培養液100 μ lを加えて培養した場合のtarget細胞 ^{51}Cr 自然放出量である。

VI. rIL-2またはOK-432の添加培養による細胞傷害活性の測定

1×10^6 cells/ml濃度のリンパ球浮遊液1 mlに種々の濃度のrIL-2(塩野義製薬，大阪)またはOK-432(中外製薬，東京)100 μ lを添加し，37°C，5%CO₂下

で5日間培養した。NK細胞抵抗性のヒト肺扁平上皮癌由来培養細胞株のPC-10をtarget細胞とし，培養リンパ球による細胞傷害活性を測定し，rIL-2及びOK-432の至適濃度を決定した。次に，リンパ球浮遊液(1×10^6 cells/ml)1 mlに至適濃度のrIL-2またはOK-432を100 μ l添加し，経時的に細胞傷害活性を測定した。target細胞はK-562, PC-10及びPC-3(NK細胞抵抗性のヒト肺腺癌由来培養細胞株)を用いた。PC-3とPC-10の選択は病理組織型の検索結果に基づいた。細胞傷害活性の測定は，NK活性の測定と同様の方法を用いて行った。

VII. IL-2産生実験

1. IL-2被検体の調整

Ficoll-Hypaque比重遠心法で得たリンパ球を 1×10^6 cells/ml濃度に2%FCS添加RPMI-1640培養液中に浮遊させ，その1 mlを13 \times 100 mmのプラスチック試験管(Falcon)に分注した後，0.1%phytohemagglutinin (PHA) (Difco Laboratories, Boston, Massachusetts, USA)またはOK-432を0.05 KE/ml(乾燥菌体0.005 mgに相当)の濃度に添加し，37°C，5%CO₂下で48時間培養した。培養後，200 \times g，4°Cで10分間遠心後，その上清をIL-2被検体とした。

2. IL-2力価の測定

マウス由来のIL-2依存性増殖T細胞培養株CTLL-2を用いたbioassay¹¹⁾によって培養上清中のIL-2力価を測定した。すなわち，被検体100 μ lを96穴マイクロプレート上でRPMI-1640培養液により2段階希釈した。各穴に20%FCS添加RPMI-1640培養液で 5×10^4 cells/ml濃度に調整したCTLL-2細胞浮遊液100 μ l (5×10^3 cells/well)を加え，37°C，5%CO₂下で24時間培養した。培養終了4時間前に0.5 μ Ci (40 μ l)宛の ^3H -thymidine (New England Nuclear)を各穴に加え，培養終了後，細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターLSC-700(アロカ)にて測定した。IL-2加価(U/ml)の算出は，標準としてのrIL-2 (100 U/ml)による ^3H -thymidineの最大取り込み値の50%を与えるIL-2被検体の希釈倍数を計算し，その逆数をU/mlとして表現した。

VIII. 測定値の有意差検定

細胞傷害活性及びIL-2産生量の測定は，2~3回反復し，測定値は平均値 \pm 標準偏差(mean \pm S.D.)をもって示した。対応のある場合の平均値の有意差検定には，paired t-testを用い，多群間の有意差検定には，分散分析後，Duncan法を用い，危険率5%以下を有意差ありと判定した。

成 績

I. PBL, RLNL 亜群の変動

PBL 亜群は、肺癌患者 I 期 6 例, II 期 6 例, III 期 6 例, IV 期 7 例について検索した(表 1)。OKT3 陽性細胞の割合は対照群(健康成人 10 人)($67.1 \pm 5.5\%$)と肺癌患者 I, II, III 期の各群間に差はなかったが, IV 期では $49.2 \pm 8.2\%$ であり, 対照群と比較して有意に ($p < 0.05$) 低値を示した。OKT4 陽性細胞の割合は, 対照群 ($40.2 \pm 4.7\%$) と I, II, III 期の各群間に差はなかったが, IV 期では $28.4 \pm 6.4\%$ であり, 有意に ($p < 0.05$) 低値を示した。また, OKT8 陽性細胞の割合では, 対照群 ($25.8 \pm 3.5\%$) と I, II, III 期の各群間に差はなかったが, IV 期では $28.6 \pm 3.1\%$ を示し, 有意に ($p < 0.05$) 高値を示した。OKT4 陽性細胞と OKT8 陽性細胞の比率 T4/T8 値においては, IV 期 (1.02 ± 0.13) のみ対照群 (1.60 ± 0.39) に比べ有意に ($p < 0.05$) 低値を示した。HLADR 陽性細胞及び B₁ 陽性細胞の割合は各群間で差はなかったが, Leu7 陽性細胞では, 対照群の $11.7 \pm 3.4\%$ に対し, III 期 ($30.0 \pm 9.5\%$) においてのみ有意に ($p < 0.05$) 高値を示した。Leu11a 陽性細胞では, Leu7 陽性細胞の場合と同様, III 期 ($29.4 \pm 6.2\%$) においてのみ有意に ($p < 0.05$) 高値を示した。

RLNL では, 肺癌の転移の有無との関係についてリンパ球亜群の変動を検討した(表 2)。転移陽性群(13

標本)では, 対照群(良性肺疾患 6 標本)や転移陰性群(24 標本)と比較して, OKT3 陽性細胞及び OKT4 陽性細胞の割合が有意に ($p < 0.05$) 低値を示し, OKT8 陽性細胞が有意に ($p < 0.05$) 高値を示し, T4/T8 値が有意に ($p < 0.05$) 低値を示した。PBL に比べ, RLNL では T 細胞亜群のうち, OKT4 陽性細胞の占める割合が高く, T4/T8 値が著しく高値を示した。また, NK 細胞については, Leu7 及び Leu11a 陽性細胞ともに数%とほとんど認められなかった。

II. 肺癌患者リンパ球の NK 活性の変動

PBL の NK 活性は, 肺癌患者 I 期 12 例, II 期 6 例, III 期 12 例, IV 期 6 例について測定した(図 1)。⁵¹Cr 放出度を指標とした NK 活性は, 対照群(10 例)で $37.8 \pm 9.5\%$, I 期 $27.2 \pm 5.9\%$, II 期 $30.5 \pm 10.4\%$, III 期 $23.6 \pm 7.6\%$, IV 期 $16.5 \pm 5.2\%$ であり, 対照群と比較して I, III, IV 期で有意に ($p < 0.05$) 低値を示した。

RLNL については, 転移を認めない 10 標本について測定したが, その⁵¹Cr 放出度は $1.5\% \sim 9.7\%$ ($5.8 \pm 2.2\%$) を示し, NK 活性はほとんど検出されなかった。

III. rIL-2 添加によるリンパ球の細胞傷害活性の増強

1. rIL-2 の至適濃度

健康成人の PBL 1×10^6 cells/ml を種々の濃度の rIL-2 添加下で 5 日間培養し, PC-10 細胞に対する傷害

Table 1. Lymphocyte subsets of PBL in patients with cancer

Stage of lung cancer	Number of cases examined	Ratio (%) of PBL positive in reaction to monoclonal antibody							
		OKT3	OKT4	OKT8	HLADR	B1	Leu7	Leu11a	T4/T8
I	6	$60.4 \pm 15.5^*$	37.4 ± 13.3	23.8 ± 7.8	26.2 ± 3.8	13.6 ± 3.5	20.3 ± 7.2	20.5 ± 9.3	1.41 ± 0.85
II	6	59.2 ± 2.2	33.1 ± 4.4	23.4 ± 6.9	33.7 ± 11.6	15.2 ± 7.6	24.3 ± 9.6	17.8 ± 4.9	1.50 ± 0.42
III	6	63.4 ± 9.0	36.1 ± 11.6	25.2 ± 8.9	20.4 ± 7.9	9.9 ± 2.1	$30.0 \pm 9.5^{\#}$	$29.4 \pm 6.2^{\#}$	1.70 ± 1.04
IV	7	$49.2 \pm 8.2^{\#}$	$28.4 \pm 6.4^{\#}$	$28.6 \pm 3.1^{\#}$	22.9 ± 5.5	10.5 ± 3.1	14.6 ± 10.8	18.8 ± 9.1	$1.02 \pm 0.13^{\#}$
Control**	10	67.1 ± 5.5	40.2 ± 4.7	25.8 ± 3.5	29.4 ± 2.2	13.2 ± 1.0	11.7 ± 3.4	15.5 ± 2.5	1.60 ± 0.39

* Mean \pm S.D.

** Healthy adults.

Significantly different ($p < 0.05$) from control.

Table 2. Lymphocyte subsets of RLNL in patients with lung cancer

Presence of metastasis lung cancer	Number of cases examined	Ratio (%) of RLNL positive in reaction to monoclonal antibody							
		OKT3	OKT4	OKT8	HLADR	B1	Leu7	Leu11a	T4/T8
(-)	24	$66.7 \pm 9.8^*$	49.8 ± 19.5	9.3 ± 5.1	40.2 ± 17.9	28.9 ± 10.0	6.7 ± 5.9	4.0 ± 2.2	5.88 ± 2.80
(+)	13	$55.3 \pm 9.1^{\#}$	$38.4 \pm 3.2^{\#}$	$14.5 \pm 2.9^{\#}$	40.1 ± 17.2	25.4 ± 7.8	3.5 ± 1.6	6.3 ± 4.1	$2.73 \pm 0.52^{\#}$
Control**	6	70.4 ± 6.1	56.3 ± 3.9	12.9 ± 5.2	46.7 ± 2.9	23.5 ± 5.8	5.3 ± 2.1	3.8 ± 1.9	5.01 ± 1.37

*, #, Refer to the footnotes of Table 1.

** Patients with benign lung disease.

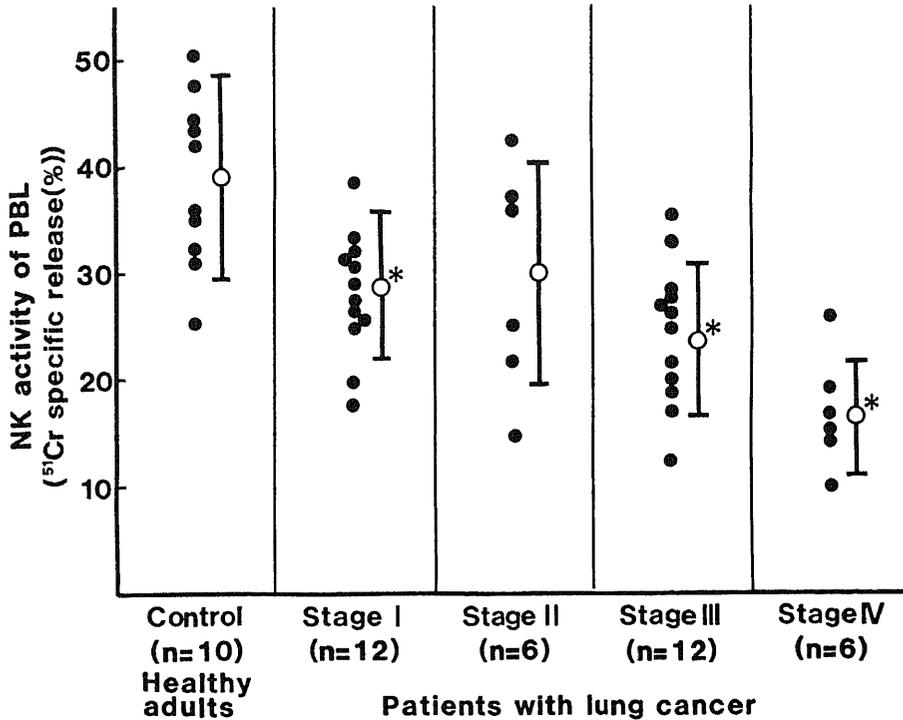


Fig. 1. NK activity of PBL in patients with lung cancer. PBL were tested for lysis of K-562 cells in ⁵¹Cr specific release assay. —○—, mean±S.D.. *, p<0.05: significantly different from control.

活性を測定した。図2に示すように、PBLにrIL-2を20 U/mlの濃度に添加培養したリンパ球の傷害活性が最高値を示したので、以下の実験では20 U/mlをrIL-2の至適濃度とした。

2. rIL-2添加培養リンパ球による細胞障害活性の経時的変化

rIL-2を添加して培養した対照群のPBL及びRLNLのK-562, PC-3及びPC-10細胞に対する傷害活性を、rIL-2添加前、rIL-2添加培養1日目、3日目及び5日目に測定した。

1) PBL (図3)

PBLのK-562細胞に対する傷害活性は、rIL-2添加前は37.8±9.5%であったが、rIL-2を添加して培養することにより著明に増強し、rIL-2添加培養1日目に最高値(81.0±7.2%)に達した。PC-3及びPC-10細胞に対するPBLの傷害活性は、rIL-2添加前各々7.3±3.4%, 3.4±4.1%を示し、活性は微弱であったが、rIL-2添加培養リンパ球では著明に増強した。しかしながら、K-562細胞に対する細胞傷害反応のrIL-2による増強とは若干異なり、培養3日目に最高値(PC-

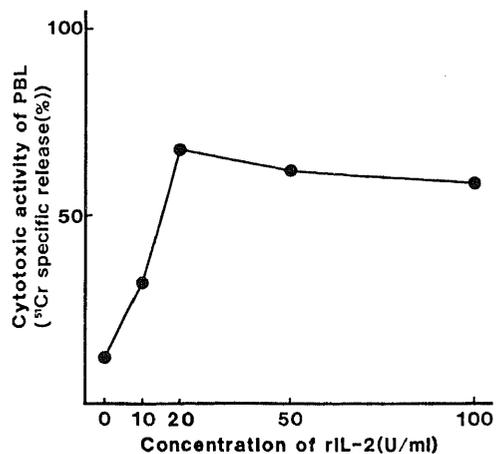


Fig. 2. Dose response of rIL-2 in inducing cytotoxic activity.

PBL (1×10⁶ cells/ml) from healthy adult were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and rIL-2 for 5 days and tested for lysis of PC-10 cells in ⁵¹Cr specific release assay.

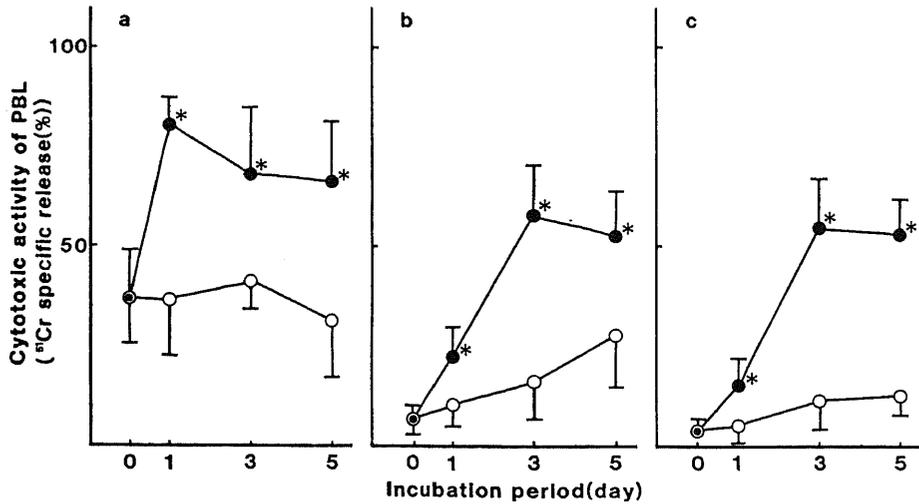


Fig. 3. Kinetics of induction of cytotoxic activity in PBL. PBL (1×10^6 cells/ml) from healthy adults were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and rIL-2 (20 U/ml) and tested for lysis of K-562 (a), PC-3 (b) and PC-10 (c) cells in ^{51}Cr specific release assay at 0, 1, 3 and 5 days of incubation period. Each value represents the mean \pm S.D. \circ , rIL-2 (-); \bullet , rIL-2 (+). *, $p < 0.01$: significantly different from rIL-2 (-) group.

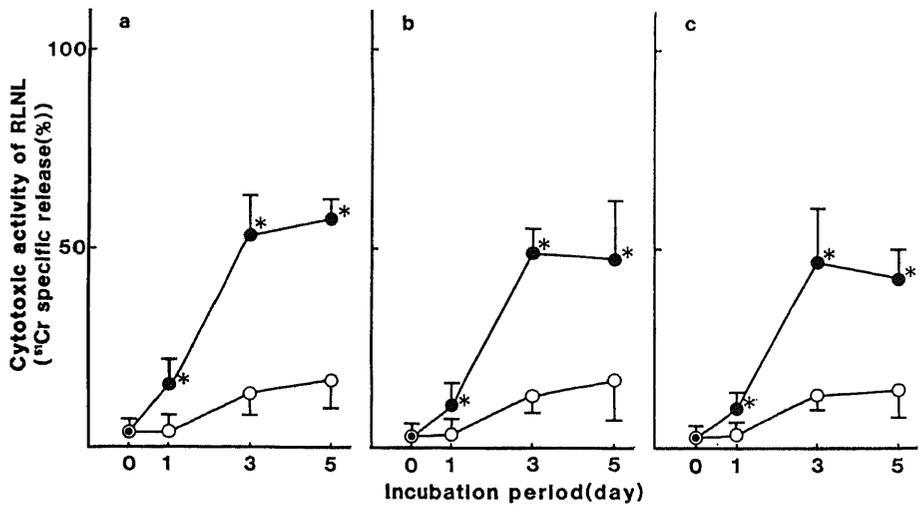


Fig. 4. Kinetics of induction of cytotoxic activity in RLNL. The experiment with RLNL from patients with benign lung diseases was carried out at the same conditions as in PBL (see Fig. 3). Target cells: a, K-562; b, PC-3; c, PC-10. Each value represents the mean \pm S.D. \circ , rIL-2 (-); \bullet , rIL-2 (+). *, $p < 0.01$: significantly different from rIL-2 (-) group.

3細胞, $58.2 \pm 13.1\%$; PC-10細胞, $54.9 \pm 13.7\%$)を示した。いずれの target 細胞に対しても, rIL-2 添加培養リンパ球の細胞傷害活性が無添加培養リンパ球と比較して有意に ($p < 0.01$) 高値を示した。

2) RLNL (図4)

RLNL の K-562 細胞に対する傷害反応は, rIL-2 添加前で $4.0 \pm 3.1\%$ と活性は微弱であったが, rIL-2 添加培養リンパ球では著明に増強した。しかしながら, PBL の場合とは異なり, rIL-2 添加培養リンパ球の傷害反応は 5 日目に最高値を示した。PC-3 及び PC-10 細胞に対しては, rIL-2 添加前のリンパ球ではほとんど傷害活性は認められなかったが, rIL-2 添加後, 3~5 日間培養することにより著明に活性の増強がみられた。また, PBL と同様, rIL-2 添加培養リンパ球の傷害活性は各々の target 細胞に対しても, 無添加の場合より有意に ($p < 0.01$) 高値を示した。

以上の対照群の rIL-2 添加培養 PBL (健康成人) 及び RLNL (良性肺疾患) の細胞傷害活性の経時的変化の成績に基づき, 以下の実験では rIL-2 無添加での培養直後, rIL-2 添加培養 1 日目及び 5 日目に細胞傷害活性を測定することにした。

IV. rIL-2 添加培養によるリンパ球亜群の変化

対照群のリンパ球に rIL-2 を添加培養した場合のリンパ球亜群の経時的変化を検討した。

1. PBL (表3)

各種モノクローナル抗体に陽性を示すリンパ球亜群の割合は, rIL-2 添加培養 1 日目のリンパ球では採血直後の値と比べ, ほとんど変化がなかった。培養 5 日目のリンパ球では, OKT3 陽性細胞 $85.3 \pm 6.1\%$, OKT4 陽性細胞 $57.4 \pm 4.7\%$ と 2 種のモノクローナル抗体に陽性を示す T 細胞の増加がみられた。Leu7 及び Leu11a 陽性細胞には変動はなかった。

2. RLNL (表4)

rIL-2 添加前のリンパ球亜群の測定結果と比較して, rIL-2 添加 5 日間培養のリンパ球で, OKT3, OKT4 及び OKT8 のモノクローナル抗体に陽性の T 細胞の増加がみられた。Leu7 及び Leu11a のモノクローナル抗体陽性細胞には変化がなかった。

V. 特定のモノクローナル抗体陽性細胞除去後の rIL-2 添加培養リンパ球による細胞傷害活性の変化

対照群リンパ球について, モノクローナル抗体を用

Table 3. Changes in lymphocyte subsets of PBL cultured with rIL-2

Incubation period (day)	Ratio (%) of PBL positive in reaction to monoclonal antibody				
	OKT3	OKT4	OKT8	Leu7	Leu11a
0	$63.1 \pm 5.4^*$	40.8 ± 4.8	25.1 ± 5.2	12.5 ± 3.7	13.6 ± 3.8
1	64.7 ± 9.8	43.2 ± 2.9	22.6 ± 3.5	13.3 ± 2.7	14.8 ± 2.1
5	85.3 ± 6.1	57.4 ± 4.7	28.9 ± 10.6	11.6 ± 2.8	12.8 ± 3.7

PBL (1×10^6 cells/ml) from healthy adults were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and rIL-2 (20U/ml). Lymphocyte subsets of PBL were measured at 0, 1 and 5 days of incubation period.

* Mean \pm S.D. (n=10).

Table 4. Changes in lymphocyte subsets of RLNL cultured with rIL-2

Incubation period (day)	Ratio (%) of RLNL positive in reaction to monoclonal antibody				
	OKT3	OKT4	OKT8	Leu7	Leu11a
0	$67.5 \pm 5.9^*$	54.2 ± 8.5	8.6 ± 3.1	2.6 ± 0.8	4.8 ± 1.7
1	62.8 ± 7.4	52.8 ± 6.3	9.4 ± 3.8	3.8 ± 1.5	6.9 ± 2.3
5	89.5 ± 2.2	70.8 ± 6.1	17.9 ± 7.2	2.9 ± 1.1	4.7 ± 1.3

RLNL (1×10^6 cells/ml) from patients with benign lung disease were cultured and assayed at the same conditions as described in Table 3.

* Mean \pm S.D. (n=6).

いて補体依存性細胞融解反応により特定のリンパ球を除去した後、rIL-2存在下で5日間培養し、PC-10細胞に対する傷害活性の変化を調べた(表5)。

PBLでは、OKT3、OKT8及びLeu11b陽性細胞を除去した場合にrIL-2添加による細胞傷害活性の増強が認められなかった。これに対し、RLNLでは、OKT3とOKT8陽性細胞を除去した場合のみにrIL-2添加による傷害活性の増強効果が認められなかった。

VI. 肺癌病期別患者のPBLにおけるrIL-2添加培養による細胞傷害活性の変化

肺癌患者I期15例、II期6例、III期16例、IV期6例のPBLについて、target細胞としてK-562細胞を用いて細胞傷害活性を測定した(図5a)。rIL-2添加前では、対照群に比べ、III期及びIV期で有意に($p < 0.05$)低値を示した。rIL-2を添加培養すると、培養1日目では全てにおいてrIL-2添加前の活性と比較して著明に活性値の上昇がみられた。対照群の傷害活性値と比較すると、III期及びIV期で有意に($p < 0.05$)低値を示した。rIL-2添加培養5日目のリンパ球では全てにおいて各期の培養1日目よりやや低値を示した。

PC-3細胞に対する傷害活性は、I期7例、II期3例、III期7例、IV期3例について測定した(図5b)。rIL-2添加前は各期を通じてほとんど傷害活性は認められなかったが、rIL-2添加培養1日目ですべてに傷害活性の

増強効果が認められた。さらに、5日間の培養リンパ球では全てにおいて著明な傷害活性の増強がみられたが、各群間に差はなかった。

PC-10細胞をtarget細胞とした場合では、I期8例、II期3例、III期9例、IV期3例について測定した(図5c)。rIL-2添加前では、target細胞PC-3での結果と同様、各期リンパ球の活性は微弱であった。rIL-2添加培養1日目のリンパ球では全てに傷害活性の増強がみられ、培養5日目では各期で培養1日目より著明な活性の増強がみられた。対照群と比較するとIV期で有意に($p < 0.05$)低値をとった。

VII. rIL-2添加培養したRLNLの細胞傷害活性と肺癌転移との相関

Target細胞としてK-562細胞を用い、肺癌患者における転移陰性リンパ節20標本、同陽性リンパ節13標本及び対照群(良性肺疾患)6標本について傷害活性を検討した(図6a)。rIL-2添加前のリンパ球では、各群で活性は微弱であったが、rIL-2添加培養1日目のリンパ球の細胞傷害活性は、各群でわずかに増強がみられた。培養5日目のリンパ球の細胞傷害活性は、転移陰性群で $49.1 \pm 4.3\%$ であり、著明な活性の増強効果が認められた。しかしながら転移陽性群での活性は $28.4 \pm 9.6\%$ であり、対照群($57.9 \pm 7.4\%$)及び転移陰性群と比較して有意に($p < 0.05$)低値を示した。

Table 5. Cytotoxic activity of PBL and RLNL cultured with rIL-2 after depletion of a specific lymphocyte subset by monoclonal antibody plus complement

Treatment**	Cytotoxic activity against PC-10 cells* (^{51}Cr specific release (%))	
	PBL	RLNL
Medium***	66.7 ± 5.1****	42.6 ± 7.2
Medium+C	66.4 ± 3.7	50.4 ± 3.7
OKT3+C	13.1 ± 6.2	10.3 ± 2.6
OKT4+C	67.1 ± 6.7	47.2 ± 3.6
OKT8+C	12.4 ± 3.8	9.2 ± 3.1
Leu7+C	56.2 ± 6.5	50.1 ± 6.4
Leu11b+C	16.9 ± 3.7	40.3 ± 9.3

* Lymphocytes (1×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and rIL-2 (20U/ml) for 5 day and tested for lysis of PC-10 cells in ^{51}Cr specific release assay.

** Lymphocytes were depleted of a specific lymphocyte subset by complement-mediated cytolysis with the use of monoclonal antibody and complement (C).

*** RPMI-1640 supplemented with 10% FCS.

**** Mean ± S.D. (n=3).

PC-3細胞をtarget細胞とした場合では, 転移陰性リンパ節7標本, 同陽性リンパ節6標本について検討した(図6b). 各群ともに, rIL-2添加前及びrIL-2添加培養1日目のリンパ球の細胞傷害活性は低値であったが, 培養5日目のリンパ球では, 対照群及び転移陰性群で著明に傷害活性の増強効果が認められた. しかし, 転移陽性群ではその活性は $20.2 \pm 5.0\%$ にすぎず

対照群や転移陰性群と比較して有意に($p < 0.05$)低かった.

PC-10をtarget細胞とした場合では, 転移陰性リンパ節13標本, 同陽性リンパ節7標本について検討した(図6c). rIL-2添加前及びrIL-2添加培養1日目のリンパ球では, PC-3細胞をtarget細胞とした場合と同様, 各群での傷害活性は低値であった. 5日間培養したリンパ球では, 対照群と転移陰性群に著明に活性の増強効果が認められたが, 転移陽性群では $21.6 \pm 10.3\%$ と他群と比較して有意に($p < 0.05$)低値を示した.

VIII. OK-432 刺激リンパ球による細胞傷害活性の変化

1×10^6 cells/ml濃度のリンパ球浮遊液にOK-432を至適濃度(0.05 KE/ml)に添加, 培養し, target細胞PC-3に対する細胞傷害活性の変化を検討した. 肺腺癌のI期症例3例について検討したところでは, PBL, RLNLともにOK-432存在下, 3~5日間の培養で細胞傷害活性の増加がみられたが, その程度はrIL-2存在下の場合よりやや低値であった(図7, 8).

IX. PBL 及び RLNL の IL-2 産生能

肺癌患者I期6例, III期5例について, PBL及びRLNLのIL-2産生能を検討した. PHA刺激の場合,

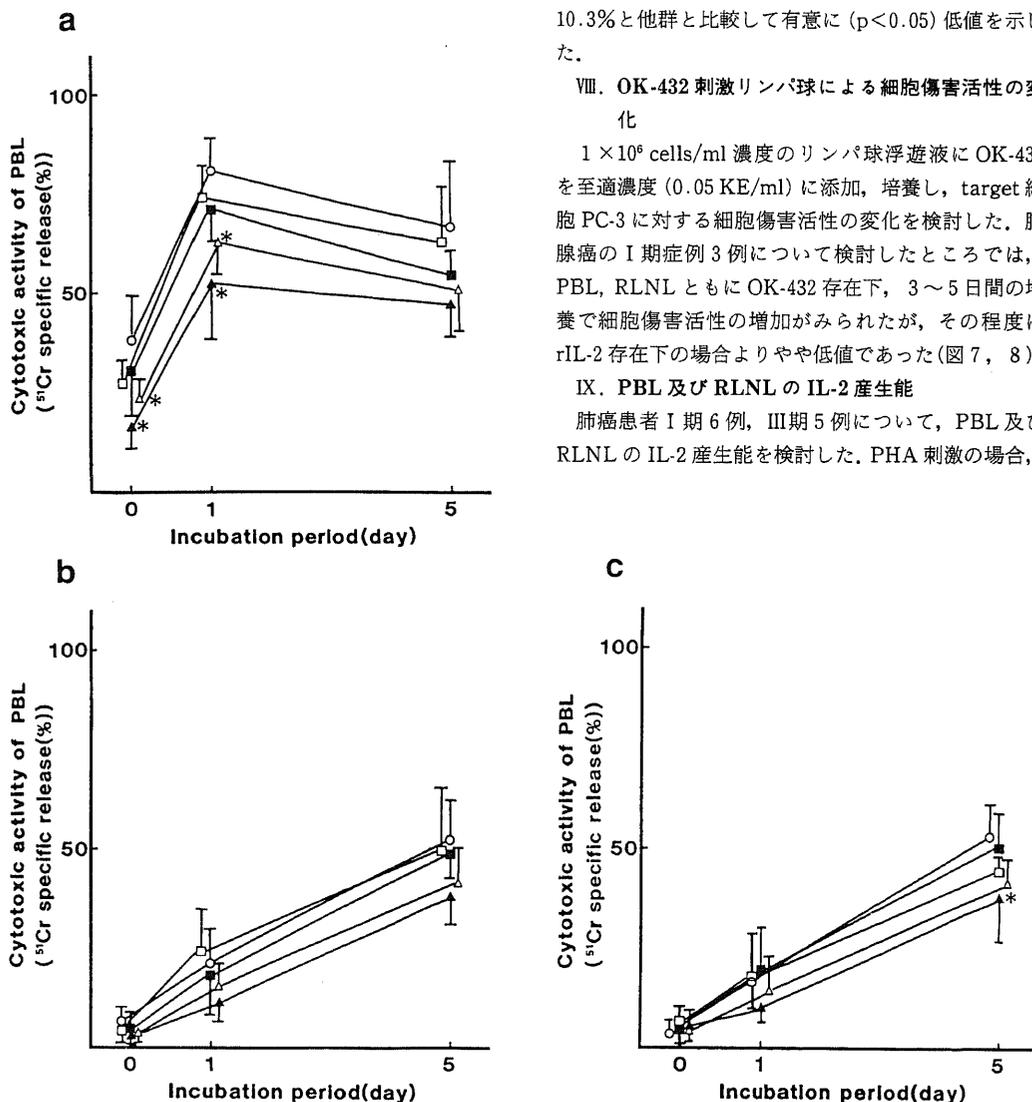


Fig. 5. Changes in cytotoxic activity of PBL by rIL-2. PBL (1×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and rIL-2 (20 U/ml) and tested for lysis of K-562 (a), PC-3 (b) and PC-10 (c) cells at 0, 1 and 5 days of incubation period. Tests were performed in ^{51}Cr specific release assay. Each value represents the mean \pm S.D.. \circ , control; \square , stage I; \blacksquare , stage II; \triangle , stage III; \blacktriangle , stage IV. *, $p < 0.05$: significantly different from control.

産生された IL-2 量は対照健康成人 (10 人) の PBL で 14.6 ± 10.2 U/ml に対し, 肺癌患者の PBL では 6.9 ± 9.6 U/ml, RLNL では 58.9 ± 28.8 U/ml であった (図 9a). PBL の IL-2 産生量は健康成人のそれに比し有意に ($p < 0.01$) 低かったが, RLNL では有意に ($p < 0.01$) 高値を示した.

OK-432 刺激リンパ球による IL-2 産生量は, 対照群の PBL で 9.3 ± 8.6 U/ml であったが, 肺癌患者の

PBL で 3.2 ± 3.0 U/ml と有意に ($p < 0.01$) 低値を示し, RLNL では 47.8 ± 27.2 U/ml と有意に ($p < 0.01$) 高値を示した (図 9a).

また, PHA 及び OK-432 刺激により, 手術後に IL-2 産生能の出現する症例が 5 例中 3 例にみられた.

考 察

近年, 特定のヒトリンパ球亜群細胞表面に発現される抗原を認識するモノクローナル抗体が開発され, それぞれの亜群を特定しうようになった. 本抗体の臨床応用の 1 つの方向として, 各モノクローナル抗体を蛍光色素で標識し, リンパ球と反応させて, フローサイトメーターによる末梢血リンパ球亜群の解析が広く行われるようになった. この方法は, 迅速かつ再現性に優れ, 免疫不全症¹²⁾や自己免疫疾患¹³⁾をはじめ, 感染症¹⁴⁾や腎移植後の拒絶反応のモニタリング¹⁵⁾などとして臨床面に導入されている. 癌患者においては, T 細胞を中心とする細胞性免疫能が抗腫瘍免疫の主体をなし癌の進行とともにその機能が低下するとされている¹⁶⁾. 著者はリンパ球亜群の分別により, 肺癌患者の抗腫瘍免疫能を検討した.

末梢血 T 細胞 (OKT3 陽性細胞) は, OKT4 陽性の helper/inducer T 細胞と OKT8 陽性の suppressor/cytotoxic T 細胞に大別される. これら T 細胞は

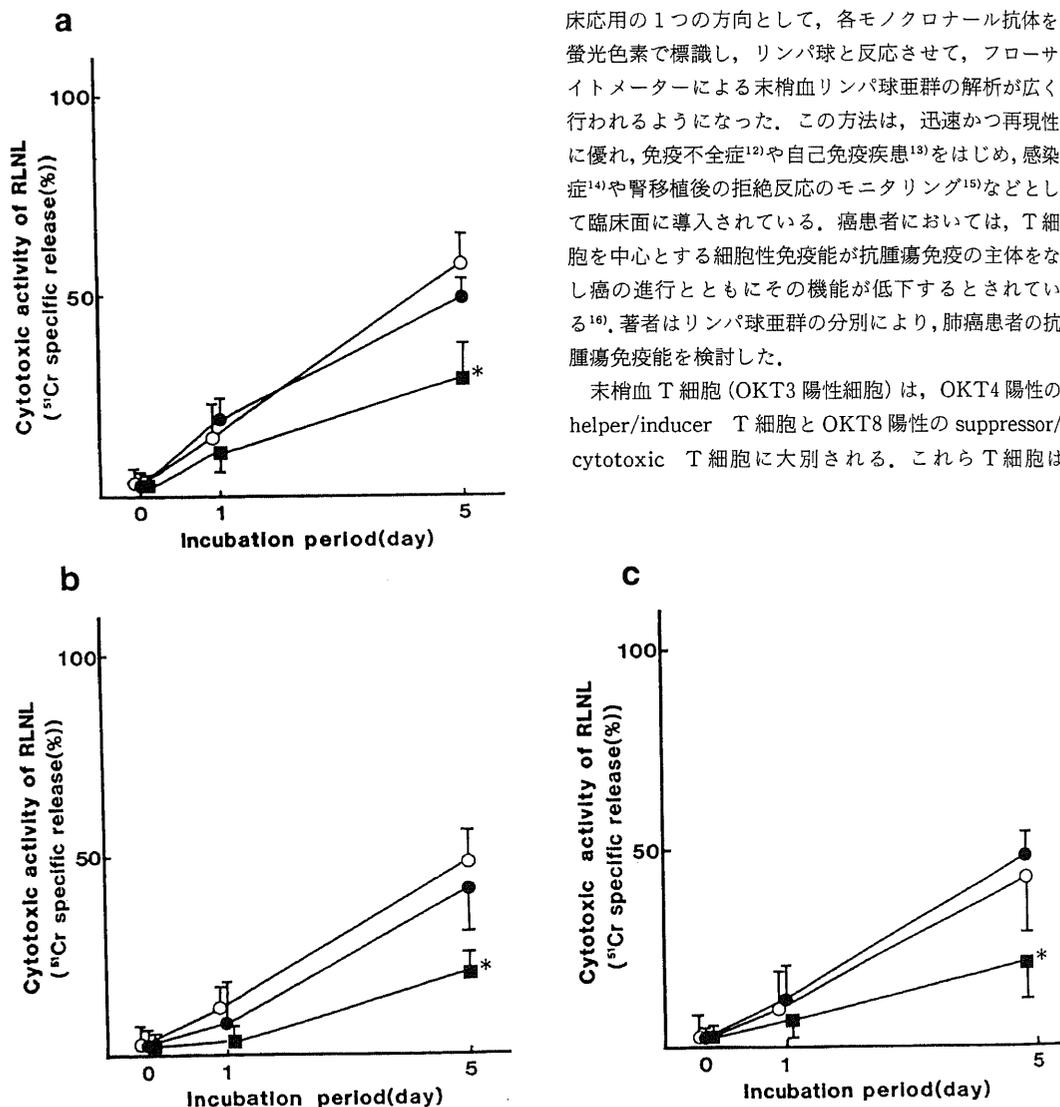


Fig. 6. Changes in cytotoxic activity of RLNL by rIL-2.

The experiment with RLNL (1×10^6 cells/ml) was carried out at the same conditions as in PBL (see Fig. 5). Target cells: a, K-562; b, PC-3; c, PC-10. Each value represents the mean \pm S.D.. ○, control; ●, metastasis (-); ■, metastasis (+). *, $p < 0.05$: significantly different from control.

regulatory 細胞として生体の免疫応答の調節に関与しており、その増減や比率 (T4/T8) の変動が宿主生体の免疫能の指標となりうると考えられている。肺癌患者では、IV期症例において T 細胞自体の減少及び機能面での suppressor 細胞の増加の 2 点より免疫能の低下をきたしていると思われる。消化器癌患者においても非治癒切除に終わった進行例で同様の成績がえられており¹⁷⁾、痛がかなり進行しないかぎり T 細胞亜群は比較的正常に保たれているようである。

一方、NK 細胞は、腫瘍細胞に対する生体の自然抵抗力の要因となっているものである。Takasugi ら¹⁸⁾により *in vitro* における正常ヒトリンパ球の腫瘍細胞に対する傷害性が報告され、まもなく Kiessling ら¹⁹⁾により natural killer (NK) 細胞と命名された。NK 細胞の機能として、発癌の免疫監視機構 (immunological surveillance)²⁰⁾ に対する役割が考えられ、具体的には、1) NK 活性の高いヌードマウスでは、正常マウスと比較して自然発癌率や化学発癌率が低いこと^{21,22)}、2) NK 機能を欠損する Beige マウスは移植腫瘍を受け入れやすく転移も形成しやすいこと²³⁾、3) ヒトにおける NK 細胞の選択的欠損病である Chediak-Higashi

病に悪性腫瘍が多発すること^{24,25)}などの報告があり、生体内における NK 細胞は腫瘍発生の初期に作用してその予防や抑制、転移の防止などに関与している可能性が強く示唆される。

癌患者の NK 活性については、胃癌²⁶⁾や乳癌²⁷⁾、食道癌²⁸⁾などの症例についての報告があり、進行度とともに NK 活性は低下する傾向にあるとされており、肺癌患者でも同様の結果がえられた。このような、担癌状態における NK 活性の低下の原因としては、リンパ球亜群上、NK 細胞は数量的には保たれているが、その機能が低下している、または、NK 活性の発現を抑制する機構が存在する、などが考えられる。担癌生体における suppressor 細胞の出現²⁹⁾や、流血中の soluble immune complex³⁰⁾やプロスタグランディンの存在³¹⁾などの報告もある。また、*in vitro* での NK 活性の測定には、標的細胞として、K-562 細胞などの造血器系の細胞が用いられることが多く、末梢血リンパ球はそのままの状態ではヒトの固型腫瘍細胞にはほとんど傷害性を示さない³²⁾。臨床上に痛と診断できるような状態では NK 細胞の抗腫瘍活性はあまり期待できないと思われる。

担癌生体での低下した NK 活性の増強³³⁾や抗腫瘍活性を持つ細胞の誘導に関して、Grimm ら³⁴⁾が興味あ

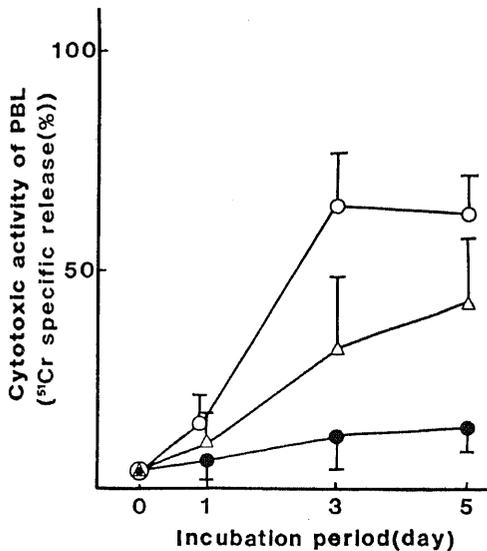


Fig. 7. Augmentation of cytotoxic activity of PBL against PC-3 cells by OK-432.

PBL (1×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and OK-432 and tested for lysis of PC-3 cells at 0, 1, 3 and 5 day of culture period. Tests were performed in ^{51}Cr specific release assay. Each value represents the mean \pm S.D. ●, no addition; △, OK-432 (0.05 KE/ml) added; ○, rIL-2 (20 U/ml) added.

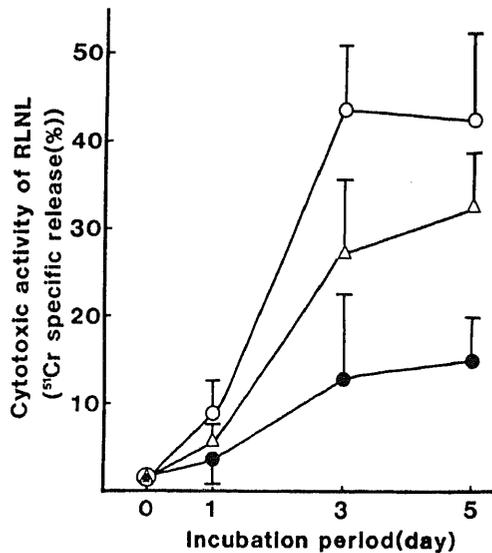


Fig. 8. Augmentation of cytotoxic activity of RLNL against PC-3 cells by OK-432.

The experiment with RLNL (1×10^6 cells/ml) was carried out at the same conditions as in PBL (see Fig. 7). Each value represents the mean \pm S.D. ●, no addition; △, OK-432 (0.05 KE/ml) added; ○, rIL-2 (20 U/ml) added.

るキラー細胞群の存在を報告した。癌患者末梢血リンパ球を IL-2 存在下に 3~4 日間培養すると、自己の固型腫瘍も含めた NK 細胞抵抗性の各種腫瘍細胞を傷害する細胞が誘導された。この細胞は前感作を必要とせず、lymphokine activated killer (LAK) 細胞と命名された。IL-2 は最近抗腫瘍免疫の分野で注目されているリンホカインの 1 つで、Gillis ら³⁹⁾によって機能性 T 細胞を長期継代培養を可能にする T 細胞増殖因子として発見された。その性状は、T 細胞 (OKT4 陽性細胞³⁹⁾) や NK 細胞³⁷⁾ が産生し、分子量 15000 (ヒト) の糖蛋白である。近年の遺伝子工学の進歩により、大腸菌を利用する rIL-2 が容易にえられるようになり、その生物学的活性も証明されている³⁸⁾。

このような LAK 活性を示す前駆細胞としては、T 細胞由来 (ヒトでは OKT3⁺, OKT8⁺, マウスでは Thy1⁺, Lyl1⁻ 2⁺³⁹⁾) とする報告や、NK 細胞由来 (OKT3⁻, Leu7⁻, Leu11⁺)⁴⁰⁾, null cell 由来 (OKT3⁻,

OKT8⁻)⁴¹⁾ とする報告もあり、一定の見解がえられていない。著者の成績では、OKT3⁺, OKT8⁺ の T 細胞と Leu11⁺ の NK 細胞の両者に由来するものと考えられた。

以上のような基礎的事実をもとにして、肺癌患者 PBL の rIL-2 に対する反応性を検討した結果、1) 肺癌患者 PBL は rIL-2 に NK 活性の増強及び LAK 活性の形で十分反応しうること、2) リンパ球亜群上、NK 細胞や LAK 前駆細胞が正常に保持されていることより、肺癌に対する免疫療法における IL-2 の重要性が明らかにされた。

IL-2 を利用する免疫療法としては、IL-2 の生体内への直接投与や、in vitro で IL-2 により誘導された LAK 細胞を IL-2 とともに投与する adoptive immunotherapy⁴²⁾ の可能性が考えられる。しかし、生体内に投与された IL-2 の血中半減期は約 3 分と極めて短く⁴³⁾ IL-2 依存性の強い LAK 細胞の生体内維持が

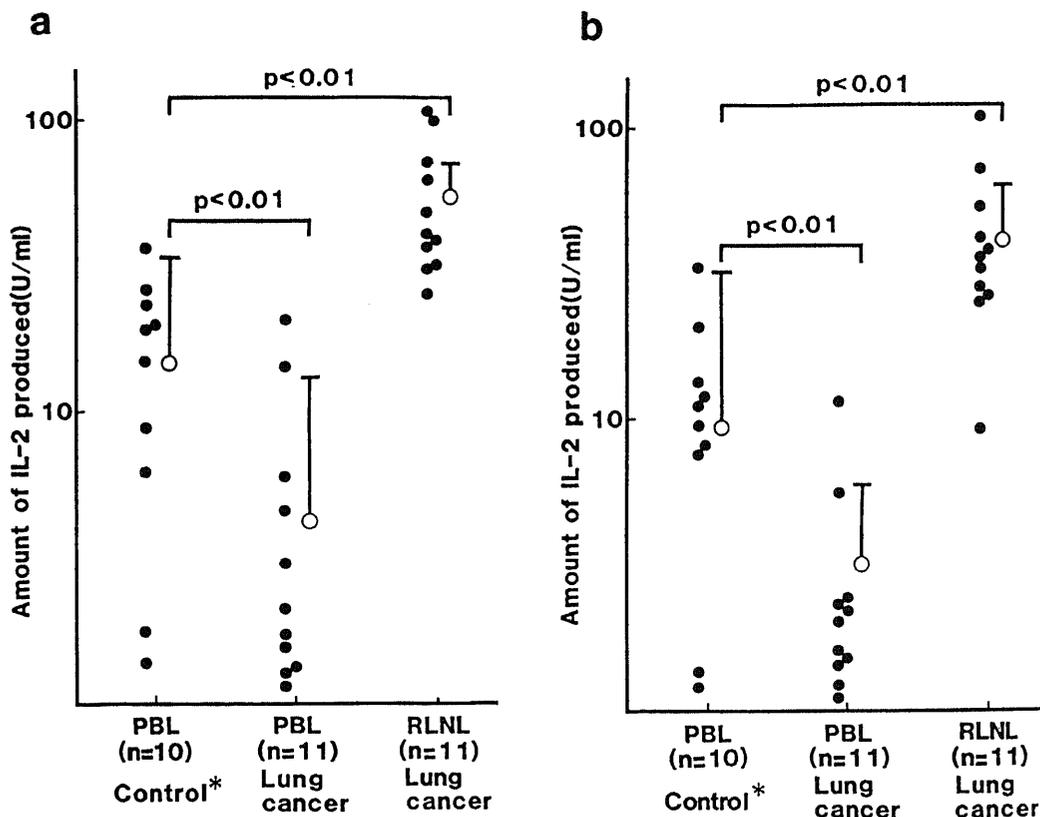


Fig. 9. Production of IL-2 in PBL and RLNL from patients with lung cancer after treatment with PHA or OK-432 in vitro. Lymphocytes (1×10^6 cells/ml) were cultured in the presence of 0.1% PHA (a) or OK-432 (0.05 KE/ml) (b) for 48 hr, and culture supernatants were tested for IL-2 activity. —○—, mean \pm S.D.. *, healthy adults.

困難、などの問題点があり、その投与方法などについて今後検討されるべきである。

外来性の IL-2 投与にこのような問題がある現在、生体内で IL-2 を産生させるような手段を考えるのが最も合理的と考え、肺癌患者 PBL の IL-2 産生能を検討した。一般に、癌患者での IL-2 産生能は低下しているとの報告⁴⁴⁾があり、肺癌においても同様であった。リンパ球亜群上は、肺癌患者において IL-2 産生細胞はほぼ正常に保持されており、この IL-2 産生能の低下の原因としては、術後に IL-2 産生能の回復がみられることより、担癌にもとづく何らかの抑制因子が考えられ、担癌状態に特異的な現象と思われる。術後に IL-2 産生能の回復してくる現象は、IL-2 産生さらには LAK 細胞の誘導作用のある⁴⁹⁾OK-432 療法の有用性を裏付ける所見と考えられる。また、逆に、IL-2 産生能の測定は、OK-432 療法施行時の新しい免疫能の指標となりうるものと思われる。

また、IL-2 は LAK 活性以外に、癌に特異的なキラー T 細胞の誘導にも重要であり、IL-2 産生能と患者の予後の関係について検討することは、今後の課題であろう。しかし、現在、一般に用いられている bioassay による IL-2 定量法では、使用する細胞の状態により測定値に誤差が生じやすいことが知られている。最近、IL-2 に対するモノクロナール抗体が開発された⁴⁶⁾が、これらを用いる radioimmunoassay など、より簡便で正確な測定法の開発が望まれる。

一方、肺癌の予後を左右する因子の一つとして、局所リンパ節転移の問題がある。担癌生体において、局所リンパ節は腫瘍の進展の単なる一経路となるにすぎないのか、あるいは全身転移に対する biological barrier なのかを検討することは、外科手術におけるリンパ節郭清の問題や術前の局所免疫療法の意義を考える上で重要である。このような目的に沿って局所リンパ節の防禦機構を検索した報告では、組織学的形態⁴⁷⁾や PHA 幼若化反応⁴⁸⁾などについての知見がえられている。著者はリンパ節リンパ球亜群の分別、NK 活性、rIL-2 による LAK 活性の誘導、IL-2 産生能などを測定し、局所リンパ節リンパ球の抗腫瘍活性を検討した。

まず、リンパ球亜群については、転移陽性群において、T 細胞自体の減少と suppressor 機能の亢進による免疫能の低下が示唆された。転移のないリンパ節は、ほぼ正常に保たれており、Poppema ら⁴⁹⁾の免疫組織学的所見と同様、OKT4 陽性細胞が優位を占めていた。

NK 細胞についてみると、転移の有無にかかわらず、Leu7、Leu11a 陽性リンパ球ともにまれであり、K-562 を標的細胞とする NK 活性が低値であることを裏付けており、局所リンパ節においては、NK 細胞による抗

腫瘍活性はそのままでは期待できないと思われる。

そこで、rIL-2 添加培養リンパ球の LAK 活性についてみると、転移のない RLNL において、rIL-2 に反応した LAK 活性の形で細胞傷害能が温存されていると思われた。しかし、PBL とは異なり、培養 1 日目の NK 活性の増強がみられなかったのは、NK 細胞自体がほとんど RLNL に存在しないためと思われる。また、RLNL の IL-2 産生能は PBL の 10~100 倍と高値であり、転移のない局所リンパ節においては、OK-432 などの外来刺激により IL-2 を産生し、それに LAK 前駆細胞が反応して LAK 活性が誘導され、その結果、抗腫瘍活性が発揮されるものと思われる。

従って、術前に何らかの方法で局所リンパ節の抗腫瘍活性を高めることは、術前や術中の腫瘍細胞の全身への撒布を防禦することになり、リンパ節転移のない早期癌の症例での局所リンパ節を温存することの妥当性が見出されるであろう。その方法としては、経気道的あるいは経気管支動脈的に IL-2 や OK-432 を投与することが考えられる。さらに、経気管支動脈的に注入されたリンパ球は腫瘍近傍や局所リンパ節に集積するとの報告⁵⁰⁾もあることから、in vitro で誘導した LAK 細胞と IL-2 の併用による adoptive immunotherapy の可能性も考えられ、今後の課題としたい。

結 論

肺癌患者の PBL 及び RLNL の抗腫瘍活性を検討する目的で、両者におけるリンパ球亜群の分別、NK 活性、rIL-2 による LAK 活性の誘導及び IL-2 産生能などについて検討した。また、BRM の一つとして、OK-432 による細胞傷害活性の誘導と IL-2 産生能の増強の有無を検討し、以下の成績が得られた。

1) リンパ球亜群分別試験では、I~III 期の PBL 及び転移のない RLNL では、リンパ球亜群の分布はほぼ正常に保たれていた。IV 期の PBL 及び転移陽性の RLNL で、OKT3 及び OKT4 陽性細胞の減少、OKT8 陽性細胞の増加、T4/T8 値の低下があり、細胞性免疫の低下がみられた。

2) NK 活性は、PBL で病期の進行とともに低下していた。RLNL では転移の有無にかかわらず、きわめて微弱であった。

3) PBL を rIL-2 存在下で培養すると、NK 活性の増強及び LAK 活性による著明な腫瘍細胞傷害活性をもつ細胞が誘導できた。転移のない RLNL でも rIL-2 による LAK 活性が誘導でき、肺癌患者の PBL 及び転移のない RLNL の rIL-2 に対する反応性が明らかとなった。また、BRM の一つである OK-432 により PBL、RLNL ともに細胞傷害活性の増強がみられた。

4) LAK 活性を示す前駆細胞としては, T 細胞 (OKT3⁺, OKT8⁺) と NK 細胞の両者が考えられ, 肺癌患者の PBL 及び転移のない RLNL で前駆細胞がほぼ正常に保持されていた。

5) PBL の PHA や OK-432 刺激による IL-2 産生は, 術前はほとんど検出されなかったが, 術後に IL-2 産生能の回復する症例がみられた。RLNL による IL-2 産生は, PBL の 10~100 倍と高値を示した。

以上より, 肺癌患者に対する免疫療法における IL-2 の重要性が明らかになり, *in vitro* で誘導された LAK 細胞と IL-2 の併用による adoptive immunotherapy や, IL-2 誘起能のある OK-432 療法の有用性が示唆された。また, 転移のない RLNL での IL-2 反応性や IL-2 産生能の結果より, 悪性腫瘍に対する biological barrier としての機能が温存されているものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました恩師岩喬教授に心から謝意を表します。また直接御指導, 御鞭撻を賜りました本学がん研究所化学療法部越村三郎教授, 免疫生物部坂井俊之助助教授, 第 1 外科渡辺洋宇助教授に深謝いたします。また, 本研究の遂行に御協力頂いた本学小児科宮脇利男講師をはじめとする小児科免疫グループの諸先生方, 金沢医科大学微生物学教室村山次哉博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 酒井秀造: 肺癌患者における細胞性免疫能の検討—臨床病期, 治療, 予後との関係について—。肺癌, 20, 251-259 (1980)。
- 2) 渡辺洋宇・佐藤日出夫・飯田茂穂・山田哲司・小林弘明・木元春生・網村幸夫・市橋 匠・清水淳三・橋爪泰夫・岩 喬: 肺癌 (非小細胞癌) に対する術後化学療法の意義。癌と化学療法, 12, 21-35 (1985)。
- 3) Watanabe, Y. & Iwa, T.: Clinical value of immunotherapy for lung cancer by the streptococcal preparation, OK-432. Cancer, 53, 248-253 (1984)。
- 4) 小川純一: 末梢血リンパ球よりみた肺癌所属リンパ節リンパ球の免疫応答能。肺癌, 19, 149-155 (1979)。
- 5) 市村 修・鈴木清吉・斉藤元男・佐藤統夫・菅原豊・石田名香雄: OK-432 によるマウス interleukin 1 および interleukin 2 の産生増強作用。医学のあゆみ, 127, 296-298 (1983)。
- 6) 羽室淳爾: インターロイキン 2, γ-インターフェロン。Immunohaematology, 7, 289-295 (1985)。
- 7) Taniguchi, R., Matsui, H., Fujita, R., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. & Hamuro, J.: Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. Nature, 302, 305-310 (1983)。
- 8) TNM Classification of Malignant Tumors, 3rd Ed., 7-16 and 41-45, UICC, Geneva, 1978。
- 9) 辻 公美: 比重遠心法によるリンパ球の分離 (Conray-Ficoll 法)。免疫実験操作法 A, 443-446, 日本免疫学会編, 金沢, 1975。
- 10) 上棚直人: モノクローナル抗体 (OKT4, OKT8) により識別されるヒト T 細胞サブセットによる免疫グロブリン産生の調節—Nocardia Water Soluble Mitogen (NWSM) 系と Pokeweed Mitogen (PWM) 系における検討。十全医会誌, 92, 136-146 (1982)。
- 11) Gillis, S., Fern, M. M., Ou, W. & Smith, K. A.: T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. J. Immunol., 120, 2027-2032 (1978)。
- 12) Reinherz, E. L., Geha, R., Wohl, M. E., Morimoto, C., Rosen, F. S. & Schlossman, S. F.: Immunodeficiency associated with loss of T4⁺ inducer T-cell function. N. Engl. J. Med., 304, 811-816 (1981)。
- 13) Morimoto, C., Reinhertz, K. L., Schlossman, S. F., Schur, P. H., Mills, J. A. & Steinberg, A. D.: Alternations in immunoregulatory T cell subsets in active systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest., 66, 1171-1174 (1980)。
- 14) Carney, W. P., Rubin, R. H., Hoffman, R. A., Hansen, W. P., Healey, K. & Hirsch, M. S.: Analysis of T lymphocyte subsets in cytomegalovirus mononucleosis. J. Immunol., 126, 2114-2116 (1981)。
- 15) Cosimi, A. B., Clovin, R., Burton, R., Rubin, R., Goldsten, G., Kung, P. C., Hansen, W. P., Delmonico, F.L. & Russel, P. S.: Use of monoclonal antibodies to T cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. N. Engl. J. Med., 305, 308-314 (1981)。
- 16) Uchida, A. & Hoshino, T.: Clinical studies on cell-mediated immunity in patients with malignant disease: I. Effect of immunotherapy with OK-432 on lymphocyte subpopulation and phyto-mitogen responsiveness *in vitro*. Cancer, 45, 476-483 (1980)。

- 17) 橋爪泰夫・山田哲司・笠原善郎・川浦幸光・岩橋, 中川正昭・瀬川安雄: 消化器癌患者の末梢血および所属リンパ節リンパ球サブセットの検討. 医学のあゆみ, 135, 315-316 (1985).
- 18) Takasugi, M., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I.: Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res.*, 33, 2898-2902 (1973).
- 19) Kiessling, R., Kleine, E. & Wigzell, H.: "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, 5, 112-117 (1975).
- 20) Burnet, F. M.: Immunological surveillance, Pergamon Press, Sydney, 1970.
- 21) Stutman, O.: Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*, 183, 534-536 (1974).
- 22) Rygaard, J. & Povlsen, C. O.: The nude mouse vs. the hypothesis of immunological surveillance. *Transplant. Rev.*, 28, 43-61 (1976).
- 23) Gorelik, E., Wiltout, R. H., Okumura, K., Habu, S. & Herberman, R. B.: Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer*, 30, 107-112 (1982).
- 24) Dent, P. B., Fish, L. A., White, J. G. & Good, R. A.: Chediak-Higashi syndrome. Observations on the nature of the associated malignancy. *Lab. Invest.*, 15, 1634-1642 (1966).
- 25) Haliotis, T., Roder, J., Klein, M., Ortaldo, J., Fauci, A. S. & Herberman, R. B.: Chediak-Higashi gene in humans. I. Impairment of natural-killer function. *J. Exp. Med.*, 151, 1039-1048 (1980).
- 26) 大谷洋一: 癌患者の Natural killer (NK) 細胞活性に関する臨床的研究. 日臨外会誌, 45, 569-583 (1984).
- 27) 秋元 実・石井 淳・西平哲郎・阿部力哉・葛西森夫: ヒト Natural killer 活性の分析と乳癌患者における変動. 臨床免疫, 13, 593-602 (1981).
- 28) 辻 利男・阿保七三郎・工藤 保・橋本正治・川村義宏: 食道癌患者における Natural killer 活性値の臨床的意義. 日消外会誌, 18, 8-14 (1985).
- 29) Savary, C. A. & Lotzova, E.: Suppression of natural killer cell cytotoxicity by splenocytes from corynebacterium parvum-injected, bone marrow-tolerant, and infant mice. *J. Immunol.*, 120, 239-243 (1978).
- 30) 西條長宏: 人末梢血リンパ球 NK 活性の分析と原発性肺癌, 転移性肺腫瘍における変動. 日癌治会誌, 15, 362-374 (1980).
- 31) 湊 長博: NK 活性発現に影響する諸因子. 臨床免疫, 16, 382-391 (1984).
- 32) Vanky, F. T., Argov, S. A., Einhorn, S. A. & Klein, E.: Role of alloantigens in natural killing. Allogenic but not autologous tumor biopsy cells are sensitive for interferon-induced cytotoxicity of human blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 151, 1151-1165 (1980).
- 33) Henney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E. & Gillis, S.: Interleukin 2 augments natural killer cell activity. *Nature*, 291, 335-338 (1981).
- 34) Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z. & Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 155, 1823-1841 (1982).
- 35) Gillis, S. & Smith, K. A.: Long term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. *Nature*, 268, 154-156 (1977).
- 36) Meuer, S. C., Hussey, R. E., Penta, A. C., Fitzgerald, K. A., Stadler, B. M., Schlossman, S. F. & Reinherz, E. L.: Cellular origin of interleukin 2 (IL 2) in man: Evidence for stimulus-restricted IL 2 production by T4⁺ and T8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 129, 1076-1079 (1982).
- 37) Kasahara, T., Djeu, J. Y., Dougherty, S. F. & Oppenheim, J. J.: Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokines: Interleukin 2, interferon, and colony stimulating factor. *J. Immunol.*, 131, 2379-2385 (1983).
- 38) Rosenberg, S. A., Grimm, E. A., McGrogan, M., Doyle, M., Kawasaki, E., Koths, K. & Mark, D. F.: Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science*, 223, 1412-1415 (1984).
- 39) Rosenstein, M., Yron, I., Kaufmann, Y. & Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cells: Lysis of fresh syngeneic natural killer-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin 2. *Cancer Res.*, 44, 1946-1953 (1984).
- 40) Itoh, K., Tilden, A. B., Kumagai, K. & Balch,

- C. M.: Leu11⁺ lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL 2)-induced activated killer (AK) cells. *J. Immunol.*, **134**, 802-807(1985).
- 41) Grimm, E. A., Ramsey, K. M., Mazumder, A., Wilson, D. J., Djeu, J. Y. & Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes, and natural killer cells. *J. Exp. Med.*, **157**, 884-897 (1983).
- 42) Donohue, J. H., Lotze, M. Y., Robb, R. J., Rosenstein, M., Brazier, R. M., Jaffe, E. S. & Rosenberg, S. A.: In vivo administration of purified Jurkat-derived interleukin 2 in mice. *Cancer Res.*, **44**, 1380-1386 (1984).
- 43) Donohue, J. H. & Rosenberg, S. A.: The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *J. Immunol.*, **130**, 2203-2208 (1983).
- 44) Rey, A., Klein, B., Zagury, D., Thierry, C. & Serrou, B.: Diminished interleukin-2 activity production in cancer patients bearing solid tumors and its relationship with natural killer cells. *Immunol. Letters*, **6**, 175-178 (1983).
- 45) 石田名香雄・斉藤元男・南條正季: OK-432 の制癌性-LAK 細胞の誘導. 癌と化学療法, **11**, 2681-2690 (1984).
- 46) Sato, H., Natsume-Sakai, S., Miyawaki, T., Taga, K., Hatano, M. & Taniguchi, N.: Monoclonal antibody which is specifying the functional portion of human IL-2 molecule. *J. Biol. Resp. Modif.*, in press.
- 47) Kaufmann, M., Wirth, K., Scheurer, J., Zimmermann, A., Lusciati, P. & Stejerswarg, J.: Immunomorphological lymph node changes in patients with operable bronchogenic squamous cell carcinoma. *Cancer*, **39**, 2371-2377 (1977).
- 48) 網村幸夫: 肺癌患者の細胞性免疫能に関する研究-特に病期, 治療, 予後との相関について-. 十全医会誌, **92**, 92-106 (1982).
- 49) Poppema, S., Bhan, A. K., Reinherz, E. L., McCluskey, R. T. & Schlossman, S. F.: Distribution of T cell subsets in human lymph nodes. *J. Exp. Med.*, **153**, 30-41 (1981).
- 50) 木村秀樹・宇野公一・藤沢武彦・山口 豊: リンパ球による腫瘍シンチグラム-^{99m}Tc にてラベルしたリンパ球を用いて-. 肺癌, **21**, 187-197 (1981).

Studies on the Induction of Tumoricidal Activity of Peripheral Blood and Regional Lymphnode Lymphocytes in Patients with Lung Cancer Yasuo Hashizume, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - *J. Jusen Med. Soc.*, **95**, 251-267 (1986)

Key words: lung cancer, interleukin 2, OK-432, lymphokine activated killer cell

Abstract

Functional cytotoxic activities of peripheral blood lymphocytes (PBL) and regional lymphnode lymphocytes (RLNL) in lung cancer patients were studied using various immune parameters. As parameters, identification of lymphocyte subsets using monoclonal antibodies, natural killer (NK) activity, induction of lymphokine activated killer (LAK) activity by recombinant interleukin 2 (rIL-2) or OK-432, and production of IL-2 were evaluated.

In analysis of lymphocyte subsets of PBL, OKT3-positive cells (peripheral pan-T cell) and OKT4-positive cells (helper/ inducer T cell) decreased and OKT8-positive cells (suppressor/ cytotoxic T cell) increased, resulting in decrease of T4/ T8 value in stage IV patients. The decrease in NK activity was observed in relation to the progressing stage of cancer. When PBL was incubated with rIL-2 or OK-432 for 3-5 days, the cytotoxic activities of them to PC-3 and PC-10 cells (NK-resistant human cell lines) were enhanced as LAK activities. Ability of PBL to produce IL-2 was extremely low before operation of lung cancer, but it was recovered in some

cases after the operation.

In analysis of lymphocyte subsets of RLNL with metastasis of lung cancer, OKT3-positive cells and OKT4-positive cells decreased and OKT8-positive cells increased, resulting in decrease of T4/T8 value as in the case of PBL. OKT4-positive cells of RLNL without metastasis was significantly increased in T cell subsets. NK activity of RLNL was not detected, but LAK activity was clearly induced by rIL-2 or OK-432. Ability of IL-2 production in RLNL was 10 to 100 times higher than that of PBL so far examined.

From these results, it is suggested that immunotherapy using rIL-2 and OK-432 is useful for lung cancer, and that regional lymphnodes play a role as a biological barrier against systemic spread of cancer cells.